
Carotinoidbiosynthese in
Flavobacterium spec P99-3

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Nina Rählert
aus Offenbach a.M.

Frankfurt 2007

vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Rüdiger Wittig
Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Sandmann
Prof. Dr. Wolfgang Brüggemann

Datum der Disputation: 23.05.2007

„Du mußt tiefgründiger forschen.

Nütze die Zeit.“

Robert Arthur

INHALTSVERZEINIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Funktionen von Carotinoiden	1
1.2	Struktur und Biosynthese von Carotinoiden	3
1.3	<i>Flavobacterium spec</i> P99-3	5
1.4	Hypothetischer Biosyntheseweg von Myxol in <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	8
1.5	Ziel dieser Arbeit	9
2.	MATERIAL & METHODEN	10
2.1	Verwendete Bakterienstämme	10
2.1.1	<i>Flavobacterium</i> -Stämme	10
2.1.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	10
2.2	Anzucht von Bakterien	10
2.2.1	LB-Medium	10
2.2.2	YTG-Medium	11
2.2.3	SOB/SOC-Medium	11
2.2.4	MB-Medium	11
2.2.5	Seesalz-Medium	11
2.3	Antibiotika	11
2.4	Vektoren	12
2.4.1	pUC-Vektor	12
2.4.2	pPQE-Vektor	12
2.4.3	pMonT-Vektor	12
2.4.4	SuperCos1 (Stratagene)	12
2.4.5	pWEB Cosmidvektor (Epicentre)	13
2.5	Plasmide	13
2.6	Anzuchsbedingungen für Bakterienkulturen	14
2.6.1	Anzucht von <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	14
2.6.2	Anzucht von <i>E. coli</i> zur Plasmid-DNA-Isolation	14
2.6.3	Anzucht von <i>E. coli</i> zur Proteinexpression	15
2.6.4	Anzucht von <i>E. coli</i> zur Carotinoidproduktion	15
2.7	Lagerung von Bakterienkulturen	15
2.8	DNA-Isolation aus <i>Escherichia coli</i>	15

2.8.1	Schnelle Plasmid-DNA-Isolation aus <i>E. coli</i>	15
2.8.2	E.Z.N.A Plasmid-Miniprep Kit I (peqlab)	16
2.8.3	E.Z.N.A Plasmid-Miniprep Kit II (peqlab)	16
2.8.4	DNA-Plasmid-Isolation von Expressionsbibliotheken mit dem Tip 100-Kit (quiagen)	16
2.8.5	Cosmid-DNA-Isolation aus <i>E. coli</i>	17
2.9	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	17
2.9.1	Herstellung von CaCl ₂ -kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	17
2.9.2	Herstellung von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen	18
2.10	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	18
2.10.1	Transformation von CaCl ₂ -kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	18
2.10.2	Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen	18
2.11	Sequenzierung von Plasmid-DNA	19
2.12	Auswertung von Sequenzdaten	20
2.13	Amplifikation von Carotinoidgenen von <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	20
2.14	PCR mit degenerierten Primern	21
2.15	Reinigung von PCR-Amplifikaten	22
2.16	Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Amplifikaten	22
2.16.1	Restriktion von DNA zur qualitativen Überprüfung	22
2.16.2	Quantitative Restriktion von DNA zur Klonierung	22
2.17	Agarosegel zur Auftrennung von DNA	23
2.18	DNA-Marker für Agarosegele	23
2.18.1	λ-Eco/Hind-Marker	23
2.18.2	1 kb ladder-Marker (Genecraft)	23
2.19	Isolation von aufgetrennter DNA aus Agarosegelen	24
2.20	Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.21	Erstellung von Cosmid-Bibliotheken	24
2.21.1	Cosmid-Bibliothek mit dem SuperCos1-Vector und Gigapack III Gold Kit (Stratagene)	24
2.21.2	Präparation des Cosmidvektors SuperCos1 (Stratagene)	25
2.21.3	Cosmid-Bibliothek mit dem pWEB Cosmid Cloning Kit (Epicentre)	27
2.22	Erstellung von Expressions-Bibliotheken	29
2.22.1	Screening der Expressions-Bibliothek	29
2.23	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	30

2.24	Fraktionierende Ammoniumsulfat-Fällung	31
2.25	Metallionen-Affinitätschromatographie	32
2.26	Carotinoideextraktion aus <i>E. coli</i> -Kulturen	32
2.26.1	Extraktion von 50 ml Flüssigkulturen mit Methanol	32
2.26.2	Extraktion von 50 ml Flüssigkulturen mit Aceton	32
2.26.3	Extraktion von <i>in vitro</i> -Tests	33
2.27	Enzym-Aktivitätstest <i>in vitro</i>	33
2.28	Analyse der Carotinoidezusammensetzung mittels HPLC	34
2.29	Identifizierung von Carotinoiden	35
2.30	Identifizierung von sekundären Hydroxygruppen	36
2.31	Herstellung von Carotinoide-Mutanten von <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	36
2.31.1	Physikalische Mutagenese mit UV-Bestrahlung	36
2.31.2	Chemische Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS)	37
2.32	Durchführung der UV-Schutzversuche	38
3.	ERGEBNISSE	39
3.1	Herstellung der Cosmidbibliothek von <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	39
3.1.1	Cosmid-Bibliothek mit dem SuperCos1-Vektor von Stratagene	39
3.1.2	Cosmid-Bibliothek mit dem pWEB-Kit von epicentre	40
3.2	PCR mit degenerierten Primern	40
3.3	Herstellung der Expressionsbibliothek von <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	41
3.4	Sequenzierung von Klon2 der Expressionsbibliothek	45
3.5	orfI1 und orfI2	48
3.6	orfY	55
3.7	orfA	58
3.8	Expression und Enzymologie von CrtA ₉₉ aus <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	69
3.9	orfAco, orfMoxR und orfIY	72
3.10	UV-Schutzversuche von Myxol in <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	73
4.	DISKUSSION	80
4.1	Cosmid-Bibliothek aus <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	80
4.2	PCR mit degenerierten Primern	81
4.3	Expressionsbibliothek aus <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	81
4.4	Carotinoidegencluster aus <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	82

4.5	<i>orf11</i> und <i>orf12</i> : Phytoen Desaturase oder 3,4-Desaturase?	83
4.6	Lycopin-Monozyklase CrtYm	85
4.7	<i>orfA</i> : Verantwortlich für die Hydroxygruppe am C2'-Atom?	87
4.8	Neuartige Carotinoide durch Genkombination in <i>E. coli</i>	90
4.9	1,2-Hydratase in <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	93
4.10	β -Carotin 3-Hydroxylase CrtZ	93
4.11	UV-Schutzversuche von Myxol	94
5.	ZUSAMMENFASSUNG	97
6.	LITERATUR	99
7.	LEBENS LAUF	109

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1:	Nomenklatur bei Carotinoiden am Beispiel von Lycopin und Myxol	3
Abb. 1-2:	Einzelkolonien von <i>Flavobacterium spec.</i> P99-3	6
Abb. 1-3:	Schwamm <i>Homaxinella spec</i>	6
Abb. 1-4:	Phylogenetischer Stammbaum der 16-S-Sequenz von <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	7
Abb. 1-5:	Hypothetischer Biosyntheseweg von Myxol aufgrund der Struktur des Myxolmoleküls	9
Abb. 2-1:	Vergleich der Aminosäuresequenzen der Phytoendesaturase CrtI aus den vier Organismen <i>Flavobacterium spec</i> R1534, <i>Agrobacterium aurantiacum</i> , <i>Erwinia uredovora</i> und <i>Erwinia herbicola</i>	21
Abb. 2-2:	Degenerierte Primer zu Amplifikation der Phytoendesaturase von <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	21
Abb. 2-3:	Schematische Darstellung der Oxidation einer sekundären Hydroxygruppe am C2-Atom durch p-Chloranil zu einer Ketogruppe	36
Abb. 2-4:	Strukturformel von Ethylmethansulfonat (EMS)	37
Abb. 3-1:	PCR mit den degenerierten Primern P99crtIstart und P99crtIend aufgetrennt über ein 1 % Agarosegel	39
Abb. 3-2:	Partieller Verdau der genomischen DNA mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen an <i>Sau3AI</i>	41
Abb. 3-3:	Verdau der Expressions-Bibliothek mit <i>PvuII</i> aufgetrennt über ein 1% Agarosegel	42
Abb. 3-4:	HPLC-Analyse von pUCK2 komplementiert in einem Lycopin-Produzenten	43
Abb. 3-5:	Restriktion von pUC8K2 mit verschiedenen Restriktionsenzymen	44
Abb. 3-6:	Schematische Darstellung der Subklonierung von pUCK2 über eine Restriktion mit <i>BamHI</i> in die drei Subklone pUCK4, pBSKK5 und pBSKK6	45
Abb. 3-7:	Hypothetisches Carotinoid-Gencluster von <i>Flavobacterium spec</i> P99-3	47
Abb. 3-8:	Phylogenetischer Stammbaum von ORFI1 und ORFI2	48
Abb. 3-9:	Elutionsprofil der HPLC Analyse der Komplementation von pUC18orfI1 in einem Hydroxyneurosporin-Hintergrund	49

Abb. 3-10:	Elutionsprofil der HPLC Analyse (C18-Säule) der Komplementation von pUC18crtD ₉₉ in einem Hydroxylycopin-Hintergrund	51
Abb. 3-11:	Elutionsprofil der HPLC Analyse der Komplementation von pUC18crtD ₉₉ in einem Hydroxy- γ -Carotin-Hintergrund	52
Abb. 3-12:	Phylogenetischer Stammbaum der Aminosäuresequenz von ORFY und Lycopin Zyklasten aus verschiedenen Bakterien	55
Abb. 3-13:	Elutionsprofil der HPLC Analyse (C18-Säule) der Komplementation von pPQE31orfY in einem Lycopin Hintergrund	55
Abb. 3-14:	Elutionsprofil der HPLC Analyse der Komplementation von pPQEcrtYm mit Monohydroxylycopin	56
Abb. 3-15:	Phylogenetischer Stammbaum von ORFA	57
Abb. 3-16:	Sequenzvergleich von ORFA mit den Monooxygenasen aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , <i>Rhodobacter capsulatus</i> und <i>Rhodovulum sulphidophilum</i>	58
Abb. 3-17:	Die Monooxygenase CrtA aus <i>Rubrivivax gelatinosus</i> fügt im Biosyntheseweg von Demethylsphaeroidenon und 1'-Hydroxydemethylsphaeroidenon eine Ketogruppe am C2 ein	59
Abb. 3-18:	Schematische Darstellung der Substrate und Produkte durch den Umsatz von ORFA auf DMS-Basis und deren Identifikation durch Umsatz mit p-Chloranil	60
Abb. 3-19:	Elutionsprofil der HPLC Analyse der Komplementation von pPQE30orfA mit DMS	61
Abb. 3-20:	Schematische Darstellung der Substrate und Produkte durch den Umsatz von ORFA auf Lycopin-Basis und deren Identifikation durch Umsatz mit p-Chloranil	62
Abb. 3-21:	Elutionsprofil der HPLC Analyse der Komplementation von pPQE30orfA mit 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin	63
Abb. 3-22:	Elutionsprofil der HPLC Analyse der Komplementation von pPQE30orfA mit 1'-Hydroxytorulin, aufgetrennt über die C18-Säule	65
Abb. 3-23:	Schematische Darstellung der Substrate und Produkte durch den Umsatz von ORFA auf γ -Carotin-Basis und deren Identifikation durch Umsatz mit p-Chloranil	66

Abb. 3-24:	Elutionsprofil der HPLC Analyse der Komplementation von pPQE30orfA mit 1',3-Dihydroxytorulin, aufgetrennt über die Hypersil-Säule bei 20 °C	67
Abb. 3-25:	Expression von CrtA ₉₉ im <i>E. coli</i> -Stamm JM101	69
Abb. 3-26:	Anreicherung von CrtA ₉₉ mittels Ammoniumsulfat-Fällung und Metallionen-Affinitäts-Chromatographie	70
Abb. 3-27:	Überprüfung der Carotinoid-Zusammensetzung des Wildtyps <i>Flavobacterium spec</i> P99-3 und den Carotinoidmutanten EMS7 und M17	73
Abb. 3-28:	UV-Resistenz von <i>Flavobacterium spec</i> P99-3 und den Carotinoid-Mutanten M11, M17 und EMS7	74
Abb. 3-29:	UV-Toleranz von Carotinoid-produzierenden <i>E. coli</i> -Transformanden	75
Abb. 3-30:	Carotinoidzusammensetzung der <i>E. coli</i> -Transformanden für die UV-Schutzversuche	77
Abb. 3-31:	Überlebensrate von <i>E. coli</i> -Transformanden in Prozent nach UV-Licht-Bestrahlung	78
Abb. 4-1:	Vergleich der Carotinoidgencluster von <i>Flavobacterium spec</i> P99-3, <i>Erwinia uredovora</i> , <i>Flavobacterium spec</i> R1534 (<i>Paracoccus zeaxanthinus</i>) und <i>Agrobacterium aurantium</i>	82
Abb. 4-2:	Phylogenetischer Stammbaum der Aminosäuresequenzen verschiedener bakterieller Lycopin Zyklasten	86
Abb. 4-3:	Möglicher Reaktionsmechanismus von CrtA ₉₉ bei Bildung der Hydroxygruppe am C2'-Atom mit molekularem Sauerstoff	89
Abb. 4-4:	Neue in <i>Escherichia coli</i> synthetisierte Carotinoide dieser Arbeit	91
Abb. 4-5:	Phylogenetischer Stammbaum der Aminosäuresequenzen verschiedener β -Carotin Hydroxylasen aus Bakterien (CrtZ) und Cyanobakterien (CrtR)	93
Abb. 4-6:	Mögliche Einlagerung von Myxol, 1',2'-Dihydroxytorulin und Lycopin in eine Doppellipidschicht	95

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1:	Verwendete <i>Flavobacterium</i> -Stämme und deren Hauptcarotinoide	10
Tabelle 2-2:	Verwendete Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentrationen in Medien	11
Tabelle 2-3:	Zusammenfassung der Expressionskonstrukte zur Carotinoidsynthese	13
Tabelle 2-4:	Primer die für Sequenzierungen verwendet wurden	19
Tabelle 2-5:	Primer zur Amplifikation von ORFs aus dem isolierten Gencluster von <i>F. spec</i> P99-3	20
Tabelle 2-6:	Komplementationstransformanden zum Screening der Expressions-Bibliothek	30
Tabelle 2-7:	Zusammensetzung eines 17,5 % SDS-Gels nach Laemmli	30
Tabelle 2-8:	Verwendete Carotinoidstandards zur Identifikation von Carotinoiden	35
Tabelle 3-1:	Verwendete <i>E. coli</i> -Transformanden zur Komplementation der Expressions-Bibliothek	42
Tabelle 3-2:	Ähnliche Phytoen Desaturasen zu den Sequenzdaten von K6.rev	46
Tabelle 3-3:	Relative Umsatzraten hydroxylierter Carotinoide der 3,4-Desaturasen aus <i>Flavobacterium spec</i> P99-3 und <i>Rubrivivax gelatinosus</i> in einem γ -Carotin-Hintergrund.	54
Tabelle 3-4:	Vergleich der gebildeten Carotinoide durch ORFA in LB- und YTG-Medium	65
Tabelle 3-5:	Carotinoid-produzierende <i>E. coli</i> -Transformanden für die UV-Versuchsreihe	75

ABKÜRZUNGEN

Abs.max.	Absorptionsmaxima	mM	Millimolar
amp	Ampicillin	MCS	Multiple Klonierungsstelle
APS	Ammoniumpersulfat	min	Minute
ATP	Adenosintri-phosphat	mg	Milligramm
bp	Basenpaare	ml	Milliliter
cfu	Kolonien bildende Einheit	MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
cm	Chloramphenicol		
d	Tag	MPa	Megapascal
DMS	Demethylsphaeroiden	MW	Molekulargewicht
DNA	Desoxyribonukleinsäure	µg	Mikrogramm
dNTP	Deoxyribonukleotid-Mix	µl	Mikroliter
DTT	Dithioretiol	nm	Nanometer
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure	ORF	offenes Leseraster
FPP	Farnesylpyrophosphat	OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat	PCR	Polymerasekettenreaktion
°C	Grad Celsius	RT	Raumtemperatur
g	Gramm	Rt	Retentionszeit
h	Stunde	SDS	Natriumdodecylsulfat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	TCA	Trichloressigsäure
IPP	Isopentenylpyrophosphat	tet	Tetracyclin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	Upm	Umdrehungen pro Minute
kan	Kanamycin	U	Einheiten
kb	Kilobasen	ÜN	über Nacht
kDa	Kilo-Dalton	V	Volt
LB	Luria Bertani		
M	Molar		

1. EINLEITUNG

1.1 Funktionen von Carotinoiden

Carotinoide sind Pigmente des Terpenoid-Stoffwechsels, die meist einen C40-Grundkörper besitzen und, abhängig von ihrer Struktur, Licht der Wellenlänge von ca. 400 - 500 nm absorbieren. Mehr als 600 Carotinoide wurden aus natürlichen Ressourcen isoliert (Straub, 1987). Sie kommen als farbgebende Komponente in Früchten, Wurzeln und Blüten bei Pflanzen vor (Goodwin, 1980). Bei Tieren, die Carotinoide über die Nahrung aufnehmen müssen, sind sie für die Färbung von Schuppen (Goldfisch) oder Federn (Flamingo) genauso verantwortlich wie für die Färbung des Lachsflisches oder Eigelbes (Olson & Krinsky, 1995). Neben Pflanzen synthetisieren auch Algen, photosynthetisch aktive und nicht photosynthetisch aktive Bakterien und einige Pilze Carotinoide. Marine Schwämme erhalten ihre Färbung ebenfalls durch Carotinoide, die von den mit ihnen symbiotisch lebenden photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Bakterien stammen (Matsuno, 2001).

Als Copigmente der Photosynthese absorbieren Carotinoide violette und blau bis blaugrüne Strahlungsanteile und ergänzen in der Thylakoidmembran die Absorption des Chlorophylls (Mathis & Schenk, 1982). Carotinoide können Zellen vor zu starker UV- und sichtbarer kurzwelliger Strahlung schützen (Luckner, 1990). Angeregte Moleküle können in der Zelle mit lebenswichtigen Komponenten reagieren und diese zerstören. Carotinoide sind in der Lage, die Energie dieser angeregten Moleküle zu quenchen (Demming-Adams et al., 1996). Der Energietransfer von angeregten Triplett-Spezies und Singulett-Sauerstoff auf Carotinoid-Moleküle ist sehr effektiv, ebenso von $^1\text{O}_2$ (Conn *et al.*, 1991; Baltschun *et al.*, 1997).

$^1\text{O}_2$ wird über zwei mögliche Wege entschärft: über physikalisches Quenching durch Energietransfer auf das Carotinoidmolekül und Abgabe der Energie an die Umgebung in Form von Wärmestrahlung wobei das Carotinoidmolekül unversehrt bleibt (Siefertmann-Harms, 1997) und über chemisches Quenching, wobei das Carotinoidmolekül zerstört wird (van den Berg *et al.*, 2000). In höheren Pflanzen ist Violaxanthin eine direkte Vorstufe des Phytohormons Absicinsäure (Schwartz *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1997), außerdem sind weitere Carotinoide am Xanthophyll-Zyklus zur Ableitung von überschüssiger Energie der Photosynthese beteiligt (Demming-Adams & Adams, 1996). Der Aufbau eines funktionsfähigen Photosynthese-Apparats in Algen und Pflanzen ist ebenfalls abhängig von der Präsenz an essentiellen Carotinoiden (Paulsen, 1999).

In Bakterien schützen Carotinoide die Zelle nicht nur vor Strahlungsschäden sondern verstärken auch Membranen durch ihre Einlagerung. Wegen ihren lipophilen Eigenschaften und bei geeigneter Moleküllänge können sich die Carotinoid-Moleküle durch die Membran spannen, unterstützt von glycosilierten Endgruppen und deren Fettsäureestern (Havaux, 1998; Hara *et al.*, 1999). Sie haben einen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften von Membranen: ihre Fluidität und ihre Permeabilität für bestimmte kleine Moleküle und Sauerstoff wird beeinflusst (Subczynski *et al.*, 1999; Berglund *et al.*, 1999).

Circa 50 der natürlich vorkommenden Carotinoide besitzen Provitamin A Aktivität, von besonderer Bedeutung sind hier β -Carotin, α -Carotin und Cryptoxanthin (van Vliet *et al.* 1996; Parker 1996). Sie stellen eine direkte Vorstufe des essentiellen Vitamin A dar, welches im tierischen Organismus zu Vitamin A gespalten wird und über Intermediate mit Opsin zu Rhodopsin, dem lichtempfindlichen Molekül vieler Photorezeptoren, umgesetzt wird (Krinsky, 1987; Krinsky *et al.*, 1993). Lutein und Zeaxanthin, in Pflanzen vorkommende Carotinoide, wird eine Schutzfunktion des Auges vor altersbedingter Degeneration der Macular und damit Schutz vor Altersblindheit zugeschrieben (Mozaffarieh *et al.*, 2003; Seddon *et al.*, 1994). Aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung, ihrer Fähigkeit Singulett-Sauerstoff zu quenchen und freie Radikale abzufangen (Olson & Krinsky, 1995), werden einigen Carotinoiden neben Schutz vor altersdegenerativen Krankheiten (Mayne, 1996; Barton-Duell, 1995; Gey, 1995) auch eine antikanzerogene Wirkung zugeschrieben (Hennekes *et al.*, 1986). Die antioxidativen Fähigkeiten in vivo von Carotinoiden ist abhängig von ihrer Konzentration, ihrer Lokalisation in der Zelle, des Gewebes oder des zellulären Kompartiments (Mathew-Roth, 1993). Carotinoide haben auch einen Effekt auf das Immunsystem, sie reduzieren die UV-induzierte Immunorepression (Fuller *et al.*, 1992) und β -Carotin konnte die T-Zell-Aktivität erhöhen (Santos *et al.*, 1996). Eine weitere physiologische Aktivität von Carotinoiden ist die Zell-Zell-Kommunikation durch gap-junctions, die durch β -Carotin, Astaxanthin und Cryptoxanthin induziert wird (Stahl & Sies, 1998).

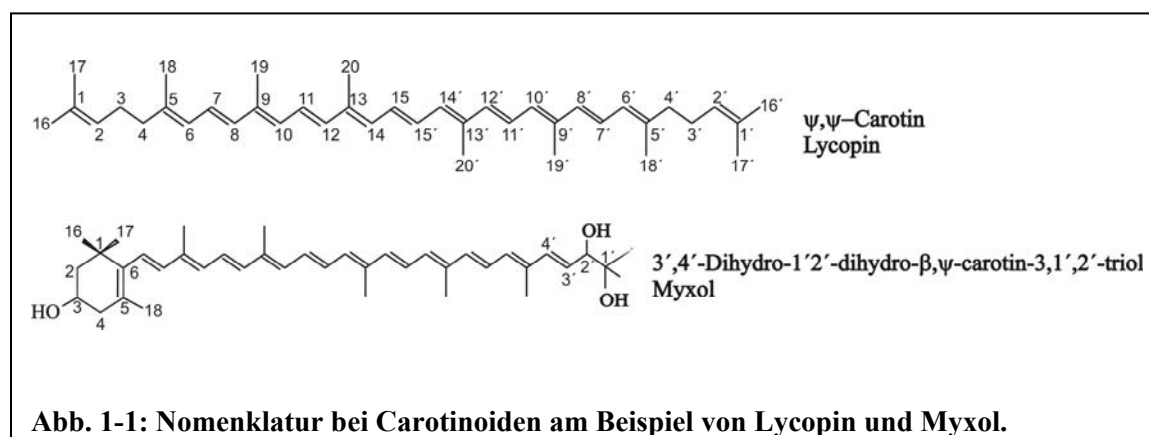
Kommerziell werden Carotinoide als Lebensmittelfarbstoffe, Tierfutterzusätze, in Kosmetik und pharmazeutischen Produkten sowie als Nahrungsergänzungsmittel genutzt. Nur wenige Carotinoide können hierfür chemisch synthetisiert werden oder über Isolation aus natürlichen Ressourcen in ausreichender Menge gewonnen werden (Johnson & Schröder, 1995). Daher gewinnt die gentechnische Herstellung großer Mengen an Carotinoiden wirtschaftlich an Bedeutung (Sandmann, 2002). Für Carotinoide konnte keine Toxizität nachgewiesen werden, auch durch die Einnahme von hohen Dosen an Provitamin A Carotinoiden konnte keine Vitamin A Toxizität festgestellt werden (Woutersen *et al.*, 1999).

1.2 Struktur und Biosynthese von Carotinoiden

Carotinoide werden in die Stoffgruppe der Terpene eingeteilt, deren Synthese von Isopentenylpyrophosphat-Einheiten ausgeht. Sie kommen nicht nur frei sondern auch als Ester, Glycoside, Sulfate und als Carotinoidproteine vor (Matsuno, 2001). Carotinoide haben in der Regel eine Grundstruktur aus 40 Kohlenstoffatomen, bei einigen Ausnahmen wird das C40-Grundgerüst um 1 oder 2 weitere Isoprenoid-Bausteine zu C45 oder C50 verlängert (Férézou, 1992). Einige Bakterien synthetisieren Apocarotinoide oder Diapocarotinoide, verkürzte Carotinoid-analoge Pigmente mit einem C35- oder C30-Grundkörper (Taylor, 1984).

Das azyklische C40-Grundgerüst kann durch verschiedene Enzyme modifiziert werden, z.B. durch Zyklisierung, Substitution, Elimination, Addition oder Umlagerung, sodass eine Vielzahl unterschiedlicher Strukturen gebildet werden kann (Britton *et al.*, 1995a). Abhängig von der Anordnung der Substituenten und der Doppelbindungen im Molekül können Carotinoide als *cis*- und *trans*-Isomere vorliegen (Zechmeister & Polgár, 1943). Mit einigen Ausnahmen wird in Organismen hauptsächlich die all-*trans* Konfiguration von Carotinoiden synthetisiert (Chandler & Schwartz, 1987), die als lineares Molekül vorliegen. *cis*-Isomere hingegen liegen nicht linear vor, was einen Effekt auf ihre Löslichkeit und die Positionierung von Seitengruppen hat (van den Berg *et al.*, 2000) und können anhand ihres Absorptionsspektrums erkannt werden, das ein zusätzliches Absorptionsmaximum im Bereich von 320 bis 360 nm besitzt.

Für die meisten Carotinoide werden Trivialnamen verwendet (Pfander, 1987), Regeln für die Nomenklatur basierend auf semi-systematischen Namen wurden von der International Union of Pure and Applied Chemistry publiziert. Im Carotinoid-Molekül werden die C-Atome des Kohlenstoffgerüsts durchnummeriert (siehe Abbildung 1-1), um die Position von Seitengruppen genau angeben zu können.



Hierbei werden z. B. bei Lycopin (ψ,ψ -Carotin) die C-Atome von links außen nach rechts bis zur Mitte des Moleküls mit 1 bis 15 benannt, die andere Hälfte des Moleküls wird von rechts außen nach links bis zur Mitte des Moleküls mit 1' bis 15' bezeichnet.

Anschließend erfolgt die Nummerierung der sekundären C-Atome 16 bis 20, bzw. 16' bis 20'. Das Myxol-Molekül hat einen β -Ring der am C3-Atom hydroxyliert ist, und am offenkettigen Ende zwei Hydroxygruppen, eine am C1'-Atom und eine am C2'-Atom. Außerdem besitzt Myxol zwischen dem C3'- und C4'-Atom eine Doppelbindung, die bei der Vorstufe γ -Carotin noch nicht vorhanden ist. Daher kann Myxol auch als 1',2',3-Trihydroxy-3',4'-dehydro- γ -Carotin bezeichnet werden.

Die Synthese von Carotinoiden ist mittlerweile bei unterschiedlichsten Spezies von Mikroorganismen bis Pflanzen untersucht worden (Sandmann, 1994; 2001). Die ersten Gene der Carotinoidbiosynthese wurden aus dem Bakterium *Rhodobacter capsulatus* isoliert (Yen & Marrs, 1976). Hierfür wurde das Photosynthese-Gen-Cluster aus dem Chromosom des Bakteriums in ein konjugatives Plasmid überführt und in photosynthese-defiziente Mutanten komplementiert (Marrs, 1981). Es konnten 8 Carotinoid-Gene in direkter Nähe zueinander auf einem 11 kb DNA-Fragment identifiziert werden. Bei *Rhodobacter sphaeroides* wurde ein 60 kb Cosmid-Klon isoliert (Pemberton & Harding, 1986), dessen Carotinoidgencluster 6 Gene enthielt, die in gleicher Weise arrangiert waren wie bei *Rhodobacter capsulatus* und zueinander Sequenzähnlichkeiten besitzen (Coomber *et al.*, 1990). Die Carotinoidgencluster aus *Erwinia uredovora* (Misawa *et al.*, 1990) und *Erwinia herbicola* (Perry *et al.* 1986). besitzen ebenfalls große Sequenzhomologie zueinander. Derzeit sind mindestens 20 Carotinoidgencluster aus unterschiedlichen Bakterien bekannt.

Der Syntheseweg der Carotinoide zweigt auf der Stufe des C20-Moleküls Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) ab. Durch eine Schwanz-Schwanz-Kondensation von 2 Molekülen GGPP vermittelt durch die Phytoen-Synthase, entsteht das erste, noch farblose Carotinoid Phytoen. Anschließend erfolgen mehrere Desaturierungsschritte, 3 bis 5 weitere Doppelbindungen werden durch die Phytoen Deaturase in das konjugierte Doppelbindungssystem eingefügt. Bei dem Carotinoid Lycopin sind 11 konjugierte Doppelbindungen vorhanden. Ein wichtiger Modifikationsschritt bei der Bildung von Myxol ist die Zyklisierung von Lycopin. Verantwortlich für diesen Schritt sind Lycopin Zyklastasen, die in zwei Klassen eingeteilt werden: β -Zyklastasen und ϵ -Zyklastasen (Cunningham *et al.*, 1996).

β -Zyklasen kommen in Bakterien und Pflanzen vor und katalysieren die Formierung eines β -Ionon-Rings. ϵ -Zyklasen kommen hauptsächlich in Pflanzen vor und bilden ϵ -Ionon-Ringe. Fast alle ϵ -Zyklasen sind Monozyklasen und bilden das asymmetrische, monozyklische δ -Carotin (ψ,ϵ -Carotin). Eine Ausnahme ist hier die ϵ -Zyklase aus *Lactuca*, die das bizyklische ϵ -Carotin (ϵ,ϵ -Carotin) bildet (Cunningham & Gantt, 2001). Monozyklische Carotinoide kommen als Intermediate bei der Synthese von bizyklischen Carotinoiden vor (Britton *et al.*, 1977) oder akkumulieren bei Inhibierung der Lycopin Zyklase Aktivität (Yokoyama *et al.*, 1996). Organismen die nur monozyklische Carotinoide produzieren sind sehr ungewöhnlich (Tao *et al.*, 2004), bekannt sind einige *Rhodococcus* Spezies (Ichiyama *et al.*, 1989), photosynthetische Bakterien wie *Chlorobium* (Leutwiler & Chapman, 1979; Takaichi *et al.*, 1997) und einige Pilze wie *Rhizophlyctis* (Davies, 1961).

Eine weitere Modifikation am Carotinoid-Molekül ist das Einfügen von Hydroxygruppen. Myxol besitzt drei Hydroxygruppen: am C3-, C1'- und C2'-Atom. Enzyme, die eine Hydroxygruppe am C3-Atom des β -Rings anfügen sind so genannte β -Carotin Hydroxylasen CrtZ (Misawa *et al.*, 1990) aus Bakterien bzw. CrtR aus Cyanobakterien (Lagarde & Vermaas, 1999). Für die Inserierung der Hydroxygruppe am C1-Atom ist die 1,2-Hydratase CrtC verantwortlich (Steiger *et al.*, 2003). Ein Enzym, das die Hydroxygruppe am C2-Atom anlagert, war zu Beginn dieser Arbeit unbekannt. Lediglich ein Enzym, welches am C2-Atom eine Ketogruppe einfügt, ist bekannt (Lang *et al.*, 1995; Takaichi & Shimada, 1999; Pinta *et al.*, 2003).

Des Weiteren besitzt Myxol eine Doppelbindung im konjugierten System zwischen dem C3'- und C4'-Atom. Ein bekanntes Enzym, welches an dieser Stelle eine Doppelbindung einfügt, ist z.B. die 3,4-Desaturasen aus *Rubrivivax gelatinosus* (Steiger *et al.*, 2000).

1.3 *Flavobacterium spec.* P99-3

Der Stamm *Flavobacterium spec.* P99-3 wurde assoziiert mit dem marinen Schwamm *Homaxinella spec.* gefunden und isoliert. Nach ersten Untersuchungen wurde P99-3 als *Flavobacterium* beschrieben (Yokoyama & Miki, 1995). *Favobacterium spec* wird taxonomisch in die Familie der Flavobacteriaceae eingeordnet. Das orangefarbene Bakterium (siehe Abbildung 1-2) erhält seine auffällige Färbung durch das selten vorkommende Carotinoid Myxol.

Jooste führte 1985 die Familie der Flavobacteriaceae ein, innerhalb der letzten zwanzig Jahre wurde die Taxonomie dieser Bakteriengruppe jedoch häufig verändert (Jooste, 1999). Der Genus *Flavobacterium* wurde 1923 für Bakterien etabliert, die aerob, gelb pigmentiert, stäbchenförmig sind und in unterschiedlichen Habitaten vorkommen (Bergey *et al.*, 1923).

Schreckenberger beschreibt 1998 zugehörige Bakterien zur Familie der Flavobacteriaceae als kleine bis mittlere, Gram negative, stäbchenförmige Bakterien, mit einer Größe von circa 0,3 bis 0,6 μm Breite und 1 bis 10 μm Länge.

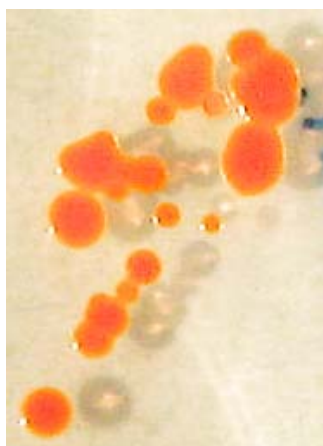


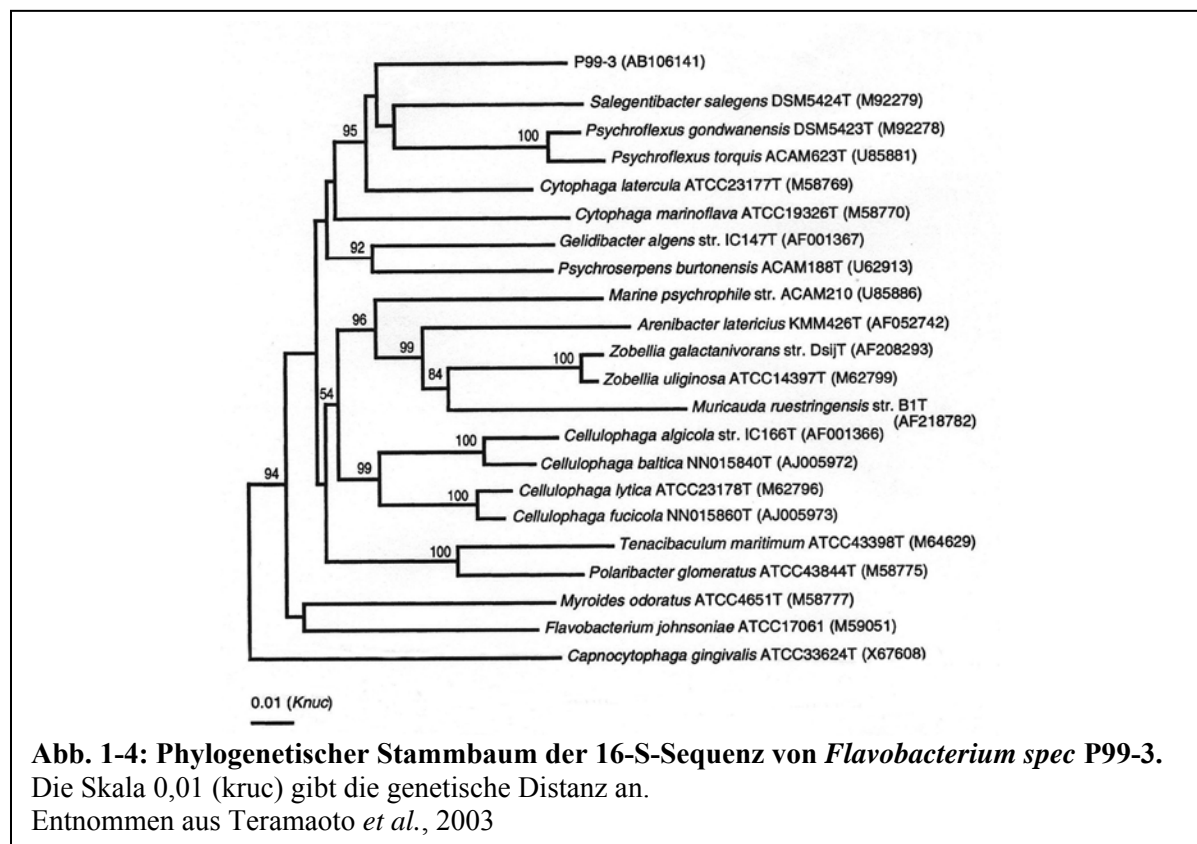
Abb.1-2: Einzelkolonien von *Flavobacterium spec. P99-3*



Abb. 1-3: Schwamm *Homaxinella spec.*
www.home.pusan.ac.kr/~jhjung/research-r.htm

Sporen und Flagellen werden nicht gebildet. Wachstum findet aerob oder anaerob bei einer Temperatur von 25 bis 35 °C statt. Kolonien können, müssen aber keine Farbe besitzen, Menaquinone 6 ist das einzige oder hauptsächlich vorkommende respiratorische Quinone. Homospermidine ist das hauptsächlich vorkommende Polyamin, Agmantin und Putrescin kommen häufig als Komponenten vor. Zellulose wird nicht abgebaut. Der G/C-Gehalt der DNA liegt zwischen 29 % und 45 %. Als Typ-Stamm wird *Flavobacterium aquatile* genannt (Schreckenberger, 1998). Bernadet *et al.* (2002) beschreiben die Familie Flavobacteriaceae, zusammen mit den Familien Bacteroidaceae, Cytophagaceae, Sphingobacteriaceae und Spirosomaceae, als eine phylogenetische Hauptlinie innerhalb der Bakterien. Einige Flavobakterien, so zum Beispiel *Flavobacterium spec* R1534, synthetisieren ebenfalls wie P99-3 Carotinoide. Jedoch werden Carotinoide nur von den marinen Spezies gebildet (Bernadet *et al.* 2002). Im Fall von *Flavobacterium spec* R1534 ist das Haupt-Carotinoid Zeaxanthin, das Carotinoidgencluster wurde 1997 isoliert und charakterisiert (Pasamontes *et al.* 1997).

Teramoto *et al.* (2003) führten eine 16S-Analyse von *Flavobacterium spec* P99-3 durch und erstellten einen phylogenetischen Stammbaum (siehe Abbildung 1-4).



Nach der 16S-Analyse von *Flavobacterium spec* P99-3 zeigt sich, dass P99-3 zwar in die Gruppe der CFB-Bakterien gehört, jedoch entfernt von den Flavobacterien. Daher sollte für P99-3 ein eigener Genus eingerichtet werden.

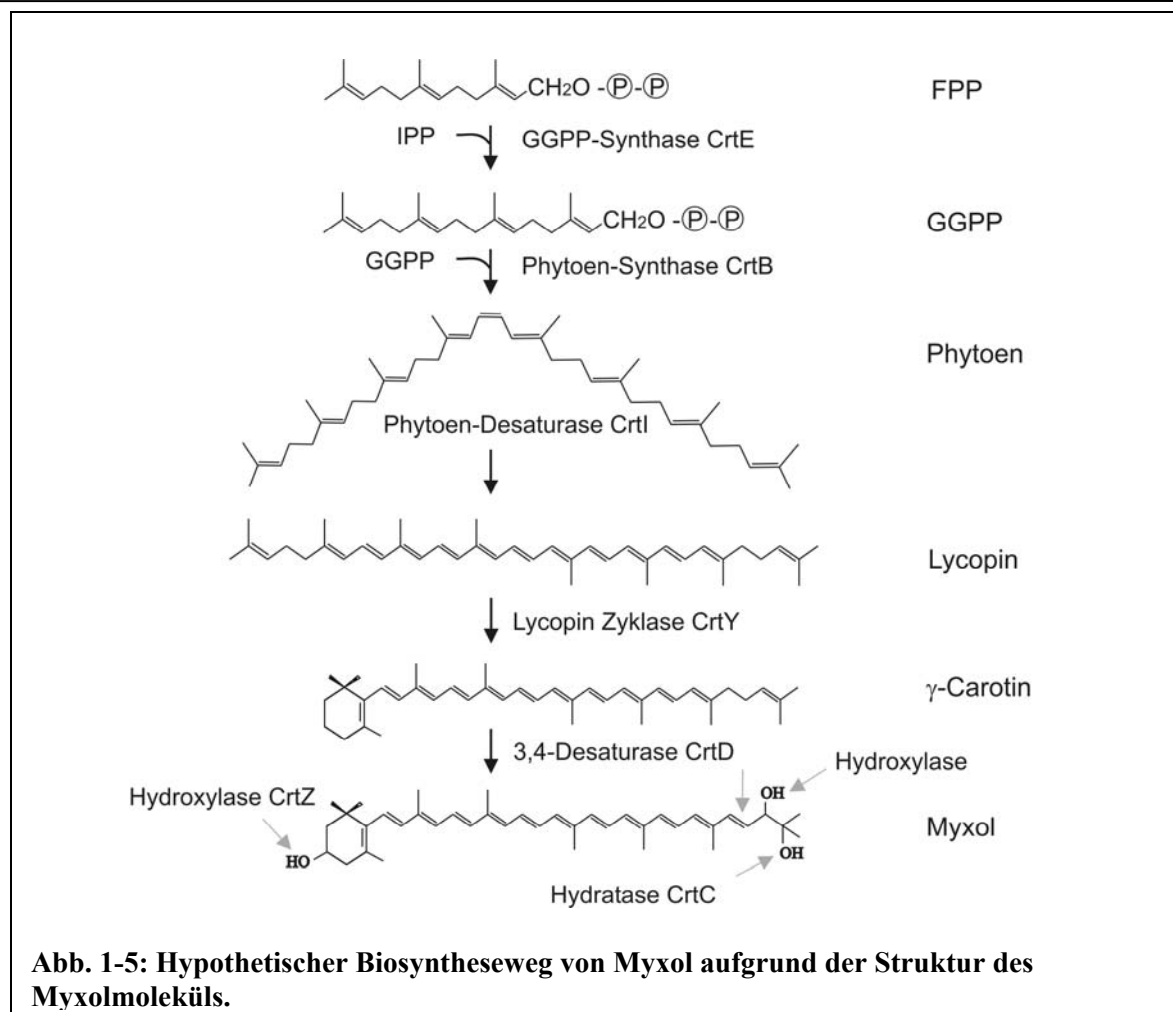
Flavobacterium spec. P99-3 synthetisiert das seltene monozyklische Xanthophyll Myxol, ein Aglikon des in Cyanobakterien vorkommenden Myxoxanthophyll. Myxoxanthophyll und Oscillaxanthin sind weit verbreitete Carotinoide in Cyanobakterien (Goodwin, 1980) und besitzt eine einzigartige Glycosid-Bindung am C2-Atom der ψ -Endgruppe, die bei keinem anderen Carotinoid vorkommt (Goodwin, 1980; Straub 1987; Nigli & Pfander, 1999). Bei Myxol sitzt an Stelle des Zuckerrestes am C2-Atom eine weitere Hydroxygruppe.

Myxoxanthophyll wurde 1936 das erste Mal aus *Oscillatoria rubescens* isoliert (Takaichi *et al.*, 2001). Takaichi *et al.* (2001) postulieren für die Biosynthese von Myxoxanthophyll in *Synechocystis sp.* PCC6803 mehr als 10 Enzyme. Fünf Gene dieses Biosynthesewegs bei *Synechocystis sp.* PCC6803 sind zu Beginn dieser Arbeit bereits funktionell untersucht worden: Phytoen Synthase CrtB (Martinez-Férez *et al.*, 1994), Phytoen Desaturase CrtP (Martinez-Férez *et al.*, 1992), ζ -Carotin Desaturase CrtQ (Breitenbach *et al.*, 1998), β -Carotin Hydroxylase CrtR (Masamoto *et al.*, 1998; Lagarde & Vermaas, 1999) und die β -Carotin

Ketolase CrtO (Fernández-González et al., 1997). Obwohl die gesamte DNA-Sequenz des Cyanobakteriums *Synechocystis* PCC 6803 veröffentlicht ist (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>), können anhand von Sequenzhomologien keine weiteren Carotinoidbiosynthesegene identifiziert werden. Bei Cyanobakterien liegen die Gene für die Carotinoidbiosynthese im Genom verteilt vor, bei Bakterien hingegen in einem Gencluster. Da anzunehmen ist, dass die Gene für die Carotinoidbiosynthese bei *Flavobacterium spec* P99-3 in einem Gencluster vorliegen, sollte es hier einfacher sein, alle Gene der Carotinoidbiosynthese für Myxol zu isolieren als bei *Synechocystis* PCC 6803. Weiterhin postulieren Takaichi *et al.* (2001) für die Synthese von Myxoxanthophyll eine Zyklisierung von Lycopin zu γ -Carotin und eine Modifikation der ψ -Endgruppe, die ähnlich verlaufen könnte wie bei den Purpurbakterien mittels CrtC und CrtD (Takaichi, 1999).

1.4 Hypothetischer Biosyntheseweg von Myxol in *Flavobacterium spec* P99-3

Da der Biosyntheseweg verschiedener Carotinoiden in den letzten Jahrzehnten gut untersucht und charakterisiert wurde und eine Vielzahl an bekannten Carotinoidgenclustern vorliegt, kann aufgrund der Struktur von Myxol ein Biosyntheseweg postuliert werden (siehe Abbildung 1-5): Die Synthese von Myxol beginnt wahrscheinlich bei der Dimerisierung von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) zu Phytoen. Diese Dimerisierung wird durch das Enzym Phytoen Synthase katalysiert. Anschließend erfolgen wahrscheinlich 4 Desaturierungsschritte durch das Enzym Phytoen Desaturase zum rötlichen Lycopin. Nun wird durch eine monozyklische β -Zyklase eine Zyklisierung an einem Ende des Moleküls zu γ -Carotin und eine Hydroxylierung am C3-Atom des β -Ringes durch eine β -Carotin Hydroxylase stattfinden. Das offenkettige Ende des Moleküls wird am C1'-Atom wahrscheinlich durch eine Hydratase hydroxyliert, zwischen C3'- und C4'-Atom von einer 3,4-Desaturase desaturiert und am C2' durch ein noch unbekanntes Enzym ebenfalls hydroxyliert. Zusammenfassend sollte im Carotinoidgencluster von *Flavobacterium spec*. P99-3 die Gene für eine Phytoen Synthase *crtB*, Phytoen Desaturase *crtI*, eine Lycopin Zyklase *crtY*, eine 3,4-Desaturase *crtD*, eine 1,2-Hydratase *crtC* und β -Carotin Hydroxylasen *crtZ* sowie für ein neuartiges Enzym, das am C2'-Atom Hydroxygruppen einfügt, zu finden sein.



1.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit soll die Aufklärung des Biosynthesewegs von Myxol sein. Hierzu soll das Carotinoidgencluster isoliert und sequenziert werden. Aufgrund von Sequenzhomologien sollen einige Gene des Carotinoidbiosynthese-Genclusters von *Flavobacterium spec* P99-3 kloniert werden und ihre Funktion mittels heterologer Komplementation in *E. coli* untersucht werden, um den Syntheseweg von Myxol aufklären zu können. Besonderes Interesse liegt hierbei bei dem noch unbekanntem Enzym, welches die Hydroxygruppe am C2'-Atom einfügt. Hierzu soll auch eine enzymologische *in vitro* Charakterisierung des gereinigten aktiven Enzyms durchgeführt werden. Weiterhin soll das selten in der Natur vorkommende Xanthophyll Myxol in *E. coli* heterolog synthetisiert werden, um einen eventuellen UV-Schutz von Myxol in *E. coli*-Zellen zeigen zu können. Um Vergleiche zum UV-Schutz von Myxol in *Flavobacterium spec* P99-3 machen zu können, sollen Carotinoidmutanten des Wildtyps hergestellt werden und die Überlebensrate nach Bestrahlung mit UV-Licht bestimmt werden.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 Verwendete Organismen

2.1.1 *Flavobacterium*-Stämme

Tabelle 2-1: Verwendete *Flavobacterium*-Stämme und deren Hauptcarotinoide

Stamm	Herkunft	Hauptcarotinoid	Zitat
<i>Flavobacterium sp.</i> P99-3	Wildtyp	Myxol	Yokoyama & Miki 1995
P99-3 M11	UV-Mutante	Myxol-Vorstufen	diese Arbeit
P99-3 M17	UV-Mutante	Phytoen	diese Arbeit
P99-3 EMS7	EMS-Mutante	Myxol-Vorstufen	diese Arbeit

2.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

- JM101 (Messing, 1979): wurde zur Produktion von verschiedenen Carotinoiden und zur Proteinexpression verwendet.
- DH5 α (Hanahan, 1983): wurde zur Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA verwendet.
- EPI100 (Epicentre): zur Erstellung einer Cosmid-Bibliothek mit dem Kit der Firma Epicentre
- XL1blue MR (Stratagene): zur Erstellung einer Cosmid-Bibliothek mit dem Kit der Firma Stratagene
- NM554 (Stratagene): zur Erstellung einer Cosmid-Bibliothek mit dem Kit der Firma Stratagene

2.2 Anzucht von Bakterien

Nachfolgend sind verschiedene Nährmedien für die Anzucht von Bakterien aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Als Nährboden für Petrischalen wurde dem Flüssigmedium noch 6 g/400 ml Agar Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

2.2.1 LB-Medium

Zur Anzucht von *E. coli* wurde außer in Ausnahmefällen Luria-Bertani-Medium verwendet (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7, autoklaviert). Standardmäßig wurde für Anzuchten Soya Pepton (Roth) verwendet. Für Anzuchten zur Proteinexpression wurden unterschiedliche Peptone (Casein, Soya, Fleisch und ein Mix aus 50 % Soya und 50 % Fleisch (Roth) eingesetzt.

2.2.2 YTG-Medium

Für die Carotinoidproduktion von monozyklischen Carotinoiden wurde YTG-Medium (16 g / l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Natriumchlorid, 5 g/l Glycerin, pH 7, autoklaviert) verwendet. (Lee, 2004).

2.2.3 SOB/SOC-Medium

SOB-Medium (20 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g Natriumchlorid, autoklaviert) wurde zur Anzucht von *E. coli* Stämmen für die Herstellung von kompetenten Zellen für die Transformation durch Elektroporation verwendet. SOC-Flüssigmedium (SOB-Medium + 20 mM MgCl₂ und 20 mM Glucoselösung) wurde nach der Elektroporation zur Anzucht der transformierten Zellen verwendet.

2.2.4 MB-Medium

MB-Flüssigmedium wurde zur Anzucht von *Flavobacterium spec.* P99-3 und dessen Mutanten verwendet. Es wurde Fertigmedium 2216 der Firma Difco verwendet und nach Herstellerangaben angesetzt und autoklaviert.

2.2.5 Seesalz-Medium

Aus Kostengründen wurde P99-3 auch auf Seesalz-Medium (5 g/l Pepton, 1 g/l Hefeextrakt, 40 g/l Seesalz (Sigma), autoklaviert) angezogen. Als Nährboden für Petrischalen wurde dem Flüssigmedium noch 6 g / 400 ml Agar Agar (Roth) vor dem Autoklavieren zugegeben.

2.3 Antibiotika

Zur selektiven Anzucht von *E. coli* Stämmen wurden die Antibiotika wie in Tabelle 2-2 angegeben eingesetzt.

Tabelle 2-2: Verwendete Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentrationen in Medien

Antibiotikum	Stammlöung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp) (Roth)	25 mg/ml in Bidest	100 µg/ml
Kanamcyin (Kan) (Sigma)	34 mg/ml in Bidest	34 µg/ml
Chloramphenicol (Cm) (Boehringer)	10 mg/ml in 70 % Ethanol	10 µg/ml
Tetracyclin (Tet) (Sigma)	10 mg/ml in 70 % Ethanol	25 µg/ml

2.4 Vektoren

2.4.1 pUC-Vektor

Der pUC-Vektor ist ein sehr einfacher Klonierungsvektor, der mit nur wenigen Restriktionsschnittstellen ausgestattet ist. Man unterscheidet mehrere Derivate des pUC-Vektors mit veränderter MCS, veränderter Orientierung der MCS (pUC 18 und 19) zum Promotor und pUC-Vektoren mit allen drei Frames (pUC 8-0, pUC 8-1 und pUC 8-2). Der Vektor pUC8-0 wurde für die Expressions-Bibliothek verwendet, da nur die *Bam*HI-Schnittstelle benötigt wurde. Der pUC18-Vektor wurde zur Klonierung von Carotinoidgenen genutzt. Alle pUC-Vektoren besitzen eine Ampicillin-Resistenz. Für Sequenzierungen können die Primer M13 und M13 reverse benutzt werden.

2.4.2 pPQE-Vektor

Die pPQE-Vektoren stammen von den pQE30, pQE31 und pQE32 Vektoren (quiagen) ab. Bei den pPQE-Vektoren wurde lediglich die *cm*-Resistenz deletiert (Krubasik, 2000c). Die pPQE-Vektoren sind Expressionsvektoren mit einem induzierbaren Promotor und einer Ampicillin Resistenz. Sie liegen in allen drei Frames vor und besitzen vor der MCS eine Ribosomenbindestelle und einen 6-His-Tag bestehend aus sechs Histidin-Resten zur selektiven Proteinreinigung. Zur Überprüfung der Klonierung kann mit den Primern pQEprom und pQErev sequenziert werden.

2.4.3 pMonT-Vektor (Monsanto)

Der Vektor pMonT wurde zur direkten Ligation von PCR-Amplifikaten über A-Überhänge genutzt. Er besitzt innerhalb seiner MCS eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Xcm*I, wodurch T-Überhänge entstehen (Borovkov & Rivkin, 1997). Außerdem besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz und man kann ein Blau-Weiß-Screening nach Transformation in *E. coli* durchführen, um Klone mit integriertem PCR-Produkt und Vektor-Religanden zu unterscheiden.

2.4.4 SuperCos1 (Stratagene)

Der Vektor SuperCos1 ist ein Cosmidvektor, der zur Klonierung von 30 - 40kb großen DNA-Fragmenten dient. Hierzu besitzt er eine *Bam*HI-Schnittstelle in seiner MCS, die von den *cos*-sites flankiert wird. Eine *Xba*I Schnittstelle dient zur Linearisierung des Vektors, da Phagenköpfe keine zirkuläre DNA aufnehmen können. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz. Für Sequenzierungen können die Primer T3-Promotor und T7-Promotor verwendet werden.

2.4.5 pWEB Cosmidvektor (Epicentre)

Der pWEB-Vektor ist ein Cosmidvektor der mit dem pWEB™ Cosmid Cloning Kit (Epicentre) zur Erstellung einer Cosmid-Bibliothek verwendet wurde. Der Vektor war bereits vorgefertigt und konnte direkt verwendet werden. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz.

2.5 Plasmide

Hier aufgeführt sind in dieser Arbeit verwendete Expressionskonstrukte zur Carotinoid-synthese in *E. coli*.

Tabelle 2-3: Zusammenfassung der Expressionskonstrukte zur Carotinoidsynthese

Plasmid	Kommentar	Zitat
pACcrtEB	pACYC184-Vektor mit den Genen <i>crtE</i> und <i>crtB</i> aus <i>E. uredovora</i> , Phytoen-Produzent, cm-Resistenz	Linden, 1991
pACcrtEBI _{rc}	pACYC184-Vektor mit den Genen <i>crtE</i> und <i>crtB</i> aus <i>E. uredovora</i> und <i>crtI</i> aus <i>Rho. capsulatus</i> , Neurosporin-Produzent, cm-Resistenz	Albrecht, 1997
pACcrtEBI _{eu}	pACYC184-Vektor mit den Genen <i>crtE</i> , <i>crtB</i> und <i>crtI</i> aus <i>E. uredovora</i> , Lycopin-Produzent, cm-Resistenz	Schnurr, 1996
pACcrtEBI _{al2}	pACYC184-Vektor mit den Genen <i>crtE</i> , <i>crtB</i> und <i>crtI</i> aus <i>E. uredovora</i> und <i>al-2</i> aus <i>Neurospora crassa</i> , γ -Carotin-Produzent, cm-Resistenz	Zhu, unveröffentlicht
pACCAR25 Δ crtX	pACYC184-Vektor mit dem Carotinoid-Gencluster aus <i>E. uredovora</i> , deletierte Glycosilase, β -Carotin-Produzent, cm-Resistenz	Misawa, 1990
pACCAR25 Δ crtY	pACYC184-Vektor mit dem Carotinoid-Gencluster aus <i>E. uredovora</i> , deletierte Lycopin Zyklase, cm-Resistenz	Misawa, 1990
pACCAR25 Δ crtI	pACYC184-Vektor mit dem Carotinoid-Gencluster aus <i>E. uredovora</i> , deletierte Phytoendesaturase, cm-Resistenz	Misawa, 1990
pACCAR25 Δ crtB	pACYC184-Vektor mit dem Carotinoid-Gencluster aus <i>E. uredovora</i> , deletierte Phytoensynthase, cm-Resistenz	Misawa, 1990
pSO50	pBBR-Vektor mit den Genen <i>crtC</i> und <i>crtD</i> aus <i>R. gelatinosus</i> , kan-Resistenz	Ouchaine, 1997
pSO53	pBBR-Vektor mit dem Gen <i>crtD</i> aus <i>R. gelatinosus</i> , kan-Resistenz	Steiger, 2000
pRKcrtC	pRK404-Vektor mit dem Gen <i>crtC</i> aus <i>Rho. capsulatus</i> , tet-Resistenz	Albrecht, 1997
pRKRH7	pRK404-Vektor mit dem Gen der IPP-Isomerase (<i>idi</i>) aus <i>Haematococcus pluvialis</i> , tet-Resistenz	Kajiwara, 1997
pRKcrtR	pRK404-Vektor mit dem Gen <i>crtR</i> aus <i>Synechococcus</i> PCC6301, tet-Resistenz	Nooten, unveröffentlicht
pFL200	pBR325-Vektor mit dem Gen <i>crtC</i> aus <i>Rho. capsulatus</i> , amp-Resistenz	Armstrong, 1989

Plasmid	Kommentar	Zitat
pBBR <i>crtZ_{eu}</i>	pBBR-Vektor mit dem Gen <i>crtZ</i> aus <i>E. uredovora</i> , kan-Resistenz	Rählerl, unveröffentlicht
pUCK2	isolierter Klon aus der Expressions-Bibliothek von <i>Flavobacterium spec</i> P99-3 im Vektor pUC8-0, amp-Resistenz	diese Arbeit
pUCK4	Subklon von pUCK2 restrigiert mit <i>Bam</i> HI, Vektor pUC8-0, amp-Resistenz	diese Arbeit
pBSKK5	Subklon von pUCK2 restrigiert mit <i>Bam</i> HI, Vektor pBSK, amp-Resistenz	diese Arbeit
PBSKK6	Subklon von pUCK2 restrigiert mit <i>Bam</i> HI, Vektor pBSK, amp-Resistenz	diese Arbeit
pPQEcrt <i>Ym</i>	pPQE31-Vektor mit dem Gen <i>crtY</i> aus <i>Flavobacterium spec</i> P99-3, amp-Resistenz	diese Arbeit
pPQEcrt <i>A₉₉</i>	pPQE30-Vektor mit dem Gen <i>crtA</i> aus <i>Flavobacterium spec</i> P99-3, amp-Resistenz	diese Arbeit
pSODA ₉₉	pBBR-Vektor mit dem Gen <i>crtD</i> aus <i>R. gelatinosus</i> und <i>crtA₉₉</i> aus <i>Flavobacterium spec</i> P99-3, kan-Resistenz	diese Arbeit
pUC18 <i>crtD₉₉</i>	pUC18-Vektor mit dem Gen <i>crtD</i> aus <i>Flavobacterium spec</i> P99-3, amp-Resistenz	Teramoto et. al. 2003
pUC18 <i>crtI₉₉</i>	pUC18-Vektor mit dem Gen <i>crtI</i> aus <i>Flavobacterium spec</i> P99-3, amp-Resistenz	Teramoto et. al. 2003
pACcrt <i>EBIYm</i>	pACYC184-Vektor mit den Genen <i>crtE</i> , <i>crtB</i> und <i>crtI</i> aus <i>E. uredovora</i> und <i>crtYm</i> aus <i>Flavobacterium spec</i> P99-3, γ -Carotin-Produzent, cm-Resistenz	Teramoto et. al. 2003

2.6 Anzuchsbedingungen von Bakterienkulturen

2.6.1 Anzucht von *Flavobacterium spec* P99-3

Das marine Bakterium wurde aus einer Glycerolkultur oder von einer LB-Platte in eine 100 ml MB-Flüssigkultur oder Seesalzmedium überimpft und für 3-5 d bei RT unter Schütteln inkubiert.

2.6.2 Anzucht von *E. coli* zur Plasmid-DNA-Isolation

Für die Isolation von Plasmid-DNA wurde die entsprechende Transformante in einer 5 ml LB-Flüssigkultur innokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.6.3 Anzucht von *E. coli* zur Proteinexpression

Zur Expression von Proteinen wurde eine 50 ml – 200 ml LB-Flüssigkultur mit der entsprechenden *E. coli*-Transformande angeimpft und bei 28, 30 oder 37 °C über Nacht angezogen. Induziert mit IPTG wurden nur die Expressionskonstrukte mit induzierbarem Promotor, wobei der optimale Induktionszeitpunkt und die Menge an IPTG zunächst ausgetestet wurden.

2.6.4 Anzucht von *E. coli* zur Carotinoidproduktion

Für die Produktion von Carotinoiden wurden 50 oder 100 ml LB-Flüssigkulturen mit der entsprechenden Transformande innokuliert und für 2 – 3 d bei 28 °C im Dunkeln unter Schütteln inkubiert. Induziert wurden die Kulturen nach 2 - 3 Stunden mit 10 mM IPTG.

2.7 Lagerung von Bakterienkulturen

Zur Lagerung von Bakterienkulturen wurden 500 µl einer nicht induzierten 5 ml Kultur in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl sterilem 80 % (w/v) Glycerin versetzt. Die Glycerinkultur wurde bei – 70 °C gelagert.

2.8 DNA-Isolation aus *Escherichia coli*

2.8.1 Schnelle Plasmid-DNA-Isolation aus *E. coli*

Diese Plasmid-Isolations-Methode eignet sich zur Isolation von Plasmid-DNA aus Klonen zur Restriktionsüberprüfung oder für eine erneute Transformation. Die isolierte Plasmid-DNA ist noch mit RNA und einigen Proteinanteilen verunreinigt, da kein RNase-Verdau und keine Chloroform-Extraktion durchgeführt werden.

Zur schnellen DNA-Extraktion aus *E. coli* wurde 1,5 ml einer 5 ml Flüssigkultur in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 14000 Upm in einer Eppendorf - Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde in 300 µl TENS-Lösung (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM Na₂-EDTA, 0,5 % (w/v) SDS, 0,1 M NaOH) resuspendiert und 150 µl 3–5 M Kaliumacetat-Lösung (29,46 g Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml Bidest) zugegeben. Nach vier- bis fünfmaligem Invertieren wurde die Probe 10 min bei 14000 Upm zentrifugiert. 400 µl des Überstands wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 1ml kaltem 100 % Ethanol versetzt und für 10 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend erfolgte wieder eine Zentrifugation wie zuvor. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das Sediment mit 800 µl kaltem 80 % Ethanol versetzt und wie zuvor zentrifugiert. Das Sediment wurde an der Luft getrocknet und in 30 µl 10 mM Tris-Puffer resuspendiert.

2.8.2 E.Z.N.A.[®] Plasmid-Miniprep Kit I (peqLab)

Zur Isolation von sehr reiner Plasmid-DNA wurde das E.Z.N.A.[®]-Plasmid Isolation Kit I von peqLab verwendet. Mit dem Kit I kann bis zu 25 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Die so isolierten Plasmide wurden z.B. für Sequenzierungen oder PCR eingesetzt. Die Isolation wurde wie in der Vorschrift angegeben durchgeführt. Eluiert wurde die Plasmid-DNA einmalig mit 70 µl 10 mM Tris-Puffer.

2.8.3 E.Z.N.A.[®] Plasmid-Miniprep Kit II (peqLab)

Dieses Plasmid-DNA-Kit ähnelt dem Kit I, ist jedoch für größere Mengen (bis zu 75 µg DNA) ausgelegt. Außerdem eignet es sich gut, um „low copy“-Plasmide in größeren Mengen zu isolieren. Resuspendiert wurden die isolierten Plasmide in 100 µl 10 mM Tris-Puffer.

2.8.4 DNA-Plasmid-Isolation von Expressionsbibliotheken mit dem Tip 100-Kit (quiagen)

Plasmid-DNA aus Bibliotheken wurde mit dem Tip 100-Kit (quiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Für die Isolation von Plasmid-DNA bis 500 µg wurde die gepoolten Klone der Bibliothek in einer Hettich-Tischzentrifuge bei 70 % pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 4 ml P1-Puffer resuspendiert und mit 4 ml P2-Puffer versetzt, 4 - 6 mal invertiert und mit 4 ml P3-Puffer versetzt und wiederum 4 - 6 mal invertiert. Nach der Überführung in ein SS34 - Zentrifugationsröhrchen wurde die Probe für 30 min bei 15000 Upm und 4 °C in einer Sorvall-Zentrifuge (SS34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugationsröhrchen überführt und wie zuvor zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde ein Tip 100-Säulchen mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert und der Überstand der Probe auf die Säule pipettiert. Nachdem die Probe durch die Säule gelaufen war, wurde die Säule mit 2 mal 10 ml QC-Puffer gewaschen und anschließend die Plasmid-DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Anschließend erfolgte eine Fällung der Plasmid-DNA mit dem 0,7-fachen Volumen (3,5 ml) an Isopropanol. Nach Zugabe und Mischen der Probe wurde diese für 30 min bei 15000 Upm wie zuvor zentrifugiert und das Sediment nochmals mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen, nochmals wie zuvor zentrifugiert und die Plasmid-DNA nach dem Trocknen in 1 ml 10 mM Tris pH 8,0 resuspendiert.

2.8.5 Cosmid-DNA-Isolation aus *E. coli*

Um Cosmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren wurden 1,5 ml einer Flüssigkultur für 5 min bei 12000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 100 µl QP-Puffer (50 mM Glucose, 1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 5 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0 in einem Volumen von 200 ml, steril filtrieren, bei 4 °C lagern.) resuspendiert und 5 min stehen gelassen. Es wurde eine frische Lösung angesetzt aus: 200 µl 10 N NaOH, 500 µl 20 % SDS-Lösung in einem Volumen von 10 ml. Von dieser Lösung wurden 200 µl jeder Probe zugegeben, die Proben 5 Mal invertiert und 5 min bei RT stehen gelassen. Nun wurden 150 µl 3–5 M Kaliumacetat-Lösung der Probe zugegeben, wieder fünf Mal invertiert und 5 min auf Eis gefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 12000 Upm für 5 min. Der Überstand (300 µl) wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 350 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, 15 sec gevortext und wiederum 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde nochmals mit Chloroform extrahiert wie zuvor. Nun wurde die Plasmid-DNA mit 500 µl kaltem 100 % Ethanol für 30 min bei – 20 °C gefällt. Nach Zentrifugation von 10 min bei 14000 Upm wurde das Sediment nochmals mit 500 µl kaltem 80 % Ethanol überschichtet und wiederum wie zuvor zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurde das Sediment an der Luft getrocknet und in 35 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 rückgelöst.

2.9 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

2.9.1 Herstellung von CaCl₂-kompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von CaCl₂-kompetenten *E. coli*-Zellen für eine Transformation von Plasmid-DNA mittels Hitzeschock wurde eine 50 oder 100 ml LB - Flüssigkultur mit den gewünschten Zellen angeimpft. Waren die Zellen bereits mit einem Plasmid transformiert, wurde die Kultur trotzdem ohne Zugabe von Antibiotika angezogen. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 - 0,8 bei 37 °C und 170 Upm in einem Aquatron wachsen gelassen. Anschließend wurden die Kulturen in sterile Zentrifugenbecher überführt und 10 min bei 4 °C und 5000 Upm in einer Sorvall-Zentrifuge (Rotor GSA) sedimentiert. Das Sediment wurde in 1/5 TFB1-Puffer (30 mM Kaliumacetat, 50 mM Manganchlorid × 4 H₂O, 400 mM Kaliumchlorid, 100 mM Calciumchlorid, 15 % Glycerin, pH 5,8 steril filtriert) des Ausgangsvolumens resuspendiert und 2 h auf Eis stehen gelassen. Die Zellen wurden wieder für 5 min bei 5000 Upm und 4 °C zentrifugiert und das Sediment in 1/5 Volumen TFB2-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM Calciumchlorid, 10 mM Kaliumchlorid, 15 % Glycerin, pH

7,0 steril filtriert) des vorherigen Volumens resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße zu 200 µl Aliquots pipettiert. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei – 70 °C gelagert.

2.9.2 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurde eine 100 ml SOB-Flüssigkultur mit den entsprechenden Zellen angeimpft und die Kultur bis zu einer OD_{600nm} von 0,7 - 0,8 bei 37 °C und 170 Upm in einem Aquatron wachsen gelassen. Nun wurde die Kultur in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt und 10 min bei 4 °C und 5000 Upm in einer Sorvall-Zentrifuge (Rotor GSA) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment viermal in sterilem 10 % Glycerin gewaschen. Das Sediment wurde dann in 15 % Glycerin resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße zu 70 µl Aliquots verteilt. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei – 70 °C gelagert.

2.10 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

2.10.1 Transformation von CaCl₂ - kompetenten *E. coli*-Zellen

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA oder mit 5 µl Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 42 °C inkubiert, wieder auf Eis gestellt und mit 800 µl LB-Medium versetzt. Nun folgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und 50 – 200 µl der Ansätze wurden auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Über Nacht wurden die Platten bei 37 °C wachsen gelassen, am nächsten Tag konnten die Kolonien weiter verwendet werden.

2.10.2 Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Die Transformation mittels Elektroporation erfolgte mit dem Cellject Basic-Elektroporationsgerät (Eurogentec). Zunächst wurden die Elektroporationsküvetten 2 – 5 min in 70 % Ethanol eingelegt und unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurden sie für 5 bis 10 min mit UV-Licht bestrahlt, um möglich DNA-Reste und Keime zu zerstören.

Die auf Eis aufgetauten Zellen wurden in die vorgekühlte, sterile Küvette pipettiert und mit 1 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz versetzt. Zur Aufnahme der DNA wurden die Zellen einem Spannungsimpuls von 2400 V (Parallelwiderstand 132 kOhm; Kapazität 40 µF) ausgesetzt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurde die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 – 200 µl des Ansatzes auf Petrischalen mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Über Nacht wurden

die Platten bei 37 °C wachsen gelassen, am nächsten Tag konnten die Kolonien weiter verwendet werden.

2.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA bei der Firma MWG, wurden 30 µl einer E.Z.N.A.[®] Plasmid-Miniprep Kit I (peqlab, s. 3.1.2) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit Bidest auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Nun wurde eine Fällung mit 10 % des Volumens an Kaliumacetat und dem 2,5-fachen Volumen an 100 % Ethanol zugegeben und für mindestens 2 h bei – 20 °C inkubiert. Nachfolgend wurde die Probe bei 4 °C für 10 min bei 14000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde nun mit 400 µl kaltem 80 % Ethanol überschichtet und erneut zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Sediments an der Luft wurde das Reaktionsgefäß mit Parafilm verschlossen. Die DNA-Proben wurden zur Sequenzierung an die Firma MWG Biotech AG geschickt. Die für die Sequenzierung benötigten Primer sind in Tabelle 2-4 aufgeführt.

Tabelle 2-4: Primer die für Sequenzierungen verwendet wurden

Primer	Sequenz	Bindungsbereich	Templat
T3	5'aattaaccctcactaaggg 3'	Pomotorbereich	pMon pUC pBSK
T7	5'taatacgactcactataggg 3'	Terminatorbereich	pMon pUC pBSK
M13reverse	5'caggaacagctatgacc 3'	Promotorbereich	pMon pUC pBSK
M13	5'tgtaaacgacggccagt 3'	Terminatorbereich	pMon pUC pBSK
K2S6P2	5'cccataatcaccaggtgtat 3'	crtD P99-3	pUCK2
K2S4P3	5'gtgctttcatacttcatcttac 3'	Anfang crtD P99-3	pUCK2
K2S6P4	5'atggataggtgtacacacagg 3'	crY P99-3	pUCK2
K2S4P5	5'aatacgtcgacattcataacg 3'	crtZ P99-3	pUCK2
K2S6P6	5'catcgggagtgaagtaacac 3'	crtY P99-3	pUCK2
K2P7	5'ccatacatatctggataatatac 3'	crtBP99-3	pUCK2
K2P8	5'atctggtgcaagacgatgtt 3'	crtY P99-3	pUCK2
K2P9	5'catgtttagtgaatctgtatc 3'	crtI2 P99-3	pUCK2
K2P10	5'tgaccattgaccatatgcttaa 3'	crtA P99-3	pUCK2
K2P11	5'cctttgatacattacctac 3'	crtI P99-3	pUCK2
K2P12	5'gcataacttcatggcaatagc 3'		pUCK2
K2P13	5'agcaccaagatatactgtg 3'		pUCK2
K2P15	5'gggagctatgataaattatca 3'		pUCK2
aco1	5'gattacatctactgcatcggc 3'	Anfang Aconitase	pUCK2
aco2	5'caaggaatgtaggtctaag 3'	Ende Aconitase	pUCK2
aco3	5'catgtcaatatcaaagcc 3'	vor Aconitase	pUCK2
aco4	5'gcaacaattggggtattcg 3'	hinter Aconitase	pUCK2
aco5	5'ttccgtgattagcattaacc 3'	moxR	pUCK2
pQEProm	5'cgtatcacgaggeccctt 3'	Promotorbereich	pQE pPQE
pQErev	5'gttctgaggtcattactgg 3'	Terminatorbereich	pQE pPQE

2.12 Auswertung der Sequenzdaten

Die Daten aus den Sequenzierungen wurden mit mehreren PC-Programmen weiter verarbeitet und analysiert. Um Sequenzhomologien auf DNA- und Aminosäure-Ebene zu finden, wurden die Sequenzdaten in die Datenbank Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) eingegeben und mit der Datenbankeinträgen verglichen. Mögliche offene Leseraster (ORF) wurden nach Editierung der Sequenzdaten mit dem Programm DNASIS 1.0 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) zu allen möglichen Proteinsequenzen visuell durchsucht.

Aminosäure-Sequenzvergleiche wurden mit dem Program ClustalX durchgeführt. Die hieraus erhaltenen Daten wurden mit den Programmen Treeview (für Phylogenie-Stammbäume) und ClustalW (für Aminosäuresequenz-Vergleiche) editiert.

2.13 Amplifikation von Carotinoidgenen von *Flavobacterium spec P99-3*

Zur Amplifikation von ORFs des sequenzierten Bereichs von *F. spec P99-3* wurden je zwei Primer (s.Tabelle 2-5) mit integrierten Schnittstellen zur Klonierung in die Epressionsvektoren pPQE30, pPQE31, pPQE32 oder pUC18 verwendet.

Tabelle 2-5: Primer zur Amplifikation von ORFs aus dem isolierten Gencluster von *F. spec P99-3*

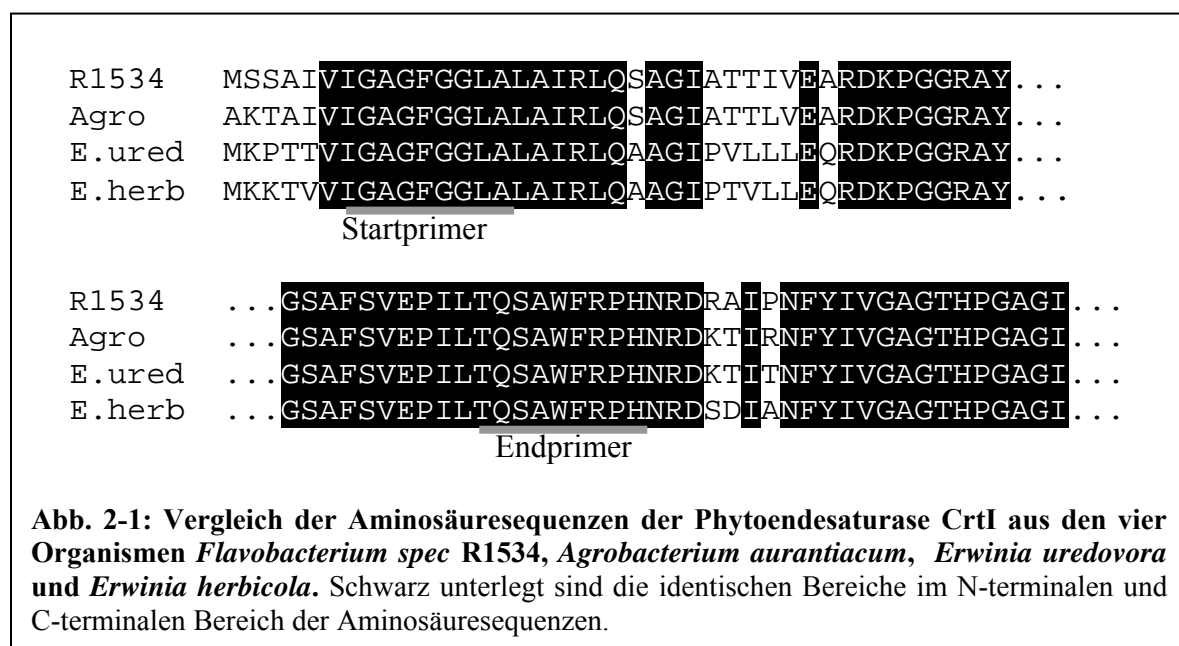
Primer	Sequenz	Tm	Puffer	Schnittstelle	Vektor
crtA sph fwd	5'gctttatctatt gcatg caatgc 3'	57°C	Opti 7	<i>SphI</i>	pPQE30
crtA hind rev	5' cttctgggaccta aagctt tttag 3'	57°C	Opti 7	<i>HindIII</i>	
moxR sph fwd	5' taaaccag catg cctatgtctgatg 3'	56°C	Biotherm	<i>SphI</i>	pPQE32
moxR hind rev	5'gtagaaa aagctt attacaggattt 3'	56°C	Biotherm	<i>HindIII</i>	
Aco sph fwd	5'gataaaaa agcatg cataggct 3'	56°C	Biotherm	<i>SphI</i>	pPQE32
Aco hind rev	5'cta aagctt cgtgtctggtg 3'	56°C	Biotherm	<i>HindIII</i>	
ORFIY sph fwd	5'cacagaat gcatg cctgaatgatag 3'	55°C	Biotherm	<i>SphI</i>	pPQE31
ORFIY hind rev	5'ccattcca aagctt ggctatatcg 3'	55°C	Biotherm	<i>HindIII</i>	

Für die Amplifikation der anderen ORFs wurde die Biotherm-Polymerase (Genecraft) verwendet. Als Puffer für die PCR-Reaktion wurde entweder der Biotherm-Reaktionspuffer oder einer der 12 Opti-Prime Puffer (Stratagene) eingesetzt.

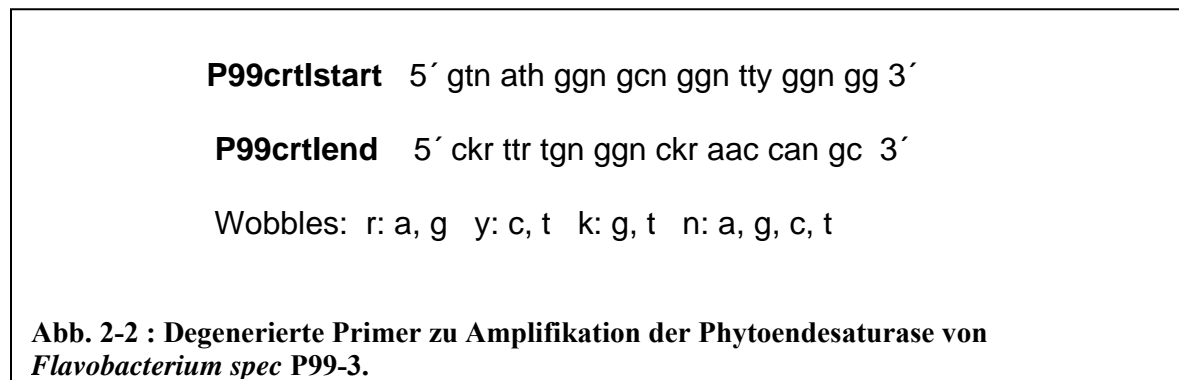
Es wurden zur Amplifikation 5 Ansätze mit je 10 µl angesetzt und nach der PCR-Reaktion die Proben wiederum vereint. Nach Überprüfung der PCR-Probe durch Auftrennung über ein Agarosegel, wurden die restlichen 48 µl der Probe eingefroren.

2.14 PCR mit degenerierten Primern

Für das Erstellen von degenerierten Primern wurden sehr homologe Aminosäuresequenzen von konservierten Carotinoidgenen aus verwandter Spezies herangezogen, um ein homologes Gen aus *Flavobacterium spec* P99-3 zu amplifizieren. Bei Bakterien eignet sich hierfür die Phytoendesaturase (CrtI), das bereits bei einigen Spezies untersucht worden ist. Für das Erstellen der degenerierten Primer für crtI aus *Flavobacterium spec* P99-3 wurden die Aminosäuresequenzen von CrtI aus *Flavobacterium spec* R1534, *Erwinia uredovora*, *Erwinia herbicola* und *Agrobacterium aurantiacum* herangezogen (siehe Abbildung 2-1). Sie zeigen untereinander 52,5 % identische Aminosäuren und 17,6 % sehr ähnliche Aminosäuren.



Die degenerierten Primer für die Amplifikation des Gens der Phytoendesaturase aus *Flavobacterium spec* P99-3 wurden wie in Abbildung 2-2 bei der Firma Roth bestellt.



Für die Amplifikation wurde genomische DNA von *Flavobacterium spec* P99-3 in die Reaktion eingesetzt. Für die PCR wurde ein Prämix aus 3 µl 50 mM MgCl₂, 10 µl Polymerase-Puffer, 10 µl 5 mM dNTPs (peqLab), 5 Units Biotherm Polymerase (Genecraft), 1 µl genomische DNA, 10 µl 10 pmol P99crtIstart - Primer und 10 pmol P99crtIend - Primer in einem Volumen von 100 µl. Für die PCR-Reaktion wurden 10 mal 10 µl Aliquots pipettiert und die Proben zunächst für 3min bei 95°C degeneriert. Anschließend folgten 30 Zyklen nach folgendem Schema: 94 °C 40 sec, 52 °C 30 sec und 72 °C 3 min. Abschließend folgte ein weiterer Amplifikationsschritt für 10 min bei 72 °C. Nach der Reaktion wurden die Aliquots vereint und über ein Agarosegel aufgetrennt.

2.15 Reinigung von PCR-Amplifikaten

Zur Reinigung von PCR-Proben wurde das PCR Reinigungs-Kit (peqLab) verwendet. Hierbei wurden die PCR-Produkte über Säulchen aufgereinigt. Dies war vor der Weiterverwendung der Amplifikate nötig, da sich noch Primer- und Nukleotid-Reste in den Ansätzen befanden und eventuelle Ligations- oder Restriktionsansätze behindern können.

2.16 Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Amplifikaten

2.16.1 Restriktion von DNA zur qualitativen Überprüfung

Um isolierte Plasmid-DNA zu überprüfen wurde eine qualitative Restriktion durchgeführt. Es wurde Plasmid-DNA (1 – 4 µl DNA, je nach Konzentration) mit Restriktionsenzym-puffer und 5 – 10 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 10 µl angesetzt und für 1 - 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der DNA über ein Agarosegel.

2.16.2 Quantitative Restriktion von DNA zur Klonierung

Für die Klonierung von DNA wurde eine größere DNA-Menge restrigiert. Von Vektor-DNA wurden 10 µl einer DNA-Plasmidisolierung mit dem peqLab-Kit in einem Volumen von 30 µl verdaut. Hierfür wurden 3 µl eines 10fach konzentrierten Restriktions-Puffers eingesetzt und 5 - 10 Units Restriktionsenzym. Verdaut wurde für 2 - 3 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurde der gesamte Restriktionsansatz über ein 1 % Agarosegel aufgetrennt.

Gereinigte PCR-Produkte wurden zur direkten Klonierung ebenfalls mit Restriktionsenzymen geschnitten. Hierfür wurden 20 µl gereinigtes PCR Produkt in einem Volumen von 30 µl wie oben beschrieben restrigiert.

2.17 Agarosegel zur Auftrennung von DNA

Für die Auftrennung von genomischer DNA wurden 0,6 % oder 0,8 % Agarosegele angesetzt, für Plasmid-DNA und PCR - Amplifikate 1 % Agarosegele.

Zur Auftrennung von DNA wurde Agarose (peqLab) in einfach TAE - Puffer (50fach: Tris Base 242 g, Eisessig 57,1 ml, Na₂EDTA 37,2 g in 1 l Bidest) in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, bis die Agarose geschmolzen war. Nun wurde der Gelschlitten mit der Agaroselösung befüllt und der Kamm eingesteckt. Nach dem Abkühlen war das Gel fest und konnte beladen werden. Als Laufpuffer wurde einfacher TAE-Puffer benutzt. Die DNA-Proben wurden mit 2 µl DNA-Probenpuffer (15 % (w/v) Ficoll 400 in 30 ml Bidest bei 50 °C lösen, Zugabe von 0,25 % (w/v) Bromphenolblau und 0,25 % (w/v) Xylene Cyanol FF, Endvolumen von 40 ml einstellen) pro 10 µl Probenvolumen versetzt und in die Geltaschen pipettiert. 2 µl eines Längenstandards wurde zur Abschätzung von Größe und Menge der aufgetrennten DNA-Fragmente mit aufgetragen. Kleine Gele wurden bei 65 mA und große Gele bei 80 mA gefahren. Nach genügender Auftrennung wurde das Gel in ein Ethidiumbromid (1 % Ethidiumbromid in TAE-Puffer) für circa 10 – 15 min unter schwenken gefärbt und unter dem Transiluminator bei 312 nm im UV-Licht angeschaut und zur Dokumentation fotografiert.

2.18 DNA-Marker für Agarosegele

2.18.1 λ-Eco / Hind - Marker

Zur Herstellung des DNA-Längenstandards wurde die DNA des Phagen λ mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* geschnitten. 50 µl λ-DNA (0,3 mg/ml MBI-Fermentas, 48,5 kb) wurden mit 7 µl 10fach konzentriertem Y⁺-Tango-Puffer (MBI-Fermentas) und je 5 µl *EcoRI* und *HindIII* (beide MBI-Fermentas) in einem Volumen von 72 µl für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min bei 70 °C inkubiert und 16 µl DNA-Probenpuffer zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei – 20 °C.

2.18.2 1 kb ladder – Marker (Genecraft)

Der 1kb ladder Marker der Firma Genecraft wurde für Agarosegele verwendet, bei denen eine sehr genaue Bestimmung der Fragmentgröße, vor allem in den Bereichen von 500 - 800 bp und 2000 - 3500 bp nötig war.

2.19 Isolation von aufgetrennter DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation von aufgetrennten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die entsprechende DNA - Bande auf dem Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde nun gewogen, um das Gewicht des Gelstücks zu bestimmen. Es wurde das 3fache Volumen an Bindepuffer (Aplichem-Kit) des Gewichtes zugegeben und 5 – 10 µl an Glasmilch. Nun wurde das Gelstück bei 50 °C für mindestens 10 min geschmolzen und die Probe dabei zwei- bis viermal invertiert. Nun wurde die Glasmilch durch Zentrifugation für 2 min bei 10000 Upm sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit dem gleichen Volumen Bindepuffer wie zuvor versetzt und gelöst. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen und das Sediment getrocknet (RT, circa 10 – 20 min). Nun wurde das Sediment mit 10 – 15 µl bidestilliertem Wasser versetzt, gelöst und für 10 min bei 50 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.20 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde standardmäßig in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Hierfür wurde 2 µl T4-Ligationspuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (MBI), 1 µl geschnittener Vektor-DNA und 3 – 5 µl Insert-DNA eingesetzt. Ligationen wurden über Nacht bei 8 °C in einem Wasserbad durchgeführt. Am folgenden Tag wurden Ligationsansätze zur Hitzeinaktivierung der Ligase 10 min bei 70 °C inkubiert.

2.21 Erstellung von Cosmid-Bibliotheken

2.21.1 Cosmid-Bibliothek mit dem SuperCos1-Vektor und Gigapack® III Gold Kit (Stratagene)

Zunächst wurde ein Verdau mit der genomischen DNA von *Flavobacterium spec* P99-3 durchgeführt. Hierfür wurde ein Prämix mit 10 µg DNA, 4 µl 10fach konzentriertem Puffer (Puffer A Boehringer) und 2 µl 1:10 verdünntem *Sau3AI* in einem Volumen von 40 µl auf Eis angesetzt. Eine Probe von 10 µl wurde sofort abgenommen und das Restriktionsenzym bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Der Rest des Ansatzes wurde bei 37 °C inkubiert und weitere Aliquots nach 30 sec, 1 min, 3 min und 20 min hitzeinaktiviert. Alle Proben wurde anschließend auf ein 0,5 % Agarosegel aufgetrennt, das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und das Gel fotografiert. Nach dem ein optimaler partieller Verdau der genomischen DNA bei 30 sec bis 1 min unter den oben beschriebenen Bedingungen festgestellt werden konnte, wurden 5 Ansätze wie oben beschrieben angesetzt und für 45 sec bei 37 °C inkubiert,

hitzeinaktiviert und die Ansätze anschließend vereint. Ein Aliquot von 2 µl wurde über ein Agarosegel aufgetrennt, um den partiellen Verdau zu überprüfen. Der Rest der Probe wurde mit 5 µl 10fach konzentriertem Dephosphorylierungspuffer und 2 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/µl, Boehringer) versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend wieder bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert.

Nun wurde der Ansatz zunächst mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, durch mehrmaliges invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und 10 min bei 14000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Nachdem die obere wässrige Phase abgenommen wurde, wurde diese nochmals mit Chloroform extrahiert, wie zuvor zentrifugiert und wiederum die obere wässrige Phase abgenommen. Diese Phase wurde anschließend mit 1/10 Volumen Natriumacetat und dem 2,5fachen Volumen 100 % Ethanol über Nacht bei – 20 °C gefällt.

Am folgenden Morgen wurde der Ansatz 10 min bei 14000 Upm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, wiederum 10 min bei 14000 Upm und 4 °C zentrifugiert und nach dem Trocknen das Pellet in 15µl bidestilliertem Wasser resuspendiert.

2.21.2 Präparation des Cosmidvektors SuperCos1 (Stratagene)

Der Vektor SuperCos1 wurde zunächst in kompetente DH5α Zellen transformiert. Von einer Kolonie wurden drei 5 ml-Kulturen in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C unter Schütteln über Nacht angezogen.

Am folgenden Tag wurde der Cosmidvektor mit dem Plasmid Isolationskit (peqLab) isoliert. Da es sich bei dem SuperCos1-Vektor um ein Vektor mit geringer Kopienanzahl handelt, wurden 3 Ansätze mit 4 ml der Kulturen 5 min bei 5000 Upm zentrifugiert und nach Anleitung des Kits isoliert. Die Vektor-DNA wurde je Ansatz mit 50 µl Elutionspuffer eluiert und vereinigt. 40 µl der isolierten DNA wurde mit 5 µl 10fach konzentriertem Puffer A (Boehringer) und 10 U *Xba*I (Genecraft, 20 U/µl) in einem Volumen von 50 µl angesetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Restriktionsenzym 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert und der gesamte Ansatz mit 6 µl 10fach konzentriertem Puffer und 2 µl Shrimp Alkaliner Phosphatase (1 U/µl) in einem Volumen von 60 µl angesetzt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde wiederum wie zuvor hitzeinaktiviert und der Ansatz danach mit 2 µl Puffer A (Boehringer), 2 µl *Bam*HI (10 U/µl, Boehringer) und 6 µl bidestilliertem Wasser versetzt und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der anschließenden Hitzeinaktivierung des Restriktionsansatzes wurde eine Extraktion mit

Phenol/Chloroform mit anschließender Fällung durchgeführt. Die gefällte und getrocknete Plasmid-DNA wurde in 10 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert.

Anschließend wurde die vorbereitete genomische DNA und der Cosmid-Vektor ligiert. Hierfür wurden 20 µl genomische DNA und 10 µl SuperCos1-Vektor mit 5 µl Ligationspuffer und 2,5 U T4-DNA-Ligase (MBI) in einem Volumen von 50 µl auf Eis angesetzt und über Nacht bei 16 °C ligiert. Da die meisten Ligase-Puffer Polyethylenglycol enthalten und dies die Verpackungsreaktion in die Phagenköpfe behindern kann, wurde der Ligationsansatz hitzeinaktiviert (10 min bei 65 °C) und anschließend Phenol/Chloroform extrahiert und gefällt. Der Ligationsansatz wurde in 10 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert. Für die Verpackungsreaktion wurde der Verpackungsextrakt aus der – 70 °C Tiefkühltruhe auf Eis aufgetaut. Kurz nach dem Tauen des Extrakts wurden 3 µl gefällter Ligationsansatz zugegeben. Dabei ist zu beachten, dass keine Luftblasen in den Reaktionsansatz gelangen. Nach dem Durchmischen der Probe mit der Pipettenspitze wurde der Ansatz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 500 µl SM-Puffer (5,8 g NaCl, 2,0 g MgSO₄ × 7 H₂O, 50 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5, 5 ml 2 % (w/v) Gelatine in 1 l) vermischt und 20 µl Chloroform zugegeben, vermischt und zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann für circa 1 Monat bei 4 °C aufgehoben werden.

Für die Titer-Bestimmung der Cosmid-Bibliothek wurden zunächst die Empfängerzellen (XL1 blue MRF[']) vorbereitet. Aus einer Glycerolkultur wurden die Zellen auf eine LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine Einzelkolonie in eine 50 ml LB-Flüssigkultur mit 10 mM MgSO₄ und 0,2 % (w/v) Maltose inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 wachsen gelassen. Nach dem Pelletieren der Zellen bei 5000 Upm für 10 min in einer Hettich-Tischzentrifuge wurden sie in 25 ml steriler 10 mM MgSO₄-Lösung vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden nun in steriler 10 mM MgSO₄-Lösung auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt.

Von der Verpackungsreaktion wurde mit SM-Puffer Verdünnungen (1:10 und 1:50) angesetzt und je 25 µl davon mit 25 µl Empfängerzellen versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Alle 15 min wurden die Ansätze vorsichtig durch Invertieren gemischt. Nun wurden die Ansätze für 1 min bei 5000 Upm zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 50 µl LB-Medium resuspendiert. Unterschiedliche Mengen der Zellen (5, 10, 25 und 50 µl) wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am

folgenden Tag wurden die Kolonien ausgezählt und die Bedingung ausgewählt, bei der circa 100 - 150 Einzellkolonien pro Platte für ein Screening vorlagen.

2.21.3 Cosmid-Bibliothek mit dem pWEB™ Cosmid Cloning Kit (Epicentre)

Bei diesem Kit zur Erstellung einer Cosmid-Bibliothek wird die genomische DNA nicht über ein Restriktionsenzym in Fragmente geschnitten, sondern mit einer Spritze geschert. Anschließend werden die gescherten Enden der DNA-Fragmente mit einem Enzym-Mix geblundet (End-Repair-Reaktion) und mit dem bereits vorbereiteten Vektor ligiert. Es ist keine weitere Aufreinigung der DNA-Fragmente mehr nötig, sodass eine „in Gel“-Ligation durchgeführt werden kann. 25 µg genomische DNA wurde mit einer Hamilton-Spritze (50 µl Volumen) geschert. Hierfür wurde zunächst eine Testreihe angesetzt, die genomische DNA wurde ein- bis viermal mit der Spritze aufgezogen und jeweils 10 µl als Probe entnommen. Die DNA wurde über ein 0,8 % Agarosegel aufgetrennt, als Längenstandard wurde 100 ng T7-DNA (Größe 40 kb) aufgetragen. Nach Färbung mit einem Ethidiumbromidbad wurde die DNA unter einem Transilluminator sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert. Es zeigte sich, dass zweimaliges Scheren der DNA optimal für die Erstellung einer Cosmid-Bibliothek war. Nach dem Scheren der genomischen DNA wurde die „End Repair“-Reaktion durchgeführt. In einem Volumen von 80 µl wurden 8 µl 10fach konzentrierter Puffer, 8 µl 2,5 mM dNTP Mix, 8 µl 10 mM ATP, 20 µg gescherte DNA und 4 µl „End Repair“-Enzym-Mix auf Eis gemischt und 45 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von DNA-Ladepuffer (2 µl pro 10 µl Probe) wurde der Ansatz 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert.

Nun wurde die DNA-Fragmente über ein 0,8 % Agarosegel („Low melting point“-Agarose) aufgetrennt. Als Längenstandard wurde wiederum 100 ng T7-DNA auf beiden Seiten der Probe aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde nur der Längenstandard, der rechts und links neben der Probe aufgetragen wurde, im Ethidiumbromidbad angefärbt, um eine Verunreinigung der Probe mit Ethidiumbromid zu vermeiden. Unter dem Transilluminator wurden die beiden Markerbanden markiert, um anschließend die DNA-Fragmente aus dem ungefärbten Gelstück bei ungefähre Größe von 40 kb ausschneiden zu können. Die Gelbande wurde in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

Nach Isolation der Insert-DNA gewünschter Größe wurde eine „in Gel“-Ligation durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die ausgeschnittene Gelprobe für 10 min bei 70 °C aufgeschmolzen und anschließend bei 45 °C 5 min inkubiert.

Nachfolgend wurde die Ligation auf Eis angesetzt: 15,5 µl ddH₂O, 5µl 10fach konz. Fast-Link™-Ligationspuffer, 2,5 µl 10 mM ATP, 1 µl pWEB-Vektor, 25 µl geschmolzene Agarose mit DNA-Fragmenten, 1µl Fast-Link™ DNA-Ligase. Nach dem Mischen der Probe wurde diese für 2 h bei RT inkubiert, und nach Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70 °C wurde der Ansatz bei 45 °C inkubiert und 1 µl GELase™ Agarosegel schneidendes Enzym (1 U/µl) zugegeben. Nach einer Inkubation für 15 min bei 45 °C wurde wiederum eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70 °C vorgenommen.

Am Tag vor der Verpackungsreaktion wurde eine 50 ml LB-Flüssigkultur mit 10 mM MgSO₄ mit einer Kolonie der EPI100 Zellen von einer LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden eine frische 50 ml LB-Kultur mit 5 ml der ÜN-Kultur angeimpft und diese bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 - 1,0 wachsen gelassen. Die Zellen können dann bis zu 72 h bei 4 °C aufbewahrt werden.

Der Verpackungsextrakt wurde aufgetaut, auf Eis gestellt und 25 µl in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert. Der Rest des Verpackungsextrakts wurde wieder bei – 70 °C eingefroren. 10 µl der Ligation wurden mit 25 µl Verpackungsextrakt durch vorsichtiges pipettieren miteinander gemischt, ohne Blasenbildung hervorzurufen, und kurz zentrifugiert. Die Probe wurde 90 min bei 30 °C inkubiert. Nun wurde die zweite Hälfte des Verpackungsextrakts aufgetaut und der Reaktion zugegeben. Wiederum wurde 90 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der Probe 500 µl Phagenverdünnungspuffer zugegeben und durch Invertieren des Gefäßes vermischt. Die Zugabe von 25 µl Chloroform und leichtem Vortexen beendete die Verpackungsreaktion.

Um den Titer der Phagen bestimmen zu können, wurden 10 µl Phagen mit 100 µl EPI100 Zellen (s.o.) vermischt. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurden die Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin als Selektionsmarker ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

Der Titer läßt sich dann nach folgender Formel berechnen:

$$\frac{(\text{Anzahl der Kolonien}) \times (\text{Verdünnungsfaktor}) (1000\mu\text{l/ml})}{(\text{Volumen der ausplattierten Phagen})} = \text{cfu/ml}$$

2.22 Erstellung von Expressions-Bibliotheken

Um das Carotinoid-Gencluster des Stamms P99-3 zu finden, wurde die genomische DNA partiell verdaut und in einen linearisierten Expressionsvektor ligiert. In Gegensatz zu einer Cosmid-Bibliothek wurden hier genomische DNA-Fragmente in der Größe von 2 - 20 kb kloniert. Die Isolation von Klonen mit Carotinidgenen erfolgte durch eine heterologe Komplementation in verschiedenen substratbildenden *E. coli*-Transformanden.

Zunächst wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* partiell verdaut. Hierfür wurden 50 µl genomische DNA mit 5 Units Enzym in einem Volumen von 100 µl in geeignetem Puffer für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Restriktionsenzym 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mit dem vorbereiteten Expressionsvektor (mit *Bam*HI linearisiert und mit Shrimp-Alkaliner-Phosphatase (MBI) dephosphoryliert) ligiert. 1 µl des Ligationsansatzes wurde mittels Elektroporation in kompetente *E. coli*-Zellen des Stamms DH5α transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf 100 LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Transformanden (50 - 150 Klone pro Platte) mit 50 ml LB-Medium abgewaschen werden. Anschließend wurden aus 25 ml der abgewaschenen und vereinten Expressions-Bibliothek die Plasmide mit dem Tip 100-Kit (quiagen) isoliert. Da das Eluat in einem relativ großen Volumen vorlag, wurden die isolierten Plasmide einer Fällung unterzogen und in 30 µl bidestilliertem Wasser rückgelöst.

2.22.1 Screening der Expressions-Bibliothek

Für das Screening der Expressions-Bibliothek wurden die Plasmide in verschiedene Carotinoid-bildende *E. coli*-Transformanden des Stamms JM101 transformiert. Hierbei wurden *E. coli*-Transformanden verwendet, die bereits Gene zur Synthese von β-Carotin auf dem Plasmid pACYC184 trugen, jedoch eine Deletion in einem der Gene vorlag, sodass der Stamm nicht in der Lage war, das Endprodukt β-Carotin zu bilden. Durch die Komplementation mit den pUC-Konstrukten sollte das deletierte Gen komplementiert werden. Ebenfalls wurde eine Transformande eingesetzt, der nur die Gene zur Synthese von Lycopin (pACcrtEBI_{eu}) besaß (siehe Tabelle 2-6), um nach Lycopin umsetzenden Genen zu screenen.

Tabelle 2-6: Komplementationstransformanden zum Screening der Expressions-Bibliothek

Komplementationstransformanden	Screening nach	Farbumschlag
JM101 pACCAR25ΔB	crtB Phytoensynthase	farblos → orange
JM101 pACCAR25ΔI	crtI Phytoendesaturase	farblos → orange
JM101 pACCAR25ΔY	crtY Lycopin Zyklase	gelb → orange
JM101 pACcrtEBI _{eu}	crtY Lycopin Zyklase	rot → orange

Um eine ausreichende Synthese der Carotinoidvorstufen in *E. coli* zu gewährleisten, wurden die Stämme JM101 pACCAR25ΔB, ΔI und ΔY zusätzlich mit einem idi-Gen cotransformiert. Hierfür wurde das Konstrukt pRK404RH7 eingesetzt.

Nach Elektroporation der Expressions-Bibliothek wurden 30 µl der Transformationsansätze auf eine LB-Platte mit entsprechenden Antibiotika und 10 mM IPTG ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten bei RT im Dunkeln inkubiert, um eine gute Carotinoid-Produktion zu ermöglichen. Nach 2 Tagen bei RT wurde ein visuelles Screening der Platten nach anders farbigen Klonen durchgeführt.

2.23 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung von denaturierten Proteinen ihrer Molmasse nach. Durch Veränderung der Acrylamidmenge kann die Porengröße und somit die Trenneigenschaft der Gele verändert werden. Nach Färbung der Gele mit Coomassie-Brilliant-Blue werden die aufgetrennten Proteine sichtbar. Die PAGE wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurden 17,5 % Acrylamidgele verwendet (siehe Tabelle 2-7).

Tabelle 2-7: Zusammensetzung eines 17,5 % SDS-Gels nach Laemmli

17,5 % SDS-Gel	30 ml Trenngel	5 ml Sammelgel
30% Acrylamidlösung (Roth)	17,5 ml	0,835 ml
2% Bis-Acrylamidlösung (Roth)	1,1 ml	0,325 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,7	7,5 ml	----
1 M Tris/HCl pH 6,8	----	0,625 ml
H ₂ O Bidest		3,125 ml
50% (w/v) APS	0,1 ml	25µl
10% (w/v) SDS-Lösung	0,3 ml	50µl
TEMED	10 µl	2,5µl

Die Proteinproben wurden mit dem 1,5 bis zweifachen Volumen an SDS-Probenpuffer (80 mM Tris/HCl pH 6,8, 130 mM Dithioereitol, 4 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 100 °C denaturiert.

Proben von Ammoniumsulfat-Fällungen oder Talonreinigungen wurden zunächst mit 1/10 Volumen 60 % TCA-Lösung versetzt, gevortext und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 10 min bei 14000 Upm. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zwei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Sediment in 20 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und 10 min bei 100 °C denaturiert.

Das Polyacrylamidgel wurde in eine Gelkammer eingespannt und die Laufpuffertanks mit einfachem Laufpuffer (10fach: 144 g Glycerin, 30 g Tris base, 10 g SDS in 1 l bidestilliertem Wasser, Lagerung bei RT) gefüllt und die Taschen mit den Proben gefüllt. Als Molmassenstandard wurde der Marker SDS-7 (Sigma) aufgetragen, der ein Gemisch aus verschiedenen Proteinen mit unterschiedlichen Molmassen (14, 20, 24, 29, 36, 45, 66 kDa) enthält. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V und RT über Nacht (ca. 16 Stunden). Das Gel wurde nach der Auftrennung 10 - 20 min in einer Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung (2,5 g Coomassie Brilliant Blue R250 (Roth) in 450 ml Methanol gelöst, dann Zugabe von 100 ml Eisessig und 450 ml entionisiertem Wasser) unter leichtem Schwenken gefärbt. Zur Entfärbung des Gelhintergrunds wurde das Gel zweimal 15 min in einer Entfärberlösung (450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 450 ml entionisiertes Wasser) unter leichtem Schwenken inkubiert. Kurzzeitig wurden die Gele in einer Lagerlösung (450 ml Methanol, 25 ml Glycerin, 525 ml entionisiertes Wasser) bei 4 °C aufbewahrt und zur Dokumentation fotografiert. Für eine längere Lagerung wurden die Gele zwischen Zellophanfolie aufgespannt und getrocknet.

2.24 Fraktionierende Ammoniumsulfat-Fällung

Die fraktionierende Ammoniumsulfat-Fällung wurde durchgeführt, um ein exprimiertes Protein anzureichern (Harris & Angal, 1989). Die Probe wurde mit 20 %, 40 % und 60 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf Eis präzipitiert und 20 min in einer Sorvall-Zentrifuge bei 15000 Upm (Rotor SS34) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2,5 ml 200 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 resuspendiert. Nun erfolgte eine Entsalzung der Proben mit einer Sephadex G-25M-Säule. 2,5 ml der Proben wurden auf eine mit 25 ml 200 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 equilibrierten PD-10 Sephadex G-25M-Säule (Pharmacia) aufgetragen und mit 3,5 ml 200 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 eluiert.

2.25 Metallionen-Affinitätschromatographie

Für die Metallionen-Affinitätschromatographie wurde TALON (Sigma) verwendet. TALON besteht aus Sepharose die chelatiert gebundene Co^{2+} -Ionen trägt. Diese zweiwertig positiven Ionen binden selektiv rekombinante Proteine, die einen Tag aus Histidin-Resten tragen. Die Probe wurde in 100 bis 200 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 mit 100 mM NaCl aufgenommen und 800 μl TALON versetzt und unter leichtem Schütteln für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf ein Säulchen mit Fritte pipettiert, sodass sich das TALON-Material in der Säule auflagern konnte. Der Durchfluss wurde aufgefangen und die Probe fünfmal mit 2 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 mit 100 mM NaCl gewaschen, die fünfte Waschfraktion wurde wieder aufgefangen. Nachfolgend wurden die gebundenen Proteine mit je 2,5 ml Puffer mit aufsteigender Imidazolkonzentrationen (20 mM, 50 mM, 100 mM und 200 mM in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 mit 100 mM NaCl) vom Säulenmaterial gewaschen. Das Eluat wurde wieder aufgefangen. Nun erfolgte eine Entsalzung der Proben mit einer Sephadex G-25M-Säule. 2,5 ml der Proben wurden auf eine mit 25 ml 200 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 equilibrierten PD-10 Sephadex G-25M-Säule (Pharmacia) aufgetragen und mit 3,5 ml 200 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 eluiert.

2.26 Carotinoideextraktion aus *E. coli*-Kulturen

2.26.1 Extraktion von 50 ml Flüssigkulturen mit Methanol

Die Kulturen wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 60 % in einer Hettich-Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20 ml Methanol resuspendiert und in einen Metallbecher überführt. Nach Zugabe von KOH (6 % Endkonzentration) wurden die Proben für 15 min bei 65 °C in einem Wasserbad inkubiert und nach dem Abkühlen auf RT in einem Scheidetrichter mit 10 % Ether in Petrolether 40° - 60° ausgeschüttelt. Die obere Phase wurde in ein Glastzentrifugenröhrchen überführt und unter Stickstoffbegasung bis zur Trockne eingeengt.

2.26.2 Extraktion von 50 ml Flüssigkulturen mit Aceton

Proben, die 3,4-desaturierte γ -Carotinoide und deren Derivate enthielten wurden mit Aceton extrahiert. Die Proben wurden wie unter 4.2.1 beschrieben geerntet und das Sediment der *E. coli*-Zellen in 20 ml Aceton resuspendiert. Anschließend wurde die Probe 15 min bei 50 °C inkubiert und wie unter 2.24.1 beschrieben mit 10 % Ether in Petrolether 40° - 60° extrahiert.

2.26.3 Extraktion von *in vitro*-Tests

Zum Abstoppen der *in vitro*-Tests wurden diese mit 2 ml Methanol oder 2 ml Aceton versetzt und kurz gevortext. Nach Inkubation der Proben für 10 min bei 65 °C bei Methanol, bzw. 10 min bei 50 °C bei Aceton, und Abkühlen der Proben auf RT wurden sie mit 2 ml 50 % Ether in Petrolether 40° - 60° versetzt und wieder kurz gevortext. Nach Zugabe von 1 - 2 ml entionisiertem Wasser zur besseren Phasentrennung wurden die Proben für 5 min bei 2000 Upm in einer Hettich-Tischzentrifuge zentrifugiert und die Oberphase mit einer Pasteurpipette in ein frisches Röhrchen überführt. Nach dem Einengen der Probe unter Stickstoff bis zur völligen Trockne konnten die Proben analysiert werden.

2.27 Enzym-Aktivitätstest *in vitro*

Für Enzym-Aktivitätstests *in vitro* wurden von einer 5 ml Vorkultur eine 50 ml LB-Flüssigkultur angeimpft und bei 28 oder 37 °C über Nacht angezogen. Nach der Ernte der Kulturen durch Zentrifugation bei 60 % in einer Hettich-Tischzentrifuge wurde der Überstand dekantiert, das Sediment in 5 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert und mit einer French Pressure Cell Press (SLM AMICO) aufgeschlossen. Hierbei wurde ein Aufschlussdruck von 95 MPa gewählt und das zweimal gepresste Zellhomogenat bei 15000 Upm in einer Zentrifuge (Sorvall RC, Rotor SS34) für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 15 ml Falcon-Röhrchen überführt (Zellüberstand) und das Sediment (Zellpellet) in 2 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert. Für eine Überprüfung der Expression wurden je 50 µl der Proben (Zellhomogenat, Zellüberstand und Zellpellet) mit 50 µl SDS -Probenpuffer versetzt, 10 min bei 100 °C denaturiert und über ein 17,5 % SDS-Gel aufgetrennt (siehe 2.23). Als Substrat wurde eine 50 ml Carotinoid-produzierende *E. coli*-Flüssigkultur für 2 - 3 Tage bei 28 °C im Dunkeln wachsen gelassen und wie oben beschrieben aufgeschlossen. Für den *in vitro*-Test wurde Substrat-Zellhomogenat des Substrats eingesetzt. Der *in vitro*-Test wurde in Glaszentrifugenröhrchen angesetzt. Hierfür wurden 500 µl Zellhomogenat, Zellüberstand oder Zellpellet mit 500 µl Substrat-Zellhomogenat gemischt und über Nacht unter Schütteln bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden die Carotinoide der Proben extrahiert und über HPLC analysiert.

2.28 Analyse der Carotinoidzusammensetzung mittels HPLC

Das verwendete HPLC - System bestand aus einer HPLC - Pumpe (ERC, Modell 64), die das verwendete Laufmittel Acetonitril/Methanol/Isopropanol (V/VV) 85:10:5 (15 % B) über den Degaser (ERC-3113) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min pumpte. Daran angeschlossen war die Trennsäule (C18 oder Hypersil) und ein Diode Array Detektor DAD 440 (Kontron Instruments). Die extrahierten Carotinoide wurden in 25 – 100 µl Aceton gelöst und 20 µl mit einer 50 µl Kloehnspritze aufgezogen und über das Rhoedyne-Injektionsventil in das System gespritzt. Der Diode Array Detektor war mit einem PC verbunden, über das Programm Ramona (Version 11.5, Nuclear Interface GmbH) konnten die Chromatogramme aufgenommen und gespeichert werden. Absorptionsspektrum zu prominenten Elutionsgipfeln konnten über das Programm Waters 994 Spectrum (Version 1.61, Universität Konstanz) auf den PC übertragen und gespeichert werden.

Trennsäule C₁₈: Die C₁₈-Trennsäule (Nucleosil 120-3 C₁₈ der Firma Macherey & Nagel, Korngröße 3 µm, Länge XID = 250 × 4,6 mm) wurde standardmäßig zu HPLC-Analyse eingesetzt.

Trennsäule Hypersil: Mit der Hypersil-Säule (C₁₈-Hypersil der Firma Hypurity™, Korngröße 5 µm, Länge XID = 250 × 4,6 mm) wurden mehrfach hydroxylierte Carotinoide auf Lycopin- und γ-Carotin-Basis aufgetrennt, wobei die Säule auf 20 °C gekühlt wurde.

2.29 Identifizierung von Carotinoiden

Zur Identifizierung von Carotinoiden anhand ihrer Retentionszeit und ihrer Absorptionsmaxima wurden Carotinoidstandards über die Säule aufgetrennt. Die nachfolgenden Standards (siehe Tabelle 2-8) wurden verwendet.

Tabelle 2-8: Verwendete Carotinoidstandards zur Identifikation von Carotinoiden

Carotinoid	Rt [min]	Absorptionsmaxima [nm]	Säule	Quelle
Myxol	6,5	445 475 508	Hypersil	<i>Flavobacterium. spec</i> P99-3
1'-Hydroxytorulin	19,6	464 486 522	Hypersil	JM101[pACcrtEBal1al2/pRKcrtC]
1',3-Dihydroxy-torulin		464 486 522	Hypersil	JM101[pACcrtEBal1al2/pRKcrtC/pBBRcrtZ _{eu}]
γ-Carotin	40	430 460 490	Hypersil	JM101[pACcrtEBIal2]
	30		C18	
1'-OH-γ-Carotin	22	430 460 490	Hypersil	JM101[pACcrtEBIal2/pRKcrtC]
1',3-Dihydroxy-γ-Carotin		430 460 490	Hypersil	JM101[pACcrtEBIal2/pRKcrtC/pBBRcrtR]
β-Carotin	55	(425) 455 485	Hypersil	JM101[pACcrtEBIal2]
	38		C18	
Zeaxanthin	8,8	(420) 455 480	Hypersil	JM101[pACcrtEBIal2/pRKcrtR]
Lycopin	31	440 470 505	Hypersil	JM101[pACcrtEBI _{eu}]
	22	440 470 505	C18	
1-Hydroxylycopin	12,4	440 470 505	Hypersil	JM101[pACcrtEBI _{eu} /pRKcrtC]
	16,5		C18	
1,1'-Dihydroxylycopin	9,5	440 470 505	Hypersil	JM101[pACcrtEBI _{eu} /pRKcrtC]
	8,4		C18	
1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin	14,9	455 485 518	Hypersil	JM101[pACcrtEBI _{eu} /pSO50]
	11,8		C18	
1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin	8,6	455 485 518	Hypersil	JM101[pACcrtEBI _{eu} /pSO50]
	7,2		C18	
1,1'-Dihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin	8,1	560 498 528	Hypersil	JM101[pACcrtEBI _{eu} /pSO50]
Neurosporin	19,5	414 440 467	C18	JM101[pACcrtEBI _{rc}]
Monohydroxy-neurosporsin	12,7	414 440 467	C18	JM101[pACcrtEBI _{rc} /pRKcrtC]
Dihydroxy-neurosporin	8,5	414 440 467	C18	JM101[pACcrtEBI _{rc} /pRKcrtC]
DMS	17,4	425 455 485	Hypersil	JM101[pACcrtEBI _{rc} /pSO50]
	12,2		C18	
1'-Hydroxy-DMS	9,8	425 455 485	Hypersil	JM101[pACcrtEBI _{rc} /pSO50]
	8,1		C18	

2.30 Identifizierung von sekundären Hydroxygruppen

Zur Identifizierung einer sekundären Hydroxygruppe an einem Carotinoidmolekül wurde eine chemische Umsetzung mit p-Chloranil durchgeführt. p-Chloranil oxidiert eine sekundäre Hydroxygruppe zu einer Ketogruppe (siehe Abbildung 2-3), woraufhin sich das Absorptionsspektrum des umgesetzten Carotinoids für Ketogruppen charakteristische Glockenform verschiebt.



Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Oxidation einer sekundären Hydroxygruppe am C2-Atom durch p-Chloranil zu einer Ketogruppe.

Die Carotinoidprobe wurde in 500 µl Benzol gelöst, mit 50 µl Ethanol versetzt und eine Spatelspitze p-Chloranil zugegeben. Nach Vortexen wurde die Probe 2 – 3 min im Dunkeln inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 50 % Ether in Petrolether 40° - 60° zugegeben und die Probe wie unter 2.26.3 beschrieben extrahiert.

2.31 Herstellung von Carotinoid-Mutanten von *Flavobacterium spec* P99-3

Von P99-3 wurden Carotinoid-Mutanten hergestellt, um vergleichend zum Wildtyp eine Aussage über den UV-Schutz von Myxol machen zu können.

Für die Herstellung der Mutanten wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt, physikalische Mutagenese mit Hilfe von harter UV-Strahlung und chemische Mutagenese mit EMS (Ethylmethansulfonat).

2.31.1 Physikalische Mutagenese mit UV-Bestrahlung

Zunächst wurde versucht, mit Hilfe von harter UV-Strahlung Carotinoid-Mutanten herzustellen. Ultraviolette Strahlung verursacht bei DNA Punktmutationen durch Dimerisierung von Pyrimidinbasen, ferner kann es zu Rasterschubmutationen aufgrund von Deletionen kommen (Schlegel, 1992).

5 ml einer Flüssigkultur von *Flavobacterium spec* P99-3 wurden in eine sterile Petrischale pipettiert, wobei der Boden der Platte gleichmäßig benetzt wurde. Die Platte wurde dann in eine lichtundurchlässige Kiste gestellt und dort mit einer UV-Lampe (Philipps UV-C-Lampe

TUV 15W/G15T8) bestrahlt. Der Abstand zur Strahlungsquelle und die Strahlungsdauer wurden variiert, um optimale Überlebensraten von circa 10 - 20 % der Ausgangskultur zu erreichen. Anschließend wurden die bestrahlten Kulturen in MB-Medium verdünnt, auf MB - Platten ausplattiert und nach Inkubation von 3 - 4 Tagen im Dunkeln bei circa 20 °C die Kolonien ausgezählt. Die Verdünnung der Kultur vor dem Ausplattieren wurde zunächst getestet, um die Platten auszählen zu können. Anschließend wurden die Platten visuell nach anders farbigen Klonen gescreent.

2.31.2 Chemische Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS)

Bei dem Arbeiten mit hoch mutagenen Reagenzien ist ein großes Maß an Sicherheit nötig. Alle anfallenden Abfälle, die mit EMS direkten Kontakt hatten, mussten gesondert gesammelt und entsorgt werden. EMS führt zur Alkylierung bestimmter Basen der DNA und so zu Punktmutationen im Erbgut (Schlegel, 1992).

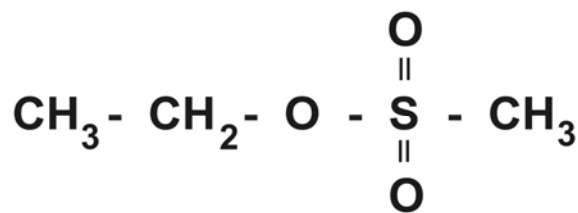


Abb. 2-4: Strukturformel von Ethylmethansulfonat (EMS).

5 ml einer *Flavobacterium spec* P99-3 Flüssigkultur wurden 30 µl einer EMS-Lösung (Konzentration EMS 15 µl/ml Flüssigkeit, Roth) zugegeben, vermischt und bei RT unter leichtem Schütteln unterschiedlich lang inkubiert. Anschließend wurde das EMS durch dreimaliges Waschen der Bakterienkultur mit MB-Medium ausgewaschen. Hierfür wurde die Bakterienkultur 10 min bei 5000 Upm in einer Hettich-Tischzentrifuge zentrifugiert und das Sediment in 5 ml frischem MB-Medium resuspendiert. Nach dem Waschen wurden unterschiedliche Verdünnungen angesetzt und die Zellen auf MB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 20 °C im Dunkeln für 3 - 4 Tage stehen gelassen und die Kolonien anschließend ausgezählt. Auf einer Platte sollten circa 150 - 200 Einzelkolonien vorhanden sein, wobei hier gegenüber der unmutierten Kontrolle noch eine Überlebensrate von 10 - 20 % vorliegen sollte. Anschließend wurden die Platten visuell nach anders farbigen Klonen gescreent.

2.32 Durchführung der UV-Schutzversuche

Um einen möglichen UV-Schutz von *Flavobacterium spec* P99-3 und den Carotinoidmutanten sowie verschiedenen Carotinoid-haltigen *E. coli*-Transformanten zu zeigen, wurden 5 ml Flüssigkulturen angezogen (*E. coli* über Nacht bei 37 °C, *Flavobacterium* 2 Tage bei RT) und 2 ml der Zellkultur mit Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt. 3 ml der Zellen wurden in kleine Petrischalen pipettiert (Durchmesser 3 cm) und mit einem Abstand von 15 cm unter eine UV-Lampe (1,3 W/m²) gestellt. Die Belichtungszeit wurde bei *Flavobacterium*-Kulturen von 0 bis 120 min gewählt, bei *E. coli*-Kulturen von 0 bis 60 min. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden Proben (100 µl) entnommen, diese 1:500.000 verdünnt und je verdünnter Probe drei Petrieschalen mit 100 µl ausplattiert (*Flavobacterien* auf MB-Platten, *E. coli*-Zellen auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika). Die Platten mit *E. coli*-Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, die *Flavobacterium*-Platten bei RT für 2-3 Tage im Dunkeln.

Die Kolonien wurden auf den Platten ausgezählt und von den drei Platten einer Probe der Mittelwert gebildet. Die Überlebensrate der Zellen in Prozent wurde auf den Mittelwert der Kolonienanzahl bei 0 min UV-Belichtung der jeweiligen Probe bezogen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Herstellung der Cosmid-Bibliothek von *Flavobacterium spec P99-3*

Um das Carotinoid-Gencluster aus *Flavobacterium spec P99-3* isolieren zu können, wurde versucht, eine Cosmid-Bibliothek herzustellen. Bei einer Cosmid-Bibliothek werden circa 40 kb große genomische DNA-Fragmente kloniert und über Phagen in die Wirtszellen (*E. coli*) eingeschleust. Sollte das gesamte Carotinoid-Gencluster auf einem Cosmid vorhanden sein und alle Gene der exprimiert werden, sollte die Wirtszelle im Stande sein, Carotinoide zu synthetisieren und kann durch ihre veränderte Färbung identifiziert und isoliert werden.

3.1.1 Cosmid-Bibliothek mit dem SuperCos1-Vektor von Stratagene

Bei der Cosmid-Bibliothek mit dem Stratagene Vektor SuperCos1 wird genomische DNA partiell mit *Sau3AI* geschnitten und in den vorbereiteten Cosmidvektor ligiert. Bei einer Cosmid-Bibliothek (Insertgröße der Cosmide zwischen 31 kb und 45 kb) von bakterieller genomischer DNA (Genomgröße ca. 4000 kb) sollten circa 500 Klone ausreichen, um mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit von 99 % das gesamte Genom in mindestens einem Klon abgedeckt zu haben. Daher wurde der Titer der infizierten Zellen bestimmt. Um eine optimale Ausbeute zu erreichen, wurden verschiedene Wirtszellen (NM554, XL1blue MR, DH5 α) im Vorfeld getestet, wobei XL1blue MR am besten kompetent war.

10 Klone wurden ausgewählt und nach Anzucht die Cosmide isoliert. Die Cosmide wurden einer Restriktion mit *Bam*HI unterzogen. Da die Insert-Fragmente nach Auftrennung über ein Agarosegel unterschiedliche Schnittmuster zeigten, konnte bei der hergestellten Bibliothek von einer großen Diversität ausgegangen werden. Nun wurden 20 LB-Platten mit circa 100 Kolonien ausplattiert und für vier bis fünf Tage im Dunkeln bei RT wachsen gelassen. Keiner der Klone zeigte eine Farbveränderung von der milchig weißen *E. coli*-Farbe zu einer gelblichen oder rötlichen Färbung durch Carotinoide.

Da mehr als viermal so viele Klone gescreent wurden als theoretisch nötig, um auf die hier beschriebene Weise einen positiven Klon zu identifizieren, wurde eine zweite Methode gewählt, um eine Cosmid-Bibliothek herzustellen.

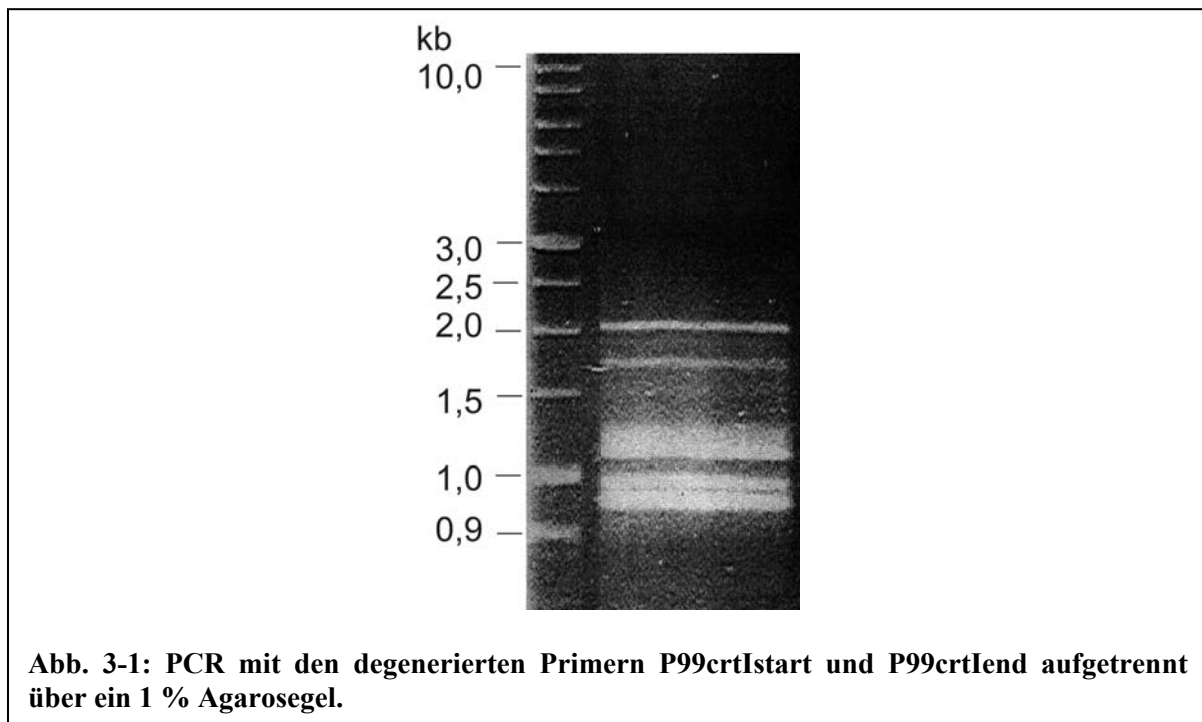
3.1.2 Cosmid-Bibliothek mit dem pWEB-Kit von epicentre

Bei diesem Cosmid-Klonierungskit wurde die genomische DNA mit einer Hamiltonspritze dreimal geschert und die Bruchenden der Fragmente mit dem „End repair“-Enzym des Kits behandelt. Dadurch wurden glatte Enden an den genomische DNA-Fragmenten hergestellt und diese konnten in den fertig gelieferten Vektor ligiert werden. Der Titer der infizierten Zellen lag bei 1.5×10^5 cfu/ml. Circa 1500 Cosmidklone wurden ausplattiert, jedoch konnte kein farbiger Klon visuell identifiziert werden.

Scheinbar liegt das Carotinoid-Gencluster von *Flavobacterium spec* P99-3 in keinem der gescreenten Cosmid-Klone funktionell vor oder die Gene für die Carotinoidbiosynthese verteilt im Genom und nicht als Gencluster vor. Es ist auch möglich, dass die Promotorregion des Carotinoid-Genclusters aus *Flavobacterium spec* P99-3 nicht von den *E. coli*-Wirtszellen erkannt wird und so ein funktionelles Screening über die Bildung von Carotinoiden nicht möglich ist.

3.2 PCR mit degenerierten Primern

Da durch Herstellung von Cosmid-Bibliotheken das Carotinoid-Gencluster von *F. spec* P99-3 nicht gefunden wurde, wurde versucht mit Hilfe der degenerierten Primer der Phytoendesaturase CrtI das homologe Gen aus *Flavobacterium spec* P99-3 mittels PCR zu amplifiziert.



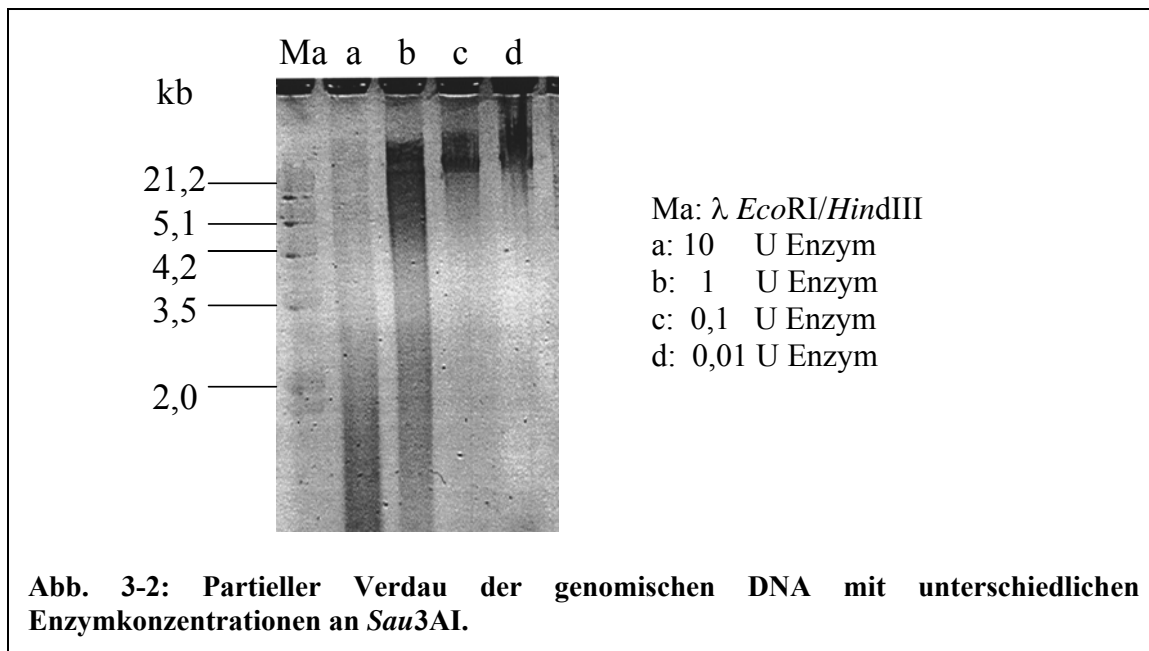
Bei der PCR wurden fünf Banden mit den degenerierten Primern P99crtIstart und P99crtIend bei einer Annealing-Temperatur von 52 °C amplifiziert (Abb. 3-1). Die Amplifikate lagen in einem Größenbereich von circa 0,95 kb, 1 kb, 1,2 kb, 1,75 kb und 2,0 kb.

Es wurde versucht, die Bedingungen für die Reaktion stringenter zu gestalten, jedoch konnte dann keine Amplifikation mehr erreicht werden. Die Banden mit einer ungefähren Größe von 1,3 kb, 1,75 kb und 2,0 kb wurden isoliert und in den pMONT-Vektor kloniert, um die Nucleinsäuresequenz bestimmen zu können. In Datenbankvergleichen der ermittelten Sequenzen bzw. der abgeleiteten Aminosäuresequenzen konnten allerdings keine signifikanten Übereinstimmungen mit bereits bekannten Phytoen-Desaturase-Sequenzen festgestellt werden. Somit war auch diese Strategie fehlgeschlagen, ein Gen des Carotinoid-Genclusters aus *Flavobacterium spec* P99-3 zu identifizieren.

3.3 Herstellung der Expressions-Bibliothek von *Flavobacterium spec* P99-3

Um das Carotinoid-Gencluster des Stammes *Flavobacterium spec* P99-3 zu isolieren, wurde die genomische DNA partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau3AI* verdaut, in den Vektor pUC8 ligiert und in kompetente DH5 α -Zellen transformiert. Für eine Expressions-Bibliothek werden genomische DNA-Fragmente einer Größe von 3 - 20 kb benötigt, also wesentlich kleinere Fragmente als bei einer Cosmid-Bibliothek. Nach Isolation der Plasmide wurden diese in verschiedene Substrat bildende *E. coli*-Stämme transformiert. Durch die Komplementation mit der Expressions-Bibliothek sollte das Carotinoid-Gencluster oder ein Teil davon über ein visuelles Screening isoliert werden.

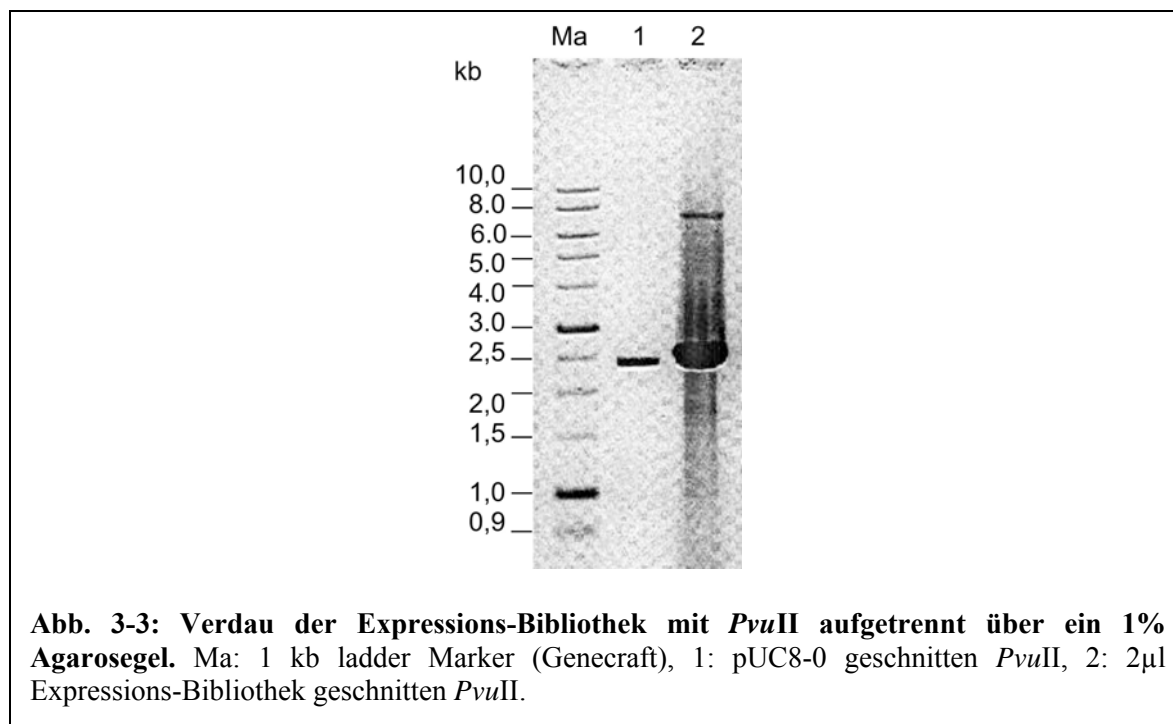
Da für die Expressions-Bibliothek DNA-Fragmente einer Größe von 3 - 20 kb benötigt wurden, wurden zunächst die Bedingungen für den partiellen Verdau optimiert. Gleiche Mengen an genomischer DNA wurden mit 10, 1, 0,1 und 0,01 Unit *Sau3AI* versetzt und für 2 min bei 37 °C inkubiert. Nach Auftrennung von 10 μ l der geschnittenen DNA zeigte sich deutlich (Abb. 3-2), dass der Ansatz mit 10 U Enzym fast vollständig zu Fragmenten einer Größe von circa 2 kb und kleiner geschnitten wurde. Der Ansatz mit 1 U Enzym zeigt geschnittene DNA-Fragmente im Bereich von 30 kb bis ca. 4 kb, der deutlich als Schmier zu erkennen ist (Abb. 3-2, Bahn b).



Dieser partielle Verdau zeigte ideale Fragmentgrößen für eine Expressions-Bibliothek. Bei dem Restriktionsansatz mit 0,1 U Enzym ist ein leichter DNA-Schmier im Bereich von 25 - 40 kb zu erkennen. Der Ansatz mit 0,01 U Enzym zeigte kaum partiell verdaute DNA.

Für die Expressions-Bibliothek wurden 50 μ l genomische DNA wie in Ansatz b partiell verdaut, in den Expressionsvektor pUC8-0 ligiert und mittels Elektroporation in kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 α transformiert. Der Transformationsatz wurde auf 22 LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Transformanden (circa 1000 Klone pro Platte) mit LB-Medium abgewaschen und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt. Anschließend wurden aus 25 ml der Expressions-Bibliothek die Plasmide mit dem Tip 100-Kit isoliert.

Da das Eluat in einem relativ großen Volumen vorlag, wurde die Plasmid-Isolation einer Fällung unterzogen und in 30 μ l Aqua Bidest rückgelöst. Zur Überprüfung der Expressions-Bibliothek wurden 3 μ l der Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *PvuII* geschnitten. Der Vektor pUC8-0 besitzt 2 *PvuII*-Schnittstellen, jeweils eine rechts und links von der MCS. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass alle Insert-Fragmente aus dem Vektor geschnitten wurden. In Abbildung 3-3 ist eine stark hervorgehobene Vektor-Bande in Höhe der Bande der pUC-Kontrolle zu erkennen, sowie viele DNA-Banden unterschiedlicher Größe im Hintergrund. Die Expressions-Bibliothek scheint in ausreichender Menge und mit Insert-Fragmente unterschiedlicher Größe vorzuliegen.



15 Klone wurden gepickt und angezogen, die Plasmide isoliert und einer Restriktion mit *Bam*HI unterzogen. Alle 15 Klone zeigten nach Auftrennung über ein Agarosegel ein unterschiedliches Schnittmuster (Daten nicht abgebildet).

Nun wurde die gereinigte Plasmid-DNA für die heterologe Komplementation in die verschiedenen Carotinoid bildenden *E. coli*-Transformanden des Stammes JM101 mittels Elektroporation transformiert (siehe Tabelle 3-1). Um eine ausreichende Synthese der Carotinoid-Vorstufen in *E. coli* zu gewährleisten, wurden die Transformanden JM101[pACCAR25ΔB], JM101[pACCAR25ΔI] und JM101[pACCAR25ΔY] zusätzlich mit Konstrukt pRKRH7, welches das Gen der IPP-Isomerase (*idi*) aus *Haematococcus pluvialis* trägt, cotransformiert (Kajiwara, 1997).

Tabelle 3- 1: Verwendete *E. coli*-Transformanden zur Komplementation der Expressions-Bibliothek

Transformande für die Komplementation	Screening nach	Farbumschlag der Kolonie
JM101[pACCAR25ΔB/pRKRH7]	<i>crtB</i> Phytoen-Synthase	farblos → orange
JM101[pACCAR25ΔI/pRKRH7]	<i>crtI</i> Phytoen-Desaturase	farblos → orange
JM101[pACCAR25ΔY/pRKRH7]	<i>crtY</i> Lycopin Zyklase	gelb → orange
JM101[pACcrtEBI _{eu}]	<i>crtY</i> Lycopin Zyklase	rot → orange

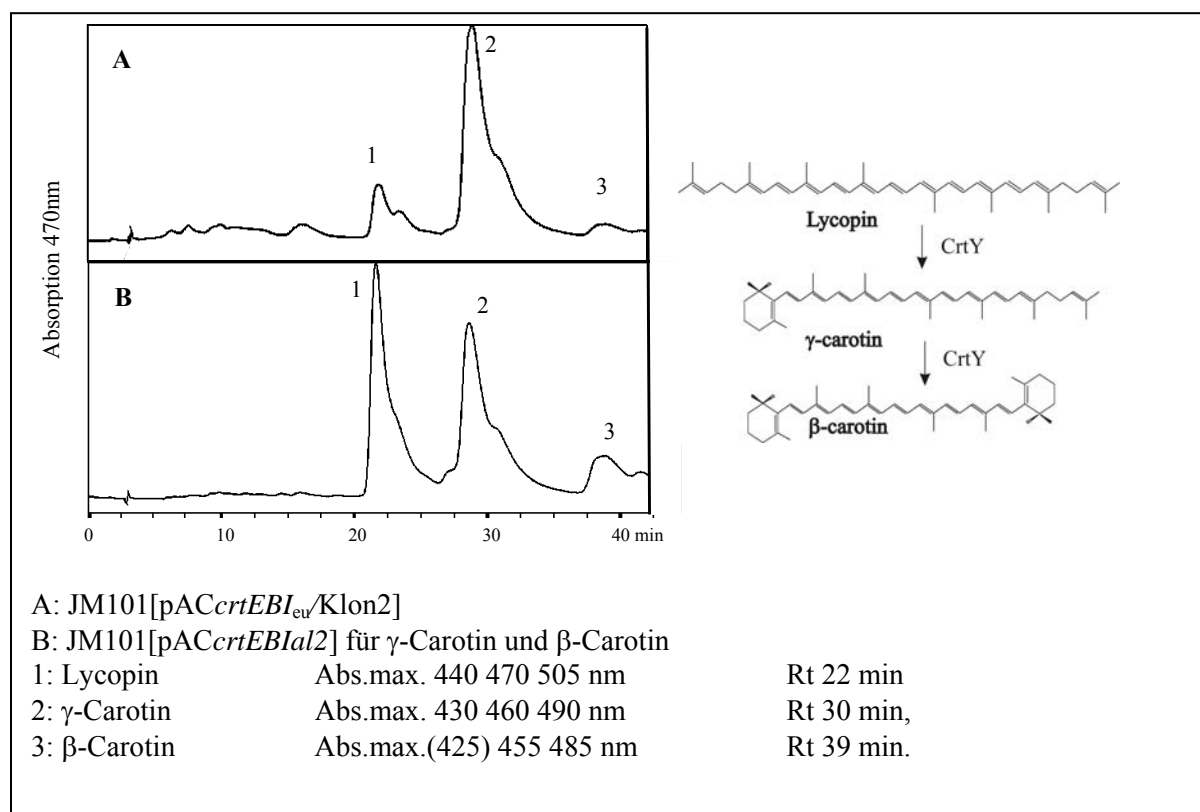
Nach Elektroporation der Expressions-Bibliothek wurden die Transformationsansätze ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert und für weitere 1 - 3 d bei RT im Dunkeln stehen gelassen, um eine gute Carotinoid-Produktion zu ermöglichen. Pro Komplementations-Transformande wurden circa 20.000 Klone gescreent. Visuell konnte bei den

Komplementations-Transformanden

JM101[pACCAR25ΔB/pRKRH7],

JM101[pACCAR25ΔI/pRKRH7] und JM101[pACCAR25ΔY/pRKRH7] bei keinem Klon ein Farbumschlag festgestellt werden.

Für das Screening nach einer Lycopin Zyklase wurde die Expressions-Bibliothek mit der Lycopin bildenden Transformande JM101[pACcrtEBI_{eu}] komplementiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C konnte bereits ein gelber Klon (K2) gegenüber den Lycopin bildenden rötlichen Klonen identifiziert werden. Dieser gelbe Klon und zur Kontrolle der γ -Carotin-Produzent JM101[pACcrtEBIal2] wurden angezogen und die Carotinoide für eine HPLC-Analyse extrahiert.



Die Messung der Probe mittels HPLC (C18-Säule) zeigt im Elutionsprofil A in Abbildung 3-4, dass das Carotinoid-Gemisch von K2 aus dem Substrat Lycopin (Elutionsgipfel 1) mit den Abs.max. 440 470 505 nm und der Rt von 22 min und den Produkten γ -Carotin (Gipfel 2) mit den Abs.max. 430 460 490 nm und der Rt 30 min und β -Carotin (Gipfel 3) mit den Abs.max. (425) 455 485 nm und der Rt 39 min bestand. Als Standard für γ -Carotin und β -Carotin wurden die Carotinoid-Produkte der Transformande JM101[pACcrtEBIal2] gemessen (Elutionsprofil B). Diese *E. coli*-Zellen tragen neben den Genen für die Lycopin-Produktion auch das Gen der Lycopin Zyklase *al-2* aus dem Pilz *Neurospora crassa*, die einen hohen

Anteil an γ -Carotin (Gipfel 2) mit dem Abs.max. 430 460 490 nm und der Rt 30 min und einen geringen Anteil an β -Carotin (Gipfel 3) mit den Abs.max. (425) 455 485 nm und der Rt 39 min produziert.

K2 zeigt Lycopin Zyklase-Aktivität, wobei γ -Carotin das Hauptprodukt ist und β -Carotin nur in Spuren zu detektieren ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass auf dem Plasmid pUCK2 der Expressions-Bibliothek von *Flavobacterium spec* P99-3 mindestens das Gen für eine Lycopin Zyklase vorliegt.

Um eine Kontamination auf den LB-Platten der Expressions-Bibliothek mit der Lycopin Zyklase aus *Neurospora crassa* ausschließen zu können, wurde die Plasmid-DNA von pUCK2 isoliert und einer Restriktionsanalyse im Vergleich zur Plasmid-DNA von pACcrtEBIal2 unterzogen. Die DNA-Fragmente bei einer Restriktion mit *EcoRI* von pUCK2 zeigte deutliche Unterschiede zu den Fragmenten von pACcrtEBIal2 (Daten nicht abgebildet).

3.4 Sequenzierung von Klon2 der Expressions-Bibliothek

Klon2 der Expressions-Bibliothek wurde mit den im Vektor pUC8-0 bindenden Primern M13 und M13reverse ansequenziert. Die Sequenzen zeigten jedoch im Datenbankenvergleich keinerlei Homologie zu bekannten Carotinoidgenen. Daher wurde pUCK2 zunächst einer Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Acc65I*, *ApaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *NcoI*, *NotI*, *SacI* und *XhoI* unterzogen.

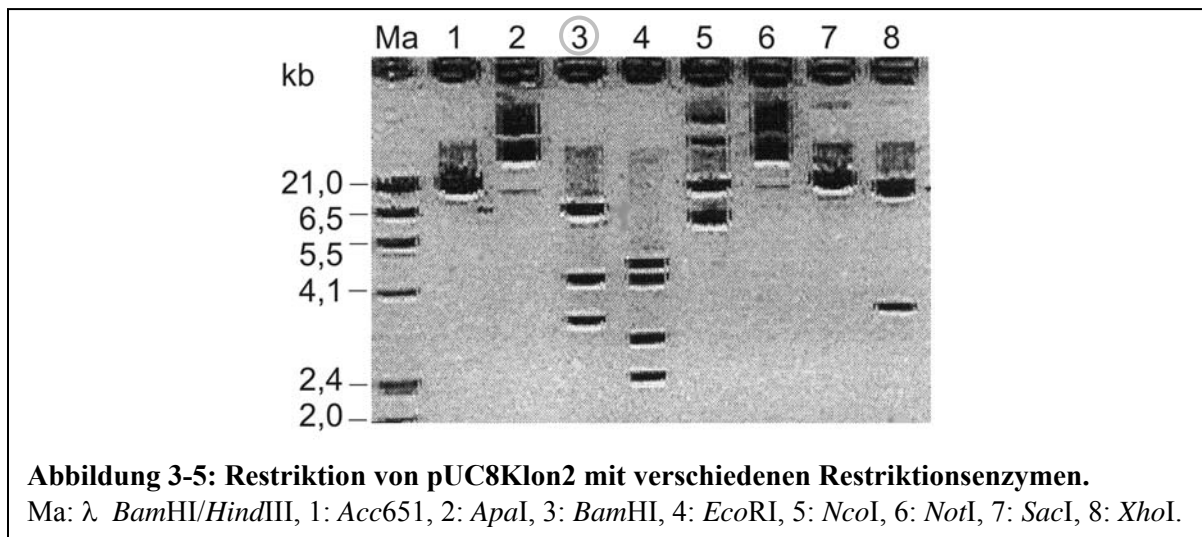
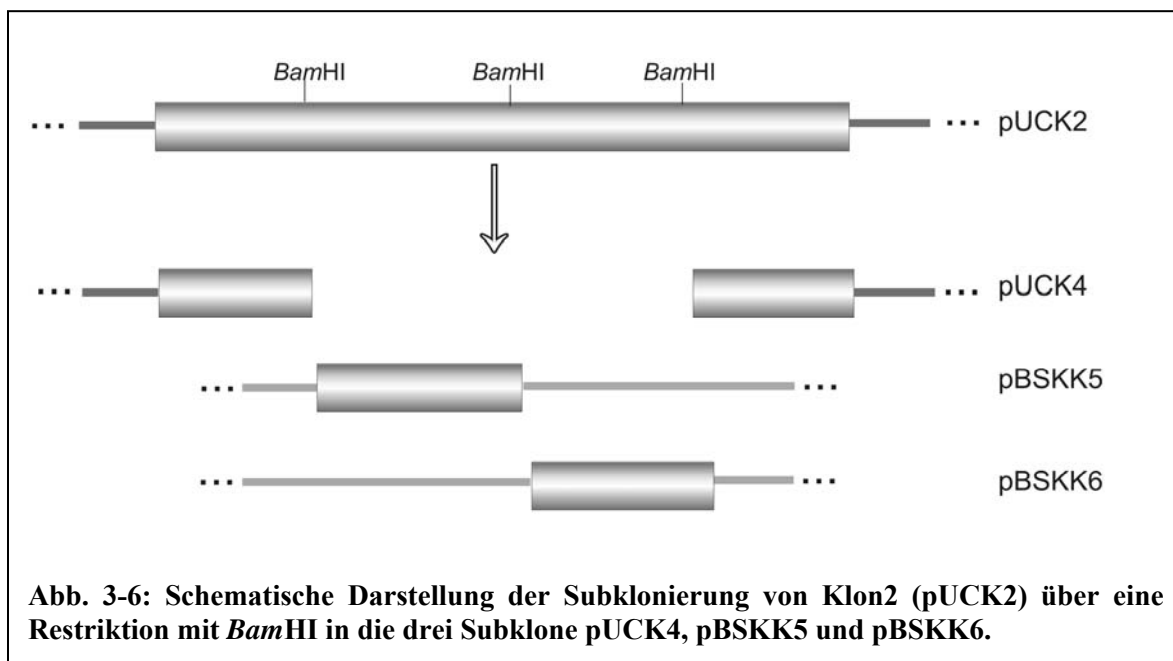


Abbildung 3-5 zeigt die aufgetrennten DNA-Fragmente von pUCK2 geschnitten mit acht verschiedenen Restriktionsenzymen. Jene Proben, die mit den Enzymen *Acc65I*, *ApaI*, *NcoI*, *SacI* und *XhoI* restrigiert wurden, zeigen relativ große DNA-Fragmente im Bereich von 6,5 bis 21 kb. Der mit *EcoRI* geschnittene Ansatz besitzt vier Fragmente in der Größe von ca. 5

kb, 4,5 kb, 3 kb und 2,5 kb (Spur 4). Die Restriktion von pUCK2 mit *Bam*HI zeigt drei DNA-Fragmente im Bereich von 6,5 kb, 4,4 kb und 3,6 kb (Spur 3). Somit kann die ungefähre Größe des Insert-Fragments von pUCK2 mit circa 15 kb angegeben werden.

Für eine Subklonierung des großen Insert-Fragments wurde eine Restriktion mit *Bam*HI durchgeführt, die drei Fragmente isoliert und zunächst einer Selbstligation unterworfen. Hierbei sollte das DNA-Fragment gefunden werden, welches die Reste des pUC8-0 Vektors aus Klon2 trägt. Das Konstrukt, das nach Religation Ampicillin-resistente Klone hervorbrachte wurde mit K4 bezeichnet und liegt im Vector pUC8-0 vor. Die anderen beiden Fragmente wurden in einen mit *Bam*HI linearisierten und dephosphorylierten pBluescript-Vektor ligiert und wurden als pBSKK5 und pBSKK6 bezeichnet.



Nun wurden die drei Plasmide (pUCK4, pBSKK5 und pBSKK6) zur Sequenzierung mit vektorspezifischen Primern zur Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) geschickt. Zunächst wurden alle drei Plasmide mit den Vektor-Primern M13reverse und M13 sequenziert, wobei die Sequenzierung mit dem M13reverse Primer als *.fwd und die Sequenzierung mit dem M13 Primer als *.rev bezeichnet wurde.

Anhand der Sequenzdaten von circa 800 bp pro Sequenzierung konnte mit dem Programm DNASIS die Aminosäuresequenz in allen möglichen Leserastern bestimmt werden und nachfolgend mit der Datenbank (BLAST) verglichen werden.

Zunächst konnte die Subklonierung der drei Insert-Fragmente aus K2 in den Vektor pBSK (K5 und K6) und pUCK4 anhand der Sequenzen bestätigt werden. Da die Sequenzierung K6.rev beim Sequenzvergleich in der Datenbank schwache Homologien zu Phytoen-

Desaturase-Genen aus unterschiedlichen Organismen zeigte (siehe Tabelle 3-2), kann davon ausgegangen werden, dass hier das Carotinoid-Gencluster von *Flavobacterium spec* P99-3 vorliegt.

Tab. 3-2: Ähnliche Phytoen Desaturasen zu den Sequenzdaten von K6.rev

Phytoen Desaturase aus	E-Value
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	1e ⁻¹⁹
<i>Rhodospirellula baltica</i>	2e ⁻¹⁷
<i>Staphylococcus aureus</i>	8e ⁻¹⁷
<i>Methylobacterium extorquens</i>	2e ⁻¹⁶

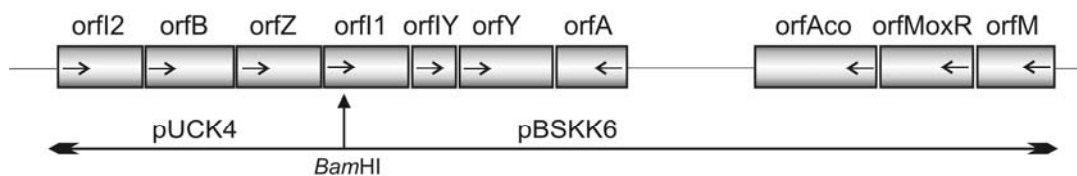
Weitere Sequenzierungen wurden durchgeführt, die Primer hierfür wurden anhand der Daten der vorherigen Sequenzierung erstellt und als Templat wurde statt K6 der ursprüngliche pUCK2 verwendet. Es wurden ca. 15 kb von Klon2 im „genomic walking“-Verfahren sequenziert.

Anhand von Datenbankvergleichen konnte ein hypothetisches Carotinoid-Gencluster für *Flavobacterium spec* P99-3 (siehe Abbildung 3-7) erstellt werden.

Der sequenzierte Bereich zeigt 10 offene Leseraste von denen 6 ORFs (orfI2, orfB, orfZ, orfI1, orfIY und orfY) direkt hintereinander in der gleichen Richtung orientiert vorliegen und wahrscheinlich über den gleichen Promotor gesteuert werden. orfA liegt direkt neben orfY, jedoch in der andere Richtung orientiert. Nach orfA kommt ein Bereich von circa 1000 bp, der kein offenes Leseraster beinhaltet. In diesem Bereich sind auch keine Promotorregionen für orfA erkennbar. Anschließend wurden noch drei ORFs (orfAco, orfMoxR und orfM) sequenziert, die wahrscheinlich nicht mehr zum Carotinoid-Gencluster gehören aber in gleicher Orientierung wie orfA vorliegen.

orfI1 und orfI2 besitzen beide Sequenzhomologien auf Aminosäureebene zu Phytoen Desaturasen, orfB hat mit 50 % identischen Aminosäuren eine große Homologien zur Squalen / Phytoen Synthasen aus *Cytophaga hutchinsonii*. orfZ zeigt große Ähnlichkeit zu einer β -Carotin-Hydroxylase aus *Novosphingobium aromaticivoran*. orfIY besitzt nur sehr schwache Homologie zu einem konservierten Protein aus verschiedenen crt-Clustern aus *Natronomonas pharaonis* mit einer schwachen Identität von 27%. Auf Proteinebene hat orfA ca. 30 % Identität zu den Oxygenasen CrtA aus *Rhodovulum sulfidophilum* und *Rhodobacter sphaeroides*. orfAco besitzt 74 % Identität zur Aconitase A aus *Cytophaga hutchinsonii* und

orfMoxR zeigt 62 % Identität zu einer MoxR ähnlichen ATPase aus *Cytophaga hutchinsonii* auf Aminosäureebene. orfM zeigt keinerlei Sequenzhomologie zu den Datenbankeinträgen.



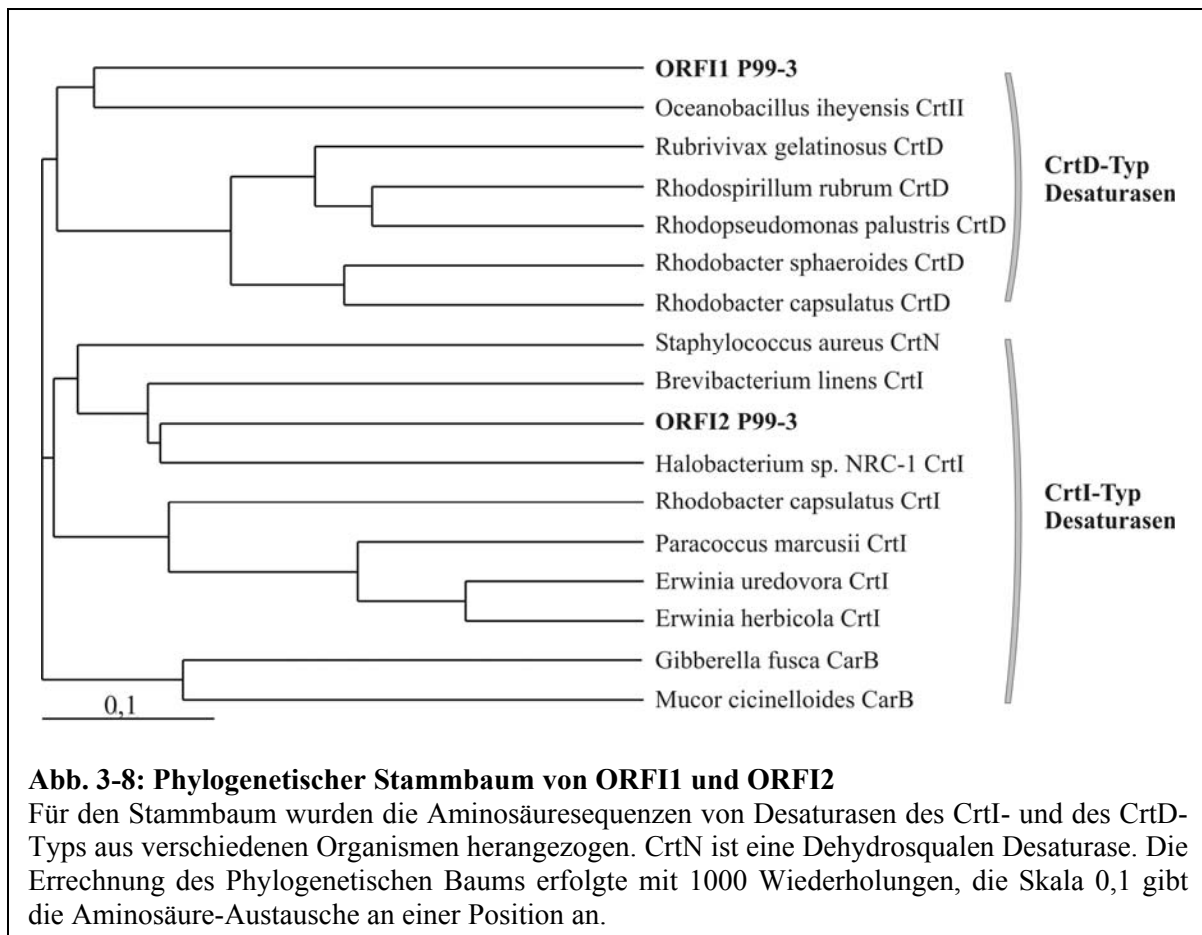
ORF	Aminosäuren	Aminosäure-Sequenzhomologie zu	Identität in %
orf12	487	Phytoen Desaturase aus <i>Halobacterium sp.</i> NRC-1 Phytoen Desaturase aus <i>Natronomonas pharaonis</i>	40 40
orfB	279	Phytoen/Squalen Synthase aus <i>Cytophaga hutchinsonii</i> Phytoen Synthase aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	50 39
orfZ	148	Sterol Desaturase aus <i>Cytophaga hutchinsonii</i> β -Carotin Hydroxylase <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	54 43
orf11	488	Phytoen Desaturase aus <i>Prothecochloris aesuarii</i> Phytoen Desaturase aus <i>Oceanobacillus iheyensis</i>	32 30
orf1Y	136	konserviertes crt-Cluster Protein aus <i>Natronomonas pharaonis</i>	27
orfY	377	Lycopin Zyklase aus <i>Chloroflexus aurantiacus</i> Lycopin Zyklase aus <i>Streptomyces griseus</i>	32 31
orfA	239	Monooxygenase aus <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> Monooxygenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	32 31
orfAco	674	Aconitase A aus <i>Cytophaga hutchinsonii</i> mitochond. Aconitase aus <i>Aspergillus fumigatus</i>	74 60
orfMoxR	342	MoxR-ähnl. ATPase aus <i>Cytophaga hutchinsonii</i>	62
orfM	141	zeigt keine Sequenzhomologie	--

Abb. 3-7: Hypothetisches Carotinoid-Gencluster von *Flavobacterium spec* P99-3.

Die ORFs wurden anhand von Sequenzhomologien im Datenbankvergleich benannt. Die Pfeile zeigen die Orientierung der hypothetischen Gene im Cluster an. In der Tabelle sind die beiden homologsten Proteine aus der Datenbank mit Angabe der identischen Aminosäuren in Prozent zu jedem ORF des sequenzierten Bereichs zusammengefasst.

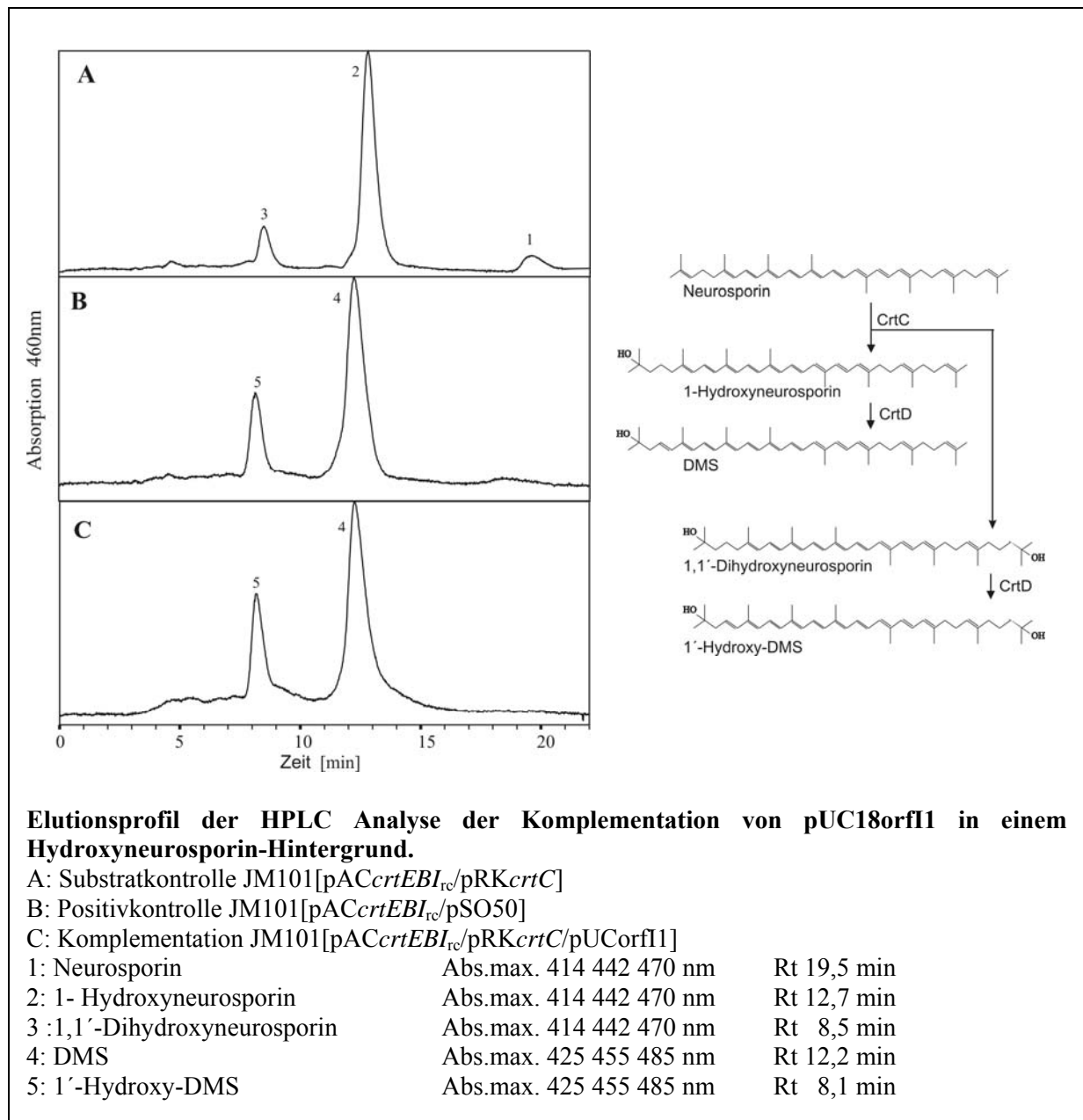
3.5 orf11 und orf12

Im hypothetischen Carotinoid-Gencluster von *Flavobacterium spec* P99-3 wurden zwei ORFs identifiziert, die Sequenzhomologien zu Desaturasen zeigten. Im Carotinoidbiosyntheseweg von Myxol muss mindestens eine Desaturase, nämlich die Phytoendesaturase CrtI, vorkommen. Des Weiteren könnte ebenfalls eine 3,4-Desaturase des CrtD-Typs im Biosyntheseweg von Myxol vorkommen. Um zunächst anhand der Sequenzdaten eine Einordnung der beiden ORF11 und ORF12 vornehmen zu können, wurde ein phylogenetischer Stammbaum mit verschiedenen Desaturasen des CrtI- und CrtD-Typs durchgeführt (siehe Abbildung 3-8).



Anhand der Sequenzvergleiche von ORF11 und ORF12 mit den Aminosäuresequenzen von CrtI- und CrtD-Typ Desaturasen zeigt sich, dass ORF11 große Sequenzhomologie zu den CrtD-Typ Desaturasen aufweist, während ORF12 größere Sequenzhomologie zu den CrtI-Typ Desaturasen aufweist. Die beiden ORFs aus dem Carotinoid-Gencluster wurden in den Vektor pUC18 kloniert. Diese Klonierungen wurde von Dr. Maki Teramoto, Japan, durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Konstrukte pUC18orf11 und pUC18orf12 wurden in verschiedene Carotinoid- produzierende *E. coli*-Zellen transformiert. Hierfür wurde für eine eventuelle CrtI-Desaturase-Aktivität der Phytoen-Produzent JM101[pACcrtEB] ausgewählt und der Hydroxyneurosporin-Produzent JM101[pACcrtEBI_{rc}/pRKcrtC].

Bei der Komplementation von pUC18orf12 konnte weder eine Umsetzung von Phytoen noch eine Umsetzung von Hydroxyneurosporin mittels HPLC- Analyse festgestellt werden. Bei der Expression von pUC18orf11 in einem Phytoen-Hintergrund konnte ebenfalls keine Umsetzung des Substrats detektiert werden.



In Abbildung 3-9 sind die HPLC-Analysen (C18-Säule) der Komplementation von orfI1 und die Kontrollen in einem Hydroxyneurosporin-Hintergrund zu sehen. Im Elutionsprofil A zeigt die Substratkontrolle des Hydroxyneurosporin-Produzenten drei Elutionsgipfel.

Gipfel 1 ist Neurosporin mit den Abs.max. von 414 442 470 nm und einer Rt von 19,5 min, Gipfel 2 1-Hydroxyneurosporin mit den Abs.max. von 414 442 470 nm und einer Rt von 12,7 min und Gipfel 3 1,1'-Dihydroxyneurosporin mit den Abs.max. von 414 442 470 nm und einer Rt von 8,5 min.

In Elutionsprofil B ist die Positivkontrolle JM101[pACcrtEBl_{rc}/pSO50] abgebildet. Der Carotinoid-Extrakt zeigt nach Auftrennung zwei Elutionsgipfel: DMS (Gipfel 4) mit den Abs.max. 425 455 485 und einer Rt von 12,2 min und 1'-Hydroxy-DMS (Gipfel 5) mit den Abs.max. 425 455 485 und einer Rt von 8,1 min. In der Komplementation von pUCorfI1 in

einem Hydroxyneurosporin-Hintergrund konnten zwei Produkte detektiert werden. Gipfel 4 entspricht DMS und Gipfel 5 1'-Hydroxy-DMS mit den entsprechenden Abs.max. und Retentionszeiten wie denen in der Positivkontrolle (Elutionsprofil B).

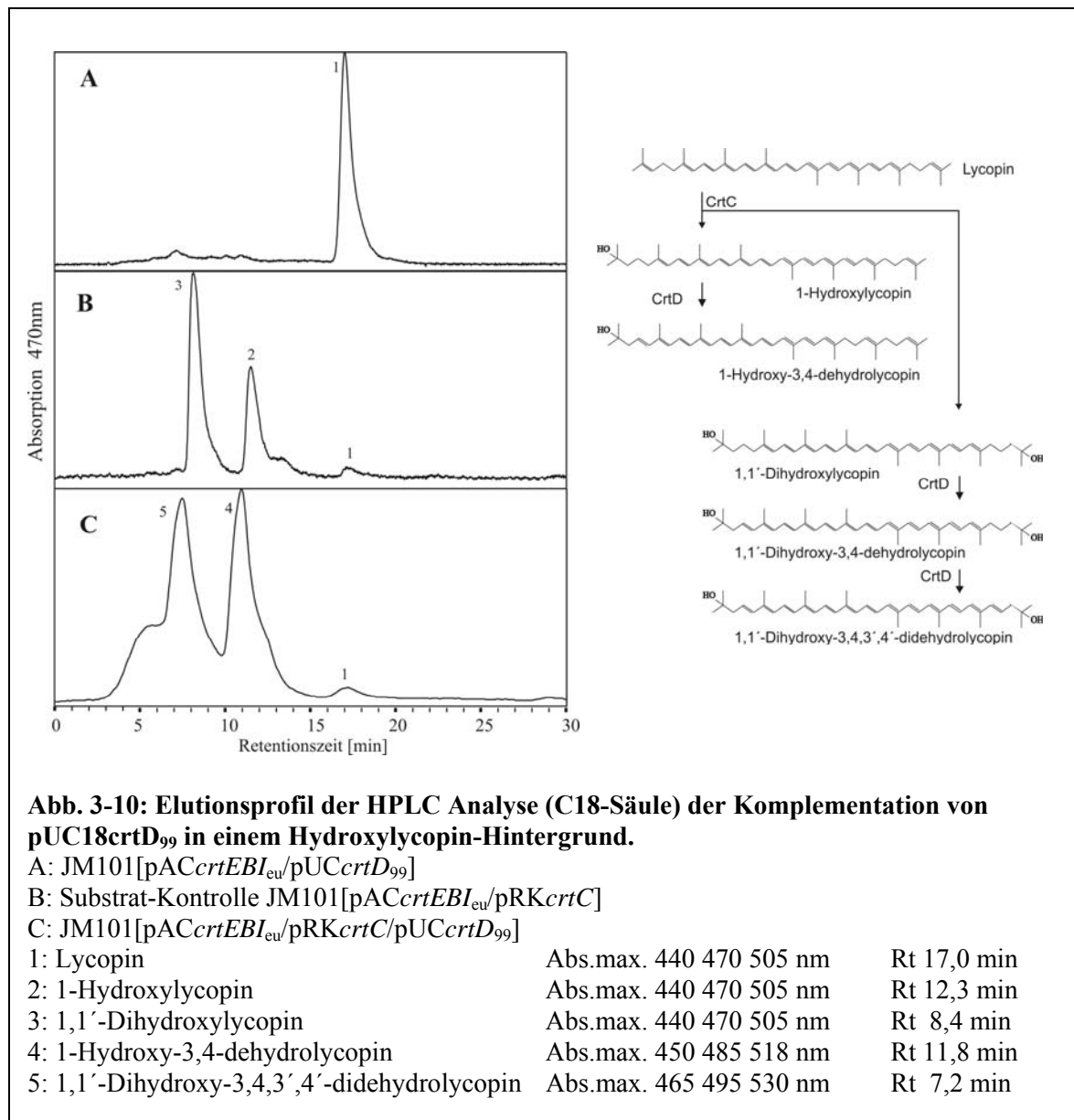
Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass orfI1 einer 3,4-Desaturase entspricht, da 1-Hydroxyneurosporin und 1,1'-Dihydroxyneurosporin zu DMS bzw. 1'-Hydroxy-DMS umgesetzt wurde. Daher kann orfI1 als 3,4-Desaturase angesehen werden und wird fortan als CrtD₉₉ bezeichnet.

Nun wurde mittels Komplementation getestet, ob CrtD₉₉ auch andere Substrate wie Hydroxylycopin und Hydroxy- γ -Carotin zwischen C3- und C4-Atom desaturieren kann.

Die 3,4-Desaturase aus *Flavobacterium spec* P99-3 wurde in Abbildung 3-10 in einem Lycopin- und einem Hydroxylyxopin-Hintergrund komplementiert. Im Elutionsprofil A ist die Komplementation von crtD₉₉ in dem Lycopin-Produzenten JM101[pACcrtEBI_{eu}] zu sehen. Hierbei ist auffällig, dass nur der Substrat-Elutionsgipfel Lycopin (1) mit den Abs.max. 440 470 505 nm und einer Rt von 17 min zu erkennen ist. CrtD₉₉ ist nicht in der Lage Lycopin zwischen C3- und C4-Atom zu desaturieren.

Im Elutionsprofil B ist die Substrat-Kontrolle zu sehen, die Transformante JM101[pACcrtEBI_{eu}/pRKcrtC] produziert drei Carotinoide: Lycopin (Elutionsgipfel 1), 1-Hydroxylycopin (Gipfel 2) mit den Abs.max. 440 470 505 nm und einer Rt von 12,3 min und 1,1'-Dihydroxylycopin (Gipfel 3) mit den Abs.max. 440 470 505 nm und der Rt von 8,4 min. Im Elutionsprofil C wurde crtD₉₉ in den Hydroxylycopin produzierenden Transformante komplementiert. Neben dem Substrat-Gipfel Lycopin (1) sind zwei weitere Elutionsgipfel zu erkennen: 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin (Gipfel 4) mit den Abs.max. 450 485 518 nm und einer Rt von 11,8 min und 1-1'-Dihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin (Gipfel 5) mit den Abs.max. 465 495 530 nm und einer Rt von 7,2 min.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass CrtD₉₉ offenkettige Carotinoide wie 1-Hydroxyneurosporin und 1-Hydroxylycopin, die am C1-Atom hydroxyliert sind, zwischen dem C3- und C4-Atom desaturieren kann.



Weiterhin wurde getestet, ob CrtD₉₉ auch einseitig zyklisierte Substrate wie γ -Carotin oder 1-Hydroxy- γ -carotin desaturieren kann. Zur besseren Auftrennung der hydroxylierten Carotinoid-Produkte im Elutionsprofil der HPLC-Analyse, wurden alle Proben über eine Hypersil Säule bei 20 °C aufgetrennt. In Abb. 3-11 sind die Elutionsprofile der Carotinoidextrakte der Komplementationen abgebildet. Im Elutionsprofil A wurde zur Orientierung auf der Hypersil-Säule der γ -Carotin-Produzent JM101[pACcrtEBI_{al2}] mit den drei Elutionsgipfeln Lycopin (1) mit dem Abs.max. 440 470 505 nm und einer Rt von 31 min, γ -Carotin (2) mit den Abs.max. 430 460 490 nm und einer Rt von 40 min und β -Carotin (3) mit den Abs.max. (420) 455 480 nm und einer Rt von 56 min aufgetrennt.

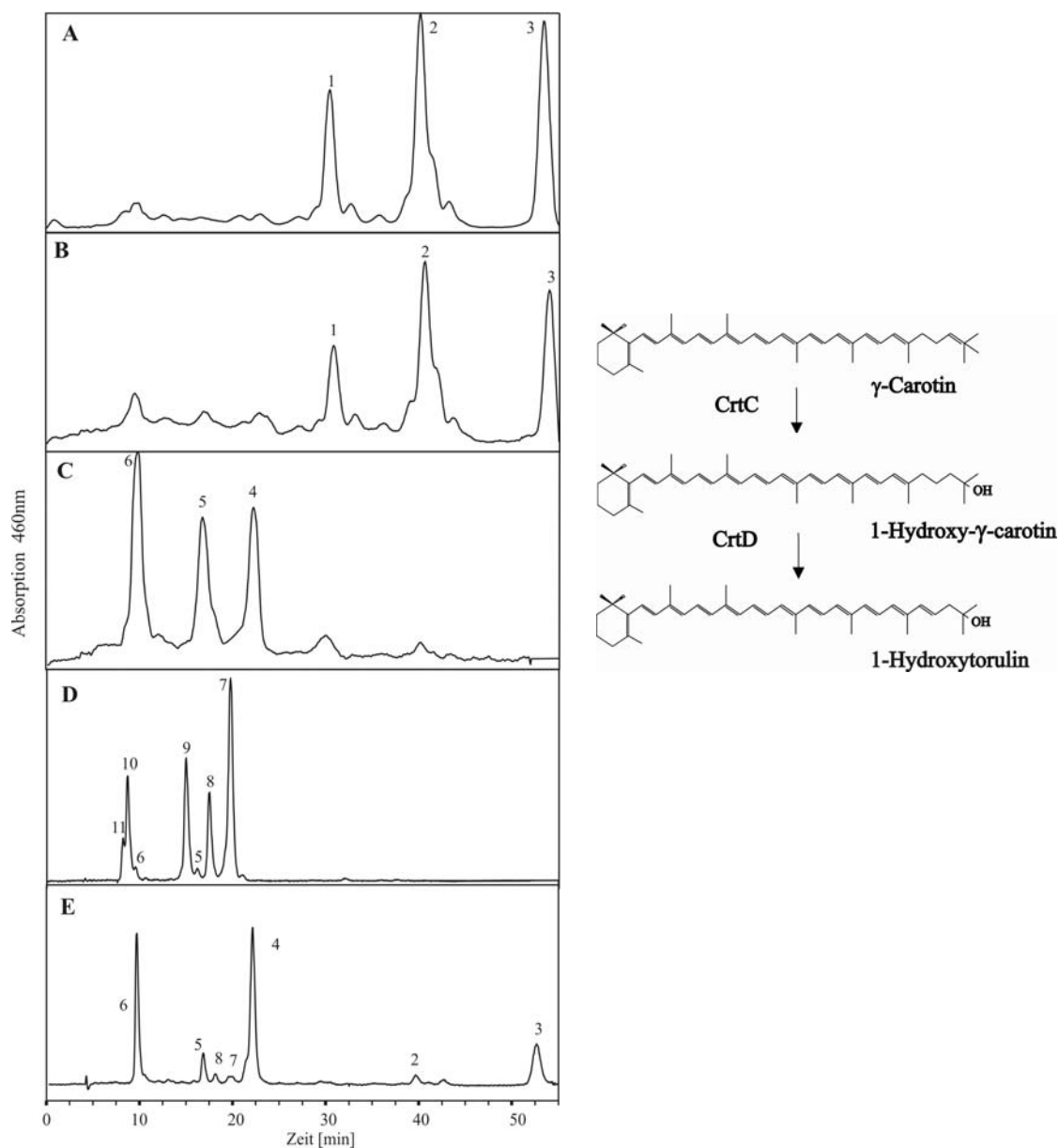


Abb. 3-11: Elutionsprofil der HPLC Analyse der Komplementation von pUC18crtD₉₉ in einem Hydroxy- γ -Carotin-Hintergrund.

A: Substratkontrolle γ -Carotin JM101[pACcrtEBlal2]

B JM101[pACcrtEBlal2/pUCcrtD₉₉]

C: Substratkontrolle Hydroxy- γ -Carotin JM101[pACcrtEBlal2/pFL200]

D: JM101[pACcrtEBlal2/pRKcrtC/pUCcrtD₉₉]

E: Positivkontrolle JM101[pACcrtEBlal2/pRKcrtC/pSO53] (*crtD* aus *Rub. gelatinosus*)

1: Lycopin	Abs.max. 440 470 505 nm	Rt 31 min
2: γ -Carotin	Abs.max. 430 460 490 nm	Rt 40 min
3: β -Carotin	Abs.max. (420)455 480 nm	Rt 56 min
4: 1'-Hydroxy- γ -carotin	Abs.max. 430 460 490 nm	Rt 22 min
5: 1-Hydroxylycopin	Abs.max. 440 470 505 nm	Rt 16,5 min
6: 1-1'-Dihydroxylycopin	Abs.max. 440 470 505 nm	Rt 9,5 min
7: 1'-Hydroxytorulin	Abs.max. 440 475 510 nm	Rt 19,6 min
8: DMS	Abs.max. 425 455 487 nm	Rt 17,4 min
9: 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin	Abs.max. 450 485 518 nm	Rt 14,9 min
10: 1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin	Abs.max. 450 485 518 nm	Rt 8,6 min
11: 1,1'-Dihydroxyd-3,4,3',4'-didehydrolycopin	Abs.max. 465 495 530 nm	Rt 8,1 min

Das Konstrukt pUCcrtD₉₉ wurde mit der γ -Carotin produzierenden Transformande komplementiert (Elutionsprofil B), auch hier konnte die 3,4-Desaturase die Substrate Lycopin (1), γ -Carotin (2) und β -Carotin (3) nicht umsetzen, da diese Carotinoide keine Hydroxygruppe am C1 besitzen.

Im Elutionsprofil C wurde die γ -Carotin produzierende Transformande mit der Hydratase CrtC aus *Rhodobacter capsulatus* (auf dem Plasmid pFL200) komplementiert, die am C1-Atom Hydroxygruppen einfügt. Im Elutionsprofil sind drei Produkte als Elutionsgipfel zu sehen: 1'-Hydroxy- γ -carotin (4) mit dem Abs.max 430 460 490 nm und einer Retentionszeit von 22 min, 1-Hydroxylycopin (5) mit den Abs.max. 440 470 505 nm und einer Rt von 16,5 min und 1,1'-Dihydroxylycopin (6) mit den Abs.max. 440 470 505 nm und einer Rt von 9,5 min. Die Komplementation von CrtD₉₉ in der 1'-Hydroxy- γ -Carotin produzierenden Transformande JM101[pACcrtEBIal2/pRKcrtC] ist im Elutionsprofil D zu sehen. Hier wurde die Hydratase CrtC aus *Rhodobacter capsulatus* im Vektor pRK404 verwendet, da das pFL200-Konstrukt nicht kompartibel mit dem pUC18crtD₉₉-Konstrukt ist und beide Vektoren die gleiche Antibiotika-Resistenz besitzen. Neben kleinen Elutionsgipfeln der Substrate 1'-Hydroxy- γ -carotin (4), 1-Hydroxylycopin (5) und 1,1'-Dihydroxylycopin (6) sind 5 neue Produkte zu erkennen: 1'-Hydroxytorulin (7) mit den Abs.max. 440 475 510 nm und der Retentionszeit von 19,6 min, Demethylsphaeroidin (8) mit den Abs.max. 425 455 487 nm und einer Rt von 17,4 min, 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin (9) mit den Abs.max. 450 485 518 nm und einer Rt von 14,9 min, 1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin (10) mit den Abs.max. 450 485 518 nm und einer Rt 8,6 min und 1,1'-Dihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin (11) mit den Abs.max. 465 495 530 nm und einer von Rt 8,1 min.

Als Positiv-Kontrolle wurde die 3,4-Desaturase aus *Rubrivivax gelatinosus* (pSO53 = pBBRcrtD_{Rg}) in JM101[pACcrtEBIal2/pRKcrtC] transformiert. Im Elutionsprofil E konnten neben den Substraten γ -Carotin (2), β -Carotin (3), 1'-Hydroxy- γ -carotin (4), 1-Hydroxylycopin (5) und 1,1'-Dihydroxylycopin (6) in sehr geringen Mengen die Produkte 1'-Hydroxytorulin (7) mit den Abs.max. 440 475 510 nm und der Rt von 19,6 min und DMS (8) mit den Abs.max. 425 455 487 Rt 17,4 min identifiziert werden. Vergleicht man die beiden 3,4-Desaturasen aus *Flavobacterium spec* P99-3 und *Rubrivivax gelatinosus* miteinander, so fällt auf, dass CrtD₉₉ fast vollständig die angebotenen Substrate umsetzt und wesentlich mehr Produkte (Elutionsgipfel 7 bis 11) erzeugt als CrtD_{Rg} (Elutionsgipfel 7 und 8), bei dessen Komplementation noch eine große Menge an Substrat-Carotinoiden und nur eine geringe Menge an entstandenen Produkten zu detektieren sind.

Tab. 3-3: Relative Umsatzraten hydroxylierter Carotinoide der 3,4-Desaturasen aus *Flavobacterium spec P99-3* und *Rubrivivax gelatinosus* in einem γ -Carotin-Hintergrund.

Konstrukt	OH-Tor	OH- γ	DMS	OH-DHL	OH-Lyc	2OH-Lyc	2OH-DDHL	2OH-DHL
pUCrtD ₉₉	39,8%	1,1%	14,8%	21,1%	2,3%	1,8%	4,2%	14,9%
pBBRcrtD _{Rg}	3,6%	50,4%	2,2%	n.d.	8,7%	35,1%	n.d.	n.d.

OH-Tor: 1'-Hydroxytorulin, OH- γ : 1'-Hydroxy- γ -carotin, DMS: Demethylsphaeroiden, OH-DHL: 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin, OH-Lyc: 1-Hydroxylycopin, 2OH-Lyc: 1,1'-Dihydroxylycopin, 2OH-DDHL: 1,1'-Dihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin, 2OH-DHL: 1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin.

Berechnet man die Mengen der Carotinoide in Prozent zur Gesamt-Carotinoidmenge durch Integration der Elutionsprofile (siehe Tabelle 3-3) so zeigt sich, dass bei der Komplementation von CrtD₉₉ in der Transformante JM101[pACcrtEBIal2/pRKcrtC] 39,8 % des Produkts 1'-Hydroxytorulin entstanden sind, während CrtD aus *Rubrivivax gelatinosus* lediglich 3,6 % 1'-Hydroxytorulin bilden konnte. Vom Substrat 1'-Hydroxy- γ -carotin lagen bei der Komplementation von CrtD₉₉ nur noch 1,1 %, bei CrtD_{Rg} lagen hingegen noch über 50 % des Substrats 1'-Hydroxy- γ -carotin vor. Dies zeigt deutlich, dass die 3,4-Desaturase aus *Flavobacterium spec P99-3* eine wesentlich größere Affinität zu 1'-Hydroxy- γ -carotin besitzt als die 3,4-Desaturase aus *Rubrivivax gelatinosus*.

3.6 orfY

Im hypothetischen Carotinoid-Gencluster wurde das offene Leseraster orfY mit 1092 bp gefunden, der Aminosäure-Sequenzhomologie zu den Lycopin Zyklasten aus *Streptomyces griseus*, *Streptomyces coelicolor*, *Paracoccus sp.* N81106 und *Erwinia uredovora* besitzt.

In Abbildung 3-12 ist ein phylogenetischer Stammbaum von ORFY und verschiedenen Lycopin Zyklasten aus Bakterien dargestellt. ORFY gruppiert sich zu den bakteriellen β -Zyklasten neben CrtY aus *Streptomyces griseus* und *Streptomyces coelicolor* ein. Anhand dieser Eingruppierung konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei ORFY um eine Lycopin Zyklaste handelt. Kloniert wurde orfY nach Amplifikation mittels PCR in den Expressionsvektor pPQE31. Die Lycopin Zyklaste Aktivität wurde durch Transformation des Konstrukts pPQE31orfY in der Lycopin-produzierenden *E. coli*-Transformante JM101[pACcrtEBI_{eu}] getestet und die Carotinoid-Zusammensetzung mittels HPLC-Analyse (C18-Säule) überprüft.

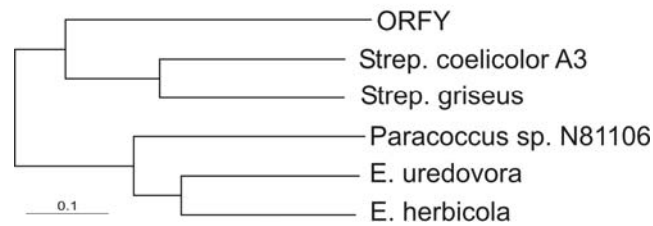
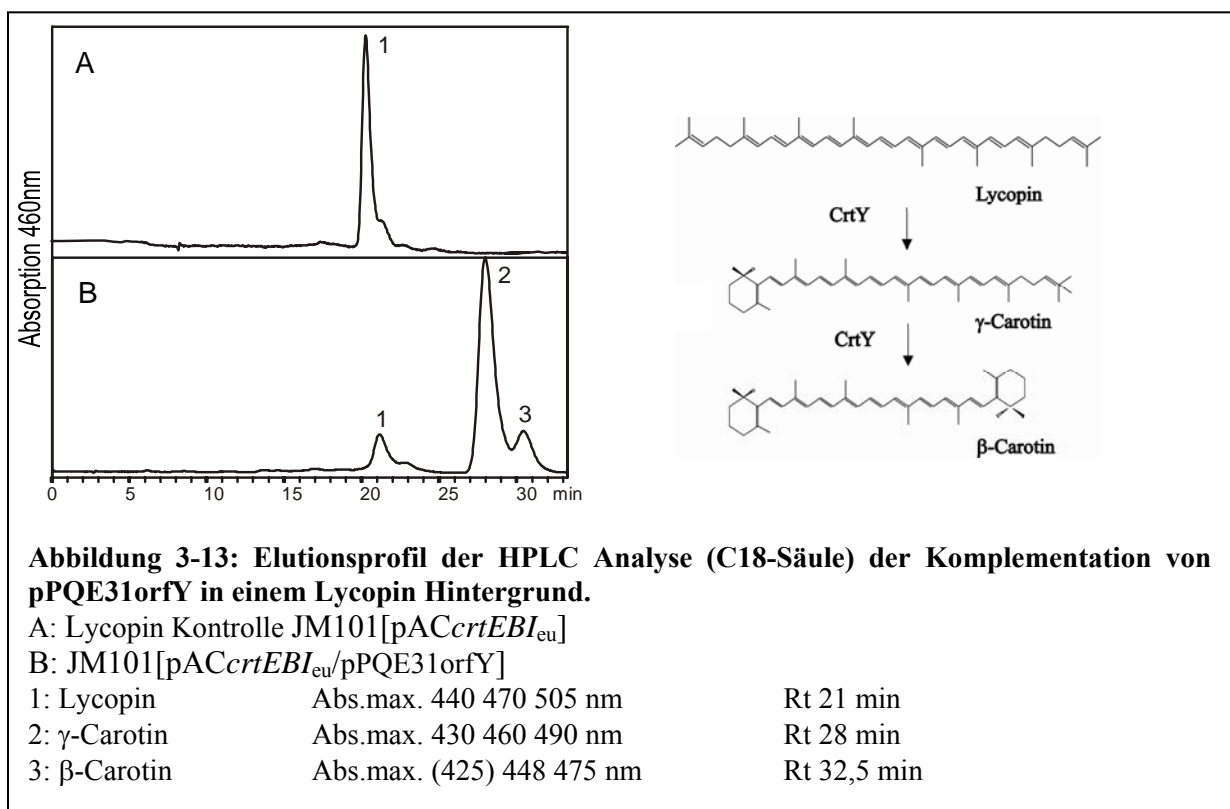


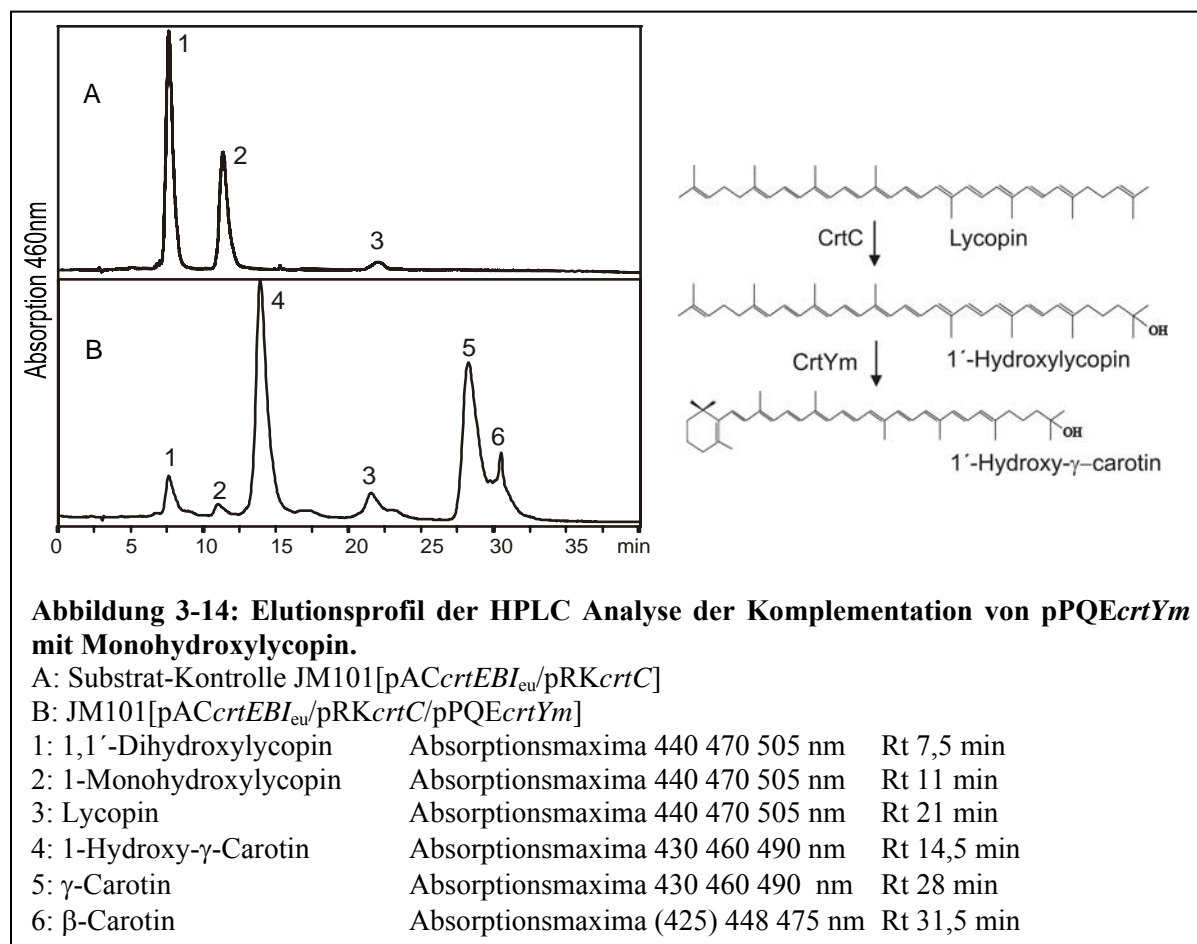
Abb. 3-12: Phylogenetischer Stammbaum der Aminosäuresequenz von ORFY und Lycopin Zyklasen aus verschiedenen Bakterien. Die Errechnung des Phylogenetischen Baums erfolgte mit 1000 Wiederholungen, die Skala 0,1 gibt die Aminosäure-Austausche an einer Position an.

In Elutionsprofil A von Abbildung 3-12 ist bei der Substrat-Kontrolle JM101[pACcrtEBl_{eu}] nur ein Elutionsgipfel von Lycopin (1) mit den Abs.max. 440 475 505 nm und einer Rt von 21 min (Abbildung 3-13) zu detektieren. Bei der Transformation des Lycopin-Produzenten mit der hypothetischen Lycopin Zyklase aus *Flavobacterium spec* P99-3 zeigen sich neben einem kleinen Lycopin-Gipfel (1) noch zwei weitere Elutionsgipfel (Elutionsprofil B). Gipfel 2 konnte als γ -Carotin mit den Abs.max. 430 460 490 nm und einer Rt von 28 min identifiziert werden, Gipfel 3 als β -Carotin mit den Abs.max. (425) 448 475 nm und einer Rt von 32,5 min. Hierbei ist auffällig, dass sehr viel γ -Carotin durch einseitige β -Zyklisierung aus Lycopin produziert wurde und nur ein geringer Teil des γ -Carotins auch am anderen Ende zu β -Carotin zyklisiert wurde. Somit kann ORFY als Monozyklase angesehen werden und wird fortan als CrtYm bezeichnet.



Weiterhin wurde getestet, ob die Monozyklase aus *Flavobacterium spec* P99-3 auch einseitig hydroxyliertes Lycopin (1-Monohydroxylycopin) zyklisieren kann. Hierfür wurde die Mono- und Dihydroxylycopin produzierende *E. coli*-Transformanden JM101[pACcrtEBl_{eu}/pRKcrtC] verwendet.

In Abbildung 3-14 sind die HPLC-Analysen der Komplementation der Monozyklase in einem Monohydroxylycopin-Produzenten zu sehen. Die Substrat-Kontrolle JM101[pACcrtEBl_{eu}/pRKcrtC] zeigt drei Elutionsgipfel. Gipfel 1 wurde als 1,1'-Dihydroxylycopin identifiziert mit den Abs.max. 440 470 505 nm und einer Rt von 7,5 min. Gipfel 2 entspricht 1-Monohydroxylycopin mit den Abs.max. 440 470 505 nm und einer Rt von 11 min. und Gipfel 3 zeigt Lycopin mit den Abs.max. 440 470 505 nm und einer Rt von 21 min. Alle drei Carotinoide besitzen das gleiche Absorptionsspektrum, lediglich die Retentionszeit verkürzt sich durch die Hydroxygruppen. Bei der Komplementation mit der Monozyklase aus *Flavobacterium spec* P99-3 treten im Elutionsprofil B neben den drei Substrat-Elutionsgipfeln noch drei weitere Gipfel auf. Hierbei handelt es sich bei Gipfel 4 um 1-Monohydroxy- γ -Carotin mit den Abs.max. 430 460 490 nm und einer Rt von 14,5 min, bei Gipfel 5 um γ -Carotin mit den Abs.max. 430 460 490 nm mit einer Rt von 28 min und bei Gipfel 6 um β -Carotin mit den Abs.max. (425) 448 475 nm mit einer Rt von 31,5 min.



Hier kann allerdings nicht eindeutig geklärt werden, ob CrtYm wirklich in der Lage ist 1-Monohydroxylycopin umzusetzen, da die beiden Enzyme Monozyklase und Hydratase (verantwortlich für die Hydroxygruppe am C1- bzw. C1'-Atom) um das Ausgangssubstrat Lycopin konkurrieren.

Da im Elutionsprofil B auch β -Carotin und nicht hydroxyliertes γ -Carotin (Elutionsgipfel 6 und 5) zu finden sind, muss davon ausgegangen werden, dass beide Enzyme gleichzeitig aktiv sind. Eine eindeutige Aussage könnte nur mit einem *in vitro*-Test gemacht werden, bei dem CrtYm nur 1-Monohydroxylycopin als Substrat angeboten wird.

Bei einer Komplementation mit Neurosporin konnte auch gezeigt werden, dass die Monozyklase aus *Flavobacterium spec* P99-3 Neurosporin einseitig zu β -Zeacarotin zyklisieren konnte.

3.7 orfA

Die Aminosäuresequenz des offenen Leserasters orfA zeigt im Datenbankenvergleich Sequenzhomologie zu den Monooxygenasen aus *Rhodovulum sulfidophilum*, *Rhodobacter capsulatus* und *Rubrivivax gelatinosus*, einem uncharakterisiertem *Proteobacterium* und der Cytochrom P Monooxygenase aus *Arabidopsis thaliana* (siehe Abbildung 3-15)

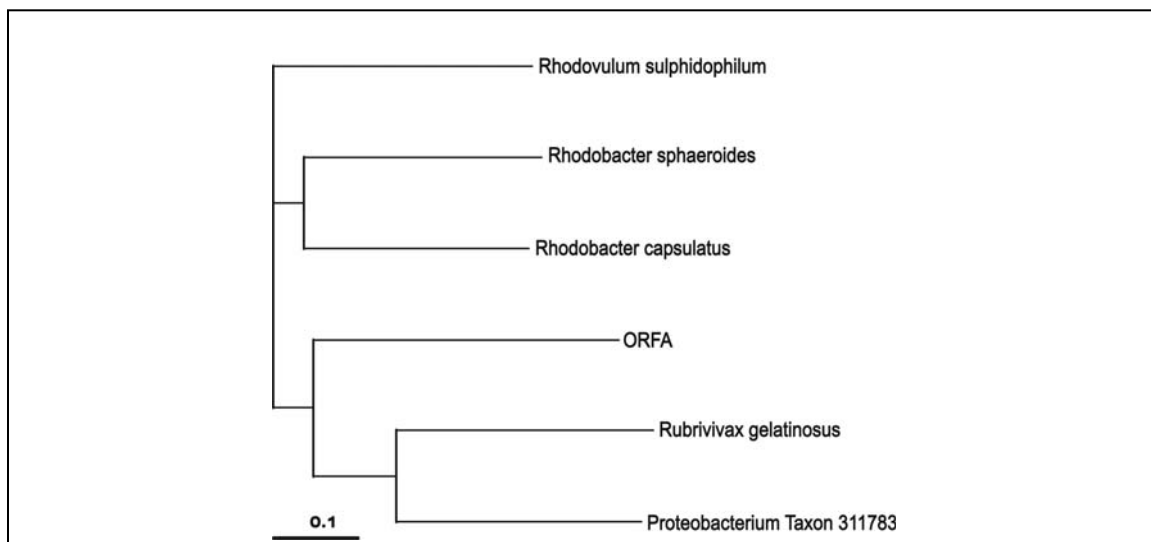
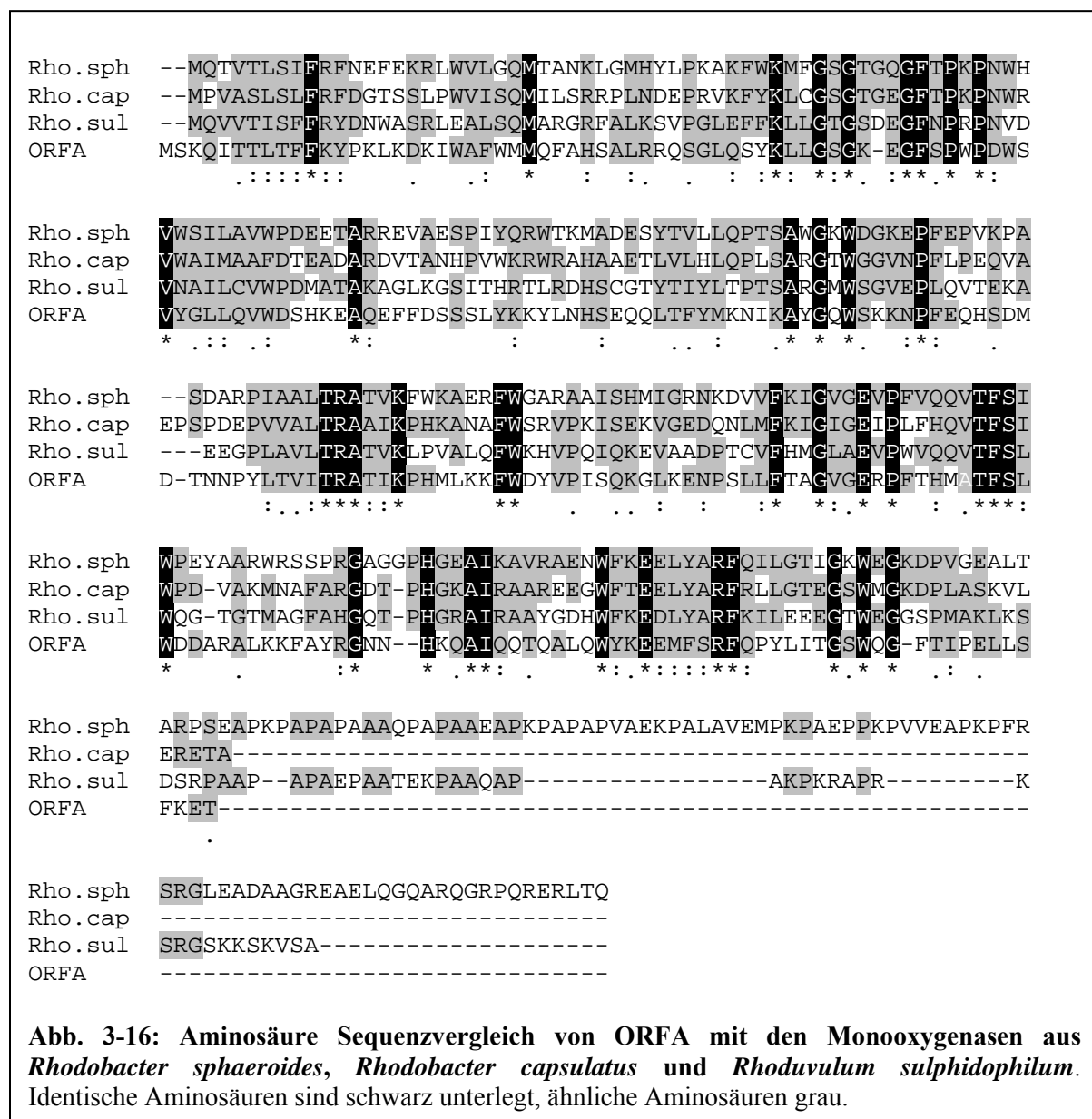


Abb. 3-15: Phylogenetischer Stammbaum von ORFA

Für den Stammbaum wurden die Aminosäuresequenzen von Monooxygenasen des CrtA- Typs aus verschiedenen Organismen und die Cytochrom P450 Monooxidase aus *Arabidopsis thaliana* herangezogen. Die Errechnung des Phylogenetischen Baums erfolgte mit 1000 Wiederholungen, die Skala 0,1 gibt die Aminosäure-Austausche an einer Position an.

Betrachtet man den phylogenetischen Stammbaum, so zeigt sich, dass ORFA nah verwandt ist mit CrtA aus *Rubrivivax gelatinosus*. Die Monoxygenasen CrtA aus *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* und *Rhodovulum sulphidophilum* zeigen große Ähnlichkeiten auf Aminosäureebene zueinander.

Im direkten Aminosäure-Sequenzvergleich in Abbildung 3-16 von ORFA und der Oxygenasen aus *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodovulum sulphidophilum* zeigen sich über die gesamte Aminosäure-Sequenz viele ähnliche Aminosäuren, in allen vier Proteinsequenzen sind knapp 17 % identische Aminosäuren vorhanden.



Die Oxygenasen aus *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides* fügen an Demethylsphaeroiden und 1'-Hydroxydemethylsphaeroiden eine Ketogruppe am C2'-Atom

ein (siehe Abbildung 3-17). Jedoch sind sie nur dazu in der Lage, wenn zuvor eine Hydroxygruppe am C1-Atom durch eine Hydratase (CrtC) und zwischen C3'- und C4'-Atom eine Doppelbindung durch eine 3,4-Desaturase (CrtD) eingefügt wurde. Da im Endprodukt Myxol der Carotinoidbiosynthese von *Flavobacterium spec* P99-3 keine Ketogruppe am C2'-Atom vorkommt, sondern eine Hydroxygruppe, wurde vermutet, dass das Enzym codiert durch *orfA* für die Hydroxylierung am C2'-Atom verantwortlich sein könnte. Daher wurde *orfA* in den Expressionsvektor pPQE30 kloniert und in verschiedene Carotinoid produzierende *E. coli*-Transformanten komplementiert. Zunächst wurde pPQE30*orfA* in den Neurosporin-Produzenten JM101[pAC*crtEBI_{rc}*] transformiert und in die *E. coli*-Transformante JM101[pAC*crtEBI_{rc}*/pRK*crtC*] eingebracht, die 1-Monohydroxyneurosporin und 1,1'-Dihydroxyneurosporin produziert. Nach Analyse der Carotinoidzusammensetzung konnte anhand von Kontrollen kein Umsatz durch ORFA festgestellt werden.

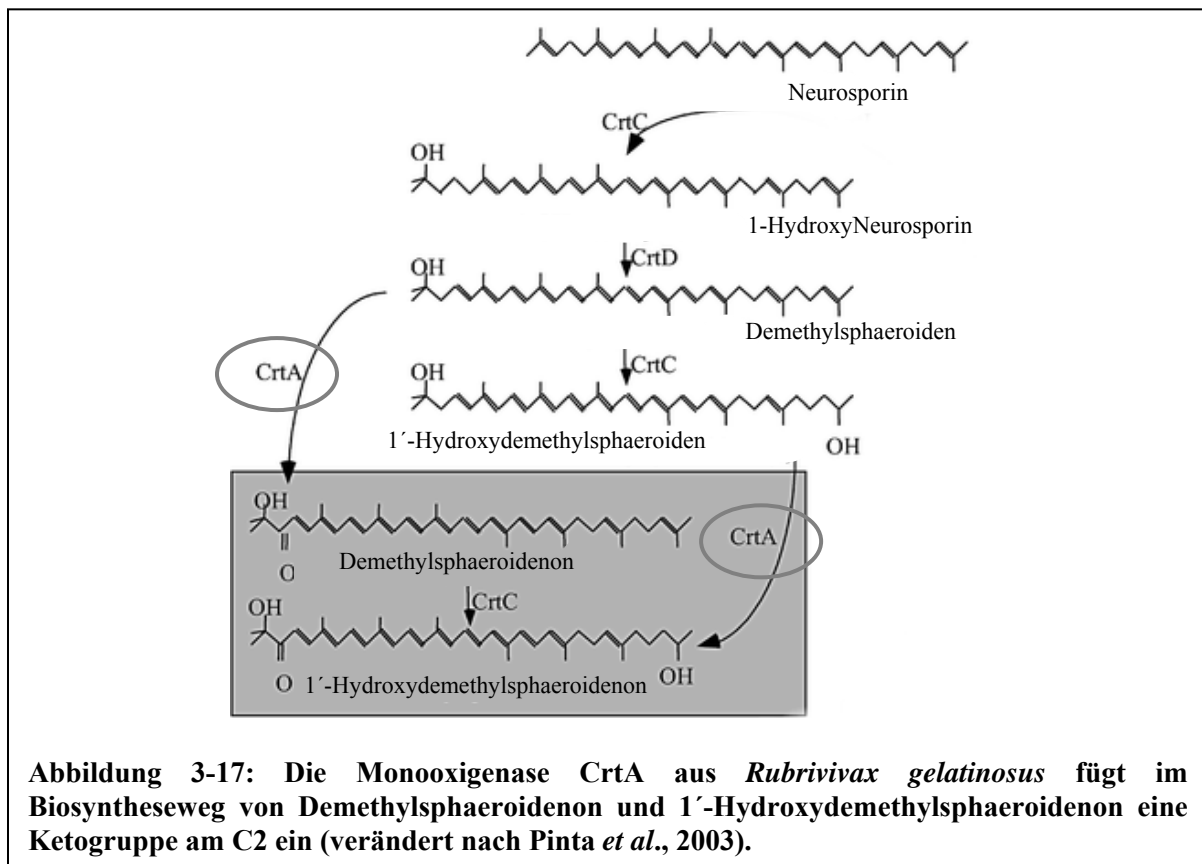
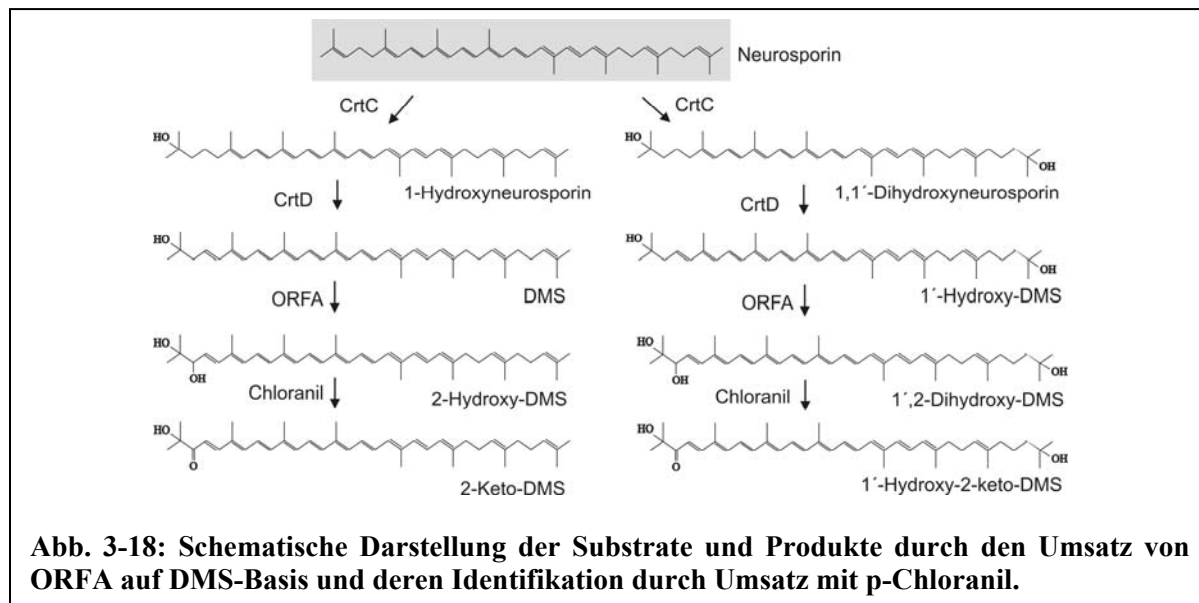


Abbildung 3-17: Die Monooxygenase CrtA aus *Rubrivivax gelatinosus* fügt im Biosyntheseweg von Demethylsphaeroidenon und 1'-Hydroxydemethylsphaeroidenon eine Ketogruppe am C2 ein (verändert nach Pinta *et al.*, 2003).

Da die Oxygenase CrtA aus *Rub. gelatinosus* und *Rho. capsulatus* nur Carotinoide auf Neurosporin-Basis umsetzt, die am C1-Atom hydroxyliert und zwischen C3- und C4-Atom desaturiert sind (z.B. DMS), wurde pPQE30*orfA* in den DMS-Produzenten JM101[pAC*crtEBI_{rc}*/pSO53/pRK*crtC*] transformiert. Mögliche Substrate und Produkte sind schematisch in Abbildung 3-18 zusammengefasst. Die entstandenen Carotinoide der

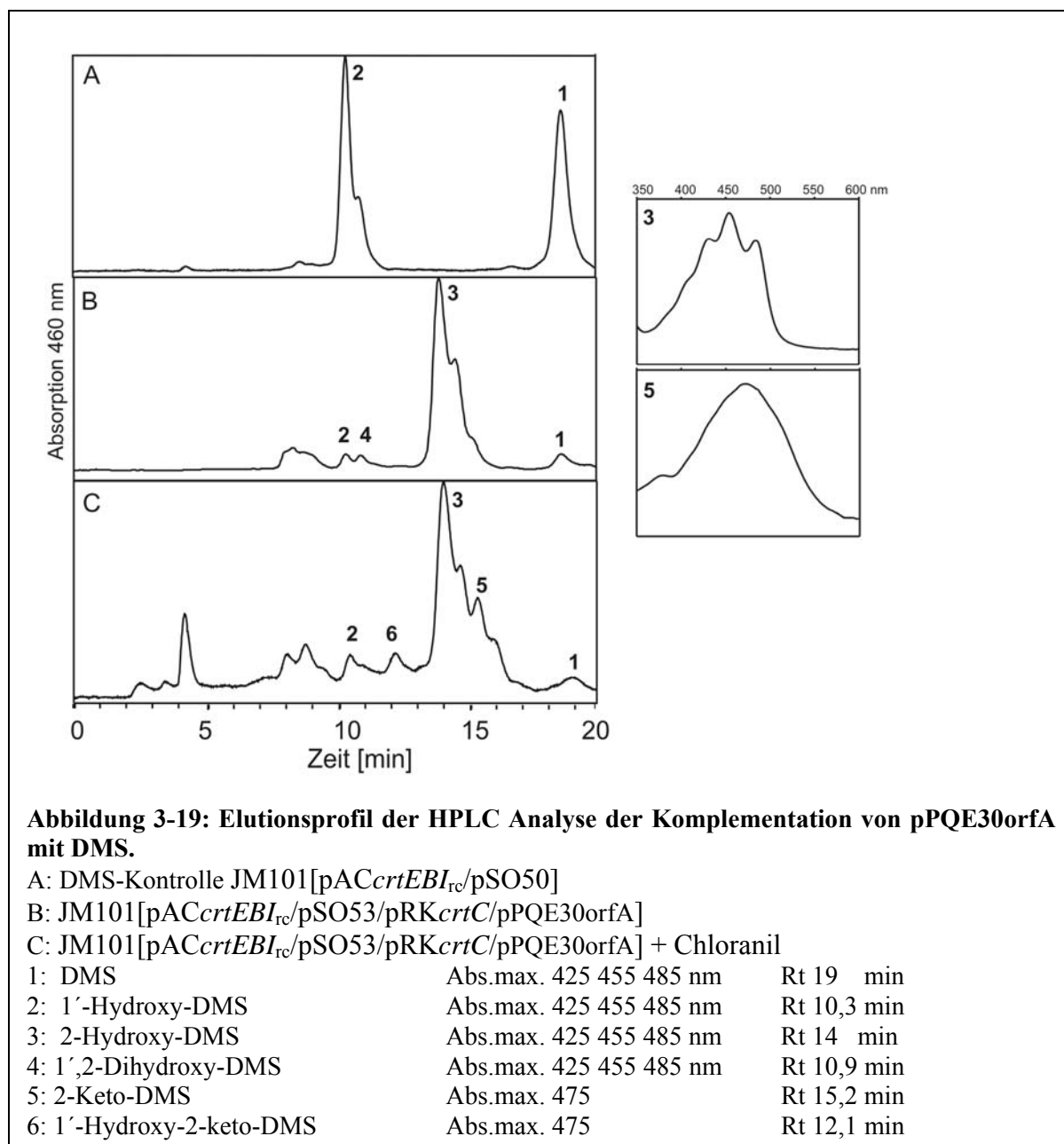
Transformation von pPQE30orfA in den DMS-Produzenten wurden mittels HPLC-Analyse (C18-Säule) identifiziert (Abbildung 3-19). Die Carotinoide wurden mit p-Chloranil umgesetzt wobei die sekundäre Hydroxygruppe zur leichteren Identifikation zu einer Ketogruppe oxidiert wird.



Im Elutionsprofil A ist die DMS-Substratkontrolle zu sehen. Die Transformante JM101[pACrtEBI_{rc}/pSO50] bildet das Carotinoid DMS (Elutionsgipfel 1) mit den Abs.max. 425 455 485 nm und einer Rt von 19 min und 1'-Hydroxy-DMS (Gipfel 2) mit den Abs.max. 425 455 485 nm und einer Rt von 10,3 min. Komplementiert man ORFA mit dem DMS-Produzenten (Elutionsprofil B) sind ebenfalls die Substrate DMS und 1'-Hydroxy-DMS zu detektieren wie auch die Produkte 2-Hydroxy-DMS (Gipfel 3) mit den Abs.max. 425 455 485 nm und einer Rt von 14 min und 1',2-Dihydroxy-DMS (Gipfel 4) mit den Abs.max. 425 455 485 und einer Rt von 10,9 min.

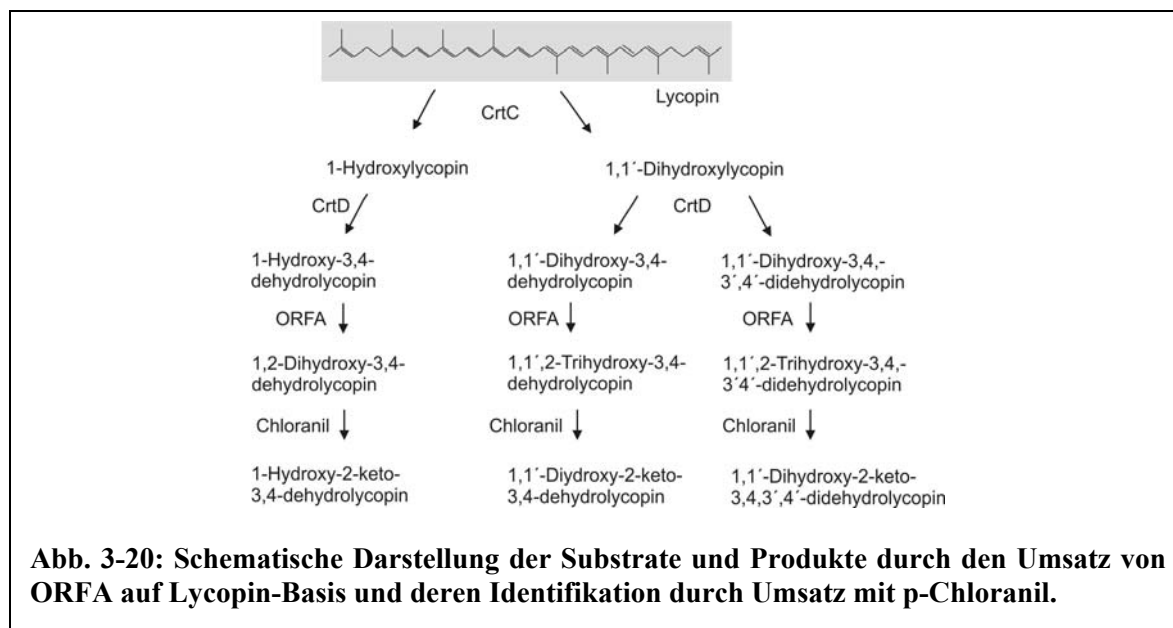
Wahrscheinlich hat das Genprodukt von pPQE30orfA DMS und 1'-Hydroxy-DMS umgesetzt und am C2-Atom eine weitere Hydroxygruppe eingefügt. Um dies nachweisen zu können, wurden die Carotinoide mit p-Chloranil umgesetzt (Elutionsprofil C). Sollte am C2-Atom eine sekundäre Hydroxygruppe vorhanden sein, wird diese durch p-Chloranil zu einer Ketogruppe oxidiert und die Abs.max. verändern sich zu einer für Keto-Carotinoide typischen Glockenform. In Elutionsprofil C sind neben den schon genannten Carotinoiden zwei neue Elutionsgipfel zu erkennen. Gipfel 5 entspricht 2-Keto-DMS mit dem Abs.max. 475 nm und einer Rt von 15,2 min und 1'-Hydroxy-2-keto-DMS mit dem Abs.max. 475 nm und einer Rt von 12,1 min. Die Absorptionsspektren von 2-Hydroxy-DMS und 2-Keto-DMS sind in Abbildung 3-19 in der rechten Spalte abgebildet. Die Absorptionsspektren der am C1'-

hydroxylierten analogen Carotinoide (Gipfel 4 und 6) gleichen denen von 2-Hydroxy-DMS und 2-Keto-DMS und sind deshalb nicht abgebildet.



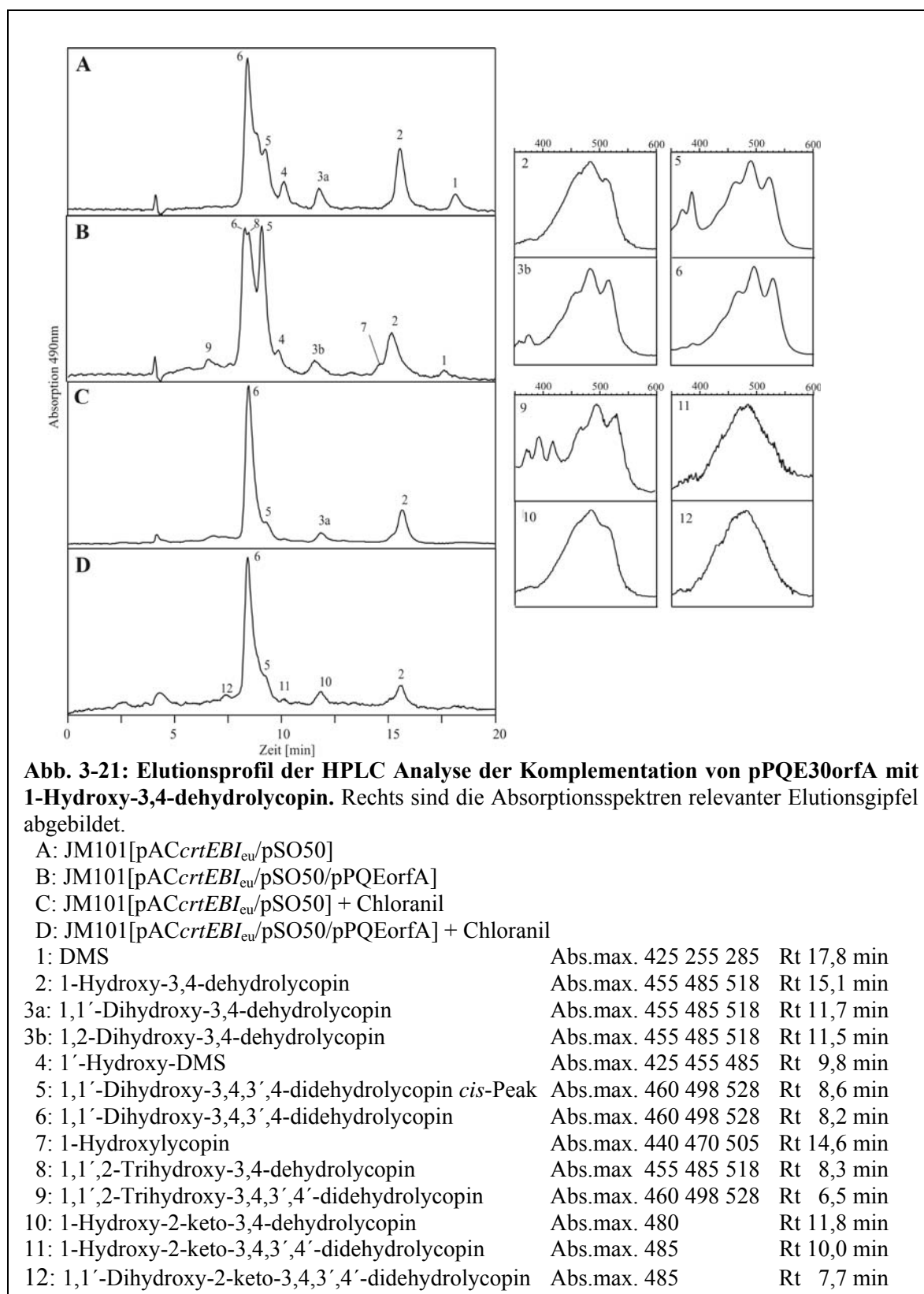
Die sekundäre Hydroxygruppe am C2-Atom konnte hier eindeutig durch die Umsetzung zu einer Ketogruppe nachgewiesen werden, die Absorptionsspektren veränderten sich von einem dreigipfeligen Absorptionsspektrum zu einem für Ketocarotinoide typischen glockenförmigen Absorptionsspektrum.

Anschließend wurde ORFA in der Transformante JM101[pACcrtEBI_{eu}/pSO53/pRKcrtC] komplementiert. Hierbei handelt es sich um einen Produzenten von 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin und 1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin. Mögliche Produkte beim Umsatz durch ORFA auf Neurosporin- und Lycopin-Basis sind in Abbildung 3-20 zusammengefasst.



Bei der Komplementation von ORFA in einem 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin- und 1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin-Hintergrund wurden die entstandenen Carotinoide über eine C18-Säule aufgetrennt. Im Elutionsprofil A von Abbildung 3-21 ist die Substrat-Kontrolle zu sehen. Die Transformante JM101[pACrtEBl_{eu}/pSO50] zeigt 6 Substrat-Elutionsgipfel. Gipfel 1 entspricht DMS mit den Abs.max. 425 455 485 und einer RT von 17,8 min, Gipfel 2 konnte als 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin mit den Abs.max. 455 485 518 und einer Rt von 15,8 min identifiziert werden (Absorptionsspektrum rechte Spalte in Abbildung 3-20). Gipfel 3a zeigt das zweifach hydroxylierte 1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin mit den Abs.max. 455 485 518 nm und einer Rt von 11,5 min, Gipfel 4 entspricht dem zweifach hydroxylierten 1'-Hydroxy-DMS mit den Abs.max. 425 455 485 nm und einer Rt von 9,8 min. Gipfel 5 und 6 zeigen 1,1'-Dihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin mit den Abs.max. 460 498 528 nm, wobei Gipfel 5 dem cis-Elutionsgipfel des Moleküls (zu erkennen an den Abs.max. 360 380 im Absorptionsspektrum, rechte Spalte in Abb.3-21) mit einer Rt von 8,6 min entspricht und Gipfel 6 dem trans-Elutionsgipfel mit einer Rt von 8,2 min.

Im Elutionsprofil B ist die Komplementation von ORFA mit dem Substrat-Produzenten zu sehen. Neben den 5 oben genannten Substrat-Gipfeln sind drei Produkt-Elutionsgipfel zu erkennen. Gipfel 3b konnte als 1,2-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin identifiziert werden, obwohl er zunächst Gipfel 3a glich (gleiche Abs.max., fast gleiche Rt). Jedoch konnte Gipfel 3b durch p-Chloranil zu Gipfel 10 umgesetzt werden (Elutionsprofil D), die Abs.max. veränderte sich dabei zu einer Glockenkurve mit dem Abs.max. von 485. Gipfel 3a (Elutionsprofil C) konnte nicht durch p-Chloranil umgesetzt werden.



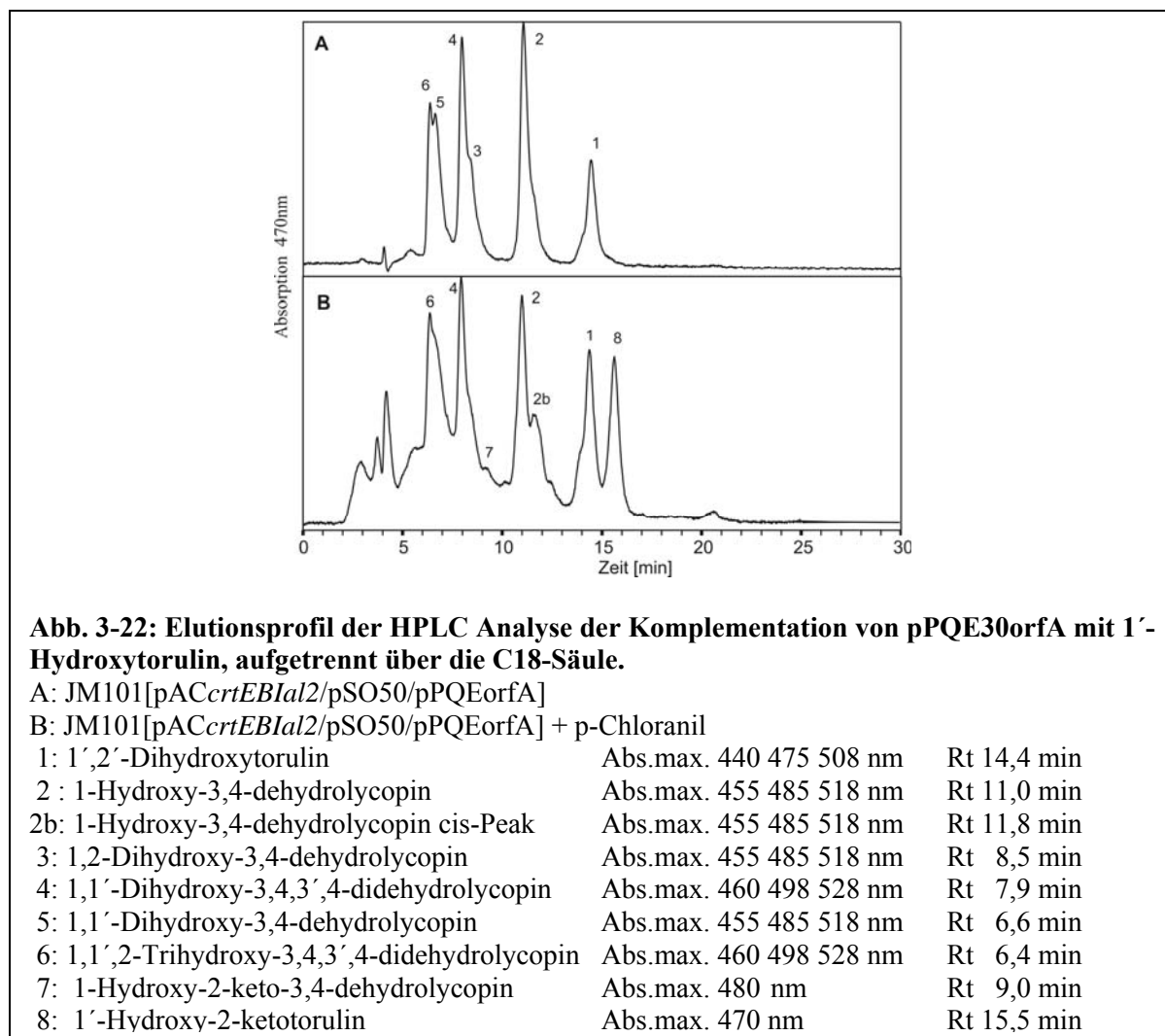
Ein weiterer Produkt-Elutionsgipfel durch ORFA im Elutionsprofil B ist Gipfel 8, der als 1,1',2-Trihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin mit den Abs.max. 460 498 528 und einer Rt von 8,3 min identifiziert wurde. Auch dieses Carotinoid mit sekundärer Hydroxygruppe

konnte durch p-Chloranil zu Gipfel 10 (1,1',2-Trihydroxy-2-keto-3,4-dehydrolycopin mit den Abs.max. 480 nm und einer Rt von 11,8 min) oxidiert werden (Elutionsprofil D).

Gipfel 11 ist 1-Hydroxy-2-keto-3,4,3',4'-didehydrolycopin mit dem Abs.max. 480 und einer Rt von 10 min, und entspricht dem durch p-Chloranil oxidiertem Elutionsgipfel. Der dritte Produkt-Gipfel im Elutionsprofil B stellt Gipfel 9 dar, 1,1',2-Trihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin mit den Abs.max. 460 498 528 und einer Rt von 6,5 min, der durch p-Chloranil (Elutionsprofil D) zu Gipfel 12 1,1'-Dihydroxy-2-keto-3,4,3',4'-didehydrolycopin mit dem Abs.max. 480 und der Rt von 7,7 min umgesetzt wurde. Im Elutionsprofil C ist die Substrat-Kontrolle mit p-Chloranil umgesetzt abgebildet. Hier sind lediglich Substrat-Elutionsgipfel wie in Elutionsprofil A zu sehen. Durch die Umsetzung der sekundären Hydroxygruppen, die durch ORFA am C2-Atom eingefügt wurden, durch p-Chloranil, konnten die drei neuen Carotinoide 1,2-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin, 1,2-Dihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin und 1,1',2-Trihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin identifiziert werden.

Da Myxol auf γ -Carotin-Basis gebildet wird, wurde nun versucht, eine Transformante mit ORFA in einem γ -Carotin-Hintergrund herzustellen. Hierfür wurde die Substrat-Transformante JM101[pACcrtEBIal2/pSO50], die 1'-Hydroxytorulin synthetisiert, verwendet (siehe Abbildung 3-22).

In Abbildung 3-22 ist das Elutionsprofil der HPLC Analyse von ORFA in einem 1'-Hydroxytorulin-Produzenten zu sehen, in Elutionsprofil A die Komplementation und in Elutionsprofil B die Umsetzung der Probe aus A mit p-Chloranil. Auffällig sind hier die vielen Lycopin-basierenden Nebenprodukte, jedoch konnte Elutionsgipfel 1 als 1',2'-Dihydroxytorulin mit den Abs.max. 440 475 508 nm und einer Rt von 11,4 min identifiziert werden. In Elutionsprofil B ist das von p-Chloranil umgesetzte 1',2'-Dihydroxytorulin als Elutionsgipfel 8 zu sehen, der 1'-Hydroxy-2'-ketotorulin mit dem Abs.max. 470 und einer Rt von 15,5 min entspricht. Um bei weiteren Komplementationen in einem γ -Carotin-Hintergrund die Menge an Lycopin-basierenden Nebenprodukten zu senken, wurden unterschiedliche Anzuchtbedingungen getestet. Entscheidend war hierbei die Anzucht der Transformante in YTG-Medium, welches 5 g/l Glycerin und mehr Pepton enthält als das üblicherweise verwendete LB-Medium.



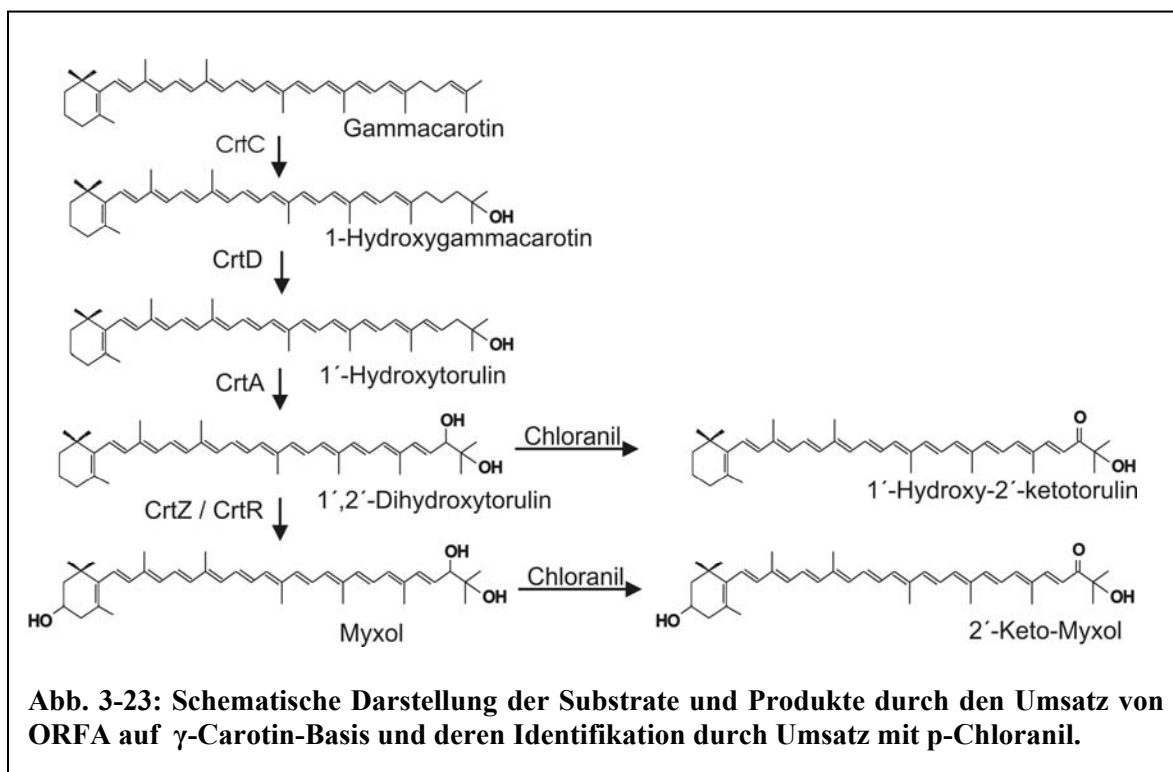
Tab. 3-4: Vergleich der gebildeten Carotinoide durch ORFA in LB- und YTG-Medium. Angabe in Prozent der Gesamt-Carotinoidmenge.

Transformande	3OH-diDHL	1OH-DHL	2OH-Tor	Myx	Zea
JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pPQEorfA] LB	19,4%	38,5%	8,9%	--	--
JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pPQEorfA] YTG	5,6%	10,6%	22,6%	--	--
JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pRKcrtR/pPQEorfA] LB	29,2%	35,1%	1,2%	27,5%	5,4%
JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pRKcrtR/pPQEorfA] YTG	11,5%	8,5%	1,3%	48,2%	25,1%

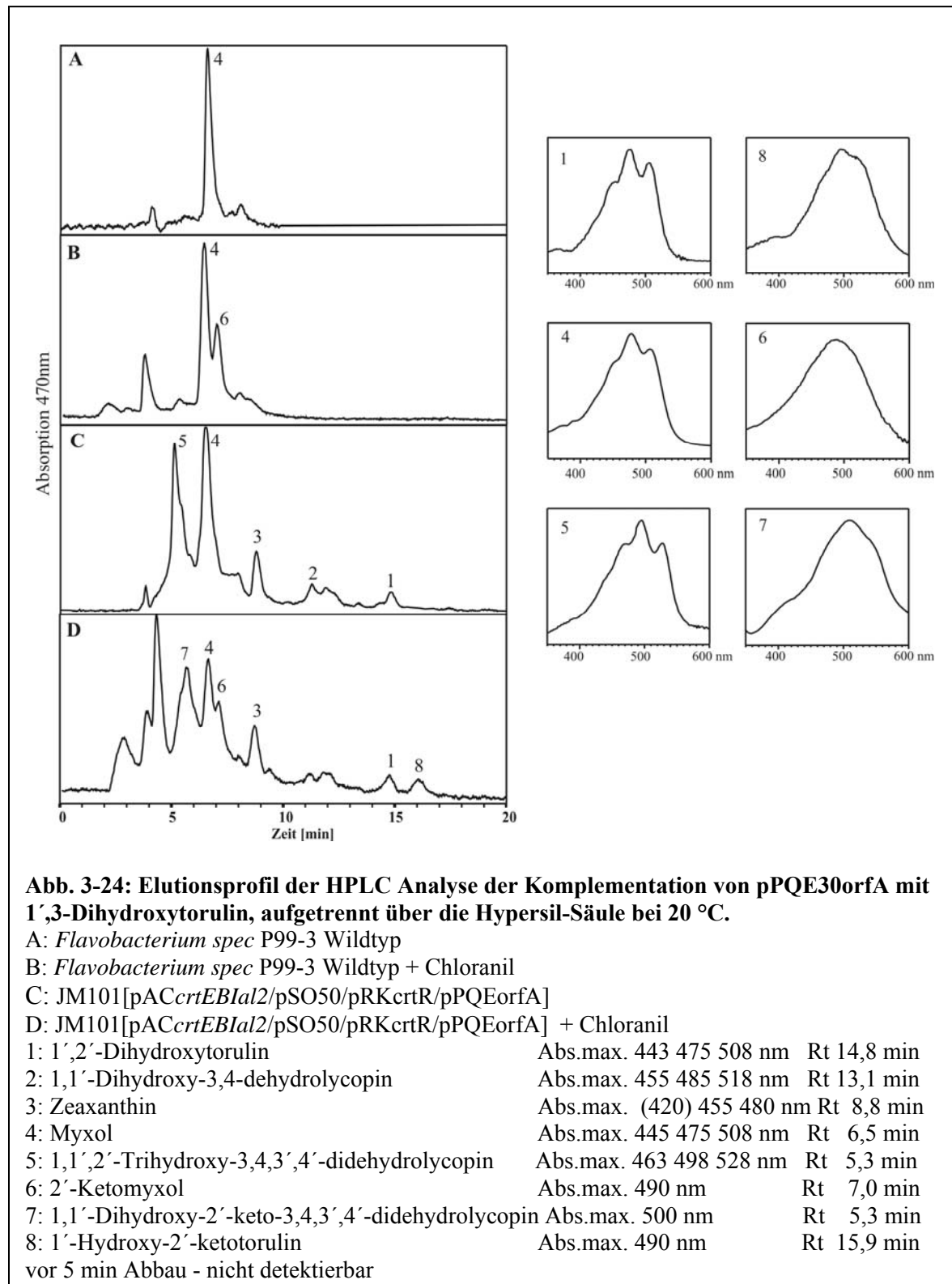
3OH-diDHL: 1,1',2-Trihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin; 1OH-DHL: 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin; 2OH-Tor: 1',2'-Dihydroxytorulin; Myx: Myxol; Zea: Zeaxanthin

Bei einem Vergleich der Transformanden JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pPQEorfA] (1'-Hydroxytorulin-Hintergrund) und JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pRKcrtR/pPQEorfA] (1',3-Hydroxytorulin-Hintergrund) zeigte sich (siehe Tabelle 3-4), dass bei Anzucht von YTG wesentlich weniger Lycopin-basierende Nebenprodukte gebildet wurden. Zum Beispiel konnte die Menge an synthetisiertem 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin in LB-Medium von 38,5 % und 35,1 % auf 10,6 % bzw. 8,5 % in YTG-Medium in Bezug auf die Gesamt-Carotinoidmenge reduziert werden. Umgekehrt konnte die Menge an gebildetem 1',2'-Dihydroxytorulin von 8,9 % in LB-Medium auf 22,6 % gesteigert werden. 1',2'-Dihydroxytorulin ist eine direkte Vorstufe von Myxol, daher sind die gebildeten Mengen in den Anzuchten JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pRKcrtR/pPQEorfA] in LB-Medium und JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pRKcrtR/pPQEorfA] in YTG-Medium nur im Bereich von 1,2 bis 1,3 % vom Gesamt-Carotinoidgehalt.

Die schematische Darstellung der Carotinoide in Abbildung 3-23 zeigt die möglichen Produkte durch den Umsatz von ORFA auf γ -Carotin-Basis. Endprodukt sollte Myxol sein, welches bis jetzt noch nicht heterolog in *E. coli*-Zellen synthetisiert werden konnte. Durch den Umsatz der durch ORFA eingefügten sekundären Hydroxygruppe mit p-Chloranil zu einer Ketogruppe sollte wiederum die Enzymaktivität von ORFA nachgewiesen werden. Angezogen wurden die *E. coli*-Zellen in YTG-Medium.



In Abbildung 3-24 sind die Elutionsprofile der HPLC-Analyse der Komplementationen der Transformante JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pRKcrtR/pPQEorfA] und die extrahierten Carotinoide aus *Flavobacterium spec* P99-3 als Kontrolle zu sehen. Die Proben wurden bei der HPLC-Analyse über eine Hypersil-Säule bei 20 °C aufgetrennt, da diese Säule im Vergleich zur C18-Säule stark polare, d.h. mehrfach hydroxylierte Carotinoide, besser trennt.



Im Elutionsprofil A ist der Carotinoid-Extrakt aus *Flavobacterium spec* P99-3 zu sehen, bei dem lediglich der prominenter Elutionsgipfel 4 Myxol mit den Abs.max. 440 475 508 nm und einer Rt von 6,5 min erkennbar ist. Nach der Umsetzung mit p-Chloranil konnten in Elutionsprofil B neben Myxol noch das oxidierte Produkt 2'-Ketomyxol (Gipfel 6, Abs.max. 490, Rt 7,0 min) identifiziert werden. Bei der Komplementation von ORFA in der Transformante JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pRKcrtR] (Elutionsprofil C) konnten neben dem gesuchten Produkt Myxol (Elutionsgipfel 4) weitere Nebenprodukte identifiziert werden: Gipfel 1 entspricht 1',2'-Dihydroxytorulin mit den Abs.max. 443 475 508 nm und der Rt 14,8 min, Gipfel 2 zeigt 1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin mit den Abs.max. 455 485 518 nm und der Rt 13,1 min, Gipfel 3 ist Zeaxanthin mit den Abs.max (420) 455 480 nm und der Rt 8,8 min und Gipfel 5 wurde identifiziert als 1,1',2'-Trihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin mit den Abs.max. 463 498 528 nm und der Rt 5,3 min.

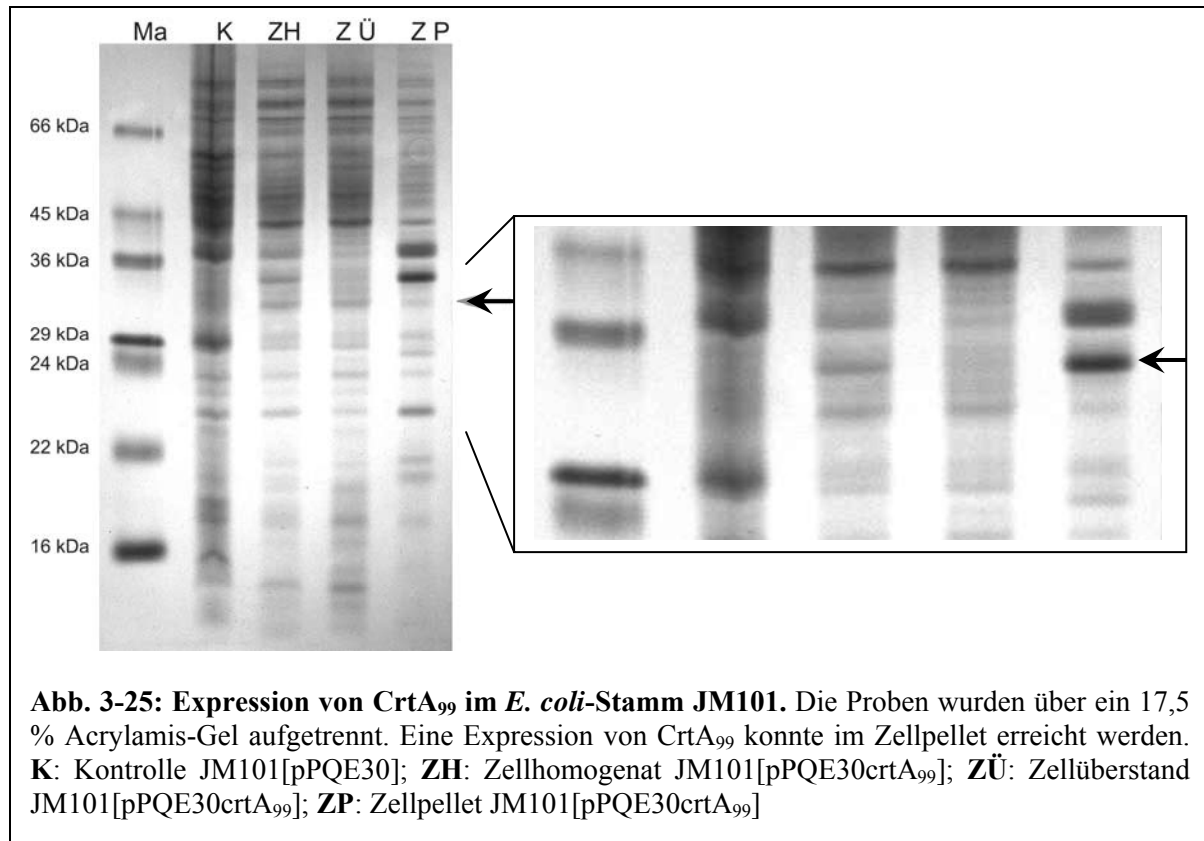
Bei dem Umsatz der Transformante JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pRKcrtR/pPQEorfA] mit p-Chloranil (Elutionsprofil D) konnten die oxidierten Produkte 2'-Ketomyxol (Gipfel 6), 1,1'-Dihydroxy-2'-keto-3,4,3',4'-didehydrolycopin (Gipfel 7, Abs.max. 500 nm, Rt 5,3 min) und 1'-Hydroxy-2'-ketotorulin (Gipfel 8, Abs.max. 490 nm, Rt 15,9 min) identifiziert werden.

Bei dieser Komplementation konnte zum ersten Mal Myxol heterolog in *E. coli*-Zellen synthetisiert werden und durch den Vergleich mit dem aus *Flavobacterium spec* P99-3 isolierten Myxol identifiziert werden. Die sekundäre Hydroxygruppe am C2-Atom konnte durch den Umsatz mit p-Chloranil zu einer Ketogruppe eindeutig nachgewiesen werden.

Somit kann man davon ausgehen, dass ORFA im Syntheseweg von Myxol für die Hydroxylierung am C2 verantwortlich ist. Daher wird *orfA* fortan als *crtA₉₉* bezeichnet.

3.8 Expression und Enzymologie von CrtA₉₉ aus *Flavobacterium spec* P99-3

Das Gen *crtA₉₉* aus *Flavobacterium spec* P99-3 codiert für eine Aminosäuresequenz von 230 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 26,9 kDa. Das Gen lag in Expressionsvektor pPQE30 vor, der einen N-terminalen His-Tag zur Reinigung an die exprimierten Proteine hängt. Zur Expression wurde das Konstrukt in den *E. coli*-Stamm JM101 transformiert. Nach Ernte der Zellen wurden diese in Phosphatpuffer resuspendiert, in der Frenchpress homogenisiert (Zellhomogenat) und mittels Zentrifugation in Zellüberstand und Zellpellet getrennt. Von Zellhomogenat, Zellüberstand und Zellpellet wurden Proben über ein 17,5 % Acrylamid-Gel nach Laemmli aufgetrennt (siehe Abbildung 3-25).



In den Proben Zellhomogenat, Zellüberstand und Zellpellets konnte eine schwache Bande mit einer ungefähren Molmasse von 30 kDa identifiziert werden, die nicht in der Kontrolle zu finden ist.

Mit den Proben wurde ein *in vitro*-Test mit dem Zellhomogenat von JM101[pACrtEBI_{rc}/pSO50] (DMS-Produzent) als Substrat angesetzt. Nach Inkubation der *in vitro*-Tests und Extraktion der Carotinoide konnte mittels HPLC kein Umsatz von DMS durch die Proteinproben von CrtA₉₉ festgestellt werden. Wahrscheinlich lag CrtA₉₉ zu verdünnt vor oder das Protein war inaktiv.

Zur Bereitstellung einer größeren Menge an CrtA₉₉ für den *in vitro*-Test wurde zunächst ein größeres Volumen (200 ml) der Kultur angezogen und die Probe nach dem Ernten in 5 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Außerdem wurde der Zellüberstand einer fraktionierenden Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen, bei der Proben bei 20, 40 und 60 % Ammoniumsulfat gefällt wurden. Mit diesen Proben wurde anschließend eine Metallionen-Affinitäts-Chromatographie mit Talon durchgeführt. Hierbei bindet der N-terminale Histidin-Rest an das Talonmaterial und kann so von den übrigen Proteinen der Probe getrennt werden. Von allen Proben wurden Aliquots abgenommen, mit TCA gefällt und über ein 17,5 % Acrylamidgel aufgetrennt (siehe Abbildung 3-26). Bei der Ammoniumsulfat-Fällung mit 40 % Ammoniumsulfat sind im Bereich von 30 kDa keine prominenten Banden zu erkennen. Bei der Ammoniumsulfat-Fällung mit 60 % Ammoniumsulfat ist bereits in der Probe des

resuspendierten Sediments (60 %) eine Bande im Bereich von 30 kDa zu sehen, die ebenso in den Proben der Imidazol-Elution c, d und e zu sehen ist. Zwar befinden sich in den Proben noch weitere Proteine unterschiedlicher Größe, jedoch nehmen ihre Konzentrationen mit steigender Imidazol Konzentration ab, während die Konzentration der Proteinbande bei 30 kDa relativ konstant zu bleiben scheint.

Dies deutet darauf hin, dass diese Bande dem rekombinanten Protein CrtA₉₉ mit His-Tag entsprechen könnte, die an das TALON-Material gebunden hat. Die Auswertung der *in vitro*-Tests der hier gezeigten Proben war jedoch negativ, das Enzym konnte DMS nicht zu 2-Hydroxy-DMS umsetzen.

Auch eine Anzucht von CrtA₉₉ in anderen *E. coli*-Stämmen wie DH5 α und XL1 blue MRF' konnte kein aktives Protein bilden, das im *in vitro*-Test DMS umsetzen konnte.

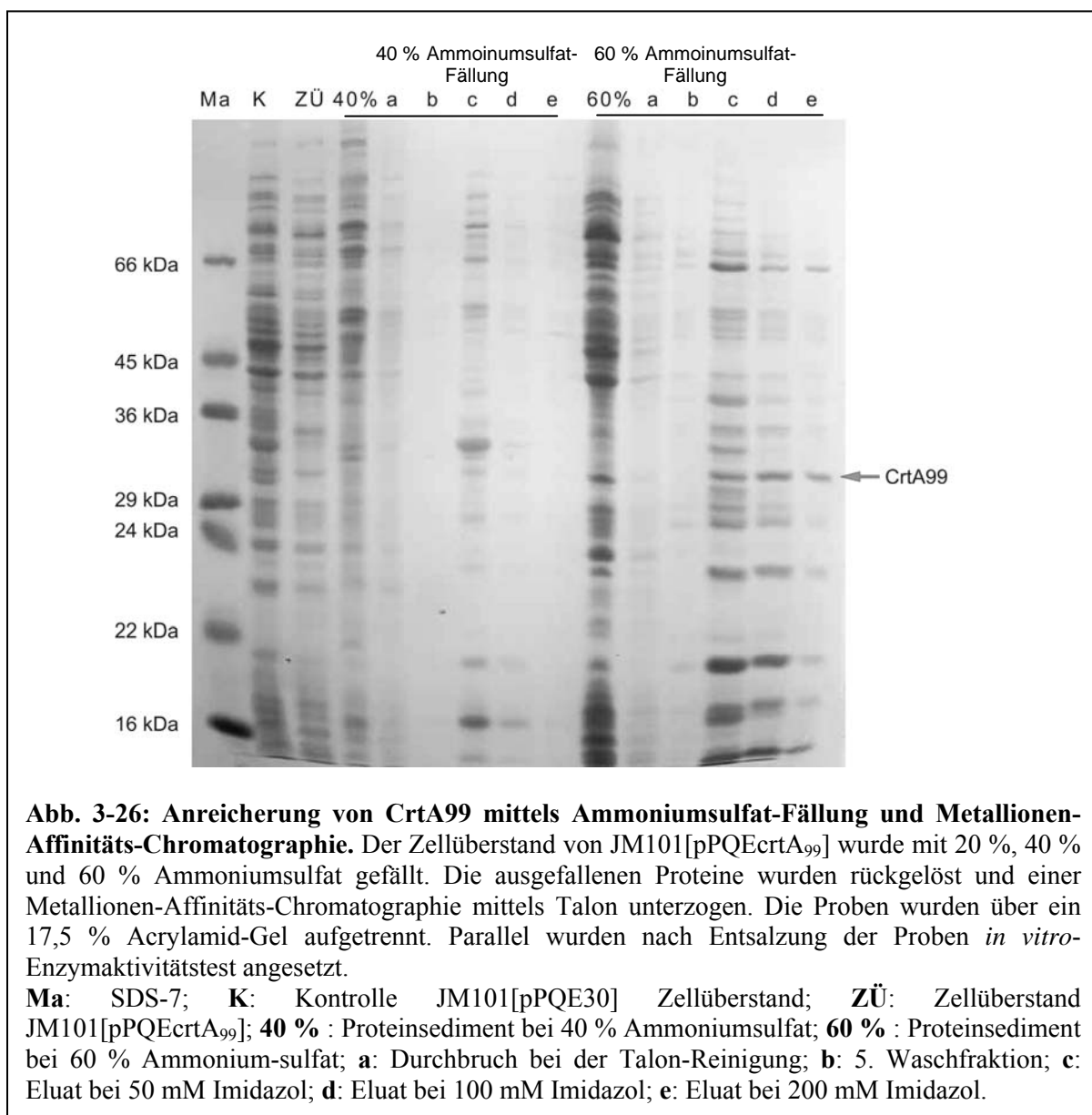


Abb. 3-26: Anreicherung von CrtA₉₉ mittels Ammoniumsulfat-Fällung und Metallionen-Affinitäts-Chromatographie. Der Zellüberstand von JM101[pPQEcrtA₉₉] wurde mit 20 %, 40 % und 60 % Ammoniumsulfat gefällt. Die ausgefallenen Proteine wurden rückgelöst und einer Metallionen-Affinitäts-Chromatographie mittels Talon unterzogen. Die Proben wurden über ein 17,5 % Acrylamid-Gel aufgetrennt. Parallel wurden nach Entsalzung der Proben *in vitro*-Enzymaktivitätstest angesetzt.

Ma: SDS-7; **K:** Kontrolle JM101[pPQE30] Zellüberstand; **ZÜ:** Zellüberstand JM101[pPQEcrtA₉₉]; **40 % :** Proteinsediment bei 40 % Ammoniumsulfat; **60 % :** Proteinsediment bei 60 % Ammonium-sulfat; **a:** Durchbruch bei der Talon-Reinigung; **b:** 5. Waschfraktion; **c:** Eluat bei 50 mM Imidazol; **d:** Eluat bei 100 mM Imidazol; **e:** Eluat bei 200 mM Imidazol.

3.9 orfAco, orfMoxR und orfIY

Da im hypothetischen Carotinoid-Gencluster von *Flavobacterium spec* P99-3 (siehe Abbildung 3-7) kein ORF mit Sequenzhomologie zu einer Hydratase CrtC gefunden werden konnte, und die 3,4-Desaturase und CrtA₉₉ nur am C1-Atom hydroxylierte Substrate umsetzen kann, wurden orfAco, orfMoxR und orfIY auf eventuelle Hydratase-Aktivität hin untersucht. Die ORFs wurden mittels PCR mit spezifischen Primern amplifiziert und in Expressions-Vektoren kloniert.

Die Konstrukte pPQE32orfAco, pPQE32orfMoxR und pPQE31orfIY wurden in die Substrat-Produzenten JM101[pACcrtEBI_{rc}] (Neurosporin), JM101[pACcrtEBI_{eu}] (Lycopin) und JM101[pACcrtEBI_{al2}] (γ -Carotin) transformiert und nach Anzucht die Carotinoide extrahiert und über einer HPLC-Messung (C18-Säule) unterzogen. Alle drei Konstrukte waren nicht in der Lage, Neurosporin, Lycopin oder γ -Carotin zu einem 1-Hydroxy-Derivat umzusetzen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass orfAco, orfMoxR und orfIY keine Hydratasen des CrtC-Typs sind. Folglich muss entweder innerhalb des Carotinoid-Genclusters ein anderes Gen für die Hydratase-Aktivität verantwortlich sein oder die Hydratase außerhalb des Genclusters liegen. Daraufhin wurden andere Gene des Carotinoid-Genclusters auf Hydratase-Aktivität hin untersucht.

Um ausschließen zu können, dass die Monozyklase CrtYm für die Hydratase-Aktivität verantwortlich ist, wurde CrtYm in das Plasmid pACcrtEBI_{eu} kloniert und in den Stamm JM101 transformiert. Diese Transformante wurde noch mit der 3,4-Desaturase aus *Flavobacterium spec* P99-3 cotransformiert, um entstehende 1-Hydroxy-Produkte, die durch CrtD₉₉ desaturiert werden, anhand von veränderten Absorptionsmaxima leichter identifizieren zu können. Die Zellen wurden in YTG-Medium angezogen, nach HPLC-Analyse konnten jedoch keine am C1-Atom hydroxylierte Carotinoide identifiziert werden. Somit ist auch die Monozyklase CrtYm aus *Flavobacterium spec* P99-3 nicht für die Hydratase-Aktivität verantwortlich.

Um die 1,2-Hydratase von *Flavobacterium spec* P99-3 zu isolieren, wurde die Expressions-Bibliothek (siehe 3-3) in eine *E. coli* Transformante komplementiert, die einen Farbumschlag der gebildeten Carotinoide durch eine 1,2-Hydratase visuell sichtbar macht. Durch das Anfügen einer Hydroxygruppe verändert sich das Abs.max. eines Carotinoid nicht, daher wurde auf Neurosporin-Basis die Transformante JM101[pACcrtEBI_{rc}/pSODA₉₉] für ein Screening verwendet. Diese Transformante enthält neben den Genen für die Synthese von Neurosporin noch die Gene *crtD_{rg}* und *crtA₉₉*, sodass ein mögliches 1-Hydroxyneurosporin

Produkt durch die 3,4-Desaturase und *CrtA₉₉* umgesetzt wird. Das entstehende Carotinoid 2-Hydroxy-DMS besitzt eine orange Färbung die visuell von Neurosporin produzierenden Transformanden (gelbe Färbung) unterschieden werden kann. Das Konstrukt *pSODA₉₉*, welches für das Screening hergestellt wurde, wurde aus dem Konstrukt *pSO50* durch Deletion von *crtC* und einfügen von *crtA₉₉* hergestellt. Nach Screening von ca. 10.000 Klonen konnte keine Transformande mit 1,2-Hydratase-Aktivität isoliert werden.

3.10 UV-Schutz von Myxol in *Flavobacterium* und in *E. coli*

Mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden (harter UV-Strahlung und chemische Mutagenese mit EMS) wurden Carotinoidmutanten von *Flavobacterium spec* P99-3 hergestellt. Mit Hilfe dieser Carotinoidmutanten sollte der UV-Schutz von Myxol *in vivo* sowie in Carotinoid-produzierenden *E. coli*-Transformanden getestet werden. Zunächst wurde die Carotinoid-Zusammensetzung der *Flavobacterium*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mittels HPLC überprüft (siehe Abbildung 3-27).

In Elutionsprofil A ist der Carotinoidextrakt aus dem Wildtyp, aufgetrennt über die Hypersil-Säule, zu sehen. *Flavobacterium spec* P99-3 bildet Myxol (Elutionsgipfel 1) mit den Abs.max. 445 475 508 nm und einer Rt von 7 min. Die kleinen Elutionsgipfel bei 8 und 9 min sind Isomere von Myxol.

In Elutionsprofil B ist der Carotinoidextrakt der durch UV-Strahlung hergestellten Mutante M11 über die Hypersil-Säule aufgetrennt. Gipfel 1 ist Myxol, Gipfel 2 konnte als 1',2'-Dihydroxytorulin mit den Abs.max. 445 475 508 und einer Rt von 15,8min identifiziert werden. Allgemein besitzt Mutante M11 mengenmäßig weniger Carotinoide als der Wildtyp. Der Carotinoidextrakt aus der farblosen Mutante M17 wurde über die C18-Säule aufgetrennt (Elutionsprofil C). Hier konnte nur Phytoen (Gipfel 3) mit den Abs.max. 267 286 300 nm und der Rt von 38,2 min detektiert werden.

In Elutionsprofil D ist die Carotinoidzusammensetzung der durch chemische Mutagenese hergestellte Mutante EMS7 abgebildet. Diese Mutante synthetisiert sehr wenig Carotinoide (hellorange Färbung der Zellen) und zeigte zwei Elutionsgipfel: Myxol und 1',2'-Dihydroxytorulin, hier mit veränderten Rt, da die Auftrennung über die C18-Säule stattfand. Nun wurden die Zellen UV-Strahlung ausgesetzt und Proben nach 0, 30, 50, 90 und 120 min genommen, verdünnt und ausplattiert. Nach Inkubation der Platten wurden die Kolonien ausgezählt und die prozentuale Überlebensrate berechnet (siehe Abbildung 3-28).

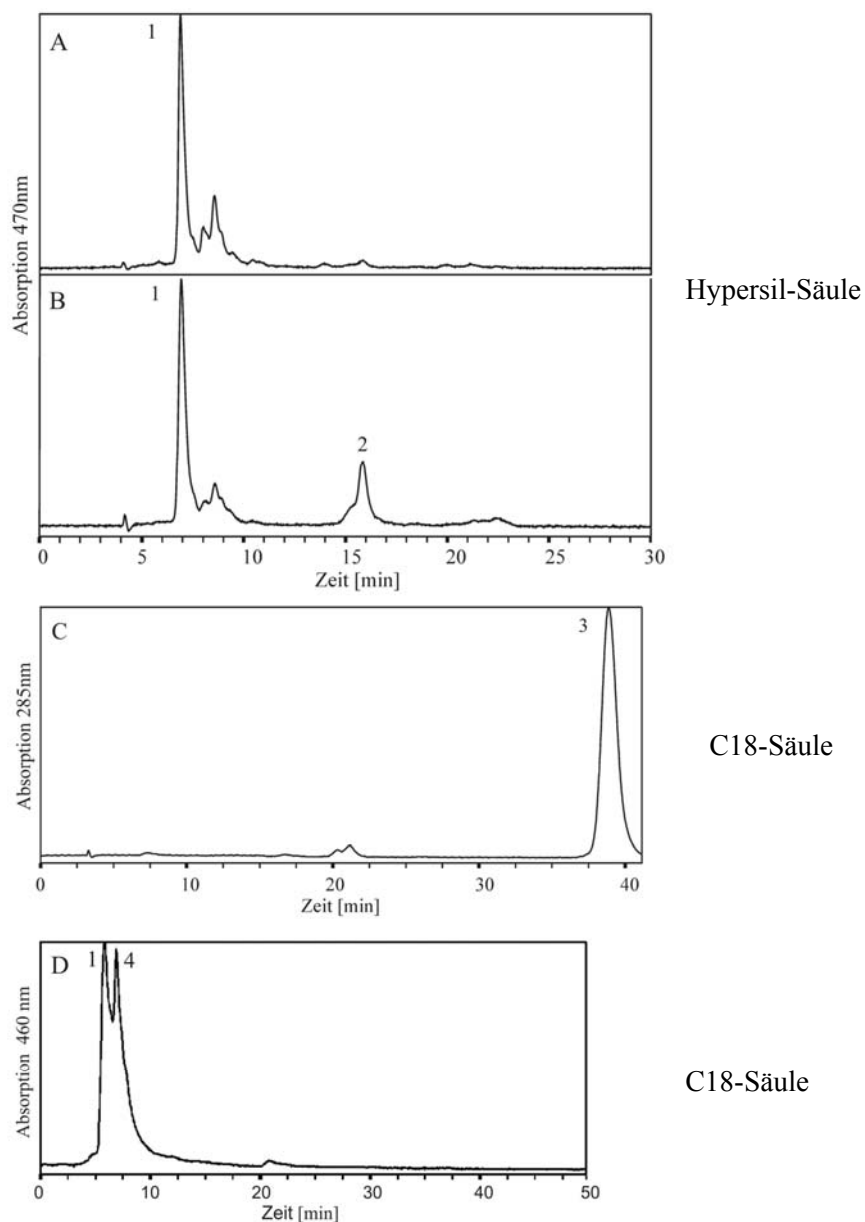


Abb. 3-27: Überprüfung der Carotinoid-Zusammensetzung des Wildtyps *Flavobacterium spec* P99-3 und den Carotinoidmutanten EMS7 und M17

A: Wildtyp *Flavobacterium spec* P99-3

B: Mutante M11

C: Mutante M17

D: Mutante EMS7

1: Myxol	Abs.max. 445 475 508 nm	Rt 7 min
2: 1'2'-Dihydroxytorulin	Abs.max. 445 475 508 nm	Rt 15,8 min
3: Phytoen	Abs.max. 267 286 300 nm	Rt 38,2 min
4: 1'2'-Dihydroxytorulin	Abs.max. 445 475 508 nm	Rt 8 min

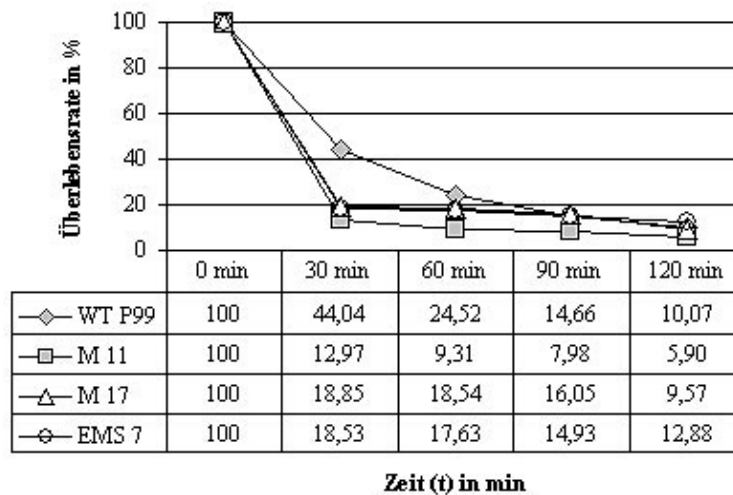


Abb. 3-28: UV-Resistenz von *Flavobacterium spec* P99-3 und den Carotinoid-Mutanten M11, M17 und EMS7.

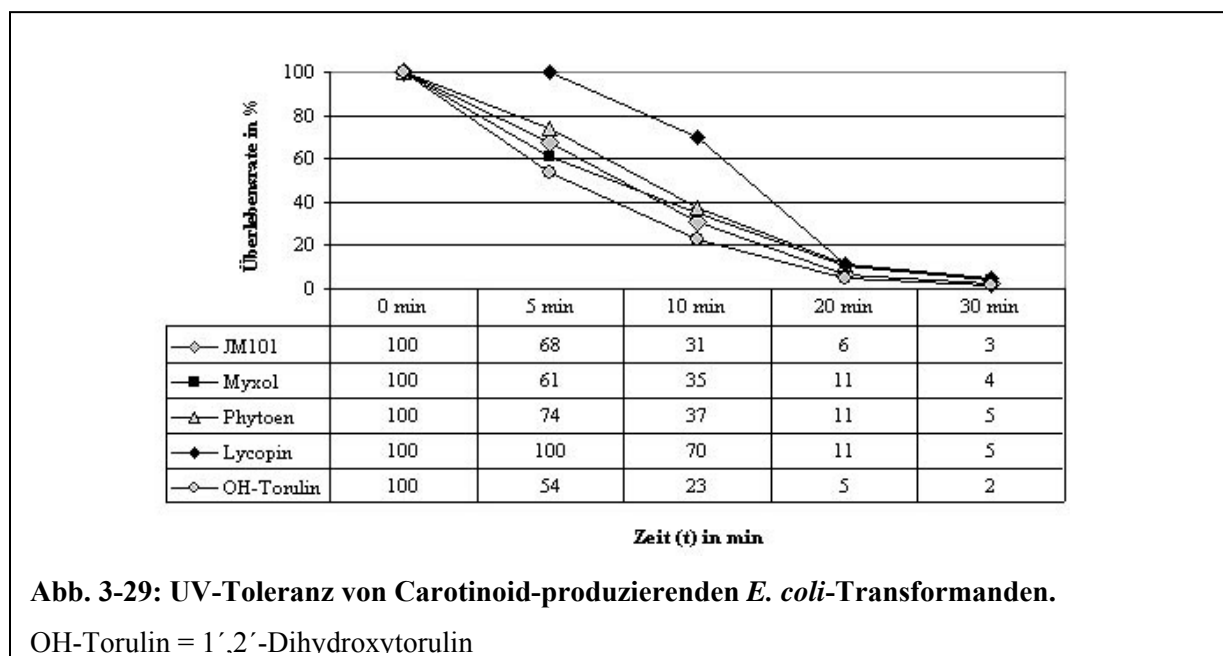
Bei diesem Versuch zeigt sich deutlich, dass der Wildtyp von *Flavobacterium spec* P99-3 nach 30 min UV-Bestrahlung am resistantesten war. Hier liegt eine Überlebensrate von 44 % der Ausgangszellen vor, während bei M17 und EMS7 die Überlebensrate innerhalb der ersten halben Stunde auf ca. 18,5 % sinkt. Bei der Phytoen-akkumulierenden Mutante M11 sinkt die Überlebensrate sogar auf nur ca. 13 %. Nach 60 min UV-Bestrahlung liegt die Überlebensrate beim Wildtyp immerhin noch bei 24,5 %, während sie bei M17 und EMS7 relativ konstant bei ca. 18 % bleibt. Bei dem Mutante M11 fällt die Überlebensrate weiter auf 9,3 %. Nach 90 min hat sich die Überlebensrate des Wildtyps an die der Myxol-haltigen Mutanten angenähert auf 14,6 %, bei M11 liegt sich noch bei knapp 8 %. Nach 120 min Bestrahlung sinkt die Überlebensrate bei allen Proben um 2 bis 4 %, wobei keine großen Unterschiede zwischen den Mutanten M17, EMS7 und dem Wildtyp festzustellen sind.

Für das gleiche Experiment in *E. coli* wurden verschiedene Carotinoid-produzierende Transformanden hergestellt. Zunächst wurden mehrere Transformanden (siehe Tabelle 3-5) und der *E. coli*-Stamm JM101 für 30 min mit UV-Licht bestrahlt und nach 5, 10, 20 und 30 min Proben entnommen.

Tab. 3-5: Carotinoid-produzierende *E. coli*-Transformanten für die UV-Versuchsreihe

Transformande	Carotinoid
JM101[pACcrtEB]	Phytoen
JM101[pACcrtEBI _{Eu}]	Lycopin
JM101[pACcrtEBIal2/pSO50//pPQEcrA ₉₉]	1'2'-Dihydroxytorulin
JM101[pACcrtEBIal2/pSO50/pRKcrtR/pPQEcrA ₉₉]	Myxol

Im UV-Resistenz-Versuch mit *E. coli* zeigte sich zunächst deutlich (siehe Abbildung 3-29), dass der Wildtyp *Flavobacterium spec* P99-3 und die drei *Flavobacterium*-Mutanten wesentlich UV-Resistenter sind als die *E. coli*-Zellen.



Bereits nach einer Bestrahlungsdauer von 5 min können bereits deutliche Unterschiede in der Überlebensrate der verschiedenen *E. coli*-Transformanten und des Stamms JM101 festgestellt werden. Während der Lycopin-Produzent noch 100 % Überlebensrate besitzt, zeigt der Phytoen-Produzent noch 74 %, die untransformierten Zellen von JM101 noch 68 %, der Myxol-Produzent 61 % und der 1',2'-Dihydroxytorulin-Produzent nur noch 54 % Überlebensrate. Nach 10 min UV-Bestrahlung sinkt die Überlebensrate des Lycopin-Produzenten auf 70 %, JM101, der Phytoen-Produzent und der Myxol-Produzent haben eine ähnliche Überlebensrate um 30 %, der Hydroxytorulin-Produzent nur noch von 25 %.

Nach 20 min UV-Licht liegt die Überlebensrate der *E. coli*-Zellen mit Lycopin, Myxol und Phytoen bei 11 %, bei JM101 und dem Hydroxytorulin-Produzenten bei ca. 5 %. Nach 30 min Bestrahlung liegt die Überlebensrate bei allen Proben bei 2 bis 5 %.

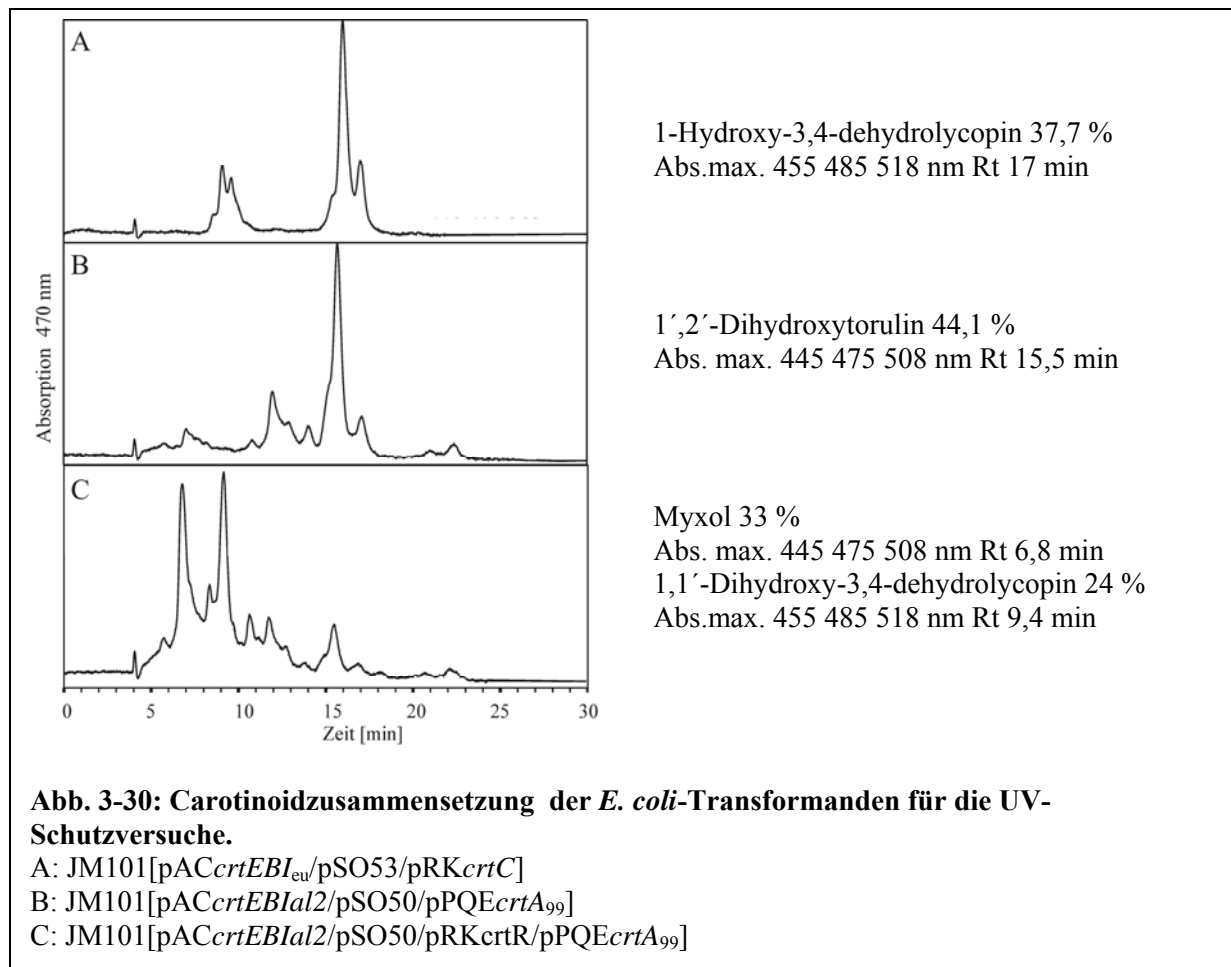
Bei *Flavobacterium spec* P99-3 und den Mutanten ist generell eine höhere UV-Resistenz festzustellen als bei den *E. coli*-Zellen. Nach 30 min Bestrahlung liegt die Überlebensrate bei dem *Flavobacterium*-Wildtyp mit einer hohen Myxol-Konzentration bei 44 % während bei den *E. coli*-Zellen zwischen 2 und 5 % der Zellen überlebten. In den *Flavobacterium*-Zellen überleben die Zellen mit der größten Menge an Myxol nach 30 min UV-Licht-Bestrahlung am besten, während die Zellen mit Phytoen oder wenig gebildeten Carotinoiden eine geringere Überlebensrate besitzen. In den *Flavobacterium*-Zellen scheinen noch andere Mechanismen für einen Schutz vor UV-Licht aktiv zu sein.

In *E. coli* bietet Lycopin den größten UV-Schutz, während Myxol ähnlich wie Phytoen vor UV-Licht schützt. Jedoch ziegten die JM101-Zellen ohne Carotinoide sehr ähnliche Überlebensraten, sodass eine sinnvolle Aussage zu diesem Experiment nicht machbar ist.

Da die Länge des konjugierten Doppelbindungssystems Einfluss auf den UV-Schutz von Carotinoid-Molekülen hat, wurden die Carotinoide Myxol, 1',2'-Dihydroxytorulin und 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin in *E. coli*-Zellen nochmals getestet. Die Zellen wurden in YTG-Medium angezogen, über die Hypersil-Säule aufgetrennt und die Menge der Carotinoide in Prozent zur Gesamtcarotinoidmenge berechnet (siehe Abbildung 3-30).

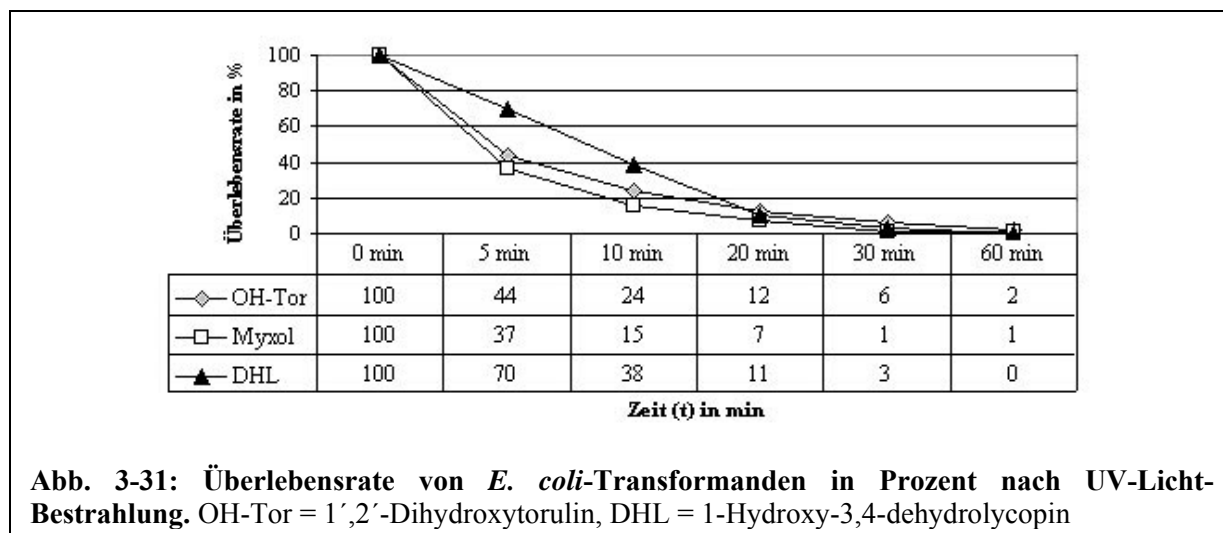
Die Transformande JM101[pACcrtEBI_{eu}/pSO53/pRKcrtC] enthält 37,7 % 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin (Elutionsprofil A) mit den Abs.max. 455 485 518 nm und einer Rt von 17 min.

In Elutionsprofil B ist die Transformande JM101[pACcrtEBI_{al2}/pSO50/pPQE_{crtA99}] abgebildet, die 44,1 % 1',2'-Dihydroxytorulin mit den Abs.max. 445 475 508 nm und einer Rt von 15,5 min bildet. Die Transformande JM101[pACcrtEBI_{al2}/pSO50/pRKcrtR/pPQE_{crtA99}] zeigt nach HPLC-Analyse (Elutionsprofil C) 33 % Myxol mit den Abs.max. 445 475 508 nm und einer Rt von 6,8 min aber auch 24 % 1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin mit den Abs.max. 455 485 518 nm und einer Rt von 9,4 min.



Diese *E. coli*-Zellen wurden wiederum unter UV-Licht gestellt und nach 5, 10, 20, 30 und 60 min Proben entnommen und wie zuvor verdünnt und ausplattiert. Die Kolonien wurden wiederum ausgezählt.

In Abbildung 3-31 ist die Überlebensrate in Prozent der *E. coli*-Zellen dargestellt. Nach 5 min UV-Bestrahlung zeigen die Zellen mit 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin (DHL) eine Überlebensrate von 70 %, 1',2'-Dihydroxytorulin (OH-Tor) von 44 % und Myxol von 37 %. Nach 10 min Bestrahlung sank die Überlebensrate bei DHL auf 38 %, bei OH-Tor auf 24 % und bei Myxol auf 15 %. Nach 20 min lag die Menge der überlebenden Zellen bei allen Proben relativ gleich bei 7 bis 12 %, und sank nach 30 und 60 min UV-Licht weiter auf 1 bis 6 % und 2 bis 0 %.



1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin zeigt in diesem Versuch den besten UV-Schutz in *E. coli*-Zellen, 1',2'-Dihydroxytorulin zeigte einen etwas besseren Schutz als Myxol. Vergleicht man diese Überlebensraten mit denen aus Abb. 3-31, kann kein wirklicher Vergleich zwischen den beiden Experimenten gezogen werden, da die Überlebensraten im ersten *E. coli*-Experiment wesentlich über denen des zweiten Experiments liegen. Wahrscheinlich liegen diese großen Unterschiede an variierenden Carotinoid-Mengen in den Zellen, daher sollten diese UV-Licht-Experimente *in vitro* mit gleichen Mengen an Carotinoiden durchgeführt werden.

4. DISKUSSION

4.1 Cosmid-Bibliothek aus *Flavobacterium spec P99-3*

Zur Erstellung der Cosmid-Bibliothek aus *Flavobacterium spec P99-3* wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen wurde die genomische DNA mit einem Restriktionsenzym partiell verdaut, zum anderen wurde die genomische DNA mittels Scherkräfte in Bruchstücke zerteilt und die 31 bis 40 kb großen Fragmente kloniert. Somit sollte sichergestellt sein, dass zumindest bei einem der beiden Ansätze das Carotinoidgencluster von *Flavobacterium spec P99-3* auf einem Klon funktionell vorliegt. Rein rechnerisch sollte bei einer Genomgröße eines Bakteriums 500 Cosmidklone mit einer Insert-Fragment-Größe von 31 bis 40 kb ausreichen, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % das gesamte Genom abzudecken.

Daher wurden nach Titerbestimmung mindestens 1500 Klone der beiden Ansätze ausplattiert und auf Carotinoidsynthese hin gescreent. Von 10 Klonen wurden die Cosmide isoliert, sie zeigten nach Auftrennung über ein Agarosegel unterschiedliche Schnittmuster mit *Bam*HI. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Cosmid-Bibliotheken das gesamte Genom von *Flavobacterium spec P99-3* abgedeckt hat.

Da kein farbiger Klon identifiziert werden konnte muss davon ausgegangen werden, dass das Carotinoidgencluster in keinem der Klone funktionell vorlag. Hierfür könnte es mehrere Gründe geben. Zum einen könnte das Gencluster auf keinem Klon vollständig vorliegen und so eine Carotinoidbiosynthese in den *E. coli*-Wirtszellen nicht möglich sein. Weil hier zwei unterschiedliche Ansätze zur Herstellung der genomischen DNA-Fragmente verfolgt wurden und drei mal mehr Klone pro Bibliothek gescreent wurden als theoretisch nötig, kann davon ausgegangen werden, dass auf mindestens einem Klon das Carotinoidgencluster hätte komplett vorliegen müssen. Außerdem könnten die Gene für die Carotinoidbiosynthese bei *Flavobacterium spec P99-3* nicht geclustert sondern verteilt im Genom vorliegen. Bei Bakterien sind in der Regel die Carotinoidgene in einem Cluster lokalisiert.

Lediglich eine Ausnahme ist hier bekannt: bei *Xanthobacter autotrophicus* Py2 liegen die Carotinoidgene *crtY*, *crtI*, *crtB* und *crtX* in einem Cluster und *crtE* in einem weiteren Cluster, wobei *crtZ* im Genom noch nicht lokalisiert werden konnte aber aufgrund der Carotinoid-Zusammensetzung vorhanden sein muß (Larsen *et al.* 2002). Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Carotinoidbiosynthese-Gene in P99-3 nicht in einem Gencluster vorliegen, sehr gering.

Es kann eher davon ausgegangen werden, dass die Promotorregion(en) der Carotinoidgene aus *Flavobacterium spec* P99-3 in *E. coli* nicht erkannt werden und daher in der Wirtszelle keine Synthese von Carotinoiden nachgewiesen werden konnte oder die Codon usage von *Flavobacterium spec* P99-3 und *E. coli* zu unterschiedlich sind.

4.2 PCR mit degenerierten Primern

Zur Amplifikation des Gens der Phytoen Desaturase aus dem hypothetischen Carotinoidgencluster von *Flavobacterium spec* P99-3 wurden degenerierte Primer anhand der Sequenzdaten der Desaturase-Gene von *Flavobacterium spec* R1534, *Agrobacterium aurantiacum*, *Erwinia uredovora* und *Erwinia herbicola* erstellt. Es konnten 5 Amplifikate nach Auftrennung über ein Agarosegel identifiziert werden.

Bei dem Versuch stringenter Bedingungen für die Polymerase-Kettenreaktion zu wählen, konnten keine Amplifikate mehr detektiert werden. Drei der zuvor amplifizierten DNA-Banden wurden kloniert, zeigten nach Sequenzierung jedoch keine Ähnlichkeit mit bereits bekannten Carotinoidgenen. Wahrscheinlich besitzt die Phytoen Desaturase aus *Flavobacterium spec* P99-3 keine so große Homologie mit den gewählten Sequenzen für die degenerierten Primer. Bereits zuvor versuchte Amplifikationen mit degenerierten Primern der Phytoen Desaturase aus *Flavobacterium linens* schlugen ebenfalls fehl (Krubasik, 2000c).

4.3 Expressions-Bibliothek aus *Flavobacterium spec* P99-3

Mit Hilfe der Expressions-Bibliothek konnte das Carotinoidgencluster identifiziert werden. Die genomische DNA wurde partiell verdaut und die Fragmente in einen *E. coli*-Expressionsvektor kloniert. Durch heterologe Komplementation der genomischen DNA-Fragmente aus *Flavobacterium spec* P99-3 unter einem induzierbaren Promotor für *E. coli* in verschiedenen *E. coli*-Wirtszellen konnte in Lycopin produzierenden Wirtszellen ein Klon isoliert werden, der γ -Carotin und β -Carotin produzierte. Das Plasmid der Expressions-Bibliothek trug eine Lycopin Zyklase. Eine Kontamination mit einer anderen Lycopin Zyklase konnte durch Restriktionsanalyse der Plasmide ausgeschlossen werden.

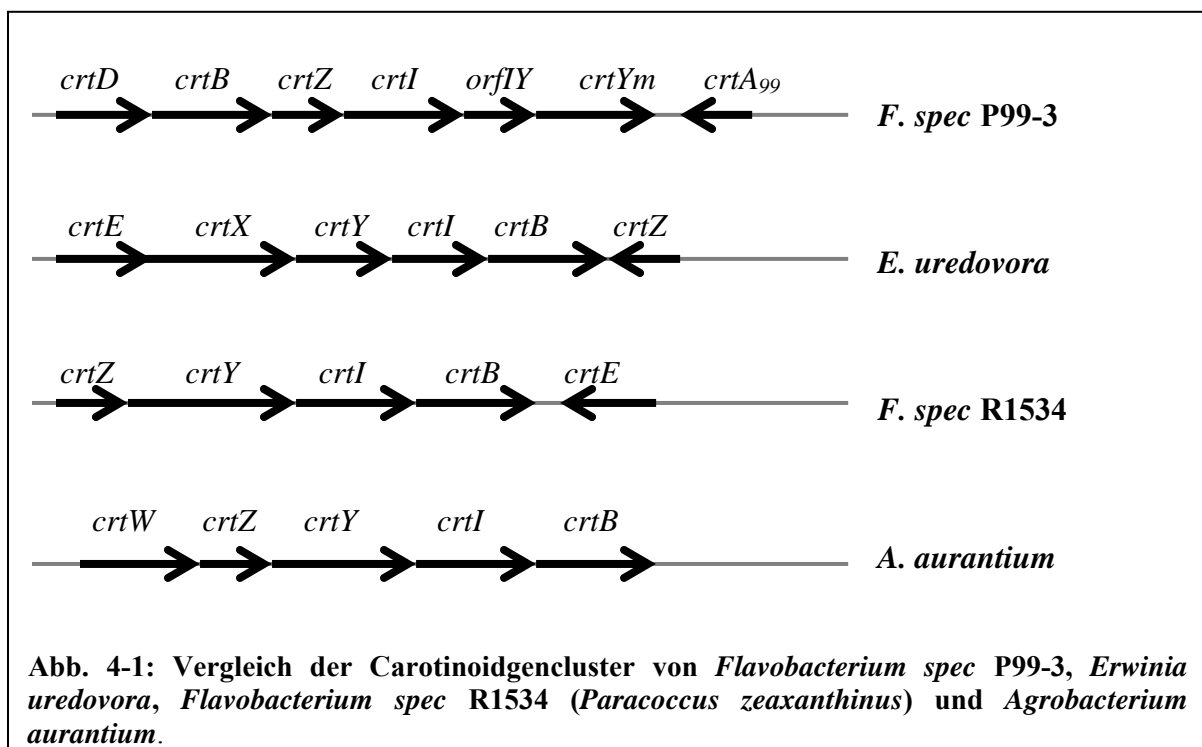
Bei der heterologen Komplementation mit *E. coli*-Wirtszellen, bei denen das Screening nach einer Phytoen Synthase und einer Phytoen Desaturase durchgeführt wurde, konnte kein Klon identifiziert werden, der zu einer weiterführenden Carotinoidbiosynthese fähig war. Da unter 20.000 Klonen mindestens ein Klon zu finden sein sollte, der einen großen Teil des Carotinoidgenclusters trägt, ist es wahrscheinlich, dass die Promotorregionen von

Flavobacterium spec P99-3 nicht von *E. coli*-Zellen erkannt werden und daher keine Expression stattfindet.

Bei dem Lycopin umsetzenden Klon ist es möglich, dass das Gen der Lycopin Zyklase von *Flavobacterium spec* P99-3 im Leseraster des Promotors des Expressionsvektors liegt oder eine eigene Promotorregion besitzt, die *E. coli* erkennt und so eine Umsetzung von Lycopin zu γ -Carotin und β -Carotin stattfinden konnte. Dies konnte auch nach der Ansequenzierung von K2 nicht nachvollzogen werden, da das Insertfragment dieses Klons nicht vollständig sequenziert wurde und mit seinem mindestens 17 kb großen Insertfragment zu schnell Sequenzierfehler auftreten.

4.4 Carotinoidgencluster aus *Flavobacterium spec* P99-3

Nach Sequenzierung eines knapp 15 kb großen Fragments von K2 aus der Expressions-Bibliothek konnten 10 offene Leseraster identifiziert werden. Anhand von Sequenzhomologien konnten einige der offenen Leseraster Carotinoidgenen zugeordnet werden (siehe Abb. 4-1).



Vergleicht man das Carotinoidgencluster aus *F. spec* P99-3 mit den Genclustern aus *E. uredovora*, *Flavobacterium spec* R1534 und *A. aurantium*, zeigt sich, dass bei *E. uredovora*, *F. spec* R1534 und *A. aurantium* die Gene *crtY*, *crtI* und *crtB* in gleicher Orientierung

hintereinander liegen. Dies kommt bislang bei allen bakteriellen Carotinoidgenclustern vor, die zyklische Carotinoide bilden (Nishida *et al.*, 2005).

Bei dem Carotinoidgencluster von *Flavobacterium spec* P99-3 hingegen liegt zwischen *crtB* und *crtI* das Gen *crtZ* und zwischen *crtI* und *crtY* das offene Leseraster *orfIY*. Das Gen *crtE* konnte im Carotinoidgencluster von *Flavobacterium spec* P99-3 nicht identifiziert werden. Das Gen *crtE* codiert für eine GGPP Synthase und könnte mit einer 1,2-Hydratase in einem weiteren nicht identifizierten Operon im Genom von *Flavobacterium spec* P99-3 vorliegen. Bei dem marinen Bakterium *Agrobacterium aurantium*, dessen Carotinoid Endprodukt Astaxanthin ist, wurde im Carotinoidgencluster ebenfalls keine GGPP Synthase gefunden (Misawa *et al.*, 1995).

Eine Promotorregion für das Carotinoidgencluster konnte nicht identifiziert werden, jedoch sollten mindestens zwei Promotorregionen für die identifizierten Strukturgene vorhanden sein, da *crtD*, *crtB*, *crtZ*, *crtI* und *crtYm* in einer Leserichtung vorliegen und *crtA₉₉* in der anderen Leserichtung. Somit liegen wahrscheinlich zwei Operons in entgegengesetzter Richtung vor.

4.5 *orfI1* und *orfI2*: Phytoen Desaturase oder 3,4-Desaturase?

Die offenen Leseraster *orfI1* und *orfI2* zeigen Sequenzhomologie zu Phytoen Desaturasen. Bei *orfI2* sind 40 % der Aminosäuresequenz identisch zu der Phytoen Desaturase aus *Halobacterium spec* NRC-1 und bei *orfI1* 32 % der Aminosäuresequenz identisch zu der Phytoen Desaturase aus *Protecochloris aesuarii*. Im phylogenetischen Stammbaum aus Abbildung 3-8 ist zu entnehmen, dass ORF11 Sequenzhomologie zu den CrtD-Typ Desaturasen besitzt, während ORF12 Sequenzhomologie zu den CrtI-Typ Desaturasen zeigt. Teramoto *et al.* (2003) klonierten *orfI2* in den pUC18-Vektor und konnten einen Umsatz von Phytoen zu Lycopin zeigen. *orfI2* codiert somit für eine Phytoen Desaturase. Eigene Komplementationsversuche mit dem CrtI₉₉-Konstrukt, welches von Dr. Teramoto zur Verfügung gestellt wurde, schlugen jedoch fehl.

orfI1 zeigte bei Komplementation mit 1-Hydroxy-Carotinoiden 3,4-Desaturase-Aktivität. CrtD₉₉ aus *Flavobacterium spec* P99-3 konnte wie crtD_{rg} aus *Rubrivivax gelatinosus* (Steiger *et al.*, 2000) strukturell unterschiedliche Substrate umsetzen. Beide 3,4-Desaturasen benötigen zur Substraterkennung an der offenkettigen ψ -Endgruppe eine Hydroxygruppe am C1-Atom und setzen 1-Hydroxyneurosporin, 1-Hydroxylycopin und 1-Hydroxy- γ -carotin um. CrtD_{rg} aus *Rubrivivax gelatinosus* war jedoch nicht in der Lage, Dihydroxy-Carotinoide wie 1,1'-Dihydroxylycopin umzusetzen. CrtD₉₉ hingegen konnte 1,1'-Dihydroxy-Carotinoide wie

1,1'-Dihydroxyneurosporin zu 1-Hydroxy-DMS und 1,1'-Dihydroxylycopin zu 1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin und zu 1,1'-Dihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin umsetzen. Jedoch konnte auch CrtD₉₉ 1-Hydroxy-DMS nicht weiter umsetzen.

Wahrscheinlich ist hierfür die fehlende Doppelbindung zwischen C7/C8 im Neurosporin-Grundgerüst verantwortlich, sodass 1-Hydroxy-DMS nicht als Substrat erkannt wird aber 1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin.

Auch konnte mit der 3,4-Desaturase aus *Flavobacterium spec* P99-3 wesentlich mehr 3,4-desaturierte Produkte gebildet werden in Bezug auf die Gesamtcarotinoidmenge der heterologen Komplementation in *E. coli* als mit der 3,4-Desaturase aus *Rubrivivax gelatinosus*. Besonders 1'-Hydroxytorulin wurde zu 39,8 % durch CrtD₉₉ gebildet (siehe Tabelle 3-3). Dieser hohe Umsatz von 1-Hydroxy- γ -carotin war zu erwarten, da das Produkt von CrtD₉₉ eine Vorstufe des Endprodukts Myxols in *F. spec* P99-3 ist. Im Wildtyp von *Flavobacterium spec* P99-3 sind so gut wie keine Nebenprodukte von Myxol zu finden (siehe Abbildung 3-24), was eine hohe Affinität der Enzyme der Carotinoidbiosynthese zu ihren Substraten vermuten lässt.

CrtD₉₉ codiert für ein Protein mit 488 AS Länge und einer aparenten Molmasse von 55 kDa. Im N-terminalen Bereich des Proteins ist eine charakteristische Bindestelle für die Cofaktoren FAD oder NAD (Aminosäure 3 bis 31) vorhanden (Wierenga *et al.*, 1986). Im C-terminalen Bereich findet sich zwischen Aminosäure 455 bis 470 eine konservierte Region von CrtD und CrtI aus *Rhodobacter capsulatus* (Armstrong *et al.*, 1989). Hypothetisch kommen in dem Protein keine Transmembrandomänen vor (Kyte & Doolittle, 1982). Evolutionär distanziert sich CrtD₉₉ von anderen 3,4-Desaturasen, da es aus einem Bakterium kommt, das monozyklische Carotinoide bildet. Alle weitere bekannte 3,4-Desaturasen stammen aus Bakterien, die nur azyklische Carotinoide synthetisieren.

4.6 Lycopin-Monozyklase CrtYm

Das offene Leseraster *orfY* zeigte bei Komplementationsversuchen β -Zyklase-Aktivität. Da hauptsächlich monozyklische Carotinoide gebildet wurden, stellt ORFY die Monozyklase CrtYm aus *Flavobacterium spec P99-3* dar. Derzeit werden die Lycopin β -Zyklasen in vier Subklassen unterteilt (Krubasik & Sandmann, 2000b):

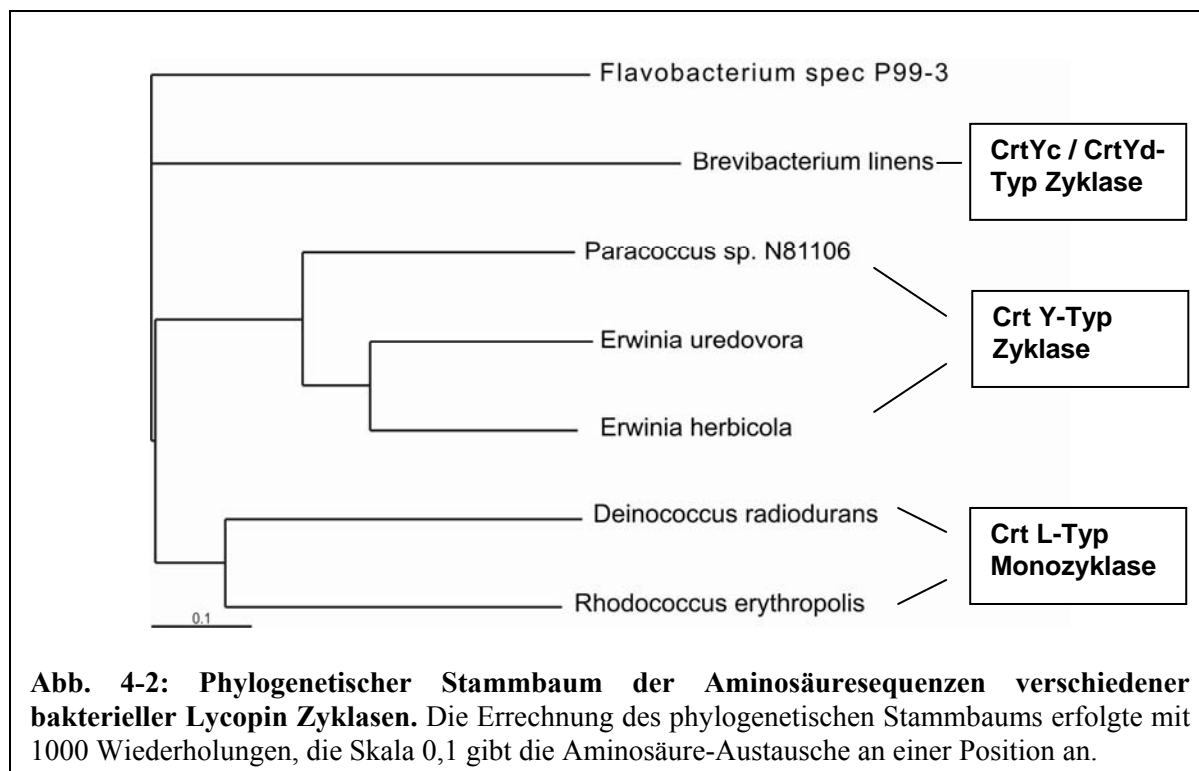
- monomerer, bakterieller CrtY-Typ (Misawa *et al.*, 1995; Schnurr *et al.*, 1996; Pasamontes *et al.*, 1997 ; Krugel *et al.*, 1999 ; Hannibal *et al.*, 2000)
- monomerer, pflanzlicher CrtL-Typ / Lcy-b-Typ (Cunningham *et al.*, 1994, 1996 ; Hugueney *et al.*, 1995 ; Pecker *et al.*, 1996)
- heterodimer CrtYc/CrtYd-Typ (Krubasik & Sandmann, 2000a ; Viveiros *et al.*, 2000)
- bifunktionaler, pilzlicher CrtYB-Typ (Verdoes *et al.*, 1999; Velayos *et al.*, 2000; Arrach *et al.*, 2001; 2002)

Betrachtet man den phylogenetische Stammbaum von verschiedenen bakteriellen Lycopin Zyklasen, zeigt sich, dass CrtYm aus *Flavobacterium spec P99-3* sich nicht in die Gruppe der bakteriellen monomerer, bakterieller CrtY-Typ Zyklasen einordnet (siehe Abbildung 4-2).

Die meisten CrtY-Typ Lycopin Zyklasen zyklisieren beide Enden von Lycopin zu β -Carotin. Monozyklische Carotinoide sind selten vorhanden als natürliche Intermediate der Synthese von bityklischen Molekülen (Britton *et al.*, 1977) oder akkumulieren bei Hemmung der Zyklase-Aktivität (Yokoyama *et al.*, 1996).

Zwei weitere Monozyklase wurden aus den nicht-photosynthetisch aktiven Bakterien *Rhodococcus erythropolis* AN12 und *Deinococcus radiodurans* R1 isoliert, beide Monozyklasen zeigen Sequenzhomologie zu den pflanzlichen Lycopin Zyklasen CrtL aber nicht zu den bakteriellen β -Zyklasen (Tao *et al.*, 2004) und sollten als neue Gruppe der Lycopin Zyklasen als bakterielle CrtL-Typ Monozyklase etabliert werden.

Die Monozyklase CrtYm gruppiert sich zu keinen der dargestellten Lycopin Zyklase Typen. Daher sollte auch für diesen Lycopin Zyklase-Typ eine weitere Gruppe etabliert werden.



Die Lycopin Zyklase CrtYm aus *Flavobacterium spec* P99-3 konnte neben Lycopin auch 1-Hydroxylycopin gut zyklisieren. Am C1-Atom hydroxylierte Substrate können nicht von allen Lycopin Zyklasen umgesetzt werden, so zum Beispiel nicht von der Lycopin Zyklase aus *Brevibacterium linens* (Rähler, 2000). Zu einem geringen Prozentsatz zyklisiert CrtYm Lycopin auch an beiden Enden zu β -Carotin. Für die Substraterkennung der Lycopin Zyklase aus *F. spec* P99-3 ist somit die Hydroxygruppe am C1-Atom irrelevant, jedoch kann die am C1-Atom hydroxylierte ψ -Endgruppe nicht zyklisiert werden.

4.7 *orfA*: Verantwortlich für die Hydroxygruppe am C2'-Atom?

Das offene Leseraster *orfA* zeigte Sequenzhomologie zu den Sphaeroiden Monooxygenasen CrtA aus *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodovulum sulphidophilum*. Durch Komplementationsversuche konnte gezeigt werden, dass OrfA₉₉ bei den Carotinoiden DMS, 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin und 1-Hydroxytorulin eine Hydroxygruppe am C2'-Atom einfügt.

Diese sekundäre Hydroxygruppe konnte eindeutig durch die Oxidation mit p-Chloranil zu einer Ketogruppe am C2'-Atom und somit zu einer Veränderung des Absorptionsmaximums nachgewiesen werden. CrtA₉₉ ist somit die erste identifizierte 2-Hydroxylase, die z.B. auch in *Rhodothermus marinus* vorhanden sein sollte, da das gebildete Carotinoid Salinixanthin in diesem Bakterium ebenfalls eine Hydroxygruppe am C2'-Atom besitzt (Lutnaes *et al.*, 2004). Ebenso sollte *Synechocystis* PCC6830 ein CrtA₉₉ ähnliches Gen zu finden sein, da das Cyanobakterium Myxoxanthophyll bildet, welches am C2'-Atom glycosiliert ist. Jedoch wurde *Synechocystis* komplett sequenziert und in der Datenbank befindet sich kein homologer ORF zu CrtA₉₉.

CrtA₉₉ konnte Substrate nur umsetzen, wenn sie bereits am C1-Atom hydroxyliert und zwischen dem C3/C4-Atom desaturiert waren. Produkte, die am C2-Atom und am C2'-Atom durch CrtA₉₉ hydroxyliert wurden, konnten nicht identifiziert werden. Ein solches Produkt ist aber theoretisch möglich. Die 2-Hydroxylase CrtA₉₉ sollte theoretisch in der Lage sein, 1,1'-Dihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin zu 1,1',2,2'-Tetrahydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin umzusetzen. Ein solches Produkt konnte allerdings auf der HPLC mit der Hypersil-Säule bei 20°C nicht identifiziert werden, da es sehr schwierig ist, Carotinoide mit mehreren Hydroxygruppen voneinander zu trennen. Zwar konnten mit der Hypersil-Säule bei 20°C zweifach hydroxylierte Produkte von dreifach hydroxylierten Produkten getrennt werden aber Produkte mit vier Hydroxygruppen dürften ungefähr mit dem Einspritzpeak von der Säule eluieren. Hierfür sollte das HPLC-System dahingehend verändert werden, dass mehrfach hydroxylierte Produkte noch besser voneinander getrennt werden können. Möglich wäre bei größeren Mengen dieser mehrfach hydroxylierten Produkte zunächst eine Trennung über Dünnschichtchromatographie mit anschließender HPLC-Analyse nach Reextraktion der einzelnen Fraktionen.

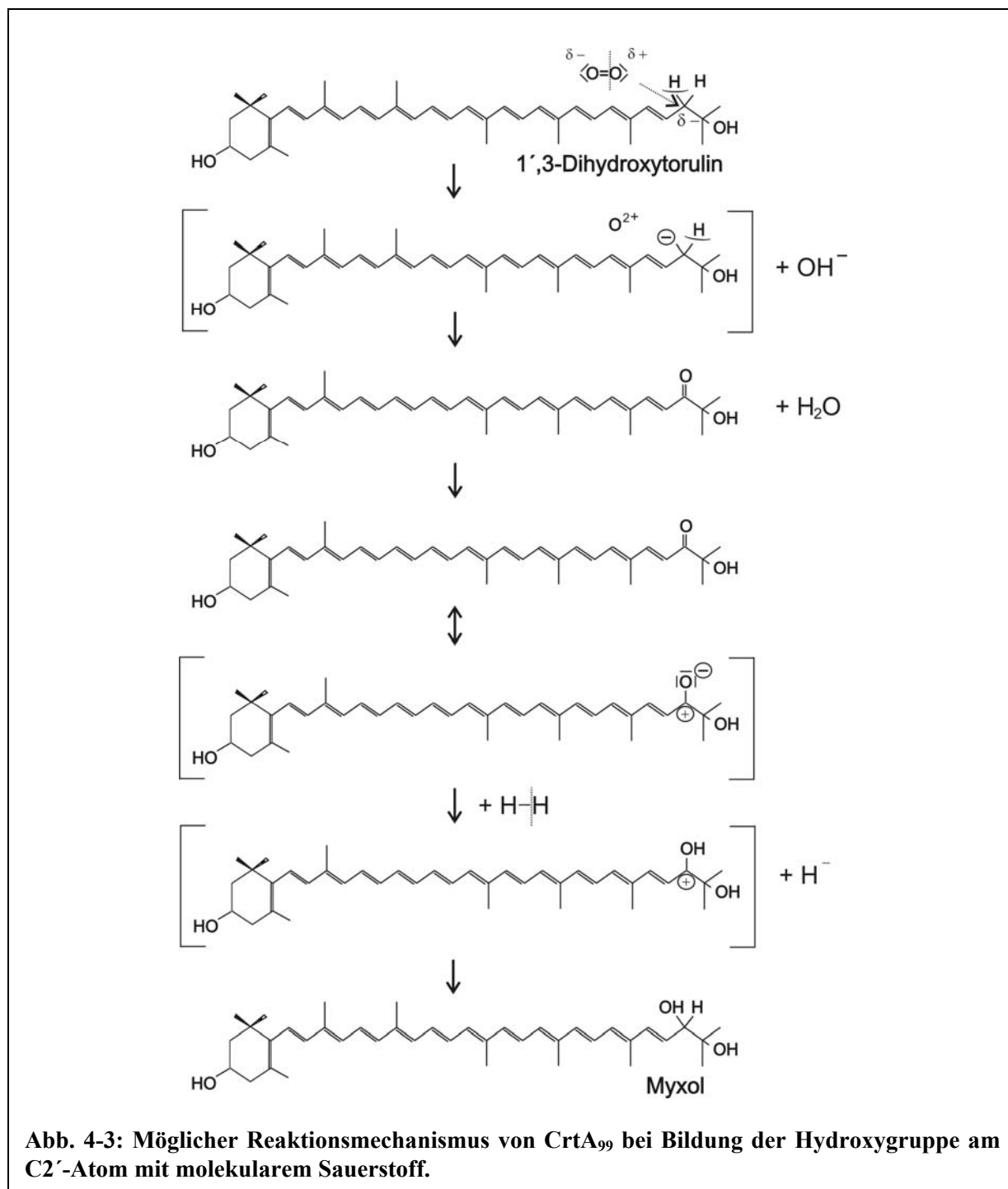
Es wurde versucht CrtA₉₉ funktionell in *E. coli* zu exprimieren und das aktive Protein mittels Metallaffinitätschromatographie zu reinigen. Hierfür wurde das Protein mit einem N-terminalen His-tag versehen. Eine schwache Expression des membranständigen Proteins konnte in *E. coli* gezeigt werden, jedoch lag es in der Membranfraktion vor und der lösliche Anteil in kleinen Membranfragmenten war verschwinden gering (siehe Abbildung 3-26). Eine *in vitro*-Aktivität konnte durch den Umsatz von DMS nicht gezeigt werden, eine Expression in anderen *E. coli*-Stämmen (DH5 α und XL1 blue MRF') führte zu keinem positiven Ergebnis.

Auch der Einsatz von Lipiden (Phosphatidylcholin) und Detergenzien (CHAPS, Mega7, Nonident P40, Tergitol, TritonX-100 und Tween40) zum Solubilisieren des membranständigen Enzyms (Sandmann, 1994) konnte zu keiner Enzymaktivität *in vitro* beitragen. Es wurde versucht, den Anteil des exprimierten Proteins durch die Anzucht in verschiedenen Nährmedien zu erhöhen. Durch eine fraktionierende Ammoniumsulfatfällung konnte der Anteil des Proteins zwar gesteigert und nach einer anschließenden Metallaffinitätschromatographie angereichert werden (siehe Abbildung 3-26), jedoch waren auch das hier gereinigte Enzym *in vitro* nicht mehr aktiv.

Da den *in vitro*-Tests neben dem gereinigten und entsalzten Enzym Substrathomogenat (aufgeschlossenen *E.coli*-Zellen, die das Carotinoid DMS gebildet hatten) zugesetzt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass alle eventuell benötigten Cofaktoren für eine Enzymaktivität vorhanden waren. Daher ist es möglich, dass das Enzym entweder leicht denaturiert war und daher inaktiv vorlag oder der N-terminale His-tag einen Substratumsatz verhindert hat. Durch die sechs Histidine am N-terminalen Ende des Proteins könnte es zu einer veränderten Faltung des Proteins gekommen sein, was einen Aktivitätsverlust nach sich ziehen könnte.

Für weitere Versuche CrtA₉₉ zu exprimieren, könnte das Gen in einen anderer Vektor kloniert werden, sodass das Protein einen C-terminalen His-tag erhält. Eventuell könnte so eine *in vitro*-Aktivität erzielt werden und das Enzym weiter charakterisiert werden. Da CrtA₉₉ Sequenzhomologien zu den Spheroidin Monooxygenasen hat, ist anzunehmen, dass sie einen ähnlichen Reaktionsmechanismus besitzen.

Hydroxylasen die eine Hydroxygruppe am C3-Atom des β -Rings einfügen nutzen molekularen Sauerstoff (Blasco *et al.*, 2004). Dieser Reaktionsmechanismus wäre bei der Hydroxylase CrtA₉₉ auch denkbar (siehe Abbildung 4-3).



Durch die Anlagerung von O₂ am δ⁻ C2'-Atom von 1',3-Dihydroxytorulin könnte H⁺ abgespalten und O²⁺ angelagert werden. Das hierbei entstehende instabile Carbanion kann einerseits durch das delokalisierte λ-Elektronensystem stabilisiert werden, andererseits auch durch den sog. mesomeren Effekt. Nach Abspaltung des zweiten H⁺-Ions am C2'-Atom kann dort eine sekundäre Ketogruppe entstehen. Da im Wildtyp von *Flavobacterium spec* P99-3 kein Ketocarotinoid identifiziert werden konnte, scheint das Enzym CrtA₉₉ noch eine Oxidation der Ketogruppe zu einer sekundären Hydroxygruppe zu katalysieren. Letzlich kann der Reaktionsmechanismus von CrtA₉₉ jedoch nur in einem *in vitro*-Test aufgeklärt werden.

4.8 Neuartige Carotinoide durch Genkombination in *E. coli*

Escherichia coli ist ein konventioneller Wirt für heterologe Carotinoidsynthese, da die meisten der Carotinoide aus Bakterien, Algen, Pilzen und höheren Pflanzen in diesem Bakterium funktionell exprimiert werden können (Sandmann, 2001).

So können durch Kombination von verschiedenen Genen aus unterschiedlichen Organismen und unterschiedlichen Carotinoidebiosynthese-Zweigen neue Carotinoide synthetisiert werden (Albrecht *et al.*, 1999; Sandmann, 2002).

Für die Synthese der „Grundcarotinoide“ wurden in dieser Arbeit für die Lycopin Synthese die Gene *crtE*, *crtB* und *crtI* aus *Erwinia uredovora* unter dem konstitutiv exprimierenden Promotor des Carotinoidegenclusters aus *E. uredovora* in einem pACYC-Vektor verwendet, für die Synthese von Neurosporin das gleiche Konstrukt jedoch mit der Phytoen Desaturase *crtI_{rc}* aus *Rhodobacter capsulatus*.

Die Hydratase CrtC im Vektor pRK404 stammt ebenfalls aus *Rhodobacter capsulatus*, oder lag auf dem Plasmid pSO50, einem pBBR-Abkömmling, mit dem Gen *crtD* aus *Rubrivivax gelatinosus* vor. Auf dem Plasmid pSO53 lag die 3,4-Desaturase aus *Rubrivivax gelatinosus* alleine vor.

Als Lycopin Zyklase wurde *al2* aus *Neurospora crassa*, kloniert auf das Plasmid für die Lycopin-Synthese, genutzt, da Al2 eine Monozyklase ist und viel γ -Carotin bildet.

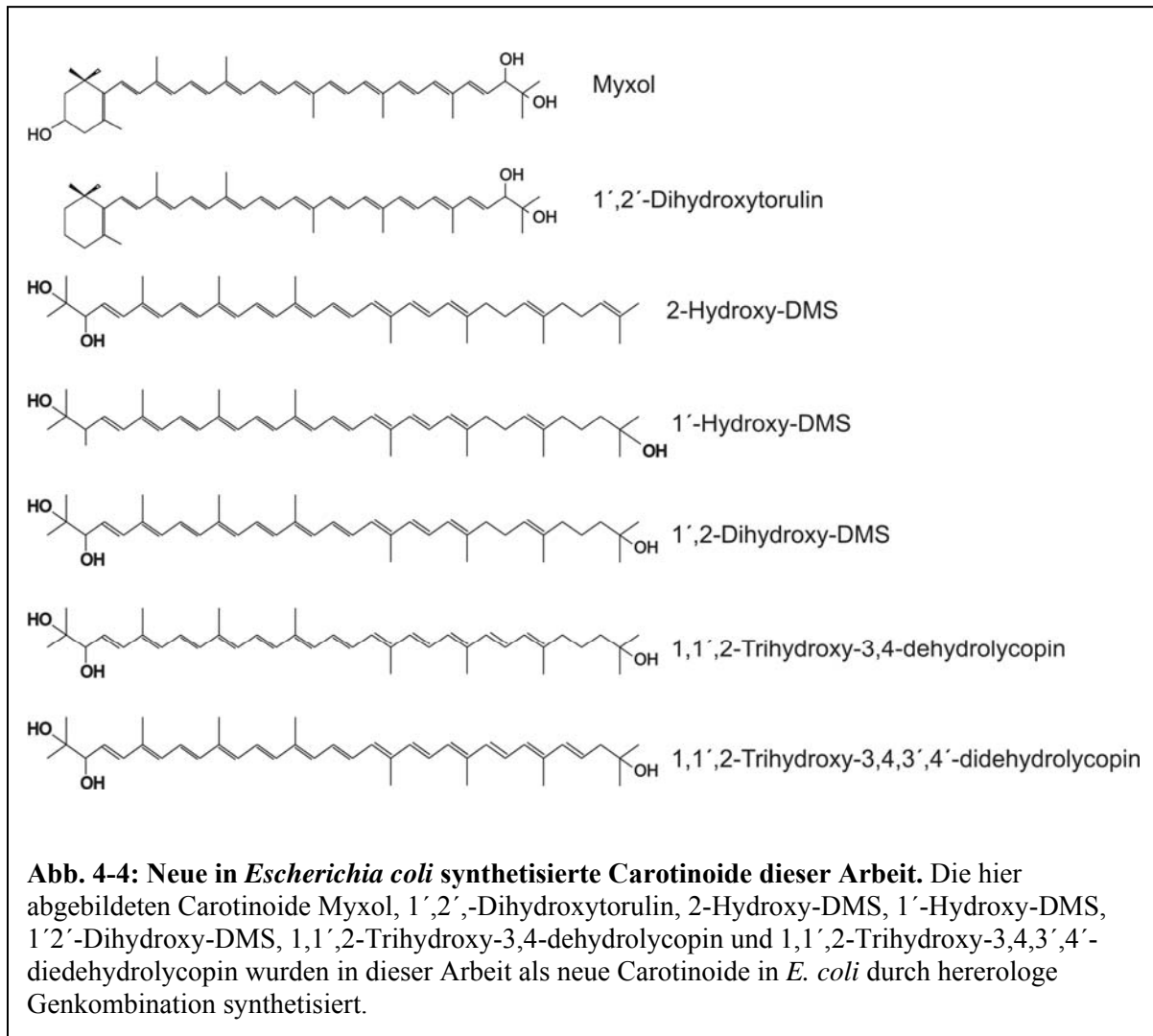
Für die Hydroxylierung des β -Rings am C3-Atom wurde das Konstrukt pRK*crtR* verwendet mit der Hydroxylase aus *Synechococcus* PCC6301.

Die zu untersuchenden Gene aus *Flavobacterium spec* P99-3 lagen auf pUC oder pQE-Vektoren vor, sodass eine Kombination mit den Substrat bildenden Plasmiden möglich war. Die verschiedenen Plasmide gehören zu unterschiedlichen Inkompatibilitätsgruppen und besitzen alle andere Antibiotika-Resistenzen zur selektiven Anzucht von Transformanten.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal in *E. coli* das Xanthophyll Myxol synthetisiert werden. Hierfür wurden die Zellen in YTG-Medium angezogen, wodurch die Synthese von Lycopin-Derivaten reduziert werden konnte und die Menge an Myxol von 27,5 % in LB-Medium auf 48, 2 % der Gesamtcarotinoide in YTG-Medium gesteigert werden konnte (siehe Tabelle 3-4).

Bei der Komplementation von CrtD₉₉ in einem DMS-Hintergrund konnte 1'-Hydroxy-DMS synthetisiert werden, da die 3,4-Desaturase aus *Flavobacterium spec* P99-3 auch 1,1'-Dihydroxyneurosporin umsetzen kann. (siehe Abbildung 3-9).

Bei der Komplementation von CrtD₉₉ in einem Hydroxylycopin-Hintergrund konnte 1,1'-Dihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin identifiziert werden (siehe Abbildung 3-10), ebenfalls ein neuartiges Carotinoid, das zuvor noch nicht in *E. coli* synthetisiert werden konnte. Bei der Komplementation der 3,4-Desaturase aus *Flavobacterium spec* P99-3 in Abbildung 3-11 konnte auch 1,1'-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin als Nebenprodukt identifiziert werden. Durch die Komplementation von CrtA₉₉, der neuartigen 2-Hydroxylase, konnten ebenfalls einige neue Carotinoide in *E. coli* synthetisiert werden.



Bei der Komplementation von CrtA₉₉ in einem DMS-Hintergrund konnte neben 2-Hydroxy-DMS auch 1',2-Dihydroxy-DMS synthetisiert werden. Ebenso konnte in einem Hydroxy-3,4-dehydrolycopin-Hintergrund 1,2-Dihydroxy-3,4-dehydrolycopin und 1,1',2-Trihydroxy-3,4,3',4'-didehydrolycopin (siehe Abbildung 3-20) und auf Hydroxytorulin-Ebenen das neue Carotinoid 1',2'-Dihydroxytorulin (siehe Abbildung 3-21) identifiziert werden.

4.9 1,2-Hydratase in *Flavobacterium spec P99-3*

Flavobacterium spec P99-3 besitzt eine 1,2-Hydratase, die in dem in dieser Arbeit charakterisierten Carotinoidgencluster nicht identifiziert werden konnte. Da Myxol jedoch eine Hydroxygruppe am C1-Atom besitzt und die 3,4-Desaturase ohne diese Hydroxygruppe Substrate nicht umsetzt (siehe Abb. 3.9) muß im Genom dieses Bakteriums eine 1,2-Hydratase vorhanden sein. Offene Leseraster wie orfAco, orfMoxR und orfIY sowie die Monozyklase CrtYm wurden auf Hydratase-Aktivität hin getestet, jedoch konnte keinem exprimiertem ORF diese Aktivität nachgewiesen werden.

Mit einem anschließenden Screening der Expressions-Bibliothek auf 1,2-Hydratase-Aktivität hin konnte leider kein Klon mit einer solchen Aktivität isoliert werden. Für das Screening wurde die Substratspezifität von CrtD und CrtA₉₉ genutzt, die beiden Enzyme setzen nacheinander am C1-hydroxylierte Carotinoide weiter um, sodass ein Farbscreening auch positiven Klonen möglich ist. Für eine Isolation der hypothetischen 1,2-Hydratase aus *Flavobacterium spec P99-3* könnte ein erneutes Screening der Expressions-Bibliothek durchgeführt werden.

Bereits charakterisierte 1,2-Hydratasen aus *Rubrivivax gelatinosus* und *Rhodobacter capsulatus* (Steiger *et al.*, 2002; 2003) katalysieren die Umsetzung von azyklischen Carotinoiden zu 1-Hydroxyderivaten, wobei CrtC aus *Rubrivivax gelatinosus* auch 1-Hydroxycarotinoide zu 1,1'-Dihydroxycarotinoiden umsetzt.

Die 1,2-Hydratase addiert Wasser an die zwischen dem C1- und C2-Atom vorhandene Doppelbindung einer ψ -Endgruppe, wobei der Reaktionsmechanismus eine Protonierung des C2-Atoms beinhaltet (Britton, 1988; Yeliseev & Kaplan, 1997).

CrtC ist teilweise inaktivierbar durch Nikotin (Singh *et al.*, 1973). Eventuell könnten Hemmversuche von *Flavobacterium spec P99-3* mit Nikotin und anschließender Carotinoidanalyse zeigen, ob das Bakterium eine CrtC-Typ Hydratase besitzt.

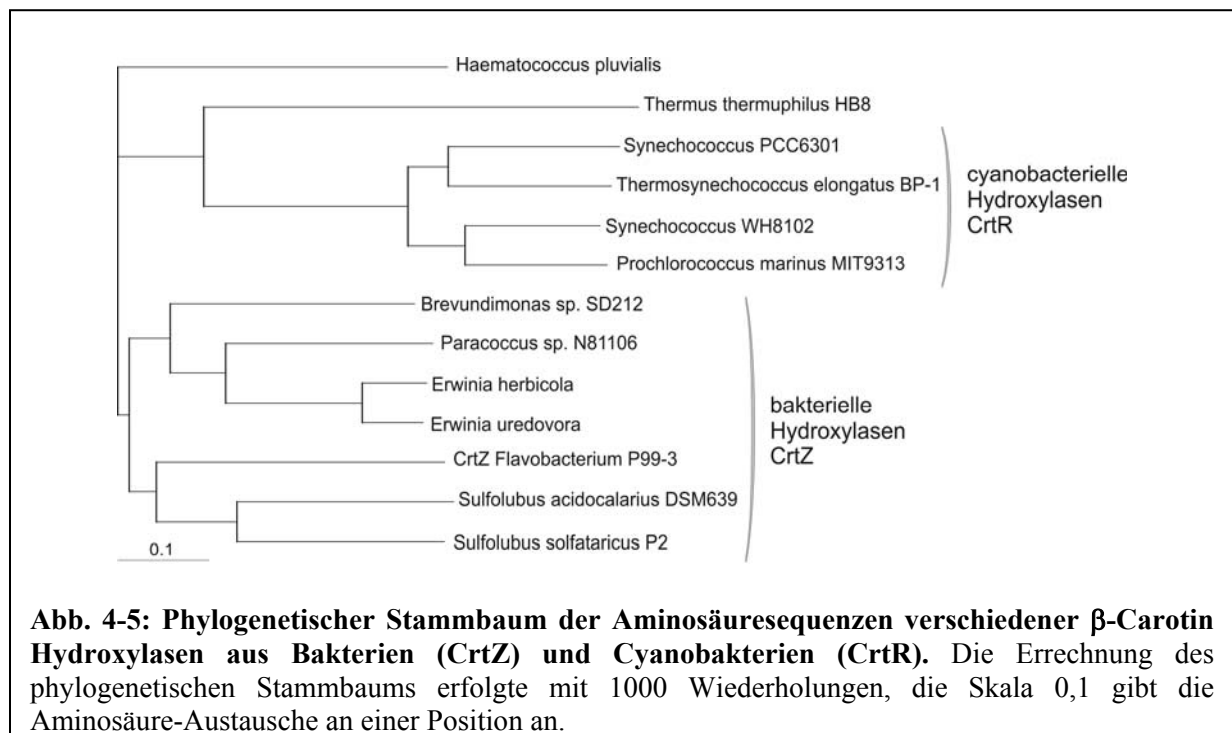
4.10 β -Carotin 3-Hydroxylase CrtZ

β -Carotin 3-Hydroxylasen fügen eine Hydroxygruppe am C3-Atom des β -Ionon-Rings ein (Misawa *et al.*, 1995) und sind eine sehr diverse Gruppe von Hydroxylasen (Ojima *et al.*, 2006). Sie beinhaltet die cyanobakteriellen 3-Hydroxylasen CrtR, die nah verwandt mit Ketolasengenenen sind (Masamoto *et al.*, 1998) und die bakteriellen 3-Hydroxylasen CrtZ.

CrtZ entspricht in höheren Pflanzen dem β -Carotin 3-Hydroxylase Gen *bhy*, dessen Protein ein Motiv aus 4 konservierten Histidin-Resten für die Eisenbindung enthält, das typisch ist für

Eisen-haltige Monooxygenasen (Bouvier *et al.*, 1998). Die P450 Monooxygenase aus *Thermus thermophilus* wurde als β -Carotin 3-Hydroxylase identifiziert (Blasco *et al.*, 2004). Das offene Leseraster orfZ des Carotinoidgenclusters aus *Flavobacterium spec* P99-3 zeigt Sequenzhomologie zu einer β -Carotin Hydroxylase (siehe Abbildung 3-4).

Betrachtet man den phylogenetischen Stammbaum verschiedener β -Carotin 3-Hydroxylasen aus Bakterien und Cyanobakterien (siehe Abbildung 4-5) zeigt sich, dass orfZ aus *Flavobacterium spec* P99-3 sich in die Gruppe der bakteriellen β -Carotin Hydroxylasen einordnet. Die größte Sequenzhomologie besteht zu den beiden Hydroxylasen aus *Sulfolobus acidocaladarius* und *Sulfolobus solfataricus*. Die P450 Monooxygenase aus *Thermus thermophilus* gruppiert sich neben die cyanobacteriellen Hydroxylasen CrtR, während CrtZ aus *Haematococcus pluvialis* einen eigenständigen Typ von β -Carotin 3-Hydroxylase darzustellen scheint.



Anhand der Sequenzähnlichkeit von orfZ aus *Flavobacterium spec* P99-3 kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem offenen Leseraster um die β -Carotin 3-Hydroxylase handelt, die im Syntheseweg von Myxol die Hydroxygruppe am C3-Atom des β -Rings von γ -Carotin einfügt.

4.11 UV-Schutz von Myxol

Das marine Bakterium *Flavobacterium spec* P99-3 synthetisiert Myxol in großen Mengen. Yokoyama & Miki (1995) isolierten 1,25mg/l Myxol, was einen Anteil von 66,5 % des Trockengewichts von *Flavobacterium spec* P99-3 entspricht. Das Carotinoid ist in der Zellmembran eingelagert und dient hier wahrscheinlich zum Schutz der Membran.

In die Membran eingelagerte Carotinoide haben einen großen Effekt auf die Membran selbst. Polare Carotinoide wie z.B. Zeaxanthin, Violaxanthin oder Lutein erhöhen die Membranfluidität, während β -Carotin die Membranfluidität erniedrigt. Lycopin hingegen disorganisiert die Zusammenlagerung der Festtsäure-Reste der Membrandoppelschicht (Gruszecki & Strzalka, 2005).

Daher wurden zum einen UV-Schutz-Versuche mit *Flavobacterium spec* P99-3 und Carotinoidmutanten des Wildtyps durchgeführt und zum anderen mit *E. coli* Transformanden, die Myxol und andere Carotinoide synthetisieren.

Flavobacterium spec P99-3 zeigte im *in vivo* UV-Schutz-Versuch nach 30 min Bestrahlung eine Überlebensrate von 40 %. Aber auch die Mutante M17, die nur Phytoen synthetisiert, zeigte immer noch eine Überlebensrate von fast 13 %. Die beiden Mutanten, die neben Myxol auch noch unterschiedliche Mengen an 1',2'-Dihydroxytorulin produzieren, zeigten ähnliche Überlebensraten von 18 %. Wahrscheinlich bietet die große Menge von 1,25 mg/l an Myxol im Wildtyp einen besonders guten Schutz vor UV-Strahlung.

Betrachtet man die UV-Schutz-Versuche in *E. coli*, so zeigt sich, dass Myxol in *E. coli* keinen besonders guten Schutz vor UV-Strahlung bietet. Bei diesem Versuchsansatz war Lycopin das Carotinoid, das den besten UV-Schutz nach 5 und 10 min Bestrahlung zeigte.

Nach 30 min UV-Bestrahlung lag die Überlebensrate aller *E. coli* Transformanden lediglich bei 2 bis 5 %. Ausschlaggebend könnten hier zum einen die geringeren Mengen an Carotinen in den *E. coli* Transformanden als in den *Flavobacterium* Stämmen sein. Auch die Fähigkeit der Carotinoide, sich in die Membran einlagern zu können sind eine wichtige Komponente beim Schutz der Membran.

Die Orientierung eines Carotinoid Moleküls in der Membrandoppelschicht und damit auch der Einfluß auf die thermodynamischen und mechanischen Eigenschaften sind abhängig von der Struktur des Carotinoids. Unpolare Carotinoide wie β -Carotin lagern sich innerhalb des hydrophoben Membraninneren ohne Orientierung ein (Yamamoto *et al.*, 1978), polare Carotinoide lagern sich mit ihren polaren Gruppen an die hydrophilen Enden der polaren Kopfgruppe der Membranlipide. Wie gut sich ein Carotinoid in eine Membran einlagern

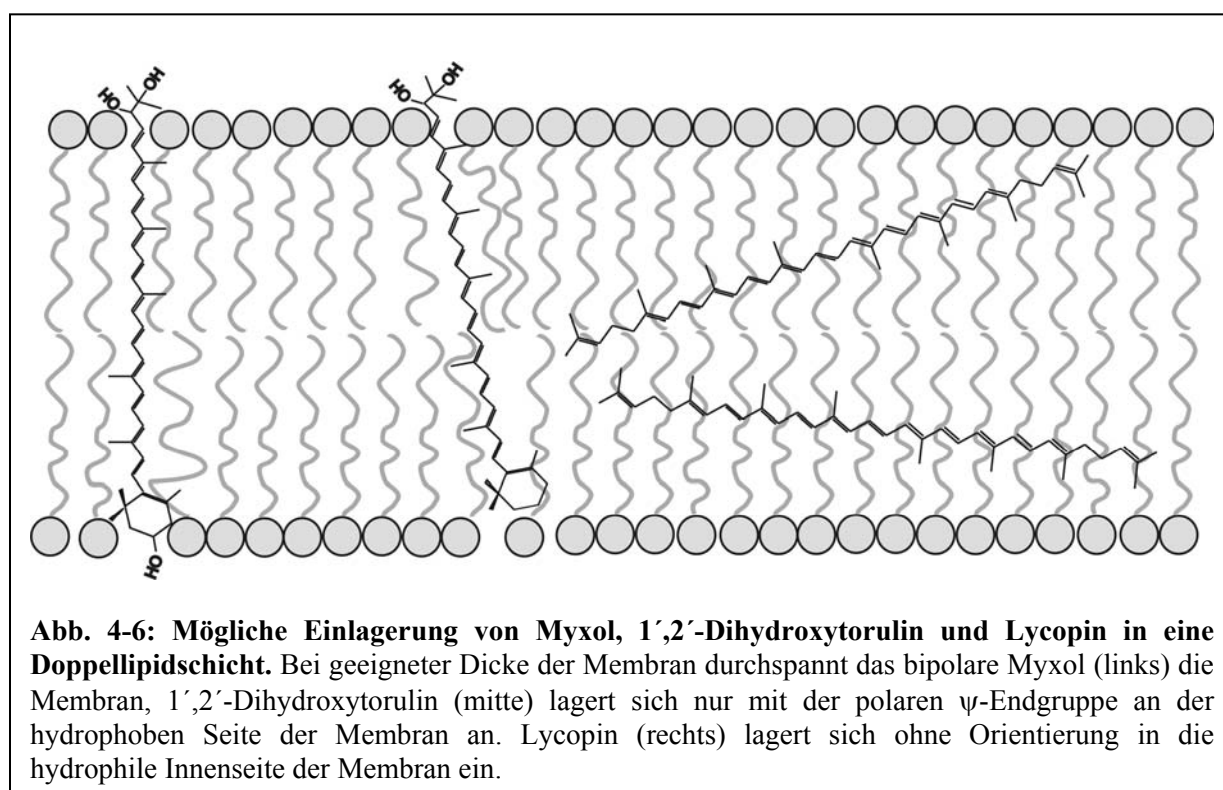
kann, hängt auch von dessen Moleküllänge in Bezug auf die Membrandicke ab (Haveaux *et al.*, 1998). Carotinoide mit glycosilierten Carotinoide können sich mit ihrem Zuckerrest an den hydrophilen Kopfgruppen verankern und die Membran zusätzlich verstärken (Hoshino *et al.*, 1994), was bei thermophilen Bakterien wichtig ist für die Aufrechterhaltung der Membranorganisation bei den hohen Temperaturen im natürlichen Habitat dieser Bakterien.

Bei *in vitro* Messungen von Myxoxanthophyll und einigen seiner Derivate wie Dehydroxymyxoxanthophyll, Myxol, 1',2'-Dihydroxytorulin und 1',3-Dihydroxytorulin zeigten die glycosilierten Carotinoide Myxoxanthophyll und Dehydroxymyxoxanthophyll die besten antioxidativen Aktivitäten (Gildenhoff, 2005).

Die Dicke einer Membran kann anhand ihrer Zusammensetzung variieren, eine Lipiddoppelschicht aus Phosphatidylcholin aus Hühnerei beträgt ca. 30 Å. So können sich Carotinoid mit einer Länge von 30 Å senkrecht in diese Membran einlagern, während sich längere Moleküle schräg in die Membran legen und sehr lange Moleküle sich waagrecht orientieren (Hara *et al.*, 1999).

Die Längen der Carotinoidmoleküle können mit dem Programm ACD Labs-ChemSketch ermittelt werden und betragen bei 1'-Hydroxytorulin 33 Å, bei 1',2'-Dihydroxytorulin 31 Å und bei Myxol ebenfalls 31 Å (Gildenhoff, 2005).

Da Myxol an beiden Enden seines Moleküls polare Gruppen besitzt und sich somit auch an beiden Enden der Membran in den hydrophilen Teil einlagert (siehe Abbildung 4-6), kann es die Membran gut stabilisieren.



Die Dicke der Membran von *Flavobacterium spec* P99-3 beträgt wahrscheinlich 30 bis 31 Å, sodass sich das Myoxl optimal und in großer Menge in die Membran einlagern kann. Die Membrandoppelschicht von *Escherichia coli* besitzt womöglich eine geringere oder eine größere Dicke als die Zellmembran von *Flavobacterium spec* P99-3, sodass sich Carotinoide wie Myxol oder 1',2'-Dihydroxytorulin nicht optimal in die Membran einlagern können und somit auch ihre membranstabilisierende Funktion nicht ausüben können.

Für den Schutz den Carotinoide einer Membran bieten, ist neben ihrer Einlagerung in die Membran aber auch ihre Fähigkeit Singulett-Sauerstoff abfangen zu können von großer Bedeutung, sowie die Photostabilität der einzelnen Carotinoide (Woodall *et al.*, 1997).

Hierbei ist die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen entscheidend, Moleküle mit einem größeren konjugierten Doppelbindungssystem fangen reaktive Sauerstoffe effektiver ab als Carotinoide mit wenigen konjugierten Doppelbindungen (Hirayama *et al.*, 1994). Myxol, 1',2'-Dihydroxytorulin und 1-Hydroxy-3,4-dehydrolycopin besitzen 12 konjugierte Doppelbindungen, Lycopin 11, Phytoen nur 3 und 1-Hydroxytorlin sogar 13.

Versuche zur Photostabilität zeigten, dass Myxol und 1'-Hydroxytorulin photostabiler zu sein scheinen als 1',2'-Dihydroxytorulin (Gildenhoff, 2005).

Jedoch kann bei den Versuchen zum UV-Schutz in *Flavobacterium spec* P99-3 und den Carotinoidmutanten sowie bei den verschiedenen *E. coli*-Transformanten eher davon ausgegangen werden, dass hier die unterschiedliche Menge an eingelagerten Carotinoidmolekülen eher ausschlaggebend ist für einen guten UV-Schutz ist. Bei *F. spec* P99-3 könnte auch eine aktivierte schnelle Neusynthese der Carotinoide bei UV-Bestrahlung zu einem verbesserten Schutz führen.

UV-Schutz-Versuche in *E. coli* zeigten ebenfalls, dass für einen guten UV-Schutz die Menge an Carotinoid, die Akkumulation in der Membran und die Struktur des Carotinoid-Moleküls von entscheidender Bedeutung sind (Sandmann *et al.*, 1998).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde das Carotinoidgencluster von *Flavobacterium spec* P99-3 isoliert und teilweise funktionell untersucht. Die Gene der Carotinoidbiosynthese, die bei *F. spec* P99-3 geclustert vorliegen, konnten durch eine Expressions-Bibliothek anhand eines orange gefärbten Klons in rötlich gefärbten Lycopin produzierenden *E. coli*-Zellen, isoliert werden. Nach Sequenzierung von ca. 15 kb des isolierten Klon2 konnten 10 offene Leseraster bestimmt werden, von denen 6 Sequenzhomologien zu bereits bekannten Carotinoidgenen aus anderen Organismen besaßen.

Im Carotinoigencluster von *Flavobacterium spec* P99-3 konnten Gene für eine Phytoen Synthase, Phytoen Desaturase, Lycopin Monozyklase, γ -Carotin Desaturase, β -Hydroxylase und einer Monooxygenase identifiziert werden.

Nach funktioneller Untersuchung zeigte die Lycopin Monozyklase CrtYm einen Umsatz von Lycopin zum Hauptprodukt γ -Carotin und zu sehr geringen Mengen β -Carotin.

Die γ -Carotin Desaturase CrtD₉₉ fügt eine weitere Doppelbindung in das konjugierte Doppelbindungssystem an der offenkettigen ψ -Endgruppe des Carotinoidmoleküls ein und besitzt zu 1-Hydroxy-Carotinoiden eine größere 3,4-Desaturase-Aktivität als CrtD aus *Rubrivivax gelatinosus*.

Die Monooxygenase CrtA₉₉ ist verantwortlich für die sekundäre Hydroxygruppe am C2'-Atom der ψ -Endgruppe. Anhand von heterologen Komplementationsversuchen in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass CrtA₉₉ nur in der Lage ist, die Hydroxygruppe am C2'-Atom einzufügen, wenn bereits am C1'-Atom eine Hydroxygruppe vorliegt und zwischen C3'- und C4'-Atom eine Doppelbindung vorhanden ist.

Da im Carotinoigencluster von *Flavobacterium spec* P99-3 kein offenes Leseraster identifiziert werden konnte, welches für eine Hydroxylierung am C1'-Atom verantwortlich ist, muß die codierende Region für dieses Enzym außerhalb des untersuchten Genclusters liegen.

Eine funktionelle Untersuchung in einem *in vitro*-Test von CrtA₉₉ scheiterte an der geringen Expression des Proteins in *E. coli*. Auch eine Anreicherung des exprimierten Proteins über Ammoniumsulfat-Fällung und Metallaffinitätschromatographie zeigte *in vitro* keinen Umsatz von Substratmolekülen durch CrtA₉₉.

Durch die Kombination von verschiedenen Carotinoidgenen aus unterschiedlichen Organismen konnten in dieser Arbeit in *E. coli* erstmals folgende Carotinoide synthetisiert und mittels HPLC identifiziert werden: Myxol, 1',2'-Dihydroxytorulin, 2-Hydroxy-DMS, 1'-Hydroxy-DMS, 1'2'-Dihydroxy-DMS, 1,1',2-Trihydroxy-3,4-dehydrolycopin und 1,1',2-Trihydroxy-3,4,3',4'-diedehydrolycopin.

Versuche zum UV-Schutz von Myxol im Wildtyp und in Carotinoid Mutanten von *Flavobacterium spec* P99-3 konnten lediglich zeigen, dass der Wildtyp außerordentlich gut gegen UV-Licht geschützt ist, was wahrscheinlich auf die Menge an produziertem Myxol und der wahrscheinlich schnellen Neusynthese des Carotinoids zurückzuführen ist.

6. LITERATUR

Albrecht M., Ruther A. & Sandmann G. (1997). Purification and biochemical characterization of a hydroxyneurosporene desaturase involved in the biosynthesis pathway of the carotenoid spheroidene in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 179: 7462-7467.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.

Armstrong G.A., Alberti M., Leach F. & Hearst J.E. (1989). Nucleotide sequence, organisation and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Gen Genet* 216:254-268.

Armstrong G. (1999). Carotenoid genetics and biochemistry. In: Cane D.E. (ed) *Comprehensive natural products chemistry*. Elsevier, Oxford, pp.:321-352.

Arrach N., Fernandez-Martin R., Cerda-Olmedo E. & Avalos J. (2001). A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1687-1692.

Arrach N., Schmidthäuser T.J. & Avalos J. (2002). Mutants of the carotene cyclase domain of the al-2 from *Neurospora crassa*. *Mol Genet Genomics* 266:914-921.

Baltschun D., Beutner S., Biviba K., Martin H.-D., Paust J., Peters M., Röver S., Sies H., Stahl W., Steigel A. & Stenhorst F. (1997). Singlet oxygen quenching abilities of carotenoids. *Liebigs Ann*:1887-1893.

Barton-Duell P. (1996). The role of dietary antioxidants in prevention of atherosclerosis. *Endocrinologist* 5:347-356.

Bergey D.H., Harrison F.C., Breed R.S., Hammer B.W. & Huntoon F.M. (1923). In: 1st ed., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore: 97-117.

Berglund A.H., Nilsson R. & Liljenberg C. (1999). Permeability of large unilamellar digalactosyldiacylglycerol vesicles for protons and glucose – influence of alpha-tocopherol, beta-carotene and cholesterol. *Plant Physiol Biochem* 37:179-186.

Bernadet J.-F., Nakagawa Y. & Holmes B. (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended description of the family. *IUMS* 52: 1049-1070.

Berry A., Janssens D., Hümbelin M., Jore J.P.M, Hoste B., Cleenwerck I., Vancanneyt M., Bretzel W., Mayer A.F., Lopez-Ulibarri R., Shanmugam B., Swings J. & Pasamontes L. (2003). *Paracoccus zeaxanthinifaciens* sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(1):231-238.

Blasco F., Kaufmann I & Schmidt R.D. (2004). CYP175A1 from *Thermus thermophilus* HB27, the first β -carotene hydroxylase from the P450 superfamily. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:671-674.

- Borovkov A.Y. & Rivkin M.I.** (1997). *XcmI*-containing vector for direct cloning of PCR products. *Biotechniques* Vol. 22, No. 5: 814-821.
- Bouvier F., Keller Y., d'Harlinguer A. & Camara C.** (1998). Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Biochim Biophys Acta* 1391:320-328.
- Breitenbach J., Fernández-González B., Vioque A. & Sandmann G.** (1998). A higher-plant type ζ -carotene desaturase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Mol Biol* 36:725-732.
- Britton G., Brown D.J., Goodwin T.W., Leuenberger F.J. & Schocher A.J.** (1977). The carotenoids of *Flavobacterium* strain R1560. *Arch Microbiol* 113:33-37.
- Britton G.** (1988). In: T.W. Goodwin (ed.) *Plant Pigments*, Academic Press, London:133-182.
- Conn P.F., Schalch W. & Truscott T.G.** (1991). The singlet oxygen carotenoid interaction. *J. Photochem Photobiol B: Biol* 11: 41-47.
- Coomber S.A., Chaudhri T.A., Connor A., Britton G. & Hunter C.N.** (1990). Localized transposon Tn5 mutagenesis of the photosynthetic gene cluster of *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* 4: 977-989.
- Chandler L.A. & Schwartz S.J.** (1987) HPLC-separation of of cis-trans carotene isomers of fresh and processed fruits and vegetables. *J Food Sci* 52: 669-672.
- Cunningham F.X. Jr., Sun Z., Chamovitz D., Hirschberg J. & Gantt E.** (1994). Molecular structure and enzymatic function of the lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *Plant Cell* 6:1107-1121.
- Cunningham F.X. Jr., Pogson B., Sun Z., McDonald K.A., DellaPenna D. & Gantt E.** (1996). Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8:1613-1626
- Cunningham F.X. Jr. & Gantt E.** (2001). One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene varepsilon-cyclases. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2905-2910.
- Davis B.H.** (1961). The carotenoids of *Rhizophlyctis rosea*. *Phytochemistry* 1:25-29.
- Demming-Adams B., Gilmore A.M. & Adams W.W.** (1996). Carotenoids 3: In vivo function of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10(4):403-412.
- Eugster C.** (1995). Chemical derivatization: microscale tests for the presence of common functional groups in carotenoids. In: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.) *Carotenoids* Vol.1A: Isolation and Analysis; Birkhäuser Verlag: 71-80.
- Fernández-González B., Sandmann G & Vioque A.** (1997). A nwe type of asymetrically acting β -carotene ketolase is required for the synthesis of echinenone in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *J Biol Chem* 272:9728-9733.

- Férézou J.P.** (1992). C50 bicyclic carotenoids: Sarcinaxanthin synthesis. In: Methods in Enzymology Vol. 213, Packer L. (ed.), Academic Press Inc.:85-112.
- Fuller C.J., Faulkner H., Bendicen A., Parker R.S. & Roe D.A.** (1992). Effects of β -carotene supplementation on photosuppression of delayed-type hypersensitivity in normal young men. *Am J Clin Nutr* 56:684-690.
- Gey K.F.** (1995). Ten-years retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis: threshold plasma levels of antioxidant micronutrients related to minimum cardiovascular risk. *Nutr Biochem* 6:206-236.
- Gildenhoff N.** (2005). Isolation von Myxoxanthophyll und seinen Derivaten und ihrer Bedeutung beim Schutz vor Photooxidation. Staatsexamensarbeit J.W. Goethe Universität Frankfurt a.M.
- Giuliano G., Pollock D., Stapp H. & Scollnik P.A.** (1988). A genetic-physical map of the *Rhodobacter capsulatus* carotenoid biosynthesis gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 213:78-83.
- Goodwin T.W.** (1980). The Biochemistry of Carotenoids, Vol. 1. Plants, 2nd edn. Chapman and Hall, London, U.K.
- Gruszecki A.C. & Strzalka K.** (2005). Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta* 1740(2):108-115.
- Hanahan D.** (1983). Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557.
- Hannibal L., Lorquin J., D'Otioli N.A., Garcia N., Chaintreuil C., Masson-Boivin C., Dreyfus B. & Giraud B.** (2000). Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium sp.* strain ORS278. *J Bacteriol* 182:3850-3853.
- Hara M., Yuan H., Yang Q., Hoshino T., Yokoyama A. & Miyake J.** (1999). Stabilization of liposomal membranes by thermozeaxanthins: carotenoid-glucoside esters. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462(1):147-154.
- Havaux M.** (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science*, Vol. 3, No.4:147-151.
- Harris E.L.V. & Angal S.** (Editors) (1989). Protein purification methods: a practical approach. IRL Press, Oxford, England.
- Hennekes C.H., Mayrent S.L. & Willett W.** (1986). Vitamin A, carotenoids and retinoids. *Cancer* 58: 1837-1841.
- Hirayama O., Nakamura K., Hamada S. & Kobayasi Y.** (1994). Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids* 29(2):149-150.

- Hoshino T., Yoshino Y., Guevarra E.D., Ishida S., Hiruta T., Fujii R. & Nakanara T.** (1994). Isolation and partial characterization of carotenoid underproducing and overproducing mutants from an extremely thermophilic *Thermus thermophilus* HB27. *J Ferm Bioeng* 77(2):131-136.
- Huguency P., Badillo A., Chen H.C., Klein A., Hirschberg J., Camara B. & Kuntz M.** (1995). Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J* 8: 417-424.
- Hundle B., Alberti M., Nievelstein V., Beyer P., Kleinig H., Armstrong G.A., Burke D.H. & Hearst J.E.** (1994). Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho10 carotenoid genes expressed in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 245:406-416.
- Ichiyama S., Shimokata K. & Tsukamura M.** (1989). Carotenoid pigments of genus *Rhodococcus*. *Microbiol Immunol* 33:503-508.
- Johnson K.L. & Schröder W.** (1995). Microbial Carotenoids. *Adv Biochem En Biotechnol* 53: 119-178.
- Jooste P.J.** (1985). The taxonomy as significance of Flavobacterium-Cytophaga strains from dairy sources. Ph.D. Study, Dept. of Microbiology, Univ. of the orange free state, Bloemfontein South Africa.
- Jooste P.J. & Hugo F.C.** (1999). The taxonomy, ecology and cultivation of bacterial genera belonging to the family Flavobacteriaceae. *Int. J. of Food Microb.* 53: 81-94.
- Kajiwara S., Fraser P.D., Kondo K. & Misawa N.** (1997). Expression of exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 324 (2): 421-426.
- Kirchman D.L.** (2002). The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Micro Let* 39: 91-100.
- Krinsky N.I.** (1987). Medical uses of carotenoids. In: Carotenoids; Krinsky N.I. (ed); Methews-Roth M.M. & Taylor R.F.: 195-206; New York: Pienum.
- Krinsky N.I., Wang X., Tang G & Russel R.M.** (1993). Mechanism of carotenoid cleavage to retinoids. *Ann NY Acad Sci* 691:167-176.
- Krubasik P. & Sandmann G.** (2000a). A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Mol Gen Genet* 263:423-432.
- Krubasik P. & Sandmann G.** (2000b). Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem Soc Trans* 28: 806-810.
- Krubasik P.** (2000c). Gene der Carotinoid Biosynthese aus den Coryneformen Bakterien *Brevibacterium linens* und *Brevibacterium flavum*. Dissertation J.W. Goethe Universität Frankfurt a.M.

- Krugel H., Krubasik P., Weber K., Saluz H.P. & Sandmann G.** (1999). Functional analysis of genes from *Streptomyces griseus* involved in the synthesis of isorenieraten, a carotenoid with aromatic end groups, revealed a novel type of carotenoid desaturase. *Biochim Biophys Acta* 1439: 57-64.
- Kovacs A.T., Rakhely G. & Kovacs K.L.** (2003). Genes involved in the biosynthesis of photosynthetic pigments in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(6): 3093-3102.
- Kyte J & Doolittle R.F.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157(1):105-132.
- Lagarde D. & Vermaas W.** (1999). The zeaxanthin biosynthesis enzyme beta-carotene hydroxylase is involved in myxoxanthophyll synthesis in *Synechocystis sp.* PCC 6803. *FEBS Lett.* 454(3):247-251.
- Lang H.P, Cogdell R.J., Takaichi S. & Hunter C.N.** (1995). Complete DNA sequence , specific Tn5 insertion map and gene assignment of the carotenoid biosynthesis of the carotenoid biosynthesis pathway of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 177: 2064-2073.
- Larsen R.A., Wilson M.M., Guss A.M. & Metcalf W.M.** (2002). Genetic analysis of pigment biosynthesis in *Xanthobacter autotrophicus* Py2 using a new, highly efficient transposon mutagenesis system that is functional in a wide variety in bacteria. *Arch Microbiol* 178:193-201.
- Lee P.C., Mijts B.N. & Schmidt-Dannert C.** (2004). Investigation of factors influencing production of the monocyclic carotenoid torulene in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Micro Biotechnol* 65(5):538-46.
- Leutwiler L.S. & Chapman D.J.** (1979). Biosynthesis of aryl carotenoids: inhibitor studies of chlorobactene biosynthesis in *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*. *Arch Microbiol* 123:267-273.
- Linden H., Misawa N., Chamovitz D., Pecker I., Hirschberg J. & Sandmann G.** (1991). Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoen desaturase genes and analysis of accumulated carotenes. *Z. Naturforsch.* 46c: 1045-1051.
- Luckner M.** (1990). Secondary metabolisms in Microorganisms, Plants and Animals. 3. Auflage, Springer-Verlag :230ff.
- Lutnaes B.F., Strand Å., Pétursdóttir S.K. & Liaaen-Jensen S.** (2004). Carotenoids of thermophilic bacteria – *Rhodothermus marinus* from submarine Icelandic hot springs. *Biochem Syst Ecol* 32:455-468.
- Marrs B.L.** (1981). Mobilization of the genes for photosynthesis from *Rhodospseudomonas capsulatus* by a promiscuous plasmid. *J. Bacteriol* 146: 1003-1012.
- Martínez-Férez I. & Vioque A.** (1992). Nucleotide Sequence of the phytoene desturase gene from *Synechocystis sp.* PCC6803 and characterization of a new mutant which confers resistance to the herbicide norflurazon. *Plant Mol Biol* 18: 981-983.

- Martínez-Férez I., Fernández-González B., Sandmann G. & Vioque A.** (1994). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for phytoene synthase from the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC6803. *Biochim Biophys Acta* 1218:145-152.
- Masamoto K., Misawa N., Kaneko T., Kikuno R & Toh H.** (1998). β -carotene hydroxylase gene from the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 39:560-564.
- Mathew-Roth M.M.** (1993). Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Ann NY Acad Sci* 691: 127-138.
- Mathis P. & Schenk C.C.** (1982). The function of carotenoids in photosynthesis. In: *Carotenoids Chemistry and Biochemistry*. Britton G. & Goodwin T.W. (eds.) pp.:339-351; Oxford, Pergamon Press.
- Matsuno T.** (2001). Aquatic animal carotenoids. *Fisheries Science* 67:771-783.
- Mayne S.T.** (1996). Beta-Carotene. Carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB J.* 10 (7):690-701.
- Messing J.** (1979). A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.* 2(2): 43.
- Misawa N., Nakagawa M., Kobayashi K., Yamano S., Izawa Y., Nakamura K. & Harashima K.** (1990). Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of the gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172 (12): 6704-6712.
- Misawa N., Satomi Y., Kondo K., Yokoyama A., Kajiwara S., Saito T., Ohtani T. & Wataru M.** (1995). Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway at the gene level. *J Bacteriol* 177(22): 6575-6584.
- Mozaffarieh M., Sacu S., Wedrich A.** (2003). The role of the carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degeneration: A review based on controversial evidence. *Nutr J* 2:20-28.
- Niggli U. & Pfander H.** (1999). Carotenoid glycosides and glycosyl esters. In: *Naturally occurring glycosides*. Ilkan R.(ed) pp.:125-145. John Wiley & Sons, Cichester, U.K.
- Nishida Y., Adachi K., Kasai H., Shizuri Y., Shindo K., Komemushi S., Miki W. & Misawa N.** (2005). Isolation and elucidation of a carotenoid biosynthesis gene cluster coding for a novel enzyme β -C2-hydroxylase and combinatorial biosynthesis of structurally novel or rare carotenoids with a 2-hydroxy group and 2,2'-dihydroxy groups. *Appl Environ Microbiol* 71(8): 4286-4296
- Ojima K., Breitenbach J., Visser H., Setogucci Y., Tabata K., Hoshino T., van den Berg, J. & Sandmann G.** (2006). Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Pfaffia rhodozyma*) and its assignment as a β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol Gen Genomics* 275(2):148-158.

- Olson J.A. & Krinsky N.I.** (1995). Introduction: the colourful, fascinating world of the carotenoids: important physiology modulators. *FASEB J.* 9:1547-1558.
- Ouchane S., Picaud M., Vernotte C. & Astier C.** (1997). Photooxidative stress simulates illegitimate recombination and mutability in carotenoid-less mutants of *Rubrivivax gelatinosus*. *EMBO Vol.* 16; Nr. 15: 4777-4787.
- Parker R.S.** (1996) Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB J* 10:542-551.
- Pasamontes L., Hug D., Tessier M., Hohmann H.P., Schierle J. & van Loon A.P.** (1997). Isolation and characterization of the carotenoid biosynthesis genes from *Flavobacterium spec.* R1534. *Genes* 185:35-41.
- Paulsen H.** (1999). Carotenoids and the assembly of light-harvesting complexes. In: Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J. (eds). *The photochemistry of carotenoids*. Kluwer, Academic Publisher, Dordrecht, pp.:123-135, ISBN 0-7923-5942-0.
- Pecker I., Gabbay R., Cunningham F.X. Jr & Hirschberg J.** (1996). Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol Biol* 30:807-918.
- Pemberton J.M. & Harding C.M.** (1986). Cloning of carotenoid biosynthesis genes from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Curr. Microbiol.* 14: 25-29.
- Perry K.L., Simonitch T.A., Harrison-Lavoie & Liu S.-T.** (1986). Cloning and Regulation of *Erwinia herbicola* Pigment Genes. *J Bacteriol* 168(2): 607-612.
- Pfander H.** (1897). *Key to carotenoids*, Birkhäuser-Verlag, Basel.
- Pinta V., Ouchane S., Picaud M., Takaichi S., Astier C. & Reiss-Husson F.** (2003) Characterization of unusual hydroxy- and ketocarotenoids in *Rubrivivax gelatinosus*: involvement of enzyme CrtF or CrtA. *Arch Microbiol.* 179(5): 354-62.
- Rähler N.** (2000). Charakterisierung der Lycopin Zyklase aus *Brevibacterium linens*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Frankfurt Frankfurt a.M.
- Reichenbach H.** (1989). Order I. Cytophagales Leadbetter 1974. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3. Staley J.T., Bryant M.P., Pfennig N. & Holt J.G. (eds) pp.: 2011-2013; Baltimore, Williams & Wilkins.
- Rose R.E.** (1988). The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucl. Acids Res.* 16: 355.
- Sandmann G.** (1994). Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem.* 223: 7-24.
- Sandmann G., Kuhn S. & Böger P.** (1998). Evaluation of different carotenoids in *Escherichia coli* transformants as protectants against UV-B radiation. *Appl Environment Microbiol* 64(5):1972-1974.

- Sandmann G., Albrecht M., Schnurr G. & Böger P.** (1999). The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. Trends in Biotech 5:233-237.
- Sandmann G.** (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. Arch. Biochem. Biophys. Acta 1533:164-170.
- Sandmann G.** (2002). Combinatorial biosynthesis of carotenoids in a heterologous host: a powerful approach for the biosynthesis of novel structures. Chem Bio Chem 3:629-635.
- Santos M.S., Meydani S.N., Leka L., Wu D., Fotouhi N., Meydani M., Hennekens C.H. & Gaziano S.M.** (1996) Natural killer cell activity in elderly men enhanced by β -carotene supplementation. Am J Clin Nutr 64:772-777.
- Schlegel H.G.** (1992) Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schnurr G., Misawa N. & Sandmann G.** (1996). Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. Biochem. J. 315: 869-874.
- Schreckenberger P.C.** (1998). Emended classification and description of the family *Flavobacteriaceae* and the Genus *Sphingobacterium*. Clinical Microbiol. Newsletter Vol. 20, 14: 115-120.
- Schwartz S.H., Tan B.C., Gage D.A., Zeevaart J.A. & McCarty D.R.** (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 in maize. Science 276(5320):1872-1874.
- Sedddon J.M., Ajani U.A., Speruto R.D., Hiller R., Blair N., Burton T.C., Farber M.D., Gragoudas E.S., Haller J., Miller T.D., Yannuzzi L.A. & Willett W.** (1994). Dietary carotenoids, vitamin A, vitamin C and vitamin E and advanced age-related macular degeneration. J Am Med Assoc 272:1413-1420.
- Siefermann-Harms, D.** (1990). Chlorophyll, carotenoids and the activity of the xanthophyll cycle. Environ. Pollut. 68 (3-4):293-303.
- Singh R.K., Ben-Aziz A., Britton G. & Goodwin T.W.** (1973). Biosynthesis of spheroidene and hydroxy spheroidene in *Rhodospseudomonas* species: experiments with nicotine as inhibitor. Biochem J 132:649-652.
- Stahl W. & Sies H.** (1998). The role of carotenoids and retinoids in gap junctional communication. Int J Vit Nutr Res 68:354-359.
- Steiger S., Astier C. & Sandmann G.** (2000). Substrate specificity of the expressed carotenoid desaturase from *Rubrivivax gelatinosus* reveals the detailed reaction sequence to spheroidene and spirilloxanthin. Biochem J. 349:635-640.
- Steiger S., Takaichi S. & Sandmann G.** (2002). Heterologous production of two unusual acyclic carotenoids, 1,1'-dihydroxy-3,4-didehydrolycopene and 1-hydroxy-3,4,3',4'-tetrahydrolycopene by combination of the crtC and crtD genes from *Rhodobacter* and *Rubrivivax*. J Biotechnol. 17;97(1):51-58.

- Steiger S., Mazet A. & Sandmann G.** (2003). Heterologous expression, purification and enzymatic characterization of the acyclic carotenoid 1,2-hydratase from *Rubrivivax gelatinosus*. Archives of Biochem. Biophys. 414: 51-58.
- Straub O.** (1987). Key to carotenoids. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Subczynski W.K., Markowska E. & Siewiesiuk J.** (1999). Effect of polar carotenoids on the oxygen diffusion-concentration product in lipid bilayers. An EPR spin label study, Biochim Biophys Acta 1068: 68-72.
- Takaichi S., Maoka T. & Masamoto K.** (2001). Myxoxanthophyll in *Synechocystis sp.* PCC6803 is Myxol-2'-dimethyl-fucoside, (3R, 2'S)-Myxol-2'-(2,4-di-O-methyl- α -L-fucoside), not rhamnoside. Plant Cell Physiol. 42(7):756-762.
- Takaichi S.** (1999). Carotenoids and carotenogenesis in anoxygenic photosynthetic bacteria. In: The photochemistry of carotenoids. Frank H.A., Young A.J., Britton G. & Cogdell R.J. (eds) pp.:39-69; Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Takaichi S. & Shimada K.** (1999). Pigment composition of two pigment-protein complexes derived from anaerobically and semi-aerobically grown *Rubrivivax gelatinosus*, and identification of a new keto-carotenoid, 2-ketospirilloxanthin. Plant Cell Physiol 40:613-617.
- Takaichi S., Wang Z.Y., Umetsu M., Nozawa T., Shimada K. & Madigan M.T.** (1997). New carotenoids from the thermophilic green sulphur bacterium *Chlorobium tepidum*: 1',2'-dihydro-gamma-carotene, 1',2'-dihydrochlorobactene and, OH-chlorobactene glucosid ester, and the carotenoid composition of different strains. Arch Microbiol 168:270-276.
- Tan B.C., Schwartz S.H., Zeevaart J.A. & McCarty D.R.** (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. PNAS USA 94(22):12235-12240.
- Tao L., Picataggio S., Rouvière P.E. & Cheng Q.** (2004). Asymmetrically acting lycopene β -cyclase (CtrLm) from non-photosynthetic bacteria. Mol Gen Genomics 271:180-188.
- Taylor R.F.** (1984). Bacterial triterpenoids. Microbiol. Reviews 48:181-198.
- Teramoto M., Takaichi S., Inomata Y., Ikenaga H. & Misawa N.** (2003). Structural and functional analysis of a lycopene β -monocyclase gene isolated from a unique marine bacterium that produces myxol. FEBS Letters 545:120-126.
- van den Berg H., Faulks R., Fernando Granado H., Hirschberg J., Olmedilla B., Sandmann G., Southon S. & Stahl W.** (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in food and the likely systemic effects. J Sci Food Agric 80: 880-912.
- van Vlient T., van Schaik F., Schreurs W.H.P & van den Berg H.** (1996). In vitro measurement of β -carotene cleavage activity: methodological considerations and the effect of other carotenoids on β -carotene cleavage. J Vit Nutr Res 66:77-85.
- Velayos A., Eslava A.P. & Itturiaga E.A.** (2000). A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the carRP gene of *Mucor circinelloides*. Eur J Biochem 267:5509-5519.

- Verdoes C.J., Krubasik P., Sandmann G. & van Ooyen A.J.** (1999). Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol Gen Genet* 262:452-461.
- Viera J. & Messing J.** (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19: 259-268.
- Viveiros M., Krubasik P., Sandmann G. & Houssaini-Iraqi M.** (2000). Structural and functional analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Mycobacterium aurum* A+. *FEMS Microbiol Lett* 187:95-101.
- Wierenga R.K., Terpstra P. & Hol W.G.** (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* 187(1):101-107.
- Woodall A.A., Britton G. & Jackson M.J.** (1997). Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochim Biophys Acta* 1336:575-586.
- Woutersen R.A., Wolterbeek A., Appel M.J. & van der Berg H.** (1999). Safety evaluation of synthetic β -carotene. *Crit Rev Toxicol* 29:515-542.
- Yamamoto H. & Bangham A.D.** (1978). Carotenoid organization in membranes – thermal transition and spectral properties of carotenoid-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta* 507:119-127.
- Yeliseev A.A., & Kaplan S.** (1997). Anaerobic carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: H₂O is a source of oxygen for the 1-methoxy group of spheroidene but not for 2-oxo group of spheroidenone. *FEBS Lett* 403:10-14.
- Yen H. C. & Marrs B.** (1976). Map of genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodospseudomonas capsulatus*. *J. Bacteriol.* 126: 619-629.
- Yokoyama A. & Miki W.** (1995). Isolation of myxol from a marine bacterium *Favobacterium* sp. associated with a marine sponge. *Fisheries Science* 61:684-686.
- Yokoyama A., Shizuri Y., Hoshino T. & Sandmann G.** (1996). Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*. *Arch Microbiol* 165:342-345.
- Zechmeister I. & Polgár A.** (1943). Cis-trans isomerization and spectral characteristics of carotenoids and some related compounds. *J Am Chem Soc* 65: 1522-1528.

7. LEBENS LAUF

Nina Rählert

geboren am 29.11.1975 in Offenbach a.M.

wohnhaft Am Heiligenkopf 6, 63571 Gelnhausen



Ausbildung

- August 1982 - Juni 1986** Grund- und Hauptschule Hailer-Meerholz
- August 1986 - Juli 1995** Grimmelschule Gymnasium Gelnhausen
- Mai - Juni 1995** Abiturprüfungen in den Fächern Chemie, Biologie (Leistungsfächer), Englisch und Geschichte
- Oktober 1995** Beginn des Biologiestudiums an der Goethe-Universität in Frankfurt a.M.
- April 1998 - Oktober 1999** Hauptstudium mit den Fächern Botanik (Hauptfach), Humangenetik und Toxikologie (Nebenfächer)
- Februar – September 2000** Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Sandmann mit dem Thema „Charakterisierung der Lycopin Zyklase aus *Brevibacterium linens*“
- Oktober 2000** Abschluß als Diplom Biologin mit der Note „sehr gut“
- Oktober 2000** Beginn der Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Sandmann mit dem Thema „Carotinoidbiosynthese in *Falvobacterium spec P99-3*“
- November 2000** Beginn des Arbeitsverhältnisses am Botanischen Institut der Universität Frankfurt als Wissenschaftliche Angestellte
- Chemikalien-Abfallbeauftragte
 - Anzucht von Algen und Pilze für Praktika
 - Bestellung von Verbrauchsmaterialien
 - Betreuung von Projektpraktikanten, Diplomanden und Staatsexamenskandidaten im Labor
- Juli 2001** Zweiwöchiger Forschungsaufenthalt an der Universität Konstanz im Arbeitskreis von Prof. Dr. P. Böger

Gelnhausen, den 14.02.2007

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Gelnhausen, den 14.02.2007

.....

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

„Carotinoidbiosynthese in *Flavobacterium spec* P99-3“

selbstständig angefertigt habe und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegeben nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Gelnhausen, den 14.02.2007

.....

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerhard Sandmann danke ich sehr herzlich für die Begleitung schon während meines Hauptstudiums, die Bereitstellung des Themas und für die immerwährende freundliche Unterstützung.

Frau Dr. Manuela Sandmann, Herrn Dr. Jürgen Breitenbach, Frau Dr. Sabine Steiger und Herrn Dr. Changfu Zhu danke ich für Hilfestellungen, Anregungen und Gedankenaustausch.

Bedanken möchte ich mich auch bei Ehemaligen des AK Sandmann: Dr. Philipp (Flip) Krubasik und Dr. Axel (Akki) Raisig, Martin (Maddin) Feussner und Dr. Lutz (Putzi) Schäfer.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Per (Perle) Stickforth, Evelyne (Evy) Weber, Nina Gildenhoff und Sabine (Bine) Nooten für diverse Kaffekränzchen und Mittagessen und ein super Arbeitsklima.

Frau Marianne Flechsel möchte ich für Kniffe und Tricks bei der Bakterien- und Algenanzucht danken; Andreas Lück fürs Kaffeekochen und sonstige Unterstützung.

Vielen Dank auch an all meine vielen Praktikanten – auch ich konnte immer noch von Euch lernen!

Herrn Dr. Hartmut Linden und Jens Steinbrenner danke ich für die super Betreuung in Konstanz.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern ohne deren Unterstützung ich das hier nicht hätte vollbringen können.

Für meinen seelischen Ausgleich danke ich von tiefstem Herzen der Primel und dem Windeby und meinen Stallkollegen Tatjana & Loucinda, Ela & Flick Flack, Iris & Cruzeiroira, meinen Trainern Laura Pröpper-Berg, Ilka Gärtner und Thomas Günther, meiner Stallgemeinschaft, meinen Reitschülern und den drei Fragezeichen.