

**Die Phytoen-Desaturase aus *Rubrivivax gelatinosus*:
Funktionelle und strukturelle Faktoren der Anzahl von
Reaktionsschritten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Per Stickforth
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2005

(D30)

I.

vom Fachbereich Biologie / Informatik der
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Heinz Dieter Osiewacz

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Sandmann

Prof. Dr. Wolfgang Brüggemann

Datum der Disputation:.....

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 07.12.2005

.....

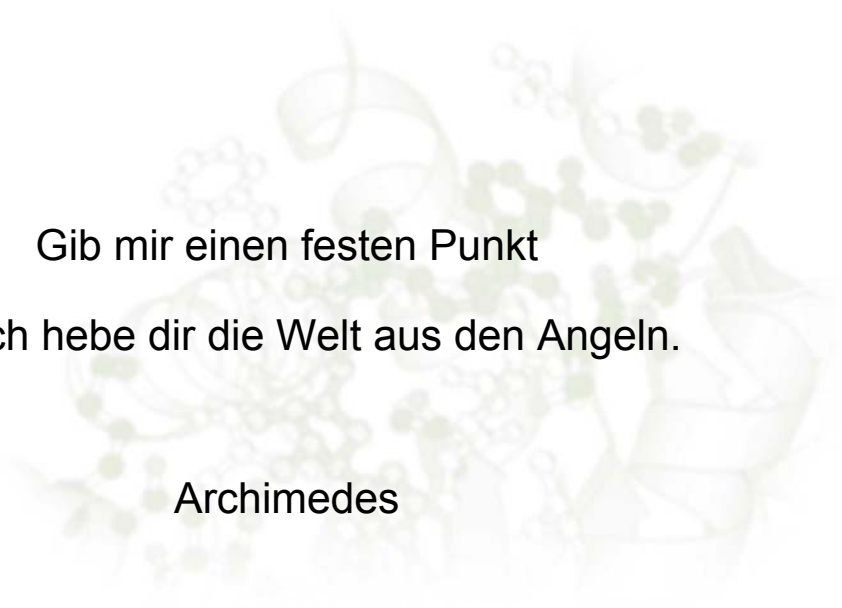
Eidesstattliche Versicherung

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

„Die Phytoen-Desaturase aus *Rubrivivax gelatinosus*: Funktionelle und strukturelle
Faktoren der Anzahl von Reaktionsschritten“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen 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.

Frankfurt am Main, den 07.12.2005



Gib mir einen festen Punkt
und ich hebe dir die Welt aus den Angeln.

Archimedes

II. Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	12
1	Ziel der Arbeit	21
II	Material und Methoden	23
1	Verwendete Mikroorganismen und Anzuchtbedingungen	23
1.1	Anzucht von Rhodospirillaceae	23
1.2	Anzucht von <i>Xanthophyllomyces dendrohous</i>	25
1.3	Anzucht von <i>E. coli</i>	25
1.3.1	Antibiotika-Zusatz	26
1.3.2	Dauerkulturen	27
2	Molekularbiologische Methoden	27
2.1	Isolation von genomischer DNA aus Rhodospirillaceae	27
2.2	Isolation von RNA aus <i>Xanthophyllomyces dendrohous</i>	27
2.3	Reverse Transkription	28
2.4	Plasmide	29
2.4.1	pMONcrtI	30
2.4.2	pPQE32crtI _{Rg}	30
2.4.3	pUC8-2crtI _{Rg}	30
2.4.4	pTrccrtI _{Rg}	30
2.4.5	pPEUcrtI _{Rg}	31
2.4.6	pUCcrtI _{Rg} MUT und pPEUcrtI _{Rg} MUT	31
2.4.7	pPQEcrtI _{Rr}	31
2.4.8	pPQEcrtI _{Rc}	31
2.4.9	pPEUcrtI _{Rs}	31
2.4.10	pPEUcrtI _{Xd} WT und pPEUcrtI _{Xd} DQ1	32
2.5	Schnelle Plasmidisolation	32
2.6	Plasmidisolation (Miniprep)	33
2.7	Dialyse von DNA	33
2.8	DNA-Sequenzierung	33
2.9	Transformation von <i>E. coli</i>	33
2.9.1	Herstellung von CaCl ₂ -kompetenten <i>E. Coli</i> -Zellen	33
2.9.2	Transformation von CaCl ₂ -kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	34

2.9.3	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.9.4	Elektroporation	35
2.10	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.10.1	Amplifizierung von Phytoen-Desaturase kodierenden Genen (<i>crtl</i>)	35
2.10.2	Kontroll-PCR	36
2.10.3	Verwendete Oligonukleotidprimer	37
2.10.4	Agarosegelelektrophorese	38
2.10.5	DNA-Rückgewinnung aus Agarosegelen	38
2.11	Mutagenisierung von <i>crtl</i> aus <i>Rvi. gelatinosus</i>	39
2.11.1	Error Prone PCR	39
2.11.2	Herstellung von Mutationsbibliotheken	40
2.11.3	Mutagenisierung von <i>crtl</i> _{RG} mittels <i>E. coli</i> XI1-Red	41
2.11.4	Mutagenisierende inverse PCR	41
2.12	Screening der erstellten Mutationsbibliotheken	43
3	Biochemische Methoden	44
3.1	Kultivierung von Bakterien-Transformanten	44
3.2	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	44
3.3	Ernte und Aufschluss der Bakterienzellen	45
3.3.1	Ernte von <i>E. coli</i> zur Proteingewinnung	45
3.3.2	Anzucht und Ernte von <i>E. coli</i> zur Substratgewinnung	45
3.4	<i>In vitro</i> Enzymtest	46
3.4.1	Enzymfunktionstest	46
3.4.2	V_{max} - und K_m -Wert Bestimmung	46
3.4.3	Enzymtests mit unterschiedlichen <i>Crtl</i> _{RG} - bzw. <i>Crtl</i> _{RS} -Mengen	46
3.4.4	Bestimmung des pH-Optimums von <i>Crtl</i> _{RG}	47
3.4.5	Einfluss von Diphenylamin (DPA) auf die Aktivität von <i>Crtl</i> _{RG}	47
3.4.6	Bestimmung des Kofaktors von <i>Crtl</i> _{RG}	47
3.4.7	Herstellung der Phosphatidylcholin-Emulsion	47
3.5	Proteinreinigung	48
3.5.1	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie	48
3.5.2	Entsalzen über Sephadex G-25M	48
3.6	Hemmstoffstudien mit <i>Xanthophyllomyces dendrohous</i>	49
3.7	Carotinoideextraktion	49
3.7.1	Extraktion der Carotinoide aus Komplementierungen	49

3.7.2	Extraktion der Carotinoide aus gefriergetrockneten <i>E. coli</i> -Zellen	50
3.7.3	Extraktion der Carotinoide aus <i>in vitro</i> Enzymtests	50
3.7.4	Extraktion der Carotinoide aus <i>X. dendrohous</i>	50
3.8	Mengenbestimmung von Carotinoiden (Britton, 1995)	51
4	Carotinoidanalytik – HPLC	51
4.1	Eichung der C18-HPLC	52
5	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	53
5.1	Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele	53
5.2	Vorbereitung der Probe für die SDS-PAGE	54
5.3	Färbung der Polyacrylamid-Gele	55
5.4	Dokumentation und Auswertung der SDS-Gele	55
5.5	Bestimmung des Proteingehalts	55
6	Verwendete Software	56
6.1	Software zur DNA- und Protein Sequenzauswertung	56
6.2	HPLC-Analytik Software	56
6.3	Weitere verwendete Software	57
III	Ergebnisse	58
1	Klonierung und funktionelle Expression der Phytoen-Desaturase aus <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	58
1.1	Klonierung von <i>crtl</i> _{Rg} in pMON38201	59
1.2	Klonierung von <i>crtl</i> _{Rg} in pUC8-2	61
1.2.1	<i>In vivo</i> Funktionstest von pUC <i>crtl</i> _{Rg}	61
1.2.2	Heterologe Expression von <i>crtl</i> _{Rg} in DH5α[pUC <i>crtl</i> _{Rg}] zur Proteingewinnung	63
1.3	Klonierung von <i>crtl</i> _{Rg} in pPQE32	65
1.3.1	<i>In vivo</i> Funktionstest von pPQE <i>crtl</i> _{Rg}	66
1.3.2	Heterologe Expression von <i>crtl</i> _{Rg} in DH5α[pPQE <i>crtl</i> _{Rg}] zur Proteingewinnung	67
1.4	Klonierung von <i>crtl</i> _{Rg} in pTrc99a	68
1.4.1	<i>In vivo</i> Funktionstest von pTrc <i>crtl</i> _{Rg}	69
1.4.2	Heterologe Expression von <i>crtl</i> _{Rg} in DH5α[pTrc <i>crtl</i> _{Rg}] zur Proteingewinnung	70
1.5	Klonierung von <i>crtl</i> _{Rg} in pPEU32	71
1.5.1	<i>In vivo</i> Funktionstest von pPEU <i>crtl</i> _{Rg}	72

1.5.2	Heterologe Expression von <i>crtl</i> _{Rg} in DH5α[pPEU <i>crtl</i> _{Rg}] zur Proteingewinnung	73
1.6	Zusammenfassung der Klonierungsergebnisse	75
2	Enzymatische Charakterisierung von Crtl _{Rg}	77
2.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> Enzym Funktionstests	77
2.2	pH-Optimum der enzymatischen Aktivität von Crtl _{Rg}	79
2.3	K _m -Wert Bestimmung von Crtl _{Rg} für die Substrate Phytoen und Neurosporin	80
2.4	Untersuchung der Korrelation zwischen Enzymkonzentration und dem Anteil des gebildeten Lycopins	82
2.5	Hemmstoffuntersuchung	84
2.6	Bestimmung der Kofaktorabhängigkeit von Crtl _{Rg}	85
2.6.1	Metallionen-Affinitätschromatografie	85
2.6.2	<i>In vitro</i> Enzymtest zur Bestimmung des Kofaktors von Crtl _{Rg}	86
3	Mutagenisierung von <i>crtl</i> _{Rg}	87
3.1	Mutagenisierung mittels Error Prone PCR	87
3.1.1	HPLC-Analyse von Carotinoidextrakten aus Mutanten	88
3.1.2	Sequenzanalysen der mutierten <i>crtl</i> _{Rg} -Leseraster aus der pUC <i>crtl</i> _{Rg} -Mutationsbibliothek	90
3.2	Klonierung der Mutationsbibliothek in pPEU32	92
3.3	<i>In vitro</i> Enzymtest mit pPEU <i>crtl</i> _{Rg} EP05	95
3.3.1	K _m -Wert Bestimmung von Crtl _{Rg} EP05 für die Substrate Phytoen und Neurosporin	95
3.3.2	Untersuchung der Korrelation zwischen Enzymmenge von Crtl _{Rg} EP05 und dem Anteil des gebildeten Lycopins	96
3.4	Mutagenisierung von pTrc <i>crtl</i> _{Rg} mittels XL1-Red	99
3.4.1	Klonierung von Mutationsbibliotheken aus pTrc99a in pPEU32	103
3.5	Gezielte Mutagenisierung von pTrc <i>crtl</i> _{Rg} mittels mutagenisierender inverser PCR	109
4	Untersuchung der Phytoen-Desaturase aus <i>Xanthophyllomyces dendrohous</i>	110
4.1	Amplifizierung von <i>crtl</i> von <i>X. dendrohous</i> aus cDNA-Bibliotheken und Klonierung in pPEU32	112
4.2	<i>In vivo</i> Enzym Funktionstest von pPEU <i>crtl</i> _{Xd} WT und pPEU <i>crtl</i> _{Xd} DQ1	114

4.3	Veränderung des Phänotyps der <i>X. dendrohous</i> -Mutanten PR1-104 und DQ1 durch alternative Hemmung	114
IV	Diskussion	120
1	Klonierung und Charakterisierung von <i>Crtl</i> aus <i>Rvi. gelatinosus</i>	121
2	Einfluss der Substrat- und Enzymkonzentration auf die Anzahl der katalysierten Reaktionsschritte	124
3	Untersuchung der Phytoen-Desaturasen aus dem Wildtyp von <i>X. dendrohous</i> und den Mutanten DQ1 und PR1-104	127
4	Mutagenisierung von <i>crtl</i> aus <i>Rvi. gelatinosus</i>	129
4.1	Mutationen führen zur Erhöhung der $Crtl_{Rg}$ -Menge	131
4.2	Mutationen bewirken Modifikationen der Enzymstruktur	134
5	Prinzipielle Ursachen für eine höhere oder niedrigere Anzahl der durch <i>Crtl</i> katalysierten Reaktionsschritte	137
V	Zusammenfassung	139
VI	Anhang	141
1	Abbildungsverzeichnis	141
2	Tabellenverzeichnis	146
3	Literaturverzeichnis	147
4	Danksagung	157
5	Lebenslauf	158

III. Abkürzungsverzeichnis

amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
cm	Chloramphenicol
d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Mix
DPA	Diphenylamin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FAD	Flavinadenindinukleotid
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde(n)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
k Ω	Kiloohm
LB	Luria Bertani
M	Molar
mM	Millimolar
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MPDA	2-(4-methylphenylthio)-diäthylamin
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

μM	Mikromolar
NAD	Nicotinadenindinukleotid
NADP	Nicotinadenindinukleotidphosphat
Nc	<i>Neurospora crassa</i>
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge von 600nm
ORF	Offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Rc	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
Rg	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>
Rr	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
Rs	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
T	Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TENS	Tris-EDTA-SDS-Natriumacetat-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Xd	<i>Xanthophyllomyces dendrohous</i>

I Einleitung

Unter den Eubakterien sind die photosynthetischen Bakterien einzigartig in ihrer Fähigkeit, Licht als Energiequelle photosynthetisch zu nutzen. Mit Ausnahme der Cyanobakterien, sind sie jedoch nicht in der Lage, Wasser photolytisch in seine konstituierenden Elemente, Sauerstoff und Wasserstoff, zu zerlegen, so wie es bei höheren Pflanzen und Algen der Fall ist. Statt dessen sind sie auf stärker reduzierte Wasserstoff-Donatoren wie Schwefelwasserstoff oder organische Substrate angewiesen und betreiben somit eine evolutiv frühzeitliche, anoxygene Photosynthese. Derartige anaerobe Mikroorganismen sind in Süß- und Meerwasser weit verbreitet. Sie sind rot, orange oder grün gefärbte Einzeller, deren Färbung durch den Gehalt an Bacteriochlorophyllen und Carotinoiden verursacht wird (Schlegel, 1985; Brock *et al.*, 1994).

Vor allem Purpurbakterien und im Speziellen einzelne Vertreter aus der Familie der schwefelfreien Purpurbakterien (Rhodospirillaceae) zeichnen sich durch ihre Pigmentausrüstung, aber auch durch den einfachen Aufbau ihres ursprünglichen Photosyntheseapparates aus. Sie siedeln hauptsächlich in anaeroben Zonen von stehenden oder langsam fließenden Süßgewässern, sind allerdings teilweise auch aerotolerant. Die schwefelfreien Purpurbakterien besitzen in der Regel Bacteriochlorophyll a, zum Teil Bacteriochlorophyll b sowie große Mengen von Carotinoiden, durch die sie ihre charakteristische purpurne Farbe erhalten. Rhodospirillaceae synthetisieren offenkettige C₄₀ Carotinoide, welche meist an den ψ -Endgruppen Methoxy- oder Ketogruppen als Substituenten besitzen und an C3,4 desaturiert sind (Takaichi, 1999). Unter anaeroben Bedingungen bilden Rhodospirillaceae als Endprodukte der Carotinoidbiosynthese entweder Spirilloxanthin (Gruppe 1) oder Spheroidin bzw. Hydroxyspheroidin (Gruppe 2). Eine dritte Gruppe synthetisiert Zwischenprodukte des Spirilloxanthinweges, wie beispielsweise Rhodopin (Goodwin, 1980). Unter semiaeroben Bedingungen werden die Carotinoide an C2 und teilweise an Position C2' ketoliert (Pinta *et al.*, 2003). Dabei werden Spheroidin zu Spheroidinon (bzw. OH-Spheroidin zu OH-Spheroidinon) und Spirilloxanthin zu Diketo-Spirilloxanthin umgesetzt. Die Synthese, sowohl der Carotinoide und Bacteriochlorophylle, als auch der Strukturproteine des

Photosyntheseapparates, ist durch Sauerstoff und Licht reguliert. Unter aeroben Bedingungen sowie unter relativ starken Lichtbedingungen ist die Transkription der daran beteiligten und in großen Operons organisierten Gene gehemmt (Penfold & Pemberton, 1991; Armstrong *et al.*, 1993a; Ponnampalam *et al.*, 1995; Elsen *et al.*, 1998). Hohe Sauerstoffkonzentrationen führen zu einem Wechsel von der Photophosphorylierung zur oxydativen Phosphosphorylierung. In diesem Fall nutzen die Bakterien den Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor der Atmungskette, über welche der zur Synthese von ATP nötige Protonengradient aufgebaut wird (Drews & Oelze, 1981; Drews *et al.*, 1983).

Rhodospirillaceae der Gattung *Rhodobacter* (*Rba. sphaeroides*, *Rba. capsulatus*) synthetisieren (anaerob) Spheroidin und Hydroxyspheroidin. Dabei entsteht intermediär das Zwischenprodukt Neurosporin mit 9 konjugierten Doppelbindungen. Dieses asymmetrische Carotinoid wird im Anschluss einseitig 1,2-hydratisiert, 3,4-desaturiert und methyliert. Im Falle der Bildung von Hydroxyspheroidin kommt es zu einer zusätzlichen Hydratisierung in Position C1',2' (Schmidt, 1978; Albrecht *et al.*, 1997; Badenhop *et al.*, 2003; Steiger *et al.*, 2003).

Als Zwischenprodukt der Carotinoidbiosynthese von *Rhodospirillum* (*Rsp.*) *rubrum* entsteht zunächst das symmetrische Lycopin (11 konjugierte Doppelbindungen), welches an beiden ψ -Endgruppen 1,2-hydratisiert, 3,4-desaturiert und methyliert wird, so dass als Endprodukt Spirilloxanthin (anaerob) gebildet wird (Komori *et al.*, 1998). In Abbildung I.1 (S.18) ist die Carotinoidbiosynthese in Rhodospirillaceae bis Lycopin dargestellt.

Im Unterschied zu anderen Rhodospirillaceae besitzt *Rubrivivax* (*Rvi.*) *gelatinosus* zwei parallele Carotinoidbiosynthesewege. Der Carotinoidextrakt einer anaerob kultivierten *Rvi. gelatinosus*-Kultur enthält in einem Verhältnis von 90:10 sowohl die Endprodukte einer Carotinoidsynthese über Neurosporin (Spheroidin u. OH-Spheroidin), als auch das, über das Zwischenprodukt Lycopin gebildete Endprodukt Spirilloxanthin (Steiger *et al.*, 2000). Dabei spielt die Phytoen-Desaturase (CrtI) aus *Rvi. gelatinosus* eine entscheidende Rolle, denn sie ist in der Lage, anders als die Phytoen-Desaturase anderer Rhodospirillaceae, sowohl das Einfügen von drei, als auch von vier Doppelbindungen in das Phytoenmolekül katalytisch zu vermitteln (Harada *et al.*, 2001). In den anderen Vertretern der Rhodospirillaceae wird durch das gleiche Enzym entweder Neurosporin oder Lycopin aus dem Substrat Phytoen

gebildet. Durch die Verzweigung des Carotinoidbiosyntheseweges nimmt die Phytoen-Desaturase eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Carotinoid-Diversität ein (Garcia-Asua *et al.*, 1998). Bisher ist völlig unklar, wodurch die unterschiedliche Produktspezifität der Phytoen-Desaturasen aus den verschiedenen Rhodospirillaceae hervorgerufen wird. In ihren Aminosäuresequenzen weisen die Enzyme hohe Homologien auf. Die Phytoen-Desaturasen aus *Rba. sphaeroides* (3-fach Desaturierung), *Rsp. rubrum* (4-fach Desaturierung) und *Rvi. gelatinosus* (3+4-fach Desaturierung) besitzen eine Übereinstimmung von etwa 54% in ihren Aminosäuresequenzen.

In Tabelle I.1 sind verschiedene Spezies aus der Familie der Rhodospirillaceae mit ihrer entsprechenden Carotinoid-Zusammensetzung aufgelistet.

Tabelle I.1 Carotinoid-Zusammensetzung unterschiedlicher Rhodospirillaceae ergänzt nach Schmidt (1978)

Organismus	Stamm	Carotinoid [% von Gesamt]									Ref.*	
		Neurosporin	OH-Neurosporin	Spheroidin	OH-Spheroidin	Spheroidinon	Anhydrorhodovibrin	2,2'-Diketospirilloxanthin	Spirilloxanthin	OH-Spirilloxanthin		Rhodovibrin
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ATH 2.4.1			90		10						a
	1760-1	2		90	4				4			b
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	8254			83	4	11	2					d
	Kb 1	1		87	5	4	2		1			b
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	ATH 2.2.1			18	69				13			c
	8290			15	68				18			c
	8290			10	64	8		1	16			b
	IL144	2	2	11	78				7			d
	S1			8	78				14			e
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	S1								89	11		b
	3860								57	39	2	b

*Referenzen a) van Niel (1947); b) Schmidt (1978); c), Eimhjellen & Liaaen-Jensen (1964); d) Harada *et al.* (2001); e) diese Arbeit

Die Funktionen von Carotinoiden in der Photosynthese sind die Absorption von Energie in Form von Lichtquanten und die Weiterleitung der Energie zum photosynthetischen Reaktionszentrum (Cogdell & Frank, 1987; Frank & Cogdell, 1996). Carotinoide sind als akzessorische Pigmente in den Lichtsammelkomplexen (LHC) und im Reaktionszentrum (RC) zu finden und erweitern den Absorptionsbereich von Chlorophyll im Bereich von 400 nm bis 550 nm. Dabei übertragen sie durch den als Singulett-Singulett-Energietransfer beschriebenen Vorgang, die durch sie absorbierte Lichtenergie auf Chlorophyll (Cogdell & Frank, 1987; Horton, 1996). Daneben besitzen Carotinoide eine große Bedeutung beim Schutz des Reaktionszentrums vor photooxidativem Stress. So wirken sie einer Schädigung des photosynthetischen Apparates durch starke Lichteinstrahlung entgegen und schützen vor Sauerstoffradikalen, die durch UV-Strahlung entstehen können (Sandmann *et al.*, 1998). Eine zu hohe Lichtstrahlung kann das Entstehen von Triplettchlorophyll ($^3\text{CHL}^*$) und Singulett-Sauerstoff ($^1\Delta\text{gO}_2$) bewirken. Carotinoide quenchen diese überschüssige Energie und gehen dabei in den 1. Triplettzustand über. Beim Zurückfallen des Elektrons in den Grundzustand wird die Energie in Form von Wärme freigesetzt (Cogdell & Frank, 1987; Siefermann-Harms, 1987). Neben dem Quenchen von Singulett-Sauerstoff und Triplettchlorophyll können Carotinoide mit freien Radikalen reagieren und diese dabei unschädlich machen. So wird beispielsweise die Gefahr der Membranschädigung durch Peroxidradikale mit Hilfe von Carotinoiden gesenkt (Edge *et al.*, 1997). Carotinoide fungieren darüber hinaus als Membranstabilisatoren. Durch die Einlagerung der lipophilen Carotinoidmoleküle erfahren Membranen eine Veränderung ihrer Fluidität. Im Falle von Carotinoiden mit polaren Endgruppen steigt dabei die Rigidität. Sie sinkt, wenn unpolare Carotinoide in die Membran eingelagert werden (Havaux, 1998; Hara *et al.*, 1999). Carotinoide stellen bedeutende Strukturelemente in den Lichtsammelkomplexen dar und sind sowohl für den Aufbau und die Integration peripherer Antennenkomplexe in die Membran, als auch zur Verminderung der Sensibilität der Komplexe gegen Proteasen von Bedeutung (Webster *et al.*, 1980; Zurdo *et al.*, 1993; Lang & Hunter, 1994; Frank *et al.*, 1999).

Carotinoide bestehen aus einem Kohlenstoffgrundgerüst, welches in der Regel aus 40 C-Atomen aufgebaut ist. Sie setzen sich aus 8 Isoprenuntereinheiten zusammen und gehören zu den Tetraterpenen. Durch Absorption des Lichts im Bereich von 400

nm bis 550 nm sind sie gelb, orange oder rot gefärbt. Derzeit sind mehr als 600 natürlich vorkommende Carotinoide bekannt. Sie werden von Pflanzen, Pilzen und Bakterien synthetisiert (Goodwin, 1980; Sandmann, 1994a). Einige Bakterien synthetisieren auch verkürzte C30 Carotinoide, wie bei *Staphylococcus aureus* (Raisig & Sandmann, 1999) oder verlängerte C45 bzw. C50 Carotinoide, wie in den Spezies der Gattungen *Micrococcus*, *Corynebacterium* und *Flavobacterium* (Raisig & Sandmann, 1999; Krubasik *et al.*, 2001).

Die wasserunlöslichen Pigmente wurden von Goodwin (1980) in die Carotine, mehrfach ungesättigte Kohlenwasserstoffe, und deren Sauerstoffhaltige Derivate, die Xanthophylle, eingeteilt. Das unterschiedliche, charakteristische Weise meist dreigipfelige Absorptionsspektrum der Carotinoide (1 Hauptmaximum und 2 Nebenmaxima) wird durch die unterschiedliche Größe des konjugierten Doppelbindungssystems hervorgerufen. Ihm gehören meist 11 oder mehr Doppelbindungen in dem Kohlenstoffrückgrat und den Endgruppen an. Die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen ist sowohl für das spezifische Absorptionsspektrum und die daraus resultierende Farbe, als auch für die photochemischen Eigenschaften des Moleküls verantwortlich (Britton, 1995). Je länger dabei die Polyenkette ist, desto besser sind die antioxidativen Eigenschaften (Albrecht *et al.*, 2000). Jedoch werden diese auch durch α - und β -Ionongruppen sowie andere Substituenten, wie Hydroxy-, Methoxy- und Ketogruppen, beeinflusst.

Carotinoide sind, wie viele andere Isoprenoide (Cholesterol, Chinone und Steroidhormone), aus einzelnen Isopreneinheiten (C_5 -Körpern) aufgebaut (Britton & Young, 1993). Die überwiegende Mehrzahl der Bakterien stellt Isopentenylpyrophosphat (IPP), die Ausgangssubstanz der Isoprenoidsynthese, über den 1-Desoxy-Xyluose-5-Phosphat-Weg (DOXP-Weg) bereit. Für das Purpurbakterium *Rba. capsulatus* konnten bereits Gene, die für diesen Syntheseweg notwendigen Enzyme ermittelt werden (Lichtenthaler, 2000; Hahn *et al.*, 2001). Durch die Isomerisierung von Isopentenylpyrophosphat (IPP), vermittelt durch das Enzym IPP-Isomerase, wird IPP zu Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) umgesetzt und durch „Schwanz-Kopf-Addition“ mit einem weiteren Molekül IPP zu dem Monoterpen Geranylpyrophosphat mit einem C_{10} -Gerüst verknüpft (Richter, 1998; Lichtenthaler, 1999). Durch zwei weitere Additionen von IPP entsteht das Diterpen Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Das vermittelnde Enzym ist die

Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (CrtE). GGPP ist sowohl das Substrat für die Carotinoid-, als auch für die Phytolsynthese (Isoprenoidseitenkette des Chlorophyll) (Garcia-Asua *et al.*, 1998). Durch die Schwanz-Schwanz-Addition zweier Moleküle GGPP wird Phytoen gebildet, wobei der Syntheseschritt durch die Phytoen-Synthase (CrtB) katalysiert wird (Sandmann, 1994b; Cunningham & Gantt, 1998). Phytoen ist das erste Carotinoid in der Biosynthesekette und aufgrund von nur 3 konjugierten Doppelbindungen und einem Absorptionsmaximum von 285 nm farblos. Es ist das Substrat für funktionell ganz unterschiedliche Phytoen-Desaturasen. Bei der Desaturierung von Phytoen werden sukzessive Doppelbindungen in das Kohlenstoff Grundgerüst eingefügt. Mit jeder dieser Desaturierungen wird das System konjugierter Doppelbindungen um je zwei Doppelbindungen verlängert. Dabei verändern sich die Absorptionseigenschaften des Moleküls, so dass Phytoen über die Zwischenprodukte Phytofluen, ζ -Carotin und Neurosporin bis zu Lycopin seine Farbe von blass gelb, über gelb bis hin zu rot verändert.

In Abbildung I.1 ist die Carotinoidbiosynthese bis Lycopin mit den entsprechenden katalytisch relevanten Enzymen der Rhodospirillaceae gezeigt.

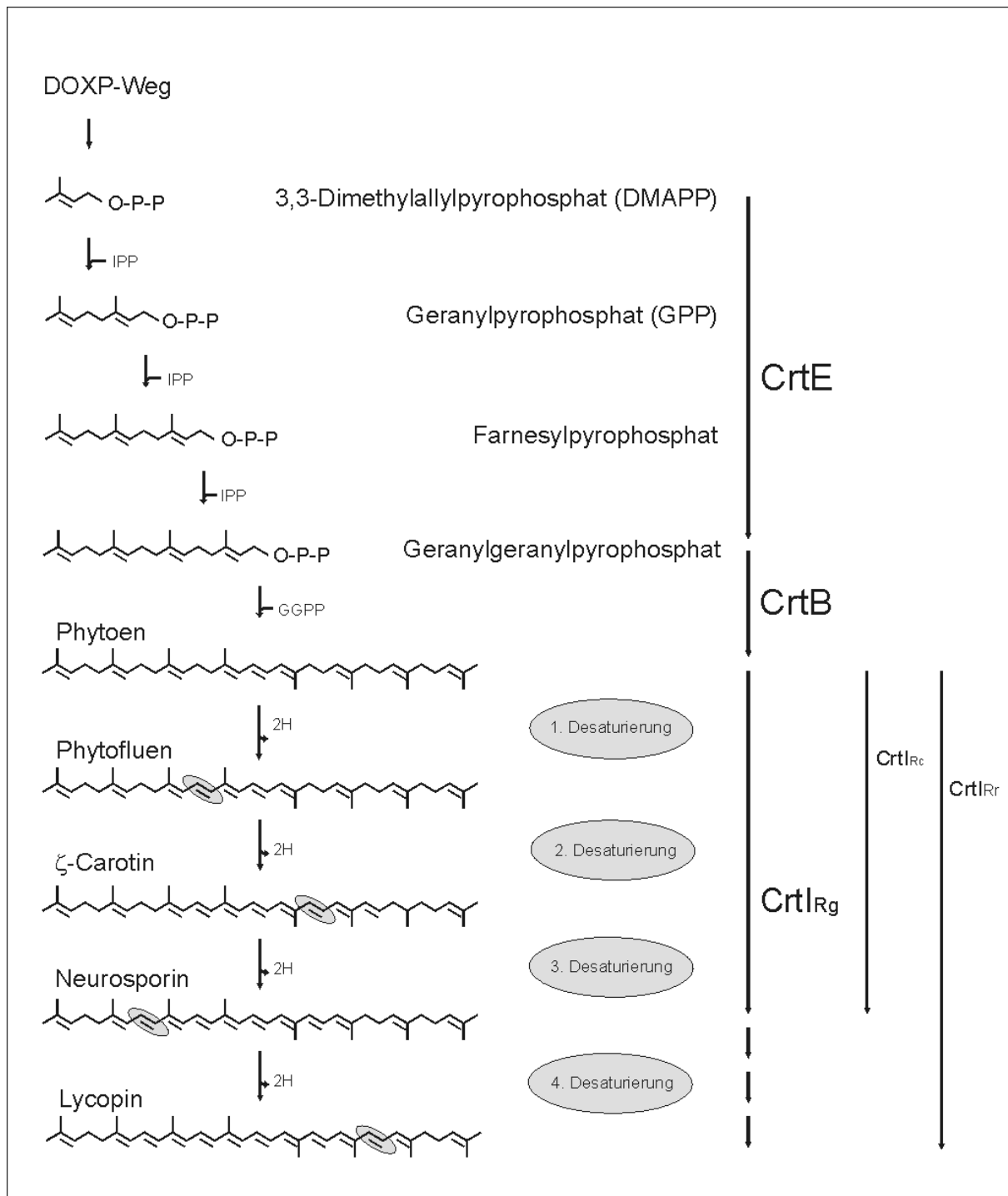


Abbildung I.1 Carotinoidbiosynthese bis Lycopin; Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (CrtE), Phytoen-Synthase (CrtB), Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* (CrtI_{Rg}), Phytoen-Desaturase aus *Rba. capsulatus* (CrtI_{Rc}), Phytoen-Desaturase aus *Rhodospirillum rubrum* (CrtI_{Rr})

Deuten Aminosäuresequenzvergleiche noch auf einen phylogenetischen Zusammenhang zwischen Phytoen-Synthasen aus Bakterien und eukaryotischen Organismen hin, zeigen entsprechende Vergleiche von Phytoen-Desaturasen aus Bakterien und eukaryotischen Organismen, bis auf ein konserviertes N-terminales Dinukleotidbindmotiv (Bartley *et al.*, 1990), keine Übereinstimmungen. So ist davon

auszugehen, dass sich während der Evolution die bakterielle Phytoen-Desaturase (CrtI) ganz unabhängig von der Phytoen-Desaturase der Pflanzen (PDS) bzw. der Cyanobakterien (CrtP) entwickelt hat. Durch Phytoen-Desaturasen des bakteriellen CrtI-Typs werden drei Desaturierungsschritte, beispielsweise bei verschiedenen *Rhodobacter* Spezies (Giuliano *et al.*, 1986), oder vier Desaturierungsschritte, wie im Falle des Enterobakteriums *Erwinia uredovora* oder dem Basidiomyceten *Xanthophyllomyces dendrohous*, katalysiert (Fraser *et al.*, 1992; Verdoes *et al.*, 1999). Mit dem Enzym Crt-al1 konnte in dem Pilz *Neurospora crassa* eine bakterielle Phytoen-Desaturase identifiziert werden, welche sogar in der Lage ist, 5 Desaturierungsschritte zu katalysieren (Bartley *et al.*, 1990; Hausmann & Sandmann, 2000). Bakterielle Phytoen-Desaturasen nutzen als Kofaktor in der Regel FAD oder NADP und sind durch Diphenylamin (DPA) inhibierbar. Mit Ausnahme des Cyanobakteriums *Gloeobacter sp.*, welches eine Phytoen-Desaturase des CrtI-Typs besitzt (Tsuchiya *et al.*, 2005; Steiger *et al.*, Im Druck), verfügen Cyanobakterien, Algen und höhere Pflanzen über eine andere Form der Phytoen-Desaturase (PDS bei Pflanzen und CrtP bei Cyanobakterien), welche zwei Desaturierungsschritte katalysiert und ζ -Carotin synthetisiert. Die pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytoen-Desaturasen sind nicht durch DPA, statt dessen aber durch Norflurazon inhibierbar, Plastochinon dient ihnen als primärer Wasserstoffakzeptor (Sandmann, 2002).

Im Anschluss an die Desaturierungsreaktionen folgt bei den Rhodospirillaceae eine 1,2 Hydratisierung (1,2-Hydratase, CrtC), eine Desaturierung in Position C3,C4 (3,4-Desaturase, CrtD) und schließlich eine Methylierung an C1 (Methyltransferase, CrtF). Neurosporin wird im Zuge dieser katalytischen Reaktionen zu Spheroidin bzw. OH-Spheroidin umgesetzt. Bei der Synthese von Spirilloxanthin wird Lycopin beidseitig modifiziert, wobei zunächst alle Reaktionsschritte an einer der beiden ψ -Endgruppen ablaufen (Zwischenprodukt: Anhydrorhodovibrin) und erst dann die zweite ψ -Endgruppe modifiziert wird (Steiger *et al.*, 2000; Pinta *et al.*, 2003). Unter Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (semiaerobe Bedingungen) werden die Carotinoide am C2 Atom ketoliert (Ketolase, CrtA) (Schmidt, 1978; Gerjets, 2002; Pinta *et al.*, 2003). Ein erhöhter Schutz des Photosyntheseapparates vor photooxidativer Schädigung durch ketolierte Carotinoide wird diskutiert (Zhu *et al.*, 1986). Im Unterschied zu den meisten anderen carotinoidbildenden Organismen,

besitzen Rhodospirillaceae keine Carotinoid-Zyklasen, weshalb sie ausschließlich azyklische Carotinoide bilden.

In Abbildung 1.2 sind die zwei alternativen Carotinoidbiosynthesewege der Rhodospirillaceae dargestellt.

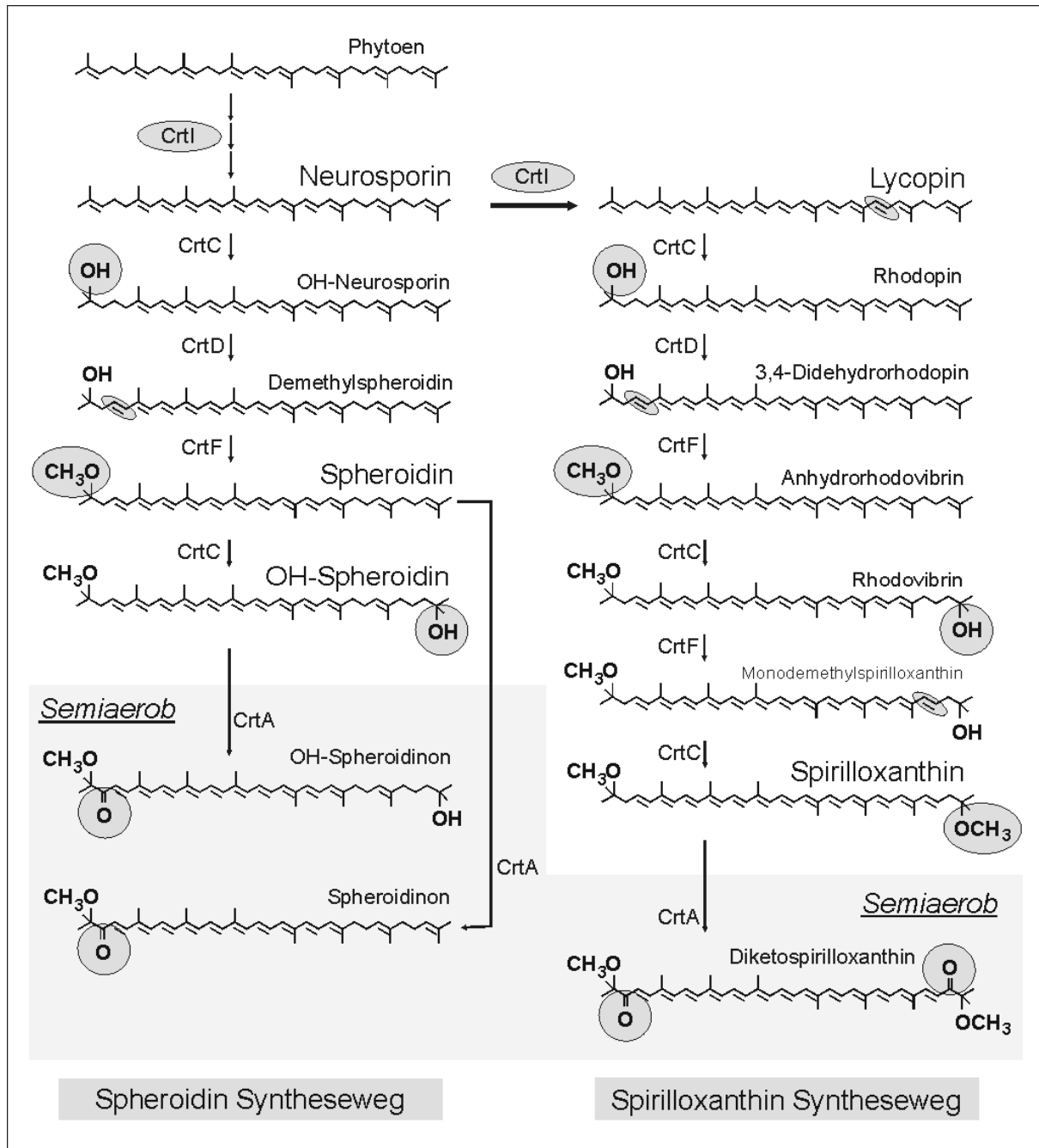


Abbildung 1.2 Carotinoidbiosynthesewege in Rhodospirillaceae (von Lycopin aus); Spheroidinweg und Spirilloxanthinweg unter aeroben bzw. unter semiaeroben Bedingungen (grau unterlegt); Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (CrtE), Phytoen-Synthase (CrtB), Phytoen-Desaturase (CrtI), 1,2-Hydratase (CrtC), 3,4-Desaturase (CrtD), Methyltransferase (CrtF), Ketolase (CrtA)

1 Ziel der Arbeit

Die Gene der Phytoen-Desaturasen aus den unterschiedlichen Rhodospirillaceae (zu denen auch *Rvi. gelatinosus* gehört) sind sich sehr ähnlich. Über Homologievergleiche der abgeleiteten Proteinsequenzen sind keine Bereiche zu erkennen, auf welche die unterschiedlichen Produktspezifitäten zurückzuführen sind. Dennoch gibt es Phytoen-Desaturasen, die 3 und solche, die 4 Doppelbindungen in ein Phytoenmolekül einfügen können. Daher findet man in den einzelnen Vertretern der Rhodospirillaceae entweder Carotinoide des Spheroidinweges oder des Spirilloxanthinweges. Davon abweichend ist die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* ($CrtI_{Rg}$) in der Lage, sowohl drei als auch vier Desaturierungsschritte katalytisch zu vermitteln (Harada *et al.*, 2001). Dies hat die Bildung zweier (Zwischen-)Produkte zur Folge, Lycopin und Neurosporin, wodurch sich die Carotinoidsynthese in 2 parallele Wege verzweigt. Dabei werden als Endprodukte der Carotinoidbiosynthese Spirilloxanthin und Spheroiden in einem Verhältnis von etwa 10:90 gebildet.

Welche funktionellen Eigenschaften des Enzyms für das Einfügen von 3 oder 4 Doppelbindungen in ein Carotinoidmolekül entscheidend sind und welche Bereiche von $CrtI_{Rg}$ dabei eine Rolle spielen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Zunächst sollte das Gen *crtI* aus *Rvi. gelatinosus* mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) aus genomischer DNA amplifiziert, in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert und die Funktion von $CrtI_{Rg}$ anhand von Komplementierungsreaktionen in *E. coli* überprüft werden. Für die enzymatische Charakterisierung *in vitro*, sollte ein geeignetes heterologes Expressionssystem entwickelt werden, um $CrtI_{Rg}$ im zellfreien System, hinsichtlich kinetischer Parameter, zu untersuchen. Dabei standen die Ermittlung von K_M - und V_{max} -Wert sowie die Bestimmung des pH-Optimums des Enzyms im Vordergrund. Eine Reinigung des Enzyms sollte ermöglichen, die Kofaktorabhängigkeit von $CrtI_{Rg}$ zu bestimmen. Durch die Verwendung eines Hemmstoffes sollte die Aktivität des Enzyms gesenkt und Intermediate des Biosyntheseweges akkumuliert werden. Mittels molekulargenetischer Manipulation in Form von zufälliger und gezielter Mutagenese, sollte die Funktion und damit die Anzahl der katalysierten Desaturierungsschritte beeinflusst werden. Dafür sollte die

Nukleotidsequenz von $crtl_{Rg}$ durch Error Prone PCR sowie durch einen mutagenisierenden *E. coli*-Stamm (XL1-Red) zufällig verändert und Mutationsbibliotheken erstellt werden. Mit diesen Bibliotheken sollten Phytoen bildende *E. coli*-Zellen transformiert und mit Hilfe eines Farbscreenings Mutanten identifiziert werden, welche entweder nur Neurospurin (gelbe Klone) oder vermehrt Lycopin (rote Klone) synthetisierten. Sequenzanalysen und Vergleiche der veränderten Enzyme mit dem ursprünglichen $Crtl_{Rg}$ sowie anderen bakteriellen Phytoen-Desaturasen sollten Hinweise geben, welche Bereiche der Phytoen-Desaturase für die Anzahl der eingefügten Doppelbindungen entscheidend sind und wo möglicherweise das aktive Zentrum von $Crtl_{Rg}$ lokalisiert ist. Mittels computeranalytischer Verfahren sollte ein Modell der zweidimensionalen Struktur des Enzyms und der membranassoziierten Domänen entworfen werden.

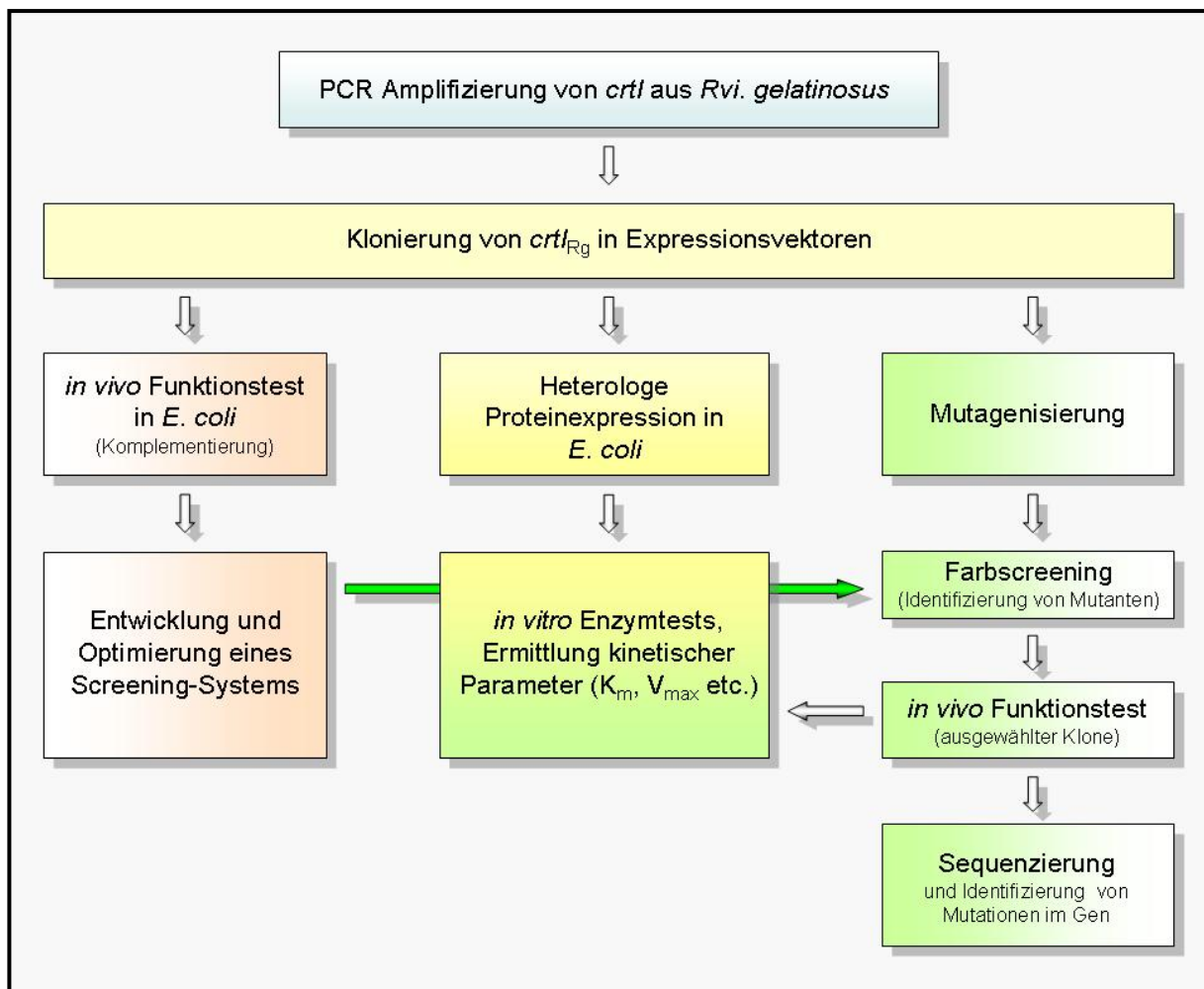


Abbildung I.3 Strategie zur Charakterisierung und Mutagenisierung von $Crtl_{Rg}$ aus *Rvi. gelatinosus*

II Material und Methoden

1 Verwendete Mikroorganismen und Anzuchtbedingungen

1.1 Anzucht von Rhodospirillaceae

Der *Rubrivivax gelatinosus*-Stamm S1 (Uffen, 1976) wurde von C. Astier (associé á l'Université Pierre et Marie Curie, Gif sur Yvette Cedex, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Daneben wurden Laborstämme von *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* und *Rhodospirillum rubrum* eingesetzt.

Die Anzucht der Rhodospirillaceae erfolgte anaerob für 8-10 Tage bei 28°C und konstanter Beleuchtung von 40 - 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Das Medium für die Flüssigkulturen setzte sich aus 20 ml Kaliumphosphatpuffer, 20 ml Malat-Lösung, 20 ml konzentrierte Lösung und 1 g Caseinhydrolysat zusammen und wurde mit H₂O auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Die Zellen wurden nach Kultivierung sedimentiert und gefriergetrocknet.

Kaliumphosphatpuffer:

- K₂HPO₄ 6,805 g
- H₂O 50 ml

- KH₂PO₄ 8,71 g
- H₂O 50 ml

19 Teile K₂HPO₄ wurden mit 31 Teilen KH₂PO₄ vermischt und mit KOH auf pH 6,8 eingestellt

Malat-Lösung:

- Malat 3,35 g
- H₂O 14 ml

Der Ansatz wurde mit 25% Ammoniak auf pH 6,8 eingestellt und mit H₂O auf 25 ml aufgefüllt

Konzentrierte Lösung:

- Titriplex I (Nitriloacetic acid) 1 g
- MgSO₄ 1,445 g
- CaCl₂ x 2 H₂O 0,332 g
- Spurenelemente (100X) 1 ml
- Ammoniummolybdat 92,4 mg
- FeSO₄ 990 mg

Vitamine (100X)

- Nikotinsäure 500 mg
- Thiamin-Aneurin 250 mg
- Biotin 5 mg
- Metals (Spurenelemente)* 5 ml
- KOH 800 mg

Der Ansatz wurde mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt

*Metals-Lösung 44:

- Titriplex II
- EDTA 250 mg
- ZnSO₄ 7 x H₂O 1095 mg
- FeSO₄ 7 x H₂O 500 mg
- MnSO₄ 7 x H₂O 154 mg
- CuSO₄ 5 x H₂O 39,2 mg
- CO(NO₃)₂ 6 x H₂O 24,8 mg
- Na₂B₄O₇ 10 x H₂O 17,7 mg

Der Ansatz wurde mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt.

Um das Ausfallen von Salzen zu verhindern, wurde 100 µl Sulfonsäure zugegeben.

1.2 Anzucht von *Xanthophyllomyces dendrohous*

Für die Isolation von RNA zur Erstellung einer cDNA-Bank und die Untersuchung der Phytoen-Desaturase aus dem Basidiomycet *Xanthophyllomyces dendrohous* (Synonym: *Phaffia rhodozyma*) wurden Zellen des aus Japan stammenden Wildtyps ATCC24202 sowie der Mutante DQ1 verwendet. Hemmstofftests wurden mit DQ1 sowie einer weiteren Mutante, PR1-104, durchgeführt. Die *Xanthophyllomyces dendrohous*-Stämme ATCC24202 (WT) und DQ1 (Mutante) wurden von Dr. T. Kakizono (Dept. Molecular Biotechnology, University Hiroshima, Japan) zur Verfügung gestellt. Die *Xanthophyllomyces dendrohous*-Mutante PR1-104 wurde von Prof. Dr. H. Visser, Universität Wageningen, Niederlande zur Verfügung gestellt. Die Anzucht von *Xanthophyllomyces dendrohous* erfolgte in autoklaviertem YPD-Flüssigmedium. Zur Kultivierung auf Festmedium wurden 15 g Agar Agar in einen Liter YPD-Medium gegeben. Nach dem Autoklavieren wurden je 20 ml in sterile Petrischalen gefüllt und bei 4°C gelagert.

Sowohl die Flüssigkulturen, als auch die Kulturen auf Festmedium wurden für drei Tage bei 18°C und Tageslicht inkubiert.

YPD-Medium:

- Hefe 10 g
 - Pepton (aus Soja) 20 g
 - D(+) Glucose-1Hydrat 20 g
- Auf 1 l mit H₂O aufgefüllt und autoklaviert

1.3 Anzucht von *E. coli*

Für die Vermehrung von DNA und die Untersuchung der Phytoen-Desaturasen aus *Rubrivivax (Rvi.) gelatinosus*, *Rhodobacter (Rba.) capsulatus*, *Rhodobacter (Rba) sphaeroides* und *Rhodospirillum (Rsp.) rubrum* sowie aus *X. dendrohous* wurden *Escherichia coli* Bakterien verwendet.

DH5α [F, Φ 80d lacZ M15, endA1, recA1, hsdR17 (rk⁻mk⁻), supE44]

DH5α wurde zur DNA-Vermehrung sowie für die heterologe Proteinexpression und die Bildung von Carotinoid-Substraten verwendet. DH5α bildet kleine kompakte Zellkolonien. Geringe Farbunterschiede durch unterschiedliche Carotinoid-

Zusammensetzung in den transformierten Zellen sind leichter zu erkennen, als beispielsweise bei Verwendung des Bakterienstammes JM101.

XL1-Red (Greener *et al.*, 1996, Stratagene) [*EndA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, *mutD5*, *mutS*, *mutT*, *Tn10(tetr)a*].

XL1-Red wurden zur Mutagenisierung von Plasmid-DNA verwendet.

Alle *E. coli* Bakterien wurden bei 37°C in LB-Medium (Luria Bertani-Medium) kultiviert (Sambrook *et al.*, 1989).

LB-Medium:

- Hefe 5 g
- Pepton (aus Soja) 10 g
- NaCl 10 g
- 1N NaOH 1ml

Auf 1 l mit H₂O aufgefüllt und autoklaviert

Für die Kultivierung von *E. coli* auf Petrischalen wurden 15 g Agar Agar in 1 l LB-Medium gegeben und anschließend autoklaviert. Jeweils 20 ml wurden in sterile Petrischalen gegeben. Nach dem Erkalten wurden die Petrischalen bei 4°C gelagert.

1.3.1 Antibiotika-Zusatz

Die in die *E. coli* Bakterien mittels Transformation aufgenommenen Plasmide enthielten unterschiedliche Antibiotikaresistenzgene. Durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika in das Nährmedium erfolgte die Selektion der Bakterientransformanten.

Verwendet wurde Ampicillin (amp) der Firma *Roth* in einer Konzentration von 100 µg/ml in Flüssigmedium und 187,5 µg/ml auf LB-Agar Platten. Ampicillin wurde in H₂O gelöst und steril filtriert (Sterilfilter Rotrand Ø 0,2 mm Porendurchmesser; *Schleicher und Schüll*).

Chloramphenicol (cm) der Firma *Boehringer* wurde in 70% EtOH gelöst und sowohl dem Flüssig-, als auch dem Festmedium in einer Konzentration von 34 µg/ml zugegeben.

Tetracyclin (tet) der Firma *Sigma* wurde in 70% EtOH gelöst und dem Flüssig-, sowie dem Festmedium in einer Konzentration von 25 µg/ml zugegeben.

1.3.2 Dauerkulturen

Von allen *E. coli*-Stämmen und Transformanten wurden Dauerkulturen angelegt. Hierfür wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl sterilem 80% Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

2 Molekularbiologische Methoden

Alle gängigen molekularbiologischen Methoden wie DNA-Restriktionsspaltungen, DNA-Trennung in Agarosegelen, DNA-Ligationen und Transformationen wurden nach der Methodensammlung von Sambrook *et al.* (1998) durchgeführt.

Restriktionsenzyme wurden von der Firma *Life Technology, New England Biolabs* bzw. *MBI Fermentas* bezogen. Für Ligationen wurde T4-DNA-Ligase der Firma *MBI Fermentas* und für die PCR Biotherm Taq-Polymerase von *GeneCraft* verwendet.

2.1 Isolation von genomischer DNA aus Rhodospirillaceae

Die Isolation der genomischen DNA aus Zellen von *Rvi. gelatinosus*, *Rba. sphaeroides* und *Rsp. rubrum* erfolgte mit Hilfe des Wizard[®] Genomic DNA Purification Kits der Firma *Promega*. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2 Isolation von RNA aus *Xanthophyllomyces dendrohous*

Die Isolation von RNA aus *X. dendrohous* erfolgte nach der Vorschrift von Schmitt *et al.* (1990).

10 ml einer *Xanthophyllomyces dendrohous* Flüssigkultur wurden zentrifugiert, das Sediment in 400 µl AE-Puffer (20 mM Na-Acetat, auf pH 5,5 eingestellt, 1 mM EDTA, autoklaviert) aufgenommen und die Zellen nach Zugabe von 40 µl SDS Lösung (10%), unter Verwendung von Glaskügelchen (Ø 0,5 mm) gevortext. Nach Zugabe von 550 µl Phenol (mit AE-Puffer equilibriert) und Mischen, wurde der Ansatz zur Denaturierung der Proteine für 4 min auf 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis

abgekühlt. Nach Zentrifugation für 2 min bei 14000 Upm wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 60 µl 3 M Na-Acetat und 1650 µl absolutem EtOH (-20°C) 1 h bei -20°C gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 14000 Upm und 4°C sedimentiert, mit 80% EtOH gewaschen und getrocknet. Die RNA wurde in 30 µl DEPC Wasser (1 ml DEPC (Roth) in 1 l Wasser gelöst, über Nacht bei 37°C inkubiert, autoklaviert) aufgenommen und bei -70°C gelagert. Die Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte photometrisch nach folgender Formel:

$$\text{RNA } [\mu\text{g}] = \Delta_{E260} \times 0,04 \times F_v$$

Δ_{E260} = gemessene Extinktion bei 260 nm

F_v = Verdünnungsfaktor

Als Maß für die Reinheit der RNA gilt, dass das Verhältnis der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und der Absorption bei 280 nm optimalerweise 2 sein sollte.

$$\frac{\lambda_{260}}{\lambda_{280}} \approx 2$$

2.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der mRNA aus *X. dendrohus* wurde mit dem Revert Aid™ Kit der Firma *MBI Fermentas* durchgeführt. Dabei wurde nach den Herstellerangaben verfahren. Für die Synthese der cDNA wurden Oligo-dT Primer verwendet. Die gewonnene cDNA wurde eingesetzt, um mittels PCR das Gen der Phytoen-Desaturase zu amplifizieren.

2.4 Plasmide

Alle Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

Die in Tabelle II.1 aufgeführten Plasmide wurden für die Klonierungen und Transformationen verwendet.

Tabelle II.1 Verwendete Plasmide; *Resistenz: amp) Ampicillin, cm) Chloramphenicol, tet) Tetracyclin; *crtE* (Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase-Gen), *crtB* (Phytoen-Synthase-Gen), *crtI* (Phytoen-Desaturase-Gen), *crtC* (1,2-Hydratase-Gen), *crtY* (Lycopin-Zyklase-Gen)

Bezeichnung	Kommentar	Resistenz*	Quelle/Zitat
pPQE	Entspricht den Expressionsvektoren pQE30, pQE31, bzw. pQE32 von Qiagen. Das cat-Gen (Chloramphenicol-resistenzgen) wurde deletiert, 6x His-Tag	amp	(Krubasik, 2000)
pPEU	wie pPQE, jedoch wurde der Promotor durch einen Promotor aus dem Carotinoidegencluster von <i>Erwinia uredovora</i> , der die Expressionstärke vermindert, ersetzt	amp	(Rudert, 2004)
pTrc99a	Klonierungsvektor	amp	(Amann <i>et al.</i> , 1988)
pMON38201	Klonierungsvektor	amp	(Borovkov & Rivkin, 1997)
pUC8-2	Klonierungsvektor	amp	(Vieira & Messing, 1982)
pACYC148	Klonierungsvektor	cm	(Chang & Cohen, 1978)
pRK404	Klonierungsvektor	tet	(Ditta <i>et al.</i> , 1985)
pAC <i>crtE</i> _{Eu}	Synthetisiert: Phytoen; enthält die Gene: <i>crtE</i> und <i>crtB</i> aus <i>Erwinia uredovora</i>	cm	(Linden <i>et al.</i> , 1991)
pAC <i>crtE</i> _{Rc}	Synthetisiert: Neurosporin; enthält die Gene: <i>crtE</i> , und <i>crtB</i> aus <i>Erwinia uredovora</i> sowie <i>crtI</i> aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>	cm	(Raisig <i>et al.</i> , 1996)
pRK <i>crtC</i> _{Rc}	Enthält das Gen <i>crtC</i> aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>	tet	(Albrecht <i>et al.</i> , 1997)
pPQE <i>crtI</i> _{Rg}	Enthält das Gen <i>crtI</i> aus <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	amp	Diese Arbeit
pPEU <i>crtI</i> _{Rg}	Enthält das Gen <i>crtI</i> aus <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	amp	Diese Arbeit
pTrc <i>crtI</i> _{Rg}	Enthält das Gen <i>crtI</i> aus <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	amp	Diese Arbeit
pUC <i>crtI</i> _{Rg}	Enthält das Gen <i>crtI</i> aus <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	amp	Diese Arbeit
pPEU <i>crtI</i> _{Rs}	Enthält das Gen <i>crtI</i> aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	amp	Diese Arbeit
pPQE <i>crtI</i> _{Rc}	Enthält das Gen <i>crtI</i> aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>	amp	Diese Arbeit
pPQE <i>crtI</i> _{Rr}	Enthält das Gen <i>crtI</i> aus <i>Rhodospirillum rubrum</i>	amp	Diese Arbeit
pPEU <i>crtI</i> _{Xd} WT	Enthält das Gen <i>crtI</i> aus <i>Xanthophyllomyces dendrohous</i>	amp	Diese Arbeit
pPEU <i>crtI</i> _{Xd} DQ1	Enthält das Gen <i>crtI</i> aus <i>Xanthophyllomyces dendrohous</i>	amp	Diese Arbeit

2.4.1 pMONcrtI

Da die direkte Klonierung geschnittener PCR-Amplifikate in Expressionsvektoren nicht sehr effizient ist, wurden die PCR-Fragmente zunächst in pMON38201 zwischenkloniert.

Die für die Phytoen-Desaturasen kodierenden Gene (*crtI*) aus den Rhodospirillaceae und den *X. dendrohous*-Stämmen wurden mittels PCR amplifiziert. Die verwendete Taq-Polymerase generierte an den 3' Enden der Amplifikate Desoxyadenosin-Überhänge, die zur Klonierung in einen *XcmI* geschnittenen pMON38201 Vektor (mit 5' T-Überhang) genutzt werden konnten.

2.4.2 pPQE32crtI_{Rg}

Für die Proteinexpression wurde *crtI_{Rg}* in einen pPQE32 Vektor kloniert. *crtI_{Rg}* konnte mittels der in die PCR-Primer eingefügten Restriktionsschnittstellen (*SacI/HindIII*) aus pMON*crtI_{Rg}* ausgeschnitten und in einen ebenfalls *SacI/HindIII* geschnittenen pPQE32 kloniert werden.

2.4.3 pUC8-2crtI_{Rg}

Neben pPQE32 wurde auch ein pUC8-2 für die Expression von *crtI_{Rg}* verwendet. Um das Gen in einen pUC8-2 Expressionsvektor zu klonieren, wurde es *EcoRI/HindIII* aus pMON*crtI_{Rg}* herausgeschnitten und in einen ebenfalls *EcoRI/HindIII* geschnittenen pUC8-2 ligiert.

2.4.4 pTrc*crtI_{Rg}*

Sowohl pPQE32 als auch pUC8-2 sind Vektoren, die durch einen starken Promotor und eine große Kopienzahl gekennzeichnet sind und dadurch zu einer sehr hohen Expressionsrate von Proteinen in *E. coli* führen.

pTrc99a besitzt im Gegensatz zu pUC und pPQE ein *lacZ* Repressor-Gen und lässt so eine bessere Kontrolle der Proteinexpression zu. *crtI_{Rg}* wurde mittels *EcoRI/HindIII* aus pMON*crtI_{Rg}* herausgeschnitten und in einen ebenso *EcoRI/HindIII* geschnittenen pTrc99a ligiert.

2.4.5 pPEUcrtI_{Rg}

Um eine schwache Expression der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* in *E. coli* zu erreichen, wurde *crtI_{Rg}* in pPEU32 kloniert. Bei dem Plasmid handelt es sich um einen modifizierten pPQE Vektor. Er besitzt vor der MCS und dem His-Tag den Promotor des Carotinoidgenclusters aus *Erwinia uredovora*, der zu einer schwächeren Proteinexpression als pPQE bzw. pUC und dadurch zur Vermeidung von unlöslichen denaturierten Protein-Aggregaten (Inclusion-bodies) führen soll (Rudert, 2004). Mittels *SacI/HindIII* wurde *crtI_{Rg}* aus pMONcrtI_{Rg} ausgeschnitten und in einen ebenfalls *SacI/HindIII* geschnittenen pPEU32 kloniert.

2.4.6 pUCcrtI_{Rg}MUT und pPEUcrtI_{Rg}MUT

Um das aus einer Error Prone PCR hervorgegangene *crtI_{Rg}*-Amplifikat in einen pUC8-2 zu klonieren, wurde das PCR-Fragment *EcoRI/HindIII* geschnitten und in einen ebenfalls *EcoRI/HindIII* pUC8-2 ligiert. Für die Ligation in pPEU32 wurde das Amplifikat *SacI/HindIII* geschnitten und in einen ebenfalls *SacI/HindIII* geschnittenen pPEU32 ligiert.

2.4.7 pPQEcrtI_{Rr}

Das Gen der Phytoen-Desaturase aus *Rsp. rubrum* wurde aus pMONcrtI_{Rr} mittels *PstI/HindIII* herausgeschnitten und in einen gleichfalls *PstI/HindIII* geschnittenen pPQE30 kloniert.

2.4.8 pPQEcrtI_{Rc}

Die Phytoen-Desaturase aus *Rba. capsulatus* wurde mittels PCR aus dem Plasmid pACYC*crtEBI_{Rc}* amplifiziert und in einen *XcmI* geschnittenen pMON38201 kloniert. *crtI_{Rc}* wurde anschließend mittels *SacI/HindIII* aus pMONcrtI_{Rc} herausgeschnitten und in einen ebenfalls *SacI/HindIII* pPQE30 kloniert.

2.4.9 pPEUcrtI_{Rs}

Das für die Phytoen-Desaturase aus *Rba. sphaeroides* kodierende Gen wurde mittels *SphI/SacI* aus pMONcrtI_{Rs} herausgeschnitten und in einen ebenso geschnittenen pPEU32 kloniert.

2.4.10 pPEUcrtI_{Xd}WT und pPEUcrtI_{Xd}DQ1

Die für die Phytoen-Desaturase aus *X. dendrohous* Wildtyp und DQ1 kodierenden cDNAs *crtI_{Xd}WT* und *crtI_{Xd}DQ1* wurden mittels *SacI/SalI* aus pMON*crtI_{Xd}WT* bzw. pMON*crtI_{Xd}DQ1* herausgeschnitten und in einen ebenso *SacI/SalI* geschnittenen pPEU30 ligiert.

2.5 Schnelle Plasmidisolierung

1,5 ml einer Bakterienkultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 14000 Upm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf: Centrifuge 5415 C) sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 50 µl LB-Medium resuspendiert. Nach der Zugabe von 300 µl TENS und kurzem Vortexen wurden 150 µl 3-5 M Ka-Acetat zugegeben und die Reaktionsgefäße mehrfach invertiert. Der Ansatz wurde 5 min bei 14000 Upm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 800 µl kaltem Ethanol (96%) gefällt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 14000 Upm wurde der Überstand verworfen, das Sediment mit 500 µl kaltem 80% Ethanol gewaschen und erneut 5 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA nach Trocknen an der Luft in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 rückgelöst.

3 - 5 M Kaliumacetat:

- Ka-Acetat 29,46 g
- Eisessig 11,5 ml
- H₂O 28,5 ml

TENS-Lösung:

- Tris 10 mM
- Na₂EDTA 1 M
- SDS 0,5%
- NaOH 0,1 M

2.6 Plasmidisolierung (Miniprep)

Mit Hilfe des DNA-Präparationskits *E.Z.N.A.*[®] Plasmid Miniprep Kit I der Firma *peQLab Biotechnologie GmbH* konnte Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad aus *E. coli* isoliert werden. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Für die Plasmidisolierung wurden 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur eingesetzt.

2.7 Dialyse von DNA

Für die Sequenzierung wurde mittels *E.Z.N.A.*[®] Plasmid Miniprep Kit I isolierte DNA über Nitrocellulosefilter mit einer Porengröße von 0,025 µm (Millipore) gegen 2 mM Tris-HCl pH 7,5 dialysiert.

2.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA wurde bei der Firma *Scientific Research & Development GmbH* sowie bei der Firma *MWG Biotechnologies* sequenziert. Für die Sequenzierung der klonierten Vektorkonstrukte sowie zur Untersuchung der Plasmide nach Mutagenisierung, wurden die in Tabelle II.4 auf S.37 aufgeführten Sequenzierprimer verwendet.

Die ermittelten Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programms DNASIS 0.1 (*Hitachi Software Engineering Co., Ltd.*) analysiert.

2.9 Transformation von *E. coli*

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

1 ml einer 5 ml Übernachtskultur wurden in 100 ml LB-Medium überimpft und bei 37°C in einem Aquatron Schüttelbad (*Infors*, Hilden) bei 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 angezogen. Die Kultur wurde in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 5000 Upm und 4°C zentrifugiert (*Sorvall* Zentrifuge, RC 5B, GSA Rotor). Das Sediment wurde in 20 ml kaltem TFB₁-Puffer rückgelöst und 2 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei 2000 Upm und 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien in 4 ml kaltem TFB₂-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots von 200 µl bei -70°C gelagert.

TFB₁-Puffer, 200 ml Ansatz:

- Kaliumacetat 0,59 g
- MnCl₂ 1,97 g
- KCl 5,96 g
- CaCl₂ 2,92 g
- Glycerin 30 ml

Der Puffer wurde mit 0,2 M Essigsäure auf pH 8,5 eingestellt, mit H₂O auf 200 ml aufgefüllt und steril filtriert. (Sterilfilter Rotrand Ø 0,2 mm; *Schleicher und Schüll*) Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

TFB₂-Puffer, 50 ml Ansatz:

- Na-MOPS 0,112 g
- CaCl₂ 0,556 g
- KCl 0,037 g
- Glycerin 7,5 ml

Mit NaOH wurde der Puffer auf pH 7,0 eingestellt und mit H₂O auf 50 ml aufgefüllt. Nach dem Sterilfiltrieren erfolgte die Lagerung bei 4°C.

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

Ein 200 µl Aliquot der CaCl₂-kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligationsansatz, bzw. 10 - 50 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis erfolgte zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen ein Hitzeschock für 1,5 min bei 42°C im Wasserbad (*Julabo* MP). Der Ansatz wurde 1,5 min auf Eis gekühlt, zur Vermehrung der Zellen mit 800 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert.

100 µl des Reaktionsansatzes wurden auf einer LB-Platte (mit den entsprechenden Antibiotika) ausplattiert und im Brutschrank (*Heræus*) bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.9.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Aufgrund der höheren Transformationsrate wurde die Elektroporationsmethode zur Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA nach Mutagenisierung und anschließender Ligation verwendet.

Aus einer 5 ml Übernacht-Kultur wurden 100 ml SOB Medium im Verhältnis von 1:100 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,7 kultiviert. Die Zellen wurden in sterile Zentrifugenbecher überführt und 10 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 100 ml eisgekühltem sterilem H₂O resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren (w.o.) wurde das Sediment in 50 ml eisgekühltem sterilem H₂O rückgelöst und wie oben zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 20 ml eisgekühlter steriler Glycerin-Lösung (15%) resuspendiert und für 10 min bei 2000 Upm zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 1,2 ml eisgekühlter Glycerin-Lösung (15%) resuspendiert, in Aliquots von 60 µl portioniert und bei -70°C gelagert.

2.9.4 Elektroporation

Je 60 µl Aliquot wurden 2 µl Ligationsansatz zur Transformation zugegeben, in eine sterile Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt und ein Spannungspuls von 2400 V angelegt (Parallelwiderstand zur Probe 132 kΩ, 40 µF Kapazität; Elektroporationsgerät: Cellject Basic). Anschließend wurden die Zellen in 800 µl LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C inkubiert. 50 µl - 100 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agar (mit den entsprechenden Antibiotika) ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.10.1 Amplifizierung von Phytoen-Desaturase-kodierenden Genen (*crtI*)

Mittels Polymerasekettenreaktion wurden die für die unterschiedlichen Phytoen-Desaturasasen kodierenden Gene bzw. cDNAs (*crtI*) aus genomischer DNA von *Rvi. gelatinosus* S1, *Rba. sphaeroides* und *Rsp. rubrum* sowie aus cDNA von *X. dendrohous* der Stämme ATCC24202 und DQ1 amplifiziert. Für die Amplifizierung von *crtI* aus *Rba. capsulatus* wurde das Plasmid pAC*crtEBI*_{Rc} als Templat eingesetzt. Die Zusammensetzungen der PCR-Ansätze ist in Tabelle II.2 gezeigt.

Tabelle II.2: PCR-Ansatz 50 µl

Komponenten	µl pro Ansatz
genom. DNA, cDNA, bzw. Plasmid-DNA	1 (10 - 50 ng)
PRIMER Start 5', 10 pM	2
PRIMER Ende 3', 10 pM	2
Puffer (10-fach) 15 mM MgCl ₂	5
Taq-Polymerase 5 U/µl	0,5
dNTP's 5 mM	2
Mit H ₂ O auf ein Volumen von 50 µl auffüllen	

Für die PCR wurde Taq-Polymerase (5 U/µl) der Firma GeneCraft verwendet. Die Reaktion wurde in einem PCR-Cycler der Firma *Techne* (Modell: *Progene*) durchgeführt. Das gewählte PCR-Programm ist in Tabelle II.3 gezeigt.

Tabelle II.3: PCR-Cycler-Programm

Programm Nr.	Temp.	Zeit
1)	40°C	2 min
2)	94°C	3 min
25x 3)	95°C	30 s
	60°C	40 s
	72°C	90 s
4)	72°C	10 min

2.10.2 Kontroll-PCR

Die Kontroll-PCR diente der Überprüfung, ob und in welcher Orientierung ein Gen in ein Plasmid integriert wurde. Hierfür wurden die nach Transformation gewonnenen Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und in 10 µl eines PCR-Ansatzes gegeben. In den Ansatz wurden jeweils 1 µl Start- und End-Primer, 1 µl Puffer (incl. 15 mM MgCl₂), 0,4 µl einer 5 mM dNTP Lösung und 0,5 U Taq-Polymerase gegeben. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Es wurde das in Tabelle II.3 beschriebene PCR-Cycler-Programm verwendet.

2.10.3 Verwendete Oligonukleotidprimer

Die in Tabelle II.4 aufgelisteten Oligonukleotidprimer wurden für die PCR verwendet.

Tabelle II.4: Verwendete PCR-Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
pQEF	cccgaaaagtgccacctg	Sequenzierungen
pQE Promotor	cgatcacgaggcccttt	
pQErev	gttctgaggtcattactgg	
M13-21Fw	tgtaaacgagggccagt	Sequenzierungen und Amplifizierung von <i>crtI</i> aus pUC und pMON (Mutagenisierung)
M13rev	caggaaacagctatgacc	
pTrcFw+45	ggctcgtataatgtgtgg	Sequenzierungen
pTrcHisrev	cttctgctgtctgatttaactcg	
Rubi-start	aggacgagctcgcagcgatgc	Amplifizierung der Phytoen-Desaturase aus <i>Rubrivivax gelatinosus</i>
Ruvi 3'+stop	gtcccaagcttcagcg	
Rg V78D up	accgaccctatctcttcga	gezielte Mutagenisierung von <i>crtI</i> aus <i>Rubrivivax gelatinosus</i> u. Sequenzierung
Rg V78D dwn	gacgatgggtggcccggc	
CRTI-up (Xd)	ccggatccatgggaaaagaacaagatcag	Amplifizierung von <i>crtI</i> aus <i>X. dendrohus</i>
CRTI-down (Xd)	ccgctgacgaaagcaagaacaccaacgga	
PrSac5'	gagctcatgggaaaagaacaag	
PrSal3'+stop	gtcgactcagaaagcaagaacac	
R.c.crtI-SacI5'	gagctcatgtccaagaacacag	Amplifizierung von <i>crtI</i> aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>
R.c.crtI-HindIII3'	gaagcttcattgcgccgcttg	
R.s.crtI-SphI5'	gcatgctgatgccctcgatctcg	Amplifizierung von <i>crtI</i> aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
R.s.crtI-SacI3'	gagctctcattccgcggaag	
R.r.crtI-SphI5'	gcatgctgatgaaactccaccag	Amplifizierung von <i>crtI</i> aus <i>Rhodospirillum rubrum</i>
R.r.crtI-SacI3'	gagctcttagaccaggaccgag	

2.10.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 1% Agarosegel (1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer). Die Agarosegelelektrophorese wurde bei 55 – 85 V durchgeführt.

Zur Färbung der DNA wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (100 µl einer 1% Ethidiumbromidlösung in 200 ml H₂O) für 20 min leicht geschwenkt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

TAE-Puffer (50X):

- Tris Base 242 g
- Eisessig 57,1 ml
- Na₂-EDTA 37,2 g

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,5 eingestellt.

DNA-Probenpuffer:

- 15% Ficoll 400
- 25% Bromphenolblau
- 0,25% Xylene

wurden in H₂O bei 50°C gelöst.

Als Längenstandard wurden 300 ng *EcoRI/HindIII* geschnittene Lambdaphagen DNA verwendet.

2.10.5 DNA-Rückgewinnung aus Agarosegelen

Die über Agarosegelelektrophorese aufgetrennte DNA aus den Restriktionsansätzen wurde mit Hilfe des DNA-Isolations-Kits der Firma *Applichem* aus der Agarose isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die eluierte DNA wurden bei –20°C gelagert.

2.11 Mutagenisierung von *crtl* aus *Rvi. gelatinosus*

Zur Mutagenisierung der für die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* kodierenden DNA-Sequenz *crtl* wurden unterschiedliche molekularbiologische Verfahren angewandt.

2.11.1 Error Prone PCR

Die Error Prone PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA, wobei durch „suboptimale“ PCR-Bedingungen zufällig falsche Nukleotide in die Sequenz eingefügt werden (Xu *et al.*, 1999). Die Folge ist eine große Zahl mutierter DNA-Sequenzen, welche statistisch gesehen eine Mutation auf tausend Nukleotide besitzen.

Die PCR wurde in zwei Schritten durchgeführt. Für die erste PCR wurde pUC*crtl*_{RG} als Templat eingesetzt. Neben 1,5 mM MgCl₂ wurden dem Ansatz auch 40 µM MnCl₂ zugegeben. Die PCR durchlief 20 Zyklen. Eine zweite PCR wurde mit 25 Zyklen durchgeführt. Dabei wurden 4 µl des ersten PCR-Ansatzes als DNA-Templat verwendet. Neben dATP, dCTP, dGTP und dTTP (200 µM dNTP) wurde 50 µM Inosintriophosphat (dITP) als Nukleotide eingesetzt.

Als Primer wurden die im pUC Vektor bindenden M13fw-21 (tgtaaacgagggccagt) und M13rev (caggaaacagctatgacc) eingesetzt. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie die verwendeten PCR-Programme sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle II.5: Error Prone PCR, Ansatz 1

Komponenten	µl pro Ansatz
pUC <i>crtl</i> _{RG} 100 ng/µl	1
5' PRIMER (M13fw-21) 10 pM	2
3' PRIMER (M13rev) 10 pM	2
Puffer (10-fach) 15 mM MgCl ₂	5
MnCl ₂ 1 mM	2
Taq-Polymerase 5 U/µl	1
dNTP's 5 mM	2
Mit H ₂ O auf ein Volumen von 50 µl auffüllen	

Tabelle II.6: Error Prone PCR, Ansatz 2

Komponenten	μl pro Ansatz
pUCcrtI _{RG} 100 ng/ μl	4
5' PRIMER (M13fw-21) 10 pM	4
3' PRIMER (M13rev) 10 pM	4
Puffer (10-fach) 15 mM MgCl ₂	10
Taq-Polymerase 5 U/ μl	2
dNTP's 5 mM	4
dITP 5 mM	1
Mit H ₂ O auf ein Volumen von 100 μl auffüllen	

Tabelle II.7: Error Prone PCR-Cycler-Programm

Programm Nr.	Temp.	Zeit
1)	40°C	2 min
2)	94°C	3 min
20 ¹ X; 25 ² X 3)	95°C	30 s
	48°C	40 s
	72°C	90 s
4)	72°C	10 min

2.11.2 Herstellung von Mutationsbibliotheken

Die mittels Error Prone PCR gewonnenen Amplifikate wurden sowohl in pUC8-2 (*EcoRI/HindIII*) sowie in pPEU32 (*SacI/HindIII*) kloniert. Jeweils 5 μl der Ligationsansätze wurden zur Transformation von DH5 α -Zellen mittels Elektroporation genutzt. Jeweils 50 μl des Transformationsansatzes wurden auf eine LB-Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Kolonien wurden gezählt und unter Verwendung eines Drigalskispatels mit je 1 ml LB-Medium von den Petrischalen abgelöst. Die Bakteriensuspension wurde in 100 ml LB-Medium kultiviert. Mit der resultierenden Kultur wurde eine Tipp-500 Säulen-DNA-Maxipräparation der Firma *Qiagen* durchgeführt. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.11.3 Mutagenisierung von *crtl*_{Rg} mittels *E. coli* XI1-Red

Ein 200 µl Aliquot CaCl₂ kompetenter XI1-Red (Stratagene) Zellen wurde mit ca. 50 ng pTrc*crtl*_{Rg} transformiert. Je 50 µl eines Transformationsansatzes wurden auf eine LB-Agar Platte ausgestrichen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Zellkolonien unter Verwendung von jeweils 2 ml LB-Medium von den Petrischalen abgewaschen, in 200 ml LB-Medium aufgenommen und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 12, 24, 32, 48 sowie 54 Stunden wurden der Kultur jeweils 20 ml entnommen und durch eine entsprechende Menge LB-Medium ersetzt. Je 10 ml der entnommenen Zellen wurden für eine Plasmidisolierung eingesetzt (*peQLab E.Z.N.A. Kit II*, Durchführung nach Herstellerangaben). Um zu verhindern, dass Mutationen im Vektorbereich das Ergebnis verfälschen, wurde *crtl*_{Rg} aus den nach 48 und 54 Stunden Inkubation erstellten pTrc*crtl*_{Rg}-Mutationsbibliotheken mittels *SacI/HindIII* heraus geschnitten und in einen gleichfalls *SacI/HindIII* geschnittenen pPEU32 kloniert.

2.11.4 Mutagenisierende inverse PCR

Für den gezielten Austausch von Nukleotiden im Leseraster von *crtl*_{Rg} wurde eine inverse PCR durchgeführt. Dabei enthielt der Start Primer „Rg V78D up“ in seiner Sequenz zwei falsch paarende Basen, welche zu einem Aminosäureaustausch an Position 78 in der Phytoen-Desaturase führen sollten. Durch die gezielte Mutagenisierung sollte in Position 78 des Proteins die Aminosäure Valin durch Asparaginsäure (V78D) ersetzt werden.

Über inverse PCR wurde das komplette Konstrukt pPEU*crtl*_{Rg} amplifiziert. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tabelle II.8, das PCR-Cycler-Programm in Tabelle II.9 angegeben.

Tabelle II.8: Ansatz für inverse PCR

Komponenten	μl pro Ansatz
pPEU $ctrl_{RG}$ 20 ng/ μl	1
5' PRIMER (M13fw-21) 10 pM	2
3' PRIMER (M13rev) 10 pM	2
Puffer (10-fach) 15 mM MgCl_2	5
Accu Taq-Polymerase 5 U/ μl	2
dNTP's 25 mM	10
Der Ansatz wurde mit 2% DMSO versetzt und mit H_2O auf ein Volumen von 50 μl aufgefüllt	

Tabelle II.9: PCR-Cycler-Programm für inverse PCR

Programm Nr.	Temp.	Zeit
1)	40°C	2 min
2)	94°C	3 min
25X 3)	95°C	30 s
	54°C	40 s
	68°C	10 min
4)	68°C	10 min

Die aus der PCR hervorgegangenen Amplifikate wurden mittels Klenow-Fragment (*MBI Fermentas*) behandelt um 5' A-Überhänge zu entfernen. Die 5'-Enden der PCR-Produkte wurden mittels einer T_4 -Polynukleotidkinase phosphoryliert. Nach Auftrennung über Agarosegelelektrophorese und Rückelution der DNA wurde die amplifizierte DNA mittels der T_4 -DNA-Ligase ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden elektrokompente DH5 α -Zellen transformiert.

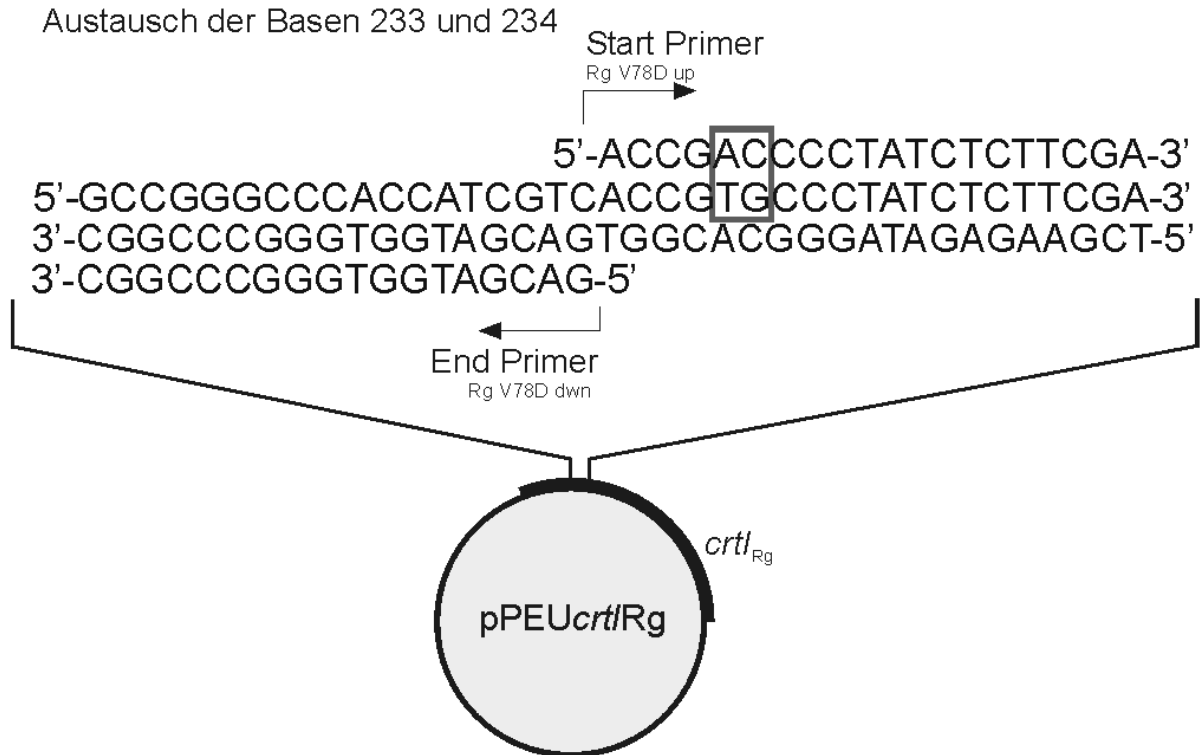


Abbildung II.1: Gezielte Mutagenisierung von *crtI*_{Rg} über inverse PCR mittels zweier falsch paarender Basen im Primer „Rg V78D up“ (Start Primer)

2.12 Screening der erstellten Mutationsbibliotheken

Um Mutationen in der Phytoen-Desaturase und eine damit verbundene Änderung der enzymatischen Eigenschaften zu erkennen, wurde die Phytoen bildende *E. coli*-Transformante DH5 α [pACcrtEB_{Eu}] mit den erstellten Mutationsbibliotheken transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Agar mit Chloramphenicol und Ampicillin ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und für 8 h bei Raumtemperatur im Dunkeln, wurden die Zellkolonien auf Farbunterschiede hin untersucht. Die ausgewählten Zellkolonien wurden abgenommen und in LB-Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Die aus den Kulturen extrahierten Carotinoide wurden mittels HPLC charakterisiert.

Aus den ausgewählten Klonen wurde die DNA isoliert, *Hind*III geschnitten und über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. pUCcrtI_{Rg} (4,5 Kb), pPEUcrtI_{Rg} (4,5 Kb) und pTrccrtI_{Rg} (5,5 Kb) konnten anhand ihrer Größe identifiziert, aus dem Gel rückgelöst und dadurch von dem Plasmid pACcrtEB_{Eu} getrennt werden. Die DNA wurde sequenziert.

3 Biochemische Methoden

3.1 Kultivierung von Bakterien-Transformanten

Für die *in vivo* Enzym Funktionstests mit den unterschiedlichen Phytoen-Desaturasen wurde die Phytoen bildende *E. coli*-Transformante DH5 α [pACcrtEB_{Eu}] mit den klonierten Plasmiden (pUCcrtl_{Rg}, pTrccrtl_{Rg}, pPQEcrtl_{Rg} und pPEUcrtl_{Rg} u.a.) transformiert. Das Plasmid pACcrtEB_{Eu} trägt die Gene *crtE* und *crtB* aus *Erwinia uredovora*. Die Expressionsprodukte dieser Gene, die Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase und die Phytoen-Synthase, sind die zur Phytoen (Substrat) Synthese nötigen Enzyme. Da Phytoen farblos, die Desaturierungsprodukte Neurosporin und Lycopin aber gelb bzw. rot gefärbt sind, kann anhand der Farbe, der nach der Transformation gebildeten Zellkolonien untersucht werden, ob die Expressionskonstrukte der klonierten *crtI*-Gene funktionell aktiv sind. Farbunterschiede der Kolonien können Hinweise auf die Anzahl der durch die Phytoen-Desaturase katalysierten Desaturierungsschritte je Phytoenmolekül geben. Dabei ist eine gelbe Kolonie ein Indiz für eine Phytoen-Desaturase, welche vorwiegend das 3-fach desaturierte Neurosporin synthetisiert. Rote Zellkolonien weisen auf eine Phytoen-Desaturase hin, welche hauptsächlich 4 Doppelbindungen in das Phytoenmolekül einfügt und Lycopin bildet. Orangefarbige Kolonien deuten auf ein durch die Phytoen-Desaturase gebildetes Gemisch aus Neurosporin und Lycopin hin. Die Klone konnten in LB-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika) kultiviert werden. Die Expression von *crtI*_{Rg} wurde in Bakterien, welche mit pUCcrtl_{Rg}, pTrccrtl_{Rg} bzw. pPQEcrtl_{Rg} transformiert wurden, bei einer OD₆₀₀ von 0,3 mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Kultivierung, mit pPEUcrtl_{Rg} transformierter Bakterien erfolgte ohne Induktion. Die Kulturen wurden 1 Tag bei 37°C geschüttelt, die gebildeten Carotinoide extrahiert und mittels HPLC analysiert.

3.2 Heterologe Expression in *E. coli*

100 ml LB-Medium (mit Ampicillin) wurden von einer LB-Agar-Platte inokuliert. Die Zellen wurden 24 h unter Schütteln in einem Aquatron (Infors) bei 37°C kultiviert. Die Expression von *crtI*_{Rg} wurde in Bakterien, welche mit pUCcrtl_{Rg}, pTrccrtl_{Rg} bzw. pPQEcrtl_{Rg} transformiert wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,3 mit 0,5 mM IPTG induziert. *E. coli*-Transformanten, welche pPEUcrtl_{Rg} enthielten, wurden nicht induziert.

3.3 Ernte und Aufschluss der Bakterienzellen

3.3.1 Ernte von *E. coli* zur Proteingewinnung

100 ml einer in 3.2 beschriebenen *E. coli* Kultur, wurden sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 5 - 10 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8 resuspendiert. Die *E. coli*-Zellen wurden zweimal mit einer French Pressure Cell Press (*Amico*) unter einem Druck von 95 Mpa aufgebrochen und ein Aliquot entnommen. Das restliche Homogenat wurde mit 10 µg/ml DNase versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Zur Trennung der löslichen cytosolischen Bestandteile von den unlöslichen Membranbestandteilen wurde das Homogenat für 20 min bei 4°C und 15000 Upm zentrifugiert (Sorvall RC 5B, SS34 Rotor). Der Überstand wurde abgenommen und die Membranfraktion in 5 - 10 ml Natriumphosphatpuffer pH 8 rückgelöst. Das zuvor aliquotierte Homogenat sowie die nach Zentrifugation erhaltene Membranfraktion (Sediment) und der Überstand (cytosolische Fraktion) wurden für SDS-PAGE bzw. Enzymtests verwendet.

3.3.2 Anzucht und Ernte von *E. coli* zur Substratgewinnung

Zur Gewinnung von Carotinoid-Substrat (Phytoen bzw. Neurosporin) für die *in vitro* Enzym Tests, wurde 1 l LB-Medium (mit Chloramphenicol) aus einer über Nacht Kultur der Phytoen bildenden Transformante DH5α[pACcrtEB_{Eu}] bzw. der Neurosporin bildenden Transformante DH5α[pACcrtEBI_{Rc}] inokuliert. Nach Kultivierung bei 37°C im Dunkeln für 3 (Phytoen) bzw. 1 Tag (Neurosporin) wurden die Kulturen in Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 5000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in Metallbecher überführt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment bei -70°C für 2 h tiefgefroren und 3 Tage lang lyophilisiert (*Christ*, Gamma 1-20). Die gefriergetrockneten Zellen wurden bei -20°C im Dunkeln gelagert.

3.4 *In vitro* Enzymtest

3.4.1 Enzymfunktionstest

Für die *in vitro* Enzymfunktionstests wurden Homogenat, Überstand und die Membranfraktion jeweils mit 5,44 µg Phytoen (in 20 µl Aceton; 20 µM Endkonz.) und 2 µl Phosphatidylcholin-Emulsion in Zentrifugengläsern 4 - 8 h oder über Nacht bei 28°C im Dunkeln und unter Schütteln inkubiert. Für die Enzymfunktionstests wurden Homogenat, Überstand und Membranfraktion von DH5α[pPEUcrtI_{Rg}], DH5α[pPEUcrtI_{Rg}Mutante] bzw. DH5α[pPEUcrtI_{Rs}] eingesetzt.

3.4.2 V_{max} - und K_m -Wert Bestimmung

Zur Charakterisierung der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* wurden die V_{max} - und K_m -Werte für die Substrate Phytoen und Neurosporin ermittelt. Die Enzymtests enthielten je 400 µl Zellüberstand von DH5α[pPEUcrtI_{Rg}] bzw. einer Mutante und 2 µl Phosphatidylcholin-Emulsion. Phytoen und Neurosporin wurden in Aceton gelöst und in Konzentrationen von 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 40 µM und 50 µM zugegeben. Die Enzymtests wurden mit 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8 auf ein Volumen von 500 µl gebracht und bei 28°C im Dunkeln unter Schütteln für 4-5 h inkubiert.

3.4.3 Enzymtests mit unterschiedlichen CrtI_{Rg}- bzw. CrtI_{Rs}-Mengen

Um zu untersuchen, ob der Anteil des gebildeten Lycopins am Gesamtumsatz von der eingesetzten Enzymmenge abhängig ist, wurde CrtI_{Rg} bzw. CrtI_{Rs} in unterschiedlichen Mengen eingesetzt. Dafür wurden 478 µl, 398 µl, 298 µl, 198 µl, 98 µl, 48 µl und 18 µl der Zellüberstände von DH5α[pPEUcrtI_{Rg}] bzw. DH5α[pPEUcrtI_{Rs}] jeweils mit 5,44 µg Phytoen (in 20 µl Aceton; 20 µM Endkonz.) und 2 µl Phosphatidylcholin-Emulsion versetzt und mit einem Überstand von DH5α[pPEU32] auf ein Volumen von 500 µl gebracht. Die Ansätze wurden 4 - 8 h oder über Nacht bei 28°C im Dunkeln und unter Schütteln inkubiert.

Die in die Enzymtests eingesetzten CrtI-Mengen wurden mit Hilfe des in 5.5 beschriebenen *Bio-Rad Proteinassays* und einer Densiometrie-Software (*Gelmess*) bestimmt.

3.4.4 Bestimmung des pH-Optimums von Crtl_{Rg}

Um das pH-Optimum der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* zu ermitteln, wurden jeweils 100 ml einer Kultur von DH5 α [pPEU_{ctrl_{Rg}}] sedimentiert und in 5 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer mit den pH-Werten 5,5 / 6 / 6,5 / 7 / 7,5 / 8 / 8,5 und 9 resuspendiert. Nach Zellaufschluss und Zentrifugation wurden jeweils 478 μ l des Überstandes mit 20 μ M Phytoen und 2 μ l Phosphatidylcholin-Emulsion über Nacht bei 28°C im Dunkeln unter Schütteln inkubiert.

3.4.5 Einfluss von Diphenylamin (DPA) auf die Aktivität von Crtl_{Rg}

Zur Untersuchung des Einflusses von DPA auf die Enzymaktivität von Crtl_{Rg} wurde 478 μ l Überstand von DH5 α [pPEU_{ctrl_{Rg}}] eingesetzt und mit 20 μ M Phytoen und 2 μ l Phosphatidylcholin-Emulsion versetzt. DPA wurde in den Konzentrationen 0,1 mM, 0,4 mM, 0,7 mM und 1 mM - jeweils in 10 μ l Methanol gelöst - den Enzymtests zugefügt. Ein Kontrollansatz enthielt 10 μ l Methanol ohne DPA. Die Ansätze wurden für 8 h bei 28° inkubiert. Zur Bestimmung des I₅₀-Wertes von DPA für Crtl_{Rg} wurden die Produktmengen der *in vitro* Enzymreaktionen in Abhängigkeit der Hemmstoffkonzentration gemessen. Die Messwerte wurden einfach reziprok gegen die Hemmstoffkonzentration aufgetragen (*Dixon-Plot*). Der I₅₀-Wert ergab sich aus dem Betrag des X-Wertes am Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse.

3.4.6 Bestimmung des Kofaktors von Crtl_{Rg}

Um den Kofaktor der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* zu ermitteln, wurde eine über Affinitätschromatographie gereinigte und entsalzte Enzymfraktion mit 20 μ M Phytoen und 2 μ l einer Phosphatidylcholin-Emulsion versetzt. Als Kofaktoren wurden NAD, NADP sowie FAD (gelöst in 20 μ l 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8) in einer Konzentration von je 0,3 mM eingesetzt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 28°C inkubiert.

3.4.7 Herstellung der Phosphatidylcholin-Emulsion

0,2 g Phosphatidylcholin (*Sigma-Aldrich*) aus Soja wurden in 2 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8 mittels Vortexen (15 min) gelöst und in einem Ultraschallbad für 1 min beschallt. Die Emulsion wurde mit Stickstoff überschichtet und luftdicht verschlossen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

3.5 Proteinreinigung

3.5.1 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie

Für die Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie wurde TALON der Firma *Clontech* verwendet. Dabei handelt es sich um Sepharose mit chelatierten Kobaltionen zur selektiven Bindung an einen His-Tag.

Eine 100 ml Kultur von DH5 α [pPEUcrt_{Rg}] wurde sedimentiert und in 5 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8, 200 mM NaCl resuspendiert. Nach Zellaufschluss und Zentrifugation wurde der Überstand mit 1 ml, zuvor mit Puffer equilibriertem TALON versetzt und unter Schwenken 1 h auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine leere 4 ml fassende Säule gegeben und 4x mit 1,5 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8, 200 mM NaCl und 1x mit 1,5 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazol gewaschen (Beseitigung nicht spezifisch an das Talon gebundener Proteine). Die an das TALON gebundenen Proteine wurden (in 4 Schritten) mit je 1,5 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8, 200 mM NaCl mit aufsteigender Imidazol-Konzentration (50 mM, 100 mM, 150 mM und 200 mM) von der Säule eluiert.

Zur Dokumentation der Proteinreinigung wurden je 10 μ l Homogenat, Überstand und Membranfraktion sowie 10 μ l des Durchbruchs (der beim Beladen der Säule eluierte Puffer) für eine SDS-PAGE eingesetzt. Jeweils 500 μ l der Wasch- und Elutionsfraktionen wurden für die SDS-PAGE zuvor mit Trichloressigsäure gefällt.

3.5.2 Entsalzen über Sephadex G-25M

Die mittels 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8, 200 mM NaCl, 100 mM Imidazol bzw. 150 mM Imidazol eluierten Fraktionen wurden vereinigt. 2,5 ml der vereinigten Fraktionen wurden auf eine zuvor mit 25 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8, 200 mM NaCl equilibrierte PD-10 Sephadex G-25M Säule (*Pharmacia*) aufgetragen und in einem Elutionsvolumen von 3,5 ml in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8 umgepuffert. Die so gewonnene Proteinfraction wurde für die Kofaktorbestimmung eingesetzt.

3.6 Hemmstoffstudien mit *Xanthophyllomyces dendrohous*

Um zu überprüfen, ob sich das Verhältnis der gebildeten Carotinoid-Endprodukte in den *X. dendrohous*-Mutanten PR1-104 und DQ1 unter Einfluss von Hemmstoffen verändert, wurden beide Pilzstämme in 50 ml Flüssigkulturen (YPD) mit bzw. ohne Hemmstoff kultiviert.

PR1-104 bildet im Gegensatz zum Astaxanthin bildenden Wildtyp hauptsächlich β -Carotin (4-fach durch CrtI_{Xd}PR1-104 desaturiert, 11 Doppelbindungen). Dagegen bildet DQ1 monozyklisches Torulin als Hauptcarotinoid (5-fach durch CrtI_{Xd}DQ1 desaturiert, 13 konjugierte Doppelbindungen).

Die Kultur von PR1-104 wurde mit 20 μ M 2-(4-methylphenylthio)-diäthylamin (MPDA, Hemmstoff der bakteriellen Lycopin-Zyklase CrtY) und das Medium von DQ1 mit 30 μ M Diphenylamin (DPA, Hemmstoff bakterieller Phytoen-Desaturasen) versetzt. Nach drei Tagen bei 18°C unter Schütteln wurden die Carotinoide extrahiert und über HPLC analysiert.

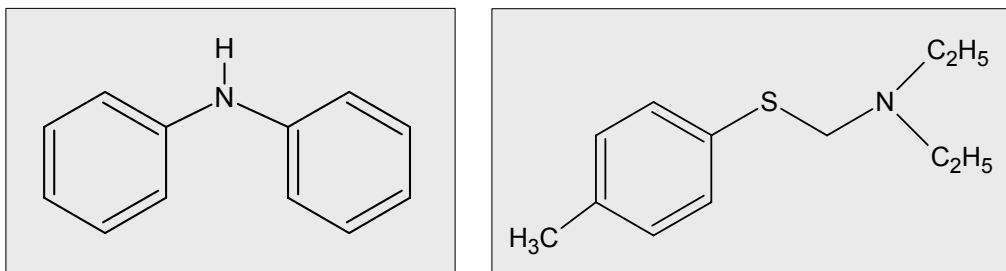


Abbildung II.2: Strukturformeln der verwendeten Hemmstoffe DPA und MPDA

3.7 Carotinoideextraktion

3.7.1 Extraktion der Carotinoide aus Komplementierungen

Aus den 50 ml Kulturen wurden je 10 ml auf Zentrifugengläser verteilt und sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment in ca. 500 μ l LB-Medium rückgelöst und nach Zugabe von 3 ml Aceton gevortext. Nach einer Inkubation von 15 min bei 55°C im Wasserbad wurden die Carotinoide gegen 5 ml 10% Ether in Petrolether ausgeschüttelt. Zur besseren Phasentrennung wurde der Ansatz mit 500 μ l H₂O versetzt und die Oberphase nach einer Zentrifugation bei 5000 Upm mit einer Pasteurpipette abgenommen. Die Carotinoide wurden unter

Stickstoffbegasung im Wärmebad (30°C) bis zur Trockne eingengt. Die extrahierten Carotinoide wurden bei -20°C im Dunkeln gelagert.

3.7.2 Extraktion der Carotinoide aus gefriergetrockneten *E. coli*-Zellen

0,35 g der gefriergetrockneten *E. coli*-Zellen wurden in einem Mörser pulverisiert und in einen Stahlbecher überführt. Nach Zugabe von 20 ml Methanol und 2 ml 60% KOH, wurden die Zellen 15 min bei 55°C inkubiert, in einen Scheidetrichter überführt und die Carotinoide gegen 30 ml 10% Ether in Petrolether ausgeschüttelt. Die Oberphase wurde in einem Rotationsverdampfer bei 250 mbar eingedampft und zur Lagerung in Aceton gelöst in ein Glasgefäß überführt und eingedampft. Die Carotinoide wurden bei -20°C gelagert.

3.7.3 Extraktion der Carotinoide aus *in vitro* Enzymtests

Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion und zur Extraktion der Carotinoide wurden die *in vitro* Enzymtests mit 3 ml Aceton versetzt und gevortext. Nach einer Inkubation von 15 min bei 55°C wurden 5 ml 10% Ether in Petrolether zugegeben. Die Probe wurde gevortext und zur besseren Phasentrennung bei 5000 Upm zentrifugiert. Die Oberphase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und die Carotinoide unter Stickstoffbegasung im Wärmebad bis zur Trockne eingengt. Die extrahierten Carotinoide wurden bei -20°C im Dunkeln gelagert.

3.7.4 Extraktion der Carotinoide aus *X. dendrohus*

10 - 20 mg lyophilisierten Zellmaterials wurden gemörsert, in 3 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und für 15 min bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlung wurden die Carotinoide in einem Scheidetrichter gegen 3 ml Ether ausgeschüttelt. Der Scheidetrichter wurde für 1 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml H₂O wurde erneut geschüttelt und die untere Phase abgelassen. Nach Zugabe von 5 ml Aceton und erneutem Schütteln wurden weitere 5 ml 10% Ether in Petrolether zugegeben. Zur besseren Phasentrennung wurden 8 - 10 ml H₂O hinzugefügt. Nach Schütteln wurde die untere Phase entfernt und die verbliebene Oberphase noch einmal mit 10 - 20 ml H₂O gewaschen. Die carotinoidhaltige Oberphase wurde unter Stickstoffbegasung eingedampft. Die Carotinoide wurden bei -20°C im Dunkeln gelagert.

3.8 Mengenbestimmung von Carotinoiden (Davies, 1976)

Zur Mengenbestimmung wurde die Carotinoid-Probe mit 1 ml Methanol versetzt, die Carotinoide vollständig gelöst und anschließend 10 µl entnommen und mit 990 µl Methanol in einer Quarzküvette vermischt. Die Extinktion wurde gegen eine Nullprobe (Methanol) in einem Zweistrahl Photometer bei einer Wellenlänge bestimmt, die dem Absorptionsmaximum des zu bestimmenden Carotinoids entsprach. Die Carotinoidmenge wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$m[\text{g}] = \frac{\Delta E \times V \times F_v}{E_{1\% \text{ cm}}^{1\%} \times 100}$$

- m: Carotinoidmasse in Gramm
 ΔE : gemessene Extinktion
 V: Volumen der Carotinoidlösung in ml
 F_v : Verdünnungsfaktor
 $E_{1\% \text{ cm}}^{1\%}$: Extinktionskoeffizient

4 Carotinoidanalytik – HPLC

Eine in Aceton gelöste Carotinoidprobe wurde mit einer 50 µl Kloehn Spritze in ein vor der Säule angebrachtes Rheodyne Injektionsventil gespritzt. Das Laufmittel wurde durch einen Degaser (ERC Degaser 3315) entgast. Dahinter wurde eine HPLC-Pumpe (ERC HPLC-Pump 64) geschaltet. Ein Gemisch aus Acetonitril/Methanol/Isopropanol 85:10:5 (v:v:v) wurde als Laufmittel verwendet. Als stationäre Phase diente eine Nucleosil C₁₈, 3 µm HPLC-Säule, welche an einen Diode Array Detektor (Kontron, DAD 440) angeschlossen war. Von diesem wurden die HPLC-Elutionsdiagramme als Spannungswerte ausgegeben und über eine Digitalisierungskarte auf einen Personal Computer übertragen. Mit dem Programm *Ramona* (Version 11.5, © Nuclear Interface GmbH, Münster) wurden die HPLC-Elutionsprofile aufgezeichnet. Die Spektren der Elutionspeaks wurden von dem Diode Array Detektor gespeichert und nach Beendigung der Trennung über ein seriell-parallel Interface Kabel (PE 2024) und die Software *Waters 994 Spektrum*

(Version 1.61, Universität Konstanz) auf einen PC übertragen und gespeichert. Anhand der Retentionszeiten und der Absorptionsspektren konnten die Carotinoide unter Verwendung von Standards identifiziert werden. Die folgenden Carotinoide wurden als Standard verwendet

3,4,3'4'-Tetrahydrolycopin aus DH5 α [pACcrtEBI_{Eu}]

Lycopin aus DH5 α [pACcrtEBI_{Eu}]

Neurosporin aus DH5 α [pACcrtEBI_{Rc}]

ζ -Carotin DH5 α [pACcrtEB_{Eu}crtP]

Phytoen DH5 α [pACcrtEB_{Eu}]

β -Carotin DH5 α [pACcrtEBI_{Eu}pRKcrtY_{Eu}]

β -Zeacarotin DH5 α [pACcrtEBI_{Rc}pRKcrtY_{Eu}]

Torulin DH5 α [pACcrtEB_{Eu}a1/a2_{Nc}]

4.1 Eichung der C18-HPLC

Zur Eichung der HPLC wurde jeweils 1 μ g des Carotinoidstandards über HPLC aufgetrennt. Die Elutionsbanden der Carotinoide im Chromatogramm wurden integriert. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

In Tabelle II.10 sind die verschiedenen Carotinoide mit den jeweiligen Flächeneinheiten pro μ g aufgelistet.

Tabelle II.10: Eichung des HPLC-Systems

Carotinoid	Flächeneinheiten pro μ g Carotinoid (F_C)	Wellenlänge [nm]
Lycopin	247925	470
Neurosporin	271117	470
ζ -Carotin	260416	400
Phytofluen	206830	350
Phytoen	140185	285

Für 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin und Phytofluen erfolgte eine indirekte Bestimmung der Flächeneinheiten pro μg Carotinoid. Dabei wurde für 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin in Annäherung der Wert von Lycopin verwendet. Für Phytofluen wurde der Wert von Phytoen mit dem Extinktionskoeffizienten von Phytoen multipliziert und durch den Extinktionswert von Phytofluen dividiert.

5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli *et al.* (1970) durchgeführt.

5.1 Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

Für die Trennung des Proteingemisches wurden 12,5% Trenngele verwendet.

30 ml Trenngel (12,5% Acrylamidgel):

- Acrylamid 30% (w/v) 12,5 ml
- Bisacrylamid 1% (w/v) 3,1 ml
- 1,5M Tris-HCl pH 8,7 7,5 ml
- H₂O (bidest.) 6,5 ml
- APS 50% (w/v) 100 μl
- SDS-Lösung 10% (w/v) 300 μl
- TEMED 10 μl

5 ml Sammelgel:

- Acrylamid 30% (w/v) 0,835 ml
- Bisacrylamid 1% (w/v) 0,065 ml
- 1M Tris-HCl pH 6,8 0,625 ml
- H₂O (bidest.) 2,8 ml
- APS 50% (w/v) 25 μl
- SDS-Lösung 10% (w/v) 50 μl
- TEMED 2,5 μl

5.2 Vorbereitung der Probe für die SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurden je 10 µl von Homogenat, Überstand und Membranfraktion mit 30 µl SDS-Probenpuffer gemischt.

Die unterschiedlichen Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden vor der Trennung über eine SDS-PAGE durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) konzentriert (Serrano, 1988). Hierfür wurden je 500 µl der Wasch- und Elutionsfraktionen mit 50 µl 60% TCA versetzt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben für 20 min bei -20°C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden sedimentiert, 2x mit H₂O gewaschen und in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Alle Proben für die SDS-PAGE wurden zum Denaturieren der Proteine 10 min im Wasserbad gekocht und anschließend mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen des Sammelgels gegeben.

Als Molmassenstandard dienen 15 µl des SDS-7 Markers (*Sigma*) mit den Molmassen 14 kDa, 20 kDa, 24 kDa, 29 kDa, 36 kDa, 45 kDa und 66 kDa.

Die Gele wurden bei Raumtemperatur über Nacht mit 55 V konstanter Spannung, oder 3 – 4 h mit 220 V konstanter Spannung gefahren.

SDS-Probenpuffer:

- Tris-HCl pH 6,8 4 ml
- DTT 1 g
- 10% SDS 20 ml
- Glycerin 10 ml
- Bromphenolblau 0,05 g

Der Ansatz wurde mit H₂O auf 50 ml aufgefüllt.

SDS-Laufpuffer (10-fache Stammlösung):

- Glycin 144 g
- Tris Base 30 g
- SDS 10 g

Der Ansatz wurde mit H₂O auf 1 l aufgefüllt.

5.3 Färbung der Polyacrylamid-Gele

Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie brilliant Blue R250 (Roth). Das Gel wurde ca. 20 min in der Färbelösung gefärbt und anschließend für ca. 20 min in Entfärbelösung inkubiert (Garfin, 1990).

Färbelösung:

- Coomassie Blue R 250 (Roth) 2,5 g
- MeOH 50 ml
- Essigsäure (100%) 100 ml
- H₂O (entionisiert) 450 ml

Entfärbelösung:

- MeOH 450 ml
- Essigsäure (100%) 100 ml
- H₂O (entionisiert) 450 ml

Glycerinlösung:

- MeOH 450 ml
- Glycerin 25 ml
- H₂O (entionisiert) 450 ml

5.4 Dokumentation und Auswertung der SDS-Gele

Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden mit einer Digitalkamera fotografiert und der prozentuale Anteil der Phytoen-Desaturase - gemessen am Gesamtprotein - mittels einer Densitometrie-Software (*Gelmess*, Universität Konstanz) berechnet.

5.5 Bestimmung des Proteingehalts

Zur Bestimmung der Proteinmenge in den verwendeten Homogenaten, Überständen bzw. Membranfraktionen sowie den Fraktionen der Affinitätschromatografie wurde der Protein Microassay von *Bio-Rad* mit BSA von 1 - 25 µg/µl als Eichkurve verwendet.

6 Verwendete Software

6.1 Software zur DNA- und Protein Sequenzauswertung

Sequenzvergleiche und Sequenzsuchen wurden in Datenbanken mit dem Programm *Blast* 2.0 (Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt. Dabei wurden *blastx*, *blastn* und *blastp* mit den voreingestellten Parametern verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Für die Sequenzsuche nach CrtI-homologen Aminosäuresequenzen zur Erstellung von Aminosäurealignments wurde eine tBLASTn Suche in der Datenbank des PEDANT-Protein Extraction Discription and Analysis Tool durchgeführt (<http://pedant.gsf.de/index.html>).

Aminosäuresequenzvergleiche (Alignments) wurden mit dem Programm *ClustalX* (Thompson *et al.*, 1997) erstellt. Die Alignments konnten mit Hilfe des Programmes *Boxshade* v3.2 (Kay Hofmann, Bioinformatics group, ISREC, Lausanne, Schweiz und Michael D. Baron, Institute for Animal Health, Pirbright, England) bearbeitet werden. Ferner wurden Phylogenetische Stammbäume der Proteinsequenzen mittels Treeview 1.6.5 erstellt (<http://www.taxonomy.zoology.ac.uk/rod/rod.html>).

Zur Vorhersage von Membranbereichen von Polypeptiden wurde die Software „TopPred“ verwendet (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>); (von Heijne, 1992; Claros & von Heijne, 1994).

Zur Vorhersage von Sekundärstrukturen von Polypeptiden wurde die Software „Predator“ verwendet (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/predator-simple.html>) (Frishman & Argos, 1995; Frishman & Argos, 1996; Frishman & Argos, 1997).

6.2 HPLC-Analytik-Software

Raytest RAMONA 11.2, 27.02.1990 Radio-Chromatographie System, nuclear interface GmbH, Münster. Für die Darstellung und Auswertung von HPLC-Elutionsprofilen.

WATERS 994 Spektrum 1.7, 04.08.1997, Universität Konstanz, Abteilung Elektronik, H. Fink. Übertragung und Speicherung von über einen Diode Array Detektor aufgezeichneten Spektren auf einen Personal Computer.

6.3 Weitere verwendete Software

Gelmess 1.2, 08.01.1996, Universität Konstanz, Abteilung Elektronik, H. Fink.
Densitometrie-Software zum Ausmessen der prozentualen Verteilung von Polypeptidbanden eines SDS-Polyacrylamidgels.

Corel Draw! 5.0/10.0 - Editierung der HPLC-Elutionsprofile und Spektren.

Adobe Photoshop CS 8.0 - Gestaltung der Abbildungen.

III Ergebnisse

1 Klonierung und funktionelle Expression der Phytoen-Desaturase aus *Rubrivivax gelatinosus*

Das für die Phytoen-Desaturase aus *Rubrivivax gelatinosus* kodierende Gen *crtl* wurde von Harada *et al.* (2001) aus einem Cosmidklon amplifiziert, in einen Expressionsvektor kloniert und die Nukleotidsequenz veröffentlicht (Acc:AB034704). Der Cosmidklon enthielt das Photosynthese-Gencluster aus *Rvi. gelatinosus* IL144. Die Funktion des Expressionsproduktes von *crtl*_{Rg} wurde *in vivo* mittels einer Phytoen bildenden *E. coli*-Transformante nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Phytoen-Desaturase Crtl_{Rg} sowohl Lycopin, als auch Neurosporin in einem Verhältnis von etwa 10:90 synthetisiert.

Im Jahre 2003 wurde von Picaud *et al.* die Nukleotidsequenz von *crtl* aus *Rvi. gelatinosus* S1 veröffentlicht (Acc:AAO93135). Die Sequenz besaß 34 abweichende Nukleotide gegenüber der von Harada *et al.* (2001) veröffentlichten Sequenz (97% Übereinstimmung). 4 dieser abweichenden Nukleotide bewirkten je einen Aminosäureaustausch innerhalb des resultierenden Enzyms. Darüber hinaus konnten Picaud *et al.* (2003) ein ATG Triplett, 6 Nukleotide in 3'-5' Richtung („stromaufwärts“) von dem von Harada *et al.* (2001) postulierten Startcodon (ATG) ermitteln. Dieses ATG wurde mit amplifiziert und als Startcodon definiert. Somit war das aus dem klonierten Leseraster resultierende Enzym N-terminal 2 Aminosäuren länger, als das Expressionsprodukt des von Harada *et al.* (2001) klonierten Gens. Die DNA-Sequenzen sowohl des von Harada *et al.* (2001), als auch des von Picaud *et al.* (2003) klonierten *crtl*_{Rg} wurden in der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/> veröffentlicht.

1.1 Klonierung von *crtl*_{Rg} in pMON38201

In dieser Arbeit stand der *Rvi. gelatinosus* Bakterienstamm S1 zur Verfügung (Uffen, 1976), daher wurde die von Picaud *et al.* (2003) veröffentlichte Nukleotidsequenz von *crtl*_{Rg} für die Konstruktion der PCR-Primer zu Grunde gelegt.

Mittels PCR konnte ein etwa 1550 bp großes DNA-Fragment aus der genomischen DNA von *Rvi. gelatinosus* amplifiziert und anschließend in einen *XcmI* geschnittenen pMON38201 kloniert werden. Eine Sequenzierung zeigte, dass das amplifizierte Fragment gegenüber der von Picaud *et al.* (2003) veröffentlichten Nukleotidsequenz von *crtl*_{Rg} bis auf zwei Nukleotide identisch war (99% Übereinstimmung). Die abweichenden Basen bewirkten keine Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins. Das resultierende Polypeptid besaß 513 Aminosäuren. Die Sequenzierung zeigte darüberhinaus, dass das Insert in einer der vektorialen Leserichtung entgegengesetzten Orientierung in das Plasmid integriert worden war.

In den folgenden Abbildungen ist die Nukleotidsequenz des aus *Rvi. gelatinosus* S1 amplifizierten und in pMON38201 klonierten Leserasters (Abbildung III.1) sowie ein Aminosäuresequenz-Alignment des aus dem amplifizierten Leseraster hervorgehenden Proteins und den veröffentlichten Sequenzen von *Crtl*_{Rg} der Bakterienstämme IL144 (Acc:AB034704) und S1 (Acc:AAO93135) gezeigt (Abbildung III.2).

```

ATGCTGATGAAGTCGGATGCCGACGCCCGCGCGCGGCCGAAAGCAGGATCCCCAGGCGCCGGTGGCGCTGGTCTG
GGAAGCGGGTTCGGCGGCATGCCGCTGCGGTGCGCTTGGCCGCCAAGGGCTACCGCGTCACGGTTCTCGAGAAGCTC
GACGCCCCCGCGCGGCCGGGCTTACGTGCACCGCCGCGAAGGCCACGTCTTCGACGCCGGGCCACCATCGTCCACCGTG
CCCTATCTCTTCGACGAGCTGTGGGCGCTGGCCGGGCGCAAGTTCAGCGACGACATCGAACTGAAGTCGCTGGACCCG
TTCTACCGCATCCGTTTCGACGACGGCGACCATTTGACTACAGCGGCGACCCGGCGCGCATGCGTGCCGAGGTGCGG
CGCATCAgCCCGTCGGACGCGCAAGGTTTCGAGCGCTTCATGCGCGAGGCCGACCAAGTGCTACGAGCTGGGCTTCGCG
ACGCTGGGCGACAAGGCCCTTCGACACCGTCGGCGACCTGATCAAGGCGGCACCGCTGATCATCaGGCTGCGCGGCTGG
CGCAGCCTGCACCAGATGGTGTCCAGCCACCTGAAGCACCCGAAGCTGCGCATCGCGATGAGCCTGCAGTCGCTGCTC
ATCGGCGGCAACCCGTTCTCGGTGACAAGCATGTACGCGCTCGTCAACGCGCTGGAGCGCCAATGGGGCGTGCACCTGG
GCGATGGGCGGAACCGGCGAGCTGATCCGCGGTCTGGTTCGACGCTCTTCGAGGGCATGGGCGGCACGATGCGGCTGAAG
GCCGAGGTCAAGCGCATCGAGGTCGACAACGGCGTCCGACCCGGCGTCACGCTGGCCGACGGCGAGCGCCTCCCGGCT
GACATCGTCGTCTGCAACGGCGACACTGGCTATCTGTACAAGAACCCTCGTCGACGCACGCTGGCGCAAGCACTGGACC
GATGCCCCGATCGAGCGCGGCACTACTCCATGGGCCTGTTCTGCTGGTACTTCGGCACCGACCCCGCTACGAGGAC
GTGCCGCACCATGATGGTGTGGGCCCGCGCTACCGCGAAGTCTGGACGACATCTTCGCAAGAAGAAGCTGGCC
GGGACTTCAGCATCTACCTGCACCGCCCGACCGCCACCGACCCGTCGATGGCGCCGGCCGGCTGCGACACCTTCTAC
GCGCTGATGCCGGTGGCCGACCTGGGCGAGCGCACCGACTGGACGACGAGCCGAGCCCTATCGCCAGTCGGTCCAG
GAGGCGCTGGAGCGCACCGTGTGCCCCGGCCTGGGCCAGCACCTGCGCGTGTGCTTCTGCACCACCGCGCTGGACTTC
CAGCACCGCCTGCTGTGCTACAAGGGCGCCGGCTTCGGCCTGGAACCGTTGCTGCTGCAGAGCGCCTACTTCCGCCCG
CACAACCGCAGCGAGGACGTGAAGAACCCTGTTTCATGGTTCGGCGCCAGCACGCACCCCGCGCGCGTGCAGGGCGCTC
ATCATGTCCGCCAAGGCGCTGGAGTCGGTGTGCCCCGACCCGGCGACGTTCCGCGGCTGA

```

Abbildung III.1 DNA-Sequenz des in dieser Arbeit amplifizierten *crtl*_{Rg}-Leserasters

						50
CrtIRg	ML MKSDAAAP	RAAGKQDPQA	PVALVVGSGF	GGMAAAVRLA	AKGYRVTVLE	
AAO93135	ML MKSDAAAP	RAAGKQDPQA	PVALVVGSGF	GGMAAAVRLA	AKGYRVTVLE	
BAA94063	<u>..</u> MKSDAAAP	RAAGKQDPQA	PVALVVGSGF	GGMAAAVRLA	AKGYRVTVLE	
						100
CrtIRg	KLDAPGGRAY	VHRREGHVFD	AGPTIVTVPY	LFDELWALAG	RKFSDDIELK	
AAO93135	KLDAPGGRAY	VHRREGHVFD	AGPTIVTVPY	LFDELWALAG	RKFSDDIELK	
BAA94063	KLDAPGGRAY	VHRREGHVFD	AGPTIVTVPY	LFDELWALAG	RKFSDDIELK	
						150
CrtIRg	SLDPFYRIRF	DDGDHFDYSG	DPARMRAEVR	RISPSDAEGF	ERFMREADQC	
AAO93135	SLDPFYRIRF	DDGDHFDYSG	DPARMRAEVR	RISPSDAEGF	ERFMREADQC	
BAA94063	SLDPFYRIRF	DDGDHFDYSG	DPARMRAEVR	RISPSDAEGF	ERFMREADQC	
						200
CrtIRg	YELGFRTLGD	KAFDVTGDLI	KAAPLI IR LR	GWRSLHQMVS	SHLKHPKLRI	
AAO93135	YELGFRTLGD	KAFDVTGDLI	KAAPLI IR LR	GWRSLHQMVS	SHLKHPKLRI	
BAA94063	YELGFRTLGD	KAFDVTGDLI	KAAPLI V KLR	GWRSLHQMVS	SHLKHPKLRI	
						250
CrtIRg	AMSLQSLIG	GNPFSVTSMY	ALVNALERQW	GVHWAMGGTG	ELIRGLVDVF	
AAO93135	AMSLQSLIG	GNPFSVTSMY	ALVNALERQW	GVHWAMGGTG	ELIRGLVDVF	
BAA94063	AMSLQSLIG	GNPFSVTSMY	ALVNALERQW	GVHWAMGGTG	ELIRGLVDVF	
						300
CrtIRg	EGMGGMRLK	AEVKRIEVDN	GVATGVTLAD	GERL P ADIVV	CNGDTGYLYK	
AAO93135	EGMGGMRLK	AEVKRIEVDN	GVATGVTLAD	GERL P ADIVV	CNGDTGYLYK	
BAA94063	EGMGGMRLK	AEVKRIEVDN	GVATGVTLAD	GERI P ADIVV	CNGDTGYLYK	
						350
CrtIRg	NLVDARWRKH	WTDARIERGH	YSMGLFVWYF	GTDRRYEDVP	HHMMVLGPRY	
AAO93135	NLVDARWRKH	WTDARIERGH	YSMGLFVWYF	GTDRRYEDVP	HHMMVLGPRY	
BAA94063	NLVDARWRKH	WTDARIERGH	YSMGLFVWYF	GTDRRYEDVP	HHMMVLGPRY	
						400
CrtIRg	RELLDDIFRK	KKL A GDFSII	LHRPTATDPS	MAPAGCDTFY	ALMPVPHLGS	
AAO93135	RELLDDIFRK	KKL A GDFSII	LHRPTATDPS	MAPAGCDTFY	ALMPVPHLGS	
BAA94063	RELLDDIFRK	KKL A SDFSII	LHRPTATDPS	MAPAGCDTFY	ALMPVPHLGS	
						450
CrtIRg	GTDWTTQAEF	YRQSVQEALE	RTVLPGLGQH	LRVSFCTTPL	DFQHRLLSYK	
AAO93135	GTDWTTQAEF	YRQSVQEALE	RTVLPGLGQH	LRVSFCTTPL	DFQHRLLSYK	
BAA94063	GTDWTTQAEF	YRQSVQEALE	RTVLPGLGQH	LRVSFCTTPL	DFQHRLLSYK	
						500
CrtIRg	GAGFGLEPLL	LQSAYFRPHN	RSEDVKNLFM	VGASTHPGAG	VPGVIMSAKA	
AAO93135	GAGFGLEPLL	LQSAYFRPHN	RSEDVKNLFM	VGASTHPGAG	VPGVIMSAKA	
BAA94063	GAGFGLEPLL	LQSAYFRPHN	RSEDVKNLFM	VGASTHPGAG	VPGVIMSAKA	
						513
CrtIRg	LESVLPDPAT	FRR				
AAO93135	LESVLPDPAT	FRR				
BAA94063	LESVLPDPAT	FRR				

Abbildung III.2 Aminosäuresequenz-Alignment des aus dem in dieser Arbeit amplifizierten Leseraster hervorgehenden Proteins („CrtIRg“) sowie von CrtIRg aus dem Bakterienstamm IL144 (Harada *et al.*, Acc:BAA94063) und CrtIRg aus dem Bakterienstamm S1 (Picaud *et al.*, Acc:AAO93135); schwarz hinterlegt sind die Aminosäuren von CrtIRg aus S1, die gegenüber CrtIRg aus IL144 abweichen.

Aufgrund der großen Übereinstimmung (99%) zwischen dem klonierten Fragment und der von Picaud *et al.* (2003) veröffentlichten Sequenz des für die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* S1 kodierenden Gens, wird das klonierte Fragment in der Folge als *crtIRg* und das daraus hervorgehende Expressionsprodukt als CrtIRg bezeichnet.

1.2 Klonierung von *crtl*_{RG} in pUC8-2

Um eine Expression von *crtl*_{RG} zu ermöglichen, wurde das Leseraster in einen pUC8-2 Expressionsvektor kloniert. Dabei wurde das Gen mittels *EcoRI/HindIII* aus pMON*crtl*_{RG} herausgeschnitten und in einen ebenso *EcoRI/HindIII* geschnittenen pUC8-2 ligiert. Eine Sequenzierung zeigte, dass *crtl*_{RG} „in frame“ und in vektorieller Leserichtung integriert worden war. Das Leseraster wurde durch die Klonierung in pUC8-2 um 57 bp in 3'-5' Richtung verlängert. Das resultierende Polypeptid besaß dadurch N-terminal 19 zusätzliche Aminosäuren (Met, Thr, Met, Ile, Thr, Asn, Cys, Glu, Phe, Leu, Gln, Pro, Leu, Ile, Gly, Arg, Ala, Arg, Arg...Crtl_{RG}).

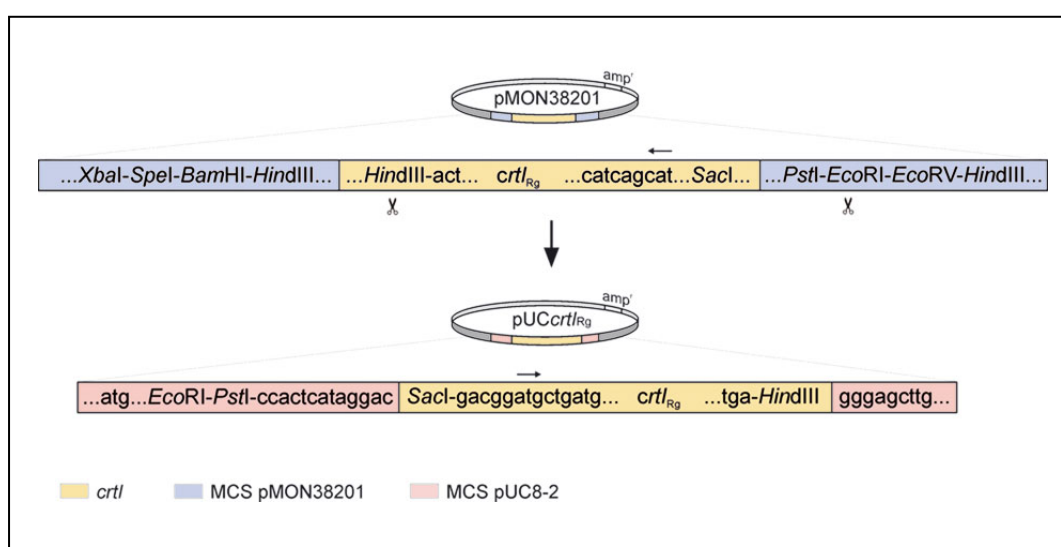


Abbildung III.3 Klonierung von *crtl*_{RG} aus pMON38201 in pUC8-2

1.2.1 *In vivo* Funktionstest von pUC*crtl*_{RG}

Um die Funktionalität des Expressionsproduktes von *crtl*_{RG} zu überprüfen, wurde die Phytoen bildende *E. coli*-Transformante DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}] mit pUC*crtl*_{RG} und zur Kontrolle mit pUC8-2 transformiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C zeigten die LB-Agar Platten der mit pUC*crtl*_{RG} transformierten Zellen rote Bakterienkolonien, wohingegen die Kolonien der Kontrolle farblos blieben (Abbildung III.4). Die unterschiedlichen Kolonien wurden in Flüssigmedium kultiviert und die Expression von *crtl*_{RG} mit 20 μ M IPTG induziert. Die Carotinoide konnten extrahiert und mittels HPLC anhand ihrer Retentionszeiten sowie ihrer Absorptionsmaxima identifiziert werden. Die Detektion der Carotinoide erfolgte bei 470 nm (0 - 30 min) und bei 285 nm (30 - 40 min).

Der Extrakt aus DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pUC8-2] zeigte bei einer Retentionszeit von 33 min einen Elutionspeak mit den Absorptionsmaxima 266 nm, 286 nm und 300 nm, der als Phytoen (P) identifiziert werden konnte.

Der Carotinoidextrakt aus DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pUCcrtI_{Rg}] zeigte, dass Phytoen vollständig umgesetzt wurde. Ein Carotinoid mit einer Retentionszeit von 17 min und den Absorptionsmaxima 480 nm, 510 nm und 545 nm wurde anhand des Spektrums als 3,4,3'4'-Tetradehydrolycopin (T) identifiziert. Dieses Carotinoid ist vollständig desaturiert und besitzt 15 konjugierte Doppelbindungen. Zwei Elutionspeaks mit den Retentionszeiten 18,5 min bzw. 19,5 min wurden als Lycopin (L) mit den Absorptionsmaxima 445 nm, 472 nm sowie 505 nm und als ein Lycopin-cis-Isomer (L') mit Absorptionsmaxima von 345 nm, 362 nm (cis-Peak), 441 nm, 467 nm, 498 nm identifiziert. Bei einer Retentionszeit von 21 min konnte Neurosporin (N) mit Absorptionsmaxima von 417 nm, 442 nm und 470 nm identifiziert werden. Der Umsatz von Phytoen zu 3, 4 bzw. 6 mal desaturierten Carotinoiden zeigte, dass es sich bei dem aus der genomischen DNA von *Rvi. gelatinosus* amplifizierten und in pUC8-2 klonierten DNA-Fragment um das für die Phytoen-Desaturase CrtI_{Rg} kodierende Gen handelte und dass ein funktionell aktives Enzym exprimiert werden konnte.

Anders als in *Rvi. gelatinosus* bildete die Phytoen-Desaturase in *E. coli* nicht nur 10 - 20% Lycopin (der Spirilloxanthingehalt in anaerob kultivierten *Rvi. gelatinosus* liegt bei 10 - 20%), sondern mit 75% vom Gesamtumsatz deutlich mehr Lycopin. Mit 15% 3,4,3'4'-Tetradehydrolycopin (6-fach durch CrtI_{Rg} desaturiert, 15 konjugierte Doppelbindungen) konnte sogar ein vollständig desaturiertes Carotinoid detektiert werden, welches in Rhodospirillaceae bisher nicht nachgewiesen wurde. Neurosporin war mit einem Anteil von 10% im Carotinoidextrakt enthalten. Erwartet wurden allerdings etwa 90%, gemäß des in anaeroben Kulturen von *Rvi. gelatinosus* nachgewiesenen Spheroidin- bzw. OH-Spheroidin Gehaltes von bis zu 90%.

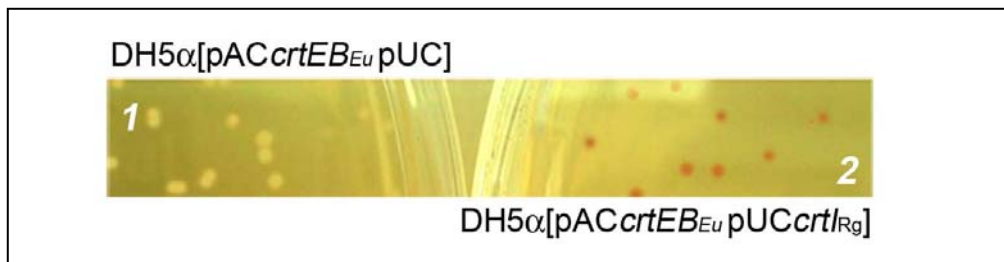


Abbildung III.4 Farbige Klone von 1) DH5α[pACcrtEB_{Eu}pUC8-2] (Kontrolle) und 2) DH5α[pACcrtEB_{Eu}pUCcrtI_{Rg}]

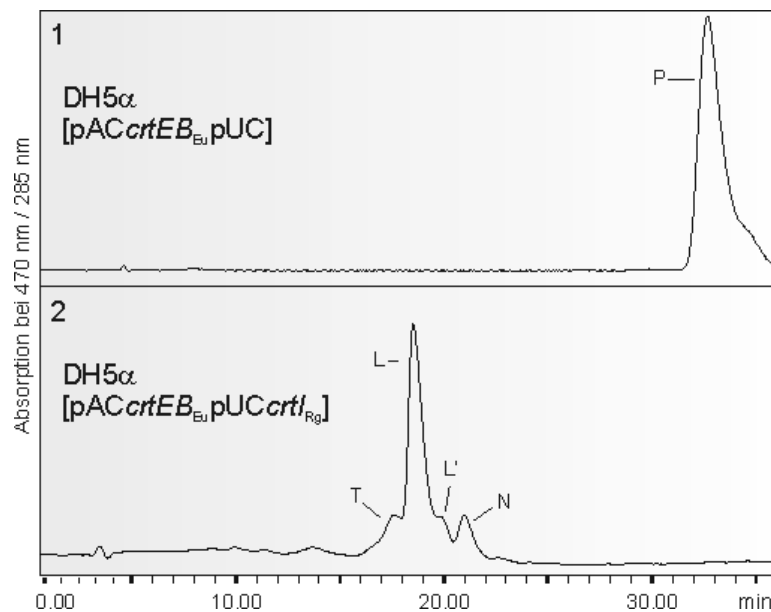


Abbildung III.5 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus funktionellen Komplementierungen 1) DH5α[pACcrtEB_{Eu}pUC8-2] (Kontrolle); 2) DH5α[pACcrtEB_{Eu}pUCcrtI_{Rg}]; Phytoen (P), 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin (T), Lycopin (L), Lycopin-cis-Isomer (L'), Neurosporin (N); die Detektion erfolgte bei 470 nm (0 - 30 min) sowie bei 285 nm (30 - 40 min)

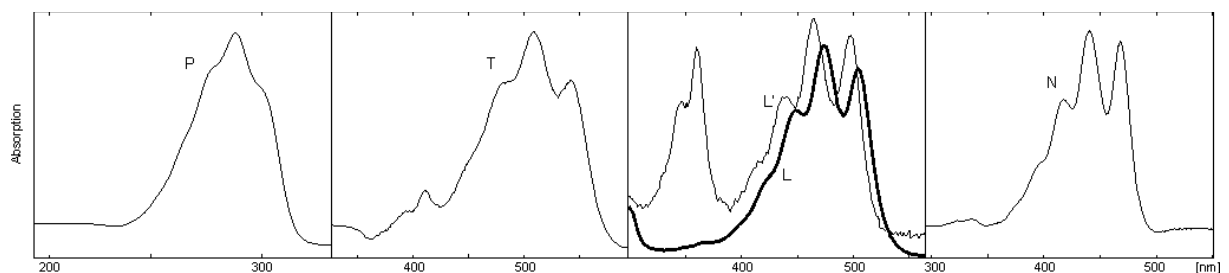


Abbildung III.6 Absorptionsspektren der mittels HPLC detektierten Carotinoide Phytoen (P), 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin (T), Lycopin (L), Lycopin-Isomer (L') und Neurosporin (N)

1.2.2 Heterologe Expression von *crtI_{Rg}* in DH5α[pUCcrtI_{Rg}] zur Proteingewinnung

Zur heterologen Proteinexpression wurden DH5α[pUCcrtI_{Rg}] und zur Kontrolle DH5α[pUC8-2] kultiviert. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 10 µl Homogenat (H), Überstand (Ü) und Membranfraktion (MF) aus einer 1:10 eingengten 50 ml

Übernachtskultur eingesetzt. Das SDS-Polyacrylamidgel zeigte im Homogenat von DH5 α [pUC $crtI_{Rg}$] ein gegenüber der Kontrolle (K) zusätzliches Polypeptid mit der molekularen Masse von ca. 57 kDa (Abbildung III.7). Diese Molmasse entsprach der über die Aminosäuresequenz errechneten molekularen Masse von CrtI $_{Rg}$. Der Anteil von CrtI $_{Rg}$ im Homogenat betrug 10% am Gesamtprotein.

Nach Zellaufschluss und Zentrifugation befand sich der größte Teil des gebildeten CrtI $_{Rg}$, mit 18% vom Gesamtprotein, in der Membranfraktion. Im Überstand wurde ein Anteil von nur 3% am Gesamtprotein bestimmt.

Sowohl die Veränderung der Konzentration, als auch des Zeitpunktes der IPTG-Zugabe bewirkte keine erkennbare Erhöhung der im Überstand lokalisierten und damit löslichen CrtI $_{Rg}$ -Menge. Ein *in vitro* Enzym Test mit Homogenat, Überstand sowie der Membranfraktion zeigte keinen Umsatz von Phytoen. CrtI $_{Rg}$ war inaktiv.

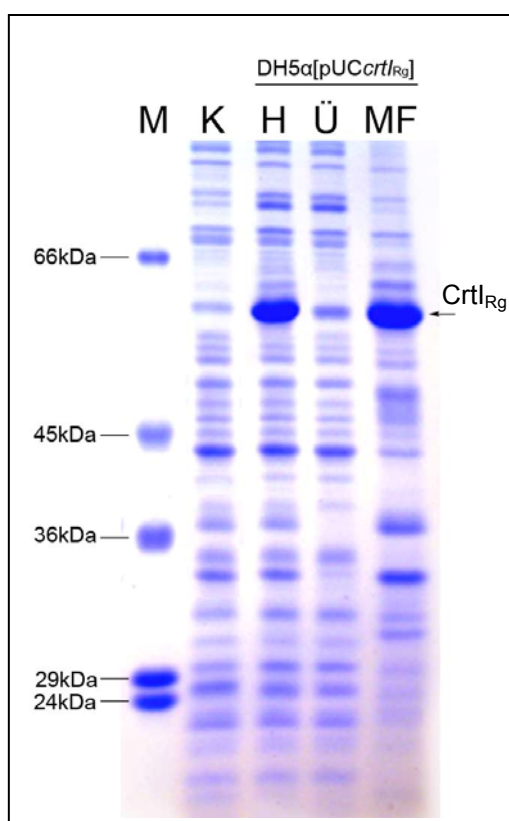


Abbildung III.7 SDS-PAGE, Auftrennung der Proteine aus Homogenat von DH5 α [pUC8-2] (Kontrolle K) sowie aus Homogenat (H), Überstand (Ü) und Membranfraktion (MF) von DH5 α [pUC $crtI_{Rg}$]; Molmassenstandard (M)

1.3 Klonierung von *crtl*_{RG} in pPQE32

Die in DH5 α [pUC*crtl*_{RG}] exprimierte Phytoen-Desaturase zeigte keine *in vitro* Aktivität und synthetisierte nach Komplementierung Phytoen bildender *E. coli*-Transformanten (DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}pUC*crtl*_{RG}]) mit 75% deutlich mehr Lycopin als die erwarteten 10 - 20%. Durch den hohen Gehalt an Lycopin waren die Kolonien rot gefärbt. Da mittels einer Mutagenisierung die Aktivität von *Crtl*_{RG} verändert, vor allem aber auch gesteigert werden sollte, wurde zunächst versucht, ein *in vivo* System zu etablieren, welches wie erwartet in gelb-orange-gefärbten Kolonien resultierte. Nur unter diesen Bedingungen ist - im Anschluss an die Mutagenisierung - ein Screening nach auffällig rot gefärbten Mutanten möglich.

Eine erhöhte Anzahl von Desaturierungen in Komplementierten *E. coli* ist oftmals auf eine starke Überexpression der Phytoen-Desaturase zurückzuführen. Unveröffentlichten Daten zu Folge ist die Phytoen-Desaturase aus *Staphylococcus aureus* bei starker Überexpression in Diapophytoen bildenden *E. coli*-Transformanten in der Lage, anders als unter natürlichen Bedingungen, einen 4. Desaturierungsschritt zu katalysieren und Diapolycopin zu bilden. Normalerweise wird nur Diaponeurosporin (3-fach desaturiert) synthetisiert. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für die Phytoen-Desaturase aus und *E. uredo* beschrieben (Linden *et al.*, 1991; Fraser *et al.*, 1992). Möglicherweise war die durch pUC*crtl*_{RG} hervorgerufene Überexpression von *Crtl*_{RG} für die erhöhte Lycopinbildung verantwortlich. Durch die Verwendung von pPQE32 wurde versucht, eine schwächere Expression von *crtl*_{RG} zu erreichen, um dadurch 1.) die Bildung eines enzymatisch aktiven und löslichen Proteins für *in vitro* Enzymtests und 2.) nach Komplementierung Phytoen bildender *E. coli*-Transformanten ein Umsatz von Phytoen zu 10 - 20% Lycopin und 80 - 90% Neurosporin zu erreichen. Dazu wurde *crtl*_{RG} mittels *SacI/HindIII* aus pMON*crtl*_{RG} herausgeschnitten und in einen *SacI/HindIII* geschnittenen pPQE32 ligiert. Bei pPQE handelt es sich um eine Modifizierung des Expressionsvektors pQE (*Qiagen*), wobei das Chloramphenicol-Resistenzgen (*cm^r*) aus pQE deletiert wurde. Damit wurde eine Cotransformation mit pACYC-Plasmiden zwecks Komplementierung von Carotinoidbiosynthesewegen in *E. coli* möglich (Krubasik, 2000). pPQE besitzt einen His-Tag vor der MCS, der es ermöglichen sollte, durch die Bildung eines rekombinanten Proteins, das Enzym zu reinigen und anzureichern. Daneben sollte durch Zugabe von IPTG eine kontrollierte mäßige

Expression erzielt werden, um $Crtl_{Rg}$ löslich und funktionell aktiv im Überstand zu erhalten und dadurch eine enzymatische Charakterisierung *in vitro* zu ermöglichen.

Eine Sequenzierung zeigte, dass sich $crtl_{Rg}$ „in frame“ und in vektorieller Leserichtung in pPQE32 befand. Das Leseraster wurde durch die Klonierung um 54 Basen in 3'-5' Richtung verlängert. Das resultierende Polypeptid besaß dadurch N-terminal 18 zusätzliche Aminosäuren, welche den aus 6 Aminosäuren bestehenden His-Tag beinhalteten (Met, Arg, Gly, Ser, His, His, His, His, His, His, Gly, Ile, Arg, Met, Arg, Ala, Arg, Arg ... $Crtl_{Rg}$).

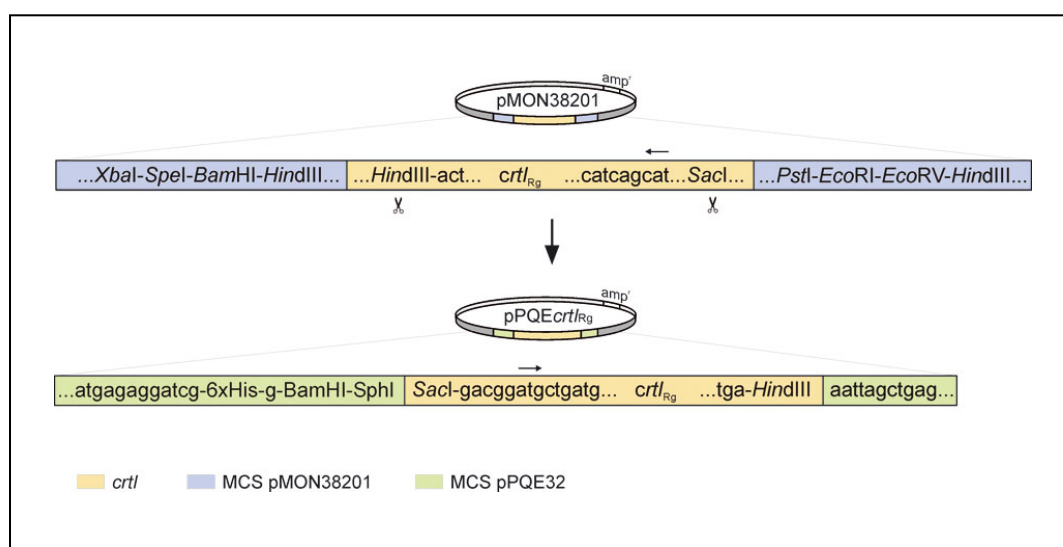


Abbildung III.8 Klonierung von $crtl_{Rg}$ aus pMON38201 in pPQE32

1.3.1 *In vivo* Funktionstest von pPQE $crtl_{Rg}$

Nach Komplementierung Phytoen bildender *E. coli*-Transformanten mit pPQE $crtl_{Rg}$ und Inkubation über Nacht hatten sich rote Kolonien gebildet.

Der Carotinoideextrakt aus DH5 α [pAC $crtEB_{Eu}$ pPQE $crtl_{Rg}$] bestand zu 49% aus Lycopin (Retentionszeit 19,5 min; Absorptionsmaxima 445 nm, 472 nm sowie 505 nm). Weiterhin konnten 3% 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin (Retentionszeit 17 min; Absorptionsmaxima 480 nm, 510 nm und 545 nm) und 20% Neurosporin (Retentionszeit 21 min; Absorptionsmaxima 417 nm, 442 nm und 470 nm) detektiert werden. Ein Teil des Phytoens (28%) wurde nicht umgesetzt und eluierte bei einer Retentionszeit von 33 min (Absorptionsmaxima 266 nm, 286 nm und 300 nm). Das Lycopin/Neurosporin-Verhältnis im Carotinoideextrakt lag bei 60:40.

Der Carotinoidextrakt aus der Kultur von DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pPQE32] (Kontrolle) enthielt ausschließlich Phytoen. Die Elutionsprofile sind in Abbildung III.9 dargestellt.

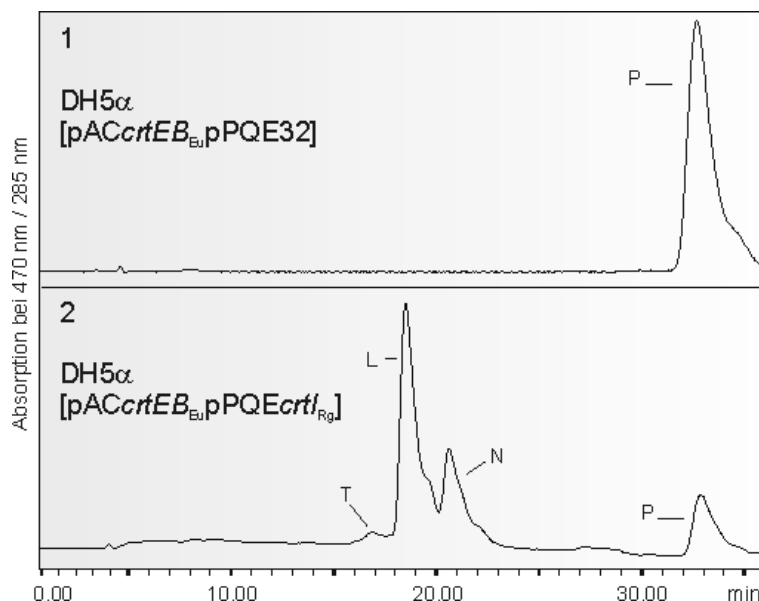


Abbildung III.9 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus funktionellen Komplementierungen 1) DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pQE32] (Kontrolle); 2) DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pQE $crtI_{Rg}$]; Phytoen (P), 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin (T), Lycopin (L), Neurosporin (N); die Detektion erfolgte bei 470 nm (0 - 30 min) sowie bei 285 nm (30 - 40 min)

1.3.2 Heterologe Expression von $crtI_{Rg}$ in DH5 α [pPQE $crtI_{Rg}$] zur Proteingewinnung

Die Homogenate von DH5 α [pPQE $crtI_{Rg}$] zeigten ebenso wie die Homogenate von DH5 α [pUC $crtI_{Rg}$] eine sehr starke Überexpression der Phytoen-Desaturase (57 kDa).

Nach Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation befand sich die Phytoen-Desaturase fast ausschließlich in der Membranfraktion (Abbildung III.10). Der Anteil des Enzyms am Gesamtprotein betrug im Homogenat 18%, in der Membranfraktion 50% und im Überstand 3%. Durch die Veränderung der in das Kulturmedium gegebenen IPTG-Menge sowie des Zeitpunktes der IPTG-Zugabe konnte keine Erhöhung der Expression eines löslichen Proteins erzielt werden.

Die durchgeführten *in vitro* Enzymtests mit Homogenat, Überstand sowie Membranfraktion zeigten keinen Umsatz von Phytoen und enthielten kein enzymatisch aktives Enzym.

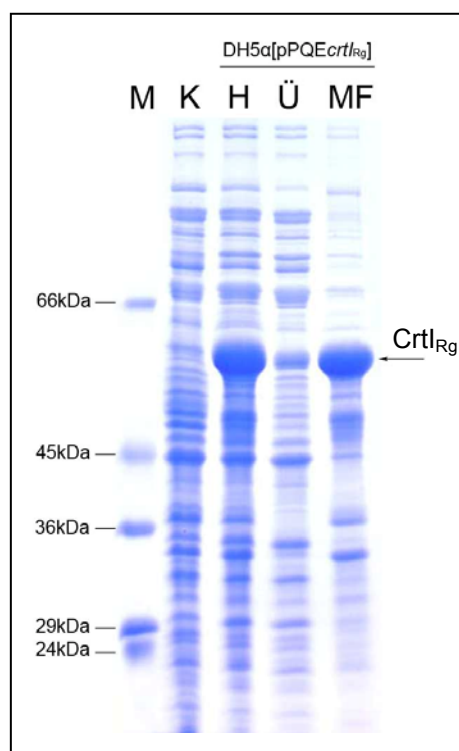


Abbildung III.10 SDS-PAGE, Auftrennung der Proteine aus Homogenat von DH5α[pPQE32] (K) sowie von Homogenat (H), Überstand (Ü) und Membranfraktion (MF) aus DH5α[pPQE crtI_{Rg}]; Molmassenstandard (M).

1.4 Klonierung von *crtI_{Rg}* in pTrc99a

Das Plasmid pTrc99a verfügt im Gegensatz zu pUC bzw. pPQE über ein vektorielles *lacZ* Repressorgen. Durch die Verwendung von pTrc99a sollte die Expression von *crtI_{Rg}* verringert werden. Durch die schwächere Expression sollte *in vivo* (Komplementierung Phytoen bildender *E. coli*-Transformanten) ein Lycopin/ Neurosporin-Verhältnis von ca. 10:90 erreicht werden. Nur in diesem Fall ist - nach Mutagenisierung von *crtI_{Rg}* - ein Farbscreening nach Mutanten mit erhöhtem Lycopin-Anteil (rote Kolonien) möglich. Daneben sollte erreicht werden, dass sich das Genprodukt von *crtI_{Rg}* nach Zellaufschluss und Zentrifugation im Überstand befindet, um dadurch eine enzymatisch aktive Phytoen-Desaturase zu erhalten, welche für die enzymatische Charakterisierung *in vitro* verwendet werden konnte.

Mittels Restriktionsspaltung (*EcoRI/HindIII*) wurde *crtI_{Rg}* aus pMON*crtI_{Rg}* herausgeschnitten und in den ebenso *EcoRI/HindIII* geschnittenen Vektor pTrc99a ligiert. Eine Sequenzierung zeigte, dass *crtI_{Rg}* „in frame“ und in vektorieller Leserichtung kloniert war. Durch die Klonierung in pTrc99a wurde das Leseraster um 39 Basenpaare in 3'-5' Richtung verlängert. Das Expressionsprodukt wurde dadurch

N-terminal um 13 Aminosäuren verlängert (Met, Glu, Phe, Leu, Gln, Pro, Leu, Ile, Gly, Arg, Ala, Arg, Arg...CrtI_{Rg}).

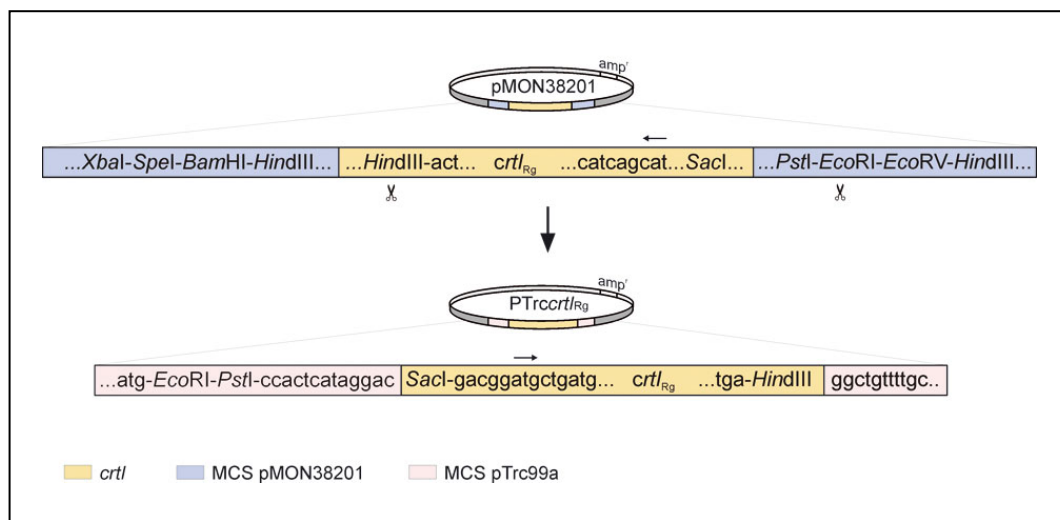


Abbildung III.11 Klonierung von *crtI*_{Rg} aus pMON38201 in pTrc99a

1.4.1 *In vivo* Funktionstest von pTrc*crtI*_{Rg}

Die Komplementierungen von DH5α[pAC*crtE*_{Eu}] mit pTrc*crtI*_{Rg} zeigten nach Inkubation über Nacht rot-orange gefärbte Kolonien. Diese waren weniger intensiv rot gefärbt, als die aus den Komplementierungen mit pUC*crtI*_{Rg} bzw. pQE*crtI*_{Rg} erhaltenen *E. coli*-Transformanten.

Abbildung III.12 zeigt die Elutionsprofile von Carotinoideextrakten aus Kulturen von DH5α[pAC*crtE*_{Eu}pTrc99a] (Kontrolle) und DH5α[pAC*crtE*_{Eu}pTrc*crtI*_{Rg}]. Der Carotinoideextrakt der Kontrolle enthielt ausschließlich Phytoen. Der Extrakt aus DH5α[pAC*crtE*_{Eu}pTrc*crtI*_{Rg}] zeigte einen vollständigen Umsatz von Phytoen zu desaturierten Carotinoiden. Das Carotinoidegemisch bestand zu 37% aus Lycopin (Retentionszeit 18,5 min; Absorptionsmaxima 445 nm, 472 nm und 505 nm). Der Anteil von Neurosporin (Retentionszeit 21 min; Absorptionsmaxima 417 nm, 442 nm und 470 nm) lag bei 63%. In DH5α[pAC*crtE*_{Eu}pTrc*crtI*_{Rg}] wurde also prozentual weniger Lycopin und mehr Neurosporin gebildet, als in den Komplementierungen mit den Plasmiden pUC*crtI*_{Rg} bzw. pQE*crtI*_{Rg}, in denen deutlich mehr Lycopin (bis 75%) als Neurosporin gebildet worden war (siehe III.1.2.1 und III.1.3.1).

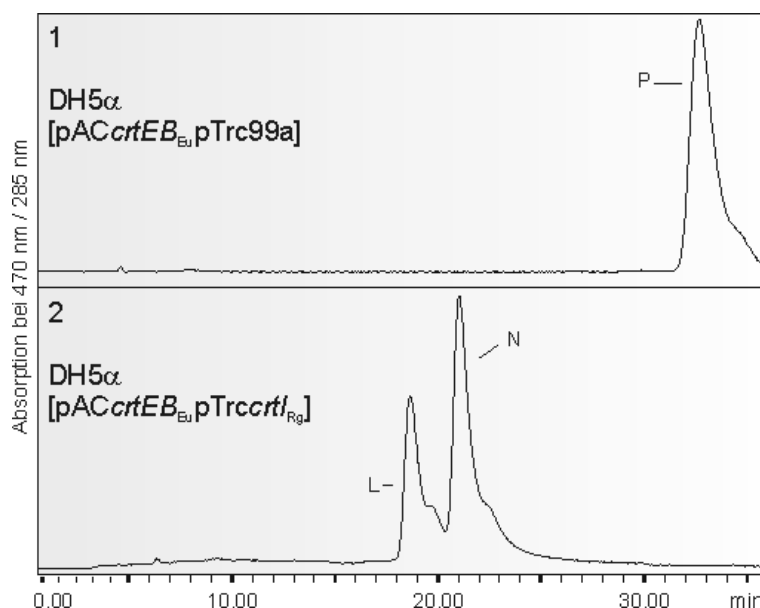


Abbildung III.12 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoideextrakten aus funktionellen Komplementierungen 1) DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pTrc99a] (Kontrolle); 2) DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pTrccrtI_{Rg}]; Phytoen (P), Lycopin (L), Neurosporin (N), Neurosporin-cis-Isomer (N'); die Detektion erfolgte bei 470 nm (0 - 30 min) sowie bei 285 nm (30 - 40 min)

1.4.2 Heterologe Expression von *crtI*_{Rg} in DH5 α [pTrccrtI_{Rg}] zur Proteingewinnung

Anders als bei DH5 α [pUCcrtI_{Rg}] und DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}] kam es in Kulturen von DH5 α [pTrccrtI_{Rg}] nicht zu einer starken Überexpression der Phytoen-Desaturase. Das SDS-PAGE mit Homogenat (H), Überstand (Ü) und der Membranfraktion (MF) (Abbildung III.13) zeigte, dass die Expression von *crtI*_{Rg} deutlich schwächer war, als in Zellen von DH5 α [pUCcrtI_{Rg}] und DH5 α [pPQEcrtI_{Rg}]. Durch eine Erhöhung der IPTG Konzentration konnte die Expressionsstärke von CrtI_{Rg} nicht verstärkt werden.

In vitro Enzym Tests mit Homogenat, Überstand sowie Membranfraktion zeigten keine Aktivität von CrtI_{Rg} und keinen Umsatz von Phytoen.

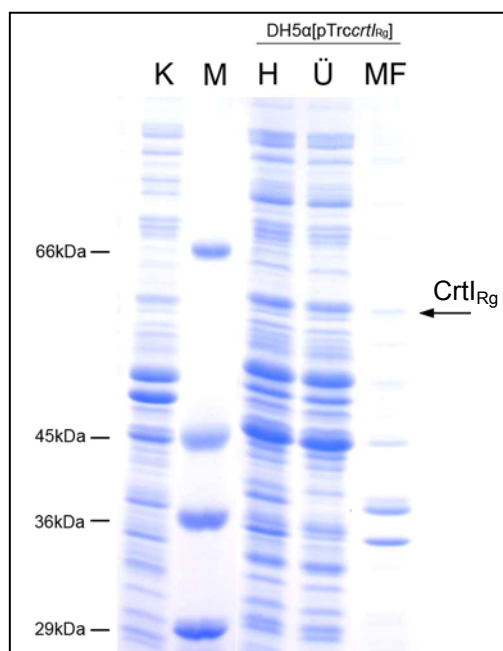


Abbildung III.13 SDS-PAGE, Auftrennung der Proteine aus Homogenat von DH5α[pTrc99a] (K); sowie von Homogenat (H), Überstand (Ü) und Membranfraktion (MF) aus DH5α[pTrcrtl_{RG}]; Molmassenstandard (M)

1.5 Klonierung von *crtl*_{RG} in pPEU32

In Komplementierungen Phytoen bildender *E. coli*-Transformanten mit pTrc*crtl*_{RG} war die Lycopinsynthese mit 60% am Gesamtprodukt so hoch, dass die Kolonien orange-rot gefärbt und für ein Farbscreening nach Mutagenisierung nur bedingt geeignet waren. Die heterologe Expression in *E. coli* unter Verwendung von pTrc*crtl*_{RG} erzeugte kein enzymatisch aktives Enzym.

Mit pPEU32 wurde ein weiteres Plasmid eingesetzt. Bei pPEU handelt es sich um eine Modifizierung des in III.1.3 beschriebenen Expressionsvektors pPQE. Dabei wurde der Promotor des Carotinoidgenclusters aus *Erwinia uredovora* vor die (MCS) des Vektors kloniert (Rudert, 2004). Dadurch sollte eine schwache Expression der Phytoen-Desaturase und eine Erhöhung des löslichen Anteils des Proteins erreicht werden. Durch die schwächere Expression sollte zudem versucht werden, den Lycopin-Anteil in den Komplementierungen mit Phytoen bildenden *E. coli*-Transformanten auf 10 - 20% zu senken. *crtl*_{RG} wurde mittels *SacI/HindIII* aus pMON*crtl*_{RG} herausgeschnitten und in einen ebenfalls *SacI/HindIII* geschnittenen pPEU32 kloniert.

Eine Sequenzierung zeigte, dass *crtl*_{RG} „in frame“ und in vektorieller Leserichtung in pPEU32 integriert worden war. Durch die Klonierung in pPEU wurde das Leseraster

in 3'-5' Richtung um 54 Basepaare verlängert. Das resultierende rekombinante Protein besaß dadurch N-terminal 18 zusätzliche Aminosäuren, welche den His-Tag für die Metallionen Affinitätschromatographie beinhalteten (Met, Arg, Gly, Ser, His, His, His, His, His, Gly, Ile, Arg, Met, Arg, Ala, Arg, Arg ...CrtI_{Rg}).

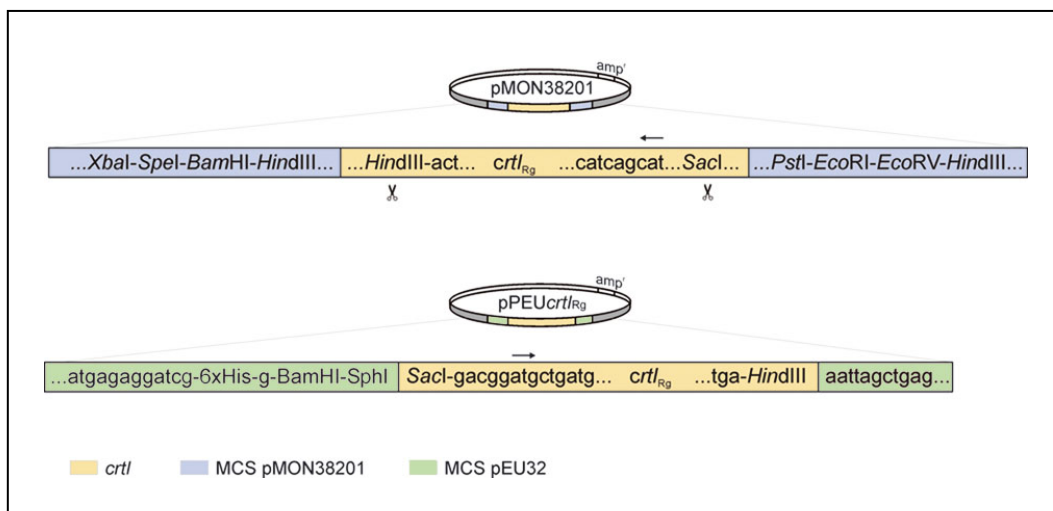


Abbildung III.14 Klonierung von *crtI*_{Rg} aus pMON38201 in pPEU32

1.5.1 *In vivo* Funktionstest von pPEU*crtI*_{Rg}

Über Nacht auf LB-Agar gewachsene Klone von DH5α[pAC*crtEB*_{Eu}pPEU*crtI*_{Rg}] wiesen eine gelb-orange Färbung auf, wohingegen die Kolonien von DH5α[pAC*crtEB*_{Eu}pPEU32] (Kontrolle) farblos blieben (Abbildung III.15). Die gelb-orange Färbung der Kolonien war ein Hinweis darauf, dass der in den Zellen gebildete Lycopin-Anteil niedrig war. Damit unterschied sich die Komplementierung mit pPEU*crtI*_{Rg} deutlich von jenen mit pUC*crtI*_{Rg}, pQE*crtI*_{Rg} und pTrc*crtI*_{Rg}. Dies wurde durch die HPLC-Analyse der Carotinoidextrakte aus Kulturen von DH5α[pAC*crtEB*_{Eu}pPEU32] und DH5α[pAC*crtEB*_{Eu}pPEU*crtI*_{Rg}] bestätigt (Abbildung III.16). Das Elutionsprofil des Carotinoidextraktes aus DH5α[pAC*crtEB*_{Eu}pPEU*crtI*_{Rg}] zeigte, dass die Verwendung von pPEU zu einer anderen Carotinoid-Zusammensetzung geführt hatte, als mit den zuvor verwendeten Plasmiden. So konnte kein 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin detektiert werden. Lycopin (Retentionszeit 18,5 min; Absorptionsmaxima 445 nm, 472 nm und 505 nm) wurde mit einem Anteil von 19% und Neurosporin (Retentionszeit 21 min; Absorptionsmaxima 417 nm, 442 nm und 470 nm) mit einem Anteil von 71% detektiert. Das von den *E. coli*-Transformanten gebildete Phytoen wurde nicht vollständig umgesetzt, der Anteil am

Gesamtcarotinoid betrug 10%. Das Lycopin/Neurosporin-Verhältnis lag bei 21:79 und entsprach damit in Annäherung dem Verhältnis von Spirilloxanthin und (OH-) Spheroidin, den Endprodukten der Carotinoidbiosynthese, die in *Rvi. gelatinosus* im Verhältnis von etwa 10:90 auftreten. Der Carotinoidextrakt aus DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pPEU32] (Kontrolle) enthielt ausschließlich Phytoen.

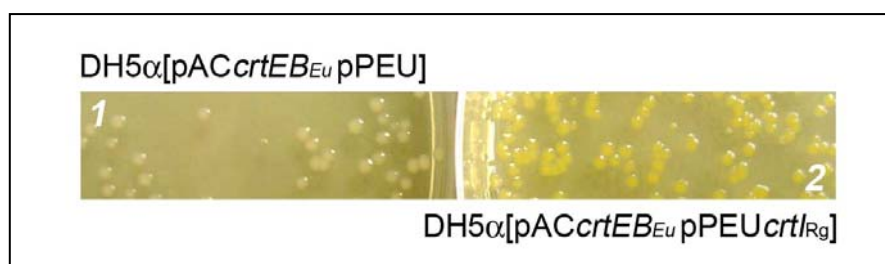


Abbildung III.15 Farbige Klone von 1) DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pPEU32] (Kontrolle) und 2) DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pPEUcrtI_{Rg}]

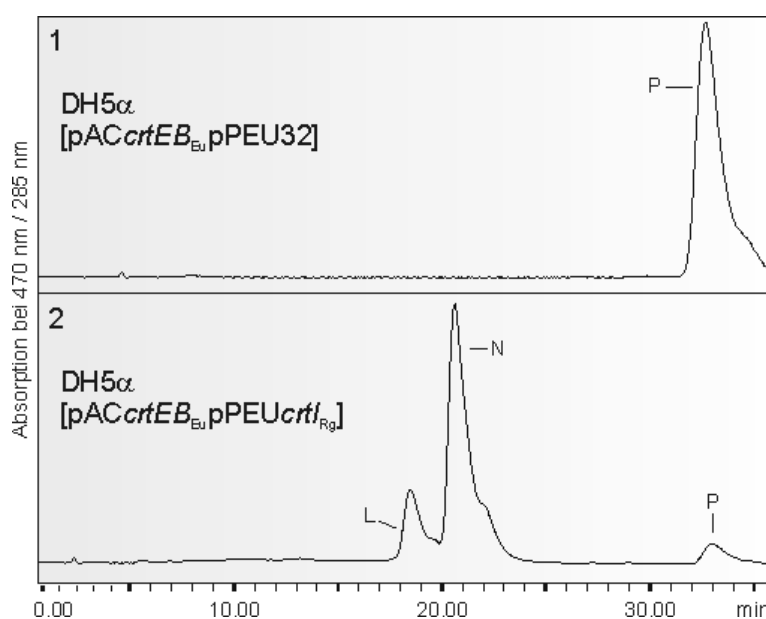


Abbildung III.16 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus funktionellen Komplementierungen 1) DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pPEU32] (Kontrolle); 2) DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pPEUcrtI_{Rg}]; Phytoen (P), Lycopin (L), Neurosporin (N); die Detektion erfolgte bei 470 nm (0 - 30 min) sowie bei 285 nm (30 - 40 min)

1.5.2 Heterologe Expression von crtI_{Rg} in DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}] zur Proteingewinnung

Auch in DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}] konnte die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* exprimiert werden. Gegenüber der Kontrolle (K) ist im Homogenat (H) deutlich die Phytoen-Desaturase CrtI_{Rg} mit der apparenten Molmasse von 57 kDa zu erkennen (Abbildung III.17). Nach Zellaufschluss und Zentrifugation befand sich das gebildete Protein mit ca. 0,4 mg CrtI_{Rg}/ml hauptsächlich im Überstand (Ü, Abbildung III.17). Der

Anteil der Phytoen-Desaturase am Gesamtprotein betrug im Homogenat (H) 8% gegenüber 10% im Überstand (Ü) und 23% in der Membranfraktion (MF). *In vitro* Enzymtests zeigten, dass durch die Verwendung von pPEUcrtI_{Rg} ein funktionell aktives Enzym exprimiert wurde. Anders als in DH5α[pUCcrtI_{Rg}] und DH5α[pPQEcrtI_{Rg}] sowie DH5α[pTrccrtI_{Rg}] konnte crtI_{Rg} somit in DH5α[pPEUcrtI_{Rg}] in großen Mengen löslich exprimiert werden. *In vitro* konnte ein Umsatz von Phytoen zu desaturierten Produkten nachgewiesen werden (siehe III.2).

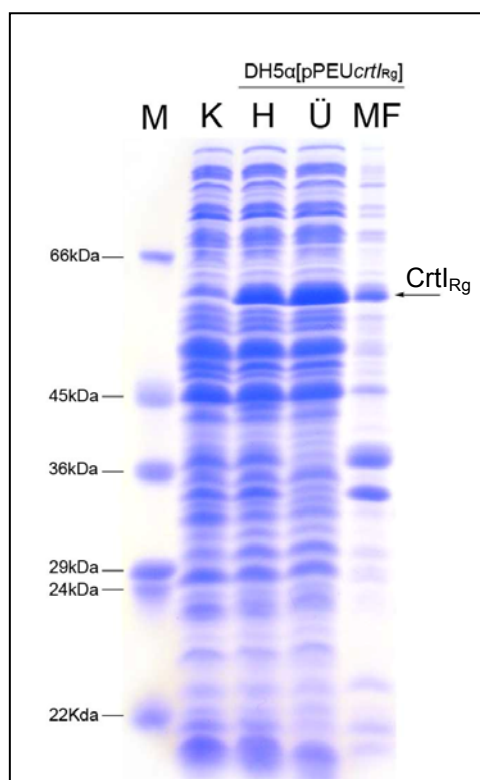


Abbildung III.17 SDS-PAGE, Auftrennung von Proteinen aus Homogenat von DH5α[pPEU32] (K) sowie aus Homogenat (H), Überstand (Ü) und Membranfraktion (MF) von DH5α[pPEUcrtI_{Rg}]; Molmassenstandard (M)

1.6 Zusammenfassung der Klonierungsergebnisse

Das Gen *crtl*_{Rg} wurde in 4 unterschiedliche Vektoren kloniert (siehe Abbildung III.18). Durch DH5 α [pUC*crtl*_{Rg}] wurde die Phytoen-Desaturase überexprimiert. Crtl_{Rg} war in der Membranfraktion lokalisiert und *in vitro* inaktiv. Komplementierungen mit dem Plasmid pUC*crtl*_{Rg} wiesen einen hohen Lycopin-Anteil auf und die Kolonien waren rot. Im Anschluss an eine Mutagenisierung von *crtl*_{Rg} (siehe Punkt III.3) konnte das Plasmid verwendet werden, um ein Farbscreening nach gelben Zellkolonien, mit einem geringeren Lycopin-Anteil, durchzuführen.

Auch das Konstrukt pPQE*crtl*_{Rg} bewirkte eine Überexpression von *crtl*_{Rg} und die Bildung eines unlöslichen, *in vitro* inaktiven Enzyms. Komplementierungen mit pPQE*crtl*_{Rg} zeigten einen extrem hohen Lycopin-Anteil und dadurch rot gefärbte Kolonien. Deshalb wurde dieses Plasmid nicht weiter verwendet.

Mit pTrc*crtl*_{Rg} konnte keine Überexpression von Crtl_{Rg} erzielt werden. Die *in vitro* Enzymtests zeigten ebenfalls keinen Umsatz von Phytoen. Nach Komplementierung einer Phytoen bildenden *E. coli*-Transformante waren die Kolonien orange gefärbt. Unter diesen Bedingungen war (nach Mutagenisierung) ein Farbscreening nach roten Kolonien möglich aber suboptimal.

Es zeigte sich, dass ausschließlich unter Verwendung von pPEU*crtl*_{Rg} die Phytoen-Desaturase als lösliches Protein im Überstand exprimiert wurde. Das Enzym konnte dadurch für die Charakterisierung *in vitro* und zur Bestimmung der kinetischen Parameter, eingesetzt werden. Daneben bildeten mit pPEU*crtl*_{Rg} komplementierte, Phytoen synthetisierende *E. coli*-Transformanten gelb-orange Kolonien. Diese waren ohne Einschränkung geeignet, um nach Mutagenisierung von *crtl*_{Rg} ein Farbscreening nach auffällig rot gefärbten Klonen durchzuführen.

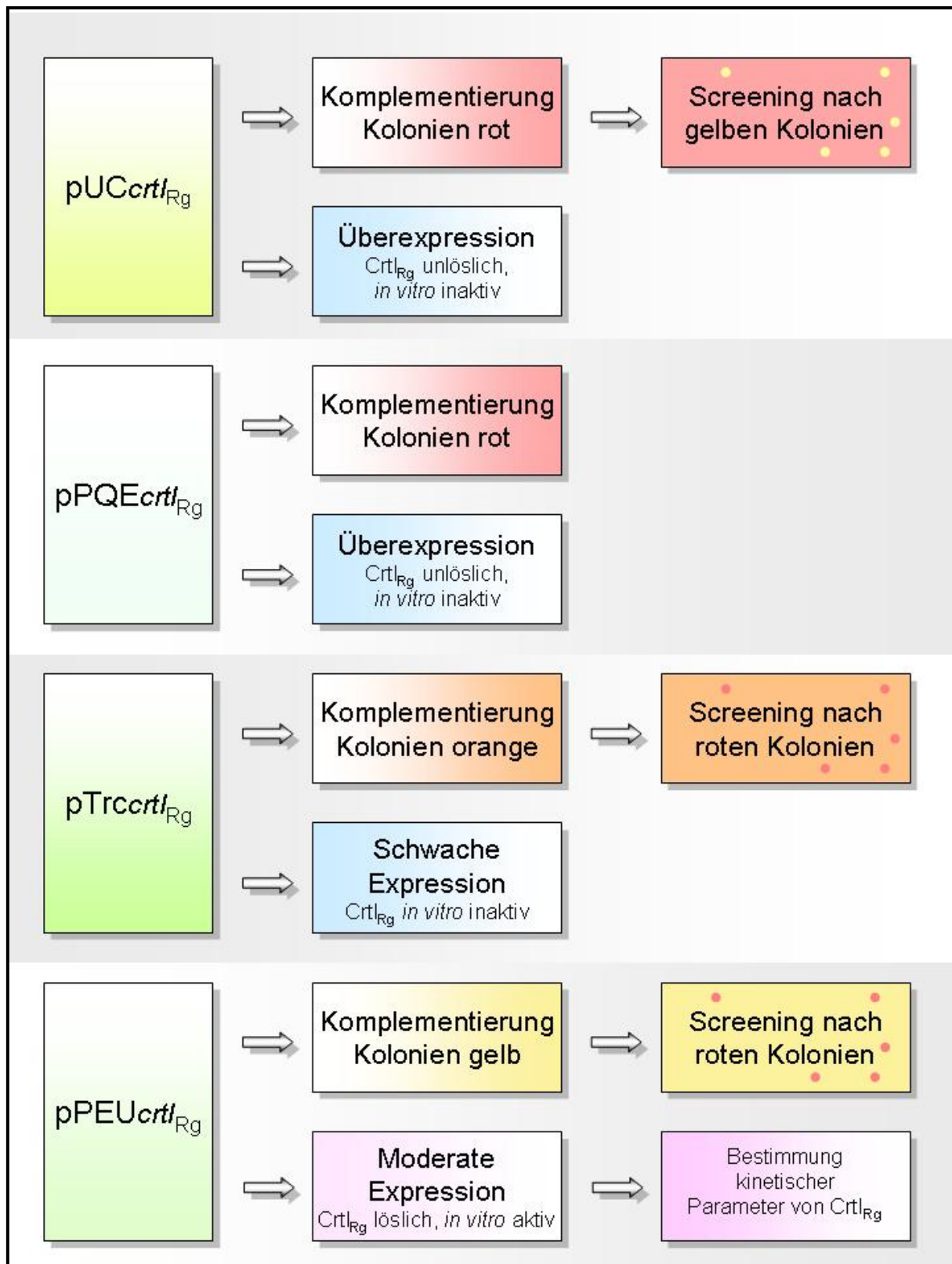


Abbildung III.18 Übersicht der klonierten Plasmide und ihrer Verwendung

2 Enzymatische Charakterisierung von CrtI_{Rg}

Der aus Kulturen von DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}] gewonnene Überstand konnte für *in vitro* Enzymtests zur enzymatischen Charakterisierung der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus*, d.h. für die Bestimmung der kinetischen Parameter und der Kofaktoren, genutzt werden.

2.1 Etablierung eines *in vitro* Enzym Funktionstests

Um zu überprüfen, ob die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* im Überstand als enzymatisch aktives Protein vorliegt und einen Umsatz von Phytoen zu den desaturierten Produkten katalysieren kann, wurde ein *in vitro* Enzymtest durchgeführt. Für die Enzymtests wurde Phytoen in einer Konzentration von 20 μ M und 0,4 mg/ml Enzym (CrtI_{Rg}) eingesetzt. In Abbildung III.19 sind die Elutionsprofile der Carotinoide aus Enzymtests mit einer Kontrolle (Überstand von DH5 α [pPEU32]) und dem Überstand von DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}] gezeigt. Die Detektion der Carotinoide erfolgte bei 470 nm (0 - 24 min), bei 400 nm (24 - 28 min), bei 350 nm (28 - 31 min) sowie bei 285 nm (31 - 40 min).

Das Elutionsprofil des Carotinoideextraktes der Kontrolle zeigte einen Elutionspeak bei einer Retentionszeit von 33 min. Das Carotinoid mit Absorptionsmaxima von 266 nm, 286 nm und 300 nm, konnte als Phytoen (P) identifiziert werden. In der Kontrolle ohne CrtI_{Rg} erfolgte keine Desaturierung von Phytoen.

Im Carotinoideextrakt des Enzymtests mit Überstand von DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}] konnten mehrere Carotinoide detektiert werden. Dabei handelte es sich um Lycopin (L) mit der Retentionszeit 18,5 min und den Absorptionsmaxima 440 nm, 470 nm sowie 505 nm und um Neurosporin bei einer Retentionszeit von 21 min, mit den Absorptionsmaxima 410 nm, 440 nm und 470 nm. Bei einer Retentionszeit von 23 min konnte ein weiteres Carotinoid mit den Absorptionsmaxima 330 nm (cis Peak), 410 nm, 435 nm und 465 nm detektiert und als Neurosporin-cis-Isomer identifiziert werden. Die Intermediate der Carotinoidebiosynthese, ζ -Carotin (Z) (Retentionszeit 25,5 min, Absorptionsmaxima 380 nm, 400 nm und 430 nm) und Phytofluoren (Pfl) (Retentionszeit 29 min, Absorptionsmaxima 335 nm, 350 nm und 370 nm) konnten ebenfalls in geringen Mengen nachgewiesen werden. Bei einer Retentionszeit von 33

min eluierte Phytoen (P) und bei 34 min bzw. 35 min zwei weitere Phytoen-Isomere (P', P'') von der HPLC-Säule. Phytoen wurde zu 43% umgesetzt.

Die Gesamtproduktmenge betrug 2,42 µg und setzte sich aus 10,5% Lycopin, 82% Neurosporin, 2,5% ζ-Carotin und 7% Phytofluen zusammen. Das Verhältnis von Lycopin und Neurosporin lag bei 12:88 und entsprach dem in *Rvi. gelatinosus* ermittelten Produktverhältnis von Spirilloxanthin und Spheroidin bzw. OH-Spheroidin von etwa 10:90. Auf die Produkte Lycopin und Neurosporin bezogen ergab sich eine spezifische Aktivität von 1,7 nmol Produkte/h*mg Crtl_{RG}.

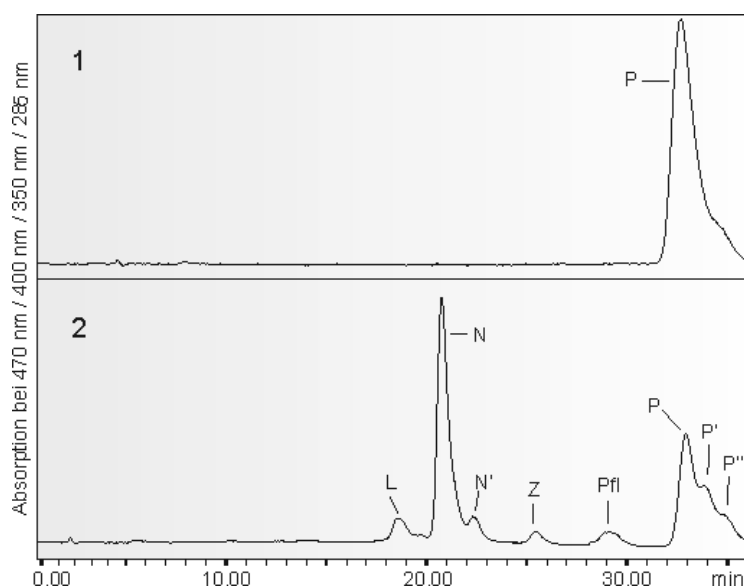


Abbildung III.19 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus *in vitro* Enzymtests mit Überstand von 1) DH5α[pPEU32] (Kontrolle) und 2) DH5α[pPEUcrtl_{RG}]; Phytoen (P), Lycopin (L), Neurosporin (N), Neurosporin-cis-isomer (N'), ζ-Carotin (Z), Phytofluen (Pfl); die Detektion erfolgte bei 470 nm (0 - 24 min), bei 400 nm (24 - 28 min), bei 350 nm (28 - 31 min) sowie bei 285 nm (31 - 40 min)

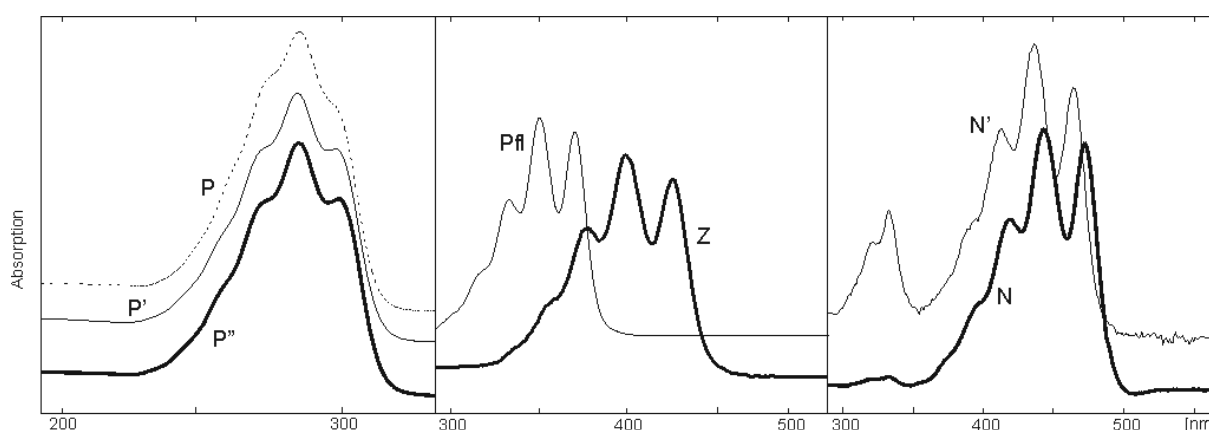


Abbildung III.20 Absorptionsspektren der mittels HPLC detektierten Carotinoide Phytoen (P), Phytoen-cis-Isomer (P'), Phytoen cis Isomer (P''), Phytofluen (Pfl), ζ-Carotin (Z), Neurosporin (N), Neurosporin-cis-Isomer (N')

In Tabelle III.1 sind die in den Komplementierungen und Enzymtests detektierten Carotinoide mit ihren spezifischen Absorptionsmaxima und Retentionszeiten gezeigt.

Tabelle III.1 Auflistung der detektierten Carotinoide sowie der spezifischen Absorptionsmaxima und Retentionszeiten

Zeichen	Carotinoid	Absorptionsmaxima [nm]	Retentionszeit [min]
T	3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin	480, 510 ,545	17
L	Lycopin	445, 472 ,505	18,5
L'	Lycopin-Isomer	345,362,441, 467 ,498	19,5
N	Neurosporin	417, 442 ,470	21
Z	ζ-Carotin	380, 400 ,430	25,5
Pfl	Phytofluen	335, 350 ,370	29
P	Phytoen	266, 286 ,300	33
P'	Phytoen-Isomer	266, 286 ,300	34
P''	Phytoen-Isomer	266, 286 ,300	35

2.2 pH-Optimum der enzymatischen Aktivität von CrtI_{RG}

Um optimale Bedingungen für Enzymtests mit der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* gewährleisten zu können, wurde das pH-Optimum für die enzymatische Reaktion von CrtI_{RG} bestimmt. Dafür wurden Kulturen von DH5α[pPEUcrtI_{RG}] sedimentiert und in Natriumphosphat-Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten rückgelöst. Nach Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation wurden die Überstände für Enzymtests eingesetzt.

Abbildung III.21 zeigt die spezifische Enzymaktivität von CrtI_{RG} in Abhängigkeit des pH-Wertes. Dabei wurden die Desaturierungsprodukte Neurosporin und Lycopin quantifiziert. Die höchste spezifische Gesamtaktivität erreicht CrtI_{RG} mit 2,1 nmol Produkte/h*mg CrtI_{RG} bei pH 8.

Alle weiteren *in vitro* Enzym Tests wurden bei pH 8 durchgeführt. Mit dem etablierten *in vitro* System war es möglich, die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* unter definierten Bedingungen (Substratmenge, Enzymmenge) zu charakterisieren.

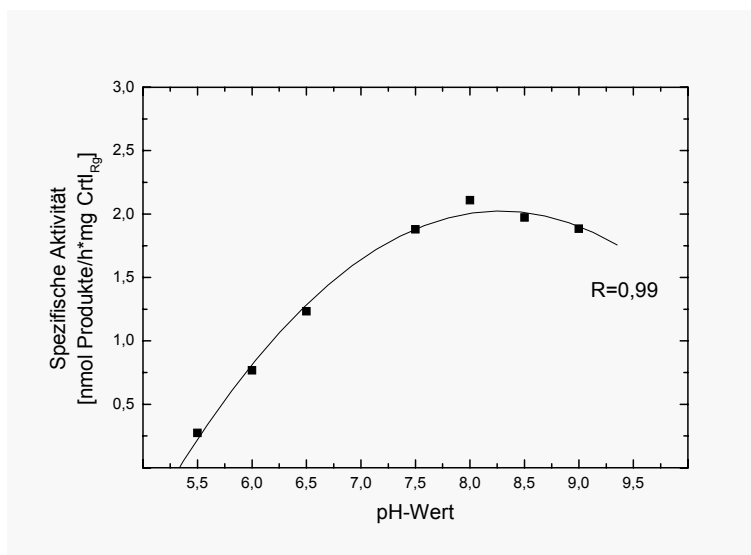


Abbildung III.21 Spezifische Aktivität der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* in Abhängigkeit vom pH-Wert

2.3 K_m -Wert Bestimmung von $Crtl_{Rg}$ für die Substrate Phytoen und Neurosporin

Um die Spezifität von $Crtl_{Rg}$ für die Substrate Phytoen und Neurosporin zu ermitteln, sollten die K_m - und V_{max} -Werte des Enzyms bestimmt werden. In Abbildung III.22 sind die spezifischen Enzymaktivitäten von $Crtl_{Rg}$ gegen die Substratkonzentrationen von Phytoen (A) und Neurosporin (B) nach Lineweaver-Burk doppelt reziprok aufgetragen. Für Phytoen wurde ein K_m -Wert von $14,8 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $5,2 \text{ nmol/h*mg } Crtl_{Rg}$ ermittelt. Für Neurosporin lag der K_m -Wert bei $33 \mu\text{M}$ mit einem korrespondierenden V_{max} -Wert von $0,6 \text{ nmol/h*mg } Crtl_{Rg}$. Die Spezifitätskonstante (V_{max}/K_m) lag für Phytoen bei 35×10^2 und für Neurosporin bei $1,8 \times 10^2$. Die Korrelationskoeffizienten waren größer als 0,9.

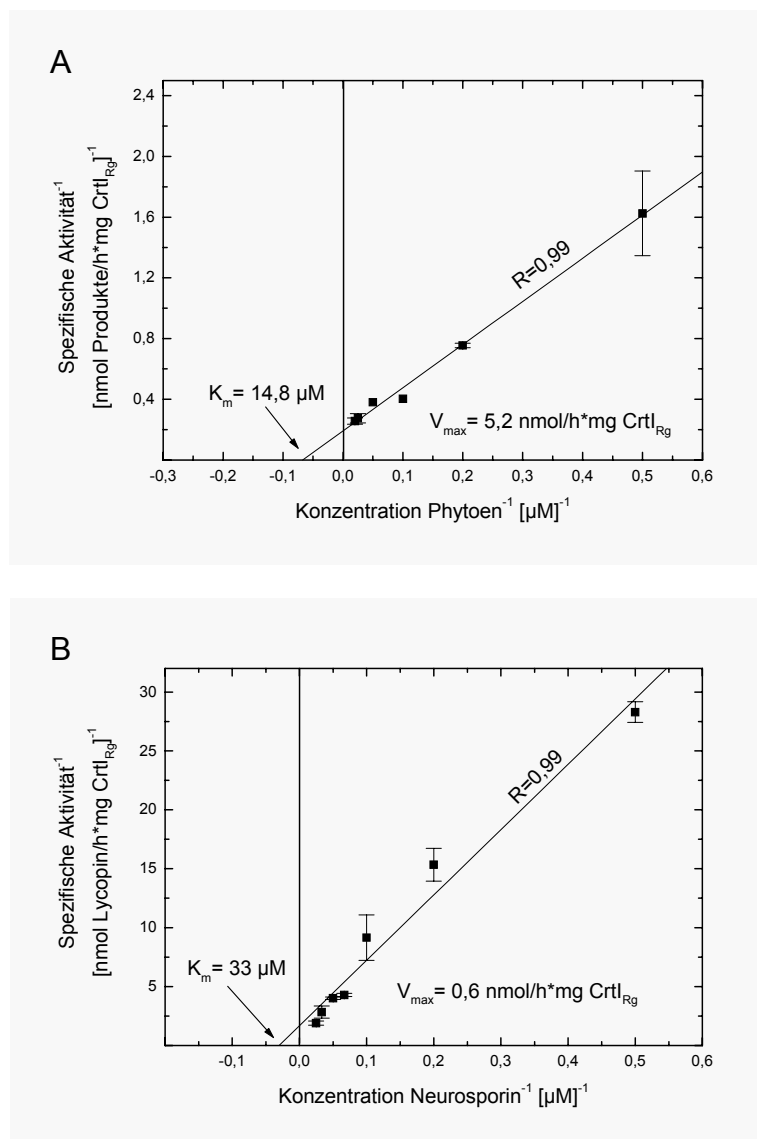


Abbildung III.22 K_m -Wert-Bestimmung der Phytoen-Desaturase Crtl_{Rg} für die Substrate Phytoen (A) und Neurosporin (B); doppeltreziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk

Bei der Bestimmung des K_m -Wertes von Crtl_{Rg} für Phytoen zeigte sich, dass der Anteil des gebildeten Lycopins mit steigender Phytoen-Konzentration stark absank und der Neurosporin-Anteil stieg. Dies wird durch Teil-Abbildung III.23 A verdeutlicht, in der die Produktmengen gegen die eingesetzte Phytoen-Konzentration aufgetragen wurde. In Teil-Abbildung III.23 B ist der prozentuale Anteil von Lycopin am Gesamtprodukt gegen die eingesetzte Phytoen-Konzentration aufgetragen. Bei einer Konzentration von 2 μ M Phytoen konnte ein Lycopin-Anteil am Gesamtprodukt von 44% ermittelt werden; dieser sank bei einer Phytoen-Konzentration von 50 μ M um das 27-fache bis auf 1,6%.

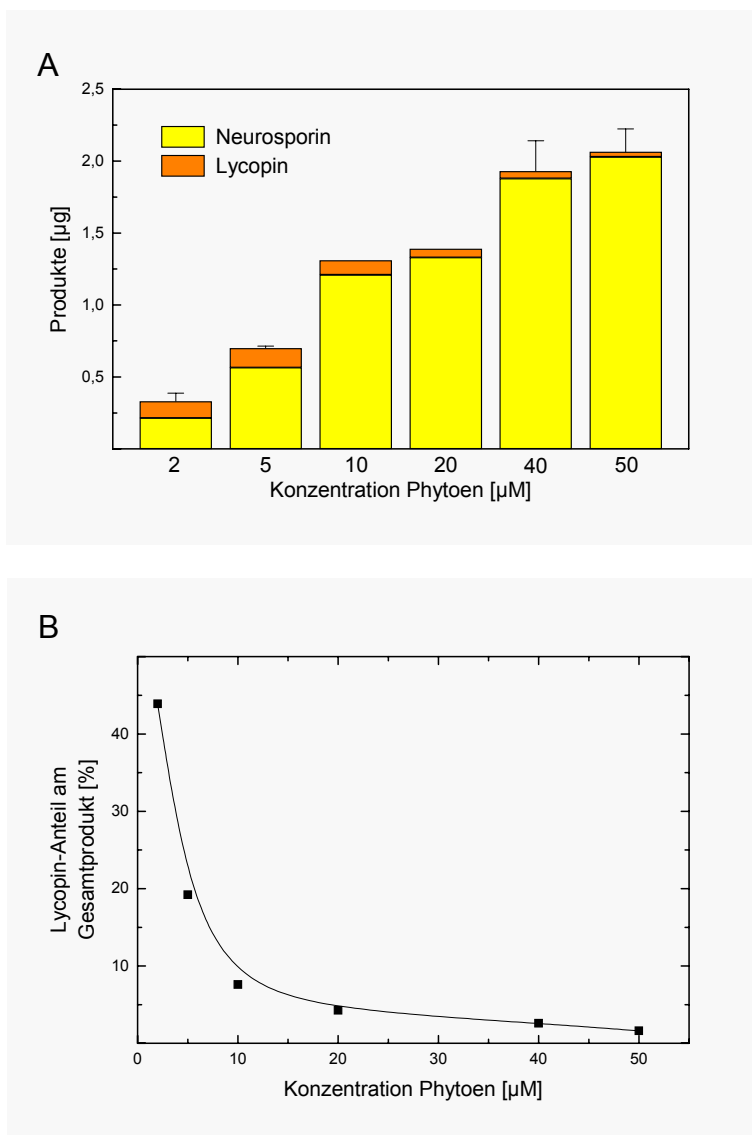


Abbildung III.23 Abhängigkeit der gebildeten Lycopin-Menge von der Substratkonzentration A) desaturierte Produkte [µg] gegen die Phytoen-Konzentration [µM]; B) prozentualer Anteil von Lycopin am Gesamtprodukt [%] gegen die Phytoen-Konzentration [µM]

2.4 Untersuchung der Korrelation zwischen Enzymkonzentration und dem Anteil des gebildeten Lycopins

Um zu überprüfen, ob die Enzymkonzentration einen Einfluss auf die Anzahl, der durch CrtI_{Rg} katalysierten Desaturierungsschritte bzw. auf das Lycopin/Neurosporin-Verhältnis hat, wurden unterschiedliche Enzymmengen bei konstanter Phytoen-Konzentration von 20 µM für die Enzymtests eingesetzt. Der Versuch wurde zum Vergleich ebenso mit der Phytoen-Desaturase aus *Rba. sphaeroides* (CrtI_{Rs}) durchgeführt. Bei CrtI_{Rs} handelt es sich um eine 3-fach-Desaturase. Das Enzym katalysiert 3 Desaturierungsschritte und setzt Phytoen zu dem Produkt Neurosporin um.

Für die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* sind die Produktmengen von Lycopin und Neurosporin bei steigender Enzymkonzentration in Teil-Abbildung III.24 A dargestellt. Der prozentuale Anteil von Lycopin am Gesamtprodukt ist in Teil-Abbildung III.24 B gegen die eingesetzte CrtI_{R_G} Konzentration aufgetragen. Es zeigte sich, dass bei einer Enzymkonzentration von 46 µg/ml Lycopin mit 0,025 µg und etwa 4% vom Gesamtprodukt (Neurosporin + Lycopin = 0,7 µg) kaum nachzuweisen war. Mit zunehmender Enzymkonzentration stieg die Menge an synthetisiertem Lycopin deutlich an. Bei der 10-fachen Enzymkonzentration (446 µg/ml) lag der Lycopin-Gehalt bei 0,42 µg und 18% vom Gesamtprodukt. Die relative Lycopin-Menge stieg somit um das 4,5-fache, während die Enzymkonzentration um das 10-fache erhöht worden war.

In Teil-Abbildung III.24 C und D sind die absolut gebildeten Carotinoidmengen bzw. der prozentuale Anteil von Lycopin am Gesamtprodukt für die Phytoen-Desaturase aus *Rba. sphaeroides* gezeigt. Ebenso wie für CrtI_{R_G} konnte auch für CrtI_{R_S} eine Korrelation zwischen der Enzymkonzentration und dem gebildeten Lycopin gezeigt werden. Dabei konnte bei den eingesetzten Enzymkonzentrationen von 13 µg/ml und 34 µg/ml kein Lycopin nachgewiesen werden. Erst ab einer Enzymkonzentration von 70 µg/ml konnte mit 0,004 µg Lycopin ein Anteil von 0,7% am Gesamtprodukt nachgewiesen werden. Bei einer Enzymkonzentration von 344 µg/ml stieg die Lycopin-Menge auf 0,1 µg, was einem Anteil von 6% entsprach.

Für beide untersuchten Phytoen-Desaturasen konnte eine nahezu lineare Korrelation zwischen Enzymkonzentration und dem synthetisierten Lycopin-Anteil gezeigt werden. Die Untersuchungen mit CrtI_{R_S} zeigten darüber hinaus, dass das Enzym, welches in *Rba. sphaeroides* fast ausschließlich drei zusätzliche Doppelbindungen in das Phytoenmolekül einfügen kann, das Potential zu einer weiteren Desaturierung besitzt, wenn das Enzym in hoher Konzentration vorhanden ist.

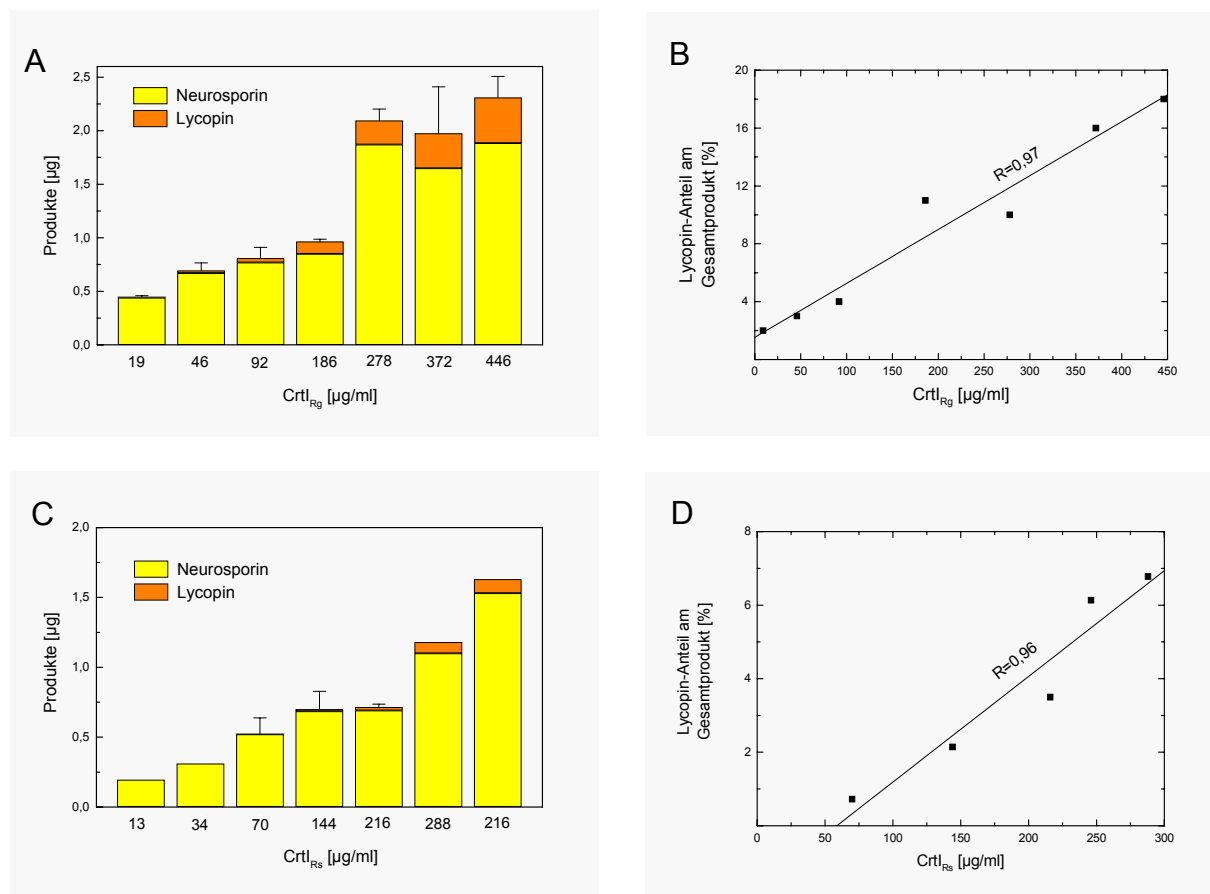


Abbildung III.24 Korrelation der Enzymkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] und dem Anteil von Lycopin am Gesamtprodukt; CrtI aus *Rvi. gelatinosus* (A,B); CrtI aus *Rba. sphaeroides* (C,D)

2.5 Hemmstoffuntersuchung

Wie andere bakterielle Phytoen-Desaturasen konnte auch CrtI_{Rg} in der Enzymaktivität durch Diphenylamin (DPA) gehemmt werden. Abbildung III.25 zeigt die einfach reziproke Darstellung eines Dixon-Plots der Messreihe von *in vitro* Enzymtests, unter Verwendung von DPA in Konzentrationen von 0,1 mM, 0,4 mM, 0,7 mM und 1 mM. Mit zunehmender DPA Konzentration wurde die Enzymaktivität eingeschränkt, so dass die Gesamtproduktmenge abnahm. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden und der X-Achse ergibt den I₅₀-Wert von 280 μM DPA.

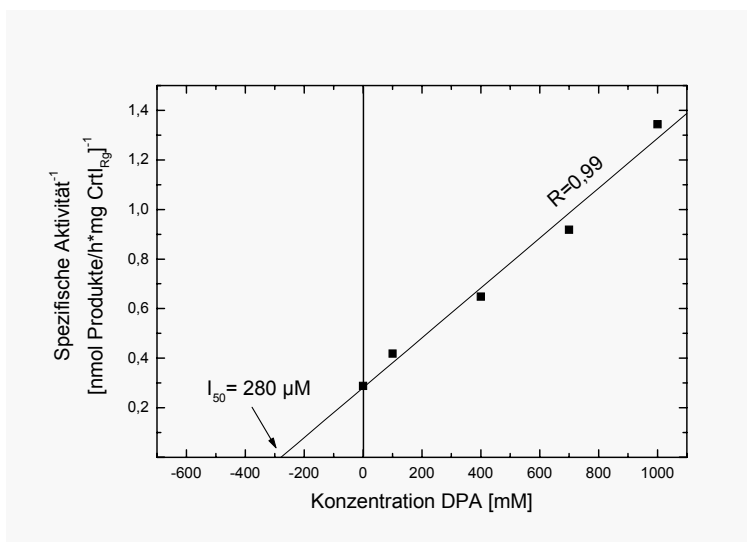


Abbildung III.25 Dixon-Plot zur Ermittlung des I_{50} -Wertes von DPA für $Crtl_{RG}$

2.6 Bestimmung der Kofaktorabhängigkeit von $Crtl_{RG}$

Für die Phytoen-Desaturase aus *Rba. capsulatus* wurde von Raisig *et al.* (1996) FAD als Kofaktor angegeben. Es wurde untersucht, ob die Zugabe oxidierter Dinukleotide (FAD, NAD und NADP) auch die enzymatische Aktivität der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* verstärken kann.

2.6.1 Metallionen-Affinitätschromatografie

Für die Bestimmung der Kofaktorabhängigkeit von $Crtl_{RG}$ war es erforderlich, das Enzym zu reinigen. Die Reinigung der Phytoen-Desaturase wurde mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatografie durchgeführt. Das korrespondierende SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung III.26) zeigt, dass die Phytoen-Desaturase durch das Verfahren in den Elutionsfraktionen (50 mM, 100 mM u. 150 mM Imidazol) stark angereichert und fast bis zur Homogenität (96% in der Elutionsfraktion 150 mM Imidazol) isoliert werden konnte. Die Elutionsfraktionen 100 mM und 150 mM Imidazol wurden vereinigt, über eine Sephadex G-25M Säule entsalzt und für die Kofaktorbestimmung verwendet.

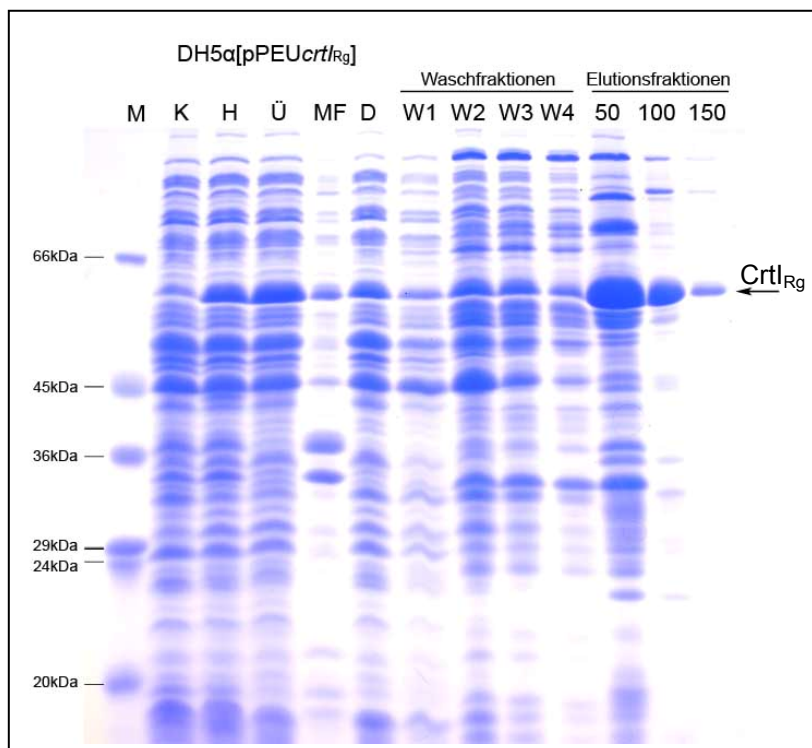


Abbildung III.26 SDS-PAGE nach immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatografie von CrtI_{Rg} aus DH5α[pPEU_{crtI_{Rg}}]; Molmassenstandard (M); Kontrolle DH5α[pPEU32] (K); Homogenat (H); Überstand (Ü); Membranfraktion (MF); Durchbruch (D); Waschschrte 1-4 (W1-W4); Elutionsfraktionen (50/100/150)

2.6.2 *In vitro* Enzymtest zur Bestimmung des Kofaktors von CrtI_{Rg}

Die Untersuchung der Abhängigkeit der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* von Kofaktoren wurde mit Hilfe der gereinigten und über Sephadex G-25M entsalzten Fraktion durchgeführt. Als Kofaktoren wurden FAD, NAD und NADP eingesetzt.

In Abbildung III.27 ist die Auswertung der Kofaktoruntersuchung gezeigt. NAD konnte die Aktivität der Phytoen-Desaturase gegenüber der Kontrolle ohne Kofaktor um das 5,5-fache steigern. NADP steigerte die Aktivität von CrtI_{Rg} lediglich um den Faktor 1,8. Unter Einsatz von FAD konnte die Aktivität um das 39-fache gesteigert werden.

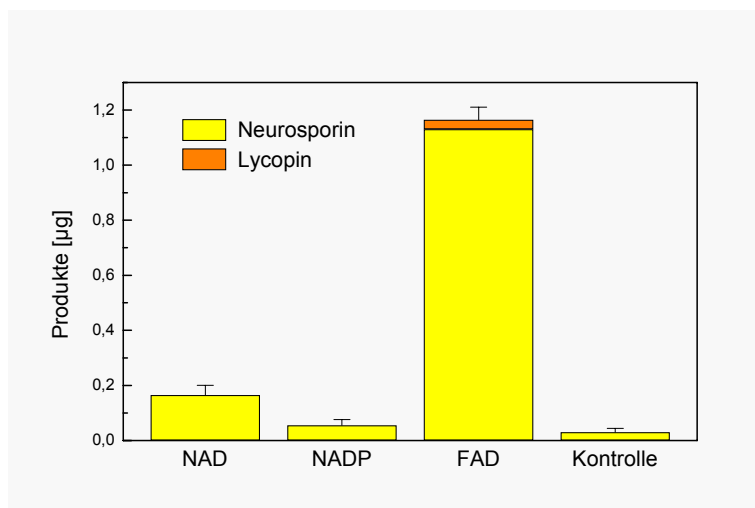


Abbildung III.27 Kofaktoruntersuchung der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus*

3 Mutagenisierung von *crtI_{Rg}*

Mittels zufälliger Mutagenisierung sollte *crtI_{Rg}* verändert werden, um in ihrer Aktivität modifizierte Genprodukte zu erhalten, die entweder nur noch Neurosporin oder fast ausschließlich Lycopin synthetisierten. Mittels eines optimierten Farbscreening-Verfahrens sollten Klone mit solchen veränderten Phytoen-Desaturasen ermittelt werden. Sequenzanalysen sollten Aufschluss über die Lokalisierung der Mutationen und die damit verbundenen strukturellen Veränderungen des Enzyms geben. Mit Hilfe dieser Daten sollten mehr Informationen über die Funktionsweise der Phytoen-Desaturase und über katalytisch relevante Bereiche der Aminosäurekette gewonnen werden.

3.1 Mutagenisierung mittels Error Prone PCR

Nach der Mutagenisierung mittels Error Prone PCR und Klonierung des PCR-Fragments über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/HindIII* in pUC8-2, wurden DH5α-Zellen mit dem Ligationsprodukt via Elektroporation transformiert. Es konnten ca. 6000 Kolonien erhalten und die Plasmid-DNA isoliert werden. Phytoen bildende DH5α[pAC*crtEB_{EU}*] wurden mit dieser pUC*crtI_{Rg}*-Mutationsbibliothek transformiert und die resultierenden Kolonien mittels Farbscreening auf mögliche Mutationen hin untersucht. Abbildung III.28 zeigt ein solches Farbscreening einer LB-Platte.



Abbildung III.28 Komplementierung Phytoen bildender *E. coli*-Transformanten mit einer pUCcrtI_{RG}-Mutationsbibliothek

3.1.1 HPLC-Analyse von Carotinoideextrakten aus Mutanten

Neben zahlreichen roten Zellkolonien zeigten sich auf den über Nacht kultivierten LB-Platten auch orange, gelb bzw. weiß gefärbte Kolonien. Ausgewählte Kolonien wurden in Flüssigmedium überimpft und die synthetisierten Carotinoide über HPLC identifiziert. Die Detektion erfolgte bei 470 nm (0 - 23 min), bei 400 nm (23 - 28 min), sowie bei 350 nm (28 - 35 min). In Abbildung III.29 sind die Elutionsprofile der aus 4 Mutanten extrahierten Carotinoide gezeigt. Teil-Abbildung 1 zeigt das Elutionsprofil einer Komplementierung von DH5 α [pACcrtEB_{EU}] mit pUCcrtI_{RG}WT (nicht mutiertes „Wildtyp-Gen“). Die nicht mutierte Phytoen-Desaturase bildete 75% Lycopin, 15% 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin und 10% Neurosporin.

Die Carotinoideextrakte der Mutanten enthielten wenig oder gar kein Lycopin. Die Klone EP08, EP16 und EP22 bildeten hauptsächlich Neurosporin. Klon EP21 synthetisierte nur geringe Mengen Neurosporin und hauptsächlich die Intermediate ζ -Carotin und Phytofluen. Die prozentuale Verteilung der Carotinoide in den Extrakten ist in Tabelle III.2 gezeigt.

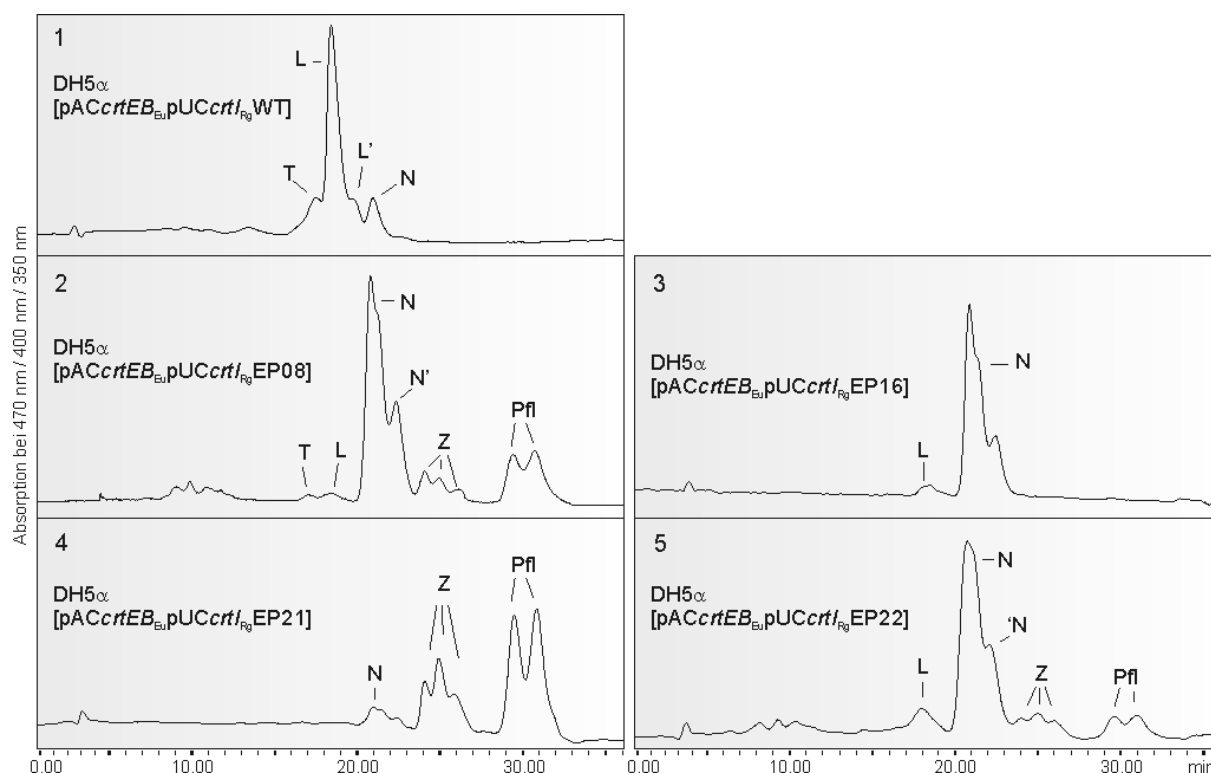


Abbildung III.29 HPLC-Elutionsprofile von Komplementierungen mit der *pUCcrtI_{Rg}*-Mutationsbibliothek 1) *DH5 α [pACcrtEB_{EU}pUCcrtI_{Rg}WT]* (Kontrolle); 2) *DH5 α [pACcrtEB_{EU}pUCcrtI_{Rg}EP08]* 3) *DH5 α [pACcrtEB_{EU}pUCcrtI_{Rg}EP16]* 4) *DH5 α [pACcrtEB_{EU}pUCcrtI_{Rg}EP21]* 5) *DH5 α [pACcrtEB_{EU}pUCcrtI_{Rg}EP22]*; Phytoen (P), 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin (T), Lycopin (L), Neurosporin (N), Neurosporin-cis-Isomer (N') ζ -Carotin (Z), Phytofluen (Pfl); die Detektion erfolgte bei 470 nm (0 - 23 min), bei 400 nm (23 - 28 min), sowie bei 350 nm (28 - 35 min)

Tabelle III.2 Zusammensetzung der Carotinoidextrakte aus *DH5 α [pACcrtEB_{EU}pUCcrtI_{Rg}WT]* (Kontrolle) sowie 4 Klonen mit veränderter Carotinoidzusammensetzung

Klon	Carotinoid Anteil von Gesamt [%]				
	Tetra DHL	Lycopin	Neurosporin	ζ -Carotin	Phytofluen
WT	15	75	10	-	-
EP08	1	2	69	8	20
EP16	-	3	97	-	-
EP21	-	-	7	33	60
EP22	-	10	76	7	7

3.1.2 Sequenzanalysen der mutierten *crtl_{Rg}*-Leseraster aus der pUC*crtl_{Rg}*-Mutationsbibliothek

In Tabelle III.3 sind die durch die Error Prone Mutagenisierung ausgetauschten Nukleotide in den Sequenzen von *crtl_{Rg}*EP08, *crtl_{Rg}*EP16, *crtl_{Rg}*EP21 und *crtl_{Rg}*EP22 bzw. die daraus resultierenden Veränderungen der jeweiligen Aminosäuresequenzen gezeigt. Eine Analyse der Aminosäuresequenzen bezüglich der Sekundärstruktur der veränderten Proteine zeigte, dass jede Mutante mindestens eine Mutation besaß, welche eine Veränderung der helikalen (Sekundär-)Struktur zur Folge hatte. Die Vorhersagen der Sekundärstrukturen wurden mittels der Software „Predator“ (Frishman & Argos, 1995; Frishman & Argos, 1996; Frishman & Argos, 1997) getroffen. So wurde im Fall von *Crtl_{Rg}*EP08 eine Helixstruktur durch die Mutation L208P um 4 Aminosäuren verkürzt. Die Mutation P134L in *Crtl_{Rg}*EP16 bewirkt eine Verlängerung einer Helix und die Verkürzung der nachfolgenden Helixstruktur um jeweils zwei Aminosäuren. Eine Verkürzung einer Helix sowie eine Verlängerung einer Faltblattstruktur hat die Mutation L424P in *Crtl_{Rg}*EP21 zur Folge. Die Mutation L153P in *Crtl_{Rg}*EP22 hat eine um 2 Aminosäuren verkürzte Helix zur Folge, darüber hinaus verkürzt die Mutation L278P eine Helix um eine Aminosäure, hebt aber vor allem eine Faltblattstruktur von 4 Aminosäuren völlig auf.

Wahrscheinlich wurde die räumliche Struktur der Enzyme durch die Veränderungen so gestört, dass sie in ihrer katalytischen Funktion eingeschränkt wurden und nur eine geringere Anzahl von Desaturierungsschritten an einem Molekül Phytoen katalysieren konnten. In Abbildung III.30 sind die Aminosäuresequenzen der veränderten Proteinbereiche mit den jeweiligen Modifikationen der Sekundärstruktur dargestellt.

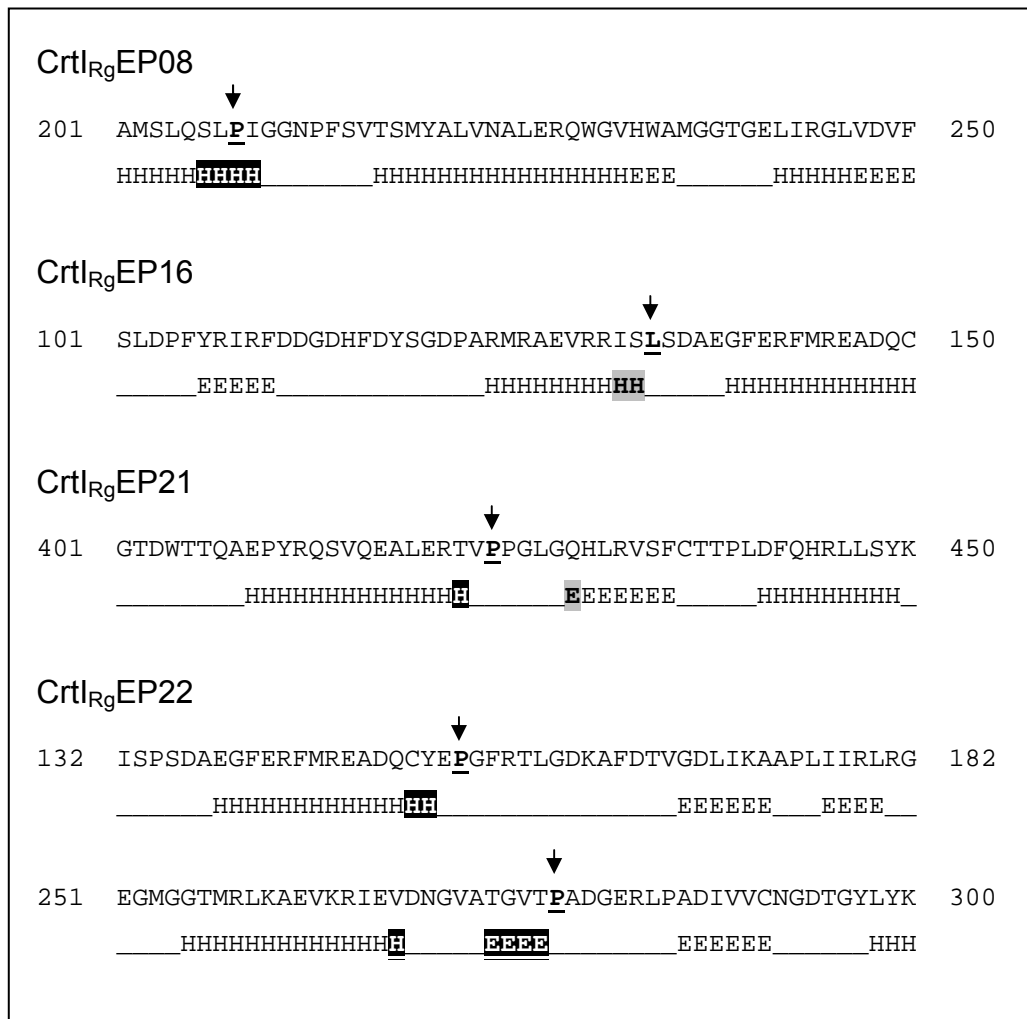


Abbildung III.30 Bereiche der veränderten Aminosäuresequenzen von CrtI_{Rg}EP08, CrtI_{Rg}EP16, CrtI_{Rg}EP21 und CrtI_{Rg}EP22 mit den jeweiligen Modifizierungen der Sekundärstruktur; ausgetauschte Aminosäuren sind mit einem Pfeil markiert, verkürzte Sekundärstrukturen sind schwarz und verlängerte Strukturen sind grau hinterlegt; Helixstruktur (H), Faltblattstrukturen (E); für die Analyse wurde die Software „Predator“ verwendet

Tabelle III.3 Verhältnis von Lycopin und Neurosporin (L:N) in den Carotinoidextrakten aus DH5 α [pACcrtEB_{EU}crtI_{Rg}WT] und den Klonen EP08, EP16, EP21 und EP22 sowie deren eingefügte Mutationen

Enzym	Aminosäuren- Austausch	Basenaustausch	Codon	L:N
CrtI _{Rg} WT	-	-	-	88:12
CrtI _{Rg} EP08	L208P*	T623C	CUC>CCC	3:97
CrtI _{Rg} EP16	Y44C	A131G	UAC>UGC	3:97
	D53G	A158G	GAC>GGC	
	P134L*	C400T,C401T	CCG>UUG	
	V395A	T184C	GUG>GCG	
CrtI _{Rg} EP21	T256M	C767T	ACG>AUG	0:100
	D355G	A1064G	GAC>GGC	
	L424P*	T1270C	CUG>CCG	
CrtI _{Rg} EP22	L153P*	T458C	CUG>CCG	12:88
	L278P*	T833C	CUG>CCG	

* Aminosäure-Austausch mit Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins

3.2 Klonierung der Mutationsbibliothek in pPEU32

Durch das Farbscreening der mit der pUCcrtI_{Rg}-Mutationsbibliothek komplementierten DH5 α [pACcrtEB_{EU}] Transformanten konnte keine Mutante, mit einem gegenüber DH5 α [pACcrtEB_{EU}pUCcrtI_{Rg}Wildtyp] erhöhten Lycopin-Anteil ermittelt werden. Die Ursache hierfür lag vor allem in den ungünstigen Bedingungen für das Farbscreening nach auffällig roten Kolonien. Da in DH5 α [pACcrtEB_{EU}pUCcrtI_{Rg}Wildtyp] durch die Verwendung des Plasmids pUC ein hoher Lycopin-Anteil gebildet wurde, waren schon die Kolonien mit dem unveränderten (Wildtyp-)CrtI_{Rg} rot gefärbt. Aus diesem Grund wurde die Mutationsbibliothek in pPEU32 kloniert. Komplementierungsversuche in *E. coli* mit dem Plasmid pPEUcrtI_{Rg} hatten gezeigt, dass bei der Verwendung dieses Plasmids *in vivo* nur ca. 20% Lycopin gebildet wurde und die Kolonien gelb-orange gefärbt waren. Daher schien das Plasmid pPEUcrtI_{Rg} deutlich besser für ein Farbscreening nach auffallend roten Zellkolonien mit höherem Lycopin-Anteil geeignet zu sein. crtI_{Rg}(mutiert) wurde aus der pUCcrtI_{Rg}-Mutationsbibliothek mittels *SacI*/*HindIII* herausgeschnitten und in einen ebenso *SacI*/*HindIII* geschnittenen pPEU32 ligiert. Nach Transformation von DH5 α -Zellen mit

dem Ligationsprodukt wurden ca. 8000 Bakterienkolonien von den LB-Platten abgewaschen und die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert. Mit der so gewonnenen pPEU*crtI*_{Rg}-Mutationsbibliothek wurden DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}] Zellen transformiert und ein Farbscreening nach auffallend roten Kolonien durchgeführt. Auf den LB-Platten befanden sich nach Inkubation über Nacht zahlreiche gelb-orange gefärbte Kolonien und einige Kolonien mit rötlicherem Farbton (Abbildung III.31). Der Carotinoideextrakt einer dieser in Flüssigkultur überimpften Klone (Klon EP05) besaß einen mit 85%, gegenüber der Kontrolle mit dem unveränderten Enzym, stark erhöhten Lycopin-Anteil. Der Carotinoideextrakt enthielt nur 15% Neurosporin. Die Kontrolle DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu} pPEU*crtI*_{Rg}WT] synthetisierte 25% Lycopin und 75% Neurosporin.

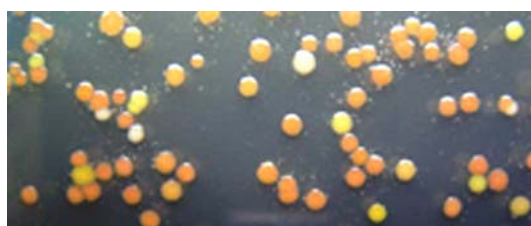


Abbildung III.31 Komplementierung Phytoen bildender *E. coli*-Transformanten mit einer pPEU*crtI*_{Rg}-Mutationsbibliothek

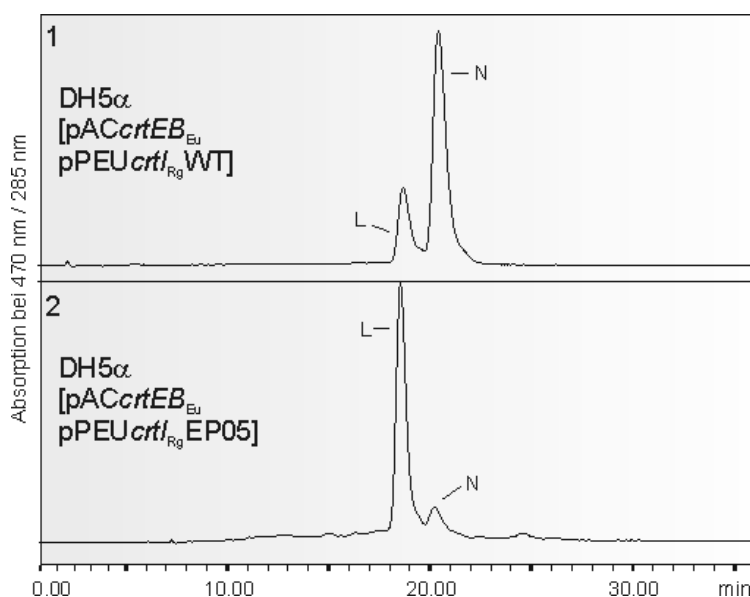


Abbildung III.32 HPLC-Elutionsprofil von Carotinoideextrakten aus 1) DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}pUC*crtI*_{Rg}WT] (Kontrolle) und 2) DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}pPEU*crtI*_{Rg}EP05] (Mutante); Lycopin (L), Neurosporin (N); die Detektion erfolgte bei 470 nm (0 - 30 min) und 285 nm (30 - 36 min)

Eine Sequenzierung des aus der Mutante isolierten Plasmids pPEU*crtI*_{Rg}EP05 zeigte, dass im Leseraster von *crtI*_{Rg}EP05 ein Nukleotid ausgetauscht und die Base Thymin in Position 622, durch Cytosin ersetzt worden war (C622T). Die Mutation der

Nukleotidsequenz hatte einen Aminosäure-Austausch in Position 208 des Proteins zur Folge, wobei Leucin durch Phenylalanin ersetzt wurde (L208F).

Um zu überprüfen, ob der erhöhte Lycopin-Anteil in dem Klon EP05 durch eine gesteigerte Expression von $CrtI_{Rg}EP05$ hervorgerufen wurde, wurden DH5 α -Zellen sowohl mit pPEU $crtI_{Rg}EP05$ als auch mit pPEU $crtI_{Rg}WT$ transformiert. Abbildung III.33 zeigt das Gel einer SDS-PAGE bei der Homogenat, Überstand und Membranfraktion von DH5 α [pPEU $crtI_{Rg}WT$] und DH5 α [pPEU $crtI_{Rg}EP05$] aufgetragen wurden. Es zeigte sich das die Phytoen-Desaturase in beiden Kulturen etwa gleich stark und in hohen Anteilen löslich im Überstand exprimiert wurde.

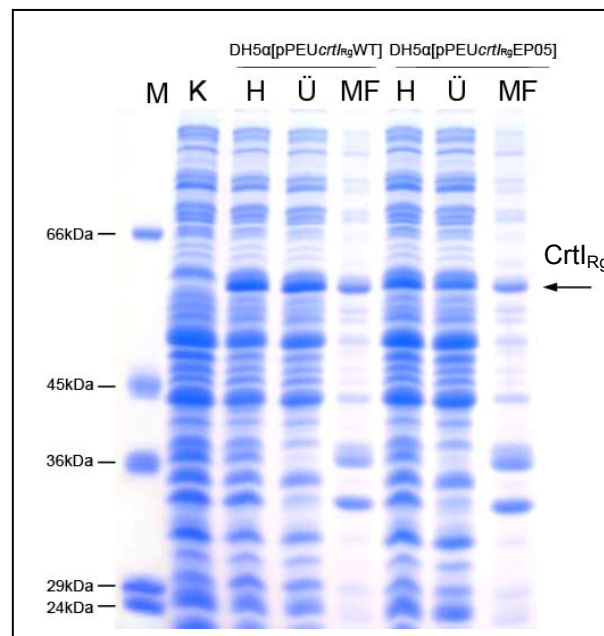


Abbildung III.33 SDS-PAGE von Proteinen, aus Homogenat von DH5 α [pPEU32] (K); Homogenat (H), Überstand (Ü) und Membranfraktion (MF) von DH5 α [pPEU $crtI_{Rg}WT$] sowie Homogenat, Überstand, und Membranfraktion aus DH5 α [pPEU $crtI_{Rg}EP05$]; Molmassenstandard (M)

Dass sowohl die unveränderte, als auch die modifizierte Phytoen-Desaturase etwa in gleichen Mengen in *E. coli* exprimiert wurde, bedeutet, dass die Expressionsstärke nicht der ausschlaggebende Parameter für die erhöhte Anzahl der durch das Expressionsprodukt von $crtI_{Rg}EP05$ katalysierten Desaturierungen sein konnte, sondern die Mutation zu einer gesteigerten Aktivität geführt haben musste.

3.3 *In vitro* Enzymtest mit pPEUcrtI_{Rg}EP05

Nach Zellaufschluss und Zentrifugation von DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}EP05] konnte der gewonnene Überstand für *in vitro* Enzymtests genutzt werden, um die modifizierte Phytoen-Desaturase enzymatisch zu charakterisieren.

3.3.1 K_m -Wert Bestimmung von CrtI_{Rg}EP05 für die Substrate Phytoen und Neurosporin

Zur Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte wurden die gemessenen Enzymaktivitäten von CrtI_{Rg}EP05 für die Substrate Phytoen (A) und Neurosporin (B) (jeweils 2 - 50 μ M) nach Lineweaver-Burk doppelt reziprok aufgetragen (Abbildung III.34). Für Phytoen wurde ein K_m -Wert von 4,8 μ M und ein V_{max} -Wert von 5,2 nmol/h*mg CrtI_{Rg}EP05 ermittelt. Für Neurosporin lag der K_m -Wert bei 66 μ M mit einem korrespondierenden V_{max} -Wert von 3,3 nmol/h*mg CrtI_{Rg}. Die Spezifitätskonstanten (V_{max}/K_m) der Enzymreaktionen der Mutante lagen mit 108×10^2 für Phytoen und 5×10^2 für Neurosporin ca. 3 mal so hoch, wie die entsprechenden Werte der Wildtyp-Desaturase CrtI_{Rg}WT (35×10^2 für Phytoen und $1,8 \times 10^2$ für Neurosporin). Dabei lag der K_m -Wert von CrtI_{Rg}EP05 für Phytoen mit 4,8 μ M deutlich niedriger als für CrtI_{Rg}WT ($K_m=14,8 \mu$ M), wohingegen die Werte des V_{max} identisch waren. Für Neurosporin lag der K_m -Wert von CrtI_{Rg}EP05 doppelt so hoch wie der, der unmodifizierten Phytoen-Desaturase CrtI_{Rg}WT; der V_{max} -Wert der Mutante war allerdings um das 5,5-fache erhöht. Die Daten zeigen, dass die modifizierte Phytoen-Desaturase CrtI_{Rg}EP05 eine gegenüber dem unveränderten Enzym CrtI_{Rg}WT deutlich erhöhte Spezifität für Phytoen und Neurosporin besaß und das Potential, eine vierte Desaturierung zu katalysieren, bei CrtI_{Rg}EP05 gesteigert war.

Der Korrelationskoeffizient (R) war bei den Messungen größer als 0,9.

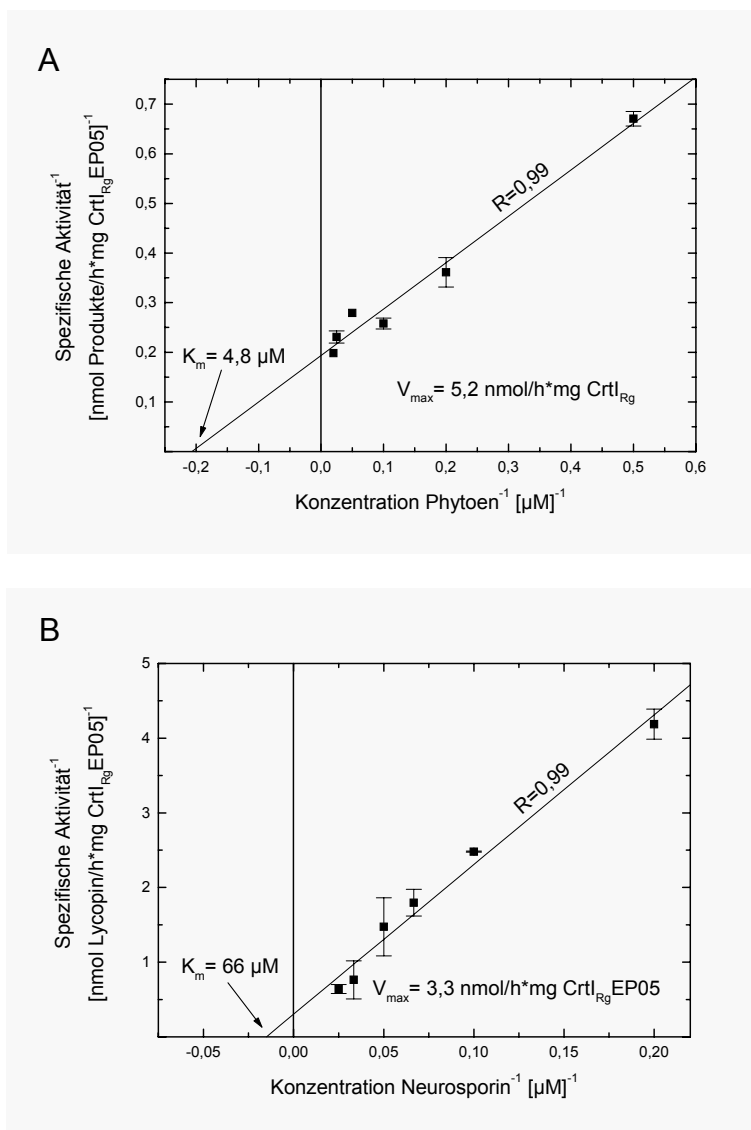


Abbildung III.34 K_m -Wert-Bestimmung der mutierten Phytoen-Desaturase Crtl_{Rg}EP05 für die Substrate Phytoen (A) und Neurospirin (B); doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk

3.3.2 Untersuchung der Korrelation zwischen Enzymmenge von Crtl_{Rg}EP05 und dem Anteil des gebildeten Lycopins

Um zu untersuchen, ob sich wie schon für die nicht mutierte Phytoen-Desaturase Crtl_{Rg}WT eine Korrelation zwischen Enzym- und Lycopin-Menge *in vitro* zeigen lässt, wurden Enzymtests mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen von Crtl_{Rg}EP05 bei einer konstanten Phytoen-Konzentration von 20 μM durchgeführt. In Abbildung III.35 B sind die Produktmengen von Lycopin und Neurospirin bei steigender Enzymkonzentration dargestellt. Der prozentuale Lycopin-Anteil am Gesamtprodukt wurde in Teil-Abbildung III.35 B gegen die Enzymkonzentration aufgetragen. Bei einer Enzymkonzentration von 34 μg/ml wurden 0,09 μg Lycopin und damit ein Anteil von 17% am Gesamtprodukt (Neurospirin und Lycopin) gebildet. Mit zunehmender

Enzymmenge stiegen die absolute und die relative Menge von Lycopin deutlich an und lagen bei einer Proteinkonzentration von 326 $\mu\text{g/ml}$ bei 1,48 μg (59% vom Gesamtprodukt). Somit stieg der Anteil von Lycopin am Gesamtprodukt, bei einer um das 10-fache erhöhten Proteinmenge um den Faktor 3,5.

Wie schon zuvor für die nicht mutierte Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* sowie die Phytoen-Desaturase aus *Rba. sphaeroides*, konnte auch für $\text{CrtI}_{\text{Rg}}\text{EP05}$ eine nahezu lineare Korrelation zwischen Enzymmenge und dem Anteil des gebildeten Lycopins gezeigt werden.

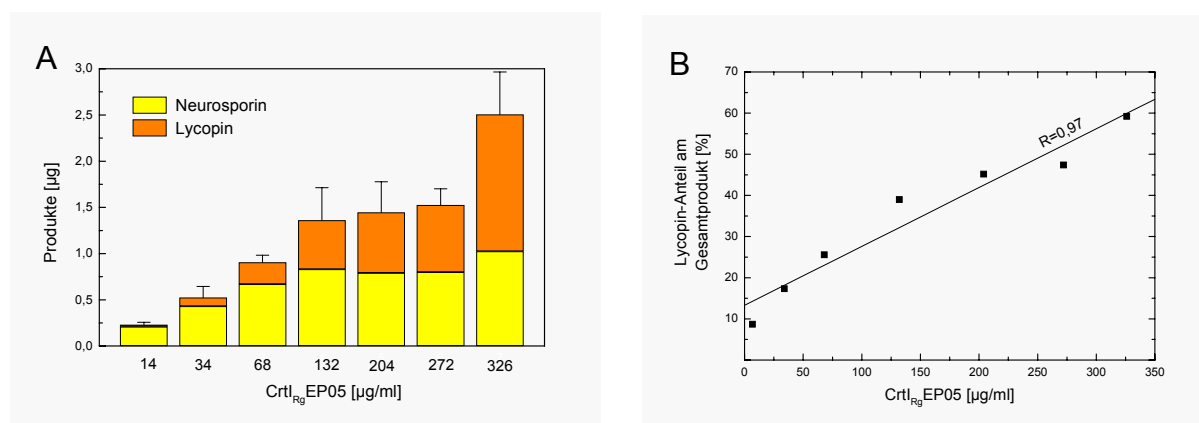


Abbildung III.35 Korrelation von Enzymmenge und Anteil des Lycopins am gebildeten Gesamtprodukt der enzymatischen Reaktion von $\text{CrtI}_{\text{Rg}}\text{EP05}$; in Teil-Abbildung A) sind die gemessenen Carotinoidmengen gegen die Enzymmenge aufgetragen; in Teil-Abbildung B) ist der prozentuale Lycopin-Anteil gegen die Enzymmenge aufgetragen

Die mittels der Software „Predator“ durchgeführte Analyse der Sekundärstruktur zeigte, dass die Mutation in $\text{crtI}_{\text{Rg}}\text{EP05}$ die Verkürzung einer Helixstruktur im Protein um eine Aminosäure bewirkt (Abbildung III.36).

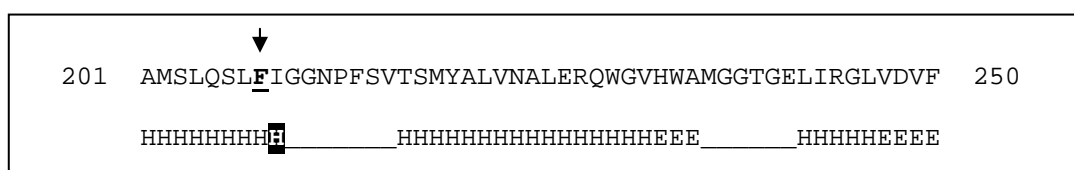


Abbildung III.36 Bereich der veränderten Aminosäuresequenz von $\text{CrtI}_{\text{Rg}}\text{EP05}$ mit der zugehörigen Modifizierung der Sekundärstruktur; die ausgetauschte Aminosäure ist mit einem Pfeil markiert, die verkürzte Sekundärstruktur ist schwarz hinterlegt; Helixstruktur (H), Faltblattstrukturen (E); die Analyse wurde mit der Software „Predator“ durchgeführt

Untersuchungen mit der Software „TopPred“ (von Heijne, 1992; Claros & von Heijne, 1994) zeigten, dass sich die Mutation in einem sehr hydrophoben, mit hoher Wahrscheinlichkeit membranassoziierten Bereich befand. Der Austausch von Leucin

durch Phenylalanin verstärkte die Lipophilie, so dass der Bereich wahrscheinlich stärker in die Membran eingebunden wurde, was möglicherweise die in der Membran stattfindenden katalytischen Desaturierungsprozesse unterstützt. Ein mittels „TopPred“ kalkulierter Wahrscheinlichkeitswert für die Lokalisierung in der Membran ergab für den Helixbereich um die Aminosäure 208, bei der nicht modifizierten Aminosäuresequenz einen Wert von 1,116, für die Mutante CrtI_{Rg}EP05 konnte ein um 5% höherer Wert von 1,172 ermittelt werden (>1,0 = wahrscheinlicher Membranbereich).

Das modifizierte Enzym CrtI_{Rg}EP05 besitzt die Mutation L208F an der gleichen Position wie die bereits in III.3.1.1 vorgestellte modifizierte Phytoen-Desaturase CrtI_{Rg}EP08 (aus der pUCcrtI_{Rg}-Mutationsbibliothek). Für die enzymatische Aktivität von CrtI_{Rg}EP08 hat dabei der Austausch von Leucin durch Prolin (L208P) einen negativen Einfluss auf die Anzahl der katalysierten Desaturierungsreaktionen. „TopPred“ Analysen zeigten, dass die Lipophilie durch die Mutation in CrtI_{Rg}EP08 gegenüber CrtI_{Rg}EP05 um ca. 20% niedriger war und mit einem Wert von 0,969 knapp unter dem kritischen Wert von 1 lag. Das heißt, dass die Membranassoziation von CrtI_{Rg}EP08 gegenüber der unmodifizierten Phytoen-Desaturase (CrtI_{Rg}WT) und der modifizierten Phytoen-Desaturase CrtI_{Rg}EP05 deutlich verringert war. Die Ergebnisse der „TopPred“ Analyse sind in Abbildung III.37 graphisch dargestellt.

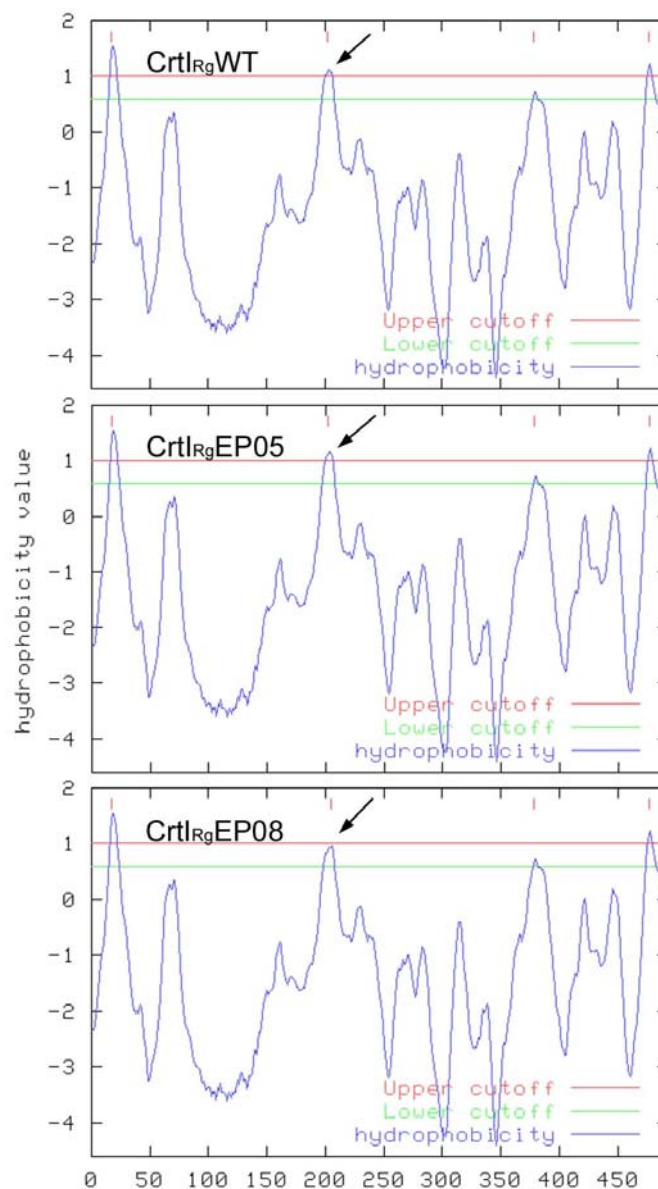


Abbildung III.37 „TopPred“-Analyse der Aminosäuresequenzen von $CrtI_{Rg}WT$, $CrtI_{Rg}EP05$ und $CrtI_{Rg}EP08$ hinsichtlich ihrer hydrophoben Bereiche und wahrscheinlichen Membrandomänen

3.4 Mutagenisierung von $pTrc_{crtI_{Rg}}$ mittels XL1-Red

XL1-Red (Stratagene) ist ein mutagenisierender *E. coli*-Stamm, mit dem Plasmid-DNA zufällig mutagenisiert und Mutationsbibliotheken erstellt werden können. Neben der Error Prone PCR-Methode sollten auch hierdurch zufällige Mutationen in $crtI_{Rg}$ eingefügt werden. Gegenüber der Error Prone PCR besitzt die Mutagenisierung mittels XL1-Red den Vorteil, dass die mutierten und im Anschluss isolierten Plasmide direkt für eine Komplementierung verwendet werden können. Ein Nachteil ist

allerdings, dass alle Bereiche des Plasmids (Promotor, Antibiotikaresistenz etc.) von Mutationen betroffen sein können, was zu Artefakten beim späteren Farbscreening oder zum „Funktionsverlust“ des Expressionsvektors führen kann. Die Nukleotidsequenzen von *crtl*_{Rg} aus Klonen mit einem veränderten Lycopin/Neurosporin-Verhältnis sollten auf Mutationen hin untersucht werden. Die Modifikationen der daraus resultierenden Aminosäuresequenzen sollten Hinweise auf funktionelle Bereiche und die Funktionsweise der Phytoen-Desaturase geben.

Mit aus den Kulturen von XL1-Red gewonnenen pTrc*crtl*_{Rg}-Mutationsbibliotheken wurden Phytoen bildende *E. coli* transformiert. Ein Farbscreening der Zellkolonien zeigte ca. 40.000 orange-rot gefärbte Kolonien. Zwei Kolonien konnten gefunden werden, welche stärker rot gefärbt waren als die restlichen Kolonien. Die roten Klone wurden kultiviert und die daraus extrahierten Carotinoide über HPLC analysiert. In allen Kulturen wurde Lycopin (Retentionszeit 18,5 min; Absorptionsmaxima 445 nm, 472 nm und 505 nm) und Neurosporin (Retentionszeit 21 min; Absorptionsmaxima 417 nm, 442 nm und 470 nm) gebildet. Der Carotinoideextrakt aus DH5α[pAC*crtEB*_{Eu}pTrc*crtl*_{Rg}WT] besaß einen Lycopin-Anteil von 35%. Die Extrakte aus den Klonen DH5α[pAC*crtEB*_{Eu}pTrc*crtl*_{Rg}3218] und DH5α[pAC*crtEB*_{Eu}pTrc*crtl*_{Rg}5405] enthielten mit 58% bzw. 56% einen deutlich erhöhten Lycopin-Anteil. Die Elutionsprofile der Carotinoideextrakte aus Kulturen der Kontrolle und den zwei Klonen DH5α[pAC*crtEB*_{Eu}pTrc*crtl*_{Rg}3218] und DH5α[pAC*crtEB*_{Eu}pTrc*crtl*_{Rg}5405] sind in Abbildung III.38 gezeigt.

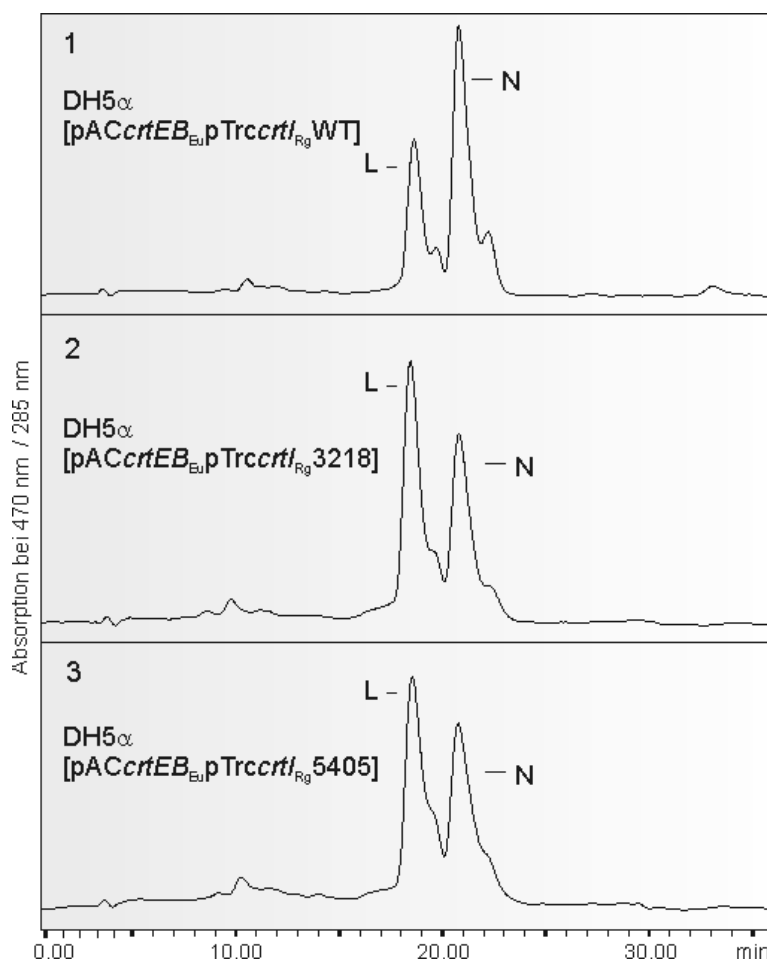


Abbildung III.38 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus den Komplementierungen DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pTrcctl_{Rg}WT] (Kontrolle), DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pTrcctl_{Rg}3218] und DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pTrcctl_{Rg}5405]; Lycopin (L), Neurosporin (N) die Detektion erfolgte bei 470 nm (0 - 30 min) und 285 nm (30 - 36 min)

Sequenzanalysen zeigten, dass sich in den Leserastern des für die Phytoen-Desaturase kodierenden Gens sowohl in pTrcctl_{Rg}3218, als auch in pTrcctl_{Rg}5405 keine Mutation befand. Allerdings konnte jeweils eine Mutation ermittelt werden, welche im Bereich der MCS zwischen dem Startcodon des Plasmids und dem Startcodon des *crtI*_{Rg}-Leserasters lag. Die Mutation in pTrcctl_{Rg}3218 bewirkte keinen Aminosäureaustausch, sondern nur einen Codonwechsel von CUC zu CUU. Beide Triplets kodieren für die Aminosäure Leucin und besitzen in *E. coli* etwa die gleiche Häufigkeit mit 10/1000 As bzw. 12/1000 As. Bei der Mutante pTrcctl_{Rg}5405 hat das veränderte Codon GGA zu GAA einen Austausch von Glycin durch Glutaminsäure zur Folge. Dabei ist die Häufigkeit des Codons GAA (38/1000 AS) um das 4-fache gegenüber GGA (10/1000 As) erhöht. Dies könnte sich förderlich auf die Geschwindigkeit der Translation und damit auf die Menge des gebildeten CrtI_{Rg} auswirken. Eine SDS-PAGE mit Proteinen aus komplementierten Bakterien zeigte,

dass die Phytoen-Desaturase in DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}pTrc*crtI*_{Rg}3218] und DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu} pTrc*crtI*_{Rg}5405] mit 9% bzw. 4% vom Gesamtprotein deutlich stärker gebildet wurde, als in der Komplementierung mit der nicht mutierten DNA DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}pTrc*crtI*_{Rg}WT] (1,6%) (Abbildung III.39).

Um zu untersuchen, ob die Mutationen in der MCS einen Einfluss auf die Expressionsstärke sowie den veränderten Lycopin-Anteil hatten, wurden die Mutationen entfernt. Hierfür wurde *crtI*_{Rg} jeweils aus pTrc*crtI*_{Rg}3218 und pTrc*crtI*_{Rg}5405 mittels *SacI*/*HindIII* herausgeschnitten und in einen ebenso geschnittenen pTrc*crtI*_{Rg}WT (aus dem *crtI*_{Rg}WT entfernt wurde) ligiert. Durch diese Strategie konnten die von der *SacI*-Schnittstelle in 5'-Richtung gelegenen Mutationen entfernt werden. Komplementierungen mit den neuen Konstrukten zeigten keinen erhöhten Lycopin-Anteil und keine verstärkte Expression der Phytoen-Desaturase. Dies bestätigte, dass die Mutationen in der MCS für die höhere Expression von *CrtI*_{Rg} und die damit verbundenen Änderungen der Lycopin/Neurosporin-Verhältnisse verantwortlich waren. In

Tabelle III.4 sind die Daten zusammenfassend dargestellt.

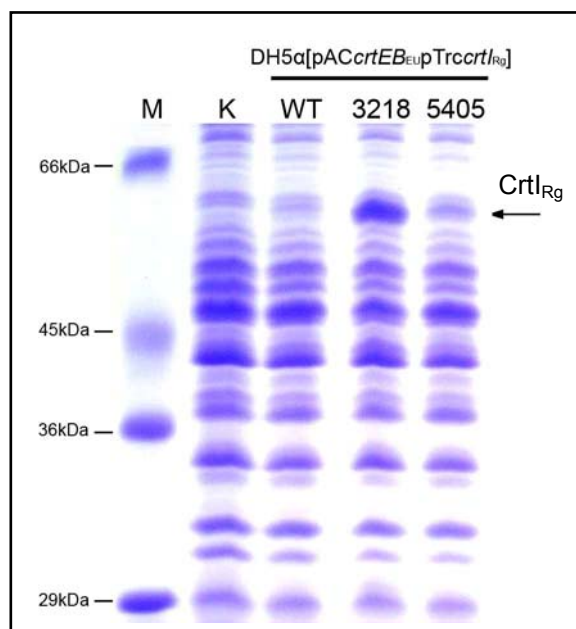


Abbildung III.39 SDS-PAGE von Proteinen aus Homogenaten von DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}pTrc*crtI*_{Rg}WT] (Kontrolle), DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}pTrc*crtI*_{Rg}3218] und DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}pTrc*crtI*_{Rg}5405]

Tabelle III.4 Quantifizierung der Carotinoide aus DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pTrccrtI_{Rg}WT], DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pTrccrtI_{Rg}3218] und DH5 α [pACcrtEB_{Eu}pTrccrtI_{Rg}5405]; Lycopin/Neurosporin-Verhältnis (L:N) sowie prozentualer Anteil von CrtI_{Rg} am Gesamtprotein

Klon	Carotinoid [μ g]			L : N	CrtI _{Rg} [% vom Gesamtprotein]
	Lycopin	Neurosporin	Phytoen		
WT	0,39	0,67	0,04	36 : 64	1,6
3218	0,52	0,37	-	58 : 42	9
5405	0,43	0,34	-	56 : 44	4

3.4.1 Klonierung von Mutationsbibliotheken aus pTrc99a in pPEU32

Eine Umklonierung der in XL1-Red hergestellten pTrccrtI_{Rg}-Mutationsbibliothek in das Plasmid pPEU32 sollte die Bedingungen für ein Farbscreening (nach Komplementierung) nach auffällig rot gefärbten Bakterienkolonien verbessern. Daneben sollten durch diese Strategie Mutationen im Vektorbereich entfernt werden. Mutationen außerhalb des Leserasters von *crtI*_{Rg} können möglicherweise zu einer Veränderung der Expressionsstärke der Phytoen-Desaturase führen und eine dadurch bedingte Verschiebung des Lycopin/Neurosporin-Verhältnisses zur Folge haben. Die mittels XL1-Red-Mutagenisierung bei einer Inkubationsdauer von 48 h hergestellte *crtI*_{Rg}-Mutationsbibliothek wurde *SacI/HindIII* aus der pTrccrtI_{Rg} Mutationsbibliothek herausgeschnitten und in einen ebenfalls *SacI/HindIII* geschnittenen pPEU32 kloniert. Durch Abwaschen der mit dem Ligationsprodukt transformierten *E. coli*-Kolonien von den LB-Platten und der anschließenden Isolation der Plasmide, wurde eine pPEU*crtI*_{Rg}-Mutationsbibliothek erstellt. Mit dieser Mutationsbibliothek wurden Phytoen bildende *E. coli* transformiert. Ausgewählte Klone wurden in Flüssigmedium kultiviert und die gebildeten Carotinoide extrahiert. In

Abbildung III.40 ist ein Foto von Flüssigkulturen der mittels Farbscreening ausgewählten Klone r4802, r4804, r4805, r4806 sowie einer Kontrolle mit der nicht modifizierten Phytoen-Desaturase gezeigt.



Abbildung III.40 Bakterienkulturen von DH5α[pACcrtEB_{Eu}pPEUcrtI_{Rg}] der Klone r4802, r4804, r4805, r4806 sowie der Kontrolle mit der unveränderten Phytoen-Desaturase (WT)

Die Analyse der aus den Kulturen gewonnenen Carotinoide über HPLC zeigte, dass sowohl die Komplementierer mit der nicht mutierten Phytoen-Desaturase, sowie die ausgewählten Klone Lycopin (Retentionszeit 18,5 min; Absorptionsmaxima 445 nm, 472 nm und 505 nm) und Neurosporin (Retentionszeit 21 min; Absorptionsmaxima 417 nm, 442 nm und 470 nm) gebildet hatten. Jedoch unterschieden sich die Extrakte hinsichtlich des Verhältnisses der beiden Carotinoide. Die Zellen der Kontrolle DH5α[pACcrtEB_{Eu}pPEUcrtI_{Rg}WT] bildeten nur 7% Lycopin (und entsprechend 93% Neurosporin). Der Anteil des in dem Klon r4806 gebildeten Lycopins lag mit 8% im Bereich des Lycopin-Anteils, der mit dem unmutierten Gen komplementierten *E. coli*-Transformanten. Die Klone r4805 und r4804 wiesen mit 21% bzw. 49% deutlich mehr Lycopin auf. Mit einem Lycopin/Neurosporin-Verhältnis von 79:21 bildete der Klon r4802 den höchsten Lycopin-Anteil. Die HPLC-Elutionsprofile von Carotinoideextrakten aus den Kulturen der Klone r4802, r4804, r4805 und r4806 sowie der Wildtypkontrolle sind in Abbildung III.41 dargestellt.

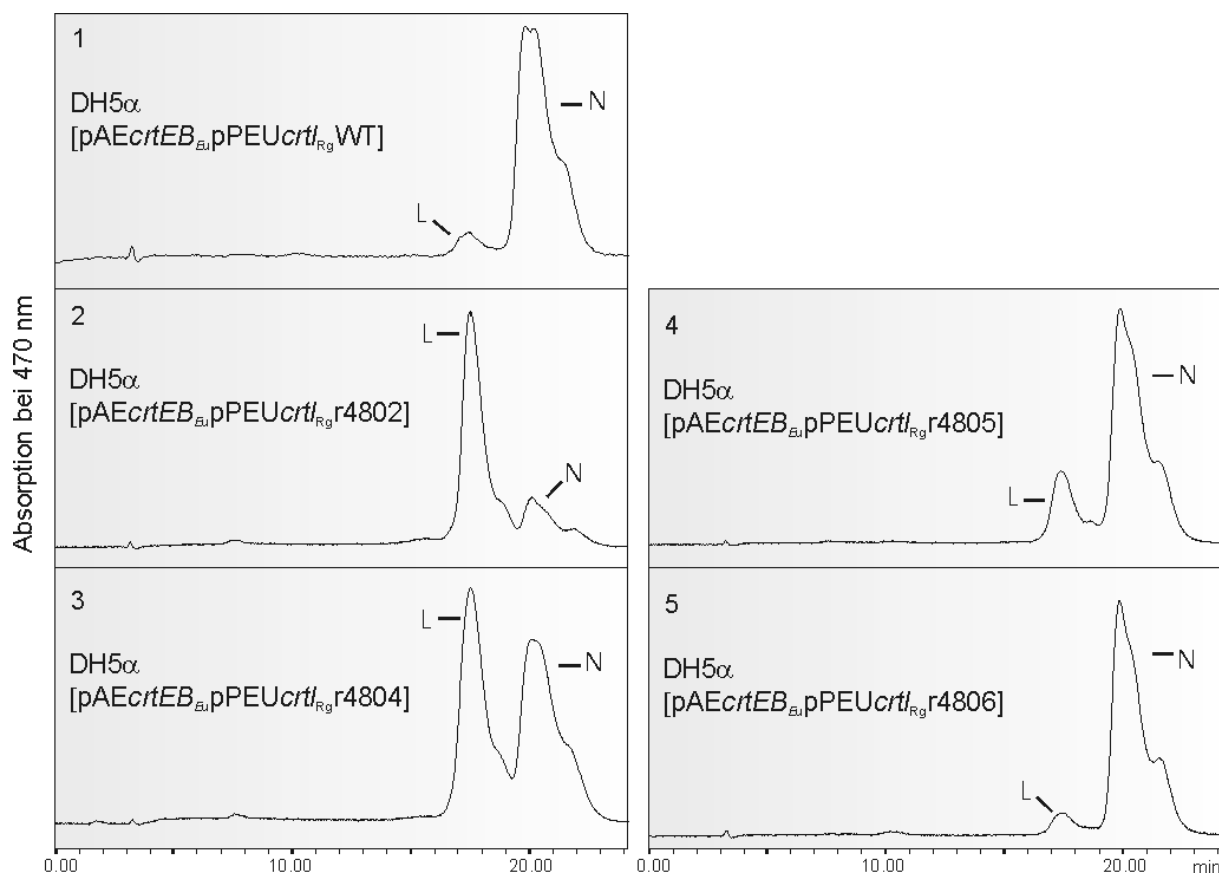


Abbildung III.41 HPLC-Elutionsprofile der Carotinoide aus den Flüssigkulturen von DH5α[pAECrtEB_{Eu} pPEUcrtI_{Rg}WT] (Kontrolle) sowie der Klone r4802, r4804, r4805, r4806; die Detektion erfolgte bei 470 nm

Sequenzierungen der aus den ausgewählten Klonen isolierten Plasmid-DNA pPEUcrtI_{Rg}r4802, pPEUcrtI_{Rg}r4804 und pPEUcrtI_{Rg}r4805 zeigten, dass die *crtI*_{Rg}-Leseraster von pPEUcrtI_{Rg}r4802 und pPEUcrtI_{Rg}r4805 mutiert waren. pPEUcrtI_{Rg}r4802 besaß eine Mutation der DNA in Position 670 (A670G). Diese Mutation bewirkte einen Austausch der Aminosäure Asparagin durch Serin an Position 224 des Polypeptids (N224S). Der Austausch hatte einen Einfluss auf die lipophilen Eigenschaften des Enzyms. So stieg der mit der Software „TopPred“ ermittelte Wahrscheinlichkeitswert für eine Membrandomäne in dem Bereich der Mutation von 1,116 bei der unveränderten Phytoen-Desaturase auf einen Wert von 1,231 und damit um 10% bei CrtI_{Rg}r4802 an. Die Mutation betraf den gleichen Membranbereich wie in den modifizierten Phytoen-Desaturasen CrtI_{Rg}EP05 (1,172) bzw. CrtI_{Rg}EP08 (0,969). pPEUcrtI_{Rg}r4805 enthielt eine Mutation (C884T), welche keinen Aminosäure-austausch bewirkte sowie zwei Mutationen, die zu Aminosäureaustauschen führten. Dabei wurde durch die Mutation G475A ein Austausch von Glycin durch Serin in Position 159 (G159S) und durch die Mutation

A1108G ein Austausch von Tyrosin durch Cystein in Position 370 (Y370C) bewirkt. Sowohl im Leseraster von *crtI_{Rg}*, sowie in dem in 3'-5' Richtung liegenden vektoriiellen Bereich (MCS/Promotor) konnte in pPEU*crtI_{Rg}*r4804 keine Mutation festgestellt werden. Die DNA des Klon r4806 wurde nicht sequenziert, da das Lycopin/Neurosporin-Verhältnis gegenüber dem nicht mutierten Enzym unverändert und eine mögliche Mutation somit indifferent war.

Eine SDS-PAGE (Abbildung III.43A) zeigte, dass *crtI_{Rg}* in den Kulturen von DH5α[pAC*crtE_{B_{Eu}}* pPEU*crtI_{Rg}*] der Klone r4802, r4804, r4805, r4806 und Wildtyp unterschiedlich stark exprimiert wurde. Alle Kulturen wurden bei der gleichen Zelldichte ($OD_{600} = 1$) geerntet. Für den Klon r4802, welche den größten Anteil Lycopin bildete (79%), konnte mit 552 μg CrtI_{Rg}/ml auch die größte Menge an CrtI_{Rg} bestimmt werden. Klon r4804 (nicht mutiert) bildete 329 μg CrtI_{Rg}/ml und einen Lycopin-Anteil von 49%. Klon r4805 bildete 21% Lycopin und 299 μg CrtI_{Rg}/ml. Klon r4806 besaß einen Lycopin-Anteil von 8% und eine korrespondierende CrtI_{Rg}-Menge von 264 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sowohl der prozentuale Lycopin-Anteil, sowie die Enzymmenge von Klon r4806 entsprachen in etwa den für die Komplementierung mit der nicht mutierten Phytoen-Desaturase erhobenen Daten von 7% Lycopin und 263 μg CrtI_{Rg}/ml. Allerdings bildete der Klon r4806 mit 182 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nahezu die doppelte Carotinoid Gesamtmenge im Vergleich zu den Komplementierungen mit der unveränderten Phytoen-Desaturase (98 $\mu\text{g}/\text{ml}$). In Abbildung III.42 ist die Korrelation des prozentual gebildeten Lycopins und der Enzymmenge, bezogen auf 1 ml der Bakterienkultur, dargestellt.

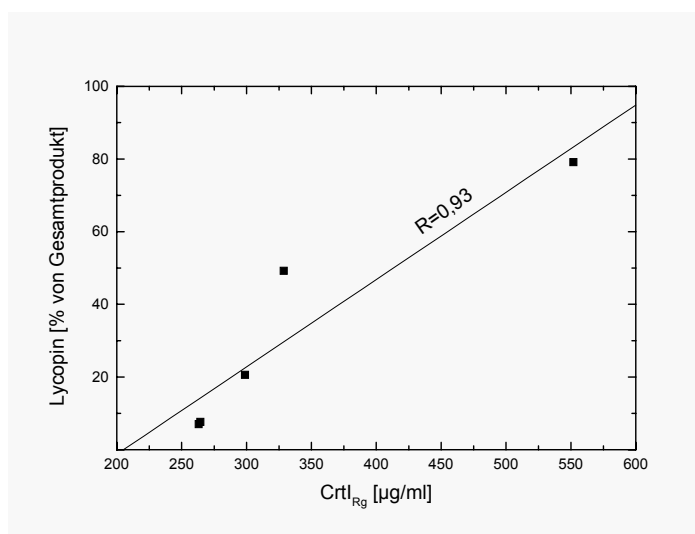


Abbildung III.42 Korrelation zwischen der CrtI_{Rg}-Menge pro ml und dem prozentualen Lycopin-Anteil in Kulturen der Klone r4802, r4804, r4805, r4806 sowie DH5α[pAC*crtE_{B_{Eu}}*pPEU*crtI_{Rg}*WT]

Bei der Isolation der Plasmid-DNA aus den Klonen r4802, r4804, r4805, r4806 und der Auftrennung der *SacI/HindIII* geschnittenen Plasmide über ein Agarosegel zeigte sich, dass die Plasmide in den Klonen unterschiedlich stark repliziert worden waren (pPEUcrtI_{Rg}-Fragment mit ca. 4500 bp). Dieses lies sich auch nach erneuter Transformation von DH5 α -Zellen mit den mutierten und nicht mutierten Plasmiden und einer anschließenden Plasmidisolierung bestätigen (Abbildung III.43B). Dabei wurden die Bakterienkulturen jeweils bis zur gleichen Zelldichte (OD₆₀₀=1) kultiviert. Die Kultur von DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}r4802] wies eine um das 4-fache erhöhte Plasmid-Menge (pPEUcrtI_{Rg}r4802) gegenüber DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}WT] auf. Auch für DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}r4804] und DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}r4805] war eine etwas gestiegene Plasmid-Kopienzahl festzustellen. DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}r4806] bildete etwa die gleiche Menge DNA wie der Wildtyp. Die in den unterschiedlichen Klonen gebildete DNA wurde in Abbildung III.44 gegen die Menge CrtI_{Rg} aufgetragen. Die Carotinoid- und CrtI_{Rg}-Mengen sowie die DNA-Konzentrationen mit den dazugehörigen Mutationen sind in Tabelle III.5 zusammengefasst.

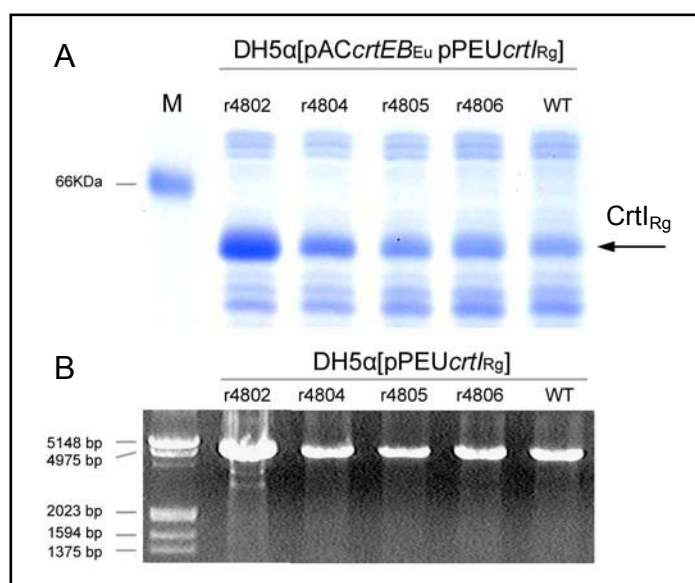


Abbildung III.43 A) SDS-PAGE von Proteinen aus Kulturen von DH5 α [pACcrtEB_{Eu} pPEUcrtI_{Rg}] der Klone r4802, r4804, r4805, r4806 sowie DH5 α [pACcrtEB_{Eu} pPEUcrtI_{Rg}WT]; B) Agarose Gel: Plasmid-DNA aus DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}4802], DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}4804], DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}4805], DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}4806] sowie DH5 α [pPEUcrtI_{Rg}WT]

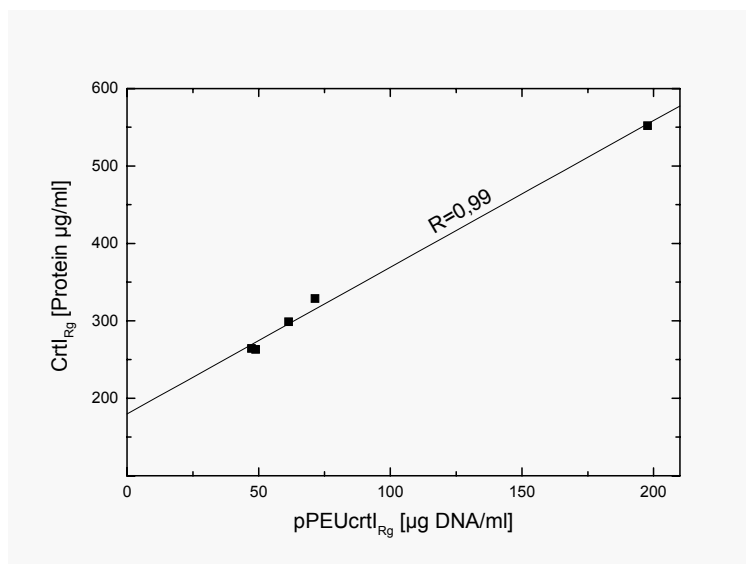


Abbildung III.44 Korrelation zwischen der gebildeten DNA-Menge (pPEUcrtI_{Rg}) und der Menge Phytyl-Desaturase in Kulturen der Mutanten DH5α[pPEUcrtI_{Rg}4802], DH5α[pPEUcrtI_{Rg}4804], DH5α[pPEUcrtI_{Rg}4805], DH5α[pPEUcrtI_{Rg}4806] sowie DH5α[pPEUcrtI_{Rg}WT]

Tabelle III.5 Carotinoid- und Enzymmengen und zugehörige Mutationen von DH5α[pACcrtEB_{Eu} pPEUcrtI_{Rg}WT] und den Klonen r4802, r4804, r4805 und r4806 sowie korrespondierende DNA-Mengen aus Kulturen von DH5α[pPEUcrtI_{Rg}WT], DH5α[pPEUcrtI_{Rg}4802], DH5α[pPEUcrtI_{Rg}4804], DH5α[pPEUcrtI_{Rg}4805] und DH5α[pPEUcrtI_{Rg}4806]

Klon	Aminosäure-Austausch	Basen-Austausch	Codon	Carotinoid [ng/ml]			L:N	CrtI _{Rg} [µg/ml]	DNA [µg/ml]
				Lycopin	Neurosporin	Gesamt-Carotinoid			
WT	-	-	-	7	88	95	7:93	263	49
r4802	N224S	A670G	AAC>AGC	135	35	170	79:21	552	198
r4804	-	-	-	126	130	256	49:51	329	71
r4805	G159S	G475A	GGC>ACG	56	214	270	21:79	299	61
	-	T885C	ACU>ACC						
	Y370C	A1109G	UAC>UGC						
r4806	n.f.	n.f.	n.f.	14	168	182	8:92	264	47

3.5 Gezielte Mutagenisierung von pTrc*crt*_{Rg} mittels mutagenisierender inverser PCR

Wang & Liao (2001) konnten zeigen, dass ein auf eine Mutation zurückzuführender Aminosäureaustausch in der Phytoen-Desaturase aus *Rba. sphaeroides* zu einer Erhöhung der katalytischen Aktivität führte, d.h. es wurde in den Komplementierungen mit der modifizierten Phytoen-Desaturase ein um 36% erhöhter Lycopin-Anteil beobachtet. Die Mutation lag in einer konservierten Region des Polypeptids (Basenaustausch T203A, Aminosäureaustausch V68D). Die Aminosäuresequenzen der Phytoen-Desaturasen aus *Rba. sphaeroides* und *Rvi. gelatinosus* sind hoch homolog. So besitzt *Crt*_{Rg} in Position 78 ebenfalls die Aminosäure Valin (Verschiebung durch 10 zusätzliche N-terminale Aminosäuren). Es sollte untersucht werden, ob eine entsprechende Mutagenisierung von *crt*_{Rg} auch zu einer Veränderung der katalytischen Eigenschaften der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* führt. Durch gezielte Mutagenisierung mittels inverser PCR wurden zwei Mutationen hervorgerufen (T233A, G234C), welche einen Aminosäureaustausch von Valin durch Asparaginsäure in Position 78 zur Folge hatten. In Abbildung III.45 ist ein Aminosäuresequenz Alignment des Bereiches um die Mutation gezeigt.

Obwohl die gezielte Mutagenese erfolgreich war und damit der Aminosäureaustausch in der Phytoen-Desaturase entsprechend der von Wang & Liao (2001) erzielten Mutation hervorgerufen werden konnte, zeigte eine Komplementierung einer Phytoen bildenden *E. coli*-Transformante mit der veränderten Phytoen-Desaturase *Crt*_{Rg}V78D gegenüber der Kontrolle keine signifikanten Unterschiede.

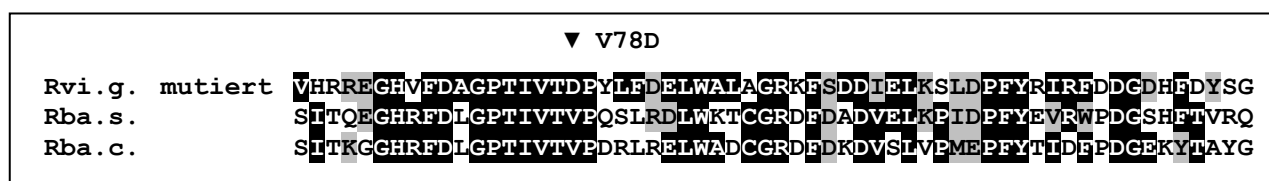


Abbildung III.45 Aminosäuresequenz Alignment des Bereiches der Mutation V78D

4 Untersuchung der Phytoen-Desaturase aus *Xanthophyllomyces dendrohous*

Die Untersuchungen der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* haben gezeigt, dass die Fähigkeit der Phytoen-Desaturase, 3 oder 4 Desaturierungsschritte zu katalysieren von, der Enzymmenge abhängen kann.

Es sollte untersucht werden, ob dies auch die Ursache für einen veränderten Phänotyp der *Xanthophyllomyces dendrohous*-Mutante DQ1 gegenüber dem Wildtyp ist oder ob der veränderte Carotinoidbiosyntheseweg in DQ1 auf eine Mutation in dem für die Phytoen-Desaturase kodierenden Gen zurückzuführen ist.

Xanthophyllomyces dendrohous ist ein Basidiomycet, der als Endprodukt der Carotinoidbiosynthese Astaxanthin synthetisiert. Astaxanthin ist ein symmetrisches Carotinoid mit 2 β -Ionon-Endgruppen. Es besitzt jeweils eine Hydroxygruppe in Position C3 bzw. C3' sowie je eine Ketogruppe in Position C4 bzw. C4'. Astaxanthin besitzt ein konjugiertes Doppelbindungssystem aus 11+2 konjugierten Doppelbindungen (11 Doppelbindungen in der Polyenkette + 2 durch die Ketogruppen). In höheren Pflanzen findet man dieses Carotinoid ausschließlich in den Petalen von *Adonis annua*, dem Adonisröschen (Seybold & Goodwin, 1959).

Die *X. dendrohous*-Mutante DQ1 bildet im Gegensatz zum Wildtyp in erheblichen Mengen das monozyklische Carotinoid Torulin und in geringen Anteilen β -Carotin. Das asymmetrische Carotinoid besitzt nur eine β -Ionon-Endgruppe und dadurch auch nur eine Hydroxy- und eine Ketogruppe in Position C3 und C4. Torulin verfügt über 13 konjugierte Doppelbindungen.

Bei der Synthese von Astaxanthin werden von der Phytoen-Desaturase zunächst 4 zusätzliche Doppelbindungen in das Phytoen-Molekül eingefügt, so dass intermediär Lycopin gebildet wird. Dieses wird im Anschluß an beiden ψ -Endgruppen - vermittelt durch Lycopin-Zyklase (CrtYB) - zyklisiert. Bei der Bildung von Torulin in der Mutante DQ1 wird Lycopin zunächst durch CrtI ein fünftes Mal desaturiert. Dies hat zur Folge, dass die Lycopin-Zyklase nur noch einen Ringschluss an der nicht C3,4 desaturierten Seite des Moleküls katalysieren kann. In Abbildung III.46 ist die Carotinoidbiosynthese von *Xanthophyllomyces dendrohous* Wildtyp sowie der Mutante DQ1 dargestellt.

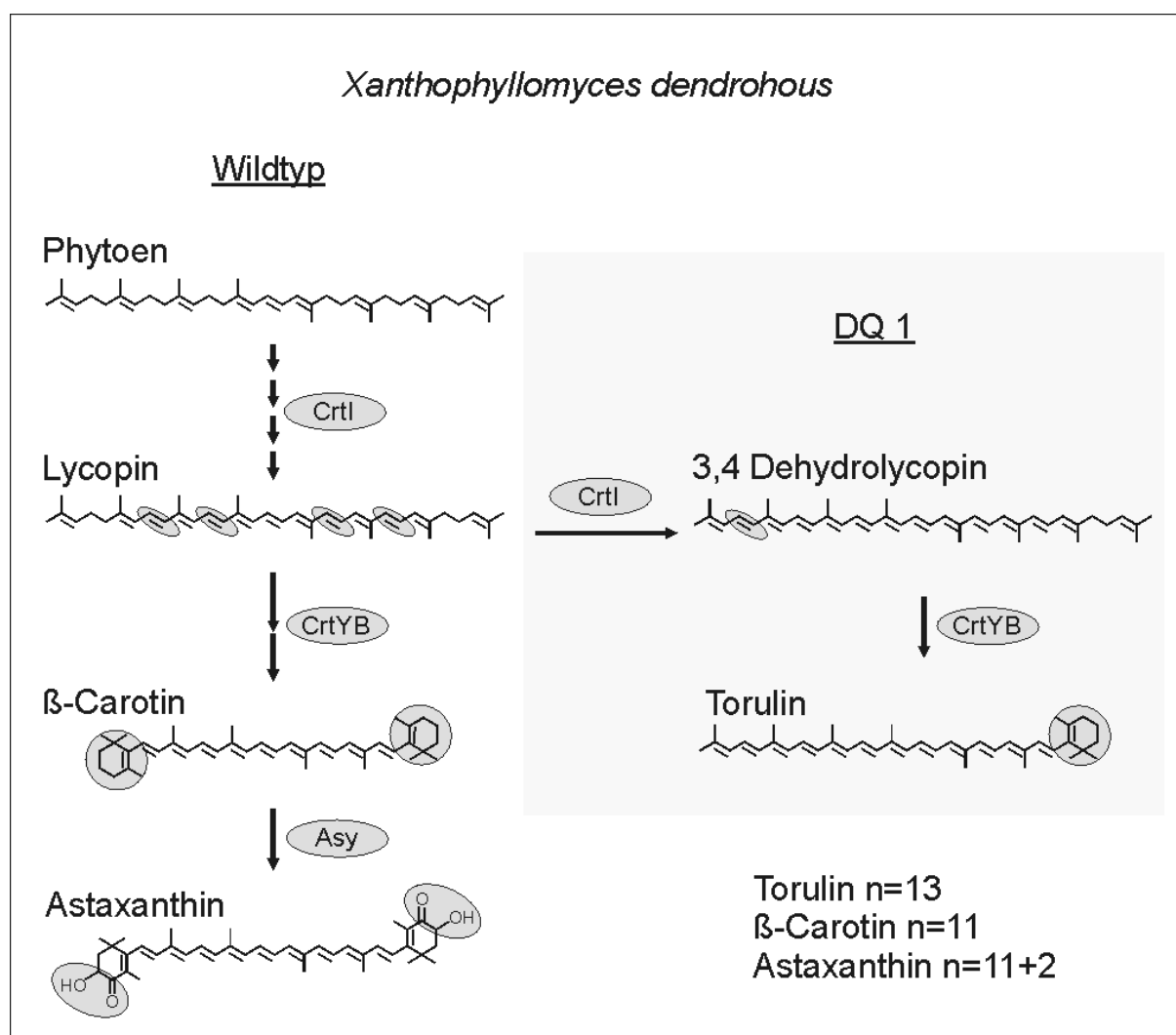


Abbildung III.46 Carotinoidbiosynthesewege von *X. dendrohous* Wildtyp und der Mutante DQ1

Es wurde untersucht, ob die Ursache für die erhöhte Desaturierungsanzahl in DQ1 in einer Mutation des Gens *crtI* und damit einer Modifizierung der enzymatischen Aktivität der Phytoen-Desaturase zu finden ist oder ob die zusätzliche Desaturierung möglicherweise durch eine größere CrtI-Menge hervorgerufen wird. Dazu sollten Hemmstofftests durchgeführt werden, um einerseits die Aktivität der Phytoen-Desaturase in der Mutante DQ1 und andererseits die Aktivität der Lycopin-Zyklase in einer weiteren Mutante (PR1-104), die hauptsächlich β-Carotin bildet, zu hemmen. Durch die Hemmstofftests sollte die Funktion der Phytoen-Desaturase und die Rolle der Lycopin-Zyklase bei der Bildung von entweder Torulin oder β-Carotin untersucht werden.

4.1 Amplifizierung von *crtl* von *X. dendrohous* aus cDNA-Bibliotheken und Klonierung in pPEU32

Zur Untersuchung der Phytoen-Desaturasen aus *X. dendrohous* des Wildtypstammes (ATCC24202) und der Mutante DQ1 wurden cDNA-Bibliotheken erstellt und daraus *crtl* jeweils mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden für die Konstruktion der PCR-Primer die bereits veröffentlichten Nukleotidsequenzen der Phytoen-Desaturase-Gene aus *X. dendrohous* (Acc:AY177424 und Acc:Y15007) verwendet.

Es konnte jeweils ein ca. 1600 bp großes PCR-Fragment amplifiziert und anschließend in pMON38201 kloniert werden. Eine Sequenzierung zeigte, dass die amplifizierten Fragmente einander identische Nukleotidsequenzen besaßen und im Vergleich mit den veröffentlichten Sequenzen von *crtl*_{Xd} aus *X. dendrohous* ATCC24230 und CBS6938 bis auf 4 bzw. 5 Nukleotide übereinstimmten. Die abweichenden Nukleotide hatten einen Aminosäureaustausch gegenüber ATCC24230 (H427Q) und einen Aminosäureaustausch gegenüber CBS6938 (F107L) zur Folge. Sowohl die Nukleotid-, sowie die daraus hervorgehende Aminosäuresequenz von *crtl*_{Xd}WT bzw. *crtl*_{Xd}DQ1 ist in Abbildung III.47 dargestellt. Beide amplifizierten cDNA-Fragmente wurden *SacI/SalI* aus pMON*crtl*_{Xd}WT bzw. pMON*crtl*_{Xd}DQ1 herausgeschnitten und in einen ebenfalls *SacI/SalI* geschnittenen pPEU32 ligiert.

Nukleotidsequenz

Xanthophyllomyces dendrohous Wildtyp ATCC24202 und Mutante DQ1

atgggaaaagaacaagatcaggataaaccacagctatcatcgtgggatgtggtatcggtggaatcgccactgcc
gctcgtcttgctaaagaaggtttccagggtcacgggttcgagaagaacgactactccggaggtcgatgctcttta
atcgagcgagatgggttatcgattcgatcaggggcccagtttgctgctcttgccagatctcttcaagcagacattc
gaagatttgggagagaagatggaagattgggtcgatctcatcaagtgtgaacccaactatggttgccactccac
gatgaagagactttcactcctttcaaccgacatggcggttgctcaagcgggaagtgcgagcgtttgaaggcaaagat
ggatttgatcgggtcttctgctgtttatccaagaagcccacagacattacgagcttgctgctggtcacgctcctgcag
aagaacttccctggcttcgcagcattcttacgggtacagttcattggccaaatcctggctcttcacccttcgag
tctatctggacaagagtttgctgatatttcaagaccgacagattacgaagagtcttctcgtttgagtgatgtac
atgggtcaaagcccatacagtgccccggaacatattccttgctcgaatacacccaattgaccgagggcatctgg
tatccgagaggaggcttttggcaggttcctaatactcttcttcagatcgtcaagcgcaacaatcctcagccaag
ttcaatttcaacgctccagtttcccagggttcttctctctcctgccaaggaccgagcactgggtgctcagacttga
tccggcgaggaacatcacgccgatgtgtgatgtcaatgctgacctcgtttacgcctccgagcacttgattcct
gacgatgccagaaacaagattggccaactgggtggaagtcaagagaagttgggtgggctgacttagttggtggaaag
aagctcaaggggaagttgcagtagtttgagcttctactggagcatggaccgaatcgtggacgggtctgggaggacac
aatatcttcttggccgaggacttcaagggatcattcgacacaatcttcgaggagtgggtctcccagccgatcct
tccttttacgtgaacggtccctcgcaatcgatccttctgcccgtcccgaaggcaaagatgctatcgtcattctt
gtgccgtgtggccatatcgacgcttcgaacctcaagattacaacaagcttgttgcctgggcaaggaagtttgtg
atccaacgctttccgccaagcttggacttcccgactttgaaaaaatgattgtggcagagaaggttcacgatgct
ccctcttgggagaaagaattcaacctcaaggacggaagcattcttgggactggctcacaacttatgcaagttctt
ggttcagggcgagcaccagacatccaagtatgacaagttgttcttcttggcgggcttcgactcatcccggaact
ggggttcccatcgtcttggctggagccaagttactgccaaccaagttctcgaatccttggaccgatcccagct
ccagatcccaatatgtcactctccgtaccatatggaaaacctctcaaatcaaatggaacgggtatcgattctcag
gtccagctgaagttcatggatttggagagatgggtataaccttttggtaattgttgattggggccgtgatcgctcga
tccggttggtgcttcttgcctttctga

Aminosäuresequenz

Xanthophyllomyces dendrohous Wildtyp ATCC24202 und Mutante DQ1

MGKEQDQDKPTAIIVCGIGGIATAARLAKEGFQVTVFEKNDYSGGRCSLIERDGYRFDQGPSLLLLLPDLFKQTF
EDLGEKMEDWVDLIKCEPNYVCHFHEETFTLSTDMALLKREVERFEGKDGFRFLSFIQEHRHYELAVVHVLQ
KNFPGFAAFLRLQFIGQILALHPFESIWTRVCRYFKTDRLRRVFSFAVMYMGQSPYSAPGTYSLLQYTELTEGIW
YPRGGFWQVPNTLLQIVKRNNPSAKFNFNAPVSQVLLSPAKDRATGVRLESGEHHADVVIVNADLVYASEHLIP
DDARNKIGQLGEVKRSWWADLVGGKLLKGCSSLSFYWSMDRIVDGLGGHNIFLAEDFKGSFDTIFEELGLPADP
SFYVNVPSRIDPSAAPEGKDAIVILVPCGHIDASNPQDYNKLVARARKFVIQTLSAKLGLPDFEKMIVAEKVHDA
PSWEKEFNLDGSILGLAHNFMQVLGFRPSTRHPKYDKLFFVGASTHPGTGVPVIVLAGAKLTANQVLESFDRSPA
PDPNMSLSVPYKPLKSNGTGIDSQVQLKFMDLERWVYLLVLLIGAVIARSVGVLAFL

Abbildung III.47 Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz der amplifizierten Fragmente aus cDNA-Bibliotheken von *X. dendrohous* Wildtyp ATCC24202 und der Mutante DQ1; die von den veröffentlichten $crtI_{xd}$ -Sequenzen (Acc:AY177424, Acc:Y15007) abweichenden Nukleotide bzw. Aminosäuren sind grau hinterlegt

4.2 *In vivo* Enzym Funktionstest von pPEU*crtI*_{Xd}WT und pPEU*crtI*_{Xd}DQ1

DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}] wurden mit den Plasmiden pPEU*crtI*_{Xd}WT bzw. pPEU*crtI*_{Xd}DQ1 transformiert. Nach Inkubation über Nacht hatten sich auf dem Agar Medium rote Kolonien gebildet. Nach dem Überimpfen und Kultivieren jeweils eines Klons in Flüssigmedium wurden die gebildeten Carotinoide extrahiert und über HPLC analysiert. In der Kontrolle DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}pPEU32] war ausschließlich Phytoen gebildet worden. Die HPLC-Elutionsprofile zeigten, dass die Carotinoide der Komplementierungen DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}pPEU*crtI*_{Xd}WT] sowie DH5 α [pAC*crtEB*_{Eu}pPEU*crtI*_{Xd}DQ1] zu 100% Lycopin enthielten. In keiner der beiden Kulturen war 3,4-Didehydrolycopin entstanden. Der Umsatz von Phytoen zu Lycopin zeigte, dass die amplifizierten und in pPEU klonierten Leseraster für funktionell aktive Phytoen-Desaturasen kodierten. Zwischen den beiden gebildeten Phytoen-Desaturasen gab es keinen Unterschied hinsichtlich der von ihnen synthetisierten Produkte. Da die cDNA von *crtI* des Wildtyps und der Mutante DQ1 identisch waren konnte ausgeschlossen werden, dass eine Mutation im Gen der Phytoen-Desaturase aus *X. dendrohous* DQ1 für die erhöhte Akkumulation von Torulin verantwortlich war.

4.3 Veränderung des Phänotyps der *X. dendrohous*-Mutanten PR1-104 und DQ1 durch alternative Hemmung

Da die *X. dendrohous*-Mutante DQ1 hauptsächlich Torulin bildet, ohne dass die Phytoen-Desaturase in ihrer Aminosäuresequenz gegenüber dem in dem Astaxanthin bildenden Wildtyp vorhandenen Enzym in ihrer Aminosäuresequenz verändert ist, müssen andere Faktoren für die zusätzliche fünfte Desaturierung verantwortlich sein.

Die Untersuchungen der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* beweisen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Enzymkonzentration und der Anzahl der katalysierten Desaturierungsschritte gibt.

Um zu überprüfen, ob sich die Zusammensetzung der in DQ1 gebildeten Carotinoide durch die Verringerung der Menge enzymatisch aktiver Phytoen-Desaturase dahingehend verändern lässt, dass mehr β -Carotin und weniger Torulin gebildet wird, wurde *X. dendrohous* DQ1 unter Zugabe von 30 μ M DPA (*CrtI*-Hemmstoff) kultiviert.

Die *X. dendrohous*-Mutante PR1-104 akkumuliert als Hauptcarotinoid β -Carotin, eine Vorstufe von Astaxanthin. Phytoen wird bei der β -Carotin Synthese zunächst 4-fach durch $CrtI_{Xd}$ desaturiert, bevor die Lycopin-Zyklase $CrtYB_{Xd}$ die Bildung zweier β -Ionon Ringe an beiden Enden des Moleküls katalysiert. Durch die Zugabe des Lycopin-Zyklase-Hemmstoffes 2-(4-methylphenylthio)-diäthylamin (MPDA) in einer Konzentration von 20 μ M sollte untersucht werden, ob durch die Senkung der Menge an enzymatisch aktiven Lycopin-Zyklase-Enzymen eine erhöhte Akkumulation von Torulin zu beobachten ist.

Abbildung III.48 zeigt die *X. dendrohous*-Stämme ATCC24202 (Wildtyp), DQ1 (Torulin-Mutante) und PR1-104 (β -Carotin-Mutante).

Der Carotinoidbiosyntheseweg in den zwei Mutanten und die Wirkungsweise der Hemmstoffe DPA und MPDA ist in Abbildung III.49 grafisch dargestellt.

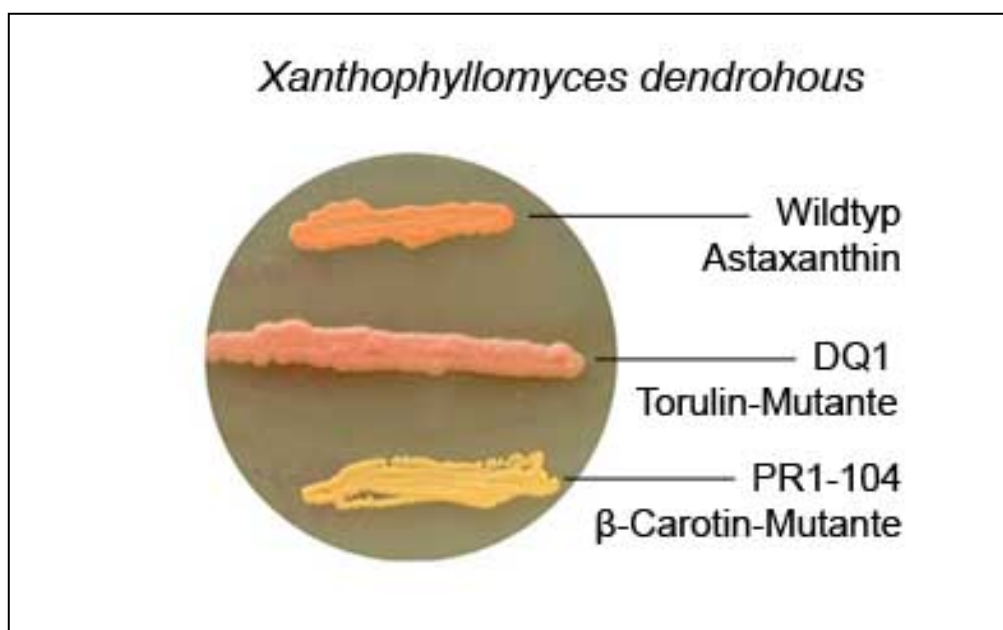


Abbildung III.48 *X. dendrohous*-Kulturen von Wildtyp, DQ1 (Torulin-Mutante) und PR1-104 (β -Carotin-Mutante) auf YPD-Medium

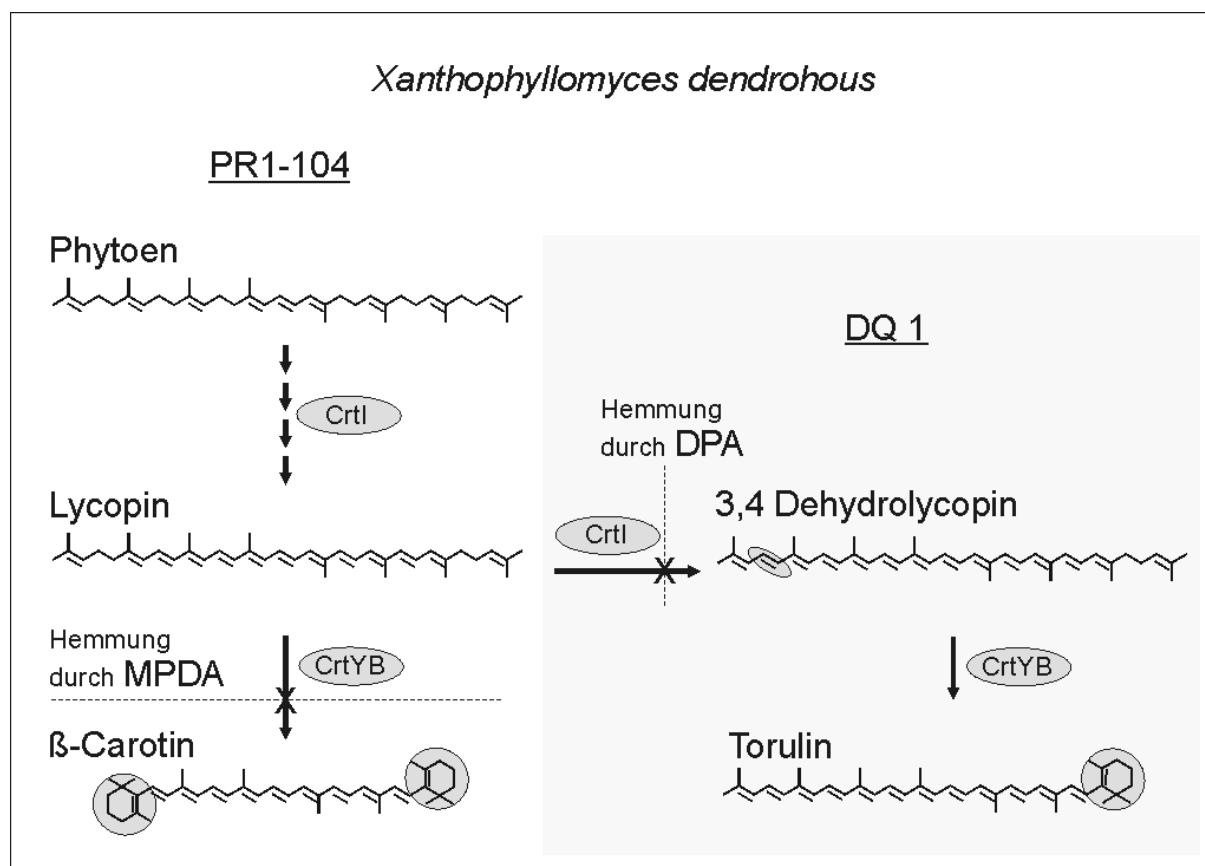


Abbildung III.49 Carotinoidbiosyntheseweg der *X. dendrohous*-Mutanten PR1-104 und DQ1; die gestrichelten Linien deuten die Wirkungsweise der Hemmstoffe MPDA u. DPA an

Die HPLC-Elutionsprofile der Carotinoidextrakte aus Kulturen der *X. dendrohous*-Mutanten DQ1 und PR1-104, jeweils ohne bzw. mit Hemmstoff, sind in Abbildung III.50 gezeigt.

Die Auftrennung des Carotinoidextraktes der Mutante DQ1 zeigte 3 Elutionspeaks (Abbildung III.50-1). Bei einer Retentionszeit von 19,5 min eluierte Lycopin mit den Absorptionsmaxima 440 nm, 470 nm und 505 nm. Bei einer Retentionszeit von 22 min konnte Torulin anhand der Absorptionsmaxima von 450 nm, 475 nm und 507 nm identifiziert werden. β -Carotin mit den Absorptionsmaxima 430 nm, 450 nm und 480 nm konnte mit einer Retentionszeit von 27,5 min detektiert werden. DQ1 bildete als Hauptcarotinoid Torulin. Das Verhältnis zwischen β -Carotin und Torulin lag bei 3:97.

Durch die Kultivierung von DQ1 unter Zugabe von 30 μ M DPA veränderte sich die Carotinoidzusammensetzung. Im Elutionsprofil des HPLC-Laufes (Teil-Abbildung III.50-2) konnten Lycopin (Retentionszeit 19,5 min, Absorptionsmaxima 445 nm, 472 nm sowie 505 nm) und Torulin (Retentionszeit 22 min, Absorptionsmaxima 450 nm,

475 nm und 507 nm) detektiert werden. Bei einer Retentionszeit von 25,5 min eluierte ein Carotinoid mit den Absorptionsmaxima 420 nm, 449 nm und 473 nm von der HPLC-Säule, welches im Extrakt der Kontrolle (ohne Hemmstoff) nicht nachgewiesen werden konnte. Dieses Carotinoid wurde als β -Zeacarotin identifiziert, welches im Gegensatz zu Torulin durch die Phytoen-Desaturase nur 3-fach zusätzlich desaturiert wurde und nicht wie Lycopin eine Desaturierung in Position C5-C6 besitzt. Als Hauptcarotinoid konnte bei einer Retentionszeit von 27,5 β -Carotin (Absorptionsmaxima 430 nm, 450 nm und 480 nm) detektiert werden. Mit den Absorptionsmaxima 266 nm, 286 nm und 300 nm eluierte Phytoen bei 33 min von der HPLC-Säule.

Durch den Phytoen-Desaturase-Hemmstoff DPA wurde $CrtI_{Xd}$ teilweise gehemmt, so dass der Gehalt an enzymatisch aktiven $CrtI_{Xd}$ -Enzymen gesenkt wurde. Phytoen konnte in den Kulturen mit DPA nicht vollständig umgesetzt werden. Darüber hinaus wurde unter Einfluss von DPA vermehrt β -Carotin und nur ein geringer Anteil Torulin gebildet (β -Carotin/Torulin-Verhältnis 79:21). Dies weist darauf hin, dass die Menge aktiver Phytoen-Desaturase Enzyme für die Bildung von 4 oder 5 zusätzlichen Doppelbindungen von entscheidender Bedeutung ist und durch eine Verringerung der Anzahl enzymatisch aktiver $CrtI_{Xd}$ -Proteine hauptsächlich 4 bzw. nur 3 Desaturierungsschritte durch $CrtI_{Xd}$ katalysiert werden können. β -Zeacarotin, welches in größeren Mengen synthetisiert wurde als Torulin, wird über das Zwischenprodukt Neurosporin gebildet. Die Phytoen-Desaturase konnte also Teile des Substrates (Phytoen) unter dem Einfluss von DPA nur 3-fach desaturieren. Das akkumulierte Neurosporin wurde im Anschluss durch die Lycopin-Zyklase $CrtYB_{Xd}$ einseitig zyklisiert. Die Senkung der enzymatisch aktiven $CrtI_{Xd}$ -Menge hat somit eine Förderung der durch die Lycopin-Zyklase katalysierten Reaktion zur Folge, welche neben dem Substrat Lycopin auch Neurosporin als Substrat akzeptiert und zu β -Zeacarotin zyklisiert. β -Zeacarotin konnte bisher weder in Carotinoidextrakten von *X. dendrohous* (Wildtyp), noch in Carotinoidextrakten der Mutante DQ1 nachgewiesen werden.

Die *X. dendrohous*-Mutante PR1-104 bildet als Hauptcarotinoid β -Carotin und in nur geringen Mengen Torulin. In der Teil-Abbildung III.50-3 ist das HPLC-Elutionsprofil des Carotinoideextraktes aus einer PR1-104 Kultur gezeigt. Bei einer Retentionszeit von 22 min eluierte Torulin (Absorptionsmaxima 450 nm, 475 nm und 507 nm) und bei einer 27,5 min β -Carotin mit den Absorptionsmaxima 430 nm, 450 nm und 480 nm. Das Verhältnis zwischen β -Carotin und Torulin lag bei 90:10.

Der Carotinoideextrakt der unter Zugabe von 20 μ M MPDA kultivierten Zellen besaß eine völlig andere Carotinoid-Zusammensetzung (Teil-Abbildung III.50-4). Bei einer Retentionszeit von 19,5 min konnte Lycopin (Absorptionsmaxima 445 nm, 472 nm sowie 505 nm) und mit einer Retentionszeit von 22 min Torulin (Absorptionsmaxima 450 nm, 475 nm und 507 nm) detektiert werden. Bei einer Retentionszeit von 23 min konnte γ -Carotin mit den Absorptionsmaxima 435 nm, 462 nm und 490 nm identifiziert werden. β -Carotin (Absorptionsmaxima 430 nm, 450 nm und 480 nm) eluierte mit einer Retentionszeit von 27,5 min. Die Zusammensetzung der unter dem Einfluss des Lycopin-Zyklase-Hemmstoffes MPDA gebildeten Carotinoide zeigte, dass es zu einer Teilhemmung der Lycopin-Zyklase CrtYB_{Xd} kam. Durch die Verringerung der Menge enzymatisch aktiver Lycopin-Zyklase Enzyme konnte weniger β -Carotin gebildet werden, als es in der Kontrolle ohne Hemmstoff der Fall gewesen war. So akkumulierten auch die Zwischenprodukte des β -Carotin-Biosyntheseweges Lycopin und γ -Carotin. Torulin wurde unter Einfluss des Hemmstoffes stärker gebildet als, in der Kontrolle ohne Hemmstoff. Das β -Carotin/Torulin-Verhältnis lag bei 64:36. Im Gegensatz dazu betrug der Torulin-Anteil in der Kontrolle nur 10%. Eine Senkung der Anzahl von enzymatisch aktiven CrtYB_{Xd}-Enzymen fördert somit die durch CrtI_{Xd} katalysierte 3,4-Desaturierung von Lycopin zu Torulin. Dieser Versuch unterstützt die These, dass die Konkurrenz zwischen der Phytoen-Desaturase und der Lycopin-Zyklase ein bedeutender Faktor für die Anzahl der durch CrtI eingefügten Doppelbindungen ist. Bei einer geringeren Anzahl von enzymatisch aktiven Lycopin-Zyklase-Molekülen treffen weitaus häufiger Lycopin und die Phytoen-Desaturase aufeinander als unter Normalbedingungen. Dadurch kommt es vermehrt zur Katalyse einer 5. Desaturierung und zur Bildung von 3,4-Didehydrolycopin, welches anschließend zyklisiert und zu Torulin umgesetzt wird.

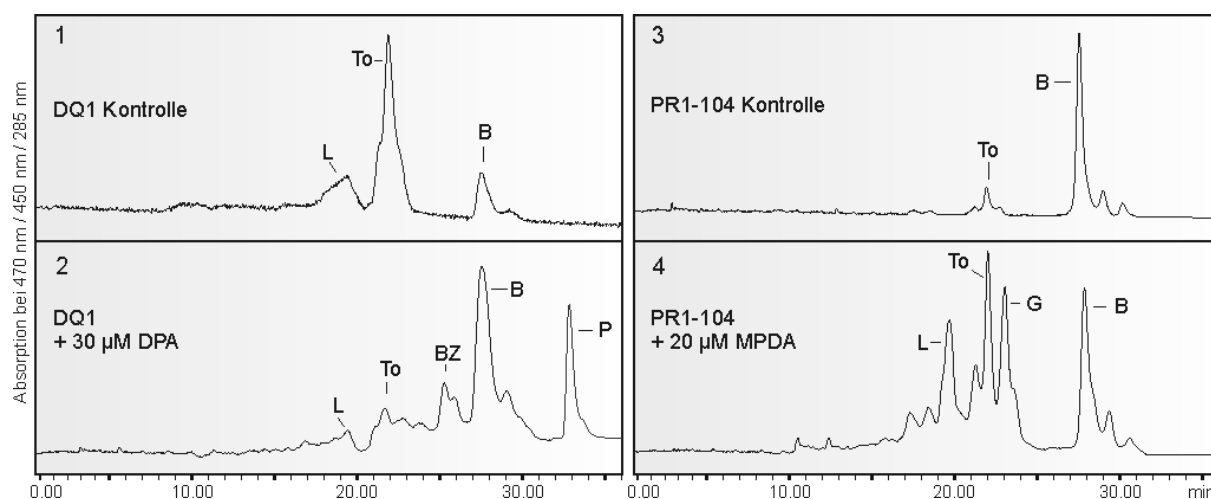


Abbildung III.50 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus Hemmstoffuntersuchungen 1) DQ1 ohne DPA, 2) DQ1 mit 30 μM DPA, 3) PR1-104 ohne MPDA, 4) PR1-104 mit 20 μM MPDA; Lycopin (L), Torulin (To), β -Carotin (B), β -Zeacarotin (BZ), Phytoen (P), γ -Carotin (G)

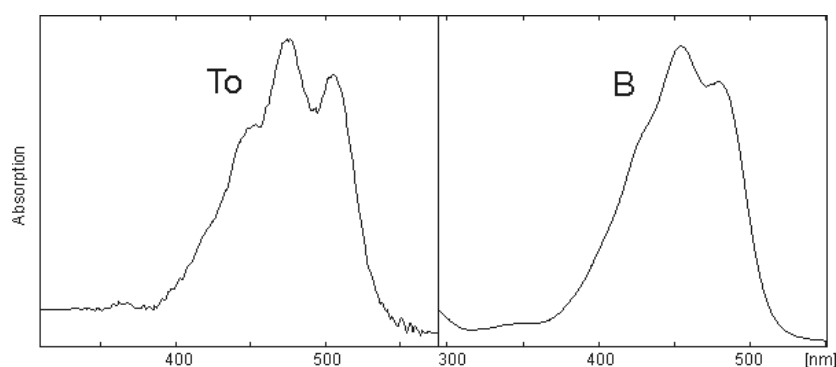


Abbildung III.51 Absorptionsspektren der HPLC-Elutionspeaks von Torulin (To) und β -Carotin (B)

Tabelle III.6 Auflistung der in *X. dendrohous* detektierten Carotinoide mit ihren spezifischen Absorptionsmaxima und Retentionszeiten

Zeichen	Carotinoid	Absorptionsmaxima [nm]	Retentionszeit [min]
L	Lycopin	445,472,505	18,5
To	Torulin	450,475,507	22
G	γ -Carotin	435,462,490	23
BZ	β -Zeacarotin	420,449,473	25,5
B	β -Carotin	430,450,480	27,5
P	Phytoen	266,286,300	33

IV Diskussion

Während der Evolution haben sich unterschiedliche Carotinoidbiosynthesewege entwickelt. Allen Carotinoid-Endprodukten ist gemein, dass sie ein großes, meist aus 9 oder 11 Doppelbindungen bestehendes konjugiertes Doppelbindungssystem besitzen. Dieses befähigt die Carotinoidmoleküle zur Absorption von Lichtenergie und macht sie dadurch als Antennen- und Schutzpigmente so bedeutend. Je länger das System konjugierter Doppelbindungen ist, desto effektiver schützen Carotinoide vor den Gefahren durch überschüssige Energie, Singulett-Sauerstoff sowie Triplett-Chlorophyll (Albrecht *et al.*, 2000).

Die schwefelfreien Purpurbakterien, Rhodospirillaceae, besitzen offenkettige Carotinoide mit bis zu 13 konjugierten Doppelbindungen, die an den Molekülenden durch Hydroxy-, Methoxy- oder Ketogruppen modifiziert sind. So findet man in *Rhodospirillum rubrum* Spirilloxanthin als Endprodukt der Carotinoidbiosynthese, während die Vertreter der Gattung Rhodobacter Spheroidin bzw. Hydroxyspheroidin synthetisieren (Schmidt, 1978).

Die Carotinoidbiosynthese in *Rubrivivax gelatinosus* ist im Vergleich zu anderen Rhodospirillaceae einzigartig, denn in dem Purpurbakterium werden sowohl Spirilloxanthin, als auch Spheroidin bzw. Hydroxyspheroidin gebildet und zwar in einem Verhältnis von ca. 10:90 (Steiger *et al.*, 2000). Propagierten Eimhjellen & Liaaen-Jensen (1964) und Schmidt (1978) noch einen Spirilloxanthinsyntheseweg über Spheroidin, konnten durch Ouchane *et al.* (1997) sowie Takaichi & Shimada (1999) geringe Mengen von Lycopin in *Rvi. gelatinosus* nachgewiesen werden, was auf eine Spirilloxanthinsynthese über das Zwischenprodukt Lycopin hindeutete. Von Harada *et al.* (2001) wurde die Phytoen-Desaturase (CrtI) aus *Rvi. gelatinosus* zum ersten Mal heterolog exprimiert. Die Expression von CrtI_{Rg} in Phytoen bildenden *E. Coli*-Transformanten zeigte, dass neben Neurosporin (3 Desaturierungsschritte) auch ca. 10% Lycopin (4 Desaturierungsschritte) gebildet wurde. Daneben konnten Harada *et al.* (2001) eine *Rvi. gelatinosus* Δ crtI-Mutante, bei der das Gen für die Phytoen-Desaturase deletiert wurde, mit unterschiedlichen bakteriellen Phytoen-Desaturasen transformieren. Die Transformante, welche die Phytoen-Desaturase aus *E. uredovora* (4-fach-Desaturase) exprimierte, besaß mit 44% am

Gesamtcarotinoidgehalt einen deutlich höheren Spirilloxanthin-Anteil als der Wildtyp. Dagegen enthielt der Carotinoidextrakt der mit der Phytoen-Desaturase aus *Rba. capsulatus* (3-fach-Desaturase) transformierten $\Delta crtI$ -Mutante kein Spirilloxanthin, sondern nur Spheroidin bzw. OH-Spheroidin. Durch diesen Versuch konnten Harada *et al.* (2001) zeigen, dass die Phytoen-Desaturase für die Verzweigung des Biosyntheseweges in *Rvi. gelatinosus* verantwortlich ist. Um weitere Informationen zu strukturellen und biochemischen Eigenschaften des Enzyms zu erhalten, wurde *CrtI* aus *Rvi. gelatinosus* in dieser Arbeit mittels molekularbiologischer und biochemischer Methoden untersucht.

1 Klonierung und Charakterisierung von *CrtI* aus *Rvi. gelatinosus*

Das aus genomischer DNA amplifizierte und klonierte Gen *crtI*_{RG}, welches für die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* S1 kodiert, konnte in *E. coli* funktionell exprimiert werden. Dabei wurden unterschiedliche Expressionsvektoren verwendet (Übersicht in Abbildung III.18). Einzig durch die Verwendung des Plasmids pPEU*crtI*_{RG} konnte die Phytoen-Desaturase mit der molekularen Masse von 57 kDa in ausreichenden Mengen als lösliches Enzym im Überstand exprimiert werden. Dadurch konnte in *in vitro* Enzymtests eine aktive Phytoen-Desaturase die Desaturierung von Phytoen katalysieren. Das Plasmid pPEU besitzt vor der MCS (multiple Klonierungsstelle) einen Promotor aus dem *E. uredoovora* Carotinoidgencluster, der zu einer moderaten Expression führt. Durch die Verwendung von pPEU konnten bereits die β -Carotin-Desaturase (*crtU*) aus *Brevibacterium linens* (Rudert, 2004) und die Prolycopin-Isomerase (*crtH*) aus dem Cyanobakterium *Anabaena sp.* PCC7120 (Weber & Sandmann, unveröffentlichte Ergebnisse) funktionell und löslich exprimiert werden. Die Verwendung anderer Expressionsvektoren führte meist zu einer sehr starken (pUC*crtI*_{RG}, pPQE*crtI*_{RG}) bzw. zu einer sehr schwachen (pTrc*crtI*_{RG}) Expression von *crtI*_{RG}, so dass das Protein entweder in einer unlöslichen und zum Teil inaktiven Form oder in nur sehr geringen Mengen vorlag. In diesen Fällen zeigte zwar ein *in vivo* Funktionstest einen Umsatz von Phytoen zu desaturierten Produkten, *in vitro* Enzymtests waren jedoch aufgrund der geringen Menge aktiver Phytoen-Desaturase negativ und Phytoen wurde nicht desaturiert. Im Übersichtsartikel von Schein (1989) wird die Aggregation von stark

exprimierten Proteinen über unspezifische Wechselwirkungen zu sogenannten „inclusion bodies“ beschrieben. Bei Enzymen der Carotinoidbiosynthese handelt es sich größtenteils um lipophile Membranproteine, was die Bildung dieser Protein-Aggregate unterstützt. Die Expression von *crtl*_{RG} mittels pPEU*crtl*_{RG} in DH5α war etwas schwächer als in DH5αpUC*crtl*_{RG} und DH5αpPQE*crtl*_{RG}, so dass es nur in geringem Maße zur Bildung von Protein-Aggregaten kam (Abbildung III.17). Jedoch wurde ausreichend funktionell aktives Protein gebildet, um Phytoen *in vitro* zu desaturieren.

Bisher konnte mit Crtl aus *Rhodobacter capsulatus* nur eine Phytoen-Desaturase aus Rhodospirillaceae *in vitro* charakterisiert werden (Raisig *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte ein *in vitro* Enzym Test etabliert und dadurch erstmals kinetische Parameter der enzymatischen Reaktion der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* bestimmt werden. Die Zugabe von 0,2% Phosphatidylcholin förderte dabei den Umsatz von Phytoen. Da es sich bei Phytoen um ein lipophiles Molekül handelt, welches während des *in vitro* Enzymtests in ein wässriges Medium gegeben wurde, konnte es wahrscheinlich durch das amphiphile Phosphatidylcholin in Lösung gehalten und damit der Phytoen-Desaturase besser zugänglich gemacht werden. Darüber hinaus vermindern die Lipide eine Aggregation der Proteine, stabilisieren die Proteinstruktur und halten das Protein damit enzymatisch aktiv.

Die Bestimmung des K_m -Wertes von Crtl_{RG} für das Substrat Phytoen zeigte, dass der K_m -Wert von 14,8 μM niedriger lag, als der für die Phytoen-Desaturase aus *Rba. capsulatus* bestimmte K_m -Wert von 49 μM (Raisig *et al.*, 1996) bzw. der für die Diapophytoen-Desaturase aus *Staphylococcus aureus* für das Substrat Diapophytoen bestimmte K_m -Wert von 33,3 μM (Raisig & Sandmann, 1999). Beide Enzyme katalysieren in den entsprechenden Bakterien 3 Desaturierungsschritte. Die Affinität der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* zum Substrat Phytoen ist also etwa 2 - 3 Mal so hoch, wie es bei den genannten bakteriellen Phytoen-Desaturasen für ihre Substrate der Fall ist.

In Wildtyp Zellen von *Rba. capsulatus* ist keine Akkumulation des Zwischenproduktes ζ -Carotin mit - gegenüber Phytoen - 2 zusätzlichen Desaturierungen nachzuweisen (Goodwin, 1980). Dieses erklären Raisig *et al.* (1996) mit einer steigenden Affinität der Phytoen-Desaturase zu höher desaturierten Produkten und mit einem K_m -Wert von 16,6 μM für das Substrat ζ -Carotin. Die Spezifitätskonstanten der Phytoen-

Desaturase aus *Rba. capsulatus* für die Substrate Phytoen und ζ -Carotin liegen bei einem identischen Wert von $0,5 \times 10^2$. Der K_m -Wert der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* für Neurosporin, welches in *Rvi. gelatinosus* in größeren Mengen akkumuliert und zu Spheroidin umgesetzt wird, liegt bei $33 \mu\text{M}$ und zeigt, dass die Affinität zum Substrat scheinbar mit steigender Zahl an Desaturierungsschritten sinkt. Die Spezifitätskonstante fällt um den Faktor 20 von 35×10^2 für Phytoen auf $1,8 \times 10^2$ für Neurosporin ab. Wahrscheinlich dissoziiert deshalb ein Großteil des Neurosporins von dem Enzym, bevor es zu einer vierten Desaturierung und der Bildung von Lycopin kommen kann. Für die Diapophytoen-Desaturase wurde ebenso eine höhere Affinität zu Diapophytoen ($K_m = 49 \mu\text{M}$) als zu Diapo- ζ -Carotin ($K_m = 245 \mu\text{M}$) beschrieben (Raisig & Sandmann, 1999). Allerdings ist in *Staphylococcus aureus* fast ausschließlich Diaponeurosporin und daraus abgeleitet Staphyloxanthin zu finden (Wieland *et al.*, 1994). Eine Akkumulation von Diapo- ζ -Carotin oder oxidierten Produkten ist nicht beschrieben worden. So wird, trotz der niedrigen Affinität des Enzyms zum Substrat, Diapo- ζ -Carotin komplett zu Diaponeurosporin umgesetzt.

Für die Desaturierung von Carotinoiden ist ein primärer Wasserstoffakzeptor nötig (Sandmann, 1994a). Wie bereits für die bakteriellen Phytoen-Desaturasen aus *Rba. capsulatus*, *S. aureus* und *E. uredovora* beschrieben, konnte auch für die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* Flavinadenindinukleotid (FAD) als Kofaktor nachgewiesen werden (Abbildung III.27). Für viele bakterielle Phytoen-Desaturasen ist eine N-terminale hoch konservierte Aminosäuresequenz beschrieben, welche als Dinukleotidbindestelle gilt (Bartley *et al.*, 1990; Armstrong *et al.*, 1993b). Das gleiche Motiv konnte auch in der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* ermittelt werden. So konnte eine 39-fache Aktivitätssteigerung des über Affinitätschromatografie gereinigten Enzyms nach Zugabe von FAD erreicht werden. Für andere bakterielle Carotinoid Desaturasen konnten auch NAD und NADP (Fraser *et al.*, 1993; Hausmann & Sandmann, 2000) sowie molekularer Sauerstoff (Albrecht *et al.*, 1996) als Kofaktor bestimmt werden. Diese hatten auf die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* einen nur geringen Effekt. Eine hemmende Wirkung der Dinukleotide NAD und NADP, wie sie für die Phytoen-Desaturase aus *E. uredovora* beschrieben wurde (Fraser *et al.*, 1992), konnte für die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* nicht festgestellt werden.

Die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* wird durch Diphenylamin (DPA) gehemmt. Der I_{50} -Wert lag bei 280 μM , einem ähnlichen I_{50} -Wert wie ihn Raisig & Sandmann (1996) mit 230 μM für die Phytoen-Desaturase aus *Rba. capsulatus* ermittelt haben. Auch die Phytoen-Desaturase aus *S. aureus* konnte mittels DPA gehemmt werden, allerdings lag die Sensitivität mit einem I_{50} -Wert von 20 μM um mehr als das 10-fache höher (Raisig & Sandmann, 2001). Hemmstoffversuche stellen neben Sequenzhomologie-Vergleichen ein weiteres Instrument zur Untersuchung von Verwandtschaftsbeziehungen von Proteinen dar. So brachten Hemmstoffversuche erste Erkenntnisse über die Anwesenheit einer bakteriellen Phytoen-Desaturase (CrtI) in dem Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* PCC4721 an Stelle einer cyanobakteriellen Phytoen-Desaturase (CrtP) (Steiger *et al.*, Im Druck).

2 Einfluss der Substrat- und Enzymkonzentration auf die Anzahl der katalysierten Reaktionsschritte

Während der Untersuchung zur Bestimmung des K_m -Wertes zeigte sich, dass die Anzahl der durch die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* eingefügten Doppelbindungen stark von der Substratmenge beeinflusst wurde. Dabei veränderte sich das Verhältnis der beiden Reaktionsprodukte Lycopin und Neurosporin. Mit steigender Phytoenkonzentration nahm der Anteil des gebildeten Lycopins (4 Desaturierungsschritte) ab. So wurde bei einer Phytoenkonzentration von 2 μM 44% Lycopin gebildet. Bei einer Erhöhung der Substratkonzentration um das 10-fache nahm der Lycopin-Anteil auf 4,3% ab und bei einer Phytoenkonzentration von 50 μM wurden nur noch 1,6% Lycopin detektiert (Abbildung III.23). Die Anzahl der durch die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* katalysierten Desaturierungsschritte ist also auch von der Substratkonzentration abhängig. Je mehr Phytoen vorhanden ist, desto geringer ist der Anteil des gebildeten Lycopins. Möglicherweise kommt es hierbei zu einer „Konkurrenz“ zwischen Phytoen und dem gebildeten Neurosporin um die Phytoen-Desaturase. Da das Enzym eine höhere Affinität zu Phytoen besitzt wird dieses, wenn es in großen Mengen vorhanden ist, bevorzugt als Substrat akzeptiert, Neurosporin hingegen nicht weiter zu Lycopin desaturiert.

in vitro Enzymtests mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen zeigten, dass auch die Menge an Phytoen-Desaturase auf die Anzahl der durch CrtI_{Rg} eingefügten Doppelbindungen Einfluss nimmt (Abbildung III.24). Bei einer Enzymkonzentration von 46 µg/ml wurden in den *in vitro* Enzymtests 3% Lycopin gebildet. Durch einen Anstieg der Enzymmenge um den Faktor 10 konnte der Lycopin-Anteil auf 18% erhöht werden. Es stellte sich ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Enzymkonzentration und dem gebildeten Lycopin-Anteil heraus, welcher in vergleichenden Untersuchungen auch für die Phytoen-Desaturase aus *Rba. sphaeroides* gezeigt werden konnte. Dabei konnte *in vitro* bis zu 7% Lycopin ermittelt werden, obwohl in dem Purpurbakterium selbst Lycopin oder Folgeprodukte des Spirilloxanthinweges bisher nur in Spuren nachgewiesen werden konnten (Schmidt, 1978). Dass verschiedene bakterielle Phytoen-Desaturasen potentiell mehr Desaturierungsschritte katalysieren können als es unter natürlichen Bedingungen zu beobachten ist, konnte bereits *in vivo* in Phytoen bildenden *E. coli*-Transformanten, mit der Phytoen-Desaturase aus *Erwinia uredovora* (Linden *et al.*, 1991; Fraser *et al.*, 1992) und der Diapophytoen-Desaturase aus *Staphylococcus aureus* (Wieland *et al.*, 1994; Raisig & Sandmann, 1999) gezeigt werden. In dieser Arbeit konnten im Zuge von Komplementierungen Phytoen bildender *E. coli*-Transformanten mit CrtI aus *Rvi. gelatinosus* bis zu 75% Lycopin und mit 10% am Gesamtcarotinoidgehalt erhebliche Mengen 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin detektiert werden. Dieses Carotinoid wurde durch die Phytoen-Desaturase 6-mal desaturiert und besitzt ein aus 15 Doppelbindungen bestehendes konjugiertes Doppelbindungssystem. 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin konnte in Vertretern der Rhodospirillaceae bisher nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass es in dieser komplementierten *E. coli*-Transformante zu einer sehr starken Expression der Phytoen-Desaturase kam, was, wie bereits dargestellt, zusätzliche Desaturierungsschritte fördert. Dass es in *Rvi. gelatinosus* nicht zur Bildung von größeren Mengen Spirilloxanthin kommt bzw. bisher keinerlei Anzeichen dafür vorhanden sind, dass 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin gebildet wird liegt wahrscheinlich an der Expressionsstärke der Phytoen-Desaturase und der Menge des bereitstehenden Phytoens. Möglicherweise lagern sich in der Membran von *E. Coli* aber auch Proteinkomplexe zusammen, welche strukturelle Unterschiede zu den in den photosynthetischen Bakterien gebildeten Komplexen besitzen und dadurch die Katalyse der zusätzlichen Desaturierungsschritte unterstützen. Allerdings kommen auch weitere Faktoren für die scheinbar

unterschiedlichen enzymatischen Eigenschaften von CrtI_{Rg} nach Expression in *E. coli* und in den ursprünglichen Organismen in Betracht. So bleibt offen, warum die von Harada *et al.* (2001) hergestellte und mit pUCcrtI_{Eu} transformierte *Rvi. gelatinosus* Δ crtI-Mutante, welche die 4 Desaturierungsschritte katalysierende Phytoen-Desaturase aus *E. uredovora* exprimiert, nur 44% Spirilloxanthin bildete. Dabei ist normaler Weise davon auszugehen, dass es unter dem Einfluss des verwendeten Plasmids pUC18 zu einer starken Expression der 4-fach Phytoen-Desaturase kommt und hauptsächlich Carotinoide des Spirilloxanthinweges akkumulieren sollten. Etwa die Hälfte des synthetisierten Neurosporins wurde, bevor es ein viertes Mal desaturiert werden konnte, zu Spheroidin bzw. Hydroxyspheroidin umgesetzt. Dies weist darauf hin, dass es in der *Rvi. gelatinosus* Δ crtI-Mutante zu einer Konkurrenz-Situation zwischen der Phytoen-Desaturase (CrtI_{Eu}) aus *E. uredovora* und der 1,2-Hydratase (CrtC_{Rg}) aus *Rvi. gelatinosus* um das Substrat Neurosporin kommt. CrtC_{Rg} katalysiert eine Hydratisierung in Position C1-C2, die sich an die Desaturierung von Phytoen anschließt (Steiger *et al.*, 2003). Ähnliche Ergebnisse publizierten auch Hunter *et al.* (1994), welche eine Δ crtI-Mutante von *Rba. sphaeroides* mit der Phytoen-Desaturase aus *E. uredovora* komplementierten, wobei neben Diketo-Spirilloxanthin signifikante Mengen von Spheroidinon (aerobe Kultivierung) gebildet wurden. Garcia-Asua *et al.* (2002) postulieren ebenfalls ein Zusammenspiel zwischen der Phytoen-Desaturase (CrtI) und der 1,2-Hydratase (CrtC). Sie konnten zeigen, dass eine *Rba. sphaeroides* Δ crtI, Δ crtC-Doppelmutante, welche die Phytoen-Desaturase aus *E. uredovora* exprimiert, mit 93% Lycopin fast das komplette Phytoen 4-fach desaturieren kann. Wurde die gleiche Mutante mit der (ihr eigenen) Phytoen-Desaturase aus *Rba. sphaeroides* transformiert, konnten immerhin 13% Lycopin nachgewiesen werden. Spirilloxanthin wird allerdings, wie bereits erwähnt, im Wildtyp von *Rba. sphaeroides* nur in Spuren gebildet. In Abwesenheit des nachfolgenden Enzyms des Carotinoidbiosyntheseweges (CrtC) ist die Phytoen-Desaturase (sowohl aus *E. uredovora*, als auch aus *Rba. sphaeroides*) in der Lage, mehr Desaturierungsschritte an einem Molekül zu katalysieren, als unter Anwesenheit der um das Substrat (Lycopin bzw. Neurosporin) konkurrierenden 1,2-Hydratase (CrtC). In *E. coli* bewirkt die gleiche Kombination von Carotinoidgenen wiederum eine andere Carotinoidzusammensetzung. Eine Phytoen bildende *E. coli*-Transformante, die sowohl die 4-fach Phytoen-Desaturase aus *E. uredovora*, als auch CrtC aus *Rba. sphaeroides* exprimiert, synthetisiert OH-Lycopin (Rhodopin)

und das zusätzlich desaturierte 3,4-Didehydrolycopin, jedoch kein Hydroxyneurosporin (Albrecht *et al.*, 1997). Phytoen wird also komplett zu Lycopin umgesetzt, bevor die 1,2-Hydratase eine Hydroxygruppe an C1 anfügt. Dass die gleichen Enzyme in *E. coli* andere Produkte synthetisieren als in *Rba. sphaeroides*, könnte an carotinoidbindenden Proteinen der photosynthetischen Bakterien liegen. So besitzen die Proteine der Lichtsammelkomplexe von *Rba. sphaeroides* und *Rvi. gelatinosus* eine Neurosporin bindende Aktivität (Lang & Hunter, 1994; Ouchane *et al.*, 1997), welche die Carotinoidbiosynthese möglicherweise beeinflusst (Harada *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist eine indirekte regulatorische (hemmende) Wirkung des über Lycopin gebildeten Endproduktes Spirilloxanthin auf die Phytoen-Desaturasen aus *Rvi. gelatinosus*, *Rba. sphaeroides* und *Rba. capsulatus* nicht auszuschließen. Diese könnte dazu führen, dass im Falle einer geringfügigen Lycopinbildung die Desaturase teilgehemmt wird und nur noch drei Desaturierungen katalysieren kann. In Komplementierungen in *E. coli*, in denen kein Spirilloxanthin entsteht, würde diese Hemmwirkung fehlen. Eine solche „feedback-Regulation“ der CrtI-Typ-Desaturase konnte für *Phycomyces blakesleeanus in vitro* gezeigt werden (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997).

Die Anzahl der durch die Phytoen-Desaturase aus Rhodospirillaceae katalysierten Desaturierungsschritte wird also neben strukturellen Eigenschaften des Enzyms und den Substratkonzentrationen auch durch die Menge der vorhandenen Phytoen-Desaturase sowie der in dem Biosyntheseweg nachfolgenden und in Konkurrenz um das Substrat Neurosporin stehenden 1,2-Hydratase beeinflusst.

3 Untersuchung der Phytoen-Desaturasen aus dem Wildtyp von *X. dendrohous* und den Mutanten DQ1 und PR1-104

Um zu Überprüfen, ob die gewonnenen Erkenntnisse auf eine weitere bakterielle Phytoen-Desaturase anzuwenden sind, wurden der Wildtyp und zwei Mutanten des Basidiomyceten *Xanthophyllomyces dendrohous* untersucht. *X. dendrohous* bildet hauptsächlich Astaxanthin, welches durch die Zyklisierung von Lycopin und nachfolgenden Substituierungen mit Hydroxy- und Ketogruppen entsteht. Torulin, das durch die Phytoen-Desaturase 5-fach desaturiert und im Anschluß durch die

Lycopin-Zyklase einseitig zyklisiert wurde, wird hingegen nur in geringen Mengen nachgewiesen. Eine regulatorische Wirkung von Astaxanthin auf die Phytoen-Desaturase aus *X. dendrohous* wird diskutiert (Johnson & Schroeder, 1996). Jedoch wird dies durch die Tatsache unwahrscheinlich, dass in der β -Carotin-Mutante PR1-104 trotz des Fehlens von Astaxanthin kaum Torulin entsteht. Möglicherweise spielt auch hier die Konkurrenz und das Expressionsniveau der an der Carotinoidbiosynthese beteiligten Enzyme die entscheidende Rolle.

In der Mutante DQ1 findet man als Hauptcarotinoid Torulin. Es sollte untersucht werden, ob hierbei eine Mutation des für die Phytoen-Desaturase kodierenden Gens oder eine erhöhte Expression und damit eine höhere $CrtI_{Xd}$ -Konzentration in *X. dendrohous* DQ1 verantwortlich war. Die in dieser Arbeit klonierten cDNA's aus dem Wildtyp und der Mutante DQ1 zeigten 100% Übereinstimmung in ihrer Nukleotidsequenz. Die erhöhte Anzahl von Desaturierungsschritten in DQ1 ist also nicht auf eine modifizierte Phytoen-Desaturase zurückzuführen. Mit Hilfe des Phytoen-Desaturase-Hemmstoffes DPA wurde in der Mutante DQ1 die Konzentration enzymatisch aktiver Phytoen-Desaturase-Enzyme gesenkt. Dies hatte zur Folge, dass deutlich mehr β -Carotin als Torulin gebildet wurde (Abbildung III.50). Als Vergleich hierzu wurde ein weiterer Hemmstoffversuch durchgeführt, wobei durch die Zugabe eines Zyklasehemmstoffes (MPDA) zu einer Kultur der *X. dendrohous*-Mutante PR1-104, die als Hauptcarotinoid β -Carotin synthetisiert, eine Erhöhung der Torulinsynthese und damit die vermehrte 5-fach-Desaturierung durch $CrtI_{Xd}$ zu beobachten war. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Teilhemmung, d.h. die Verminderung der aktiven Enzymmenge von $CrtI_{Xd}$, die Zyklisierungsreaktion gefördert wird. Dagegen wird bei einer Teilhemmung von $CrtYB_{Xd}$ der durch die Phytoen-Desaturase $CrtI_{Xd}$ katalysierte 5. Desaturierungsschritt begünstigt. Wie schon für die Carotinoidbiosynthese in Rhodospirillaceae postuliert wurde, weisen auch die Versuche mit den unterschiedlichen *X. dendrohous*-Stämmen auf eine Konkurrenz zwischen der Phytoen-Desaturase ($CrtI_{Xd}$) und dem nachfolgenden Enzym (in diesem Fall $CrtYB_{Xd}$) um das Substrat (in diesem Fall Lycopin) hin. Die unterschiedliche Carotinoid-Zusammensetzung von *X. dendrohous* Wildtyp und DQ1 wird wahrscheinlich durch unterschiedliche Expressionsstärken von $CrtI_{Xd}$ und $CrtYB_{Xd}$ hervorgerufen. Dabei ist in DQ1 entweder die Expression von $CrtI_{Xd}$ deutlich höher oder die Expression von $CrtYB_{Xd}$ deutlich niedriger als im Wildtyp.

4 Mutagenisierung von *crtl* aus *Rvi. gelatinosus*

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass die Anzahl der durch die verschiedenen Phytoen-Desaturasen katalysierten Reaktionsschritte von der Expressionsstärke und der bereitgestellten Substratmenge abhing. Diese Faktoren können jedoch nicht alleine für die Katalyse von 3 oder 4 Desaturierungsschritten in den Rhodospirillaceae verantwortlich sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Phytoen-Desaturase aus *Rba. sphaeroides* nur in deutlich geringerem Maße Lycopin synthetisierte als *Crtl* aus *Rvi. gelatinosus*, obwohl die Bedingungen und Konzentrationen von Enzym und Substrat etwa gleich waren (Abbildung III.24). Es müssen also auch die Enzymstrukturen für die Anzahl der katalysierten Desaturierungsschritte ausschlaggebend sein. Die Gene der Phytoen-Desaturasen aus den unterschiedlichen Rhodospirillaceae sind sich allerdings sehr ähnlich. Über Homologievergleiche der abgeleiteten Proteinsequenzen sind keine Bereiche zu erkennen, auf welche die unterschiedlichen Produktspezifitäten zurückzuführen sind.

Aus diesem Grund sollten durch zufällige Mutagenisierung von *crtl*_{Rg} Bereiche oder einzelne Aminosäuren in dem daraus hervorgehenden Protein identifiziert werden, die für die Anzahl der durch die Phytoen-Desaturase katalysierten Reaktionsschritte von Bedeutung sind.

Mittels zufälliger Mutagenisierung von Carotinoidgenen konnten bereits verschiedene, für die katalytischen Eigenschaften der jeweiligen Enzyme wichtige Aminosäuren identifiziert werden. So konnten Cunningham & Gantt (2001) durch den Austausch einer einzigen Aminosäure innerhalb der ϵ -Zyklase aus *Arabidopsis thaliana* erreichen, dass das Enzym zwei Ringschlüsse an einem Molekül Lycopin katalysieren und ϵ -Carotin synthetisieren konnte. Das unveränderte Enzym kann lediglich einen Ringschluss katalysieren, wobei es zur Bildung von δ -Carotin kommt. Es wird vermutet, dass die veränderte Aminosäure eine Dimerisierung des Enzyms fördert. In der Folge soll dann je eine Untereinheit eine Zyklisierung durchführen. Ein weiteres Beispiel für eine erfolgreich durchgeführte Mutagenisierung ist das für die FPP-Synthase kodierende Gen aus *Bacillus stearothomophilus* (Ohnuma *et al.*, 1996). Das Enzym konnte so modifiziert werden, dass es GGPP synthetisierte. Die verantwortliche Aminosäure konnte identifiziert werden. Weiterhin konnte *crtl* aus *Rba. sphaeroides* mutagenisiert und dadurch das abgeleitete Enzym modifiziert

werden, so dass in Komplementierungsreaktionen mit Phytoen bildenden *E. Coli*-Transformanten als Hauptcarotinoid Lycopin und nicht Neurosporin gebildet wurde, wie es bei dem unveränderten Enzym der Fall war (Wang & Liao, 2001). Die Versuche wurden allerdings ausschließlich *in vivo* durchgeführt und Informationen über die Expressionsstärken in den Komplementierungen mit den modifizierten Phytoen-Desaturasen sind nicht veröffentlicht. Möglicherweise kam die verstärkte Lycopinbildung auch durch ein erhöhtes Expressionsniveau der Phytoen-Desaturase zustande, so wie es in der vorliegenden Arbeit bei *Crtl* aus *Rvi. gelatinosus* aber auch aus *Rba. sphaeroides* beobachtet werden konnte.

Das für die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* kodierende Gen wurde mittels unterschiedlicher Techniken mutagenisiert. Die Error Prone PCR hatte dabei den Vorteil, dass nur das Leseraster von *crtl* mutagenisiert und anschließend in ein Plasmid kloniert werden konnte. Ein Nachteil dabei ist die geringe Effizienz bei der Restriktion und der anschließenden Ligation des PCR-Amplifikates in das Plasmid. Jedoch wird bei der zufälligen Mutagenese angestrebt, möglichst viele unterschiedliche Mutationen (1 - 5 Basenaustausche in einem Gen) in den veränderten Leserastern zu erhalten. Die für *crtl*_{RG} verwendete Methode der Zufallsmutagenese mittels PCR beruhte auf der Erhöhung der Bindung falsch paarender dNTPs durch Zugabe von Manganionen zu einem ersten PCR-Ansatz. Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde im Anschluss für eine zweite PCR - unter Zugabe von dITP (2'-Desoxy-Inosin-Triphosphat) und dNTPs - als Templat eingesetzt (Goodman *et al.*, 1983; Ohnuma *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu anderen mutagenisierenden PCR-Methoden, die nur auf Zugabe von Manganionen (Leung *et al.*, 1989) oder Manganionen in Kombination mit ungleichen Mengenverhältnissen der Nukleotide in einem PCR-Ansatz beruhen (Vartanian *et al.*, 1996), soll es bei der angewandten Methode nach Ohnuma *et al.* (1999) vermehrt zu CG>GC- bzw. GC>CG-Austauschvorgängen kommen. Bei der Mutagenisierung mit nur Manganionen oder Manganionen in Kombination mit ungleichen Mengenverhältnissen der Nukleotide kommt es hauptsächlich zu CG>TA-oder AT>GC- Austauschvorgängen. Es stellte sich jedoch heraus, dass alle durch die Error Prone PCR hergestellten und ermittelten Mutationen dennoch entweder Veränderungen von CG zu TA oder von AT zu GC waren. So konnten vermutlich nicht alle statistisch möglichen Mutationen hergestellt werden. Allerdings lag die Anzahl der Mutationen im Gen zwischen 1 und

4 und damit in dem von Harayama (1998) als optimal vorgeschlagenen Bereich von 1,5 bis 5 Mutationen pro Gen.

Neben der Error Prone PCR wurde auch der *E. coli*-Stamm XL1-Red (Stratagene) zur Mutagenisierung von *crtl*_{Rg} verwendet. Mit Hilfe von XL1-Red konnten ebenfalls ausschließlich CG>TA- oder AT>GC- Austauschvorgänge erzielt werden. Daneben zeigte sich, dass Mutationen im vektoriiellen Bereich und in der MCS vor dem Leseraster des Gens die Aktivität des Enzyms durch unterschiedlich starke Expression beeinflussten. Um diese Artefakte auszuschließen, mussten die Leseraster in unveränderte Plasmide kloniert werden. Dabei verringerte sich wiederum die Ausbeute an unterschiedlichen Mutanten durch Verluste bei der Ligation.

Die mutagenisierten Gene konnten in Phytoen bildenden *E. coli*-Transformanten exprimiert werden. Mit Hilfe eines optimierten Farbscreenings konnten veränderte Expressionsprodukte identifiziert werden. Dabei konnte eine pUC*crtl*_{Rg}-Mutationsbibliothek für ein Screening nach Enzymen eingesetzt werden, die nur 3 Desaturierungsschritte katalysieren. Eine pTrc*crtl*_{Rg}-Mutationsbibliothek sowie eine pPEU*crtl*_{Rg}-Mutationsbibliothek konnten für die Suche nach „Crtl-Mutanten“ verwendet werden, welche überwiegend Lycopin bildeten und damit in einem erhöhten Maße einen vierten Desaturierungsschritt katalysierten. Dabei war es wichtig die Expressionstärke der in den ausgewählten Klonen exprimierten Phytoen-Desaturasen zu überprüfen, da eine erhöhte oder verringerte Desaturierungszahl, wie bereits beschrieben, auch auf die Menge exprimierten des Enzyms (Crtl) zurückzuführen sein kann.

4.1 Mutationen führen zur Erhöhung der Crtl_{Rg}-Menge

In zwei Fällen (pTrc*crtl*_{Rg}3218 und pTrc*crtl*_{Rg}5405) bewirkten Mutationen in der MCS des Vektors pTrc99a eine stärkere Expression von *crtl*_{Rg} in den komplementierten *E. coli* Bakterien und dadurch ein in Richtung Lycopin verschobenes Lycopin/Neurosporin-Verhältnis (Abbildung III.38). Die Mutation in pTrc*crtl*_{Rg}3218 bewirkte keinen Aminosäure-Austausch, sondern nur einen Codonwechsel von CUC zu CUU. Beide Triplets kodieren für die Aminosäure Leucin und besitzen in *E. coli* etwa die gleiche Häufigkeit mit 10/1000 As bzw. 12/1000 As. Durch welchen Mechanismus diese Mutation die verstärkte Expression verursachte, bleibt dabei

ungeklärt. Bei pTrc*crtI*_{Rg}5405 hat das veränderte Codon GGA zu GAA einen Austausch von Glycin durch Glutaminsäure zur Folge. Dabei ist die Häufigkeit des Codons GAA (38/1000 AS) um das 4-fache gegenüber GGA (10/1000 As) erhöht. Möglicherweise wurde hierdurch die Translation gefördert, so dass mehr Phytoen-Desaturase gebildet wurde.

Mit pPEU*crtI*_{Rg}4802 konnte ein weiteres Leseraster identifiziert werden, das stärker exprimiert wurde, als das unveränderte Gen und dessen Expressionsprodukt verstärkt Lycopin bildete. Es konnte bei pPEU*crtI*_{Rg}4802 eine Mutation innerhalb des Leserasters von *crtI*_{Rg}4802 ermittelt werden. Diese bewirkte in der Sequenz des korrespondierenden Enzyms *CrtI*_{Rg}4802 einen Austausch der Aminosäure Asparagin durch Serin an Position 224 (N224S). Der Austausch bewirkte eine Erhöhung der lipophilen Eigenschaften des Enzyms in diesem Bereich. Ob dies ebenso einen fördernden Einfluss auf die Anzahl der eingefügten Doppelbindungen hatte oder ausschließlich die größere Menge der gebildeten Phytoen-Desaturase in den Zellen für das gegenüber der Kontrolle veränderte Lycopin/Neurosporin-Verhältnis von 79:21 ausschlaggebend war, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Ursache für die stärkere Expression von *crtI*_{Rg}4802 war vermutlich eine erhöhte Plasmidkopienzahl in den *E. coli*-Zellen. Die Extraktion der DNA zeigte, dass die Plasmidmenge von pPEU*crtI*_{Rg}4802 gegenüber der nicht mutierten DNA um das 4-fache höher war (Abbildung III.43). Vermutlich wurde durch die Mutation im Gen die Replikationsrate des Plasmids erhöht, in dessen Folge die Expression von *crtI*_{Rg}4802 anstieg. pPEU ist ein Abkömmling des Plasmids pQE (Qiagen) und besitzt wie dieses einen ColE1-Replikationsursprung (*ori* aus dem Plasmid pBR322). Die Regulierung der Kopienzahl findet in ColE1-Plasmiden mittels zweier Transkripte, RNAII und RNAI, statt (Cesareni *et al.*, 1991). Die Replikation der Plasmide beginnt dabei mit der Bildung eines RNA-Primers (RNAII) im Bereich des Replikationsursprungs. RNAII lagert sich an die DNA an und initiiert die Replikation (Itoh & Tomizawa, 1980; Masukata & Tomizawa, 1990). Neben RNAII wird auch eine Antisense RNA (RNAI) gebildet, die mit RNAII über die Loop-Strukturen hybridisieren kann und damit einen sogenannten „kissing complex“ bildet, welcher eine Konformationsänderung bewirkt und dazu führt, dass RNAII nicht mehr an die DNA binden kann und die Replikation gestoppt wird (Itoh & Tomizawa, 1980; Masukata & Tomizawa, 1990). Yavachev & Ivanov (1988) postulierten, dass unbeladene tRNA-

Moleküle mit den regulatorischen RNA-Strukturen interagieren können, nicht aber beladene tRNA-Moleküle, da diese effektiv und unmittelbar der Proteinbiosynthese an den Ribosomen zugänglich gemacht werden. Es wurde beschrieben, dass sowohl RNAI als auch RNAII mit unbeladenen tRNAs hybridisieren können und dadurch die Interaktion zwischen RNAI und RNAII sowie die Bildung des „kissing complex“ verhindert wird. In der Folge kommt es zu einer unkontrollierten Replikation des Plasmids (Wrobel & Wegrzyn, 1998).

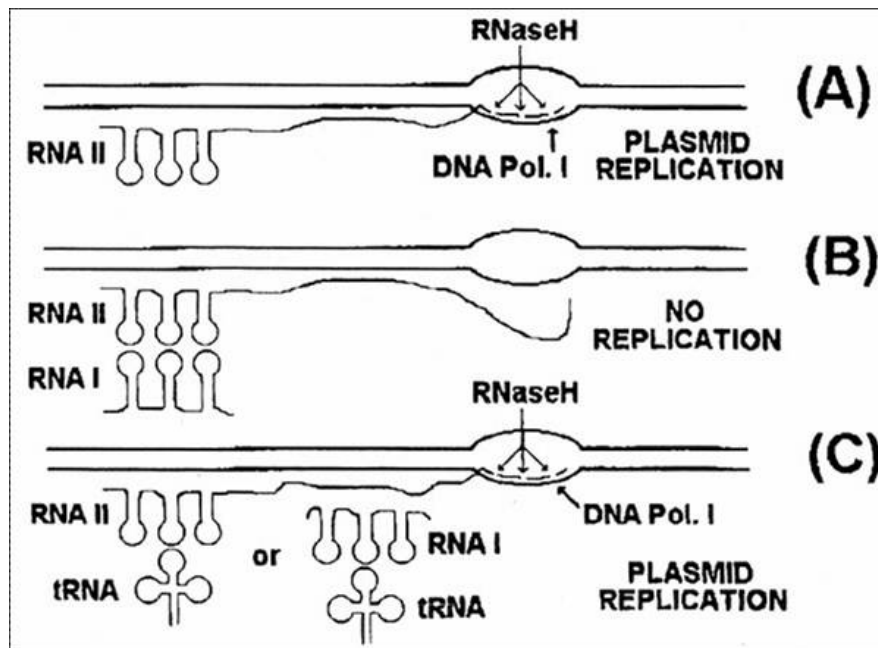


Abbildung IV.1 Modell für die Replikationskontrolle von ColE1-Plasmiden. A) RNAII wird durch RNaseH geschnitten. Die geschnittenen Fragmente bilden die Primer für die Replikation durch die DNA-Polymerase I. B) RNAI ist eine Antisense RNA, welche durch Hybridisierung mit RNAII eine Konformationsänderung bewirkt. Dadurch wird die Initiation der Replikation verhindert. C) Unbeladene tRNA-Moleküle können sowohl mit RNAII, sowie mit RNAI interagieren und verhindern damit die Bildung des „kissing complex“ zwischen RNAII und RNAI. Dadurch kommt es zu einer ständigen Initiation der Plasmidreplikation (Wrobel & Wegrzyn, 1998).

Herman *et al.* (1994) konnten zeigen, dass die Verarmung an verschiedenen Aminosäuren dazu führt, dass in den Zellen vermehrt unbeladene tRNA Moleküle akkumulieren, was einen Einfluss auf die Replikationskontrolle hat. Besonders während der heterologen Expression in *E. coli* kann es zur Verarmung von Aminosäuren und dadurch zur verstärkten Replikation des Plasmids kommen. In Abhängigkeit vom Aminosäuremuster des rekombinanten Proteins kann es zu großen Ungleichgewichten in der Aminosäureversorgung der Zelle kommen – die Aminosäuresynthese der Zelle ist evolutionär an die zelleigenen Proteine angepasst. Bei der Überexpression rekombinanter Proteine kann daher leicht eine Aminosäure ins Minimum geraten. In der Folge treten unbeladene tRNAs auf. Durch den Wechsel

des Codons von AAC zu AGC in pPEU $crtI_{Rg}$ 4802 könnte ein solcher Zustand hervorgerufen worden sein. Das Codon AAC (40/1000 As) kommt in *E. coli* deutlich häufiger vor als AGC (10/1000 As). Möglicherweise bewirkt der Codonwechsel in pPEU $crtI_{Rg}$ 4802, dass es zu einer Verknappung beladener t-RNAs mit dem Codon AGC kommt und durch eine Interaktion der entsprechenden unbeladenen t-RNA-Moleküle mit RNAI und/oder RNAII zu einer Erhöhung der Kopienzahl. Dabei handelt es sich bei dem veränderten Codon jedoch nicht um ein in *E. coli* „seltenes“ Codon wie AGG und AGA (Kleber-Janke & Becker, 2000). Bei der Anhäufung dieser Triplets innerhalb eines heterolog exprimierten Gens kommt es allerdings meist zu einer sehr geringen Expression. Zudem sind wahrscheinlich auch die unbeladenen tRNA Moleküle dieser Codons nur in geringer Anzahl vorhanden, so dass diese auch keinen entscheidenden Effekt auf die Replikationsrate des Plasmids haben.

4.2 Mutationen bewirken Modifikationen der Enzymstruktur

Neben den gefundenen $crtI_{Rg}$ -Sequenzen, deren Genprodukte stärker exprimiert wurden und dadurch eine erhöhte Lycopinbildung hervorriefen, konnte mit pPEU $crtI_{Rg}$ EP05 auch eine mutierte Sequenz ermittelt werden, deren Genprodukt in Komplementierungen einen um mehr als das 3-fache erhöhten Lycopin-Anteil bildete, ohne, dass die Expression des Gens im Vergleich zum nicht mutierten Gen erhöht war. Somit mussten strukturelle Veränderungen im Enzym CrtI $_{Rg}$ EP05 die erhöhte Lycopinsynthese verursachen. Die Mutation des Gens bewirkte einen Aminosäureaustausch an Position 208 von CrtI $_{Rg}$, wobei Leucin durch Phenylalanin ersetzt wurde. Computer gestützte Analysen zeigten, dass sich die Mutation in einem aller Wahrscheinlichkeit nach membrangebundenen Helixbereich des Enzyms befand und dass die lipophilen Eigenschaften des Enzyms in diesem Bereich gegenüber dem nicht modifizierten Enzym verstärkt wurden. Die Analysen zeigten ferner, dass CrtI $_{Rg}$ neben dieser zentralen drei weitere membranassoziierte Helices besitzt, eine weitere zentrale Helix und je eine N-terminale und eine C-terminale Helix (Abbildung IV.2).

Die modifizierte Phytoen-Desaturase CrtI $_{Rg}$ EP05, die verstärkt Lycopin synthetisierte wurde *in vitro* charakterisiert. Bei der gleichen Enzymkonzentration wie bei dem *in vitro* Enzymtest mit dem unveränderten Enzym lag der Lycopingehalt mit 59% um den Faktor 3 höher als im Enzymtest mit der nicht mutierten Phytoen-Desaturase.

Der K_m -Wert der Mutante zeigte mit $4,8 \mu\text{M}$ eine um das 3-fache gestiegene Affinität zum Substrat Phytoen. Der V_{\max} -Wert lag (unverändert) bei $5,2 \text{ nmol/h}\cdot\text{mg CrtI}_{\text{Rg}}$. Die Affinität zum Substrat Neurosporin war zwar deutlich geringer ($66 \mu\text{M}$) als die des nicht mutierten Enzyms ($33 \mu\text{M}$), jedoch der V_{\max} -Wert mit $3,3 \text{ nmol/h}\cdot\text{mg CrtI}_{\text{Rg}}$ um das 5-fache erhöht. Die Spezifitätskonstanten lagen sowohl für Lycopin (108×10^2), als auch für Neurosporin (5×10^2) um das 3-fache über Werten des unveränderten CrtI_{Rg} .

Aus der pUC-Mutationsbibliothek konnte mit $\text{crtI}_{\text{Rg}}\text{EP08}$ eine weitere Mutante identifiziert werden. Die Mutation bewirkte einen Austausch in der resultierenden Aminosäuresequenz an Position 208. Es war also die gleiche Aminosäure betroffen wie im Falle von $\text{CrtI}_{\text{Rg}}\text{EP05}$. Dabei wurde Leucin durch Prolin ersetzt (L208P). Das Enzym bildete in Komplementierungen - trotz starker Expression durch pUC - fast ausschließlich Neurosporin (69%), ζ -Carotin (8%) und Phytofluen (20%). Nur in Spuren wurden Lycopin (2%) und 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin gebildet (Tabelle III.3). Der Austausch von Leucin durch Prolin bewirkte ein starkes Absinken der lipophilen Eigenschaften in dem membranassoziierten Bereich um die Aminosäure 208. Da es sich bei Prolin um einen sehr starken Helixbrecher handelt, ist es darüber hinaus wahrscheinlich, dass die Mutationen einen Einfluss auf die räumliche Struktur des Enzyms hat, wodurch die Interaktion zwischen dem hydrophoben Substrat und Enzym oder die Zusammenlagerung zu einem Enzymkomplex behindert werden könnte. Analysen mit der Software „Predator“ zeigten, dass die durch die Mutation betroffene Helix um 4 Aminosäuren verkürzt wurde (Abbildung III.30).

Da zwei verschiedene Mutationen ($\text{crtI}_{\text{Rg}}\text{EP05}$, $\text{crtI}_{\text{Rg}}\text{EP08}$) an der gleichen Position (208) in der Aminosäurekette von CrtI_{Rg} unterschiedliche Auswirkungen hervorriefen, ist zu vermuten, dass sich die Mutationen in einem für die Anzahl der katalysierten Desaturierungsschritte entscheidenden Bereich des Proteins befinden. Ein Aminosäuresequenzvergleich zeigte, dass die Mutationen in einer konservierten Region von bakteriellen Phytoen-Desaturasen lokalisiert waren. Möglicherweise befindet sich in diesem Bereich das aktive Zentrum des Enzyms an dem auch das Carotinoid bindet. Aufgrund anderer Beobachtungen wurde von Armstrong *et al.* (1989) eine solche Region in einer konservierten Aminosäuresequenz im C-terminalen Bereich der Phytoen-Desaturase aus *Rba. capsulatus* postuliert. Gestützt auf die Untersuchungen mittels der Software „TopPred“ und auf Sequenzvergleiche

wurde ein zweidimensionales Modell für die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* entworfen. In Abbildung IV.2 ist ein Modell der möglichen Sekundärstruktur der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* stellvertretend für die Phytoen-Desaturasen des bakteriellen CrtI Typs dargestellt, Dabei wurde auch die hoch konservierte N-terminale Dinukleotidbindestelle berücksichtigt (Armstrong *et al.*, 1993b).

Neben *crtI_{Rg}*EP08 konnten drei weitere mutierte Leseraster (*crtI_{Rg}*EP16, *crtI_{Rg}*EP21, *crtI_{Rg}*EP22) aus der pUC-Mutationsbibliothek ermittelt werden, deren modifizierte Genprodukte kaum Lycopin und hauptsächlich Neurosporin (*crtI_{Rg}*EP16, *crtI_{Rg}*EP22) oder ζ-Carotin und Phytofluon (*crtI_{Rg}*EP21) bildeten (Tabelle III.2). In all diesen modifizierten Phytoen-Desaturasen kam es zu einem Leucin–Prolin-Austausch (oder umgekehrt). Diese Mutationen beeinflussten durch die Helix- und auch Faltblattbrechenden Eigenschaften die räumliche Struktur des Enzyms, so dass die Funktion oder die Zugänglichkeit des Substrates zum aktiven Zentrum eingeschränkt sein könnte.

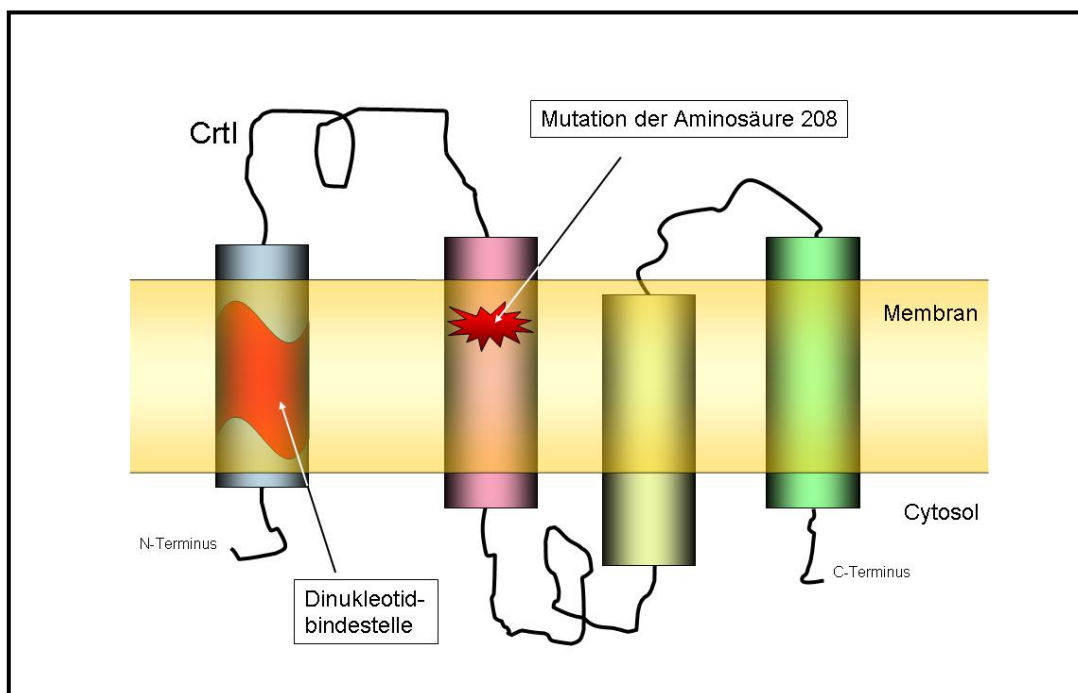


Abbildung IV.2 Modell der Sekundärstruktur von CrtI aus *Rvi. gelatinosus* mit vier transmembranen Helices; Modifikationen der Aminosäure an Position 208 führten zu einem Enzym, das mehr Lycopin (CrtI_{Rg}Ep05) und einem, das weniger Lycopin (CrtI_{Rg}Ep08) bildete. Vermutlich befindet sich in diesem Bereich der Phytoen-Desaturase eine für die Funktion entscheidende Domäne (evtl. aktives Zentrum); Gezeigt ist auch die N-terminale Dinukleotidbindestelle

5 Prinzipielle Ursachen für eine höhere oder niedrigere Anzahl der durch CrtI katalysierten Reaktionsschritte

Drei Prinzipien können für die Funktion der Phytoen-Desaturasen aus Bakterien zu Grunde gelegt werden. Zum einen sind die Konzentrationen sowohl des Substrates, als auch des Enzyms CrtI entscheidend für die Möglichkeit mehr oder weniger Desaturierungsschritte zu katalysieren und im Fall der Phytoen-Desaturasen aus Rhodospirillaceae hauptsächlich Neurosporin oder hauptsächlich Lycopin zu bilden. Dabei spielt die Konkurrenz des Substrates Phytoen mit dem Desaturierungsprodukt Neurosporin um die Carotinoidbindestelle des Enzyms die entscheidende Rolle. Ist viel Enzym vorhanden und wenig Substrat (Phytoen) wird durch CrtI vorzugsweise ein vierter Desaturierungsschritt katalysiert und Lycopin gebildet.

In den jeweiligen Bakterien (und Pilzen) kommt es darüberhinaus zu einer Konkurrenz zwischen der Phytoen-Desaturase und dem sich in der Carotinoidbiosynthesekette anschließenden Enzym. In den Rhodospirillaceae bedeutet dies eine Konkurrenz von CrtI und der 1,2-Hydratase (CrtC) um das Substrat Neurosporin. Ist die Konzentration von CrtI in den Zellen gering, kommt es zur Hydratisierung von Neurosporin durch CrtC, bevor eine vierte Doppelbindung durch CrtI eingefügt werden kann. Ist im Gegensatz dazu die Phytoen-Desaturase in großen Mengen vorhanden, ist sie gegenüber CrtC im „Vorteil“ und kann teilweise einen vierten Desaturierungsschritt katalysieren.

Durch die starke Expression der Phytoen-Desaturase in Phytoen bildenden *E. coli*-Transformanten werden bei verschiedenen bakteriellen Phytoen-Desaturasen ein oder mehrere zusätzliche Desaturierungsschritte katalysiert. Das stützt die Vermutung, dass viele bakterielle Phytoen-Desaturasen unter natürlichen Bedingungen weniger Doppelbindungen in ein Phytoen-Molekül einfügen können, als es potentiell möglich wäre.

Neben der Substrat- und Enzymkonzentration sowie der Konkurrenz zwischen verschiedenen Enzymen um ein Substrat, sind auch strukturelle Faktoren für die Anzahl der eingefügten Doppelbindungen entscheidend, wobei die räumliche Struktur, die Stärke der Membranassoziation sowie die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums des Enzyms die maßgeblichen Parameter sind. Durch eine bessere Zugänglichkeit wird dabei die zusätzliche Desaturierung gefördert. Die Modifikation

der Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus* an Position 208 der Aminosäuresequenz hatte einen starken Einfluss auf die Anzahl der durch CrtI_{Rg} katalysierten Reaktionsschritte. Die Aminosäure 208 befindet sich in einer Membranassoziierten Helix, in der möglicherweise das aktive Zentrum mit der Carotinoidbindestelle des Enzyms lokalisiert ist.

V Zusammenfassung

Das für die Phytoen-Desaturase (Crtl) aus *Rubrivivax gelatinosus* kodierende Gen konnte aus genomischer DNA amplifiziert und in unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert werden. Die Funktion der Phytoen-Desaturase wurde *in vivo* durch Komplementation einer Phytoen bildenden *E. coli*-Transformante überprüft.

Die heterologe Expression von *crtl*_{RG} in *E. coli*, als lösliches und aktives Enzym mit einer molekularen Masse von 57 kDa, konnte nur mit dem Plasmid pPEU*crtl*_{RG} erreicht werden. Mittels *in vitro* Enzymtests konnten kinetische Parameter und der Kofaktor des Enzyms bestimmt werden. Der K_m -Wert für das Substrat Phytoen lag bei 14,8 μM , der V_{max} -Wert bei 5,2 $\text{nmol/h}\cdot\text{mg Crtl}_{\text{RG}}$. Für das Substrat Neurosporin konnte ein K_m -Wert von 33 μM und ein V_{max} -Wert von 0,6 $\text{nmol/h}\cdot\text{mg Crtl}_{\text{RG}}$ ermittelt werden. FAD steigerte als Kofaktor den Umsatz des Substrates um das 39-fache.

Sowohl für die Phytoen-Desaturase aus *Rvi. gelatinosus*, als auch für die Phytoen-Desaturase aus *Rba. sphaeroides* konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Anzahl der an einem Carotinoidmolekül katalysierten Reaktionsschritte stark von der Enzym- bzw. Substratkonzentration abhängt. Bei einer hohen Phytoen- und einer niedrigen Enzymkonzentration wird fast nur Neurosporin gebildet (3 zusätzliche Doppelbindungen), während bei einer hohen Enzym- und einer niedrigen Phytoenkonzentration deutlich mehr Lycopin synthetisiert wird (4 zusätzliche Doppelbindungen).

In den jeweiligen Organismen spielt die Konkurrenz der bakteriellen Phytoen-Desaturase mit dem sich in der Carotinoidbiosynthesekette anschließenden Enzym in Bezug auf die Anzahl der eingefügten Doppelbindungen eine wichtige Rolle. Dies konnte in Hemmstoffuntersuchungen am Beispiel zweier *Xanthophyllomyces dendrohous*-Mutanten gezeigt werden. Die Verringerung der aktiven Crtl-Menge in der Torulin-Mutante DQ1 förderte die Bildung von β -Carotin (nur 4 Desaturierungsschritte). Dagegen führte die Senkung der aktiven Lycopin-Zyklase-Menge in der β -Carotin-Mutante PR1-104 zur Förderung der durch Crtl katalysierten Reaktion mit der Folge, dass hauptsächlich Torulin gebildet wurde (5 Desaturierungsschritte).

Mittels Error Prone PCR sowie dem *E. coli*-Stamm XL1-Red konnte das Gen *crtI* aus *Rvi. gelatinosus* mutagenisiert werden. Die erstellten Mutationsbibliotheken konnten in Phytoen bildenden *E. coli*-Transformanten exprimiert und Klone mit veränderten Phytoen-Desaturasen mittels Farbscreening identifiziert werden. Aus Klonen mit einem veränderten Lycopin/Neurosporin-Verhältnis wurde die DNA isoliert und *crtI* sequenziert. Dadurch konnten mutierte Gene ermittelt werden, deren modifizierte Expressionsprodukte entweder mehr Lycopin oder fast ausschließlich Neurosporin bildeten. Es zeigte sich, dass die Veränderung der Aminosäure an Position 208 einen starken Einfluss auf die Anzahl der eingefügten Doppelbindungen hat. Die Aminosäure befindet sich in einer membrangebundenen Helixstruktur bei der es sich vermutlich um einen direkt an der katalytischen Reaktion beteiligten Bereich handelt. Es konnte gezeigt werden, dass alle Mutationen, die die Anzahl der katalysierten Reaktionsschritte senkten, Leucin-Prolin-Austausche (oder umgekehrt) waren. Prolin (bzw. Leucin) veränderte in diesen Fällen die Sekundärstruktur des Proteins wodurch, die Funktion gestört wurde.

Neben diesen strukturellen Veränderungen wurden Mutationen ermittelt, die zu einer verstärkten Expression der Phytoen-Desaturase führten, was eine erhöhte Lycopinbildung bewirkte. Es zeigte sich, dass bei einigen dieser Mutanten die Replikation der Plasmid-DNA erhöht war. Die starke Replikation ist wahrscheinlich auf eine Verarmung an beladenen tRNA Molekülen zurückzuführen. In ColE1-Plasmiden (pPEU) kann es zu einer unkontrollierten Replikation kommen, die auf Wechselwirkungen zwischen den Replikationsregulierenden Strukturen RNAI und RNAII mit den unbeladenen tRNA Molekülen zurückzuführen ist.

Auf der Grundlage der erlangten Erkenntnisse und mittels Computer gestützter Analysen konnte ein Modell der Sekundärstruktur und der Membranassoziation des Enzyms erstellt werden.

VI Anhang

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung I.1 Carotinoidbiosynthese bis Lycopin	18
Abbildung I.2 Carotinoidbiosynthesewege in Rhodospirillaceae (von Lycopin aus); Spheroidinweg und Spirilloxanthinweg unter aeroben bzw. unter semiaeroben Bedingungen	20
Abbildung I.3 Strategie zur Charakterisierung und Mutagenisierung von $CrtI_{Rg}$ aus <i>Rvi. gelatinosus</i>	22
Abbildung II.1: Gezielte Mutagenisierung von $crtI_{Rg}$ über inverse PCR mittels zweier falsch paarender Basen im Primer „Rg V78D up“	43
Abbildung II.2: Strukturformeln der verwendeten Hemmstoffe DPA und MPDA.....	49
Abbildung III.1 DNA-Sequenz des amplifizierten $crtI_{Rg}$ -Leserasters	59
Abbildung III.2 Aminosäuresequenz-Alignment des aus dem in dieser Arbeit amplifizierten Leseraster hervorgehenden Proteins sowie von $CrtI_{Rg}$ aus dem Bakterienstamm IL144 (Harada <i>et al.</i> , Acc:BAA94063) und $CrtI_{Rg}$ aus dem Bakterienstamm S1 (Picaud <i>et al.</i> , Acc:AAO93135).....	60
Abbildung III.3 Klonierung von $crtI_{Rg}$ aus pMON38201 in pUC8-2.....	61
Abbildung III.4 Farbige Klone von 1) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pUC8-2] (Kontrolle) und 2) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pUCcrtI _{Rg}]	63
Abbildung III.5 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus funktionellen Komplementierungen 1) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pUC8-2] (Kontrolle); 2) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pUCcrtI _{Rg}]	63
Abbildung III.6 Absorptionsspektren der mittels HPLC detektierten Carotinoide	63
Abbildung III.7 SDS-PAGE, Auftrennung der Proteine aus Homogenat von DH5 α [pUC8-2] (Kontrolle K) sowie aus Homogenat (H), Überstand (Ü) und Membranfraktion (MF) von DH5 α [pUCcrtI _{Rg}]	64
Abbildung III.8 Klonierung von $crtI_{Rg}$ aus pMON38201 in pPQE32.....	66

Abbildung III.9 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus funktionellen Komplementierungen 1) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pQE32] (Kontrolle); 2) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pQE $crtI_{Rg}$]	67
Abbildung III.10 SDS-PAGE, Auftrennung der Proteine aus Homogenat von DH5 α [pPQE32] (K) sowie von Homogenat (H), Überstand (Ü) und Membranfraktion (MF) aus DH5 α [pPQE $crtI_{Rg}$].	68
Abbildung III.11 Klonierung von $crtI_{Rg}$ aus pMON38201 in pTrc99a.....	69
Abbildung III.12 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus funktionellen Komplementierungen 1) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pTrc99a] (Kontrolle); 2) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pTrc $crtI_{Rg}$]	70
Abbildung III.13 SDS-PAGE, Auftrennung der Proteine aus Homogenat von DH5 α [pTrc99a] (K); sowie von Homogenat (H), Überstand (Ü) und Membranfraktion (MF) aus DH5 α [pPQE $crtI_{Rg}$]	71
Abbildung III.14 Klonierung von $crtI_{Rg}$ aus pMON38201 in pPEU32.....	72
Abbildung III.15 Farbige Klone von 1) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pPEU32] (Kontrolle) und 2) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pPEU $crtI_{Rg}$].....	73
Abbildung III.16 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus funktionellen Komplementierungen 1) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pPEU32] (Kontrolle); 2) DH5 α [pACcrtEB _{Eu} pPEU $crtI_{Rg}$].....	73
Abbildung III.17 SDS-PAGE, Auftrennung von Proteinen aus Homogenat von DH5 α [pPEU32] (K) sowie aus Homogenat (H), Überstand (Ü) und Membranfraktion (MF) von DH5 α [pPEU $crtI_{Rg}$].....	74
Abbildung III.18 Übersicht der klonierten Plasmide und ihrer Verwendung	76
Abbildung III.19 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus <i>in vitro</i> Enzymtests mit Überstand von 1) DH5 α [pPEU32] (Kontrolle) und 2) DH5 α [pPEU $crtI_{Rg}$].....	78
Abbildung III.20 Absorptionsspektren der mittels HPLC detektierten Carotinoide	78
Abbildung III.21 Spezifische Aktivität der Phytoen-Desaturase aus <i>Rvi. gelatinosus</i> in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	80
Abbildung III.22 K_m -Wert-Bestimmung der Phytoen-Desaturase $CrtI_{Rg}$ für die Substrate Phytoen (A) und Neurosporin (B)	81

Abbildung III.23 Abhängigkeit der gebildeten Lycopin-Menge von der Substratkonzentration.....	82
Abbildung III.24 Korrelation der Enzymkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] und dem Anteil von Lycopin am Gesamtprodukt.....	84
Abbildung III.25 Dixon-Plot zur Ermittlung des I_{50} -Wertes von DPA für CrtI_{Rg}	85
Abbildung III.26 SDS-PAGE nach immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatografie von CrtI_{Rg} aus $\text{DH5}\alpha[\text{pPEUcrtI}_{\text{Rg}}]$	86
Abbildung III.27 Kofaktoruntersuchung der Phytoen-Desaturase aus <i>Rvi. gelatinosus</i>	87
Abbildung III.28 Komplementierung Phytoen bildender <i>E. coli</i> -Transformanten mit einer $\text{pUCcrtI}_{\text{Rg}}$ -Mutationsbibliothek.....	88
Abbildung III.29 HPLC-Elutionsprofile von Komplementierungen mit der $\text{pUCcrtI}_{\text{Rg}}$ -Mutationsbibliothek 1) $\text{DH5}\alpha[\text{pACcrtEB}_{\text{Eu}}\text{pUCcrtI}_{\text{Rg}}\text{WT}]$ (Kontrolle); 2) $\text{DH5}\alpha[\text{pACcrtEB}_{\text{Eu}}\text{pUCcrtI}_{\text{Rg}}\text{EP08}]$ 3) $\text{DH5}\alpha[\text{pACcrtEB}_{\text{Eu}}\text{pUCcrtI}_{\text{Rg}}\text{EP16}]$ 4) $\text{DH5}\alpha[\text{pACcrtEB}_{\text{Eu}}\text{pUCcrtI}_{\text{Rg}}\text{EP21}]$ 5) $\text{DH5}\alpha[\text{pACcrtEB}_{\text{Eu}}\text{pUCcrtI}_{\text{Rg}}\text{EP22}]$	89
Abbildung III.30 Bereiche der veränderten Aminosäuresequenzen von $\text{CrtI}_{\text{Rg}}\text{EP08}$, $\text{CrtI}_{\text{Rg}}\text{EP16}$, $\text{CrtI}_{\text{Rg}}\text{EP21}$ und $\text{CrtI}_{\text{Rg}}\text{EP22}$ mit den jeweiligen Modifizierungen der Sekundärstruktur.....	91
Abbildung III.31 Komplementierung Phytoen bildender <i>E. coli</i> -Transformanten mit einer $\text{pPEUcrtI}_{\text{Rg}}$ -Mutationsbibliothek	93
Abbildung III.32 HPLC-Elutionsprofil von Carotinoidextrakten aus 1) $\text{DH5}\alpha[\text{pACcrtEB}_{\text{Eu}}\text{pUCcrtI}_{\text{Rg}}\text{WT}]$ - Kontrolle und 2) $\text{DH5}\alpha[\text{pACcrtEB}_{\text{Eu}}\text{pPEUcrtI}_{\text{Rg}}\text{EP05}]$ - Mutante	93
Abbildung III.33 SDS-PAGE von Proteinen, aus Homogenat von $\text{DH5}\alpha[\text{pPEU32}]$ (K); Homogenat (H), Überstand (Ü) und Membranfraktion (MF) von $\text{DH5}\alpha[\text{pPEUcrtI}_{\text{Rg}}\text{WT}]$ sowie Homogenat, Überstand, und Membranfraktion aus $\text{DH5}\alpha[\text{pPEUcrtI}_{\text{Rg}}\text{EP05}]$	94
Abbildung III.34 K_m -Wert-Bestimmung der mutierten Phytoen-Desaturase $\text{CrtI}_{\text{Rg}}\text{EP05}$ für die Substrate Phytoen (A) und Neurosporin (B).....	96
Abbildung III.35 Korrelation von Enzymmenge und Anteil des Lycopins am gebildeten Gesamtprodukt der enzymatischen Reaktion von $\text{CrtI}_{\text{Rg}}\text{EP05}$	97

Abbildung III.36 Bereich der veränderten Aminosäuresequenz von CrtI _{Rg} EP05 mit der zugehörigen Modifizierung der Sekundärstruktur	97
Abbildung III.37 „TopPred“-Analyse der Aminosäuresequenzen von CrtI _{Rg} WT, CrtI _{Rg} EP05 und CrtI _{Rg} EP08 hinsichtlich ihrer hydrophoben Bereiche und wahrscheinlichen Membrandomänen	99
Abbildung III.38 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus den Komplementierungen DH5α[pACcrtEB _{Eu} pTrccrtI _{Rg} WT] (Kontrolle), DH5α[pACcrtEB _{Eu} pTrccrtI _{Rg} 3218] und DH5α[pACcrtEB _{Eu} pTrccrtI _{Rg} 5405]	101
Abbildung III.39 SDS-PAGE von Proteinen aus Homogenaten von DH5α[pACcrtEB _{Eu} pTrccrtI _{Rg} WT] (Kontrolle), DH5α[pACcrtEB _{Eu} pTrccrtI _{Rg} 3218] und DH5α[pACcrtEB _{Eu} pTrccrtI _{Rg} 5405]	102
Abbildung III.40 Bakterienkulturen von DH5α[pACcrtEB _{Eu} pPEUcrtI _{Rg}] der Klone r4802, r4804, r4805, r4806 sowie der Kontrolle mit der unveränderten Phytoen-Desaturase (WT)	104
Abbildung III.41 HPLC-Elutionsprofile der Carotinoidextrakte aus den Flüssigkulturen von DH5α[pACcrtEB _{Eu} pPEUcrtI _{Rg} WT] Wildtyp (Kontrolle) sowie der Klone r4802, r4804, r4805, r4806	105
Abbildung III.42 Korrelation zwischen der CrtI _{Rg} -Menge pro ml und dem prozentualen Lycopin-Anteil in Kulturen der Klone r4802, r4804, r4805, r4806 sowie DH5α[pACcrtEB _{Eu} pPEUcrtI _{Rg} WT]	106
Abbildung III.43 A) SDS-PAGE von Proteinen aus Kulturen von DH5α[pACcrtEB _{Eu} pPEUcrtI _{Rg}] der Klone r4802, r4804, r4805, r4806 sowie DH5α[pACcrtEB _{Eu} pPEUcrtI _{Rg} WT]; B) Agarose Gel: Plasmid-DNA aus DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4802], DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4804], DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4805], DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4806] sowie DH5α[pPEUcrtI _{Rg} WT]	107
Abbildung III.44 Korrelation zwischen der gebildeten DNA-Menge (pPEUcrtI _{Rg}) und der Menge Phytoen-Desaturase in Kulturen der Mutanten DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4802], DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4804], DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4805], DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4806] sowie DH5α[pPEUcrtI _{Rg} WT]	108
Abbildung III.45 Aminosäuresequenz Alignment des Bereiches der Mutation V78D	109

Abbildung III.46 Carotinoidbiosynthesewege von <i>X. dendrohous</i> Wildtyp und der Mutante DQ1	111
Abbildung III.47 Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz der amplifizierten Fragmente aus cDNA-Bibliotheken von <i>X. dendrohous</i>	113
Abbildung III.48 <i>X. dendrohous</i> -Kulturen von Wildtyp, DQ1 (Torulin-Mutante) und PR1-104 (β -Carotin-Mutante) auf YPD-Medium.....	115
Abbildung III.49 Carotinoidbiosyntheseweg der <i>X. dendrohous</i> -Mutanten PR1-104 und DQ1	116
Abbildung III.50 HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten aus Hemmstoffuntersuchungen 1) DQ1 ohne DPA, 2) DQ1 mit 30 μ M DPA, 3) PR1-104 ohne MPDA, 4) PR1-104 mit 20 μ M MPDA	119
Abbildung III.51 Absorptionsspektren der HPLC-Elutionspeaks von Torulin (To) und β -Carotin (B).....	119
Abbildung IV.1 Modell für die Replikationskontrolle von ColE1-Plasmiden	133
Abbildung IV.2 Modell der Sekundärstruktur von CrtI aus <i>Rvi. gelatinosus</i>	136

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle I.1 Carotinoid-Zusammensetzung unterschiedlicher Rhodospirillaceae.....	14
Tabelle II.1 Verwendete Plasmide	29
Tabelle II.2: PCR-Ansatz 50 µl	36
Tabelle II.3: PCR-Cycler-Programm	36
Tabelle II.4: Verwendete PCR-Primer	37
Tabelle II.5: Error Prone PCR, Ansatz 1	39
Tabelle II.6: Error Prone PCR, Ansatz 2.....	40
Tabelle II.7: Error Prone PCR-Cycler-Programm.....	40
Tabelle II.8: Ansatz für inverse PCR.....	42
Tabelle II.9: PCR-Cycler-Programm für inverse PCR.....	42
Tabelle II.10: Eichung des HPLC-Systems.....	52
Tabelle III.1 Auflistung der detektierten Carotinoide sowie der spezifischen Absorptionsmaxima und Retentionszeiten	79
Tabelle III.2 Zusammensetzung der Carotinoidextrakte aus DH5α[pACcrtEB _{EU} pUCcrtI _{Rg} WT] (Kontrolle) sowie 4 Klonen mit veränderter Carotinoid- zusammensetzung	89
Tabelle III.3 Verhältnis von Lycopin und Neurosporin (L:N) in den Carotinoid- extrakten aus DH5α[pACcrtEB _{EU} crtI _{Rg} WT] und den Klonen EP08, EP16, EP21 und EP22 sowie deren eingefügte Mutationen	92
Tabelle III.4 Quantifizierung der Carotinoide aus DH5α[pACcrtEB _{EU} pTrccrtI _{Rg} WT], DH5α[pACcrtEB _{EU} pTrccrtI _{Rg} 3218] und DH5α[pACcrtEB _{EU} pTrccrtI _{Rg} 5405]; Lycopin/Neurosporin-Verhältnis (L:N) sowie prozentualer Anteil von CrtI _{Rg} am Gesamtprotein	103
Tabelle III.5 Carotinoid- und Enzymmengen und zugehörige Mutationen von DH5α[pACcrtEB _{EU} pPEUcrtI _{Rg} WT] und den Klonen r4802, r4804, r4805 und r4806 sowie korrespondierende DNA-Mengen aus Kulturen von DH5α[pPEUcrtI _{Rg} WT], DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4802], DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4804], DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4805] und DH5α[pPEUcrtI _{Rg} 4806]	108
Tabelle III.6 Auflistung der in <i>X. dendrohous</i> detektierten Carotinoide	119

3 Literaturverzeichnis

- Albrecht M, Linden H, Sandmann G (1996).** Biochemical characterization of purified zeta-carotene desaturase from *Anabaena* PCC 7120 after expression in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* **236**:115-120.
- Albrecht M, Ruther A, Sandmann G (1997).** Purification and biochemical characterization of a hydroxyneurosporene desaturase involved in the biosynthetic pathway of the carotenoid spheroidene in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* **179**:7462-7.
- Albrecht M, Takaichi S, Steiger S, Wang ZY, Sandmann G (2000).** Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* **18**:843-6.
- Amann E, Ochs B, Abel KJ (1988).** Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene.* **69**:301-15.
- Armstrong GA, Alberti M, Leach F, Hearst JE (1989).** Nucleotide sequence, organization, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Gen Genet.* **216**:254-68.
- Armstrong GA, Cook DN, Ma D, Alberti M, Burke DH, Hearst JE (1993a).** Regulation of carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis genes and identification of an evolutionarily conserved gene required for bacteriochlorophyll accumulation. *J Gen Microbiol.* **139**:897-906.
- Armstrong GA, Hundle BS, Hearst JE (1993b).** Evolutionary conservation and structural similarities of carotenoid biosynthesis gene products from photosynthetic and nonphotosynthetic organisms. *Methods Enzymol.* **214**:297-311.
- Badenhop F, Steiger S, Sandmann M, Sandmann G (2003).** Expression and biochemical characterization of the 1-HO- carotenoid methylase CrtF from *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiol Lett.* **222**:237-242.

- Bartley GE, Schmidhauser TJ, Yanofsky C, Scolnik PA (1990).** Carotenoid desaturases from *Rhodobacter capsulatus* and *Neurospora crassa* are structurally and functionally conserved and contain domains homologous to flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem.* **265**:16020-4.
- Borovkov AY, Rivkin MI (1997).** XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products. *Biotechniques.* **22**:812-4.
- Britton G (1995).** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* **9**:1551-8.
- Britton G, Young A. (1993).** Carotenoids in photosynthesis. Chapman and Hall. London.
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. (1994).** Biology of Microorganisms. Prentice-Hall inc. New Jersey.
- Cesareni G, Helmer-Citterich M, Castagnoli L (1991).** Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet.* **7**:230-5.
- Chang ACY, Cohen SN (1978).** Construction and characterisation of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15a cryptic miniplasmid. *J Bacteriol.* **134**:235-241.
- Claros MG, von Heijne G (1994).** TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci.* **10**:685-6.
- Cogdell RJ, Frank HA (1987).** How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochim Biophys Acta.* **895**:63-79.
- Cunningham FX, Gantt E (1998).** Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **49**:557-583.
- Cunningham FX, Jr., Gantt E (2001).** One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:2905-2910.
- Davies BH. (1976).** Chapter 19. In: Chemistry of Plant Pigments. Goodwin TW, editor. Academic Press ed. London.

- Ditta G, Schmidhauser T, Yakobson E, Lu P, Xiao-Wu L, Finlay DR, Guiney D, Helinski DR (1985).** Plasmids Related to the Broad Host Range Vektor, pRK290, Useful for Genecloning and for Monitoring Gene Expression. *Plasmid*. **13**:149-153.
- Drews G, Oelze J (1981).** Organization and differentiation of membranes of phototrophic bacteria. *Adv Microb Physiol*. **22**:1-92.
- Drews G, Peters J, Dierstein R (1983).** Molecular-organization and biosynthesis of pigment-protein complexes of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Ann Microbiol (Paris)*. **134B**:151-8.
- Edge R, Mc Garvey DJ, Truscott TG (1997).** The carotenoids as anti-oxidants - a review. *J Photochem Photobiol B*. **41**:189-200.
- Eimhjellen KE, Liaaen-Jensen S (1964).** The biosynthesis of carotenoids in *Rhodopseudomonas gelatinosa*. *Biochem Biophys Res Commun*. **82**:21-40.
- Elsen S, Ponnampalam SN, Bauer CE (1998).** CrtJ bound to distant binding sites interacts cooperatively to aerobically repress photopigment biosynthesis and light harvesting II gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Biol Chem*. **273**:30762-9.
- Frank HA, Cogdell RJ (1996).** Carotenoids in photosynthesis. *Photochem Photobiol*. **63**:257-264.
- Frank HA, Young AJ, Britton G, Cogdell DE. (1999).** The photochemistry of carotenoids. Kluwer Academic. Dordrecht.
- Fraser PD, Linden H, Sandmann G (1993).** Purification and reactivation of recombinant Synechococcus phytoene desaturase from an overexpressing strain of *Escherichia coli*. *Biochem J*. **291**:687-92.
- Fraser PD, Misawa N, Linden H, Yamano S, Kobayashi K, Sandmann G (1992).** Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. *J Biol Chem*. **267**:19891-5.
- Frishman D, Argos P (1995).** Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins*. **23**:566-79.

- Frishman D, Argos P (1996).** Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng.* **9**:133-42.
- Frishman D, Argos P (1997).** Seventy-five percent accuracy in protein secondary structure prediction. *Proteins.* **27**:329-35.
- Garcia-Asua G, Cogdell RJ, Hunter CN (2002).** Functional assembly of the foreign carotenoid lycopene into the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*, achieved by replacement of the native 3-step phytoene desaturase with its 4-step counterpart from *Erwinia herbicola*. *Mol Microbiol.* **44**:233-244.
- Garcia-Asua G, Lang HP, Cogdell RJ, Hunter CN (1998).** Carotenoid diversity: a modular role for the phytoene desaturase step. *Trends Plant Sci.* **3**:445-449.
- Garfin DE. (1990).** Purification procedures: Electrophoretic methods. In: Methods in Enzymology 182. Academic Press ed. San Diego: Deutscher, M. PL. p 425-440.
- Gerjets T. (2002).** Diplomarbeit an der Goethe Universität Frankfurt a. M.: Expression und Charakterisierung von Carotinoidketolasen aus photosynthetischen Bakterien.
- Giuliano G, Pollock D, Scolnik PA (1986).** The gene *crtI* mediates the conversion of phytoene into colored carotenoids in *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Biol Chem.* **261**:12925-9.
- Goodman MF, Keener S, Guidotti S, Branscomb EW (1983).** On the enzymatic basis for mutagenesis by manganese. *J Biol Chem.* **258**:3469-75.
- Goodwin TW. (1980).** The biochemistry of the carotenoids. 1. Chapman and Hall. New York.
- Hahn FM, Eubanks LM, Testa CA, Blagg BS, Baker JA, Poulter CD (2001).** 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the gene product of open reading frame (ORF) 2816 and ORF 2895 in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol.* **183**:1-11.

- 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.* **1461**:147-54.
- Harada J, Nagashima KV, Takaichi S, Misawa N, Matsuura K, Shimada K (2001).** Phytoene desaturase, CrtI, of the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*, produces both neurosporene and lycopene. *Plant Cell Physiol.* **42**:1112-8.
- Harayama S (1998).** Artificial evolution by DNA shuffling. *Trends Biotechnol.* **16**:76-82.
- Hausmann A, Sandmann G (2000).** A single five-step desaturase is involved in the carotenoid biosynthesis pathway to beta-carotene and torulene in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* **30**:147-153.
- Havaux M (1998).** Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* **3**:147-151.
- Herman A, Wegrzyn A, Wegrzyn G (1994).** Regulation of replication of plasmid pBR322 in amino acid-starved *Escherichia coli* strains. *Mol Gen Genet.* **243**:374-8.
- Horton P. (1996).** Nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. In: Light as an Energy Source and Information Carrier in Plant Physiology. Jennings RC, Zuccelli G, Ghetti F, Colombetti G, editors. New York: Plenum Press. p 99-111.
- Hunter CN, Hundle BS, Hearst JE, Lang HP, Gardiner AT, Takaichi S, Cogdell RJ (1994).** Introduction of new carotenoids into the bacterial photosynthetic apparatus by combining the carotenoid biosynthetic pathways of *Erwinia herbicola* and *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* **176**:3692-7.
- Itoh T, Tomizawa J (1980).** Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **77**:2450-4.
- Johnson EA, Schroeder WA (1996).** Microbial carotenoids. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **53**:119-78.

- Kleber-Janke T, Becker WM (2000).** Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr Purif.* **19**:419-24.
- Komori M, Ghosh R, Takaichi S, Hu Y, Mizoguchi T, Koyama Y, Kuki M (1998).** A null lesion in the rhodopin 3,4-desaturase of *Rhodospirillum rubrum* unmasks a cryptic branch of the carotenoid biosynthetic pathway. *Biochemistry.* **37**:8987-94.
- Krubasik KP. (2000).** Dissertation an der Goethe Universität Frankfurt a. M.: Gene der Carotinoidbiosynthese aus den Corynebakterien *Brevibacterium linens* und *Brevibacterium flavum*.
- Krubasik P, Takaichi S, Maoka T, Kobayashi M, Masamoto K, Sandmann G (2001).** Detailed biosynthetic pathway to decaprenoxanthin diglucoside in *Corynebacterium glutamicum* and identification of novel intermediates. *Arch Microbiol.* **176**:217-23.
- Lang HP, Hunter CN (1994).** The relationship between carotenoid biosynthesis and the assembly of the light-harvesting LH2 complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem J.* **298**:197-205.
- Leung DW, Chen E, Goeddel DV (1989).** A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique.* **1**:11-15.
- Lichtenthaler HK (1999).** The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **50**:47-65.
- Lichtenthaler HK (2000).** Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochem Soc Trans.* **28**:785-9.
- Linden H, Misawa N, Chamovitz D, Pecker I, Hirschberg J, Sandmann G (1991).** Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes. *Z Naturforsch.* **46**:1045-51.
- Masukata H, Tomizawa J (1990).** A mechanism of formation of a persistent hybrid between elongating RNA and template DNA. *Cell.* **62**:331-8.

- Ohnuma S, Nakazawa T, Hemmi H, Hallberg AM, Koyama T, Ogura K, Nishino T (1996).** Conversion from farnesyl diphosphate synthase to geranylgeranyl diphosphate synthase by random chemical mutagenesis. *J Biol Chem.* **271**:10087-95.
- Ouchane S, Picaud M, Vernotte C, Astier C (1997).** Photooxidative stress stimulates illegitimate recombination and mutability in carotenoid-less mutants of *Rubrivivax gelatinosus*. *EMBO J.* **16**:4777-87.
- Penfold RJ, Pemberton JM (1991).** A Gene from the Photosynthetic Gene Cluster of *Rhodobacter sphaeroides* Induces trans Suppression of Bacteriochlorophyll and Carotenoid Levels in *R. sphaeroides* and *R. capsulatus*. *Curr Biol.* **23**:259-263.
- 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**:354-362.
- Ponnampalam SN, Buggy JJ, Bauer CE (1995).** Characterization of an aerobic repressor that coordinately regulates bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol.* **177**:2990-7.
- Raisig A, Bartley G, Scolnik P, Sandmann G (1996).** Purification in an active state and properties of the 3-step phytoene desaturase from *Rhodobacter capsulatus* overexpressed in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo).* **119**:559-564.
- Raisig A, Sandmann G (1999).** 4,4'-diapophytoene desaturase: Catalytic properties of an enzyme from the C-30 carotenoid pathway of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **181**:6184-6187.
- Raisig A, Sandmann G (2001).** Functional properties of diapophytoene and related desaturases of C-30 and C-40 carotenoid biosynthetic pathways. *Biochim Biophys Acta.* **1533**:164-170.
- Richter G. (1998).** Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. Thieme. Stuttgart.
- Rudert S. (2004).** Diplomarbeit an der Goethe Universität Frankfurt a. M.: Expression des Gens der β -Carotin-Desaturase aus *Brevibacterium linens*.

- Ruiz-Hidalgo MJ, Benito EP, Sandmann G, Eslava AP (1997).** The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol Gen Genet.* **253**:734-44.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989).** Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Sandmann G (1994a).** Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur J Biochem.* **223**:7-24.
- Sandmann G (1994b).** Phytoene Desaturase - Genes, Enzymes and Phylogenetic Aspects. *J Plant Physiol.* **143**:444-447.
- Sandmann G (2002).** Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. *Physiol Plant.* **116**:431-440.
- Sandmann G, Kuhn S, Boger P (1998).** Evaluation of structurally different carotenoids in *Escherichia coli* transformants as protectants against UV-B radiation. *Appl Environ Microbiol.* **64**:1972-1974.
- Schein HC (1989).** Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *BioTechniques.* **7**:1141-1149.
- Schlegel HG. (1985).** Allgemeine Mikrobiologie. Thieme. Stuttgart.
- Schmidt K. (1978).** Biosynthesis of Carotenoids in photosynthetic bacteria. In: The Photosynthetic Bacteria. Plenum Press ed. New York: Clayton, R.K., Sistrom, W.R. p 729-759.
- Serrano P (1988).** H⁺-ATPase from Plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: Purification and reconstruction. *Methods Enzymol.* **157**:533-544.
- Seybold A, Goodwin TW (1959).** Occurrence of astaxanthin in the flower petals of *Adonis annua L.* *Nature.* **184**:1714-1715.
- Siefermann-Harms D (1987).** The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol Plant.* **69**: 561-568.
- Steiger S, Astier C, Sandmann G (2000).** Substrate specificity of the expressed carotenoid 3,4-desaturase from *Rubrivivax gelatinosus* reveals the detailed reaction sequence to spheroidene and spirilloxanthin. *Biochem J.* **349**:635-40.

- Steiger S, Jackisch Y, Sandmann G (Im Druck)**. Carotenoid biosynthesis in *Gloeobacter violaceus* PCC4721 involves a single crtI-type phytoene desaturase instead of typical cyanobacterial enzymes. *Arch Microbiol*.
- Steiger S, Mazet A, Sandmann G (2003)**. Heterologous expression, purification, and enzymatic characterization of the acyclic carotenoid 1,2-hydratase from *Rubrivivax gelatinosus*. *Arch Biochem Biophys*. **414**:51-8.
- Takaichi S. (1999)**. Carotenoids and carotenogenesis in anoxygenic photosynthetic bacteria. In: The Photochemistry of Carotenoids. Frank HA, Young AJ, Britton G, Cogdell RJ, editors. Dordrecht: Kluwer Academic. p 39-69.
- Tsuchiya T, Takaichi S, Misawa N, Maoka T, Miyashita H, Mimuro M (2005)**. The cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 uses bacterial-type phytoene desaturase in carotenoid biosynthesis. *FEBS Lett*. **579**:2125-9.
- Uffen RL (1976)**. Anaerobic growth of a *Rhodospseudomonas* species in the dark with carbon monoxide as sole carbon and energy substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **73**:3298-302.
- Vartanian JP, Henry M, Wain-Hobson S (1996)**. Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic Acids Res*. **24**:2627-31.
- Verdoes JC, Misawa N, van Ooyen AJ (1999)**. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Bioeng*. **63**:750-5.
- Vieira J, Messing J (1982)**. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*. **19**:259-68.
- von Heijne G (1992)**. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol*. **225**:487-94.
- Wang CW, Liao JC (2001)**. Alteration of product specificity of *Rhodobacter sphaeroides* phytoene desaturase by directed evolution. *J Biol Chem*. **276**:41161-4.

- Webster GD, Cogdell RJ, Lindsay GJ (1980).** The location of the carotenoid in the B800--850 light-harvesting pigment--protein complex from *Rhodospseudomonas capsulata*. *FEBS Lett.* **111**:391-4.
- Wieland B, Feil C, Gloria-Maercker E, Thumm G, Lechner M, Bravo JM, Poralla K, Gotz F (1994).** Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **176**:7719-26.
- Wrobel B, Wegrzyn G (1998).** Replication regulation of ColE1-like plasmids in amino acid-starved *Escherichia coli*. *Plasmid.* **39**:48-62.
- Xu H, Petersen EI, Petersen SB, El-Gewely MR (1999).** Random mutagenesis libraries: Optimization and simplification by PCR. *Bio Techniques.* **27**:1102-1108.
- Yavachev L, Ivanov I (1988).** What does the homology between *E. coli* tRNAs and RNAs controlling ColE1 plasmid replication mean? *J Theor Biol.* **131**:235-41.
- Zhu YS, Cook DN, Leach F, Armstrong GA, Alberti M, Hearst JE (1986).** Oxygen-regulated mRNAs for light-harvesting and reaction center complexes and for bacteriochlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* during the shift from anaerobic to aerobic growth. *J Bacteriol.* **168**:1180-8.
- Zurdo J, Fernandez CC, Ramirez JM (1993).** A structural role of carotenoid in the light-harvesting II protein of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem J.* **290**:531-537.

4 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gerhard Sandmann für das interessante Thema dieser Arbeit und für die Hilfe bei Fragen, die in Zusammenhang mit ihrer Bewältigung auftauchten.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Brüggemann, der die Aufgabe des Zweitgutachters übernommen hat.

Allerherzlichsten Dank möchte ich Frau Dr. Sabine „Mama“ Steiger aussprechen, die mich in allen Belangen wissenschaftlich, moralisch und energetisch unterstützt hat, dass es eine helle Freude war.

Ein großer Dank gilt Sophie Rudert für die Herstellung des Plasmids pPEU, ohne das ich ganz schön in die Röhre geguckt hätte. Dr. Lutz Schäfer bin ich sehr dankbar für die zur Verfügung-Stellung der „grünen Schreibtischunterlage“ und die gemeinsame Nutzung der Selbigen. Nina Rählerlert verdanke ich die Verringerung meiner Nackenverspannung und meinen Großen Wissensschatz rund um das Thema Pferd. Meiner Schwester Gundje Arnold danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, den leckeren Cappuccino und den „Planschispaß“. Dankeschön Martina Komor, Ulf Soltau und Marilu Huertas, mit euch war das Studium eine Freude.

Dem ganzen Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Sandmann einschließlich aller ehemaligen Kollegen und Kolleginnen danke ich für das sehr gute Arbeitsklima das gute Teamwork und das Ertragen meiner gelben Turnhose bei 40 °C und aller anderen Merkwürdigkeiten.

Danke:

Andreas Lück, Marianne Flechsel, Dr. Manuela Sandmann, Dr. Jürgen Breitenbach, Martin Feussner, Tanja Gerjets, Yvonne Jackisch, Evelyne Weber, Sabine Nooten, Astrid Elter, Melanie Friedrich, Dr. Changfu Zhu

Danke Luise, Kerstin und Christoph, dass ihr immer für mich da seid.

Meinem Vater danke ich für das Frühstück jeden zweiten Mittwoch und die erhellenden Gespräche während dessen.

Meiner Mitbewohnerin Heike Hackemesser verdanke ich ein Aufregendes WG-Leben, das ich nicht missen möchte.

5 Lebenslauf



Familienname Stickforth
 Vorname Per
 Anschrift Rat-Beil-Str. 59a
 60318 Frankfurt a.M.
 Telefon Privat 069-559707
 Mobil 0179-3744975
 Email stickforth@uni-frankfurt.de
 Geburtsdatum 27.Oktober 1966
 Geburtsort Frankfurt a.M.

Ausbildung und Schule

Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Botanischen Instituts der Johann W. v. Goethe Universität Frankfurt a.M. in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Sandmann im Fachbereich Pflanzenphysiologie und Molekularbiologie.

Promotion Die Beschäftigung beinhaltete die Betreuung von PraktikantInnen und DiplomantInnen.
 Seit 12/2001

Thema Die Phytoen Desaturase aus *Rubrivivax gelatinosus*: Funktionelle und strukturelle Faktoren der Anzahl von Reaktionsschritten Termin der Disputation 09/2005

Methoden Molekularbiologische Methoden insbesondere spezielle PCR Techniken, Mutagenisierung, Transformation von E. Coli, chromatographische Trennverfahren, HPLC-Analytik, Proteinreinigung sowie immunologische Verfahren.

Studium Studium der Biologie an der Johann W. v. Goethe Universität, Frankfurt a.M.; Abschluss des Biologiestudiums mit Erlangung des akademischen Grades „Diplom-Biologe“ mit der Note „sehr gut“ (1)
 10/95 - 10/01 Hauptfach: Botanik (Biochemie, Physiologie und Molekularbiologie); Nebenfächer: Toxikologie und Zoologie

Weitere Studiengänge	Studium der Musikpädagogik an der Johann W. v. Goethe Universität, Frankfurt a.M.
04/88 - 10/95	Studium der Vor- und Frühgeschichte an der Johann Wolfgang v. Goethe Universität, Frankfurt a.M.
10/87 - 04/88	
Publikationen	Stickforth, P.; Steiger, S.; Hess, W. R.; Sandmann, G.A (2003). Novel type of lycopene epsilon-cyclase in the marine cyanobacterium <i>Prochlorococcus marinus</i> MED4 Arch. Microbiol. 179, 409-415
Vorträge	Rhein-Main-Kolloquium (April, 2005) an der botanischen Fakultät der Universität Mainz Thema: Mutagenisierung der Phytoendesaturase aus <i>Rubrivivax gelatinosus</i> und Effekte der heterologen Expression in <i>E. coli</i>
Schulabschluss	Max-Beckmann-Gymnasium, Frankfurt a.M. Abschluss: Abitur (Note 2,7)
09/83 - 06/87	
Praktische Tätigkeiten	Verkauf und Einkauf von Musikinstrumenten sowie geschäftsführende Tätigkeiten im Musikgeschäft Spielraum Musik & Saxophon Studio GbR
Jobs	
10/1988-11/2000	Verkauf von Konzert- und Veranstaltungstickets bei Tickets per Post. Telefon- und Ladenverkauf sowie Kundenservice
11/1997-11/2001	
Musik	Produktion und Veröffentlichung diverser Tonträger seit 1989, Solo-Auftritte sowie Konzerte mit unterschiedlichen musikalischen Formationen.
Fähigkeiten / Interessen	Fundierte PC-Kenntnisse, MS Office, Adobe Photoshop, Correl Draw, Internetdatenbanken, biotechnologische Software, Video- und Audibearbeitungssoftware.
EDV	
Fremdsprachen	Englisch
Interessen	Radfahren, Wandern, Fotografie, Videoschnitt / Tontechnik, Literatur

Frankfurt a.M., 7. Dezember 2005