

**Gene und genetische Modifikation der
Carotinoidbiosynthese in
*Phaeodactylum tricornutum***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften (FB15)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Ulrike Eilers-Pulch
aus Ludwigsburg

Frankfurt, 2016
(D30)

vom Fachbereich (FB15) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan(in):

Gutachter(in):.....

Datum der Disputation:

The secret of genius is to carry the spirit of the child into old age, which means never losing your enthusiasm.

Aldous Huxley

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Mikroalgen - Diatomeen (Bacillariophyceae)	1
1.1.1 Molekulargenetik bei <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	2
1.2 Carotinoide.....	3
1.2.1 Carotinoidbiosynthese.....	4
1.2.1 Proteinimport in den Chloroplasten.....	7
1.2.2 Non photochemical quenching.....	8
1.2.3 Diurnale Expression	12
1.3 Aufklärung und biotechnologische Anwendung der Carotinoidbiosynthese von <i>P. tricornutum</i>	13
1.3.1 Homologe und heterologe Expression	13
1.3.2 Fucoxanthin	14
1.3.3 Phytoen-Synthase	15
1.3.4 Zeaxanthin-Epoxidase.....	18
1.3.5 Astaxanthin und die β -Carotin-Ketolase.....	22
2 Zielsetzung	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Chemikalien, Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien	26
3.2 Systematik und Anzucht der verwendeten Organismen	27
3.2.1 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	27
3.2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
3.2.3 <i>Escherichia coli</i>	28
3.2.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29

3.3	Isolationsmethoden	30
3.3.1	Isolation genomischer DNA	30
3.3.2	Isolation von Plasmid-DNA	31
3.3.3	Isolation von Gesamt-RNA.....	32
3.3.4	Proteinisolation.....	33
3.3.5	Pigmentextraktion	34
3.4	Bestimmung der Synthesekapazität der Phytoen-Synthase	36
3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.5.1	Reverse Transkription	38
3.5.2	PCR zur Klonierung.....	38
3.5.3	Fusions-PCR.....	39
3.5.4	Semiquantitative Duplex-PCR.....	40
3.5.5	PCR für den genetischen Nachweis von Transformationen	40
3.5.6	Quantitative real time.....	41
3.6	Klonierungstechniken	42
3.6.1	Restriktion.....	43
3.6.2	Ligationsansätze.....	44
3.6.3	Agarose-Gelelektrophorese	45
3.6.4	DNA-Gelelelution	45
3.6.5	Sequenzierung	46
3.7	Transformationstechniken	46
3.7.1	Für <i>E. coli</i>	46
3.7.2	Für <i>A. tumefaciens</i>	47
3.7.3	Für <i>P. tricornutum</i>	47
3.7.4	Für <i>A. thaliana</i>	48
3.8	Analysetechniken	49
3.8.1	Densitometrische Bestimmung mit Image J für die diurnale Expression.....	49
3.8.2	Proteinanalytik.....	49
3.8.3	Ermittlung der Proteinstrukturmodelle.....	51
3.8.4	High-Performance-Liquid-Chromatographie	52
3.8.5	<i>In-vivo</i> Fluoreszenz-Messungen.....	54

3.8.6	Fluoreszenz-Mikroskopie	55
4	Ergebnisse	57
4.1	Bedeutung der Phytoen-Synthase für die Carotinoid-Akkumulation	57
4.1.1	Funktionelle Charakterisierung der Phytoen-Synthase	57
4.1.2	Ballistische Transformation von <i>P. tricornutum</i> und genetischer Nachweis	59
4.1.3	Wachstumsraten im Vergleich	60
4.1.4	RNA-Bestimmung	61
4.1.5	Synthesekapazität der Phytoen-Synthase	62
4.1.6	Pigmentgehalt	63
4.2	Identifizierung und Funktion von Zeaxanthin-Epoxidase-Genen aus	
	<i>P. tricornutum</i>	65
4.2.1	Wachstum	68
4.2.2	Genetische Integration	69
4.2.3	Pigmentanalyse	70
4.2.4	Fluoreszenz-Messungen (F_v/F_m und NPQ)	73
4.2.5	Transkriptanalysen	76
4.2.6	Zelluläre Lokalisation und Expression in Wildtyp-Protoplasten	76
4.2.7	Strukturmodelle der Zeaxanthin-Epoxidasen 1, 2 und 3	78
4.2.8	Diurnale Expression von <i>zep1</i> , 2 und 3 in <i>P. tricornutum</i>	80
4.3	Heterologe Expression der β-Carotin-Ketolase in <i>P. tricornutum</i>	82
4.3.1	Analyse der <i>bkt6</i> -Transformante	82
5	Diskussion	86
5.1	Funktionelle Charakterisierung von Genen aus <i>P. tricornutum</i>	88
5.1.1	Funktioneller Nachweis des Phytoen-Synthase-Gens aus <i>P. tricornutum</i> in <i>E. coli</i>	88
5.1.2	Regulation der Phytoen-Synthase in <i>P. tricornutum</i>	88
5.1.3	Funktioneller Nachweis der Zeaxanthin-Epoxidase-Gene von <i>P. tricornutum</i> in <i>A. thaliana</i>	89
5.1.4	Weiterführende Analysen zur Klärung der ausbleibenden <i>zep1</i> -Aktivität	93
5.1.5	Regulation der der Zeaxanthin-Epoxidase in <i>P. tricornutum</i>	94

5.2	Genetische Modifikation der Carotinoidbiosynthese von <i>P. tricornutum</i>.....	95
5.2.1	Probleme bei der biotechnologischen Anwendung in <i>P. tricornutum</i>	96
5.2.2	Analyse der <i>P. tricornutum psy</i> -Transformanden.....	96
5.2.3	Astaxanthinsynthese in <i>P. tricornutum</i>	98
5.3	Ausblick.....	100
6	Zusammenfassung.....	102
7	Literaturverzeichnis.....	104
8	Anhang	119
8.1	Vektorinformationen	119
8.2	Übersicht der verwendeten Primer in den verschiedenen PCRs	121
8.3	Zeaxanthin-Epoxidasen	124
8.3.1	Verwendete Sequenzen zur Erstellung des Kladogramms	124
8.3.2	Homologe Sequenzbereiche in %-Werten.....	125
8.3.1	Protein-Alignment der Zeaxanthin-Epoxidase.....	126
8.4	Absorptionsmaxima, Retentionszeiten und Mengenangaben zu den Pigmentanalysen	128
8.4.1	Funktionelle Charakterisierung der Phytoen-Synthase in <i>E. coli</i> bzw. <i>P. tricornutum</i>	128
8.4.2	Funktionelle Charakterisierung der Zeaxanthin-Epoxidasen aus <i>P. tricornutum</i> in <i>A. thaliana</i> -Linien.....	129
8.5	Verwendete Präsequenzen zur Astaxanthinsynthese in <i>P. tricornutum</i>.....	130
	Danksagung	131
	Lebenslauf	132

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen/Veröffentlichungen wiedergegeben:

Eilers U, Dietzel L, Breitenbach J, Büchel C, Sandmann G (2016): Identification of genes coding for functional zeaxanthin epoxidases in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: Journal of Plant Physiology 192, S. 64–70.

Eilers, U.; Bikoulis, A.; Breitenbach, J.; Büchel, C.; Sandmann, G. (2015): Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornutum*. In: Journal of Applied Phycology 28 (1), S. 123–129.

Dambek, M.; Eilers, U.; Breitenbach, J.; Steiger, S.; Buchel, C.; Sandmann, G. (2012): Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricornutum*. In: Journal of experimental botany 63 (15), S. 5607–5612.

Abkürzungsverzeichnis

As:	Aminosäure
At:	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bidest.:	bidestilliertes Wasser
Bhy:	β -Carotin-Hydroxylase
Bkt:	β -Carotin-Ketolase
CA1:	chloroplastidäre Anhydrase 1
Dde:	Diadinoxanthin-Deepoxidase
Dxs:	1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase
CDS:	coding sequence – kodierende Sequenz
Dte:	Diatoxanthin-Epoxidase
DTT:	Dithiothreitol
Chl:	Chlorophyll
bzw.:	beziehungsweise
EDTA:	Ethylendinitrietetraessigsäure
et al.:	et alteri: und andere
EtBr:	Ethidiumbromid
FbaC1:	Fructose-1,6-Bisphosphat chloroplastidäre Aldolase 1
Fcp:	Fucoxanthin/Chlorophyll a/c-Protein
Fm:	maximale Fluoreszenz
Fv:	variable Fluoreszenz
Fo:	Grundfluoreszenz
GFP:	Green fluorescence protein
HL:	Starklicht (high light)
HPLC:	high pressure liquid chromatographie
JGI:	Joint Genome Institute
KCl:	Kaliumchlorid
LHC:	Lichtsammelkomplex
LED:	Leuchtdiode
LL:	Schwachlicht (low light)
M:	molar; Molekulargewicht
MEV:	Mevalonatweg
MEP:	Methylerythritol-Phosphat-Weg
mRNA:	messenger Ribonukleinsäure
NaCl:	Natriumchlorid
NFZ:	Norflurazon
NPQ:	nicht photochemisches Quenching
PAGE:	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS:	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
pH:	pondus hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Psy:	Phytoen-Synthase
Pt:	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>
PVDF:	Polyvinylidenfluorid
rRNA:	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SP:	Signalpeptid
TEMED:	N, N, N', N'-Tetramethylethylenamid
TP:	Transitpeptid
Tris:	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
Tween:	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
Upm:	Umdrehungen pro Minute
VAZ-Zyklus:	Violaxanthin-Antheraxanthin-Zeaxanthin-Zyklus
Vde:	Violaxanthin-Deepoxidase
v/v:	Volumen pro Volumen
WT:	Wildtyp
Zep:	Zeaxanthin-Epoxidase

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 2: ASP-Medium.....	28
Tabelle 3: LB-Medium.....	29
Tabelle 4: YEP-Medium.....	30
Tabelle 5: CTAB-Puffer.....	31
Tabelle 6: DEX-Puffer.....	31
Tabelle 7: 2x-Probenpuffer.....	34
Tabelle 8: Übersicht der durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen und Verwendungszweck.....	37
Tabelle 9: PCR-Programme für die Amplifikation der beschriebenen cDNAs mit der Phusion-Polymerase.....	39
Tabelle 10: PCR-Programm zur Amplifikation von GFP.....	39
Tabelle 11: PCR-Programm für die Fusion von SP+TP_CA1 an <i>bkt</i>	40
Tabelle 12: PCR-Programme für die Amplifikation der gesuchten Fragmente innerhalb der Duplex PCR.....	40
Tabelle 13: PCR-Programme für den Nachweis des Transgens in die <i>P. tricornutum</i> - bzw. <i>A. thaliana</i> -Linien.....	41
Tabelle 14: PCR-Programme für die Bestimmung der Transkript-Ebene von <i>P. tricornutum</i> - bzw. <i>A. thaliana</i> -Linien.....	42
Tabelle 15: Namen der zur Klonierung verwendeten putativen Enzyme (Gene) mit den zugehörigen Identifikationsnummern (ID).....	43
Tabelle 16: Verwendete Plasmide ohne eingebrachte Fragmente.....	43
Tabelle 17: verwendete Restriktionsenzyme.....	44
Tabelle 18: Ligationsansätze.....	45
Tabelle 19: TAE-Puffer.....	45
Tabelle 20: Zur spezifischen Selektion verwendete Antibiotika.....	46
Tabelle 21: Dipp-Puffer.....	48
Tabelle 22: SDS-Gelzusammensetzung.....	50
Tabelle 23: 3x-Gelpuffer.....	50
Tabelle 24: Kathoden- und Anodenpuffer für SDS-PAGE.....	50
Tabelle 25: Anodenpuffer 1 und 2 für Western Blot.....	50
Tabelle 26: Kathodenpuffer für Western Blot.....	50
Tabelle 27: 10x-PBS-Puffer.....	51

Tabelle 28: ECL-Detektionsreagenz.....	51
Tabelle 29: Mobile Phase der HPLC-Analyse und verwendeter 2-Stufen-Gradient zur Auftrennung der Pigmente.	54
Tabelle 30: Carotinoidgehalt der untersuchten <i>A. thaliana</i> -Linien.	72
Tabelle 31: Gemittelte Fv/Fm-Werte der analysierten <i>A. thaliana</i> Pflanzen.	73
Tabelle 32: Übersicht über die verschiedenen Konstrukte zur Astaxanthinsynthese.	82
Tabelle 33: Namen, Sequenzen, eingebaute Schnittstellen bzw. Verwendungen und Amplifikatlängen	121
Tabelle 34: Absorptionsmaxima zu den Pigmentanalysen der funktionellen Charakterisierung in <i>E.coli</i>	128
Tabelle 35: Absorptionsmaxima zu den Pigmentanalysen der Carotinoidüberexpression in <i>P. tricornutum</i>	128
Tabelle 36: Phytoengehalt von <i>P. tricornutum</i>	129
Tabelle 37: Carotinoidgehalt von <i>P. tricornutum</i>	129
Tabelle 38: Absorptionsmaxima zu den Pigmentanalysen der <i>A. thaliana</i> -Linien.	129

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Übersicht über den Mevalonat- und den Methylerythritolphosphatweg (MEV/MEP).....	4
Abbildung 2: Übersicht der wichtigsten Schritte der Carotinoidbiosynthese in höheren Pflanzen bzw. Grün- und Braunalgen.	5
Abbildung 3: VAZ-Zyklus höherer Pflanzen, Grün- und Braunalgen.	10
Abbildung 4: Diadino-Diatoxanthin-Zyklus in Diatomeen.....	11
Abbildung 5: Struktur von Fucoxanthin.	15
Abbildung 6: Phylogenetischer Stammbaumanalyse der Phytoen-Synthase.	16
Abbildung 7: Regulation der Phytoen-Synthase.	17
Abbildung 8: Modell der β -Faltblätter und den beteiligten konservierten Lipokalinmotiven (I, II, III) zur Bildung der Faserstruktur.	19
Abbildung 9: Schematische Darstellung verschiedener Zeaxanthin-Epoxidasen.	20
Abbildung 10: Regulation der Zeaxanthin-Epoxidasen.....	21
Abbildung 11: Mögliche Wege zur Bildung von Astaxanthin in <i>P. tricornutum</i>	24
Abbildung 12: Zusammenfassung zur Vorgehensweise, um einen höheren Carotinoidgehalt zu erreichen und die Bildung von Astaxanthin zu bewerkstelligen.....	56
Abbildung 13: Verwendete Proteinsequenz für den Komplementationsversuch in <i>E. coli</i> und für das Konstrukt pPhaN- <i>psy</i> für die Überexpression in <i>P. tricornutum</i>	58
Abbildung 14: Nachweis der Phytoen-Synthase von <i>P. tricornutum</i>	58
Abbildung 15: Ausschnitt des Transformationsvektors pPhaN- <i>psy</i>	59
Abbildung 16: Ballistische Transformation von <i>P. tricornutum</i>	60
Abbildung 17: Wachstumsraten der <i>P. tricornutum</i> Kulturen in Batch-Kulturen.....	60
Abbildung 18: Quantitative Analyse der Phytoen-Synthase auf Transkript-Ebene.	61
Abbildung 19: Synthesekapazität der Phytoen-Synthase.	62
Abbildung 20: Pigmentgehalt von <i>P. tricornutum</i>	63
Abbildung 21: Pigmentverhältnisse bezogen auf das Trockengewicht.	64
Abbildung 22: Ausschnitte aus den verwendeten Transformationsvektoren zur Komplementation von <i>A. thaliana npq2</i> -Mutanten.	65
Abbildung 23: Übersetzte Proteinsequenzen von den Konstrukten <i>zep1</i> , <i>2</i> und <i>3</i> sowie <i>zep1_gfp</i> von <i>P. tricornutum</i> für den Komplementationsversuch in <i>A. thaliana</i>	66
Abbildung 24: Phänotypen der <i>A. thaliana</i> -Linien. Gezeigt werden hier der WT, <i>npq2</i> -Mutante und die <i>npq2</i> -Transformanden (<i>npq2+zep1</i> , <i>npq2+zep2</i> , <i>npq2+zep3</i>) nach sechs Wochen Kultivierung.	68

Abbildung 25: Genetischer Nachweis der <i>A. thaliana</i> -Transformanden.	69
Abbildung 26: Identifizierung der Carotinoide in den verschiedenen <i>A. thaliana</i> -Linien bei 450 nm mit der HPLC.	70
Abbildung 27: Chromatogramm zur Trennung der Pigmente Antheraxanthin und Lutein-5,6-Epoxid.....	71
Abbildung 28: NPQ-Messungen der <i>A. thaliana</i> -Linien.	75
Abbildung 29: Gemitteltetes Transkriptionslevel der komplementierten <i>npq2</i> -Mutanten.	76
Abbildung 30: Zelluläre Lokalisation und Expression des <i>zep1_gfp</i> -Konstruktes aus <i>P. tricornutum</i> in WT Protoplasten von <i>A. thaliana</i>	77
Abbildung 31: Dreidimensionale Proteinmodelle von Zep1, 2 und 3 aus <i>P. tricornutum</i> im Vergleich zur Zep aus <i>A. thaliana</i> (<i>AtZep</i>).....	79
Abbildung 32: Diurnale Expression von <i>zep1</i> , 2 und 3 auf Transkriptionsebene von <i>P. tricornutum</i> WT.....	80
Abbildung 33: Übersicht über den Transformationsvektor für das mit <i>gfp</i> markierte <i>CA1_bkt</i> -Konstrukt.....	83
Abbildung 34: Verwendete Proteinsequenz für das Konstrukt <i>pPhaT_CA1_bkt_gfp</i>	83
Abbildung 35: Genetischer Nachweis von <i>P. tricornutum</i> UTEX 646 mit dem Vektor <i>pPhaT_eGFP</i> und der eingebrachten cDNA von <i>CA1</i> fusioniert an die <i>bkt</i> -Sequenz der β -Carotin-Ketolase..	84
Abbildung 36: Nachweis des Konstruktes <i>CA1_bkt_gfp</i> der <i>bkt6</i> -Transformande auf Transkriptionsebene.	84
Abbildung 37: Immunodetektion des Konstruktes <i>CA1_bkt_gfp</i> in <i>P. tricornutum</i>	85
Abbildung 38: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Schritte des Carotinoidbiosyntheseweges.....	87
Abbildung 39: Stammbaum der Zeaxanthin-Epoxidasen.....	92
Abbildung 40: Transformationsvektor <i>pPha_NR</i>	119
Abbildung 41: Transformationsvektor <i>pPhaT_eGFP</i>	120
Abbildung 42: Transformationsvektor <i>pGreen</i>	120
Abbildung 43: Aminosäuresequenzvergleich von Zeaxanthin-Epoxidasen aus <i>A. thaliana</i> und <i>P. tricornutum</i> Zep1, 2, 3.....	127
Abbildung 44: Übersetzte Proteinsequenz des Konstruktes <i>FbaC1_short</i>	130
Abbildung 45: Übersetzte Proteinsequenz des Konstruktes <i>FbaC1_long</i>	130

1 Einleitung

1.1 Mikroalgen - Diatomeen (Bacillariophyceae)

Mikroalgen stellen für die Industrie und Pharmazie eine vielversprechende Möglichkeit dar, biologische Produkte nachhaltig zu produzieren. Hierzu zählt unter anderem die Produktion von Carotinoiden (Del Campo et al., 2007), welche beispielsweise in der Futtermittelindustrie zur Färbung von Lachs (Elmadfa und Majchrzak, 1998) verwendet werden. Die Produktivität und die Zusammensetzung gewünschter Stoffe hängt maßgeblich von der Art der Kultivierung ab (Guedes et al., 2011). Gleichzeitig wird die Produktion solcher Stoffe mit Hilfe natürlicher Organismen aber durch Probleme wie beispielweise den Anzuchtbedingungen zur Anreicherung gewünschter Produkte oder geeigneten Ernte und- Aufreinigungsmethoden erschwert (<http://giavap.eu/content/project>). Die jedoch allgemein betrachtet einfachen und genügsamen Bedingungen zur Kultivierung der autotrophen Mikroorganismen und das Interesse an erneuerbaren Ressourcen lassen die Nachfrage stetig steigen und es wird intensiv daran gearbeitet, entsprechende Probleme zu überwinden. Hierbei werden verschiedene Organismen, welche durch genetische Modifikationen für die Industrie besser zugänglich und handhabbar gemacht werden, getestet.

Auch die eukaryotischen Einzeller der Diatomeen werden zu den potentiell interessanten Mikroalgen gezählt. Sie finden sich in der Abteilung der Heterokontophyta (Klasse Bacillariophyceae) wieder und lassen sich auf Grund ihrer Morphologie in zwei Hauptgruppen unterteilen: die radiärsymmetrischen Centrales wie z.B. *Thalassiosira pseudonana* und die bilateralen Pennales wie z.B. *Phaeodactylum tricornutum* (Scala und Bowler, 2001).

Diatomeen stellen wohl eine der wichtigsten und mit mehr als 100'000 Arten eine der diversesten Gruppen im Phytoplankton dar (Falciatore und Bowler, 2002). Ihr Adaptionsvermögen ist so enorm, dass man sie in verschiedensten Süß- und Salzwasserhabitaten findet. Mit etwa 40 % Beteiligung an der marinen (Falkowski et al., 1998) bzw. etwa 25 % an der globalen Primärproduktion (Falkowski, 1994) nehmen Diatomeen eine zentrale Stellung im Ökosystem ein. Die Diatomeen werden zu den Chromista gezählt, welche aufgrund einer sekundären Endosymbiose durch vier Membranen um ihre Plastiden gekennzeichnet sind (Gibbs, 1979; Archibald und Keeling, 2002). Die Thylakoide liegen hier in Form undifferenzierter Dreierstapel vor (Pyszniak und Gibbs, 1992) und die Lichtsammelkomplexe werden im Gegensatz zu den LHCs (Light-Harvesting-Complexes) von höheren Pflanzen und Grünalgen als sogenannte Fucoxanthin-Chlorophyll-Bindeproteine

(FCPs) bezeichnet. Sie sind besonders durch unterschiedliche Pigmente (Fucoxanthin anstelle von Lutein, Chl c anstelle von Chl b) und einem anderen Pigmentverhältnis gekennzeichnet. Die Pigmente Chl a, Fucoxanthin und Chl c liegen im Verhältnis 4:4:1 vor. Diese Pigmentausrüstung verleiht ihnen die für ihren Lebensraum nötige Fähigkeit, Licht im blaugrünen Wellenlängenbereich zu absorbieren (Beer et al., 2006; Lamote et al., 2003).

1.1.1 Molekulargenetik bei *Phaeodactylum tricornutum*

P. tricornutum hat in den letzten Jahren biotechnologisch erheblich an Aufmerksamkeit gewonnen und zeichnet sich nicht nur durch seine Robustheit und damit relativ einfache Kultivierung aus, sondern ist auch durch seine verhältnismäßig kurzen Wachstumsphasen interessant. Darüber hinaus wird auch das molekulare Arbeiten durch das inzwischen vollständig sequenzierte Genom (Bowler et al., 2008) (<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>) erheblich erleichtert. Dieses gehört mit etwa 27,4 Mb zu den kleinsten, bekanntesten eukaryotischen Genomen (Coesel et al., 2008). Erste Voraussetzungen für das molekulare Arbeiten mit diesem Organismus wurden bereits 2005 durch die Veröffentlichung von EST-Datenbanken (expressed sequence tags) geschaffen (Maheswari et al., 2005; Montsant et al., 2005) (<http://avesthagen.sznbowler.com>). Die Grundlagen für das gentechnische Arbeiten mit *P. tricornutum* wurden aber schon 1996 erbracht (Apt et al., 1996). Hierbei wurde mittels Transformation eine Reihe an Selektionsmarkern und Reportergenen wie beispielsweise das auch in dieser Arbeit verwendete „enhanced green fluorescent protein“ (eGFP – im weiteren Verlauf als GFP bezeichnet) getestet. Ein speziell für die ballistische Transformation entwickelter Transformationsvektor (pPha_T1), welcher eine Selektion durch Zeozin erlaubt, ermöglicht seitdem die nukleäre Expression von Genen und damit die Untersuchung vielfältiger Fragestellungen (Apt et al., 1996; Zaslavskaja et al., 2000). Der weiterentwickelte pPha_NR Vektor ist durch den Promotor und Terminator der Nitratreduktase (NR) um die multiple „cloning site“ (MCS) verändert. Die Expression eines Transgens kann somit durch die Zugabe von Nitrat ins Medium reguliert werden (Hempel et al., 2009). Außerdem wurden mittlerweile durch die Untersuchung von Haushaltsgenen weitere Grundlagen für das molekulare Arbeiten mit *P. tricornutum* geschaffen (Siaut et al., 2007). Der zur Transformation nicht zielgerichtete Beschuss der Zellen hat eine unspezifische Integration der eingebrachten Gene ins Genom von *P. tricornutum* zur Folge. Falciatore et al. (1999) beschreiben, dass Transformanden, welche einem stetigem Selektionsdruck ausgesetzt sind, auch noch nach einem Jahr die genetische

Resistenz zeigen, während 80 % der Transformanten ohne Selektionsdruck bereits nach drei Monaten ihre Resistenz verloren haben.

1.2 Carotinoide

Carotinoide werden zur Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe gezählt. Inzwischen sind weit über 750 sich strukturell unterscheidende Carotinoide bekannt (Britton et al., 2004). Die gemeinsame Grundstruktur von 40 C-Atomen und einem konjugierten Doppelbindungssystem resultiert daraus, dass Carotinoide aus acht Isopentenyl-Pyrophosphat-Molekülen aufgebaut sind. In Abhängigkeit ihrer Elektronenkonfiguration erscheinen die Pigmente in unterschiedlichen Farben (Jucker, 2011). Unterschieden werden die Carotinoide in zwei Gruppen, die hydrophoben Carotine und die durch Anlagerung von Sauerstoff eher hydrophileren Xanthophylle. Generell werden Carotinoide von Pflanzen, Algen, einigen Pilzen und Bakterien (z.B. Rhodobakterien und Cyanobakterien) synthetisiert, aber nicht von Tieren (Sandmann, 1994). Carotinoide übernehmen in verschiedensten Organismen, eine Reihe äußerst wichtiger Funktionen, so dass sie für den Menschen sogar essentiell sind und mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. Neben den antioxidativen Eigenschaften und den damit verbundenen präventiven Schutzfunktionen, spielen sie beispielsweise eine nicht unwesentliche Rolle beim Sehvorgang. Auch die Fähigkeit aufgrund ihres Elektronensystems Licht zu absorbieren und die Energie weiterzuleiten ist eine grundlegende Eigenschaft von Carotinoiden und erlaubt ihnen wichtige Aufgaben innerhalb der photosynthetisch aktiven Organismen zu übernehmen. Zum einen sind sie wesentlich daran beteiligt den Photosyntheseapparat vor überschüssiger Lichtenergie und somit vor Photooxidation zu schützen. Hierbei wird Anregungsenergie von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) in Form von Wärme mit Hilfe des sogenannten non photochemical quenching (NPQ) abgeleitet (Ruban et al., 2004; siehe auch 1.2.2). Zum anderen absorbieren Carotinoide Teile des sichtbaren Lichts und sind so als akzessorische Pigmente maßgeblich daran beteiligt die aufgenommene Energie in die Reaktionszentren der Photosysteme weiterzuleiten und so für die Oxidation des Chl a Dimers im Inneren der Photosysteme bereit zu stellen. Neben vielen weiteren Aufgaben der Carotinoide sind beispielsweise die Stabilisierung von Biomembranen (Havaux, 1998) oder in höheren Pflanzen die Färbung von Blüten und/oder Früchten sowie die Funktion als Vorläufermoleküle der ABA-Synthese (Milborrow, 2001; Seo und Koshiba, 2002) zu nennen.

1.2.1 Carotinoidbiosynthese

Obwohl die grundlegenden Schritte des sogenannten Mevalonat-Weges und bzw. oder Methylerythritol-Phosphat-Weg (MEV/MEP) zur Bildung der Vorläufermoleküle der Carotinoidbiosynthese in allen Organismen gleich sind (Dambeck et al., 2012; Bertrand, 2010) und es inzwischen einige Versuche zur Klärung noch offener Fragen der Carotinoidbiosynthese in Diatomeen gibt, bedarf es dennoch einer intensiven Grundlagenforschung, um den gesamten Weg der Carotinoidbiosynthese verstehen zu können. Nach Bertrand (2010) kann Isopentenylpyrophosphat (IPP) und sein Strukturisomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) entweder über den MEV oder den MEP synthetisiert werden.

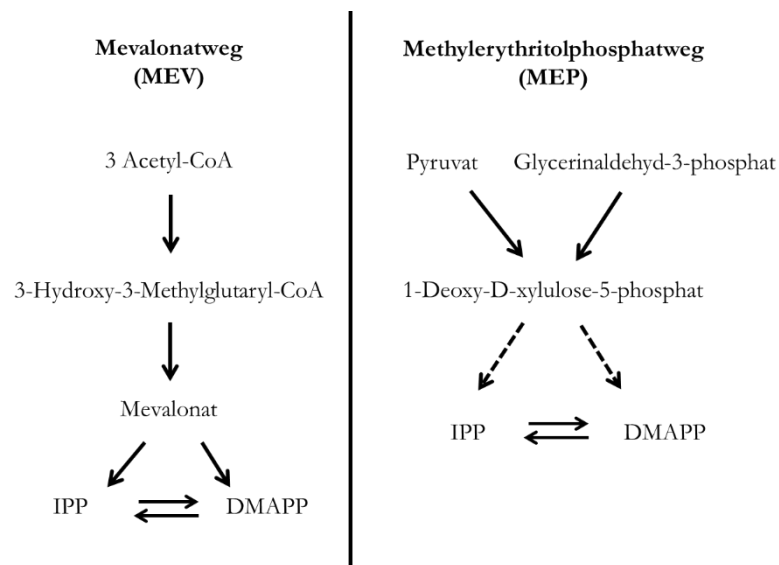


Abbildung 1: Vereinfachte Übersicht über den Mevalonat- und den Methylerythritolphosphatweg (MEV/MEP).

Auf der linken Hälfte ist der zytosolische MEV dargestellt, bei welchem IPP und DMAPP aus Acetyl-CoA gewonnen werden, während auf der rechten Hälfte der zur Synthese chloroplastidärer Moleküle verwendete MEP aufgezeigt ist. Gestrichelte Pfeile deuten auf mehrere Teilreaktionen hin. CoA=Coenzym A; IPP=Isopentenylpyrophosphat; DMAPP=Dimethylallylpyrophosphat.

Der zytosolische MEV findet für die Biosynthese von Sterolen, Sesquiterpenen und Triterpenoiden statt. Zur Kondensation werden drei Moleküle Acetyl-CoA verwendet, welche über 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA und Mevalonat zu Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat umgewandelt werden (Kuzuyama, 2002; Abbildung 1). Der MEP hingegen wird für die Biosynthese plastidärer Moleküle wie beispielsweise für Phytol und Carotinoide verwendet. Hierbei wird bereits innerhalb der Chloroplasten aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat unter Addition und Abspaltung von CO₂ 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat (Dxp) gebildet und über mehrere Zwischenstufen die Strukturisomere Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat synthetisiert. (Lichtenthaler, 1999; Rohmer 2010; Abbildung 1). Innerhalb des Chloroplasten werden zwei solcher Isoprene mit

Hilfe der Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase zu einem Monoterpen C10 fusioniert, durch die Addition zweier weiterer Isoprene entsteht das Vorläufer-Molekül Geranylgeranylpyrophosphat C20 (GGPP).

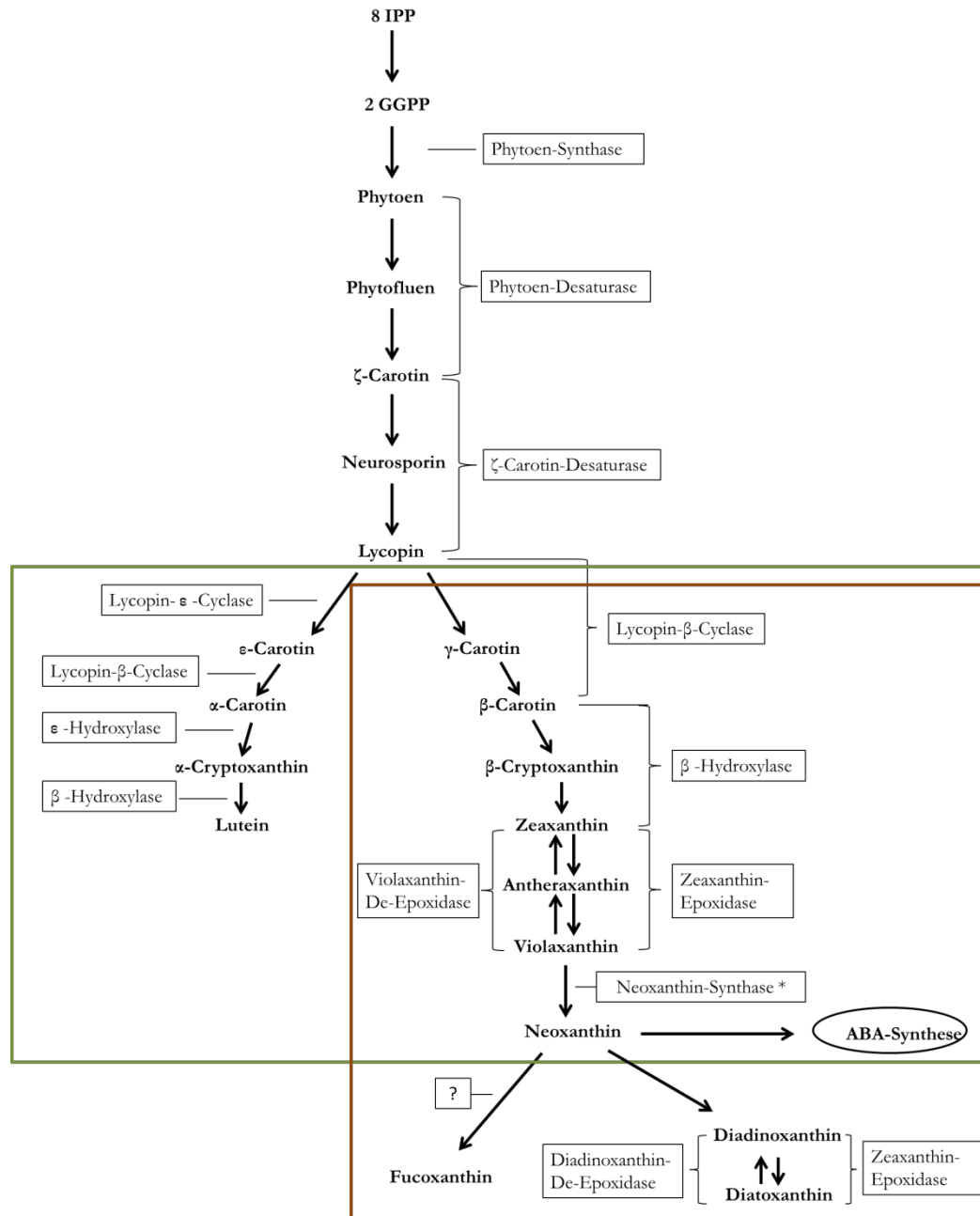


Abbildung 2: Übersicht der wichtigsten Schritte der Carotinoidbiosynthese in höheren Pflanzen bzw. Grün- und Braunalgen.

Der erste Abschnitt der Biosynthese verläuft sowohl in höheren Pflanzen bzw. Grün- und Braunalgen gleich. Darauf folgend ist in der grünen Box der Biosyntheseweg von höherer Pflanzen und Grünalgen dargestellt. In der braunen Box ist der Biosyntheseweg von Braunalgen aufgeführt. ABA=Abscisinsäure; *=in Braunalgen bislang nicht identifiziertes Enzym, ?=bislang unbekannte Enzyme. Entnommen und modifiziert nach Mikami und Hosokawa (2013); erweitert nach Dambeck et al. (2012).

Für die Bildung, des ersten Tetraterpens, das farblose Phytoen, werden zwei Moleküle Geranylgeranylpyrophosphat mit Hilfe der Phytoen-Synthase kondensiert (Cunningham und Gantt, 1998; Sandmann, 1994). Im weiteren Syntheseweg wird durch Aktivität der Phytoen-Desaturase und der ζ -Carotin-Desaturase Lycopin gebildet. Von hier aus spaltet sich der Syntheseweg in den sogenannten α - und β -Zweig auf. Höhere Pflanzen, Grün- und Rotalgen besitzen sowohl den α - und β -Zweig, während Braunalgen lediglich über den β -Zweig verfügen. Der α -Zweig wird durch die Aktivität Lycopin- ϵ -Cyclase eingeleitet, welche ein Ende des Lycopins zu einem ϵ -Ionon-Ring zyklisiert. Die Lycopin- β -Cyclase übernimmt den nächsten Schritt zur Bildung von α -Carotin, welches in weiteren Schritten zum Xanthophyll Lutein umgewandelt wird. Der β -Zweig wird direkt durch die Lycopin- β -Cyclase eingeleitet, so dass durch gleichzeitige Zyklisierung beider Enden β -Carotin entsteht, welches im Anschluss ebenfalls zur Bildung weiterer Xanthophylle dient (Abbildung 2). Der fehlende α -Zweig in Braunalgen wie *P. tricornutum* erklärt, warum diesen Lutein als Pigment fehlt. Entweder haben Braunalgen in ihrer evolutiven Entwicklung (sekundäre Endosymbiose) die Genkopie der Lycopin- ϵ -Cyclase verloren und anstelle dieser neue Gene zur Bildung weiterer Xanthophylle (Fucoxanthin, Diadino- und Diatoxanthin) hervorgebracht (Mikami und Hosokawa, 2013) oder sie haben diese nie erworben.

Für *P. tricornutum* wurden bis vor kurzem lediglich aufgrund von Sequenzanalysen Gene und deren putative enzymatische Funktion für die Carotinoidbiosynthese vorgeschlagen (Coesel et al., 2008). Inzwischen konnten jedoch die ersten enzymatischen Schritte der Carotinoidbiosynthese beginnend mit der Synthese von Phytoen bis hin zur Bildung von β -Carotin, exklusive der Prolycopene-Cyclase-Gene, für *P. tricornutum* nachgewiesen werden. Darunter sind die Gene der Phytoen-Synthase (*psy*: #Pt56881), der Phytoen-Desaturase (*pds*: #Pt45735), der ζ -Carotin-Desaturase (*zds*: #Pt53744) und der Lycopin- β -Cyclase (*lyc-b*: #Pt56484) (Dambeck et al., 2012). Der funktionelle Nachweis der von β -Carotin „downstream“ operierenden Enzyme des nun folgenden VAZ-Zyklus, der drei potentiellen Genkopien der Zeaxanthin-Expoxygenasen 1, 2, 3 (*zep1*, 2 und 3: #Pt45845/#Pt56488/#Pt56492) war Teil dieser Arbeit.

Die Identifizierung des Zwischenproduktes Neoxanthin als Oxidationsprodukt von Violaxanthin (Dambeck et al., 2012) vervollständigt den Verlauf der Carotinoidbiosynthese – das dazu gehörige Enzym ist für *P. tricornutum* bislang noch nicht identifiziert. In höheren Pflanzen z.B. in *Lycopersicon esculentum* (Tomate) oder *Arabidopsis*-Mutanten jedoch wird dieser Schritt von einer putativen Neoxanthin-Synthase übernommen (Bouvier et al., 2000; Ruiz-Sola und Rodríguez-Concepción, 2012). Von hieraus findet in *P. tricornutum* die Aufspaltung in das am häufigsten vorkommende Ketocarotinoid Fucoxanthin und in Diadinoxanthin statt (Dambeck et

al., 2012). Letzteres spielt in Diatomeen eine wesentliche Rolle im Rahmen des Diadino-Diatoxanthin-Zyklus zum Schutz vor übermäßiger Lichtenergie (Lohr und Wilhelm, 1999). Da die Gene der Carotinoidbiosynthese kernkodiert sind, müssen die Proteine nach ihrer Synthese in den Chloroplasten importiert werden.

1.2.1 Proteinimport in den Chloroplasten

Während der sekundären Endosymbiose wurden die meisten Gene der plastidenlokalisierten Proteine in den Nukleus transferiert (Hackett et al., 2004), so dass sich heute alle für die Carotinoidbiosynthese nötigen Gene im Nukleus wiederfinden. Dieses Ereignis geht einher mit einem hochkomplexen Transportsystem der im Nukleus lokalisierten Gene für Proteine, die Funktionen innerhalb der Chloroplasten erfüllen. Die äußerste der vier Membranen, welche es zu überwinden gilt, steht in Verbindung mit dem Endoplasmatischen Retikulum und stammt vermutlich von der ursprünglichen Plasmamembran der Vakuole des Wirtsorganismus. Die darauffolgende dritte Membran ist vermutlich die Plasmamembran der endosymbiotisch aufgenommenen Rotalge (PPM=periplasmatic membran) und die innersten zwei Membranen sind wohl die Überbleibsel des Plastiden des Endosymbionten (Gibbs, 1981; Ishida et al., 2000; Cavalier-Smith, 2003). Um die Membranen überwinden zu können gibt es N-Terminal am Protein sogenannten Signal- und Transitpeptide, welche während und bzw. oder nach erfolgreichem Transport enzymatisch abgetrennt werden. Das Signalpeptid dient entweder der Lokalisation ins endoplasmatische Retikulum oder entsprechend der vom endoplasmatischen Retikulum abstammenden Membran des Chloroplasten. Das Transitpeptid ist für den weiteren Transport ins Stroma des Chloroplasten notwendig und ist entsprechend zwischen dem Signalpeptid und dem reifem Protein lokalisiert (Emanuelsson et al., 2007). Genaue Mechanismen zum Transport der Proteine in den Chloroplasten fehlen aber bislang (Kilian und Kroth, 2005). Für den Transfer über die Membranen gibt es verschiedene Hypothesen. Nach Kilian und Kroth (2004) und (2005) gibt es im Wesentlichen zwei Modelle, welche den Import ermöglichen könnten. Zum einen den Import über ein Vesikelsystem (vesicula shuttle model) und zum anderen über Transporter (translocator model). Weiterhin untersuchten Kilian und Kroth (2005) den chloroplastidären Import anhand von 39 mit GFP fusionierten Sequenzen. Das Aminosäuremotiv ASAF spielt scheinbar eine ausschlaggebende Rolle für die Erkennung enzymatischer Schnittstellen entsprechender Proteasen im Übergang vom Signal- zum Transitpeptid. In dieser Sequenz scheint besonders die Aminosäure Phenylalanin (F) für den Import unabdingbar zu sein (Kilian und Kroth, 2005; Gruber et al., 2007). Eine genaue Erkennungssequenz für den Übergang vom Transitpeptid zum reifen Protein fehlt bislang. Für

höhere Pflanzen gibt es eine Reihe bioanalytischer Computerprogramme, welche zuverlässig entsprechende Sequenzen identifizieren. Auch für Diatomeen wurden inzwischen vielfältige Analysen und im speziellen auch für *P. tricornutum* durchgeführt, um die genauen Sequenzen der für den Transport benötigten Signal- und Transitpeptide kennenzulernen. Das Signalpeptid kann anhand spezifischer bioanalytischer Computerprogramme weitestgehend erkannt werden (z.B. Signal P: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Nielsen et al., 1997; Emanuelsson et al., 2007), während das Transitpeptid und der Übergang zum reifen Protein von den für höhere Pflanzen und Grünalgen herkömmlich verwendeten Standardprogrammen (z.B. Chloro P: <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) unzuverlässige Ergebnisse liefert. Um den Transport in den Chloroplasten zu ermöglichen, wurden die in dieser Arbeit verwendete Sequenzen der putativen Zeaxanthin-Epoxidasen 1, 2 und 3 N-Terminal gekürzt und mit einem bekannten Transitpeptid ausgestattet.

1.2.2 Non photochemical quenching

Photosynthetisch aktive Organismen (Algen, höhere Pflanzen, Cyanobakterien) haben die Eigenschaft, die Energie des Sonnenlichtes zu nutzen. Hierbei besteht neben dem positiven Effekt der Energiegewinnung die Möglichkeit einer Überenergetisierung, welche schwerwiegende Folgen wie die Photooxidation und die Photoinhibition haben kann. Daher haben photosynthetisch aktive Organismen Mechanismen entwickelt, die es ihnen erlauben sich vor Photooxidation zu schützen. Eine weitverbreitete Methode ist das sogenannte NPQ (Müller et al., 2001), welches unter geeigneten Lichtbedingungen durch die Photochemie, als photochemical quenching (qP) bezeichnet, gering gehalten wird. Anregungsenergie kann dabei, sofern sie nicht zur Photochemie verwendet wird, in Form von Fluoreszenz und bzw. oder Wärme abgegeben werden. Die zum Schutz wichtigste Komponente des NPQs, um überschüssige Excitonenenergie loszuwerden, ist die energiedissipierende Komponente, als energy dependent quenching (qE) bezeichnet, welche durch die Xanthophyllzyklen bestimmt wird (Ruban et al., 2004). Induziert wird diese Komponente durch den während der Photosynthese laufenden Elektronen- bzw. damit verbundenen Protonentransfer, wodurch eine Änderung des pH-Gradienten über der Thylakoidmembran stattfindet. In Diatomeen läuft qE hauptsächlich über die Pigmente Diadino- und Diatoxanthin (siehe auch 1.2.2.1; Lohr und Wilhelm, 1999). Die Relaxation dauert hier nur wenige Sekunden. In höheren Pflanzen findet, aktiviert durch ein Ladungsungleichgewicht zwischen den Photosystemen, zudem die sogenannte state-Transitions (qT) statt. Hierbei werden LHC II Proteine reversibel phosphoryliert, welche sich dadurch vom Photosystem II ablösen und

zum Photosystem I wandern. Die darauffolgende Relaxation ereignet sich im Minutenbereich. Dieser Mechanismus hat eine Energieumverteilung zur Folge. Die NPQ-Komponente der Photoinhibition (qI) ist auf Schädigungen der Proteine am Photosystem II zurückzuführen (Müller et al., 2001).

1.2.2.1. Xanthophyllzyklen und die Komponente qE

Der Xanthophyllzyklus ist ein zur Energiedissipation eingerichteter Mechanismus photosynthetisch aktiver Organismen. In höheren Pflanzen, Grünalgen und Braunalgen operiert der VAZ-Zyklus, während in anderen Algengruppen wie z.B. Dinophyceen und Diatomeen der Diadino-Diatoxanthin-Zyklus dominiert (Müller et al., 2001). Unter Starklichtbedingungen werden in beiden Zyklen durch Epoxidasen die Lichtsammelpigmente (Violaxanthin bzw. Diadinoxanthin) in einer reversiblen Reaktion in die epoxidfreien Schutzpigmente (Zeaxanthin bzw. Diatoxanthin) umgewandelt, wodurch die Abgabe überschüssiger Energie in Form von Wärme abgegeben werden kann.

In höheren Pflanzen wird der VAZ-Zyklus pH-abhängig unter Starklichtbedingungen zum Schutz vor überschüssiger Energie aktiviert. Die Violaxanthin-Deepoxidase katalysiert unter der Verwendung des Kofaktors Ascorbat die reversible Reaktion der Abspaltung der beiden Epoxigruppen von Violaxanthin über Antheraxanthin mit einer Epoxigruppe zu Zeaxanthin. Die Synthese von Zeaxanthin führt zu einer Konformationsänderung im Antennensystem von Photosystem II und letztlich zu einer Abgabe von Energie (Horton et al., 2000). Die Violaxanthin-Deepoxidase gehört wie die Zeaxanthin-Epoxidase zur Proteinfamilie der Lipokaline, ist aber im Lumen lokalisiert (Bugos und Yamamoto, 1996) und wird bei niedrigem pH-Wert aktiviert (Hager, 1969; Pfündel et al., 1994). Sie ist damit direkter Gegenspieler der bereits beschriebenen Zeaxanthin-Epoxidase, welche die Hinreaktion katalysiert und durch einen hohen pH-Gradienten aktiviert wird (Goss et al., 2005).

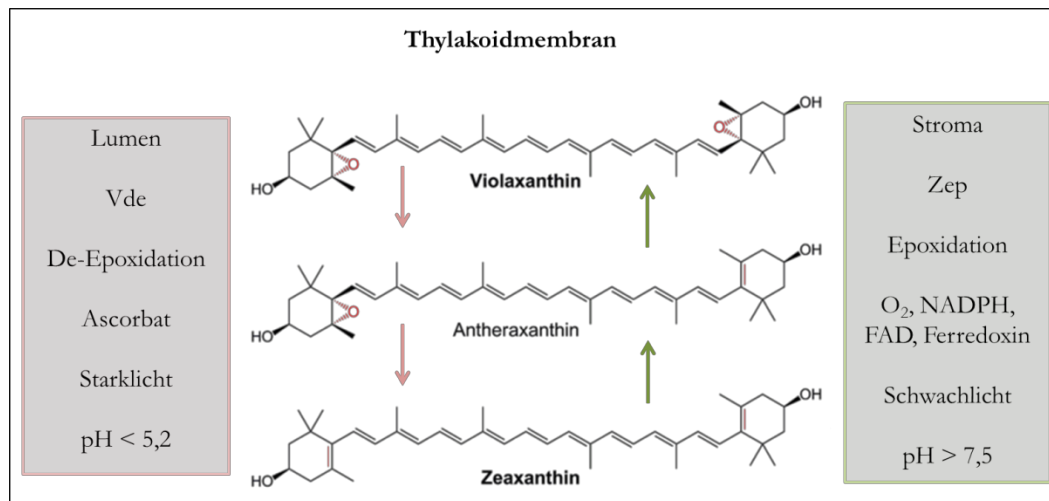


Abbildung 3: VAZ-Zyklus höherer Pflanzen, Grün- und Braunalgen.

Im Stroma findet unter Schwachlichtbedingungen die zweifache Epoxidation von Zeaxanthin über Antheraxanthin zu Violaxanthin statt. Die Reaktion wird unter zu Hilfenahme verschiedener Substanzen und Kofaktoren von der Zeaxanthin-Epoxidase (Zep) bewerkstelligt. Im Lumen findet die Rückreaktion statt. Die Violaxanthin-Deepoxidase (Vde) katalysiert hier die De-Epoxidation unter zu Hilfenahme von Ascorbat bei niedrigem pH < 5,2.

In Diatomeen wird der VAZ-Zyklus durch die Xanthophylle Diadino- und Diatoxanthin ersetzt, welche direkt ineinander überführt werden (Stransky und Hager, 1970). Jedoch können hier sowohl der VAZ- als auch der Diadinoxanthin-Diatoxanthin-Zyklus gleichzeitig operieren (Müller et al., 2001). In Diatomeen und auch für *P. tricornutum* konnte gezeigt werden, dass das NPQ auf den Xanthophyllzyklus zurückzuführen ist (Lavaud et al., 2002), da andere Komponenten des NPQs, wie sie in höheren Pflanzen zu finden sind (z.B. qT), nicht vorhanden zu sein scheinen. Bei der veränderten Variante des Xanthophyllzyklus findet nur ein Epoxidierungsschritt statt. In *P. tricornutum* gibt es nur ein Gen (*vde*), welches für das Vde-Protein codiert und auch als Diadinoxanthin-Deepoxidase (Dde) bezeichnet wird. Die Dde weist starke Sequenzähnlichkeiten zur Vde höherer Pflanzen auf (Lavaud et al., 2012). Für die Dde konnte gezeigt werden, dass sie in beiden Xanthophyllzyklen operieren kann (Jakob et al., 2001). Weiterhin wurden zwei ähnliche Sequenzen gefunden, welche als *vd1* und *vd2* bezeichnet werden (Coesel et al., 2008). Mit Violaxanthin als Substrat konnte eine Aktivität der Produkte von *vde* und *vd2* aus *P. tricornutum* gezeigt werden (Bojko et al., 2013). Die Aktivität des Produktes von *vd1* konnte bislang jedoch nicht dargestellt werden.

Der Gegenspieler der Dde ist wie auch bei dem VAZ-Zyklus die Diatoxanthin-Epoxidase (Dte). Beide Enzyme benötigen dieselben Kosubstrate bzw. Kofaktoren wie die entsprechenden Enzyme im VAZ.

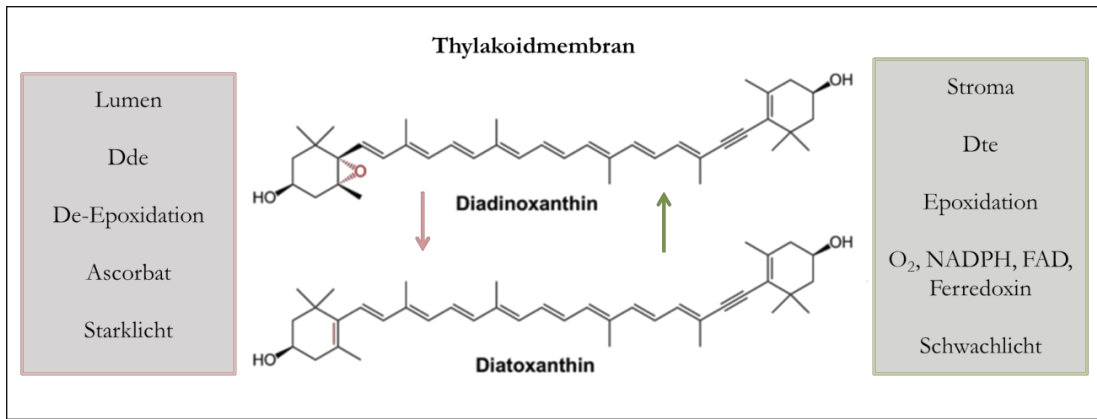


Abbildung 4: Diadino-Diatoxanthin-Zyklus in Diatomeen.

Im Stroma findet unter Schwachlichtbedingungen die einfache Epoxidation von Diato- zu Diadinoxanthin statt. Die Reaktion wird unter zu Hilfenahme verschiedener Reduktionsäquivalente, Sauerstoff und Kofaktoren von der Diatoxanthin-Epoxidase (Dte) bewerkstelligt. Im Lumen findet die Rückreaktion statt. Die Diadinoxanthin-Deepoxidase (Dde) katalysiert hier die De-Epoxidation unter zu Hilfenahme von Ascorbat. NADPH=Nicotinamidadeninindinukleotidphosphat; FAD=Flavin-Adenin-Dinukleotid.

Für die Deepoxidierung von Diadino- zu Diatoxanthin gibt es im Unterschied zur Vde höherer Pflanzen einige Besonderheiten: So findet eine schnelle Aktivierung der Dde bei bereits leichter Ansäuerung des Lumens statt (Jakob et al., 2001), die Dde benötigt nur eine geringe Menge des Kosubstrates Ascorbat (Goss und Jakob 2010) und es wird eine bestimmte Zusammensetzungen von Lipiden innerhalb der Thylakoidmembran zur Aktivität der Dde benötigt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch Lutein zum NPQ beiträgt. Mutanten der Grünalge *Chlamydomonas lor1*, welchen lediglich die Pigmente Lutein und Loroanthin fehlen, weisen ein geringeres NPQ auf als der WT (Niyogi et al., 1997). Ein Rückgang des NPQs konnte auch für die *Arabidopsis*-Mutanten *Lut1*, gezeigt werden, welche aufgrund einer defizienten Lycopin- ϵ -Cyclase einen Mangel an Lutein aufweisen (Pogson et al., 1998). Eine lichtabhängige Epoxidation konnte für Avocadopflanzen gezeigt werden, wobei Lutein in Lutein-5,6-Epoxid umgewandelt wird (Förster et al., 2009). Dieser Xanthophyllzyklus wurde bereits von Bungard et al. (1999) in *Cuscuta pentagona* (Teufelszwirn) gezeigt. Inzwischen konnte von Ruban et al. (2007) gezeigt werden, dass Lutein in den Antennenkomplexen des LHC II zum NPQ beitragen kann.

1.2.3 Diurnale Expression

Die Expression von Genen unterliegt in verschiedensten Organismen einer strengen Regulation. Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass die Lichtqualität und -quantität erheblichen Einfluss auf die Regulation bestimmter Gene für Prozesse der Photosynthese und deren Expression hat. Findet diese Regulation innerhalb eines Tagesganges statt, so spricht man von einer diurnalen Expression. Es verwundert daher nicht, dass eine entsprechende Regulation der Proteine zur optimalen Nutzung der Sonnenenergie während der Sonnenstunden stattfindet (Piechulla, 1999). Spezifische Carotinoide sind zusammen mit Chlorophyllen in den Thylakoidmembranen photosynthetisch aktiver Organismen an Proteine assoziiert und bilden die sogenannten Lichtsammelkomplexe (LHCs bzw. FCPs). Die lichtabhängige Regulation der LHCs wurde inzwischen vielfältig demonstriert und einzelne Effekte sind bei höheren Pflanzen intensiv untersucht und beschrieben worden (Horton et al., 1996). Auch für Carotinoide wurde die Abhängigkeit der Regulation bezüglich der Lichtqualität und -quantität gezeigt. So konnten Simkin et al. (2003) an Chloroplasten in Paprikablättern (*Capsicum annuum*) zeigen, dass mit Hilfe von Norflurazon (NFZ), einem Inhibitor der Carotinoidbiosynthese (Böger und Sandmann, 1998), eine Akkumulation des farblosen Carotinoids Phytoen unter Lichteinfluss stattfindet. Zudem konnte hierbei gezeigt werden, dass mit steigenden Lichtintensitäten eine steigende Phytoenakkumulation stattfindet, wohingegen bei Dunkelheit kein Phytoen detektiert werden konnte. Diese Analysen deuten auf eine Stagnation der Carotinoidbiosynthese und entsprechend der Transkripte in den Dunkelphasen sowie einer lichtabhängigen Regulation während des Tages hin.

Auch in Diatomeen konnten vereinzelte Nachweise einer lichtabhängigen Regulation gezeigt werden. Oeltjen et al. (2002) bzw. (2004) zeigten, dass in *Cyclotella cryptica* das Gen *fcp2* bzw. *fcp6* einer diurnalen Expression unterliegt. Siaut et al., 2007 demonstrierten speziell für *P. tricornutum* die lichtabhängige Regulation für *fcpb*. Der physiologische Zusammenhang zwischen Pigmenten und Proteinen der Lichtsammelkomplexe erlaubt die Vermutung einer lichtabhängigen Expression von Carotinoiden auch in *P. tricornutum*. Zwar nicht im Rahmen einer Analyse zur diurnalen Expression, aber dennoch in Abhängigkeit von Lichtqualität und -quantität konnten bereits Coesel et al. (2008) und Nymark et al. (2009) an zuvor 48 Stunden dunkeladaptierter *P. tricornutum* Zellen eine lichtabhängige Regulation einzelner Gene auf Transkriptionsebene nachweisen (siehe auch 1.3.3; 1.3.4). Um dieser These nachzugehen wurden die drei Genkopien der Zeaxanthin-Epoxidase von *P. tricornutum* im Rahmen dieser Arbeit einer diurnalen Analyse unterzogen.

1.3 Aufklärung und biotechnologische Anwendung der Carotinoidbiosynthese von *P. tricornutum*

Für die genetische Modifikation von Mikroalgen ist es unabdingbar, die einzelnen Gene und die Funktion ihrer Proteine innerhalb eines Biosyntheseweges im Organismus zu kennen sowie etwaige Limitierungen und Stellschrauben zu verstehen. In dieser Arbeit sollen Grundlagen zur genetischen Modifikation des Carotinoidbiosyntheseweges in *P. tricornutum* geschaffen werden. Zur Steigerung des Carotinoidgehalts wurde dafür die funktionelle Charakterisierung des putativen Phytoen-Synthase-Gens und anschließend die Aufklärung der Regulation und die limitierenden Eigenschaften der putativen Phytoen-Synthase (Psy; 1.3.3) untersucht. Des Weiteren wurde die funktionelle Charakterisierung der putativen Zeaxanthin-Epoxidase-Gene (*zep1*, 2 und 3; 1.3.4) durchgeführt und ebenfalls die Regulation der Produkte analysiert. Die putativen Zeaxanthin-Epoxidasen sollten anschließend als Stellschraube zur Bildung von Astaxanthin dienen. Die funktionellen Charakterisierungen erfolgten mit Hilfe der homologen und heterologen Expression (1.3.1). Des Weiteren wurde ein Versuch zur Bildung von Astaxanthin unternommen (Bkt: β -Carotin-Ketolase; 1.3.5).

1.3.1 Homologe und heterologe Expression

In verschiedenen Organismen kommen Proteine jeweils nur in bestimmten Mengen in der Zelle vor. Durch Änderungen der Milieubedingungen können veränderte Expressionsraten in Organismen auf natürliche Art und Weise erreicht werden. So gibt es neben biotischen Faktoren verschiedene abiotische Faktoren (Temperatur, Salzgehalt etc.), welche Einfluss auf die Stoffwechsellage der Organismen haben und sich im Labor überprüfen lassen.

Inzwischen ist es aber auch durch gentechnische Methoden möglich, in den Stoffwechsel bzw. die Maschinerie der Expression direkt einzugreifen und so die vorhandenen Proteinmengen zielgerichtet zu verändern. Mit entsprechenden organismenspezifischen Expressionsvektoren und ausgewählten Promotoren bzw. Expressionskassetten lässt sich die Expression spezifischer Proteine in einem Organismus weitestgehend kontrollieren. Hierfür gibt es bereits eine große Bandbreite an Expressionssystemen. Diese können sowohl von außen regulierbar oder auch konstitutiv angewendet werden. Unterscheiden kann man zwischen der sogenannten homologen und der heterologen Expression. Die homologe Expression bezeichnet die veränderte Expression eines Gens im endogenen Wirt. Die heterologe Expression hingegen bezeichnet die Expression eines Gens in einem fremden Organismus. So konnten

beispielsweise Misawa und Shimada (1997) durch heterologe Expression die Synthese der Carotinoide Lycopin, β -Carotin und Astaxanthin in Hefe (*Candida utilis*) erreichen.

Das Verändern des Zellhaushaltes durch genetische Manipulation kann aber auch Probleme mit sich bringen, so dass es nicht immer zur erwünschten Expression kommt (Sandmann, 2001). Beispielsweise haben manche Proteine in veränderten Konzentrationen, besonders bei der heterologen Expression, toxische Wirkung und werden daher abgebaut oder die Zelle wird der Apoptose/Lyse unterzogen. Gleichzeitig muss der Nachschub an entsprechenden Vorläufer-Molekülen gewährleistet sein (Sandmann, 2001). Zudem können bei Überexpression hohe Mengen zur Aggregation der Proteine führen. Besonders bei der heterologen Expression ist zusätzlich auf die sogenannte „Codon Usage“, die Verwendung unterschiedlicher Triplets zur Bildung von Aminosäuren, verschiedener Organismen zu achten. Solche für den modifizierten Organismus negativen Einflüsse bewirken daher oft eine Gegenregulation des eingebrachten Transgens.

Um entsprechende zielgerichtete Techniken anwenden zu können, müssen im Vorhinein jedoch die Gene, welche für das gewünschte Protein codieren, bekannt sein. Durch spezifische Komplementierungsexperimente ist es möglich, einen funktionellen Nachweis für ein Gen eines Biosyntheseweges zu erhalten (Misawa et al., 1990). So können nicht nur Enzymfunktionen nachgewiesen, sondern auch Carotinoide *in-vivo* heterolog und homolog gebildet werden (Albrecht et al., 2000). Für die funktionelle Charakterisierung einiger Gene der Carotinoidbiosynthese in *P. tricornutum* wurde auch in dieser Arbeit die Methode der heterologen und homologen Expression angewendet.

1.3.2 Fucoxanthin

Fucoxanthin wird zur Gruppe der Xanthophylle gezählt und kommt in Phaeophyceen und Bacillariophyceen (Diatomeen) vor (Stransky und Hager, 1970). Hier dient es besonders in den Lichtsammelkomplexen als akzessorisches Pigment (Owens und Wold, 1986), wobei Licht im grünen Wellenlängenbereich (510–525 nm) absorbiert wird. Aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften dient es als Radikalfänger und ist gleichzeitig am Schutz vor Photooxidation beteiligt (Sachindra et al., 2007; Dambeck und Sandmann, 2014). Fucoxanthin hat inzwischen das wirtschaftliche und pharmazeutische Interesse geweckt. Neben seiner Funktion als antikanzerogen (Kumar et al., 2013) sorgen auch die antidiabetischen sowie antiadipösen Eigenschaften (Maeda et al., 2009) und damit sein Potential zur Gewichtsreduzierung (Hu et al., 2012) für eine gesteigerte Nachfrage. Fucoxanthin ist das Hauptpigment in *P. tricornutum* (Kim et al., 2012; Mikami und Hosokawa, 2013) und liegt hier verhältnismäßig in deutlich

höheren Mengen vor als beispielsweise in Makroalgen wie *Laminaria japonica* oder *Eisenia bicyclis* (Kim et al., 2012). *P. tricornutum* stellt damit einen potentiellen Kandidaten dar, um die Produktion von Fucoxanthin im industriellen Interesse zu erhöhen. Bislang ist der Carotinoidbiosyntheseweg in *P. tricornutum* nicht vollständig aufgeklärt, so dass eine Überproduktion von Fucoxanthin durch molekulargenetische Modifikationen bisher noch nicht möglich ist. Um dies zu ermöglichen bedarf es der Kenntnis von den die Carotinoidbiosynthese regulierenden und limitierenden Enzymen. Ein putativ limitierendes Enzym stellt die Phytoen-Synthase dar.

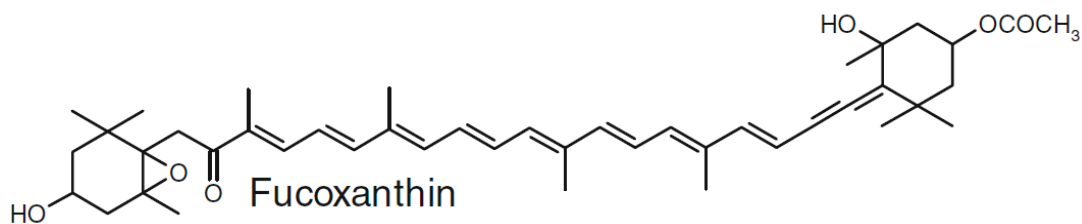


Abbildung 5: Struktur von Fucoxanthin.

Die Struktur von Fucoxanthin ist durch eine Keto- und Epoxidgruppe, zwei Hydroxylgruppen und eine allenische Bindung beim Übergang der Kohlenstoffkette zu einem der Iononringe charakterisiert. Struktur entnommen aus Betrand (2012).

1.3.3 Phytoen-Synthase

Die Phytoen-Synthase (Psy) katalysiert die erste Reaktion innerhalb der Carotinoidbiosynthese. Hierbei werden zwei Moleküle Geranylgeranylpyrophosphat durch eine Kopf-zu-Kopf-Kondensation aneinander addiert, wobei vorerst das Zwischenprodukt Prephytoendiphosphat entsteht. Dieses wird anschließend durch eine Umlagerung zu Phytoen umgewandelt.

Die Phytoen-Synthase ist zumindest in höheren Pflanzen membranständig in den Chloroplasten verankert (Hirschberg, 2001). Strukturell ähnelt sich die Phytoen-Synthase in allen Organismen (Tran et al., 2009, Abbildung 6) und die Aminosäuren-Sequenzen bzw. Proteindomänen weisen Ähnlichkeiten zu Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase und anderen Prenyl-Transferasen bzw. Squalensynthasen (Hirschberg, 2001; Iwata-Reuyl et al., 2003) auf. Als Kofaktor wird Mangan benötigt (Iwata-Reuyl et al., 2003).

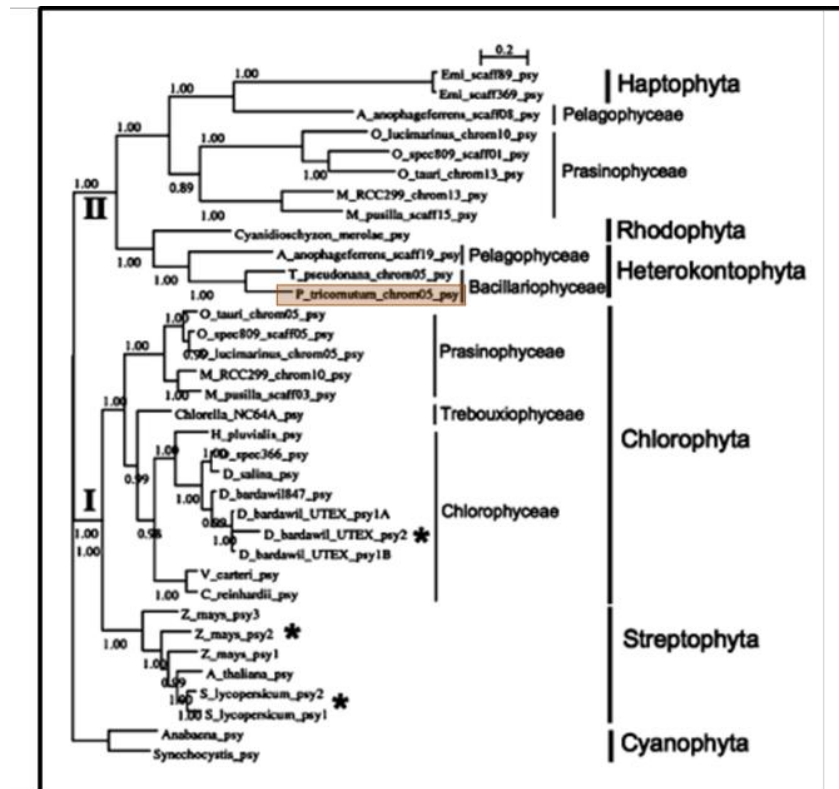


Abbildung 6: Phylogenetischer Stammbaumanalyse der Phytoen-Synthase.

Zur Generierung wurden die Sequenzen der Phytoen-Synthase verschiedener Organismen wie Cyanobakterien, Algen und einiger höherer Pflanzen verwendet. Orange markiert ist die Phytoen-Synthase von *P. tricornutum*. Die Sterne zeigen an, wo spätere Genduplikationen zu paralogen Genen geführt haben. Römisch I und II geben die zwei unterschiedlichen Klassen der Phytoen-Synthase an, welche durch Genduplikation entstanden sind. Entnommen und modifiziert aus Tran et al. (2009).

Durch phylogenetische Analysen zeigten Tran et al. (2009), dass die Strukturähnlichkeit der Phytoen-Synthase in verschiedenen Organismen scheinbar sowohl auf orthologen Genen beruht, z.B. bei *Ostreococcus*, als auch durch Genduplikationen (Paralogie) hervorgerufen wurde. Diese Annahmen erklären, warum in unterschiedlichen Organismen eine unterschiedliche Anzahl von Genkopien für die Phytoen-Synthase zu finden ist, welche zum Teil auch unterschiedlich lokalisiert und reguliert zu werden scheinen. In *L. esculentum* wurden beispielsweise mehrere paraloge Genkopien gefunden, welche in unterschiedlichen Geweben operieren. Genkopie *psy-1* bringt eine Frucht- und Blütenspezifische Isoform hervor, während die Isoform von *psy-2* hauptsächlich in grünem Gewebe dominiert (Bartley und Scolnik, 1993; Fraser et al., 1999). Für Diatomeen und im speziellen auch für *P. tricornutum* geben Tran et al. (2009) das Vorhandensein von nur einer Genkopie an. Die Phytoen-Synthase von *P. tricornutum* #Pt56481 liegt danach auf Chromosom 5 im Abschnitt 447594-449378, ist 1524 bp lang und hat ein Intron von 91 bp. Das Protein hat ein molekulares Gewicht von 56,76 kDa.

Es konnte gezeigt werden, dass die Phytoen-Synthese als limitierender Schritt für die Carotinoidbiosynthese angesehen werden kann und so die Syntheseleistung zumindest in Bakterien (Götz et al., 2002) und höheren Pflanzen (Fray et al., 1995; Rodríguez-Villalón et al., 2009) kontrolliert. Somit kann man davon ausgehen, dass auch in *P. tricornutum* die Phytoen-Synthese die gesamten Carotinoidbiosynthese limitiert – ein Nachweis fehlt bislang. Für die Modellpflanze *A. thaliana* konnten Toledo-Ortiz et al. (2010) zeigen, dass die Aktivität der Phytoen-Synthese über bestimmte Transkriptionsfaktoren (PIF phytochrome interacting factor) in Abhängigkeit von Licht reguliert wird (Toledo-Ortiz et al., 2010). Für *Haematococcus pluvialis* konnte gezeigt werden, dass die Gene der Phytoen-Synthese unter Stressbedingungen wie z.B. Starklicht und Nährstoffmangel hochreguliert werden (Steinbrenner und Linden, 2001, 2003). Die Lichtabhängigkeit von einigen Enzymen der Carotinoidbiosynthese wurde im speziellen für *P. tricornutum* auch von Coesel et al. (2008) auf Transkriptionsebene demonstriert. Bei 48 Stunden dunkeladaptierten Zellen konnte so für die Phytoen-Synthese eine Regulation in Abhängigkeit der Lichtqualität und der Zeit gezeigt werden (Abbildung 7). Besonders stark reguliert wurde die Phytoen-Synthese durch weißes Licht. Nach etwa fünf Stunden Lichtexposition konnte hier ein Maximum der Transkriptionsmenge festgestellt werden. Für blaues Licht konnte eine ähnliche Regulation nachgewiesen werden, wohingegen bei rotem Licht kaum eine Regulation stattzufinden scheint.

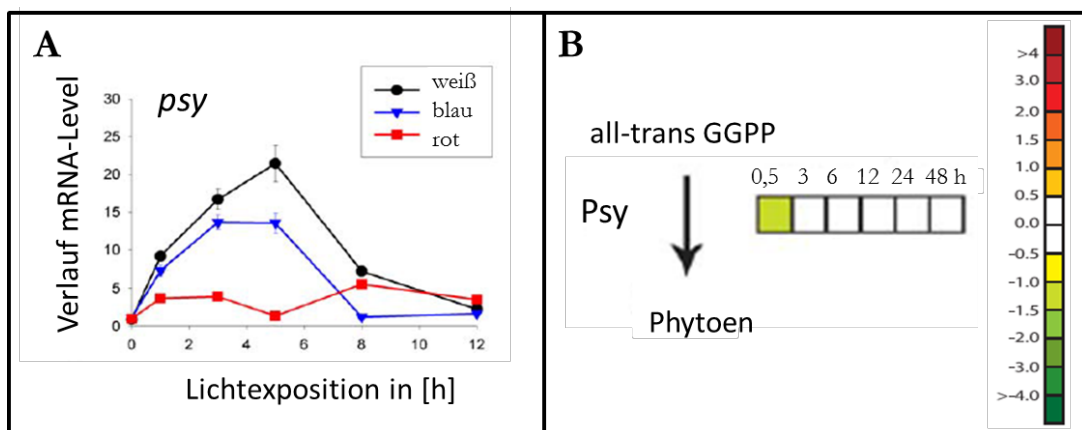


Abbildung 7: Regulation der Phytoen-Synthese.

A Regulation der Phytoen-Synthese von *P. tricornutum* auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit von Lichtqualität und Zeit. Die Zellen wurden vor der Lichtexposition für 48 Stunden dunkeladaptiert und anschließend mit weißem ($175 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$), blauem ($25 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) und rotem Licht ($25 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Modifiziert nach Coesel et al. (2008). **B** Regulation der Phytoen-Synthese von *P. tricornutum* auf Transkriptionslevel. Die Zellen wurden 48 Stunden dunkeladaptiert und anschließend unter weißem Starklicht ($500 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) die Transkriptionsmenge bestimmt. Modifiziert nach Nymark et al. (2009).

Auf Analysen der quantitativen Echtzeit-PCR beruhend sind nach Nymark et al. (2009) jedoch die meisten Transkripte der Carotinoidbiosynthese, so auch das der Phytoen-Synthese, im

allgemeinen Vergleich zu beispielsweise den Genen der Antennenproteinen oder des Elektronentransports unter Starklicht verhältnismäßig schwach reguliert.

Neben der Lichtqualität scheinen auch andere Faktoren die Carotinoidbiosynthese zumindest auf Transkriptionsebene wesentlich zu beeinflussen. So weisen Coesel et al. (2008) darauf hin, dass beispielsweise in EST-Datenbanken unter Eisen-limitierenden Bedingungen das Transkript des Phytoen-Synthase-Gens häufig vorkommt.

Die Analyse bzw. die funktionelle Charakterisierung der Phytoen-Synthase aus *P. tricornutum* war Teil dieser Arbeit. Im Anschluss wurde die Phytoen-Synthase zusätzlich in *P. tricornutum* homolog eingebracht, um einen erhöhten Carotinoidgehalt zu gewinnen. Ein ähnlicher Ansatz wurde durch Überexpression des Phytoen-Synthase-Gens aus dem Bakterium *Erwinia uredovora* durchgeführt. Dabei konnte der Lycopingehalt in *L. esculentum* gesteigert werden (Fraser et al., 2002).

1.3.4 Zeaxanthin-Epoxidase

Für *P. tricornutum* konnten drei putative Kandidaten für die Gene der Zeaxanthin-Epoxidase (*zep1*, 2 und 3) identifiziert werden, welche nach Coesel et al. (2008) vermutlich ebenfalls auf Genduplikationen zurückzuführen sind. Die Autoren nehmen an, dass diese Duplikation als Event vor der sekundären Endosymbiose stattgefunden hat. Zum ersten Mal wurde das Gen für eine Zeaxanthin-Epoxidase in ABA-defizienten *Nicotiana plumbaginifolia*-Mutanten (*aba2*) entdeckt (Marin et al., 1996). In höheren Pflanzen ist Zeaxanthin zudem ein Vorläufer-Molekül der ABA-Synthese, welche in Diatomeen nicht vorhanden ist. Die Zeaxanthin-Epoxidase (Zep) katalysiert in höheren Pflanzen (Bouvier et al., 1996) die Reaktionen innerhalb des VAZ. Das Enzym hat eine Flavin-Monooxygenase (FMO)-Aktivität und ist zusätzlich mit der hierfür notwendigen FAD-Domäne ausgestattet (Coesel et al., 2008). In Analogie zu Marin et al. (1996) geben Coesel et al. (2008) aufgrund von Sequenzanalysen die Anwesenheit einer ADP-Bindestelle innerhalb der Sequenz an, wobei beide Autoren nicht weiter auf dessen Funktion eingehen. Durch zweifache Epoxidation wird bei einem pH-Wert von 7,5 mit Hilfe von molekularem Sauerstoff als Kosubstrat, NADPH als Elektronendonator, Ferredoxin als Elektronenüberträger und unter dem Einfluss des Kofaktors FAD auf der stromalen Seite der Chloroplasten Zeaxanthin über Antheraxanthin zu Violaxanthin umgewandelt (Bouvier et al., 1996). Die Struktur des Enzyms ähnelt Proteinen, welche zur Lipokalin-Familie gezählt werden und sich durch eine gemeinsame Tertiärstruktur auszeichnen (Grzyb et al., 2006). Die Zuordnung der Zeaxanthin-Epoxidasen zur Familie der Lipokaline wurde erstmals von Bugos et al. (1998) demonstriert.

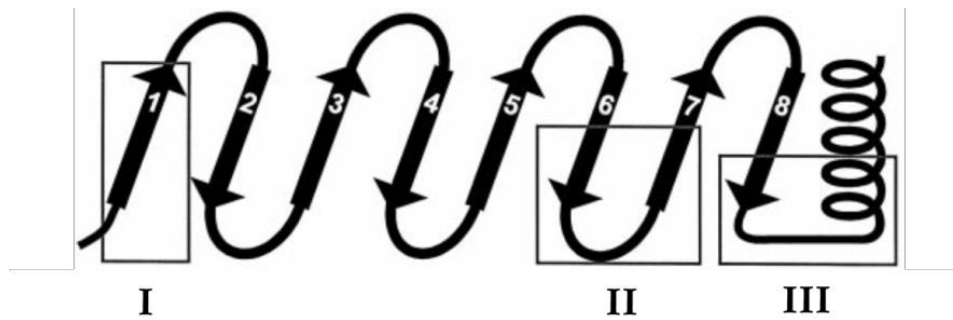


Abbildung 8: Modell der β -Faltblätter und den beteiligten konservierten Lipokalinmotiven (I, II, III) zur Bildung der Faserstruktur.

Die β -Faltblätter 1, 6, 7 und 8 treten in den unterschiedlichen konservierten Bereichen auf, während die β -Faltblätter 2, 3, 4 und 5 in den Sequenzen dazwischen zu finden sind. (modifiziert nach Bugos et al., 1998).

Innerhalb dieser Struktur kann zwischen drei sogenannten Lipokalinmotiven unterschieden werden. Generelle Charakteristika für Lipokalinmotive sind laut Grzyb et al. (2006), Flower (1996) und Flower et al. (2000) besonders kurze Sequenzmotive, welche sich durch ihre starke Ähnlichkeit der Aminosäuren auszeichnen. Hierzu zählt ein besonders konserviertes Muster aus acht antiparallelen β -Faltblattsträngen, die das sogenannte β -Fass (β -barrel) ausbilden. Diese konische Höhle ist zu einer Seite hin geöffnet und dient der Substratbindung. Trotz dieser Ähnlichkeiten sind die Gesamtsequenzen der zur Lipokalinfamilie gehörenden Proteine oft stark divergent (Cowan et al., 1990) und ebenso vielfältig sind ihre Funktionen (Grzyb et al., 2006). Allgemein sind solche Proteine für den Transport kleiner hydrophober Moleküle wie beispielsweise Steroide geeignet, an der Komplexbildung mit löslichen Makromolekülen beteiligt oder binden an spezifische Oberflächenproteine.

Coesel et al. (2008) weisen darauf hin, dass das Lipokalinmotiv I aus *P. tricornutum* für das Protein Zep1 und 2 im Gegensatz zu Zep3 deutlich länger ist als in höheren Pflanzen. Außerdem ist das Lipokalinmotiv I in Zep1, 2, 3 im Vergleich zu höheren Pflanzen nicht konserviert und die Sequenzen weisen keine sogenannte „forkhead-assoziierte“ Domäne (FHA, Phosphopeptiderkennungdomäne) auf. Für Zep3 konnte C-Terminal eine transmembrane Region definiert werden (Coesel et al., 2008).

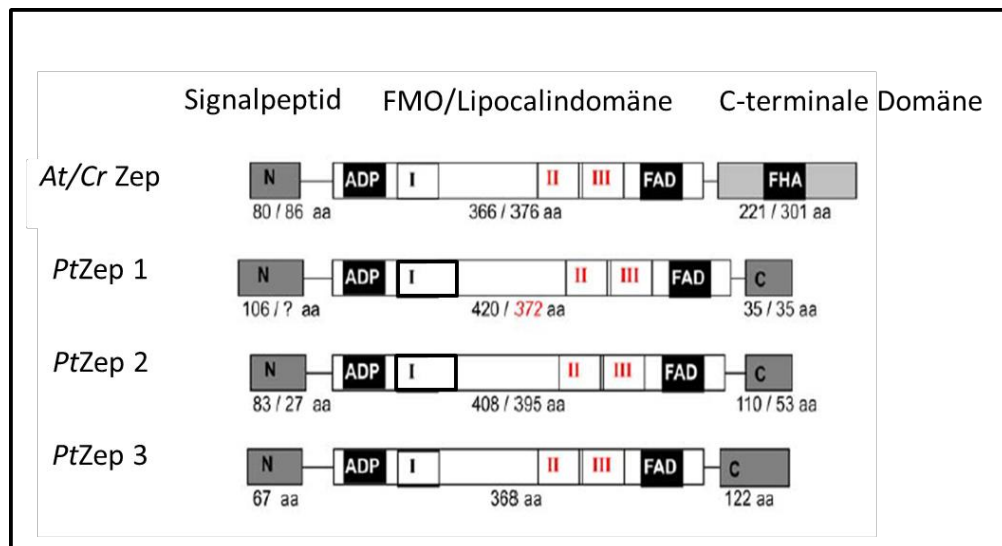


Abbildung 9: Schematische Darstellung verschiedener Zeaxanthin-Epoxidasen.

Dargestellt sind wichtige Domänen der Zep-Proteine der Organismen *A. thaliana* (*At*) bzw. *C. reinhardtii* (*Cr*) im Vergleich zu *P. tricornutum* (*Pt*). Die Domänen beginnen mit dem N-terminalen Ende der Proteine und der anschließenden ADP-Bindestelle. Es folgen die drei Domänen der Lipocalinmotive 1, 2, 3 und die anschließende FAD-Bindestelle. C-Terminus ist die FHA-Domäne dargestellt. Modifiziert nach Coesel et al. (2008). ADP=Adenosindiphosphat; FAD=Flavin-Adenin-Dinukleotid; FHA=forkhead-homology-associated domain.

Analysen auf Transkriptionsebene zeigen eine lichtabhängige Regulation. Bei 48 Stunden dunkeladaptierten *P. tricornutum*-Zellen konnten Coesel et al. (2008) für alle drei Genkopien eine verstärkte Regulation insbesondere für weißes und blaues Licht nachweisen. Die Regulation variiert allerdings im zeitlichen Verlauf. Während *zep1* und *2* bereits nach fünf Stunden Lichtexposition ihr Maximum erreicht haben (sowohl bei blauem als auch bei weißem Licht), ist bei *zep3* unter Weißlichtbedingungen das Maximum erst nach acht Stunden Lichtexposition erreicht. Eine Regulation für rotes Licht konnte wie bereits bei der Photosynthese nur minimal bis gar nicht festgestellt werden.

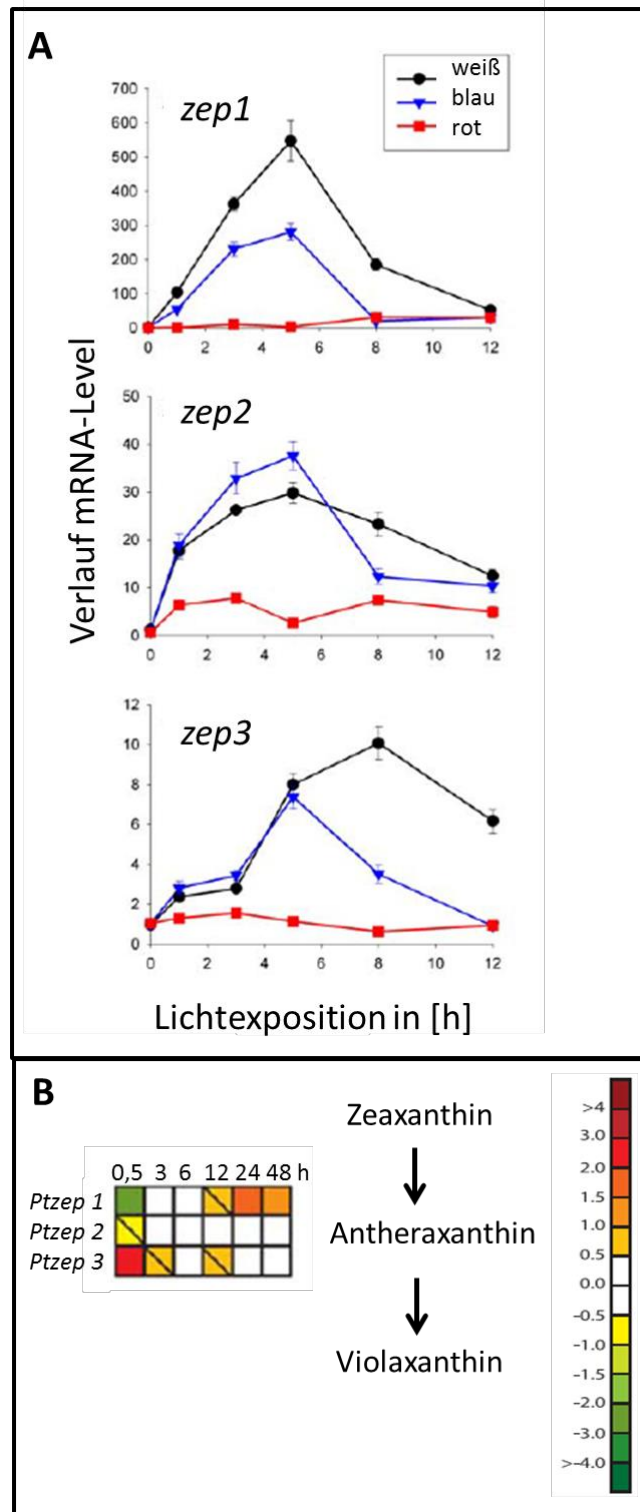


Abbildung 10: Regulation der Zeaxanthin-Epoxidasen.

A Regulation der Zeaxanthin-Epoxidase 1, 2, 3 von *P. tricornutum* auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit von Lichtqualität und Zeit. Die Zellen wurden vor der Lichtexposition für 48 Stunden dunkeladaptiert und anschließend mit weißem ($175 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$), blauem ($25 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) und rotem Licht ($25 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Modifiziert nach Coesel et al. (2008). **B** Regulation der Zeaxanthin-Epoxidase 1, 2, 3 von *P. tricornutum* auf Transkriptionslevel. Die Zellen wurden 48 Stunden dunkeladaptiert und anschließend unter weißem Starklicht ($500 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) die Transkriptionsmenge bestimmt. Modifiziert nach Nymark et al. (2009).

Nymark et al. (2009) konnten unter Starklichtexposition nach 0,5 Stunden für *zep1* eine klar schwächere Regulation nachweisen, während *zep3* im Gegenzug deutlich hochreguliert wird. Nach etwa 12 Stunden Starklichtexposition konnte eine Hochregulation für *zep1* festgehalten werden, während *zep3* eher zu Beginn der Lichtexposition 0,5–12 Stunden reguliert zu werden scheint. Für *zep2* hingegen wurde keine Regulation unter Starklichtbedingungen nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die drei für *P. tricornutum* annotierten Sequenzen der putativen Zeaxanthin-Epoxidasen *zep1*, 2 und 3 funktionell charakterisiert werden.

1.3.5 Astaxanthin und die β -Carotin-Ketolase

Astaxanthin, ein rotes Carotinoid, wird zu den sogenannten „high-value-products“ gezählt, weshalb es aufgrund seines hohen Marktpreises eine besondere wirtschaftliche Bedeutung einnimmt. Es wird beispielsweise zur Tierfütterung in der Fisch bzw. Lachszucht eingesetzt (Benemann, 1992). Gleichzeitig wirkt Astaxanthin auch als Antioxidant und hat somit für den Menschen eine besondere Bedeutung. Ihm wird die Fähigkeit zugeschrieben, durch oxidativen Stress ausgelösten Krankheiten (Bildung von ROS (reaktive Sauerstoffspezies)), entgegenzuwirken (Ikeda et al., 2008).

Durch das Modifizieren und Einbringen neuartiger Gene in den Carotinoidbiosyntheseweg eines Organismus kann bei diesem durch geeignete Überexpression nicht nur eine Steigerung des Carotinoidgehalts erreicht, sondern durch heterologe Expression auch deren Zusammensetzung entsprechend verändert werden. Die industrielle Nachfrage an sowohl hydroxylierten Carotinoiden als auch an Ketocarotinoiden steigt. Obwohl photosynthetisch aktive Organismen Carotinoide produzieren, sind die wenigsten unter ihnen in der Lage Ketocarotinoide (Ralley et al., 2004) zu synthetisieren, was sich mit dem Fehlen entsprechender Ketolasen erklären lässt. Eines der wenigen Beispiele höherer Pflanzen ist das sogenannte Adonisröschen (*Adonis aestivalis*). Aber auch hier sind die extrahierbaren Mengen eher im unteren Bereich anzusiedeln. Neben ein paar höheren Pflanzen wird Astaxanthin nur von wenigen Bakterien, einigen Grünalgen (z.B. *H. pluvialis*) und dem Pilz *Xanthophyllomyces dendrorhous* synthetisiert (Zhong et al., 2011). Eine erhöhte Astaxanthinproduktion konnte speziell für *H. pluvialis* unter Stressbedingungen gezeigt werden (Wang et al., 2003).

Generell sind Ketocarotinoide Derivate von β -Carotin, welche sich durch Ketogruppen auszeichnen. Unter den Ketocarotinoiden kommt dem bereits erwähnten Astaxanthin (3,3'-dihydroxy-4,4'-diketo- β -Carotin) in letzter Zeit ein gesteigertes Interesse entgegen. Je nach Syntheseweg und Organismus werden hierbei zwei Enzyme benötigt: die β -Carotin-

Ketolase (Bkt) und die β -Carotin-Hydroxylase (Bhy). In *P. tricornutum* bestehen ausgehend von den Molekülen β -Carotin, β -Cryptoxanthin und Zeaxanthin verschiedene Möglichkeiten mittels Bkt und Bhy Astaxanthin zu synthetisieren (Abbildung 11). Die Menge an synthetisiertem Astaxanthin scheint speziell durch die Bkt limitiert zu werden. Auf der Suche nach einer Bkt-Variante mit besserer Substratspezifität für 3-Hydroxy- β -Carotin haben Zhong et al. (2011) die Effizienz des Enzyms Bkt aus drei verschiedenen Organismen (*Chlamydomonas reinhardtii* (CrBkt), *Chlorella zofingiensis* (CzBkt) und *Haematococcus pluvialis* (HpBkt)) mittels *E. coli*-Systemen identifiziert und analysiert. Generell haben alle drei Bkts die Eigenschaft sowohl hydroxylierte (wie z.B. Zeaxanthin), als auch nicht-hydroxylierte (wie z.B. β -Carotin) Formen umzuwandeln, wobei die Effizienz bei der Umwandlung von hydroxylierten Formen stark sinkt. Interessanterweise zeigt dabei die CrBkt von *Chlamydomonas* mit 85 % die höchste Konvertierungsrate. Auch in anschließend transformierten *Arabidopsis*-Linien konnte bei der mit CrBkt inokulierten Mutante die größte Menge Astaxanthin in mg pro Trockengewicht bestimmt werden.

Eines der Ziele dieser Arbeit war, das Ketocarotinoid Astaxanthin heterolog in *P. tricornutum* zu synthetisieren. Verwendet wurde hierfür die genetische Sequenz der Bkt aus *Chlamydomonas*.

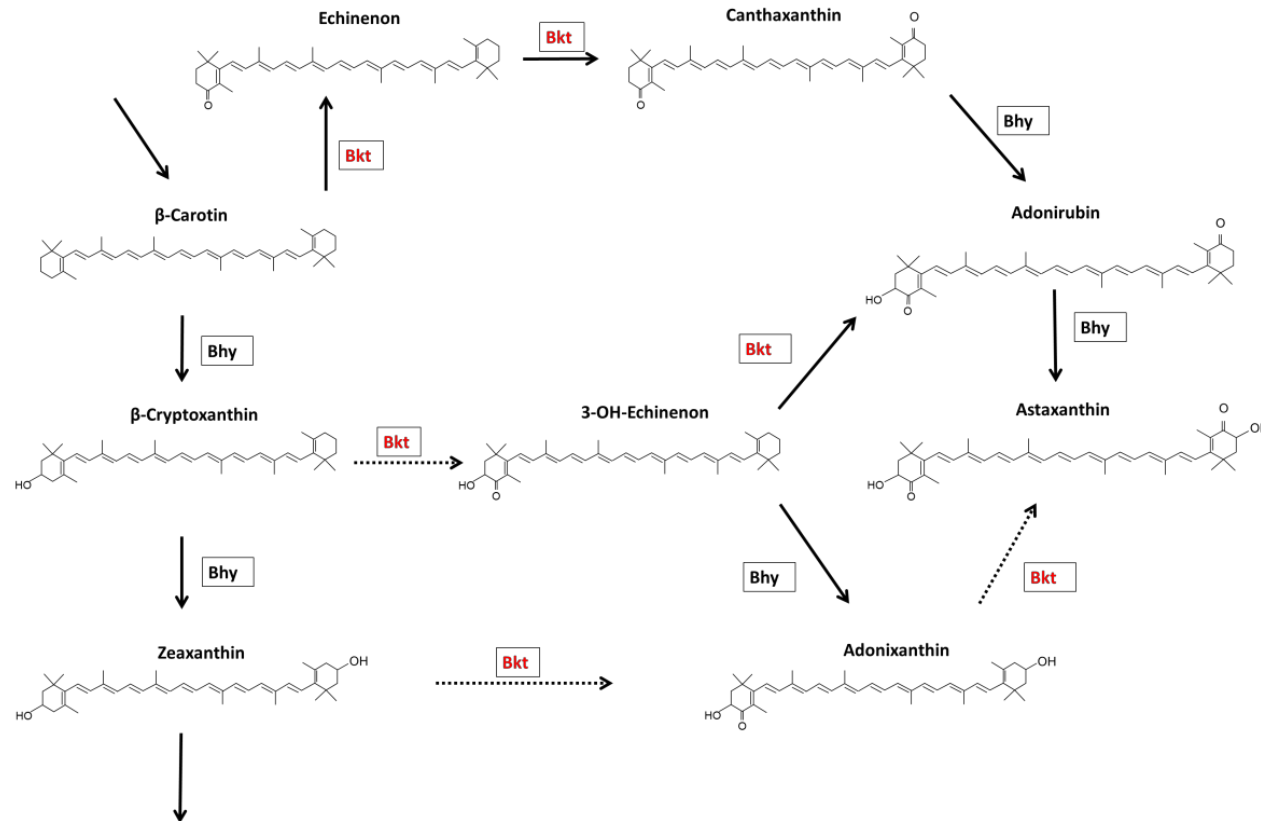


Abbildung 11: Mögliche Wege zur Bildung von Astaxanthin in *P. tricornutum*.

Durch das Einbringen der β -Carotin-Ketolase in *P. tricornutum* kann Astaxanthin auf unterschiedliche Weise gewonnen werden, modifiziert nach Zhong et al. (2011). Von β -Carotin ausgehend kann durch zweifache Ketolierung über Echinon und Canthaxanthin und darauffolgende zweifache Hydroxylierung über Adonirubin Astaxanthin gewonnen werden. Von β -Cryptoxanthin kann Astaxanthin über 3-OH-Echinon und weiter entweder über Adonirubin oder Adonixanthin synthetisiert werden. Von Zeaxanthin aus verläuft ein Syntheseweg über Adonixanthin zu Astaxanthin. Bhy= β -Carotin-Hydroxylase; Bkt= β -Carotin-Ketolase. Gestrichelte Pfeile zeigen Reaktionen mit geringer Effizienz an, da bereits hydroxylierte Gruppen vorhanden sind.

2 Zielsetzung

Über den Carotinoid-Biosyntheseweg in *P. tricornutum* ist bislang nicht viel bekannt. In den vergangenen Jahren wurden wenige Untersuchungen zu Genen bzw. Proteinen vorgenommen, so dass bis heute der funktionelle Nachweis nur für vereinzelte Proteine erbracht wurde. Genaue Charakterisierungen stehen jedoch noch aus. Die Kenntnis über die Funktionalität und die Regulation von Enzymen ist aber Grundlage, um Stellschrauben innerhalb des Syntheseweges kennen zu lernen und damit genetische Modifikationen vornehmen zu können. Ziel der Arbeit war es, den Carotinoid- und damit den Fucoxanthingehalt von *P. tricornutum* zu erhöhen und im Weiteren den Syntheseweg zur Bildung von Astaxanthin umzulenken. Bedingt durch die fehlende Kenntnis der Funktionen einiger Proteine in der Carotinoidbiosynthese, war die Grundlage für diese Arbeit der funktionelle Nachweis spezifischer Genkandidaten. Hierfür wird die annotierte Sequenz *psy* der putativen Phytoen-Synthase ebenso wie die annotierten Genkandidaten *zep1*, *zep2* und *zep3* für die Zeaxanthin-Epoxidase heterolog exprimiert. Des Weiteren soll jeweils die Regulation und im Falle der Phytoen-Synthase auch das limitierende Potential untersucht werden.

Die erlangten Kenntnisse sollten mittels genetischer Modifikation von *P. tricornutum* zur biotechnologischen Anwendung genutzt werden. Um den Fucoxanthingehalt weiterhin zu erhöhen, wurden Überexpressionsmutanten in *P. tricornutum* erstellt. Zusätzlich soll versucht werden, den Carotinoidbiosyntheseweg zur Bildung von Astaxanthin umzulenken. Dazu muss die β -Carotin-Ketolase heterolog exprimiert werden. Carotinoide, die dann in *P. tricornutum* zu Astaxanthin umgesetzt werden können, sind β -Carotin, β -Cryptoxanthin und Zeaxanthin. Entsprechend kann hier dann das neu identifizierte Gen in *P. tricornutum* genutzt werden, um durch Herunterregulieren der Zeaxanthin-Epoxidase eine Akkumulation der oben genannten Carotinoide zu erreichen und damit der Fluss für die Bildung von Astaxanthin verstärkt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von der Firma Roth oder Merck verwendet. Spezielle Apparaturen sind im Fließtext angegeben.

Tabelle 1: Verwendete Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien.

Gerät/Material	Typ/Modell	Firma
Autoklav	VB-150	Systec
Blotapparatur	Trans Blot SD Semi-Dry T. Cell	Bio-Rad
Dioden-Detektor	Diodenarray Detektor	Hitachi
	Diodenarray-Detektor 440	Kontron
Fluor-Cam	800 MF	Photon Sytem Instrument
Gefriertrockner	Alpha 1-4 LSC	Christ
Gellaufapparatur	Minigel	BioSpec Products
Gel-UV-Apparatur	TFX-20M	Appligene
Glasperlen	Ø 0,1 mm	Braun
	Ø 0,2 – 0,3 mm	Braun
Homogenisator	Typ RW 18	Janke & Kunkel IKA-Werke
HPLC-Apparatur VWR	Elite LaChrom	Hitachi
HPLC-Entgase	ERC 3217	ERC
HPLC-Pumpe	ERC 64	ERC
HPLC-Säulenofen	CROCO-CIL	ERC
Inkubationsofen/Wärmeschrank	B 50425 E	Heraeus Instrumentes
Magnetrührer	50380	Heidolph
Mikrowelle	Mikro-Chef FM 3510	Moulinex
Nanodrop	Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific
PCR-Gerät	1210-0407	VWR
qrt-PCR-Gerät	Stratagene Mx3000p	Agilent Technologies
pH-Elektrode	pH-Meter-766 Calimatic	Knick
Photometer	Jasco V-530	Systems
Röntgenfilm	Hyperfilm™ ECL	Amersham Bioscience
Schüttler groß	Certomat R	B. Braun
Schüttler klein	Multi Bio 3D	Biosan

Spannungsquelle	E431	Consort
	Desatronic 3x500/100	Desaga
Sterilbank	BSB 4 A	Gelaire
	Lamin Air HB 2448	Heraeus Instruments
Tissuelyser	TissueLyser LT	Qiagen
Thermoschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
Trennsäule	Chromolith RP-18	Merck
	Nucleosil RP-18	Macherey & Nagel
	C18-218TP54	Vydac
Vakuumpumpe	CVC 24	vacuubrand
Handzentrifuge	DW-41	Quiltron
Zentrifuge klein	Z 216 MK	Hermile
Zentrifuge groß	Biofuge primo R	Heraeus Instruments

3.2 Systematik und Anzucht der verwendeten Organismen

3.2.1 *Phaeodactylum tricornutum*

Der in diesen Versuchen verwendete einzellige Organismus *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646 (Bacillariophyceae) stammt aus der Algensammlung „University of Texas Culture Collection“ und zählt morphologisch zu den pennaten Diatomeen.

Die Algenkulturen der Diatomeenart *P. tricornutum* WT UTEX 646 sowie die erstellten Mutanten wurden bei 18 ± 1 °C und 40 ± 2 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in 50 ml Batch-Kulturen auf einem Schüttler bei 120 Umdrehungen pro Minute (Upm) in ASP-Medium (modifiziert nach Provasoli et al., 1957, siehe Tabelle 2 , pH 7,7 (H_2SO_4)) angezogen. Dabei wurde ein 16-Stunden-Tag-8-Stunden-Nacht-Rhythmus zur Anzucht verwendet. Zum Erhalt der Stammkultur wurde diese alle zwei Wochen steril in frisches Medium überimpft. Bei Bedarf an mehr Zellmaterial wurden die Kulturen in größere Gefäße überimpft. Für alle Versuche, einschließlich der Wachstumsraten wurden die Kulturen auf eine Zellzahl von 10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.2.1.1. Bestimmung der Wachstumsraten

Für die Zellzählung wurde die Thoma Zählkammer New Assistant (0,1 mm Tiefe; $0,0025 \text{ mm}^2$) verwendet. Hierbei wurde an definierten Tagen jede Zählkammer mit 10 μl der zu bestimmenden Kulturen befüllt und die Zellzahl mindestens in Doppelbestimmung ermittelt.

Die Zellzahl wurde dann mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor, sowie dem Verrechnungsfaktor von 15625 multipliziert.

Tabelle 2: ASP-Medium.

NaCl	86 mM
Tris	4 mM
KCl	21 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	8,1 mM
NaNO ₃	11,8 mM
K ₂ HPO ₄	0,58 mM
H ₃ BO ₃	0,16 mM
CaCl ₂	2,72 mM
Eisen(III) Lösung	0,1 % (v/v)
Spurenelementlösung A	0,1 % (v/v)

Spurenelement – Lösung A (pH 5,5)

EDTA=Titriplex III	80,6 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	20,5 mM
ZnCl ₂	8,3 mM
Spurenelement-Lösung B	5 % (v/v)

Spurenelement – Lösung B

CaCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,5 mM
CuCl ₂ 2 H ₂ O	0,35 mM

Eisen III –Lösung

EDTA=Titriplex III	12,5 mM
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	12,3 mM

3.2.2 *Arabidopsis thaliana*

Der in diesem Versuch verwendete Organismus *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Col-0 (Rosopsida) sowie die *npq2*-Mutanten (Niyogi et al., 1998) wurden von Prof. Peter Jahns (Universität Düsseldorf) bereitgestellt. Um eine gleichzeitige Keimung aller Samen der *A. thaliana*-Linien zu gewährleisten, wurden diese vor den Versuchen nach der Aussaat stets für 48 Stunden bei 4 °C ins Dunkle gestellt. Anschließend erfolgte die Kultivierung in einem 9-Stunden-Tag-15-Stunden-Nacht-Rhythmus, einer Temperatur von etwa 19-21 °C und einer Lichtintensität von etwa 80-100 µm Photonen m⁻² s⁻¹.

3.2.3 *Escherichia coli*

Zur Plasmidamplifikation und Klonierung wurde in diesen Versuchen auf den *Escherichia coli* Stamm XL1-Blue (Bullock et al., 1987) zurückgegriffen.

Für den funktionellen Nachweis der Carotinoidbiosynthese-Gene *psy* (Phytoen-Synthase) und *zep1*, *zep2* und *zep3* (Zeaxanthin-Epoxidasen 1, 2 und 3) wurde mit dem Stamm JM101 (Messing, 1979) gearbeitet. Um eine Komplementation zu ermöglichen, wurden im Vorfeld die Plasmide pACCAR25Δ*crtB* bzw. pACCAR25Δ*crtX* in JM101 eingebracht. Diese Plasmide tragen

die nötigen Gene (*crtE* (Geranygeranylpyrophosphat), *crtB* (Phytoen), *crtI* (Lycopin) und *crtY* (β -Carotin), *crtZ* (Zeaxanthin), *crtX* (Zeaxanthin- β -D-Glucosid)) zur Vervollständigung der Carotinoidbiosynthese, bis auf das entsprechende Gen *psy* oder *zep* (Misawa et al., 1995). Entsprechend erlauben die Plasmide nach der Komplementation durch die Expression der Gene *psy* bzw. *zep* den indirekten Produktnachweis von Intermediaten der Carotinoidbiosynthese bis hin zu Zeaxanthin.

Alle *E. coli*-Kulturen wurden stets in LB-Medium (modifiziert nach Bertani, 1951, Tabelle 3) oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Zur Selektion der gewünschten Kulturen wurde die entsprechende Menge des benötigten Antibiotikums hinzugegeben. Wenn nicht anders erwähnt, wurden sowohl die Kulturen in Flüssigmedium als auch diejenigen auf LB-Platten stets über Nacht bei 37 °C inkubiert. Wurde innerhalb des Komplementationsversuchs mit dem Stamm *E. coli* JM101 gearbeitet, so erfolgte die Kultivierung sowohl auf Platte als auch im Flüssigmedium bei Raumtemperatur und im Dunkeln über einen Zeitraum von 48 Stunden. Je nach benötigter Menge wurden entweder 5 ml (Miniprep) oder 100 ml (Midiprep) Flüssigkulturen bei 180 Upm auf einem Rundschüttler hochgezogen. Hiernach folgte die Plasmid- oder Carotinoidisolation (3.3.2, 3.3.5).

Tabelle 3: LB-Medium.

Substanzen	Konzentration
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l

Zur Herstellung von LB-Agarplatten (1,5 %) wurde nach dem Abkühlen des Mediums auf etwa 37 °C die entsprechende Menge Antibiotikum (Tabelle 20) beigefügt und die Platten gegossen. Die fertigen Platten wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.2.4 *Agrobacterium tumefaciens*

Der *Agrobacterium tumefaciens* (Alphaproteobacteria) Stamm GV3101, enthält die Plasmide pSoup und pMP90 (Hellens et al., 2000), welche die Resistenz gegen Tetracyclin (Tetr) (pSoup) bzw. die Resistenz gegen Gentamycin (Gent) (pMP90) vermitteln. Der Agrobakterienstamm wurde von Prof. Dr. R. Tenhaken aus der Universität Salzburg zur Verfügung gestellt.

Die zur Infektion von *A. thaliana* transformierten Agrobakterien wurden unter Schütteln (180 Upm) bei 28 °C im Dunkeln in Yeast-Extract-Peptone (YEP)-Medium bei pH 7 (Tabelle 4) angezogen.

Tabelle 4: YEP-Medium.

Substanzen	Konzentration
Hefeextrakt (yeast extract)	10 g/l
Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l

Für die Selektion positiver Agrobakterien nach der Transformation wurden YEP-Agarplatten (2 % Agar) verwendet. Nach dem Abkühlen des Mediums auf etwa 37 °C wurde die entsprechende Menge Antibiotikum (Tabelle 20) beigefügt und die Platten gegossen. Die fertigen Platten wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.3 Isolationsmethoden

3.3.1 Isolation genomischer DNA

Die DNA-Isolation war einerseits Grundlage verschiedener Klonierungstechniken, andererseits diente sie dem Nachweis der genetischen Insertion bei erstellten Mutanten-Linien.

3.3.1.1. DNA-Isolation aus *P. tricornutum*

Für die Isolation genomischer DNA aus *P. tricornutum* wurden 2 ml einer dicht gewachsenen Kultur bei 13000 Upm für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl CTAB-Puffer (Cetyltrimethylammoniumbromid, Tabelle 5; Winnepenninckx et al., 1993) und einer Spatelspitze Glasperlen der Mischung [Ø 1 mm/0,3 mm im Verhältnis (1:1), Braun] versetzt. Es erfolgte der Aufschluss der Zellen mit dem Tissuelyser für 13 Minuten bei 50 Hz. Anschließend wurde dem Homogenisat 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt und gut gemischt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000 Upm für zwei Minuten. Die entstandene oberste Phase wurde in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und die darin enthaltene DNA mit dem gleichen Volumen 100 % Isopropanol für 30 Minuten bei -20 °C gefällt. Die gefällte DNA wurde bei 4 °C und 13000 Upm für zehn Minuten pelletiert. Anschließend wurde die DNA noch zweimal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschliessend getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte stets in 20 µl sterilem H₂O_{bidest.}.

Tabelle 5: CTAB-Puffer.

Substanzen	Konzentration
CTAB	1 % (w/v)
Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
NaCl	700 mM

3.3.1.2. DNA-Isolation aus *A. thaliana*

Für die Isolation genomischer DNA aus *A. thaliana* wurde die DEX-Methode modifiziert nach Murray und Thompson (1980) verwendet. Etwa 100 mg frisches Blattmaterial wurden hierfür unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Homogenisators zu einem feinen Puder zermahlen. Es folgte die Zugabe sowohl von 200 µl DEX- Puffer pH 8 (Tabelle 6) als auch von 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Nach kurzem Mischen wurden Zelltrümmer und andere Zellbestandteile bei 4 °C und 13000 Upm für acht Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und wie oben bei *P. tricornutum* fortgeföhren (3.3.1.1). Die Resuspendierung erfolgte stets in 30 µl sterilem H₂O_{bidest.}

Tabelle 6: DEX-Puffer.

Substanzen	Konzentration
Tris-HCl	100 mM
EDTA	10 mM
CTAB	1 %
NaCl	700 mM

3.3.2 Isolation von Plasmid-DNA

Je nach Bedarf der benötigten Konzentration wurden entweder 5 ml (Miniprep) oder 100 ml (Midiprep) der wie im Kapitel „Anzucht“ (3.2.3; 3.2.4) beschriebenen angewachsenen und transformierten *E. coli* (3.7.1) oder *A. tumefaciens* (3.7.2) Kulturen bei 5000 Upm für fünf Minuten sedimentiert.

Im Falle der Miniprep wurden die Plasmide nach dem Protokoll des Kits „GeneJet Plasmid Miniprep Kit“ von Fermentas (Katalognummer #K0503) isoliert.

Im Falle der Midiprep wurden die Plasmide nach dem Protokoll des Kits „Pure Yield Plasmid Midiprep System“ von Promega ((Katalognummer #A2495) isoliert.

3.3.3 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolierte RNA wurde stets in cDNA umgeschrieben (3.5.1) und war damit einerseits Grundlage verschiedener Klonierungstechniken, andererseits diente sie dem Nachweis der Expression verschiedener Fragmente auf Transkriptebene. Des Weiteren wurde sie bei der Bestimmung der diurnalen Expression der drei Genkopien *zep1*, *2*, *3* aus *P. tricornutum* verwendet. Zur Bestimmung der lichtabhängigen Expression wurden die Kulturen innerhalb eines Tagesganges in Zusammenarbeit mit Bikoulis (2013) nach sieben Tagen Kultivierung wie folgt beprobt: Beginn der Belichtungsphase (t_0), nach einer Stunde (t_1), drei Stunden (t_3), fünf Stunden (t_5), neun Stunden (t_9) und nach 15 Stunden am Ende der Lichtexpositionsphase (t_{15}). Während der Dunkeladaption erfolgte eine Probenentnahme nach einer (t_{1N}), nach drei (t_{3N}), nach fünf (t_{5N}), nach sieben (t_{7N}) und nach acht Stunden (t_{8N}) Dunkelphase. Nach der RNA-Isolation erfolgte auch hier die Synthese von cDNA, mit welcher eine Duplex-PCR (3.5.4) durchgeführt wurde. Die Analyse erfolgte mittels Image J (3.8.1).

3.3.3.1. RNA-Präparation aus *P. tricornutum* und *A. thaliana*

Die RNA-Isolation aus verschiedenen *Phaeodactylum*-Kulturen erfolgte mit Hilfe des Kits „innuPREP Plant RNA Kit“ (analytikjena). Für die Zellernte wurden stets 40 ml dicht gewachsene Kultur bei 4 °C, 5000 Upm für fünf Minuten pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit DEPC-Wasser (0,1 % (v/v), Diethylpyrocarbonat vorbehandeltem H₂O_{bidest.}) gewaschen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 4 °C und 13000 Upm für drei Minuten. Das entstandene Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und direkt verwendet oder bei -80°C gelagert. Den tiefgefrorenen Sedimenten der Zellernte von *P. tricornutum* wurde eine Spatelspitze Glasperlen der Mischung [Ø 1 mm/0,3 mm im Verhältnis (1:1)] hinzugegeben, sowie 450 µl Resuspensions-Puffer PL aus dem Kit (RNA „innuPREP Plant RNA Kit“ (Analytikjena, #845-KS-2060010). Der mechanische Aufschluss erfolgte am vorgekühlten (-20 °C) Tissuelyser bei 50 Hz für 15 Minuten. Nach dem Zellaufschluss wurden die Perlen und etwaige Zelltrümmer bei 4 °C und 13000 Upm für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur weiteren RNA-Isolation herangezogen.

Für die Isolation der RNA aus *A. thaliana* wurden etwa 100 mg frisches Blattmaterial unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Homogenisators zu einem feinen Puder zermahlen. Dem feingemahlten Blattmaterial von *A. thaliana* wurden 450 µl Resuspensions-Puffer RL aus dem Kit hinzugegeben.

Die RNA-Isolation erfolgte im weiteren Verlauf jeweils nach dem Protokoll des „innuPREP Plant RNA Kit“ (Analytikjena, #845-KS-2060010). Die RNA wurde in 20 µl DEPC-H₂O eluiert und bei -80°C gelagert.

3.3.3.2. DNase-Verdau

Die isolierte RNA wurde von unerwünschter, genomischer DNA durch einen DNase-Verdau befreit. Hierfür wurde von der präparierte RNA 1 µg RNA nach dem Protokoll des Kits „TURBO-DNA-FREE™“ (Ambion, #AM1907) verdaut und die DNase anschließend mit 50 mM Natriumacetat als Endkonzentration bei 65 °C für zehn Minuten hitzeinaktiviert.

3.3.3.3. Bestimmung der Konzentration isolierter Nukleinsäuren

Über den Quotienten OD_{260}/OD_{280} kann die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden, wobei ein Wert von 2 reine RNA und ein Wert von 1,8 reine DNA anzeigt (Lottspeich und Engels, 2006).

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten DNA bzw. RNA wurde mit DEPC-Wasser als Referenz am Nanodrop mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} * V * F$$

c=Konzentration der Ausgangslösung; OD_{260} =Absorption bei 260nm; V=Verdünnungsfaktor; F=Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA; 40 für RNA).

3.3.4 Proteinisolation

Für die Proteinisolation von *P. tricornutum* wurden 100 ml einer einen Wochen alten Kultur bei 4°C und 13000 Upm für drei Minuten pelletiert. Das Sediment wurde bei -80 °C gelagert und dann zum Aufschluss der Zellen unter Zugabe von insgesamt 1 ml gepuffertem 80 % Aceton (v/v) (200 mM Tris-HCl pH 7,4) und Glasperlen der Mischung [Ø 1 mm/0,3 mm im Verhältnis (1:1)] mit Hilfe des Tissuelyser bei 50 Hz für 13 Minuten zu einem homogenen Gemisch verarbeitet. Die Proteine wurden nach dem Zellaufschluss für 15 Minuten bei -20 °C präzipitiert und bei 4 °C und 13000 Upm für zehn Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Chlorophyllbestimmung (3.3.4.1) herangezogen. Nach der Chlorophyllbestimmung wurde das Pellet mit 2x-Probenpuffer pH 6,8 (Tabelle 7) an 5 µg Chl a pro 20 µl für die Proteinanalysen angepasst. Die Proben wurden jeweils unter flüssig N₂ schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 7: 2x-Probenpuffer.

Substanzen	Konzentration
Tris-HCl	0,12 M
SDS	4 %
Saccharose	30 %
DTT	40 mM

3.3.4.1. Chlorophyllbestimmung *P. tricornutum*

Der Chlorophyllgehalt wurde in dieser Arbeit für die Proteinanalysen im Rahmen der Untersuchungen zur Bildung von Astaxanthin bestimmt.

Die Chlorophyllbestimmung von drei Replikaten erfolgte im Dunkeln und auf Eis. Hierfür wurden aus dem Überstand der gefällten Proteine 50 µl mit 950 µl 80 % Aceton vermischt (1:20), anschließend bei 4 °C und 13000 Upm für fünf Minuten pelletiert und der Überstand zur Chlorophyllbestimmung am Photometer (Spectral photometer V-650, Jasco) herangezogen. Die Messung erfolgte bei drei unterschiedlichen Wellenlängen (750 nm, 664 nm and 630 nm) mit 80 % Aceton als Referenz. Der Streuwert bei 750 nm wurde von den gemessenen Werten bei 664 und 630 nm abgezogen und unter Einbringung der Verdünnungsfaktoren der Chlorophyllgehalt nach Jeffrey and Humphry (1975) berechnet:

$$\text{Chl a [mg/l]} = 11.47 * E_{664} - 0.4 * E_{630}$$

3.3.5 Pigmentextraktion

Pigmente wurden im Rahmen der Komplementationsversuche zur funktionellen Charakterisierung der Phytoen-Synthase und der Zeaxanthin-Epoxidasen 1, 2, 3 von *P. tricornutum* aus *E. coli* bzw. *A. thaliana* isoliert. Außerdem wurden die Überexpressionslinien von *P. tricornutum* (#13, #14) im Vergleich zum WT auf ihren Carotinoidhaushalt und indirekt die Aktivität der Phytoen-Synthase (3.4) überprüft. Alle Proben wurden vor der Pigmentextraktion über Nacht gefriergetrocknet.

3.3.5.1. Extraktion der Pigmente für die Analyse der Komplementationsversuche bzw. des Carotinoidgehalts pro mg Trockengewicht

Die Carotinoidextraktion aus dem Stamm *E. coli* JM101 für die funktionelle Charakterisierung der Phytoen-Synthase erfolgte aus gefriergetrockneten Pellets, wie in Dambeck et al. (2012) beschrieben: Die gefriergetrockneten Pellets wurden in Methanol in einem 60 °C heißen

Wasserbad für 15 Minuten extrahiert. Anschließend wurde das Pigmentgemisch über einen Filter in den Scheidetrichter gegeben und die Zellbestandteile auf ihre Farbe (Pigmente) visuell überprüft. Bei Bedarf wurde das Pellet nochmals mit 5 ml 100 % Aceton im 60 °C warmen Wasserbad für drei Minuten inkubiert und ebenfalls in einen Scheidetrichter gegeben. Dann wurden die Extrakte mit 5 % Volumenanteil Wasser in Petroleum ausgeschüttelt. Die unteren Phasen wurde einer weiteren Extraktion mit 50 % Diethylether in Petroleumbenzin (Sdp. 40-60 °C) und NaCl-gesättigtem Wasser unterzogen. Alle ausgeschüttelten organischen Phasen, welche die Carotinoide enthielten wurden vereinigt, unter N₂ eingedampft und entweder bei -20 °C gelagert oder direkt zur Analyse an der HPLC herangezogen.

Die Carotinoideextraktion für die Bestimmung des Gesamtcarotinoidgehalts pro mg Trockengewicht aus den *P. tricornutum*-Kulturen (WT, #13, #14) und für die Bestimmung des Phytoengehalts erfolgte in Zusammenarbeit mit Andreas Lück (AK Sandmann, Goethe-Universität Frankfurt). Hierfür wurden 40 ml einer zehn Tage alten Zellkultur bei 4 °C und 5000 Upm im Dunkeln für fünf Minuten geerntet. Das Pellet wurde mit H₂O_{bidest.} in 1,5 ml Gefäße überführt und bei 13000 Upm und 4 °C für drei Minuten sedimentiert. Zur Extraktion wurden die Proben gefriergetrocknet, gewogen und ebenfalls nach Dambeck et al. (2012) fortgefahren.

Für die Carotinoideextraktion aus *A. thaliana* wurden einige Blätter der Pflanze zu einem feinen Puder zermahlen, gefriergetrocknet, gewogen und ebenfalls nach Dambeck et al. (2012) fortgefahren. Dem Methanol wurden zu Beginn der Extraktion 6 % KOH beigelegt.

3.3.5.2. Extraktion der Pigmente für die Analyse des Carotinoidgehalts pro Chl a-Molekül

Eine weitere Carotinoideextraktion der *P. tricornutum*-Kulturen (WT, #13, #14) erfolgte zur Bestimmung des Carotinoidgehalts pro Chl a. Hierfür wurden jeweils 2 ml Kultur bei 13000 Upm und 4 °C für drei Minuten sedimentiert. Das gefriergetrocknete Pellet wurde unter Zugabe des bereits in der RNA-Isolation (3.3.3.1) erwähnten Glasperlengemisches und 500 µl 90 % Tris (1M)-Methanol am TissueLyser aufgeschlossen. Abwechselnd wurde hierbei stets drei Minuten aufgeschlossen und drei Minuten bei -20 °C inkubiert bis das entstandene Pellet farblos war. Der Überstand wurde abgenommen, bei 4 °C und 13000 Upm für zehn Minuten zentrifugiert und 20 µl davon für die Analysen an der HPLC (3.8.4) verwendet.

3.4 Bestimmung der Synthesekapazität der Phytoen-Synthase

Die Synthesekapazität der Phytoen-Synthase wurde indirekt mit Hilfe von Norflurazon (NFZ) bestimmt. Durch die Hemmung der Phytoen-Desaturase mit NFZ kommt es zur Akkumulation von Phytoen. Dies kann als indirekter Nachweis für die Aktivität der Phytoen-Synthase herangezogen werden. Die Bestimmung erfolgte jeweils in Triplikaten. Hierfür wurden vergleichend pro *Phaeodactylum*-Linie (WT, #13, #14) 50 ml Ansätze unter Standardbedingungen kultiviert. Nach zehn Tagen wurde den Kulturen mit Beginn des Lichtzyklus 100 mM NFZ beigefügt, und diese für neun Stunden wieder bei Standardkulturbedingungen (Schwachlicht; low light LL) oder bei Starklicht (high light HL; $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) unter Schütteln inkubiert. Zur Probennahme wurden je 40 ml bei 4 °C und 5000 Upm für fünf Minuten zentrifugiert, danach wurden die Pellets mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{biest.}}$ in 1,5 ml Gefäße überführt und erneut bei 4 °C und 13000 Upm für drei Minuten pelletiert. Die Proben wurden unter N_2 schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Vor der Pigmentextraktion wurden die Proben (3.3.5) über Nacht gefriergetrocknet und anschließend zur Analyse an der HPLC (3.8.4) herangezogen. Als Referenz dienten Kulturproben die direkt nach Zugabe von NZF entnommen worden sind.

3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Arten der Polymerase-Kettenreaktionen zu verschiedenen Zwecken durchgeführt. Nachfolgende Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Arten der PCRs und deren Verwendungszweck. In Tabelle 15 sind die Zielsequenzen der verwendeten Gene mit ihren Identifikationsnummern aufgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCRs, die dabei verwendeten Primer mit ihren Sequenzen, die Amplifikatgrößen, und der Zweck der jeweiligen PCR sind im Anhang (Tabelle 33) zusammenfassend dargestellt.

Die Primer und die zugehörigen Schmelztemperaturen wurden mit Hilfe der Software CloneManager (Version 8 für Windows, Sci-Ed Software) hergestellt bzw. ermittelt. Hierfür wurden die entsprechenden Sequenzen aus den Datenbanken DOE Joint Genome Institute website (<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2>) oder aus (www.uniprot.org) verwendet.

Generell wurde, unabhängig von der Konzentration, wenn nicht anders erwähnt 1 μl der isolierten DNA in die PCR eingesetzt.

Die benötigte gDNA oder RNA, welche in cDNA umgewandelt wurde, zur Amplifikation der Konstrukte wurde stets direkt aus dem entsprechenden Organismus gewonnen. Bei den

Analysen zur Expression und zellulären Lokalisation des *zep1*-Konstruktes wurde die Sequenz für GFP (*gfp*) aus dem Vektor pRTd35S-GFP.Bgl II (Weber et al., 2008) amplifiziert. Die bei den Analysen zur Astaxanthinsynthese verwendete Sequenz *bkt* ist am C-Terminus trunziert (Zhong et al., 2011) und stammt von *C. reinhardtii*, welche aus dem Vektor ppQE30 (modifizierter pQE mit deletiertem Chloramphenicol-Gen; Krubasik, 2000) amplifiziert wurde (kloniert von Dr. J. Breitenbach, AK Sandmann, Goethe-Universität Frankfurt). Die Sequenz *CA1* für das Signal- bzw.- Transitpeptid der Chloroplastidären Anhydrase 1 (CA1) wurde mittels der Artikel von Tanaka et al. (2005) und Satoh et al. (2001) ausgesucht.

Tabelle 8: Übersicht der durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen und Verwendungszweck.

Art der PCR	Quer- verweis	Verwendungszweck/Kommentar
Reverse Transkription (rtPCR)	3.5.1	Gewinnung von <i>Pt</i> -cDNA
		Gewinnung <i>At</i> -cDNA
Klonierungs-PCR	3.5.2	Amplifikation der <i>psy</i> -cDNA-Sequenz
		Amplifikation der <i>zep</i> -Präsequenz aus <i>At</i>
		Amplifikation der <i>zep1, 2, 3</i> -cDNA-Sequenz
		Amplifikation von <i>gfp</i> für das <i>zep1_gfp</i> Konstrukt aus pRTd35S-GFP.Bgl II
		Amplifikation der <i>CA1</i> -Präsequenz aus cDNA von <i>Pt</i>
		Amplifikation von <i>bkt</i> aus ppQE30
Fusions-PCR	3.5.3	Fusion der <i>CA1</i> -Präsequenz mit <i>bkt</i>
Duplex -PCR	3.5.4	Expressionsanalyse von <i>zep1, 2, 3</i> in <i>Pt</i>
Genetischer Nachweis	3.5.5	<i>psy</i> in <i>Pt</i> -Transformanden
		<i>zep1, 2, 3</i> in <i>npq2</i> -Mutanten
		<i>CA1_bkt</i> -Konstrukt in <i>Pt</i> -Transformanden
Quantitative real time PCR (qrtPCR)	3.5.6	Expressionsanalyse von <i>psy</i> in Transformanden versus WT
		Expressionsanalyse von <i>zep1, 2, 3</i> in <i>npq2</i> -Mutanten

3.5.1 Reverse Transkription

Die aufgereinigte, präparierte RNA (3.3.3) wurde anschließend in cDNA umgeschrieben. Generell wurde dabei 1 µg DNase-verdaute (3.3.3.2) RNA mittels Oligo-dT₁₈-Primer Primern in cDNA umgeschrieben.

Sollte die cDNA im weiteren Verlauf funktionell exprimiert (Phytoen-Synthase; Zeaxanthin-Epoxidase 1, 2, 3) werden, so wurde die „Reverse Transcriptase RevertAid™ Premium“ (Fermentas, #EP0723) eingesetzt und das Protokoll entsprechend den Herstellerangaben des Kits durchgeführt. Für alle anderen Analysen (diurnale Expression der *zep1*, 2, 3; qrtPCR von *zep1*-, 2-, 3-Transformanden und *psy*-Transformanden (#13, #14); Nachweis des *CA1_bkt_gfp*-Konstruktes auf RNA-Ebene) wurde die RevertAid™ Reverse Transcriptase der Firma Thermo Fermentas (#EP0441) verwendet und die cDNA nach Empfehlungen des Herstellers synthetisiert.

3.5.2 PCR zur Klonierung

Soll die Expression eines Genes der funktionellen Charakterisierung auf Proteinebene dienen, so ist es sinnvoll hier mit einer sogenannten „Proofreading-Polymerase“ zu arbeiten. Solche Polymerasen verringern die Fehlerquote in der Basenabfolge während der PCR und damit auch die Fehlfunktions- oder -faltung des Proteins. Hierfür wurde mit der „Phusion Polymerase“ (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs, #F-530S) entsprechend den Angaben des Herstellers gearbeitet. Zu Beginn jeder PCR erfolgte eine initiale Denaturierung bei 98 °C für 30 Sekunden sowie eine finale Elongation bei 72 °C für zehn Minuten.

Phytoen-Synthase, Zeaxanthin-Epoxidasen 1, 2, 3 und β-Carotin-Ketolase

Für die Analysen der funktionellen Charakterisierungen der Phytoen-Synthase und der Zeaxanthin-Epoxidasen 1, 2, 3 wurde mit cDNA (3.5.1) gearbeitet. Für die verwendeten Primer und Amplifikatlängen siehe Tabelle 33 im Anhang. Die synthetisierte cDNA der Phytoen-Synthase wurde letztlich in den Expressions- bzw. Transformationsvektor pUC8.1 bzw. pPha_NR eingebracht.

Die cDNAs der Zeaxanthin-Epoxidasen 1, 2, 3 wurden letztlich zusammen mit dem Transitpeptid der Zeaxanthin-Epoxidase von *At* und im Falle des zusätzlichen *zep1_gfp*-Konstruktes zusammen mit der Sequenz für GFP in den Transformationsvektor pGreen eingebracht. Die Sequenz von GFP (Tabelle 10) wurde als einziges zu sequenzierendes Fragment mit der taq-Polymerase (EconoTaq® PLUS GREEN & EconoTaq PLUS 2X Master Mixe,

Lucigen, 30035-1 nach Angaben des Herstellers aus dem Vektor pRTd35S-GFP.Bgl II (Weber et al., 2008) amplifiziert.

Die *bkt*-Sequenz wurde aus dem Vektor ppQE30 gewonnen, an die Präsequenz *CA1* fusioniert und anschließend in die Vektoren pPha_NR und pPhaT_eGFP eingebracht.

Tabelle 9: PCR-Programme für die Amplifikation der beschriebenen cDNAs mit der Phusion-Polymerase.

Name des Amplifikats	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sekunden]	Zyklen
<i>psy</i>	Denaturierung	98	10	30
	Annealing	50	15	
	Elongation	72	73	
<i>At_TP_zep</i>	Denaturierung	98	10	30
	Annealing	65-59	20	
	Elongation	72	10	
<i>zep1,2,3/ zep1_gfp</i>	Denaturierung	98	10	30
	Annealing	65-59	20	
	Elongation	72	80	
<i>CA1 und bkt</i>	Denaturierung	98	10	28
	Annealing	63-57	20	
	Elongation	72	15	

Tabelle 10: PCR-Programm zur Amplifikation von GFP.

Initiale Denaturierung: 94 °C für drei Minuten, finale Elongation: 72 °C für zehn Minuten.

Name des Amplifikats	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sekunden]	Zyklen
<i>gfp</i> für <i>zep1</i>	Denaturierung	94	30	30
	Annealing	62-55	30	
	Elongation	72	30	

3.5.3 Fusions-PCR

Die *CA1*-Sequenz für das Signal- und Transitpeptid der Carbo-Anhydrase1 (*CA1*) aus *P. tricornutum* wurde über Fusions-PCR an das Gen *bkt* der β -Carotin-Ketolase aus

C. reinhardtii fusioniert, um schließlich in die entsprechenden Transformationsvektoren pPha_NR und pPhaT_eGFP eingebracht zu werden. Die Fusion erfolgte mit Hilfe der bereits erwähnten Phusion-Polymerase (3.5.2), um es anschließend zur Sequenzierung zu schicken.

Tabelle 11: PCR-Programm für die Fusion von SP+TP_CA1 an *bkt*.

Name des Amplifikats	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sekunden]	Zyklen
CA1_bkt	Denaturierung	98	10	28
	Annealing	63-57	20	
	Elongation	72	70	

3.5.4 Semiquantitative Duplex-PCR

Die Duplex-PCR wurde zur Analyse der diurnalen Expression der *zep1, 2, 3* im WT von *P. tricornutum* auf RNA-Ebene durchgeführt. Hierbei wurde 1 µl cDNA eingesetzt. Als Haushaltsgen diente das *Histon*-Gen *h4* (# 34971). Die Menge eingesetzter cDNA wurde an das Signal von *Histon* angeglichen. Die PCR erfolgte mit der bereits erwähnten taq-Polymerase EconoTaq entsprechend den Angaben des Herstellers. Für Primer siehe Tabelle 33 im Anhang.

Tabelle 12: PCR-Programme für die Amplifikation der gesuchten Fragmente innerhalb der Duplex PCR.

Zweck de PCR	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sekunden]	Zyklen
Diurnale Expression der <i>zep1,2,3</i>	Denaturierung	94	30	27
	Annealing	61-57	30	
	Elongation	72	25	

3.5.5 PCR für den genetischen Nachweis von Transformationen

Die PCR zum Nachweis transformierter Gene ins Genom von *P. tricornutum* erfolgte mit der bereits erwähnten taq-Polymerase EconoTaq. Für den Nachweis wurde im Falle der Transformanden von *P. tricornutum* jeweils ein Primer im transformierten Konstrukt und ein Primer im Transformationsvektor (pPhaN_f/r oder pPhaT_f/r) gewählt. Für die Transformanden von *A. thaliana* wurden genspezifische Primer verwendet. Für die verwendeten Primer siehe Tabelle 33 im Anhang (8.2).

Zur Kontrolle positiver Klone nach einer Transformation von *E. coli*- oder *A. tumefaciens*-Zellen wurde eine sogenannte Kolonie-PCR durchgeführt. Hierbei wurde für das jeweilige Konstrukt

genspezifische Forward- und Reverse-Primer verwendet. Neben 10 µl Master Mix der bereits erwähnten EconoTaq-Polymerase wurden je 1 µl Primer hinzugegeben und mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Anschließend wurde eine Kolonie gepickt, diese kurz auf einer neuen Platte des entsprechenden Mediums und mit dem benötigten Antibiotika gedippt und der Rest der Kolonie mit einem PCR-Ansatz (20 µl) vermischt. Die Kolonien auf der Platte wurden bei 37 °C über Nacht kultiviert, während die PCR auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und die Signale mit Hilfe von EtBr detektiert wurden (3.6.3). Am nächsten Tag wurden wenn möglich drei der als positiv selektierten Klone von der Platte in Flüssigkultur überimpft (3.2.3). Zur weiteren Kontrolle wurden die aus den angezogenen Kolonien isolierten Plasmide (3.3.2) mit Hilfe von spezifischen Restriktionsenzymen (Tabelle 17) verdaut. Bei Bestätigung des gewünschten Ergebnisses wurde mit diesen Plasmiden bzw. Kolonien weiter gearbeitet. Die Annealing-Temperaturen der Primer und die Elongationszeiten wurden an die jeweiligen für das Amplifikat spezifischen Bedingungen angepasst.

Tabelle 13: PCR-Programme für den Nachweis des Transgens in die *P. tricornutum*- bzw. *A. thaliana*-Linien.

Zweck de PCR	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Nachweis des zusätzlich eingebrachten <i>psy</i> -Konstruktes in <i>Pt</i>	Denaturierung	94	30	30
	Annealing	60-54	30	
	Elongation	72	120	
Nachweis der eingebrachten <i>zep-1,2,3</i> -Konstrukte in <i>npq2</i>	Denaturierung	94	30	30
	Annealing	62-57	30	
	Elongation	72	120	
Nachweis des eingebrachten <i>CA1_bkt</i> -Konstruktes in <i>Pt</i>	Denaturierung	94	30	33
	Annealing	63-57	30	
	Elongation	72	120	

3.5.6 Quantitative real time

Die quantitative real time PCR wurde zur Expressionsanalyse auf Transkript-Ebene für die Phytoen-Synthese mit den erstellten *psy*-Transformanden #13 und #14 im Vergleich zum WT

von *P. tricornutum* bzw. für die Analyse der generierten *zep1*-, *2*-, *3*-Tranformanten im Vergleich zur *nqq2*-Mutante und dem WT von *A. thaliana* durchgeführt. Verwendet wurde hierfür entsprechend den Angaben des Herstellers der Master Mix SensiFAST™ SYBR Lo-ROX (BIOLINE, BIO-94020). Im Falle der Analysen für *P. tricornutum* wurde jeweils 1 µl cDNA eingesetzt; für die Analysen mit *At* wurden 1:10-Verdünnungen aus der cDNA hergestellt und davon jeweils 1 µl eingesetzt. Für die noRT-Kontrollen wurde die entsprechende Menge an DNase-verdauter RNA verwendet. Die Effizienzen der verwendeten Primer wurden im Vorfeld über eine Verdünnungsreihe (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) bestimmt. Als Referenzgen diente im Falle der Phytoen-Synthase das *Histon*-Gen *h4*. Im Falle der in *A. thaliana* eingebrachten Zeaxanthin-Epoxidasen 1, 2, 3 von *P. tricornutum* wurde auf das Gen der Zeaxanthin-Epoxidase von *A. thaliana* (#AT5G67030) normiert. Zu Beginn jeder PCR fand eine initiale Denaturierung bei 95 C für zwei Minuten statt. Um potentielle Nebenprodukte bzw. Artefakte zu identifizieren, wurden außerdem nach dem letzten Zyklus die Schmelzkurven der Amplifikate bestimmt. Zur Auswertung wurde die Software MxPro QPCR verwendet.

Tabelle 14: PCR-Programme für die Bestimmung der Transkript-Ebene von *P. tricornutum*- bzw. *A. thaliana*-Linien.

Zweck der PCR	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sekunden]	Zyklen
Expression der eingebrachten <i>psy</i> -Konstrukte in <i>Pt</i>	Denaturierung	95	5	40
	Annealing	57	10	
	Elongation	72	15	
Expression der <i>zep</i> - <i>1,2,3</i> - Konstrukte in <i>nqq2</i> -Mutanten	Denaturierung	95	5	40
	Annealing	57	20	
	Elongation	72	25	

3.6 Klonierungstechniken

Folgende Tabellen geben einen Überblick über die verwendeten putativen Gensequenzen, Plasmide bzw. Expressions- und Transformationsvektoren. Dargestellt sind jeweils nur die

leeren Vektoren, in welche die über PCR (3.5) oder Restriktionsverdau (3.6.1) gewonnenen Fragmente ligiert (3.6.2) wurden.

Tabelle 15: Namen der zur Klonierung verwendeten putativen Enzyme (Gene) mit den zugehörigen Identifikationsnummern (ID).

Enzym (Gen)	Protein ID	Organismus
Phytoen-Synthase (<i>psy</i>)	#Pt56881	<i>P. tricornutum</i>
Zeaxanthi -Epoxidase 1 (<i>zep1</i>)	#Pt45845	<i>P. tricornutum</i>
Zeaxanthin -Epoxidase 2 (<i>zep2</i>)	#Pt56488	<i>P. tricornutum</i>
Zeaxanthin-Epoxidase 3 (<i>zep3</i>)	#Pt56792	<i>P. tricornutum</i>
β -Carotin-Ketolase (<i>bkt</i>)	#CrAEA35045.1	<i>C. reinhardtii</i>

Tabelle 16: Verwendete Plasmide ohne eingebrachte Fragmente.

Plasmid	Zweck	Hinweis
pJet1.2	Sequenziervektor	Thermo Scientific
pUC8.1	Expression in <i>E. coli</i>	Vieira und Messing (1982)
pPha_NR	Transformation von <i>Pt</i>	Hempel et al. (2009)
pPhaT_eGFP	Transformation von <i>Pt</i>	Zaslavskaja et al. (2000)
pGreen	Transformation von <i>At</i>	Hellens et al. (2000)
pRTd35S-GFP.Bgl II	Gewinnung von <i>gfp</i> für pGreen	Weber et al. (2008)
ppQE30	Gewinnung der <i>bkt</i> Sequenz	Krubasik (2000)

Die genauen Vektorkarten der zur Transformation verwendeten Plasmide von *P. tricornutum* und den *npq2*-Mutanten (pPha_NR, pPhaT_GFP, pGreen) sind dem Anhang (8.1) zu entnehmen.

3.6.1 Restriktion

Restriktionsverdau wurden in dieser Arbeit entweder dazu verwendet gewünschte Fragmente aus bestimmten Plasmiden zu gewinnen, Plasmide für Ligationsansätze zu linearisieren oder um isolierte Plasmide auf eine erfolgreiche Integration des gewünschten Fragmentes zu überprüfen. Die Plasmide wurden hierfür mit den gewünschten Restriktionsenzymen in einem 20 μ l Ansatz (FastDigest® Restriktionsenzymen der Firma Thermo Fermentas, Tabelle 17) entgegen Herstellerangaben für 60 Minuten bei 37 °C verdaut. Der Verdau wurde anschließend auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und überprüft.

Tabelle 17: verwendete Restriktionsenzyme.

Zielsequenz (Gen)	Fragment	Restriktions- endonuklease	Größe des Fragments [bp]
Phytoen-Synthase (<i>psy</i>)	<i>Pt</i> _Phytoen-Synthase	EcoRI; HindIII	1525
Zeaxanthin -Epoxidasen (<i>zep</i>)	Transitpeptid <i>At</i> _ Zeaxanthin-Epoxidase	XbaI; BamHI	241
	<i>Pt</i> _ Zeaxanthin-Epoxidase_1	SmaI; SacI	1521
	<i>Pt</i> _ Zeaxanthin-Epoxidase_2	SmaI; SacI	1707
	<i>Pt</i> _ Zeaxanthin-Epoxidase_3	BamHI; SmaI	1584
	<i>Pt</i> _ Zeaxanthin-Epoxidase_1 für GFP	SmaI; SacI	1518
	Green-Fluorescence-Protein	SacI; EcoRI	725
β -Carotin-Ketolase (<i>bkt</i>)	Signal-Transitpeptid: <i>Pt</i> _Chloroplastidäre-Carbo- Anhydrase I	SacI	Zusammen mit HindIII bzw Sall
	<i>Cr</i> _ β -Carotin-Ketolase	HindIII	1133
	<i>Cr</i> _ β -Carotin-Ketolase für eGFP	Sall	1126

3.6.2 Ligationsansätze

Ligiert wurden in dieser Arbeit entweder zur Sequenzierung in den Vektor pJet1.2 oder in einen gewünschten Transformations- bzw. Expressionsvektor.

Die aus der PCR amplifizierten und aufgereinigten (3.6.3; 3.6.4) Fragmente wurden nach Herstellerangaben in den Vektor pJet1.2. BLUNT (Firma Thermo Fermentas, #K1231) eingebracht.

Für alle anderen Ligationsansätze in einen Transformations- oder Expressionsvektor wurde etwa dreimal soviel des einzubringenden Fragments wie Vektor verwendet. Der Ansatz wurde mit 2 μ l Ligationspuffer (10x T4 DNA Ligase Buffer (#B69)) und 1 μ l T4 Ligase (Fa. Thermo Fermentas, #EL0014) auf 20 μ l mit H₂O_{bidest.} aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach einer Ligation wurden kompetente *E. coli* oder Agrobakterien-Zellen mit dem entsprechenden Vektor (Tabelle 18) transformiert (3.7.1; 3.7.2.).

In folgender Tabelle sind die für die Versuche verwendeten fertigen Vektoren mit dem vollständig inserierten Fragment aufgeführt.

Tabelle 18: Ligationsansätze.

Vektor	ligiertes Fragment/Konstrukt	Zweck
pUC8.1	<i>psy</i>	Funktionelle Charakterisierung in <i>E. coli</i> JM101
pGreen	TP_ <i>Atzep_zep1</i> , 2 oder 3	Funktionelle Charakterisierung in <i>npq2</i>
pGreen	<i>zep1_gfp</i>	zelluläre Lokalisation der Konstrukte
pPha_NR	<i>psy</i>	Überexpression der Phytoen-Synthase
pPha_NR	<i>CA1_bkt</i>	Heterologe Expression der β -Carotin-Ketolase
pPhaT_eGFP	<i>CA1_bkt</i>	Nachweis der Expression via Immunodetektion

3.6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um die gewonnenen Produkte nach der PCR oder nach einem Restriktionsverdau aufzutrennen wurde ein 1 oder 1,5 %-Agarosegel verwendet. Die Agarose wurde hierbei in einfachem TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer; pH 7,5) gelöst und aufgeköcht (Tabelle 19). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Größe des Gels bei 75-125 V und 200-400 mA ebenso in einfachem TAE-Puffer. Als Größenstandard wurde der Marker „O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (Fermentas, #SM1173) verwendet.

Nach der Auftrennung erfolgte die Färbung der DNA in einem Ethidiumbromidbad (0,1 μ l/ml) für etwa 20 Minuten. Anschließend wurden die Produkte unter UV-Licht detektiert und bei Bedarf aus dem Gel eluiert (3.6.4).

Tabelle 19: TAE-Puffer.

Substanzen	Konzentration
Natriumacetat	200 mM
EDTA	10 mM
Tris	400 mM

3.6.4 DNA-Gelelution

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte oder durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente wurden stets nach dem Protokoll des Kits „GeneJet™ Gel Extraction Kit“ (Fermentas, #K0692) aus dem Gel aufgereinigt.

3.6.5 Sequenzierung

Fragmente, die der Expression bestimmter Gene dienen sollten, wurden vorab sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte, wenn nicht anders erwähnt aus dem Vektor pJet1.2. Hierfür wurden die in dem Kit pJet1.2. CloneJET PCR Cloning (Fa. Thermo Fermentas, #K1231) vorliegenden Sequenzier-Primer verwendet. Die Sequenzierung erfolgte über die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland). Die erhaltenen Sequenzen wurde mit den Sequenzen der Online-Datenbank <http://expasy.org> oder <http://genome.jgi-psf.org/pages/search-for-genes.jsf?organism=Phatr2> abgeglichen.

3.7 Transformationstechniken

Während der Arbeit wurden verschiedene Transformationstechniken zur Klonierung verschiedener Kulturen verwendet. Zur Selektion sowohl in Flüssigmedium als auch zur Selektion auf Platten und auf Erde, wurden hierfür in Abhängigkeit der verwendeten Plasmide spezifische Antibiotika verwendet.

Tabelle 20: Zur spezifischen Selektion verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Arbeitskonzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Stammlösung [mg/ml]	Stamm/Plasmid
Ampicilin	100	100 in H_2O	<i>E. coli</i> XL1/pJet1.2; pUC8.1; pPha-NR, pPhaT_GFP
Tetracyclin	12,5	12,5 in H_2O	<i>E. coli</i> XL1, <i>A. tumefaciens</i> / pGreen
Gentamycin	25	25 in Ethanol	
Neomycin/Kanamycin	50	50 in H_2O	
Zeozin	75	75 in H_2O	<i>P. tricornutum</i> / pPha-NR, pPhaT_eGFP
Chloramphenicol	34	34 in H_2O	<i>E. coli</i> JM101/ pACCAR25 Δ crtB

3.7.1 Für *E. coli*

Die Amplifikation von Plasmiden erfolgte über die Transformation mit chemokompetenten *E. coli* XL1-Blue Zellen. Die Komplementation des Carotinoidbiosyntheseweges erfolgte über eine Transformation von *E. coli* JM101-Zellen (Dambeck et al., 2012), welche wie in 3.2.3

beschrieben bereits mit einem Plasmid (pACCAR25 Δ crtB oder pACCAR25 Δ crtX) ausgestattet sind, jeweils unter Verwendung mit dem entsprechenden Antibiotikum nach Sambrook et al. (1989). Die auf Eis aufgetauten Zellen wurden mit 100 μ l der kompetenten Zellen und 20 μ l des entsprechenden Ligationsansatzes oder 100 ng des entsprechenden Vektors (3.6.2) vermischt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert ehe die Zellen einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden unterzogen wurden. Anschließend wurde den Zellen 1 ml LB-Medium zugegeben, welche dann bei 37 °C erneut für 30 Minuten unter schütteln inkubiert wurden. Hiernach wurden die Zellen bei 5000 Upm und RT für fünf Minuten sedimentiert und in 75 μ l LB-Medium suspendiert ehe sie auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen wurden. Die Selektion und Amplifikation erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.7.2 Für *A. tumefaciens*

Chemisch kompetente *A. tumefaciens* (GV3101) Zellen (Berberich et al., 2008), welche bereits die Plasmide pSoup und pMP90 (Hellens et al., 2000) tragen wurden, modifiziert nach Berberich et al. (2008), mit den präparierten pGreen Vektoren bei 37 °C für fünf Minuten inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 ml YEP-Medium und eine 2-4 stündige Inkubationsphase bei 28 °C. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 g für zehn Minuten sedimentiert, die Zellen in 100 μ l YEP-Medium aufgenommen und auf YEP-Platten (mit 50 μ g/ml Kanamycin, 25 μ g/ml Gentamycin und 12,5 μ g/ml Tetracyclin) ausplattiert. Es folgte eine Inkubtion für 2-3 Tage bei 28 °C unter Lichtausschluss. Für die Transformation der *A. thaliana*-Linien wurde je Konstrukt eine über Kolonie-PCR positiv getestete Kultur in 50 ml YEP-Medium zur Blütezeit kultiviert (3.7.4).

3.7.3 Für *P. tricornutum*

Die Transformation der Algenzellen von WT *P. tricornutum* Utex 646 mit den fertiggestellten pPha_{NR}- und pPhaT_{eGFP}-Vektoren (Tabelle 18) erfolgte während der exponentiellen Wachstumsphase, modifiziert nach Apt et al. (1996) und Zaslavskaja et al. (2000). Hierfür wurden etwa 10⁹ Algenzellen geerntet und in 50 ml Gefäßen bei 3000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 1 ml ASP-Medium (Tabelle 2) vereinigt. Von dieser Zellsuspension wurden etwa 10⁸ Zellen (100 μ l) mit einem Durchmesser von etwa 3 cm pro ASP-Platte mittig aufgetragen und die Platten über Nacht bei 18 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die DNA an die Wolfram-Partikel gebunden, die Kulturen transformiert und für einen weiteren Tag unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Mit jeweils 500 μ l ASP-

Medium wurden dann die Zellen von den Platten aufgenommen und auf zwei weitere ASP-Platten mit Zeozin zur Selektion ausgestrichen und unter Standardkulturbedingungen (3.1) selektiert. Nach etwa 3-4 Wochen konnten die ersten Transformanten festgestellt werden. Diese wurden gepickt und in Flüssigkultur überimpft. Hierfür wurden 20 ml ASP-Medium mit Zeozin (75 µg/ml) versetzt. Die transgenen Diatomeen wurden zur weiteren Analyse herangezogen.

3.7.4 Für *A. thaliana*

Innerhalb des Komplementationsversuches mit den *npq2*-Mutanten und den Genen *zep1*, *2*, *3* von *P. tricornutum* wurden für die Inokulation der *npq2*-Mutanten die transformierten Agrobakterien zunächst in 50 ml YEP-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Neomycin, Gentamycin, Tetracyclin, Tabelle 20) über Nacht bei 28 °C im Dunkeln bei 180 Upm kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 5000 g und RT für zehn Minuten sedimentiert und das Sediment in 50 ml „Dipp-Puffer“ (Tabelle 21) suspendiert.

Für die Inokulation wurden die geschlossenen Blüten der gewünschten Pflanzen mit der Suspension behandelt. Die Inkubation der anschließend in Frischhaltefolie eingepackten Pflanzen erfolgte über Nacht im Dunkeln (modifiziert nach Clough und Bent, 1998). Am nächsten Tag wurden die Pflanzen unter Anzuchtsbedingungen wieder belichtet. Nach etwa einer Woche wurde der Vorgang zur Inokulation wiederholt. Die Samen der transformierten, getrockneten Pflanzen wurden geerntet und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die nächste Generation wurde mit einer 300 µM Glufosinatamonium-Lösung (BASTA) selektioniert.

Tabelle 21: Dipp-Puffer.

Substanzen	Konzentration
Saccharose	5 %
Benzylaminopurin	0,04 µM
Tween 20 (v/v)	0,01 %
MS-Salz	2,2 mg/ml

3.7.4.1. Transiente Transformation von *A. thaliana*-Protoplasten

Um festzustellen, ob die hergestellten Konstrukte der Zeaxanthin-Epoxidasen exprimiert und ob diese in den Chloroplasten importiert werden können, wurde ein Konstrukt in pGreen mit der Sequenz für GFP markiert (*zep1_gfp*). Dieses Konstrukt wurde zur transienten Expression in präparierte *A. thaliana* Protoplasten eingebracht (hergestellt von D. Bublak, AK Schleiff, Goethe-Universität Frankfurt; Machettira et al., 2011; Sommer et al., 2011), welche unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (3.8.6) analysiert wurden. Als Positivkontrolle diente die mit GFP

markierte kleine Untereinheit der RubisCO von *N. plumbaginifolium* (pSSU_*N.p.*), welche von B. Tillmann AK Schleiff, Goethe-Universität Frankfurt hergestellt wurde.

3.8 Analysetechniken

3.8.1 Densitometrische Bestimmung mit Image J für die diurnale Expression

Die Signale der Duplex-PCR (3.5.4), welche zur Analyse der diurnalen Expression der *zep1*, *2*, *3* auf Transkript-Ebene dienten, wurde mit Hilfe der Software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) ausgewertet. Hierfür wurden die Flächen und die Grauwerte einer Bande und damit das relative Signal berechnet – Histon wurde dabei auf 1 gesetzt und die Signale der zu untersuchenden Gene so miteinander verglichen.

3.8.2 Proteinanalytik

Um den Erfolg der Expression des heterolog eingebrachten *CA1_bkt*-Konstruktes auf Protein-Ebene zu überprüfen, wurde das Konstrukt mit der Sequenz für GFP markiert und mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers die Expression getestet. Die Proben wurden, wie in 3.3.4 beschrieben vorbereitet.

3.8.2.1. SDS-PAGE

In dieser Arbeit wurde zur Auftrennung der Proteine ein diskontinuierliches Gelsystem nach Schägger und Jagow (1987) verwendet. Die Proteine wurden über ein 4 %-Sammel- und ein 10 %-Trenngel (Tabelle 22), welche in eine Biometra-Gelapparatur eingespannt und mit einfachem Kathoden- bzw. Anodenpuffer (Tabelle 24) befüllt war, aufgetrennt. Die Spannung wurde für das Sammel-bzw. Trenngel auf 15 bzw. 30 mA eingestellt.

Die Proteinmengen wurden nach der Chlorophyllbestimmung (3.3.4.1) zuerst mit einem Gesamtchlorophyllgehalt von 5 µg aufgetragen. Im weiteren Verlauf wurde diese Menge auf Grund des starken Signals für die Positivkontrolle um $\frac{1}{4}$ reduziert, da sich ein Gesamtchlorophyllgehalt von 5 µg als zu üppig erwies. Als Größenstandard wurde ein gefärbter Proteinstandard (Fermentas SM#0441) verwendet. Dabei wurden die vom Hersteller angegebenen Proteingrößen von Dr. M. Schmidt für das von uns verwendete Gelsystem durch ungefärbte Referenzproteine geeicht.

Tabelle 22: SDS-Gelzusammensetzung.

Substanzen	Trenngel (10 %)	Sammelgel (4 %)
Harnstoff	5,4 g	-
3x-Gelpuffer	5 ml	2,5 ml
Rotiph. 40	3,85 ml	0,77 ml
Rotiph. Gel B	0,34 ml	56,25 µl
Mit H ₂ O auffüllen auf:	15 ml	7,5 ml
10 % APS	45 µl	75 µl
TEMED	4,5 µl	7,5 µl

Tabelle 23: 3x-Gelpuffer; pH 8,45.

Substanzen	für 200 ml
Tris 3M	72,68 g
SDS 0,3 % (w/v)	1,2 g

Tabelle 24: Kathoden- und Anodenpuffer für SDS-PAGE; pH 8,25 bzw. 8,9.

10x-Kathodenpuffer		10x-Anodenpuffer	
Substanzen	Menge	Substanzen	Menge
1 M Tris	121,1 g/l	1M Tris	24,2 g/l
1 M Tricine	179,1 g/l		
1 % SDS	10 g/l		

3.8.2.2. Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte direkt im Anschluss der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran (Roth, Porengröße 0,45 µm). Diese wurde hierfür durch einminütige Inkubation in 100 % Methanol aktiviert und anschließend zwei Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie für eine Minute in Anodenpuffer 1 gelegt wurde. Zudem wurden zwei Lagen Filterpapier in Anodenpuffer 1, ein Filterpapier in Anodenpuffer 2 und sowohl das Gel als auch drei Lagen Filterpapier für mindestens fünf Minuten in Kathodenpuffer inkubiert- Der Transfer von der Kathode zur Anode erfolgte für eine Stunde bei 1,1 mA/cm² Gel wie folgt: dreimal Filterpapier in Kathodenpuffer, Gel der SDS-Page, PVDF-Membran, einmal Filterpapier in Anodenpuffer 2, zweimal Filterpapier in Anodenpuffer 1.

Tabelle 25: Anodenpuffer 1 und 2 für Western Blot; pH 10,4 bzw. 10,2.

Anodenpuffer 1		Anodenpuffer 2	
Substanzen	Menge	Substanzen	Menge
Tris (0,3M)	36,3 g/l	Tris (25 mM)	3,03 g/l
Methanol 10 % (v/v)	100 ml/l	Methanol 10 % (v/v)	100 ml/l

Tabelle 26: Kathodenpuffer für Western Blot; pH 9,0.

Substanzen	Menge
Tris (25mM)	3,03 g/l
Glycin (40mM)	3,00 g/l
Methanol 10 % (v/v)	100 ml/l

3.8.2.3. Immunologischer Nachweis

Der immunologische Nachweis erfolgte mit Hilfe des polyklonalen GFP-Antikörpers (gewonnen aus immunisierten Kaninchen (Rabbit)) der Firma Rockland, # 600-401-215. Hierfür wurde die Membran eine Stunde oder über Nacht in Blockierlösung gegeben und anschließend für eine Stunde mit dem Erst-Antikörper (α -GFP; 1:1000) in 5 % Milchpulver in 1x-PBS-Puffer (Tabelle 27) inkubiert. Die Membran wurde nun mit 1x-PBS-Puffer für dreimal zehn Minuten gewaschen bevor die Inkubation für wiederum eine Stunde mit dem Zweit-Antikörper (polyklonal, gewonnen aus immunisierten Ziegen: Goat- α -Rabbit; 1:10000; Calbiochem) in 5 % Milchpulver in 1x-PBS-Puffer erfolgte. Nachdem die Membran final für dreimal zehn Minuten gewaschen wurde, erfolgte die einminütige Inkubation in der „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL)-Lösung (Tabelle 28). Zur Detektion wurde die Reaktion für 5-10 Sekunden auf einem Röntgenfilm (AGFA HealthCare) festgehalten und anschließend nacheinander in Entwickler (Roentogen, Tetenal) und Fixierer (Adefofix, Adefo) nach Herstellerangaben fixiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Inkubation in 2 % Essigsäure.

Tabelle 27: 10x-PBS-Puffer.

Substanzen	Konzentration	Menge
NaCl	1,37 M	80 g/l
KCl	27 mM	2 g/l
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	43 mM	7,65 g/l
KH ₂ PO ₄	14 mM	1,9 g/l

Blockierlösung: 5 % Milchpulver in PBS-Puffer

Tabelle 28: ECL-Detektionsreagenz.

Lösung	Substanzen	Aus den Lösungen zu entnehmen sind und auf 20 ml mit H ₂ O auffüllen:
A	Luminol in DMSO (C ₂ H ₆ SO) 250 mM	200 μ l
B	p-Coumarsäure in DMSO (C ₂ H ₆ SO) 90 mM	89 μ l
C	Tris_HCl; pH 8,5 1M	2 ml
D	30 % ige H ₂ O ₂ Lösung	6,5 μ l

3.8.3 Ermittlung der Proteinstrukturmodelle

Die Tertiär- und Quartärstrukturen der putativen Zep-Proteine von *P. tricornutum* und des Zep-Proteins von *A. thaliana* wurden mit Hilfe „SWISS-MODEL workspace“ (Biasini et al., 2014; Arnold et al., 2006) ermittelt. Dabei wurde mit dem Programm „SWISS-MODEL workspace“ ein Aminosäureblast nach Sequenzen-Homologen Proteinen (Homologieanalyse) durchgeführt

und zur Ermittlung der hypothetischen Proteinstrukturmodelle der Zeaxanthin-Epoxidase jeweils der beste „hit“ (Treffer) ausgewählt. So wurden Röntgenstrukturen bereits bekannter Proteine zur Vorhersage der Proteinstrukturen herangezogen: Mit einer Übereinstimmung von 55 bzw. 62 % für AtZep bzw. Zep1 von *A. thaliana* und *P. tricornutum* wurde die Harnstoff-Oxidase von *Kelbsiella pneumoniae* (Hicks et al., 2013) verwendet. Mit einer Übereinstimmung von 63 % für Zep2 diente die 4-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (Wang et al., 2002) und mit einer Übereinstimmung von 69 % für Zep3 die 3-Hydroxybenzoat-6-Hydroxylase von *Rhodococcus jostii* (MonTERSINO et al., 2013). Sowohl Oxidasen, Hydroxylasen als auch Monooxygenasen werden zu der Gruppe der Oxidoreduktasen gezählt, welche mit entsprechenden Coenzymen arbeiten.

Anhand der Homologieanalysen wurden die Sequenzen der Zeaxanthin-Epoxidasen von dem Programm „SWISS-MODEL workspace“ zur Modellierung C- und N-Terminal trunkiert: verwendete Aminosäuren (As) vom gesamten Protein (insg.) sind bei AtZep: As 81-471 (667); PtZep1: As 107-530 (insg. As 565); PtZep2: AA 84-535 (insg. As 604); PtZep3: AA 67-491 (insg. As 557).

3.8.4 High-Performance-Liquid-Chromatographie

Die Auswirkungen der integrierten cDNA bei den Komplementationsversuchen (*psy*, *zep1*, *2*, *3*) und bei der Herstellung der *P. tricornutum*-Linien mit den Sequenzen von *psy* und *bkt* wurden auf Pigment-Ebene untersucht. Zur Bestimmung des Carotinoidgehalts wurden die Pigmente isoliert (3.3.5) und über eine HPLC analysiert.

3.8.4.1. Analyse der Carotinoide pro mg Trockengewicht

Sowohl für die funktionelle Charakterisierung der Phytoen-Synthase, die Analyse des Carotinoidgehalts der *P. tricornutum*-Linien und die indirekte Bestimmung der Enzymaktivität der Phytoen-Synthase als auch für die *A. thaliana*-Linien erfolgte die HPLC-Analyse des Gesamtcarotinoideextraktes pro mg Trockengewicht wie in Dambeck et al. (2012) beschrieben. Die extrahierten Pigmente wurden entsprechend in Aceton suspendiert und 20 µl in die Apparatur zur Analyse eingespritzt. Die Auftrennung der Carotinoide erfolgte mit einer 25 cm C18-Nucleosil-Säule (3 µm, Macherey & Nagel) mit Hilfe eines Laufmittelgemisches aus Acetonitril/Methanol/2-Propanol (85:10:5, v/v/v). Bei beiden Analysen wurde eine Flussgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute verwendet. Zur besseren Auftrennung wurde die Säule bei den Proben aus *E. coli* *A. thaliana*-Linien bei 32 °C und bei den Proben von *P. tricornutum* bei 20 °C gehalten. Die Absorption der einzelnen Pigmente wurden mit Hilfe

eines Dioden Array Detektors (Kontron) bei 440 nm aufgenommen und mit der Software Clarity Lite (DataApex) ausgewertet.

In weiteren Analysen fand die Trennung und Quantifizierung von Antheraxanthin und Lutein-5,6-Epoxid, wie bereits für andere Carotinoide von Breitenbach et al. (2013) beschrieben, statt. Hierzu wurden die Pigmente vorerst über eine Dünnschichtchromatographie (DC-Kieselgelplatte) aufgetrennt und angereichert (Toluene/Ethylacetat/Methanol 76:20:4). Die Bande bei einem R_f -Wert („related front“) wurde abgekratzt, in Methanol gelöst und zur HPLC-Analyse verwendet. Verwendet wurde eine C18-218TP54-Säule (Vydac) und eine Flussgeschwindigkeit von 0,8 ml pro Minute. Als Eluent diente ein Laufmittelgemisch aus 2 % Wasser in Methanol. Diese Methode wurde bereits von Zhu et al. (2008) zur Trennung der Carotinoide Zeaxanthin und Lutein beschrieben und ermöglichte hier die Trennung der Pigmente Antheraxanthin und Lutein-5,6-Epoxid mit den Retentionszeiten 29,4 Minuten (Absorptionsmaxima 414, 439, 470 nm) und 31,2 Minuten (Absorptionsmaxima 422, 443 and 472 nm). Die Absorption der einzelnen Pigmente wurde ebenfalls mit Hilfe eines Dioden Array Detektor (Kontron) bei 440 nm aufgenommen und mit der Software Clarity Lite (DataApex) ausgewertet.

3.8.4.2. Analyse der Carotinoideextrakte pro Chl a-Molekül

Der Carotinoidgehalt der transgenen *P. tricornutum*-Linien (#13, #14) wurde per HPLC (ELITE LaChrome, Hitachi) im Vergleich zum WT überprüft. Die Pigmente wurden nach der Extraktion (3.3.5) über eine sogenannte Revere-Phase-Säule (MERCK, Chromolith, RP-18e, 100-4, 25 cm x 6 mm) nach ihrer Polarität aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte über einen 2-Stufen-Gradienten (Tabelle 29) bei einer Flussrate von 2 ml pro Minute. Die Detektion fand an Hand der pigmentspezifischen Retentionszeiten, sowie den charakteristischen Absorptionen der einzelnen Pigmente bei einem Absorptionsspektrum der Wellenlängen 370 nm bis 750 nm (Papagiannakis et al., 2005) (Dioden Array Detektor, Hitachi), statt. Zur Analyse der Verhältnisse wurden die Flächen mit Hilfe der Software EZChrome-Elite unter den Wellenlängen mittels eines spezifischen Korrelationskoeffizienten (mündliche Mitteilung K. Gundermann) verrechnet und auf Chl a normiert.

Tabelle 29: Mobile Phase der HPLC-Analyse und verwendeter 2-Stufen-Gradient zur Auftrennung der Pigmente.

Eluenten C und D dienen ausschließlich dem Waschvorgang.

Mobile Phase		2-Stufen-Gradient	
Mobile Phase A	80 % Methanol, 1 mM TRIS, pH 7.5	Zeit [Minuten]	Mobile Phase
Mobile Phase B	60 % Methanol + 40 % Aceton	0	100 % A und 0 % B
Mobile Phase C	20 % Methanol	3,5	0 % A und 100 % B
Mobile Phase D	80 % Methanol	6,5	0 % A und 100 % B
		6,7	100 % A und 0 % B
		8,0	100 % A und 0 % B

3.8.5 *In-vivo* Fluoreszenz-Messungen

In-vivo Fluoreszenz-Messungen können unter anderem herangezogen werden, um Aussagen über die Wärmedissipation auf Kosten der photochemischen Löschung zu machen. Wichtige Parameter sind die minimale Chlorophyllfluoreszenz F_0 , welche beim Anschalten des Messlichtes festgehalten wird. Die maximale Fluoreszenz (F_m), welche mittels des ersten sättigenden Lichtblitzes auf die dunkeladaptierten Proben bestimmt wird. Es folgt unter aktinischem Licht die Messung weiterer maximaler Chlorophyllfluoreszenzen (F_m'), welche in Folge einer aktivierten Elektronentransportkette der Photosynthese-Systeme absinkt. Die maximale Chlorophyllfluoreszenz sättigender Lichtblitze in der darauffolgenden Relaxationsphase werden in folgendem mit F_m'' beschrieben.

Die Fluoreszenz-Messungen in dieser Arbeit dienen der Bestimmung des NPQs im Rahmen des Komplementationsversuches der verschiedenen *A. thaliana*-Linien (WT, *npq2*, komplementierte *npq2*). Stets wurde bei Raumtemperatur gemessen und zudem jeweils der F_v/F_m ($F_v=(F_m-F_0)$) der Linien bestimmt. Zur Steuerung der Messeinheiten und zur Aufzeichnung der Fluoreszenz wurde die Software „Fluor Win Sens MS 3.0.0“ verwendet. Berechnung der nicht- photochemischen Löschung während der aktinischen Lichtphase (I) bzw. der Relaxationsphase (II), (Bilger und Björkmann, 1990):

$$(I) \quad NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$$

$$(II) \quad NPQ' = (F_m - F_m'') / F_m''$$

Die im Vorfeld komplementierten *npq2*-Linien (*npq2+zep1*, 2, 3) wurden hinsichtlich ihrer Fluoreszenz mit dem WT und der nicht-komplementierten *npq2*-Linie verglichen. Hierfür wurden vier Wochen alte Pflanzen verwendet, welche unter Standardkulturbedingungen kultiviert wurden. Die Pflanzen (WT, *npq2*, *npq2+zep1*, 2, 3) wurden vor der Bestimmung des NPQs mit der FluorCam 800 MF device, (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic) für 15 Minuten dunkeladaptiert. F_0 wurde für drei Sekunden bestimmt, anschließend erfolgte die Messung für F_m mit einem sättigendem Lichtblitz von $\geq 5000 \mu\text{mol Photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Aufzeichnung des NPQs erfolgte über insgesamt 160 Sekunden. Das aktinische Licht wurde mit Hilfe einer roten-LED-Diode ($\lambda_{\text{max}}=620 \text{ nm}$) über 70 Sekunden angeschaltet, anschließend erfolgte für 90 Sekunden die Relaxationsphase ohne aktinisches Licht. Die Lichtintensität des aktinischen Lichtes lag bei $500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Das Messlicht wurde auf $10 \mu\text{s}$ eingestellt und die Sensitivität der FluorCam lag bei 65 %. Der F_v/F_m -Wert wurde gleichzeitig mit dieser Messung bestimmt. Zur Auswertung wurde die Software FluorCam 7 verwendet.

3.8.6 Fluoreszenz-Mikroskopie

Für die Analyse der Expression und der zellulären Lokalisation des mit der Sequenz für GFP markierten Konstruktes (*zep1_gfp*) wurde ein Axiophot Mikroskop (Zeiss, Deutschland) verwendet. GFP wurde bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 495–525 nm detektiert. Von den transient hergestellten *Arabidopsis*-Protoplasten von (3.7.4.1) wurden wenige μl auf einen Objektträger aufgebracht und unter verschiedenen Vergrößerungen (40x und unter Öl-Immersion (Leica) 63x) mit nicht transformierten Protoplasten (Negativkontrolle) bzw. der Positivkontrolle verglichen. Die Aufnahmen der Protoplasten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. M. Fauth (Goethe-Universität, Frankfurt) durchgeführt. Das Fluoreszenz-Mikroskop ist mit einer Kamera von Olympus (ColorView XS) ausgestattet, zur Bildvisualisierung und -verarbeitung diente die Software analySIS (Olympus). Verwendet wurde das Filterset G 365 (Katalog Nummer 48 77 02, Zeiss), welches den Anregungsfilter G 365, den chromatischen Strahlenteiler (chromatic beam splitter) FT 395 und den Abdeckungsfilter (barrier filter) LP 420 enthält. Durch das Okular bedingt, ergibt sich eine zusätzliche 10x Vergrößerungen.

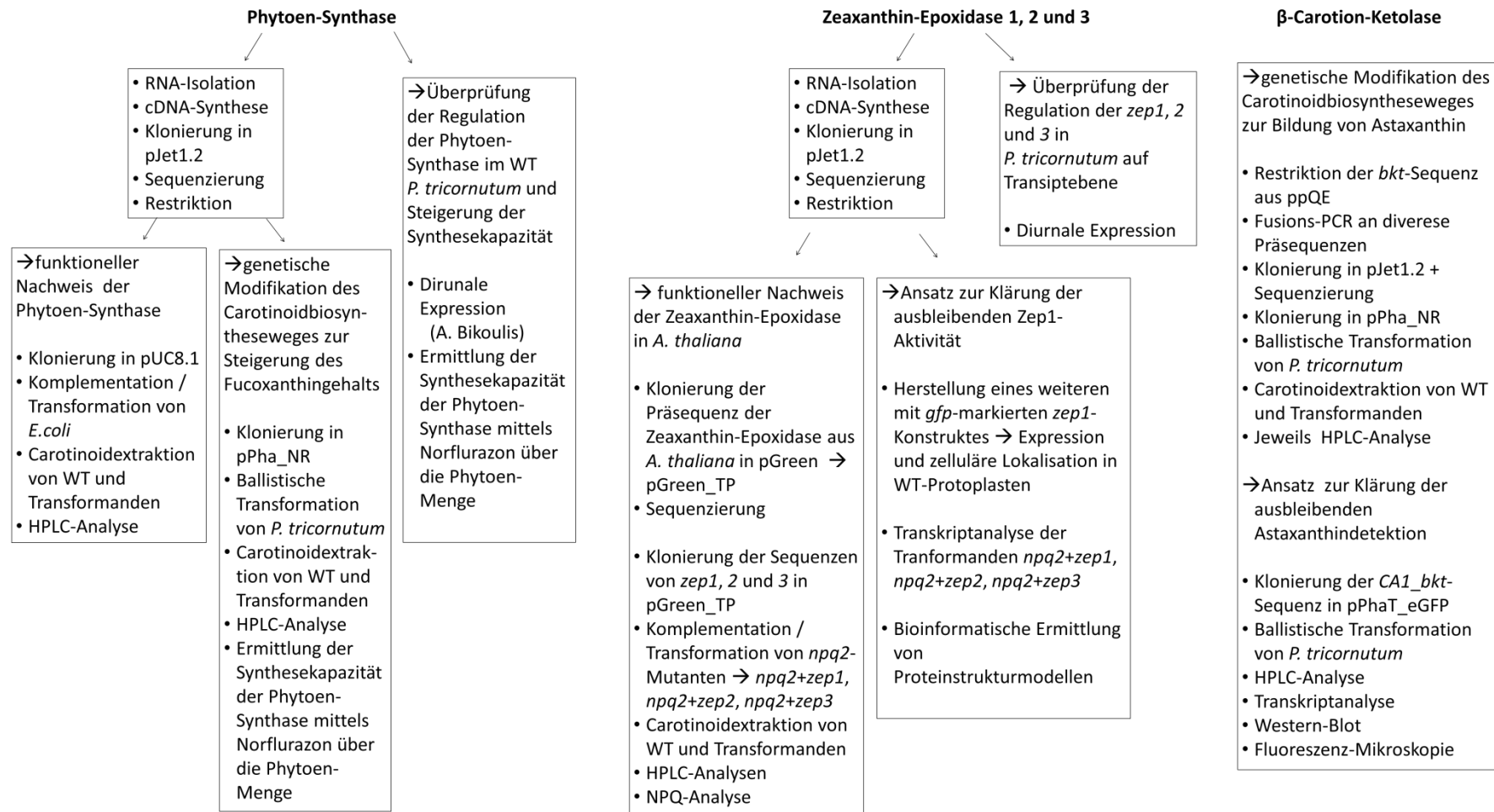


Abbildung 12: Zusammenfassung zur Vorgehensweise, um einen höheren Carotinoidgehalt zu erreichen und die Bildung von Astaxanthin zu bewerkstelligen.

Hierfür wurden vorerst annotierte Sequenzen für die Phytoen-Synthase und die Zeaxanthin-Epoxidasen funktionell charakterisiert. Die Phytoen-Synthase dient als Eingangsenzym, zur Steigerung der Fucoxanthingehalts. Die Zeaxanthin-Epoxidasen dienen als Stellschraube, um letztlich durch geeignete heterologe Transformation die Bildung von Astaxanthin mittels β-Carotin-Ketolase zu verstärken. Die Bildung von Astaxanthin wurde zuvor am WT von *P. tricornutum* untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Bedeutung der Phytoen-Synthase für die Carotinoid-Akkumulation

Um eine Steigerung des Carotinoid- und damit des Fucoxanthingehalts zu erreichen, war die funktionelle Charakterisierung der putativen Phytoen-Synthase aus *P. tricornutum* Gegenstand dieser Arbeit. Hierfür wurde synthetisierte cDNA zuerst in den Expressionsvektor pUC8.1 eingebracht und anschließend in einer Komplementationstudie in *E. coli* untersucht. Des Weiteren wurden die Regulation und damit die limitierenden Eigenschaften der Phytoen-Synthase analysiert. Um im weiteren Verlauf der Arbeit einen höheren Carotinoidgehalt in *P. tricornutum* zu erreichen, wurden anschließend Überexpressionsmutanten von *P. tricornutum* erstellt. Es folgte die Analyse der Transformanten (#13, #14) im Vergleich zum WT auf DNA-, RNA- sowie Pigment-Ebene.

4.1.1 Funktionelle Charakterisierung der Phytoen-Synthase

Für den funktionellen Nachweis der putativen Phytoen-Synthase wurde diese in Form von cDNA in den Sequenzierungsvektor pJet ligiert und anschließend sequenziert. Die aus RNA synthetisierte cDNA (3.5.1) wurde mit der Primerkombination *psy_EcoR1_f* und *psy_HindIII_r* aus Tabelle 33 und des in Tabelle 9 beschriebenen PCR-Ablaufs amplifiziert.

Das Ergebnis der Sequenzierung wurde mit der annotierten Sequenz aus den Datenbanken DOE Joint Genome Institute Website (<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2>) verglichen (Abbildung 13). Der Vergleich in Abbildung 13 für die cDNA der Phytoen-Synthase zeigt an vier Positionen Abweichungen in der Aminosäuresequenz (Isoleucin I40 → Serin S40, Phenylalanin F47 → Tyrosin Y47, -59 → Serin S59, Glutamin G200 → Lysin K200). Die Sequenzierung wurde auf Grund dieser Abweichungen mehrfach aus unabhängigen biologischen Replikaten (RNA-Isolationen) vorgenommen, zeigte aber immer die gleichen Austausch. In der Datenbank ist der Stamm CCAP 1055/1 annotiert, hingegen wurde in dieser Arbeit mit dem Stamm UTEX 646 gearbeitet.

> Proteinsequenz vom *psy*-Konstrukt

MKVSTKLCYAVCTCAPLLTRAWIGNKMHFSGVPGTNTYGSSTPTSLYSLATPPQS
 SGKSSSSAAQKSQQHEQIEMGRVLEGGQVIDFSSVKASSHAHALAQARHLL
 QKSPSTWDGRTILGINDDVIAEVGHDLGTFCTSAQVQEVAAAYLRSQAPAGLFEP
 LPKHLQPQTDNAPSLDSSLVSSNDSAETLKYREIMAKAYFESGEVTSFAKTFYM
 GTMLLDEPAREAIWAVYVWCRRTDEIVDAPRDDGDDMLEDLSSWELRLERLW
 QYGQVQDVFIDLCLLDLRIQYPTLDITPFMDMIRGMLMDVPELGVDRYEAFDEL
 HLYCYRVAGTVGLMSLPVFGCADGFNDEVAREPALS LGVAFQLTNILRDVGEDAS
 ERGRVYLPQEDLRRFGVTEEQIFAQKVDENYINMMKFQIARARMYYERARRGV
 FMLAPESRLPVQSSLDAYGRILDKIEANGYDSLTKRAYVDKWEKLSIIPFSWYRTQ
 DISQWLPLPGDRPVQLDQV*

Abbildung 13: Verwendete Proteinsequenz für den Komplementationsversuch in *E. coli* und für das Konstrukt pPhaN-*psy* für die Überexpression in *P. tricornutum*.

Rot hinterlegt sind die Aminosäureaustausche, welche im Vergleich mit der annotierten Sequenz der Phytoen-Synthase aus JGI festgestellt wurden. Der Sequenzvergleich erfolgte mit CloneManager Professional Suite 8.

Die sequenzierte cDNA wurde für weitere Zwecke herangezogen und mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII (3.6.1) aus dem Vektor pJet herausgeschnitten. Das so gewonnene Fragment wurde in den Expressionsvektor pUC8.1 (3.6.2) ligiert. Anschließend wurde das Konstrukt in *E. coli* JM101 pACCAR25 Δ *crtB* (3.2.3 bzw. 3.7.1) transformiert. Dieser Stamm trägt bereits den Vektor pACCAR25 Δ *crtB*, welcher alle bis zur Bildung von Zeaxanthin nötigen Gene für die Carotinoidbiosynthese, außer das Gen der Phytoen-Synthase. Die Kulturen wurden auf ihr Pigmentgehalt überprüft (Abbildung 14).

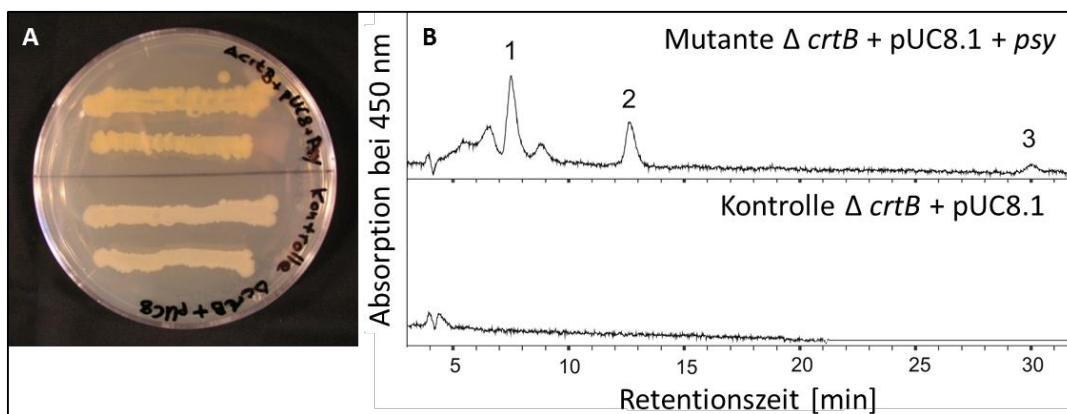


Abbildung 14: Nachweis der Phytoen-Synthase von *P. tricornutum*.

Vergleich des transformierten Stammes *E. coli* JM101 pACCAR25 Δ *crtB* mit der cDNA der putativen Phytoen-Synthase in pUC8.1. Als Kontrolle diente pUC8.1 ohne cDNA der Phytoen-Synthase. **A** Visueller Vergleich zwischen den *E. coli*-Zellen. In der oberen Hälfte der Abbildung ist die mit cDNA komplementierte Linie abgebildet, in der unteren Hälfte die Kontrolle. **B** Chromatogramm der nach Kultivierung der transformierten Zellen extrahierten Pigmente. 1: Zeaxanthin; 2: β -Cryptoxanthin; 3: β -Carotin (n=3).

Durch das Einbringen der cDNA der putativen Phytoen-Synthase in *E. coli* ist bereits nach zwei Tagen Anzucht visuell eine Farbänderung der Transformanden im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 14 A) zu erkennen. Während die Kontrolle die *E. coli*-übliche Farbpigmentierung aufweist, zeigt der Transformand mit der cDNA der Phytoen-Synthase eine stark orangefarbene Pigmentierung. Nach der Kultivierung des Transformanden und der Kontrolle in Flüssigmedium wurden die Carotinoide mittels HPLC (3.8.4) analysiert. Der unterschiedliche Pigmentgehalt zeigt sich in Abbildung 14 B. Hier sind im oberen Chromatogramm eindeutige Peaks zu spezifischen Retentionszeiten von den Carotinoiden Zeaxanthin (7,27 Minuten), β -Cryptoxanthin (12,41 Minuten) und β -Carotin (30 Minuten) (mit den Absorptionsmaxima 425 nm, 453 nm und 480 nm) zu sehen. Diese bewirken die orangene Färbung in der Transformande. In der Kontrolle konnten diese Pigmente nicht detektiert werden.

4.1.2 Ballistische Transformation von *P. tricornutum* und genetischer Nachweis

Nach erfolgreicher Verifizierung der Funktion der klonierten cDNA der Phytoen-Synthase wurde diese in den Transformationsvektor pPha_NR eingebracht (pPhaN-*psy*; Abbildung 15) und zur ballistischen Transformation von *P. tricornutum* verwendet (3.7.3).

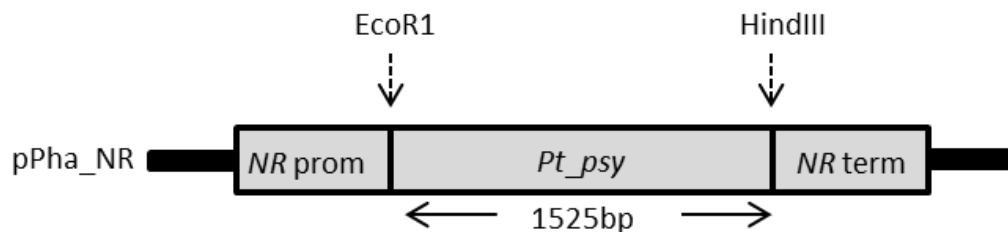


Abbildung 15: Ausschnitt des Transformationsvektors pPhaN-*psy*.

Die cDNA wurde über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII in den Transformationsvektor pPha_NR eingebracht (pPhaN-*psy*). NR=Nitratreduktase-Gen; *psy*=Phytoen-Synthase-Gen; prom=Promoter; term=Terminator.

Die eingebrachte cDNA der Phytoen-Synthase sollte den Carotinoidgehalt von *P. tricornutum* erhöhen. Die ersten Transformanden konnten nach etwa sechs Wochen in Flüssigmedium zur weiteren Analyse kultiviert werden. Die Transformanden wurden in ASP-Medium mit dem Antibiotikum Zeozin unter Standardkulturbedingungen (3.2.1) kultiviert und nach weiteren drei Wochen auf die genetische Integration des Konstruktes überprüft. Das amplifizierte Fragment des Vektors pPhaN-*psy* hat eine Größe von 1657 bp.

Abbildung 16 **B** zeigt das erwartete PCR-Fragment bei vier der 16 Transformanten (#1, 2, 13, 14). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Transformanten #13 und #14 zur Analyse herangezogen.

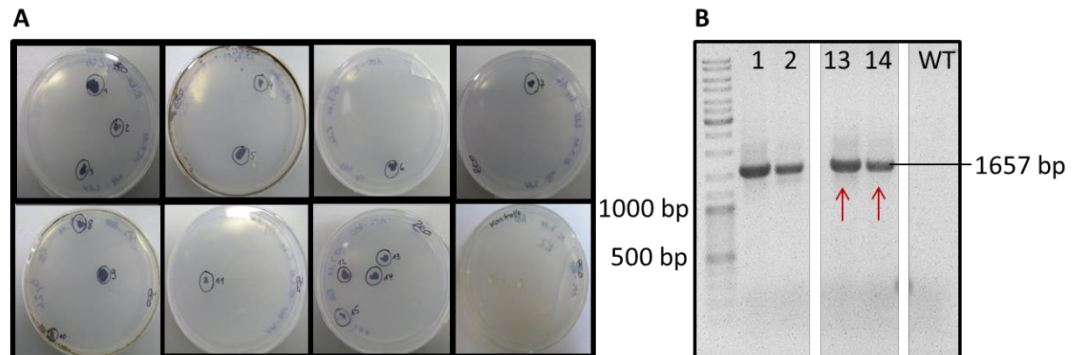


Abbildung 16: Ballistische Transformation von *P. tricornutum*.

Transformiert wurde der Stamm Utex 646 mit dem Vektor pPhaN-*psy*. **A** Nach der Transformation konnten 16 Transformanten auf den mit Zeozin [75 µg/ml] als Selektionsmarker verwendeten ASP-Platten identifiziert werden. Die letzte Platte ist die Kontrolle, bei welcher Wolframpartikel ohne DNA zur Transformation verwendet wurden. **B** 1 % Agarosegel. Nach genetischer Überprüfung mittels PCR wurden die Transformanten #1, 2, 13, 14 mit dem gewünschten Fragment (1657 bp) identifiziert. Der WT diente als Negativkontrolle und zeigt auf entsprechender Höhe kein Signal. Die Pfeile markieren die Linien #13 und #14, die im weiteren Verlauf der Arbeit zur Analyse herangezogen wurden.

4.1.3 Wachstumsraten im Vergleich

Das Wachstum der Transformanten #13 und #14 wurden mit dem des WT verglichen. Hierfür wurden unabhängige Zellzählungen durchgeführt, welche stets mit 10^6 Zellen/ml am Tag 0 beimpft und in Folge 14 Tage lang das Wachstum beprobt wurde.

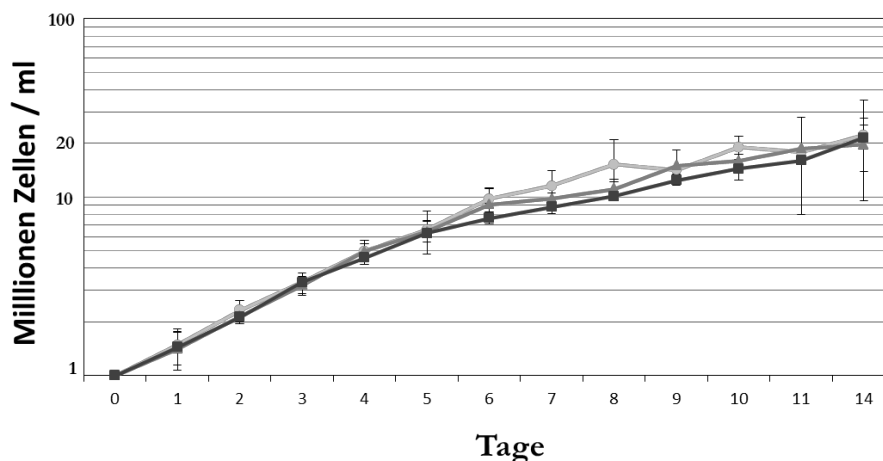


Abbildung 17: Wachstumsraten der *P. tricornutum* Kulturen in Batch-Kulturen.

Die Zellen wurden mit 10^6 Zellen inokuliert und über 14 Tage beobachtet. Die berechnete Zellzahl in den Kulturen wurde dekadisch logarithmisch skaliert. Die hellgraue Kurve zeigt den WT, in dunkelgrau bzw. schwarz sind die beiden Transformanten #13 und #14 zu sehen. (n=9; Mittelwert (MW)±Standardabweichung (SD)).

Ein Vergleich der Wachstumsraten zwischen dem WT von *P. tricornutum* und den Transformanten #13 und #14 zeigt, dass die zusätzlich eingebrachte Phytoen-Synthase keinen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum innerhalb der ersten 14 Tage hat – die Wachstumsraten sind sehr ähnlich.

4.1.4 RNA-Bestimmung

Als nächstes wurde in dieser Arbeit überprüft, ob sich der erhöhte DNA-Gehalt der Phytoen-Synthase auf Transkript-Ebene widerspiegelt. Hierfür wurden Analysen mittels quantitativer real time PCR (qrtPCR) durchgeführt. Innerhalb dieser Analyse wurde *Histon (h4)* als Haushaltsgen verwendet und in der Auswertung der Transkript-Menge der mRNA-Gehalt der Phytoen-Synthase darauf normiert.

Für die Primereffizienzen wurden Werte für *h4*: 96,3 % und für *psy*: 109,6 % ermittelt.

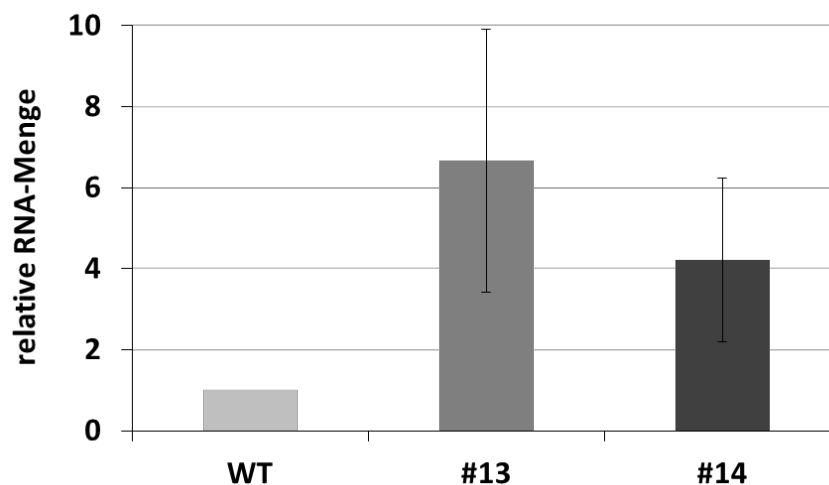


Abbildung 18: Quantitative Analyse der Phytoen-Synthase auf Transkript-Ebene.

In hellgrau ist der auf 1 normierte WT zu sehen, in dunkelgrau die Transformante #13 (n=4 MW±SD) und in schwarz Transformante #14 (n=3 MW±SD).

Die quantitative Analyse auf RNA-Ebene (Abbildung 18) zeigt, dass durch das Einbringen zusätzlicher *psy*-cDNA Kopien der Phytoen-Synthase auf Ebene der Transkription ebenfalls ein höherer Gehalt erreicht werden konnte. Im Falle der Transformante #13 konnte eine Erhöhung der relativen Transkriptmenge um den Faktor 6,6 und bei Transformante #14 um den Faktor 4,2 im Vergleich zum WT beobachtet werden.

4.1.5 Synthesekapazität der Phytoen-Synthase

Mittels HPLC-Analysen wurde indirekt die Enzymkapazität überprüft. Hierfür wurden die Kulturen von *P. tricornutum* (WT, #13, #14) wie in 3.4 beschrieben mit NFZ, welches die Phytoen-Desaturase inhibiert, behandelt und so die Akkumulation von Phytoen induziert. Die zugehörigen Analysen fanden ebenfalls mittels HPLC statt (3.8.3), wobei die Akkumulation von Phytoen pro mg Trockengewicht vom WT im Vergleich zu den Transformanden #13 und #14 bestimmt wurde. Die Akkumulation von Phytoen erlaubt so, Rückschlüsse auf die Synthesekapazität der Phytoen-Synthase zu ziehen.

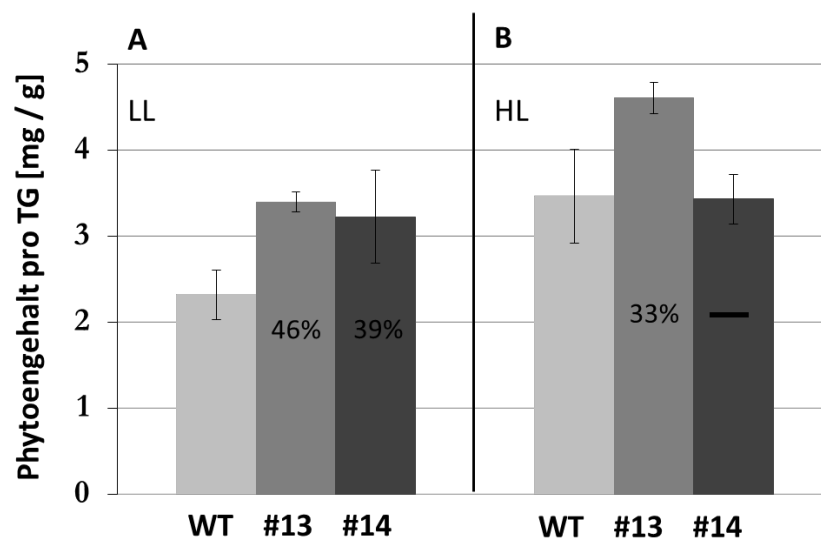


Abbildung 19: Synthesekapazität der Phytoen-Synthase.

Nach Zugabe von NFZ wurde die Akkumulation von Phytoen verschiedener *P. tricornutum*-Linien (WT=hellgrau, #13=dunkelgrau, #14=schwarz) mittels HPLC-Analysen (3.8.3) bestimmt. **A** zeigt die Analysen unter Schwachlichtbedingungen (LL=low light), **B** zeigt die Analysen unter Starklichtbedingungen (HL=high light).

Die indirekte Bestimmung der Phytoen-Synthesekapazität spiegelt das Ergebnis des zuvor bestimmten Transkriptgehalts wieder. Es kann eine deutlich gesteigerte Akkumulation von Phytoen in den Transformanden im Vergleich zum WT festgestellt werden, was auf eine höhere Aktivität der Phytoen-Synthase durch das Einbringen zusätzlicher cDNA zurückzuführen ist. Unter LL Bedingungen (Abbildung 19 **A**) lässt sich für die Transformande #13 eine 46 % höhere Akkumulation im Vergleich zum WT verzeichnen, während für die Transformande #14 39 % mehr Phytoen detektiert werden konnte. Unter HL Bedingungen (Abbildung 19 **B**) ist im Vergleich zwischen dem WT und Transformande #13 nur noch eine erhöhte Akkumulation von 33 % zu erkennen, während für die Transformande #14 unter diesen Bedingungen keine Steigerung mehr festgestellt werden konnte. Die genauen Werte sind im Anhang zu finden.

4.1.6 Pigmentgehalt

Die erhöhte Synthesekapazität der Phytoen-Synthase in *P. tricornutum* wurde weiter auf Pigment-Ebene ohne Inhibitor (3.3.5) untersucht. Hierbei wurde zum einen der Carotinoidgehalt pro Chl a bestimmt (Abbildung 20 A) und zum anderen die Gesamtmenge der Carotinoide auf das Trockengewicht (TG) berechnet (Abbildung 20 B).

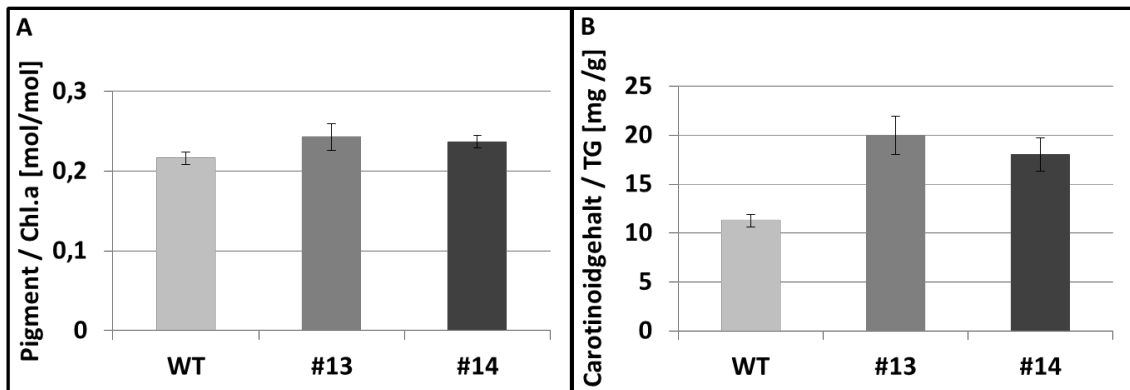


Abbildung 20: Pigmentgehalt von *P. tricornutum*.

Dargestellt ist der Pigmentgehalt (3.3.5) der *P. tricornutum*-Linien (WT; #13; #14) bei den Analysen des Gesamtcarotinoidgehalts pro Chl a in A (3.8.3; n=3) bzw. pro mg Trockengewicht in B (3.8.3; n=5 MW±SD). In hellgrau ist jeweils der WT dargestellt, in dunkelgrau bzw. schwarz ist die Transformante #13 bzw. #14 zu sehen.

Die Analysen wurden an unterschiedlichen HPLC-Systemen (3.8.4) durchgeführt. Die Hauptcarotinoide, welche bei beiden HPLC-Analysen detektiert wurden, sind Fucoxanthin, Diadinoxanthin sowie β -Carotin. Andere Pigmente wie z.B. Diatoxanthin oder Chlorophyllid a waren nur in vernachlässigbaren Mengen vorhanden und wurden daher nicht in die Berechnung des Gesamtcarotinoidgehalts einbezogen. Die genauen Absorptionsmaxima und Retentionszeiten der einzelnen Pigmente, sowie die genauen Werte der HPLC-Analysen können den Tabellen im Anhang entnommen werden (8.4).

Vergleicht man den Gesamtcarotinoidgehalt pro Chl a der Transformanten #13 und #14 zu demjenigen des WT (Abbildung 20 A), so zeigt sich, dass hier kaum eine gravierende Veränderung stattgefunden hat. Die Erhöhung des Carotinoidgehalts der beiden Transformanten im Vergleich zum WT ist nur marginal, solange man sich auf Chl a bezieht. Bezieht man jedoch den Carotinoidgehalt auf das Trockengewicht, wie in Abbildung 20 B dargestellt, so lässt sich ein deutlicher Unterschied festhalten. Es zeigt sich, dass hier eine Erhöhung der Gesamtcarotinoide durch die ballistische Transformation erreicht werden konnte. Im Vergleich hat hier die Transformante #13 eine um 77 % höhere Menge an

Carotinoiden als der WT. Auch die Transformante #14 zeigt, bezogen auf das Trockengewicht, einen deutlich höheren Gehalt (60 %) im Vergleich zum WT. Die Syntheseleistung wird in beiden Transformanden durch Fucoxanthin bedingt. Auch für Diadinoxanthin und β -Carotin konnte ein höherer Gehalt festgestellt werden, wobei die Mengenverhältnisse zwischen den Transformanden und dem WT für β -Carotin diejenigen von Fucoxanthin widerspiegeln, während für Diadinoxanthin eher ein höherer Gehalt bei der Transformante #14 vorzufinden ist. Diese Änderungen in den Mengenverhältnissen unterliegen jedoch den natürlichen Messunsicherheiten, die Unterschiede sind nicht signifikant.

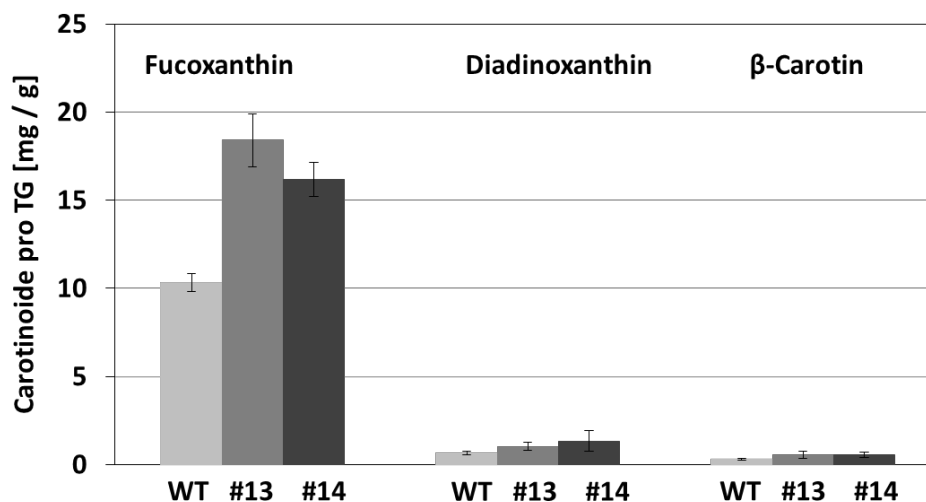


Abbildung 21: Pigmentverhältnisse bezogen auf das Trockengewicht.

In den Transformanden #13 und #14 wurde hauptsächlich Fucoxanthin detektiert (3.8.4.1). Daneben kommen Diadinoxanthin und β -Carotin in nur geringen Mengen vor. In hellgrau ist jeweils der WT dargestellt, in dunkelgrau bzw. schwarz ist die Transformante #13 bzw. #14 zu sehen.

Insgesamt war die funktionelle Charakterisierung der Phytoen-Synthese aus *P. tricornutum* in *E. coli* erfolgreich. Auch die Überexpression der Phytoen-Synthese in *P. tricornutum* führte zum gewünschten Ergebnis, da eine Erhöhung des Carotinoidgehalts pro g Trockengewicht erreicht werden konnte.

4.2 Identifizierung und Funktion von Zeaxanthin-Epoxidase-Genen aus *P. tricornutum*

Der funktionelle Nachweis der putativen Zeaxanthin-Epoxidasen 1, 2 und 3 aus *P. tricornutum* konnte mittels des Komplementationsversuches mit dem prokaryotischen Organismus *E. coli* nicht gezeigt werden. Auch in anderen Arbeiten, wie beispielsweise von Bouvier et al. (1996), konnte die Zeaxanthin-Epoxidase in *E. coli*-Zellen nicht exprimiert werden. Daher wurde ein eukaryotisches Expressionssystem aus *A. thaliana* zur Komplementation herangezogen. Sogenannte *npq2*-Linien, welche eine defiziente Expression der Zeaxanthin-Epoxidase von *A. thaliana* aufweisen, wurden daher jeweils einzeln mit den erstellten Konstrukten heterolog komplementiert. Ein zusätzliches mit der Sequenz für GFP markiertes Konstrukt der putativen Zeaxanthin-Epoxidase 1 (*zep1_gfp*) von *P. tricornutum* diente der Überprüfung der transienten Expression und der zellulären Lokalisation in Protoplasten von *A. thaliana*.

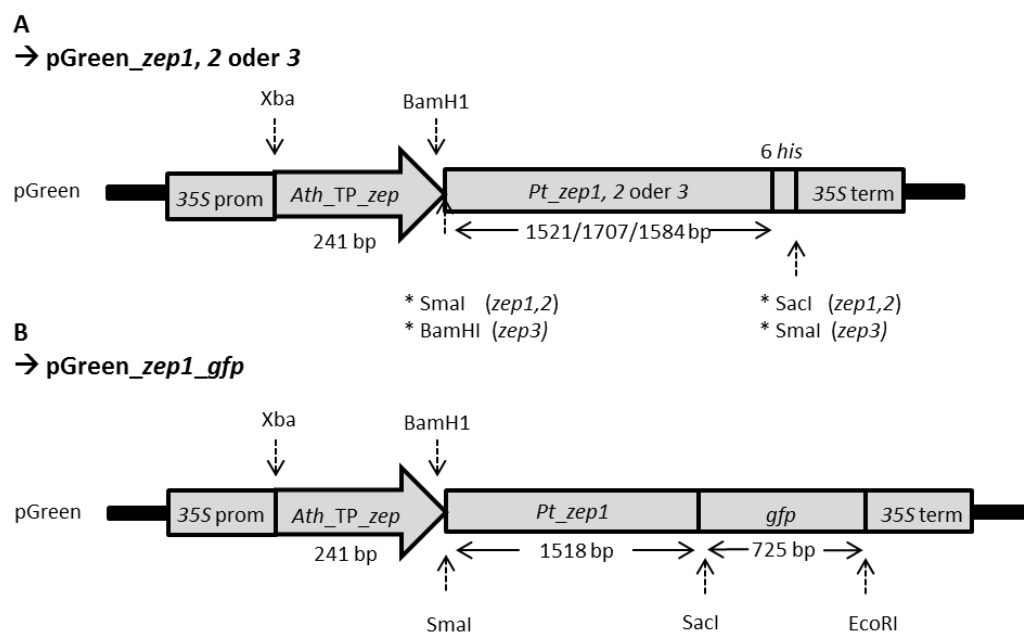


Abbildung 22: Ausschnitte aus den verwendeten Transformationsvektoren zur Komplementation von *A. thaliana npq2*-Mutanten.

A Übersicht über die zur Transformation von *npq2*-Linien verwendeten Konstrukte der putativen Zeaxanthin-Epoxidasen 1, 2 und 3. **B** Darstellung des zusätzlichen pGreen_*zep1_gfp* Konstruktes, welches für die Überprüfung der Expression und der zellulären Lokalisation verwendet wurde. Um einen Import in den Chloroplasten zu ermöglichen, besitzen die Konstrukte vor der eigentlichen CDS der *zep1, 2, 3* aus *P. tricornutum* die Sequenz für das Transitpeptid der Zep aus *A. thaliana*. Dieses Transitpeptid wurde direkt in den Transformationsvektor pGreen eingebracht und sequenziert, die cDNA der *zep1, 2, 3* wurde hingegen vorerst in den Sequenzierungsvektor pJet eingebracht, sequenziert und dann mittels Primer generierter Schnittstellen für Restriktionsenzyme in pGreen überführt. *Gfp* wurde ebenfalls vor der cDNA von *zep1* in pGreen eingebracht, zuvor jedoch in dem Vektor pJet sequenziert. Prom=Promoter; term=Terminator; TP=Transitpeptid; *gfp*=green fluorescence protein.

Die folgenden Sequenzen stellen die fertigen Sequenzen dar, so wie sie im pGreen-Vektor im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet wurden.

A > Proteinsequenz des TP von *A.th.zep*
 MGSTPFCYSINSPSKLDFTRTHVFSVSKQFYLDLSSFSGKPGGVSGFRSRRALLGVKAATALVEKE

B > Proteinsequenz vom *zep1*-Konstrukt
GSPGDRFRKASQDAANAKGCVAQDDGDESSWWRKPLPEDNDVIS**D**QRPLRVVIAGGGVAGLVTAACHAKGM
 QVAIFEQASQYAPYGGPIQIQSNALRALERINPVICCEIR**K**AGTVTADRVSGLKIGYKKGVFLGLGKQYEKGDWLVRFD
TLQPALDAGLYPTVVVDRPVIQILLEGHIPEKTVRIKSRIANYEELGPGKGVRIILEDGTVAYADVLIGSDGIWSSVRRIMHGLD
QGADGFAASGAAGGALNEAEARRMAKDSVLMANNANRRYSKFTCYAALTEHRASNIEEVSQILLGKDKY
FVSTDGGGERQQWFALIREPAGGVDPPEPTPENPTPKLTRLLEQFNHEEPGDQNGDVWDDFAYELFKATPEEDIKRR
 DLYDGSPLLQGWSKGQVAICGDAAHPMMPNLGQGGCQATEDGYRLAEELATVRTTKDIEGALQEYRKRIPRTTIIQ
 ALAQLGSDLLVDFDKMMTIPLVGPFFLFMTQVSMFPVLRFLYTP**HHHHHHH***

C > Proteinsequenz vom *zep2*-Konstrukt
GSPGTRHMTYPFPASSLRISTRVASTAVPPEDVAFDKLSLPAREGRPLKIAIAGGGVGLTTALCMLKKGFDVTVYEK
 TAAFARFGGPIQFASNLSVLKEIDETLFRVMDKFTFTGTRTCGIKDGRLADGSGFRMTEDRDLYLWNPADWDFV
KFPLKQCADFLGLPYTGVDRPDLOEILIDECRKLKPDFLINGNPVVGIEDLKGQGVITINLNDQTASADVLVGS
DIWSAVRDQMYKEGGVKSTANKKKRQGCDSGYTVFAGETILKTPDY**E**TGKYVYIGPKRYFVTSVGDGRIQWYAFF
ALPPGTTKAPSGWGSGSTRDGQTDPEENLVYVKLHEGWSDEVMMVLDSTSPDSVEQRDLYDRAPELFRSWANG
 NVVLIGDAVHAMMPNLGQGGCQAIEDAYVLTETLANTRTTEKLQDALQEYRKRIVRSIVQFLSKLASDLIINAFDTP
 WSPHDNLGKSWKSYLTFWFKPILQFAIFPMQFAYLYSYPTGNMMDLPAKLEAIWKEKHKTDAEAVFEQASKEGFVM
 EHEASFFKKAELSPTAL**G**TK**EE**LSHHHHHHH*

D > Proteinsequenz vom *zep3*-Konstrukt
GSRQPTTTARFVSGTAPSSNVASEEKVDAISEAHLKVLIAAGAVGGLSLAKVLTKMPTMDVTVLEQTSEFKRFGGP
 IQLASNAMEILKHMdkpVFDKVM**E**KFTFTGDKENGIKDGIRTEWYAKFDLKTPAENRNMPYTGVIERPDLQIFLDS
LPKGTVQNGDGV**A**HYEKLDPGGVKAVLKSKEVYGDVLIGADGIWSAVRATMRDSPAKGDSGATYSGYTVFAGEL
AYDSFDNGQVGYKVYIGPGQYFVITDIGNGNYQWYAFLARPADSASSTDMPDGQSKYLKYLQEIFAGWSEEVHILR
 VTQEHEIEQRDLYDRPPSAMKPWTDGPVALLGDGIHAMMPNLGQGGCQAIEDAFVIGQELGSATKRSQ**V**VDKLR**EY**
HSRRLIRSAAVQGLSRFASDIIRGFDTPAKIYRDENGKQFENCNYAGIVTKILQPILPIFFSVQFAFLYDGWKNDKQIDF
 KA**F**FGSVLGGGLIVSLVLFELAEAGLIGLGAEALLGAEGLLDFGGISAAIQDFFLGGGAAGLHHHHHHH*

E > Proteinsequenz vom *zep1_gfp*-Konstrukt
GSPGDRFRKASQDAANAKGCVAQDDGDESSWWRKPLPEDNDVIS**D**QRPLRVVIAGGGVAGLVTAACHAKGMQV
 AIFEQASQYAPYGGPIQIQSNALRALERINPVICCEIR**K**AGTVTADRVSGLKIGYKKGVFLGLGKQYEKGDWLVRFDTLQP
ALDAGLYPTVVVDRPVIQILLEGHIPEKTVRIKSRIANYEELGPGKGVRIILEDGTVAYADVLIGSDGIWSSVRRIMHGLD
QGADGFAASGAAGGALNEAEARRMAKDSVLMANNANRRYSKFTCYAALTEHRASNIEEVSQILLGKDKYFVSTDGG
GERQQWFALIREPAGGVDPPEPTPENPTPKLTRLLEQFNHEEPGDQNGDVWDDFAYELFKATPEEDIKRRDLYDGSPLL
 QGWSKQVAICGDAAHPMMPNLGQGGCQATEDGYRLAEELATVRTTKDIEGALQEYRKRIPRTTIIQAL**AL**QLGSDLLV
 DFDKMMTIPLVGPFFLFMTQVSMFPVLRFLYTP**EFELI**AM**GK**GEELFTGVV**PIL**VELDGDV**NGH**KFSVSGEGEGDATY**GK**
 LTL**K**FICTTGKLPVPWPTLVTTFCYGVQCFSRYPDHMKQHDF**FS**KAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEV**K**FE**G**DTLVN
 RIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN**V**YITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQ**NT**PIGDGPVLLPD**NH**YLS
 TQSALS**K**DPNEKR**DH**MVLL**EF**VTAAGITH**G**MD**EL**DL*

Abbildung 23: Übersetzte Proteinsequenzen von den Konstrukten *zep1*, *2* und *3* sowie *zep1_gfp* von *P. tricornutum* für den Komplementationsversuch in *A. thaliana*.

A Aminosäuresequenzen der sequenzierten und anschließend verwendeten gDNA vom Transitpeptid der Zep aus *A. thaliana*. **B-D** Aminosäuresequenz von den Konstrukten *zep1*, *2*, *3* aus *P. tricornutum*. In **E** ist die Sequenz des zusätzlichen *zep1*-Konstruktes mit der Sequenz für GFP in grün dargestellt. In rot sind Aminosäure-Austausche gekennzeichnet, welche stammabhängig sind (n=3). In **B-D** ist am Ende jeweils ein His-Tag in kursiv gekennzeichnet. Unterstrichen markiert sind die nach Coesel et al. (2008) funktionell wichtigen Domänen der Lipokalinmotive. Mit * ist jeweils das C-terminale Ende dargestellt. In fett und kursiv sind Linker-Sequenzen gekennzeichnet.

Die verwendeten Sequenzen sind aus Abbildung 23 zu entnehmen: in **A** ist das Transitpeptid der Zep aus *A. thaliana* in pGreen dargestellt, welches an die jeweilige Sequenz kloniert wurde (**B** *zep1* **C** *zep2* **D** *zep3* **E** *zep1_gfp*). In rot sind stets die Aminosäure-Austausche, welche durch mehrmaliges Sequenzieren unabhängiger Replikate/Isolationen als stammabhängig identifiziert werden konnten dargestellt. Diese Austausche sind in **B** und **E** dieselben (Asparagin N103 → Asparaginsäure D103). In **C** (Alanin A318/A598 → Glutaminsäure E318 und Glycin G598) und in **D** (Lysin K193 → Glutamin Q193, Arginin R200 → Histidin H200, Alanin A337 → Valin V337, Valin V371 → Isoleucin I371, Isoleucin I405 → Valin V405, Glutamin Q413 → Histidin H413, Glutamin Q414 → Serin S414, Leucin L498 → Phenylalanin F498).

Nach der erfolgreichen Herstellung der Konstrukte mit den gewünschten Sequenzen der *zep1*, *2*, *3* aus *P. tricornutum*, wurden stabile Linien der *npq2*-Mutanten (*A. thaliana*) mittels Agrobakterien (3.7.2) mit jeweils einem *zep*-Konstrukt transformiert (3.7.4).

Des Weiteren wurden WT Protoplasten von *A. thaliana* (3.7.4.1) transient mit dem Konstrukt pGreen_*zep1_gfp* transformiert. Dies diente der Überprüfung der zellulären Lokalisation des Konstruktes bzw. dessen Expression.

Die komplementierten *npq2*-Linien wurden im Vergleich zum WT und der *npq2*-Linie auf DNA-, RNA, und Pigment-Ebene analysiert. Außerdem wurden Unterschiede im Wachstum und in der Fluoreszenz (NPQ) festgehalten. Im Anschluss erfolgte im Rahmen einer diurnalen Expression in *P. tricornutum* die Bestimmung der lichtabhängigen Regulation der Zeaxanthin-Epoxidasen.

Analysen der komplementierten *npq2*-Transformanden

Um stabile Linien zu erhalten, wurden die *A. thaliana npq2*-Mutanten mit den hergestellten Konstrukten transformiert (3.7.4) und anschließend über BASTA selektioniert. Wie in Abbildung 25 gezeigt, sind für die Komplementation mit *zep1* und *zep2* jeweils zwei bzw. drei Linien untersucht wurden. Im weiteren Verlauf werden *zep1a* und *zep2e* vorgestellt, welche stets als *zep1* bzw. *zep2* tituliert werden. Unter den verschiedenen *zep1*-Transformanden lassen sich keine Unterschiede bestimmen, bei den *zep2*-Transformanden ist die *zep2e* diejenige, welche die eindeutigsten/homogensten Ergebnisse liefert und damit homozygot zu sein scheint. Bei der Komplementation mit *zep3* konnte nur eine Transformande verifiziert werden.

4.2.1 Wachstum

Gleichzeitig ausgesäte Samen der *A. thaliana*-Linien vom WT, *npq2* und *npq2*-Transformanden, welche mit den Konstrukten der Sequenzen *zep1*, 2 bzw. 3 von *P. tricornutum* komplementiert wurden, zeigten nach sechs Wochen Kultivierung einen deutlichen Unterschied im Phänotyp (Abbildung 24).

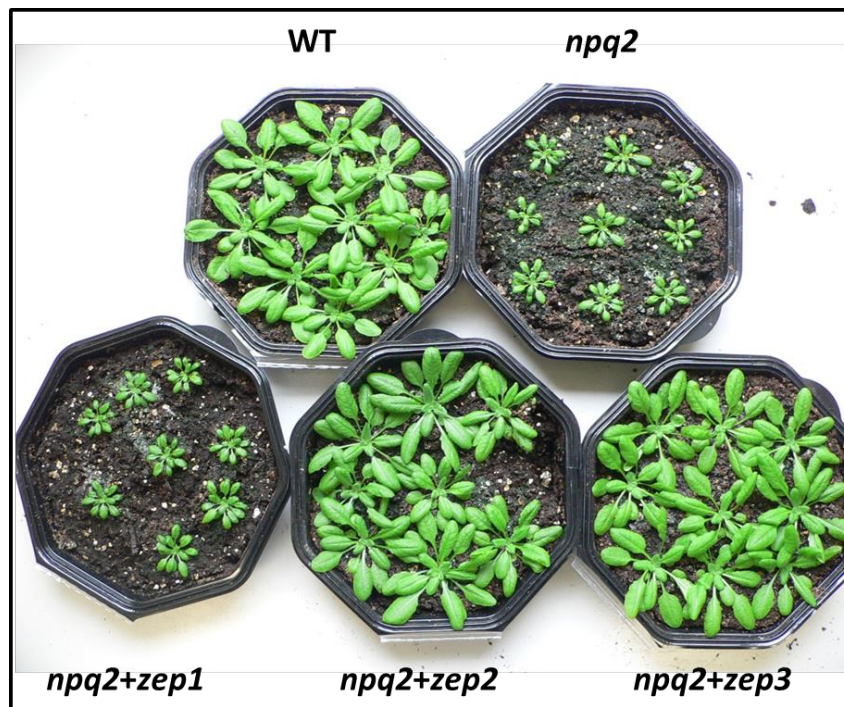


Abbildung 24: Phänotypen der *A. thaliana*-Linien. Gezeigt werden hier der WT, *npq2*-Mutante und die *npq2*-Transformanden (*npq2+zep1*, *npq2+zep2*, *npq2+zep3*) nach sechs Wochen Kultivierung. Die Samen wurden gleichzeitig ausgesät und anschließend für zwei Tage bei 4 °C ins Dunkle gestellt, bevor sie bei Standardkulturbedingungen (3.2.2) kultiviert wurden.

Die *npq2*-Mutante von *A. thaliana* weist im Vergleich zum WT ein deutlich vermindertes Wachstum auf. Während nach der Transformation (Komplementation) der *npq2*-Mutante mit dem *zep2*- und 3-Konstrukt die komplementierten Transformanden phänotypisch wieder wie der WT aussehen, zeigt die mit dem *zep1*-Konstrukt komplementierte Transformante ein deutlich vermindertes Wachstum und sieht aus wie die *npq2*-Mutante.

4.2.2 Genetische Integration

Von allen Linien wurden DNA-Proben (3.3.1.2) genommen, um die genetische Integration der Konstrukte ins Genom mittels PCR nachzuweisen.

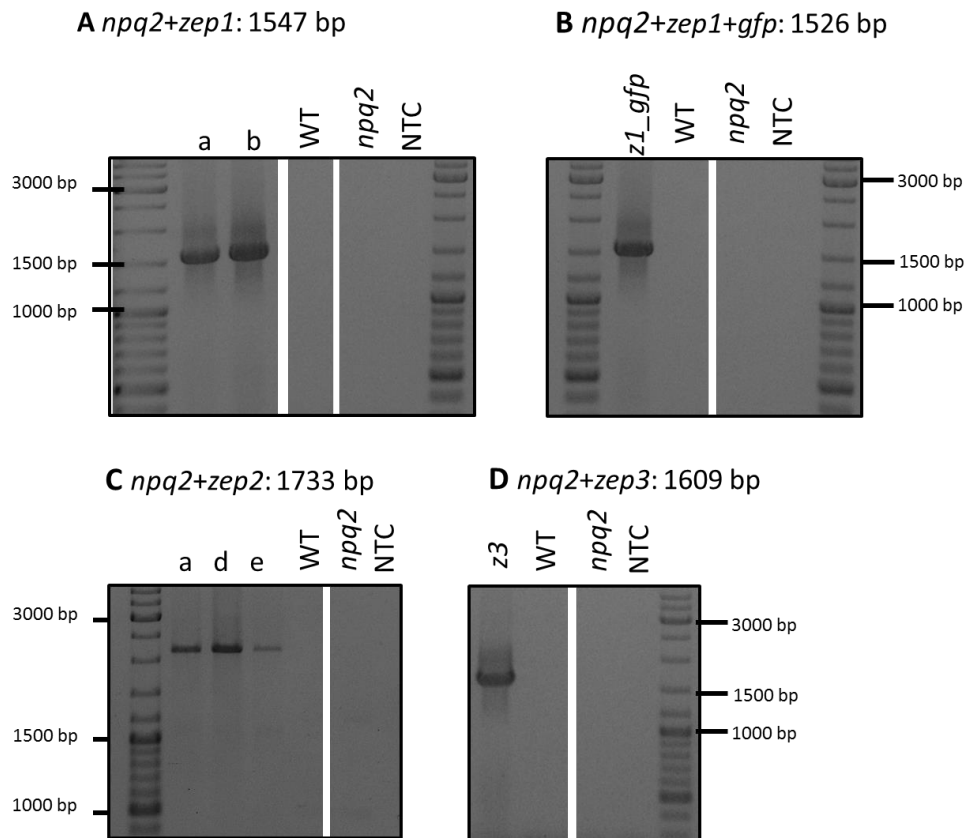


Abbildung 25: Genetischer Nachweis der *A. thaliana*-Transformanden.

Das 1 % ige Agarosegel zeigt die Integration von *zep1*, 2 und 3 ins Genom der *npq2*-Mutanten. **A** *npq2+zep1* mit 1547 bp, **B** *npq2+zep2* mit 1733 bp, **C** *npq2+zep3* mit 1609 bp. In **A**, **B**, **C** und **D** wurde zusätzlich jeweils noch eine Kontrolle durchgeführt mit der entsprechenden Primerkombination für WT, *npq2* sowie eine NTC (=no template control, Probe ohne DNA). Die Primer und Programme sind Tabelle 33 und Tabelle 13 zu entnehmen.

Die genetische Integration der Konstrukte für die *zep1*-, 2- und 3-Sequenzen konnte über PCR nachgewiesen werden (Abbildung 25). Die verwendeten genspezifischen Primerkombinationen hierfür waren *Ptzep1_pG_f/r*, *Ptzep2_pG_f/r* und *Ptzep3_pG_f/r*. In Abbildung 25 **A-D** zeigt sich bei den komplementierten Transformanden für alle drei Konstrukte ein Signal für die entsprechende Größe des Konstruktes, während in den Kontrollen beim WT, *npq2* und NTC kein Signal vorhanden ist. Für die *zep1*-Transformanden konnte für zwei unabhängige Linien (a, b) die genetische Integration des Konstruktes bei einer Größe von 1547 bp und für die *zep1_gfp*-Transformanden bei einer Linie ein Signal bei 1526 bp nachgewiesen werden. Bei den *zep2*-Transformanden konnte für drei unabhängige Linien (a, d, e) ein Signal mit der Größe

von 1733 bp detektiert werden, wohingegen für das *zep3*-Konstrukt nur bei einer Transformande das gewünschte Signal bei 1609 bp erzielt wurde.

4.2.3 Pigmentanalyse

Nachdem der Nachweis über die Integration der *zep-1*, *2*- und *3*-Sequenzen in das Genom der *npq2*-Mutante (Abbildung 25) erbracht werden konnte, wurden die verschiedenen Linien hinsichtlich ihres Carotinoidgehalts analysiert. Hierfür wurden die Pigmente aus sechs Wochen alten *A. thaliana*-Linien isoliert (3.3.5) und mit Hilfe der HPLC (3.8.3) analysiert. Bestimmt wurde hierbei der Pigmentgehalt pro g Trockengewicht.

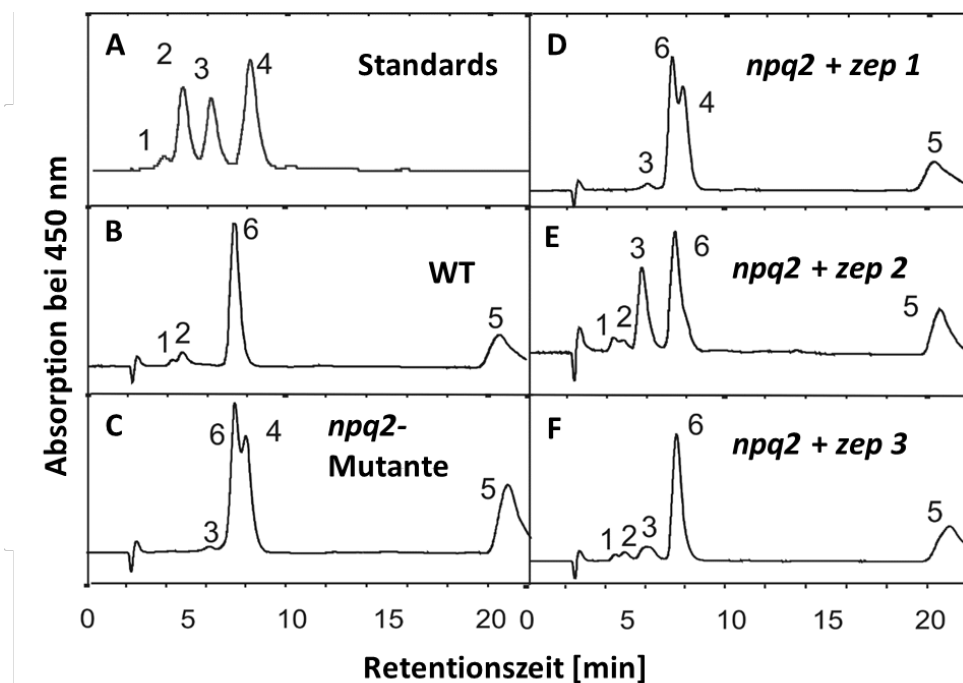


Abbildung 26: Identifizierung der Carotinoide in den verschiedenen *A. thaliana*-Linien bei 450 nm mit der HPLC.

Die Proben wurden von sechs Wochen alten Pflanzen entnommen. **A** Pigmentstandard, **B** WT, **C** *npq2*, **D** *npq2+zep1*, in **E** *npq2+zep2*, in **F** *npq2+zep3*. Mit den Carotinoiden: 1=Neoxanthin; 2=Violaxanthin; 3=Antheraxanthin; 4=Zeaxanthin; 5= β -Carotin; 6=Lutein. Die spezifischen Absorptionsmaxima und Retentionszeiten sind der Tabelle (8.4) im Anhang zu entnehmen.

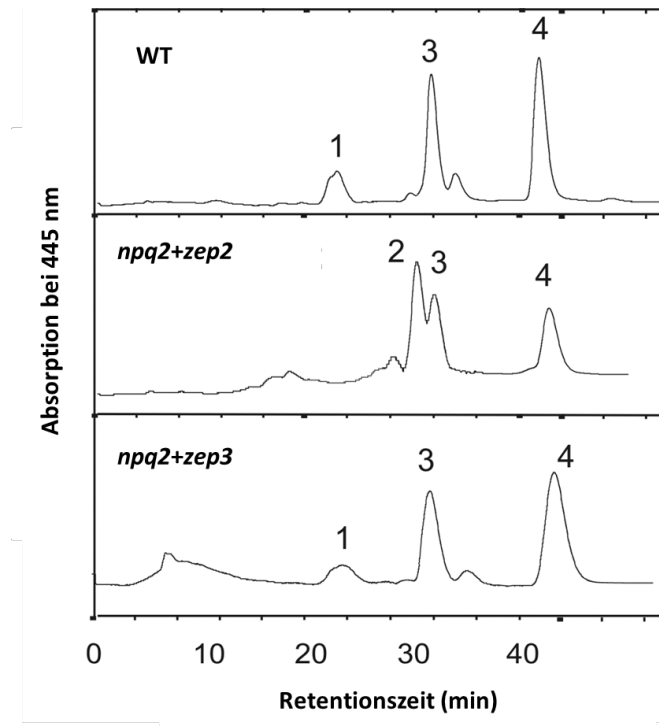


Abbildung 27: Chromatogramm zur Trennung der Pigmente Antheraxanthin und Lutein-5,6-Epoxid.
 Von oben nach unten sind die Linien WT, *npq2+zep2* und *npq2+zep3* dargestellt. Mit den Carotinoiden: 1=Violaxanthin; 2=Lutein-5,6-Epoxid; 3=Antheraxanthin; 4=Lutein.

In Abbildung 26 sind die Chromatogramme der HPLC-Analysen der *A. thaliana*-Linien, welche im Vergleich zum WT und der *npq2*-Mutante im Rahmen der funktionellen Charakterisierung durchgeführt wurden, dargestellt. Die genauen Werte der HPLC-Analysen können Tabelle 30 entnommen werden. Wie man bei dem Vergleich zwischen WT (Abbildung 26 B) und *npq2*-Mutante (Abbildung 26 C) sehen kann, weist der WT im Chromatogramm zum Teil andere Peaks auf als die *npq2*-Mutante. Gemeinsam haben sie Peak 5 und 6, das heißt β -Carotin und Lutein. Bei dem WT können Peak 1 und Peak 2 bei einer Retentionszeit von 3,9 Minuten bzw. 4,2 Minuten detektiert werden, im Gegensatz zur *npq2*-Mutante die diese Peaks nicht zeigt. Peak 1 und 2 lassen sich auf die Pigmente Neoxanthin und Violaxanthin zurückführen. Bei der *npq2*-Mutante hingegen lassen sich die Pigmente Antheraxanthin (Peak 3) und Zeaxanthin (Peak 4) detektieren, die bei dem WT nicht gefunden werden.

In Abbildung 26 D ist das Chromatogramm der *zep1*-Transformante zu sehen, welches dem der *npq2*-Mutanten ähnelt. Sowohl Neoxanthin als auch Violaxanthin konnten nicht detektiert werden. Hingegen wurden hier wie in der *npq2*-Mutante Anthera- und Zeaxanthin detektiert. In den *zep2*-Transformanden kann kein Zeaxanthin ausgemacht werden. Peak 3 (Abbildung 26 E) liegt hier im Vergleich zu allen anderen Linien deutlich erhöht vor. Dieses Phänomen lässt sich auch Tabelle 30 entnehmen. Durch weitere HPLC-Analyse in einem anderen System konnte bei Peak 3 Antheraxanthin von Lutein-5,6-Epoxid getrennt werden. Es konnte gezeigt

werden, dass sich dieser Peak aus den Pigmenten Antheraxanthin und Lutein-5,6-Epoxid im Verhältnis 41,2 zu 58,8 % zusammensetzt (Abbildung 27).

Das Chromatogramm in Abbildung 26 F für die *zep3*-Transformande zeigt dieselben Peaks wie bei der *zep2*-Transformande. Auch hier sind die Peaks 1, 2, 3, 5 und 6 vorhanden, allerdings liegt Antheraxanthin in viel geringerer Konzentration vor als bei der *zep2*-Transformande (Tabelle 30). Es konnte für Peak 3 kein zusätzliches Lutein-5,6-Epoxid detektiert werden, so dass ausschließlich Antheraxanthin für die Pigmentkonzentration verantwortlich sein muss.

Anthera- und Violaxanthin sind in der Biosynthesekette direkte Produkte der Zeaxanthin-Epoxidase. Inzwischen konnte auch Neoxanthin als direktes Produkt nach Violaxanthin identifiziert werden (Dambeck et al., 2012).

Tabelle 30: Carotinoidgehalt der untersuchten *A. thaliana*-Linien.

Aufgeführt sind die Werte des Carotinoidgehalts [mg/g TG] von WT, *npq2*-Mutante und den Transformanden *zep1*, 2 und 3. Nx=Neoxanthin; Vx=Violaxanthin; Ax=Antheraxanthin; Lut=Lutein; Zx=Zeaxanthin; β C= β -Carotin. a)=Antheraxanthin plus Lutein-5,6-Epoxid im Verhältnis von 41,2 versus 58,8 %.

Linie	Nx	Vx	Ax	Lut	Zx	β C
WT	20,8+2,7	71,3+9,2	12,1+1,6	612,0+78,5	0	378,4+48,5
<i>npq2</i>	0	0	26,0+1,1	474,0+17,6	431,6+16,1	388,5+34,0
<i>zep1</i>	0	0	28,6+1,1	606,9+76,5	551,6+69,6	599,8+75,6
<i>zep2</i>	16,1+1,4	36,2+3,3	503,5+45,7 ^{a)}	52,4+4,7	0	418,1+18,3
<i>zep3</i>	29,8+4,5	50,5+8,5	53,5+6,3	603,2+100,9	0	453,8+65,9

Insgesamt wird aus Tabelle 30 nochmal deutlich, dass besonders die *npq2*-Mutante und die *zep1*-Transformande einen hohen Zeaxanthingehalt haben, hingegen kein Neo- und Violaxanthin detektiert werden konnte. Die *zep1*-Transformande verhält sich damit wie die *npq2*-Mutante, die ein starkes Defizit in der *Arabidopsis*-eigenen Zeaxanthin-Epoxidase hat.

Bei den *zep2*- und *zep3*-Transformanden konnte wie im WT sowohl Neoxanthin als auch Violaxanthin detektiert werden. Bei der *zep2*-Transformande fällt der stark erhöhte Antheraxanthingehalt auf, welcher sich aus zwei Pigmenten (Antheraxanthin und Lutein-5,6-Epoxid) zusammensetzt. Auch bei der *zep3*-Transformande ist eine deutlich höhere Menge an Antheraxanthin vorhanden, jedoch ist hier kein Lutein-5,6-Epoxid detektierbar. Diese Ergebnisse zeigen die Funktionalität der Zeaxanthin-Epoxidase 2 und 3 aus *P. tricornutum*.

Zusätzlich wird anhand der Tabelle deutlich, dass die Menge von Lutein und Antheraxanthin konträr zueinander ist. Ist eine hohe Konzentration von Lutein vorhanden, so lässt sich eine geringere Menge von Antheraxanthin detektieren und umgekehrt.

4.2.4 Fluoreszenz-Messungen (F_v/F_m und NPQ)

Nachdem die Analyse über die Bildung der Pigmente in den *zep*-durchgeführt war, wurden die Transformanden auf ihre nicht photochemische Löschung (NPQ, non photochemical quenching) untersucht (3.8.5). Hierfür wurden die Pflanzen in gleichem Maße kultiviert (3.2.2) und vorab eine gleichzeitige Keimung induziert. Die Fluoreszenzen der verschiedenen Linien von *A. thaliana* (WT; *npq2*; *zep1*-, 2- und 3-Transformanden) wurden nach sechs Wochen mittels FluorCam 800 M (3.8.5) gemessen, um das NPQ bestimmen zu können. Zudem wurde bei allen zu untersuchenden Linien zusätzlich die Effizienz des Photosystems II über den F_v/F_m -Wert ermittelt, welche als Maß für die Vitalität der Pflanzen herangezogen werden kann.

Alle zu untersuchenden Pflanzen befanden sich zum Zeitpunkt der Messung bei guter Vitalität. Die *npq2*-Mutanten aber auch die Transformanden unterscheiden sich kaum bis gar nicht vom WT. Bei höheren Pflanzen wird ein F_v/F_m -Wert von $\sim 0,79$ als vital bezeichnet, das heißt in diesem Zustand sind keine erheblichen Stressfaktoren zu verzeichnen. Die in dieser Arbeit gemessenen F_v/F_m -Werte liegen bei 0,76 bis 0,79.

Tabelle 31: Gemittelte F_v/F_m -Werte der analysierten *A. thaliana* Pflanzen.

In **A**, **B**, **C** ist jeweils der WT und die *npq2*-Mutante mit zusätzlich je einer der Transformande mit *zep1*, *zep2* oder *zep3* vorgestellt ($n=3\pm SD$).

A.th. Linie	F_v / F_m
A WT	0,78 \pm 0,02
<i>npq2</i>	0,78 \pm 0,01
<i>npq2 + zep1</i>	0,78 \pm 0,01
B WT	0,77 \pm 0,01
<i>npq2</i>	0,78 \pm 0,01
<i>npq2 + zep2</i>	0,76 \pm 0,01
C WT	0,78 \pm 0,01
<i>npq2</i>	0,79 \pm 0,01
<i>npq2 + zep3</i>	0,76 \pm 0,02

Die NPQ-Messungen spiegeln die Ergebnisse der Komplementation wieder. Die drei unabhängig voneinander gemessenen Werte des WT zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf (Abbildung 28 A, B und C). Mit Beginn der aktinischen Lichtphase ist mit dem ersten sättigenden Puls ein Anstieg im NPQ zu verzeichnen. Die anschließend gesetzten sättigenden Lichtimpulse bewirken einen stetigen Anstieg des NPQs, bis ein Maximum nach 70 Sekunden erreicht wird. Die Induktionsphase des NPQs ist bei der Zeaxanthin-akkumulierenden *npq2*-Mutante erwartungsgemäß höher und schneller als beim WT. Die nach 70 Sekunden beginnende Relaxationsphase, in der das aktinische Licht fehlt, bewirkt einen Rückgang des NPQ-Kurvenverlaufs. Der Rückgang ist dabei im WT deutlich schneller als bei der *npq2*-Mutante. Hier ist ein langsames sukzessives Absinken des NPQ zu beobachten. In Abbildung 28 A wird der NPQ von WT und *npq2*-Mutante vergleichend zur komplementierten *zep1*-Transformante dargestellt. Die Induktionskinetik der *npq2*-Mutante und der *zep1*-Transformante verläuft hier fast identisch. Die *zep1*-Transformante zeigt einen steilen Anstieg der NPQ-Werte zu Beginn der aktinischen Lichtphase und einen nur schwachen Rückgang mit Einsetzen der Relaxationsphase.

Betrachtet man hingegen in Abbildung 28 B den NPQ der verschiedenen *A. thaliana*-Linien, so ist ein klarer Unterschied zwischen der *zep2*-Transformante und den Vergleichslinien WT und *npq2*-Mutante zu erkennen. Die *zep2*-Transformante weist das geringste NPQ auf. Mit dem Einsetzen der sättigenden Lichtimpulse in der aktinischen Lichtphase ist nur ein schwacher Anstieg im NPQ zu verzeichnen, der im weiteren Verlauf deutlich unter den Werten des NPQs des WT bleibt. Entsprechend ist auch der Rückgang mit Beginn der Relaxationsphase deutlich geringer.

Auch nach der Komplementation mit *zep3* ist eine veränderte NPQ-Kinetik (Abbildung 28 C) zu erkennen. Während mit beginnender Lichtphase die *zep3*-Transformante noch einen steilen Anstieg im Kurvenverlauf aufweist, wird in der Relaxationsphase das unterschiedliche Quenchverhalten im Gegensatz zur *npq2*-Mutante sichtbar. Hier ist ein schneller und steiler Rückgang des Kurvenverlaufes zu sehen. Dieses Ergebnis zeigt sich rechts in der fotografischen Abbildung 28 C1, bei dem WT und die *zep3*-Transformante ähnlich grün-türkis erscheinen, während die *npq2*-Mutante eher einen gelblich-orangen Farbton einnimmt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei der NPQ-Induktion deutliche Unterschiede festzustellen sind. Besonders die *zep2*-Transformante zeigt im Vergleich zur *npq2*-Mutante eine deutlich langsamere Induktion. Das NPQ dieser Transformante weist eine sehr geringe Intensität, welche deutlich unter dem WT liegt, auf. Bei der *zep3*-Transformante liegt die Induktion ebenso wie die NPQ-Intensität zwischen WT und *npq2*-Mutante. Insgesamt kommt

das NPQ der *zep3*-Transformante dem des WT am nächsten. Die mit *zep1* komplementierte Transformante hingegen bleibt mit ihrem NPQ auf dem Niveau der *npq2*-Mutante.

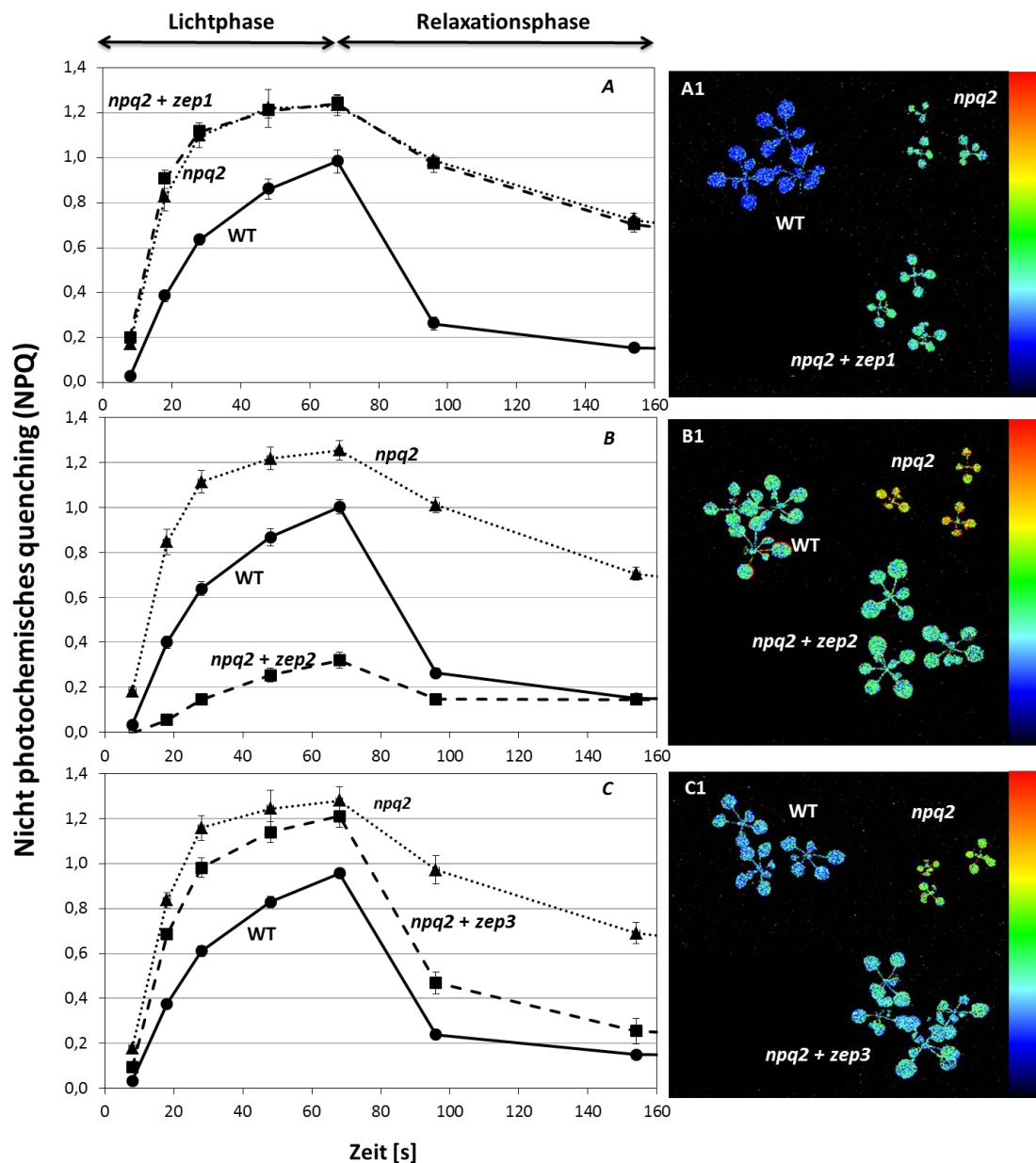


Abbildung 28: NPQ-Messungen der *A. thaliana*-Linien.

In **A**, **B** und **C** ist in der linken Hälfte jeweils der gemittelte NPQ über insgesamt 160 Sekunden dargestellt (70 Sekunden mit aktinischem Licht, 90 Sekunden Relaxationsphase). Der WT ist in einer durchgezogenen Linie, die *npq2*-Mutante in einer gepunkteten Linie dargestellt. Weiter ist die *npq2*-Transformante mit *zep1* in **A**, mit *zep2* in **B** und mit *zep3* in **C** in einer gestrichelten Linie dargestellt. Auf der rechten Seite ist jeweils beispielhaft das zugehörige Bild des NPQs am Ende der aktinischen Lichtphase dargestellt **A1**, **B1**, **C1**. Hier ist jeweils eine Transformante exemplarisch dargestellt. Die für 15 Minuten dunkeladaptierten Pflanzen wurden mit Messlicht bestrahlt, um die Grundfluoreszenz zu bestimmen, gefolgt von einem sättigenden Lichtpuls, welcher die Maximalfluoreszenz bewirkt. Anschließend erfolgte für 70 Sekunden die Bestimmung des NPQ mit aktinischem Licht $500 \mu\text{m} \text{ Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und der Relaxation im Dunkeln für 90 Sekunden ($n \geq 6$ MW \pm SD).

4.2.5 Transkriptanalysen

Auf molekularer Ebene wurde das Transkriptionslevel der in die *npq2*-Mutanten eingebrachten *zep1*-, *2*- und *3*-Konstrukte aus *P. tricornutum* mit dem von WT und der *npq2*-Mutante über qrtPCR verglichen. Da sich während dieser Analyse zeigte, dass sowohl im WT, in der *npq2*-Mutante und den entsprechenden komplementierten Transformanden die RNA der eigenen *zep* von *A. thaliana* auf gleichem Niveau transkribiert wird (Ergebnisse nicht gezeigt), wurde die Transkription von *zep* aus *A. thaliana* als Vergleichswert (Haushaltsgen) herangezogen. Alle Analysen wurden in biologischen Triplikaten erstellt (n=3). Die Primereffizienzen wurden ermittelt und wie folgt festgehalten: *Atzep*: 87,9 %, *Ptzep1*: 83,9 %, *Ptzep2*: 85,7 % und für *Ptzep3*: 100 %.

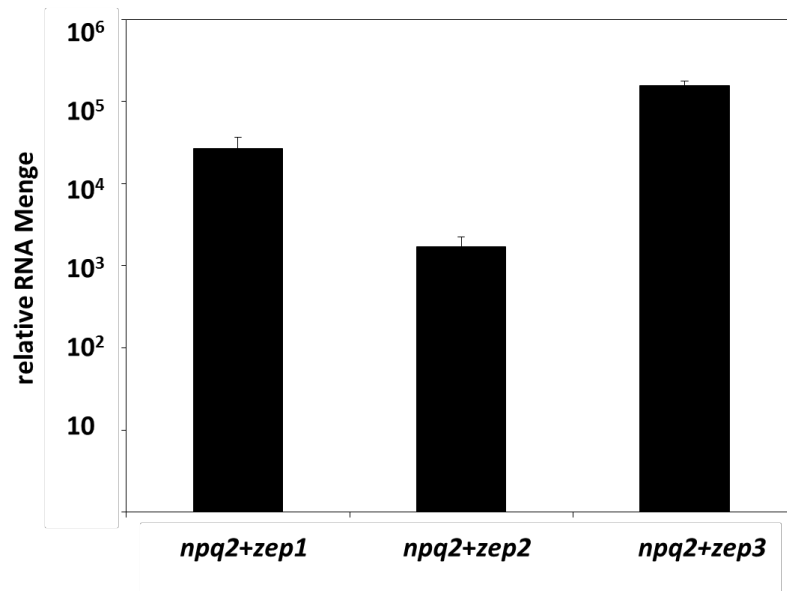


Abbildung 29: Gemittelttes Transkriptionslevel der komplementierten *npq2*-Mutanten. Normiert wurde auf *zep* von *A. thaliana* (n=3 MW±SD).

Die Analysen der RNA-Mengen der in die *npq2*-Mutanten eingebrachten Konstrukte für *zep1*, *2* und *3* zeigen, dass auf dieser Ebene alle drei Konstrukte detektiert werden können. In WT und *npq2*-Transformante konnte keines der eingebrachten Konstrukte detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Transkriptionslevel von *zep1* wurde zwischen dem Transkriptionslevel von *zep2* und *zep3* (Abbildung 29) detektiert. *Zep3* hat mit etwa 156'000 die eindeutig höchste RNA-Menge aufzuweisen und liegt damit 160x häufiger vor als *zep2*.

4.2.6 Zelluläre Lokalisation und Expression in Wildtyp-Protoplasten

Da der funktionelle Nachweis des *zep1*-Konstruktes ausblieb, wurden der Import in den Chloroplasten und die Expression mittels GFP-Markierung zusätzlich überprüft. WT

Protoplasten wurden hierfür transient transformiert und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (3.8.6) untersucht.

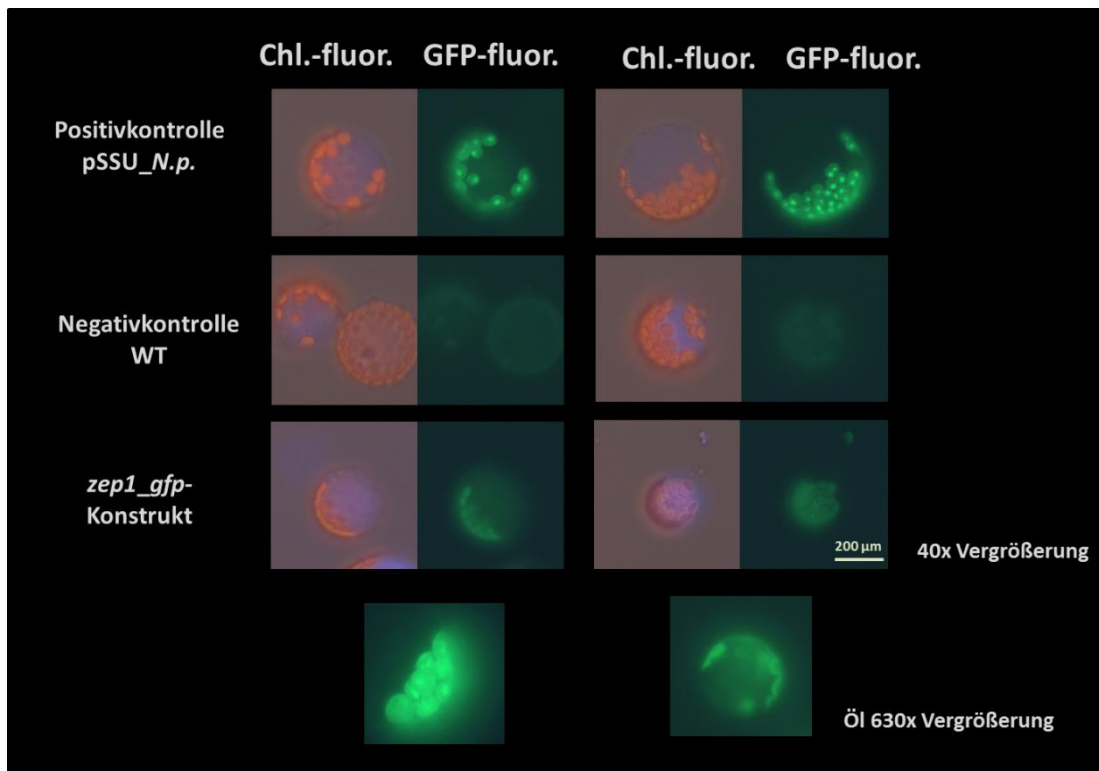


Abbildung 30: Zelluläre Lokalisation und Expression des *zep1_gfp*-Konstruktes aus *P. tricornutum* in WT Protoplasten von *A. thaliana*.

Von oben nach unten mit 40x Vergrößerung: Positivkontrolle *pssU_N.p.*=kleine RubisCO-Untereinheit von *Nicotiana plumbaginifolia* bereitgestellt von B. Tillmann (Goethe-Universität Frankfurt, AK Schleiff). Negativkontrolle WT=nicht transformierte Protoplasten. Das zu untersuchende Konstrukt von *zep1* ist in einem weiteren Bild auch mit Öl-Dispersion 630x vergrößert in der untersten Reihe dargestellt. Von links nach rechts ist zwei Mal in Folge nacheinander der Protoplast mit seinen Chloroplasten in unterschiedlichen Bildern dargestellt - jeweils einmal in rot fluoreszierend mit der Chlorophyll-Eigenfluoreszenz und anschließend in grün die zugehörige GFP-Fluoreszenz.

In den Reihen der Chlorophylleigenfluoreszenz lassen sich bei allen untersuchten Proben (Positiv- und Negativkontrolle sowie *zep1_gfp*) die Chloroplasten durch die rote Autofluoreszenz deutlich erkennen und damit innerhalb der Protoplasten lokalisieren. In der jeweils darauffolgenden Reihe der GFP-Fluoreszenz kann daher die Lokalisation der exprimierten Genprodukte innerhalb oder außerhalb der Chloroplasten identifiziert werden. Die mikroskopische Analyse der zellulären Lokalisation bzw. Expression der mit der Sequenz für GFP markierten Konstrukte zeigt im Falle der Positivkontrolle eine starke GFP-Fluoreszenz innerhalb der Chloroplasten (Abbildung 30). Für die Negativkontrolle ist ein sehr schwaches Signal ebenfalls innerhalb der Chloroplasten zu erkennen, welches sich durch die Eigenfluoreszenz erklären lässt. Im Falle des exprimierten *zep1_gfp*-Konstruktes ist ein deutliches GFP-Fluoreszenzsignal im Chloroplasten zu erkennen.

4.2.7 Strukturmodelle der Zeaxanthin-Epoxidasen 1, 2 und 3

Die vier generierten Proteinmodelle der Zeaxanthin-Epoxidasen zeigen eine Struktur aus einem α -Helixbündel (blau, orange und gelb), das durch konische β -Faltblätter (grün) unterbrochen wird (Abbildung 31), welche eine hypothetische Substratbindetasche bilden könnten. Die hypothetischen Modelle ähneln der Faserstruktur der Lipokalinproteine. Coesel et al. (2008) ordnen die drei Zeaxanthin-Epoxidasen aufgrund ihrer Funktion den Monooxygenasen zu, welche putative Lipokalinmotive besitzen. Konservierte und divergierende Bereiche innerhalb der Sequenzen der Lipokalinmotive der Zeps von *P. tricornutum* können Coesel et al. (2008) entnommen werden. Neben der konischen Struktur der β -Faltblätter weisen die ermittelten Proteinmodelle weitere Gemeinsamkeiten auf. So zeigt sich, dass bei Zep2 und 3 sowie bei AtZep am C-Terminus jeweils eine α -Helix (rot) zu erkennen ist, welche in Zep1 fehlt. Interessanterweise liegt bei Zep2 und Zep3 diese C-terminale α -Helix vor der von den β -Faltblättern geformten potentiellen Substratbindestellen, während der C-Terminus darüber hinausragt. Bei AtZep ist der C-Terminus unterhalb der Höhle zu finden, während er bei Zep1 seitlich an dieser potentiellen Substratbindestelle endet.

Eine weitere Gemeinsamkeit ist eine Ansammlung von β -Faltblättern im oberen rechten Ende der Strukturen. Der N-Terminus der vier Proteinmodelle wird von einer Schleifen-Helix Region (dunkelblau) gebildet, gefolgt von drei kürzeren α -Helices (blau) im oberen linken Bereich.

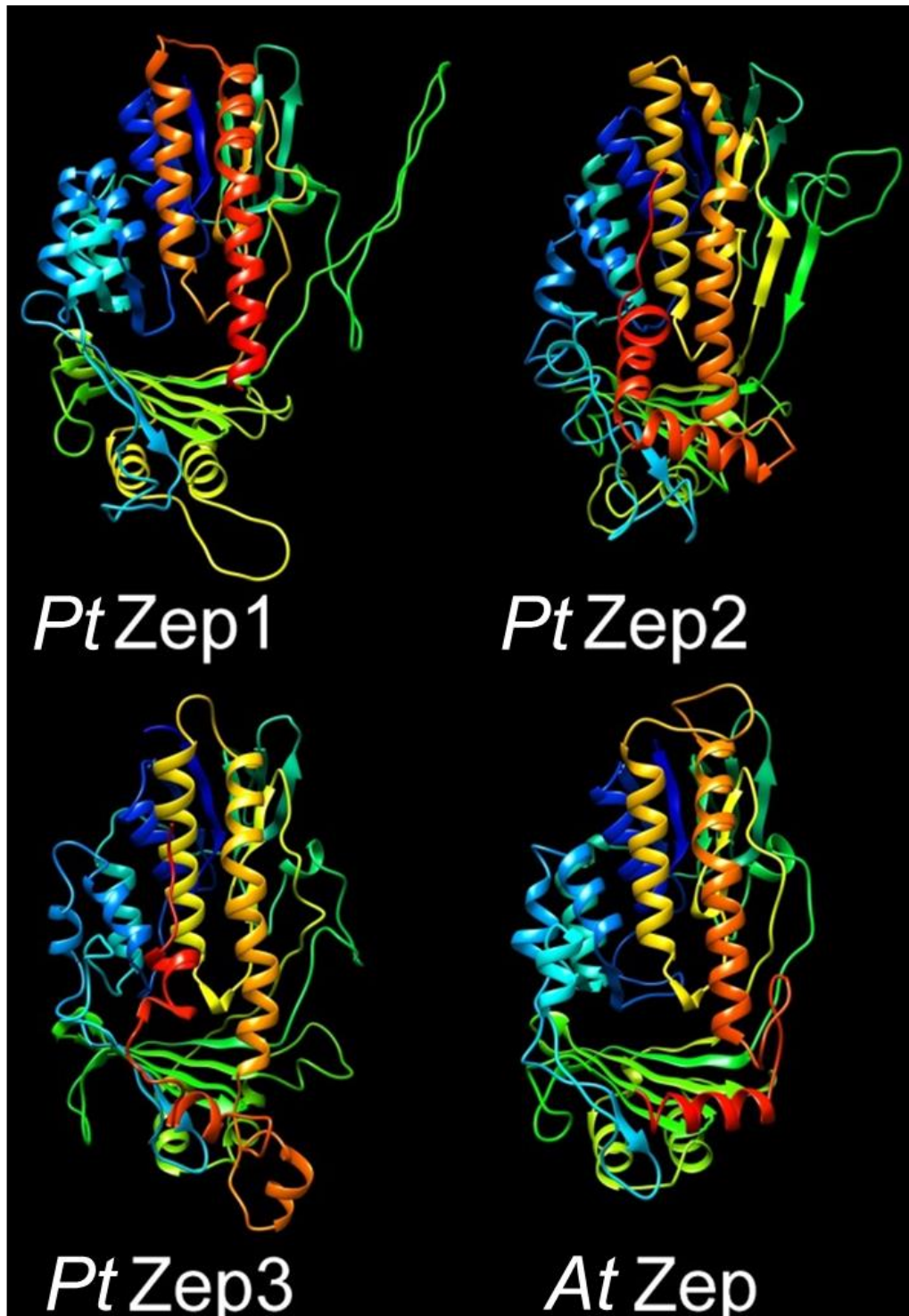


Abbildung 31: Dreidimensionale Proteinmodelle von Zep1, 2 und 3 aus *P. tricornutum* im Vergleich zur Zep aus *A. thaliana* (*AtZep*).

In dunkelblau ist in allen Strukturen das N-terminale Ende und in rot das C-terminale Ende dargestellt. Die β -Faltblätter sind in grün dargestellt, sie bilden eine konische Substratbindetasche.

4.2.8 Diurnale Expression von *zep1*, *2* und *3* in *P. tricornutum*

Um das Expressionsverhalten der drei Genkopien *zep1*, *2*, *3* aus *P. tricornutum* nachvollziehen zu können, wurden Kulturen sieben Tage angezogen, bevor die Expression innerhalb eines Tagesganges zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert wurde (Probenentnahmen und RNA-Isolation siehe 3.3.3). Die Transkriptomanalyse erfolgte dabei mittel Duplex-PCR (3.5.4) mit genspezifischen Primerkombinationen für die cDNA von *zep1*, *2*, *3* (Tabelle 33) und für das *Histon-Gen h4*, welches als Referenz verwendet wurde. Die Ergebnisse wurden anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image J (3.8.1) analysiert. Parallel dazu wurden Kontrollen mit entsprechenden RNA-Proben (noRT) durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt), die frei von genomischer DNA waren.

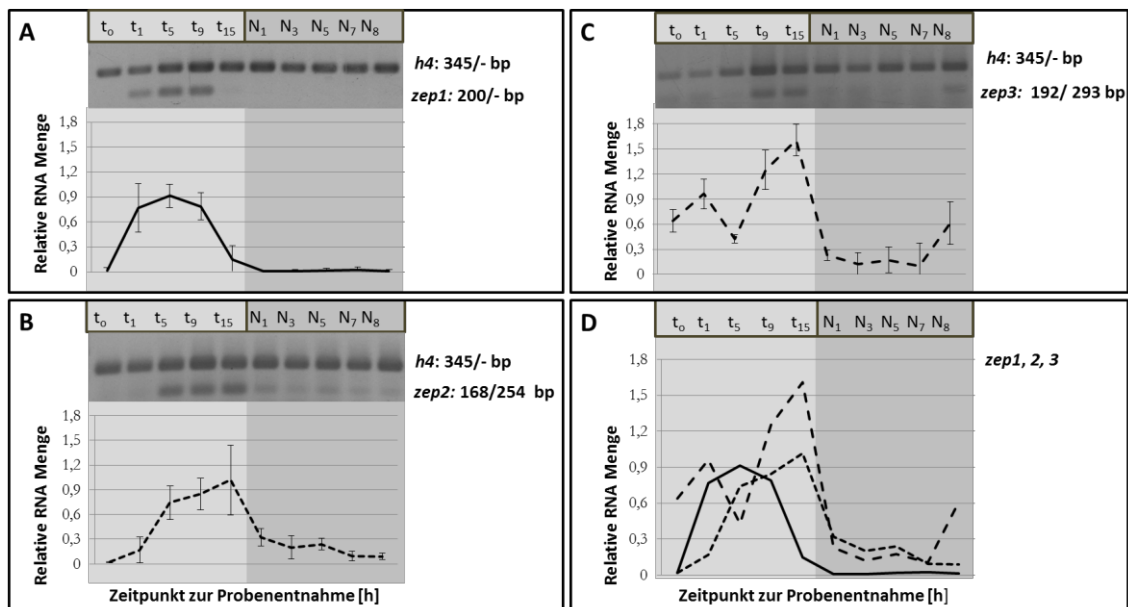


Abbildung 32: Diurnale Expression von *zep1*, *2* und *3* auf Transkriptebene von *P. tricornutum* WT.

In **A** für *zep1*, **B** für *zep2*, **C** für *zep3* ist jeweils beispielhaft ein Duplex-PCR-Lauf (3.5.4) auf einem 1 % Agarosegel dargestellt und darunter die Auswertung der relativen Expressionslevel auf *Histon h4* genormt mit Hilfe von Image J (n=3 MW±SD). Je 40 ml Probe wurden innerhalb eines Tagesganges zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, RNA isoliert, cDNA synthetisiert und diese für die Duplex-PCR (3.5.4) verwendet: Beginn der Belichtungsphase (t₀), nach einer Stunde (t₁), drei Stunden (t₃), fünf Stunden (t₅), neun Stunden (t₉) und nach 15 Stunden am Ende der Lichtexpositionsphase (t₁₅). Während der Dunkeladaption erfolgte eine Probenentnahme nach einer (t_{1N}), nach drei (t_{3N}), nach fünf (t_{5N}), nach sieben (t_{7N}) und nach acht Stunden (t_{8N}) Dunkelphase. **Abb. D** zeigt die ermittelte Expression der drei vorhandenen *zeps* im Tagesverlauf von *P. tricornutum* zusammen. *h4*=Histon ohne Intron 345 bp. *zep1*=200 bp (besitzt kein Intron); *zep2*=ohne Intron 192 bp/mit Intron 293 bp; *zep3*=ohne Intron 169 bp/mit Intron 254 bp.

Die Expressionslevel der *zep1*, *2*, *3* zeigen alle drei eine ähnliche Tendenz: in der Belichtungsphase (tagsüber) findet eine Hochregulation der Expression mit unterschiedlichen

Höhepunkten statt und in der Dunkelpphase (nachts) wird die Expression weitestgehend reduziert (Abbildung 32 **D**).

Das Expressionslevel von *zep1* zeigt tagsüber den klassischen Verlauf einer Normalverteilung, wie sie für die Gaußkurve charakteristisch ist (Abbildung 32 **A**). Bereits eine Stunde nach Lichtexposition steigt das Expressionslevel auf einen relativen RNA-Gehalt von $\sim 0,8$ an, um vier Stunden später, also nach fünf Stunden Lichtexposition, auf ein Maximum von $\sim 0,9$ zu steigen. Nach neun Stunden sinkt das Expressionslevel wieder ab ($\sim 0,8$) und fällt nach 15 Stunden Belichtung fast auf seinen Ursprungswert zu Beginn der Lichtphase ($\sim 0,15$). In den folgenden acht Stunden Dunkelpphase bleibt die Expression von *zep1* auf einem Minimum, das erst wieder eine Stunde nach Belichtung ansteigt.

Das Expressionslevel von *zep2* (Abbildung 32 **B**) steigt zu Beginn der Lichtphase deutlich langsamer als bei *zep1*. Erst fünf bis neun Stunden nach Lichtexposition (t_5/t_9) liegt hier das Transkriptionslevel bei $\sim 0,8$ und steigt anschließend nach 15 Stunden auf ein Maximum von $\sim 1,0$. Anschließend kommt es in der Dunkelpphase zu einer Reduktion des Transkriptionslevels auf $\sim 0,3$ und die RNA-Menge sinkt im Laufe der Nacht allmählich weiter, bis sie nach acht Stunden Dunkelheit etwa den Ausgangswert von t_0 erreicht hat.

Das Transkriptionslevel von *zep3* (Abbildung 32 **C**) weist zu Beginn der Lichtphase t_0 schon eine deutlich höhere Menge an RNA auf ($\sim 0,8$) als bei *zep1* und *zep2*. Nach einer Stunde ist ein leichter Anstieg der Transkriptionsmenge zu verzeichnen, gefolgt von einem deutlichen Abfall nach fünf Stunden auf einen Wert von $\sim 0,45$. Innerhalb der nächsten beiden Zeitpunkte während der Belichtungsphase (t_9, t_{15}) erreicht das Transkriptionslevel sein Maximum von $\sim 1,6$, um dann zur Dunkelpphase drastisch abzufallen ($N1 \approx 0,2$). Von nun an pendelt sich ein weitestgehend konstantes Niveau der RNA-Menge ein, bis es nach acht Stunden Dunkelheit erneut zu einer Erhöhung des Transkriptionslevel kommt ($\sim 0,6$).

Die in Abbildung 32 **D** übereinander gelegten Verläufe der drei Expressionsraten innerhalb eines Tagesganges zeigen unterschiedliche zeitabhängige Maxima der RNA-Menge in der Lichtphase. Es zeigt sich, dass *zep1* bereits nach fünf Stunden Lichtexposition eine deutliche Hochregulation auf sein Maximum erfährt, während *zep3* hier sogar erstmals in seinem RNA-Level absinkt. *Zep2* und *zep3* erreichen beide ihre Maxima erst nach 15 Stunden Lichtexposition, hier ist *zep1* bereits wieder auf seinen fast ursprünglichen Wert ganz zu Beginn der Lichtphase abgesunken. In der Dunkelpphase sind alle drei Kopien gering vorhanden, *zep2* und *zep3* geringfügig mehr als *zep1*. Nur *zep3* erfährt zum Ende der Nacht bereits eine Hochregulation.

4.3 Heterologe Expression der β -Carotin-Ketolase in *P. tricornutum*

Die Synthese von Astaxanthin in *P. tricornutum* sollte mittels heterologer Expression der β -Carotin-Ketolase (Bkt) aus *C. reinhardtii* untersucht werden. Um den Import in den Chloroplasten zu bewerkstelligen, wurden verschiedene Konstrukte getestet: ein Konstrukt ohne fusionierte Präsequenz und zwei Konstrukte mit Signal- und Transitpeptiden von der Fructose-1,6-Bisphosphat chloroplastidäre Aldolase 1 (FbaC1) und der chloroplastidären Carbo-Anhydrase1 (CA1) - je experimentell analysiert von Kilian und Kroth (2004) bzw. Tanaka et al. (2005). Die Präsequenz *FbaC1* wurde dabei in zwei unterschiedlichen Versionen verwendet (Tabelle 32 und im Anhang 8.5). Die Detektion von Astaxanthin über die HPLC blieb in allen Transformanden aus. Zur Klärung der ausbleibenden Astaxanthindetektion wurde ein zusätzliches Konstrukt, in welchem die Sequenz *bkt* mit der Sequenz für GFP markiert wurde, für Lokalisationsstudien herangezogen.

Tabelle 32: Übersicht über die verschiedenen Konstrukte zur Astaxanthinsynthese.

Verwendet wurden verschiedene Präsequenzen im Vektor pPha_NR. Die Präsequenz CA1 wurde zusätzlich in den GFP Vektor pPhaT_eGFP kloniert. FbaC1=Fructose-1,6-Bisphosphat chloroplastidäre Aldolase 1; CA1=chloroplastidäre Carbo-Anhydrase1.

Präsequenz (Signalpeptid/ Transitpeptid)	Vektor	Anzahl auf genetischer Ebene positiv identifizierter Transformanden	Astaxanthindetektion mittels HPLC
-	pPha_NR	1	-
<i>FbaC1_short</i> *	pPha_NR	4	-
<i>FbaC1_long</i> **	pPha_NR	5	-
<i>CA1</i>	pPha_NR	4	-
<i>CA1+gfp</i>	pPha_T_eGFP	1	-

* *FbaC1_short* genau am Übergang zum „mature-Protein“ nach 45 AS abgeschnitten und an *bkt* fusioniert → Sequenz siehe Anhang 8.5

** *FbaC1_long* mit 13 AS vom „mature-Protein“ des FbaC1, also insgesamt nach 58 AS und an *bkt* fusioniert → Sequenz siehe Anhang 8.5

4.3.1 Analyse der *bkt6*-Transformande

Da in keiner der transformierten Zellen Astaxanthin detektiert werden konnte, wurde die Transformande (*bkt6*) mit der mit *gfp* markierten *bkt*-Sequenz genauer untersucht.

CA1_bkt-Konstrukt für die ballistische Transformation und genetischer Nachweis

Abbildung 33 zeigt einen schematischen Ausschnitt aus dem Transformationsvektor für das mit GFP markierte CA1_bkt-Konstrukt. Die Kassette zur Expression des Konstruktes beginnt mit dem *fcpA*-Promoter. Dazwischen befindet sich die Präsequenz CA1, welche an die *bkt*-Sequenz fusioniert wurde. Anschließend kommt die Sequenz für die Expression des GFP Proteins. Die Kassette endet mit dem *fcpA*-Terminator. Abbildung 34 zeigt die gesamte Aminosäuresequenz beginnend mit dem Signal- und Transitpeptid CA1 fusioniert an Bkt und anschließend GFP.

→ pPhaT_CA1_bkt_gfp

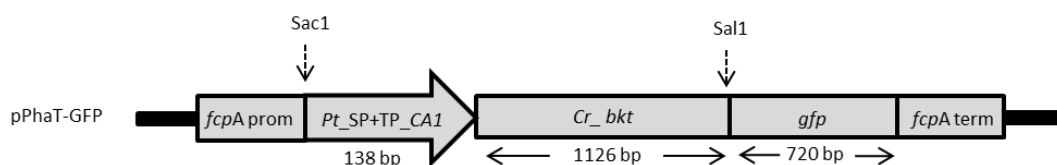


Abbildung 33: Übersicht über den Transformationsvektor für das mit *gfp* markierte CA1_bkt-Konstrukt.

Verwendet wurde der Vektor pPhaT_eGFP (Zaslavskaja et al., 2000), welcher mit einem *fcpA*-Promotor (prom) und –Terminator (term) ausgestattet ist. Über die mittels Primern hergestellten Schnittstellen SacI und SaltI wurde das PCR-Fusionsprodukt der Präsequenz CA1 aus *P. tricornutum* (*Pt*) und der *bkt*-Sequenz für die β -Carotin-Ketolase aus *C. reinhardtii* (*Cr*) in den Vektor eingebracht. Prom=Promotor; term=Terminator; *fcp*=Fucoxanthin-Chlorophyl-Bindeprotein.

> Peptidsequenz vom CA1_bkt_gfp-Konstrukt

MKFLSASIALACATSVEAFNANKAFRFGAKAMPEVSSSESATTALSMGPGIQPTSARPCS
 RTKHSRFALLAAALTARRVKQFTKQFRSRRMAEDILKLWQRQYHLPRESDKRTLRLRVH
 LYRPPRSDLGGIAVAVTVIALWATLFVYGLWVFKLPWALKVGETATSWATIAAVFFSLEF
 LYTGLFITTHDAMHGIALRNRRLNDFLGNLAISLYAWFDYSVLHRKHWEHNNHTGEPRV
 DPDFHRGNPNLAVWFAQFMVSYMTLNQFLKIAVWSNLLLLAGAPLANQLLFMTAAPILSA
 FRLFYGYVPHHPEKGHTGAMPWQVSRSSASRLQSFILCYHFDLHWEHHRWPYAPWWE
 LPKCRQIARGAALAVDMVSKGEELFTGVVPIVVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT
 LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD
 GNYKTRAEVKFEGLTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKV
 NFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLF
 VTAAGITLGMDELYK*

Abbildung 34: Verwendete Proteinsequenz für das Konstrukt pPhaT_CA1_bkt_gfp.

Die Peptidsequenz zeigt das Fusionsprodukt aus der Sequenz für das Transitpeptid CA1 mit der Sequenz für Bkt und dem darauffolgenden GFP aus dem pPhaT_eGFP-Vektor, welches zur ballistischen Transformation von *P. tricornutum* herangezogen wurde. In blau sind jeweils das Methionin der neuen Sequenz dargestellt. Rot hinterlegt ist der Aminosäureaustausch (Serin S220 → Asparagin N220) innerhalb des Bkts. In grün ist das GFP gezeigt. Das Sternchen markiert das Ende der Sequenz.

Nach der Transformation von *P. tricornutum* mit dem Vektor pPhaT_CA1_bkt_gfp konnte bei nur einer Transformante (*bkt6*) eine genetische Integration des C-Terminal mit der Sequenz für GFP markierten und N-Terminal mit der Sequenz für das SP+TP von CA1 fusionierten *bkt*-Gens nachgewiesen werden. Für weitere Untersuchungen der Proteinexpression bzw. der Lokalisation des Konstruktes wurde daher diese Transformante (*bkt6*) herangezogen.

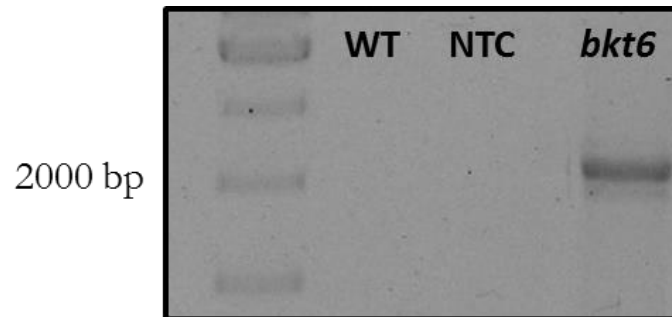


Abbildung 35: Genetischer Nachweis von *P. tricornutum* Utex 646 mit dem Vektor pPhaT_eGFP und der eingebrachten cDNA von CA1 fusioniert an die *bkt*-Sequenz der β -Carotin-Ketolase.

Nach genetischer Überprüfung mittels PCR (Primer: pPhaT_f/pPhaT_r) wurde bei der *bkt6*-Transformante ein Signal auf gewünschter Höhe identifiziert (2004 bp). Der WT diente als Negativkontrolle und zeigt auf entsprechender Höhe kein Signal. NTC=Negativkontrolle. Kontrolle ohne DNA-Template. 1 % Agarosegel.

Nachweis auf Transkriptions- und Expressionsebene

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde auf Transkript- und Proteinebene überprüft, ob das Konstrukt transkribiert bzw. exprimiert wird.

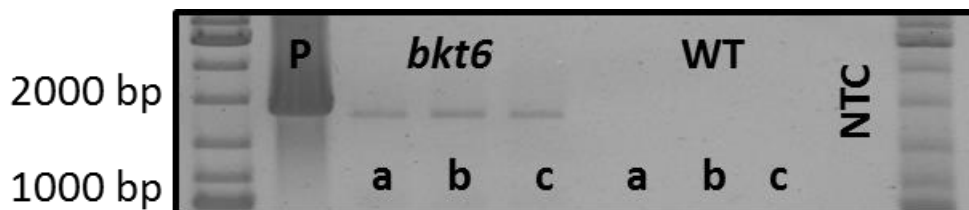


Abbildung 36: Nachweis des Konstruktes CA1_bkt_gfp der *bkt6*-Transformante auf Transkriptebene.

Sowohl für die Transformante als auch für den WT wurden drei unabhängig voneinander verwendete RNA-Präparationen bzw. cDNAs verwendet (a, b und c). Das erwartete Signal von 1804 bp ist nur bei den drei Ansätzen der *bkt6*-Transformante sichtbar. Verwendet wurde die Primerkombination CA1_bkt_fwd/eGFP_rev. P=Positivkontrolle, genomische DNA; NTC=no template control, Kontrolle ohne cDNA-Template. 1,5 % Agarosegel.

Für den Nachweis der Transkriptbildung, wurde die aus RNA gewonnene cDNA zur Größenbestimmung auf ein Agarosegel aufgetragen. Der Nachweis ist in Abbildung 36 zu sehen. Für die drei unabhängig voneinander präparierten RNA-Isolationen (a, b und c) konnte auf der Höhe von 1804 bp ein Signal erzielt werden. Dieses Signal ergibt sich aus der

Präsequenz *CA1* fusioniert an *bkt* und *gfp*. Dasselbe Signal ist wie auch bei der Positivkontrolle (gDNA) zu erkennen.

Für die Überprüfung der Proteinbildung wurden ebenfalls Triplikate (a, b und c) von der Transformante und vom WT angefertigt (3.3.4). Dabei wurden die Proteinextrakte über eine Immunodetektion (3.8.2.3) mit dem GFP Antikörper nachgewiesen (Abbildung 37).

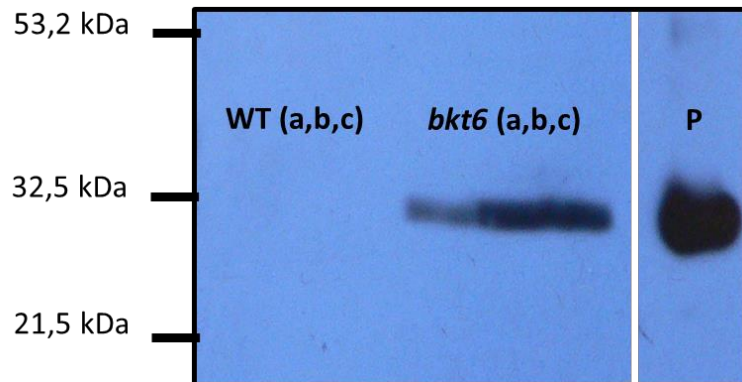


Abbildung 37: Immunodetektion des Konstruktes *CA1_bkt_gfp* in *P. tricornutum*.

Mit Hilfe des GFP-Antikörpers wurden jeweils drei unabhängige Isolate vom WT (a, b und c) und der Transformante (a, b und c) untersucht. P=Positivkontrolle, Proteinextrakt einer Transformante, welche den Vektor pPhaT_GFP trägt (hergestellt von S. Jäger, Goethe-Universität Frankfurt). Das Signal von reinem GFP liegt bei 26,9 kDa, das Signal für das gesuchte Konstrukt bei 65 kDa. Letzteres konnte nicht detektiert werden.

Hierbei zeigt sich, dass keine vollständige Expression des Konstruktes *CA1_bkt_gfp* (65,9 kDa) erfolgte. Es konnte ein Signal auf der Höhe von 26,9 kDa detektiert werden. Dieses Signal entspricht dem erwarteten Signal der Positivkontrolle, bei welchem nur GFP mit 26,9 kDa detektiert wurde. Auch bei mehrmaligem Wiederholen des Versuches konnte auf der Höhe des gesamten Konstruktes *CA1_bkt_gfp* kein Signal erreicht werden.

Außerdem war GFP fluoreszenzmikroskopisch nicht nachweisbar (Ergebnisse nicht gezeigt).

5 Diskussion

Carotinoide finden in den letzten Jahren verstärkt Anwendung z.B. in der Futtermittelindustrie, in Kosmetika, aber auch in medizinischen und pharmazeutischen Produkten (Higuera-Ciagara et al., 2006; Baker und Günther, 2005). Die wirtschaftliche und biotechnologische Bedeutung sowie die Nachfrage an nicht synthetisch hergestellten Carotinoiden haben daher in den letzten Jahren stark zugenommen. Mikroalgen wie *P. triornutum* wecken unter anderem aufgrund ihres Hauptpigmentes Fucoxanthin das industrielle Interesse. Um eine höhere Syntheseleistung in einem gewünschten Organismus zu erreichen, kommt es dabei darauf an, die einzelnen Schritte innerhalb eines Biosyntheseweges zu verstehen und insbesondere die Funktion und Regulation einzelner Gene bzw. deren Produkte aufzuklären. Eine wichtige Rolle für das Verständnis und die Anwendung liegt dabei besonders in der Aufklärung und der Erkenntnis limitierender Schritte.

In dieser Arbeit sollten daher entsprechende Grundlagen für die biotechnologische Anwendbarkeit von *P. triornutum* geschaffen werden. Ein in *P. triornutum* limitierender Schritt für den der Carotinoidbiosynthese vorangestellten Terpenoidstoffwechsel konnte in Eilers et al. (2015) demonstriert werden. Durch heterologe Expression von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (Dxs) in *E. coli* bzw. der Überexpression in *P. triornutum* selbst konnte sowohl die Funktionalität als auch das Potential zur Erhöhung der Carotinoidbiosyntheseleistung gezeigt werden. Die Funktionalität weiterer Enzyme (Phytoen-Desaturase, z-carotin-Desaturase, Lycopon-b-Cyclase) innerhalb der Carotinoidbiosynthese von *P. triornutum* konnte bereits von Dambeck et al. (2012) zu großen Teilen aufgeklärt werden. In folgender Abbildung 38 wird nochmals eine knappe Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Schritte des Carotinoidbiosyntheseweges in *P. triornutum* gegeben.

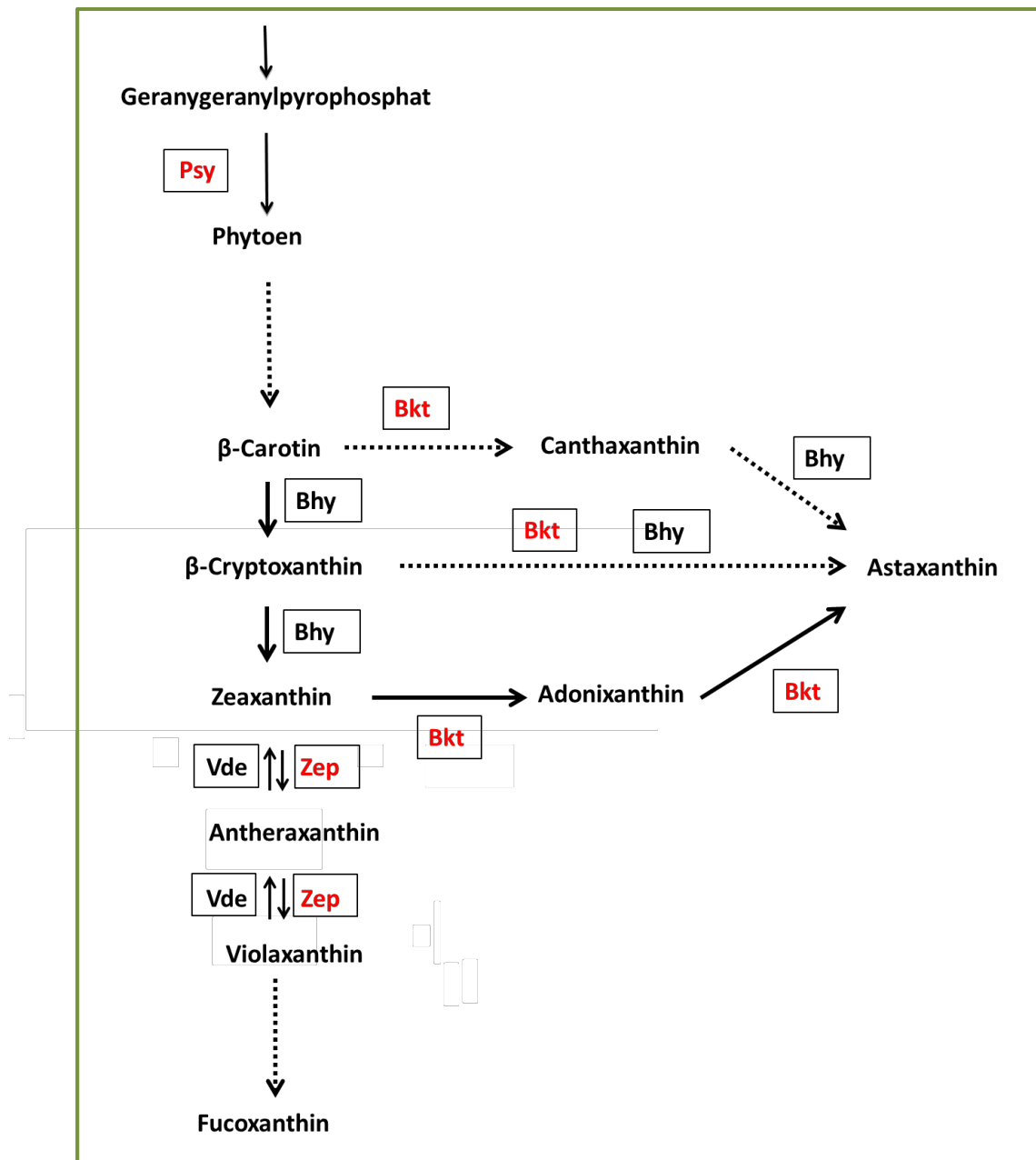


Abbildung 38: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Schritte des Carotinoidbiosyntheseweges.

Im Chloroplasten wird aus zwei Molekülen Geranylgeranylpyrophosphat mittels der Phytoen-Synthase (Psy) Phytoen gebildet. Dieses wird zu β -Carotin metabolisiert, welches mittels der β -Carotin-Hydroxylase (Bhy) über β -Cryptoxanthin zu Zeaxanthin umgewandelt wird. Von diesen drei Intermediaten führen verschiedene Wege zu Astaxanthin, unter anderem mit Hilfe der in *P. tricornutum* eingebrachten β -Carotin-Ketolase (Bkt). Zeaxanthin wird mittels der Zeaxanthin-Epoxidase (Zep) über Anthraxanthin zu Violaxanthin epoxidiert. Unter Starklicht wird dieses durch die Violaxanthin-Deepoxidase (Vde) wieder zu Zeaxanthin de-epoxidiert. Unter Schwachlichtbedingungen wird Violaxanthin über Zwischenstufen (Neoxanthin) zu Fucoxanthin metabolisiert. Die rot markierten Enzyme sind die untersuchten Schritte des Carotinoidbiosyntheseweges. Gepunktete Pfeile geben mehrere Zwischenschritte an.

5.1 Funktionelle Charakterisierung von Genen aus *P. tricornutum*

5.1.1 Funktioneller Nachweis des Phytoen-Synthase-Gens aus *P. tricornutum* in *E. coli*

Mittels genetischer Komplementation in *E. coli* konnte die Funktion der Phytoen-Synthase nachgewiesen werden (Abbildung 14). Der bereits festzustellende farbige Unterschied zwischen der Kontrollkultur und der Transformante wird durch die Analysen an der HPLC unterstützt. In den vergleichenden Chromatogrammen der Kontrolle und der Transformante zeigt sich die Akkumulation von Carotinoiden, welche von der Kontrolle nicht gebildet werden können. Der Versuch zeigt damit, dass das Produkt des Genes #Pt56881 eine funktionelle Phytoen-Synthase exprimiert.

5.1.2 Regulation der Phytoen-Synthase in *P. tricornutum*

Limitierende Enzyme sind die Stellschrauben eines Syntheseweges, um beispielsweise mittels genetischer Modifikationen die Syntheseleistung zu erhöhen. Bereits für höhere Pflanzen (Fray et al., 1995; Rodríguez-Villalón et al., 2009), aber auch für Bakterien (Götz et al., 2002) ist bekannt, dass die Phytoen-Synthase als Schlüsselenzym und als limitierender Schritt der Carotinoidbiosynthese fungiert.

Die Lichtqualität und -intensität können Einfluss auf die Regulation der Carotinoidbiosynthese haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einer von mir betreuten Masterarbeit von Bikoulis (2013), die lichtabhängige Expression der Phytoen-Synthase während eines Tag-Nacht-Rhythmus im WT von *P. tricornutum* auf Transkriptionsebene analysiert. Diese diurnale Regulation zeigt, dass es während der Lichtphase, wenn der Bedarf an photoprotektiven Pigmenten hoch ist, zu einem Anstieg der Transkriptmenge kommt, während in der Dunkelphase die Transkriptmenge auf ein Minimum reduziert wird. Es bestätigt sich, dass das Licht ein wesentlicher Faktor ist, wodurch die Transkription von Carotinoidbiosynthesegenen in *P. tricornutum* induziert wird. Auch der Fucoxanthingehalt spiegelt diese lichtabhängige Regulation wieder (Ragni und Ribera d'Alcala, 2007). Lavaud et al. (2002) konnten zeigen, dass sich durch periodische Unterbrechungen der Lichtverhältnisse das Reservoir an Diadinoxanthin verdoppelt. Unter kurzfristigem Starklichtstress steigt der Diatoxanthingehalt an, während der Gehalt an Fucoxanthin konstant bleibt (Domingues et al., 2012).

Der regulatorische Einfluss von Licht auf die Carotinoidbiosynthese wurde ausgenutzt, um die limitierenden Eigenschaften der Phytoen-Synthase in *P. tricornutum* im Übergang von Schwach- zu Starklicht zu zeigen. So wurde die Akkumulation von Phytoen als direkte

Auswirkung von Starklicht im WT auf die Synthesekapazität der Phytoen-Synthase im Vergleich zu Schwachlicht mittels NFZ, welches die Inhibierung der Phytoen-Desaturase induziert (Breitenbach et al., 2001), untersucht. Um die gebildete Carotinoidmenge zu quantifizieren eignet sich das zu Beginn der Carotinoidsynthese gebildete und gegenüber Licht stabilere Phytoen besser als Fucoxanthin, welches am Ende des Biosyntheseweges steht. Die Menge von Fucoxanthin ist abhängig von der Synthese und dem photooxidativen Abbau durch Lichtstress. Bei diesem Versucht zeigt sich, dass beim WT die verwendeten Lichtverhältnisse Einfluss auf die Phytoenproduktion haben – der Phytoengehalt akkumuliert unter Starklichtbedingungen. Dieses Ergebnis gibt einen eindeutigen Hinweis darauf, dass zumindest im WT die Kapazität der Phytoen-Synthase durch Licht reguliert und damit durch Schwachlichtbedingungen begrenzt wird. Allein durch die Steigerung der Lichtintensität kann in *P. tricornutum* eine erhöhte Synthesekapazität der Phytoen-Synthase erreicht werden. Damit ist die Phytoen-Synthase ein valider Kandidat, um im Sinne biotechnologischer Anwendung durch genetische Modifikationen eine weitere Steigerung der Carotinoidbiosynthese und so letztlich von Fucoxanthin zu bekommen.

5.1.3 Funktioneller Nachweis der Zeaxanthin-Epoxidase-Gene von *P. tricornutum* in *A. thaliana*

Die Zeaxanthin-Epoxidase katalysiert auf der stromalen Seite der Chloroplasten höherer Pflanzen die Epoxidation von Zeaxanthin über das Intermediat Antheraxanthin zu Violaxanthin (Bouvier et al., 1996). Durch diese Reaktion ist das Enzym am klassischen Carotinoidbiosyntheseweg aber auch am sogenannten Xanthophyllzyklus beteiligt. In Diatomeen gibt es zusätzlich den Diadino-Diatoxanthin-Zyklus, bei welchem ebenfalls durch eine Epoxidase die Umwandlung von Diatoxanthin in Diadinoxanthin stattfindet. Im Gegensatz zu höheren Pflanzen und Grünalgen, welche wie beispielsweise in *C. reinhardtii* (Merchant et al., 2007) und *C. variabilis* (Blanc et al., 2010), nur eine Genkopie der Zeaxanthin-Epoxidase besitzen, findet man in der Diatomee *T. pseudonana* zwei (*zep1, 2*; Coesel et al., 2008) und in *P. tricornutum* drei solcher putativen Genkandidaten (*zep1, 2, 3*, Coesel et al., 2008). Obwohl die Intermediate des Carotinoidbiosyntheseweges in *P. tricornutum* inzwischen beschrieben sind (Dambeck et al., 2012), fehlt der Nachweis über die Funktionalität einiger Gene wie beispielsweise derjenige der Zeaxanthin-Epoxidasen. Die genetischen Sequenzen der drei für *P. tricornutum* als Zeaxanthin-Epoxidasen annotierten Kandidaten wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Aktivität und Funktionalität sowie ihre Regulation auf Transkriptebene überprüft.

Bisher war die funktionelle Expression von potentiellen Zeaxanthin-Epoxidase-Sequenzen in *E. coli* noch nicht möglich. Bouvier et al. (1996) demonstrierten entsprechende Versuche anhand der Zeaxanthin-Epoxidase von Paprika. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte die Expression der Zeaxanthin-Epoxidase von *P. tricornutum* in *E. coli* nicht gezeigt werden. Um die Funktion dieser drei Genkandidaten dennoch einzeln nachweisen zu können, wurden diese daher im Rahmen eines Komplementationsversuches heterolog in *A. thaliana npq2*-Mutanten eingebracht und somit in einem anderen Expressionssystem getestet. Die verwendeten *npq2*-Mutanten haben eine defiziente Expression der Zeaxanthin-Epoxidase, wodurch Zeaxanthin akkumuliert. Als Folge der Akkumulation von Zeaxanthin weist die Pflanze im Vergleich zum WT ein verstärktes NPQ auf und ist im Wachstum reduziert (Niyogi et al., 1998; Kalituho et al., 2007). Die Pigmente Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin sind in *P. tricornutum* nachfolgende Produkte in der Biosynthesekette von Zeaxanthin (Dambeck et al., 2012); die Detektion dieser Metaboliten in den Transformanten kann daher als Nachweis für die Aktivität der neu eingebrachten Gene und ihrer Produkte herangezogen werden.

Die Transformation mit den einzelnen putativen Genkopien der *zep1*, *2* oder *3* von *P. tricornutum* wirkt sich unterschiedlich auf die Carotinoidzusammensetzung aus.

Die unveränderte Pigmentzusammensetzung der *zep1*-Transformanten zeigt, dass durch diese Komplementation keine Metabolisierung von Zeaxanthin stattgefunden hat (Tabelle 30). Bei der *zep1*-Transformante konnte entsprechend auch keine Restoration des NPQs festgestellt werden – der NPQ ähnelt daher dem der *npq2*-Mutante (Abbildung 28 A). Bei dem Produkt des Genes #Pt45845 handelt es sich damit, zumindest in *A. thaliana npq2*-Pflanzen, um eine nicht funktionell aktive Zep.

Betrachtet man hingegen die Pigmentwerte der *zep2*- und *zep3*-Transformanten (Tabelle 30) so erkennt man, dass hier eine Änderung durch die Komplementation stattgefunden hat.

Bei den *zep2*-Transformanten konnte Zeaxanthin metabolisiert werden (Abbildung 26; Tabelle 30). Besonders fällt dabei der erhöhte Gehalt von Antheraxanthin und die Bildung von Lutein-5,6-Epoxid (Abbildung 27; Tabelle 30) auf. Die Bildung des Lutein-Epoxids erklärt somit den im Gegensatz zum WT, ebenfalls auffälligen geringeren Gehalt an Lutein und zeigt gleichzeitig, dass das Enzym effizient Mono-Epoxide wie Antheraxanthin bildet. Die Bildung von Di-Epoxiden wie Violaxanthin wird hingegen nur schwach ausgeführt. Die Zep2 akzeptiert sowohl Zeaxanthin als auch Lutein als Substrat. In beiden Fällen wird hier der β -Iononring an C5, C6 epoxidiert. Dabei diskriminiert das Enzym nicht zwischen unterschiedlichen Iononringen am anderen Ende des Moleküls. Goss et al. (1998) und Goss (2003) zeigten, dass die Vde aus der Carotinoidsynthese in der Grünalge *M. squamata* in der „upstream“-Reaktion des Xanthophyllzyklus einseitig arbeitet und im Gegensatz zu anderen Vdes Violaxanthin nur bis

zu Antheraxanthin aber nicht weiter umsetzt. Die Vde aus *M. squamata* zeigt damit dasselbe Phänomen wie die Zep2 aus *P. tricornutum* nur verstärkt und in der Gegenreaktion.

Das Einbringen der aktiven Zep2 spiegelt sich auch im Wachstum wieder. Der Phänotyp der *zep2*-Transformanden ähnelt wieder stark demjenigen des WT (Abbildung 24). Die Auswirkungen der aktiven Zep2 aus *P. tricornutum* in den komplementierten *npq2*-Mutanten wurden weiterhin im Xanthopyllzyklus untersucht. Hier zeigt sich, dass eine Restoration des NPQ stattgefunden hat. Allerdings weist das NPQ eine große Diskrepanz zum WT auf (Abbildung 28), welche sich im Vergleich zum WT mit dem leicht geringeren Violaxanthin, aber besonders mit dem stark erniedrigten Luteingehalt erklären lässt. Ruban et al. (2007) konnten zeigen, dass ein Luteinmolekül innerhalb des LHC II direkt an der Dissipation von Energie beteiligt ist. Die Auswirkung auf das NPQ in den *zep2*-Transformanden spiegelt auch das Phänomen von zwei Lutein-defizienten Mutanten (*Lut1* und *Lut2*), in welchen Antheraxanthin in großen Mengen akkumuliert und Lutein nur in geringen Konzentrationen vorkommt, wieder (Della Penna, 1999). Die aktive Zep2 aus *P. tricornutum* weist damit eine zum Teil andere Funktionalität als die Zep von *A. thaliana* auf.

Die Pigmentwerte und Verhältnisse der *zep3*-Transformande kommen denjenigen des WT am nächsten (Tabelle 30). Der Lutein-, Zeaxanthin- und Neoxanthingehalt unterscheiden sich kaum zwischen dem WT und der *zep3*-Transformande (Tabelle 30). Im Vergleich zur *zep2*-Transformande konnte hier allerdings kein Lutein-Epoxid detektiert werden.

Das Einbringen einer aktiven Zep3 wirkt sich entsprechend auf das Wachstum aus. Der Phänotyp der *zep3*-Transformanden gleicht demjenigen des WT (Abbildung 24).

Die Pigmentdaten spiegeln sich im NPQ der *zep3*-Transformanden wieder. Der NPQ Kurvenverlauf der *zep3*-Transformande kommt dem NPQ vom WT am nächsten. Durch das Einbringen einer aktiven Zep3 findet die Restoration des NPQ statt. Besonders beim Übergang von der Licht- in die Dunkelphase wird der Rückgang des NPQs gefördert, da hier die eingebrachte Zep3 aktiv Zeaxanthin umwandelt. Die Funktionalität der Zep3 kommt damit derjenigen der Zep von *A. thaliana* am nächsten, was sich durch die Bildung entsprechender Carotinoide am Wirkungsort erklären lässt.

Ein von Coesel et al. (2008) erstellter Stammbaum zur Phylogenie der Zeaxanthin-Epoxidasen verschiedener Algenklassen zeigt eine Aufspaltung der drei Genkopien von *P. tricornutum* (Abbildung 39 A). Zwei der drei Zeaxanthin-Epoxidasen stehen näher zusammen, während eine sich davon stärker abgrenzt (Abbildung 39 A). Für eine Zuordnung zu den spezifischen Proteinen Zep1, 2 oder 3 wurde deshalb ein weiterer Stammbaum mit den Proteinsequenzen

der potentiellen Zeaxanthin-Epoxidasen von *P. tricornutum*, *T. pseudonana* und *A. thaliana* erstellt (Abbildung 39 B).

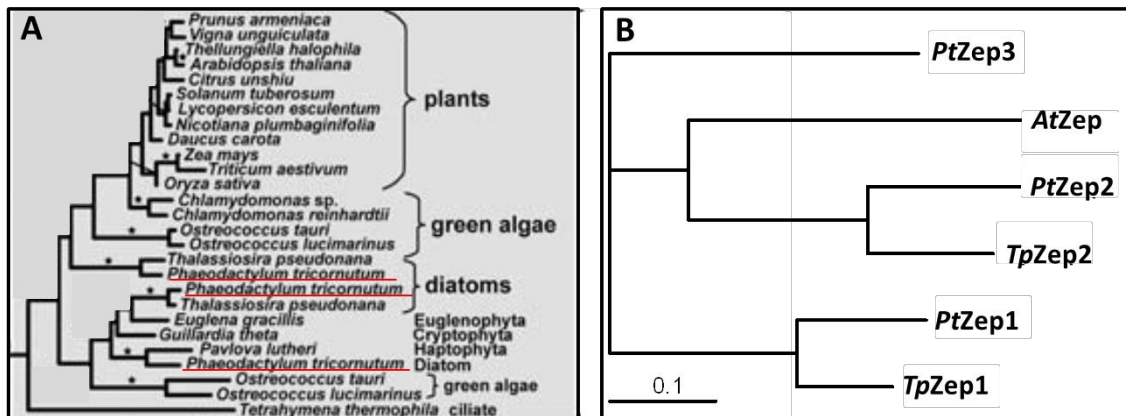


Abbildung 39: Stammbaum der Zeaxanthin-Epoxidasen.

A erstellter Stammbaum von Coesel et al. (2008, modifiziert). Rot unterstrichen sind die nicht zugeordneten Zep von *P. tricornutum*. **B** Der Stammbaum wurde mit den Proteinsequenzen der Zeaxanthin-Epoxidasen (8.3) von *P. tricornutum* (PtZep1, 2 und 3), *T. pseudonana* (TpZep1, 2) und *A. thaliana* (AtZep) mit der Neighbour Joining Methode erstellt. Die Proteinsequenzen wurden hierfür mit der Software ClustalX 2.0.12 verglichen, die Darstellung des Stammbaumes erfolgte mit der Software TreeView 1.6.6.

Dieser neue Stammbaum zeigt, dass es sich bei den enger verwandten Zeps jeweils um die Zep1 und Zep2 sowohl von *T. pseudonana* als auch von *P. tricornutum* handelt. Die Zep3 von *P. tricornutum* fehlt in *T. pseudonana*. Durch Proteinalignments konnte gezeigt werden, dass die Zep2 und Zep3 aus *P. tricornutum* eine höhere Identität zur Zep von *A. thaliana* (25,6 % bzw. 29,6 %) aufweisen als die Zep1 (24,3 %) (siehe Anhang 8.4.2). Dies entspricht auch dem Ergebnis der funktionellen Charakterisierung der Enzyme, welche zeigen, dass die Funktion der Zep3 aus *P. tricornutum* derjenigen von *A. thaliana* am nächsten kommt. Über die Funktionen der putativen Zeaxanthin-Epoxidasen von *T. pseudonana* sind bislang keine experimentellen Daten vorhanden. Es kann daher keine Aussage über die Funktionalität der Zep1 in *T. pseudonana* getroffen werden – interessant wäre es hier zu wissen, ob sich die Zep1 von *T. pseudonana* ähnlich der Zep1 von *P. tricornutum* verhält und ein nicht funktionelles Protein hervorbringt.

Anhand der gewonnenen Daten kann festgehalten werden, dass Zeaxanthin durch das Einbringen der Gene *zep2* und *zep3* in die *npq2*-Mutanten wieder metabolisiert werden kann. Erstmals lässt sich hieraus auf eine zumindest in *A. thaliana* im Xanthophyllzyklus aktiv funktionierende Zep2 und 3 aus *P. tricornutum* schließen. Die Funktion von Zep3 kommt dabei der Funktion der Zep von *A. thaliana* am nächsten. Des Weiteren zeigen die Daten, dass die

Zep2 eine andere Substratspezifität als die Zep3 aufweist. Die Zep2 stellt somit einen validen Kandidaten für die Epoxidation von Diatoxanthin in Diadinoxanthin in *P. tricornutum* dar.

Das Produkt von *zep1* zeigt in dieser Studie keine Epoxidaseaktivität. Des Weiteren zeigen diese Ergebnisse, dass die verwendeten *npq2*-Mutanten im Gegensatz zu *E. coli* ein valides Expressionssystem für die Überprüfung der Zeaxanthin-Epoxidasen darstellen.

5.1.4 Weiterführende Analysen zur Klärung der ausbleibenden *zep1*-Aktivität

Die qrtPCR erlaubt auf Transkriptebene eine quantitative Bestimmung der vorhandenen RNA-Mengen. Beim Vergleich der RNA-Mengen der *zep1*, 2 und 3 konnte gezeigt werden, dass neben den Transkripten von *zep2* und *zep3* auch das Transkript für *zep1* in den entsprechenden Transformanden in ausreichenden Mengen vorliegt (Abbildung 29). Diese Ergebnisse zeigen, dass die vorliegende Menge an RNA von *zep1* nicht der limitierende Faktor für eine aktive Zep1 sein kann. Ergebnisse dieser Analyse könnten auf eine posttranskriptionelle Regulation von *zep1* hinweisen. Um den Prozess der Expressionskaskade von *zep1* in den weiteren Analysen nachvollziehen zu können und den Import in den Chloroplasten sowie die Expression des *zep1*-Konstruktes zu verifizieren, wurde ein mit der Sequenz für GFP markiertes Konstrukt verwendet. Über die Herstellung transienter WT Protoplasten mit diesem Konstrukt konnte die Lokalisation sowie die Expression des *zep1_gfp*-Konstruktes mikroskopisch, durch die Fluoreszenz, eindeutig innerhalb der Chloroplasten gezeigt werden. Für die *zep1*-Transformanden bestehen somit verschiedene Möglichkeiten, welche die ausbleibende Restoration der mit *zep1* transformierten *npq2*-Mutante erklären könnten. So könnte beispielsweise das Produkt von *zep1* keine Spezifität für Zeaxanthin als Substrat aufweisen oder als ein nicht funktionelles Protein exprimiert werden. In Anbetracht dessen, dass die Diatomee *T. pseudonana* nur zwei Genkopien der Zeaxanthin-Epoxidase (*zep1* und *zep2*) besitzt (Coesel et al., 2008) ist es durchaus denkbar, dass auch in *P. tricornutum* nur zwei der drei Kopien ein funktionelles Protein hervorbringen.

Die Proteinmodelle der Zep1, 2 und 3 aus *P. tricornutum* wurden vergleichend mit dem Proteinmodell der Zep aus *A. thaliana* analysiert. Coesel et al. (2008) ordnen die Zep1, 2 und 3 von *P. tricornutum* zur Proteinfamilie der Lipokaline zu. Lipokaline sind durch eine typische aus acht β -Faltblättern bestehende Faszstruktur gekennzeichnet. Wie in Abbildung 8 zu sehen ist zeigt sich aber auch, dass nicht alle der faszstrukturformenden β -Faltblätter innerhalb dieser konservierten Regionen der Lipokalinmotive vorliegen, was eine unterschiedliche Faszstruktur in den ermittelten Proteinmodellen erklären könnte (Abbildung 31). Vergleicht man die Modelle der Proteinstrukturen (Abbildung 31), wird ersichtlich, dass in *P. tricornutum* Zep1 am

C-terminalen Ende kürzer ist als bei Zep2 und Zep3. Dieses kürzere C-terminale Ende zeigt sich auch in entsprechenden Sequenzvergleichen der Zeaxanthin-Epoxidasen von *A. thaliana* und *P. tricornutum* (Anhang Abbildung 43). Entsprechend ist auch die Zep von *A. thaliana* um diesen Teil der Proteinstruktur verlängert. Das verkürzte C-terminale Ende könnte, wie auch in bereits bekannten, strukturell ähnlichen Enzymen beschrieben (Monterisino et al., 2013), zur Dimerisierung von Zep1 führen. Gesetz des Falles, dass es sich dabei nicht um ein Homodimer sondern um ein Heterodimer handeln würde, könnte ein fehlender Dimerisierungspartner in *A. thaliana* die ausbleibende Aktivität der Zep1 zumindest aus diesem Blickwinkel erklären. In Zep2 und Zep3 liegt die Helix des C-terminalen Endes in der Nähe der β -Faltblätter, die das Lipokalinmotive bilden. Hier ist eine durch die C-terminale Helix induzierte Substratspezifität denkbar. Das C-terminale Ende wurde in dieser Komplementationsstudie mit jeweils einem *his*-Tag versehen, welcher in Zep2 und Zep3 scheinbar keine störende Funktion ausübt. In Zep1 ragt das Ende der Proteinstruktur stärker über das aktive Zentrum, so dass die Aktivität des Proteins von dem *his*-Tag sterisch beeinträchtigt werden könnte. Darüber hinaus zeigen aber die Modellstrukturen von Zep2 und Zep3 mehr Ähnlichkeit zur Struktur der Zep aus *A. thaliana* als die Struktur von Zep1. Das könnte *per se* auf eine ähnliche Funktion hindeuten und damit eine erfolgreiche heterologe Komplementation in *A. thaliana* für Zep2 und Zep3 im Gegensatz zu Zep1 erklären.

5.1.5 Regulation der der Zeaxanthin-Epoxidase in *P. tricornutum*

Weiterhin wurde die lichtabhängige Expression der drei *zep*-Gene in *P. tricornutum* während eines Tag-Nacht-Rhythmus untersucht. Auch hier zeigt sich derselbe Trend, der bereits bei der Regulation anderer Gene, wie beispielsweise der Phytoen-Synthase und der 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (Eilers et al., 2015), in der Carotinoïdsynthese in *P. tricornutum* zu erkennen ist. In der Lichtphase, wenn der Bedarf an photoprotektiven Pigmenten hoch ist, steigt das Transkriptionslevel an, während es in der Dunkelphase zu einem Rückgang kommt. Analysen zur Expression der drei Genkopien von *P. tricornutum* wurden bereits von Coesel et al. (2008) und Nymark et al. (2009) bzw. (2013) durchgeführt und unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit weitestgehend. Im Unterschied zur Analyse in dieser Studie wurden die Zellen aber jeweils 48 Stunden lang dunkel adaptiert, bevor sie 24 Stunden dem Licht exponiert wurden. Nymark et al. (2009) postulieren aufgrund einer Hochregulation von *zep3* auf Transkriptionsebene zu Beginn der Lichtphase eine Aktivität von Zep3 bei der De-Epoxidation und auf Grund einer gleichzeitig schwächeren Regulation von *zep1* eine gegensätzliche Rolle für das Zep1 Protein. 2013 klassifizieren Nymark et al. (2013) auf Grund der Expression ihrer

Transkriptomanalysen *zep1* und *2* in eine gemeinsame Kategorie von Genen, wohingegen *zep3* wiederum zu einer anderen Kategorie gezählt wird.

Im Tagesgang lassen sich die Daten der diurnalen Expression mit denjenigen von Nymark et al. (2009) und Coesel et al. (2008) weitestgehend vergleichen. Insgesamt ist das Maximum von *zep2* und *zep3* im Gegensatz zu *zep1* nach rechts verschoben (Abbildung 32). Besonders auffällig ist das Absinken des RNA-Gehalts von *zep3* nach fünf Stunden Belichtungsphase. Bei Nymark et al. (2013) beruhen die Daten zum RNA-Gehalt lediglich auf Messungen nach sechs und 24 Stunden Belichtungsphase. Durch zwei weitere Messpunkte nach neun und 15 Stunden Belichtung, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der RNA-Gehalt hiernach unmittelbar wieder ansteigt, wodurch sich das Expressionsmuster ändert und damit doch demjenigen von *zep2* stark ähnelt. Dieser weitestgehend parallele Verlauf der RNA-Expression zwischen *zep2* und *zep3* könnte der Hinweis für eine parallele Funktion beider Enzyme sein.

Zudem zeigt die diurnale Expression im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Transkriptanalysen auch den Gehalt der RNA Menge über Nacht. In der Dunkelphase sinken alle Expressionslevel auf ein Minimum ab, wobei nur der RNA-Gehalt von *zep3* bereits vor Tagesbeginn wieder ansteigt. Hierdurch lässt sich die im Gegensatz zu *zep1* und *zep2* und wie auch von Nymark et al. (2009) bereits gezeigte leicht erhöhte RNA-Menge zu Tagesbeginn erklären.

Der divergente Verlauf der Expressionsmuster unterstützt die Ergebnisse mit den *A. thaliana*-Transformanden, die zeigen, dass die *Zep1* keine Funktion als Epoxidase übernimmt, während *Zep2* und *Zep3* eine Epoxidase-Funktion aufweisen. Die unterschiedliche Regulation der *zep1*-Transformanden im Gegensatz zu derjenigen der *zep2*- und *3*-Transformanden lassen ebenfalls darauf schließen, dass dem Produkt von *zep1* eine andere Bedeutung als dem von *zep2* und *zep3* in *P. tricornutum* zukommt.

5.2 Genetische Modifikation der Carotinoidbiosynthese von *P. tricornutum*

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten die identifizierten Gene und die Ergebnisse bezüglich der Funktionalität und der limitierenden Eigenschaften in der Carotinoidbiosynthese von *P. tricornutum* angewendet werden. Durch das Einbringen weiterer Genkopien der Phytoen-Synthase in *P. tricornutum* soll eine weitere Steigerung der Carotinoidsynthese das heißt von Fucoxanthin erreicht werden. Das Herunterregulieren funktionell aktiver Zeaxanthin-Epoxidasen soll gleichzeitig mit dem Einbringen des Fremdgens (*bkt*) zur Bildung von

Astaxanthin führen. Ob die Bildung von Astaxanthin *per se* durch genetische Modifikation erreicht werden kann, sollte zuvor jedoch am WT von *P. tricornutum* untersucht werden.

5.2.1 Probleme bei der biotechnologischen Anwendung in *P. tricornutum*

Die Chloroplasten von *P. tricornutum* sind aufgrund der sekundären Endosymbiose mit vier Membranen ausgestattet. Spezifische Präsequenzen bestehend aus einem Signal- und einem Transitpeptid, sowie entsprechende Transportsysteme ermöglichen den Import kerncodierter Proteine in den Chloroplasten (siehe 1.2.1). Mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen konnten einige dieser spezifischen Präsequenzen experimentell bestimmt und damit erstmals fremde Proteine (GFP) erfolgreich in den Chloroplasten von *P. tricornutum* lokalisiert werden (Kilian und Kroth, 2004; Tanaka et al., 2005; Satoh et al., 2001). Eine funktionell erfolgreiche Expression chloroplastidärer fremd-Proteine, abgesehen von GFP, konnte bislang jedoch nicht demonstriert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei der in der Literatur bislang vorgestellten Präsequenzen der Proteine Fructose-1,6-Bisphosphate chloroplastidäre Aldolase 1 (FbcA1) und chloroplastidäre Anhydrase 1 (CA1) zum Import von Bkt in den Chloroplasten herangezogen. In allen Versuchen blieb die Detektion von Astaxanthin aus.

Neben einer ungerichteten Integration der einzubringenden DNA ins Genom von *P. tricornutum* (siehe 1.1.1) besteht speziell bei Organismus-fremden chloroplastidär arbeitenden Proteinen die Problematik des Imports in den Chloroplasten. Während der Import in den Chloroplasten zusätzlich eingebrachter Organismus-eigener Proteine wie beispielsweise der Phytoen-Synthase problemlos funktioniert, gilt es für den Import von Organismus-fremden Proteinen weitere Präsequenzen zu testen und somit ein zuverlässiges Transportsystem zu etbalieren.

5.2.2 Analyse der *P. tricornutum* psy-Transformanden

Nachdem weitere Kopien der Phytoen-Synthase ins Genom von *P. tricornutum* eingebracht wurden konnte dessen Synthesekapazität gesteigert werden. Die im Vergleich zum WT unveränderten Wachstumsbedingungen der beiden analysierten Transformanden #13 und #14 waren Grundlage, um mit weiteren Untersuchungen der beiden Stämme fortzufahren (Abbildung 16). Die Auswirkungen zusätzlich eingebrachter Genkopien der Phytoen-Synthase wurden auf Transkript- und Pigmentebene bei verschiedenen Lichtverhältnissen ebenso wie mit und ohne NFZ untersucht.

Wie bereits bei den Analysen zur Regulation der Phytoen-Synthase im WT mittels NFZ demonstriert wurde, ist dessen Kapazität durch geringe Lichtverhältnisse limitiert. Im Sinne der

biotechnologischen Anwendung, soll überprüft werden, ob mittels zusätzlicher Genkopien eine weitere Steigerung des Carotinoidgehalts möglich ist. Als Maß der Synthesekapazität der Phytoen-Synthese dient hier ebenfalls die mittels NFZ ermittelte Phytoenmenge. Unter Schwachlichtbedingungen zeigen beide Transformanden eine deutliche Erhöhung des Phytoengehalts im Gegensatz zum WT (Abbildung 19). Auch unter Starklichtbedingungen lässt sich zumindest bei einer der beiden Transformanden (#13) eine noch weitere Steigerung des Phytoengehalts erreichen. Die erhöhte Akkumulation in den beiden Transformanden #13 und #14 kann als Nachweis gewertet werden, dass durch zusätzliche Kopien der Phytoen-Synthese tatsächlich das Produkt Phytoen verstärkt gebildet wird. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse des NFZ-Versuches, dass durch genetische Modifikation in Kombination mit Starklicht eine noch höhere Synthesekapazität als nur im WT erreicht werden kann.

Entsprechend zeigt sich bei einem Vergleich auf RNA-Ebene (Abbildung 18), dass durch das Einbringen zusätzlicher Kopien der Phytoen-Synthese in beiden Transformanden ein höherer Gehalt an relativer RNA-Menge vorhanden ist. Geht man davon aus, dass die Transkriptmenge äquivalent zur Menge an gebildeter Phytoen-Synthese ist, so zeigt sich, dass bei einem Vergleich des Transkriptlevels mit *in-situ* synthetisierter Phytoenmenge und insgesamt gebildeten Carotinoiden zwischen WT, Transformande #13 und Transformande #14 durchweg die Transformande #14 weniger Transkript bzw. Produkt aufweist als die Transformande #13. Dies kann auf eine geringere Anzahl eingebrachter Kopien durch die ballistische Transformation zurückgeführt werden. Gleichzeitig kann man bei der Transformande #13 erkennen, dass die Phytoenproduktion in einem nicht linearen Zusammenhang mit der Transkriptmenge steht. Eine substratbedingte Limitierung der Phytoen-Synthese ist hier denkbar. Durch ein erhöhtes Substratangebot, könnte der Phytoen- bzw. der Carotinoidgehalt weiter gesteigert werden. Ein erhöhtes Substratangebot kann beispielsweise mittels genetischer Modifikation des Eingangsenzym des Terpenoidstoffwechsels 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase erreicht werden (Eilers et al., 2015).

Weitere Analysen auf Pigmentebene unter Schwachlichtbedingungen zeigen, dass Fucoxanthin als das mengenmäßig häufigste Pigment in *Phaeodactylum*, auch in den Transformanden #13 und #14 am meisten gebildet wird. Andere Pigmente wie Diadinoxanthin und β -Carotin, werden nur in geringfügig höheren Mengen als im WT gefunden (Abbildung 21). Abbildung 20 B bestätigt die Ergebnisse des NFZ-Versuches und zeigt, dass in den Transformanden insgesamt mehr Carotinoide pro g Trockengewicht detektiert werden konnten. Gleichzeitig zeigt Abbildung 20 A, dass es im Verhältnis Carotinoid/Chl a zu keiner Änderung zwischen WT und Mutanten kommt. Eine Erhöhung des Carotinoidgehalts hat hier eine Steigerung des Chl a Gehalts zur Folge. Der gleichzeitige Anstieg des Chlorophyllgehalts könnte sowohl auf einen

Anstieg in der Anzahl der Lichtsammelkomplexe als auch der Photosysteme hindeuten, was auf eine Speicherung der zusätzlichen Pigmente innerhalb dieser Systeme hinweisen könnte. Zumindest müssen die zusätzlich gebildete Carotinoide irgendwo in der Zelle gespeichert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das zusätzlich gebildete Fucoxanthin in den Transformanden keine Funktion in den Pigmentproteinkomplexen einnimmt und so als freies Pigment vorliegt. Die von Wong und Franz (2013) in *P. tricornutum* vorkommenden Ölkörperchen liegen außerhalb der Chloroplasten und stellen somit keine Alternative zur Speicherung von zusätzlichem Fucoxanthin dar.

Umfassende Pigmentanalysen unter Starklichtbedingungen fanden im Rahmen dieser Arbeit nicht statt. Jedoch zeigten sowohl Beer et al. (2006) als auch Falbel et al. (1994) für *C. meneghiniana* bzw. *Tricum* L. (Weizen), dass sich unter Starklichtbedingungen der Pool der Schutzpigmente (Diathoxanthin und Zeaxanthin) erhöht, während zumindest in der Diatomee der Fucoxanthingehalt pro Chl a sinkt. Daher ist davon auszugehen, dass die erhöhte Synthesekapazität der Phytoen-Synthase, welche sich unter Starklichtbedingungen in den Transformanden in einem erhöhten Phytoengehalt gegenüber dem WT widerspiegelt, insgesamt in der Bildung von mehr Xanthophyllzykluspigmenten (Diadinoxanthin, Diathoxanthin bzw. Zeaxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin) als dem Antennenpigmente Fucoxanthin resultiert, um damit für einen ausreichenden Schutz vor Überenergetisierung zu sorgen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass nicht nur die Lichtintensität sondern auch das Vorhandensein einer unterschiedlichen Anzahl von *psy*-Kopien eine Limitierung für die Bildung von Carotinoiden und damit Fucoxanthin darstellt. Eine weitere Limitierung kann durch einen Mangel an Substrat erzeugt werden. Des Weiteren könnte durch Optimierung der Lichtqualität eine erhöhte Biomasseproduktion erreicht werden, was letztlich zum selben Carotinoidgehalt in einem kürzeren Zeitraum führen würde. So zeigen beispielsweise Wichuk et al. (2014), dass sich durch eine Kombination aus je 50 % blau- und rotfarbenen LEDs die Biomasseproduktion von *P. tricornutum* entsprechend verdoppeln lässt.

5.2.3 Astaxanthinsynthese in *P. tricornutum*

Zur industriellen Anwendung der Carotinoidbiosynthese soll überprüft werden, ob *P. tricornutum* genetisch so modifiziert werden kann, dass Astaxanthin gebildet wird. Viele carotinoidproduzierende Organismen besitzen aufgrund ihrer enzymatischen Ausstattung die Fähigkeit 3-Hydroxycarotinoide wie z.B. Lutein oder Zeaxanthin zu synthetisieren, ihnen fehlt aber die Möglichkeit 4-Ketocarotinoide wie z.B. Astaxanthin zu produzieren (Han et al., 2013).

Die Bkt aus *C. reinhardtii*, welche in dieser Arbeit verwendet wurde, besitzt im Gegensatz zu vielen anderen Bkts die Eigenschaft auch bereits hydroxylierte Iononringe mit verhältnismäßig hoher Effizienz zu ketolieren und so beispielsweise Zeaxanthin in Astaxanthin umwandeln zu können (Zhong et al., 2011). Eine trunkierte Version der Bkt aus *C. reinhardtii* wurde im Rahmen dieser Untersuchung zum Import in den Chloroplasten an verschiedene Präsequenzen (*FbaC1*, *CA1*) fusioniert. Die Bildung von Astaxanthin blieb in allen Fällen aus. Hierbei bleibt festzuhalten, dass es nicht auszuschließen ist, dass Bkt dennoch in den Chloroplasten importiert wurde, aber hier nicht funktionell arbeiten kann. Es stellt sich die Frage, welcher Vorgang in der Zelle dazu führt, dass die vorliegende mRNA nicht zur Expression eines vollständigen Proteins herangezogen wird, und bzw. oder ob möglicherweise das Konstrukt nicht in den Chloroplasten importiert wurde.

Die Verwendung einer C-terminal trunkierten Version der Bkt sollte keine Schwierigkeiten bei der Expression auf Proteinebene darstellen, da diese Version der Bkt bereits erfolgreich exprimiert und zur Produktion von Astaxanthin z.B. in *A. thaliana* (Zhong et al., 2011), in Tabak (Huang et al., 2012) und auch Tomatenpflanzen (Huang et al., 2013) verwendet wurde. Damit sind allerdings alle bisherigen Ansätze der genetischen Modifikation der Carotinoidbiosynthese mit der Bkt aus *C. reinhardtii* innerhalb einer evolutiven Linie, den Grünalgen bzw. den höheren Pflanzen, zu finden. *P. tricornutum* zählt zu den Heterokontophyta und zeichnet sich damit im Gegensatz zu höheren Pflanzen durch vier Membranen um die Chloroplasten aus. Der unterschiedliche Aufbau der Chloroplasten von höheren Pflanzen im Gegensatz zum Aufbau der Chloroplasten von *P. tricornutum* könnte ein Grund sein, warum die Expression und der Import der Bkt schwer in *P. tricornutum* durchzuführen ist.

Um Informationen über den Verbleib der Konstrukte bzw. deren Expression zu erlangen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit das Fusionsprodukt aus der Präsequenz von *CA1* (Tanaka et al., 2005; Satoh et al., 2001) und der Sequenz *bkt* mit *gfp* markiert. Hierbei zeigt sich, dass auf Transkriptebene (Abbildung 36) wiederholt das gesamte Fusionsprodukt detektiert werden kann, während auf Proteinebene (Abbildung 37) ein Signal auf Höhe der Positivkontrolle (reines GFP) zu sehen ist. Dies spricht dafür, dass das GFP nicht in Teilfragmenten auf- und/oder abgebaut wurde. Gleichzeitig kann hier aber keine Aussage über die Lokalisation des GFPs getroffen werden, da das Signal zu gering ist, um fluoreszenzmikroskopisch bestimmt zu werden.

Eine weitere Möglichkeit, welche zu einer unvollständigen Expression des Proteins oder dessen Abbau führen könnten, ist Alternatives Spleißen. Das Alternatives Spleißen in eukaryotischen Zellen beruht auf einer Vielzahl von Mechanismen und Regulationen, die bisher weitestgehend

nicht bekannt sind (Matlin et al., 2005). Alternatives Spleißen wurde für *P. tricornutum* von Guihéneuf et al. (2011) für das Gen bzw. Protein „Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1-like-gene“ (PtDGAT1) gezeigt. In der verwendeten *bkt*-Sequenz des Konstruktes liegen drei Startcodons vor, so dass durchaus die Möglichkeit einer Art des alternativen Spleißens besteht. In diesem Fall würde die Translation der mRNA mit dem ATG der *gfp*-Sequenz präferiert beginnen, während das Startcodon der Präsequenz und bzw. oder des *bkts* übersprungen wird. Eine weitere Möglichkeit besteht in der durch die Fusion bedingten Bildung von Prozessierungsstellen. Einzige Prozessierungsstelle, neben der Präsequenz ist die des Transitpeptids von *C. reinhardtii*. Weitere alternative Prozessierungsstellen konnten jedoch innerhalb des Konstrukts mittel Target P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> (02.12.15)) nicht gefunden werden. Wäre es zu einer Prozessierung am Transitpeptid gekommen, so müsste das detektierte GFP-Signal entsprechend größer ausfallen als das der Positivkontrolle. Gesetz des Falles, dass Bkt von GFP durch entsprechende Prozessierungsmaßnahmen der Zelle abgespalten wurde und für sich alleinstehend als funktionelles Protein existieren könnte, so könnte auch das noch in Bkt vorhandene Transitpeptid, welches für den Import in den Chloroplasten in *C. reinhardtii* zuständig ist, den Transport in den Chloroplasten oder die Funktionalität des Proteins in *P. tricornutum* beeinflussen. Diese Überlegung könnte auch der Grund sein, warum die Transformanden ohne *gfp*-Konstrukt kein Astaxanthin bilden konnten.

5.3 Ausblick

Die Identifizierung neuer Gene lassen weitere genetische Modifikation in der Carotinoidbiosynthese in *P. tricornutum* zu.

Um eine weitere Steigerung der Carotinoidsynthese und damit des Fucoxanthingehalts zu erreichen, muss der Substratlimitierung der Phytoen-Synthase entgegen gewirkt werden. Dafür kann durch die zusätzliche Modifikation des *dxs*-Genes die Synthesekapazität von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase erhöht und damit mehr Substrat für die Phytoen-Synthase zur Verfügung gestellt werden. Wie bereits beschrieben, können ebenso die Lichtverhältnisse für eine bessere Ausbeute angepasst werden.

Um in *P. tricornutum* die genetische Modifikation mit einem Fremdgen in Richtung Astaxanthinsynthese zu ermöglichen, müssen erst universell nutzbare Signal- und Transitpeptide zur Verfügung stehen.

Sobald die Bildung von Astaxanthin in *P. tricornutum* möglich ist, kann eine zusätzliche Umleitung des Biosyntheseweges mit Zeaxanthin als Zweigstelle stattfinden. Die gewonnenen Erkenntnisse über die Funktionalität der Zeaxanthin-Epoxidase 2 und 3 ermöglicht dabei ein

gezieltes Herunterregulieren entsprechender Gene. Diese putativen „knock-down“ Mutanten der Zeaxanthin-Epoxidase sollten durch eine Akkumulation von Zeaxanthin der eingebrachten β -Carotin-Ketolase mehr Substrat zur Verfügung stellen und somit den Biosyntheseweg verstärkt hin zur Astaxanthinsynthese umlenken. Ein „knock-down“ der Zeaxanthin-Epoxidase muss dabei allerdings genau dosiert sein, damit es in *P. tricornutum* nicht zu einer physiologischen Einschränkung, das heißt einem Mangel an Violaxanthin für die weiterführende Synthese, kommt. Unter Schwachlichtbedingungen würde ein Mangel an Fucoxanthin vermutlich zu einer Reduzierung der Lichtsammelkomplexe führen. Unter Starklichtbedingungen hätten solche *zep*-Mutanten wahrscheinlich aufgrund der fehlenden Xanthophylle Lichtstress und so Probleme im Umgang mit einer Überenergetisierung.

6 Zusammenfassung

Mikroalgen wird aufgrund ihrer photoautotrophen Lebensweise, ihrer meist einfachen Anzucht und ihres schnellen Wachstums ein großes Potential als Produzenten verschiedener Stoffe, wie beispielsweise den Sekundärmetaboliten der Carotinoidbiosynthese, zugesprochen. Zur Produktion solcher Stoffe bedarf es der Aufklärung der in einem Biosyntheseweg operierenden Enzyme und ihrer zugehörigen Gene.

In dieser Arbeit sollte einerseits durch genetische Modifikation der Carotinoidbiosynthese der Fucoxanthingehalt erhöht und andererseits die Produktion von Astaxanthin in *P. tricornutum* erreicht werden. Bisher fehlen experimentelle Nachweise über die Funktion, Regulation und die limitierenden Eigenschaften daran beteiligter Gene und deren Enzyme. Um dem Ziel der Arbeit näher zu kommen, wurden zuerst potentiell an der Regulation der Carotinoidbiosynthese beteiligte Gene ausgewählt und deren Enzyme funktionell charakterisiert. Eines dieser Enzyme ist das Eingangsenzym der Carotinoidbiosynthese, die Phytoen-Synthase. Die entsprechend annotierte putative Sequenz (*psy* #Pt56881) wurde zur Analyse herangezogen. Nachdem im Rahmen dieser Arbeit über die Komplementation in einem dafür ausgerichteten *E. coli* Stamm der funktionelle Nachweis der Phytoen-Synthase erbracht werden konnte, wurde untersucht, ob die Phytoen-Synthase einer lichtabhängigen Expression unterliegt und somit die Carotinoidsynthese im WT von *P. tricornutum* limitiert. Durch die Inhibierung der Phytoen-Desaturase mittels Norflurazon konnte die verstärkte Akkumulation des Produktes der Phytoen-Synthase, Phytoen, bei einem Transfer der *P. tricornutum*-Kulturen von Schwach- in Starklicht gezeigt werden. Die Expression der Phytoen-Synthase von *P. tricornutum* wird demnach durch die Lichtbedingungen reguliert und limitiert auch die Carotinoidsynthese. Ein weiteres an der Carotinoidsynthese beteiligtes Enzym ist die Zeaxanthin-Epoxidase. Sie bietet zugleich eine Möglichkeit, an dieser Stelle die Carotinoidsynthese in Richtung Astaxanthinproduktion umzulenken. Für *P. tricornutum* sind drei potentielle Genkandidaten (*zep1*: #Pt45845; *zep2*: #Pt56488; *zep3*: #Pt56792) annotiert, welche ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit funktionell charakterisiert wurden. Der funktionelle Nachweis erfolgte dabei ebenfalls mittels eines Komplementationsansatzes in einem damit neu etablierten Expressionssystem mit *npq2*-Mutanten aus der Modellpflanze *A. thaliana*. Die Analyse der Transformanten zeigte eine Epoxidase-Aktivität des Produktes aus *zep2* und *zep3*. Das Enzym Zeaxanthin-Epoxidase 2 weist dabei eine andere Spezifität auf als die Zeaxanthin-Epoxidase 3, welche funktionell betrachtet der Zeaxanthin-Epoxidase aus *A. thaliana* am nächsten kommt. Die Zeaxanthin-Epoxidase 2 akzeptiert im Unterschied zu Zeaxanthin-Epoxidase 3 neben Zeaxanthin auch andere Substrate wie Lutein mit nur einem 3-Hydroxy-β-

Iononring und stellt damit einen validen Kandidaten für die Umwandlung von Diatoxanthin in Diadinoxanthin in *P. tricornutum* dar. Obwohl die Transkriptanalysen ausreichende Mengen an RNA von *zep1* in *A. thaliana* zeigen und anhand eines zusätzlichen mit der Sequenz für GFP markierten *zep1*-Konstruktes in WT-Protoplasten von *A. thaliana* der Import in den Chloroplasten und die Expression nachgewiesen werden konnte, weist die Zeaxanthin-Epoxidase 1 zumindest in den *A. thaliana*-Transformanten keine Epoxidase-Aktivität auf. Des Weiteren zeigt die diurnale Expression in *P. tricornutum*, dass die Regulation der Zeaxanthin-Epoxidasen an den Bedarf photoprotektiver Pigmente angepasst wird. Während die Regulation des Transkript-Levels von *zep2* und *zep3* nahezu parallel laufen und ein gemeinsames Maximum aufweisen, zeigt das Transkript-Level von *zep1* ein anderes Maximum.

Die gewonnenen Erkenntnisse wurden dann zur Steigerung der Synthesekapazität mittels genetischer Modifikation des Carotinoidsyntheseweges in *P. tricornutum* angewendet. Durch das Einbringen zusätzlicher Genkopien der Phytoen-Synthase in *P. tricornutum* konnte dabei eine deutliche Steigerung des Fucoxanthingehalts unter Schwachlichtbedingungen erreicht werden. Gleichzeitig konnte durch weitere inhibitorische Versuche mittels Norflurazon beim Transfer von Schwach- zu Starklicht demonstriert werden, dass die Carotinoidsynthese durch die Kombination der genetischen Modifikation mit der Phytoen-Synthase und Starklicht *per se* weiterhin gesteigert werden kann. Zusammen mit den Transkriptanalysen zeigen die Pigmentanalysen, dass es einen nicht-linearen Zusammenhang zwischen RNA-Menge und gebildeter Phytoenmenge gibt, welcher durch eine zusätzliche Substratlimitierung der Phytoen-Synthase erklärt werden kann.

Bevor das Herunterregulieren der Zeaxanthin-Epoxidasen in *P. tricornutum* durchgeführt und damit ein verstärkter Fluss zur Astaxanthinbildung erreicht werden sollte, wurde das Potential von *P. tricornutum* zur Astaxanthinproduktion überprüft. Hierfür wurde die β -Carotin-Ketolase (*bkt* #CrAEA35045.1) aus *C. reinhardtii* einmal ohne und zusätzlich mit verschiedenen Präsequenzen fusioniert separat in *P. tricornutum* eingebracht. Astaxanthin konnte trotz Nutzung funktionell bestätigter Präsequenzen aus der Literatur nicht nachgewiesen werden. Die Versuche zeigen damit, dass hier noch weitere Untersuchungen nötig sind, um mittels eines geeigneten Transportsystems Fremd-Proteine in den Chloroplasten von *P. tricornutum* einzubringen. Das Ausbleiben der Astaxanthinproduktion konnte an dieser Stelle nicht hinreichend geklärt werden.

Insgesamt schaffen die Ergebnisse dieser Arbeit eine weitere Grundlage, um die Carotinoidbiosynthese in *P. tricornutum* besser zu verstehen und diese mittels genetischer Modifikationen biotechnologisch nutzbar zu machen.

7 Literaturverzeichnis

- Albrecht, M.; Takaichi, S.; Steiger, S.; Wang, Z. Y.; Sandmann, G.** (2000): Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*. In: *Nature biotechnology* 18 (8), S. 843–846.
- Apt, K. E.; Kroth-Pancic, P. G.; Grossman, A. R.** (1996): Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Molecular & general genetics : MGG* 252 (5), S. 572–579.
- Archibald, J. M.; Keeling, P. J.** (2002): Recycled plastids: a 'green movement' in eukaryotic evolution. In: *Trends in genetics : TIG* 18 (11), S. 577–584.
- Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T.** (2006): The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 22 (2), S. 195–201.
- Baker R., Günther C.** (2005): Carotenoids for all! The antioxidant value of pigments. In: *Feed Mix* (13), S. 18–21.
- Bartley, G. E.; Scolnik, P. A.** (1993): cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (34), S. 25718–25721.
- Beer, A.; Gundermann, K.; Beckmann, J.; Buchel, C.** (2006): Subunit composition and pigmentation of fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms: evidence for a subunit involved in diadinoxanthin and diatoxanthin binding. In: *Biochemistry* 45 (43), S. 13046–13053.
- Benemann, J. R.** (1992): Microalgae aquaculture feeds. In: *Journal of Applied Phycology* 4 (3), S. 233–245.
- Berberich, T.; Takahashi, Y.; Saitoh, H.; Terauchi, R.** (2008): High-Throughput Functional Screening of Genes In Planta. In: *The Handbook of Plant Functional Genomics: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, S. 113–136.
- Bertani, G.** (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 62 (3), S. 293–300.
- Bertrand, M.** (2010): Carotenoid biosynthesis in diatoms. In: *Photosynthesis research* 106 (1-2), S. 89–102.

- Biasini, M.; Bienert, S.; Waterhouse, A.; Arnold, K.; Studer, G.; Schmidt, T. et al. (2014):** SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. In: *Nucleic acids research* 42 (Web Server issue), W252-8.
- Bikoulis, A. (2013):** Analyse der Regulation und Genexpression spezifischer Enzyme der Carotinoidbiosynthese der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*. Masterarbeit.
- Bilger, W.; Björkman, O. (1990):** Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of the light- induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. In: *Photosynthesis Research Springer Verlag* (25), S. 173–185.
- Blanc, G.; Duncan, G.; Agarkova, I.; Borodovsky, M.; Gurnon, J.; Kuo, A. et al. (2010):** The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. In: *The Plant cell* 22 (9), S. 2943–2955.
- Böger P, Sandmann G. (1998):** Carotenoid biosynthesis inhibitor herbicides – mode of action and resistance mechanisms. In: *Pesticide Outlook* (9), S. 29–35.
- Bojko, M.; Olchawa-Pajor, M.; Tuleja, U.; Kuczynska, P.; Strzalka, W.; Latowski, D.; Strzalka, K. (2013):** Expression of three diadinoxanthin de-epoxidase genes of *Phaeodactylum tricornutum* in *Escherichia coli* Origami b and BL21 strain. In: *Acta biochimica Polonica* 60 (4), S. 857–860.
- Bouvier, F.; D'harlingue, A.; Backhaus, R. A.; Kumagai, M. H.; Camara, B. (2000):** Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 267 (21), S. 6346–6352.
- Bouvier, F.; D'harlingue, A.; Huguene, P.; Marin, E.; Marion-Poll, A.; Camara, B. (1996):** Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). In: *The Journal of biological chemistry* 271 (46), S. 28861–28867.
- Bowler, C.; Allen, A. E.; Badger, J. H.; Grimwood, J.; Jabbari, K.; Kuo, A. et al. (2008):** The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. In: *Nature* 456 (7219), S. 239–244.
- Breitenbach, J.; Gerjets, T.; Sandmann, G. (2013):** Catalytic properties and reaction mechanism of the CrtO carotenoid ketolase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 529 (2), S. 86–91.

- Breitenbach, J.; Zhu, C.; Sandmann, G.** (2001): Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 49 (11), S. 5270–5272.
- Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.** (Hg.) (2004): Carotenoids Handbook; Birkhäuser: Basel, Switzerland, 2004.
- Bugos, R. C.; Hieber, A. D.; Yamamoto, H. Y.** (1998): Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (25), S. 15321–15324.
- Bugos, R. C.; Yamamoto, H. Y.** (1996): Molecular cloning of violaxanthin de-epoxidase from romaine lettuce and expression in *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (13), S. 6320–6325.
- Bullock, W. O.; Fernandez, J. M.; Stuart, J. M.** (1987): XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. In: *BioTechniques* (5), S. 376–379.
- Bungard, R. A.; Ruban, A. V.; Hibberd, J. M.; Press, M. C.; Horton, P.; Scholes, J. D.** (1999): Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (3), S. 1135–1139.
- Cavalier-Smith, T.** (2003): Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 358 (1429), S. 109-33
- Clough, S. J.; Bent, A. F.** (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 16 (6), S. 735–743.
- Coesel, S.; Obornik, M.; Varela, J.; Falciatore, A.; Bowler, C.** (2008): Evolutionary origins and functions of the carotenoid biosynthetic pathway in marine diatoms. In: *PloS one* 3 (8), e2896.
- Cowan, S. W.; Newcomer, M. E.; Jones, T. A.** (1990): Crystallographic refinement of human serum retinol binding protein at 2A resolution. In: *Proteins* 8 (1), S. 44–61.
- Cunningham, F. X.; Gantt, E.** (1998): Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. In: *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 49, S. 557–583.

- Dambeck, M.; Sandmann, G.** (2014): Antioxidative activities of algal keto carotenoids acting as antioxidative protectants in the chloroplast. In: *Photochemistry and photobiology* 90 (4), S. 814–819.
- Dambeck, M.; Eilers, U.; Breitenbach, J.; Steiger, S.; Buchel, C.; Sandmann, G.** (2012): Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Journal of experimental botany* 63 (15), S. 5607–5612.
- Del Campo, J. A.; Garcia-Gonzalez, M.; Guerrero, M. G.** (2007): Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. In: *Applied microbiology and biotechnology* 74 (6), S. 1163–1174.
- Della Penna, Dean** (1999): Carotenoid Synthesis and Function in Plants: Insights from Mutant Studies in *Arabidopsis thaliana*. In: Harry A. Frank, Andrew J. Young, George Britton und Richard J. Cogdell (Hg.): *The Photochemistry of Carotenoids*. Dordrecht: Springer Netherlands, S. 21–37.
- Domingues, N.; Matos, A. R.; Marques, da Silva J.; Cartaxana, P.** (2012): Response of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to photooxidative stress resulting from high light exposure. In: *PloS one* 7 (6), e38162.
- Eilers, U.; Bikoulis, A.; Breitenbach, J.; Büchel, C.; Sandmann, G.** (2015): Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Journal of Applied Phycology* 28 (1), S. 123–129.
- Elmadfa, I.; Majchrzak, D.** (1998): Carotenoids and vitamin A in fish. In: *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 37 (2), S. 207–210.
- Emanuelsson, O.; Brunak, S.; Heijne, G. von; Nielsen, H.** (2007): Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. In: *Nature protocols* 2 (4), S. 953–971.
- Falbel, T. G.; Staehelin, LA.; Adams, W.** (1994): Analysis of xanthophyll cycle carotenoids and chlorophyll fluorescence in light intensity-dependent chlorophyll-deficient mutants of wheat and barley. In: *Photosynthesis research* 42 (3), S. 191–202.
- Falciatore, A.; Bowler, C.** (2002): Revealing the molecular secrets of marine diatoms. In: *Annual review of plant biology* 53, S. 109–130.
- Falciatore, A.; Casotti, R.; Leblanc, C.; Abrescia, C.; Bowler, C.** (1999): Transformation of Nonselectable Reporter Genes in Marine Diatoms. In: *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* 1 (3), S. 239–251.

- Falkowski, P. G.** (1994): The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. In: *Photosynthesis research* 39 (3), S. 235–258.
- Falkowski, P. G.; Barber, R. T.; Smetacek, V. V.** (1998): Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5374), S. 200–207.
- Flower, D.; North, A. C.; Sansom, C. E.** (2000): The lipocalin protein family: structural and sequence overview. In: *Biochimica et biophysica acta* 1482 (1-2), S. 9–24.
- Flower, D.** (1996): The lipocalin protein family: structure and function. In: *The Biochemical journal* 318 (Pt 1), S. 1–14.
- Förster, B.; Osmond, C. B.; Pogson, B. J.** (2009): De novo synthesis and degradation of Lx and V cycle pigments during shade and sun acclimation in avocado leaves. In: *Plant physiology* 149 (2), S. 1179–1195.
- Fraser, P. D.; Kiano, J. W.; Truesdale, M. R.; Schuch, W.; Bramley, P. M.** (1999): Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. In: *Plant molecular biology* 40 (4), S. 687–698.
- Fraser, P. D.; Romer, S.; Shipton, C. A.; Mills, P. B.; Kiano, J. W.; Misawa, N. et al.** (2002): Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2), S. 1092–1097.
- Fray, Rupert G.; Wallace, Andrew; Fraser, Paul D.; Valero, Daniel; Hedden, Peter; Bramley, Peter M.; Grierson, Donald** (1995): Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. In: *The Plant Journal* 8 (5), S. 693–701.
- Gibbs, S. P.** (1979): The route of entry of cytoplasmically synthesized proteins into chloroplasts of algae possessing chloroplast ER. In: *Journal of cell science* 35, S. 253–266.
- Gibbs, S. P.** (1981): The Chloroplast Endoplasmic Reticulum: Structure, Function, and Evolutionary Significance. In: G. H. Bourne, J. F. Danielli und K. W. Jeon (Hg.): *International Review of Cytology*, Volume 72: Academic Press, S. 49–99.
- Goss, R.** (2003): Substrate specificity of the violaxanthin de-epoxidase of the primitive green alga *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae). In: *Planta* 217 (5), S. 801–812.

- Goss, R.; Jakob, T.** (2010): Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. In: *Photosynthesis research* 106 (1-2), S. 103–122.
- Goss, R.; Lepetit, B.; Wilhelm, C.** (2005): Evidence for a rebinding of antheraxanthin to the light-harvesting complex during the epoxidation reaction of the violaxanthin cycle. In: *Journal of plant physiology* 163 (5), S. 585–590.
- Goss, R.; Böhme, K.; Wilhelm, C.** (1998): The xanthophyll cycle of *Mantoniella squamata* converts violaxanthin into antheraxanthin but not to zeaxanthin: consequences for the mechanism of enhanced non-photochemical energy dissipation. In: *Planta* 205 (4), S. 613–621.
- Götz, T.; Sandmann, G.; Romer, S.** (2002): Expression of a bacterial carotene hydroxylase gene (*crtZ*) enhances UV tolerance in tobacco. In: *Plant molecular biology* 50 (1), S. 129–142.
- Gruber, A.; Vugrinec, S.; Hempel, F.; Gould, S. B.; Maier, U. G.; Kroth, P. G.** (2007): Protein targeting into complex diatom plastids: functional characterisation of a specific targeting motif. In: *Plant molecular biology* 64 (5), S. 519–530.
- Grzyb, J.; Latowski, D.; Strzalka, K.** (2006): Lipocalins - a family portrait. In: *Journal of plant physiology* 163 (9), S. 895–915.
- Guedes, A. C.; Amaro, H. M.; Malcata, F. X.** (2011): Microalgae as sources of high added-value compounds--a brief review of recent work. In: *Biotechnology progress* 27 (3), S. 597–613.
- Guihéneuf, F.; Leu, S.; Zarka, A.; Khozin-Goldberg, I.; Khalilov, I.; Boussiba, S.** (2011): Cloning and molecular characterization of a novel acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1-like gene (*PtDGAT1*) from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *The FEBS journal* 278 (19), S. 3651–3666.
- Hackett, J. D.; Yoon, H. S.; Soares, M. B.; Bonaldo, M. F.; Casavant, T. L.; Scheetz, T. E. et al.** (2004): Migration of the plastid genome to the nucleus in a peridinin dinoflagellate. In: *Current biology : CB* 14 (3), S. 213–218.
- Hager, A.** (1969): Light dependent decrease of the pH-value in a chloroplast compartment causing the enzymatic interconversion of violaxanthin to zeaxanthin; relations to photophosphorylation. In: *Planta* 89 (3), S. 224–243.
- Han, D.; Li, Y.; Hu, Q.** (2013): Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological Implications. In: *Algae* 28 (2), S. 131–147.

- Havaux, M.** (1998): Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. In: *Trends in plant science* 3 (4), S. 147–151.
- Hellens, R. P.; Edwards, E. A.; Leyland, N. R.; Bean, S.; Mullineaux, P. M.** (2000): pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. In: *Plant molecular biology* 42 (6), S. 819–832.
- Hempel, F.; Bullmann, L.; Lau, J.; Zauner, S.; Maier, U. G.** (2009): ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. In: *Molecular biology and evolution* 26 (8), S. 1781–1790.
- Hicks, K. A.; O'Leary, S. E.; Begley, T. P.; Ealick, S. E.** (2013): Structural and mechanistic studies of HpxO, a novel flavin adenine dinucleotide-dependent urate oxidase from *Klebsiella pneumoniae*. In: *Biochemistry* 52 (3), S. 477–487.
- Higuera-Ciapara, I.; Felix-Valenzuela, L.; Goycoolea, F. M.** (2006): Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. In: *Critical reviews in food science and nutrition* 46 (2), S. 185–196.
- Hirschberg, J.** (2001): Carotenoid biosynthesis in flowering plants. In: *Current opinion in plant biology* 4 (3), S. 210–218.
- Horton, P.; Ruban, A. V.; Walters, R. G.** (1996): Regulation of Light Harvesting in Green Plants. In: *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 47, S. 655–684.
- Horton, P.; Ruban, A. V.; Wentworth, M.** (2000): Allosteric regulation of the light-harvesting system of photosystem II. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 355 (1402), S. 1361–1370.
- Hu, X.; Li, Y.; Li, C.; Fu, Y.; Cai, F.; Chen, Q.; Li, D.** (2012): Combination of fucoxanthin and conjugated linoleic acid attenuates body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced obese rats. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 519 (1), S. 59–65.
- Huang, J.; Zhong, Y.; Sandmann, G.; Liu, J.; Chen, F.** (2012): Cloning and selection of carotenoid ketolase genes for the engineering of high-yield astaxanthin in plants. In: *Planta* 236 (2), S. 691–699.
- Huang, J. C.; Zhong, Y. J.; Liu, J.; Sandmann, G.; Chen, F.** (2013): Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin. In: *Metabolic engineering* 17, S. 59–67.

- Ikeda, Y.; Tsuji, S.; Satoh, A.; Ishikura, M.; Shirasawa, T.; Shimizu, T.** (2008): Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. In: *Journal of neurochemistry* 107 (6), S. 1730–1740.
- Ishida, Ken-ichiro; Cavalier-Smith, Thomas; Green, Beverley R.** (2000): Endomembrane structure and the chloroplast protein targeting pathway in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae, chromista). In: *Journal of Phycology* 36 (6), S. 1135–1144.
- Iwata-Reuyl, D.; Math, S. K.; Desai, S. B.; Poulter, C. D.** (2003): Bacterial phytoene synthase: molecular cloning, expression, and characterization of *Erwinia herbicola* phytoene synthase. In: *Biochemistry* 42 (11), S. 3359–3365.
- Jakob, T.; Goss, R.; Wilhelm, C.** (2001): Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Journal of plant physiology* 158 (3), S. 383–390.
- Jeffrey, S. W.; Humphry, G. F.** (1975): New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. In: *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* (167), S. 191–194.
- Jucker, W.** (2011): Carotenoids. In: *Chimia* 65 (1-2), S. 109–110.
- Kalituho, L.; Rech, J.; Jahns, P.** (2007): The roles of specific xanthophylls in light utilization. In: *Planta* 225 (2), S. 423–439.
- Kilian, O.; Kroth, P. G.** (2004): Presequence acquisition during secondary endocytobiosis and the possible role of introns. In: *Journal of molecular evolution* 58 (6), S. 712–721.
- Kilian, O.; Kroth, P. G.** (2005): Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 41 (2), S. 175–183.
- Kim, S. M.; Jung, Y. J.; Kwon, O. N.; Cha, K. H.; Um, B. H.; Chung, D.; Pan, C. H.** (2012): A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 166 (7), S. 1843–1855.
- Krubasik, P.** (2000): Gene der Carotinoid Biosynthese aus den Coryneformen Bakterien *Brevibacterium linens* und *Brevibacterium flavum*. Dissertation. Frankfurt a. M.

- Kumar, S.; Hosokawa, M.; Miyashita, K.** (2013): Fucoxanthin: A Marine Carotenoid Exerting Anti-Cancer Effects by Affecting Multiple Mechanisms. In: *Marine Drugs* 11 (12), S. 5130–5147.
- Kuzuyama, T.** (2002): Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, S. 1619–1627.
- Lamote, M.; Darko, E.; Schoefs, B.; Lemoine, Y.** (2003): Assembly of the photosynthetic apparatus in embryos from *Fucus serratus* L. In: *Photosynthesis research* 77 (1), S. 45–52.
- Lavaud, J.; Materna, A. C.; Sturm, S.; Vugrinec, S.; Kroth, P. G.** (2012): Silencing of the violaxanthin de-epoxidase gene in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* reduces diatoxanthin synthesis and non-photochemical quenching. In: *PloS one* 7 (5), e36806.
- Lavaud, J.; Rousseau, B.; van Gorkom, H. J.; Etienne, A. L.** (2002): Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Plant physiology* 129 (3), S. 1398–1406.
- Lichtenthaler, H. K.** (1999): The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. In: *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 50, S. 47–65.
- Lohr, M.; Wilhelm, C.** (1999): Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (15), S. 8784–8789.
- Lottspeich, F.; Engels, J. W.** (Hg.) (2006): Bioanalytik. 2. Aufl.: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München; Heidelberg.
- Machettira, A. B.; Gross, L. E.; Sommer, M. S.; Weis, B. L.; Englich, G.; Tripp, J.; Schleiff, E.** (2011): The localization of Tic20 proteins in *Arabidopsis thaliana* is not restricted to the inner envelope membrane of chloroplasts. In: *Plant molecular biology* 77 (4-5), S. 381–390.
- Maeda, H.; Hosokawa, M.; Sashima, T.; Murakami-Funayama, K.; Miyashita, K.** (2009): Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. In: *Molecular medicine reports* 2 (6), S. 897–902.

- Maheswari, U.; Montsant, A.; Goll, J.; Krishnasamy, S.; Rajyashri, K. R.; Patell, V. M.; Bowler, C.** (2005): The Diatom EST Database. In: *Nucleic acids research* 33 (Database issue), S. D344–D347.
- Marin, E.; Nussaume, L.; Quesada, A.; Gonneau, M.; Sotta, B.; Hugueney, P. et al.** (1996): Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. In: *The EMBO journal* 15 (10), S. 2331–2342.
- Matlin, A. J.; Clark, F.; Smith, C. W.** (2005): Understanding alternative splicing: towards a cellular code. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (5), S. 386–398.
- Merchant, S. S.; Prochnik, S. E.; Vallon, O.; Harris, E. H.; Karpowicz, S. J.; Witman, G. B. et al.** (2007): The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. In: *Science (New York, N.Y.)* 318 (5848), S. 245–250.
- Messing, J.** (1979): A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. In: *Recomb. DNA Tech. Bull* 2 (2), S. 43.
- Mikami, K.; Hosokawa, M.** (2013): Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. In: *International journal of molecular sciences* 14 (7), S. 13763–13781.
- Milborrow, B. V.** (2001): The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. In: *Journal of experimental botany* 52 (359), S. 1145–1164.
- Misawa, N.; Nakagawa, M.; Kobayashi, K.; Yamano, S.; Izawa, Y.; Nakamura, K.; Harashima, K.** (1990): Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 172 (12), S. 6704–6712.
- Misawa, N.; Satomi, Y.; Kondo, K.; Yokoyama, A.; Kajiwara, S.; Saito, T. et al.** (1995): Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. In: *Journal of bacteriology* 177 (22), S. 6575–6584.
- Misawa, N.; Shimada, H.** (1997): Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. In: *Journal of biotechnology* 59 (3), S. 169–181.
- Monterisino, S.; Orru, R.; Barendregt, A.; Westphal, A. H.; van Duijn, E.; Mattevi, A.; van Berkel, W. J.** (2013): Crystal structure of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase uncovers

- lipid-assisted flavoprotein strategy for regioselective aromatic hydroxylation. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (36), S. 26235–26245.
- Montsant, A.; Jabbari, K.; Maheswari, U.; Bowler, C.** (2005): Comparative genomics of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Plant physiology* 137 (2), S. 500–513.
- Müller, P.; Li, X. P.; Niyogi, K. K.** (2001): Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. In: *Plant physiology* 125 (4), S. 1558–1566.
- Murray, M. G.; Thompson, W. F.** (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. In: *Nucleic acids research* 8 (19), S. 4321–4325.
- Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; Heijne, G. von** (1997): A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. In: *International journal of neural systems* 8 (5-6), S. 581–599.
- Niyogi, K. K.; Bjorkman, O.; Grossman, A. R.** (1997): *Chlamydomonas* Xanthophyll Cycle Mutants Identified by Video Imaging of Chlorophyll Fluorescence Quenching. In: *The Plant cell* 9 (8), S. 1369–1380.
- Niyogi, K. K.; Grossman, A. R.; Bjorkman, O.** (1998): *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. In: *The Plant cell* 10 (7), S. 1121–1134.
- Nymark, M.; Valle, K. C.; Brembu, T.; Hancke, K.; Winge, P.; Andresen, K. et al.** (2009): An integrated analysis of molecular acclimation to high light in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *PloS one* 4 (11), e7743.
- Nymark, M.; Valle, K. C.; Hancke, K.; Winge, P.; Andresen, K.; Johnsen, G. et al.** (2013): Molecular and photosynthetic responses to prolonged darkness and subsequent acclimation to re-illumination in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *PloS one* 8 (3), e58722.
- Oeltjen, A.; Krumbein, W. E.; Rhiel, E.** (2002): Investigations on Transcript Sizes, Steady State mRNA Concentrations and Diurnal Expression of Genes Encoding Fucoxanthin Chlorophyll a/c Light Harvesting Polypeptides in the Centric Diatom *Cyclotella cryptica*. In: *Plant Biology* 4 (2), S. 250–257.
- Oeltjen, A.; Marquardt, J.; Rhiel, E.** (2004): Differential circadian expression of genes *fcp2* and *fcp6* in *Cyclotella cryptica*. In: *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 7 (2), S. 127–131.

- Owens, T. G.; Wold, E. R.** (1986): Light-Harvesting Function in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*: I. Isolation and Characterization of Pigment-Protein Complexes. In: *Plant physiology* 80 (3), S. 732–738.
- Papagiannakis, E.; H M van Stokkum, I; Fey, H.; Büchel, C.; van Grondelle, R.** (2005): Spectroscopic characterization of the excitation energy transfer in the fucoxanthin-chlorophyll protein of diatoms. In: *Photosynthesis research* 86 (1-2), S. 241–250.
- Pfündel, E. E.; Renganathan, M.; Gilmore, A. M.; Yamamoto, H. Y.; Dilley, R. A.** (1994): Intrathylakoid pH in Isolated Pea Chloroplasts as Probed by Violaxanthin Deepoxidation. In: *Plant physiology* 106 (4), S. 1647–1658.
- Piechulla, B.** (1999): Circadian expression of the light-harvesting complex protein genes in plants. In: *Chronobiology international* 16 (2), S. 115–128.
- Pogson, B. J.; Niyogi, K. K.; Bjorkman, O.; Della Penna, D.** (1998): Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (22), S. 13324–13329.
- Provasoli, L.; MC Laughlin, J. J.; Droop, M. R.** (1957): The development of artificial media for marine algae. In: *Archiv fur Mikrobiologie* 25 (4), S. 392–428.
- Pyszniak, A. M.; Gibbs, S. P.** (1992): Immunocytochemical localization of photosystem I and the fucoxanthin-chlorophylla/c light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Protoplasma* 166 (3), S. 208–217.
- Ragni, M.; Ribera d'Alcala, M.** (2007): Circadian variability in the photobiology of *Phaeodactylum tricornutum*: pigment content. In: *J Plankton Res* (29), S. 141–156.
- Ralley, L.; Enfissi, E. M.; Misawa, N.; Schuch, W.; Bramley, P. M.; Fraser, P. D.** (2004): Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 39 (4), S. 477–486.
- Rodríguez-Villalón, A.; Gas, E.; Rodríguez-Concepción, M.** (2009): Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 60 (3), S. 424–435.
- Rohmer, M.** (2010): Methylerythritol phosphate pathway. In: *Mander L, Lui H-W (eds) Comprehensive natural products II: chemistry and biology*, vol 1. Elsevier, Oxford, S. 517–555

- Ruban, A.; Lavaud, J.; Rousseau, B.; Guglielmi, G.; Horton, P.; Etienne, A. L.** (2004): The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants. In: *Photosynthesis research* 82 (2), S. 165–175.
- Ruban, A. V.; Berera, R.; Iliaia, C.; van Stokkum, I. H.; Kennis, J. T.; Pascal, A. A. et al.** (2007): Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. In: *Nature* 450 (7169), S. 575–578.
- Ruiz-Sola, M. A.; Rodríguez-Concepción, M.** (2012): Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. In: *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 10, e0158.
- Sachindra, N. M.; Sato, E.; Maeda, H.; Hosokawa, M.; Niwano, Y.; Kohno, M.; Miyashita, K.** (2007): Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 55 (21), S. 8516–8522.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F.; Maniatis, T.** (Hg.) (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandmann, G.** (1994): Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 223 (1), S. 7–24.
- Sandmann, G.** (2001): Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. In: *Trends in plant science* 6 (1), S. 14–17.
- Satoh, D.; Hiraoka, Y.; Colman, B.; Matsuda, Y.** (2001): Physiological and molecular biological characterization of intracellular carbonic anhydrase from the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. In: *Plant physiology* 126 (4), S. 1459–1470.
- Scala, S.; Bowler, C.** (2001): Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58 (11), S. 1666–1673.
- Schägger, H.; Jagow, G.** von (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. In: *Analytical biochemistry* 166 (2), S. 368–379.
- Seo, M.; Koshiba, T.** (2002): Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. In: *Trends in plant science* 7 (1), S. 41–48.

- Siaut, M.; Heijde, M.; Mangogna, M.; Montsant, A.; Coesel, S.; Allen, A. et al. (2007):** Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Gene* 406 (1-2), S. 23–35.
- Simkin, A. J.; Zhu, C.; Kuntz, M.; Sandmann, G. (2003):** Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. In: *Journal of plant physiology* 160 (5), S. 439–443.
- Sommer, M. S.; Daum, B.; Gross, L. E.; Weis, B. L.; Mirus, O.; Abram, L. et al. (2011):** Chloroplast Omp85 proteins change orientation during evolution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (33), S. 13841–13846.
- Steinbrenner, J.; Linden, H. (2001):** Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. In: *Plant physiology* 125 (2), S. 810–817.
- Steinbrenner, J.; Linden, H. (2003):** Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. In: *Plant molecular biology* 52 (2), S. 343–356.
- Stransky, H.; Hager, A. (1970):** Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen. V. Einzelne Vertreter der Cryptophyceae, Euglenophyceae, Bacillariophyceae, Chrysophyceae und Phaeophyceae. In: *Archiv für Mikrobiologie* 71 (2), S. 164–190.
- Tanaka, Y.; Nakatsuma, D.; Harada, H.; Ishida, M.; Matsuda, Y. (2005):** Localization of soluble beta-carbonic anhydrase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Sorting to the chloroplast and cluster formation on the girdle lamellae. In: *Plant physiology* 138 (1), S. 207–217.
- Toledo-Ortiz, G.; Huq, E.; Rodríguez-Concepción, M. (2010):** Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (25), S. 11626–11631.
- Tran, D.; Haven, J.; Qiu, W. G.; Polle, J. E. (2009):** An update on carotenoid biosynthesis in algae: phylogenetic evidence for the existence of two classes of phytoene synthase. In: *Planta* 229 (3), S. 723–729.

- Vieira, J.; Messing, J.** (1982): The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. In: *Gene* (19), S. 259–268.
- Wang, B.; Zarka, A.; Trebst, A.; Boussiba, S.** (2003): Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. In: *Journal of Phycology* 39 (6), S. 1116–1124.
- Wang, J.; Ortiz-Maldonado, M.; Entsch, B.; Massey, V.; Ballou, D.; Gatti, D. L.** (2002): Protein and ligand dynamics in 4-hydroxybenzoate hydroxylase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2), S. 608–613.
- Weber, C.; Nover, L.; Fauth, M.** (2008): Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 56 (4), S. 517–530.
- Wichuk, K.; Brynjolfsson, S.; Fu, W.** (2014): Biotechnological production of value-added carotenoids from microalgae: Emerging technology and prospects. In: *Bioengineered* 5 (3), S. 204–208.
- Winnepeninckx, B.; Backeljau, T.; DeWachter, R.** (1993): Extraction of high-molecular-weight DNA from molluscs. In: *Trends Genet* (9), S. 407.
- Wong, D. M.; Franz, A. K.** (2013): A comparison of lipid storage in *Phaeodactylum tricoratum* and *Tetraselmis suecica* using laser scanning confocal microscopy. In: *Journal of microbiological methods* 95 (2), S. 122–128.
- Zaslavskaja, L. A.; Lippmeier, J. C.; Kroth, P.G.; Grossman, A. R.; Apt, K. E.** (2000): Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. In: *Journal of Phycology* 36 (2), S. 379–386.
- Zhong, Y. J.; Huang, J. C.; Liu, J.; Li, Y.; Jiang, Y.; Xu, Z. F. et al.** (2011): Functional characterization of various algal carotenoid ketolases reveals that ketolating zeaxanthin efficiently is essential for high production of astaxanthin in transgenic *Arabidopsis*. In: *Journal of experimental botany* 62 (10), S. 3659–3669.
- Zhu, C.; Naqvi, S.; Breitenbach, J.; Sandmann, G.; Christou, P.; Capell, T.** (2008): Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (47), S. 18232–18237.

8 Anhang

8.1 Vektorinformationen

Vektoren, welche zur Transformation von *P. tricornutum* bzw. *A. thaliana* verwendet wurden sind in Folgendem als Leervektoren dargestellt.

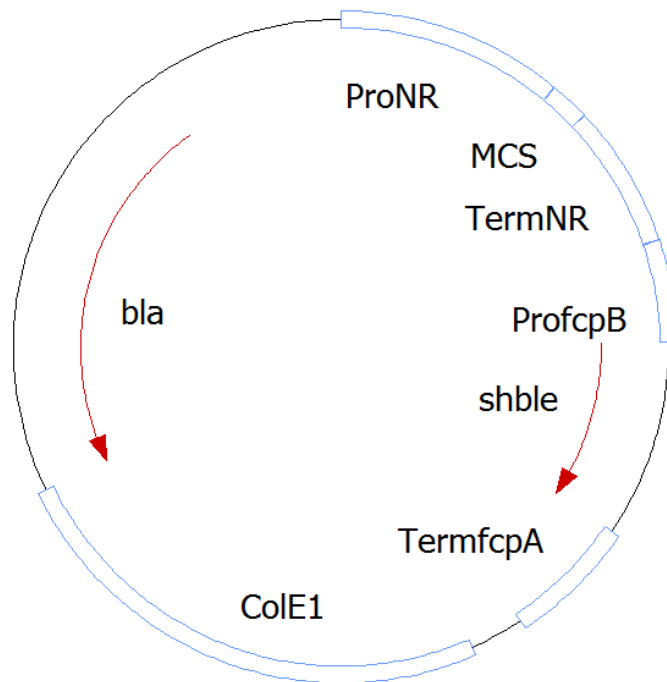


Abbildung 40: Transformationsvektor pPha_NR

Der Vektor ist 3860 bp groß. bla: Ampicillinresistenz; shble: Zeocinresistenz; ColE1: Replikationsregion; MCS: Multiple Cloning Site; ProNR/TermNR: Promoter/Terminator der Nitratreduktase (NR); ProfcpB: Promoter fcpB; Term fcpA: Terminator fcpA (Hempel et al., 2009).

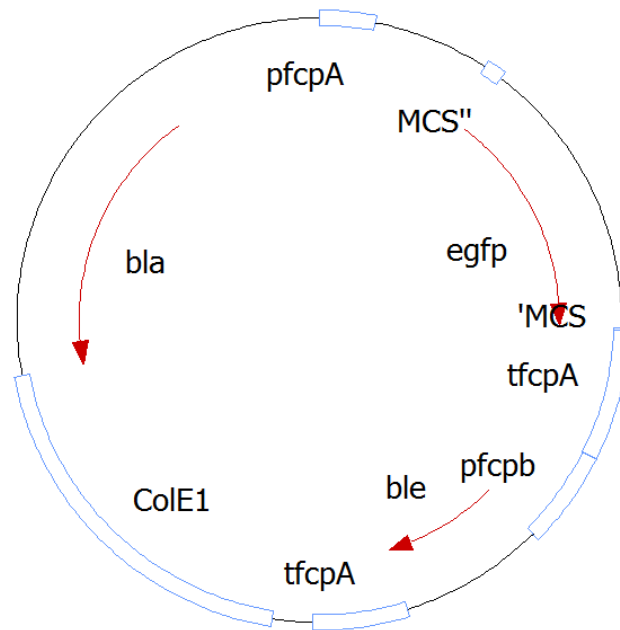


Abbildung 41: Transformationsvektor pPhaT_eGFP

Der Vektor ist 4804 bp groß. bla: Ampicillinresistenz; shble: Zeocinresistenz; ColE1: Replikationsregion; MCS: Multiple Cloning Site; egfp: encoding gene-green fluorescence protein pfcpa/tfcpb: Promoter/Terminator fcpA; pfcpb: Promoter fcpB; tfcpa: Terminator fcpA. (Zaslavskaja et al., 2000).

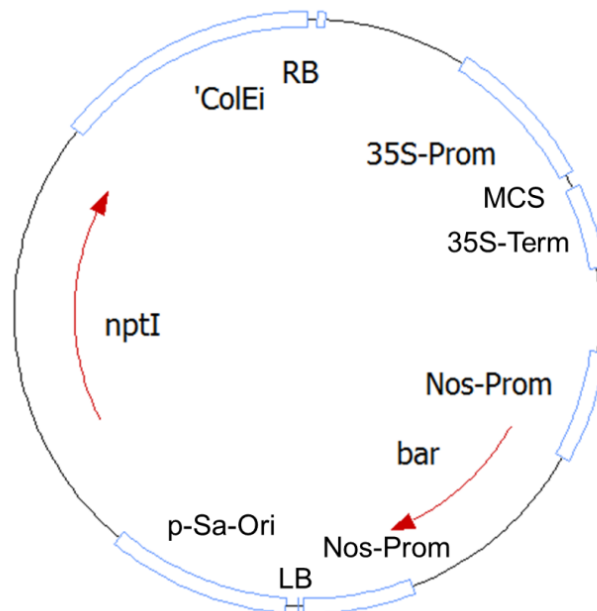


Abbildung 42: Transformationsvektor pGreen

Der Vektor ist 5036 bp groß. RB: right border; LB: left border. ColE1: Replikationsregion für E.coli; MCS: Multiple Cloning Site; nptI: Gen für Kanamycinresistenz; p-Sa-Ori: Replikationsregion für *A. tumefaciens*; Nos-Prom/Nos_Term: Nopaline-Promoter/-Terminator; bar: Nopalinegen; 35S-Prom/35S-Term: 35S-Promoter/-Terminator (Hellens et al., 2000).

8.2 Übersicht der verwendeten Primer in den verschiedenen PCRs

Tabelle 33: Namen, Sequenzen, eingebaute Schnittstellen bzw. Verwendungen und Amplifikatlängen

(- ohne/+ mit Intron) der verwendeten Primer.

Zielsequenz	Name des Primers	Sequenz (5'→3')	Schnittstelle	Verwendung	Amplifikat [bp] -/+ Intron
Allgemeine verwendete Primer	<i>h4_f</i>	GGTCCTTCGCGACAATATCC	-	Duplex PCR <i>psy</i> DNA Ebene	248/496
	<i>h4_r</i>	CGCAGGTCTGCTGTGATTC	-		
	<i>h4a_f</i>	CGTGGTGGTGTGAAACGTATC	-	Diurnale Expression	345
	<i>h4_qrt_f</i>	CGTGGTGGTGTGAAACGTATC	-	qrtPCR	190
	<i>h4_qrt_r</i>	AACCTCCGAATCCGTAGAGA	-		
	<i>pPha_NR_f</i>	CGGATCCTTCCAGCAACCATTC	-	Kontrolle der Insertion	201
	<i>pPha_NR_r</i>	CCTAACAGTGATCCTCATCGTCG	-		
	<i>pPhaT_f</i>	TTGCTTCGTCGGGAATCCCTACG	-		192
<i>pPhaT_r</i>	GAGCAAGGATGCCCATTTGTGC	-			
Phytoen-Synthase (<i>psy</i>)	<i>psy_EcoR1_f</i>	GAATTCGATGAAAGTTTCGACAAAGCTCTG	EcoRI	Generierung des <i>psy</i> -Konstruktes	1531
	<i>psy_HindIII_r</i>	AAGCTTTCATACTTGATCCAATTGGACC	HindIII		
	<i>psyk_f</i>	ATCCACCTTGGACATTACG	-	Duplex/	239/329

	<i>psyk_r</i>	ATGTTTCGTC AATTGGAACGC	-	qrtPCR	
Zeaxanthin- Epoxidase (<i>zep</i>)	<i>AtTP-zep_f</i>	TATCTAGATGCTCTTCTCGTCGGTGAAA	XbaI	Generierung des TP von <i>Atzep</i>	251
	<i>AthTP-zep_r</i>	TAGGATCCCTCCTTCTCAACTAAC GCCGTCG	BamHI		
	<i>Ptzep1_pG_f</i>	TACCCGGGCGATCGTTTTCCGCAAGG	SmaI	Generierung der <i>zep1, 2, 3</i> Sequenzen für den pGreenVektor	1547 bzw. 1521
	<i>Ptzep1_pG_r</i>	ATGAGCTCTTAGTGATGGTGATG GTGATGAAACTCTGGCGTGATAGAAAC	SacI		
	<i>Ptzep1_gfp_r</i>	ATGAGCTCAAACCTCTGGCGTGATAGAAAC	SacI		
	<i>Ptzep2_pG_f</i>	TACCCGGGTACAAGGCACATGACCTAC	SmaI		
	<i>Ptzep2_pG_r</i>	TAGAGCTCCTAGTGATGGTGATG GTGATGGCTTAGTCTTCTTTCGTAGCTG	SacI		1733
	<i>Ptzep3_pG_f</i>	TAGGATCCAGACAACCCACTACAACGG	BamHI		1609
	<i>Ptzep3_pG_r</i>	ATCCCGGGTTAGTGATGGTGATGGTGATGCAAACCGGCTGCGCCA	SmaI		
	<i>gfp_f</i>	TAGAGCTCATAGCCATGGGTAAGGAGAA	SacI		Expression des <i>zep1</i> -Konstruktes
	<i>gfp_r</i>	TAGAATTCTTAGAGATCTAGTTCATCCATGCC	EcoRI		
	<i>Atzep_rt_fwd</i>	CTATGTGACCGATAACGAAGGA	-	qrtPCR	124
	<i>Atzep_rt_rev</i>	GATTACTTTCACCTAAACGCC	-		
	<i>Ptzep1_rt_fwd</i>	CAGTTACCAGATTCTACTCGG	-		200
	<i>Ptzep1_rt_rev</i>	CATCACCATTCTGATCTCCT	-		
	<i>Ptzep2_rt_fwd</i>	ATTGGTTCGTC AAATTTCCG	-		
<i>Ptzep2_rt_rev</i>	CTAAGTCTTCGTAACCTACGAC	-	168/254		

	<i>Ptzep3_rt_fwd</i>	GGTCAAGTTGGGTACAAAGT	-		192/293
	<i>Ptzep3_rt_rev</i>	GTGGTGAACCTCCTCTGAC	-		
β-Carotin- Ketolase (<i>bkt</i>)	<i>PtCA1(Sac1)_f</i>	AGTGAGCTCTCATGAAGTTCTTGTCCAGCCTCCATC	SacI	Generierung des <i>CA1_bkt</i> - Konstruktes	167
	<i>PtCA1_bkt_r</i>	TTGTATCCCAGGGCCCATGGACAGAGCAGTAGTTGC	-	Fusions- PCR	1019 bzw. 1011
	<i>bkt_PtCA1_f</i>	GCAACTACTGCTCTGTCCATGGGCCCTGGGATACAA	-		
	<i>bkt_r</i>	ATCGAAGCTTATGTTACGCCAGGGCT	HindIII	Generierung des	
	<i>bkt(Sall)_r</i>	CAGGTCGACCGCCAGGGCTGCG	Sall	<i>CA1_bkt</i> - Konstruktes	

8.3 Zeaxanthin-Epoxidasen

8.3.1 Verwendete Sequenzen zur Erstellung des Kladogramms

>At_Zep

MGSTPFCYSINPSPSKLDFTRTHVFSVPVSKQFYLDLSSFSGKPGGVSGFRSRRALLGVKAATALVEKEEKREAV
TEKKKSRVLVAGGGIGGLVFALAAKKKGFVLDLVEKDLAIRGEGKYRGP IQIQSNALAALEAIDIEVAEQV
MEAGCITGDRINGLVDGISGTWYVKFDTFTPAASRGLPVTRVISRMTLQQILARAVGEDVIRNESNVVDFED
SGDKVTVVLENGQRYEGDLLVGADGIWSKVRNLFGRSEATYSGYTCYTGIADFIPADIESVGYRVFLGHKQ
YFVSSDVG GGMQWYAFHEEPAGGADAPNGMKRKLFEIFDGWCDNVLDLLHATEEEAILRRDIYDRSPGF
TWGKGRVTLGDSIHAMQPNMGQGGCMAIEDSFQLALELDEAWKQSVETTPVDVVSLLKRYEESRRLRV
AIIHAMARMAAIMASTYKAYLGVGLGPLSFLT KFRVPHPGRVGGRFFVDIAMP SMLDWVLGGNSEKLQGR
PPSCRLTDKADDRLREWFEDDDALERTIKGEWYLIPHGDCCVSETLCLTKDEDQPCIVGSEP DQDFPGMRI
VIPSSQVSKMHARVIYKDGAFFLMDLRSEHGTYVTDNEGRRYRATPNFPARFRSSDIIEFGSDKKAARVVKVI
RKTPKSTRKNESNNDKLLQTA

>Pt_Zep1

MKFSTTVSSALFLIASVSTTTSTFTPVQSFVHRRTLLVTPRHATVEPPVREPETS DRVRQVRDRFRKASQDAA
NAKGCVAQDDGDESSWWRKLPEDNDVISNQRPLRVVIAGGGVAGLVTAACHAKGMQVAIFEQASQY
APYGGPIQIQSNALRALERINPVIC EEIRKAGTVADRVSGLKIGYKKG VFLGLGKQYKGDWLVRFDTLQPA
LDAGLYPTVVDRPVIQQILLEHGIPEKTVRIKSRIANYEELGPGKGV RILLEDGT VAYADVLIGSDGIWSSVRR
IMHGLDQGADGFAASGAAGGALNEAEARRMAKDSVLMANNANRRYSKFTCYAALTEHRASNIEEVSQIL
LGKDKYFVSTDGGGERQQWFALIREPAGGVDP EPTPENPTPKLTRLLQEFNHEEPGDQNGDVWDDFAYEF
KATPEEDIKRRDLYDGSPLLMQGW SKGQVAICGDAHPMMPNLGQGGCQATEDGYRLAEELATVRTTKD
IEGALQEYRKRIPRTTIIQALAQ LGSDLLVDFDKMMTIPLVGPFFLFMTQVSMFPVLRFLYTP EF

>Pt_Zep2

MGLSFLSLCAVLTASSAMAFVTRSPACNDVTRSLHRINTRHMTYFPYPASSLRISTRVASTAVPPEDVAFDK
LSLPAREGRPLKIAIAGGGVGG LTTALCMLKKGFDVTVYEKTA AFARFGGPIQFASNALSVLKEIDETL FERV
MDKFTFTGTRTCGIDGLRADGSRMTEDRLDYLWNP DAPADWFVKFPLKQCADLFG LPYTGVIDRPDLQ
EILIDECRKLKPDFLINGNPVVG YEDLGKGQGV TINLNDQTTASADVLVGS DGIWSAVRDQMYKEGGVKST
SANKKKRQGC DYSGYTVFAGETILKTPDYATGYKVYIGPKRYFVTS DVGDRIQWYAFFALPPGTTKAPSG
WGGSTRDGQTDPEENLV DYVKGLHEGWSDEVMMLVDSTSPDSVEQRDLYDRAPELFRSWANGNVVLIG
DAVHAMMPNLGQGGCQAIEDAYVLTETLANTRTTEKLQDALQEYRKRIVRSIVQFLSKLASDLIINAFDTP
WSPHDNLGKSWKSYLTFWKPILQFAIFPMQFAYLSYPTGNMGDLP AKLEAIWKEKHKTDAEAVFEQAS
KEGFVMEHEASFFKAEVELSPTALAAATKEELS

>Pt_Zep3

MKRCSIVTILYVATTVRAFAPAPLVQSSCFFQRQP TTTARFVSGTAPPSSNVASEEKVDAISEAHR LKVLIAG
AGVGGLSLAKVLT KMPTMDVTVLEQTSEFKRFGGPIQLASNAMEILKHMDKPVFDKVM EKFTFTGDKENG
IKDGIRTEWYAKFDLKT PAENRNMPYTGVIERPDLQQIFLDSL PKGTVKNGDGVARYEKLPDGGVKAVL KSG
KEYVGDVLIGADGIWSAVRATMRDSPA KGDGSGATYSGYTVFAGELAYDSFDNGQVGYKVYIGPGQYFVIT
DIGNGNYQWYAFLARPADSASSTDM PDGQSKYLQEIFAGWSEEVHILRATQEHEIEQRDLYDRPPS AMK
PWT DGPVALLGDGVHAMMPNLGQGGCQAIEDAFVIGQELGSATKRSQIVDKLREYQRRRLIRSAAVQGLS
RFASDIIIRGFDTPAKIYRDENGK FQFENCNYAGIVTKILQPILPIFFSVQFAFLYDGWKN DKQIDFKAF LGF SVL
GG LIVSLVLFELAEAGLGIGLGA EALLGA ELLDFGGISAAIQDFFLGGGAAGL

>Tp_Zep1 (#269147)

MKVALFEQASSYAPYGGPIQIQSNALRALQQINPEIFQELVTAGTCTADRVSLKIGYKKGKGNKLAGLYDAGD
 WLVRFDITIGPALEAGLPATVVVDRPVIQQILVKYGFPEGTVRIKSRIQSYEDLGKGRGVSVTLEDGKAYADV
 LVGADGIWSQMEVAIAAKADRRFSGFTCYAALAPHRASNIENVSQILLGEKKYFVSTDGGGGDRQQWFALI
 REPAGGVDPEPTPEDPHPKLRLRKEFACNGSGDADGNVWDPFALELINAASEEDIKRRDLYDGAPLLTTLD
 PQRLLSPWAKGPVALCGDAAHPMMPNLGQGGCQATEDGYRLVEELAKVQHSRDVPGALGRYSRVRVIRT
 AIIQGFAQLGSDLLVDFDLMMTIPLLGPFLLTMTQLSMPFILRYLYTPSF

> Tp_Zep2 (#26139)

MADDEADADFNSSDYELLGRPARPGRPLKVAIAGGGVGGGLTAALCMLKKGFDVTVYEKTAAFARFGGPIQ
 FASNALSVIKEIDEELFERVMDKFTFTGTRACGIKDGRLADGSFRMTNDSLWLNPEAPADWFKPLRQ
 CADLFGPYTGVIDRDLQEILLDECRKIKPDFIQNGNPVNGYVSKGKNGVTVNLADGTTAEADVLVGSDG
 IWSAIRAQMYGEEIKSSNALKRQGCTYSGYTVFAGETVLKTEDYYETGYKVYIGPQRYFVTSVDGDRVQ
 WYAFFALPPGTTKAPSGWGDYIKSLHQGSDEVMTVLDSTPPDSVEQRDLDRPPELLRSWADGNVVLIG
 DAVHPMMPNLGQGGCQAIEDAFVLSETLEACESTQKLEDALQDFYKRVRSIVQFLSRLASDLIINAFDT
 WSPHDDLGKSWKSYLTFWVKVRGVAPFYGNQCQHSYLLFSTQQPS

8.3.2 Homologe Sequenzbereiche in %-Werten

Vergleich von *A. thaliana* Zep mit *P. tricornutum*

AtZep : PtZep1: Identität 24,3 % ; Ähnlichkeit 34,6 %

http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=emboss_stretcher-I20160304-083619-0117-4558483-oy (04.03.16)

AtZep : PtZep2: Identität 25,6 % ; Ähnlichkeit 40,8 %

http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=emboss_stretcher-I20160304-083728-0574-41337415-oy (04.03.16)

AtZep : PtZep3: Identität 29,6 % ; Ähnlichkeit 43,1 %

http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=emboss_stretcher-I20160304-083816-0120-35469379-es (04.03.16)

Vergleich der Zep von *P. tricornutum* untereinander

PtZep1 : PtZep3 Identität 25,4 % ; Ähnlichkeit 39,6 %

http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=emboss_stretcher-I20160304-084520-0119-30264100-oy (04.03.16)

PtZep1 : PtZep2 Identität 29,2 % ; Ähnlichkeit 42,9 %

http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=emboss_stretcher-I20160304-085231-0065-75159779-es (04.03.16)

PtZep2 : PtZep3 Identität 37,6 % ; Ähnlichkeit 51,3 %

http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=emboss_stretcher-I20160304-085451-0667-10709860-oy (04.03.16)

8.3.1 Protein-Alignment der Zeaxanthin-Epoxidase

```

A.th.  MG--STPFC-----YSINPSPSKLDFTRTHVF-SPVSKQFYLDLSSFSGKPGG 45
1_Zep1 MKFSTTVSSALFLIAS-VSTTTSFTPVQSFVHRRTLI-VTPRHATVEF----PVREPET 54
2_Zep2 MGLSFLSLCAVLTASSAMAFVTRSPACNDVTRSLHRINTRHMTYPFYP-----ASSLR 54
3_Zep3 ----MKRSCSIVTILYVATTVRAFAPAP--LV-----QSSCFFQ-----RQPTT 38
      .               : *               .

```



```

A.th.  VSGF---R--SRRALLGVKAATALVEKE-----EKREAVTEKKKKSRVLVAGG 88
1_Zep1 SDRVRQVRDRFRKASQDAANAKGCVAQDDGDESSWWRKPLPEDNDVINSQRPLRVVIAGG 114
2_Zep2 ISTR-----VASTAVPPEDVAFD-----KLS-LPAREGRPLKIAIAGG 91
3_Zep3 TARF-----VSGTAPSSNVASE-----EKV-DAISEAHRLKVLIAGA 75
      .           * :               : : : :*.

```



```

A.th.  GIGGLVFALAAKK-KGFDVLFVEKDLSAIRGEGKYRGPFIQIQSNALAALEAIDIEVAEQV 147
1_Zep1 GVAGLVTAACHA-KGMQVAIFEQASQ----YAPYGGPIQIQSNALRALERINPVICEEI 169
2_Zep2 GVGGLTTALCMLK-KGFDVTVEKTAA----FARFGGPIQFASNALSVLKEIDETLFEV 146
3_Zep3 GVGGLSLAKVLTkMPTMDVTVLEQTSE----FKRFGGPIQLASNAMEILKHMDKPVDFDKV 131
      *:.** *           ::* : * :           : ***** :***: * : : : :.

```



```

A.th.  MEAGCITGDRINGLVDGIS-----GTWYVKFDFTTPAASRGLPV 186
1_Zep1 RKAGVTADRVSGLKIGYKKGVFLGL-----GKQYEKGDWLVRFDTLQPALDAGLYP 221
2_Zep2 MDKFTFTGTRTCGIKDGLRADGSFRMTEDRLDYLNWPDAPADWFVKFPLKQCADLFGLPY 206
3_Zep3 MEKFTFTGDKENGIKDGIR-----TEWYAKFDLKTPAENRNMPY 170
      .  .* : * : *           * .:* * :

```



```

A.th.  TRVISRMTLQQILARAVGE---DVIRNESNVVDFEDSGD--KVTVVLENGQRYEGDLLVG 241
1_Zep1 TVVVD RPVIQQILLEHGIP--EKTVRIKSRIANYEELGPGKGVRIILEDGTVAADVLI 279
2_Zep2 TGVIDRPDLQEILIDECKRKLKPDFLINGNPVVGIEDLGKGQGVINLNDQTASADVLVG 266
3_Zep3 TGVIERPDLQQIFLDSLPK---GTVKNGDGVARYEKLDPG-GVKAVLKSGKEVYGDVLIG 226
      * * :.* :*:* :           : . :. :*. * * :. .*:*:*

```



```

A.th.  ADGIWSKVRNNLFG-----RSEATYSGYTC 266
1_Zep1 SDGIWSSVRRIMHGLDQGADGFAASGAAGGALNEAEARRMAKDSVLMANNANRRYSKFTC 339
2_Zep2 SDGIWSAVRDQMYKEGGVKST-----SANKKKRQGCDSYGYTV 304
3_Zep3 ADGIWSAVRATMRDS-----PAKGDGSGATYSGYTV 257
      :***** ** :               ** :*

```



```

A.th.  YTGFIADFI PADIESVGYRVFLGHKQYFVSSDVGGGKMQWYAFHEEPAGGADA----- 318
1_Zep1 YAALTEHRASNIEEVSYQILLGKDKYFVSTDGGGERQQWFALIREPAGGVDPEPTPE--- 396
2_Zep2 FAGETILKTPDYATGYKVYIGPKRYFVTSVDGDGRIQWYAFFALPPGTTKAPSGWGGST 364
3_Zep3 FAGELAYDSFDNGQVGKVVYIGPGQYFVITDIGNGNYQWYAF LARPADSASS----- 309
      :. :           : ..*:: :* :*** :* * . **:*: * .

```

```

A.th.  -----PNGMKKRLF-----EIFDGWCDNVLDLLHATEEEAILRRDIYDRSPGF- 361
1_Zep1 -----NPTPKLTRLLOEFNHEEPGDQNGDVWDDFAYELFKATPEEDIKRRDLYDGSPLLM 451
2_Zep2 RDGQTDPEENLVYVVK-----GLHEGWSDEVMMVLDSTSPDSVEQRDLYDRAPELF 415
3_Zep3 ----TDMPDGQSKYLQ-----EIFAGWSEEVHHILRATQEHEIEQRDLYDRPPSAM 356
      :                               * : . :: :* . : :*:** *

A.th.  -TWGKGRVTLGDSIHAMQPNUMGGGCMIEDSFQLALELDEAWKQSVETTTTPVDVSSSL 420
1_Zep1 QGWSKGQVAICGDAAHPMMPNLGQGGCQATEDGYRLAEELATVR-----TTKDIEGAL 504
2_Zep2 RSWANGNVVLIGDAVHAMMPNLGQGGCQAIEDAYVLTETLANTR-----TTEKLQDAL 468
3_Zep3 KPWTDGPVALLGDGVHAMMPNLGQGGCQAIEDAFVIGQELGSAT-----KRSQIVDKL 409
      * . * *.: ** . * * **:***** * **.: : * . . .: *

A.th.  KRYEESRRLRVAIHIMARMAAIMAS-----TYKAYLGVGL-----GPLSFLTFRVVP 468
1_Zep1 QEYYRKRIPTTTIIQALAQGLSLLVDF-DKMMTIP-LVGPFF-----LFMT----- 549
2_Zep2 QEYYRKRIVRVSIQFLSKLASDLIINAFDTPWSPHDNLGKSW-----KSYLTFFWKP 521
3_Zep3 REYQQRRLIRSAAVQGLSRFASDIIIRGFDTPAKIYRDENGKQFQFENCNYAGIVTKILQP 469
      :.* . * * : :: :*:*: : . . .: *

A.th.  HPGRVGGRRFFVDIAMP SMLDWVLGGNSEKIQGRPPSCRLTDKADDRLREWFEDD-----D 523
1_Zep1 -----QVSMFVLRFLYTPEF----- 565
2_Zep2 ILQ-----FAIFPMQFAYLYSYPTGNMGDLPAK-----LEAIWKEKHKTDAEA 565
3_Zep3 ILP-----IFFSVQFAFLYDQWKNKQ-----IDFKA 496
      : : :

A.th.  ALERTIKGEWYLIPHGDCCVSETLCLTKDEDQPCIVGSEPDQDFPGMRIVIPSSQVSKM 583
1_Zep1 ----- 604
2_Zep2 VFEQASKEGF-VMEHEASFFKAEVE----LSPTALAAATKEELS----- 604
3_Zep3 FLGFSVLGGL-IVSL--VLFELAEAGLGIGLGAEALLGAEGLLDFGGISAAIQDFFLGGG 553

A.th.  HARVIYKDGAFFLMDLRSEHGTYVTDNEGRRYRATPNFPARFRSSDIIEFGSDKKAARV 643
1_Zep1 ----- 557
2_Zep2 -----
3_Zep3 AAGL-----

```

Abbildung 43: Aminosäuresequenzvergleich der Zeaxanthin-Epoxidasen aus *A. thaliana* und *P. tricornutum* Zep1, 2, 3.

Mit grün markiert sind die mittels Restriktionsenzymen abgeschnittenen N-terminalen Enden der verwendeten Sequenzen für die Bildung der verschiedenen Konstrukte. *=alle AS sind identisch, ein Punkt zeigt an, dass die konservierte Stelle auf einer Gruppe mit wenige gemeinsamen Eigenschaften beruht. Zwei Punkte zeigen an, dass die konservierte Stelle auf einer Gruppe mit starken gemeinsamen Eigenschaften beruht. Erstellt am 18.01.2016 in <http://www.uniprot.org/align/A2016011875R6Z07FX5>

8.4 Absorptionsmaxima, Retentionszeiten und Mengenangaben zu den Pigmentanalysen

8.4.1 Funktionelle Charakterisierung der Phytoen-Synthese in *E. coli* bzw. *P. tricornutum*

Tabelle 34: Absorptionsmaxima zu den Pigmentanalysen der funktionellen Charakterisierung in *E. coli*.

In entsprechenden Lösungsmittelgemischen Acetonitril/Methanol/2-Propanol (85:10:5, v/v/v); Hypersil-Säule 32 °C.

Pigment (Peak)	Maxima (I,II,III) [nm]	Retentionzeit [min]
Zeaxanthin (1)	429, 452, 478	7,27
β-Cryptoxanthin (2)	425, 449, 476	12,41
β-Carotin (3)	429, 452, 478	30

Tabelle 35: Absorptionsmaxima zu den Pigmentanalysen der Carotinoidüberexpression in *P. tricornutum*.

In entsprechenden Lösungsmittelgemischen (A) 2-Stufen-Gradient aus Aceton: Methanol (3.8.4.2) Chromolith-Säule RT (B) Acetonitril/Methanol/2-Propanol (85:10:5, v/v/v) Nucleosil-Säule 20 °C; (3.3.5.1; 3.8.4.1).

Pigment	Maxima (I,II,III) [nm] (A)	Retentionzeit [min](A)	Maxima (I,II,III) [nm] (B)	Retentionzeit [min](B)
Fucoxanthin	450, 469	3,4	450, 468	7,25
Diadinoxanthin	425, 448, 478	3,9	424, 445, 474	14,15
β-Carotin	426, 453, 479	6,6	426, 453, 479	20,3

Tabelle 35: Absorptionsmaxima von Phytoen bei der Pigmentanalyse des NFZ-Versuches (4.1.5).

In entsprechenden Lösungsmittelgemischen Acetonitril/Methanol/2-Propanol bei 20 °C. (85:10:5, v/v/v) (3.4, 3.3.5.1, 3.8.4.1).

Pigment	Maxima (I,II,III) [nm]	Retentionzeit [min]
Phytoen	276, 286, 297	32,30

Tabelle 36: Phytoengehalt von *P. tricornutum*.

Aufgeführt ist der Phytoengehalt [mg/g TG] von WT, Transformante #13 und #14 nach 9 Stunden Behandlung mit NFZ. (n=5 MW±SD).

	WT	#13	#14
LL	2,32±0,29	3,40±0,12	3,22±0,54
HL	3,46±0,55	4,60±0,18	3,43±0,28

Tabelle 37: Carotinoidgehalt von *P. tricornutum*.

Aufgeführt ist der Carotinoidgehalt der verschiedenen Linien (WT, #13, #14) in **A** pro Chl a (n=3; MW±SD), in **B** pro mg Trockengewicht (n=5; MW±SD).

	Fcx	Ddx	b-Car	Gesamt
A				
WT	0,70 ± 0,01	0,13 ± 0,002	0,02 ± 0,002	0,28±0,01
#13	0,80 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0,02 ± 0,006	0,32±0,01
#14	0,77 ± 0,02	0,16 ± 0,004	0,01 ± 0,001	0,31±0,01
B				
WT	10,32±0,53	0,65 ± 0,09	0,31±0,04	11,28±0,66
#13	18,40 ± 1,51	1,02±0,23	0,56 ± 0,21	19,98±1,95
#14	16,17±0,96	1,33 ± 0,57	0,56±0,15	18,06±1,68

8.4.2 Funktionelle Charakterisierung der Zeaxanthin-Epoxidasen aus *P. tricornutum* in

A. thaliana-Linien

Tabelle 38: Absorptionsmaxima zu den Pigmentanalysen der *A. thaliana*-Linien (4.2.3).

In entsprechenden Lösungsmittelgemischen Acetonitril/Methanol/2-Propanol bei 32 °C (85:10:5, v/v/v) (3.3.5.1; 3.8.4.1).

Pigment (Peak)	Maxima (I,II,III)	Retentionzeit
	[nm]	[min]
Neoxanthin (1)	420, 445, 473	3,9
Violaxanthin (2)	420, 445, 473	4,2
Antheraxanthin (3)	422, 446, 474	6,2
Zeaxanthin (4)	429, 452, 478	8,2
β-Carotin (5)	429, 452, 478	20,3
Lutein (6)	422, 447, 474	7,9

8.5 Verwendete Präsequenzen zur Astaxanthinsynthese in

P. tricornutum

```

1 mklstaalfipavvafappqaafsrnralfatetaaektvfskmmgpggiqptsarpcsrthksrfalla
1 .....

211 aaltarrvkqftkqfrsrrmaedilklwqrqyhlpredsdkrtlrervhlyrpprsdlggiavavtvial
211 .....

421 watlfvyglwfvklpwalkvgetatswatiaavffsleflytqglfitthdamhgtialnrnrlnndflgnl
421 .....

631 aislyawfdysvlhrkhwehnhntgeprvdpdfhrqgnplavwfaqfmsymtlsqflkiavwsnlllla
631 .....

841 gaplanqlfntaapilsafrlfyygytyvphhpekghtgampqwvrtssasrlqsfiltcyhfdlhwehh
841 .....

1051 rwpypawwelpkcrqiargaala*
1051 .....*

```

Abbildung 44: Übersetzte Proteinsequenz des Konstruktes *FbaC1_short*.

Bei der Klonierung wurde die cDNA von *FbaC1* (ohne Intron) verwendet: die Präsequenz wurde auf genetischer Ebene genau am Übergang zum „mature-Protein“, in der Abbildung nach 45 AS, amplifiziert und auf genetischer Ebene an *bkt* fusioniert. Der Start von *Bkt* ist rot unterstrichen. Die obere Sequenz zeigt das hypothetisch zusammengesetzte Produkt der annotierten Sequenzen, die untere zeigt das Ergebnis der Sequenzierung. AS-Austausch: Serin gegen Aspargin → beide polar/neutral. Das * deutet das Ende der Sequenz an.

```

1 mklstaalfipavvafappqaafsrnralfatetaaektvfskmpasvkgpvtgkamgpggiqptsarpcsrthksrfa
1 .....

241 llaaaltarrvkqftkqfrsrrmaedilklwqrqyhlpredsdkrtlrervhlyrpprsdlggiavavtvialwatlfvy
241 .....

481 glwfvklpwalkvgetatswatiaavffsleflytqglfitthdamhgtialnrnrlnndflgnlaislyawfdysvlhrkh
481 .....

721 wehnhntgeprvdpdfhrqgnplavwfaqfmsymtlsqflkiavwsnllllagaplanqlfntaapilsafrlfyygt
721 .....

961 yvphhpekghtgampqwvrtssasrlqsfiltcyhfdlhwehrrwpypawwelpkcrqiargaala*
961 .....*

```

Abbildung 45: Übersetzte Proteinsequenz des Konstruktes *FbaC1_long*.

Bei der Klonierung wurde die cDNA von *FbaC1* (ohne Intron) verwendet: die Präsequenz wurde mit 13 AS vom „mature-Protein“ des *FbaC1*-Proteins, also in der Abbildung nach insgesamt 58 AS an *Bkt* fusioniert. Der Start von *Bkt* ist rot unterstrichen, zusätzliche AS im Vergleich zum short-Konstrukt sind grün unterstrichen. Die obere Sequenz zeigt das hypothetisch zusammengesetzte Produkt der annotierten Sequenzen, die untere zeigt das Ergebnis der Sequenzierung. AS-Austausch: Serin gegen Aspargin → beide polar/neutral. Das * deutet das Ende der Sequenz an.