

Funktionelle Expression,  
Reinigung und biochemische Charakterisierung  
der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus  
*Capsicum annuum*  
(Paprika)

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
Jürgen Breitenbach  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2001

D F 1

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

Dekan: Prof. Dr. Karl-Dieter Entian

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Sandmann

Prof. Dr. Willy Hilgenberg

Datum der Disputation: .....18.9.2001.....

## **DANKSAGUNG**

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerhard Sandmann danke ich herzlich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für Bereitstellung des Themas, sowie für die freundliche Unterstützung. Weiterhin danke Ich Dr. Manuela Sandmann für ihre Hilfestellung und zahlreichen Anregungen. Ebenso danke Ich Prof. Dr. Willy Hilgenberg, der die Aufgabe des Zweitgutachters übernommen hat. Bedanken möchte Ich mich bei meinen ehemaligen Kollegen Dr. Axel Raisig und Dr. Phillip Krubasik für die angenehme Arbeitsatmosphäre. In gleicher Weise bedanke Ich mich bei Dr. Sabine Steiger, insbesondere für ihre Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts und auch bei Frau Flechsel für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Danken möchte Ich ferner Dr. Changfu Zhu sowie Lutz Schäfer, Martin Feussner, Nina Raehlert, Dr. Marion Weil und allen anderen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen.

## PUBLIKATIONSLISTE

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen wiedergegeben:

- Breitenbach, J., Fernandez-Gonzales, B., Vioque, A. & Sandmann, G. (1998). A higher-plant type  $\zeta$ -carotene desaturase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Molec. Biol.* 36: 725-732.
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G. & Kuntz, M. (1999). Mutations in the *Arabidopsis* gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *The Plant Cell* 11: 57-68.
- Breitenbach, J., Kuntz, M., Takaichi, S. & Sandmann, G. (1999). Catalytic properties of an expressed and purified higher plant type  $\zeta$ -carotene desaturase from *Capsicum annuum*. *Eur. J. Biochem.* 265: 376-383.
- Simkin, A. J., Breitenbach, J., Kuntz, M. & Sandmann, G. (2000). *In vitro* and *in situ* inhibition of carotenoid biosynthesis in *Capsicum annuum* by bleaching herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4676-4680.
- Breitenbach, J., Braun, G., Steiger, S. & Sandmann, G. (2001). Chromatographic performance on a C30-bonded stationary phase of mono-hydroxycarotenoids with variable chain length or degree of desaturation and of lycopene isomers synthesized by different carotene desaturases. *J. Chromatogr.*, im Druck.
- Breitenbach, J., Zhu, C. & Sandmann, G. (2001). The bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *J. Agric. Food Chem.*, zur Veröffentlichung eingereicht.

## ABKÜRZUNGEN

3-AT:	3-Aminotriazol
Amp:	Ampicillin
BHT:	Butyl-Hydroxy-Toluol (2,6-di-tert-butyl-4-Methylphenol)
bp:	Basenpaare
ca.:	Cirka
Cm:	Chloramphenicol
CrtP:	Cyanobakterielle Phytoendesaturase
CrtQb:	Cyanobakterielle $\zeta$ -Carotin-Desaturase (pds-Typ)
CrtQa:	Cyanobakterielle $\zeta$ -Carotin-Desaturase (crtI-Typ) (aus <i>Anabaena</i> )
dITP:	2'-Desoxy-Inosin-5'-Triphosphat
FPP:	Farnesylpyrophosphat
g:	Erdbeschleunigung, $9,81 \text{ m/s}^2$
GGPP:	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP:	Geranylpyrophosphat
HIS3:	Histidin Selektionsmarker des Two-Hybrid-Systems
His-tag:	6 Histidinaminosäuren (N-terminal) an der überexprimierten ZDS zur Reinigung über chelatierte Metallionen-Affinitätschromatographie
I <sub>50</sub> :	Inhibitorkonzentration bei der eine 50%ige Hemmung der Enzymaktivität vorliegt
IPP:	Isopentenylpyrophosphat
IPTG:	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid
kbp:	Kilobasen Paare
kd:	Kilo-Dalton
K <sub>m</sub> :	Michaelis-Menten Konstante
Kn:	Kanamycin
LB-Medium:	Luria Bertani-Medium
LEU2:	Leucin-Selektionsmarker des Two-Hybrid-Systems
MTBE:	Methyl-tertiär-Butyl-Ether, Teil des HPLC-Laufmittels
OD <sub>600nm</sub> :	Optische Dichte bei 600nm Wellenlänge
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
PDS:	Pflanzliche Phytoendesaturase
rpm:	Umdrehungen pro Minute
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
Tet:	Tetracyclin
TRP1:	Tryptophan Selektionsmarker des Two-Hybrid-Systems
u.a.:	unter anderem
U:	units, Einheiten
ZDS:	Pflanzliche $\zeta$ -Carotin-Desaturase

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite
<b>Abbildung 1-1:</b> Syntheseweg von Capsanthin und Capsorubin in der Frucht von <i>Capsicum annuum</i> .	3
<b>Abbildung 1-2 :</b> Aminosäuresequenzvergleich zwischen der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> (Cap.ZDS) und den Phytoendesaturasen aus <i>Capsicum annuum</i> (Cap.PDS) und <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 (Syn.CrtP).	5
<b>Abbildung 1-3:</b> Ausgewählte Lycopin-Isomere und sterische Hinderung der 7-cis-Doppelbindung.	7
<b>Abbildung 2-1:</b> Ligation des PCR-Fragmentes der <i>in vitro</i> -Mutagenese mit dem Vektor pUC8.	20
<b>Abbildung 2-2:</b> Induktion der Mutation der ZDS über inverse PCR und einer falsch paarenden Base in einem der verwendeten Primer.	22
<b>Abbildung 2-3:</b> Strukturformeln der verwendeten Herbizide.	38
<b>Abbildung 3-1:</b> Heterologe Expression der <i>Capsicum</i> -ZDS in <i>E. coli</i> unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.	42
<b>Abbildung 3-2:</b> Lineare Regression der spezifischen Enzymaktivität der ZDS gegen den relativen Gehalt an ZDS.	44
<b>Abbildung 3-3:</b> Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung und der Affinitätsreinigung der <i>Capsicum</i> -ZDS nach Auftrennung über SDS-Gelelektrophorese.	46
<b>Abbildung 3-4:</b> Erhöhung des Umsatzes von $\zeta$ -Carotin durch die ZDS über die Zugabe des Detergens Lubrol PX zu den <i>in vitro</i> -Aktivitätstests.	48
<b>Abbildung 3-5:</b> Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität der gereinigten ZDS über die Zugabe von Phosphatidylcholin zu den <i>in vitro</i> -Aktivitätstests.	49
<b>Abbildung 3-6:</b> Spezifische Aktivität der <i>Capsicum</i> -ZDS in Abhängigkeit von der Zugabe des Antioxidants BHT und von Phosphatidylcholin zu den <i>in vitro</i> -Aktivitätstests.	50
<b>Abbildung 3-7:</b> Carotinoideextrakt aus der funktionellen Komplementierung der Lycopinsynthese in <i>E. coli</i> mit der $\zeta$ -Carotindesaturase aus <i>Capsicum annuum</i> .	52
<b>Abbildung 3-9:</b> Analyse der Produkte der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> über C <sub>18</sub> - und C <sub>30</sub> -HPLC.	55
<b>Abbildung 3-10:</b> C <sub>18</sub> - und C <sub>30</sub> -HPLC-Chromatogramm des Substrates $\zeta$ -Carotin und aller Produkte der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> .	58
<b>Abbildung 3-11:</b> Identifikation von all trans $\zeta$ -Carotin in einem $\zeta$ -Carotinextrakt aus <i>E. coli</i> JM101/pACCRT-EBP durch Co-Chromatographie mit einem all trans- $\zeta$ -Carotin-Standard.	60
<b>Abbildung 3-12:</b> Co-Chromatographie des von der ZDS gebildeten Prolycopins und Carotinoids N1 mit einem Proneurosporin-Standard.	62
<b>Abbildung 3-13:</b> Identifikation von N1 als ein Neurosporin-Isomer über die Photoisomerisierung mit Iod.	63
<b>Abbildung 3-14:</b> Identifikation von all trans-Neurosporin unter den Produkten der <i>Capsicum</i> -ZDS.	65
<b>Abbildung 3-15:</b> Identifikation von all trans-, 9-cis-, 5,9'-dicis-, 5-cis- und 5,5'-dicis-Lycopin unter den Produkten der <i>Capsicum</i> -ZDS.	66
<b>Abbildung 3-16:</b> Untersuchung der Extraktionstemperatur bei Acetonextraktion auf Isomerisierung der Produkte der <i>Capsicum</i> -ZDS.	68
<b>Abbildung 3-17:</b> Nachweis von 4 Phytoenisomere in einem Phytoenextrakt aus <i>E.coli</i> JM101/pACCRT-EB.	70
<b>Abbildung 3-18:</b> Produkte der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> in Abhängigkeit der als Substrat verwendeten $\zeta$ -Carotin-Isomere.	74
<b>Abbildung 3-19:</b> Zeitlicher Verlauf des Umsatzes der $\zeta$ -Carotin-Isomere 2 bis 5 bei <i>in vitro</i> -Aktivitätstests der <i>Capsicum</i> - ZDS.	76
<b>Abbildung 3-20:</b> C <sub>30</sub> -HPLC-Chromatogramme der Carotinoideextrakte aus den funktionellen Komplementierungen der Lycopin-Synthese in <i>E. coli</i> mit pflanzlichen und cyanobakteriellen $\zeta$ -Carotin- sowie bakteriellen Phytoen-Desaturasen.	79

<b>Abbildung 3-21:</b> C <sub>30</sub> -HPLC-Chromatogramme der Carotinoideextrakte aus den funktionellen Komplementierungen der $\beta$ -Carotin-Synthese in <i>E. coli</i> mit den $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus <i>Capsicum</i> , <i>Synechocystis</i> und <i>Anabaena</i> .	83
<b>Abbildung 3-22:</b> Kofaktoruntersuchung der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> .	85
<b>Abbildung 3-23:</b> Unabhängigkeit der Aktivität der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> von molekularem Sauerstoff unter <i>in vitro</i> -Bedingungen.	85
<b>Abbildung 3-24:</b> Kofaktoruntersuchung der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	86
<b>Abbildung 3-25:</b> Kofaktoruntersuchung der Phytoendesaturase aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.	87
<b>Abbildung 3-26:</b> Kofaktoruntersuchung der Phytoendesaturase aus <i>Gentiana lutea</i> .	88
<b>Abbildung 3-27:</b> Spezifische Aktivität der <i>Capsicum</i> -ZDS in Abhängigkeit vom pH-Wert.	90
<b>Abbildung 3-28:</b> Kinetik der Carotinoidebildung in den <i>in vitro</i> -Aktivitätstests.	91
<b>Abbildung 3-29:</b> K <sub>m</sub> -Wert-Bestimmung der Substrate $\zeta$ -Carotin und Neurosporin für die ZDS aus <i>Capsicum annuum</i> .	92
<b>Abbildung 3-30:</b> Einfach reziproke Auftragungen der Produktmenge gegen die Hemmstoffkonzentration (Dixon-Plots) zur Bestimmung der I <sub>50</sub> -Werte der Hemmstoffe Norflurazon, LS80707 und J852 für die ZDS aus <i>Capsicum annuum</i> .	94
<b>Abbildung 3-31:</b> Einfach reziproke Auftragungen der Produktmengen gegen die Hemmstoffkonzentrationen (Dixon-Plots) zur Bestimmung der I <sub>50</sub> -Werte der Hemmstoffe J852 und LS80707 für die PDS aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.	95
<b>Abbildung 3-32:</b> Doppelt reziproke Auftragung der spezifischen Aktivität der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> gegen die $\zeta$ -Carotin-Konzentration mit und ohne den Hemmstoff J852.	97
<b>Abbildung 3-33:</b> Doppelt reziproke Auftragung der spezifischen Aktivität der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> gegen die Kofaktorkonzentration mit und ohne den Hemmstoff J852.	98
<b>Abbildung 3-34:</b> Doppelt reziproke Auftragung der spezifischen Aktivität der Phytoendesaturasen aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 (A) und aus <i>Gentiana lutea</i> (B) gegen die Kofaktorkonzentration mit und ohne den Hemmstoff Norflurazon.	99
<b>Abbildung 3-35:</b> Test auf Dimerisierung der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> mit dem Hefe Two-Hybrid-System.	101
<b>Abbildung 3-36:</b> Native Gelelektrophorese der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> nach Schägger und von Jagow, 1991.	102
<b>Abbildung 3-37:</b> Gelfiltration der nativen $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> .	104
<b>Abbildung 3-38:</b> Substratspezifität der ZDS aus <i>Capsicum</i> .	106
<b>Abbildung 3-39:</b> Substratspezifität der ZDS aus <i>Capsicum</i> .	107
<b>Abbildung 3-40:</b> Aminosäuresequenzvergleich der $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus <i>Capsicum</i> , <i>Arabidopsis</i> und <i>Synechocystis</i> und über inverse PCR ausgetauschte Aminosäuren der ZDS aus <i>Capsicum</i> .	112
<b>Abbildung 3-41:</b> C <sub>30</sub> -HPLC-Chromatogramme der Produkte der mutierten <i>Capsicum</i> -ZDS (Klon 622) und der Wildtyp-ZDS.	113
<b>Abbildung 4-1:</b> Phylogenetischer Baum ausgewählter Phytoen- und $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus höheren Pflanzen und aus Cyanobakterien.	124
<b>Abbildung 4-2:</b> Modell der Übertragung der bei der Desaturierung von $\zeta$ -Carotin gewonnenen Elektronen auf Sauerstoff oder auf Photosystem I.	126
<b>Abbildung 4-3:</b> Substrat-Erkennungssequenz der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> .	133
<b>Abbildung 4-4:</b> Desaturierungsschritte der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> in Abhängigkeit der Konfiguration der Doppelbindungen in Position 9 und 9' des $\zeta$ -Carotin-Substrates.	136
<b>Abbildung 4-5:</b> Entstehung der bei $\zeta$ -Carotin zu findenden Doppelbindungen.	141
<b>Abbildung 4-6:</b> $\beta$ -Zyklisierung von Lycopin.	143
<b>Abbildung 4-7:</b> Syntheseweg von 13-cis-, 9-cis- und all trans- $\beta$ -Carotin.	144

## TABELLENVERZEICHNIS

	Seite
<b>Tabelle 2.1:</b> Organismen und Verwendungszweck.	10
<b>Tabelle 2.2:</b> Verwendete Plasmide zur heterologen Expression der Desaturasen.	12
<b>Tabelle 2.3:</b> Komplementierungen der Synthese einzelner Carotinoide in <i>E. coli</i> .	12
<b>Tabelle 2.4:</b> Weitere verwendete Plasmide.	16
<b>Tabelle 2.5:</b> Verwendete Plasmide zur Durchführung von Kontrolltransformationen des Two-Hybrid-Systems.	18
<b>Tabelle 2.6:</b> Sequenzier-Primer zur Überprüfung der Mutagenese über inverse PCR.	18
<b>Tabelle 2.7:</b> Verwendete Primer zur Durchführung der Mutagenese über inverse PCR.	22
<b>Tabelle 2.8:</b> Extinktionskoeffizienten verschiedener Carotinoide nach Britton (1995a).	26
<b>Tabelle 2.9:</b> Verwendete HPLC-Säulen und Laufmittelsysteme.	27
<b>Tabelle 2.10:</b> Eichung der HPLC-Systeme.	28
<b>Tabelle 2.11:</b> Co-Transformationen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y190 zur Durchführung des Two-Hybrid-Tests.	35
<b>Tabelle 2.12:</b> <i>In vitro</i> -Reaktionsbedingungen zur Kofaktoruntersuchung.	37
<b>Tabelle 3.1:</b> Spezifische Aktivität der ZDS und des relativen Gehaltes an ZDS in Abhängigkeit der gewählten Anzuchtbedingung bei heterologer Expression der ZDS in <i>E. coli</i> .	43
<b>Tabelle 3.2:</b> Anreicherung der ZDS durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung.	45
<b>Tabelle 3.3:</b> Reinigung der heterolog in <i>E. coli</i> exprimierten ZDS.	46
<b>Tabelle 3.4:</b> Spezifische Aktivität der <i>Capsicum</i> -ZDS in Abhängigkeit des zugesetzten Detergens oder Lipids in den <i>in vitro</i> -Enzymreaktionen.	47
<b>Tabelle 3.5:</b> Enzymaktivität der gereinigten ZDS in Abhängigkeit des in den <i>in vitro</i> -Aktivitätstests verwendeten Lipids oder Detergens.	49
<b>Tabelle 3.6:</b> Vergleich der ZDS-Aktivität in Abhängigkeit des <i>in vitro</i> verwendeten Puffers.	51
<b>Tabelle 3.7:</b> Untersuchung von Tris- oder Kaliumphosphatpuffer auf eine Carotinoid-abbauende Wirkung.	51
<b>Tabelle 3.8:</b> Absorptionsmaxima der Produkte und der Substratisomere der $\zeta$ -Carotindesaturase aus <i>Capsicum</i> .	53
<b>Tabelle 3.9:</b> Eigenschaften der Produkte Lycopin, Neurosporin und der Substrate $\zeta$ -Carotin und Neurosporin der <i>Capsicum</i> -ZDS.	56
<b>Tabelle 3.10:</b> Verteilung von Lycopin, Neurosporin und $\zeta$ -Carotin als Substrate und Produkte der $\zeta$ -Carotin-Desaturasereaktion.	56
<b>Tabelle 3.11:</b> Produkte der <i>Capsicum</i> -ZDS, aufgetrennt über C <sub>30</sub> -HPLC.	59
<b>Tabelle 3.12:</b> Spektrale Eigenschaften der Carotinoidstandards zur Identifizierung der Produkte der ZDS aus <i>Capsicum</i> .	59
<b>Tabelle 3.13:</b> Spektrale Daten und prozentuale Verteilung der durch Photo-Isomerisierung von Carotinoid N1, von Proneurosporin (N2) und von Prolycopin (L1) entstandenen Carotinoide.	64
<b>Tabelle 3.14:</b> Untersuchung der Extraktionsmethode auf eine Isomerisierung der Produkte der <i>Capsicum</i> -ZDS.	67



<b>Tabelle 3.15:</b>	Prozentuale Verteilung der extrahierten Carotinoide in Abhängigkeit der Extraktionstemperatur.	69
<b>Tabelle 3.16:</b>	Phytoisomere aus einer funktionellen Komplementierung der Phytoensynthese in <i>E. coli</i> nach Auftrennung über C <sub>30</sub> -HPLC.	71
<b>Tabelle 3.17:</b>	ζ-Carotin-Isomere in <i>E. coli</i> in Abhängigkeit der bei funktioneller Komplementierung der ζ-Carotin-Synthese verwendeten GGPP-Synthase.	72
<b>Tabelle 3.18:</b>	ζ-Carotin-Substratfraktionen mit unterschiedlichen Anteilen an Isomeren.	75
<b>Tabelle 3.19:</b>	Prozentuale Zusammensetzung der Produkte der <i>Capsicum</i> -ZDS in Abhängigkeit der ζ-Carotin-Substrat-Isomere.	75
<b>Tabelle 3.20:</b>	Bei funktioneller Komplementierung der Lycopinsynthese in <i>E. coli</i> gebildeten Carotinoide.	80
<b>Tabelle 3.21:</b>	Bei funktioneller Komplementierung der β-Carotinsynthese in <i>E. coli</i> gebildete β-Carotin-Isomere.	83
<b>Tabelle 3.22:</b>	Regressionsgleichungen der pH-Kurven.	91
<b>Tabelle 3.23:</b>	<i>In vitro</i> -Reaktionsbedingungen zur Bestimmung der I <sub>50</sub> -Werte der Hemmstoffe J852, LS80707 und Norflurazon für die ζ-Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> und für die Phytoendesaturase aus <i>Synechococcus</i> sp. 7942.	93
<b>Tabelle 3.24:</b>	<i>In vitro</i> -Reaktionsbedingungen der Hemmkinetiken.	96
<b>Tabelle 3.25:</b>	Kinetische Daten der Hemmung der ZDS aus <i>Capsicum</i> durch den Inhibitor J852.	97
<b>Tabelle 3.26:</b>	K <sub>m</sub> -Werte für Plastochinon in Abhängigkeit der Hemmstoffkonzentration.	98
<b>Tabelle 3.27:</b>	<i>In vitro</i> -Umsatz verschiedener Carotinoide als Substrat für die ζ-Carotin-Desaturase.	108
<b>Tabelle 3.28:</b>	Erhöhung des Carotinoidgehaltes durch die IPP-Isomerase aus <i>Haematococcus pluvialis</i> .	109
<b>Tabelle 3.29:</b>	Spezifische Aktivitäten der Wildtyp-ZDS, der ZDS aus den Klonen 25 und 89 und zugehörige, eingefügte Mutationen.	110
<b>Tabelle 3.30:</b>	Carotinoidmengen, die bei Komplementierung der Lycopinsynthese mit der mutierten <i>Capsicum</i> -ZDS der Klone 25 und 89 gebildet wurden.	110
<b>Tabelle 3.31:</b>	Carotinoidmengen, die bei <i>in vitro</i> -Aktivitätstest mit der über inverse PCR mutierten <i>Capsicum</i> -ZDS gebildet wurden.	114
<b>Tabelle 3.32:</b>	Spezifische Aktivität der ZDS in Abhängigkeit der ausgetauschten Aminosäure.	115

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
1. Carotinoide	1
2. Synthese von C40-Carotinoiden	1
3. Phytoen- und $\zeta$ -Carotin-Desaturasen	4
4. Heterologe Expression von Genen der Carotinoidbiosynthese und funktionelle Komplementierung der Carotinoidsynthese in <i>Escherichia coli</i>	6
5. Cis-, trans-Isomerie der Carotinoide	7
6. Ziel der Arbeit	8
II. MATERIAL UND METHODEN	
1. Verwendete Organismen	10
1.1. <i>Escherichia coli</i> -Stämme	10
1.2. Zur Extraktion von Carotinoiden verwendete Organismen	10
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y190	10
2. Anzucht	
2.1. <i>Escherichia coli</i>	11
2.1.1. LB-Medium	11
2.1.2. SOB-Medium	11
2.1.3. Anzucht von <i>E. coli</i> zur heterologen Expression der $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus <i>Capsicum annuum</i> , <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 sowie der Phytoendesaturasen aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 und <i>Gentiana lutea</i>	11
2.1.4. Anzucht von <i>E. coli</i> zur Gewinnung von Substratcarotinoiden	12
2.2. <i>Phycomyces blakesleeanus</i> S442	13
2.3. <i>Scenedesmus obliquus</i> C-6D	13
2.4. <i>Neurospora crassa</i>	13
2.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y190	13
3. Plasmide	13
3.1. pQE30zds	14
3.2. pUC8zds	14
3.3. pBBR1-MCS2zds	15
3.4. pACYC184PDSdel35PYS	15
3.5. pQE31pds <sub>Ca</sub>	15
3.6. Weitere Plasmide	16
3.7. Plasmide des Two-Hybrid-Systems	17
3.7.1. pAS2zds	17
3.7.2. pACT2zds	17
3.7.3. Plasmide für die Kontrolltransformationen	18
3.8. DNA-Sequenzierung	18
3.9. <i>In vitro</i> -Mutagenese der <i>Capsicum</i> -ZDS	19
3.9.1. Mutagenese der <i>Capsicum</i> -ZDS über PCR (error prone PCR) zur Erzeugung einer Bibliothek mutierter zds-cDNA im Vektor pUC8	19
3.9.2. Ligation der mutierten cDNA der ZDS in den Vektor pUC8	19
3.9.3. Gewinnung der Plasmid-Bibliothek mutierter zds-cDNA	20

3.9.4. Selektion mutierter ZDS über die funktionelle Komplementierung der Lycopinsynthese in <i>E. coli</i>	20
3.9.5. Mutagenese der <i>Capsicum</i> -ZDS über inverse PCR	21
3.10. Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
3.10.1. DNA-Minipräparation	22
3.10.2. Concert DNA-Präparationskit	23
4. Transformation von <i>E. coli</i>	23
4.1. Transformation kompetenter Zellen	23
4.2. Elektroporation	23
5. Carotinoide, Extraktion und Analytik	24
5.1. Methanolextraktion von Carotinoiden	24
5.2. Acetonextraktion von Carotinoiden	24
5.3. Reinigung von Substratcarotinoiden	25
5.3.1. Neurosporin	25
5.3.2. Hydroxy-Carotinoide, Prolycopin, Proneurosporin, Demethylspheroidin, Spheroidin und $\zeta$ -Carotin-Isomere	25
5.4. Konzentrationsbestimmung von Carotinoidlösungen	25
5.5. Photo-Isomerisierung von Carotinoiden mit Iod (Zechmeister, 1962)	26
5.6. Carotinoidanalytik mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	26
5.6.1. Verwendete Trennsysteme	26
5.6.2. Eichung der C <sub>18</sub> - und C <sub>30</sub> -HPLC	27
5.6.3. Verwendete Carotinoidstandards	28
6. Enzymatische Charakterisierung der $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus <i>Capsicum</i> und <i>Synechocystis</i> sowie der Phytoendesaturasen aus <i>Synechococcus</i> , <i>Gentiana</i> über <i>In vitro</i> -Enzymreaktionen	29
6.1. French Pressure Cell Press-Aufschluß	29
6.2. Tris- und Kaliumphosphat-Puffer	29
6.3. pH-Optimum der Aktivität der <i>Capsicum</i> -ZDS	30
6.4. Verwendete Detergenzien	30
6.5. Herstellung und Verwendung der Phosphatidylcholin-Emulsion	30
6.6. Verwendung des Antioxidants Butyl-Hydroxy-Toluol (BHT)	31
6.7. <i>In vitro</i> -Enzymreaktion (Aktivitätstest) zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus <i>Capsicum</i> und <i>Synechocystis</i> , sowie der Phytoendesaturasen aus <i>Gentiana</i> und <i>Synechococcus</i>	31
6.8. Extraktion der in den <i>in vitro</i> -Enzymreaktionen gebildeten Carotinoide	32
7. Reinigung der in <i>E. coli</i> heterolog exprimierten $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i>	32
7.1. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	32
7.2. Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie	32
7.3. Entsalzung der Fraktionen der Affinitätschromatographie über Sephadex G-25M	33
7.4. Proteinfällung mit Trichloressigsäure (Serrano, 1988)	33
8. Analyse der heterolog exprimierten <i>Capsicum</i> -ZDS	33
8.1. Gelelektrophorese	33
8.1.1. Denaturierende SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)	33
8.1.2. Blaue native Gelelektrophorese der gereinigten ZDS nach Schägger und von Jagow (1991)	33
8.1.3. Coomassie-Färbung	34
8.1.4. Dokumentation und Auswertung der Polyacrylamidgele	34

8.2. Ermittlung des Proteingehaltes	34
8.3. Untersuchung der nativen ZDS auf Dimerisierung	34
8.3.1. Two-Hybrid-System	34
8.3.1.1. Transformationen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y190	35
8.3.1.2. Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkung über den Nachweis von $\beta$ -Galaktosidaseaktivität	35
8.3.2. Gelfiltration (Ausschluß-Chromatographie) der nativen $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum</i>	36
9. Kinetische Untersuchungen	36
9.1. $K_m$ -Wert-Bestimmung von $\zeta$ -Carotin und Neurosporin	36
9.2. Kofaktoruntersuchungen	37
9.3. $K_m$ -Wert-Bestimmung von Decyl-Plastochinon	37
9.4. Hemmstoffuntersuchungen	38
9.4.1. Verwendete Desaturase Hemmstoffe	38
9.4.2. Hemmkinetische Untersuchungen, $I_{50}$ -Bestimmung	38
10. Untersuchung der Substratspezifität der <i>Capsicum</i> -ZDS	39
11. Verwendete Software	39
III. ERGEBNISSE	41
1. Optimierung der heterologen Expression nativer ZDS aus <i>Capsicum annuum</i> in <i>E.coli</i>	41
2. Reinigung der heterolog in <i>E.coli</i> exprimierten <i>Capsicum</i> -ZDS	45
3. Optimierung der <i>in vitro</i> Reaktionsbedingungen zur Messung der $\zeta$ -Carotin-Desaturase-Aktivität	47
3.1. Zusatz von Detergenzien	47
3.2. Zusatz von Phosphatidylcholin	48
3.3. Zusatz des Antioxidants Butyl-hydroxy-Toluol (BHT)	49
3.4. Wirkung von Kaliumphosphat- und Tris-Puffer auf die ZDS-Aktivität	50
4. Analyse der Produkte der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i>	51
4.1. Carotinoid-Analytik über Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit einer Nucleosil $C_{18}$ -Trennsäule	51
4.1.1. Trennproblematik	51
4.1.2. Identifikation der Reaktionsprodukte der <i>Capsicum</i> -ZDS über $C_{18}$ - und $C_{30}$ -HPLC und Carotinoidstandards	54
4.2. Analyse sämtlicher Desaturierungsprodukte der <i>Capsicum</i> -ZDS über $C_{30}$ -HPLC	57
4.2.1. Gebildete Carotinoide bei funktioneller Komplementierung der Lycopinsynthese in <i>E. coli</i> mit der ZDS aus <i>Capsicum</i>	57
4.2.2. Identifikation von all trans- $\zeta$ -Carotin	60
4.2.3. Identifikation des Carotinoids N1 als ein cis-Neurosporin über die Photo-Isomerisierung mit Iod	61
4.2.4. Identifikation von all trans-Neurosporin unter den Desaturierungsprodukten der <i>Capsicum</i> -ZDS	64
4.2.5. Identifikation einzelner Lycopin-Isomere unter den Produkten der <i>Capsicum</i> -ZDS durch Co-Chromatographie mit einem Gemisch NMR-charakterisierter Lycopinisomere	65
4.3. Überprüfung der Extraktionsmethode auf Isomerisierung der Produkte der <i>Capsicum</i> -ZDS	66
4.4. Nachweis neuer Phytoen-Isomere bei Trennung eines Carotinoidextraktes aus JM101/pACCRT-EB über $C_{30}$ -HPLC	69

4.5. Bildung von $\zeta$ -Carotin-Isomere in Abhängigkeit der bei Komplementierung der $\zeta$ -Carotin-Synthese in <i>E. coli</i> verwendeten GGPP-Synthasen	71
5. Biochemische Eigenschaften der $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus <i>Capsicum annuum</i> , <i>Synechocystis</i> sp. 6803 und der Phytoendesaturasen aus <i>Synechococcus</i> sp. 7942 und <i>Gentiana lutea</i>	72
5.1. Umsatz verschiedener $\zeta$ -Carotin-Isomere durch die ZDS bei <i>in vitro</i> -Aktivitätstests	72
5.2. Vergleich der in <i>E. coli</i> durch die <i>Capsicum</i> -ZDS gebildeten Carotinoide mit den Produkten anderer $\zeta$ -Carotin- und Phytoendesaturasen	77
5.3. Bildung von $\beta$ -Carotinisomere in Abhängigkeit der bei funktioneller Komplementierung verwendeten $\zeta$ -Carotin-Desaturase	81
5.4. Kofaktoruntersuchungen	84
5.4.1. Kofaktoruntersuchung der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i>	84
5.4.2. Kofaktoruntersuchung der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	86
5.4.3. Kofaktoruntersuchung der Phytoendesaturase aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	87
5.4.4. Kofaktoruntersuchung der Phytoendesaturase aus <i>Gentiana lutea</i>	88
5.5. pH-Optimum der Aktivität der ZDS aus <i>Capsicum annuum</i>	89
5.6. Enzym-Kinetische Untersuchungen	91
5.6.1. $K_m$ -Wert Bestimmung von $\zeta$ -Carotin und Neurosporin und dem Kofaktor Decylplastochinon für die ZDS aus <i>Capsicum</i>	91
5.6.2. Bestimmung der $I_{50}$ -Werte der Hemmstoffe J852, LS80707 und Norflurazon für die ZDS aus <i>Capsicum</i> sowie von J852 und LS80707 für die Phytoendesaturase aus <i>Synechococcus</i>	93
5.6.3. Hemmkinetische Untersuchungen	96
5.6.3.1. Bestimmung des Hemmtyps von J852 bezogen auf das Substrat der <i>Capsicum</i> -ZDS	96
5.6.3.2. Bestimmung des Hemmtyps von J852 bezogen auf die Bindung des Kofaktors Decyl-Plastochinon bei der <i>Capsicum</i> -ZDS	97
5.6.3.3. Bestimmung des Hemmtyps des Bleichherbizids Norflurazon bezogen auf die Bindung des Kofaktors Decyl-Plastochinon bei den Phytoendesaturasen aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 und aus <i>Gentiana lutea</i> .	98
5.7. Untersuchung der nativen ZDS aus <i>Capsicum annuum</i> auf Dimerisierung	99
5.7.1. Two-Hybrid-System	99
5.7.2. Native Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow 1991	102
5.7.3. Gelfiltration der nativen ZDS mit nachfolgender Untersuchung der Elutionsfraktionen auf enzymatische Aktivität	103
5.7. Untersuchung der Substratspezifität der <i>Capsicum</i> -ZDS	105
6. <i>In vitro</i> -Mutagenese der <i>Capsicum</i> -ZDS	108
6.1. Selektion von mutierter ZDS über die funktionelle Komplementierung der Lycopsin synthese in <i>E. coli</i>	109
6.2. Mutagenese der <i>Capsicum</i> -ZDS über error prone PCR	109
6.3. Auswirkung des Austauschs einzelner Aminosäuren auf die Aktivität der <i>Capsicum</i> -ZDS	111
IV. DISKUSSION	
1. Optimierung der Expression nativer ZDS in <i>E. coli</i>	116
2. ZDS-Reinigung	118
3. Optimierung der <i>in vitro</i> -Enzymreaktion der <i>Capsicum</i> -ZDS	119

4. Biochemische Eigenschaften der <i>Capsicum</i> -ZDS	121
4.1 Kofaktor der $\zeta$ -Carotindesaturasen aus <i>Capsicum annuum</i> und <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 sowie der Phytoen-Desaturasen aus <i>Gentiana lutea</i> und <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	121
4.2. Hemmkinetische Untersuchungen der <i>Capsicum</i> -ZDS. Vergleich mit den Phytoen-Desaturasen aus <i>Synechococcus</i> und <i>Gentiana lutea</i> .	127
4.3. Bestimmung der $K_m$ -Werte der Substrate $\zeta$ -Carotin und Neurosporin	129
4.4. pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der <i>Capsicum</i> -ZDS	130
4.5. Die <i>Capsicum</i> -ZDS ist als Monomer aktiv	131
4.6. Substratspezifität der <i>Capsicum</i> -ZDS	132
4.7. 9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin ist das Substrat der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum</i>	135
4.8. Herkunft der 9,9'-dicis-Doppelbindung des $\zeta$ -Carotins	140
4.9. Vergleich der Desaturierungsprodukte der <i>Capsicum</i> -ZDS mit denen der $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus <i>Synechocystis</i> und <i>Anabaena</i> , sowie mit denen der bakteriellen Phytoendesaturasen	141
5. Mutagenese der <i>Capsicum</i> -ZDS	145
5.1. Auswirkung der Mutagenese auf die Aktivität der ZDS	145
5.2. Akkumulation des Intermediats Proneurosporin bei der Desaturierung von $\zeta$ -Carotin durch die mutierte ZDS aus <i>Capsicum annuum</i>	147
V. Zusammenfassung	151
VI. Literatur	153
VII. Lebenslauf	161
Erklärung	

# I. Einleitung

## 1. Carotinoide

Carotinoide sind meist aus 8 Isopreneinheiten aufgebaute lipophile Pigmente, die zur Klasse der Tetraterpene gehören. Ihre Farbigkeit beruht auf der Absorption von Anteilen des sichtbaren Lichts durch ihr konjugiertes Doppelbindungssystem. Zu den Carotinoiden werden die Carotine und ihre sauerstoffhaltigen Derivate, die Xanthophylle gezählt. Carotinoide erfüllen in der Photosynthese zwei Aufgaben. Einerseits wirken sie als akzessorische Pigmente (Britton, 1995b) und andererseits schützen sie den Photosyntheseapparat vor Photooxidation, indem sie die Anregungsenergie von Triplett-Chlorophyll oder Singulett-Sauerstoff übernehmen und als Wärme abgeben (Foote & Denny, 1968; Edge et al., 1997; Tinkler et al., 1994, Hirayama et al., 1994). Weiterhin besitzen Carotinoide antioxidative Eigenschaften (Matsufuji et al., 1998; Conn et al., 1991; Miller et al., 1996; Albrecht et al., 2000). Carotinoide werden von Pflanzen, Cyanobakterien, einigen Pilzen sowie einigen phototrophen und nicht-phototrophen Bakterien gebildet (Sandmann, 1994). Sie sind u.a. an der Synthese von Abscisinsäure beteiligt (Parry & Horgan, 1991) und wirken als Stabilisatoren von Membranen (Havaux, 1998). Weiterhin sorgen sie für die Färbung von Blüten, Früchten und bewirken die Färbung von Gefieder einiger Vögel, wobei die Carotinoide bei Tieren alle aus der Nahrung stammen.  $\beta$ -Carotin dient bei Wirbeltieren als Vorstufe von Vitamin A (Provitamin A) und Zeaxanthin scheint degenerativen Erkrankungen der Macula entgegenzuwirken (Hammond et al., 1997; Johnson et al., 2000). Carotinoide finden Verwendung als Lebensmittelfarbstoffe (Mouly et al., 1999) oder werden als Futtermittelzusatz, bei Hühnern zur Färbung des Eidotters (Jiang et al., 1994), oder in der Fischzucht zur Färbung von Lachs verwendet (Elmadfa & Majchrzak, 1998).

## 2. Synthese von C40-Carotinoiden

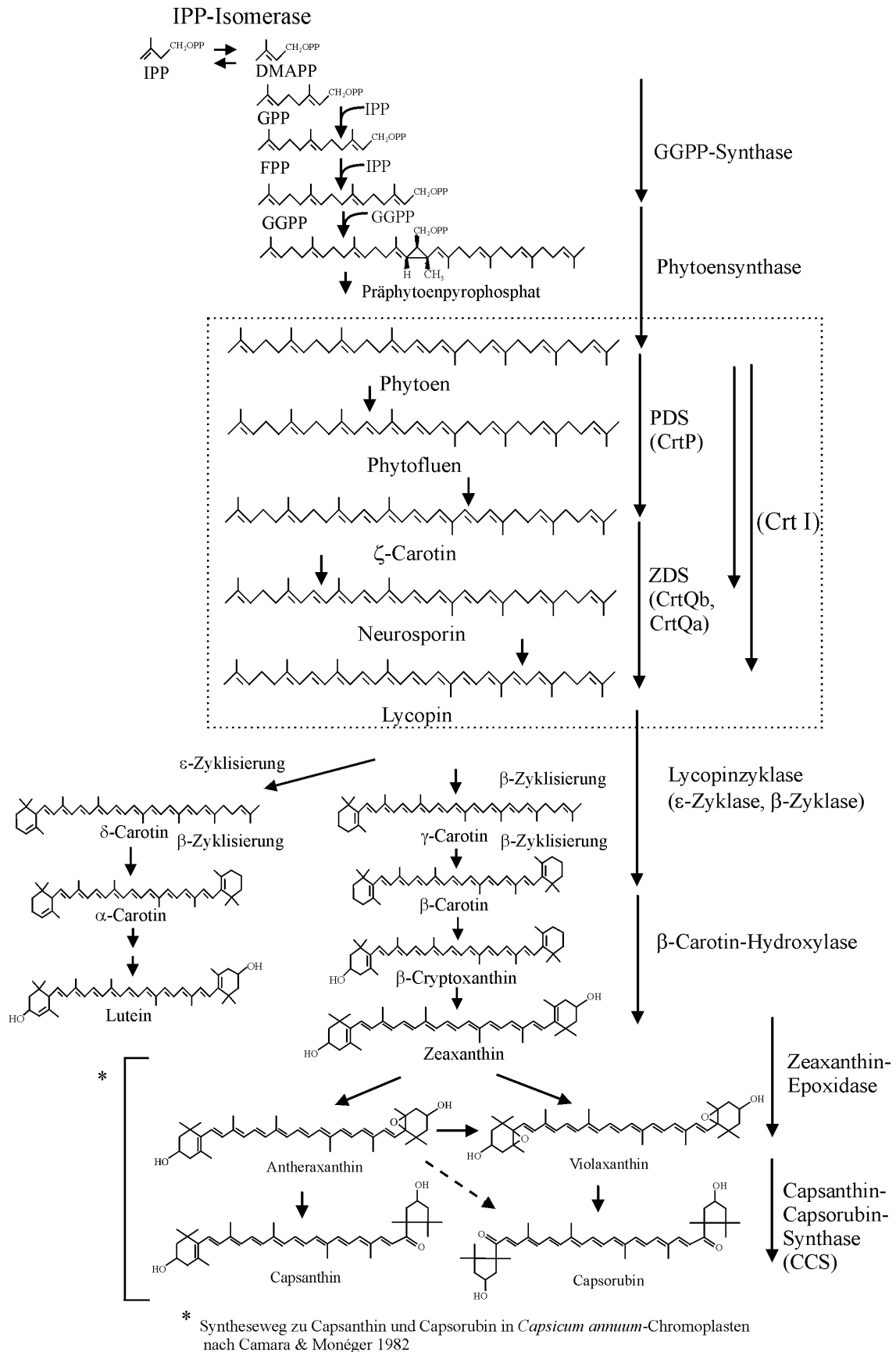
Die Synthese der Carotinoide findet in höheren Pflanzen in den Chloroplasten und den Chromoplasten statt (Camara et al., 1982). Die Synthese erfolgt durch kerncodierte Enzyme (Bonk et al., 1997) ausgehend von Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylidiphosphat (IPP). IPP wird in Chloroplasten über den 1-Deoxy-Xylulose-5-Phosphat-Weg synthetisiert (Lichtenthaler, 1999). Bei der Synthese von C40-Carotinoiden werden durch eine Geranyl-geranyl-Pyrophosphatsynthase sukzessive drei Moleküle IPP an DMAPP angefügt bis zur Bildung von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Die Phytoensynthase katalysiert die Verbindung zweier Moleküle GGPP zu dem Intermediat

Präphytoenpyrophosphat und die Bildung des ersten Carotinoids Phytoen (Sandmann, 1994; Cunningham & Gantt, 1998). In Chromoplasten von *Capsicum annuum* konnte gezeigt werden, daß die Synthese von Phytoen im Stroma, die nachfolgenden Desaturierungsreaktionen dagegen in den Thylakoidmembranen erfolgen (Camara et al., 1982).

Die folgenden Desaturierungsschritte führen in der Regel 4 Doppelbindungen in das Molekül ein, wodurch die Verbindung aufgrund der Verlängerung des konjugierten Doppelbindungssystems (von 3 beim Phytoen auf 11 beim Lycopin) zunehmend Anteile des sichtbaren Lichtes absorbiert. Die 4 Desaturierungsschritte werden bei carotinoidbildenden Bakterien und Pilzen durch ein einziges Enzym, der Phytoendesaturase katalysiert. Bei Cyanobakterien und Pflanzen werden dagegen die vier Desaturierungsschritte von zwei Enzymen katalysiert. Die Phytoendesaturase (CrtP bei Cyanobakterien, PDS bei Pflanzen) katalysiert die Desaturierung von Phytoen zum  $\zeta$ -Carotin (Chamovitz et al., 1991) und die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase (CrtQ bei Cyanobakterien, ZDS bei Pflanzen) von  $\zeta$ -Carotin zum Lycopin (Albrecht et al., 1995 a, 1995b). Die Bildung von  $\beta$ -Carotin mit 2  $\beta$ -Ionon-Ringen erfolgt anschließend über die Zyklisierung des Lycopins über die Wirkung einer  $\beta$ -Zyklase. Bei der Biosynthese von  $\alpha$ -Carotin wird durch die Katalyse der  $\epsilon$ -Zyklase zunächst der  $\epsilon$ -Ionon-Ring und nachfolgend durch die Katalyse der  $\beta$ -Zyklase der  $\beta$ -Ionon gebildet (Goodwin, 1980; Sandmann, 1994). Durch die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase wird  $\beta$ -Carotin zu  $\beta$ -Cryptoxanthin und Zeaxanthin hydroxyliert.

In Chromoplasten von *Capsicum annuum* führt die Carotinoidsynthese ausgehend von Zeaxanthin weiter zu Violaxanthin und Antheraxanthin. Aus Antheraxanthin wird Capsanthin, aus Violaxanthin Capsorubin gebildet. An diesen Syntheseschritten sind die Zeaxanthinepoxidase und die Capsanthin-Capsorubin-Synthase beteiligt (Camara & Monéger, 1982). Die Carotinoide Capsanthin und Capsorubin finden sich in reifen Früchten von rotem Paprika (*Capsicum annuum*), wobei Capsanthin im Verhältnis zu anderen Carotinoiden am stärksten vertreten ist (Deli et al., 2001). Beide liegen dort meist in veresterter Form vor (Matsufuji et al., 1998; Camara & Monéger, 1982).





**Abbildung 1-1:** Syntheseweg von Capsanthin und Capsorubin in rotem Paprika (*Capsicum annuum*). Die Desaturierungsschritte von Phytoen zu Lycopin sind eingerahmt. PDS: Pflanzliche Phytoendesaturase, ZDS: Pflanzliche  $\zeta$ -Carotin-Desaturase. Die bakteriellen und cyanobakteriellen Phytoendesaturasen, sowie die cyanobakteriellen  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen die die analogen Reaktionsschritte katalysieren, sind in Klammern angegeben. CrtP: Cyanobakterielle Phytoendesaturase, CrtQb: Cyanobakterielle  $\zeta$ -Carotindesaturase (pds-Typ), CrtQa: Cyanobakterielle  $\zeta$ -Carotindesaturase (crtI-Typ).

### 3. Phytoen- und $\zeta$ -Carotin-Desaturasasen

Die Desaturierung von Phytoen zu Lycopin beinhaltet 4 Desaturierungsschritte (Dehydrogenierungen), die von den beteiligten Enzymen, den Desaturasasen durchgeführt werden. Es gibt zwei Gruppen von **Phytoendesaturasasen**, die sich in der Anzahl der durchgeführten Desaturierungsschritte und in der Aminosäuresequenz voneinander unterscheiden. So findet sich bei carotinoidbildenden **Bakterien und Pilzen** eine Phytoendesaturase, die im allgemeinen 3-5 Desaturierungsschritte durchführt (Linden et al., 1991). Bekannte Phytoendesaturasasen sind die aus dem Bakterium *Erwinia uredovora* (CrtI, katalysiert 4 Desaturierungen), *Rhodobacter capsulatus* (CrtI, katalysiert hauptsächlich 3 Desaturierungen) oder dem Pilz *Neurospora crassa* (Al-1) (katalysiert 5 Desaturierungen).

Die Phytoendesaturasasen aus **Pflanzen (PDS) und Cyanobakterien (CrtP)** katalysieren hingegen nur zwei Desaturierungen von Phytoen über Phytofluen bis zum  $\zeta$ -Carotin. Aufgrund einer hohen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen (> 65 % identische Aminosäuren) der Phytoendesaturasasen aus Cyanobakterien und Pflanzen wird deren phylogenetische Verwandtschaft diskutiert (Sandmann, 1994). Die Aminosäuresequenzen der bakteriellen Phytoendesaturasasen besitzen dagegen bis auf einen N-terminalen Bereich, einer Dinukleotidbindestelle, keine Ähnlichkeiten zu den Phytoendesaturasasen aus Pflanzen und Cyanobakterien. Es wird daher vermutet, daß die Gruppe der bakteriellen und die der pflanzlichen-cyanobakteriellen Phytoendesaturasasen unabhängig voneinander über konvergente Entwicklung entstanden sind (Pecker et al., 1992; Sandmann, 1994).

Da die Phytoendesaturase aus Pflanzen und Cyanobakterien zwei Desaturierungsschritte durchführt, ist ein zweites Enzym, die  **$\zeta$ -Carotin-Desaturase** notwendig, das die folgenden Desaturierungsschritte von  $\zeta$ -Carotin über Neurosporin zum Lycopin katalysiert (Linden et al., 1994; Breitenbach et al., 1998). Die pflanzlichen (ZDS) und cyanobakteriellen  $\zeta$ -Carotin-Desaturasasen (CrtQ) (**pds-Typ**) zeigen eine Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu den pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytoendesaturasasen (Abbildung 1-2) (Albrecht et al., 1995a; Scolnik & Bartley, 1995). So besitzt die *Capsicum*-ZDS ab der Aminosäure 80 der Transitsequenz 35,5 % identische (59 % ähnliche) Aminosäuren mit der *Capsicum*-PDS und 33,5 % identische (58 % ähnliche) Aminosäuren mit der *Synechococcus*-Phytoendesaturase (Hugueney et al., 1992). Im Unterschied dazu, sind bis auf einen N-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeiten zu den bakteriellen und pilzlichen Phytoendesaturasasen zu finden (Chamovitz et al., 1991). Man vermutet daher eine **phylogenetische Verwandtschaft** zwischen den Phytoen- und den  $\zeta$ -Carotindesaturasasen aus Pflanzen und Cyanobakterien. Es wird diskutiert, daß die Gene der

pflanzlichen und der cyanobakteriellen Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen von einem gemeinsamen ursprünglichen Gen stammen. Dieses codierte für ein Enzym, das in der Lage war alle 4 Desaturierungen zu katalysieren. Über Duplikation wurde dieses Gen verdoppelt und es entwickelten sich aus diesen die spezialisierten Desaturase-Gene der PDS und der ZDS (Albrecht et al., 1995a). Die Entwicklung der Phytoen- und der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen erfolgte dabei bei einem der Vorfahren der heutigen Cyanobakterien, aus denen sich die Chloroplasten der Pflanzen entwickelten.

Caps. ZDS	1	-----MATCSAYLCCPATASLKKRVFPDGSAGFLFFGRRLSNRLVT-----
Caps. PDS	1	MPQIGLVSAVNLRVQNSAYLWSRSSSLGTDSDQGCQRNSLCEGSDSMSHRLKIRNPHSITRRLAKDF
Syn. Crtp	1	-----
Caps. ZDS	44	-P--KSVIR--ADINSMVSDMSTNAPKGLFPPEPEHYRGPKLKVAIIIGAGLAGMSTAVELLDQGHVDTI
Caps. PDS	71	RPLKVVCIIDYPRPEIDNTVNYLEAAFLSSSFRSRRPTKP--LEIVLAGAGLGGGLSTAKYLADAGHKPIL
Syn. Crtp	1	-----MRVATAGAGLAGLSCAKYLADAGHPTIV
Caps. ZDS	108	YESRITFIGGKVGSEFVDKRGNHIFMGLHVFFGCYNNLFRIMKKVGAEKNNLLVKEHTHTFVN--KGGEIGEL
Caps. PDS	139	LEARDVLGGKVAAWKDDGDWYETGLHIFFGAYPNMONLFGELGINDRLQWKEHSMIFAMPNKPGEFSRF
Syn. Crtp	29	YERDVLGGKVAAWKDEDGDWYETGLHIFFGAYPNMLQLFKELNIEDRLQWKSMSMIFNQPTKPGTYSRF
Caps. ZDS	176	DFRFPVGGAPLHGINAFLSTNQLKTYDKARNAVALALSPVVRALVDPDQALQQIRDLDSVFSDFWMSKGG
Caps. PDS	209	DFPEALPAPLNGILAILKNNEMLTWPEKVKFAIGLLPAMLGQS-----YVEAQDGI SVKDWMRKQGV
Syn. Crtp	99	DFPD-IPAPINGVAAILSNNDMLTWBEKIKFGLGLLPAMIRGQS-----YVEEMDQYSWTEWLRKQNI
Caps. ZDS	246	TRASIQRMWDPVAYALCFIDCDNISARCMLTIFALEATKTEASLLRMLKGSQPDVYLSGPIKKYIIDKGR
Caps. PDS	272	PDRVTDDEVFIAMSKALNFINPDELSMQCIILALNRFLOEKHGSKMAFLDGNPPERLCMPIVEHIESKGGQ
Syn. Crtp	161	PERVNDDEVFIAMAKALNFIDPEISATVVVLTALNRFLOEKKGSMAFLDGAPPERLCQPIVEHVQARGD
Caps. ZDS	316	FHLRWGCREVL YETSSDGS MYVSGLAMSKATQKKIVKADAYVAACVVPGIKRLVPOKRELEFFGNIIYKI
Caps. PDS	342	VRLNSRIKKIELNE--DGSVKCFILN----DGSTLEGDAFVFATPVDIFKLLLPEDWKEIPYFQKLEKIL
Syn. Crtp	231	VLLNAPLKEFVLLND--DSSVQAFRIAGIKQEEQILEADAYVSALPVDPLKLLLPDAWKAMPYFOQLDGL
Caps. ZDS	386	IGVPVVTVQLRYNGWVTELDLERSRQSKRATGDNLLYTPDADEFCFADLALASPEYDYIEGQGSLLQC
Caps. PDS	405	VGVPVINVHLWFD-----RKLKNTSDNLLFSRSPLLSVYADMSVTCRE--YYDPNKSMLEL
Syn. Crtp	299	QGVVPVINHLWFD-----RKLKT-DIDHLLFSRSPLLSVYADMSNTCRE--YEDPDRSMLEL
Caps. ZDS	456	VLTIPGDPYMLPNEEIIIRRVSKQVLALEFPSSQGLEVT-----WSSVVKIGQSLYREGPGKDFPRPDQKTP
Caps. PDS	459	VFAPAEWVSRSDSEIIDATMKELAKLFPDEISADQSKAKILKYHVKTTPRSVYKTVPGCEPCRLLRQSP
Syn. Crtp	352	VFAPAKDWIGRSDEDI LAATMAEIEKLFPOHFSGENP-ARLRKYKIVKTPLSVYKATPGRQOYRDPDQASP
Caps. ZDS	521	VENFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLSGRQASAYICDAGEQLLALRKKIAAAELNEISKGVLSLSDLSLV
Caps. PDS	529	VEGFYLAGDYTKQYKYLASMEGAVLSGKLCQAQAVQDYELLVGRSQ-RKLAETS SVV-----
Syn. Crtp	421	IANFELTGDYTMQRYLASMEGAVLSGKLTAAQAIARQDELQRRSSGRPLAASQA-----

**Abbildung 1-2** : Aminosäuresequenzvergleich zwischen der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* (Cap.ZDS) und den Phytoendesaturasen aus *Capsicum annuum* (Cap.PDS) und *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Syn.CrtP). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau und verschiedene Aminosäuren weiß unterlegt. Die schwarze Linie markiert die potentielle Dinukleotidbindestelle, der Pfeil das Ende der mutmaßlichen Transitsequenz der *Capsicum*-ZDS (nach Albrecht et al. 1995a).

Ein zweiter Typ einer  $\zeta$ -Carotin-Desaturase (**crtI-Typ**) wurde aus dem Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120 (CrtQa) (Linden et al., 1994) isoliert, dessen Aminosäuresequenz eine größere Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz bakterieller Phytoendesaturasen besitzt, als zu der pflanzlicher  $\zeta$ -Carotindesaturasen (Sandmann, 1994; Albrecht et al., 1995b, Breitenbach et al., 1998).

#### 4. Heterologe Expression von Genen der Carotinoidbiosynthese und funktionelle Komplementierung der Carotinoidsynthese in *Escherichia coli*

In Pflanzen sind die Enzyme der Carotinoidbiosynthese nur in geringen Mengen in Chloroplasten und Chromoplasten vorhanden. Als membranständige Enzyme sind sie schwer zu isolieren, da die Solubilisierung mit Detergenzien oftmals mit einem Aktivitätsverlust verbunden ist (Cunningham & Gantt, 1998). Durch die Isolation der Carotinoidgene aus den carotinoidbildenden Organismen und der heterologen Expression dieser Gene in Bakterien wie *E. coli*, kann für eine Reinigung ausreichend große Menge des gewünschten Proteins gewonnen werden (Sandmann, 1997). Durch die Wahl eines geeigneten Expressionsvektors kann das gewünschte Enzym als rekombinantes Protein mit 6 N-terminalen Histidinen exprimiert und über immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie selektiv mit hoher Reinheit separiert werden (Sandmann, 1997; Breitenbach et al., 1999).

Die katalysierte Reaktion eines Enzyms der Carotinoidbiosynthese kann über funktionelle Komplementierung in *E. coli* untersucht werden. Werden die Gene für die Synthese von  $\zeta$ -Carotin in einen Expressionsvektor kloniert (Linden et al., 1993) und dieser in *E. coli* transformiert, kommt es *in vivo* zur Bildung des entsprechenden Carotinoids. Dies zeigt sich in einer deutlichen Gelbfärbung der Bakterien.

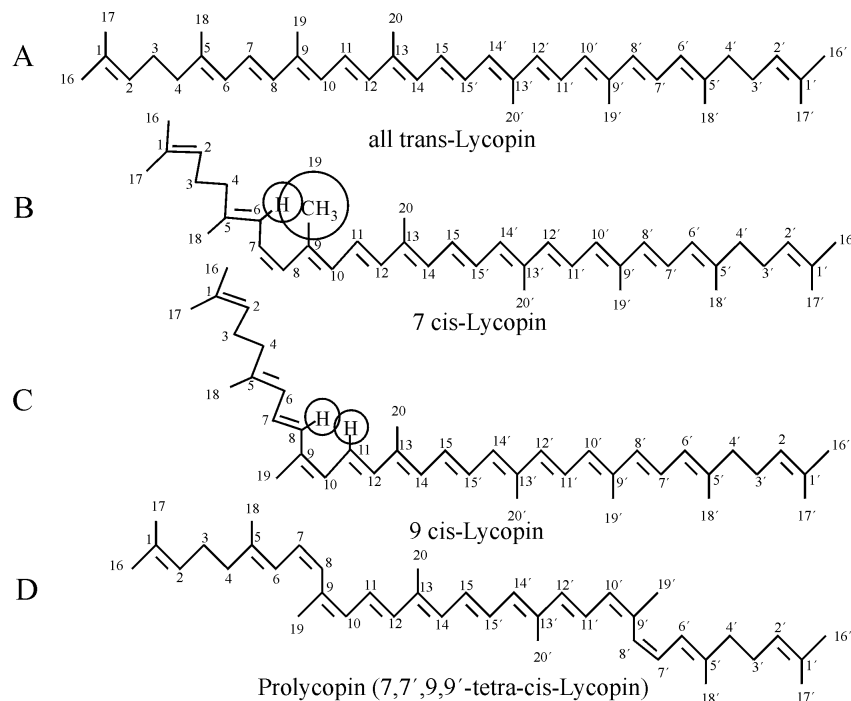
Wird *E. coli* mit einem zweiten Plasmid co-transformiert, welches das Gen der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum* enthält und exprimiert, wird das gebildete Carotinoid als Substrat von der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase *in vivo* umgesetzt. Auf diese Weise wird der Syntheseweg für Lycopin funktionell komplementiert. Über die Analyse der gebildeten Carotinoidisomere ist es möglich zu untersuchen, ob eine Präferenz für bestimmte Substratisomere vorliegt.

Durch die Transformation mit Expressionsvektoren, die verschiedene Kombinationen von Carotinoidgenen tragen, ist es möglich *E. coli*-Stämme zu gewinnen, die unterschiedliche Substratcarotinoide zur Durchführung von Komplementierungen bilden. Durch die funktionelle Komplementierung des Carotinoidsyntheseweges ist es auch möglich, neuartige, normalerweise in der Natur nicht oder nur in geringen Mengen vorkommende Carotinoide *in vivo* zu bilden (Albrecht et al., 2000; Sandmann, 2001). So treten die verschiedenen Intermediate der Carotinoidsynthese wie Phytoen,  $\zeta$ -Carotin in zu geringen Mengen in der Pflanze auf, um nachweisbar zu sein. Nur in Mutanten wie der Grünalge *Scenedesmus obliquus* C-6D (Ernst & Sandmann, 1988), von *Phycomyces* (Fraser et al., 1991) oder mit

Hemmstoffen der Carotinoidsynthese behandelten Pflanzen (Chollet et al., 1990) akkumulieren die Intermediate.

## 5. Cis-, Trans-Isomerie der Carotinoide

Bedingt durch die Doppelbindungen im Carotinoidmolekül, können neben einem all trans-Carotinoid verschiedene cis-Isomere auftreten. Unter den cis-Isomeren sind die cis-Doppelbindungen sterisch günstig, deren Kohlenstoffatom eine Methylseitengruppe trägt (5, 5', 9, 9', 13, 13' bei Lycopin; Abbildung 1-3 C). Für die cis-Doppelbindungen an den Kohlenstoffatomen ohne Methylrest (7, 7', 11, 11'; B) dagegen liegt eine sterische Hinderung vor. So lassen sich dementsprechend bei einer Photoisomerisierung von Carotinoiden nur Isomere mit cis-Doppelbindungen in den sterisch günstigen Doppelbindungen finden (Goodwin, 1980; Britton, 1995b).



**Abbildung 1-3:** Ausgewählte Lycopin-Isomere und sterische Hinderung der 7-cis-Doppelbindung. A: all trans-Lycopin, B: 7-cis-Lycopin, C: 9-cis-Lycopin, D: Polycopin. Die cis-Doppelbindung des 9-cis-Lycopins ist aufgrund der Methylgruppe sterisch günstiger als die des 7-cis-Lycopins. Zur besseren Darstellung der sterischen Gegebenheiten ist die Methylgruppe am C-Atom 9 des 7-cis-Lycopins und das Wasserstoffatom am C-Atom 6 eingezeichnet, ebenso wie die Wasserstoffatome am C-Atom 8 und 11 des 9-cis-Lycopins.

Die cis-Isomere lassen sich aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften gegenüber dem all trans-Isomer unterscheiden. So tritt im Absorptionsspektrum eines cis-Isomers im Bereich von 290 bis 380 nm Wellenlänge beim Vorliegen einer einzelnen cis-Doppelbindung nahe des Zentrums des konjugierten Doppelbindungssystems (Position 15, 15') eine cis-

Absorptionsbande auf. Neben dem Auftreten einer ausgeprägten cis-Absorptionsbande im Spektrum kommt es zu einer Verschiebung der Absorptionsmaxima zu kürzeren Wellenlängen hin (hypsochromer Effekt) und zu einer Abnahme des molaren Extinktionskoeffizienten (hypochromer Effekt). Die Extinktion im Bereich der cis-Absorptionsbande nimmt mit dem Abstand der cis-Doppelbindung vom Zentrum des konjugierten Doppelbindungssystems ab, oder verschwindet nahezu völlig wenn sie am Rande des konjugierten Doppelbindungssystems liegt. Im Falle von cis-Isomeren wie Prolycopin (Zechmeister, 1962; Clough & Pattenden, 1979), das eine gestreckte Konfiguration aufweist (Abbildung 1-3, D), tritt im Spektrum keine cis-Absorptionsbande, dafür aber eine hohe hypsochrome Verschiebung auf (33 nm, von all trans-Lycopin zu Prolycopin) (Zechmeister, 1962). Das Lycopinisomer Prolycopin tritt in Pflanzen normalerweise nicht auf. Prolycopin wurde bisher nur in wenigen Pflanzen wie der Tomatenmutante Tangella nachgewiesen (Clough & Pattenden, 1979, 1983).

## 6. Ziel der Arbeit

ζ-Carotin-Desaturasen haben in höheren Pflanzen und Cyanobakterien aufgrund ihrer Beteiligung bei den initialen Schritten der Carotinoidbiosynthese eine große Bedeutung. Bisher ist nur eine ζ-Carotin-Desaturase aus dem Cyanobakterium *Anabaena* (crtI-Typ) gereinigt und enzymatisch charakterisiert worden. Für die Desaturierungsprodukte der *Capsicum*-ZDS gab es bisher nur Daten aus Komplementierungsexperimenten in *E. coli* (Albrecht et al., 1995a). Aus diesem Grund sollte die ζ-Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* in *E. coli* heterolog exprimiert, in nativer Form isoliert und enzymatisch charakterisiert werden.

Die heterologe Expression der ζ-Carotin-Desaturase in *E. coli* bietet gegenüber dem Versuch einer Isolation des Enzyms aus *Capsicum*-Chromoplasten den Vorteil, durch die Verwendung eines geeigneten Expressionsvektors größere Mengen des nativen Enzyms gewinnen zu können. Durch die Verwendung eines Expressionsvektors, der die ζ-Carotin-Desaturase als rekombinantes Protein mit mit 6 N-terminalen Histidinen exprimiert, sollte dieses Enzym nativ über Metallionen-Affinitätschromatographie mit hoher Reinheit aus *E. coli* separiert werden.

Über *in vitro*-Aktivitätstest sollten Untersuchungen zur Substrat- und Kofaktorspezifität, sowie enzymkinetische Untersuchungen mit verschiedenen Hemmstoffen durchgeführt werden. Die Daten sollten mit denen einer Phytoendesaturase aus einer höheren Pflanze

und mit denen einer Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus Cyanobakterien verglichen werden, für die eine phylogenetische Verwandtschaft diskutiert wird. Dazu waren die Desaturasen ebenfalls in *E. coli* heterolog zu exprimieren und bezüglich des Kofaktors und der hemmkinetischen Eigenschaften zu charakterisieren.

Die Produkte der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* sollte mit denen der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* und der phylogenetisch nicht verwandten  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Anabaena* und einzelner bakterieller Phytoendesaturasen verglichen werden. Die Desaturasen sollten dazu in *E. coli*-Stämme transformiert werden, die die zugehörigen Carotinoid-Substrate akkumulieren (funktionelle Komplementierung der Lycopinsynthese). Zur Charakterisierung der Desaturierungsprodukte standen zwei HPLC-Apparaturen mit einer  $C_{18}$ - und einer zur Trennung von cis-trans-Carotinoidisomeren optimierten  $C_{30}$ -Säule zur Verfügung. Unter Verwendung von Carotinoidstandards und der spektralen Eigenschaften der Desaturierungsprodukte sollte die Identifizierung der gebildeten Carotinoide erfolgen. Weiterhin war ein geeignetes Laufmittelsystem zu wählen, mit dem die Carotinoidisomere in einem für eine Identifizierung ausreichendem Maß voneinander getrennt werden sollten.

Bisher war umstritten, ob die  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen eine Substratspezifität für eine bestimmte cis-trans-Konfiguration von  $\zeta$ -Carotins besitzen (Albrecht et al., 1995b, Beyer et al., 1994). Unter Verwendung verschiedener  $\zeta$ -Carotin-Isomere als Substrat für die *Capsicum*-ZDS in den *in vitro*-Aktivitätstests, sollte geklärt werden, ob die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase eine Spezifität für eine bestimmte cis-trans-Konfiguration des  $\zeta$ -Carotins besitzt.

Über das aktive Zentrum der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen lagen bisher keine Informationen vor. Durch die *in vitro*-Mutagenese der cDNA-Sequenz der *Capsicum*-ZDS, sollte versucht werden, Bereiche innerhalb der Aminosäuresequenz zu identifizieren, die für die enzymatische Aktivität der ZDS von Bedeutung sind.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Verwendete Organismen

#### 1.1. *Escherichia coli*-Stämme

- JM101 (Messing, 1979) wurde nach Komplementierung mit verschiedenen Carotinoidgenen zur Carotinoidproduktion, zur heterologen Expression der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum annuum*, *Synechocystis* sp. PCC 6803 und den Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 und *Gentiana lutea* verwendet.
- XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, USA) wurde zur Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA verwendet.

#### 1.2. Zur Extraktion von Carotinoiden verwendete Organismen

In Tabelle 2.1. sind die Organismen aufgeführt, die zur Extraktion von Carotinoiden dienen.

**Tabelle 2. 1:** Organismen und Verwendungszweck

Organismus	Verwendungszweck	Referenz
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> , Mutante S442	Extraktion von all trans- $\zeta$ -Carotin als HPLC-Standard	Bejarano et al., 1987
<i>Scenedesmus obliquus</i> , Mutante C-6D	Extraktion von Prolycopin als HPLC-Standard	Ernst & Sandmann, 1988
<i>Neurospora crassa</i> Mutante 7852	Extraktion von $\beta$ -Zeaxarotin (diese Mutante akkumuliert $\beta$ -Zeaxarotin)	Albrecht et al., 1995b

#### 1.3. *Saccharomyces cerevisiae* Y190

Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm Y190 (MATa gal4 gal80 his3 trp-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,-112+URA3::GAL-->lacZ, LYS2::GAL(UAS)-->HIS3 cyh<sup>r</sup>) wurde für das auf dem Gal4-Transkriptionsfaktor beruhenden Two-Hybrid-System zum *in vivo*-Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen verwendet. Der Stamm besitzt die Reportergene HIS3 und lacZ zum Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkung und ist auxotroph für die Aminosäuren L-Leucin, L-Tryptophan und L-Histidin. Der Hefestamm wurde freundlicherweise von James Miskin im Arbeitskreis von Professorin Dr. Linda Dixon (Institute of Animal Health, Pirbright, England) zur Verfügung gestellt.



## 2. Anzucht

### 2.1. *Escherichia coli*

#### 2.1.1. LB-Medium

Zur Anzucht von *E. coli* wurde Luria Bertani-Medium (LB; 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7, autoklaviert) verwendet. Als Nährböden in Petrischalen wurde das LB-Medium durch Agar (1,6 %) verfestigt. Für die Verbesserung der heterologen Expression der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* in *E. coli* wurde dem Medium zusätzlich 0,5 M Sorbitol und 3 mM Betain (Blackwell & Horgan, 1991) zugesetzt und bei 110°C autoklaviert. Entsprechend der Antibiotikaresistenzen der in *E. coli* transformierten Plasmide wurden folgende Antibiotikakonzentrationen zur Selektion verwendet: Chloramphenicol (34  $\mu$ g/ml), Ampicillin (20  $\mu$ g/ml), Tetracyclin (25  $\mu$ g /ml), Kanamycin (25  $\mu$ g/ml), Carbenicillin (70  $\mu$ g/ml) (Sambrook et al., 1989).

#### 2.1.2. SOB-Medium

Zur Anzucht von *E. coli*-Bakterien, die für eine Elektroporation eingesetzt werden sollten, wurde SOB-Medium (20 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,584 g/l NaCl, 0,186 g/l KCl in bidestilliertem H<sub>2</sub>O) verwendet.

#### 2.1.3. Anzucht von *E. coli* zur heterologen Expression der $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum annuum*, *Synechocystis* sp. PCC 6803 sowie der Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* PCC 7942 und *Gentiana lutea*.

Für die Anzucht von *E. coli* zur heterologen Expression der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum annuum*, *Synechocystis* sp. PCC 6803 und der Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Fraser et al., 1993; Schneider et al., 1997) und *Getiana lutea*, wurden kompetente *E. coli*-Zellen (Stamm JM101) mit in Tabelle 2.2 aufgeführten Plasmiden transformiert. 20  $\mu$ l transformierte Zellen wurden auf Petrischalen mit LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurde eine Übernachtskultur angeimpft, und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde das LB-Medium in einem Verhältnis von 1:50 angeimpft und bei 37°C im Schüttelwasserbad bei 180 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,1-0,2 inkubiert. Die Kulturen wurden auf 25°C abgekühlt, durch Zugabe von IPTG die heterologe Expression der Desaturase induziert und bei 25°C über Nacht unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation der Kulturen (10 min, 4000 g, Sorvall RC-5B plus). Die sedimentierten Zellen wurden in 200 mM

Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8 für die ζ-Carotin-Desaturasen, pH 7,2 für die Phytoendesaturasen) resuspendiert, sofort nach Zellaufschluß für *in vitro*-Aktivitätsuntersuchungen verwendet oder bei -80°C gelagert.

**Tabelle 2. 2 :** Verwendete Plasmide zur heterologen Expression der Desaturasen. Die Beschreibung der Plasmide ist im Abschnitt 3 aufgeführt.

Plasmid	Desaturase	Herkunftsorganismus	IPTG-Endkonzentration [µM]	Anzuchtmedium
pQE30zds	ζ-Carotin-Desaturase	<i>Capsicum annuum</i> (Paprika)	50	LB mit 0,5 M Sorbitol und 3 mM Betain
pTrc0940	ζ-Carotin-Desaturase	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	100	LB
pPDSdel35 (pds oex)	Phytoendesaturase	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	100	LB
pUC8pds <sub>GI</sub>	Phytoendesaturase	<i>Gentiana lutea</i> (gelber Enzian)	100	LB

### 2.1.4 Anzucht von *E. coli* zur Gewinnung von Substratcarotinoiden

LB-Medium wurde mit einer Vorkultur von *E. coli* JM101, mit den in Tabelle 2.3 aufgeführten Plasmiden transformiert, in einem Volumenverhältnis von 1:100 angeimpft und bei 28°C unter Lichtabschluß bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4-0,5 unter Schütteln inkubiert. Durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die Expression der Carotinoide zur Carotinoidebildung induziert. Die Kulturen wurden für 2 bis 3 Tage weiterkultiviert und die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4000 g) geerntet.

**Tabelle 2. 3:** Komplementierungen der Synthese einzelner Carotinoide in *E. coli*.

Die Komplementierungen wurden zur Gewinnung von Substratcarotinoiden durchgeführt. **crtE:** GGPP-Synthase aus *Erwinia uredovora*, **crtB:** Phytoensynthase aus *Erwinia uredovora*, **crtI<sub>Rc</sub>:** Phytoendesaturase aus *Rhodobacter capsulatus*, **pds:** Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942, **crtC:** Hydroxyneurosporin-Synthase aus *Rhodobacter capsulatus*, **crtD:** Methoxyneurosporin-Desaturase aus *Rubrivivax gelatinosus*, **crtF:** Hydroxyneurosporin-O-Methyltransferase aus *Rhodobacter capsulatus*.

Produkt(e)	Plasmid(e) in <i>E. coli</i> JM101	Carotinoidegene
Phytoen	pACCRT-EB	<i>crtE</i> , <i>crtB</i>
ζ-Carotin	pACCRT-EBP	<i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>pds</i>
Neurosporin	pACCRT-EBI <sub>Rc</sub>	<i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i>
ζ-Carotin, Hydroxy-ζ-Carotin, Di-Hydroxy-ζ-Carotin	pACCRT-EBP + pRKCRT-C	<i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>pds</i> , <i>crtC</i>
Neurosporin, Hydroxy-Neurosporin, Di-Hydroxy-Neurosporin	pACCRT-EBI <sub>Rc</sub> + pRKCRT-C	<i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtC</i>
Demethylspheroidin	pACCRT-EBI <sub>Rc</sub> + pSO50	<i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtC</i> , <i>crtD</i>
Spheroidin	pACCRT-EBI <sub>Rc</sub> + pSO50 + pUCCRT-F	<i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtC</i> , <i>crtD</i> , <i>crtF</i>

Die sedimentierten Zellen wurden gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Christ Gamma 1-20) und die gebildeten Carotinoide extrahiert. Die verschiedenen Carotinoide dienen als

Substrate in den Desaturase-Aktivitätstests.

## **2.2. *Phycomyces blakesleeanus* S442**

Ein Stück eingefrorenes Mycel wurde als Vorkultur auf einer Petrischale (20 ml 3 % Malzextrakt, 1,5 % Agar) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Woche Kulturdauer wurden 0,5 l Medium (24 g/l potatoe dextrose broth (Difco, Detroit, USA), pH-Wert 5,1, autoklaviert) mit einem Teil des Mycels angeimpft, unter Schütteln bei 60 rpm in gedämpftem Licht für eine Woche inkubiert und nachfolgend das Medium über eine Nutsche und Vakuumpumpe abgesaugt. Das erhaltene Mycel wurde gefriergetrocknet, durch ein Metallsieb zerrieben und das  $\zeta$ -Carotin extrahiert.

## **2.3. *Scenedesmus obliquus* C-6D**

Die Grünalgenmutante *Scenedesmus obliquus* C-6D (Ernst & Sandmann, 1988) wurde nach Sandmann & Böger (1981) angezogen und die gefriergetrockneten Zellen zur Extraktion von Prolycopin (7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin), Proneurosporin (7,9,9'-tricyclic-Neurosporin) und Pro- $\zeta$ -Carotin (9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin) verwendet.

## **2.4. *Neurospora crassa***

Die Anzucht der  $\beta$ -Zeacarotin akkumulierenden *Neurospora crassa*-Mutante 7852 erfolgte nach Albrecht et al. (1995b). Die Mutante wurde zur Extraktion von  $\beta$ -Zeacarotin verwendet.

## **2.5. *Saccharomyces cerevisiae* Y190**

Zur Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* wurden Zellen einer Dauerkultur (30 % Glycerin, Lagerung -80°C) auf einer Petrischale mit YEPD-Agar (16 g/l Agar, 50 g/l YEPD (GibcoBRL (Paisley,UK): 20 g/l Pepton 185, 20 g/l Glucose, 10 g/l Hefeextrakt)), ausgestrichen, bei 30°C für 4 bis 5 Tage inkubiert, eine Einzelkolonie in 50 ml YEPD-Medium (50 g/l YEPD) überimpft, über Nacht bei 30°C und unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Die Hefezellen wurden zur Transformation mit den Plasmiden des Two-Hybrid-Systems verwendet.

## **3. Plasmide**

Alle für die beschriebenen Klonierungen notwendigen Arbeitsschritte, auch für das Two-Hybrid-System, erfolgten nach Sambrook et al. (1989). Restriktionsendonucleasen und die *Taq*-Polymerase wurden von GibcoBRL (Karlsruhe, Deutschland), T4-DNA-Ligase, T4-Polynukleotid-Kinase, Shrimps alkalische Phosphatase und Klenow-Fragment von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) bezogen. Zur Extraktion von Restriktionsfragmenten und PCR-

Produkten aus Agarosegelen wurden der DNA-Extraktionskit "Concert Matrix Gel Extraction System" von GibcoBRL verwendet. Oligonukleotide zur Verwendung als Primer für PCR-Reaktionen wurden von Roth (Karlsruhe) bezogen. Zur Amplifikation des gesamten Plasmides pQE30zds im Rahmen der Mutagenese über inverser PCR wurde die "ACCUAQ LA DNA" Polymerase von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Nucleotide wurden von peQLab, dITP zur *in vitro*-Mutagenese der *Capsicum*-ZDS über PCR von New England Biolabs (Beverly, USA) bezogen.

### 3.1. pQE30zds

Zur heterologen Expression der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase (ZDS) aus *Capsicum annuum* in *E. coli* diente das Plasmid pQE30zds, welches von Marcel Kuntz (Génétique Moléculaire des Plantes, Université J. Fourier & CNRS, Grenoble, Frankreich) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Die cDNA-Sequenz der *Capsicum*-ZDS im Bluescript KS<sup>-</sup>-Vektor (Albrecht et al., 1995a) wurde am 5'-Ende über die in der cDNA liegende *NcoI*-Restriktionsschnittstelle geschnitten, mittels Klenow-Fragment und dNTPs aufgefüllt und am 3'-Ende über die im Bluescript KS<sup>-</sup>-Vektor gelegene *PstI*-Schnittstelle ausgeschnitten. Das 1848 bp lange Fragment wurde in die aufgefüllte *BamHI*- sowie in die *PstI*-Restriktionsschnittstelle des pQE30-Vektors (Qiagen, Hilden) ligiert. Die cDNA der *Capsicum*-ZDS erhielt auf diese Weise am 3'-Ende das *NotI-PstI*-Fragment der multiplen Klonierungsstelle des Bluescript KS<sup>-</sup>-Vektors. Der pQE30-Vektor diente zur Expression der *Capsicum*-ZDS als rekombinantes Polypeptid mit 6 N-terminalen Histidinen (His-tag), wodurch eine spätere Reinigung über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie ermöglicht wurde.

Eine 170 Basenpaare lange Sequenz der cDNA wurde am 5'-Ende durch die Klonierung in den Vektor pQE30 entfernt. Diese codiert für eine 54 Aminosäuren lange Sequenz, welche nach Albrecht et al. (1995a) möglicherweise eine Transitsequenz für den Transport der ZDS in Plastiden darstellt.

### 3.2. pUC8zds

Das Plasmid pUC8zds enthält das 1849 bp große 5'-*BamHI*-,3'-*PstI*-Restriktionsfragment der cDNA-Sequenz der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus dem Plasmid pQE30zds. Das Fragment wurde am 5'-Ende mittels Klenow-Fragment und dNTPs aufgefüllt und in die auf gleiche Art aufgefüllte *BamHI*- und in die *PstI*-Restriktionsschnittstelle der multiplen Klonierungsregion des pUC8-Vektors ligiert. Das Plasmid wurde zur Komplementierung mit dem Plasmid pACCRT-EBP und zur Expression der mutierten  $\zeta$ -Carotin-Desaturase für *in vitro*-

Reaktionen verwendet.

Die PCR-Produkte der Zufallsmutagenese wurden zur Klonierung in den Vektor pUC8 *NcoI*- und *PstI*- geschnitten und über die *NcoI*- und *PstI*-Restriktionsschnittstellen des Plasmids pUC8zds ligiert. Durch die Verwendung des Plasmids pUC8zds konnte eine bei der Klonierung der zds in den Vektor pUC8 eingebrachte *NcoI*-Schnittstelle zur Klonierung der PCR-Fragmente genutzt werden (Abbildung 2-1, S.20).

### 3.3. pBBR1-MCS2zds

Das 6776 bp große Plasmid trägt die cDNA-Sequenz für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* und ein Resistenzgen gegen Kanamycin. Für die Klonierung der zds-cDNA in den Vektor pBBR1-MCS2 wurde diese mittels PCR amplifiziert, wobei mit einem Primer am 3'-Ende eine *SacII*-Restriktionsschnittstelle generiert wurde:

- forward Primer: 5'-CAC CAT CAC GGC CCC ATG GTC-3',
- reverse Primer: 5'-TCC TTA TCC GCG GCC TAA CTG A-3',

(Die *SacII*-Schnittstelle ist unterstrichen).

Das PCR-Fragment (1610 bp) wurde in den *XcmI*-geschnittenen Vektor pMON38201 ligiert. Anschließend wurde die cDNA über die *ApaI*-Restriktionsschnittstelle des Vektors pMON38201 und der mittels PCR generierten *SacII*-Restriktionsschnittstelle als ein 1720 bp großes Fragment in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Vektors pBBR1-MCS2 kloniert. Das Plasmid pBBR1-MCS2zds wurde zur Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* mit den Plasmiden pQE31pds<sub>ca</sub> und pACCRT-EB verwendet.

### 3.4. pACYC184PDSdel35PYS

Das Plasmid enthält die Gene für eine Phytoensynthase und Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942. Aus dem Plasmid pPDSdel35PYS (Chamovitz et al., 1992) wurde mit *PvuII* ein 2,9 kb-Fragment herausgeschnitten, welches die für die Phytoensynthase und Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 codierende Sequenz sowie den lacZ-Promotor enthält und in den *EcoRV*-geschnittenen Vektor pACYC184 ligiert. Das Plasmid wurde zur Komplementierung in *E. coli* mit GGPP-Synthasen bakterieller, pilzlicher und pflanzlicher Herkunft verwendet.

### 3.5. pQE31pds<sub>ca</sub>

Aus dem Plasmid pPDS<sub>ca</sub>, welches die cDNA der *Capsicum*-PDS (Hugueney et al., 1992) im Bluescript KS'-Vektor enthält, wurde über die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *SalI* ein 1859 bp-Fragment mit der pds-cDNA-Sequenz herausgeschnitten und in die *SacI*- und *SalI*-

Schnittstellen der multiplen Klonierungstelle des Vektors pQE31 ligiert.

Das Plasmid wurde zur Komplementierung der Carotinoidsynthese in *E. coli* in Verbindung mit dem Plasmid pACCRT-EB und den Plasmiden pACCRT-EB mit pBBR1-MCS2zds verwendet.

### 3.6. Weitere Plasmide

Die in Tabelle 2.4 aufgeführten Plasmide wurden für verschiedene Komplementierungen bzw. zur heterologen Expression von Carotinoidenzymen in *E. coli* verwendet:

**Tabelle 2.4:** Weitere verwendete Plasmide.

Cm: Chloramphenicol, Tet: Tetracyclin, Amp: Ampicillin, Kn: Kanamycin; Die Desaturase-Gene sind in Klammern angegeben.

Plasmid	Selektionsmarker	Carotinoidgen(e)	Referenz
pRKCRT-C	Tet	Hydroxyneurosporin-Synthase ( <i>crtC</i> ) aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>	Albrecht et al., 1997
pRKCRT-Y	Tet	Lycopinzyklase ( <i>crtY</i> ) aus <i>Erwinia uredovora</i>	Schnurr et al., 1996
pRK-RH7	Tet	IPP-Isomerase ( <i>idi</i> ) aus <i>Haematococcus pluvialis</i>	Kajiwarra et al., 1997
pSO50	Kn	Hydroxyneurosporinsynthase ( <i>crtC</i> ) Methoxyneurosporin Desaturase ( <i>crtD</i> ) aus <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	Ouchane et al., 1997
pUCCRT-F	Amp	Hydroxyneurosporin-O-Methyltransferase ( <i>crtF</i> ) aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Albrecht et al., 1997
pPDSdel35PYS	Amp	Phytoendesaturase ( <i>pds</i> ) und Phytoensynthase ( <i>crtE</i> ) aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	Chamovitz et al., 1992
pZDS-1B	Amp	ζ-Carotin-Desaturase aus <i>Anabaena</i> ( <i>crtQ<sub>a</sub></i> )	Linden et al., 1993
pTrc0940	Amp	ζ-Carotin-Desaturase ( <i>crtQ<sub>b</sub></i> ) aus <i>Synechocystis</i> PCC 6803 im Vektor pTrc99A (Pharmacia), Expression der ζ-Carotin-Desaturase für <i>in vitro</i> -Reaktionen	Kotani et al., 1995; Breitenbach et al., 1998
pPDSdel35 ( <i>pds oex</i> )	Amp	Phytoendesaturase ( <i>pds</i> ) aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 im Vektor pBluescript KS+, Überexpression der PDS für <i>in vitro</i> Reaktionen (Bestimmung des I <sub>50</sub> -Wertes von J852, LS80707, Kofaktoruntersuchung).	Chamovitz et al., 1991; Fraser et al., 1993; Schneider et al., 1997
pUC8 <i>pds<sub>GI</sub></i>	Amp	cDNA der Phytoendesaturase ( <i>pds</i> ) aus <i>Gentiana lutea</i> im pUC-Vektor zur heterologen Expression der Phytoendesaturase in <i>E. coli</i> . Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Changfu Zhu zur Kofaktoruntersuchung der Phytoendesaturase zur Verfügung gestellt.	Dr. Changfu Zhu, Ak Prof. Dr. G. Sandmann
pQE31	Amp, Cm	Klonierungsvektor zur Expression eines Fusionsproteins mit 6 N-terminalen Histidinen zur Reinigung über Metallionen-Affinitätschromatographie	Qiagen Hilden
pACYC184	Cm, Tet	Klonierungsvektor	Chang & Cohens, 1978; Rose, 1988
pUC8	Amp	Klonierungsvektor	Vieira & Messing, 1982
pMON38201	Amp	Klonierungsvektor für PCR-Produkte zur Klonierung über die A-Überhänge	Monsanto Company, BioTechniques 1997

Plasmid	Selektionsmarker	Carotinoidgen(e) / Produkte(e)	Referenz
pACCRT-EB	Cm	GGPP-Synthase ( <i>crtE</i> ), Phytoensynthase ( <i>crtB</i> ) aus <i>Erwinia uredovora</i> / Phytoen	Linden et al., 1991
pACCRT-EBP	Cm	GGPP-Synthase ( <i>crtE</i> ), Phytoensynthase ( <i>crtB</i> ) aus <i>Erwinia uredovora</i> und Phytoendesaturase ( <i>pds</i> ) aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 / $\zeta$ -Carotin	Linden et al., 1993
pACCRT-EBI <sub>Rc</sub>	Cm	GGPP-Synthase ( <i>crtE</i> ), Phytoensynthase ( <i>crtB</i> ) aus <i>Erwinia uredovora</i> , Phytoendesaturase <i>crtI</i> aus <i>Rhodobacter capsulatus</i> / Neurosporin, geringe Mengen Lycopin	Linden et al., 1993; Raisig et al., 1996
pACCRT-EBI <sub>Eu</sub>	Cm	GGPP-Synthase ( <i>crtE</i> ), Phytoensynthase ( <i>crtB</i> ), Phytoendesaturase ( <i>crtI</i> ) aus <i>Erwinia uredovora</i> / Lycopin	Schnurr et al., 1996
pACCRT-MN	Cm	Diapophytoensynthase ( <i>crtM</i> ) und Diapophytoendesaturase ( <i>crtN</i> ) aus <i>Staphylococcus aureus</i> / Diaponeurosporin	Wieland et al., 1994

### 3.7. Plasmide des Two-Hybrid-Systems

#### 3.7.1. pAS2zds

Das Plasmid diente zur Expression der *Capsicum*-ZDS als Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors in *Saccharomyces cerevisiae* zur Durchführung des Two-Hybrid-Systems. Das Plasmid pQE30zds wurde über *PstI* am 3'-Ende aufgeschnitten, mit Klenow-Fragment und dNTPs aufgefüllt und mit *NcoI* am 5'-Ende die cDNA-Sequenz der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase als ein 1,8 kb-Fragment herausgeschnitten, so daß ein Fragment mit überhängendem 5'-Ende und glattem 3'-Ende entstand.

Der Vektor pAS2-1 (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, USA) wurde an der multiplen Klonierungsstelle mit dem Restriktionsenzym *SalI* aufgeschnitten, die Schnittstelle mit Klenow-Fragment und dNTPs aufgefüllt und mit *NcoI* am 5'-Ende geschnitten. Das 1,8 kb-Fragment wurde in den auf diese Weise geschnittenen Vektor ligiert. Der Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli* und ein Gen zur Bildung von Tryptophan (TRP1) als Selektionsmarker in Hefe.

#### 3.7.2. pACT2zds

Der Vektor pACT2 (CLONTECH Laboratories, Inc.) wurde an der multiplen Klonierungsstelle *NcoI*- (5'-Ende), *SmaI*- (3'-Ende) geschnitten und das zds-Fragment, wie für pAS2zds beschrieben, in den Vektor ligiert. Das Plasmid pACT2zds diente zur Expression der *Capsicum*-ZDS als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors in *Saccharomyces cerevisiae*. Der Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli* und ein Gen zur Bildung von Leucin (LEU2) als Selektionsmarker in Hefe.

### 3.7.3 Plasmide für die Kontrolltransformationen

Die in Tabelle 2.5 aufgelisteten Plasmide pSE1112, pSE1111, pA238L und int9fd wurden zur Durchführung des Two-Hybrid-Systems freundlicherweise von James Miskin im Arbeitskreis von Professorin Dr. Linda Dixon, Institute of Animal Health, Pirbright, England zur Verfügung gestellt, wo ebenfalls alle Arbeiten zur Durchführung des Two-Hybrid-Systems erfolgten.

**Tabelle 2. 5:** Verwendete Plasmide zur Durchführung von Kontrolltransformationen des Two-Hybrid-Systems. Amp: Ampicillin, TRP1: Gen zur Tryptophanbildung, LEU2: Gen zur Leucinbildung.

Plasmid	Selektionsmarker	Beschreibung
pSE1112	TRP1, Amp	SNF1 (Fields & Song, 1989) an die DNA-Bindedomäne von GAL4 in pAS1 kloniert; das Plasmid wurde als Positivkontrolle zusammen mit dem Plasmid pSE1111 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y190 kotransformiert.
pSE1111	LEU2, Amp	SNF4 (Fields & Song, 1989) an die DNA-Aktivierungsdomäne von GAL4 in pACT kloniert
pA238L	TRP1, Amp	Offenes Leseraster von A238L in-frame mit der GAL4- DNA-Bindedomäne in dem Plasmid pGBT (CLONTECH). A238L ist ein Gen des Afrikanischen Schweinefieber Virus (Miskin et al., 1998; Powell et al. 1996); dieses Plasmid wurde als zweite Positivkontrolle zusammen mit dem Plasmid int9fd in <i>S.c.</i> Y190 kotransformiert.
int9fd	LEU2, Amp	Calcineurin offenes Leseraster in frame kloniert mit der GAL4-Aktivierungsdomäne in pACT2 (Durfee et al., 1993)

### 3.8. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Scientific Research & Development GmbH, Oberursel durchgeführt. Die Sequenzierung der mutierten cDNA-Sequenz der ZDS erfolgte im genomic walking-Verfahren. Sie diente zur Identifikation der Mutationen nach durchgeführter *in vitro*-Mutagenese der cDNA der *Capsicum*-ZDS im Plasmid pUC8zds.

Zur Kontrolle der cDNA-Sequenz der ZDS im Plasmid pQE30zds nach der Mutagenese über inverser PCR wurden die in Tabelle 2.6 aufgeführten Sequenzier-Primer verwendet. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Concert DNA-Präparationskit (GibcoBRL, Karlsruhe) aus *E. coli* XL1-Blue MRF' isoliert und über Nitrocellulose-Filter mit einer Porengröße von 0,025 µm (MILLIPORE) gegen 2 mM Tris-HCl pH 8,0 dialysiert.

**Tabelle 2. 6:** Sequenzier-Primer zur Überprüfung der Mutagenese über inverse PCR

Primer	Sequenz	Mutation der Base
614 MZDS	5'-CTG CTA GTG AAG GAG CAT A-3'	614, 952
1216 MZDS	5'-GCA TGT GTA GTA CCT GGA AT-3'	1216
1606 MZDS	5'-CTT CCC AAG GTC TTG AGG TA-3'	1606, 1712, 1726



### 3.9. *In vitro*-Mutagenese der *Capsicum*-ZDS

#### 3.9.1. Mutagenese der *Capsicum*-ZDS über PCR (error prone PCR) zur Erzeugung einer Bibliothek mutierter *zds*-cDNA im Vektor pUC8

Die Mutagenese wurde nach Xu et al. (1999) durchgeführt. Als DNA-Templat für die error prone PCR diente der *Xmn*I-geschnittene Vektor pUC8zds, der die cDNA-Sequenz der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* enthält. Es wurde folgender PCR-Ansatz durchgeführt (Endvolumen 50  $\mu$ l):

- 5 Einheiten *Taq*-Polymerase,
- 5  $\mu$ l *Taq*-Polymerase-Puffer,
- 10 pmol M13 reverse Primer (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3'),
- 10 pmol M13-20 forward Primer (5'-CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG-3'),
- 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 40  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>
- 200  $\mu$ M dNTP
- 100 ng *Xmn*I geschnittener Vektor pUC8zds,
- 35,8  $\mu$ l bidest. steriles Wasser.

Folgende Zyklen wurden für die PCR-Reaktion verwendet (PCR-Gerät Progene, Techne, Cambridge, UK): 1 x 2 Minuten 40°C; 1 x 3 Minuten 94°C; 20 x 1 Minute 94°C, 2 Minuten 55°C und 2 Minuten 72°C; 1 x 10 Minuten 72°C.

Nachfolgend wurde eine zweite PCR mit der amplifizierten DNA als Templat für die zweite PCR-Reaktion durchgeführt :

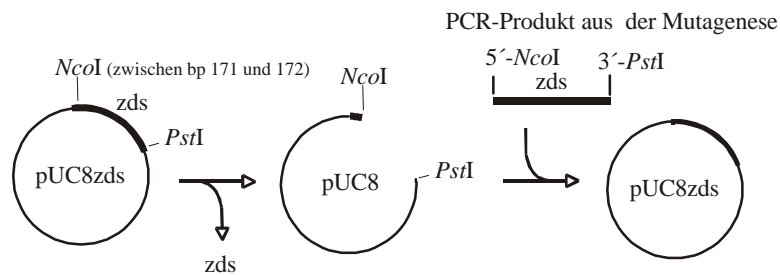
- 4  $\mu$ l PCR-Produkt,
  - 10 Einheiten *Taq*-Polymerase,
  - 30 pmol M13 reverse Primer,
  - 30 pmol M13-20 forward Primer,
  - 2 mM MgCl<sub>2</sub>,
  - 50  $\mu$ M dITP,
  - 200  $\mu$ M dNTP,
  - 10  $\mu$ l PCR-Puffer,
- mit bidestilliertem Wasser auf 100  $\mu$ l Volumen ergänzt.

#### 3.9.2. Ligation der mutierten cDNA der ZDS in den Vektor pUC8

Nach erfolgter PCR wurde die amplifizierte DNA mit Ethanol präzipitiert (Sambrook et al., 1989) und in 60  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 resuspendiert. Die resuspendierten DNA (30  $\mu$ l) wurde mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Pst*I geschnitten, über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das 1,8 kb große *zds*-Fragment mit dem Concert Matrix Gel Extraction System (GibcoBRL, Karlsruhe) isoliert. Die DNA wurde in 30  $\mu$ l mit 5 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert und mit dem *Nco*I- und *Pst*I-geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pUC8 ligiert (16°C, 18 Stunden, 4 Einheiten T4-DNA-Ligase, 2  $\mu$ l 10-fach Ligationspuffer, 2  $\mu$ g Vektor-DNA, 4  $\mu$ g PCR-Produkt). Zur Bestimmung der Anzahl

an Religationen wurde ein Ligationsansatz mit Vektor allein durchgeführt. Die Ligationsreaktion wurde durch Inkubation für 15 Minuten bei 65°C gestoppt.

Da der Vektor pUC8 normalerweise über keine *NcoI*-Schnittstelle verfügt, wurde das Plasmid pUC8zds *NcoI*-, *PstI*- verdaut und der Vektor pUC8 über Gelelektrophorese isoliert. Auf diese Weise erhielt der Vektor pUC8 die 5'-*NcoI*-Schnittstelle der cDNA der ZDS. Über die *NcoI*- und *PstI*-Schnittstelle erfolgte die Ligation mit dem entsprechend geschnittenen PCR-Fragment.



**Abbildung 2-1:** Ligation des PCR-Fragmentes der *in vitro*-Mutagenese mit dem Vektor pUC8.

### 3.9.3. Gewinnung der Plasmid-Bibliothek mutierter zds-cDNA

Jeweils 2 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation des *E. coli*-Stammes XL1-Blue mittels Elektroporation verwendet. Von den transformierten Zellen wurden 10 µl und 50 µl auf Petrischalen mit LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der verbleibende Transformationsansatz wurde über Nacht bei 4°C gelagert. Die Kolonienzahl wurde bestimmt und die für ca. 2000 Kolonien pro Petrischale nötigen Volumina der Transformationsansätze auf Petrischalen mit LB-Agar ausplattiert und diese bei 37°C über Nacht inkubiert.

Die Kolonien wurden mit jeweils 2 ml LB-Medium unter Verwendung eines Trigalski-Spatel abgelöst und die Bakteriensuspension in 100 ml LB-Medium überführt. Mit der erhaltenen 100 ml Kultur wurde eine tip-500 Säulen-DNA-Maxipräparation von Qiagen (Hilden) durchgeführt.

### 3.9.4. Selektion von mutierter *Capsicum*-ZDS über die funktionelle Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli*

Die erhaltene Plasmid-DNA mit der mutierten zds-cDNA wurde in einen ζ-Carotin bildenden *E. coli*-Stamm (JM101/pACCRT-EBP + pRK-RH7) transformiert. Das Plasmid pRK-RH7 trägt die IPP-Isomerase aus *Haematococcus pluvialis* (Kajiwara et al., 1997) im Vektor pRK404. Es wurde bei Komplementierungen zur Erhöhung des Carotinoidgehaltes verwendet. Die Erhöhung des Carotinoidgehaltes diente dazu, im Rahmen der Mutagenese der ZDS aus *Capsicum annuum* die farbliche Unterscheidung von Bakterienkolonien mit mutierter ZDS zu

erleichtern.

Nach Transformation der Zellen mittels Elektroporation wurde auf jeweils 2 Petrischalen 10 µl und 50 µl einer 1:10-Verdünnung der transformierten Zellen ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Kolonienzahl wurde bestimmt und auf Petrischalen (30ml LB-Agar, Carbenicillin, Chloramphenicol, Tetracyclin, 1mM IPTG) die Volumina der Transformationsansätze JM101/pACCRT-EB + pRK-RH7 + pUC8zds für ca. 200-400 Kolonien pro Petrischale ausplattiert (ca. 16000 Kolonien Gesamtzahl). Die Petrischalen wurden für 2-5 Tage bei 28°C inkubiert und gegenüber einer Kontrolltransformation nach intensiv orange-rot und schwächer gefärbten Kolonien gesichtet. Diese Kolonien wurden abgeimpft und mit ihnen 5 ml und 50 ml LB-Übernachtskulturen unter Zugabe von 1 mM IPTG angelegt. Die 5 ml- Kulturen wurden zur Plasmid-Isolation, die 50 ml-Kulturen zur Extraktion der gebildeten Carotinoide und zur HPLC-Analyse verwendet.

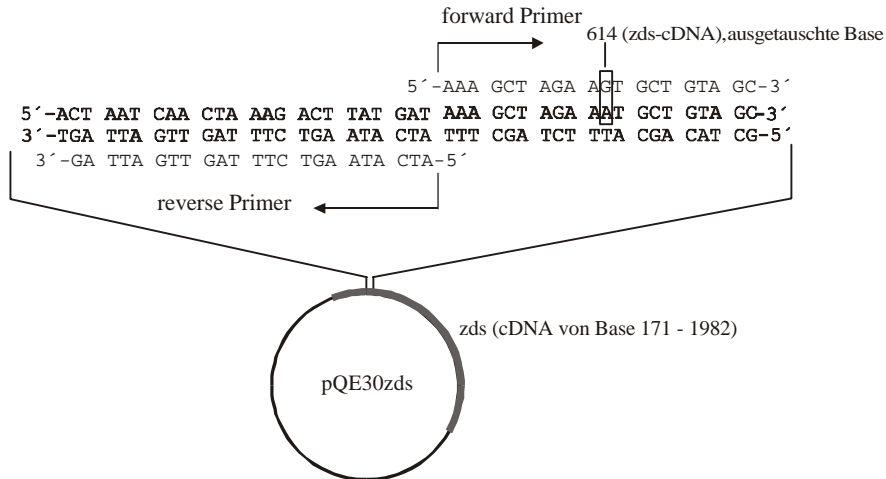
Die isolierte Plasmid-DNA enthielt neben dem Plasmid pUC8zds noch die Plasmide pRK-RH7, pACCRT-EBP. Zur Gewinnung des Plasmids pUC8zds ohne die anderen Plasmide wurde die isolierte Plasmid-DNA in *E. coli* XL1-Blue transformiert und auf Petrischalen mit Ampicillin (Selektion des Plasmids pUC8zds) ausplattiert. Von den gebildeten Kolonien wurden Übernachtskulturen angelegt und diese zur Plasmidisolation verwendet.

### 3.9.5. Mutagenese der *Capsicum*-ZDS über inverse PCR

Das Ziel war es, nach Analyse der durch Zufallsmutagenese erzeugten Mutationen der *Capsicum*-ZDS, diese einzeln über inverse PCR in die ZDS einzuführen und die Auswirkung auf die Enzymaktivität zu untersuchen. Für die PCR-Reaktion enthielt einer der zwei Primer in seiner Sequenz eine falsch paarende Base, die zum gewünschten Aminosäureaustausch der ZDS führte (Abbildung 2-2, Tabelle 2.7).

Über inverse PCR mit Hilfe einer DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (ACCUTAQ LA DNA Polymerase, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde das gesamte Plasmid pQE30zds mit der cDNA der ZDS amplifiziert (500 µM dNTP-Mix, ca. 20 ng pQE30zds Plasmid DNA, 2 % DMSO, je 400 nM Primer, 0,05 Einheiten AccuTaq LA DNA Polymerase Mix pro µl, in 50 µl Volumen). Die PCR-Reaktion beinhaltete folgende Reaktionsbedingungen:

1 Zyklus à 2 Minuten 40°C, 1 Zyklus à 3 Minuten 95°C, 30 Zyklen à 40 Sekunden 95°C, 40 Sekunden 53°C und 8 Minuten 68°C, 1 Zyklus à 10 Minuten 68°C.



**Abbildung 2-2:** Induktion der Mutation über inverse PCR und einer falsch paarenden Base in einem der verwendeten Primer.

Die aus der PCR-Reaktion resultierenden A-Überhänge der amplifizierten DNA wurden mit Klenow-Fragment entfernt und die 5'-Enden der PCR-Produkte über T4-Polynucleotid Kinase phosphoryliert. Die DNA wurde über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mittels eines DNA-Elutionskit aus der Agarose extrahiert. Mittels T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) wurde die amplifizierte DNA geschlossen. Die erhaltenen Plasmide wurden in *E. coli* JM101 mittels Elektroporation transformiert und zur Kontrolle der Mutation mit den in Tabelle 2.6 angegebenen Primern ansequenziert. Die in *E. coli* überexprimierte ZDS wurde wie beschrieben gereinigt und für *in vitro*-Aktivitätsuntersuchung verwendet.

**Tabelle 2. 7:** Verwendete Primer zur Durchführung der Mutagenese über inverse PCR. Die gegenüber der Originalsequenz veränderte Base ist unterstrichen.

Ausgetauschte Base Nr.	Sequenz des forward Primers	Sequenz des reverse Primers
623 (A->G)	5'-AAAGCTAGAA <u>G</u> TGCTGTAGC-3'	5'-ATCATAAGTTTCGATGGTATTA-3'
961 (C->G)	5'-AAGGTTCCAT <u>G</u> TGAGGTGG-3'	5'-CCCCCCTTGTCTATGATGT-3'
1225 (G->T)	5'- <u>A</u> GTTGCAGTACTTGGAGCG-3'	5'-CCGTAACCCAGCCATTGTA-3'
1615 (A->C)	5'-AGGACTAC <u>C</u> TCGATAGTATG-3'	5'-GTTTTGTATATGAGCCAGCAA-3'
1721 (A->C)	5'-CTGCTGCTG <u>C</u> GTAAACGA-3'	5'-CAATCTTTTTTCGCAGCGC -3'
1735 (T->C)	5'-TTAAACGAGATC <u>C</u> CTAAAGGT-3'	5'-CTCAGCAGCAGCAATCTTTT-3'

### 3.10. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

#### 3.10.1. DNA-Minipräparation

1,5 ml einer LB-Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue MRF', transformiert mit dem zu isolierenden Plasmid, wurde über eine Eppendorf-Tischzentrifuge (1 min, 14000 rpm, Modell

5415) abzentrifugiert, der Überstand bis auf 50 µl Volumen verworfen und die sedimentierten Zellen unter Zugabe von 300 µl TENS (10 mM Tris-HCl, 1mM Na-EDTA, 0,5 % SDS, 0,1 M NaOH, pH 8,0, autoklaviert) resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl 3-5 M Na-Acetat (pH 4,8) wurden die Proteine durch Zentrifugation (10 min, 14000 rpm) präzipitert und die DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 800 µl eiskaltem Ethanol und nachfolgender Zentrifugation (5 min, 14000 rpm) gefällt. Die präzipitierte DNA wurde mit 500 µl 80 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) resuspendiert.

### **3.10.2. Concert DNA-Präparationskit (GibcoBRL, Karlsruhe)**

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte aus aus 1,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert mit dem zu isolierenden Plasmid. Die Durchführung erfolgte nach Herstellervorgaben. Die über den Concert DNA-Präparationskit gereinigte DNA wurde zur Sequenzierung verwendet.

## **4. Transformation von *E. coli***

### **4.1. Transformation kompetenter Zellen**

100 ml LB-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft, bis zur einer  $OD_{600nm}$  von 0,4-0,5 bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert, die Bakterien pelletiert (10 min, 4000 g) und für 1,5 bis 2,5 Stunden auf Eis in 20 ml TFB<sub>1</sub>-Puffer (30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin p.a., pH 5,8) inkubiert. Die Bakterien wurden erneut durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 650 g), in 2 ml TFB<sub>2</sub>-Puffer (10 mM Na-MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerin p.a.) resuspendiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert.

Zur Transformation wurde zu je einem Aliquot Zellen 1 µl Plasmid-DNA gegeben, der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert, für 2 Minuten auf 42°C erhitzt und nachfolgend für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert, 20 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agar mit dem zur Selektion notwendigen Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

### **4.2. Elektroporation**

Die Elektroporation wurde aufgrund ihrer höheren Effizienz zur Kotransformation zweier Plasmide oder zur Transformation von ligierter Plasmid-DNA verwendet. 200 ml SOB-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft, bis zur einer  $OD_{550nm}$  von 0,7-0,8 bei 37°C im Schüttelwasserbad (Aquatron, Infors) inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (10 min, 4000 g) sedimentiert, zweimal in 100 ml

bidestilliertem Wasser und einmal in 25 ml eiskaltem 15 % (v/v) Glycerin p.a. resuspendiert und nach jedem Resuspendieren zentrifugiert (10 min, 4000 g). Anschließend wurden die Zellen in 2 ml 15 % Glycerin p.a. resuspendiert und zu 60 µl Volumen aliquotiert.

Je Aliquot Bakterien wurden 2 µl Ligationsansatz oder je 1 µl Plasmid-DNA zugegeben, in eine sterilisierte Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) überführt, ein Spannungspuls von 2400 Volt (Parallelwiderstand zur Probe 132 kOhm, 40 µF Kapazität, Elektroporationsgeräte 'Cellject Basic, Equibio 02/92') angelegt und 1 ml SOC-Medium (SOB-Medium mit 10 µl/ml Mg-Stammlösung; Mg-Stammlösung: 2,03 g MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 2,47 g MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O in 10 ml H<sub>2</sub>O bidest.) zugegeben. Die transformierten Zellen wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert, davon 2 bis 100 µl auf LB-Agar (mit dem zugehörigen Antibiotika zur Selektion) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

## 5. Carotinoide, Extraktion und Analytik

Alle Arbeitsschritte zur Extraktion wurden unter abgedunkelten Lichtverhältnissen durchgeführt.

### 5.1. Methanolextraktion von Carotinoiden

50 mg bis 800 mg gefriergetrocknetes Zellmaterial wurde gemörsert (*Scenedesmus obliquus* C-6D, *E. coli*) oder durch ein Metallsieb gerieben (*Neurospora crassa* 7852, *Phycomyces* S442), mit 20 ml Methanol und 2 ml 60 %iger Kaliumhydroxidlösung (6 % (v/v)) versetzt und auf 60°C für 20 Minuten erhitzt. Die Carotinoide wurden mit 10 % Diethylether in Petroleumbenzin (Sdp. 40° - 60°C) im Scheidetrichter unter Wasserzugabe ausgeschüttelt und das Extrat in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Die Carotinoide wurden in einem geringem Volumen Diethylether rückgelöst, in ein 20 ml Glasgefäß überführt, unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, verschlossen und bei -20°C im Dunkeln bis zur Verwendung gelagert.

### 5.2. Acetonextraktion von Carotinoiden

50 mg bis 800 mg gefriergetrocknete, gemörserte Bakterien oder 20 ml einer 1:30 eingengten, über French Pressure Cell Press aufgeschlossenen *E. coli*-Kultur wurden mit 20 ml Aceton versetzt und 15 Minuten bei 60°C inkubiert. Die Carotinoide wurden im Scheidetrichter mit 10 % Diethylether in Petroleumbenzin bp. 40-60°C ausgeschüttelt und bis zur Trockene, wie für die Methanolextraktion beschrieben, eingengt.

### 5.3. Reinigung von Substratcarotinoiden

#### 5.3.1. Neurosporin

Carotinoideextrakte aus *E. coli* JM101/pACCRT-EBI<sub>R.c.</sub> enthielten neben Neurosporin geringe Mengen an Lycopin. Die Trennung der beiden Carotinoide erfolgte über Aluminiumoxid (ICN Alumina N, Brockmann Grad II (3 % H<sub>2</sub>O (w/v), Säulenlänge 20 cm, Durchmesser 4 mm). Die Carotinoide wurden in 1 ml Petroleumbenzin (Sdp. 40-60°C) gelöst und in 3 Fraktionen mit Diethylether in Petroleumbenzin mit steigenden Anteilen an Diethylether in Petroleumbenzin (0, 5, 10 %) eluiert. Die Fraktionen wurden über HPLC auf Verunreinigung mit Lycopin überprüft, die Lycopin-freien Neurosporinfraktionen wurden vereint und unter N<sub>2</sub> eingengt.

#### 5.3.2. Hydroxy-Carotinoide, Prolycopin, Proneurosporin, Demethylspheroidin, Spheroidin und ζ-Carotin-Isomere

Die Carotinoide Mono- und Di-Hydroxy-ζ-Carotin, Mono- und Di-Hydroxy-Neurosporin, Spheroidin, Demethylspheroidin und cis-trans ζ-Carotin-Isomere wurden über C<sub>18</sub>-HPLC (Nucleosil 120-3-Trennsäule, Macherey & Nagel (Düren), Laufmittel 15 % B) gereinigt. Die Carotinoidfraktionen wurden aufgefangen, die Carotinoide durch Zugabe von 10 % Diethylether in Petroleumbenzin im Verhältnis 1:1 zur Elutionsfraktion unter Wasserzugabe aus dem Laufmittel ausgeschüttelt und nachfolgend unter N<sub>2</sub> bis zur Trockene eingengt.

Prolycopin, Proneurosporin und Pro-ζ-Carotin aus *Scenedesmus obliquus* C-6D wurden über C<sub>30</sub>-HPLC (Laufmittel 40 % und 70 % MTBE) voneinander getrennt, die Fraktionen einzeln aufgefangen und wie oben beschrieben ausgeschüttelt und eingengt.

### 5.4. Konzentrationsbestimmung von Carotinoidlösungen

Das Carotinoid wurde in Aceton bzw. in Methanol (Phytoen) gelöst, um den Faktor 100 bis 200 verdünnt und die Extinktion mit einem Zweistrahlphotometer (Shimadzu UV-160 A) bestimmt. Zur Verdünnung wurden die in Tabelle 2.8 aufgeführten Lösungsmittel verwendet. Die Carotinoidkonzentration wurde über den gemessenen Extinktionswert unter Verwendung der in Tabelle 2.8 aufgelisteten Extinktionskoeffizienten nach Davies (1976) berechnet:

$$m \text{ [g]} = (V * F_v * \Delta E) / (E_{1\text{cm}}^{1\%} * 100),$$

m : Carotinoidmasse in g,  
 V : Volumen der Carotinoidlösung in ml,  
 F<sub>v</sub> : Verdünnungsfaktor,  
 ΔE : Extinktion,  
 E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> : Extinktionskoeffizient.

**Tabelle 2. 8:** Extinktionskoeffizienten verschiedener Carotinoide nach Britton (1995a)

Carotinoid	Extinktionskoeffizient $E_{1\text{cm}}^{1\%}$	Lösungsmittel	Wellenlänge [nm]
Phytoen	1250	Petroleum (Sdp. 40-60 °C)	286
ζ-Carotin	2555	Hexan	400
Neurosporin	2914	Hexan	440
Lycopin	3450	Petroleum (Sdp. 40-60 °C)	470

### 5.5. Photo-Isomerisierung von Carotinoiden mit Iod (Zechmeister, 1962)

0,5 - 2 µg Carotinoid wurden in 1 ml n-Hexan gelöst und 1 µl einer alkoholischen Iodlösung (2,5 g/l Iod, 2,5 g/l Kaliumjodid in 90 % (v/v) Ethanol, 0,25 % Endkonzentration) zugegeben und der Reaktionsansatz mit diffusem Tageslicht ( $15 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  pro µA; Messgerät LICOR Modell LI-189) für 1 Minute belichtet. Die isomerisierten Carotinoide wurden unter Zugabe von 4 ml 10 % Diethylether in Petroleumbenzin (Sdp. 40-60°C) und 5 ml Wasser ausgeschüttelt und unter N<sub>2</sub> eingengt.

### 5.6. Carotinoidanalytik mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

#### 5.6.1. Verwendete Trennsysteme

Es wurden zwei verschiedene HPLC-Trennsäulen verwendet:

- **Nucleosil 120-3 C<sub>18</sub>** (poröses Kieselgel (SiO<sub>2</sub>) als kugelförmige Teilchen, chemisch modifiziert), Macherey & Nagel (Düren), Phase Octadecyl  $-(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$ , Korngröße 3 µM, Länge X ID = 250 X 4,6 mm.
- **YMC30 C<sub>30</sub>**, YMC Inc. (Wilmington, NC; YMC Europe GmbH, Schermbeck), Korngröße 3 µM, Länge X ID = 250 X 4,6 mm (Sander et al., 1994).

Die verwendeten HPLC-Systeme beinhalteten eine HPLC-Pumpe (ERC Modell 64), die über eine Vor- und Trennsäule an einen Diode Array Detektor DAD 440 (Kontron, Straubenhard) angeschlossen war. Die in Aceton gelösten Carotinoidextrakte wurden über eine 50 µl Kloehn Mikroliterpipette in ein vor den Säulen angebrachtes Rhoedyn-Injektionsventil mit einer 20 µl Probenschleife aufgetragen. Die Laufmittel (Tabelle 2.9) wurden durch einen Degasser (ERC-3217) entgast. Zur Konstanthaltung der Säulentemperatur bei der C<sub>30</sub>-HPLC wurde ein thermoelektrisches Kühl- und Heizelement (ERC CROCO-CIL) mit Steuergerät eingesetzt. Die HPLC-Elutionsdiagramme wurden von dem Diode Array Detektor als Spannungswerte ausgegeben und über eine Digitalisierungskarte auf einen Personalcomputer übertragen. Mit dem Programm Ramona (Version 11.5, (c) Nuclear Interface GmbH, Münster) wurden die HPLC-Elutionsprofile aufgezeichnet. Die Spektren der Elutionsprofile wurden vom Diode Array Detektor gespeichert und nach Beendigung der Trennung über ein seriell-parallel



Interface-Kabel (PE Modell 2024) und dem Programm WATERS 994 SPEKTRUM (Version 1.61) auf einen PC übertragen und gespeichert. Zur Trennung von Neurosporin-, Lycopin- und  $\beta$ -Carotin-Isomeren ( $C_{30}$ -HPLC) wurde ein Zwei-Stufen-Gradient (Laufmittel) verwendet.

**Tabelle 2. 9:** Verwendete HPLC-Säulen und Laufmittelsysteme.

B: Summe der prozentualen Anteile von Methanol und Isopropanol im Laufmittel..

MTBE: Methyl-tertiär-Butyl-Ether .

System	Säule	Laufmittel / Temperatur	Flußrate [ml/min]	Verwendungszweck / Referenz
C <sub>18</sub>	Nucleosil 120-3, C <sub>18</sub> von Macherey & Nagel (Düren)	15 % B: Acetonitril : Methanol: Isopropanol = 85:10:5 (v/v/v), / 26°C.	0,8	Trennung von $\zeta$ -Carotin, Neurosporin, Lycopin/ Albrecht et al., 1995b
		25 % B: Acetonitril : Methanol : Isopropanol = 75:16,7:8,3 (v/v/v) / 26°C.	0,8	Trennung von Demethylspheroidin und 1-Hydroxy-3,4-Didehydrolycopin
C <sub>30</sub>	YMC 30, C <sub>30</sub> , 3 $\mu$ M von YMC Inc. Wilmington	50% MTBE: Methanol: Methyl-Tertiär-Butyl-Ether: Wasser = 46:50:4 (v/v/v) / 26°C.	0,9	Trennung von Neurosporin und Prolycopin / Breitenbach et al. 1999
		40 % MTBE: (0-28 Minuten), Methanol: Methyl-Tertiär-Butyl-Ether:Wasser = 56:40:4 (v/v/v), 70 % MTBE: (28-70 Minuten) Methanol: Methyl-Tertiär-Butyl-Ether:Wasser = 26:70:4 (v/v/v) / 26°C.	0,9	Trennung von $\zeta$ -Carotin, Neurosporin, Lycopin, Prolycopin
		15 % MTBE: Methanol: Methyl-Tertiär-Butyl-Ether: Wasser = 81:15:4 (v/v/v) / 11°, 45 °C.	0,9	Trennung von Phytoen-Isomeren
		40 % MTBE: (0-40 Minuten), Methanol: Methyl-Tertiär-Butyl-Ether :Wasser = 56:40:4 (v/v/v), 85 % MTBE: (40-80 Minuten), Methanol: Methyl-Tertiär-Butyl-Ether :Wasser = 11:85:4 (v/v/v) / 11°C.	0,9	Trennung von $\beta$ -Carotin-Isomeren
		25 % MTBE: Methanol: Methyl-Tertiär-Butyl-Ether: Wasser = 71:25:4 (v/v/v) / 26°C.	0,9	Trennung von $\zeta$ -Carotin-Isomeren, Phytoen-Isomeren

### 5.6.2. Eichung der C<sub>18</sub>- und C<sub>30</sub>-HPLC

Zur Eichung der HPLC wurden jeweils 1  $\mu$ g - 5 $\mu$ g des Carotinoidstandards über HPLC aufgetrennt. Die Elutionsbanden der Carotinoide im Chromatogramm wurden integriert und der Quotient aus Flächeneinheiten und aufgetragener Carotinoidmenge (Flächeneinheiten pro  $\mu$ g Carotinoid ( $F_c$ )) gebildet. Jede Messung wurde zweimal durchgeführt und der Mittelwert beider Quotienten gebildet.

**Tabelle 2. 10:** Eichung der HPLC-Systeme.

HPLC-System	Carotinoid	Flächeneinheiten pro µg Carotinoid (F <sub>C</sub> )	Wellenlänge [ nm ]
C <sub>18</sub> (15 % B)	Phytoen	101045	286
	ζ-Carotin	333343	425
	Neurosporin	384014	440
	Neurosporin	240093	475
	Lycopin	303918	440
	Lycopin	448742	475
	Spheroidin	567697	485
	1-Methoxy-3',4'-di-dehydrolycopin	485294	485
C <sub>18</sub> (25 % B)	1-Hydroxy-3',4'-di-dehydrolycopin	465326	485
	Demethylspheroidin	393610	485
C <sub>30</sub>	Phytoen	463746	285
	Phytoen	33641	300
	ζ-Carotin	192646	375
	ζ-Carotin	323446	400
	Neurosporin	235169	440
	Neurosporin	223330	465
	Lycopin	102404	465
	Lycopoin	98123	470
	Prolycopin	195677	440
	Prolycopin	124233	465

Die erhaltenen Quotienten (F<sub>C</sub>, Tabelle 2.10) gaben jeweils die einem µg entsprechende Flächeneinheiten des Carotinoid-Elutionsgipfels für die gewählte Wellenlänge an. Die Berechnung der Carotinoidmenge nach Integration eines HPLC-Elutionsgipfels ergab sich aus:

$$m [\mu\text{g}] = F / F_C .$$

m: Carotinoidmasse,  
 F: Gemessene Flächeneinheiten eines Elutionsgipfels,  
 F<sub>C</sub>: Flächeneinheiten pro µg Carotinoid.

### 5.6.3. Verwendete Carotinoidstandards

Die Identifikation der Desaturierungsprodukte der *Capsicum*-ZDS erfolgte über den Vergleich mit den spektralen Eigenschaften und den Retentionszeiten der Carotinoidstandards:

- NMR-charakterisierter Lycopinstandard (BASF, Ludwigshafen) mit all trans-, 13-, 5,13'-, 5-, 5,5'-, 5,9'- und 9-cis-Lycopin,
- all trans-ζ-Carotin aus *Phycomyces* S442,
- all trans-Neurosporin aus *E. coli* JM101/pACCRT-EBI<sub>R.c.</sub>,
- Prolycopin aus *Scendesmus obliquus* C-6D,
- 9-cis-, 15-cis- und all trans-β-Carotin. β-Carotin-Extrakt aus der Grünalge *Dunaliella* mit zum Teil charakterisierten Isomeren.

Zur Identifikation einzelner Desaturierungsprodukte der *Capsicum*-ZDS wurden diese mit einem der Carotinoidstandards vermischt und über HPLC gemeinsam getrennt (co-chromatographiert). Der Elutionsgipfel des Carotinoids dessen Retentionszeit mit dem

Carotinoidstandard übereinstimmte, wurde im aufgezeichneten Chromatogramm erhöht.

## **6. Enzymatische Charakterisierung der $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum* und *Synechocystis*, sowie der Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* und *Gentiana* über *In vitro*-Enzymreaktionen**

### **6.1. French Pressure Cell Press-Zellaufschluß**

Die gefrorene Bakteriensuspension wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und mittels einer auf 4°C vorgekühlten French Pressure Cell Press (SLM AMINCO, Urbana, Illinois USA) zweimal mit einem Druck von 95 MPa für die  $\zeta$ -Carotindesaturasen aus *Capsicum*, *Synechocystis* und mit 30 MPa für die Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* sowie *Gentiana* aufgebrochen. Das Zellhomogenat wurde nach Zugabe von DNase (10µg/ml) für 20 Minuten auf Eis inkubiert und nachfolgend für 20 Minuten bei 40000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und für die weitere Reinigung der *Capsicum*-ZDS oder direkt für *in vitro*-Enzymreaktionen verwendet.

Zur Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften der Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Gentiana lutea* und der  $\zeta$ -Carotindesaturase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde der Zellüberstand mit den heterolog exprimierten Desaturasen für *in vitro*-Enzymreaktionen verwendet.

### **6.2. Tris- und Kaliumphosphat-Puffer**

Für vergleichende *in vitro*-Aktivitätsbestimmungen zwischen Tris- und Kaliumphosphatpuffer wurde 200mM Tris-Puffer pH 7,8 verwendet, der aus einer 1 M Stammlösung mit bidest. Wasser verdünnt wurde.

Der verwendete Kaliumphosphatpuffer wurde aus zwei 0,4 M sterilen Stammlösungen von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  gemischt (Gueffroy, 1990) und der gewünschte pH-Wert von 5,8 bis 7,8 über die Variation der Volumenanteile beider Stammlösungen und Kontrolle über ein pH-Meter eingestellt. Nachfolgend wurde der Puffer auf 200 mM Konzentration mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

### 6.3. pH-Optimum der Aktivität der *Capsicum*-ZDS

Eine *E. coli* JM101/pQE30zds-Kultur wurde in 11 gleiche Volumen aufgeteilt, zentrifugiert (10 min, 4000 g), die sedimentierten Bakterien in einem dreißigstel des Ausgangsvolumens in Kaliumphosphat-Puffer der pH-Werte von pH 5,8 bis 7,8 in pH-Schritten von 0,2 resuspendiert. Nach French Pressure Cell Press-Aufschluß und Zentrifugation (20 min, 40000g) wurden die erhaltenen Zellüberstände für *in vitro*-Reaktionen zur Bestimmung der ZDS-Aktivität verwendet.

### 6.4. Verwendete Detergenzien

Folgende Detergenzien wurden zusammen mit Zellüberständen von JM101/pQE30zds für *in vitro*-Enzymtests der ZDS eingesetzt und auf eine steigernde Wirkung der Desaturaseaktivität gegenüber einer Detergenzien-freien Kontrolle hin untersucht:

- Deriphat 160 (Henkel KGaA, Düsseldorf),
- Chaps, Brij 58, Tween 60, Tween 20, Mega-7, Tergitol, Deoxycholinsäure, Lubrol PX (Sigma, Taufkirchen, Deutschland),
- Zwittergent Detergent (Calbiochem, La Jolla, CA),
- Brij 35 (Serva, Heidelberg),
- Genapol X-100 (Hoechst AG).

Es wurden jeweils eine 1 %ige (w/v) Stammlösung in 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8) angesetzt und eine 0,1 %ige (v/v) *in vitro*-Endkonzentration verwendet. Zur Messung der ZDS-Aktivität in Abhängigkeit der Lubrol PX-Konzentration wurde 0,01 bis 0,4 % Lubrol PX den *in vitro*-Aktivitätstests (500 µl Zellüberstand (2 mg Gesamtproteingehalt) aus *E. coli* JM101/pQE30zds, 5 µg ζ-Carotin, 180 rpm, 28°C, 16 Stunden Reaktionsdauer, 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5) der ZDS zugesetzt.

### 6.5. Herstellung und Verwendung der Phosphatidylcholin-Emulsion

0,2 g Phosphatidylcholin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) aus Soja wurde in 2 ml Chloroform gelöst, mit 2 ml Puffer (Kaliumphosphatpuffer pH 7,8, 200 mM) gevortext und zur Phasentrennung zentrifugiert (700 g). Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang wiederholt. Die Chloroformphase wurde abgezogen und in einem 10 ml-Glasgefäß, unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Zum Lösen wurden 2 ml Kaliumphosphatpuffer (200 mg/ml, pH 7,8, 200 mM) zugegeben, der Ansatz geschüttelt (15 Minuten) und in einem eisgekühlten Ultraschallbad für 1 Minute beschallt. Routinemäßig wurden 30 µl dieser Emulsion den *in vitro*-Enzymtests der ζ-Carotindesaturasen und 5 µl den *in vitro*-Enzymtests der Phytoendesaturasen zugesetzt.

### 6.6. Verwendung des Antioxidants Butyl-Hydroxy-Toluol (BHT)

BHT (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde in einer Enkonzentration von 0,02 % für *in vitro*-Enzymtests eingesetzt. Dazu wurde eine 5 %ige Lösung (w/v) in Methanol angesetzt und 4 µl dieser Stammlösung unter Schütteln in den Reaktionsansatz pipettiert. Bei Hemmstoffuntersuchungen wurde kein BHT den *in vitro*-Enzymtests zugesetzt.

### 6.7. *In vitro*-Enzymreaktion (Aktivitätstest) zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der ζ-Carotin-Desaturasen aus *Capsicum* und *Synechocystis*, sowie der Phytoendesaturasen aus *Gentiana* und *Synechococcus*

Als Reaktionsgefäße wurden 15 ml Glaszentrifugengläser mit Skalierung und zulaufender Spitze verwendet, die mit Silikonstopfen luftdicht verschlossen wurden. Jeder Reaktionsansatz der ζ-Carotin-Desaturasen aus *Capsicum* oder *Synechocystis* enthielt in 1 ml Volumen: 3 mg Phosphatidylcholin in Form einer Emulsion (100 mg/ml, in 200 mM Kaliumphosphatpuffer), 5 bis 10 µg Carotinoid, 0,02 % BHT (4 µl von 5 % (w/v) BHT in Methanol), 10 µM Decyl-Plastochinon (Sigma, 10 µl 1 mM Stammlösung in Methanol). Für die Untersuchung der Aktivität der ZDS aus *Capsicum* wurden zwischen 12 und 65 µg gereinigter ζ-Carotin-Desaturase oder 500 bis 900 µl *E. coli*-Zellüberstand JM101/pQE30zds zu dem Reaktionsansatz zugesetzt. Für die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes von Neurosporin sowie zur Untersuchung der Substratspezifität wurde die mit der ζ-Carotin-Desaturase aus *Capsicum* angereicherte Ammoniumsulfat-gefällte und resuspendierte Fraktion verwendet (500 µl pro Enzymtest). Bei der ζ-Carotin-Desaturase aus *Synechocystis* wurde 500 bis 900 µl des Zellüberstandes von JM101/pTrc0940 den *in vitro*-Enzymreaktionen zugegeben.

Jeder Reaktionsansatz der Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* oder *Gentiana* enthielt in 1 ml Volumen: 0,5 mg Phosphatidylcholin, 5 µg Phytoen, 10 µM Decyl-Plastochinon und 500 bis 900 µl Zellüberstand aus *E. coli* JM101/pPDSdel35 (*Synechococcus*-CrtP) oder pUC8pds<sub>GI</sub> (*Gentiana*-PDS) in 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei einer Temperatur von 28°C unter starkem Schütteln bei 200 rpm im Dunkeln für eine Dauer von bis zu 16 Stunden. Bei kinetischen Untersuchungen der Desaturasen betrug die Inkubationsdauer bis zu 6 Stunden innerhalb des linearen Bereiches der Enzymaktivität.

Zur Erzielung anaerober Reaktionsbedingungen wurde *in vitro* eine Sauerstoff-verbrauchende Reaktion (Schneider et al., 1997) zusammen mit der Desaturierungsreaktion durchgeführt. Dazu enthielt jeder Reaktionsansatz 2 mM Glucose, 20000 Einheiten Katalase (aus

Rinderleber, Boehringer Mannheim) und 20 Einheiten Glucoseoxidase (*Aspergillus niger*). Vor dem luftdichten Verschließen der Reaktionsgefäße, wurden diese mit Stickstoff überschichtet. Zum Vergleich der Auswirkung aerober und anaerober Reaktionsbedingungen, wurde in den aeroben Reaktionsansätzen keine Glucoseoxidase zugegeben.

### **6.8. Extraktion der in den *in vitro*-Enzymreaktionen gebildeten Carotinoide**

Die Produkte der *in vitro*-Enzymreaktionen der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen wurden durch die Zugabe 4 ml Aceton, 4 ml 10 % Diethylether in Petroleumbenzin (Sdp. 40-60°C) und Vortexen extrahiert. Die *in vitro*-Reaktionsprodukte der Phytoendesaturasen wurden durch Zugabe von 3 ml Methanol, 5 ml 10 % Diethylether in Petroleumbenzin (Sdp. 40°-60°C) und Vortexen mit nachfolgender Zugabe von 2 ml Wasser extrahiert. Unter einem leichten Stickstoffstrom als Schutzgas wurden die Extrakte bis zur Trockene eingengt, luftdicht verschlossen und bis zur Quantifizierung der Reaktionsprodukte im Dunkeln bei -20°C gelagert. Die Identifikation und Quantifizierung der Reaktionsprodukte der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen erfolgte über HPLC, die Quantifizierung der Produkte der Phytoendesaturasen erfolgte photometrisch bei 425 nm.

## **7. Reinigung der in *E. coli* heterolog exprimierten $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum***

### **7.1. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung**

Die Proteine des nach Zellaufschluß und Zentrifugation gewonnenen Überstands aus *E. coli* JM101/pQE30zds wurden zur Anreicherung der ZDS über Ammoniumsulfatfällung (Harris & Angal, 1989) mit 40 % (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Zentrifugation (20 Minuten, 40000 g) präzipitiert. Das erhaltene Sediment wurde in 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8) mit 100 mM NaCl im Verhältnis 1:3 zum Ausgangsvolumen resuspendiert.

### **7.2. Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie**

Die ZDS-angereicherte Proteinfraction der Ammoniumsulfatfällung wurde im Volumen-Verhältnis 20:1 mit TALON (Sephacel mit chelatierten und gebundenen Kobaltionen  $\text{Co}^{2+}$  zur selektiven Bindung von rekombinanten Proteinen mit 6 N-terminalen Histidinen) von CLONTECH (Palo Alto, USA) versetzt und für eine Stunde auf Eis unter Schwenken inkubiert. Die Mischung wurde für zwei Minuten bei 700 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und verworfen. Das TALON wurde zweimal in 200 mM Kaliumphosphatpuffer mit 25 mM Imidazol resuspendiert, für 5 Minuten unter Schwenken inkubiert und zentrifugiert

(700 g, 2 Minuten). Die Sepharose mit der gebundenen ZDS wurde anschließend in eine leere Säule mit 4 ml Volumen gefüllt und die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase mit 200 mM Imidazol in 200 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) eluiert.

### **7.3. Entsalzung der Fraktionen der Affinitätschromatographie über Sephadex G-25M**

Die eluierte ZDS wurde auf eine mit 25 ml 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8) equilibrierte PD-10 Sephadex G-25M-Säule (Probenauftragsvolumen 2,5 ml) von PHARMACIA (Uppsala, Schweden) aufgetragen und in einem Elutionsvolumen von 3,5 ml in 200 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH7,8) umgepuffert.

### **7.4. Proteinfällung mit Trichloressigsäure (Serrano, 1988)**

Stark verdünnte Proteinfractionen wurden vor der Trennung über eine denaturierende SDS-Acrylamidgelelektrophorese durch Fällung mit Trichloressigsäure konzentriert. Dazu wurden der Proteinfraction 72 %ige Trichloressigsäure (w/v, in Wasser) in einer Endkonzentration von 7,2 % zugesetzt und nachfolgend diese für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 14000 rpm mittels einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Modell 5415 C) zentrifugiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit reinem Ethanol gewaschen, nachfolgend getrocknet, in 20  $\mu$ l SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 10 Minuten siedendem Wasser inkubiert.

## **8. Analyse der heterolog exprimierten *Capsicum*-ZDS**

### **8.1. Gelelektrophorese**

#### **8.1.1. Denaturierende SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)**

Die denaturierende SDS-Gelelektrophoresen nach Laemmli wurde unter Verwendung von 10 %igen Polyacrylamidtrenngelen mit 1,5 M Harnstoff durchgeführt. Als Molmassenstandard wurde ein Proteingemisch von 6 oder 7 verschiedenen Proteinen mit den molaren Massen von 205, 116, 97,4, 66, 45, 29 kd (SDS-6H, Sigma) oder von 66, 45, 36, 29, 24, 20, 17 kd (SDS-7H) verwendet.

#### **8.1.2. Blaue native Gelelektrophorese der gereinigten ZDS nach Schagger und von Jagow (1991)**

Die Fraktion mit der gereinigten ZDS wurde über CENTRICON-10-Konzentratoren von AMICON (Ausschlußvolumen MW 10000) und einer Festwinkelzentrifuge (Bachofer,

Reutlingen) bei 4°C auf 1/25 des Ausgangsvolumens von 3,5 ml konzentriert und die Proteinkonzentration bestimmt. 50 bis 200 µg ZDS wurden mit einer Mischung aus 20 µl Kathodenpuffer A (50 mM Tricine, 15 mM Bistris, 0,02 % Serva Blue G, pH 7,0), 12,5 µl Probenvorbereitungspuffer (1,5 M Aminohexansäure, 100mM Bistris/HCl (pH 7,0)) und 12,5 µl Probenfärbepuffer (5 % Serva Blue G in 500 mM Aminohexansäure) versetzt und auf ein Polyacrylamidgel mit einem Trenngel-Polyacrylamidgradienten (6-13 %) zur Trennung von Proteinkomplexen von ca. 10<sup>5</sup> Da bis 10<sup>6</sup> Da aufgetragen. Die Spannung betrug 100 V bis die Lauffront das Trenngel erreichte, anschließend wurde die Spannung auf 500 V erhöht und nach 1/3 der Laufstrecke der Kathodenpuffer A durch einen Serva Blue G-freien Kathodenpuffer ersetzt. Als Anodenpuffer wurde 50 mM Bistris / HCl pH 7,0 verwendet. Abschließend wurde das Gel Coomassie-gefärbt. Als Molmassenstandard wurden Rinderserumalbumin (Sigma, 66 kd Monomer, 132 kd Dimer) sowie Urease (Sigma, 272 kd Trimer, 545 kd Hexamer) verwendet. Die native Gelelektrophorese wurde bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt.

### **8.1.3. Coomassie-Färbung**

Zur Färbung der Polyacrylamidgele, der denaturierenden SDS- und der blauen nativen Gelelektrophorese, wurde eine methanolische Lösung von Coomassie Blue R250 (Serva; 2,5 % (w/v) Coomassie Blue, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in H<sub>2</sub>O) verwendet. Die Färbung der Gele und Entfärbung des Gelhintergrundes erfolgten nach Garfin (1990).

### **8.1.4. Dokumentation und Auswertung der Polyacrylamidgele**

Zur Dokumentation wurden Polyacrylamidgele über Flachbett-Scanner (Mustek 600 II N) gescannt und der prozentuale Anteil des Zielproteins gemessen am Gesamtproteingehalt mittels einer Densitometrie-Software (Gelmess) berechnet. Der Gesamtproteingehalt der einzelnen Protein-Fractionen wurde über Proteinbestimmung den BIO-RAD Microassay ermittelt.

## **8.2. Ermittlung des Proteingehalts**

Die Proteinbestimmung erfolgte über den Protein Microassay von BIO-RAD (München) mit BSA von 1 bis 25 µg/ml als Eichkurve. Jeder Wert wurde dreifach bestimmt.

## **8.3. Untersuchung der nativen ZDS auf Dimerisierung**

### **8.3.1. Two-Hybrid-System**

Zur Untersuchung, ob die native ζ-Carotin-Desaturase als Dimer vorliegt, wurde das Two-Hybrid-System basierend auf den GAL4-Transkriptionsfaktor verwendet, welches unter *in*



*vivo*-Bedingungen Protein-Protein-Wechselwirkungen nachweist. Für das Two-Hybrid-System wurden die zwei Shuttle-Vektoren (für Hefe und *E. coli*) pAS2-1 und pACT2 des MATCHMAKER Two-Hybrid System 2 von CLONTECH verwendet. Die cDNA-Sequenz der ZDS wurde jeweils in die multiple Klonierungsstelle der beiden Vektoren kloniert. In den Hefestamm Y190 cotransformiert, führen die Plasmide pAS2zds und pACT2zds zur Expression der ZDS in Form zweier Fusionsproteine bestehend aus der ZDS und der DNA-Bindedomäne, bzw. der DNA-Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4. Bei Wechselwirkung beider Fusionsproteine über die ZDS-Anteile, gelangen beide Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4 in räumliche Nähe zueinander. Dadurch kommt es in den Hefezellen zur Bildung des funktionellen Transkriptionsfaktors, der zur Expression der  $\beta$ -Galaktosidase führt. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde über einen Farbttest (colony lift filter test) colorimetrisch nachgewiesen.

### 8.3.1.1. Transformationen von *Saccharomyces cerevisiae* Y190

Die Transformation des Hefe-Stammes Y190 erfolgte nach Schiestl und Gietz (1989) und Hill et al. (1991). Die in Tabelle 2.11 aufgelisteten Kotransformationen zweier Plasmide und Einzeltransformationen wurden zur Durchführung des Two-Hybrid-Systems durchgeführt.

**Tabelle 2. 11:** Co-Transformationen in *Saccharomyces cerevisiae* Y190 zur Durchführung des Two-Hybrid-Tests. 3-AT: 3-Aminotriazol ist ein kompetitiver Hemmstoff des Hefe HIS3-Proteins und unterdrückt die geringe Basis-Expression des Proteins.

Zweck	pAS2 basierendes Plasmid	pACT2 basierendes Plasmid	Minimalmedium ohne
Positivkontrollen	pSE1112	pSE1111	Trp, Leu
	pA238L	int9fd	Trp, Leu
Negativkontrollen	pA238	pSE1111	Trp, Leu
	pSE1112	int9fd	Trp, Leu
Test auf unspezifische Wechselwirkung mit einem Fremdprotein	pAS2zds	pSE1111	Trp, Leu
Test auf Autoaktivierung	pAS2zds	-----	Trp
Test auf Autoaktivierung	-----	pACT2zds	Leu
Test auf ZDS-ZDS Wechselwirkung	pAS2zds	pACT2zds	Trp, Leu und Trp, Leu, His, +10mM 3-AT

### 8.3.1.2. Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkung über den Nachweis von $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

Zum Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkung wurden die Hefezellen auf Petrischalen mit Minimalmedium (YNB-Agar, GibcoBRL (Paisley, UK); 2 % Glucose, Aminosäuren: Ile,

Val, Ade, Arg, Lys, Met, Phe, Thr, Tyr, Ura und Leu, Trp, His je nach Selektionsmarker (Tabelle 2.11)) ausplattiert und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Einzelkolonien wurden abgeimpft, auf einer Petrischale mit Minimalmedium (ohne die den Selektionsmarkern entsprechenden Aminosäuren) ausgestrichen und für weitere 2 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der  $\beta$ -Galaktosidase-Filter Test durchgeführt (beschrieben in "Colony-Lift Filter Assay, MATCHMAKER Two-Hybrid-System 2 (PT1030-1)" (Katalog #K1604-1, Seiten 40-41). Eine Protein-Protein-Wechselwirkung beider exprimierter Fusionsproteine zeigt sich dabei als Blaufärbung der durch Einfrieren aufgebrochenen Hefezellen. Für jeden Hefetransformanten wurde eine Petrischale mit Filterpapier (Whatman) ausgelegt und mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Testlösung bestehend aus 3 ml Z-Puffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  16,1g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5,5g/l, KCl 0,75g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,246g/l, pH 7,0 und autoklaviert) mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,27ml/100ml Z-Puffer) und X-Gal (1,67ml/100ml Z-Puffer, 20mg/ml in Dimethylformamid) befeuchtet. Die Hefekolonien wurden auf verstärkte Nitrocellulose-Filter (Hybond-C-Super, Amersham (Buckinghamshire, UK)) übertragen und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff für 30 Sekunden eingefroren. Die Nitrocellulosefilter mit den Hefezellen wurden in die mit der Färbelösung vorbereiteten Petrischalen gelegt, für maximal 8 Stunden bei 30°C inkubiert und fotografisch dokumentiert.

### **8.3.2. Gelfiltration (Ausschluß-Chromatographie) der nativen $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum***

Die gereinigte ZDS wurde durch Präzipitierung mit Ammoniumsulfat (60 % (w/v)) und Aufnahme der sedimentierten ZDS in 0,2 ml 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 konzentriert. Die Gelfiltration erfolgte über das Biologic System HR+ von BIO RAD mit einer Ausschluß-Chromatographie-Säule (Bio-Sil SEC 250-5) 300 x 7,8 für Proteine mit einer Molmasse von 10 bis 300 kd. Zur Kalibrierung der Säule wurden folgende Molmassenstandards verwendet: Rinder Thyroglobin (670 kd), Rinder  $\gamma$ -Globulin (158 kd), Hühner-Ovalbumin (44 kd), Pferde-Myoglobin (17 kd) und Vitamin B12 (1,35 kd) von BIO-RAD.

## **9. Kinetische Untersuchungen**

### **9.1. $K_m$ -Wert-Bestimmung von $\zeta$ -Carotin und Neurosporin**

Zur Erfassung des linearen Bereiches der ZDS-Aktivität, für den die Michaelis-Menten-Kinetik gilt, wurde als Vortest die Bildung der ZDS-Desaturierungsprodukte in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

Für die  $K_m$ -Wert Bestimmung von  $\zeta$ -Carotin wurde dieses in einer Konzentration von 1 bis 50  $\mu\text{M}$ , von Neurosporin von 2 bis 30  $\mu\text{M}$  *in vitro* eingesetzt. Die spezifischen Enzymaktivitäten wurden nach Lineweaver-Burk doppelt reziprok gegen die Substratkonzentration aufgetragen und die  $K_m$ -Werte sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeiten über lineare Regression berechnet.

## 9.2. Kofaktoruntersuchungen

Zur Kofaktoruntersuchung der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum annuum*, *Synechocystis* und der Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* und *Gentiana lutea* wurden verschiedene oxidierte Dinukleotide und oxidierte Chinone verwendet. Die lipophilen Chinone Decyl-Plastochinon, Decyl-Ubichinon und Vitamin K1 wurden vor Zugabe zu den *in vitro*-Enzymtests in 10  $\mu\text{l}$  Methanol gelöst. Die oxidierten Dinukleotide NAD, NADP, FAD wurden in 50  $\mu\text{l}$  200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8) gelöst. Alle verwendeten Kofaktoren wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Für die Kofaktoruntersuchung wurden die in Tabelle 2.12 angegebenen Bedingungen gewählt.

**Tabelle 2.12:** *In vitro*-Reaktionsbedingungen zur Kofaktoruntersuchung. Die Desaturasen wurden in gereinigter Form (*Capsicum annuum*) oder als *E. coli* Zellüberstand mit der heterolog exprimierten Desaturase den *in vitro*-Reaktionsansätzen zugesetzt. Es wurden jeweils 3 Meßreihen durchgeführt.

Desaturase <i>in vitro</i> -Bedingung	ZDS <i>Capsicum annuum</i> (Abb.3-22,23)	CrtQb <i>Synechocystis</i> (Abb.3-24)	CrtP <i>Synechococcus</i> (Abb. 3-25)	PDS <i>Gentiana lutea</i> (Abb. 3-26)
Proteinmenge	30 $\mu\text{g}$ , gereinigte ZDS	2,84 mg, Zellüberstand JM101/pTRC0940	5,9 mg, Zellüberstand JM101/ pPDSdel35	3,2 mg, Zellüberstand JM101/pUC8pds <sub>GI</sub>
Kofaktorkonzentration [mM]	1	0,01	0,1	0,1
Reaktionsdauer [h]	16 (Abb.3-22) , 3 (Abb.3-23)	15	2,5	2,0
Phosphatidylcholinkonz. [mg/ml]	3	3	0,5	0,5
Substrat	$\zeta$ -Carotin	$\zeta$ -Carotin	Phytoen	Phytoen
Substratmenge [ $\mu\text{g}$ ]	10	10	5	5
Substratkonz. [ $\mu\text{M}$ ]	18,6	18,6	9	9
pH-Wert	7,8	7,8	7,2	7,2
Aerob / anaerob	aerob	aerob	anaerob	anaerob
Quantifizierung der Reaktionsprodukte	C <sub>18</sub> -HPLC (15 % B)	C <sub>18</sub> -HPLC (15 % B)	photometrisch bei 425 nm	photometrisch bei 425 nm

## 9.3. $K_m$ -Wert-Bestimmung von Decyl-Plastochinon

Zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für Decyl-Plastochinon wurden Decylplastochinon in steigenden Konzentrationen von 0 bis 30  $\mu\text{M}$  in die Reaktionsansätze als Kofaktor für die

*Capsicum*-ZDS eingesetzt. Die Reaktionen wurden nach 4 Stunden beendet und die gemessene spezifische Aktivität doppelt reziprok gegen die Konzentration des Kofaktors aufgetragen.

## 9.4. Hemmstoffuntersuchungen

### 9.4.1. Verwendete Desaturase-Hemmstoffe

Die in Abbildung 2-3 dargestellten Hemmstoffe wurden für hemmkinetische Untersuchungen bei der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* und den Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 und *Gentiana lutea* verwendet:

- **J852** (4-(3-methyl-propoxy)-2-isopropylamino-6-methyl-pyrimidine; Ridley, 1982), ZDS-Hemmstoff,
- **LS80707** (ethyl-cis-5-methyl-5-ethyl-2-phenyl-5,6-dihydropyran-4-one-3-carboxylate; Sandmann et al., 1985), ZDS-Hemmstoff,
- **Norflurazon** (SAN 9879; 4-chloro-5-methylamino-2-(3-trifluoromethylphenyl)-pyridazin-3(2H)one; Pardo et al., 1980), PDS-Hemmstoff.

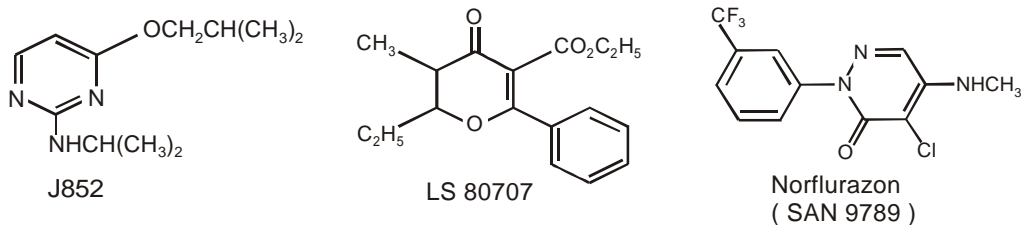


Abbildung 2-3: Strukturformeln der verwendeten Herbizide (Sandmann & Böger, 1989)

Die Hemmstoffe wurden aus methanolischen Stammlösungen (0,01 M) mit Methanol verdünnt, wobei das zu den *in vitro*-Enzymtests zugegebene Volumen von 15  $\mu$ l (1,5 %) nicht überschritten wurde.

### 9.4.2. Hemmkinetische Untersuchungen, I<sub>50</sub>-Bestimmung

Zur Untersuchung der Wirkung von J852 auf die Bindung des Substrates und des Kofaktors der *Capsicum*-ZDS, wurde die enzymatische Aktivität der ZDS bei ansteigenden Konzentrationen des Substrates (1 bis 30  $\mu$ M), bzw. des Kofaktors (0 bis 10  $\mu$ M) gemessen. Zu jeder Meßreihe erfolgte die Zugabe von 0 bis 10  $\mu$ M des Hemmstoffes J852. Die gemessenen Enzymaktivitäten wurden nach Lineweaver-Burk doppelt reziprok aufgetragen. Aus der Lage des Schnittpunkts aller Geraden wurde der Hemmtyp abgeleitet.

In gleicher Weise wurde der Hemmtyp von Norflurazon auf die Kofaktorbindung bei den Phytoendesaturasen-Desaturasen aus *Gentiana lutea* und *Synechococcus* sp. PCC 7942 bestimmt. Die Hemmstoffkonzentration lag bei 0, bzw. 0,06  $\mu$ M und die Kofaktorkonzentration zwischen 0,2 und 10  $\mu$ M.

Zur Bestimmung der I<sub>50</sub>-Werte der Hemmstoffe J852, LS80707 und Norflurazon für die  $\zeta$ -

Carotin-Desaturase aus *Capsicum* und der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* (J852, LS80707) wurde die Produktmengen der *in vitro*-Enzymreaktionen in Abhängigkeit der Hemmstoffkonzentration gemessen. Die Meßwerte wurden einfach reziprok gegen die Hemmstoffkonzentration aufgetragen (**Dixon-Plot**). Der I<sub>50</sub>-Wert ergab sich aus dem Betrag des x-Wertes am Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse.

## 10. Untersuchungen der Substratspezifität der *Capsicum*-ZDS

Drei ζ-Carotinfractionen mit unterschiedlichen Anteilen an Isomeren wurden bei *in vitro*-Enzymtests unter Verwendung der pH-Werte von 5,8 und 7,2 als Substrate eingesetzt, die Reaktionsprodukte über C<sub>30</sub>-HPLC (Laufmittel 40 %, 70 % MTBE) aufgetrennt und quantifiziert.

Folgende Substratcarotinoide (1-5 µg) wurden in den *in vitro*-Aktivitätstest zur Untersuchung der Substratspezifität verwendet: ζ-Carotin, Neurosporin, Mono-hydroxy-ζ-Carotin, Dihydroxy-ζ-Carotin, Mono-hydroxy-Neurosporin, Dihydroxy-Neurosporin, Phytoen, Demethylspheroidin, Spheroidin und β-Zeacarotin. Die Reaktionsprodukte wurden über C<sub>18</sub>-HPLC quantifiziert und der Umsatz der Reaktion berechnet:

$$\text{Umsatz [\%]} = (\text{Produktmenge} / (\text{Summe Substratmenge und Produktmenge})) * 100 .$$

## 11. Verwendete Software

- **Raytest Ramona-MCS (Ramona):** Radio-Chromato-Graphic-System, Version 11.2., 27.2.1990, (C) nuclear interface GmbH, Goldstr. 64, D-4400 Münster. Darstellung und Auswertung von HPLC-Elutionsprofilen.
- **WATERS 994 Spektrum:** Version 1.7., 4.8.1997, Universität Konstanz, Abteilung Elektronik, H. Fink. Übertragung und Speicherung über Diode Array Detektor aufgezeichneter Spektren auf einen Personal-Computer.
- **Gelmess:** Version 1.2., 8.1.1996, Universität Konstanz, Abteilung Elektronik, H. Fink. Densitometrie-Software zum Ausmessen der prozentualen Verteilung von Proteinbanden eines SDS-Polyacrylamidgels.
- **Corel Draw! [TM]:** Version 5.00.G1, (c) 1988-1995 Corel Corporation. Editierung der HPLC-Elutionsprofile und Spektren, Gestaltung der Abbildungen.
- **Paint Shop Pro 5.00:** (c) 1991-1998 Jasc Software, Inc. Scannen von SDS-Polyacrylamidgelen über einen Flachbettscanner (Mustek 600 II N).
- **Winword 2000:** Textverarbeitung.

- **Exel 2000:** Tabellenkalkulation der Meßwerte.
- **Curveexpert V.1.3.:** Lineare Regression und Polynomregression.
- **DNASIS, Hitachi Software Engineering America, Ltd.:** Das Programm wurde zum Editieren von DNA-Sequenzen verwendet.
- **ClustalX 1.8** (Thompson et al., 1997) (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/>): Zur Berechnung von phylogenetischen Bäumen, sowie zur Durchführung von Aminosäuresequenzvergleichen (Alignments).
- **Treeview 1.6.5** (<http://taxonomy.zoology.ac.uk/rod/rod.html>): Das Programm diente der grafischen Darstellung der über das Programm Clustal X berechneten phylogenetischen Bäume.
- **ChloroP v1.1, Chloroplast Transit Peptide Prediction** (Emanuelson et al., 1999), ([www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/)): Das Programm diente der Vorhersage der Aminosäuren zwischen denen die Abspaltung der Transitsequenzen der pflanzlichen Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen erfolgt.
- **Boxshade v3.33 C** (Kay Hofmann, Bioinformatics Group, ISREC, Lausanne, Schweiz und Michael D. Baron, Institute for Animal Health, Pirbright, England): Die durch das Programm ClustalX angeordneten Aminosäuren bei Durchführung eines Aminosäure-Alignments mehrerer Aminosäuresequenzen wurden entsprechend dem Grad ihrer Übereinstimmung durch das Programm Boxshade farblich hervorgehoben.
- **Blast (Basic local alignment search tool; Altschul et al., 1990)** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): Datenbank-gestütztes Programm zur Suche von zu einer Aminosäure- oder Nucleotidsequenz ähnlichen Peptiden oder Genen. Das Programm wurde zum Vergleich der Aminosäuresequenz der  $\zeta$ -Carotindesaturase aus *Capsicum annuum* mit der Aminosäuresequenz anderer  $\zeta$ -Carotin- und Phytoendesaturasen verwendet.

### III. ERGEBNISSE

#### 1. Optimierung der heterologen Expression nativer ZDS aus *Capsicum annuum* in *E. coli*

Ziel war es, durch die Wahl geeigneter Wachstumsbedingungen von JM101/pQE30zds, eine Anreicherung der ZDS in nativer Form im Zellüberstand nach mechanischem Aufschluß über French Press und Zentrifugation zu erreichen. Zur Ermittlung der optimalen Anzuchtsbedingungen, wurden 6 Kulturen JM101/pQE30zds in LB-Medium unter Zusatz von 0,5 M Sorbitol und 3 mM Betain, sowie eine Kultur in LB-Medium angelegt. Nachfolgend wurden die Kulturen bei 37°C bis zur Induktion der ZDS-Expression geschüttelt. Folgende Parameter wurden variiert: Induktionszeitpunkt, Induktionstemperatur, Kulturmedium und IPTG-Konzentration (Tabelle 3.1).

Die Abbildung 3-1 (A) zeigt die Auftrennung der in den Zellhomogenaten und Zellüberständen von JM101/pQE30zds (Spuren 3 bis 9) und JM101/pQE30 (Spur 2) enthaltenen Proteine über denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die durch JM101/pQE30zds gebildete ZDS erscheint gegenüber JM101/pQE30 als zusätzliches Polypeptid mit einer apparenten Molmasse von 60 kd. Die über densitometrische Bestimmung ermittelten prozentualen Anteile der  $\zeta$ -Carotin Desaturase am Gesamtproteingehalt sind in Abbildung (B) unterhalb der Ausschnittsvergrößerungen der SDS-Gele aus Abbildung (A) angegeben. In den Zellhomogenaten zeigte der relative Gehalt an ZDS nur eine geringe Abhängigkeit von den gewählten Anzuchtsbedingungen. Er lag zwischen 6,36 % (Spur 4) und 8,65 % (Spur 8). Der relative Gehalt an ZDS in den nach Zellaufschluß und Zentrifugation erhaltenen Zellüberständen von JM101/pQE30zds zeigte dagegen eine deutliche Abhängigkeit von den gewählten Anzuchtsbedingungen. Der höchste relative Gehalt an ZDS wurde mit 5,15 % (Spur 6 der Teilabbildung B) wurde unter folgenden Bedingungen erreicht:

- Induktion der Expression der ZDS mit einer geringen IPTG-Konzentration (50 $\mu$ M),
- Induktion der Expression der ZDS in einem frühen Wachstumsstadium der Kultur ( $OD_{600nm} = 0,1$ ),
- Inkubationstemperatur von 25°C nach erfolgter Induktion,
- Zusatz von Sorbitol (0,5 M) und Betain (3 mM) im LB-Medium.

Die Induktion der Expression der ZDS zu einem zunehmend späteren Wachstumsstadium der Kulturen mit höheren Zelldichten (Spuren 7 bis 9), führte zu einer Abnahme des relativen Gehaltes an ZDS im Zellüberstand von 4,93 % auf 3,01 %.

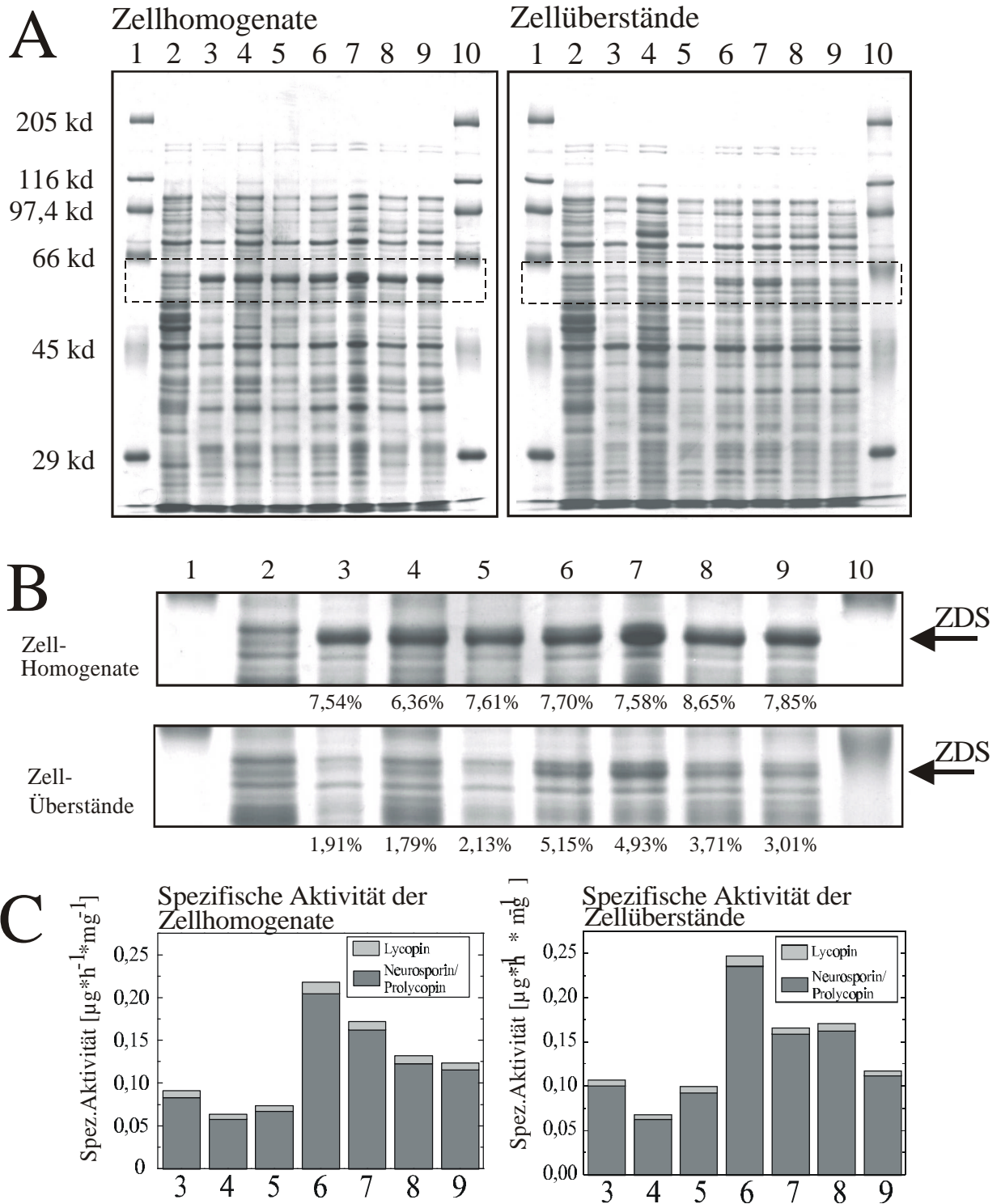


Abbildung 3-1: Heterologe Expression der *Capsicum*-ZDS in *E. coli* unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.

Spuren 3-9: JM101/pQE30zds.

A: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Spur 1 und 10: Molmassenstandard,

Spur 2: *E. coli* JM101/pQE30,

Spur 3: Induktion mit 1mM IPTG,

Spur 4: Induktion bei 37°C,

Spur 5: LB-Medium ohne Sorbitol/Betain,

Spur 6: Induktion bei  $OD_{600\text{nm}}=0,10$ ,

Spur 7: Induktion bei  $OD_{600\text{nm}}=0,28$ ,

Spur 8: Induktion bei  $OD_{600\text{nm}}=0,49$ ,

Spur 9: Induktion bei  $OD_{600\text{nm}}=0,5$ ,

B: Ausschnittsvergrößerung aus A, angegeben ist der Anteil der ZDS am Gesamtproteingehalt in %.

C: Spezifische Enzymaktivitäten in den verschiedenen Zellhomogenaten und Zellüberständen angegeben in  $\mu\text{g}$  Carotinoid pro Stunde und  $\text{mg}$  Gesamtprotein.



Ein noch geringerer relativer Gehalt an ZDS ergab sich durch Induktion der Expression der ZDS mit einer IPTG-Konzentration von 1 mM (Spur 3; 1,91 %), Induktion bei einer Temperatur von 37°C (Spur 4; 1,79 %) und Verwendung von LB-Medium ohne den Zusatz von 0,5 M Sorbitol und 3 mM Betain (Spur 5; 2,13 %).

In Abbildung 3-1 (C) ist die gemessene spezifische Aktivität der ZDS bezogen auf den Gesamtproteingehalt unter verschiedenen Anzuchtsbedingungen von JM101/pQE30zds dargestellt. Die Höhe der spezifischen Aktivität der ZDS schwankt in Abhängigkeit von den Anzuchtsbedingungen, wobei im wesentlichen die im Zellüberstand befindliche ZDS zur gemessenen Enzymaktivität beiträgt.

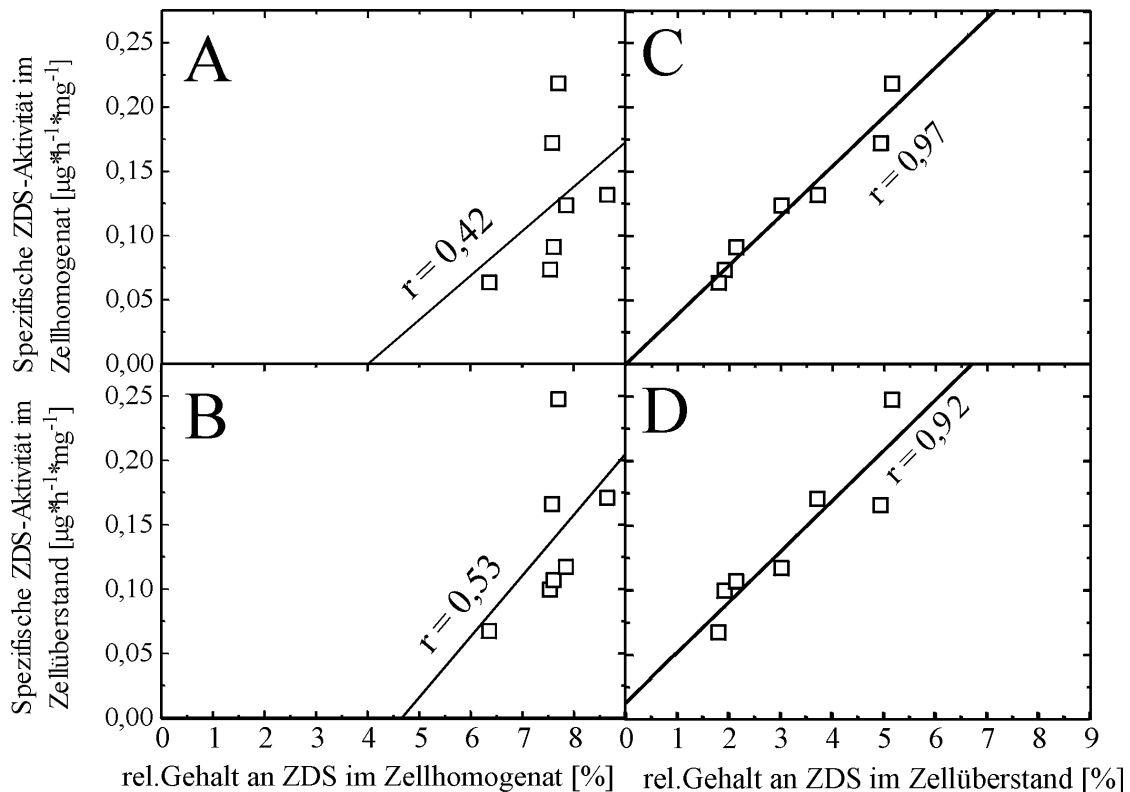
Es zeigte sich eine Abhängigkeit der gemessenen spezifischen Aktivität der ZDS in den Zellhomogenaten und den Zellüberständen von dem relativen Gehalt an ZDS in den Zellüberständen. So erreichte die spezifische Enzymaktivität der ZDS im Zellüberstand (0,247  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ) und im Zellhomogenat (0,218  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ) der Kultur 4 zusammen mit dem relativen Gehalt an ZDS im Zellüberstand (5,15 %, Spur 6) die höchsten Werte. In Kultur 2 (Spur 4) dagegen wurde die niedrigste spezifische Aktivität der ZDS im Zellüberstand (0,068  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ) und im Zellhomogenat (0,064  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ) zusammen mit dem niedrigsten relativen Gehalt an ZDS im Überstand (1,79 %) gemessen. Trotz der Schwankungen der spezifischen Aktivität der ZDS im Zellhomogenat war der relative Gehalt der ZDS im Zellhomogenat dagegen nahezu gleichmäßig hoch.

**Tabelle 3.1:** Spezifische Aktivität der ZDS und des relativen Gehaltes an ZDS in Abhängigkeit der gewählten Anzuchtsbedingung bei heterologer Expression der ZDS in *E. coli*. Die Anzuchtsbedingungen, die zur höchsten Aktivität der ZDS führen sind unterstrichen. (S&B: 0,5 M Sorbitol & 3 mM Betain).

Kultur	Spur	Indukt. bei OD <sub>600nm</sub>	T <sub>Indukt.</sub> [°C]	IPTG-Konz.	Medium	rel.ZDS-Gehalt Homog. [%]	rel.ZDS-Gehalt Überst. [%]	Spez.Akt. d. ZDS im Homogenat. [ $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ]	Spez.Akt. d. ZDS im Überstand [ $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ]
1	3	0,100	25°C	1 mM	LB/S&B	7,54	1,91	0,0736	0,0997
2	4	0,100	37°C	50 $\mu\text{M}$	LB/S&B	6,36	1,79	0,0636	0,0675
3	5	0,100	25°C	50 $\mu\text{M}$	LB	7,61	2,13	0,0911	0,1069
<b>4</b>	<b>6</b>	<b>0,100</b>	<b>25°C</b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>LB/S&amp;B</b>	<b>7,70</b>	<b>5,15</b>	<b>0,2183</b>	<b>0,2474</b>
5	7	0,280	25°C	50 $\mu\text{M}$	LB/S&B	7,58	4,93	0,1721	0,1659
6	8	0,489	25°C	50 $\mu\text{M}$	LB/S&B	8,65	3,71	0,1317	0,1708
7	9	0,590	25°C	50 $\mu\text{M}$	LB/S&B	7,85	3,01	0,1235	0,1173

Über lineare Regression wurde die gemessene spezifische Aktivität der ZDS der Zellhomogenate und Zellüberstände gegen den Gehalt an ZDS der Zellhomogenate bzw. der Zellüberstände aufgetragen und die Korrelationskoeffizienten berechnet (Abbildung 3-2). Anhand der Korrelationskoeffizienten zeigt sich, daß die Aktivität der ZDS der

Zellhomogenate und die der Zellüberstände mit dem relativen Gehalt an ZDS in den Zellüberständen korreliert (Korrelationskoeffizient 0,97 bzw. 0,92). Folglich ist die im Zellüberstand enthaltene  $\zeta$ -Carotin-Desaturase für die gemessene Aktivität verantwortlich. Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,42 korreliert dagegen die Aktivität der ZDS der Zellhomogenate kaum mit dem relativen Gehalt an ZDS in den Zellhomogenaten. Demzufolge ist ein Teil der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase in den Zellhomogenaten inaktiv. Durch die Veränderung der Anzuchtbedingungen war es möglich, das Verhältnis inaktiver ZDS zugunsten aktiver ZDS zu verschieben.



**Abbildung 3-2:** Lineare Regression der spezifischen Enzymaktivität der ZDS gegen den relativen Gehalt an ZDS. In den Abbildungen A bis D ist der Korrelationskoeffizient  $r$  eingetragen.

- A: Spezifische Aktivität der ZDS im Zellhomogenat, aufgetragen gegen den Gehalt an ZDS im Zellhomogenat,
- B: Spezifische Aktivität der ZDS im Zellüberstand, aufgetragen gegen den Gehalt an ZDS im Zellhomogenat,
- C: Spezifische Aktivität der ZDS im Zellhomogenat, aufgetragen gegen den Gehalt an ZDS im Zellüberstand,
- D: Spezifische Aktivität der ZDS im Zellüberstand, aufgetragen gegen den Gehalt an ZDS im Zellüberstand.

## 2. Reinigung der heterolog in *E. coli* exprimierten $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum*

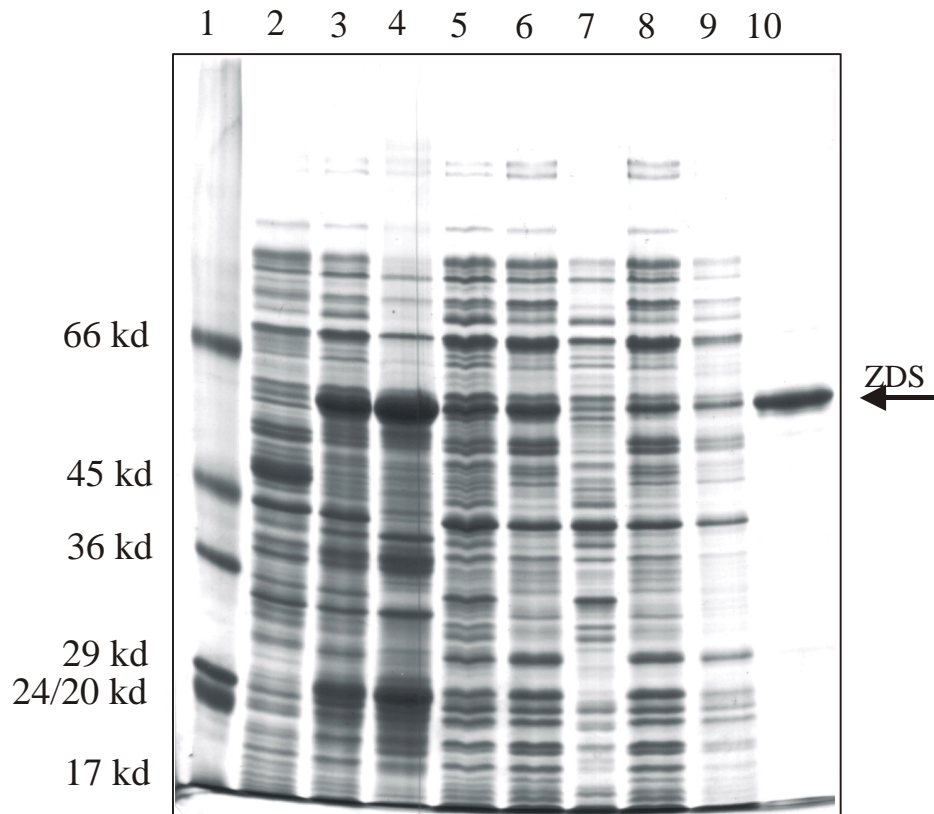
Durch eine fraktionierte Fällung der Proteine des Zellüberstandes aus JM101/pQE30zds mit 0-20, 20-40, 40-60 und 60-80 % Ammoniumsulfat wurde die ZDS angereichert, um über eine nachfolgende Affinitätschromatographie bis zur Homogenität gereinigt zu werden. Das Ergebnis der Ammoniumsulfatfällung ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Ausgehend von einem relativen Gehalt an ZDS von 3,90 % erhöhte sich dieser bis auf 4,48 % in der Fraktion der mit 20-40 % Ammoniumsulfat gefällten Proteine. In der nachfolgenden Fraktion von 40-60 % Ammoniumsulfat verringerte sich der relative Gehalt an ZDS auf 1,74 %. Für die eine Anreicherung der ZDS wurde diese daher stets mit 0-40 % Ammoniumsulfat präzipitiert und der verbleibende Überstand verworfen.

**Tabelle 3.2:** Anreicherung der ZDS durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Fraktion	relativer Gehalt an ZDS [%]
Zellüberstand aus JM101/pQE30zds	3,90
0-20 % Ammoniumsulfat präzipitierte Fraktion	4,05
20-40 % Ammoniumsulfat präzipitierte Fraktion	4,48
40-60 % Ammoniumsulfat präzipitierte Fraktion	1,74

Die Abbildung 3-3 zeigt das SDS-Polyacrylamidgel der einzelnen Reinigungsschritte der ZDS. In Tabelle 3.3 sind die zugehörigen gemessenen Aktivitäten der ZDS aufgelistet. Das Zellhomogenat aus JM101/pQE30zds (Spur 3) zeigt die exprimierten ZDS als zusätzliches Polypeptid mit einer apparenten Molmasse von 60 kd gegenüber dem Zellhomogenat von JM101/pQE30 (Spur 2), das den Vektor ohne die cDNA der ZDS trägt. Der relative Gehalt an ZDS bezogen auf die gesamten Proteine erreicht im Homogenat 11 % mit einer zugehörigen spezifischen Aktivität von 0,05  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Im Zellsediment beträgt dieser 14,3 % (Spur 4). Der relative Gehalt an ZDS im Überstand (Spur 5) ist gegenüber dem relativen Gehalt an ZDS im Homogenat und im Sediment mit 7 % am geringsten. Die gemessene spezifische Aktivität der ZDS des Überstandes erreicht mit 0,110  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  den höheren Wert gegenüber den spezifischen Aktivitäten der ZDS im Homogenat und Sediment. Der relative Gehalt an ZDS erhöhte sich nach Präzipitierung mit Ammoniumsulfat (Spur 6) auf 8,5 % und die spezifische Aktivität erreichte 0,186  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ .

Im Durchfluß der Metallionen-Affinitätschromatographie (Spur 8) betrug der relative Gehalt an ZDS 4 %, bei einer spezifischen Aktivität von 0,146  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Die Bindung an die Affinitätssäule erfolgte über die koordinative Bindung der 6 N-terminalen Histidinen der ZDS an die an Sepharose gebundenen  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen.



**Abbildung 3-3:** Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung und der Affinitätsreinigung der *Capsicum*-ZDS nach Auftrennung über SDS-Gelelektrophorese:

- Spur 1: Molmassenstandard,  
 Spur 2: JM101/pQE30,  
 Spur 3: Homogenat JM101/pQE30zds,  
 Spur 4: Sediment JM101/pQE30zds,  
 Spur 5: Überstand JM101/pQE30zds,  
 Spur 6: Ammoniumsulfatpräzipitat,  
 Spur 7: Überstand des Ammoniumsulfatpräzipitats,  
 Spur 8: Durchfluß der Affinitätschromatographie,  
 Spur 9: Ungebundene Proteine der Affinitätschromatographie (Waschfraktion),  
 Spur 10: Entsalzte ZDS-Elutionsfraktion.

**Tabelle 3.3:** Reinigung der heterolog in *E. coli* exprimierten ZDS.

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein [mg]	ZDS Protein [mg]	Rel. ZDS-Gehalt [%]	Spez. Akt. [ $\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]	Ausbeute [%]
Zellhomogenat	17,0	188,20	20,70	11,0	0,050	100
Zellsediment (resusp.)	15,0	92,60	13,24	14,3	0,066	64,0
Zellüberstand	15,0	64,70	4,50	7,0	0,110	21,7
Ammoniumsulfat-Präzipitat (0-40%)	7,0	33,10	2,80	8,5	0,186	13,5
Präzipitat-Überstand	6,5	12,52	0,21	1,7	0,085	1,0
Durchfluß Affinitätschr.	6,5	22,90	0,92	4,0	0,146	4,4
Waschfraktion (ungebundene Prot.)	5,0	4,98	0,48	9,6	0,420	2,3
200 mM Imidazol-Eluat (entsalzt)	3,5	0,92	0,87	94,5	3,150	4,2

Durch Spülen der Chromatographiesäule (Spur 9, Waschfraktion) mit Imidazol-haltigen Puffer (25 mM) wurden unspezifisch gebundene Proteine eluiert. Der relative Gehalt der ZDS unter den Proteinen in der Waschfraktion betrug 9,6 %, bei einer spezifischen Aktivität von 0,420  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Die Fraktion der ZDS, die mit 200 mM Imidazol eluiert und über Sephadex G-25M entsalzt wurde (Spur 10), enthielt die relativen Gehalt von 94,5 % und bei einer spezifischen Aktivität von 3,15  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Die gemessene spezifische Aktivität erhöhte sich ausgehend vom Homogenat von JM101/pQE30zds bis zur Fraktion der gereinigten ZDS um den Faktor 63, bei einer Ausbeute des Desaturase-Proteins von 4,2 %.

### 3. Optimierung der *in vitro*-Reaktionsbedingungen zur Messung der $\zeta$ -Carotin-Desaturase-Aktivität

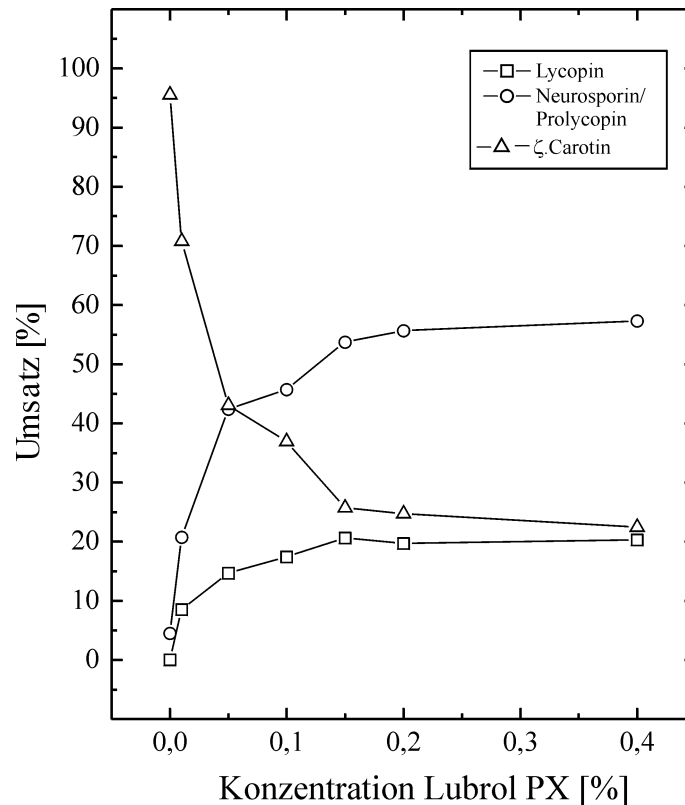
Das Ziel der Optimierung war es, eine hohe Aktivität der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase bei den *in vitro*-Aktivitätstests zu erreichen. Auf diese Weise sollten die für eine Quantifizierung und Identifikation über HPLC ausreichenden Mengen an Carotinoidprodukten der ZDS gebildet werden.

#### 3.1. Zusatz von Detergenzien

12 Detergenzien wurden einzeln in den *in vitro*-Aktivitätstests der heterolog in *E. coli* exprimierten ZDS verwendet, um sie auf eine steigernde Wirkung auf die ZDS-Aktivität zu untersuchen (die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3.4 angegeben). Die Verwendung von Lubrol PX, Genapol, Deoxycholinsäure und Tergitol in Verbindung mit der ungereinigten ZDS in Form des Zellüberstandes aus *E. coli* JM101/pQE30zds (ohne Kofaktorzugabe) führten zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität gegenüber einer Detergenzien-freien Kontrolle.

**Tabelle 3.4:** Spezifische Aktivität der *Capsicum*-ZDS in Abhängigkeit des zugesetzten Detergens oder Lipids\* in den *in vitro*-Enzymreaktionen (in ng gebildetes Carotinoid pro Stunde bezogen auf den Gesamtproteingehalt).

Detergens *(Lipid)	Spezifische Aktivität [ng/(h*mg)]	Verhältnis von gebildetem Lycopin zu Neurosporin
Ohne	0,10	0,29
Phosphatidylcholin (0,02%)*	0,25	0,47
Deriphat	0,63	0,50
Chaps	0,12	0,44
Zwittergent	0,14	0,66
Brij 58	0,07	0,75
Brij 35	0,12	0,71
Tween 60	0,18	0,63
Tween 20	0,58	0,31
Mega-7	0,05	0,00
Genapol	0,92	0,16
Tergitol	0,78	0,30
Deoxycholinsäure	1,51	0,12
<b>Lubrol PX</b>	<b>1,48</b>	<b>0,21</b>



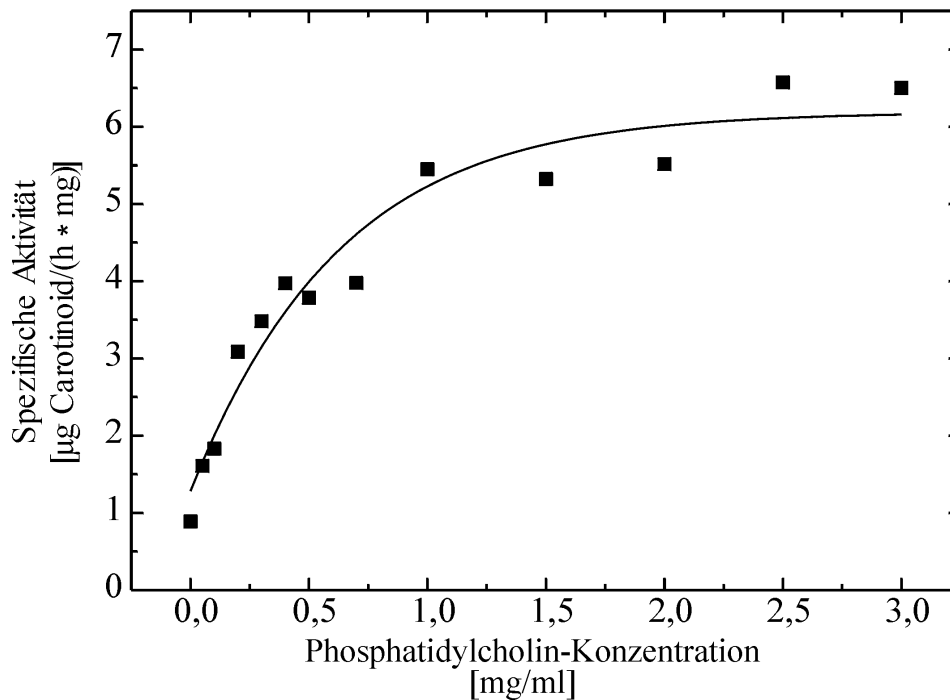
**Abbildung 3-4:** Erhöhung des Umsatzes von  $\zeta$ -Carotin durch die ZDS über die Zugabe des Detergens Lubrol PX zu den *in vitro*-Aktivitätstests (Die ZDS wurde in Form des Zellüberstand aus JM101/pQE30zds eingesetzt).

Unter Zusatz von Lubrol PX oder Deoxycholinsäure erhöhte sich die ZDS-Aktivität um den Faktor 15. In Abbildung 3-4 ist die Abhängigkeit des  $\zeta$ -Carotin-Umsatzes von der Konzentration an zugesetztem Lubrol PX in den *in vitro*-Aktivitätstests der ZDS dargestellt. Es zeigte sich, daß der Umsatz von  $\zeta$ -Carotin bis zu einer Gabe von 0,2 % Lubrol PX-Zugabe von 5 % auf 75 % erhöht wurde.

### 3.2. Zusatz von Phosphatidylcholin

Zur Bestimmung der Lipidkonzentration für eine hohe *in vitro*-Enzymaktivität wurde Phosphatidylcholin in steigender Konzentration von 0 bis 3 mg/ml den *in vitro*-Aktivitätstests zugesetzt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze beinhaltete 10  $\mu$ g  $\zeta$ -Carotin, 65  $\mu$ g gereinigte  $\zeta$ -Carotin-Desaturase, 0,02 % BHT, 10  $\mu$ M Decyl-Plastochinon und 0 bis 3mg Phosphatidylcholin. Die Reaktionsdauer betrug zwei Stunden.

Die Abbildung 3-5 zeigt die gemessenen spezifischen Aktivitäten der gereinigten ZDS in Abhängigkeit von der zugesetzten Konzentration an Phosphatidylcholin. Über die einzelnen Meßpunkte wurde eine sigmoidale Regression durchgeführt und als Kurve zwischen die Meßpunkte eingezeichnet. Dabei zeigte sich, daß die spezifische Aktivität der Desaturase bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml Phosphatidylcholin deutlich zunahm.



**Abbildung 3-5:** Erhöhung der spezifischen Aktivität der gereinigten ZDS über die Zugabe von Phosphatidylcholin zu den *in vitro*-Aktivitätstests (sigmoitale Regression nach Boltzmann).

Mit gereinigter ZDS wurden je zwei *in vitro*-Aktivitätstests unter Zugabe von 0,3 % Lubrol PX und von 0,3 % Phosphatidylcholin (Tabelle 3.5) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß Phosphatidylcholin bei Verwendung der gereinigten ZDS zu einer höheren Enzymaktivität gegenüber dem Detergens Lubrol PX führt. Demzufolge wurde für die *in vitro*-Reaktionsansätze Phosphatidylcholin verwendet.

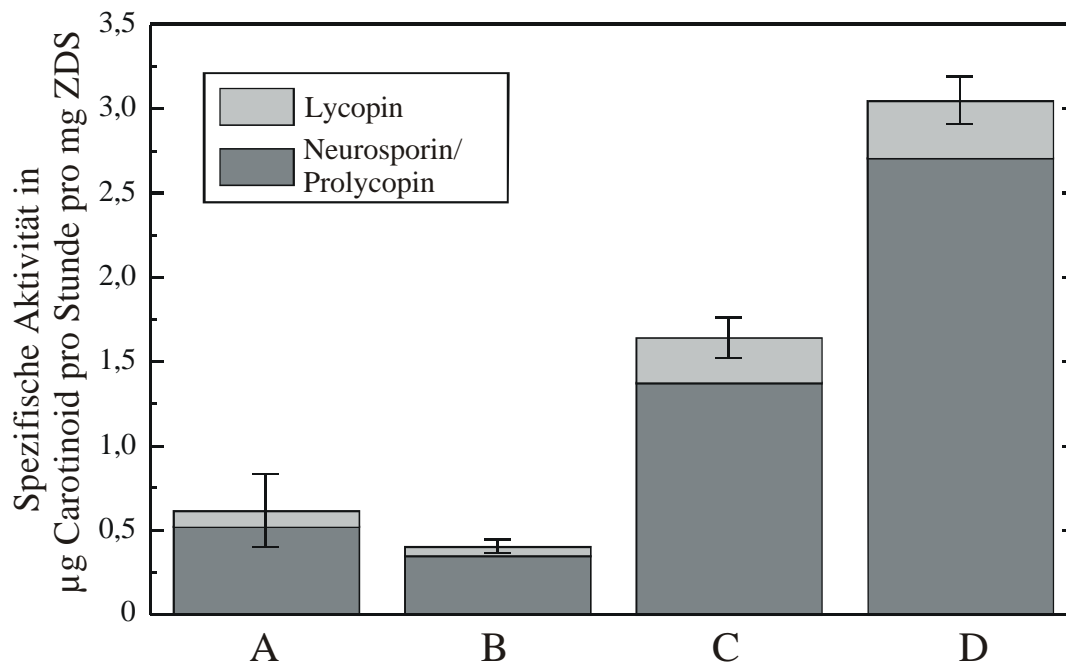
**Tabelle 3.5:** Enzymaktivität der gereinigten ZDS in Abhängigkeit des in den *in vitro*-Aktivitätstests verwendeten Lipids oder Detergens. Die Reaktionsdauer betrug 2 Stunden bei Verwendung von 64 µg ZDS, 5 µg ζ-Carotin, 10 µM Decyl-Plastochinon.

Lipid / Detergens (0,3%)	Spezifische Aktivität [µg/(h*mg)]
Phosphatidylcholin	1,043
Lubrol PX	0,146

### 3.3. Zusatz des Antioxidants Butyl-hydroxy-Toluol (BHT)

Carotinoide können oxidativ abgebaut werden (Woodall et al., 1996). Um dem Abbau der Carotinoide in den *in vitro*-Aktivitätstests vorzubeugen, sollte ein Antioxidants zugesetzt werden. Abbildung 3-6 zeigt die Wirkung von 0,02 % BHT auf die gebildeten Produktmengen in den *in vitro*-Aktivitätstests mit gereinigter ZDS (79 µg ZDS, 10 µM Decyl-Plastochinon, 5 µg ζ-Carotin). Ohne Zugabe von Phosphatidylcholin und BHT (A) und vergleichend unter Zugabe von BHT (B) wurde eine in etwa gleich hohe spezifische Aktivität

der ZDS erreicht. Durch die Zugabe von 0,3 % Phosphatidylcholin (C) steigerte sich die spezifische Aktivität um mehr als das Doppelte.



**Abbildung 3-6:** Spezifische Aktivität der *Capsicum*-ZDS in Abhängigkeit von der Zugabe des Antioxidants BHT und von Phosphatidylcholin zu den *in vitro*-Aktivitätstests. A: Ohne Zugabe von Phosphatidylcholin und BHT (Kontrolle), B: Zugabe von 0,02 % BHT, C: Zugabe von 0,3 % Phosphatidylcholin, D: Zugabe von 0,3 % Phosphatidylcholin und 0,02 % BHT. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Meßreihen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die zusätzliche Gabe von 0,02 % BHT (D) konnte die gemessene spezifische Aktivität gegenüber (C) nochmals um den Faktor 2 erhöhen. Durch die Verwendung von BHT und Phosphatidylcholin konnte die spezifische Aktivität der ZDS gegenüber der Kontrolle (A) um den Faktor 5 erhöht werden.

### 3.4. Wirkung von Kaliumphosphat- und Tris-Puffer auf die ZDS-Aktivität

Tabelle 3.6 zeigt die in den *in vitro*-Aktivitätstests gemessene spezifische Aktivität der gereinigten ZDS unter Verwendung von Kaliumphosphat- oder Tris-Puffer (3 h Reaktionsdauer, 28 µg ZDS, 10 µM Plastochinon). Durch die Verwendung von Kaliumphosphatpuffer wurde eine höhere Aktivität der ZDS gegenüber der Verwendung von TRIS-Puffer gemessen. Als Kontrolle dafür, daß kein Abbau der Carotine in Tris- oder Kaliumphosphatpuffer erfolgt, wurden die Carotinoide ζ-Carotin, Neurosporin und Lycopin in Tris- und Kaliumphosphatpuffer inkubiert. Es ergab sich bei den Kontrollen keinen Unterschied in den Carotinoidmengen (Tabelle 3.7), d.h. es findet kein Abbau der Carotinoide in Tris-Puffer statt.



**Tabelle 3.6:** Vergleich der ZDS-Aktivität in Abhängigkeit des *in vitro* verwendeten Puffers. Die angegebenen Produktmengen sind Mittelwerte zweier Messreihen.

Puffer	Gebildete Mengen an Lycopin [µg]	Gebildete Mengen an Neurosporin/ Prolycopin [µg]	Spezifische Aktivität [µg/(h*mg)]
Kaliumphosphat	0,0196	0,493	6,191
TRIS	0,0188	0,363	4,610

**Tabelle 3.7:** Untersuchung von Tris- oder Kaliumphosphatpuffer auf eine Carotinoid-abbauende Wirkung. Ausgangsmengen: ζ-Carotin (6,7 µg), Neurosporin (2,4 µg) und Lycopin (1,1µg).

Puffer	Lycopin [µg]	Neurosporin [µg]	ζ-Carotin [µg]
Kaliumphosphat	1,1	2,4	6,6
TRIS	0,9	2,4	6,4

## 4. Analyse der Produkte der ζ-Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum*

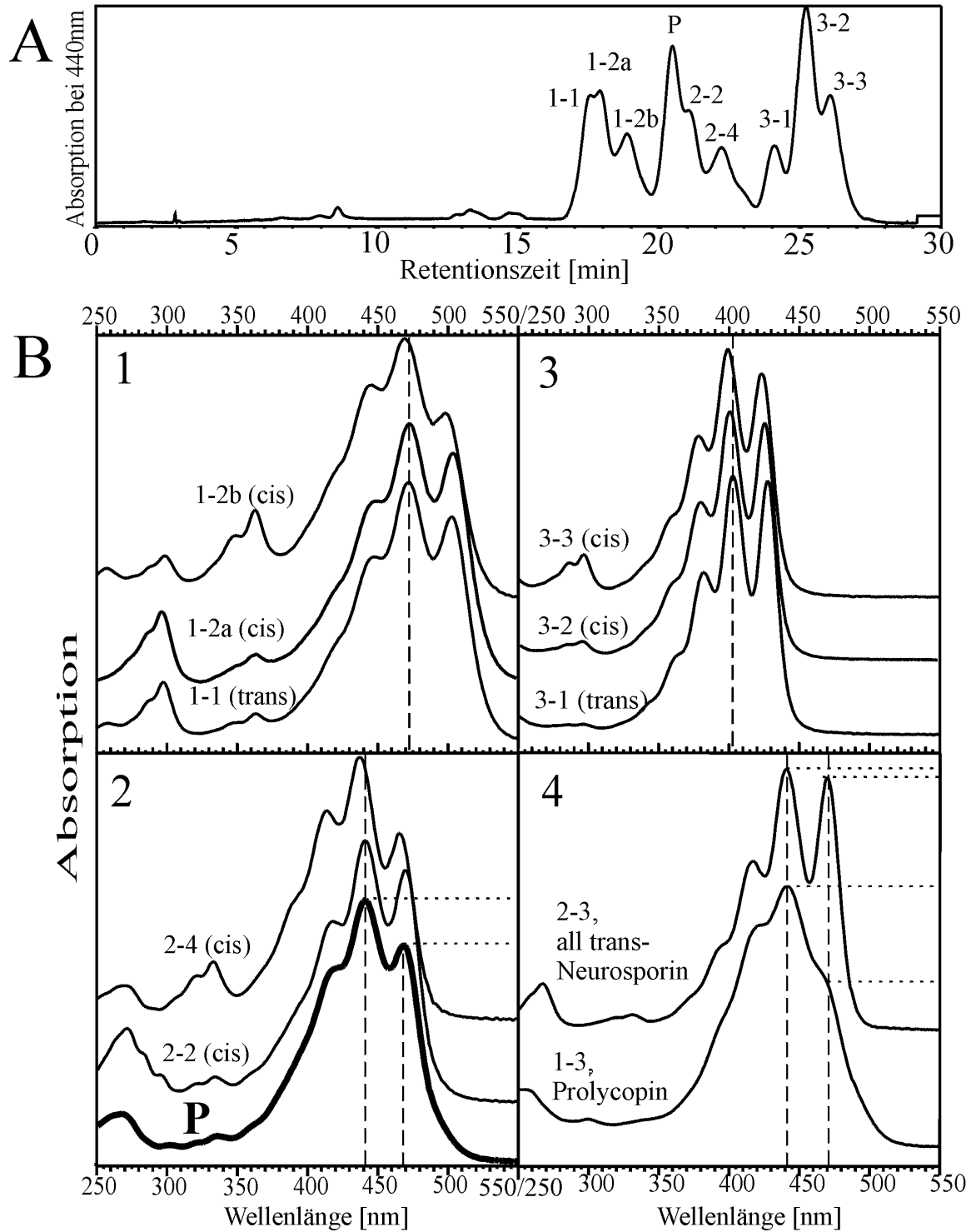
### 4.1. Carotinoid-Analytik über Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit einer Nucleosil C<sub>18</sub>-Trennsäule

#### 4.1.1. Trennproblematik

Das C<sub>18</sub>-HPLC-Chromatogramm (Laufmittel 15 %B) in Abbildung 3-7 (A) zeigt die bei funktioneller Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* mit der *Capsicum*-ZDS gebildeten Carotinoide. In Tabelle 3.8 sind die zugehörigen Absorptionsmaxima der entstandenen Carotinoide aufgelistet.

Das Chromatogramm (A) zeigt von links nach rechts drei Elutionsfraktionen von Lycopin (1-1, 1-2a, 1-2b), drei Elutionsfraktionen mit Neurosporin-Spektrum (P, 2-2, 2-4) und drei Elutionsfraktionen des Substrates ζ-Carotin (3-1, 3-2, 3-3). Die Carotinoide eluieren von der HPLC-Säule in Abhängigkeit der Zahl der Doppelbindungen und der cis-trans-Konfiguration. Lycopin, mit 13 Doppelbindungen eluiert vor Neurosporin mit 12 und dieses vor ζ-Carotin mit 11 Doppelbindungen. Unter den Isomeren des jeweiligen Carotinoids besitzt das all trans-Isomer (1-1, 3-1) in dem vorliegenden Trennsystem die kürzeste Retentionszeit und eluiert vor den cis-Isomeren (1-2a, 1-2b, 3-2, 3-3).

Die Teilabbildung B zeigt die Spektren der einzelnen Carotinoidisomere. Lycopin (B-1) besitzt wie Neurosporin (B-2) und ζ-Carotin (B-3) ein Spektrum mit einem Haupt- sowie zwei Nebenmaxima im sichtbaren Licht (Tabelle 3.8, Abbildung 3-7). Weiterhin tritt ein von der Konfiguration der Doppelbindungen abhängiges Absorptionsmaximum im UV-Bereich (cis-Absorptionsbande), sowie ein davon unabhängiges Absorptionsmaximum bei noch kürzeren Wellenlängen auf (Tabelle 3.8).



**Abbildung 3-7:** Carotinoideextrakt aus der funktionellen Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* mit der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum*.

A: **C<sub>18</sub>-HPLC-Chromatogramm** der Carotinoide aus JM101/pACCRT-EBP+pQE30zds.

B: **Spektren** der Carotinoideisomere (1-1, 1-2a, 1-2b: Lycopin; 2-2, 2-4: cis-Neurosporin; P: **Überlängerungs-Spektrum** von all trans-Neurosporin (2-3), Prolycopin (1-3) und geringen Mengen von cis-Neurosporin (2-1).

3-1, 3-2, 3-3:  $\zeta$ -Carotin; 4: Spektren von all trans-Neurosporin 2-3 und Prolycopin 1-3 nach Trennung des gemeinsamen Elutionsgipfels P über C<sub>30</sub>-HPLC).

Eine ausgeprägte cis-Absorptionsbande tritt im Spektrum auf, wenn in dem System der konjugierten Doppelbindungen eine zentral liegende Doppelbindungen eine cis-Konfiguration aufweist (Zechmeister 1962). Diese ist um so ausgeprägter, je zentraler die cis-Doppelbindung vorliegt. Mit dem Auftreten der cis-Absorptionsbande kommt es zu einer Verschiebung des Hauptmaximums zu kürzeren Wellenlängen (hypsochrome Verschiebung) und zu schwächer ausgeprägten Nebenmaxima des Spektrums. Diese cis-Bande tritt bei den cis-Lycopin- (1-2a, 1-2b), cis-Neurosporin- (2-2, 2-4) und cis- $\zeta$ -Carotin-Isomeren (3-2, 3-3) auf. Das Spektrum des Elutionsgipfels P im Chromatogramm der C<sub>18</sub>-HPLC (Teilabbildung B-2, Abbildung 3-7) zeigt die Absorptionsmaxima bei Wellenlängen von 415, 440 und 470 nm, die denen von all trans-Neurosporin entsprechen. Als ein all trans-Neurosporin müsste die Absorption im Spektrum bei 440 nm und 470 nm die gleichen Werte besitzen, jedoch ist die Absorption bei 470 nm deutlich geringer als bei 440 nm.

**Tabelle 3.8:** Absorptionsmaxima der Produkte und der Substratisomere der  $\zeta$ -Carotindesaturase aus *Capsicum*. Auftrennung über HPLC mit einer Nucleosil C<sub>18</sub>-Säule. Der cis-Absorptionsbereich (cis-Bande) ist unterstrichen.

Elutionsgipfel	Carotinoid	Absorptionsmaxima [nm]
1-1	all trans-Lycopin	285, 295, 446, 471, 505
1-2a	cis-Lycopin	285, 296, <u>362</u> , 446, 472, 505
1-2b	cis-Lycopin	285, 296, <u>346</u> , <u>362</u> , 444, 468, 495
<b><u>P</u></b>	<b><u>all trans-Neurosporin,</u></b> <b><u>cis-Neurosporin &amp;</u></b> <b><u>Prolycopin</u></b>	<b><u>270, 415, 440, 470</u></b>
2-2	cis-Neurosporin	270, <u>320</u> , <u>330</u> , 415, 440, 470
2-4	cis-Neurosporin	270, <u>320</u> , <u>330</u> , 412, 437, 466
3-1	all trans- $\zeta$ -Carotin	382, 403, 427
3-2	cis- $\zeta$ -Carotin	<u>286</u> , <u>295</u> , 380, 400, 425
3-3	cis- $\zeta$ -Carotin	<u>286</u> , <u>295</u> , 378, 399, 423

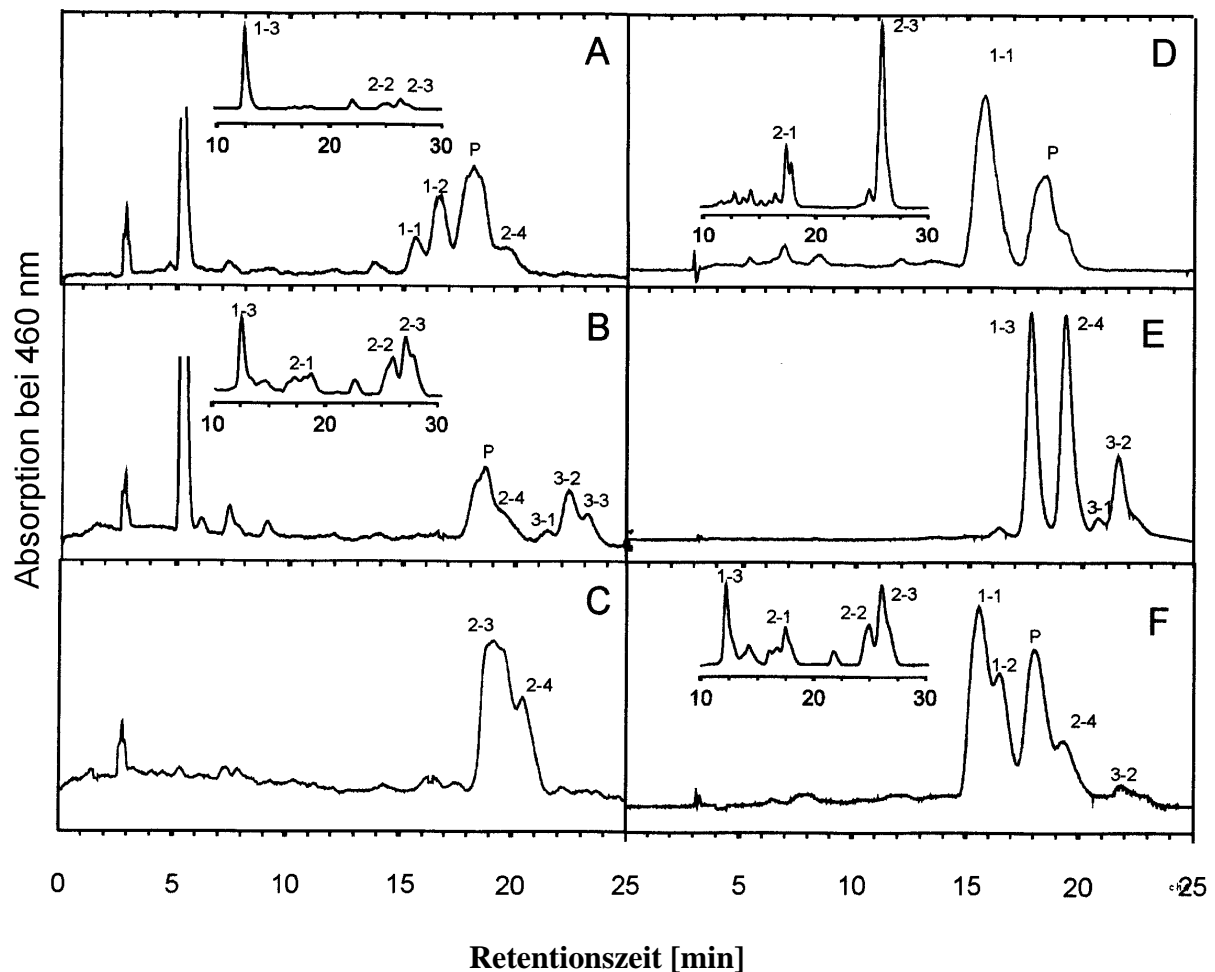
Die Verwendung einer HPLC-Trennsäule mit einer von Sander et al. (1994) entwickelten C<sub>30</sub>-Phase, die eine höhere Selektivität gegenüber Carotinoidisomeren zeigt als die C<sub>18</sub>-Phase, ermöglichte die Auftrennung der Carotine des Elutionsgipfels P in Prolycopin (1-3), all trans-Neurosporin (2-3) und geringe Mengen eines cis-Neurosporins (2-1, Abbildung 3-9). Der Elutionsgipfel P ist demnach eine Überlagerung dieser Carotine (Spektren unter B4). Die von Prof. Shinichi Takaichi (Biological Laboratory, Nippon Medical School, Kawasaki, Japan) durchgeführte Massenspektroskopie der Carotinoide der Elutionsfraktion P (Takaichi, 1993) bestätigte das Vorliegen von Neurosporin mit einer Molmasse von 538 g/mol und von Prolycopin (7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin) mit einer Molmasse von 536 g/mol. Beide Verbindungen besitzen im verwendeten C<sub>18</sub>-HPLC-Trennsystem die gleiche Retentionszeit, trotz unterschiedlicher Zahl von Doppelbindungen (Prolycopin 13, Neurosporin 12). Wie Neurosporin hat Prolycopin ein Absorptionsmaximum bei 440 nm, besitzt aber trotz vier vorhandener cis-Bindungen (7,9,7',9'-cis) keine cis-Bande im Absorptionsspektrum (Clough

& Pattenden, 1979; Zechmeister, 1962). Die Überlagerung von Neurosporin und Prolycopin ist daher über das Spektrum schwer erkennbar. Der Unterschied des Prolycopinspektrums gegenüber dem Neurosporinspektrum liegt in der geringeren Absorption von Prolycopin bei 469 nm Wellenlänge (das Verhältnis der Höhe der Absorption bei 470 zu 440 nm beträgt 0,98 für all trans-Neurosporin und 0,79 für Prolycopin). Zur getrennten Quantifizierung von all trans-Neurosporin und Prolycopin erfolgte die Trennung der ZDS-Desaturierungsprodukte aus Komplementierungen oder *in vitro*-Aktivitätstests zum Teil über C<sub>30</sub>-HPLC.

#### **4.1.2. Identifikation der Reaktionsprodukte der *Capsicum*-ZDS über C<sub>18</sub>- und C<sub>30</sub>-HPLC und Carotinoidstandards**

Die Reaktionsprodukte aus *in vitro*-Aktivitätstest und aus Komplementierungen der ZDS mit einem  $\zeta$ -Carotin bildenden *E. coli*-Stamm (JM101/pACCRT-EBP) wurden über die C<sub>18</sub>-HPLC (15% B) aufgetrennt und mittels Carotinoidstandards (I-IV) anhand der Absorptionsmaxima und der Spektren identifiziert. Der Elutionsgipfel P, bestehend aus dem sich überlagernden Neurosporin und Prolycopin wurde aufgefangen und über C<sub>30</sub>-HPLC getrennt (Teilabbildungen in A, B, D, F). Die HPLC-Chromatogramme der Desaturierungsprodukte der *Capsicum*-ZDS sind unter Abbildung 3-9 dargestellt, die zugehörige Tabelle 3.9 zeigen die Eigenschaften der Carotinoide, die Tabelle 3.10 gibt die prozentualen Anteile der Isomere der verwendeten Substrate und der Produkte an.

Die Carotine der Elutionsgipfel 1-1 und 1-2 konnten als all trans- und cis-Lycopin und 2-4 als ein cis-Neurosporin identifiziert werden. Der Elutionsgipfel P ergab sich aus der Überlagerung von Neurosporin und Prolycopin (1-3). Nach der Auftrennung der Carotine des Elutionsgipfels P über C<sub>30</sub>-HPLC, wurden Prolycopin (1-3), zwei cis-Neurosporine (2-1, 2-2) sowie all trans- Neurosporin (2-3) identifiziert.



**Abbildung 3-9:** Analyse der Produkte der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* über  $C_{18}$ - und  $C_{30}$ -HPLC. Die eingefügten Ausschnittsvergrößerungen in den Teilabbildungen A, B, D, F stellen die Chromatogramme der Auftrennung des Elutionsgipfels P über  $C_{30}$ -HPLC dar.

- A: *In vitro*-Reaktionsprodukte mit  $\zeta$ -Carotin als Substrat,
- B: *In vitro*-Reaktionsprodukte mit  $\zeta$ -Carotin als Substrat unter Zusatz von Lubrol PX,
- C: *In vitro*-Reaktionsprodukte mit einer all trans  $\zeta$ -Carotin angereicherten Substratfraktion,
- D: *In vitro*-Reaktionsprodukte mit einer all trans Neurosporin angereicherten Substratfraktion,
- E: *In vitro*-Reaktionsprodukte mit einer cis- $\zeta$ -Carotin (3-2) angereicherten Fraktion als Substrat,
- F: *In vivo*-Reaktionsprodukte der ZDS bei einer Komplementierung der *Capsicum*-ZDS mit den Carotinoidgenen zur Bildung von  $\zeta$ -Carotin in *E. coli*.

Unter Abbildung A und B sind die Reaktionsprodukte zweier *in vitro*-Aktivitätstests dargestellt. A zeigt die Reaktionsprodukte, die von der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase unter Verwendung von 400 mM Kaliumphosphatpuffer gebildet wurden. Durch die Zugabe des Detergens Lubrol PX und Reduzierung der Pufferkonzentration von 400 auf 100 mM verringerte sich der Anteil des gebildeten Lycopins und Prolycopin im Verhältnis zum Intermediat Neurosporin (B, Tabelle 3.10). Unter C wurde  $\zeta$ -Carotin mit einem 78 % -Anteil an all trans  $\zeta$ -Carotin als Substrat verwendet. Das Spektrum des Elutionsgipfels 2-3 zeigt ein Neurosporinspektrum, d.h. daß aus all trans  $\zeta$ -Carotin kein Prolycopin gebildet wurde. Es

wurden all trans-Neurosporin 2-3 und cis-Neurosporin 2-4 gebildet, Lycopin war nicht nachweisbar.

**Tabelle 3.9:** Eigenschaften der Produkte Lycopin, Neurosporin und der Substrate  $\zeta$ -Carotin und Neurosporin der *Capsicum*-ZDS. \*Verhältnis des 2. Absorptionsmaximums zum 3. Absorptionsmaximum. Das unterstrichene Absorptionsmaximum stellt den cis-Absorptionsgipfel (cis-Bande) dar.

Elutionsgipfel	Absorptionsmaxima [nm]	Ratio II/III*	Molmasse [g/mol]	Carotinoid
1-1	295, 446, 471, 503	0,885	536	all trans Lycopin
1-2	295, <u>362</u> , 444, 468, 495	0,741	536	cis Lycopin
1-3	255, 416, 440, (469)	0,787	536	polycis-Lycopin
2-1	270, <u>332</u> , 410, 434, 462	0,917	538	cis Neurosporin
2-2	265, 414, 440, 469	0,901	538	cis Neurosporin
2-3	265, 414, 440, 469	0,980	538	all trans Neurosporin
2-4	270, <u>330</u> , 412, 438, 465	0,752	538	cis Neurosporin
3-1	235, 384, 402, 425	0,980	540	all trans $\zeta$ -Carotin
3-2	<u>295</u> , 378, 400, 428	0,935	540	cis $\zeta$ -Carotin
3-3	360, 380, 402, 429	0,943	540	cis $\zeta$ -Carotin
Standard I	295, 444, 472, 504	0,893	536	all trans Lycopin
Standard II	256, 416, 440, (468)	0,800	536	Prolycopin (7,9,7',9'-tetrakis Lycopin)
Standard III	265, 412, 440, 468	0,926	538	all trans Neurosporin
Standard IV	235, 378, 402, 425	1,010	540	all trans $\zeta$ -Carotin

**Tabelle 3.10:** Verteilung von Lycopin, Neurosporin und  $\zeta$ -Carotin als Substrate und Produkte der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasereaktion. S(A/B) Substratverteilung in den Reaktionen A und B, S(C)  $\zeta$ -Carotin aus *Phycomyces* S442, S(D) Isomerverteilung von Neurosporin synthetisiert von der 3-Schritt-Desaturase crtI aus *Rhodobacter capsulatus* (Linden et al., 1991); S(E) mit dem  $\zeta$ -Carotin Isomer 3-2 angereicherte Substratfraktion.

Gipfel	Carotinoid	Carotinoidverteilung [%]									
		des Substrates				der Reaktionsprodukte					
		S (A/B)	S(C)	S(D)	S(E)	A	B	C	D	E	F
1-1	all trans Lycopin					9,7	0		100	4,7	36,2
1-2	cis Lycopin					24,9	0		0	0	17,9
1-3	Prolycopin					37,6	11,9		0	55,2	6,9
2-1	cis Neurosporin			22,3		3,9	17,0			0	8,5
2-2	cis Neurosporin			0		5,2	16,9			0	3,3
2-3	all trans Neurosporin			77,7		10,5	32,9	76,5		0	15,7
2-4	cis-Neurosporin			0		8,3	21,3	23,5		40,3	11,5
3-1	all trans $\zeta$ -Carotin	12,8	78,2		10,2						
3-2	cis $\zeta$ -Carotin	53,1	19,4		82,4						
3-3	cis $\zeta$ -Carotin	34,1	2,4		7,4						

Bei Verwendung von Neurosporin als Substrat (D), mit einem hohen Anteil an all trans-Neurosporin (2-3: 77,7%; 2-1: 22,3%), wurde all trans Lycopin (1-1) gebildet.

Bei Zugabe einer  $\zeta$ -Carotin-Fraktion mit einem hohen Anteil (>82 %) an cis- $\zeta$ -Carotin (E) wurden in erster Linie Prolycopin 1-3 (55,2 %) und cis-Neurosporin 2-4 (40,3 %) gebildet.

Die Teilabbildung F zeigt die Carotinoidzusammensetzung einer funktionellen Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* mit der ZDS aus *Capsicum* (Expressionsvektor mit der cDNA der ZDS, transformiert in einem  $\zeta$ -Carotin akkumulierenden *E. coli* Stamm). Es zeigen sich dabei die gleichen Elutionsgipfel wie unter

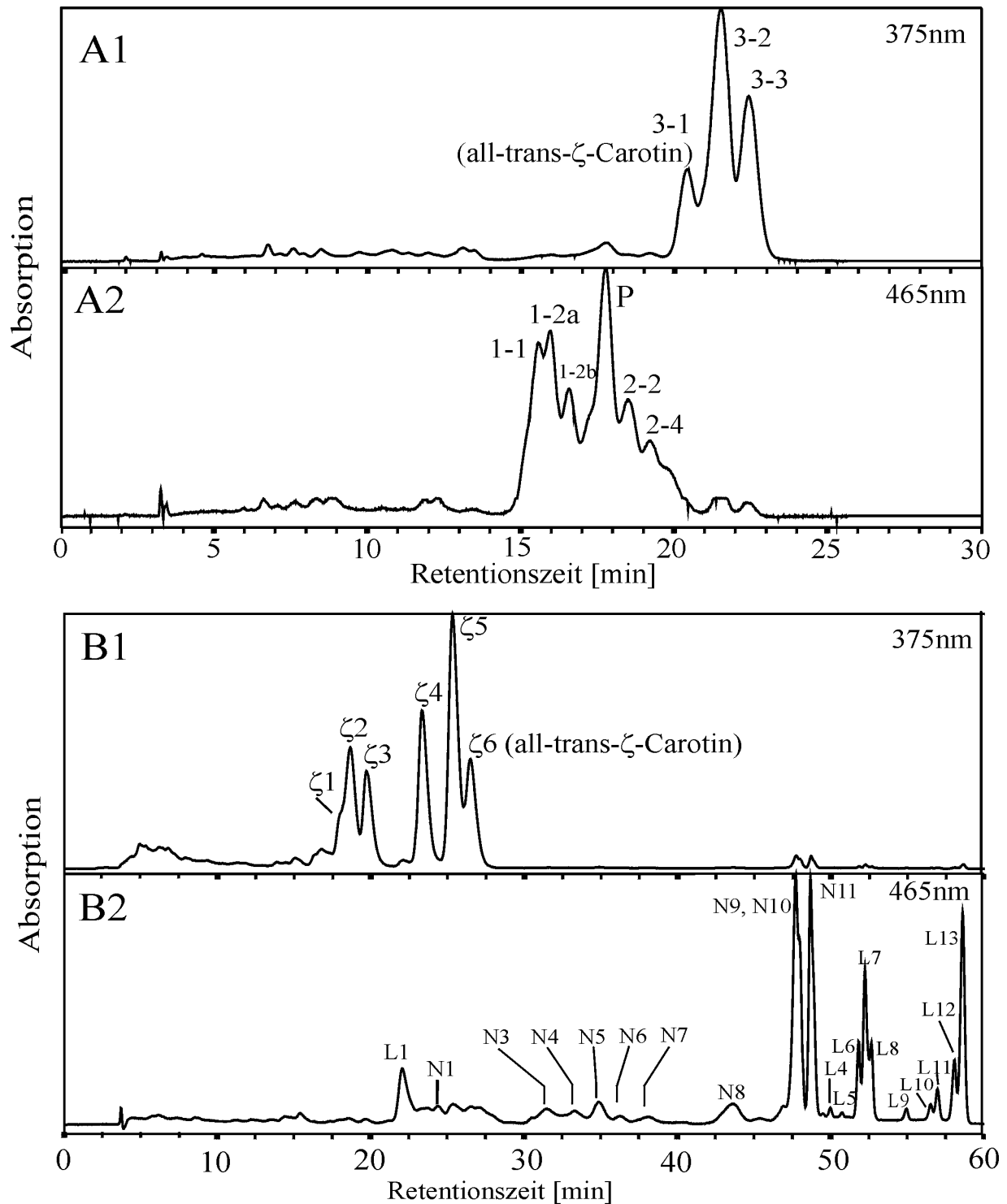
B und A, wobei die Bildung von all trans Lycopin mit einem Anteil von 36,2 % am Gesamtcarotinoidgehalt höher lag, als in den *in vitro*-Versuchen.

## 4.2. Analyse aller Desaturierungsprodukte der *Capsicum*-ZDS über C<sub>30</sub>-HPLC

### 4.2.1. Gebildete Carotinoide bei funktioneller Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* mit der ZDS aus *Capsicum*

Von Sander et al. (1994) wurde für die HPLC-Trennung von Carotinoiden eine C<sub>30</sub>-Phase entwickelt, die gegenüber den bisher für die Trennung von Carotinoiden verwendeten C<sub>18</sub>-Phasen eine höhere Selektivität gegenüber verschiedenen Carotinoidisomeren zeigt und eine bessere Trennung dieser ermöglicht. Die höhere Selektivität ergibt sich aus der längeren Kohlenwasserstoffkette der gebundenen C<sub>30</sub>-Phase, wodurch Wechselwirkungen in Form von Van der Waals-Kräften über die gesamte Länge der zu trennenden Carotinoidmoleküle erfolgen. Die Verwendung einer C<sub>30</sub>-HPLC-Trennsäule ermöglichte die bessere Trennung und Analyse der Substrat- und der Produktisomere der *Capsicum*-ZDS.

Unter Abbildung 3-10 sind die C<sub>18</sub>- und C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramme eines Carotinoideextraktes aus einer funktionellen Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* dargestellt. Dazu wurde das Plasmid mit der cDNA der *zds* in einen ζ-Carotin-akkumulierenden *E. coli*-Stamm transformiert (JM101/pACCRTEBP+pQE30zds). Die Chromatogramme, die bei 375 nm aufgezeichnet wurden, dokumentieren die ζ-Carotin-Substrat-Isomere. Die Chromatogramme, die bei 465 nm aufgezeichnet wurden, zeigen dagegen die Desaturierungsprodukte der ZDS. ζ-Carotin wurde über C<sub>18</sub>-HPLC (A) in 3 Isomerfraktionen getrennt, wobei all trans ζ-Carotin (3-1) die kürzeste Retentionszeit besaß. Bei Trennung von ζ-Carotin über C<sub>30</sub>-HPLC, trennten sich dieses in 6 Elutionsgipfel auf, wobei all trans-ζ-Carotins die längste Retentionszeit besaß. Bei Trennung der Desaturierungsprodukte über C<sub>30</sub>-HPLC konnten 11 Lycopin- sowie 10 Neurosporinisomere voneinander getrennt werden. Unter den Lycopinisomeren fanden sich mit zunehmender Retentionszeit Prolycopin (L1, 7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin), 9-cis-(L7), 5,9'-cis- (L8), 7-cis-(L10,11), all trans-(L12), 5-cis- und 5,5'-dici-Lycopin (L13) (Tabellen 3.10, 3.11). 4 der Lycopinisomere konnten nicht identifiziert werden. Unter den 10 Neurosporinisomeren fanden sich neben all trans-Neurosporin (N11) ein Neurosporinisomer (N1) mit einem Spektrum vergleichbar dem 7,9,9'-trici-Neurosporinstandard (Proneurosporin) (Tabelle 3.11, 3.12).



**Abbildung 3-10:** C<sub>18</sub>- und C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramme des Substrates  $\zeta$ -Carotin (A1, B1) und aller Produkte der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* (A2, B2) (Extrakt aus JM101/pACCRT-EBP + pQE30zds).

**A: C<sub>18</sub>-HPLC Chromatogramm** der  $\zeta$ -Carotin-Substrat-Isomere (A1) und der Desaturierungsprodukte (A2); **1-1:** all trans-Lycopin; **1-2a, 1-2b:** cis-Lycopin; **P:** all trans-Neurosporin/Prolycopin; **2-2, 2-4:** cis-Neurosporin; **3-1:** all trans- $\zeta$ -Carotin; **3-2, 3-3:** cis- $\zeta$ -Carotin; (Laufmittel: 15% B).

**B: C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramm** der  $\zeta$ -Carotin-Substrat-Isomere (B1) und der Desaturierungsprodukte (B2) **L1:** Prolycopin (7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin); **N1:** cis-Neurosporin; **N3-N10:** cis-Neurosporin; **N11:** all trans-Neurosporin; **L4-L6:** cis-Lycopin; **L7:** 9-cis-Lycopin; **L8:** 5,9'-di-cis-Lycopin; **L10, L11:** 7-cis-Lycopin; **L12:** all trans-Lycopin; **L13:** 5-cis-, 5,5'-dici-Lycopin, (Laufmittel: 0-30 min: 40 % MTBE; 30-70 min: 70 % MTBE).



**Tabelle 3.11:** Produkte der *Capsicum*-ZDS, aufgetrennt über C<sub>30</sub>-HPLC.

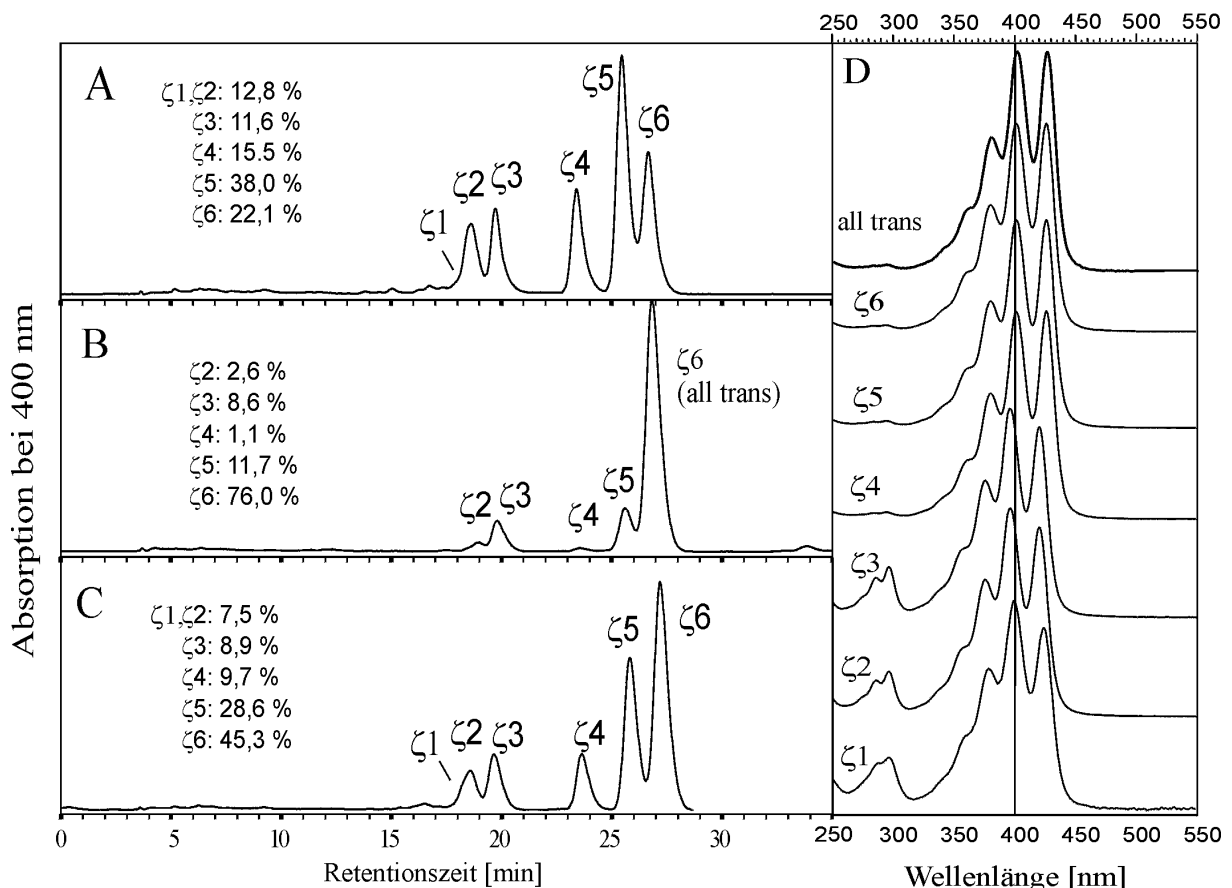
Carotin	Rf [Min]	Absorptionsmaxima [nm]					Verhältnis der Extinktion			Carotinoid
		cis	I	II	III	cis/II	I/II	III/II		
ζ1	17,97		287, 296	377	399	424	0,24	0,68	0,87	cis-ζ-Carotin
ζ2	18,60		285, 295	375	395	420	0,19	0,65	0,92	cis-ζ-Carotin
ζ3	19,70		285, 295	375	395	420	0,23	0,65	0,90	cis-ζ-Carotin
ζ4	23,30		295	380	401	426	0,04	0,61	1,01	9,9'-di-cis-ζ-Carotin
ζ5	25,30		295	380	401	426	0,04	0,61	1,00	cis-ζ-Carotin
ζ6	26,43		295	380	401	426	0,04	0,61	1,00	all trans-ζ-Carotin
L1	22,01			416	440	469	0,00	0,87	0,71	Prolycopin (7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin)
N1	24,38			407	431	456	0,00	0,88	0,40	cis-Neurosporin
N3	31,45	268	319, 332	411	435	464	0,12	0,65	0,97	cis-Neurosporin
N4	33,23	268	319, 332	411	435	464	0,32	0,68	0,92	cis-Neurosporin
N5	34,84	268	320, 332	412	435	463	0,12	0,66	0,94	cis-Neurosporin
N6	36,19	268	320, 334	420	444	469	0,07	0,67	0,89	cis-Neurosporin
N7	38,09	268	320, 334	420	444	469	0,11	0,72	0,94	cis-Neurosporin
N8	43,55		335	420	444	470	0,11	0,72	0,92	cis- Neurosporin
N9	47,66	268	332	422	442	470	0,11	0,70	0,97	cis-Neurosporin
N10	47,83	268	320, 332	417	442	471	0,06	0,65	0,96	cis-Neurosporin
N11	48,62	268	332	415	441	470	0,06	0,65	0,97	all trans-Neurosporin
L4	49,93	296	362	442	467	496	0,15	0,75	0,79	cis-Lycopin
L5	50,68	296	362	442	466	495	0,12	0,75	0,79	cis-Lycopin
L6	51,75	296	362	439	468	495	0,13	0,75	0,89	cis-Lycopin
L7	52,19	296	362	443	468	498	0,14	0,68	0,89	9-cis-Lycopin
L8	52,61	296	363	440	468	498	0,13	0,68	0,89	5, 9'-dicis-Lycopin
L9	54,86		364	445	467	495	0,10	0,81	0,78	cis-Lycopin
L10	56,45	295	362	445	470	500	0,09	0,75	0,84	7-cis-Lycopin <sup>1</sup>
L11	56,92	295	363	445	470	500	0,09	0,75	0,84	7-cis-Lycopin <sup>1</sup>
L12	58,03	285, 295	363	447	472	504	0,07	0,68	0,90	all trans-Lycopin
L13	58,63	285, 295	363	445	473	504	0,07	0,67	0,92	5, 5'-di-cis- und 5-cis-Lycopin

**Tabelle 3.12:** Spektrale Eigenschaften der Carotinoidstandards zur Identifizierung der Produkte der ZDS aus *Capsicum*. Für 7-cis-Lycopin sind die spektralen Daten aus Hengartner et al. (1992), für Pro-ζ-Carotin und Proneurosporin aus Clough & Pattenden (1983) angegeben.

Rf [Min.]	Absorptionsmaxima [nm]					Verhältnis der Absorption			Carotinoidstandard
	cis	I	II	III	cis/II	I/II	III/II		
20,43			416	440	469	0	0,87	0,70	Prolycopin
21,00			410	433	459	0	0,93	0,45	Pro-Neurosporin
22,84		295	380	401	427	0,04	0,61	1,02	9,9'-di-cis-ζ-Carotin (Pro-ζ-Carotin)
23,13			408	431	456	0	0,88	0,40	cis-Neurosporin
45,36	268	330	417	441	470	0,06	0,65	0,95	all trans-Neurosporin
48,88	286, 296	362	439	466	497	0,15	0,71	0,88	9-cis-Lycopin
49,32	286, 296	362	440	467	497	0,13	0,68	0,88	5, 9'-cis-Lycopin
54,66	285, 295	362	445	473	504	0,07	0,70	0,90	all trans-Lycopin
55,16	285, 295	362	446	473	503	0,07	0,68	0,90	5-cis- und 5',5-cis-Lycopin
in Hexan mit 2 % CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		362	443	469	499	0,08	0,73	0,84	<sup>1</sup> 7-cis-Lycopin
in n-Hexan		294	379	401	427	keine Angaben			Pro-ζ-Carotin
in n-Hexan			410	433	459	keine Angaben			Proneurosporin

#### 4.2.2. Identifikation von all trans- $\zeta$ -Carotin

Die Identifikation von all trans- $\zeta$ -Carotin im Extrakt aus JM101/pACCRT-EBP erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten und der spektralen Eigenschaften der 6  $\zeta$ -Carotin-Isomere mit einem all trans- $\zeta$ -Carotin-Standard aus *Phycomyces* S442. Zur Identifikation von all trans- $\zeta$ -Carotin wurde ein Teil des  $\zeta$ -Carotin-Extraktes aus *E. coli* mit dem all trans- $\zeta$ -Carotin-Standard zu gleichen Anteilen vermischt und gemeinsam über C<sub>30</sub>-HPLC aufgetrennt (C), bzw. co-chromatographiert. Der Elutionsgipfel des  $\zeta$ -Carotin-Isomers 6 wurde durch die Überlagerung mit all trans- $\zeta$ -Carotin erhöht (C), d.h. beide Verbindungen besaßen die gleiche Retentionszeit. Die Spektren von all trans- $\zeta$ -Carotin und  $\zeta$ -Carotin Isomer 6 stimmten ebenfalls überein (Abbildung 3-11). Bei dem  $\zeta$ -Carotin Isomer 6 handelt es sich daher um all trans- $\zeta$ -Carotin.



**Abbildung 3-11:** Identifikation von all trans  $\zeta$ -Carotin in einem  $\zeta$ -Carotinextrakt aus *E. coli* JM101/pACCRT-EBP durch Co-Chromatographie mit einem all trans- $\zeta$ -Carotin Standard.

A:  $\zeta$ -Carotin-Extrakt aus JM101/pACCRT-EBP,

B:  $\zeta$ -Carotin-Standard (aus *Phycomyces* S442 mit 76 % all trans- $\zeta$ -Carotin),

C: Co-Chromatographie der Extrakte aus A und B; der Gipfel 6 ist gegenüber A erhöht. Isomer 6 stellt all trans- $\zeta$ -Carotin dar.

D: Spektren der Isomere 1 bis 6. Die Isomere 1 bis 3 besitzen eine ausgeprägte cis-Absorptionsbande im Spektrum.

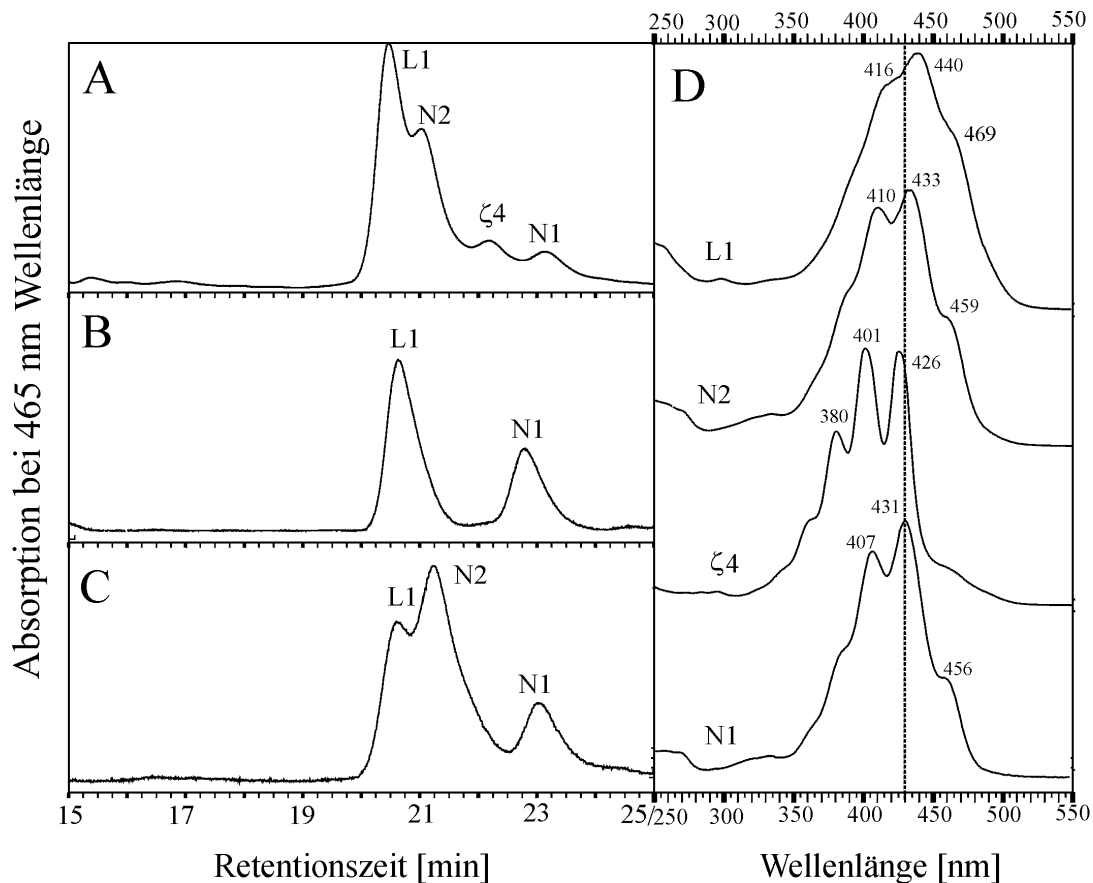
Die Verbindungen 1 bis 5 stellen cis-Isomere des  $\zeta$ -Carotins dar, mit einer oder mehreren cis-Doppelbindungen. Die Isomere 1 bis 3 besitzen eine ausgeprägte cis-Absorptionsbande im Spektrum und sollten nach Zechmeister (1962) daher eine zentral gelegene Doppelbindung im konjugierten Doppelbindungssystem aufweisen, d.h. in den Positionen 11, 11', 13, 13' oder 15. Die Isomere der Elutionsfraktionen 4 und 5 besaßen die selben spektralen Eigenschaften wie all trans- $\zeta$ -Carotin (Isomer 6), aber aufgrund der geringeren Retentionszeiten handelt es sich ebenfalls um cis-Verbindungen mit einer oder zwei cis-Doppelbindung im peripheren Bereich (9, 9') des konjugierten Doppelbindungssystems. Aufgrund der peripher gelegenen Doppelbindungen tritt keine cis-Absorptionsbande im Spektrum auf.

#### **4.2.3. Identifikation des Carotinoids N1 als ein Neurosporin-Isomer über die Photoisomerisierung mit Iod.**

Bei dem Carotinoid **N1** konnte es sich aufgrund seines dem Proneurosporin (7,9,9'-tri-cis-Neurosporin) sowie dem Prolycopin (7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin) vergleichbaren Spektrums (Abbildung 3-12, D) und einer vergleichbaren Retentionszeit, um ein cis-Neurosporin oder cis-Lycopin mit mehreren cis-Doppelbindungen handeln. Der verwendete Proneurosporin- und Prolycopinstandard wurde aus der Grünalgenmutante *Scenedesmus obliquus* C-6D (Ernst & Sandmann, 1988) extrahiert. Die spektralen Eigenschaften des Proneurosporinstandards stimmen mit den Absorptionsmaxima (410, 433, 459 nm) des von Clough & Pattenden (1983) über NMR-Spektroskopie charakterisierten Proneurosporins überein. Die Co-Chromatographie von N1 mit dem Proneurosporinstandard (N2) ergab unterschiedliche Retentionszeiten, so daß es sich bei N1 nicht um Proneurosporin handelte (Abbildung 3-12, C).

Da das Absorptionsspektrum von N1 dem Prolycopin- oder Proneurosporin-Spektrum sehr ähnlich war und eine ausgeprägte cis-Absorptionsbande fehlte, wurde die Existenz mehrerer cis-Doppelbindungen im Carotinoidmolekül bei einer gestreckten Konfiguration vermutet. Bei Carotinoiden mit mehr als einer cis-Doppelbindung und einer gestreckten Konfiguration, wie beim Prolycopin, kommt es zu einer starken Verschiebung der Absorptionsmaxima zu kürzeren Wellenlängen (Zechmeister, 1962). So besitzt Prolycopin ein Absorptionsmaximum von 440 nm und all trans-Lycopin von 472 nm. Durch die Photoisomerisierung von N1 mit Iod, sollte die Änderung der Konfiguration und damit die Bildung anderer cis-Isomere und des all trans-Isomers von N1 erreicht werden. Über den Vergleich der durch die Isomerisierung von N1 gebildeten Carotinoidisomere mit denen durch die Isomerisierung von

Prolycopin- oder Proneurosporin gebildeten Isomere, sollte die Identifikation von N1 als ein Neurosporin oder Lycopin erfolgen.



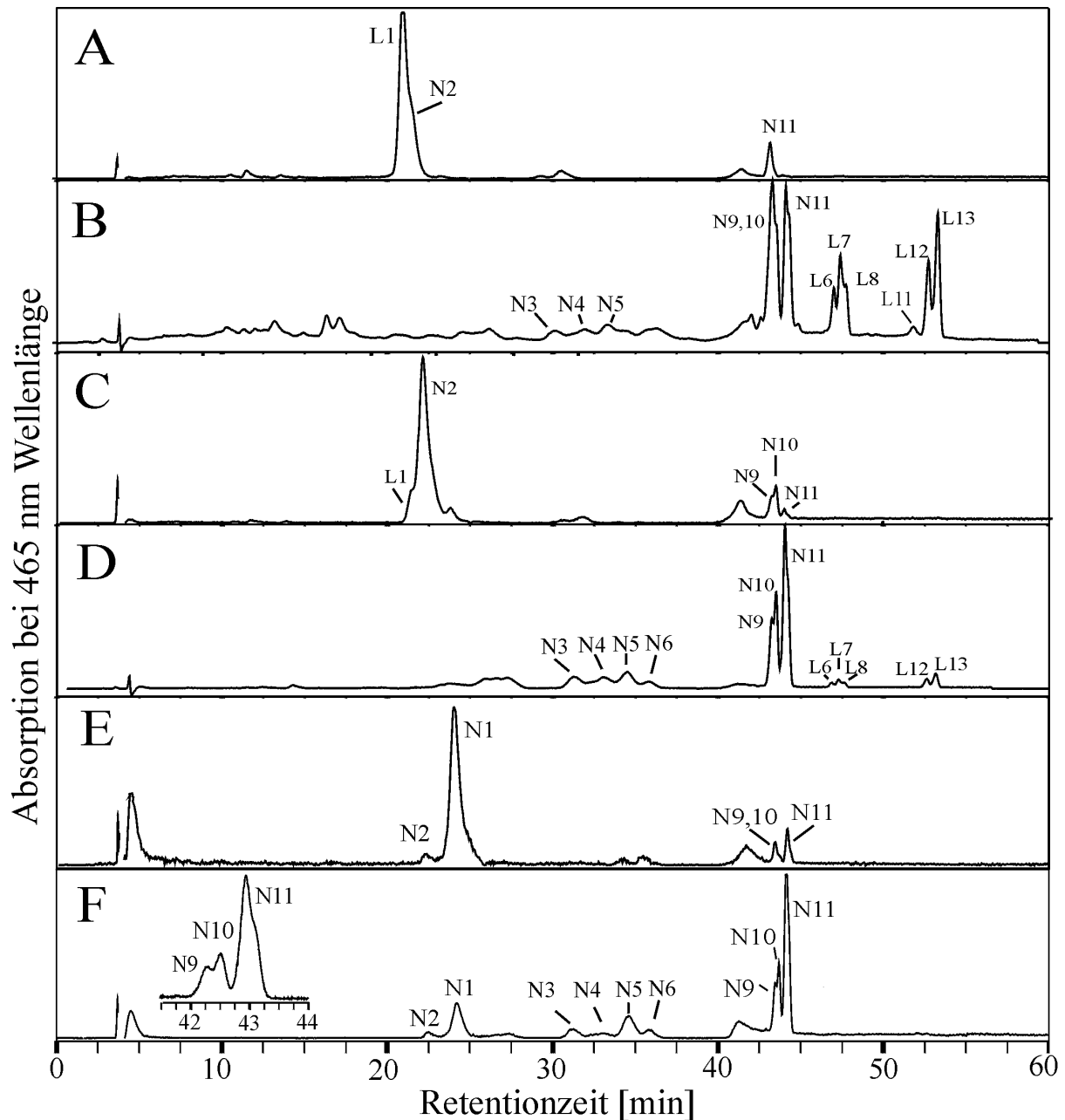
**Abbildung 3-12:** Co-Chromatographie des von der ZDS aus *Capsicum* gebildeten Prolycopins und Carotinoids N1 mit einem Proneurosporin-Standard (N2).

- (A) Prolycopin (L1), Proneurosporin (N2),  $\zeta$ -Carotin ( $\zeta$ 4), unbekanntes Carotinoid (N1) aus *Scenedesmus obliquus* C-6D. Proneurosporin wurde aus *Scenedesmus obliquus* C-6D über  $C_{30}$ -HPLC isoliert und anhand der spektralen Daten von Clough & Pattenden (1983) identifiziert.
- (B) Prolycopin und Carotinoid N1 aus einer funktionellen Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* mit der *Capsicum*-ZDS.
- (C) Co-Chromatographie des Proneurosporinstandards mit Prolycopin und dem Carotinoid N1 aus (B).
- (D) Spektren der Carotinoide aus (A) bis (C).

Prolycopin und Proneurosporin wurden nach Isolation über  $C_{30}$ -HPLC einer Photoisomerisierung unter Zusatz von Iod unterzogen. Aus einer mit Prolycopin angereicherten Fraktion wurden nach Isomerisierung mehrheitlich Lycopin- und ein Teil Neurosporin-Isomere gebildet (Abbildung 3-13, A und B). Eine mit Proneurosporin angereicherte Fraktion (C, 3-13), lieferte nach Isomerisierung mehrheitlich Neurosporin-Isomere (D, 3-13).

Aus dem Carotinoid N1 wurden durch die Isomerisierung ausschließlich Neurosporin-Isomere und keine Lycopin-Isomere gebildet, so daß es sich bei dem Carotinoid N1 um ein

cis-Neurosporin mit mehreren cis-Doppelbindungen, ähnlich dem Proneurosporin (7,9,9'-tricyclic-Neurosporin) handelt (Abbildung 3-13, F; Tabelle 3.13).



**Abbildung 3-13:** Identifikation von N1 als ein Neurosporin-Isomer über die Photoisomerisierung mit Iod.

**A:** Prolycopin (L1) und Proneurosporin (N2) aus *Scenedesmus obliquus* C-6D,

**B:** Isomerisierungsprodukte von Prolycopin und Proneurosporin,

**C:** Proneurosporin und geringe Mengen an Prolycopin.

**D:** Isomerisierungsprodukte aus C,

**E:** Carotinoid N1 isoliert aus den Desaturierungsprodukten der *Capsicum*-ZDS,

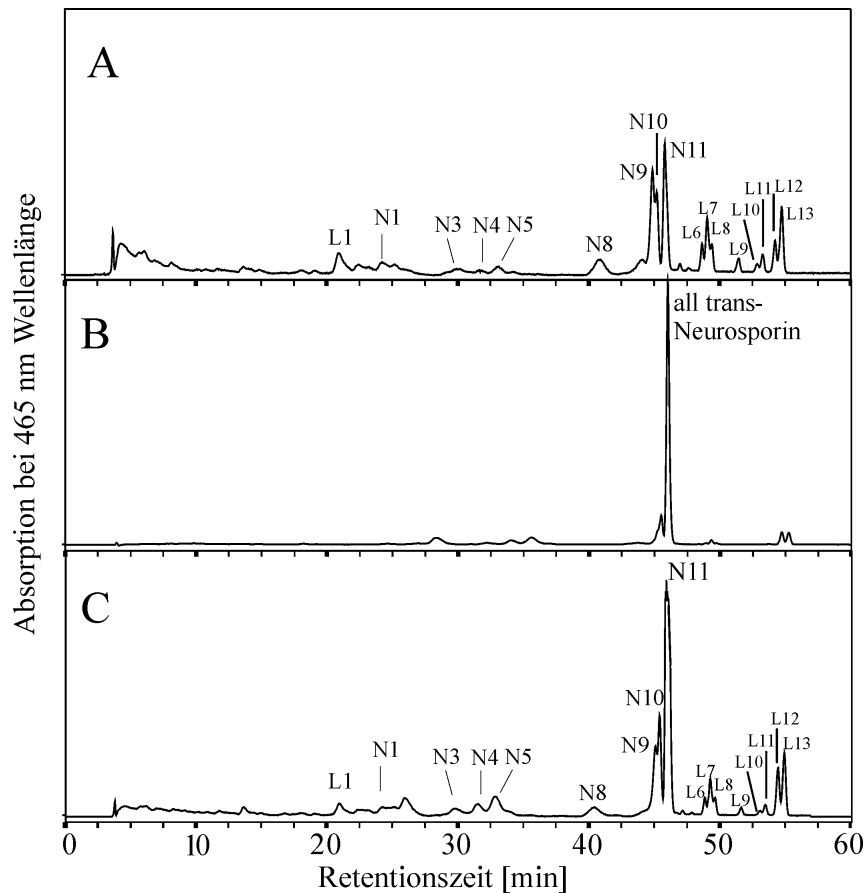
**F:** Neurosporinisomere entstanden aus der Photo-Isomerisierung von N1 mit Iod. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die sich teilweise überlagernden Neurosporinisomere N9,10 und N11 (all trans-Neurosporin).

**Tabelle 3.13:** Spektrale Daten und prozentuale Verteilung der durch Photo-Isomerisierung von Carotinoid N1, Proneurosporin (N2) und Prolycopin (L1) entstandenen Carotinoide. L1: Prolycopin, N2: Proneurosporin, N1: cis-Neurosporin, N: Neurosporin-isomere, L: Lycopinisomere, **Z**: cis-Konfiguration, **all E**: all trans-Konfiguration.

Carotinoid	Absorptionsmaximum [nm]				Verhältnis von		Prozentualer Anteil in							
	cis	I	II	III	cis/II	III/II	A	B	C	D	E	F		
L1 (7,9,7',9'Z)		416,	440,	469	0	0,710	69,3		4,6					
N2 (7,9,9'Z)		410,	433,	459	0	0,450	22,9		86,3		4,9	4,7		
N1 (Z)		408,	431,	456	0	0,400					80,1	25,8		
N3 (Z)	268,	320,	332,	412,	434,	463	0,132	0,941	2,6	0,8	7,1		4,2	
N4 "	268,	320,	332,	412,	435,	463	0,347	0,909	3,3	1,9	7,6		3,8	
N5 "	268,	320,	332,	413,	435,	463	0,110	0,919	2,4	3,1		8,0	10,3	
N6 "	268,	320,	332,	420,	444,	469	0,077	0,905			3,0		3,2	
N9 "		332,	417,	442,	470		0,079	0,911		12,7	2,3	10,1	4,0	7,5
N10 "		332,	418,	442,	470		0,075	0,978		4,3	3,1	13,0	3,7	8,7
N11 (all E)		332,	417,	441,	470		0,061	0,970	5,4	13,4	1,1	32,3	7,4	31,8
L6	285,295,346,362,440,467,497						0,143	0,882		8,6		2,6		
L7 (9 Z)	285,295,340,362,440,467,497						0,143	0,884		12,4		3,5		
L8 (5,9'Z)	285,295,346,362,440,467,497						0,139	0,904		5,9		2,1		
L11 (7 Z)	285, 295, 363, 445, 470, 500						0,090	0,840		3,8				
L12 (all E)	285, 295, 363, 446, 472, 504						0,069	0,905		11,9		4,3		
L13 (5 Z;5,5'Z)	285, 295, 363, 446, 472, 504						0,069	0,905		18,1		6,4		

#### 4.2.4. Identifikation von all trans-Neurosporin unter den Desaturierungsprodukten der *Capsicum*-ZDS durch Co-Chromatographie mit einem all trans-Neurosporin-Standard

Unter den Produkten der ZDS fanden sich 11 verschiedene Neurosporin-Isomere. Durch Co-Chromatographie eines Carotinoidextraktes aus *E. coli* JM101/pACCRT-EBP + pQE30zds (A) mit einem all trans-Neurosporin-Standard sollte dieses unter den 11 Neurosporin-Isomeren identifiziert werden. Als entsprechender Standard wurde ein Extrakt aus *E. coli* JM101/pACCRT-EBI<sub>RC</sub> mit einem hohen Anteil (71 %) an all trans-Neurosporin (B) (Raisig et al., 1996) verwendet. Der Elutionsgipfels des Carotinoids N11 wurde durch die Co-Chromatographie mit all trans-Neurosporin deutlich erhöht (Chromatogramm C). Weiterhin stimmen die spektralen Eigenschaften mit denen des all trans-Neurosporinstandards überein (Tabelle 3.11, 3.12). Das Neurosporin-Isomer N11 (Abbildung 3-14, A) ist daher all trans-Neurosporin.

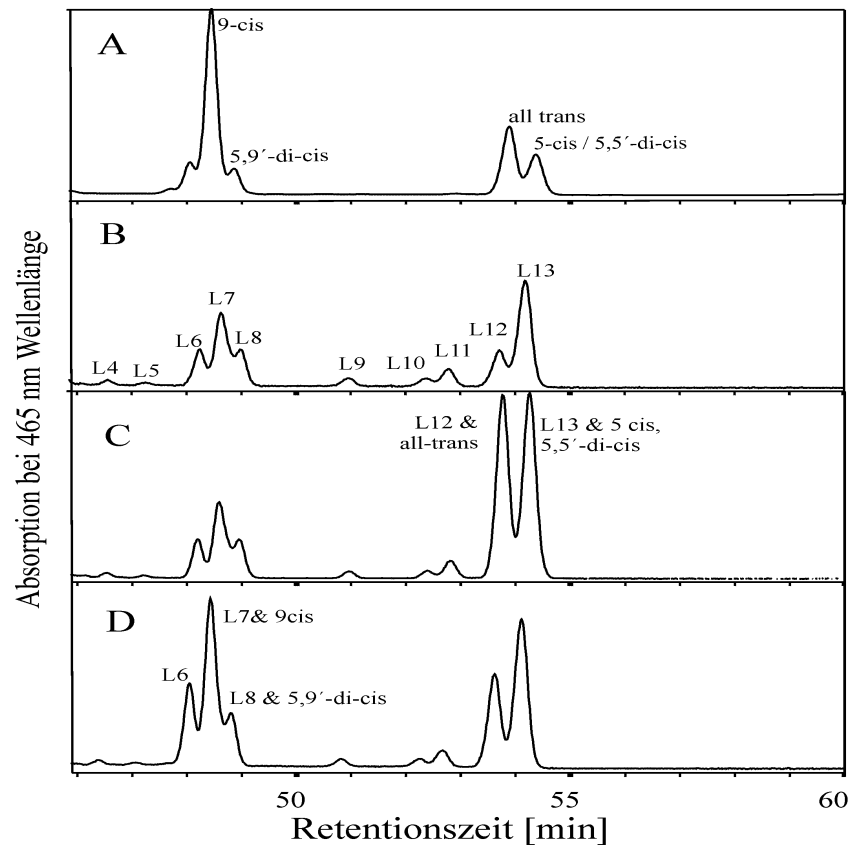


**Abbildung 3-14:** Identifikation von **all trans-Neurosporin** unter den Produkten der *Capsicum*-ZDS. Gezeigt ist die Co-Chromatographie von all trans-Neurosporin mit einem Extrakt der funktionellen Komplementation der Lycopinsynthese in *E. coli* mit der ZDS aus *Capsicum annum*. L: Lycopinisomere, N: Neurosporin-Isomere.  
 (A) Carotinoideextrakt aus JM101/pACCRT-EBP + pQE30zds.  
 (B) All trans-Neurosporin aus JM101/pACCRT-EBI<sub>RC</sub>.  
 (C) Co-Chromatographie der Extrakte aus A und B; der Neurosporin-Elutionsgipfel **N11** ist deutlich erhöht.

#### 4.2.5. Identifikation einzelner Lycopin-Isomere unter den Produkten der *Capsicum*-ZDS durch Co-Chromatographie mit einem Gemisch NMR-charakterisierter Lycopinisomere

Durch Co-Chromatographie des Carotinoideextraktes aus *E. coli* JM101/pACCRT-EBP + pQE30zds mit einem Gemisch über NMR-Spektroskopie charakterisierter Lycopinisomere (von BASF Ludwigshafen freundlicherweise zur Verfügung gestellt), konnte ein Teil der Lycopinisomere unter den Desaturierungsprodukten der *Capsicum*-ZDS identifiziert werden. So konnten unter all trans-, 5 cis-, 5,5' cis-, 5,9' cis- und 9 cis-Lycopin identifiziert werden (Abbildung 3-15).

Die Lycopinisomere L10 und L11, stimmten von ihren spektralen Eigenschaften her mit den von Hengartner et al. (1992) für 7 cis-Lycopin angegebenen Werten überein (Tabelle 3.12). Aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten kann angenommen werden, daß eine der beiden Verbindungen eine oder mehrere zusätzliche peripher gelegene cis-Bindungen besitzt.



**Abbildung 3-15:** Identifikation von all trans-, 9-cis-, 5,9'-dici-, 5-cis- und 5,5'-dici-Lycopin unter den Produkten der *Capsicum*-ZDS. Co-Chromatographie der durch die ZDS gebildeten Lycopinisomere mit einem Gemisch über NMR-Spektroskopie charakterisierter Lycopinisomere (BASF, Ludwigshafen).  
 A: Lycopinstandard (BASF),  
 B: Komplementierung JM101/pACCRT-EBP + pQE30zds,  
 C: Co-Chromatographie der Carotine aus B mit all trans-Lycopin und 5-cis-Lycopin/5,5'-di-cis-Lycopin aus A,  
 D: Co-Chromatographie der Carotine aus B mit 9-cis-Lycopin und 5,9'-di-cis-Lycopin aus A.

#### 4.3. Überprüfung der Extraktionsmethode auf die Isomerisierung von Carotinoiden

Unter den Desaturierungsprodukten der *Capsicum*-ZDS fanden sich 11 Lycopin- und 10 Neurosporin-Isomere. Ziel war es zu klären, ob alle Isomere enzymatischen Ursprungs sind oder Artefakte der Extraktionsmethode darstellen. Dazu wurden *E. coli* Zellen JM101/pACCRT-EBP + pQE30zds verschiedenen Extraktionsmethoden unterzogen.

Eine Extraktion erfolgte bei 25°C unter Verwendung von Aceton und eine weitere bei 60°C unter Verwendung von Methanol mit 6% Kaliumhydroxyd zur Verseifung vorhandener *E. coli*-Lipide. In Tabelle 3.14 sind die Mengen und die prozentuale Verteilung der extrahierten und über C<sub>30</sub>-HPLC quantifizierten Desaturierungsprodukte aufgelistet. Dabei zeigte sich die gleiche Anzahl der Carotinoidisomere und bis auf Prolycopin ungefähr die gleiche prozentuale Verteilung. Der Carotinoidextrakt aus der Methanolextraktion mit 6 %



Kaliumhydroxyd enthielt mehr Prolycopin (8,3 %) als der Acetonextrakt (4,1 %), d.h. Prolycopin wurde mit Methanol bei 60°C unter Verseifung der *E. coli*-Lipide besser extrahiert, als mit Aceton bei 25 °C. Eine Bildung von Prolycopin durch die Isomerisierung der anderen Lycopinisomere ist ausgeschlossen, da die Isomerisierung von Prolycopin zu anderen Lycopinisolomeren die energetisch begünstigte Reaktion darstellt. Der Vorteil der Extraktion bei 60°C unter Verseifung der Lipide zeigte sich in einem 7-fach höheren Gesamtcarotinoidgehalt des Carotinoidextraktes gegenüber der Extraktion bei 25°C mit Aceton.

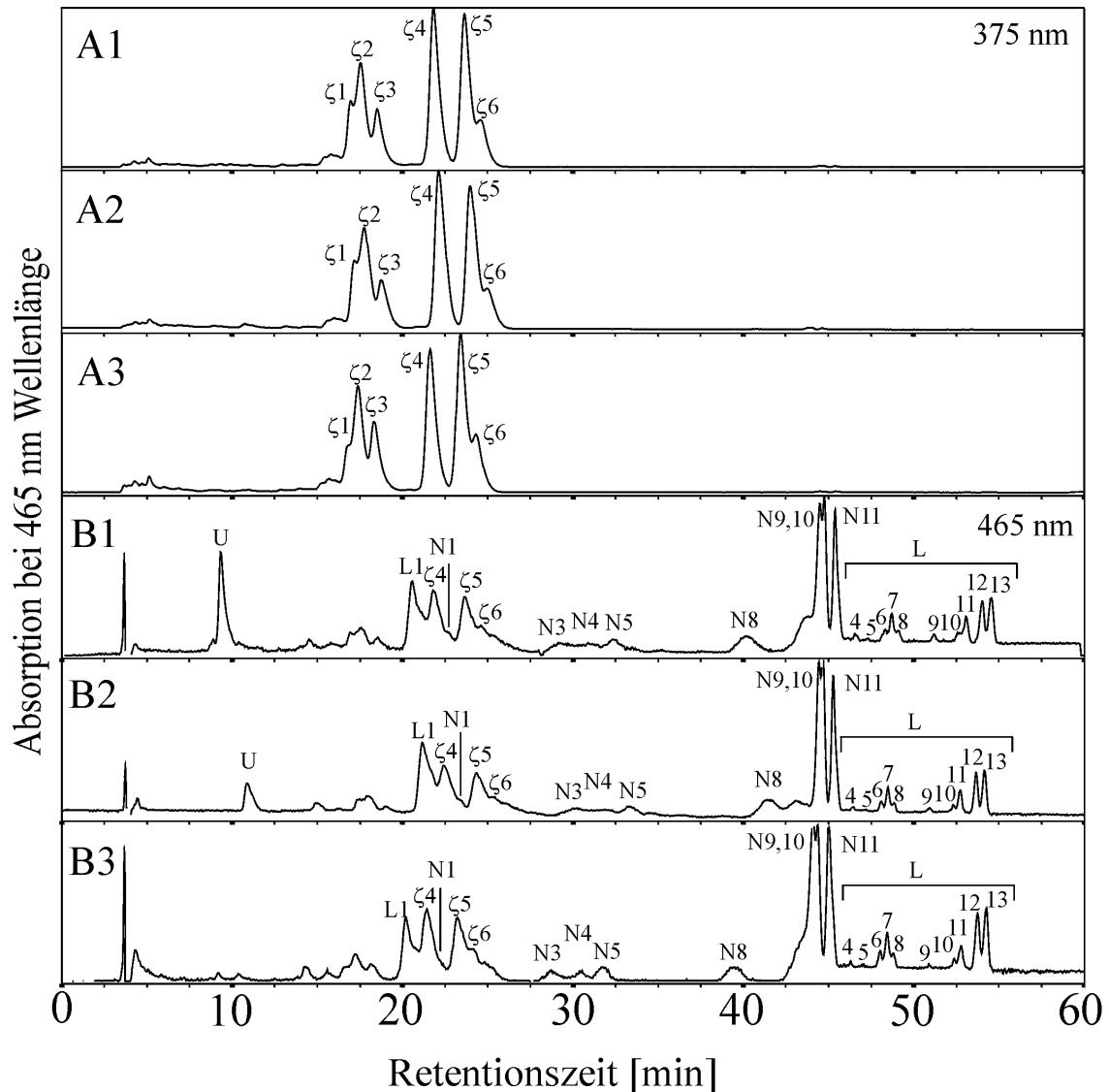
**Tabelle 3.14:** Untersuchung der Extraktionsmethode auf eine Isomerisierung der Produkte der *Capsicum*-ZDS (JM101/pACCRT-EBP + pQE30zds).

Carotinoid	Acetonextraktion bei 25°C Carotinoidmasse pro 100mg <i>E. coli</i> Trockenmasse [µg]	Prozentualer Anteil der Carotinoide	Methanolextraktion mit 6% KOH, 65°C Carotinoidmasse pro 100mg <i>E. coli</i> Trockenmasse [µg]	Prozentualer Anteil der Carotinoide
<b>N1 (cis)</b>	0,004	0,7	0,071	1,7
N3 (cis)	0,009	1,6	0,063	1,5
N4 "	0,010	1,7	0,094	2,3
N5 "	0,010	1,8	0,068	1,7
N6 "	0,005	0,9	0,029	0,7
N7 "	0,012	2,0	0,039	0,9
N8 "	0,038	6,6	0,224	5,5
N9 "	0,078	1,3	0,043	1,0
N10 "	0,079	13,6	0,591	14,4
N11 (all trans)	0,038	6,6	0,277	6,8
<b>L1 (7,9,7',9'-cis)</b>	0,024	4,1	0,341	8,3
L4	0,001	0,2	0,024	0,6
L5	0,001	0,2	0,020	0,5
L6	0,026	4,5	0,177	4,3
L7 (9 cis)	0,053	9,1	0,354	8,6
L8 (5,9'cis)	0,024	4,1	0,146	3,6
L9	0,001	0,2	0,024	0,6
L10	0,006	1,1	0,063	1,5
L11	0,012	2,1	0,104	2,5
L12 (all trans)	0,090	15,6	0,550	13,4
L13 (5; 5,5'cis)	0,128	22	0,797	19,5
<b>Summe</b>	<b>0,579</b>	<b>100</b>	<b>4,097</b>	<b>100</b>

Um den Einfluß der Extraktionstemperatur auf die Zusammensetzung der extrahierten Carotinoidisomere ohne Beeinflussung durch Kaliumhydroxid zu untersuchen, wurden die Zellen JM101/pACCRT-EBP+pQE30zds unmittelbar nach der Zellernte mechanisch aufgeschlossen und die Carotinoide sofort mit Aceton extrahiert. Die Acetonextraktionen wurden bei 60°C, 25°C und bei 25°C unter Zugabe des Antioxidants BHT (0,04 %) durchgeführt (Abbildung 3-16 und Tabelle 3-15).

Es ergaben sich nur geringe Unterschiede unter den prozentualen Anteilen der Carotinoidisomere bei Acetonextraktion mit 25°C oder 60°C (Tabelle 3.15, Abbildung 3-16).

Weiterhin konnten alle Carotinoidisomere identifiziert werden, die sich auch bei der Extraktion der gefriergetrockneten Zellen fanden (Tabelle 3.14). Die Extraktionstemperatur von 60°C führt demnach nicht zur deutlichen Isomerisierung der Carotinoidisomere. Die Zugabe des Antioxidants BHT veränderte nicht die Anzahl der Carotinoidisomere. Ein Elutionsgipfel (U), der in den Extrakten bei 25 °C Extraktionstemperatur auftrat besaß kein Carotinoidspektrum.



**Abbildung 3-16:** Untersuchung der Extraktionstemperatur bei Acetonextraktionen auf Isomerisierung der Produkte der *Capsicum*-ZDS (JM101/pACCRT-EBP + pQE30zds),  
 A1, B1 Extraktion mit Aceton bei 25°C  
 A2, B2 Extraktion mit Aceton bei 25°C unter Zugabe von 0,04 % BHT  
 A3, B3 Extraktion mit Aceton bei 60°C

**Tabelle 3.15:** Prozentuale Verteilung der extrahierten Carotinoide in Abhängigkeit der Extraktionstemperatur ( $\zeta$ :  $\zeta$ -Carotin-Isomere, L1: Prolycopin, N1: cis-Neurosporin, N: Neurosporin-Isomere, L: Lycopin-Isomere).

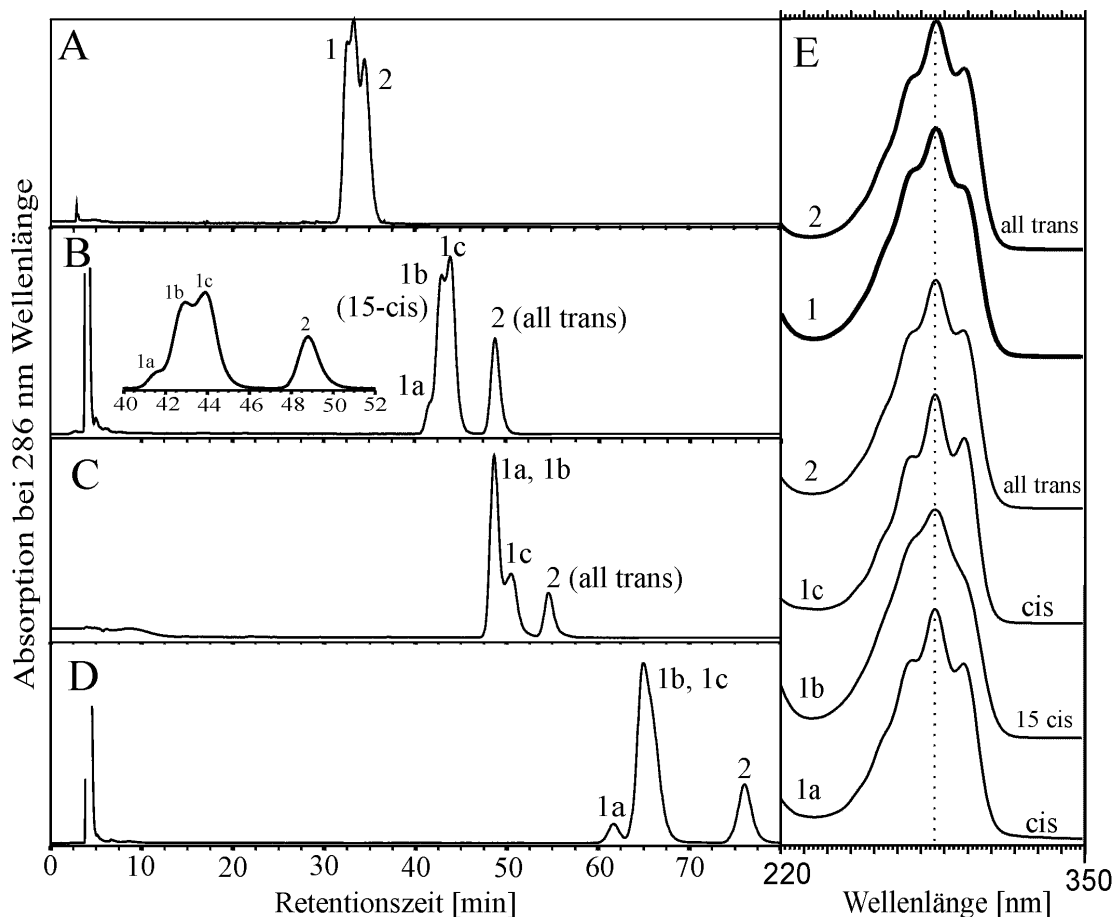
Carotinoid	A [%] (Extraktion bei 25 °C in Aceton)	B [%] (Extraktion bei 25°C in Aceton mit BHT)	C [%] (Extraktion bei 60°C in Aceton)
$\zeta$ 1, $\zeta$ 2	24,23	25,13	22,64
$\zeta$ 3	9,55	7,92	11,67
$\zeta$ 4 (9,9'-cis)	26,77	28,34	23,94
$\zeta$ 5	25,83	26,31	26,49
$\zeta$ 6 (all trans)	7,59	6,23	9,43
<b>N1 (cis)</b>	<b>0,28</b>	<b>0,18</b>	<b>0,23</b>
N3 (cis)	0,16	0,10	0,10
N4 "	0,16	0,14	0,08
N5 "	0,15	0,12	0,12
N6 "	0,04	0,03	0,01
N7 "	0,04	0,02	0,01
N8 "	0,23	0,31	0,15
N9 "	0,64	0,64	0,80
N10 "	0,45	0,57	0,43
N11 (all trans)	0,58	0,62	0,62
<b>L1 (7,9,7',9'-cis)</b>	<b>1,27</b>	<b>1,52</b>	<b>0,90</b>
L4	0,15	0,07	0,13
L5	0,08	0,08	0,13
L6	0,15	0,12	0,22
L7 (9cis)	0,26	0,24	0,33
L8 (5,9'-cis)	0,16	0,10	0,14
L9	0,12	0,11	0,09
L10 (7 cis)	0,13	0,11	0,14
L11 (7 cis)	0,22	0,23	0,22
L12 (all trans)	0,39	0,38	0,50
L13 (5-; 5,5'-di-cis)	0,37	0,39	0,49
<b>Summe [<math>\mu</math>g]</b>	<b>13,59</b>	<b>9,83</b>	<b>11,33</b>

#### 4.4. Nachweis neuer Phytoen-Isomere bei Trennung eines Carotinoidextraktes aus JM101/pACCRT-EB über C<sub>30</sub>-HPLC

Es stellte sich die Frage nach der Herkunft der beobachteten Isomere. Es sollte geklärt werden, wo die cis-Doppelbindungen der Isomere enzymatisch gebildet werden. Bei Komplementierung einer GGPP-Synthase und eine Phytoen-Synthase aus *Erwinia uredovora*, sowie einer 2-Schritt Phytoendesaturase aus *Synechococcus* konnte die Bildung von 6 verschiedenen  $\zeta$ -Carotin-Isomere nachgewiesen werden. Es stellte sich daher die Frage ob alle cis-Doppelbindungen bei Desaturierung von Phytoen zu  $\zeta$ -Carotin entstanden sind, oder mehrere cis-Doppelbindungen bereits beim Phytoen vorlagen. Bei Vorhandensein mehrerer Phytoenisomere würde zumindest ein Teil dieser cis-Doppelbindungen bereits bei der Phytoensynthese durch die GGPP- und Phytoensynthase entstehen. Phytoen, das durch die heterologe Expression der GGPP-Synthase und Phytoensynthase aus *Erwinia uredovora* in *E. coli* JM101/pACCRT-EB gebildet wurde, konnte über C<sub>18</sub>-HPLC in zwei Phytoenisomere getrennt werden. Durch Vergleich der Elutionsreihenfolge und der Spektren mit den von

Neudert et al. (1998) angegebenen Daten, handelt es sich um 15-cis-Phytoen mit der kürzeren und all trans-Phytoen mit der längeren Retentionszeit.

Der gleiche Phytoen-Extrakt wurde über C<sub>30</sub>-HPLC aufgetrennt. Dadurch wurde es möglich, Phytoen in 4 verschiedene Isomere aufzutrennen. Über den Vergleich der spektralen Daten mit denen von Clough & Pattenden (1983) für 15-cis-Phytoen (über NMR-Spektroskopie charakterisiert) angegebenen Daten konnte das Isomer 1b als **15-cis-Phytoen** identifiziert werden (Tabelle 3.16). Aufgrund der längsten Retentionszeit handelt es sich bei dem Isomer 2 um **all trans-Phytoen (2)**. Die Phytoenisomere **1a** und **1c** konnten weder der 15-cis- noch der all trans-Konfiguration zugeordnet werden. Die Bildung mehrerer cis-Doppelbindungen, bzw. mehrerer Isomere kann demnach bereits bei der Synthese von Phytoen durch die GGPP-Synthase oder die Phytoensynthase erfolgen.



**Abbildung 3-17:** Nachweis von 4 Phytoenisomere in einem Phytoenextrakt aus *E. coli* JM101/pACCRT-EB. Die Auftrennung über C<sub>30</sub>-HPLC zeigt zwei in der Literatur bisher nicht beschriebene Phytoenisomere (1a und 1c).

A: C<sub>18</sub>-HPLC-Chromatogramm, Laufmittel Acetonitril:Methanol:2-Propanol=85:10:5.

B: C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramm, 26°C Säulentemperatur, Laufm. 25% MTBE.

C: C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramm, 45°C Säulentemperatur, Laufm. 15% MTBE.

D: C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramm, 11°C Säulentemperatur, Laufm. 15% MTBE.

E: Spektren der Phytoenisomere, die Spektren des Chromatogramms A sind fett markiert.

**Tabelle 3.16:** Phytoenisomere aus einer funktionellen Komplementierung der Phytoensynthese in *E. coli* nach Auftrennung über C<sub>30</sub>-HPLC (Laufmittelsystem 15% MTBE). Die relativen Anteile wurden aus den Chromatogrammen C und D der Abbildung 3-17 berechnet.

Phytoenisomer	Retentionszeit [Min.]	Ratio II/III	Ratio I/II	rel.Anteil [%]	Absorptionsmaxima [nm]		
					I	II	III
1a	41,6	0,76	0,76	5,1	276, 286, 298		
1b (15 cis-Phytoen)	42,9	0,73	0,84	47,0	276, 286, 296		
1c	43,7	0,83	0,74	28,8	276, 286, 298		
2 (all trans)	48,7	0,78	0,78	19,2	276, 286, 298		
15 cis-Phytoen (Daten aus Clough & Pattenden, 1983)	-	0,73	0,82	-	276, 286, 296		

#### 4.5. Bildung von $\zeta$ -Carotin-Isomere in Abhängigkeit der bei Komplementierung in *E. coli* verwendeten GGPP-Synthasen (*crtE*) verschiedener Organismen

In einem Carotinoidextrakt aus JM101/pACCRT-EBP wurden 6 verschiedene  $\zeta$ -Carotin-Isomere nachgewiesen. Bei Phytoen, der Synthesevorstufe von  $\zeta$ -Carotin, wurden 4 verschiedene Phytoen-Isomere nachgewiesen. Die Phytoenbildung wird von zwei Enzymen katalysiert, der Phytoensynthese (CrtB) und der GGPP-Synthase (CrtE). Die GGPP-Synthase ist bei der Synthese von Phytoen bei der Bildung von sechs Doppelbindungen beteiligt (Position 5, 5', 9, 9', 13 und 13').

Es ergab sich die Fragestellung, ob die Bildung der 6- $\zeta$ -Carotinisomere nur bei Komplementierungen mit der GGPP-Synthase aus *Erwinia uredovora* oder auch bei Komplementierungen mit GGPP-Synthasen aus anderen Organismen erfolgt. Dazu wurden die Komplementierungen der GGPP-Synthasen verschiedener Organismen zusammen mit der Phytoensynthese und der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 zur Bildung von  $\zeta$ -Carotin durchgeführt.

Die prozentuale Verteilung der in *E. coli* gebildeten  $\zeta$ -Carotin-Isomere bei Komplementierung der Phytoendesaturase und Phytoensynthese aus *Synechococcus* PCC 7942 mit GGPP-Synthasen verschiedener Organismen sind in Tabelle 3.17 aufgeführt. In allen Komplementierungen wurden 6  $\zeta$ -Carotin-Isomere gebildet, unabhängig vom Herkunftsorganismus der GGPP-Synthase. Ein Unterschied ergab sich nur in einer geringfügig unterschiedlichen Verteilung. In keiner der Komplementierungen wurde allein all trans- $\zeta$ -Carotin (Isomer 6) gefunden.

**Tabelle 3.17:**  $\zeta$ -Carotin-Isomere in *E. coli* in Abhängigkeit der bei funktioneller Komplementierung der  $\zeta$ -Carotin-Synthese verwendeten GGPP-Synthase. Die GGPP-Synthase aus *Erwinia* (Kontrolle) wurde mit der Phytoensynthese aus *Erwinia* und der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* in *E.coli* co-transformiert. Die GGPP-Synthasen der anderen Organismen wurden mit der Phytoensynthese und Phytoendesaturase aus *Synechococcus* in *E. coli* co-transformiert.

GGPP-Synthase aus	Isomer $\zeta$ 1 [%]	Isomer $\zeta$ 2 [%]	Isomer $\zeta$ 3 [%]	Isomer $\zeta$ 4 (9,9'-cis) [%]	Isomer $\zeta$ 5 [%]	Isomer $\zeta$ 6 (all trans) [%]
<i>Erwinia uredovora</i> (Kontrolle)	3,2	9,1	12,4	16,0	35,5	23,6
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	5,7	16,0	8,1	29,6	31,8	8,8
<i>Neurospora crassa</i>	9,0	9,0	6,4	30,8	32,2	10,9
<i>Capsicum annuum</i>	7,6	11,0	7,4	26,6	33,6	13,9
<i>Gentiana lutea</i>	16,4	12,3	8,0	22,4	30,8	10,1

## 5. Biochemische Eigenschaften der $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum annuum*, *Synechocystis* sp. 6803 und der Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* sp. 7942 und *Gentiana lutea*

### 5.1. Umsatz verschiedener $\zeta$ -Carotin-Isomere durch die ZDS bei *in vitro*-Aktivitätstests

Ziel der Untersuchung war es festzustellen, welche  $\zeta$ -Carotin-Isomere die Substrate der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase darstellen und welche Produkte aus ihnen hervorgehen. Vor allem sollte geklärt werden, aus welchem  $\zeta$ -Carotin-Isomer Prolycopin (7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin) gebildet wird.

Es wurden dazu 3  $\zeta$ -Carotinfractionen mit unterschiedlichen Anteilen an Isomeren in den *in vitro*-Aktivitätstests als Substrat für die *Capsicum*-ZDS verwendet (Tabelle 3.18). Die  $\zeta$ -Carotinfractionen wurden durch Trennung eines  $\zeta$ -Carotin-Extraktes aus JM101/pACCRT-EBP über C<sub>18</sub>-HPLC (15 % B) gewonnen. Die *in vitro*-Enzymreaktion wurde mit der über Ammoniumsulfat aus dem Zellüberstand von JM101/pQE30zds präzipitierten ZDS bei pH 5,8 und pH 7,2 durchgeführt. Die Abbildung 3-18 zeigt die C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramme der  $\zeta$ -Carotin-Substratisomere als Ausschnittsvergrößerungen in den Chromatogrammen A1 bis D1 und die der gebildeten Produkte (Chromatogramme A1 bis D1 (pH 5,8), A2 bis D2 (pH 7,2)).

Unter Verwendung des  $\zeta$ -Carotin-Gesamtextraktes aus JM101/pACCRT-EBP (Tabelle 3.18, Fraktion A) als Substrat der ZDS, wurden bei dem pH-Wert von 5,8 neben Prolycopin (26,4 %), dem Neurosporin N1 (14,4 %), all trans-Neurosporin (N11, 10,9 %) und all trans-Lycopin (L12, 6,0 %) geringe Mengen weiterer Neurosporin- und Lycopin-Isomere gebildet

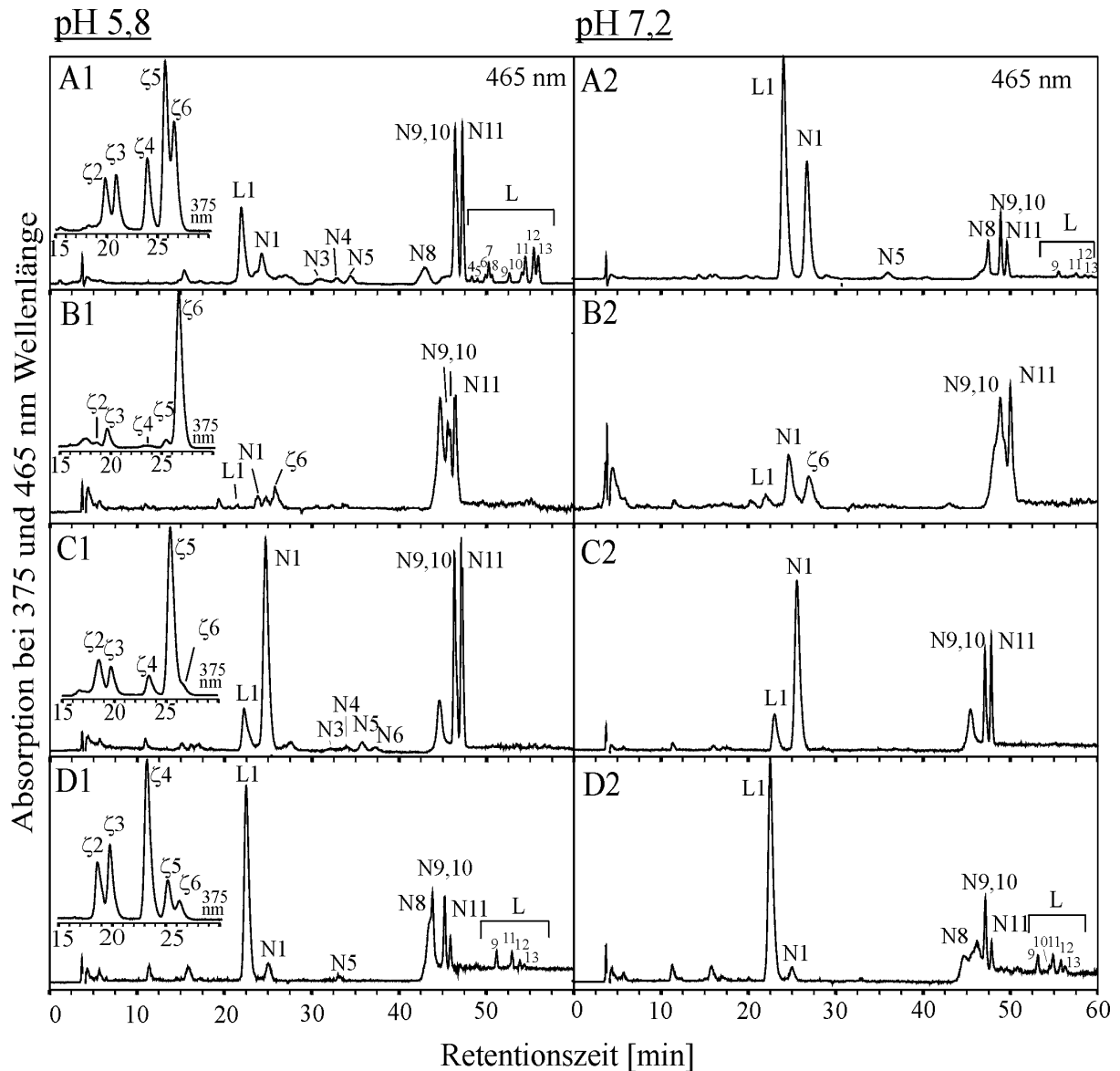
(Tabelle 3.19). Bei Durchführung des *in vitro*-Aktivitätstest bei dem pH-Wert 7,2 stellten **Prolycopin** und das **Neurosporin-Isomer N1** mit einem Anteil von 55,7 % und 30,6 % die **Hauptprodukte der ZDS aus *Capsicum*** dar (A, Tabelle 3.19; A2, Abbildung 3.18). Der prozentuale Anteil aller anderen Neurosporin- und Lycopin-Isomere war dagegen gering. Die spezifische Aktivität der ZDS war bei dem pH-Wert 7,2 mit 0,26 µg/(h\*mg) höher als bei dem pH-Wert 5,8 mit 0,21 µg/(h\*mg).

Aus der mit all **trans-ζ-Carotin** (81,2 %) angereicherten Substratfraktion **B** entstanden bei dem pH-Wert 5,8 all trans Neurosporin (40,2 %, N11), sowie die Neurosporinisomere N10 (18,0 %) und N11 (22,9 %). Prolycopin und das Neurosporin-Isomer N1 wurden nur zu 4,4 % und 14,6 % gebildet. Bei dem pH-Wert 7,2 erhöhte sich der Anteil des Neurosporin-Isomers N1 auf 37,4 % und des Prolycopins auf 10,0 %. Die spezifische Aktivität der ZDS war unter Verwendung von all trans-ζ-Carotin als Substrat um einen Faktor 4 bis 5 geringer als unter Verwendung der Substratfraktionen C und D (Tabelle 3.19).

Unter Einsatz der ζ-Carotin-Substrat-Fraktion **C** mit 64,4 % Anteil an **Isomer 5** wurde als Hauptprodukt sowohl bei pH 5,8, als auch bei pH 7,2 das **Neurosporin-Isomer N1** mit 52,4, bzw. 60,4 % Anteil an den Produkten gebildet. Andere Lycopin-Isomere als Prolycopin waren nicht nachweisbar.

Aus der ζ-Carotin-Substrat-Fraktion **D** mit 45,6 % Anteil an **Isomer 4**, wurde **Prolycopin** als Hauptprodukt mit einem Anteil von 64,4 % bei pH 5,8 und 69,9 % bei pH 7,2 gebildet. Gegenüber der Verwendung der Substratfraktionen B und C wurden zusätzlich die Lycopin-Isomere L9, L10 (7cis), L12 (all trans) und L13 (5 cis; 5,5'-di-cis) gebildet.

Die höchste spezifische Aktivitäten der ZDS wurden unter Einsatz der ζ-Carotin-Substrat-Fractionen C (64,4 % Isomer 5) und D (45,6 % Isomer 4) gemessen (Tabelle 3.19). Demzufolge ist die Konfiguration der ζ-Carotin-Isomere 5 und 4 für die Desaturierungsreaktion notwendig. Allein das ζ-Carotin-Isomer 4 besitzt die geeignete Konfiguration, um die 2 Desaturierungsschritte bis zum Lycopin (7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin, Prolycopin) durch die ZDS zu ermöglichen. Das ζ-Carotin-Isomer 5 besitzt dagegen eine Konfiguration, die nur einen Desaturierungsschritt zu dem Neurosporin-Isomer N1 erlaubt. All trans-ζ-Carotin wird aufgrund seiner Konfiguration kaum desaturiert.



**Abbildung 3-18:** Produkte der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* in Abhängigkeit der als Substrat verwendeten  $\zeta$ -Carotin-Isomere. Dargestellt sind die  $C_{30}$ -HPLC-Chromatogramme der Produkte und des Substrats.

**A1-D1:** Desaturierungsprodukte bei **pH 5,9**;

die Ausschnitte links zeigen die  $C_{30}$ -HPLC-Chromatogramme der  $\zeta$ -Carotin-Substrat-Isomere gemessen bei 375 nm Wellenlänge.

**A2-D2:** Desaturierungsprodukte bei **pH 7,2**.

**$\zeta$ -Carotin-Substrate:**

**A1,2:**  $\zeta$ -Carotin-Gesamtextrakt aus *E. coli* JM101/pACCRT-EBP,

**B1,2:** Isomer 6 (all trans- $\zeta$ -Carotin) angereicherte Fraktion,

**C1,2:** Isomer 5 angereicherte  $\zeta$ -Carotin-Fraktion,

**D1,2:** Isomer 4 (9,9'-cis- $\zeta$ -Carotin) angereicherte  $\zeta$ -Carotin-Fraktion.

Die verwendete  $\zeta$ -Carotin-Fraktion D, aus der Prolycopin als Hauptprodukt gebildet wurde, enthielt noch Anteile der  $\zeta$ -Carotin-Isomere 2 und 3. Es wurde der zeitliche Verlauf der Menge der  $\zeta$ -Carotin-Isomere gemessen, um zu untersuchen, ob die Konzentration der  $\zeta$ -Carotin-Isomere 2 und 3 zeitlich abnahm. Ziel war es zu klären, ob durch die Desaturierung



der Isomere 2 oder 3 Prolycopin gebildet wird, und nicht durch Desaturierung des  $\zeta$ -Carotin-Isomers 4.

**Tabelle 3.18:**  $\zeta$ -Carotin-Substratfraktionen mit unterschiedlichen Anteilen an Isomeren. Der höchste Wert ist unterstrichen.

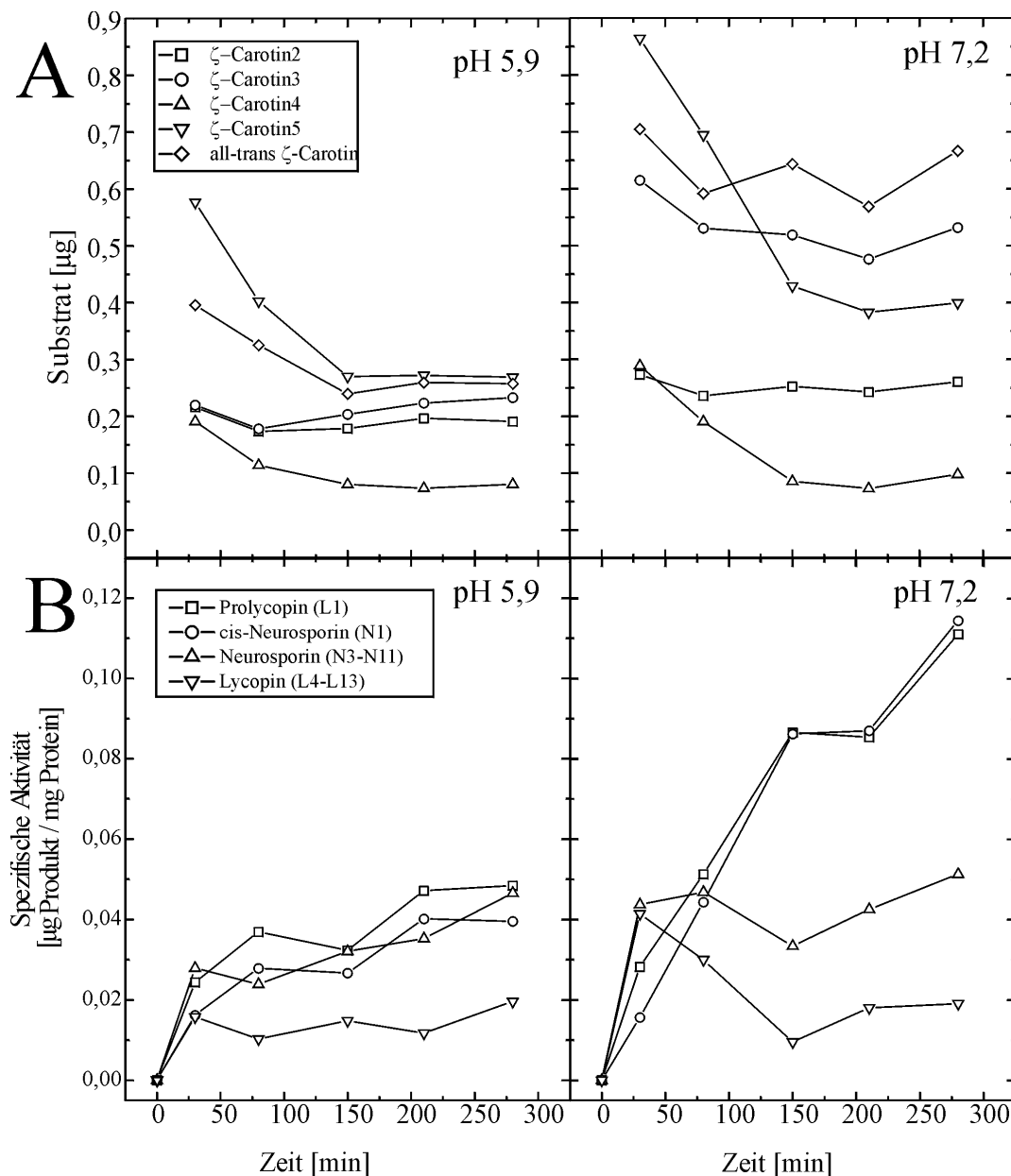
Isomer (Elutionsgipfel)	Verteilung der $\zeta$ -Carotin-Substrat-Isomere in Fraktion			
	A (Gesamtextrakt) [%]	B [%]	C [%]	D [%]
2	12,6	2,9	15,2	17,3
3	12,4	9,3	10,2	20,0
4	16,0	2,4	7,4	<u>45,6</u>
5	<u>35,5</u>	4,1	<u>64,4</u>	11,3
6 (all trans- $\zeta$ -Carotin)	<u>23,6</u>	<u>81,2</u>	2,6	5,8

**Tabelle 3.19:** Prozentuale Zusammensetzung der Produkte der *Capsicum*-ZDS in Abhängigkeit der  $\zeta$ -Carotin-Substrat-Isomere. Vom  $\zeta$ -Carotin-Gesamtextrakt (A) wurden 5  $\mu\text{g}$ , von den anderen  $\zeta$ -Carotin-Fractionen 2  $\mu\text{g}$  als Substrat eingesetzt. N: Neurosporin, L: Lycopin.

Carotinoid	Verteilung der Produkte der ZDS unter Verwendung der Substrat-Fraktion und den pH-Werte							
	A		B		C		D	
	pH 5,8 [%]	pH 7,2 [%]	pH 5,8 [%]	pH 7,2 [%]	pH 5,8 [%]	pH 7,2 [%]	pH 5,8 [%]	pH 7,2 [%]
<b>N1 (Z)</b>	<b>14,4</b>	<b>30,6</b>	<b>14,6</b>	<b>37,4</b>	<b>52,4</b>	<b>60,4</b>	<b>6,1</b>	<b>5,0</b>
N3 "	1,9	0,2			0,8			
N4 "	1,3	1,2			1,4			
N5 "	1,6	0,2			1,8		0,8	
N6 "	0,2	0,4			0,8			
N7 "	0,1							
N8 "	4,6	3,8						5,6
N9 "	11,6	3,1	22,9	25,5	10,4	9,2	10,7	5,5
N10 "	4,3	0,7	18,0	8,6	2,9	1,6	6,9	0,7
<b>N11 (all E)</b>	10,9	2,1	40,2	18,5	16,0	10,9	2,7	2,0
<b>L1 (7,7',9,9'Z)</b>	<b>26,4</b>	<b>55,7</b>	<b>4,4</b>	<b>10,0</b>	<b>13,5</b>	<b>17,9</b>	<b>64,4</b>	<b>69,6</b>
L4	0,7							
L5	0,3							
L6	1,0							
L7 (9Z)	2,7							
L8 (5,9' cis)	0,8							
L9	1,4	0,7					2,7	3,3
L10 (7Z)	1,8	0,2					0,6	1,2
L11 (7Z)	3,8	0,5					2,9	3,4
<b>L12 (all E)</b>	6,0	0,3					1,3	2,4
L13 (5Z; 5,5'Z)	4,1	0,2					0,9	1,3
<b>Spezifische Aktivität [<math>\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})</math>] bezogen auf Gesamtprotein</b>	<b>0,208</b>	<b>0,261</b>	<b>0,007</b>	<b>0,013</b>	<b>0,037</b>	<b>0,062</b>	<b>0,039</b>	<b>0,057</b>

Es wurde zwei Meßreihen bestehend aus jeweils 5 Einzelmessungen durchgeführt. Eine Meßreihe wurde bei einem pH-Wert *in vitro* von 5,9 durchgeführt, die andere mit einem pH-Wert von 7,2 (10  $\mu\text{M}$  Decylplastochinon, 25  $\mu\text{l}$  Phosphatidylcholin-Emulsion (100 mg/ml), 5  $\mu\text{g}$   $\zeta$ -Carotin, 500  $\mu\text{l}$  Zellüberstand aus JM101/pQE30zds).

In Abbildung 3-19 ist die zeitliche Bildung der Desaturierungsprodukte durch die *Capsicum*-ZDS und die Abnahme der  $\zeta$ -Carotin-Isomere dargestellt. Es zeigte sich vor allem bei pH 7,2 eine Abnahme der  $\zeta$ -Carotin-Isomere 4 und 5 bei gleichzeitiger Bildung von Prolycopin (L1) und dem Neurosporin-Isomer (N1). Die Menge der  $\zeta$ -Carotin-Isomere 2 und 3 nahm dagegen kaum ab. Dies zeigt, daß die Bildung von Prolycopin durch die Desaturierung des  $\zeta$ -Carotin-Isomers 4 erfolgt und nicht durch die Desaturierung der  $\zeta$ -Carotin-Isomere 2 oder 3.



**Abbildung 3-19:** Zeitlicher Verlauf des Umsatzes der  $\zeta$ -Carotin-Isomere 2 bis 5 bei *in vitro*-Aktivitätstests der *Capsicum*-ZDS.

A: Abnahme der  $\zeta$ -Carotinmenge bei den pH-Werten 5,9 und 7,2.

B: Produkte der ZDS bei den pH-Werten 5,9 und 7,2.

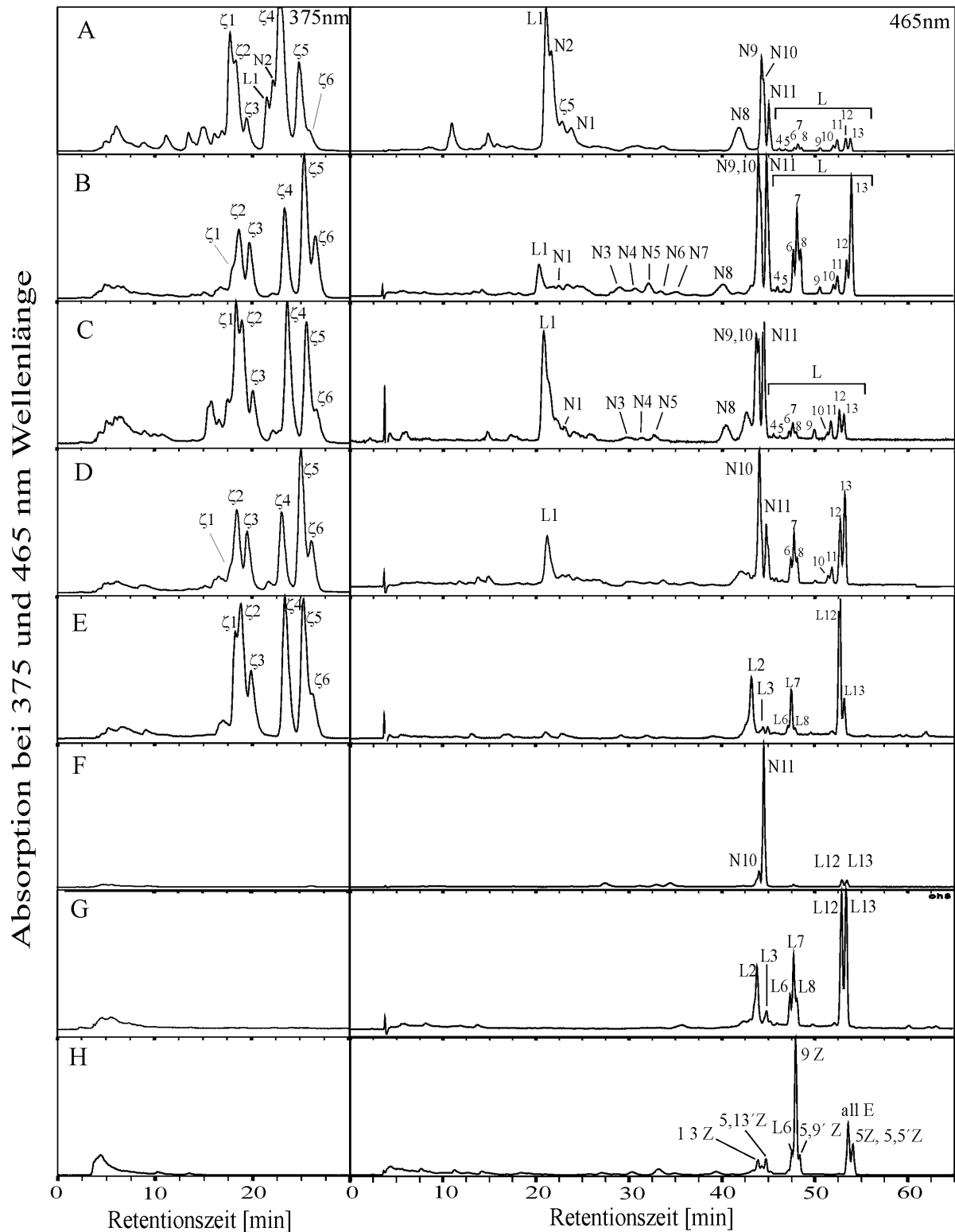
## 5.2. Vergleich der in *E. coli* durch die *Capsicum*-ZDS gebildeten Carotinoide mit den Produkten anderer $\zeta$ -Carotin- und Phytoendesaturasen

Ziel war es, die Produkte der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum* und aus *Synechocystis* (pds-Typ) mit denen der phylogenetisch nicht verwandten  $\zeta$ -Carotindesaturase aus *Anabaena* sp. PCC 7120 (*crtI*-Typ) und der bakteriellen Phytoendesaturasen aus *Rhodobacter capsulatus* (katalysiert im wesentlichen 3 Desaturaseschritte), *Erwinia uredovora* (katalysiert 4 Desaturaseschritte) zu vergleichen. Ein Carotinoid-Extrakt aus der Grünalgen-Mutante *Scenedesmus obliquus* C-6D diente als Standard für die poly-cis-Carotinoide. Die  $\zeta$ -Carotin- und Phytoendesaturasen wurden zur funktionellen Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* verwendet.

In der Abbildung 3-20 sind links die  $C_{30}$ -HPLC-Chromatogramme der Carotinoidextrakte bei 375 nm Wellenlänge mit den vorhandenen  $\zeta$ -Carotinisomeren, rechts davon die Chromatogramme der Desaturierungsprodukte, gemessen bei 465 nm dargestellt. Die Art und Anzahl der Desaturierungsprodukte bei Komplementierung in *E. coli* ist unabhängig davon, ob die *Capsicum*-ZDS mit der *Capsicum*-Phytoendesaturase (C) oder der *Synechococcus*-Phytoendesaturase (B) komplementiert wird. In beiden Komplementierungen kommt es zur Bildung von Prolycopin. Die ZDS aus *Synechocystis* (D), die eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz mit der ZDS aus *Capsicum* aufweist (64 % identische, 78 % ähnliche Aminosäuren), katalysierte wie die *Capsicum*-ZDS die Bildung von Prolycopin. Weiterhin wurden die gleichen Desaturierungsprodukte wie die der *Capsicum*-ZDS nachgewiesen.

Die ZDS aus *Anabaena* sp. PCC 7120, die eine Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz der bakteriellen Phytoendesaturasen besitzt (Sandmann, 1994), bildete dagegen kein Prolycopin (E). Es entstanden dagegen die gleichen Lycopinisomere (L2, L3, L6, L7, L8, L12 und L13) wie bei der Desaturierung von Phytoen durch die bakterielle Phytoendesaturase aus *Erwinia uredovora* (G). Ebenso fand sich nicht das Intermediat Neurosporin unter den Desaturierungsprodukten der *Anabaena*-ZDS. Es traten zwei zusätzliche Lycopinisomere (13-cis (L2), 5,13'-cis (L3)) auf. Diese Lycopinisomere konnten bei den Komplementierungen B und C mit der *Capsicum*-ZDS nicht nachgewiesen werden. Gegenüber der Komplementierung mit der *Capsicum*-ZDS trat bei der ZDS aus *Anabaena* in Spuren zusätzlich ein Dehydrolycopinisomer auf, das sich ebenfalls unter den Desaturierungsprodukten der bakteriellen Phytoendesaturase aus *Erwinia uredovora* fand.

Bei funktioneller Komplementation der Lycopinsynthese in *E. coli* mit der Phytoendesaturase aus *Rhodobacter capsulatus*, die im wesentlichen 3 Desaturaseschritte durchführt, wurde all trans-Neurosporin (N11) mit dem größten prozentualen Anteil unter den Carotinoiden gebildet (71,0 %). Andere Neurosporin-Isomere waren nur in geringen Anteilen vorhanden und es wurden geringe Mengen an Lycopin (L12, L13) gebildet. Prolycopin konnte bei keiner der Komplementierungen mit den Desaturasen aus *Anabaena*, *Rhodobacter capsulatus* oder *Erwinia uredovora* nachgewiesen werden.  $\zeta$ -Carotin, als ein Intermediat der Desaturierung von Phytoen durch die Phytoendesaturasen aus *Erwinia* oder *Rhodobacter*, konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 3-20:** C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramme der Carotinoidextrakte aus den funktionellen Komplementierungen der Lycopin-Synthese in *E. coli* mit pflanzlichen (B, C) und cyanobakteriellen (D, E)  $\zeta$ -Carotin-, sowie bakteriellen Phytoen- Desaturasen (F, G). A: Carotinoidextrakt aus der Grünalgenmutante *Scendesmus obliquus* C-6D, B: *Capsicum annuum* ZDS, C: *Capsicum annuum* ZDS und PDS, D: *Synechocystis* sp. PCC 6803 CrtQb, E: *Anabaena* sp. PCC 7120 CtrQa, F: *Rhodobacter capsulatus* Phytoendesaturase CrtI, G: *Erwinia uredovora* Phytoendesaturase CrtI, H: Lycopinstandard (BASF, Ludwigshafen). L: Lycopin-Isomere, N: Neurosporin-isomere,  $\zeta$ :  $\zeta$ -Carotin-Isomere, L1: 7,9,7',9'-tetracis-Lycopin, N2: 7,9,9'-cis-Neurosporin. Z: cis-Konfiguration, E: trans-Konfiguration.

**Tabelle 3.20:** Bei funktioneller Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* gebildete Carotinoide. Alle Komplementierungen enthielten neben der GGPP-Synthese und der Phytoensynthese aus *Erwinia uredovora* zusätzlich die unter B bis F angegebenen Desaturasen. Angegeben sind der relative Anteil des einzelnen Carotinoids in % und das Verhältniss der Absorption der cis-Bande zum Hauptmaximum in Prozent.

A: Carotinoidextrakt aus *Scenedesmus obliquus* C-6D,

B: *Capsicum annuum*- $\zeta$ -Carotin-Desaturase, *Synechococcus*-Phytoendesaturase,

C: *Capsicum annuum*- $\zeta$ -Carotin-Desaturase, *Capsicum annuum*-Phytoendesaturase,

D: *Anabaena* sp. PCC 7120  $\zeta$ -Carotin-Desaturase, *Synechococcus*-Phytoendesaturase,

E: *Rhodobacter capsulatus*-Phytoendesaturase,

F: *Erwinia uredovora*-Phytoendesaturase,

G: Lycopingemisch von teilweise über NMR-Spektroskopie charakterisierten Lycopin-Isomeren.

$\zeta$ :  $\zeta$ -Carotin-Isomere, L1: Prolycopin, N2: Poly-cis-Neurosporin, N: Neurosporin-Isomere, L: Lycopin-Isomere. **Z**: cis-Konfiguration, **E**: trans-Konfiguration.

Carotin	Absorptionsmaxima [nm]	Scenedesmus <i>obliquus</i> C-6D-Extrakt		<i>Capsicum</i> ZDS		<i>Capsicum</i> ZDS (+ PDS <sub>Ca</sub> )		<i>Synechocystis</i> CrtQb		Anabaena CrtQa	
		Ratio cis/II	[%]	Ratio cis/II	[%]	Ratio cis/II	[%]	Ratio cis/II	[%]	Ratio cis/II	[%]
$\zeta$ 1	286,296,380,400,425	23,5	18,3	24,3	3,8	24,0	20,7	24,0	3,3	23,9	11,1
$\zeta$ 2	285,295,373,395,419	22,6	13,9	19,1	15,9	19,9	18,0	19,9	19,0	22,8	22,5
$\zeta$ 3	285,295,375,395,420	22,6	6,1	23,3	12,5	23,0	8,9	23,0	14,3	22,6	12,2
$\zeta$ 4 (9,9'Z)	380,401,425	3,5	39,7	3,5	20,5	3,5	25,7	3,5	19,0	3,5	24,5
$\zeta$ 5	380,401,425	3,5	18,5	3,5	32,8	3,5	21,1	3,5	33,1	3,5	23,9
$\zeta$ 6 all E	380,401,425	3,5	3,6	3,5	14,4	3,5	5,6	3,5	11,4	3,5	6,2

Carotinoid	Absorptionsmaxima [nm]	<i>Scenedesmus obliquus</i> C-6D, (A)		<i>Capsicum</i> -ZDS, (B)		<i>Capsicum</i> -ZDS (+ PDS <sub>Ca</sub> ), (C)		<i>Synechocystis</i> CrtQb, (D)	
		Ratio cis/II	[%]	Ratio cis/II	[%]	Ratio cis/II	[%]	Ratio cis/II	[%]
<b>N2 (7,9,9'Z)</b>	<b>410,433,459(S)</b>	<b>0</b>	<b>24,2</b>						
<b>N1 (Z)</b>	<b>407,431,459</b>	<b>0</b>	<b>10,9</b>	<b>0</b>	<b>2,6</b>	<b>0</b>	<b>4,3</b>	<b>0</b>	<b>3,6</b>
N3 "	268,319,332,411,435,464			12,2	2,0	12,2	2,1		
N4 "	268,319,332,411,435,464	37,1	2,6	32,2	1,8	32,2	1,3		
N5 "	268,320,332,411,435,463			12,2	2,3	12,2	1,4		
N6 "	268,320,332,412,435,469			7,3	0,7				
N7 "	267,320,334,420,444,469			11,2	1,0				
N8 "	335,420,444,470	10,9	6,3	11,2	2,9	11,2	4,0		
N9 "	332,417,442,470	7,9	6,3	7,9	10,7	7,9	8,6		
N10 "	320, 332, 423, 443, 470	9,7	3,4	10,3	4,5	10,3	4,4	11,0	15,9
N11 (all E)	320, 332, 417, 442, 470	6,0	3,2	6,0	10,5	6,0	10,3	6,5	6,5
<b>L1(7,7',9,9'Z)</b>	<b>416 (S), 440, 469 (S)</b>	<b>0</b>	<b>35,3</b>	<b>0,0</b>	<b>8,9</b>	<b>0,0</b>	<b>42,8</b>	<b>0,0</b>	<b>21,0</b>
L2 (13Z)	345, 362, 441, 467, 498								
L3 (5,13'Z)	345, 362, 445, 460, 490								
L4	361, 442, 466, 495	14,6	0,3	14,8	0,8	14,8	1,2		
L5	361, 442, 466, 495	13,0	0,2	12,3	1,5	12,3	0,7		
L6	345, 362, 441, 467, 497	13,0	0,4	14,3	5,6	14,3	1,3	13,0	4,4
L7 (9Z)	345, 362, 442, 467, 497	13,9	0,9	13,8	11,4	13,8	2,6	14,5	9,5
L8 (5,9'Z)	345, 362, 442, 467, 497	12,2	0,4	12,1	5,1	12,1	1,2	13,7	4,0
L9	363, 445, 469, 497	10,3	0,4	10,4	1,4	10,4	1,9		
L10 (7Z)	363, 445, 469, 501	8,8	0,7	8,6	1,6	8,6	1,2	8,5	2,1
L11 (7Z)	363, 445, 470, 500	9,6	1,4	8,7	2,7	8,7	2,8	8,7	3,9
L12 (all E)	363, 446, 472, 504	6,9	1,7	6,9	5,1	6,9	4,4	6,5	12,7
L13 (5;5,5'E)	363, 446, 473, 504	6,9	1,6	6,9	16,8	7,0	3,6	6,5	16,5

Carotinoid	Absorptionsmaxima [nm]	<i>Anabaena</i> <i>CrtQa</i> , (E) Ratio cis/II [%]		<i>Rhodobacter</i> <i>capsulatus CrtI</i> , (F) Ratio cis/II [%]		<i>Erwinia</i> <i>uredovora Crt I</i> , (G) Ratio (G) cis/II [%]		Lycopin- Standard , (H) Ratio cis /II
<b>N2 (7,9,9'Z)</b>	<b>410,433,459(S)</b>							
<b>N1 (Z)</b>	<b>407,431,459</b>							
N3	268,319,332,411,435,464							
N4	268,319,332,411,435,464							
N5	268,320,332,411,435,463							
N6	268,320,332,412,435,469							
N7	267,320,334,420,444,469							
N8	335,420,444,470							
N9	332,417,442,470							
N10	320, 332, 423, 443, 470			9,6	12,2			
N11 (all E)	320, 332, 417, 442, 470			6,0	71,0			
<b>L1(7,9,7',9'Z)</b>	<b>416 (S), 440, 469 (S)</b>							
L2 (13 Z)	345, 362, 441, 467, 498	55,8	24,2			55,7	17,7	
L3 (5,13'Z)	345, 362, 445, 460, 490	25,0	4,8			27,0	5,0	28,0
L4	361, 442, 466, 495							
L5	361, 442, 466, 495							
L6	345, 362, 441, 467, 497	13,8	3,2			12,1	5,9	13,0
L7 (9Z)	345, 362, 442, 467, 497	13,8	10,9			14,7	13,7	14,7
L8 (5,9'Z)	345, 362, 442, 467, 497	14,5	2,3			14,8	3,6	12,5
L9	363, 445, 469, 497							
L10	363, 445, 469, 501							
L11 (7Z)	363, 445, 469, 501							
L12 (all E)	363, 446, 472, 504	6,9	42,2	6,9	8,5	6,9	26,1	6,89
L13 (5; 5,5'Z)	363, 446, 473, 504	6,9	9,1	6,9	8,3	6,9	24,6	6,89
DHL1	388,465,490,524					73,9	1,3	
DHL2	386,460,490,523	22,1	3,2			24,1	0,9	
DHL3	465,491,525					9,6	1,2	

### 5.3. Bildung von $\beta$ -Carotinisomere in Abhängigkeit der bei funktioneller Komplementierung verwendeten $\zeta$ -Carotin-Desaturase

In der Pflanze *Capsicum annuum* oder in *Synechocystis*-Zellen wird kein Prolycopin (L1) akkumuliert. Prolycopin akkumuliert nur in wenigen Pflanzen wie der Tomatenmutante Tangella (Clough & Pattenden, 1979, 1983). Bei funktioneller Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* mit der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum* oder *Synechocystis*, konnte die Bildung von Prolycopin nachgewiesen werden. Es stellte sich daher die Frage, ob es auch bei der funktionellen Komplementierung der  $\beta$ -Carotin-Synthese mit der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum* oder *Synechocystis*, zur Akkumulation von Prolycopin kommt und welche  $\beta$ -Carotin-Isomere gebildet werden. Als Vergleichsmöglichkeit wurde die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Anabaena* verwendet, die kein Prolycopin bildet. *E. coli* wurde dazu mit den Expressionsvektoren transformiert, die die Gene zur Bildung von  $\zeta$ -Carotin, das Gen der Lycopinzyklase aus *Erwinia uredovora* sowie die Gene der  $\zeta$ -Carotindesaturasen aus *Anabaena*, *Synechocystis* und *Capsicum* (cDNA) trugen. Zur Identifikation von 9-cis- und 15-cis- $\beta$ -Carotin wurden entsprechende  $\beta$ -Carotin-Standards verwendet. Die Identifikation von 13-cis- $\beta$ -Carotin und all trans- $\beta$ -Carotin erfolgte über den Vergleich mit den für 13-cis- $\beta$ -

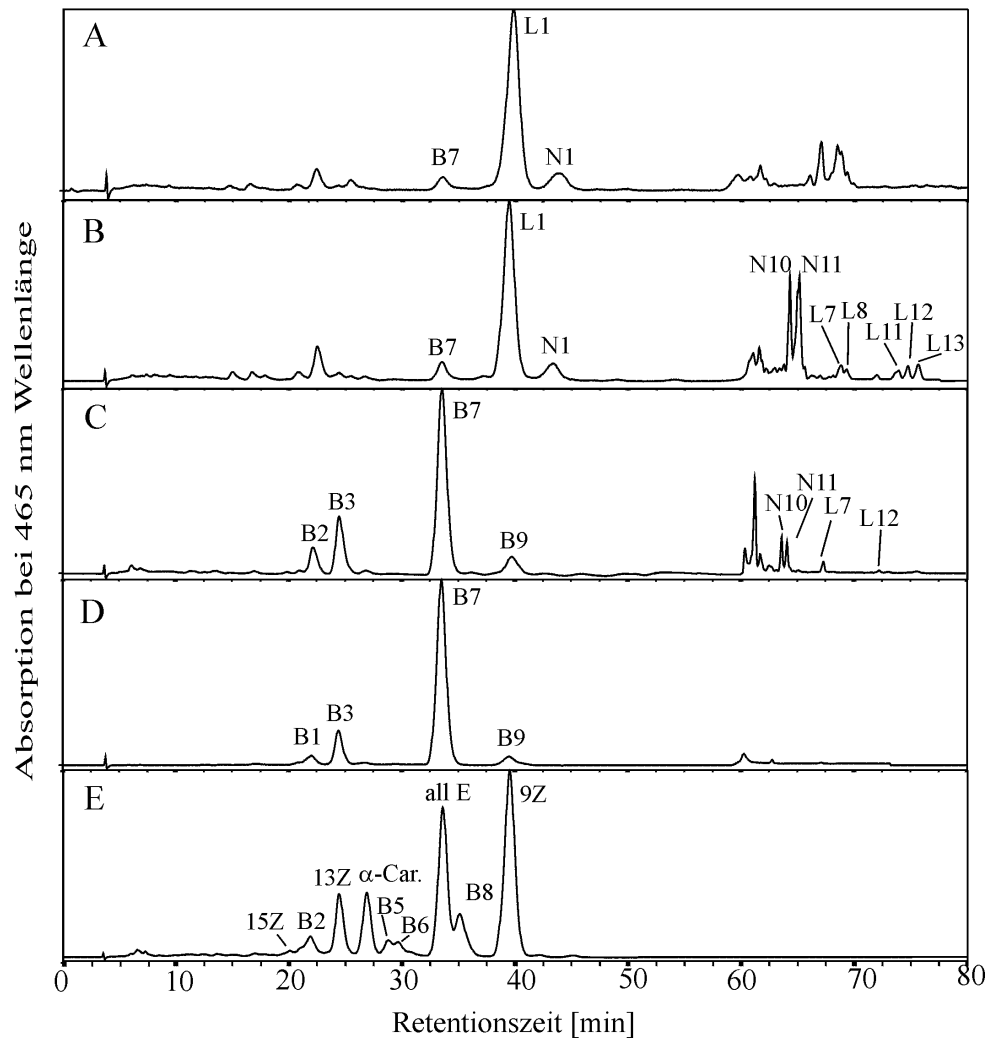
Carotin von Müller et al. (1997) und den für all trans- $\beta$ -Carotin von Tsukida et al. (1983) angegebenen spektralen Daten (Tabelle 3.21), sowie mit einem  $\beta$ -Carotin-Standard aus der Grünalge *Dunaliella*. Die Konfiguration beider  $\beta$ -Carotin-Isomere wurde von den Autoren über NMR-Spektroskopie bestimmt. Unter der Abbildung 3-21 sind die  $C_{30}$ -HPLC-Chromatogramme der Carotinoideextrakte aus den funktionellen Komplementierungen mit der ZDS aus *Capsicum* (A), *Synechocystis* (B) und *Anabaena* (C) dargestellt. Zum Vergleich sind die Chromatogramme eines  $\beta$ -Carotin-Extraktes aus den Zellen von *Synechocystis* (D) und der  $\beta$ -Carotin-Isomere eines teilweise charakterisierten  $\beta$ -Carotin-Standards aus *Dunaliella* (E) dargestellt.

Bei den Komplementierungen mit den  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen des pds-Typs (A, B) (*Capsicum*, *Synechocystis*) war im Vergleich zu den  $\beta$ -Carotinisomeren aus den *Synechocystis*-Zellen (D) lediglich all trans- $\beta$ -Carotin nachweisbar. Ansonsten wurden vor allem Prolycopin und das cis-Neurosporin N1 akkumuliert. Es waren noch geringe Mengen der Neurosporin-Isomere N10 (cis), N11 (all trans) sowie Spuren der Lycopin-Isomere 9-cis- (L7), 5,9-dicis- (L8), 7-cis- (L11), all trans- (L12) und 5-cis-, 5,5'-dicis-Lycopin (L13) nachweisbar. Prolycopin konnte von der Lycopinzyklase aus *Erwinia uredovora* nicht zu  $\beta$ -Carotin zyklisiert werden und akkumulierte daher. Die Komplementierung mit der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Anabaena* (crtI-Typ) (C) dagegen zeigte 4 verschiedene  $\beta$ -Carotin-Isomere, wie sie bis auf Isomer B1 auch in dem Extrakt aus den Zellen von *Synechocystis* nachgewiesen wurden. Die Elution der  $\beta$ -Carotin-Isomere von der  $C_{30}$ -HPLC erfolgte ausgehend von der kürzesten Retentionszeit: 13-cis-, all trans-, 9-cis- $\beta$ -Carotin.

In den Zellen von *Synechocystis* wird kein Prolycopin akkumuliert. Bei funktioneller Komplementierung des  $\beta$ -Carotinsyntheseweges mit der Lycopinzyklase CrtY aus *Erwinia*, der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Synechocystis* und den Genen zur  $\zeta$ -Carotin-Synthese akkumulieren Prolycopin (L1) und das cis-Neurosporin (N1). Prolycopin akkumuliert, da es aufgrund seiner Konfiguration (7,9,7',9' tetrakis) von der Lycopinzyklase nicht zu  $\beta$ -Carotin zyklisiert werden kann.

Die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase des crtI-Typs aus *Anabaena* dagegen bildet aus den verschiedenen  $\zeta$ -Carotin-Isomeren wie unter Abschnitt 5.2. gezeigt (Abbildung 3-20, E; Tabelle 3.20) kein Prolycopin, so daß eine Zyklisierung des Lycopins zu den beobachteten  $\beta$ -Carotin-Isomeren erfolgen kann. Darüber hinaus gleicht die Verteilung und Zusammensetzung der  $\beta$ -Carotinisomere der funktionellen Komplementierung mit der *Anabaena*-ZDS, bis auf das Isomer B2 in dem Extrakt aus den *Synechocystis*-Zellen.





**Abbildung 3-21:** C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramme der Carotinoidextrakte aus den funktionellen Komplementierungen der  $\beta$ -Carotin-Synthese in *E. coli* mit den  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum*, *Synechocystis* und *Anabaena*. E: trans-Konfiguration, Z: cis-Konfiguration  
 A: ZDS aus *Capsicum annum*,  
 B: CrtQb aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, D:  $\beta$ -Carotin-Extrakt aus *Synechocystis*-Zellen,  
 C: CrtQa aus *Anabaena* sp. PCC 7120, E:  $\beta$ -Carotin-Standard aus *Dunaliella*.

**Tabelle 3.21:** Bei funktioneller Komplementierung der  $\beta$ -Carotinsynthese in *E. coli* gebildete  $\beta$ -Carotin-Isomere (A bis C).

$\beta$ -Carotin	Absorptionsmax. [nm]	A		B		C		D		E (Standard)	
		cis/II	[%]	cis/II	[%]	cis/II	[%]	cis/II	[%]	cis/II	[%]
B1	<u>338</u> ,426(S),450,475							0,45	5,1		
B2	<u>338</u> ,420(S),444,470(S)					0,41	8,2			0,40	4,6
B3, 13 Z	<u>339</u> ,422(S),445,470					0,43	17,8	0,45	12,0	0,39	9,8
B4	<u>338</u> ,420(S),442,470							0,14	1,4	0,14	10,2
B5	<u>338</u> ,419,442,470									0,10	2,5
B6	<u>330</u> ,420,442,472									0,08	3,0
B7, all E	<u>338</u> ,428(S),452,479	0,05	100	0,05	100	0,05	65,6	0,05	75,7	0,05	25,5
B8	<u>340</u> ,420,442,468									0,08	8,2
B9, 9 Z	<u>340</u> ,424(S),446,474					0,11	8,5	0,11	4,9	0,10	36,2
9 Z	<u>338</u> ,424(S),449,475	0,10 (cis/II)									
15 Z	<u>340</u> ,425,446,474	0,56 (cis/II)									
13 Z	<u>337</u> ,423, 443, 470	0,43 (cis/II); spektrale Daten aus Müller et al.,1997, Lösungsmittel Hexan/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> =98:2									
all E	<u>337</u> ,425, 450, 478	0,06 (cis/II); spektrale Daten aus Tsukida et al., 1983, Lösungsmittel n-Hexan									

## 5.4. Kofaktoruntersuchungen

### 5.4.1. Kofaktoruntersuchung der ZDS aus *Capsicum annuum*

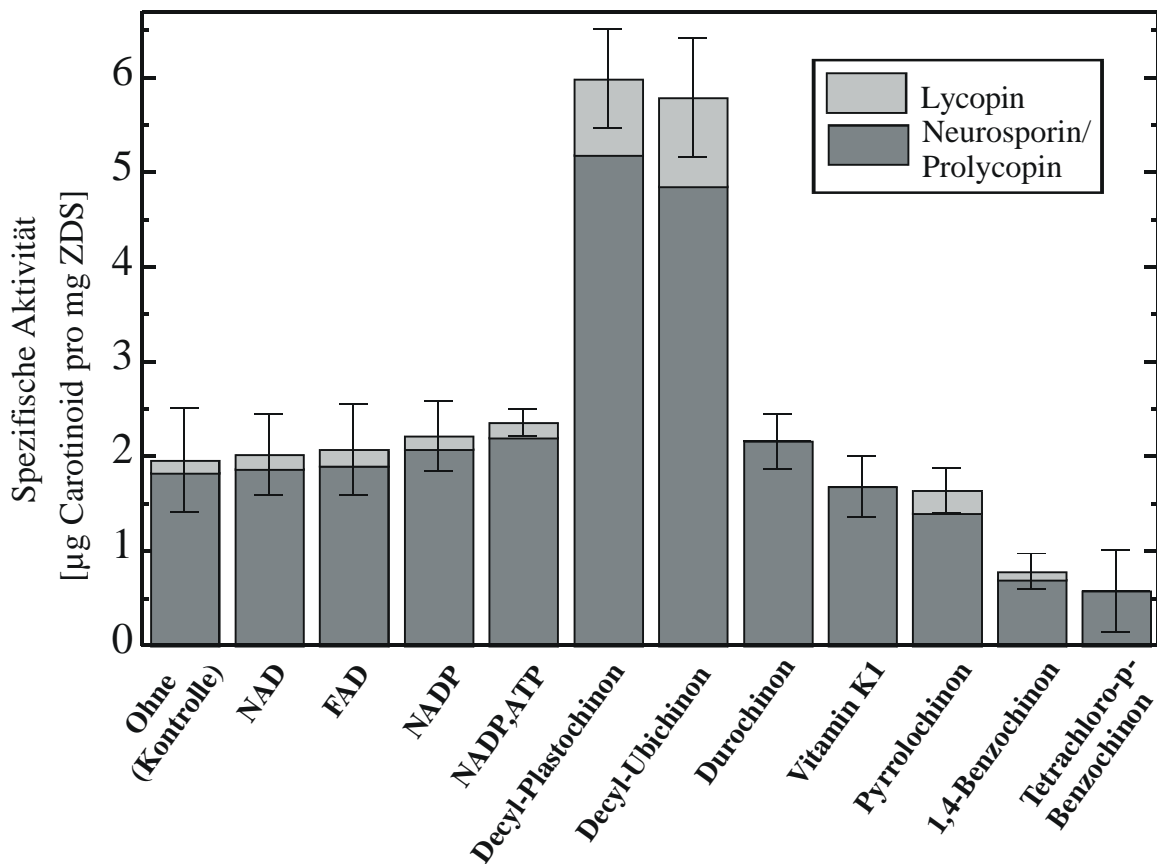
Für die Phytoendesaturase aus *Capsicum annuum* wurde von Hugueney et al. (1992) FAD als prosthetische Gruppe angegeben. Die Phytoendesaturase aus *Capsicum* und die Phytoendesaturasen u.a. aus den Cyanobakterien *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803, dem Bakterium *Erwinia uredovora* oder dem Pilz *Neurospora crassa* besitzen eine N-terminale Aminosäuresequenz, die als potentielle Dinukleotidbindestelle gilt (Pecker et al., 1992). Da auch die ZDS aus *Capsicum* eine potentielle Dinukleotidbindestelle besitzt (Albrecht et al., 1995), wurden eine Reihe verschiedener oxidierten Dinukleotide zur Kofaktoruntersuchung eingesetzt. Die Zugabe von oxidierten Dinukleotiden bewirkte jedoch gegenüber der Kontrolle keine deutliche Zunahme der enzymatischen Aktivität.

Für die Desaturierung von Phytoen in Chromoplasten aus *Narcissus pseudonarcissus* L. war eine Abhängigkeit von Chinonen beschrieben worden (Mayer et al., 1989). Da die Aminosäuresequenz der ZDS aus *Capsicum* eine Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz der Phytoendesaturase aus *Capsicum* besitzt (35,5 % identische, 59 % ähnliche Aminosäuren) (Albrecht et al., 1995) und es sich bei der Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin um eine ähnliche Reaktion handelt, wurden für die *Capsicum*-ZDS ebenfalls eine Reihe lipophiler und hydrophiler Chinone als Kofaktor eingesetzt.

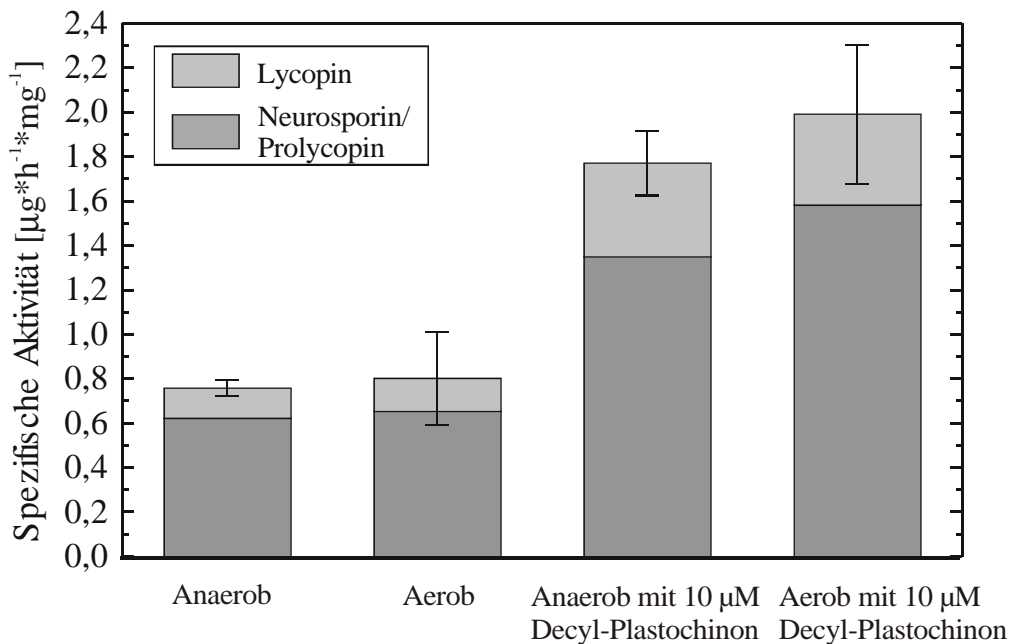
In Abbildung 3-22 ist die gemessene spezifische Aktivität der ZDS in Abhängigkeit des zugesetzten Kofaktors dargestellt. Die enzymatische Aktivität der ZDS nahm ausgehend von 1,96  $\mu\text{g}/\text{mg}$  ohne Kofaktor unter Verwendung der lipophilen Chinone Decyl-Plastochinon und Decyl-Ubichinon um den Faktor 3 auf 5,98  $\mu\text{g}/\text{mg}$  und 5,79  $\mu\text{g}/\text{mg}$  zu. Damit konnte erstmals die Notwendigkeit von Plastochinon als Kofaktor für eine pflanzliche  $\zeta$ -Carotin-Desaturase nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den genannten Chinonen führte die Zugabe anderer lipophiler oder hydrophiler Chinone zu keiner Zunahme, bzw. im Falle von 1,4-Benzochinon und Tetrachloro-p-Benzochinon zu einer Abnahme der enzymatischen Aktivität der ZDS gegenüber der Kontrolle.

Für die ZDS aus *Anabaena* wurde eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von molekularem Sauerstoff beschrieben (Albrecht et al., 1995). Zur Untersuchung, ob Sauerstoff auch für die Basisaktivität der *Capsicum*-ZDS verantwortlich ist, wurden sowohl aerobe und anaerobe *in vitro*-Reaktionsbedingungen geschaffen. Unter anaroben Bedingungen konnte jedoch kein

Unterschied der spezifischen Aktivität zu aeroben Bedingungen gemessen werden (Abbildung 3-23).



**Abbildung 3-22:** Kofaktoruntersuchung der ζ-Carotin-Desaturase aus *Capsicum annum*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Gesamtaktivität an.

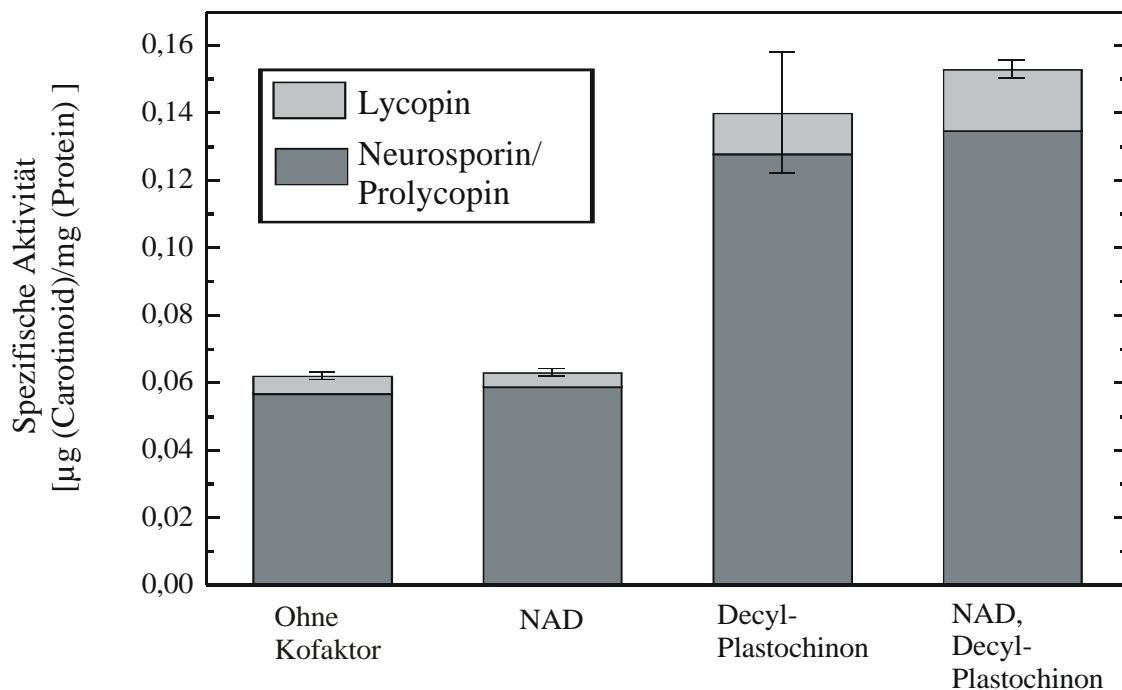


**Abbildung 3-23:** Unabhängigkeit der ZDS-Aktivität von molekularem Sauerstoff unter *in vitro*-Bedingungen. Die Balken geben die Mittelwerte dreier Meßreihen an. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Gesamtaktivität (Lycopin, Neurosporin, Prolycopin) an. Die spezifische Aktivität ist in µg gebildetes Carotinoid pro Stunde und mg ZDS angegeben.

### 5.4.2. Kofaktoruntersuchung der ZDS aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Die ZDS aus *Synechocystis* wurde wie die ZDS aus *Capsicum* aufgrund ihrer Homologie zu den pflanzlichen  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen einer Kofaktoruntersuchung unterzogen. Sie zeigt eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz zu den  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen höherer Pflanzen (Breitenbach et al., 1998).

Die Kofaktoruntersuchung der heterolog in *E. coli* exprimierten und ungereinigten *Synechoystitis*-ZDS ist in Abbildung 3-24 dargestellt. Ebenso wie bei der *Capsicum*-ZDS ist ohne Kofaktorzugabe (Kontrolle) ein geringer Anteil an Aktivität von 0,062  $\mu\text{g}/\text{mg}$  vorhanden. Unter Verwendung von NAD als Kofaktor, kam es im Vergleich zur Kontrolle zu keiner Zunahme der Enzymaktivität (0,063  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Die Zugabe von Decyl-Plastochinon dagegen führte wie bereits bei der ZDS aus *Capsicum* zu einer deutlichen Zunahme der enzymatischen Aktivität auf 0,14  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Die Gabe von NAD und Decyl-Plastochinon erhöhte die Enzymaktivität gegenüber der alleinigen Zugabe von Decylplastochinon nur geringfügig auf 0,153  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

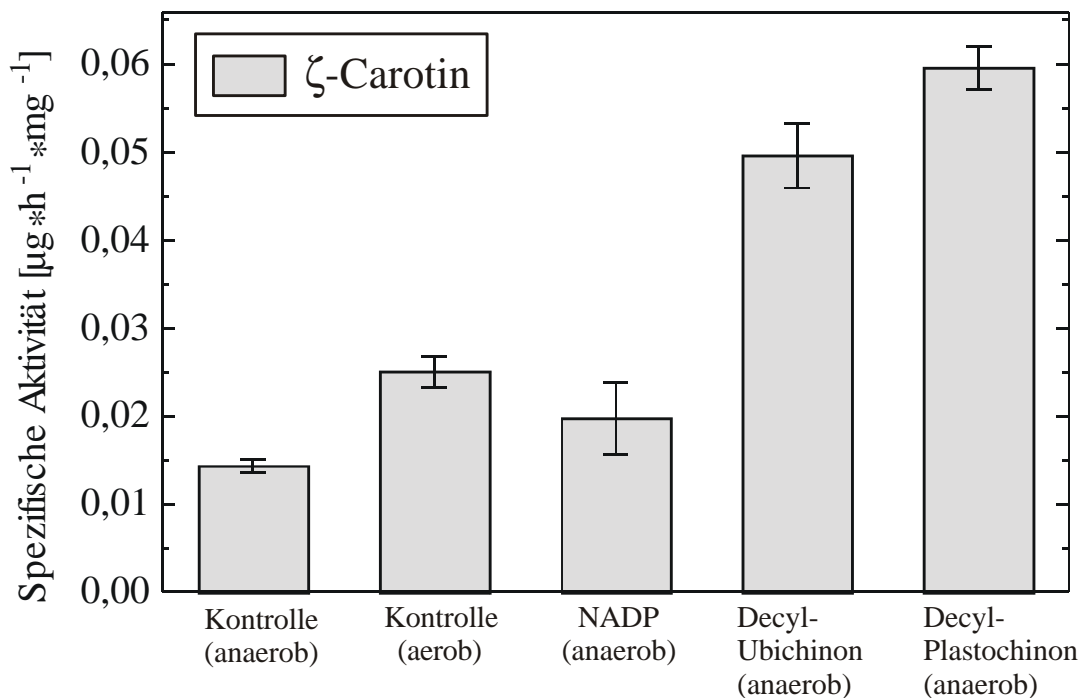


**Abbildung 3-24:** Kofaktoruntersuchung der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (10  $\mu\text{M}$  NAD, 10  $\mu\text{M}$  Decyl-Plastochinon). Die Meßwerte sind Mittelwerte dreier Messungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

### 5.4.3 Kofaktoruntersuchung der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942

Wie für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus dem Cyanobacterium *Synechocystis* wurde auch für die Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 aufgrund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft zu den pflanzlichen Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen (Sandmann, 1994) eine Kofaktoruntersuchung durchgeführt.

Unter Abbildung 3-25 sind die Ergebnisse der Kofaktoruntersuchung der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942, dargestellt. Die Phytoendesaturase wurde heterolog in JM101/pPDSdel35 exprimiert. Nach Zellaufschluß und Zentrifugation wurde der Zellüberstand aus *E. coli* zur Kofaktoruntersuchung verwendet. Unter anaeroben Reaktionsbedingungen, die durch eine parallel zur Desaturierung von Phytoen ablaufenden Sauerstoff-verbrauchenden Reaktion erzielt wurde, zeigte die Phytoendesaturase ohne die Zugabe von Kofaktoren eine Basisaktivität von 0,015  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Unter aeroben Reaktionsbedingungen ohne Kofaktorzugabe erhöhte sich die enzymatische Aktivität um den Faktor 2. Diese Sauerstoffabhängigkeit wurde von Schneider et al. (1997) für diese Phytoendesaturase beschrieben. Beide Ansätze dienten zur Kontrolle der anaeroben Reaktionsbedingungen. Bei Zugabe von NADP unter anaeroben Reaktionsbedingungen erhöhte sich die enzymatische Aktivität nur leicht auf 0,02  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Durch die Zugabe der lipophilen Chinone Decyl-Ubichinon oder Decyl-Plastochinon erhöhte sich die Aktivität etwa um den Faktor 3 bis 4 im Vergleich zur anaeroben Kontrolle.

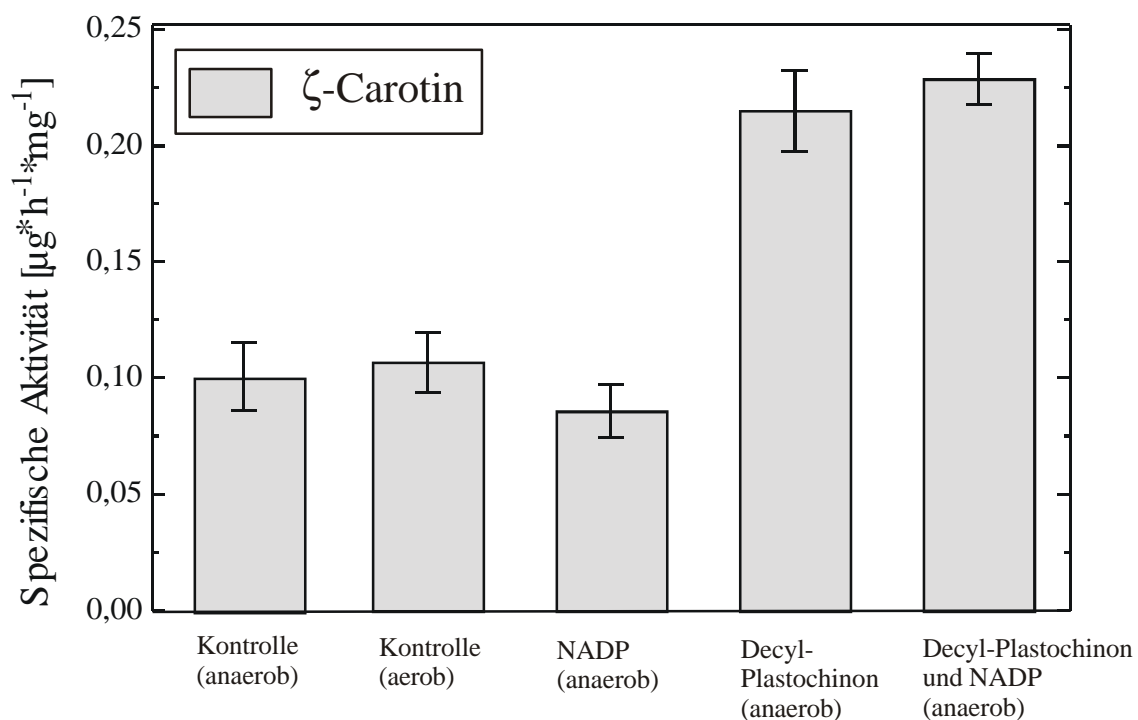


**Abbildung 3-25:** Kofaktoruntersuchung der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 (100  $\mu\text{M}$  NADP, 100 $\mu\text{M}$  Decyl-Ubichinon, 100  $\mu\text{M}$  Decyl-Plastochinon). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte dreier Messungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

#### 5.4.4. Kofaktoruntersuchung der Phytoendesaturase aus *Gentiana lutea*

Da sich Plastochinon bei der Phytoendesaturase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* als Kofaktor erwiesen hatte, sollte überprüft werden, ob dies auch für die Phytoendesaturase aus der Pflanze *Gentiana lutea* (gelber Enzian) gilt. Für die Phytoendesaturasen höherer Pflanzen lagen bezüglich des Kofaktors bisher keine genauen Daten vor. Es gab bisher Untersuchungen an Chromoplasten aus *Narcissus* (Beyer et al., 1994) und Arabidopsis-Mutanten (Norris et al., 1995) die auf Plastochinon als Kofaktor der Phytoendesaturase hindeuteten.

Die Phytoendesaturase aus *Gentiana lutea* (gelber Enzian) wurde heterolog in *E. coli* exprimiert. Der Zellüberstand von JM101/pUC8pds<sub>GI</sub> wurde *in vitro* auf die Aktivität der *Gentiana*-PDS untersucht (Abbildung 3-26). Die gemessene Basisaktivität von 0,1  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  kann als Folge der Verwendung ungereinigter PDS gedeutet werden. Dabei zeigte die PDS unter aeroben und anaeroben Bedingungen die gleiche spezifische Aktivität, d.h. Sauerstoff wirkte nicht als Kofaktor. Die Zugabe von NADP führte zu einer geringfügig niedrigeren spezifischen Aktivität der PDS von 0,09  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Die Zugabe von Decyl-Plastochinon führte zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität um den Faktor 2 auf 0,22  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ .



**Abbildung 3-26:** Kofaktoruntersuchung der Phytoendesaturase aus *Gentiana lutea* (100  $\mu\text{M}$  NADP, 100  $\mu\text{M}$  Decyl-Plastochinon und Decyl-Plastochinon mit 100  $\mu\text{M}$  NADP). Die dargestellten Meßwerte sind Mittelwerte dreier Meßwerte. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

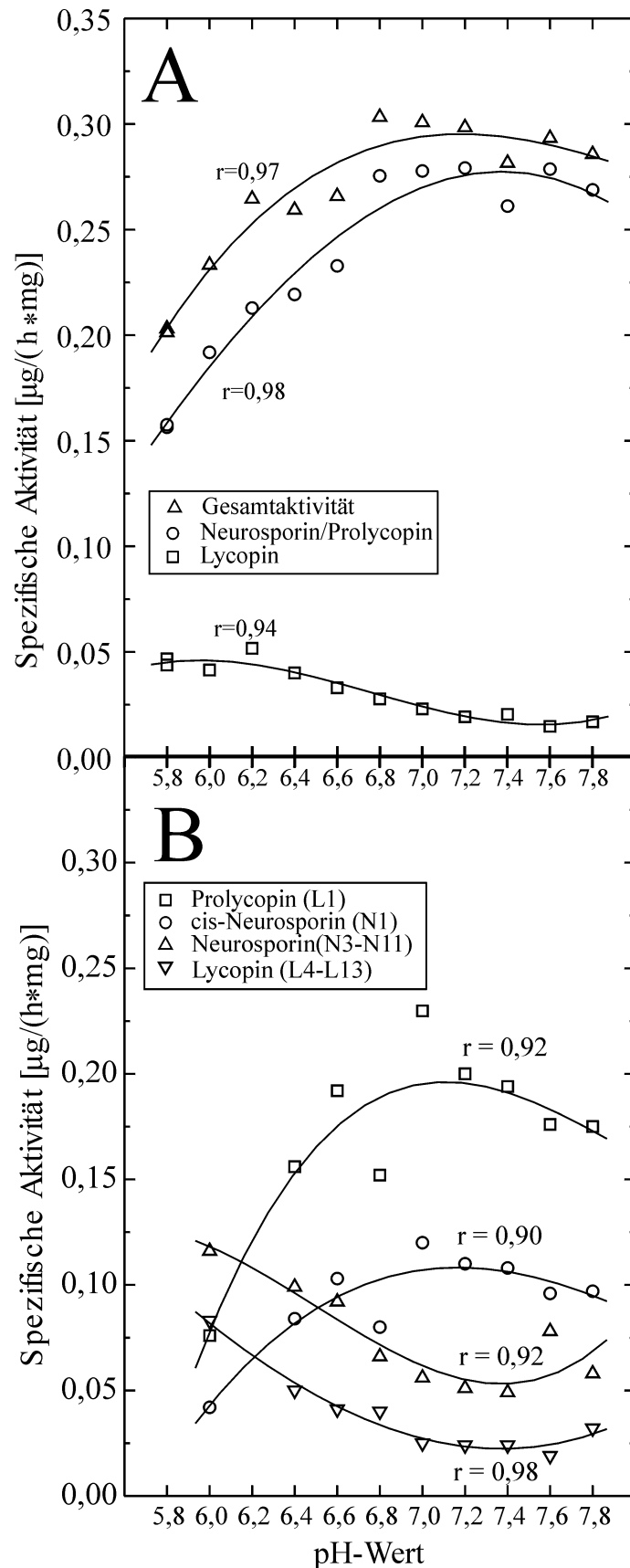
Die Kombination von Decyl-Plastochinon und NADP führte zu keiner deutlichen Erhöhung der spezifischen Aktivität auf 0,23  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Decyl-Plastochinon ist demnach auch für die PDS aus *Gentiana lutea* als Kofaktor wirksam.

### 5.5. pH-Optimum der Aktivität der ZDS aus *Capsicum annuum*

In der Abbildung 3-27 ist die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der ZDS vom pH-Wert dargestellt. Die Teilabbildung A zeigt die Quantifizierung der Desaturierungsprodukte der *Capsicum*-ZDS über  $\text{C}_{18}$ -HPLC (Laufmittel 15 % B) die Teilabbildung B die Quantifizierung der Desaturierungsprodukte über  $\text{C}_{30}$ -HPLC (Laufmittel 40 und 70 % MTBE).

Das die höchste Aktivität der ZDS wurde bei pH 7,2 erreicht, in der Nähe des von Albrecht et al. (1995) angegebenen pI-Wertes von 7,4. Bei Analyse der Produkte über  $\text{C}_{18}$ -HPLC ergab sich für die Bildung der Carotinoide Neurosporin und Prolycopin ein Optimum bei pH 7,4. Im Gegensatz dazu nahm die Bildung anderer Lycopinisomere mit ansteigendem pH-Wert bis 7,4 ab. Die Bildung anderer Lycopinisomeren als Prolycopin, nahm mit geringer werdenden pH-Werten zu.

Bei einer Analyse der Produkte über  $\text{C}_{30}$ -HPLC zeigte sich (B), daß die Bildung von Prolycopin (L1) und dem cis-Neurosporin (N1) etwa bei pH 7,1 am stärksten war. Die Bildung anderer Neurosporin- (N3-N11) und Lycopinisomere (L4-L13) war bei pH 7,1 gering. Dagegen kam es mit abnehmendem pH-Wert zur stärkeren Auftreten der anderen Neurosporin- (N3-N11) und Lycopinisomere (L4-L13). Die Bildung von Prolycopin (L1) und dem cis-Neurosporin (N1) wurde dagegen mit abnehmendem pH-Werten geringer. In Tabelle 3.22 sind die Regressionsgleichungen für die pH-Kurven aufgeführt.



**Abbildung 3-27:** Spezifische Aktivität der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* in Abhängigkeit vom pH-Wert (oberste Kurve in A).

A: Quantifizierung der Reaktionsprodukte über  $\text{C}_{18}$ -HPLC, Maximum der ZDS-Aktivität bei pH 7,2.

B: Quantifizierung der Reaktionsprodukte über  $\text{C}_{30}$ -HPLC (r: Korrelationskoeffizient der Polynomregression).



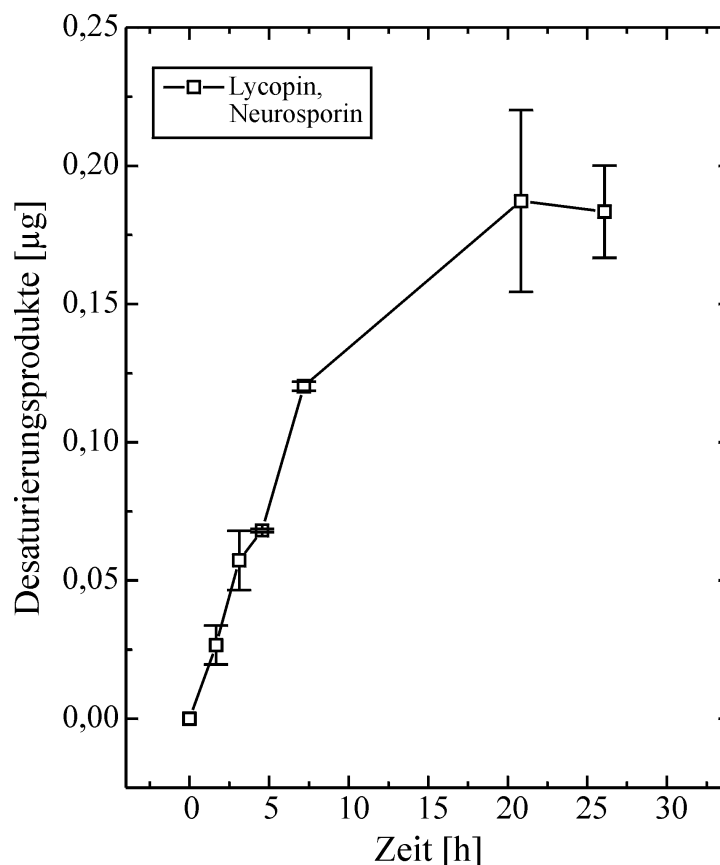
**Tabelle 3.22:** Regressionsgleichungen der pH-Kurven

Regressionskurve für	Regressionsgleichung	r
Lycopin (A)	$y=-4,334+1,994x-0,2992x^2+0,0148x^3$	0,93
Neurosp./Prolyc. (A)	$y=-0,907+0,0748x+0,0451x^2-0,0045x^3$	0,98
Gesamtaktivität (A)	$y=-5,241+2,069x-0,254x^2-0,00453x^3$	0,97
Lycopin (B)	$y=0,6082+0,0299x-0,0405x^2+0,00348x^3$	0,98
Neurosporin (B)	$y=-6,996+3,999x-0,5332x^2+0,0274x^3$	0,92
Poly-cis-Neurosporin (B)	$y=-4,881+1,813x-0,2145x^2+0,00819x^3$	0,90
Prolycopin (B)	$y=-12,686+4,96x-0,6308x^2+0,0264x^3$	0,92

## 5.6. Enzym-Kinetische Untersuchungen

### 5.6.1. Bestimmung der $K_m$ -Wert der Substrate $\zeta$ -Carotin und Neurosporin und des Kofaktors Decylplastochinon für die ZDS aus *Capsicum*

Zur Erfassung des linearen Reaktionsbereiches für den die Michaelis-Menten-Kinetik gilt, wurde vor der Bestimmung der  $K_m$ -Werte die Menge der durch die ZDS gebildeten Carotinoide in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. In der Abbildung 3-28 ist die Menge der entstandenen Reaktionsprodukte gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

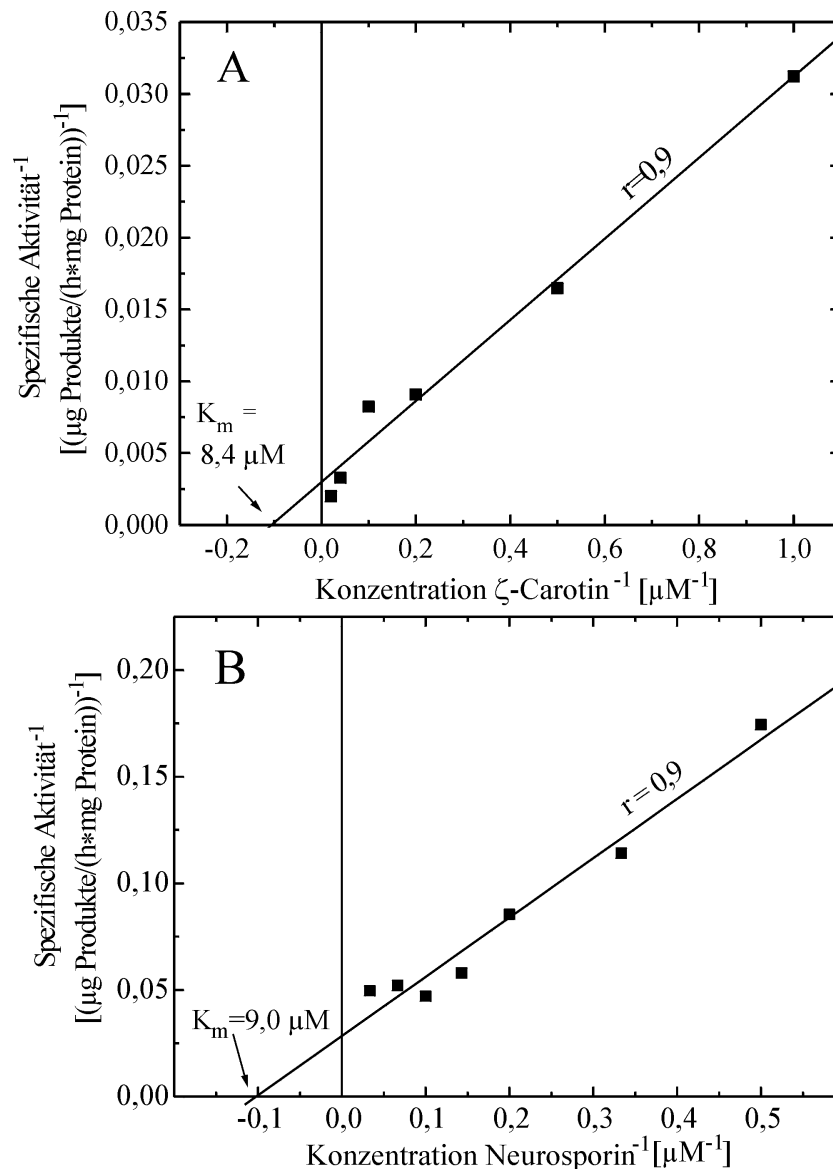


**Abbildung 3-28:** Kinetik der Carotinoïdbildung in den *in vitro*-Aktivitätstests, (30 µg ZDS, 10 µg  $\zeta$ -Carotin).

Dabei zeigte sich, daß bis zu einer Dauer von 7 Stunden unter den gegebenen Reaktionsbedingungen, die Zunahme der Reaktionsprodukte proportional zur Reaktionszeit

erfolgt. Nach 7 Stunden erfolgt eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit. Für die Bestimmung der  $K_m$ -Werte von Neurosporin und  $\zeta$ -Carotin wurde daher eine Reaktionsdauer von 6 Stunden eingehalten.

In Abbildung 3-29 ist die doppelt reziproke Auftragung der Enzymaktivität gegen die Substratkonzentrationen von  $\zeta$ -Carotin (A) und Neurosporin (B) nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung der zugehörigen  $K_m$ -Werte dargestellt. Für  $\zeta$ -Carotin wurde als Mittelwert von 3 Bestimmungen ein  $K_m$ -Wert von  $8,4 \mu\text{M}$  ( $\pm 2 \mu\text{M}$ ) und ein zugehöriger  $V_{\text{max}}$ -Wert von  $0,665 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  ( $\pm 0,2 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) bestimmt. Für Neurosporin konnte ein  $K_m$ -Wert von  $9 \mu\text{M}$  ( $\pm 1,5 \mu\text{M}$ ) und ein  $V_{\text{max}}$ -Wert von  $0,0542 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  ( $\pm 0,009 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) bestimmt werden. Der Korrelationskoeffizient der durchgeführten linearen Regressionen war für alle Bestimmungen größer als 0,9. Angegeben ist jeweils die Standardabweichung.



**Abbildung 3-29:**  $K_m$ -Wert-Bestimmung der Substrate  $\zeta$ -Carotin (A) und Neurosporin (B) für die ZDS aus *Capsicum annuum*. Die berechneten  $K_m$ -Werte sind die Mittelwerte von 3 Bestimmungen.

Für den Kofaktor Decyl-Plastochinon wurde der  $K_m$ -Wert zu  $0,4 \mu\text{M}$  ( $\pm 0,3 \mu\text{M}$ ) bestimmt. Der  $K_m$ -Wert wurde aus den Werten dreier Messungen gemittelt.

### 5.6.2. Bestimmung der $I_{50}$ -Werte der Hemmstoffe J852, LS80707 und Norflurazon für die ZDS aus *Capsicum* sowie von J852 und LS80707 für die Phytoendesaturase aus *Synechococcus*

Bei Behandlung von Pflanzen, bzw. *Capsicum annuum* mit dem  $\zeta$ -Carotin-Desaturase-Hemmstoff J852 kommt es zur Akkumulation von  $\zeta$ -Carotin und von Phytoen (Chollet al., 1990; Simkin et al., 2000). Es wurde daher diskutiert, ob neben den pflanzlichen  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen auch die pflanzlichen Phytoendesaturasen durch die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase-Hemmstoffe wie J852 und LS80707 inhibiert werden (Simkin et al., 2000). Zur Bestimmung der  $I_{50}$ -Werte von J852 und LS80707 über *in vitro*-Enzymreaktionen konnten keine dazu ausreichenden Mengen einer pflanzlichen Phytoendesaturase in *E. coli* heterolog exprimiert werden. Zur Bestimmung der  $I_{50}$ -Werte von J852 und LS80707 wurde daher die strukturell verwandte Phytoendesaturase aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Albrecht et al., 1995a; Abbildung 1-2) verwendet.

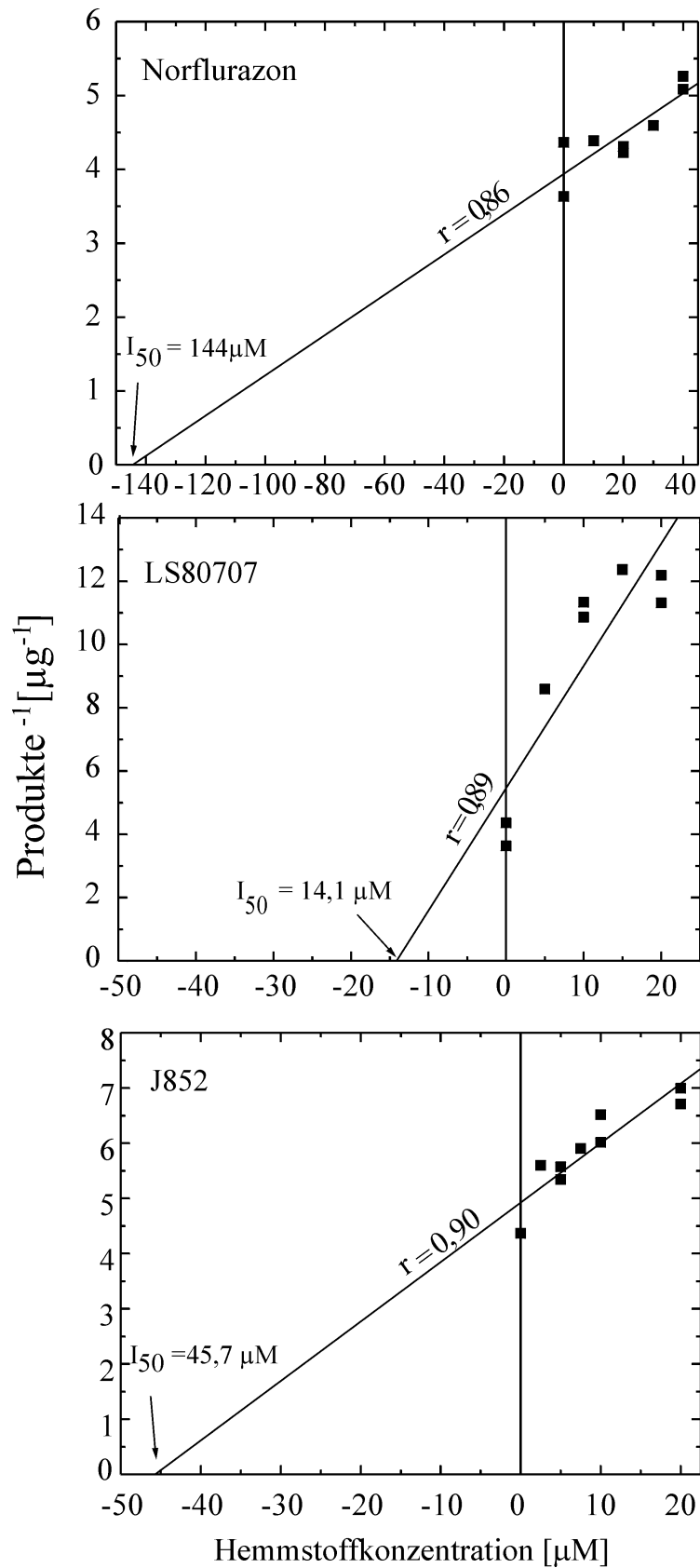
Für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum* und die Phytoendesaturase aus *Synechococcus* wurden die  $I_{50}$ -Werte von J852 und LS80707 bestimmt. Zusätzlich wurde der  $I_{50}$ -Wert von Norflurazon, einem Phytoendesaturasehemmstoff (Sandmann & Böger, 1989), für die ZDS aus *Capsicum* bestimmt.

**Tabelle 3.23:** *In vitro*-Reaktionsbedingungen zur Bestimmung der  $I_{50}$ -Werte der Hemmstoffe J852, LS80707 und Norflurazon für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* und für die Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942.

Desaturase	Hemmstoff	Hemmstoffkonz. [ $\mu\text{M}$ ]	Reaktionsdauer [h]	Substratmenge [ $\mu\text{g}$ ]	Protein
ZDS aus <i>Capsicum</i>	J852	2,5 bis 10	4	10	27 $\mu\text{g}$ gereinigte ZDS
	LS80707	5 bis 20			
	Norflurazon	10 bis 40			
Phytoendesaturase aus <i>Synechococcus</i>	J852	1 bis 70	2	4	9,7 mg Protein ( <i>E. coli</i> Zellüberstand JM101/pPDSdel35)
	LS80707	1 bis 150			

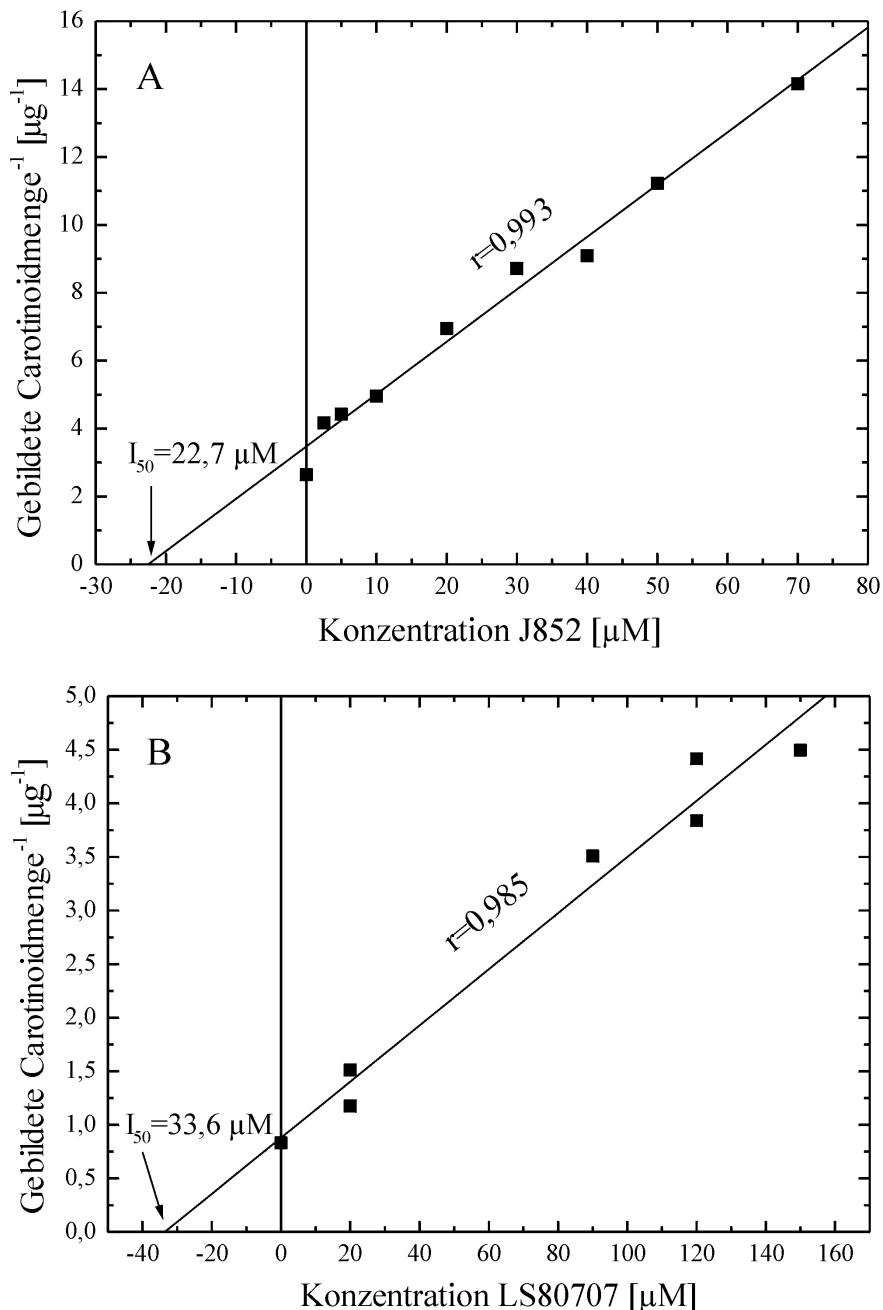
In Tabelle 3.23 sind die *in vitro*-Reaktionsbedingungen zur Bestimmung der  $I_{50}$ -Werte aufgeführt. In Abbildung 3-30 sind die Bestimmungen der  $I_{50}$ -Werte für die Herbizide Norflurazon, LS80707 und J852 dargestellt. Für das Herbizid Norflurazon ergab sich ein  $I_{50}$ -Wert von  $144 \mu\text{M}$ . Für die als  $\zeta$ -Carotin-Desaturase-Hemmstoffe bekannten Verbindungen

LS80707 und J852 (Sandmann & Böger, 1989) ergaben sich deutlich niedrigere  $I_{50}$ -Werte von  $14,1 \mu\text{M}$  für LS80707 und  $45,7 \mu\text{M}$  für J852.



**Abbildung 3-30:** Einfach reziproke Auftragungen der Produktmenge gegen die Hemmstoffkonzentration (Dixon-Plots) zur Bestimmung der  $I_{50}$ -Werte der Hemmstoffe Norflurazon, LS80707 und J852 für die ZDS aus *Capsicum annum*.

Zum Vergleich wurden die  $I_{50}$ -Werte von J852 und LS80707 für die cyanobakterielle Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 bestimmt. Für J852 ergab sich der  $I_{50}$ -Wert von 22,7  $\mu\text{M}$ . Für den Hemmstoff LS 80707 ergab sich der  $I_{50}$ -Wert von 33,6  $\mu\text{M}$ . Die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase Hemmstoffe J852 und LS80707 waren somit auch bei der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* in vergleichbar hohen Konzentrationen wirksam (Abbildung 3-31).



**Abbildung 3-31:** Einfach reziproke Auftragungen der Produktmengen gegen die Hemmstoffkonzentrationen (Dixon-Plots) zur Bestimmung der  $I_{50}$ -Werte der Hemmstoffe J852 (A) und LS80707 (B) für die Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942.

### 5.6.3. Hemmkinetische Untersuchungen der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum* und der Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* und *Gentiana*

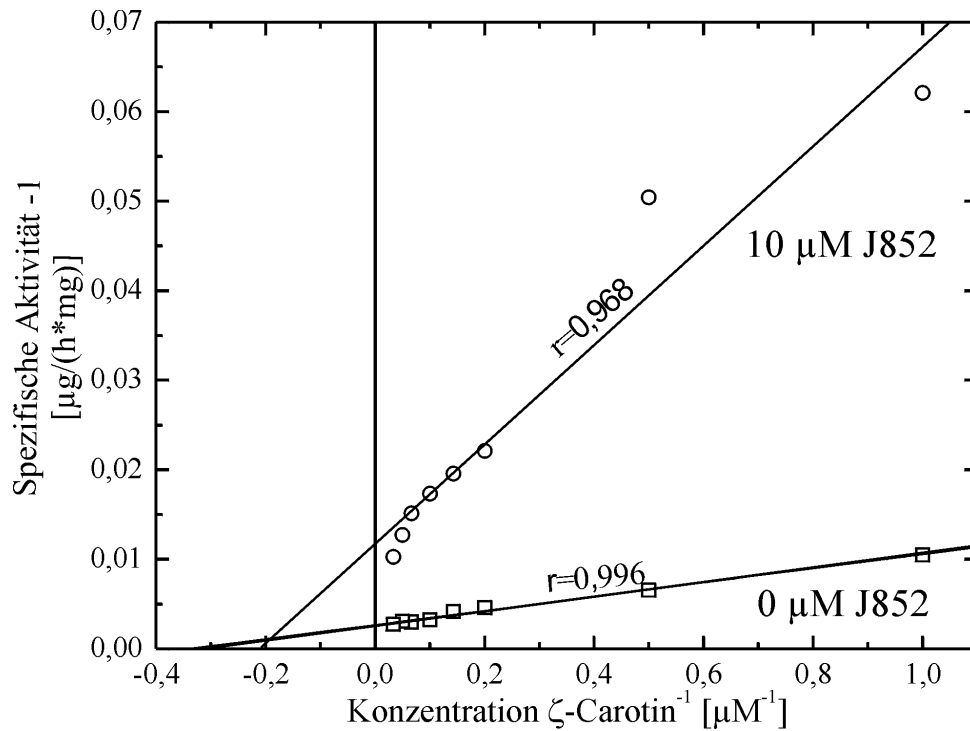
Ziel war es, die Art der Hemmung des Inhibitors J852 auf die Bindung des Substrates der ZDS und auf die Bindung des Kofaktors hin zu untersuchen. Für die Phytoendesaturasen aus *Gentiana lutea* und aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 konnte gezeigt werden, daß sie wie die ZDS aus *Capsicum annuum* den Kofaktor Plastochinon verwenden. Es sollte untersucht werden, ob diese strukturell verwandten Phytoendesaturasen durch den Hemmstoff Norflurazon in gleicher Weise gehemmt werden, wie die *Capsicum*-ZDS durch den Inhibitor J852. In Tabelle 3.24 sind die *in vitro*-Reaktionsbedingungen zur den Hemmkinetiken angegeben.

**Tabelle 3.24:** *In vitro*-Reaktionsbedingungen der Hemmkinetiken

Desaturase	Hemmstoff	Hemmstoffkonz. [ $\mu\text{M}$ ]	Reaktionsdauer [h]	Kofaktorkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Substratmenge [ $\mu\text{M}$ ]	Protein
ZDS aus <i>Capsicum annuum</i>	J852	0 und 10	3	10	1 bis 30	27 $\mu\text{g}$ gereinigte ZDS
		0, 5 und 10	2	0,5 bis 10	18,6 [10 $\mu\text{g}$ ]	
CrtP aus <i>Synechococcus</i>	Norflurazon	0 und 0,06	2	0,2 bis 10	9	5,3 mg Protein (Zellüberstand aus JM101/pdsoex)
PDS aus <i>Gentiana lutea</i>	Norflurazon	0 und 0,06	2	0,2 bis 10	9	2,36 mg Protein (Zellüberstand aus JM101/pUC8pds)

#### 5.6.3.1. Bestimmung des Hemmtyps von J852 bezogen auf das Substrat der *Capsicum*-ZDS

Unter Abbildung 3-32 ist die doppelt reziproke Auftragung der gebildeten Carotinoidmenge gegen die Substratkonzentration unter Einsatz von 0 und 10  $\mu\text{M}$  J852 dargestellt. Die zugehörigen Regressionsgeraden treffen sich nahezu auf der X-Achse und schneiden die Y-Achse in unterschiedlicher Höhe. Die berechneten  $K_m$ -Werte (Tabelle 3.25) unterscheiden sich voneinander nur geringfügig um den Faktor 1,4. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist bei Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  J852 dagegen um den Faktor 4,8 geringer. Es liegt eine nicht-kompetitive Hemmung der ZDS durch den Hemmstoff J852 bezogen auf das Substrat  $\zeta$ -Carotin vor.



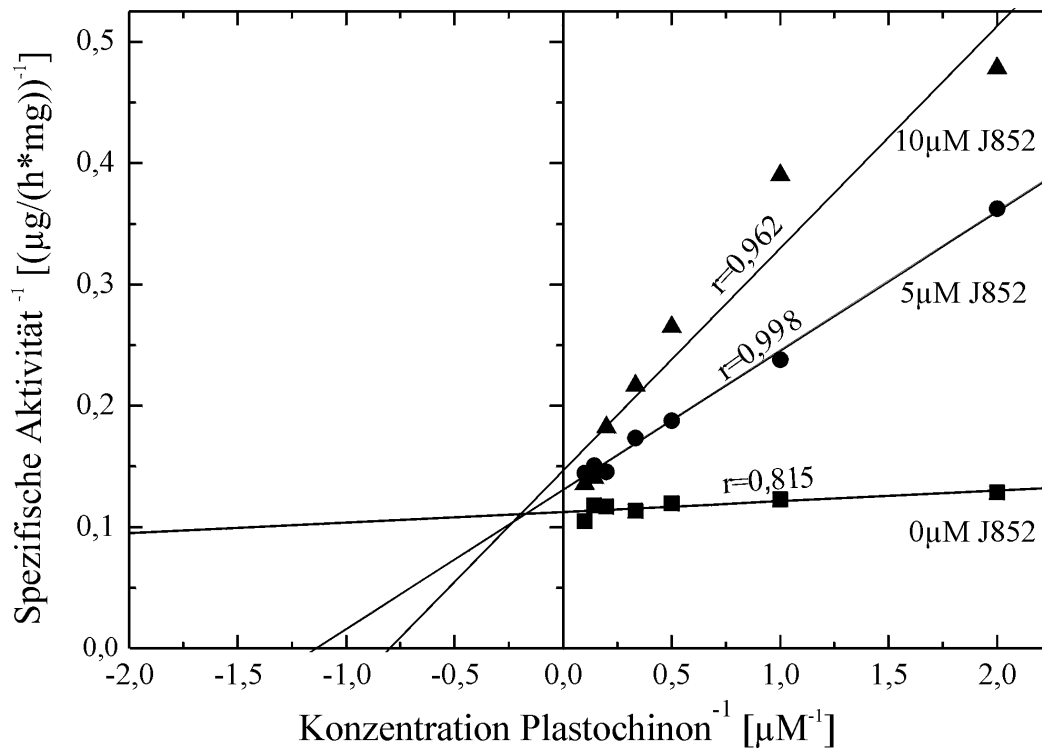
**Abbildung 3-32:** Doppelt reziproke Auftragung der spezifischen Aktivität der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* gegen die  $\zeta$ -Carotin-Konzentration mit und ohne den Hemmstoff J852. Es liegt eine nicht-kompetitive Hemmung der *Capsicum*-ZDS durch das Herbizid J852 bezogen auf das Substrat vor.

**Tabelle 3.25:** Kinetische Daten der Hemmung der ZDS aus *Capsicum* durch den Inhibitor J852.

Hemmstoffkonzentration J852 [ $\mu\text{M}$ ]	$K_m$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\max}$ [ng/(h*mg)]
0	3,04	383,1
10	4,36	80,61

### 5.6.3.2. Bestimmung des Hemmtyps von J852 bezogen auf die Bindung des Kofaktors Decyl-Plastochinon bei der *Capsicum*-ZDS

Nach doppelt reziproker Auftragung der spezifischen Enzymaktivität gegen die Kofaktorkonzentration bei drei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen zeigte sich eine Kompetition des Hemmstoffs J852 und des Kofaktors Decyl-Plastochinon um die Kofaktorbindestelle (Abbildung 3-33). Die Regressionsgeraden schneiden sich in der Nähe der Y-Achse, d.h. die  $K_m$ -Werte unterscheiden sich deutlich voneinander, die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten werden im Vergleich dazu von dem Hemmstoff weniger verändert. In der Tabelle 3.26 sind die  $K_m$ -Werte und die zugehörigen  $V_{\max}$ -Werte aufgelistet. Durch Zugabe von  $10\mu\text{M}$  J852 erhöht sich der  $K_m$ -Wert von  $0,08\mu\text{M}$  auf  $1,25\mu\text{M}$ , was einer Änderung um den Faktor 15,6 entspricht. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit dagegen ändert sich nur um den Faktor 1,3.



**Abbildung 3-33:** Doppelt reziproke Auftragung der spezifischen Aktivität der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* gegen die Kofaktorkonzentration mit und ohne den Hemmstoff J852. Es liegt eine kompetitive Hemmung der Bindung des Kofaktors durch das Herbizid J852 vor.

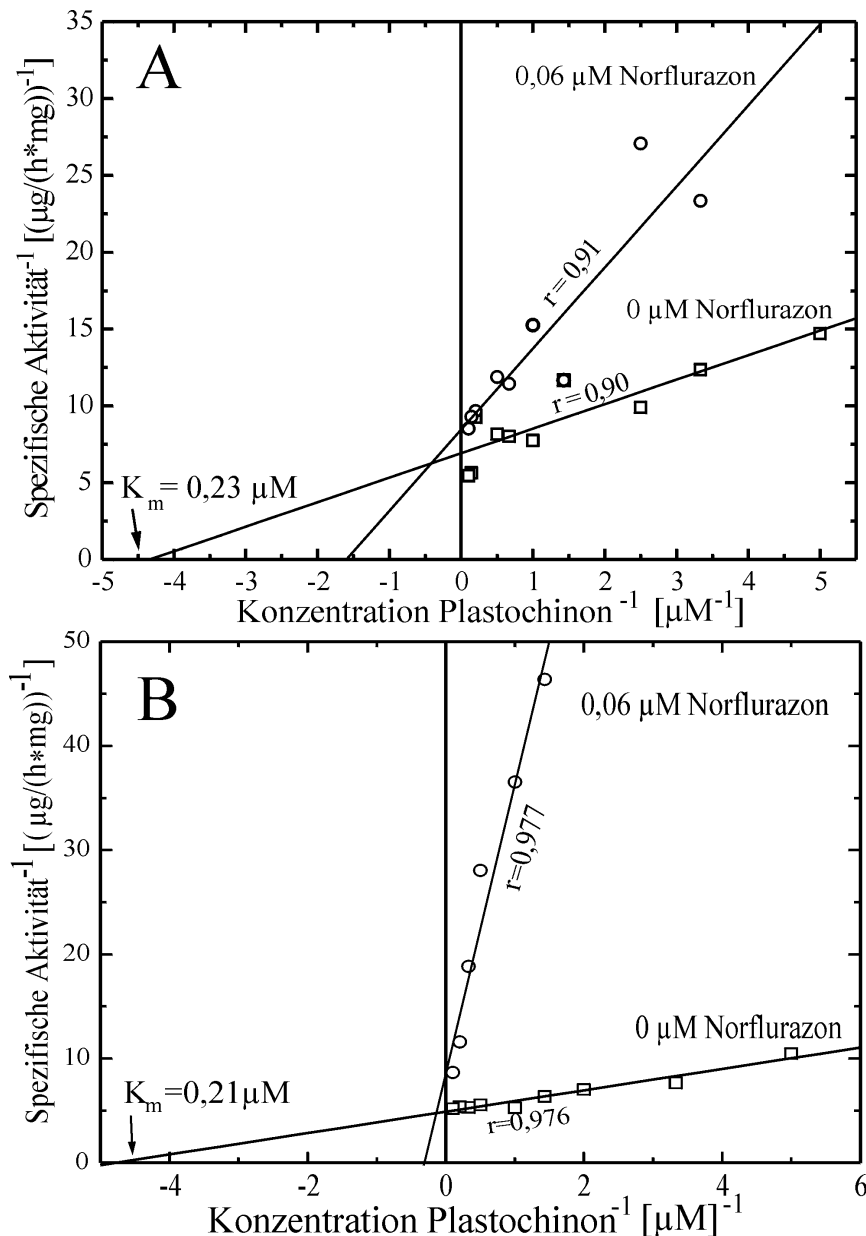
**Tabelle 3.26:**  $K_m$ -Werte für Plastochinon in Abhängigkeit der Hemmstoffkonzentration

Hemmstoffkonzentration J852 [ $\mu\text{M}$ ]	$K_m$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\max}$ [ $\mu\text{g} / (\text{h} \cdot \text{mg})$ ]
0	0,08	8,89
5	0,88	7,67
10	1,25	6,83

### 5.6.3.3. Bestimmung des Hemmtyps des Bleichherbizids Norflurazon bezogen auf die Bindung des Kofaktors Decyl-Plastochinon bei den Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 und aus *Gentiana lutea*

Die Regressionsgeraden beider Hemmkinetiken schneiden sich in der Nähe der Y-Achse, d.h. die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird durch Norflurazon kaum verändert, der  $K_m$ -Wert dagegen erhöht. Für die Phytoendesaturase aus *Synechococcus* erhöhte sich der  $K_m$ -Wert von  $0,23 \mu\text{M}$  auf  $0,62 \mu\text{M}$  durch die Zugabe von  $0,06 \mu\text{M}$  Norflurazon. Für die PDS aus *Gentiana* erhöhte sich dagegen der  $K_m$ -Wert von  $0,21 \mu\text{M}$  auf  $3,25 \mu\text{M}$  durch die Zugabe von  $0,06 \mu\text{M}$  Norflurazon. Für die Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 und aus *Gentiana lutea* liegt demnach eine Kompetition des Kofaktors Decyl-Plastochinon und des Bleichherbizids Norflurazon um die Kofaktorbindestelle vor.





**Abbildung 3-34:** Doppelt reziproke Auftragung der spezifischen Aktivität der Phytoendesaturasen aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 (A) und *Gentiana lutea* (B) gegen die Kofaktorkonzentration mit und ohne den Hemmstoff Norflurazon. Es liegt eine Konkurrenz des Kofaktors Decyl-Plastochinon der Phytoendesaturasen aus *Gentiana* und *Synechococcus* mit dem Inhibitor Norflurazon um die Kofaktorbinderstelle vor.

## 5.7. Untersuchung der nativen ZDS aus *Capsicum annuum* auf Dimerisierung

### 5.7.1. Two-Hybrid-System

Da die Desaturierung von Phytoen über mehrere Desaturierungen erfolgt und es sich bei dem Phytoen um ein symmetrisches Molekül handelt, wurde bereits in der Vergangenheit diskutiert, ob eine Dimerisierung der Phytoendesaturasen zur Durchführung mehrerer Desaturierungsschritte erforderlich ist (Bartley et al., 1990; Pecker et al., 1992).

Eine mögliche Dimerisierung der ZDS, wurde über das auf dem GAL4 Transkriptionsfaktor von *Saccharomyces* basierenden Two-Hybrid-Systems in *Saccharomyces* untersucht, mit dem es möglich ist, in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) Protein-Protein-Wechselwirkungen heterolog exprimierter Proteine nachzuweisen.

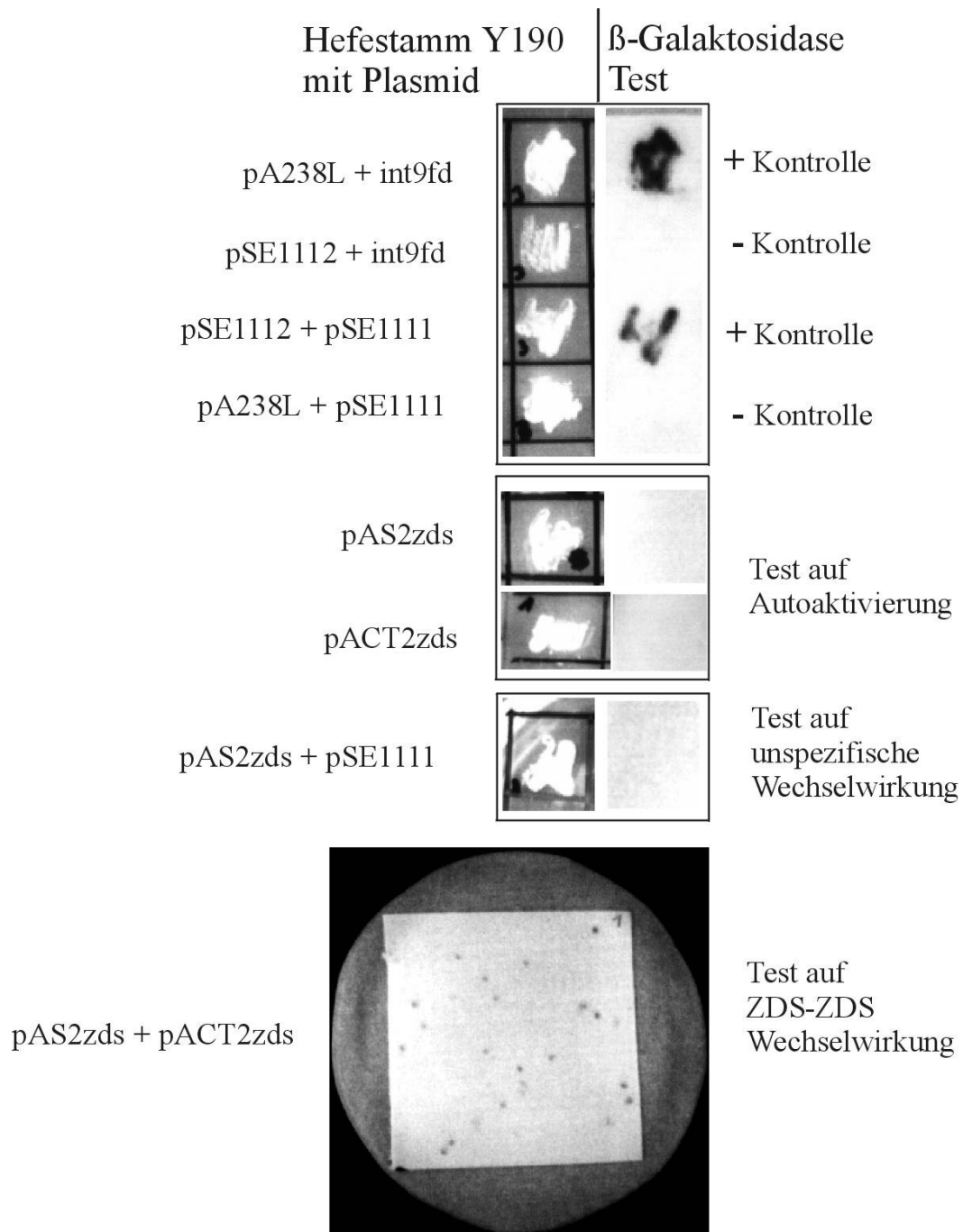
Die ZDS aus *Capsicum* wurde dazu in Hefe heterolog in Form zweier Fusionsprotein exprimiert. Eines der Fusionsproteine enthielt die ZDS zusammen mit der DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors. Das andere Fusionsprotein, enthielt die ZDS zusammen mit der GAL4-Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors. Bei Dimerisierung der ZDS, entsteht der funktionelle GAL4-Transkriptionsfaktor, was colorimetrisch nachgewiesen wird.

Die Ergebnisse des Two-hybrid Systems sind in der Abbildung 3-35 zusammengefasst. Auf der linken Seite der Abbildung ist jeweils eine auf Petrischale ausgestrichene Hefekolonie zu sehen, die mit den angegebenen Plasmiden transformiert wurde. Rechts davon ist der zugehörige Nitrocellulose- $\beta$ -Galaktosidase Farbttest (colony-lift filter test) gezeigt. Die Dunkelfärbung des Farbttests deutet auf vorhandene  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität hin und damit auf die Bildung eines GAL4-Transkriptionsfaktors durch die vorhandene Protein-Protein-Wechselwirkung. Am unteren Ende der Abbildung ist der  $\beta$ -Galaktosidase-Farbttest aller Kolonien der Transformation des Hefestammes Y190 mit den beiden ZDS-cDNA tragenden Plasmiden pAS2zds und pACT2zds dargestellt. Erwartungsgemäß zeigten beide Positivkontrollen (Y190 kotransformiert mit pA238L + int9fd sowie Y190 kotransformiert mit pSE1112+pSE1111) eine starke Dunkelfärbung des Nitrocellulosefilters. Die Negativkontrollen, bei denen die Plasmide zur Kotransformation getauscht wurden (Y190 mit pSE1112 + int9fd, Y190 mit pA238L + pSE1111), zeigen dagegen im Farbttest keine Färbung.

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Test des Two-Hybrid-Systems zeigte eine leichte ZDS-ZDS-Wechselwirkung (Kotransformation Y190/pAS2zds + pACT2zds). Der Nitrocellulose-Filter trägt die Kolonien einer Kotransformation des Hefestammes Y190 mit den Plasmiden pAS2zds und pACT2zds. Die Kolonien zeigen alle eine leichte Färbung, die damit eine geringe Wechselwirkung der nativen ZDS mit sich selbst bzw. die Dimerisierung nachweist.

Die Negativkontrollen (Transformationen Y190/pAS2zds und Y190/pACT2zds), zeigten keine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität an, d.h. die ZDS als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (pAS2zds) oder der GAL4-Aktivierungsdomäne (pACT2zds) allein ist nicht als

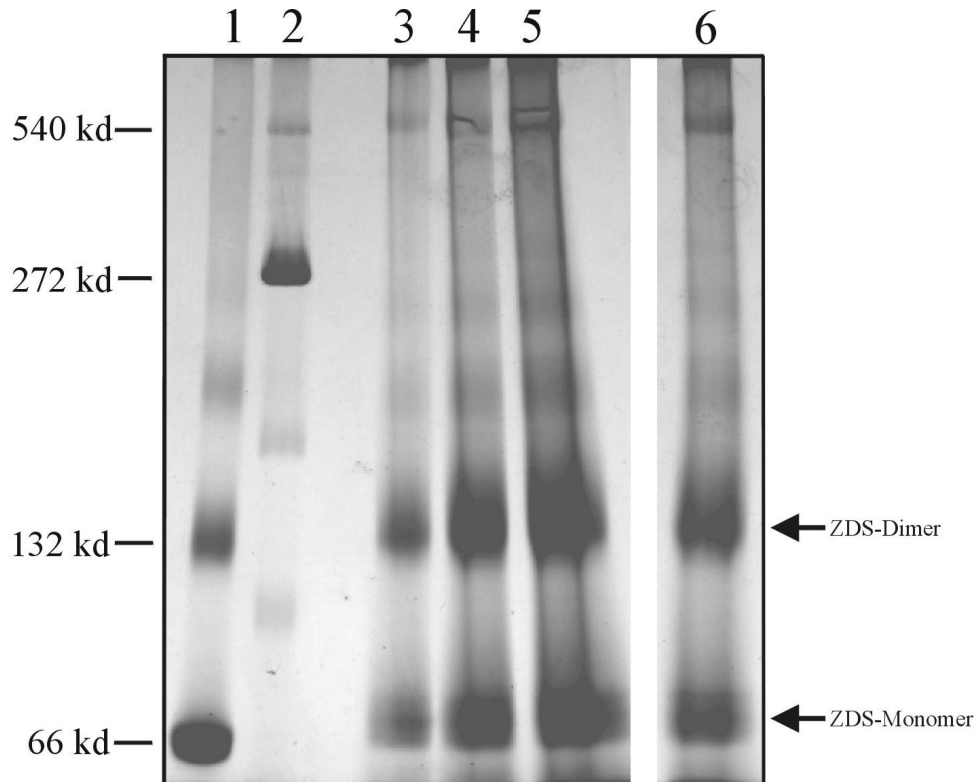
Transkriptionsfaktor für die Transkription der  $\beta$ -Galaktosidase wirksam. Die zweite Kontrolltransformation Y190/pAS2zds+pSE1111 zeigte ebenfalls keine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität, d.h. keine unspezifische Wechselwirkungen mit dem fremden Protein.



**Abbildung 3-35:** Test auf Dimerisierung der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* mit dem Hefe Two-Hybrid-System.

### 5.7.2. Native Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow (1991)

Anhand des Two-Hybrid Systems zeigte die *Capsicum*-ZDS eine leichte Wechselwirkung mit sich selbst. Zur Überprüfung der über das Two-Hybrid-System nachgewiesenen Dimerisierung der ZDS, wurde eine native Gelelektrophorese (Schägger & von Jagow, 1991) der gereinigten *Capsicum*-ZDS durchgeführt.



**Abbildung 3-36:** Native Gelelektrophorese der ZDS aus *Capsicum annuum* nach Schägger und von Jagow, 1991.

- Spur 1: Rinderserumalbumin (66 kd Monomer, 132 kd Dimer)
- Spur 2: Urease (272 kd Trimer, 545 kd Hexamer),
- Spur 3: 50 µg ZDS
- Spur 4: 125 µg ZDS
- Spur 5: 200 µg ZDS
- Spur 6: 75 µg ZDS, 1mM CoCl<sub>2</sub>.

In der Abbildung 3-36 ist das Ergebnis der nativen Gelelektrophorese der ZDS aus *Capsicum* dargestellt. Die Spuren 1 und 2 zeigen den Molmassenstandard, die Spuren 3 bis 5 je 50 µg, 125 µg und 200 µg der nativen ZDS und Spur 6 eine mit 1mM Kobaltchlorid versetzte Probe der ZDS.

Bei der nativen Gelelektrophorese traten zwei intensiv gefärbte Polypeptide von ca. 66 und 130 kd (Spuren 3 bis 5) auf. Entsprechend der Molmasse der denaturierten ZDS von ca. 60 kd, stellen die zwei Polypeptide ein Monomer und ein Dimer der ZDS dar. Durch Zusatz von 1 mM Kobaltchlorid zur nativen ZDS (Spur 6) ergaben sich keine Unterschiede in der Stärke

der Proteinbanden der monomeren und dimeren Form der ZDS. Eine Dimerisierung des rekombinanten Proteins durch die zugesetzten zweiwertigen Metallionen und die 6 N-terminalen Histidine der rekombinanten ZDS fand folglich nicht statt.

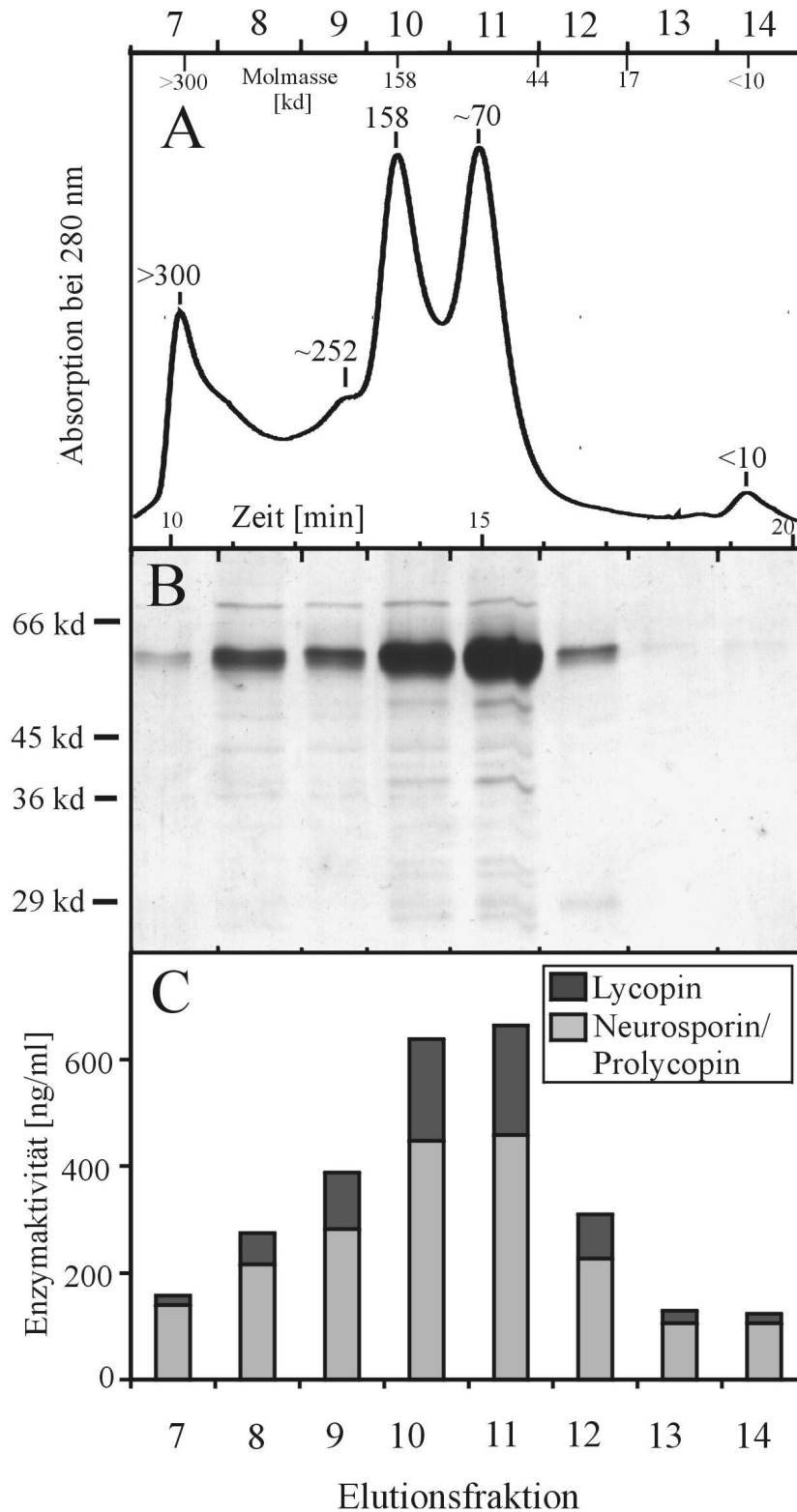
### 5.7.3. Gelfiltration der nativen ZDS aus *Capsicum* mit nachfolgender Untersuchung der enzymatischen Aktivität der Elutionsfraktionen

Um die monomere und dimere Form der nativen ZDS auf ihre enzymatische Aktivität zu untersuchen, wurden diese über Gelfiltration aufgetrennt und die Aktivität der erhaltenen Fraktionen über *in vitro*-Tests bestimmt (Abbildung 3-37, A-C).

Die Teilabbildung (A) zeigt das Elutionsprofil der Gelfiltration. Die untere x-Achse in A gibt die Retentionszeit in Minuten an, die obere x-Achse die während der Trennung aufgefangenen Fraktionen 7 bis 14. Zusätzlich sind die Molmassenstandards in der oberen x-Achse (158 kd, 44 kd, 17 kd) eingetragen.

Es zeigten sich in den Fraktionen 11 und 10 der Gelfiltration, zwei gleich große Elutionsgipfel, die einer Molmasse der ZDS von ca. 70 (Fraktion 11) und 158 kd (Fraktion 10) entsprachen. Gemäß der Molmasse der ZDS von ca. 60 kd enthielten diese Elutionsfraktionen 11 und 10 somit eine monomere und eine dimere Form der ZDS. Der Elutionsgipfel der Elutionsfraktion 7 entsprach allen Proteinen größer als 300 kd, gemäß dem Ausschlußvolumen der verwendeten Säule. Neben den zwei großen Elutionsgipfeln trat ein kleinerer von ca. 250 kd auf (Fraktion 9). Die darunterliegende Teilabbildung (B) zeigt die über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Polypeptide der Fraktionen der Gelfiltration. Dabei zeigte sich die ZDS in den Fraktionen 7-14 als ein Polypeptid einheitlicher Größe von ca. 60 kd, mit der größten Menge der ZDS in den Fraktionen 10 und 11.

In der Abbildung C sind die gemessenen Enzymaktivitäten der ZDS in den Fraktionen 7 bis 14 in ng Produkt pro ml Fraktionsvolumen angegeben. Die spezifischen Aktivitäten betrugen 1,54  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  für die dimere Form (Fraktion 10) und 1,37  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  für die monomere Form (Fraktion 11) der ZDS. Folglich ist die ZDS sowohl als Monomer und als Dimer gleich aktiv. Eine Dimerisierung zur Durchführung beider Desaturierungsschritte von  $\zeta$ -Carotin zu Neurosporin und Lycopin ist nicht notwendig. Dies zeigte sich am Verhältnis des gebildeten Neurosporins zum Lycopin von 1,79 für Fraktion 10 (Dimer) und von 1,77 für Fraktion 11 (Monomer).



**Abbildung 3-37:** Gelfiltration der nativen  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum*.

A: FPLC-Chromatogramm der ZDS mit den Elutionsfraktionen 7 bis 14, die obere X-Achse gibt die Molmasse des verwendeten Molmassenstandards (158, 44, 17 kd), die untere X-Achse die Retentionszeit an.

B: Denaturierende SDS-Gelelektrophorese der FPLC-Fractionen 7 bis 14.

C: *In vitro*-ZDS-Aktivitäten der FPLC-Fractionen.

Die Teilabbildungen A, B, C sind so übereinander angeordnet, daß die einander entsprechenden FPLC-Fractionen untereinander zum Liegen kommen.

### 5.8. Untersuchung der Substratspezifität der *Capsicum*-ZDS

Enzyme der Carotinoidbiosynthese erkennen oft nur bestimmte Bereiche des Substratmoleküls (Sandmann, 1994). Durch die Untersuchung der Substratspezifität ist es möglich Rückschlüsse auf die Bereiche des Moleküls zu ziehen, die für die Substratbindung wichtig sind. Ziel war es daher, über den Umsatz verschiedener Carotinoidsubstrate in den *in vitro*-Aktivitätstests, den Bereich der Carotinoidmoleküle zu bestimmen, der für die Substratbindung an die ZDS notwendig ist. Als Substrate wurden  $\zeta$ -Carotin, Neurosporin, Hydroxy- und Di-hydroxy- $\zeta$ -Carotin, Hydroxy- und Dihydroxy-Neurosporin,  $\beta$ -Zeaxarotin, Demethylspheroidin, Spheroidin, Diaponeurosporin und Phytoen eingesetzt (Abbildung 3-38, 3-39).

Die Abbildungen 3-38, 3-39 zeigen die  $C_{18}$ -HPLC-Chromatogramme (J,  $C_{30}$ -HPLC) der *in vitro*-Reaktionsprodukte zusammen mit dem Substrat, sowie die zugehörigen Strukturformeln. Die berechneten Anteile der einzelnen Produkte am Gesamtcarotinoidgehalt sind in der Tabelle 3-27 aufgelistet, ebenso wie die Retentionszeiten und die Absorptionsmaxima der einzelnen Carotinoide. Sowohl  $\zeta$ -Carotin (1) als auch das einseitig (4) oder das doppelseitig (7) hydroxylierte  $\zeta$ -Carotin wurden desaturiert. Die Retentionszeiten der Produkte als auch der Substrate verkürzen sich mit der zunehmenden Anzahl an Hydroxygruppen bedingt durch die zunehmende Polarität der Verbindungen. Die Gesamtumsätze variierten von 14,8 % für  $\zeta$ -Carotin (A) über 9 % für Hydroxy- $\zeta$ -Carotin (B) hin zu 14,6 % (C) für Dihydroxy- $\zeta$ -Carotin, d.h. die ZDS kann in gleichem Maße  $\zeta$ -Carotin als auch die mono- und dihydroxylierten  $\zeta$ -Carotin-Substrate desaturieren.

Bei Verwendung von Neurosporin (10) und deren hydroxylierte Derivate (12), (14) zeigte sich eine Abnahme des Umsatzes von Substrat zu Produkt mit Einführung einer Hydroxygruppe in Position 1 und 1'. Der Umsatz nahm ausgehend von 44,7 % für Neurosporin (D) über 17,4 % für Hydroxy-Neurosporin (E) auf ca. 6,7 % für Dihydroxyneurosporin (F) ab, d.h. die Desaturierungsreaktion (siehe Abbildung 3-38) wurde mit Hydroxylierung der Substrate zunehmend behindert. Die Desaturierung von  $\beta$ -Zeaxarotin (16) zu  $\gamma$ -Carotin (17) erfolgte dagegen durch die ZDS mit einem Umsatz von 27 %.

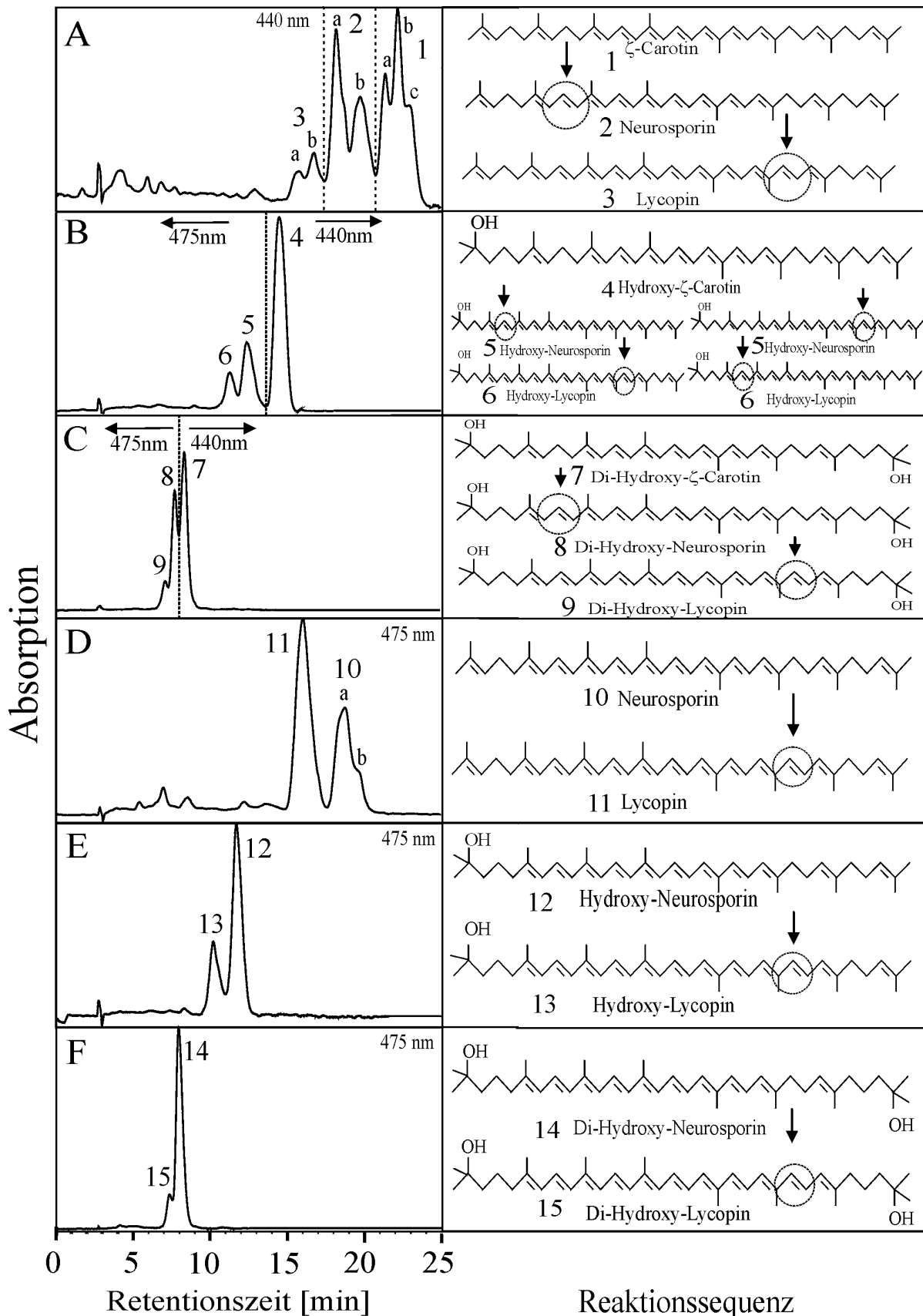
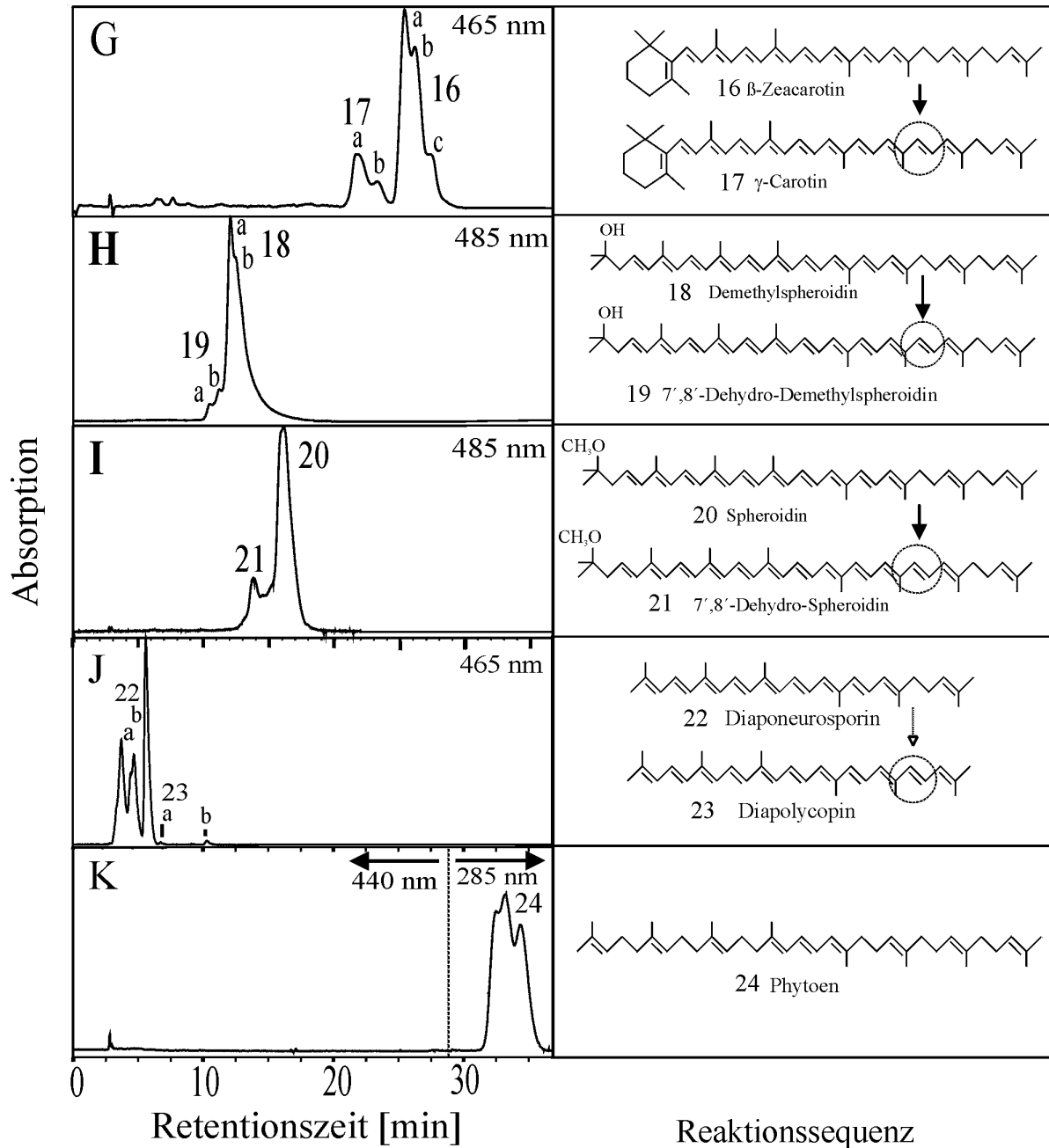


Abbildung 3-38: Substratspezifität der ZDS aus *Capsicum*.

$C_{18}$ -HPLC-Chromatogramme der Produkte der *Capsicum*-ZDS, die in den *in vitro*-Aktivitätstest unter Verwendung verschiedener Carotinoide als Substrat gebildet wurden. In jedem Chromatogramm stellt der rechte Elutionsgipfel das Substrat, der oder die links stehenden Elutionsgipfel die Desaturierungsprodukte dar. Zur Vereinfachung der Darstellung sind die Strukturformeln der all *trans*-Isomere gezeigt.





**Abbildung 3-39:** Substratspezifität der ZDS aus *Capsicum*. C<sub>18</sub>- und C<sub>30</sub>-(J) HPLC-Chromatogramme der Carotinoide, die in den *in vitro*-Aktivitätstests umgesetzt wurden (G, H, I), nur gering umgesetzt wurden (J) oder nicht umgesetzt wurden (K). Zur Vereinfachung der Darstellung sind die Strukturformeln der all *trans*-Isomere gezeigt.

Das Substrat Demethylspheroidin (18) unterscheidet sich von Hydroxyneurosporin durch eine zusätzliche Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 3 und 4. Es wurde von der ZDS zu 6,9 % zu 1-Hydroxy-3,4-Didehydrolycopin (19) umgesetzt.

Spheroidin (20), welches sich von Demethylspheroidin durch eine Methoxygruppe an C-1 anstelle einer Hydroxygruppe unterscheidet, wurde von der ZDS zu 18 % 1-Methoxy-3,4-Didehydrolycopin (21) umgesetzt. Diaponeurosporin (22), ein C<sub>30</sub>-Carotinoid wurde dagegen nur zu 3,4 % zu Diapolycopin desaturiert. Phytoen (24) wurde bei den *in vitro*-Reaktionen durch die ZDS nicht desaturiert.

**Tabelle 3.27:** *In vitro*-Umsatz verschiedener Carotinoide als Substrat für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase.

Bild	Substrat	Elutions- gipfel	Anteil [%]	Eluierte Carotinoide	Rf [Min.]	Absorptionsmaxima [nm]
<b>A</b>	$\zeta$ -Carotin	1 a	85,15	$\zeta$ -Carotin	21,40	381, 403, 426
		b			22,20	<b>285, 296</b> , 380, 401, 425
		c			22,90	<b>285, 296</b> , 379, 400, 424
		2 a	11,44	Neurosporin, Prolyc.	18,20	415, 440, 468
		b			19,75	<b>333</b> , 414, 439, 467
		3 a	3,41	Lycopin	15,75	445, 470, 502
b	16,70	<b>362</b> , 445, 470, 500				
<b>B</b>	Hydroxy- $\zeta$ -Carotin	4	91,31	Hydroxy- $\zeta$ -Carotin	14,30	<b>285, 295</b> , 375, 400, 425
		5	6,97	Hydroxyneurosporin	12,33	<b>320, 333</b> , 414, 439, 469
		6	1,72	Hydroxylycopin	11,23	<b>350, 362</b> , 445, 470, 502
<b>C</b>	Dihydroxy- $\zeta$ -Carotin	7	85,37	Dihydroxy- $\zeta$ -Carotin	8,40	<b>285, 295</b> , 375, 400, 425
		8	13,00	Dihydroxyneurosporin	7,70	<b>320, 333</b> , 414, 439, 469
		9	1,63	Dihydroxylycopin	7,05	<b>350, 362</b> , 445, 470, 502
<b>D</b>	Neurosporin	10 a	55,30	Neurosporin	18,67	415, 440, 468
		b			19,60	<b>320, 335</b> , 415, 440, 469
		11	44,70	Lycopin	16,00	<b>370</b> , 445, 470, 500
<b>E</b>	Hydroxy- neurosporin	12	82,60	Hydroxyneurosporin	11,65	<b>320, 333</b> , 414, 439, 469
		13	17,44	Hydroxylycopin	10,17	<b>360</b> , 445, 470, 502
<b>F</b>	Dihydroxy- neurosporin	14	93,33	Dihydroxyneurosporin	7,93	<b>320, 333</b> , 414, 439, 469
		15	6,67	Dihydroxylycopin	7,37	<b>350, 362</b> , 445, 470, 502
<b>G</b>	$\beta$ -Zeaxarotin	16 a	73,30	$\beta$ -Zeaxarotin	25,27	405, 430, 455
		b			26,13	405, 430, 455
		c			27,27	<b>318</b> , 405, 430, 455
		17 a	26,70	$\gamma$ -Carotin	21,67	430, 460, 492
		b			23,20	<b>350</b> , 430, 457, 485
<b>H</b>	Demethylspheroidin (HPLC 1b)	18 a	93,10	Demethylspheroidin	12,00	280, <b>345</b> , 430, 454, 485
		b			12,40	280, <b>345</b> , 429, 453, 483
		19 a	6,90	1-Hydroxy-3,4- Didehydrolycopin	10,37	<b>310</b> , 445, 485, 518
		b			11,13	310, <b>360</b> , 380, 460, 490
<b>I</b>	Spheroidin	20	82,00	Spheroidin	16,10	280, <b>345</b> , 430, 455, 485
		21	18,00	1-Methoxy-3,4- Didehydrolycopin*	13,75	<b>360</b> , 460, 485, 516
<b>J</b>	Diaponeurosporin	22 a	96,70	Diaponeurosporin	5,04	<b>329</b> , 407, 430, 462
		b			6,05	<b>330</b> , 415, 440, 469
		23 a	3,35	Diapolycopin	7,36	
		b			11,76	<b>360</b> , 445, 470, 500

\* (Steiger et al., 2000)

## 6. *In vitro*-Mutagenese der *Capsicum*-ZDS

Bisher lagen keine Informationen über den Bindungsbereich der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase für das Substrat vor. Das Ziel der Mutagenese der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum* war es daher, über die ungerichtete Mutation des Enzyms und nachfolgender Selektion von mutierten Formen der ZDS, Aminosäure-Bereiche zu identifizieren, die für dessen Aktivität von Bedeutung sind.

## 6.1. Selektion von mutierter ZDS über die funktionelle Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli*

Für die Selektion mutierter ZDS war ein Teil der Plasmidbibliothek mutierter ZDS (pUC8zds) in *E. coli* JM101/pACCRT-EBP + pRK-RH7 transformiert worden. Das Plasmid pRK-RH7 führt in *E. coli* zur Expression einer IPP-Isomerase (Kajiwara et al., 1997). In Komplementierungen der Carotinoidsynthese in *E. coli* führt diese zu einer Steigerung des Carotinoidgehaltes und damit zu einer intensiveren Färbung der Bakterienkolonien. Durch das Plasmid pRK-RH7 wurde der Gehalt an Lycopin und Neurosporin jeweils verdoppelt. Dies sollte das Auffinden von Bakterienkolonien mit mutierter ZDS über deren Färbung erleichtern. In der Tabelle 3.28 sind die gemessenen Lycopin- und Neurosporingehalte in *E. coli* mit und ohne dem Plasmid pRK-RH7 aufgelistet.

**Tabelle 3.28:** Erhöhung des Carotinoidgehaltes durch die IPP-Isomerase aus *Haematococcus pluvialis*. Kontrolltransformationen.

<i>E. coli</i> -Transformation	Carotinoid	Carotinoidgehalt in $\mu\text{g}$ Carotinoid/mg Trockenmasse
JM101/pACCRT-EBP + pUC8zds	Lycopin, Neurosporin	0,13 0,33
JM101/pACCRT-EBP + pUC8zds + pRK-RH7	Lycopin, Neurosporin	0,21 0,55

## 6.2. Mutagenese der *Capsicum*-ZDS über error prone PCR

In Tabelle 3.29 sind die durch die durch Zufalls-Mutagenese ausgetauschten Basen und Aminosäuren zweier ZDS-Klone von 20 auf Carotinoidgehalt untersuchten Klonen aufgelistet (Gesamtzahl aller Kolonien ca. 16000). Die Klone 25 und 89 wurden über Komplementierung der mutierten ZDS mit dem Plasmid pACCRT-EBP zur  $\zeta$ -Carotin-Bildung in *E. coli* gefunden. Der Klon 89 zeigte gegenüber einer Kontroll-Komplementierung eine blasse Gelbfärbung, der Klon 25 eine intensiv Orangefärbung. Bei beiden Klonen trat die selbe Mutation der Base 1092 auf, da jedoch der Klon 25 eine höhere, Klon 89 eine niedrigere Aktivität gegenüber der nicht mutierten ZDS aufwies, ist diese Mutation für die Enzymaktivität indifferent. Jeweils eine über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennte Probe des Zellüberstandes von *E. coli* JM101/pUC8zds (Wildtyp-ZDS, Klon 89, Klon 25) zeigte nach densitometrischer Bestimmung des Anteils der exprimierten ZDS am Gesamtproteingehalt einen Wert von 2,5 % (Tabelle 3.29). Die gemessenen Aktivitätsunterschiede der *in vitro*-Aktivitätstests beruhen somit nicht auf unterschiedlich starker Expression der ZDS.

**Tabelle 3.29:** Spezifische Aktivitäten der Wildtyp-ZDS, der ZDS aus den Klonen 25 und 89 und zugehörige, eingefügte Mutationen. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Messungen. Die Mutationen, die in beiden Klonen auftraten sind eingeklammert. Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt mit dem Startcodon der Transitsequenz der cDNA (Acc.Nr. X89897).

Klon	Aminosäuren-austausch	Basenaustausch	Codon	Spezifische Aktivität [ $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{mg}_{\text{Ges. Prot.}})$ ] / Anteil der ZDS am Gesamtprotein
<b>Wildtyp</b>	-	-	-	0,0059 / 2,51 %
<b>25</b>	205 Asn -> Ser (361 Val -> Asp)	614 A -> G (1083 A -> T) (1082 T -> A)	AAT->AGT GTA->GAT	0,0088 / 2,54 %
	406 Asp -> Tyr 536 Ile -> Leu 576 Ser -> Pro	1216 G -> T 1606 A -> C 1726 T -> C	GAC->TAC ATC->CTC TCT->CCT	
	-	366 T -> A	GGT->GTA	
	-	978 C -> T	CTC->CTT	
	-	1485 A -> T	TCA->TCT	
	-	1545 T -> C	CCT->CCC	
	-	1719 C -> T	AAC->AAT	
<b>89</b>	318 Leu -> Val (361 Val -> Asp)	952 C -> G (1083 A -> T) (1082 T -> A)	CTG->GTG GTA->GAT	0,0047 / 2,49 %
	571 Glu -> Ala	1712 A -> C	GAG->GCG	
	-	363 T -> C	TTT->TTC	
	-	564 T -> C	ATT->ATC	
	-	675 G -> A	TTG->TTA	
	-	1507 T -> C	TTA->CTA	

**Tabelle 3.30:** Carotinoidmengen, die bei Komplementierung der Lycopsinthese mit der mutierten *Capsicum*-ZDS der Klone 25 und 89 gebildet wurden (JM101/pACCRT-EBP+pUC8zds). Angegeben sind die Mittelwerte der Carotinoidkonzentration jeweils dreier Kulturen. **Sd:** Standardabweichung, **WT:** Wildtyp. **N:** Neurosporinomere, **L:** Lycopinomere; **Z:** cis-Doppelbindung, **E:** trans-Doppelbindung.

Carotinoid	Carotinoidmenge in ng pro mg Bakterientrockenmasse					
	ZDS WT [ng/mg]	Sd [ng/mg]	ZDS-Klon 25 [ng/mg]	Sd [ng/mg]	ZDS-Klon 89 [ng/mg]	Sd [ng/mg]
<b>N1 (Z)</b>	<b>5,08</b>	<b>0,91</b>	<b>15,5</b>	<b>2,13</b>	<b>0,093</b>	<b>0,078</b>
N3	0,39	0,10	0,70	0,15	0,136	0,030
N4	0,56	0,08	1,01	0,13	0,005	0,007
N5	0,29	0,16	0,35	0,07	0,010	0,014
N6	0,27	0,05	0,59	0,05	0	0
N7	0,16	0,02	0,44	0,13	0,019	0,022
N8	2,01	0,42	3,17	0,75	0,012	0,017
N9	3,52	0,30	6,54	0,64	0,158	0,028
N10	0,38	0,12	0,75	0,02	0,060	0,028
N11 (all E)	1,22	0,19	2,52	0,21	0,143	0,040
<b>L1 (7,9,7',9'Z)</b>	<b>26,34</b>	<b>3,63</b>	<b>40,8</b>	<b>5,77</b>	<b>0,172</b>	<b>0,065</b>
L4	0,49	0,09	0,58	0,15	0	0
L5	0,31	0,06	0,43	0,13	0	0
L6	0,52	0,06	0,77	0,07	0,019	0,027
L7 (9 Z)	1,12	0,11	1,76	0,18	0,018	0,025
L8 (5,9'Z)	0,43	0,06	0,63	0,11	0,021	0,029
L9	0,66	0,10	0,93	0,45	0,021	0,030
L10 (7Z)	0,43	0,07	0,77	0,19	0,009	0,012
L11 (7Z)	1,07	0,08	1,65	0,35	0,017	0,024
L12 (all E)	1,11	0,10	1,94	0,19	0,014	0,020
L13 (5Z, 5,5'Z)	1,33	0,15	2,39	0,20	0,014	0,020
<b>Summe [ng/mg]</b>	<b>47,69</b>	<b>6,86</b>	<b>84,28</b>	<b>12,05</b>	<b>0,939</b>	<b>0,516</b>
<b>Neurosporin</b>	<b>29,1 %</b>		<b>37,6 %</b>		<b>67,6 %</b>	
<b>Lycopin</b>	<b>70,9 %</b>		<b>62,5 %</b>		<b>32,4 %</b>	

Die Tabelle 3.30 zeigt die bei einer funktionellen Komplementierung der Lycopinsynthese mit den mutierten  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen der Klone 25, 89 und der Wildtyp-ZDS gebildeten Carotinoidmengen. Der Gehalt der Desaturierungsprodukte ist beim Klon 25 deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht. Vor allem der Gehalt an Prolycopin und dem cis-Neurosporin N1 ist höher. Der Klon 89 dagegen bildete gegenüber der Komplementierung mit der Wildtyp-ZDS nur sehr geringe Mengen an Lycopin und Neurosporin.

### 6.3 Auswirkung des Austauschs einzelner Aminosäuren auf die Aktivität der *Capsicum*-ZDS

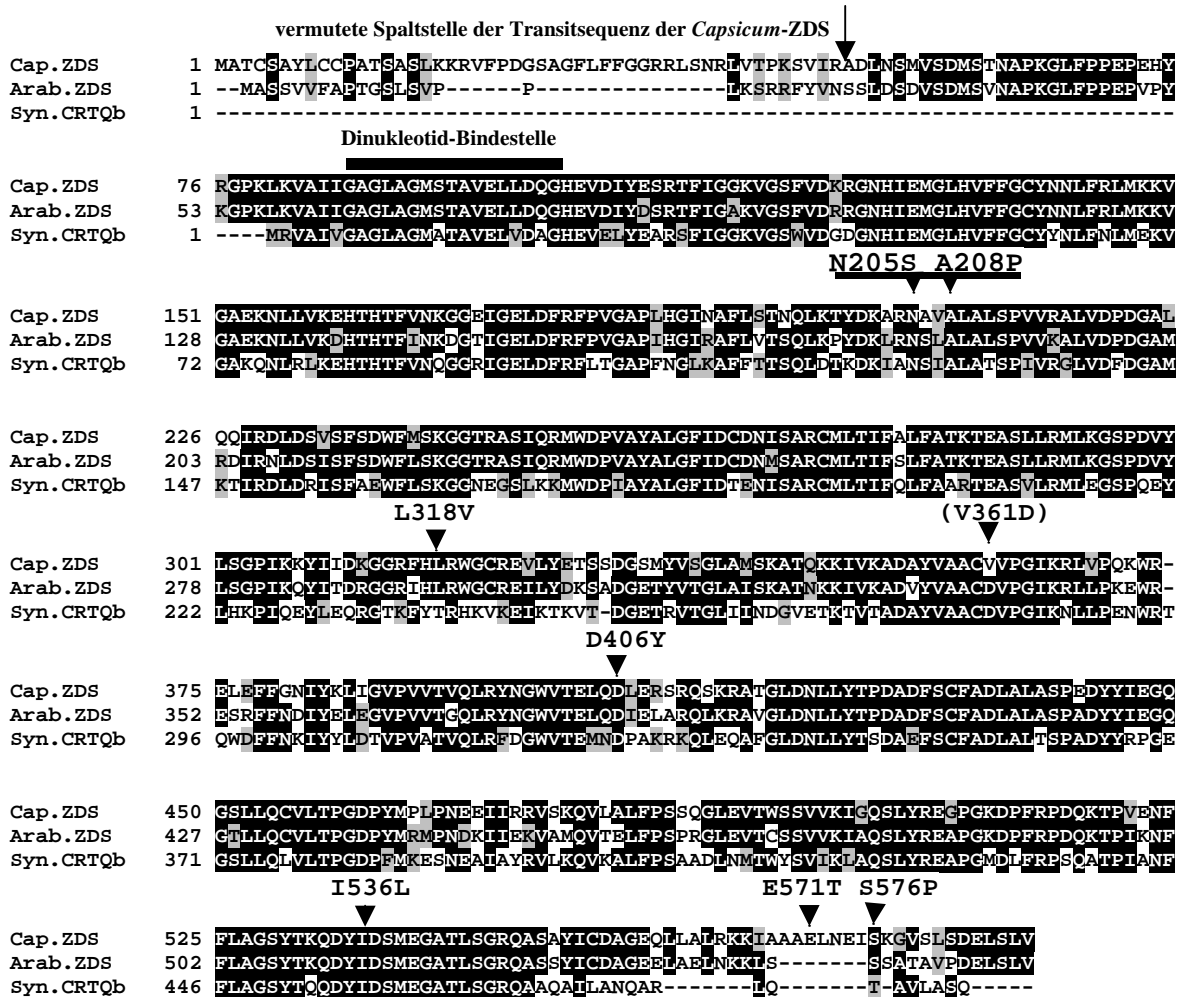
Über die Mutagenese der ZDS konnten zwei Klone isoliert werden, die jeweils eine ZDS mit 5 (Klon 25) und mit 3 (Klon 89) ausgetauschten Aminosäuren enthielten. Über inverse PCR wurden die Mutationen einzeln in die Aminosäuresequenz der ZDS eingefügt. Das Ziel war es die Auswirkung der einzelnen Mutationen auf die Aktivität und die Zusammensetzung der Desaturierungsprodukte zu untersuchen.

Der Aminosäuren-Sequenzvergleich der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum annuum*, *Arabidopsis thaliana* und aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist in Abbildung 3-40 dargestellt. Für alle drei Desaturasen ist die Bildung von Prolycopin bei Komplementierung in einem  $\zeta$ -Carotin-akkumulierenden *E. coli*-Stamm nachgewiesen. Die *Arabidopsis*-ZDS besitzt dabei mit der *Capsicum*-ZDS 81 % identische und 89 % ähnliche Aminosäuren, die *Synechocystis*-ZDS 64 % identische und 78 % ähnliche Aminosäuren. Die über inverse PCR ausgetauschten Aminosäuren sind oberhalb des Sequenz der *Capsicum*-ZDS eingezeichnet.

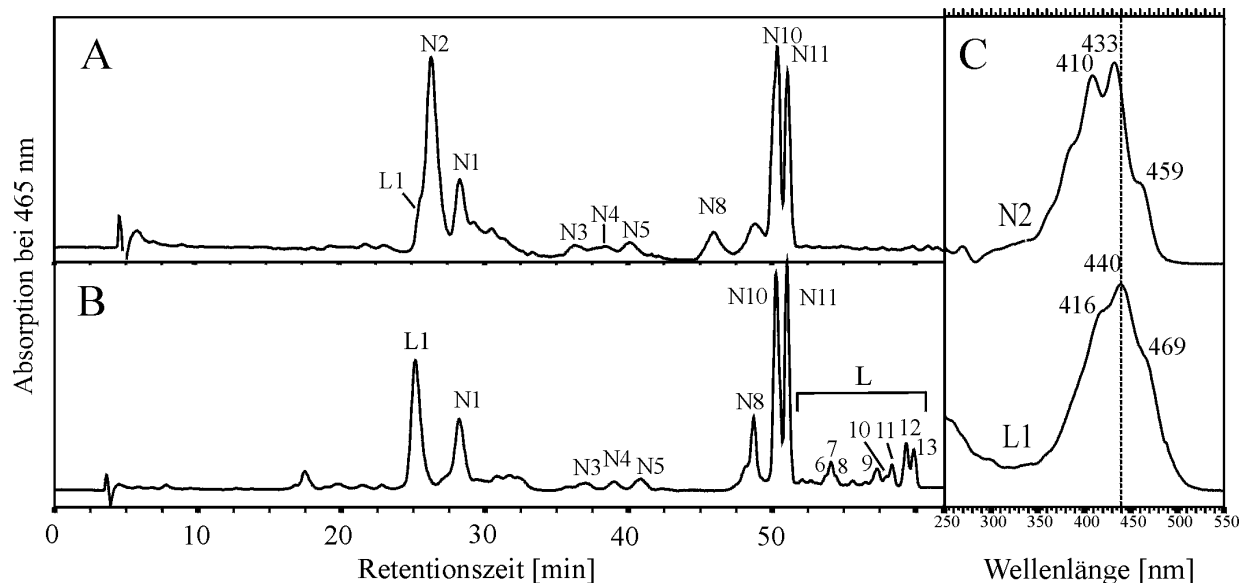
Die Ergebnisse der *in vitro*-Tests mit der gereinigter ZDS, bei der über inverse PCR jeweils eine Aminosäure ausgetauscht wurde und von drei weiteren Klonen, sind in den Tabellen 3.31 und 3.32 dargestellt. Für jeden Klon wurden 3 Messungen durchgeführt, sowie Mittelwert und Standardabweichung der gebildeten Carotinoidisomere berechnet.

Der gleichzeitige Austausch der Aminosäure **205 Asparagin gegen Serin** und der Aminosäure **208 Alanin gegen Prolin (Klon 622)** führte zu einer starken Abnahme der Bildung von Prolycopin L1 (siehe C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramm, Abbildung 3-41, Tabelle 3.32), andere Lycopinisomere waren nicht mehr nachweisbar. Der Anteil von Lycopin an den gesamten Desaturierungsprodukten betrug nur 7 %, der Neurosporinanteil dagegen 93 %. Weiterhin kam es erstmals zu einer **Akkumulation des Intermediats Proneurosporin (N2) (7,9,9'-tricis-Neurosporin)**. Die Akkumulation des Intermediats Proneurosporin (7,9,9'-tricis-Neurosporin) konnte nur für die mutierte ZDS der Klone 622, 614, 614-2 und 952

nachgewiesen werden. Die mutierte ZDS führte durch den Austausch der Aminosäuren 205 und 208 im wesentlichen nur noch einen Desaturierungsschritt von  $\zeta$ -Carotin zu Neurosporin durch. Die Durchführung des zweiten Desaturierungsschritts wurde durch die Mutationen deutlich behindert (Abbildung 3-41; Tabelle 3.31). Gleichzeitig verringerte sich die enzymatische Aktivität der ZDS auf 42 % der Wildtyp-ZDS.



**Abbildung 3-40:** Aminosäuresequenzvergleich der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum* (Acc.Nr. X89897), *Arabidopsis* (Acc.Nr. U38550) und *Synechocystis* (Acc.Nr. BAA18400) und über inverse PCR ausgetauschte Aminosäuren der ZDS aus *Capsicum*. Für diese drei  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen ist die Bildung von Prolycopin nachgewiesen. Die über inverse PCR ausgetauschten Aminosäuren sind oberhalb der ZDS eingezeichnet. Die Pfeile markieren die einzelnen bei der Mutagenese der *Capsicum*-ZDS über inverse PCR ausgetauschten Aminosäuren. Der oberste Pfeil markiert die Position an der die Abspaltung der mutmaßlichen Transitsequenz erfolgt, die Linie markiert die potentielle Dinukleotidbindestelle (Albrecht et al., 1995a).



**Abbildung 3-41:** C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramme der Produkte der mutierten *Capsicum*-ZDS (Klon 622, A) und der Wildtyp-ZDS (B). Die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase führt in Folge des gleichzeitigen Austauschs der Aminosäuren **205 Asn** gegen **Ser** und **208 Ala** gegen **Pro** im wesentlichen nur noch **einen Desaturierungsschritt** von  $\zeta$ -Carotin zu Neurosporin durch. Dargestellt sind die C<sub>30</sub>-HPLC-Chromatogramme der Desaturierungsprodukte der **mutierten ZDS (A, Klon 622)** und der **Wildtyp-ZDS (B)** aus *in vitro*-Aktivitätstests. Unter **C** sind die **Spektren** von Prolycopin (7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin) L1 und Proneurosporin (7,9,9'cis) N2 dargestellt. Die ZDS aus dem Klon 622 bildet nur noch geringe Mengen an Lycopin (7 % Prolycopin), dafür akkumuliert **Proneurosporin N2**, das Intermediat der Prolycopinbildung. **Die Carotinoidzusammensetzung des Extraktes aus dem Klon 622 ist in Tabelle 3.31 angegeben.**

Der einzelne Austausch der Aminosäuren 205 Asn (**Klon 614**) gegen Ser führte dagegen zu einer sehr geringen Aktivität von 8 % der Aktivität der Wildtyp-ZDS. Wie bei dem Klon 622 war die Bildung von Lycopin verringert (14,5 % Lycopingehalt). Die zusätzliche Entfernung der Aminosäuren 199Asp, 200 Tyr (**Klon 614-2**) zusätzlich zu dem Austausch von Aminosäure 205 Asn gegen Ser, führte ebenfalls zu einer deutlich geringeren Aktivität von 18 % gegenüber der Kontrolle. Der Lycopinanteil unter den Produkten betrug nur 25 %. Beim Klon **952** wurde die Aminosäure 318 Leucin gegen Valin ausgetauscht. Der Austausch dieser Aminosäure führte zu einer Verringerung der Aktivität auf 20 % der Aktivität der Wildtyp-ZDS unter Akkumulation des Intermediats Proneurosporin. Gleichzeitig verringerte sich der Lycopin-Anteil auf 26 % der Produkte. Proneurosporin (N2), daß bei den *in vitro*-Aktivitätstests der Wildtyp-ZDS nie akkumulierte, trat nur unter den Produkten der ZDS aus den Klonen 614 (19,2 ng), 614-2 (18,8 ng), 952 (28,3 ng) und 622 (187 ng) auf. Die ZDS aus dem Klon 622 bildete Proneurosporin (N2) mit dem größten Anteil an den Produkten der ZDS von 46,4 % (Tabelle 3.31).

**Tabelle 3.31:** Carotinoidmengen, die bei *in vitro*-Aktivitätstest mit der über inverse PCR mutierten *Capsicum*-ZDS gebildet wurden. Dargestellt sind die Produktmengen in ng die von der ZDS aus den angegebenen Klonen gebildet wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Messungen unter Angabe der Standardabweichung (sd). Am Ende jeder Tabelle sind die relativen Neurospirin- und Lycopinanteile angegeben. N: Neurosp., L: Lycopin. (siehe Abbildung 3-41, S.113)

Carotinoid	WT (Kontrolle)		Klon 614		Klon 614-2		Klon 622		Klon 952	
	m [ng]	sd [ng]	m [ng]	sd [ng]	m [ng]	sd [ng]	m [ng]	sd [ng]	m [ng]	sd [ng]
<b>N1 (Z)</b>	<b>171,9</b>	<b>22,7</b>	<b>11,8</b>	<b>4,4</b>	<b>15,3</b>	<b>9,8</b>	<b>65,0</b>	<b>0,9</b>	<b>24,3</b>	<b>1,6</b>
<b>N2 (7,9,9'Z)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>19,2</b>	<b>4,7</b>	<b>18,8</b>	<b>14,9</b>	<b>187,0</b>	<b>11,0</b>	<b>28,3</b>	<b>1,0</b>
N3	19,4	4,0	0	0,0	6,8	0,2	3,5	1,6	4,9	1,1
N4	14,9	3,6	0	0,0	6,5	1,2	4,4	4,2	4,9	2,0
N5	18,7	3,8	0	0,0	7,6	1,2	8,4	3,3	5,4	2,2
N6	3,9	1,3	0	0,0	3,2	0,4	7,6	4,7	3,2	1,5
N7	1,1	1,0	0	0,0	1,2	0,4	3,8	0,6	3,1	1,2
N8	35,0	12,7	2,6	0,0	2,3	3,3	12,8	5,7	9,4	10,8
N9	100,9	8,8	14,4	6,9	21,9	5,0	21,5	4,6	18,8	3,4
N10	34,2	6,9	10,9	7,5	13,3	1,3	29,6	9,9	20,8	12,5
N11 (all E)	116,2	13,6	7,9	2,7	32,2	8,4	30,8	9,2	20,6	18,2
<b>L1 (7,9,7',9'Z)</b>	<b>251,0</b>	<b>31,6</b>	<b>11,3</b>	<b>4,4</b>	<b>14,3</b>	<b>10,0</b>	<b>29,1</b>	<b>5,2</b>	<b>20,5</b>	<b>1,1</b>
L4	7,3	0,3	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L5	5,1	1,4	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	1,4
L6	10,2	2,4	0	0,0	1,6	2,3	0,0	0,0	3,0	2,6
L7 (9Z)	25,5	4,0	0	0,0	3,9	1,6	0,0	0,0	3,3	3,1
L8 (5,9'Z)	8,8	2,0	0	0,0	1,2	1,7	0,0	0,0	3,6	1,3
L9	13,4	14,4	0	0,0	3,2	1,1	0,0	0,0	3,3	2,9
L10 (7Z)	11,6	1,8	0	0,0	1,7	0,8	0,0	0,0	2,4	1,4
L11 (7Z)	24,2	2,6	0	0,0	3,1	1,1	0,0	0,0	3,4	1,5
L12 (all E)	53,2	11,1	0	0,0	6,7	4,1	0,0	0,0	5,8	1,0
L13 (5Z, 5,5'Z)	43,4	8,1	0	0,0	6,5	2,8	0,0	0,0	5,4	0,5
<b>Summe</b>	<b>970</b>	<b>158</b>	<b>78</b>	<b>31</b>	<b>171,4</b>	<b>71,2</b>	<b>403,4</b>	<b>61,0</b>	<b>195</b>	<b>72</b>
Neurospirin	<b>53,2 %</b>		85,6 %		75,3 %		92,8 %		73,7 %	
Lycopin	<b>46,8 %</b>		14,5 %		24,7 %		<b>7,2 %</b>		26,3 %	
WT-Aktivität	<b>100 %</b>		8,1 %		17,7 %		41,6 %		20,1 %	

Carotinoid	Klon 1216		Klon 1606		Klon 1712		Klon 1726		Klon 1725	
	m [ng]	sd [ng]	m [ng]	sd [ng]	m [ng]	sd [ng]	m [ng]	sd [ng]	m [ng]	sd [ng]
<b>N1 (Z)</b>	<b>255,8</b>	<b>47,0</b>	<b>298,8</b>	<b>28,2</b>	<b>220,8</b>	<b>14,8</b>	<b>139,6</b>	<b>17,5</b>	<b>304,6</b>	<b>18,5</b>
<b>N2 (7, 9,9'Z)</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
N3	23,8	10,4	23,7	0,2	20,4	5,7	1,8	1,8	4,5	3,0
N4	25,8	4,9	13,7	0,5	14,4	6,5	4,6	4,8	10,6	2,3
N5	25,4	7,1	18,6	0,0	19,1	7,7	1,6	1,6	5,1	2,7
N6	12,6	6,0	6,1	1,6	4,0	2,5	2,6	2,9	5,8	3,0
N7	4,6	0,5	1,0	0,3	0,0	0,0	1,6	1,6	2,8	1,8
N8	39,3	3,7	30,2	0,8	32,9	1,0	9,9	10,4	18,3	3,0
N9	142,9	4,1	93,2	1,0	106,4	14,4	33,8	1,8	19,7	17,5
N10	43,2	10,8	29,2	2,7	31,7	11,2	9,0	1,2	30,7	32,6
N11 (all E)	152,5	22,8	107,2	0,5	115,8	30,4	26,1	3,0	32,8	9,7
<b>L1 (7,9,7',9'Z)</b>	<b>387,1</b>	<b>72,8</b>	<b>369,4</b>	<b>31,9</b>	<b>283,6</b>	<b>32,0</b>	<b>304,3</b>	<b>17,3</b>	<b>503,2</b>	<b>11,5</b>
L4	13,4	4,5	6,0	2,6	6,3	2,2	1,5	1,4	4,0	3,5
L5	10,6	5,2	4,2	0,9	4,0	1,6	1,4	1,2	6,0	6,1
L6	17,8	5,3	7,7	0,0	9,4	5,4	2,3	1,2	1,5	0,1
L7 (9Z)	37,1	11,8	16,7	1,4	20,6	8,9	3,8	0,7	3,4	0,9
L8 (5,9'Z)	17,9	5,3	6,7	0,0	8,2	4,1	2,4	1,0	2,1	0,4
L9	7,7	4,5	4,8	0,8	4,6	0,6	7,1	0,4	2,8	2,4
L10 (7Z)	20,3	3,5	11,1	1,1	11,1	1,6	4,0	1,2	2,4	0,5
L11 (7Z)	31,4	3,2	19,4	2,5	22,2	6,4	8,1	2,0	5,7	1,3
L12 (all E)	70,8	21,9	35,9	4,4	45,2	18,7	8,5	2,7	5,3	0,9
L13 (5Z, 5,5'Z)	59,6	21,4	30,1	0,1	36,2	15,5	5,1	1,5	3,2	0,5
<b>Summe</b>	<b>1400</b>	<b>277</b>	<b>1134</b>	<b>82</b>	<b>1016,9</b>	<b>191,3</b>	<b>579,3</b>	<b>77,4</b>	<b>974,5</b>	<b>122,1</b>
Neurospirin	51,9 %		54,8 %		55,6 %		39,8 %		44,6 %	
Lycopin	48,2 %		45,2 %		44,4 %		60,2 %		55,4 %	
WT-Aktivität	144,3 %		116,9 %		104,8 %		59,7 %		100,5 %	



**Tabelle 3.32:** Spezifische Aktivität der ZDS in Abhängigkeit der ausgetauschten Aminosäure. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte dreier Messungen, als Fehler ist die Standardabweichung angegeben. Die höchste und die geringste Enzymaktivität sind fett markiert. Die Zählung der Basen beginnt mit der ersten Base des Startcodons der cDNA der *Capsicum*-ZDS unter der Datenbank-Nummer X89897 (Reaktionsansatz: 80 µg gereinigte ZDS, 7µg ζ-Carotin, 0,02 % BHT, 10µM Decyl-Plastochinon, 2,5 mg Phosphatidylcholin bei 3,25 Stunden Reaktionsdauer).

Klon der inversen PCR	Mutation trat auf im Klon	Aminosäurenaustausch	Basenaustausch	Spezifische Aktivität bezogen auf die gereinigte ZDS [µg/(h*mg)]
<b>WT</b>	<b>WT</b>	-	-	4,04 +/- 0,66
<b>614</b>	<b>25</b>	205 Asn ->Ser	614 A -> G	0,33 +/- 0,13
<b>1216</b>		-	582 T -> C	
<b>1606</b>		406 Asp ->Tyr	1216 G -> T	5,83 +/- 1,15
<b>1726</b>		536 Ile -> Leu	1606 A -> C	4,73 +/- 0,34
<b>1726</b>		576 Ser -> Pro	1726 T -> C	2,41 +/- 0,32
<b>952</b>	<b>89</b>	318 Leu -> Val	952 C -> G	0,81 +/- 0,3
<b>1712</b>		571Glu -> Ala	1712 A -> C	4,24 +/- 0,80
<b>614-2</b>	<b>-</b>	-199Tyr, -200Asp, 205 Asn ->Ser	- 598-603, 614 A -> G	0,71 +/- 0,29
<b>622</b>		<b>205 Asn -&gt;Ser</b>	<b>614 A -&gt; G</b>	<b>1,68 +/- 0,25</b>
<b>1725</b>		<b>208 Ala -&gt; Pro</b>	<b>622 G -&gt; C</b>	
		575 Ile -> Arg 576 Ser -> Asp 577 Lys -> Pro 578 Gly -> Stop	-1714 -1718 (CGA GAT CCC TAA)	4,06 +/- 0,51

Zu einer Erhöhung der Aktivität der ZDS um 44 % gegenüber der Kontrolle (**Klon 1216**) kam es durch den Austausch der Aminosäure 406 Asparaginsäure gegen Tyrosin (Tabelle 3.31). Der prozentuale Anteil von Lycopin unter den Produkten zeigte mit 48 % gegenüber 47 % der Kontrolle dagegen keine deutliche Abweichung (Tabelle 3.31).

Der Austausch der Aminosäure 576 Serin gegen Prolin (**Klon 1726**) führte zu einer 40 % niedrigeren Aktivität, Proneurosporin konnte nicht nachgewiesen werden. Der Austausch der Aminosäuren 571 Glutamin gegen Alanin (**Klon 1712**) und der Aminosäuren 575 bis 578 (**Klon 1725**, Tabelle 3.32) zeigte keine Auswirkungen auf die Gesamtaktivität.

## IV. DISKUSSION

### 1. Optimierung der Expression nativer ZDS in *E.coli*

Durch die Veränderung der Anzuchtbedingungen von *E. coli* JM101/pQE30zds ist es gelungen, die anfänglich geringen Mengen heterolog exprimierter, nativer ZDS aus *Capsicum* zu erhöhen. Somit wurde es möglich, die für eine enzymatische Charakterisierung der ZDS notwendigen Mengen des Proteins zu gewinnen.

Die Anzuchtbedingungen, die die gewünschte hohe Konzentration der nativen ZDS im Zellüberstand (> 5 % des Proteingehaltes) erzielte, beinhaltete ein Wachstum der *E. coli*-Kultur bis zu einer optischen Dichte von 0,1 bis 0,2<sub>600nm</sub>. In diesem Kulturstadium erfolgte die Induktion der Expression der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase mit einer geringen IPTG-Konzentration von 50 $\mu$ M bei einer niedrigen Inkubationstemperatur von 25°C. Das Kulturmedium enthielt als Zusatz 0,5 M Sorbitol und 3 mM Betain.

Die spezifische Aktivität (bezogen auf den Gesamtproteingehalt) wurde gegenüber den ungünstigsten Anzuchtbedingungen (37°C Inkubationstemperatur, Induktion der ZDS-Expression mit 1mM IPTG-Konzentration und eine Induktion der Expression der ZDS bei einem späteren Wachstumsstadium (OD<sub>600nm</sub>=0,59) der *E. coli*-Kultur) um den Faktor 3 erhöht. Besonders wichtig für die Verringerung der Bildung von inclusion bodies war die Induktion der Expression der ZDS zu einem frühen Wachstumsstadium der *E. coli*-Kultur. Dies war für die heterologe Expression anderer Desaturasen in *E. coli* bisher nicht beschrieben worden. Der Anteil der ZDS an den Proteinen im Zellüberstand war mit über 5 % hoch genug, um ausreichende Mengen des Enzyms für die Reinigung über Affinitätschromatographie und für eine enzymatische Charakterisierung mittels der *in vitro*-Reaktionen zu erhalten.

Die heterologe Proteinexpression unter Verwendung eines prokaryontischen Expressionssystem besitzt gelegentlich den Nachteil der Ablagerung des exprimierten Proteins zusammen mit Membranbestandteilen in einer inaktiven Form als 'inclusion bodies' (Sriubolmas et al., 1997). Diese Problematik ergab sich zunächst bei der heterologen Expression der *Capsicum*-ZDS in *E. coli*, bei der der größere Anteil des exprimierten Enzyms nicht aktiv war. Die inaktive ZDS befand sich in dem Sediment der mechanisch aufgebrochenen Zellen nach der Zentrifugation. Die native ZDS befand sich dagegen im Zellüberstand. Für eine Reinigung der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus dem Zellüberstand, war

jedoch das Enzym zunächst in zu geringen Konzentrationen enthalten. Eine mögliche Erklärung für die Bildung von inclusion bodies bei der heterologen Expression der *Capsicum*-ZDS wäre, daß es sich bei der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum* um ein membranständiges Enzym handelt, das bei hohen Konzentrationen über hydrophobe Bereiche unspezifisch miteinander wechselwirkt und präzipitiert. Im Übersichtsartikel von Schein (1989) wird als eine mögliche Ursache für die Bildung von inclusion bodies die Aggregation von exprimierten Proteinen über unspezifische Wechselwirkungen beschrieben, wenn sie in hohen lokalen Konzentrationen auftreten.

Der erfolgreiche Einsatz von Detergenzien zur Solubilisierung einer heterolog exprimierten Desaturase in *E. coli* wurde für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus dem Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120 beschrieben (Albrecht et al., 1995b). Ebenso konnte eine Phytoendesaturase mit 8 M Harnstoff aus den inclusion bodies solubilisiert und anschließend renaturiert werden (Fraser et al., 1992). Oftmals führt jedoch die Verwendung von Detergenzien zum Solubilisieren von Enzymen zu einem Aktivitätsverlust (Sandmann, 1994). Ziel war es daher, die native *Capsicum*-ZDS aus dem Zellüberstand zu reinigen, ohne die Solubilisierung der inaktiven ZDS aus den inclusion bodies.

Von Blackwell & Horgan (1991) wurde der Einfluß des Anzuchtsmediums von *E. coli* auf die Bildung von inclusion bodies bei heterologer Expression von Proteinen beschrieben. Über die Zugabe von Sorbitol und Betain in das Anzuchtsmedium konnte die Bildung von inaktivem Protein vermieden werden. Die Protein-stabilisierende Wirkung von Betain und anderen neutralen, osmotisch aktiven Substanzen, wie sie auch in halophilen Bakterien vorkommen, wurde von Bao-Lu & Arakawa (1995) und Arakawa & Timasheff (1985) beschrieben. Nach Arakawa & Timasheff erhöht Betain in wässriger Lösung die Oberflächenspannung. Dadurch tendieren gelöste Proteine die Wechselwirkung mit dem wässrigen Milieu klein zu halten und damit zu einer Verringerung ihrer Oberfläche. Da globuläre Proteine im nativen Zustand über eine geringere Oberfläche als im denaturierten Zustand verfügen, wird durch die höhere Oberflächenspannung die Stabilisierung der nativen, globulären Struktur erreicht. Blackwell & Horgan (1991) stellten eine Methode vor, die sich diese stabilisierende Wirkung von Betain auf Proteine über die zusätzliche Verwendung von Sorbitol bei der heterologen Expression eines Enzyms in *E. coli* zunutze machte. Das osmotisch aktive Sorbitol kann von *E. coli* nicht aufgenommen werden und dient bei der Anzucht der Bakterien zur Erzeugung von osmotischem Stress. Betain wird daraufhin von *E. coli* zur Aufrechterhaltung des Turgors aufgenommen (Lucht & Bremer, 1994). Durch die hohe Betainkonzentration in *E. coli* wird die Aggregation der exprimierten Proteine in Form

von inclusion bodies vermieden. Bei der Expression der *Capsicum*-ZDS in *E. coli* war es ebenfalls möglich, über die Veränderung der Anzuchtbedingungen die Bildung der inclusion bodies zu verringern und die Konzentration der im Zellüberstand befindlichen nativen ZDS zu erhöhen. Insbesondere wurde dazu das Anzuchtmedium mit Sorbitol und Betain versetzt. Die Verringerung der Bildung von inclusion bodies durch die Erniedrigung der Inkubationstemperatur wurde auch von Schneider et al. (1997) für die heterologe Expression der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* in *E. coli* beschrieben.

## 2. ZDS-Reinigung

Die Reinigung der ZDS gelang in nur 2 Stufen durch eine Anreicherung des Proteins über Ammoniumsulfatfällung und nachfolgender Metall-Ionen-Affinitätschromatographie. Das Enzym wurde mit einer Reinheit von 95 % und einer Ausbeute von 4,2 % separiert. Gegenüber der spezifischen Aktivität der ZDS im Zellhomogenat von *E. coli* JM101/pQE30zds erhöhte sich die spezifische Aktivität der gereinigten ZDS um den Faktor 63, auf 3,15 µg Carotinoid pro mg Protein und Stunde.

Der Reinigung der ZDS lag folgendes Prinzip zugrunde. Die *Capsicum*-ZDS wurde über den Vektor pQE30zds als rekombinantes Polypeptid mit 6 N-terminalen Histidinen exprimiert. Die Histidine binden koordinativ an  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen der Metallionen-Affinitätssäule. Die Bindung beruht auf der Wechselwirkung des heterozyklischen Stickstoffatoms der Histidin-Seitengruppe mit den positiv geladenen Kobaltionen ( $\text{Co}^{2+}$ ). Die Metallionen sind über 4 koordinative Bindungen an einen Chelator und dieser an Sepharose als Trägermaterial gebunden. Die Elution der gebundenen ZDS erfolgt über Imidazol, das diese von dem Metallion verdrängt. Die Bindung anderer Proteine über einzelne Histidine ist schwächer und diese werden durch einen Puffer mit geringer Imidazol-Konzentration vor der Elution der ZDS entfernt.

Die Reinigung der ZDS erfolgte aus dem Zellüberstand, da die ZDS im Zellüberstand mit 0,11 µg/(h\*mg) deutlich aktiver war, als die ZDS im Zellsediment mit 0,066 µg/(h\*mg) und für die Reinigung nicht solubilisiert werden mußte. Die exprimierte ZDS konnte als Polypeptid mit einer Molmasse von etwa 59 kDa Größe detektiert werden, die damit dem theoretischen Wert von 59,4 kDa ohne Transitsequenz für den Transport in Chloroplasten entsprach. Das Vorläufer-Protein (588 Aminosäuren) mit einer Transitsequenz von 54 Aminosäuren besitzt eine apparente Molmasse von 64,7 kDa, war aber in

Komplementierungsexperimenten in *E. coli* weniger aktiv, als ohne Transitsequenz (Albrecht et al., 1995a).

Die erzielte spezifische Aktivität und die Ausbeute lagen in der Größenordnung, wie sie bei Reinigung anderer Desaturasen erreicht wurde. Neben der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* ist bisher nur die Reinigung einer  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus dem Cyanobakterium *Anabaena* (Albrecht et al., 1995b) nach heterologer Expression in *E. coli* gelungen und über *in vitro*-Aktivitätstests enzymatisch charakterisiert worden. Bei deren Reinigung wurde eine Ausbeute von 0,64 % und eine 14-fache Erhöhung der spezifischen Aktivität auf 10,12  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  erzielt.

Gegenüber den  $\zeta$ -Carotindesaturasen aus *Capsicum* und *Anabaena* konnten bereits mehrere Phytoendesaturasen nach heterologer Expression in *E. coli* gereinigt und mittels *in vitro*-Aktivitätstests charakterisiert werden, so u.a. aus *Rhodobacter capsulatus* (Raisig et al., 1996), *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Schneider et al., 1997) und *Erwinia uredovora* (Fraser et al., 1992). Für die Phytoendesaturase aus *Rhodobacter capsulatus* wurde die Ausbeute des Enzyms mit 5,3 % und einer 219-fachen Steigerung der spezifischen Aktivität angegeben (17,5  $\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{mg}$ ). Für die Phytoendesaturase aus *Synechococcus* wurde eine 1 %ige Ausbeute bei 15-facher Erhöhung der spezifischen Aktivität auf 13,5  $\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{mg}$  erzielt.

### 3. Optimierung der *in vitro*-Aktivitätstests

Eine Optimierung der *in vitro*-Reaktionsbedingungen war aufgrund der anfänglich geringen Aktivität der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase notwendig. Die zur Charakterisierung anderer Desaturasen beschriebenen *in vitro*-Reaktionsbedingungen (Albrecht et al., 1995b; Raisig et al., 1996; Schneider et al., 1997) führten bei der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase nur zu einer geringen Aktivität. Die Optimierung der *in vitro*-Aktivitätstest für eine hohe ZDS-Aktivität, diente einer Verringerung des Meßfehlers bei der Quantifizierung der gebildeten Carotinoide über HPLC und einer Erleichterung der Identifizierung der gebildeten Carotinoide über das Spektrum. Zu geringe Carotinoidmengen ergeben Absorptionsspektren mit nicht eindeutigen Absorptionsmaxima, über die eine Identifikation des gebildeten Carotinoids nicht möglich ist.

Die Zugabe von 0,3 % Phosphatidylcholin zu den *in vitro*-Reaktionsansätzen führte zu einer deutlichen Erhöhung der Enzymaktivität um den Faktor 6 (Abschnitt 3.2, Abb. 3-5). Die optimale Konzentration von Phosphatidylcholin lag mit 0,3 % deutlich höher, als die optimale Konzentration von 0,075 %, wie sie zur enzymatischen Charakterisierung der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 beschrieben wurde (0,075%) (Schneider

et al., 1997). Für die Wirkungsweise des Phosphatidylcholins könnte es zwei Möglichkeiten geben. Einerseits handelt es sich bei dem Substrat  $\zeta$ -Carotin um ein lipophiles Molekül, das in den *in vitro*-Reaktionsansätzen in ein wässriges Milieu gegeben wird. Phosphatidylcholin kann als amphiphiles Molekül das lipophile  $\zeta$ -Carotin in Lösung halten und möglicherweise so die Zugänglichkeit des  $\zeta$ -Carotins für das Enzym erhöhen. Die Entfernung von Lipiden aus biologischen Membranen kann zur Inaktivierung der Membranproteinen führen. Bei der Reinigung eines Membranproteins kann es zum Verlust von Lipiden kommen die an dem Protein anhaften (Jones et al., 1987). Die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase als ein membranständiges Enzym, könnte durch die Zugabe von Phosphatidylcholin rekonstituiert und vor Denaturierung geschützt werden.

Eine Reihe verschiedener Detergenzien wurde zu den *in vitro*-Aktivitätsuntersuchungen mit ungereinigter ZDS gegeben und die zugehörige Enzymaktivität bestimmt. Das nichtionische Detergens Lubrol PX (0,02 %) und Deoxycholinsäure erhöhten die Enzymaktivität der ungereinigten ZDS in den *in vitro*-Aktivitätstests gegenüber der Kontrolle um den Faktor 14. Die Steigerung der Enzymaktivität war mit diesen Detergenzien höher als unter der Zugabe von Deriphat, Chaps, Zwittergent, Brij 58, Brij 35, Tween 60, Tween 20, Mega-7, Genapol und Tergitol. Die Erhöhung der Lubrol PX-Konzentration führte bis zu 0,2 % (v/v) in den *in vitro*-Aktivitätstest zu einer Erhöhung der ZDS-Aktivität. Die Lubrol PX-Konzentration lag mit 0,2 %, über der von Jones et al. (1987) für Lubrol PX angegebenen kritischen Micellenkonzentration von 0,006 %.

Unter Verwendung von gereinigter ZDS in den *in vitro*-Aktivitätstest konnte durch die Zugabe von 0,3 % Lubrol PX eine spezifische Aktivität von 0,15  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  erreicht werden. Die Zugabe von Phosphatidylcholin zur gereinigten ZDS zu den *in vitro*-Aktivitätstests, ohne die Verwendung von Lubrol PX, erhöhte die spezifische Aktivität nochmals um den Faktor 7 auf 1,04  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Folglich wurde für die *in vitro*-Aktivitätsuntersuchungen der gereinigten  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum* Phosphatidylcholin verwendet und auf die Zugabe von Lubrol PX verzichtet.

Carotinoide besitzen antioxidative Eigenschaften und sind in der Lage Phospholipide vor Peroxidation zu schützen. Sie selbst unterliegen dabei einem Abbau (Woodall et al., 1996). Gegenüber den *in vitro*-Aktivitätstests der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* (Schneider et al., 1997) wurde eine vierfach höhere Lipidkonzentration eingesetzt. Aufgrund der größeren Phosphatidylcholinkonzentration in den *in vitro*-Aktivitätstests sollte die Zugabe eines lipophilen Antioxidants der Bildung von Lipidperoxiden vorbeugen. Für das lipophile,

synthetische Antioxidants BHT (Butyl-Hydroxy-Toluol; 2,6-di-tert-Butyl-4-Methylphenol) wurde seine schützende Wirkung vor Peroxidation (Barclay et al., 1999; Henderson & Slickman, 1999) beschrieben. Die Zugabe von 0,02 % BHT führte in den *in vitro*-Aktivitätstests zu einer 2-fach höheren Enzymaktivität. Diese Steigerung der Enzymaktivität trat nur in Verbindung mit der Zugabe von Lipiden im Reaktionsansatz auf. Ohne die Zugabe von Phosphatidylcholin, führte die BHT-Zugabe zu keiner Erhöhung der enzymatischen Aktivität der ZDS (Abb. 3-6, A und B). Folglich schützt BHT die gebildeten Carotinoide oder das Substratcarotinoid vor Abbau durch Peroxidradikale, indem es die Peroxidbildung bei den Lipiden unterdrückt. Bei der Bestimmung der  $I_{50}$ -Werte der Hemmstoffe wurde auf die Verwendung von BHT verzichtet, um möglicherweise auftretende Wechselwirkungen zwischen Hemmstoff und BHT zu vermeiden.

Für die enzymatische Charakterisierung der Phytoen-Desaturase aus *Erwinia uredovora* und *Rhodobacter capsulatus* wurde die Verwendung von Tris-Puffer in den *in vitro*-Aktivitätstests beschrieben (Fraser et al., 1992; Raisig et al., 1996). Die Verwendung von Kaliumphosphatpuffer in den *in vitro*-Aktivitätsuntersuchungen der *Capsicum*-ZDS, führte im Vergleich zum Tris-Puffer zu einer etwa 34 % höheren Enzymaktivität (Tabelle 3.6). Kaliumphosphatpuffer wurde von Albrecht et al. (1995b) ebenfalls für die Charakterisierung der *Anabaena*-ZDS verwendet. Die Inkubation von  $\zeta$ -Carotin, Neurosporin und Lycopin in Kaliumphosphat- und in Tris-Puffer ergab, daß es in keinem der Puffer zu einem deutlichen Abbau der Carotine kam. Die Aktivitätsunterschiede der ZDS in Kaliumphosphat- und Tris-Puffer beruhten daher auf einer Erhöhung der enzymatischen Aktivität der ZDS durch Kaliumphosphatpuffer.

#### **4. Biochemische Eigenschaften der *Capsicum*-ZDS**

##### **4.1. Kofaktor der $\zeta$ -Carotindesaturasen aus *Capsicum annuum* und *Synechocystis* sp. PCC 6803 sowie der Phytoen-Desaturasen aus *Gentiana lutea* und *Synechococcus* sp. PCC 7942.**

Für die  $\zeta$ -Carotindesaturasen höherer Pflanzen gab es bisher keine Angaben bezüglich des benötigten Kofaktors. Lediglich für die ZDS aus dem Cyanobakterium *Anabaena*, die jedoch bezüglich ihrer Aminosäuresequenz eine höhere Ähnlichkeit zu den bakteriellen Phytoendesaturasen zeigt, wurde molekularer Sauerstoff als Kofaktor nachgewiesen (Albrecht et al., 1995b). Für die Phytoendesaturasen höherer Pflanzen wurden Chinone oder Sauerstoff

(Mayer et al., 1990, Norris et al., 1995; Beyer et al., 1994) als Kofaktor indirekt nachgewiesen.

Die Desaturierungsreaktion erfordert einen Akzeptor für die bei der Dehydrogenierung von  $\zeta$ -Carotin freiwerdenden Elektronen und Protonen. Die lipophilen Chinone wie Decyl-Plastochinon und Decyl-Ubichinon erhöhten die ZDS-Aktivität gegenüber der Kontrolle um den Faktor 3, von 1,96  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  auf 5,99  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ , bzw. 5,80  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Andere wasserlösliche und lipophile Chinone (Vitamin K1) führten zu keiner Erhöhung der ZDS-Aktivität. Durochinon, das als Kofaktor der Phytoendesaturase aus *Narcissus* angegeben wurde (Mayer et al., 1990), war kein Kofaktor der *Capsicum*-ZDS. Mit Plastochinon und Ubichinon konnte erstmals für eine gereinigte ZDS aus höheren Pflanzen die Notwendigkeit oxidierter Chinone für die Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin nachgewiesen werden. Die gemessene Basisaktivität der ZDS läßt sich möglicherweise über die in *E. coli* vorhandenen Chinone erklären. So finden sich in *E. coli* an Chinonen im wesentlichen Ubichinon, Menachinon und Demethylmenachinon (Shestopalov et al., 1997). Da Ubichinon lipophil ist, könnte es der ZDS nach der Reinigung anhaften und zu einer geringen Basisaktivität der ZDS führen, ohne die externe Zugabe eines Kofaktors. Ubichinon erwies sich wie Plastochinon als geeigneter Kofaktor für die ZDS. Bei funktioneller Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* mit der ZDS aus *Capsicum* werden daher die Elektronen der Desaturierungsreaktion vermutlich ersatzweise auf das in *E. coli* vorkommendes Ubichinon übertragen. Für Decyl-Plastochinon ergab sich durch Mittelwertbildung dreier Messungen ein  $K_m$ -Wert von etwa 0,4  $\mu\text{M}$ . Für andere  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen liegen bisher keine  $K_m$ -Werte von Kofaktoren vor, so daß die Vergleichsmöglichkeit fehlt.

Die ZDS aus *Capsicum* besitzt N-terminal eine potentielle Dinukleotidbindestelle (Albrecht et al., 1995a). Eine N-terminale Dinukleotidbindestelle findet sich bei den phylogentisch nicht mit der ZDS verwandten bakteriellen Phytoendesaturasen. Für eine Reihe bakterieller Phytoendesaturasen, wie aus *Erwinia uredovora* (Fraser et al., 1992), *Rhodobacter capsulatus* (Bartley et al., 1990; Raisig et al., 1996) oder einer Diapophytoen-Desaturase aus *Staphylococcus aureus* (Raisig & Sandmann, 1999) wurden oxidierte Dinukleotide (FAD) als Kofaktor beschrieben. Gleiches gilt auch für eine Phytoen-Desaturase aus *Myxococcus xanthus* (FAD) (Dailey & Dailey, 1998) oder einer pilzlichen Phytoendesaturase aus *Neurospora crassa* (NAD) (Hausmann & Sandmann, 2000). Für die Phytoen-Desaturase aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942, war NADP oder NAD der Kofaktor (Schneider et al., 1997). Für die Phytoendesaturase aus *Narcissus pseudonarcissus* wurde



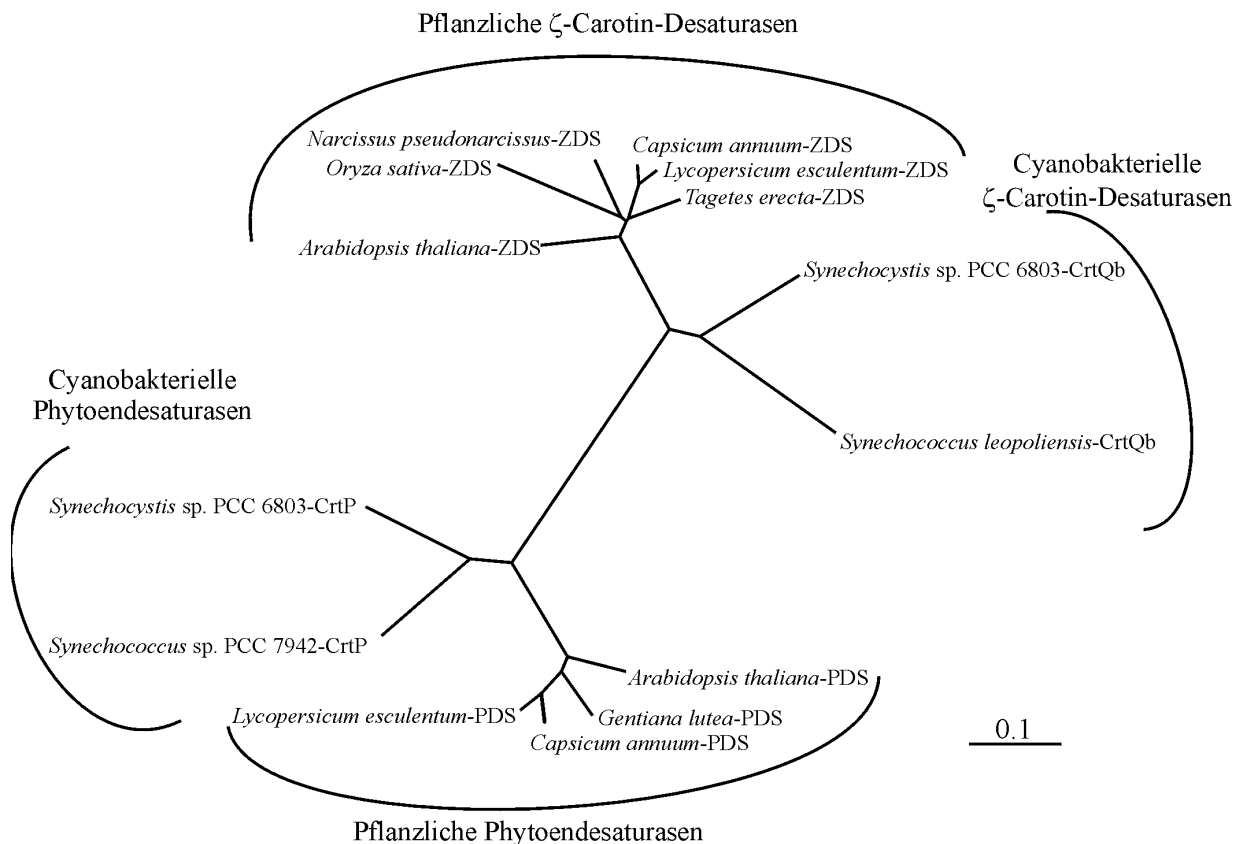
FAD (Al-Babili et al., 1996) als prosthetische Gruppe genannt. Die oxidierten Dinukleotide NAD, FAD und NADP führten bei der *Capsicum*-ZDS jedoch zu keiner Erhöhung der enzymatischen Aktivität. Ebenso konnte gezeigt werden, dass molekularer Sauerstoff nicht der Kofaktor der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum* ist.

Für die Phytoen- und  $\zeta$ -Carotindesaturasen von Pflanzen und von Cyanobakterien wird eine phylogenetische Verwandtschaft diskutiert (Albrecht et al., 1995a). So ergibt eine Datenbanksuche aller bekannten Phytoendesaturasen aus Pflanzen und Cyanobakterien mit dem Programm Blast mehr als 64 % identische Aminosäuren untereinander. Alle bekannten pflanzlichen und cyanobakteriellen  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen, bis auf eine  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Anabaena* (crtI-Typ), besitzen untereinander mehr als 61 % identische Aminosäuren. Die Aminosäuresequenzen von  $\zeta$ -Carotin- und Phytoendesaturasen unterscheiden sich dagegen stärker. Dennoch besitzt die *Capsicum*-ZDS ab der Aminosäure 80 der Transitsequenz 35,5 % identische (59 % ähnliche) Aminosäuren mit der *Capsicum*-PDS, sowie 33,5 % identische (58 % ähnliche) Aminosäuren mit der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Albrecht et al., 1995a, Hugueney et al., 1992). Ein phylogenetischer Baum unter Abbildung 4-1 stellt die Verwandtschaftsbeziehung von pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen dar. Die Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen von Pflanzen und Cyanobakterien stammen vermutlich von einem gemeinsamen ursprünglichen Gen ab. Dieses codierte für eine Desaturase, die zunächst 4 Desaturierungsschritte katalysierte. Durch Duplikation wurde dieses Gen verdoppelt und aus diesen entwickelten sich die Gene der auf zwei Desaturierungsschritte spezialisierten Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen.

Die bakteriellen Phytoendesaturasen entstanden unabhängig von den pflanzlichen Phytoendesaturasen über konvergente Entwicklung (Sandmann, 1994).

Damit ergab sich die Frage, ob Plastochinon ebenfalls der Kofaktor der Phytoendesaturase aus *Gentiana lutea* (gelber Enzian) ist. Decyl-Plastochinon führte in den *in vitro*-Aktivitätsuntersuchungen zu einer Verdoppelung der Enzymaktivität von 0,10  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  auf 0,21  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  (Abbildung 3-26, S.88), d.h. auch für die Phytoendesaturase aus *Gentiana lutea* war Decyl-Plastochinon der Kofaktor. Ohne die Zugabe eines Kofaktors konnte bei der Phytoendesaturase aus *Gentiana* eine Basisaktivität gemessen werden. Diese war vermutlich in der Verwendung ungereinigter Phytoendesaturase begründet. Dabei wurden die Elektronen der Desaturierungsreaktion vermutlich auf die im Zellüberstand von *E. coli* befindlichen oxidierten Chinone übertragen. Die Kofaktor-Untersuchung für die PDS aus *Gentiana* wurde durchgeführt, da für die pflanzlichen Phytoendesaturasen bisher keine genauen Daten aus *in*

*in vitro*-Untersuchungen vorlagen. So wurde durch Norris et al. (1995) die Beteiligung von Plastochinon bei der Phytoendesaturierung über die Untersuchung zweier Arabidopsis-Mutanten, die Phytoen akkumulierten, nachgewiesen.



**Abbildung 4-1:** Phylogenetischer Baum ausgewählter Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus höheren Pflanzen und aus Cyanobakterien. Die Berechnung des phylogenetischen Baumes erfolgte mit dem Programm Clustal X (Thompson et al., 1997), ohne die Transitsequenzen der pflanzlichen Desaturasen. Für die pflanzlichen Desaturasen sind die Nummern der Aminosäuren (AS) angegeben, zwischen denen nach Berechnung mit dem Programm ChloroP v1.1 (Emanuelsson et al., 1999) die Abspaltung der Transitsequenz erfolgt. Gen-Bank-Nummer der Desaturasen aus: *Lycopersicon esculentum* (PDS: X71023, AS 43-44; ZDS: AF195507, AS 49-50), *Synechocystis* sp. **PCC 6803** (CrtP: X62574, CrtQb: D90914), *Arabidopsis thaliana* (PDS: L16237, AS 75-76; ZDS: U38550, AS 34-35), *Synechococcus* sp. **PCC 7942** (CrtP: X55289), *Tagetes erecta* (ZDS: AF251013, AS 47-48), *Synechococcus leopoliensis* (CrtQb: AJ250721), *Narcissus pseudonarcissus* (ZDS: AJ224683, AS 42-43), *Capsicum annuum* (PDS: X89897, AS 25-26; ZDS: X68058, AS 49-50), *Oryza sativa* (ZDS: AF054629), *Gentiana lutea* (AS 62-63). Die Sequenz der PDS aus *Gentiana lutea* wurde bisher nicht publiziert. Eine mit dem Programm Blast durchgeführte Datenbanksuche ergab 31 % identische (49 % ähnliche) Aminosäuren der Phytoendesaturase aus *Gentiana lutea* mit der ZDS aus *Capsicum* bei einem e-Wert von  $7e^{-55}$  und 80 % identische (87 % ähnliche) Aminosäuren mit der PDS aus *Capsicum* (e-Wert 0). Die Berechnung des phylogenetischen Baumes erfolgte mit 1000 Wiederholungen. Die Skala gibt 0,1 Aminosäureaustausche an einer Position an.

Die Phytoendesaturase war dabei in beiden Mutanten von der Mutation nicht betroffen. Dafür zeigte sich, daß die Synthese von Plastochinon-9 in beiden Mutanten blockiert war. Über die externe Zufuhr von Homogentinsäure (HGA) einem Intermediat der Plastochinonsynthese, konnte bei den Pflanzen die darauf einsetzende Desaturierung von Phytoen beobachtet

werden. Über die Hemmung der Plastochinonsynthese bei *Lemna gibba* (Wasserlinse) durch das Bleichherbizid SC-0051, wurde ebenfalls die Carotinoidbildung gehemmt, obwohl die Phytoendesaturase durch das Herbizid selbst nicht gehemmt wurde (Schulz et al., 1993). Dies spricht ebenfalls für die Beteiligung von Plastochinon bei der Carotinoidsynthese.

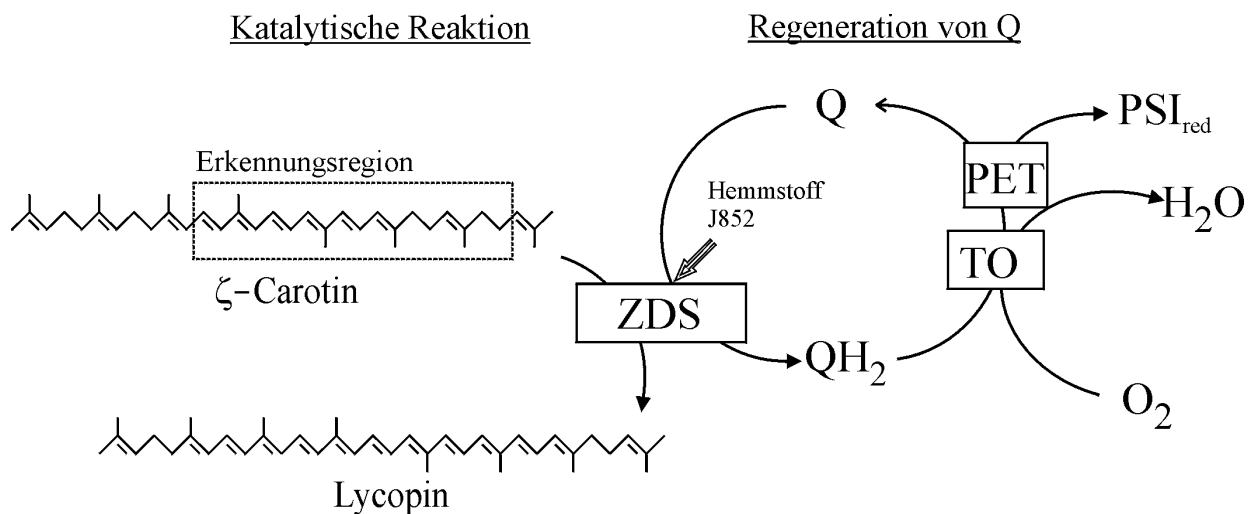
Die Kofaktorstudien an der cyanobakteriellen Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 und der cyanobakteriellen  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 ergaben, daß diese ebenfalls Plastochinon als Kofaktor verwenden. Von Schneider et al. (1997) war eine Sauerstoff-Abhängigkeit der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* bei *in vitro*-Aktivitätstests beschrieben worden. Bei aeroben Reaktionsbedingungen wurde eine fast doppelt so hohe Aktivität von 0,025  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  gegenüber 0,014  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  gemessen (Abbildung 3-25, S.87). Die Zugabe des von Schneider et al. (1997) angegebenen Kofaktors NADP führte nur zu einer geringen Erhöhung der Phytoendesaturase-Aktivität auf 0,02  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Die geringe Aktivitätszunahme gegenüber der Kontrolle lag vermutlich in der Zugabe von nur 0,1 mM NADP, bei einem von Schneider et al. (1997) angegebenen  $K_m$ -Wert von 14,3 mM. Sowohl die Zugabe von 0,1 mM Decyl-Ubichinon als auch Decyl-Plastochinon führten dagegen zu einer drei- bzw. vierfachen Erhöhung der Aktivität auf 0,05  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  und 0,06  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ .

Die Kofaktoruntersuchung bei der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Synechocystis* ergab, daß Decyl-Plastochinon oder Decyl-Ubichinon zu einer Verdoppelung der Aktivität führten, ausgehend von 0,061  $\mu\text{g}/\text{mg}$  auf 0,014  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Folglich ist Plastochinon auch der Kofaktor der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Synechocystis*. Die aus den Vergleichen der Aminosäuresequenz zwischen den Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen höherer Pflanzen und Cyanobakterien abgeleitete phylogenetische Verwandtschaft, wird durch die Verwendung des gleichen Kofaktors Plastochinon der untersuchten pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen unterstützt.

Da Plastochinon der Kofaktor der  $\zeta$ -Carotindesaturase darstellt ist zu fragen, wie die Reoxidation des Plastochinons im Chloroplasten erfolgt und wohin die bei der Desaturierung von Phytoen und  $\zeta$ -Carotin gewonnenen Elektronen und Wasserstoffatome fließen, bzw. welche Verbindung der Endakzeptor ist. Von Carol et al. (1999) konnte gezeigt werden, daß die Mutation des Arabidopsis Gens *Immutans* zu einer Akkumulation von Phytoen in den betroffenen Blattbereichen führte. Die Mutation dieses Gens führt bei den betroffenen Pflanzen zu einem Phänotyp, bei dem einzelne Blattareale unter Lichteinwirkung ausbleichen. Gleichzeitig ist in den betroffenen Blattbereichen der Phytoengehalt erhöht. Das zugehörige Protein (IM) soll in die Thylakoid-Membran der Chloroplasten transportiert werden und dort

die Funktion einer terminalen Oxidase ausüben. Diese terminale Oxidase soll dabei die Reoxidation von Plastohydrochinon durchführen und die Elektronen auf Sauerstoff übertragen. Auf diese Weise wäre das IM-Protein an der Desaturierung von Phytoen über Reoxidation von Plastohydrochinon zu Plastochinon beteiligt. Nach Norris et al. (1995) sollen die bei der Phytoendesaturierung freiwerdenden Elektronen über Plastochinon in die Elektronentransportkette der Photosynthese einfließen. Die Bedeutung des IM Proteins läge dann darin, zu einem frühem Stadium der Chloroplastenentwicklung, wenn die photosynthetische Elektronentransportkette noch nicht voll funktionsfähig ist, die bei der Desaturierung von Phytoen freiwerdenden Elektronen auf Sauerstoff zu übertragen (Carol et al., 1999; Wu et al., 1999).

Da Decyl-Plastochinon der Kofaktor der Phytoen- als auch der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase darstellt, wäre es denkbar, daß auch die Elektronen der Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin wie bei der Phytoendesaturase höherer Pflanzen (Carol & Kuntz, 2001) auf die Chloroplasten-assoziierte terminale Oxidase übertragen werden. Damit ergäbe sich für die bei der Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin gewonnenen Elektronen, der in der Abbildung 4-2 dargestellte Weg.



**Abbildung 4-2:** Modell der Übertragung der bei der Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin gewonnenen Elektronen auf Sauerstoff oder Photosystem I.

Die plastidäre  **$\zeta$ -Carotin-Desaturase (ZDS)** überträgt die bei der Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin zu Lycopin gewonnenen Elektronen auf den Kofaktor **Plastochinon (Q)**, der zu **Plastohydrochinon (QH<sub>2</sub>)** reduziert wird. Die **plastidäre terminale Oxidase (TO)** überträgt die Elektronen von Plastohydrochinon auf Sauerstoff oder sie fließen über den **Photosynthetischen Elektronentransport (PET)** zum **Photosystem I (PSI)**. Plastohydrochinon wird dabei wieder zu Plastochinon oxidiert. Der Hemmstoff J852 wechselwirkt mit der Kofaktorbindestelle.

Die bei der Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin zu Lycopin gewonnenen Elektronen werden auf den Kofaktor Plastochinon übertragen und dieser zu Plastohydrochinon reduziert. Nachfolgend werden die Elektronen von Plastohydrochinon übernommen und über eine plastidäre terminale Oxidase (TO) auf Sauerstoff übertragen oder sie fließen über den Plastochinonpool in den photosynthetischen Elektronentransport ein (PET) und werden auf Photosystem I übertragen. Der Kofaktor Plastochinon wird auf diese Weise reoxidiert. Der Hemmstoff J852 hemmt die ZDS dabei kompetitiv über die Kofaktorbindestelle.

#### **4.2. Hemmkinetische Untersuchungen der *Capsicum*-ZDS. Vergleich mit den Phytoen-Desaturasen aus *Synechococcus* und *Gentiana lutea*.**

Für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus Pflanzen sind nur wenige Hemmstoffe bekannt, wie die Pyrimidinderivate J852 und LS80707 (Böger & Sandmann, 1998). Bisher lagen keine Daten zu der Art der Hemmung der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen durch diese Verbindungen vor. Ebenso war nicht bekannt, inwieweit diese Verbindungen in der Lage sind, auch die pflanzliche Phytoendesaturase zu hemmen. Die Behandlung von Pflanzen mit den Hemmstoffen J852 und LS80707 führen zu einer Akkumulation von  $\zeta$ -Carotin und von Phytoen (Simkin et al., 2000). Daher wurde vermutet, so daß diese Verbindungen auch die pflanzliche Phytoendesaturase hemmen. Ziel der Hemmstoffversuche war es daher, die  $I_{50}$ -Werte der Hemmstoffe J852, LS80707 und Norflurazon für die ZDS aus *Capsicum annuum* zu bestimmen und mit den entsprechenden Werten einer pflanzlichen Phytoendesaturase zu vergleichen. Die Bestimmung der  $I_{50}$ -Werte von J852 und LS80707 konnten an der PDS aus *Capsicum* nicht durchgeführt werden, da sich die *Capsicum*-PDS nicht in ausreichender Menge in *E. coli* heterolog exprimieren ließ und eine andere pflanzliche Phytoendesaturase zunächst nicht zur Verfügung stand. Daher wurde die strukturell verwandte Phytoendesaturase aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* PCC 7942 (64 % identische, 77 % ähnliche Aminosäuren) in *E. coli* heterolog exprimiert und über *in vitro*-Hemmkinetiken die  $I_{50}$ -Werte für J852 und LS80707 bestimmt. Für die ZDS aus *Capsicum* wurde zusätzlich der  $I_{50}$ -Wert des Phytoendesaturase-Hemmstoffs Norflurazon bestimmt, da nicht bekannt war, ob diese Verbindung auch die  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen höherer Pflanzen hemmt.

Die  $I_{50}$ -Werte der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase-Hemmstoffe J852 und LS80707 betragen für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum* 45,7  $\mu$ M für J852 und 14,1  $\mu$ M für LS80707. Demnach wird die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase durch LS80707 etwas stärker gehemmt als durch J852. Mit

einem  $I_{50}$ -Wert von 144  $\mu\text{M}$  wird die *Capsicum*-ZDS durch Norflurazon gegenüber den Hemmstoffen J852 und LS80707 schwächer gehemmt.

Für die Phytoendesaturase aus *Synechococcus*, betragen die  $I_{50}$ -Werte 22,7  $\mu\text{M}$  für J852 und 33,6  $\mu\text{M}$  für LS80707. Von Simkin et al. (2000) wurde der  $I_{50}$ -Wert für Norflurazon und der Phytoendesaturase aus *Synechococcus* mit 0,12  $\mu\text{M}$  angegeben. Damit liegen die  $I_{50}$ -Werte der Hemmstoffe J852 und LS80707 in der gleichen Größenordnung, wie die Werte für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase, d.h. die cyanobakterielle Phytoendesaturase wird durch die Hemmstoffe der pflanzlichen  $\zeta$ -Carotin-Desaturase vergleichbar stark gehemmt. Der Vergleich mit dem  $I_{50}$ -Wert von Norflurazon für die *Capsicum*-ZDS zeigt, dass die Phytoendesaturase aus *Synechococcus* durch Norflurazon deutlich stärker gehemmt wird und Norflurazon damit selektiver wirkt, als die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase-Hemmstoffe J852 und LS80707. Die Hemmung der Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen in Pflanzen durch Hemmstoffe der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen erklärt die bei Pflanzen beobachtete Akkumulation von  $\zeta$ -Carotin und Phytoen. Der  $\zeta$ -Carotin-Hemmstoff J852 hemmt neben der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum* auch die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* (Breitenbach et al., 1998). Die Hemmbarkeit der Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen durch J852 und LS80707, einem  $\zeta$ -Carotin-Desaturase-Hemmstoff, spricht für deren strukturelle Ähnlichkeit. Weiterhin wird die über den Vergleich der Aminosäuresequenzen abgeleitete phylogenetische Verwandtschaft der Phytoen- und  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus Pflanzen und Cyanobakterien unterstützt. In Unterschied dazu, wird die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Anabaena*, die eine größere Sequenzähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz der bakteriellen Phytoendesaturasen zeigt (crtI-Typ), durch die Hemmstoffe J852 und LS80707 nur schwach gehemmt (Albrecht et al., 1995b).

Für die *Capsicum*-ZDS wurde der  $K_m$ -Wert für das Substrat  $\zeta$ -Carotin bei zwei verschiedenen Konzentrationen des  $\zeta$ -Carotin-Desaturase-Hemmstoffes J852 bestimmt. Die  $K_m$ -Werte unterschieden sich wenig, dafür wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erniedrigt. Die Hemmung der ZDS durch J852 bezogen auf das Substrat  $\zeta$ -Carotin erfolgt damit in einer nicht-kompetitiven Weise.

In gleicher Weise wurde der  $K_m$ -Wert von Plastochinon bei verschiedenen Konzentrationen von J852 bestimmt, wobei sich unterschiedliche  $K_m$ -Werte, aber nur geringfügig voneinander abweichende Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ergaben. Demnach lag eine Konkurrenz des Kofaktors Plastochinon und des Hemmstoffes J852 um die

Kofaktorbindestelle vor, bzw. der Hemmstoff J852 wechselwirkt mit der Kofaktorbindestelle der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum*.

Die Phytoendesaturase aus *Gentiana lutea* und dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 verwenden wie die  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum annuum* und dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 den Kofaktor Plastochinon. Es stellte sich die Frage, ob der Phytoendesaturase-Hemmstoff Norflurazon die Phytoendesaturase über die Wechselwirkung mit der Kofaktorbindestelle hemmt, wie der Hemmstoff J852 die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum*. Die hemmkinetische Untersuchung wurde mit den Phytoendesaturasen aus der Pflanze *Gentiana lutea* und aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 durchgeführt. Dazu wurden der  $K_m$ -Wert des Kofaktors Plastochinon bei zwei verschiedenen Norflurazonkonzentrationen bestimmt. Aufgrund stark voneinander abweichender  $K_m$ -Werte und fast gleicher maximaler Reaktionsgeschwindigkeiten lag für beide Phytoendesaturasen eine kompetitive Hemmung vor. Beide Phytoendesaturasen werden über die Wechselwirkung des Hemmstoffes Norflurazon mit der Kofaktorbindestelle kompetitiv gehemmt. Wie bereits die Verwendung des gemeinsamen Kofaktors Plastochinon der cyanobakteriellen und pflanzlichen Phytoendesaturase, spricht auch der gleiche Hemmtyp durch das Herbizids Norflurazon für die strukturelle Ähnlichkeit beider Phytoendesaturasen und deren phylogenetische Verwandtschaft.

#### 4.3. Bestimmung der $K_m$ -Werte für die Substrate $\zeta$ -Carotin und Neurosporin

Für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase wurden für die Substrate  $\zeta$ -Carotin und Neurosporin die  $K_m$ -Werte von 8,4  $\mu\text{M}$  und 9  $\mu\text{M}$  bestimmt. Demnach besitzt die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase für beide Carotine ungefähr die gleiche Affinität. Diese Werte liegen im Bereich der Werte für Phytoen und Phytofluen der Phytoendesaturase aus *Capsicum*. Für diese wurden für die Carotine Phytoen und Phytofluen die  $K_m$ -Werte zu 3  $\mu\text{M}$  und 4  $\mu\text{M}$  bestimmt (Hugueney et al., 1992). Somit liegen die  $K_m$ -Werte für die Carotine der 4 Desaturierungsschritte von Phytoen zum Lycopin in der gleichen Größenordnung. Für die Phytoendesaturase aus *Synechococcus*, die ebenfalls nur 2 Desaturierungsschritte katalysiert, wurde für Phytoen ein  $K_m$ -Wert von 3,4  $\mu\text{M}$  bestimmt werden, was nahezu dem Wert der *Capsicum*-PDS entspricht.

Für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus dem Cyanobakterium *Anabaena*, von Albrecht et al. (1995) für  $\zeta$ -Carotin und Neurosporin die  $K_m$ -Werte zu 9,7  $\mu\text{M}$  und 10,3  $\mu\text{M}$  bestimmt und sind

damit mit denen der ZDS aus *Capsicum* vergleichbar groß. Für die bakterielle Phytoendesaturase aus *Rhodobacter capsulatus*, die 3 Desaturierungsschritte katalysiert wurden größere  $K_m$ -Werte von 33,3  $\mu\text{M}$  für Phytoen und 16,6  $\mu\text{M}$  für  $\zeta$ -Carotin bestimmt (Raisig et al., 1996).

#### 4.4. pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der *Capsicum*-ZDS

Für die enzymatische Aktivität der ZDS ergab sich ein Maximum bei dem pH-Wert 7,2. Das Optimum der ZDS-Aktivität liegt damit in der Nähe des von Albrecht et al. (1995) angegebenen pI-Wertes von 7,4. Für die Phytoen-Desaturase aus *Capsicum annuum* wurde von Hugueney et al. (1992) das pH-Optimum der Desaturaseaktivität für einen pH-Bereich von 7,2 bis 8 bei einem pI von 5,8 angegeben. Demnach liegt das pH-Optimum der *Capsicum*-ZDS im Bereich des pH-Optimums der *Capsicum*-PDS. Dies erscheint sinnvoll, da die Reaktionssequenz ausgehend vom Phytoen zum Lycopin von der PDS (Desaturierung von Phytoen zum  $\zeta$ -Carotin) und von der ZDS (Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin zum Lycopin) katalysiert wird.

Für die Menge des gebildeten Prolycopins, des cis-Neurosporins N1 und der anderen Lycopin- und Neurosporinisomere ergab sich eine unterschiedliche Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Bildung des Isomers Prolycopin (7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin) und des cis-Neurosporin N1 erreichte ein Maximum bei dem pH-Wert von 7,1. Die Summe aller anderen Lycopin- und Neurosporin-Isomere nahm mit sinkendem pH-Wert im sauren pH-Bereich leicht zu. Carotinoidisomere sind dafür bekannt im sauren pH-Bereichen leichter zu isomerisieren als im basischen pH-Bereich (Goodwin, 1980). Es wäre möglich, daß bei niedrigen pH-Werten Prolycopin L1 und das cis-Neurosporin N1 in den *in vitro*-Aktivitätstests stärker isomerisieren als im neutralen pH-Bereich und es zur Bildung der anderen Lycopin- (L4 – L13) und Neurosporin-Isomeren (N3- N11) kommt. Alternativ müssten bei niedrigem pH-Wert andere  $\zeta$ -Carotin-Isomere wie all trans- $\zeta$ -Carotin desaturiert werden, unter Bildung der Lycopinisomere L4-L13 und Neurosporinisomere N3-N11. Angesichts der geringen spezifischen Aktivität der *Capsicum*-ZDS unter Verwendung einer mit all trans- $\zeta$ -Carotin angereicherten Substratfraktion in den *in vitro*-Aktivitätsuntersuchungen bei dem pH-Wert 5,8 und 7,2 ist diese Möglichkeit unwahrscheinlich. Weiterhin konnte bei dem pH-Wert 5,8 unter Verwendung von all trans- $\zeta$ -Carotin keine Bildung der Lycopin-Isomere L4 bis L13 gemessen werden (Tabelle 3.19, S.75).



#### 4.5. Die *Capsicum*-ZDS ist als Monomer aktiv

Die Desaturierung von Phytoen erfolgt durch die pflanzliche und cyanobakterielle Phytoendesaturase in zwei Desaturierungsschritten, wobei auf jeder Seite des Moleküls, an der eine Desaturierung erfolgt, die gleiche Struktur vorliegt. Aufgrund dieser Symmetrie des Phytoenmoleküls wurde von Bartley et al. (1990) und Pecker et al. (1992) die Möglichkeit einer Dimerisierung der Phytoendesaturasen vermutet, um auf jeder Seite des Moleküls jeweils eine der Desaturierungen durchzuführen. Da das  $\zeta$ -Carotin-Molekül wie das Phytoen-Molekül symmetrisch ist, wurde daher auch die Möglichkeit einer Dimerisierung der ZDS zur Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin zu Lycopin vermutet. Die ZDS aus *Capsicum annuum* wurde daher auf eine Dimerisierung hin untersucht. Dies geschah über das Two-Hybrid System in Hefe, mit dem eine schwache Wechselwirkung der ZDS mit sich selbst unter *in vivo*-Bedingungen nachgewiesen werden konnte. Der alleinige Nachweis der Wechselwirkung gab keine Antwort darauf, ob die Dimerisierung der ZDS für die Katalyse beider Desaturierungsschritte notwendig ist. Weiterhin war diese Wechselwirkung gering, so daß das Ergebnis des Two-Hybrid-Systems über weitere Untersuchungen überprüft werden sollte. Dazu wurden eine native Gelelektrophorese nach Schägger & von Jagow (1991) und eine Fraktionierung der nativen ZDS nach Molmasse über Gelfiltration durchgeführt.

Über die native Gelelektrophorese zeigte die ZDS eine monomere und dimere Form von 66 und 132 kDa Molmasse, was die über das Two-Hybrid-System nachgewiesene Dimerisierung bestätigte. Von Hom & Volkman (1998) wurde die Dimerisierung eines rekombinanten Polypeptids mit 10 N-terminalen Histidinen (His-tag) als Artefakt bei der Reinigung dieses Polypeptids über Metallionen-Affinitätschromatographie beschrieben. Die Dimerisierung erfolgte über zweiwertige Metallionen, die als Folge von Auswaschung aus dem Affinitätsmaterial in die Lösung des gereinigten Polypeptids gelangten. Das für die Affinitätsreinigung der ZDS verwendete His-tag beinhaltete nur 6 Histidine. Eine Probe der gereinigten ZDS, die über die native Gelelektrophorese getrennt werden sollte (Abbildung 3-36), wurde mit Kobaltchlorid versetzt. Auf dem nativen Gel ergaben sich keine Unterschiede in den Mengen der monomeren und der dimeren Form der ZDS unter Zugabe von Kobaltionen, so daß die Möglichkeit der Dimerisierung der ZDS über die 6 N-terminalen Histidine ausgeschlossen werden konnte. Desweiteren konnte die Dimerisierung der ZDS unter *in vivo*-Bedingungen über das Two-Hybrid-System nachgewiesen werden, bei dem die ZDS ohne 6 N-terminale Histidine exprimiert wurde.

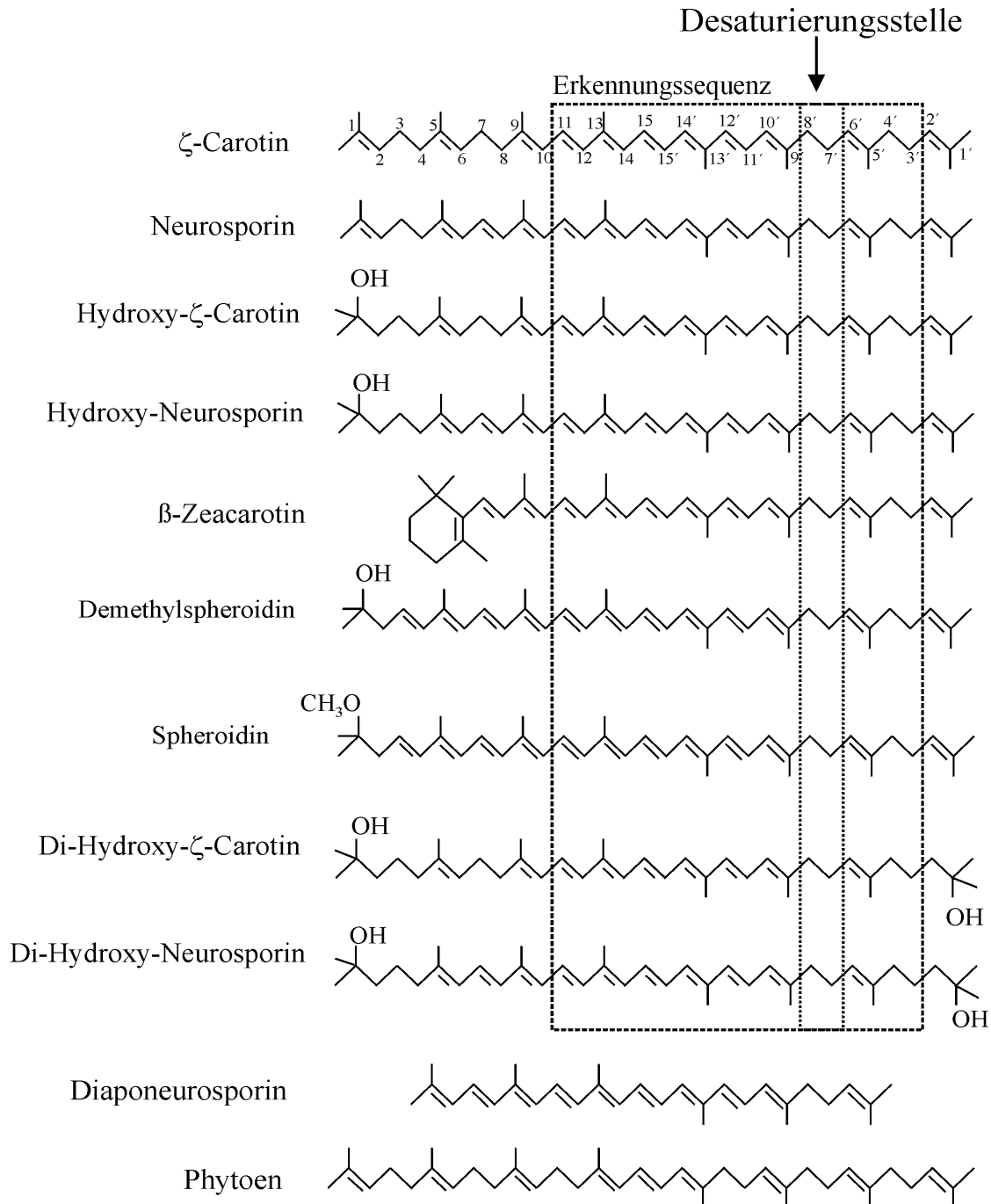
Die Aktivität der ZDS in ihrer monomeren und dimeren Form wurde über die Gelfiltration untersucht. Dabei erfolgte die Trennung der nativen ZDS nach Molmasse mit einem nachfolgenden *in vitro*-Aktivitätstest der erhaltenen Fraktionen der ZDS. Dabei zeigte sich, daß die Desaturierung des  $\zeta$ -Carotins zu Neurosporin und zu Lycopin unabhängig davon erfolgte, ob die ZDS als Monomer oder als Dimer vorlag. In beiden Fällen war das Verhältnis von gebildetem Neurosporin/Prolycopin zu Lycopin gleich. Für die Fraktionen 10 und 11, die die dimere und die monomere Form der ZDS enthielten, ergab sich in etwa die gleiche spezifische Aktivität von 1,54  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  für die dimere und 1,37  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  für die monomere ZDS. Folglich ist die Dimerisierung für die Durchführung beider Desaturierungen von  $\zeta$ -Carotin zu Lycopin nicht erforderlich.

#### 4.6. Substratspezifität der *Capsicum*-ZDS

Bezüglich der Substratspezifität der ZDS wurde die Notwendigkeit eines zentralen konjugierten Doppelbindungssystems aus 7 Doppelbindungen mit einer nicht konjugierten angrenzenden Doppelbindung als Erkennungssequenz für die ZDS postuliert (Sandmann, 1994). Diese Erkennungssequenz würde von C-Atom 5 bis 9', bzw. 9 bis 5' reichen, wie sie bei  $\zeta$ -Carotin und Neurosporin gegeben ist. Zur Untersuchung der Substratspezifität wurden in den *in vitro*-Aktivitätsuntersuchungen verschiedene Substratcarotinoide verwendet. Neben  $\zeta$ -Carotin, Neurosporin, deren mono- und di-hydroxylierten Derivate wurde auch ein einseitig zyklisiertes Derivat ( $\beta$ -Zeacarotin) eingesetzt. Weiterhin wurden einseitig methoxylierte und hydroxylierte Carotine mit einer gegenüber Neurosporin (Demethylspheroidin, Spheroidin) zusätzlichen Doppelbindung in der Position 3 und Phytoen mit nur 3 konjugierten Doppelbindungen *in vitro* auf Desaturierung durch die ZDS untersucht (Abbildung 4-3).

Phytoen besitzt gegenüber  $\zeta$ -Carotin nur 3 zentral gelegene konjugierte Doppelbindungen (13,13', 15) und konnte bei den *in vitro*-Aktivitätstests nicht von der ZDS desaturiert werden. Auch bei Komplementierung der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase in einen Phytoen-akkumulierenden *E. coli*-Stamm, wurde Phytoen nicht desaturiert (Albrecht et al., 1995a). Das System aus 3 zentralen konjugierten Doppelbindungen von C13 bis C13' ist zu kurz und entspricht nicht der Substraterkennungssequenz. Das Carotinoid Phytofluen unterscheidet sich gegenüber Phytoen durch eine Verlängerung des konjugierten Doppelbindungen auf 4 mit der zusätzlichen Doppelbindung in Position C11 oder C11'. Es ist das Intermediat der  $\zeta$ -Carotinbildung durch die Phytoendesaturase. Wenn Phytofluen nicht umgesetzt werden kann, müssen mindestens 6 konjugierte Doppelbindungen vorliegen und vom C9' bis zum C-Atom 11 oder C9 bis 11' reichen. Phytofluen stand als Substrat für die *in vitro*-Untersuchung jedoch

nicht zur Verfügung, da es aufgrund seiner Instabilität kaum zu extrahieren ist und unter *in vitro*-Bedingungen der Enzymreaktionen zur Messung der Desaturase-Aktivität einem schnellen, nicht-enzymatischem Abbau unterliegt (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. G. Sandmann).



**Abbildung 4-3:** Substrat-Erkennungssequenz der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum*. Die Erkennungssequenz reicht von C-Atom 11 bis 3'. Diaponeurosporin ist auf beiden Seiten 5 C-Atome kürzer, als die anderen Substrate und wird kaum desaturiert. Phytoen ist aufgrund der fehlenden Doppelbindungen in Position 11 und 11' ebenfalls kein Substrat der ZDS. Zur Vereinfachung der Illustration ist die all trans-Konfiguration der Carotinoide dargestellt.

Bei *in vitro*-Reaktionen wurde sowohl  $\zeta$ -Carotin mit 7 konjugierten als auch Neurosporin mit 9 konjugierten Doppelbindungen desaturiert, d.h. zur Erkennung der Desaturierungsstellen in Position C7 oder C7' muß eine Doppelbindung in Position C11 und C11' vorliegen. Eine Verlängerung des konjugierten Doppelbindungssystems über 6 Doppelbindungen hinaus, wie bei Neurosporin mit 9 konjugierten Doppelbindungen oder 10 bei Spheroidin und Demethylspheroidin, beeinträchtigt die Desaturierung an Position 7' nicht. Beide Verbindungen wurden desaturiert.  $\beta$ -Zeacarotin, das einseitig zyklisiert ist, kann von der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase an Position 7' desaturiert werden, und deckt sich damit mit der Annahme, daß das System konjugierter Doppelbindungen nicht mehr als 6 konjugierte Doppelbindungen von C11 bis C9' oder C9 bis C11' erfordert (Abbildung 4-3).

Die Bildung einer Doppelbindung in Position 3 oder 3' (Abbildung 4-3) wird von der ZDS nicht durchgeführt. Neben 7 konjugierten Doppelbindungen sollte daher ein weiteres Merkmal des Moleküls zur Erkennung der Desaturierungsstelle in Position 7 oder 7' notwendig sein, wie der Bereich um die 3 zentralen Doppelbindungen 13, 13', 15 oder der Bereich zwischen C-Atom 1 und Position 7, bzw. von C-Atom 1' zu 7'.

Die mono- und dihydroxylierten Derivate verfügen aufgrund der Hydroxylierung des C-Atoms in Position 1 über keine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 1 und 2. Die mono- und dihydroxylierten  $\zeta$ -Carotin und Neurosporin-Derivate konnten von der ZDS zu Mono- und Di-Hydroxy-Neurosporin sowie Mono- und Di-Hydroxy-Lycopin desaturiert werden, so daß die Doppelbindung zwischen dem C-Atom 1 und 2 zur Substraterkennung nicht erforderlich ist. Es konnte jedoch ein geringerer Umsatz der Di-hydroxy-Verbindung beobachtet werden. Die Erkennungssequenz sollte daher von C11 bis C3', bzw. C3 bis C11' reichen.

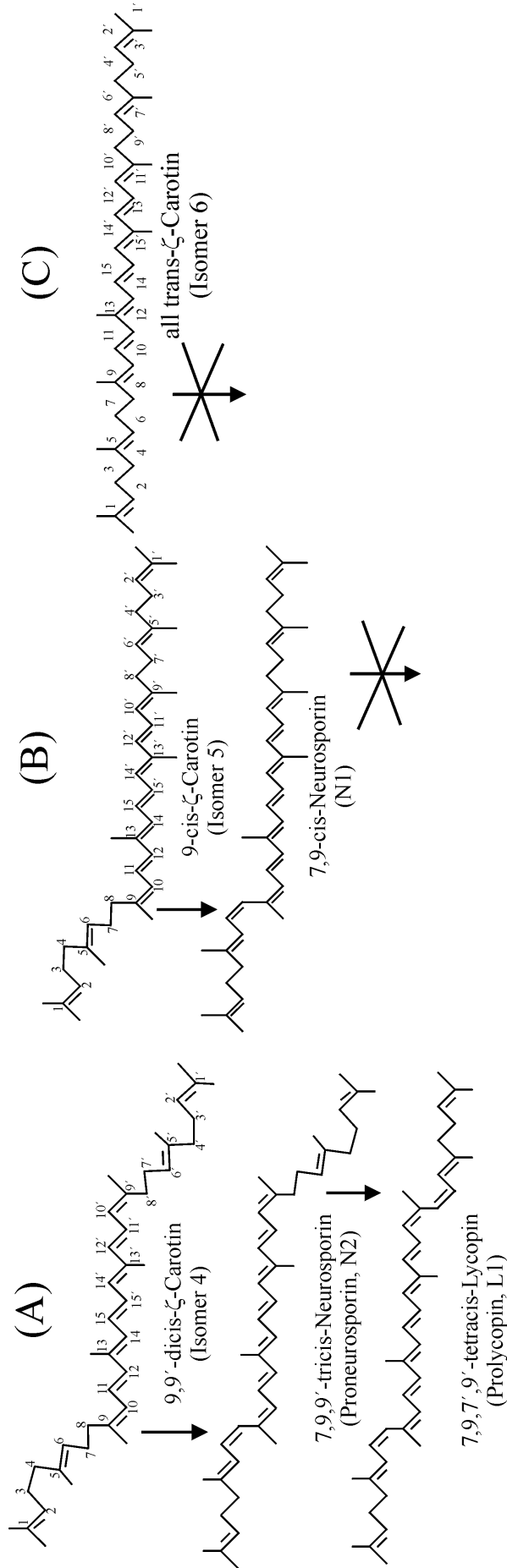
Um zu prüfen, ob das C-Atom 3 zur Substraterkennung notwendig ist, wurde Diaponeurosporin als Substrat *in vitro* eingesetzt. Diaponeurosporin ist ein C<sub>30</sub>-Carotinoid, dessen Molekülbau dem C<sub>40</sub>-Neurosporin zwischen den C-Atomen C4' bis C-15', bzw. C4 bis C15 entspricht. Es fehlen dabei gegenüber C<sub>40</sub>-Neurosporin die C-Atome 1' bis 3' und 1 bis 3 (Abbildung 4-3). Der *in vitro*-Test ergab, daß Diaponeurosporin nur zu sehr geringen Anteilen zu Diapolycopin umgesetzt werden konnte (3,35 %). Demnach erfolgt die Substraterkennung über die Länge des konjugierten Doppelbindungssystem von C11 bis C9' oder C9 bis C11' und über die Länge des Substratmoleküls von C11 bis zum C-Atom 3' bzw. C11' bis C-Atom 3 erfolgt (Abbildung 4-3).

#### 4.7. 9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin ist das Substrat der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum*

Zur Untersuchung, ob die *Capsicum*-ZDS eine Selektivität für eine bestimmte Konfiguration des  $\zeta$ -Carotin-Substrates besitzt und welche Produkte aus den  $\zeta$ -Carotin-Isomeren hervorgehen, wurden über  $C_{18}$ -HPLC aus einem  $\zeta$ -Carotin-Extrakt aus JM101/pACCRT-EBP drei Fraktionen mit unterschiedlichen Anteilen an  $\zeta$ -Carotin-Isomeren isoliert. Diese Fraktionen wurden bei *in vitro*-Aktivitätstests der ZDS als Substrate zugeführt und die Reaktionsprodukte über  $C_{30}$ -HPLC analysiert und quantifiziert.

Unter der Verwendung einer  $\zeta$ -Carotin-Fraktion mit 81 % all trans- $\zeta$ -Carotin (Isomer 6) als Substrat, wurde mit 0,013  $\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{mg}$  gegenüber den  $\zeta$ -Carotin-Substratfraktionen mit den Isomeren 5 oder 4 die geringste Aktivität der ZDS in den *in vitro*-Aktivitätstests gemessen. Demnach wird  $\zeta$ -Carotin nicht oder kaum als Substrat akzeptiert, wenn die Doppelbindungen in Position 9 oder 9' in trans-Konfiguration vorliegen (Abbildung 4-4). Es waren in geringen Mengen die Neurosporinisomere N1, N9, N10 und N11 (all trans) nachweisbar. Prolycopin trat mit einem relativen Anteil von nur 10 % auf und andere Lycopinisomere waren nicht nachweisbar (Tabelle 3.19, S. 75). Die geringen Mengen an Neurosporin entstanden vermutlich aus dem  $\zeta$ -Carotin-Isomer 5, daß in dieser  $\zeta$ -Carotin-Fraktion noch zu 4 % enthalten war.

Die  $\zeta$ -Carotin-Substrat-Fraktionen, die mit den Isomeren 5 (64,4 %) und 4 (45,6 %) angereichert waren, führten in etwa zu den gleichen Aktivitäten von 0,062  $\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{mg}$  und 0,057  $\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{mg}$  und waren damit um den Faktor 4 höher, als unter Verwendung der mit all trans- $\zeta$ -Carotin angereicherten Substratfraktion. Durch die Desaturierung der mit dem **Isomer 4** angereicherten  $\zeta$ -Carotin-Fraktion (45,6 %) wurde im wesentlichen **7,9,7',9'-tetracis-Lycopin** (Prolycopin; 71 %) gebildet (Abbildung 4-4, A). Prolycopin wird dabei aus dem  $\zeta$ -Carotin-Isomer 4 gebildet. In dieser Fraktion fanden sich noch die Isomere 2 und 3. Die Möglichkeit, daß Prolycopin aus einer dieser zwei Isomere gebildet wurde, konnte durch eine Kinetik ausgeschlossen werden. Es zeigte sich dabei, daß die Isomere 2 und 3 kaum umgesetzt werden. Weiterhin kann die Bildung von Prolycopin aus einer der  $\zeta$ -Carotin-Isomere 2 und 3 dadurch ausgeschlossen werden, daß sich diese Isomere auch in der mit dem  $\zeta$ -Carotin-Isomer 5 angereicherten Substratfraktion fanden, aus der im wesentlichen das Neurosporin N1 und nur wenig Prolycopin gebildet wurde.



**Abbildung 4-4:** Desaturierungsschritte der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* in Abhängigkeit der Konfiguration der Doppelbindungen in Position 9 und 9' des  $\zeta$ -Carotin-Substrates.

- (A) 2 Desaturierungsschritte bei 9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin unter Bildung von Prolycopin (L1).
- (B) 1 Desaturierungsschritt bei 9-cis- $\zeta$ -Carotin unter Bildung von 7,9-dicis-Neurosporin (N1).
- (C) Keine Desaturierung von all trans- $\zeta$ -Carotin.

Prolycopin besitzt cis-Doppelbindungen in den Positionen 7,9,7',9'. Daraus läßt sich folgern, daß die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase bei dem  $\zeta$ -Carotin-Isomer 4 die Doppelbindungen in den Positionen 7 und 7' in cis-Konfiguration einfügt. Bei dem  $\zeta$ -Carotin-Isomer 4 muß es sich demnach um Pro- $\zeta$ -Carotin handeln, mit einer cis-Doppelbindungen in den Positionen 9,9' (Abbildung 4-4, A). Der Vergleich der Absorptionsmaxima der Spektren eines Pro- $\zeta$ -Carotin-Standards aus einem Carotinoideextrakt aus *Scenedesmus obliquus* C-6D (Ernst & Sandmann, 1988) mit dem  $\zeta$ -Carotin-Isomer 4 zeigte die gleichen Absorptionsmaxima von 380, 401 und 426 nm, die gleichen Verhältnisse der Extinktionen (Tabellen 3.11 und 3.12) und ungefähr die gleiche Retentionszeit von 23,30 min und 23,13 min. Die spektralen Daten stimmten ebenso mit den Werten des von Clough & Pattenden (1983) über NMR-Spektroskopie charakterisierten Pro- $\zeta$ -Carotin überein. Die Existenz zentral gelegener cis-Doppelbindungen in dem  $\zeta$ -Carotin-Isomer 4 lassen sich aufgrund des Fehlens einer ausgeprägten cis-Absorptionsbande im zugehörigen Spektrum ausschließen (das Verhältnis der Extinktion der cis-Absorptionsbande zu der Extinktion des Hauptmaximums beträgt 0,04). Die zwei Doppelbindungen in den Positionen 9 und 9' sind die zwei äußersten Doppelbindungen der 7 konjugierten Doppelbindungen des  $\zeta$ -Carotins. Nach Zechmeister (1962) tritt eine ausgeprägte cis-Absorptionsbande nur auf, wenn eine der zentralen konjugierten Doppelbindungen in cis-Konfiguration vorliegt. Damit stehen die zwei cis-Doppelbindungen in den Positionen 9 und 9' in Übereinstimmung mit dem Fehlen einer ausgeprägten cis-Absorptionsbande im Spektrum.

Die  $\zeta$ -Carotin-Fraktion mit einem hohen Anteil des **Isomers 5** (64,4 %) führte im wesentlichen zur Bildung des Carotinoids N1 mit dem größten Anteil von 60 % unter den Desaturierungsprodukten. Aufgrund seiner Absorptionsmaxima von 407, 431 und 456 nm und dem Fehlen einer cis-Absorptionsbande im Spektrum, konnte es zunächst weder einem Lycopin- noch einem Neurosporinisomer zugeordnet werden. Ein entsprechender Carotinoidstandard zur Identifizierung von N1 lag nicht vor. Die Photoisomerisierung von N1 mit Iod (Abbildung 3-13, F) führte zur Bildung von all trans-Neurosporin und cis-Isomeren von Neurosporin, wodurch N1 eindeutig als ein Neurosporinisomer identifiziert werden konnte. Da für das  $\zeta$ -Carotin-Isomer 5, aus dem N1 gebildet wurde, kein Carotinoidstandard vorlag, kann über dessen Konfiguration und die des gebildeten Neurosporinisolomers (N1) nur spekuliert werden. Aufgrund der geringeren Retentionszeit gegenüber all trans- $\zeta$ -Carotin (Isomer 6) muß es sich bei dem Isomer 5 um ein cis-Isomer handeln. Da es über keine deutliche cis-Absorptionsbande im Spektrum und über die gleichen Absorptionsmaxima wie Isomer 4 oder all trans- $\zeta$ -Carotin verfügt (Abbildung 3-11, Tabelle 3.11), muß die cis-

Doppelbindung ebenfalls am Rande des konjugierten Doppelbindungssystems liegen. Weiterhin besitzt das  $\zeta$ -Carotin-Isomer 5 eine Retentionszeit, die zwischen dem Isomer 4 (9,9'cis) und all trans- $\zeta$ -Carotin liegt (Abbildung 3-11). Es könnte sich daher bei dem  $\zeta$ -Carotin-Isomer 5 um ein 9 cis-Isomer handeln (Abbildung 4-4, B). Da die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase zur Substraterkennung eine cis-Doppelbindung in Position 9 benötigt, um in Position 7 eine cis-Doppelbindung einzufügen, ist zu folgern, daß **aus der Desaturierung von dem  $\zeta$ -Carotin-Isomer 5 das 7,9-dicis-Neurosporin** entsteht. Die andere Seite des 7,9-dicis-Neurosporin besitzt eine gestreckte Konfiguration ohne eine 9'cis-Doppelbindung und wird wie all trans- $\zeta$ -Carotin nicht oder kaum weiter desaturiert und akkumuliert als Intermediat. Dies würde die Bildung von Prolycopin (7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin) aus dem  $\zeta$ -Carotin 4 (9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin), von einem Neurosporin-Isomer (N1, 7,9-dicis-Neurosporin) aus dem  $\zeta$ -Carotin-Isomer 4 und den geringen Umsatz von all trans- $\zeta$ -Carotin erklären (Abbildung 4-4).

Bei dem Neurosporinisomer N1 kann es sich nicht um Proneurosporin (7,9,9'cis-Neurosporin) handeln, aufgrund seiner Absorptionsmaxima von 407, 431 und 456 nm Wellenlänge, die geringer sind als die von Clough & Pattenden (1983) für Proneurosporin angegebenen Absorptionsmaxima von 410, 433 und 459 nm. Weiterhin wurde aus dem  $\zeta$ -Carotin-Isomer 4 (9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin) Prolycopin gebildet, wobei Proneurosporin das Intermediat darstellt (Abbildung 4-4). Proneurosporin akkumulierte in den *in vitro*-Enzymreaktionen nicht, vermutlich aufgrund einer effizienten Desaturierung durch die ZDS. Weiterhin ergab die Co-Chromatographie von Proneurosporin aus *Scenedesmus obliquus* C-6D mit den Produkten der *Capsicum*-ZDS für Proneurosporin und dem Neurosporin-Isomer N1 eine unterschiedliche Retentionszeit (Abbildung 3-12, S. 62).

Das Fazit ist, daß die Doppelbindungen in den Positionen C9, C9' in cis-Konfiguration vorliegen müssen, damit  $\zeta$ -Carotin desaturiert werden kann. Gleiches wurde auch für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Arabidopsis thaliana* gefunden (Bartley et al., 1999). Das Hauptprodukt der ZDS aus *Capsicum* ist folglich Prolycopin. Die Bildung von Prolycopin aus Pro- $\zeta$ -Carotin wird von Clough & Pattenden (1979, 1983) für die Tomatenmutante Tangella beschrieben. Für die aus den Tomaten von Tangella isolierten Carotinoide wurde von Clough & Pattenden über NMR-Spektroskopie die Konfiguration der Carotinoidisomere eines Extraktes aus der Tomate 'Tangella' zu 15 cis-Phytoen, 15,9'-dicis-Phytofluen, 9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin (Pro- $\zeta$ -Carotin), 7,9,9'-tricis-Neurosporin (Pro-Neurosporin) und 7,9,7',9'-tetrakis-Lycopin (Prolycopin) bestimmt (A, Abbildung 4-6). Die Grünalgenmutante *Scenedesmus*



*obliquus* C-6D (Ernst & Sandmann, 1988) akkumuliert im Dunkeln ebenfalls poly-cis-Carotinoide wie Pro- $\zeta$ -Carotin, Proneurosporin und Prolycopin. Nach Beyer et al. (1994) erfolgt in *Narcissus*-Chromoplasten ebenfalls die Bildung von Prolycopin aus Pro- $\zeta$ -Carotin. Ebenso wurde für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Arabidopsis thaliana* die Bildung von Prolycopin aus Pro- $\zeta$ -Carotin beschrieben (Bartley et al., 1999). Die Bildung von Prolycopin in der Tomaten- oder Grünalgenmutante kann daher nicht die Folge einer mutierten  $\zeta$ -Carotin-Desaturase sein.

Da die *Capsicum*-ZDS nur Pro- $\zeta$ -Carotin und cis-Neurosporin zu Prolycopin und zu 7,9-dicis-Neurosporin desaturiert, stellt sich die Frage nach der Herkunft der anderen beobachteten Neurosporin- und Lycopinisomere. Über  $C_{30}$ -HPLC identifizierte Lycopin-Isomere konnten neben Prolycopin 5-cis-, 5,5'-dicis-, 5,9'-dicis-, 9-cis-, 7-cis- und all trans-Lycopin identifiziert werden. Unter den Neurosporinen fanden sich neben all trans-Neurosporin und dem Neurosporin N1, neun weitere Neurosporin-Isomere. Die Isomerisierung von Prolycopin und dem Neurosporin-Isomer N1 durch Extraktion der Desaturierungsprodukte aus JM101/pACCRT-EBP+pQE30zds durch die Extraktionstemperatur von 60°C konnte durch Vergleichsextraktionen bei 25°C ausgeschlossen werden. Ebenso führt die Verseifung der *E. coli*-Lipide mit 6 % Kaliumhydroxid zu keiner deutlichen Isomerisierung unter den durch die ZDS gebildeten Carotinoiden.

Da die Produkte der ZDS Prolycopin und 7,9-dicis-Neurosporin sind, entstehen alle anderen nachgewiesenen Lycopin- und Neurosporin-Isomere folglich aus der Isomerisierung von Prolycopin und dem 7,9-dicis-Neurosporin (N1). Eine Isomerisierung von Prolycopin und dem Neurosporin N1 erfolgte bei den *in vitro*-Aktivitätstests mit längeren Inkubationszeiten (>2 h) und bei der funktionellen Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* mit der ZDS aus *Capsicum*. Bei kurzen Inkubationszeiten der *in vitro*-Aktivitätstests der ZDS fanden sich im wesentlichen Prolycopin (L1) und 7,9-dicis-Neurosporin (N1) (Abbildung 3-18, A2, S. 74). Bei der funktionellen Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli*, die längere Kulturzeiten von 2 Tagen erfordert, war die Menge des Prolycopin und des 7,9-dicis-Neurosporins (N1) erniedrigt und die aller anderen Lycopin- und Neurosporin-Isomere dagegen erhöht (Abbildung 3-10, S. 58). Die Bildung von Prolycopin (L1) und 7,9-cis-Neurosporin (N1) durch Isomerisierung anderer Isomere ist ausgeschlossen, da die Doppelbindung in Position 7 sterisch ungünstig ist (Goodwin, 1980). Für die Bildung der Lycopinisomere aus Prolycopin (L1) und der Neurosporinisomere aus 7,9-dicis-Neurosporin (N1) (7,9-dicis) spricht, daß durch Photo-Isomerisierung dieser Carotine mit Iod nahezu alle anderen Neurosporin- und Lycopin-Isomere gebildet werden konnten (Abbildung 3-13). Auch

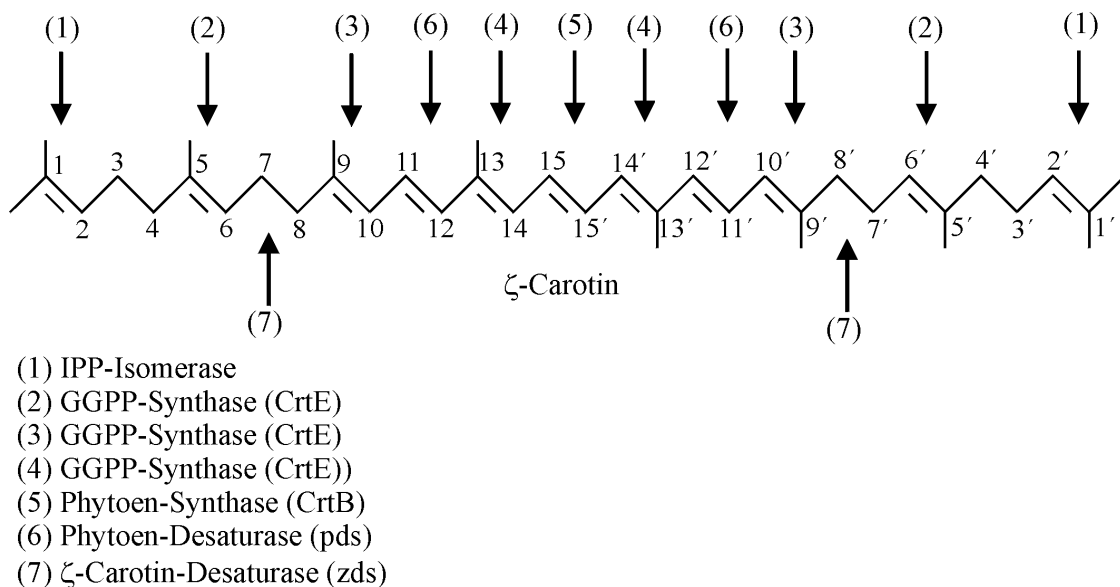
das 7-cis-Lycopin konnte durch Isomerisierung von Prolycopin gebildet werden. Die Bildung von 7 cis-Lycopin durch Isomerisierung von Prolycopin steht im Übereinstimmung mit Goodwin (1980). Bei Bildung von 7-cis-Lycopin durch Isomerisierung von Prolycopin wird keine neue 7-cis-Doppelbindung gebildet, es werden lediglich die vorhandenen 9-, 9'- und eine 7'-cis-Doppelbindung des Prolycopins von cis nach trans isomerisiert unter Beibehaltung einer 7-cis-Doppelbindung.

Bei den *in vitro*-Aktivitätsuntersuchungen die über C<sub>18</sub>-HPLC ausgewertet wurden, diente eine mit all trans-Neurosporin angereicherte Carotinoidfraktion in einem *in vitro*-Aktivitätstest als Substrat (Abbildung 3-9 D, S. 55). Dabei konnte die Bildung von Lycopin aus den Neurosporin-Isomeren gemessen werden. Da all trans- $\zeta$ -Carotin und all trans-Neurosporin nicht umgesetzt werden, ist das Lycopin aus den cis-Isomeren (> 20 % cis-Neurosporin) entstanden. Prolycopin war dabei nicht nachweisbar. Bei der langen Inkubationszeit von 16 Stunden wurde vermutlich das Prolycopin, daß aus dem cis-Neurosporin gebildet wurde zu all trans-Lycopin isomerisiert.

#### 4.8. Herkunft der 9,9'-cis-Doppelbindung des $\zeta$ -Carotins

Da für das Substrat der ZDS die Doppelbindungen in Position 9 und 9' in cis-Konfiguration vorliegen müssen, stellte sich die Frage nach der Herkunft der 9-, 9'-cis-Doppelbindungen. Unter den  $\zeta$ -Carotin-Isomeren konnten durch Trennung über C<sub>30</sub>-HPLC 6 Isomere isoliert werden, neben dem all trans- $\zeta$ -Carotin und den anderen 4 Isomeren auch 9,9'-cis- $\zeta$ -Carotin. Unter Abbildung 4-5 ist die Herkunft der Doppelbindungen bei der Synthese von  $\zeta$ -Carotin dargestellt. Die Doppelbindungen, in Position C-5, C-5', C-9, C-9' und C-13, C-13' entstehen bei der Synthese von Geranylgeranylpyrophosphat durch die Wirkung der GGPP-Synthase ausgehend vom Dimethylallyl-Pyrophosphat durch die sukzessive Anfügung dreier Moleküle Isopentenylidiphosphat. Die Doppelbindung in Position 15 ist auf die Phytoensynthase, die in Position 11, 11' auf die Phytoendesaturase zurückzuführen. Demnach könnte die cis-Konfiguration der Doppelbindungen in der Position 9,9' bei der Bildung durch die GGPP-Synthase entstehen. Bisher wurden für die Synthese von Phytoen bei Komplementierung der GGPP-Synthase und der Phytoensynthase aus *Erwinia uredovora* in *E.coli* zwei Isomere beschrieben, all trans- und 15 cis-Phytoen (Neudert et al., 1998). Die Trennung eines Phytoenextraktes, das aus einer Komplementierung der GGPP-Synthase mit der Phytoensynthase aus *Erwinia uredovora* isoliert wurde, wurde über C<sub>30</sub>-HPLC in 4 verschiedene Isomere separiert, wobei nur eines davon das Spektrum von 15 cis-Phytoen

zeigte. Demzufolge ist es nicht auszuschließen, daß die cis-Doppelbindungen in Position C9 und C9' des Pro- $\zeta$ -Carotins enzymatisch gebildet werden. Die 9-cis-Doppelbindung könnte bereits bei einem der Phytoen-Isomere vorliegen und bei der Synthese von GGPP entstehen (B, Abbildung 4-6). Durch die Komplementierung der Carotinoidgene der Phytoensynthase (CrtB) und der 2-Schritt Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Chamovitz et al., 1992) mit verschiedenen GGPP-Synthasen (CrtE) sowohl aus Bakterien als auch höheren Pflanzen, wurden ebenfalls stets Pro- $\zeta$ -Carotin unter den gleichen 6  $\zeta$ -Carotin-Isomeren gefunden, d.h. die Bildung der 9-, 9'-cis-Doppelbindungen erfolgt unabhängig vom Herkunftsorganismus der GGPP-Synthase.



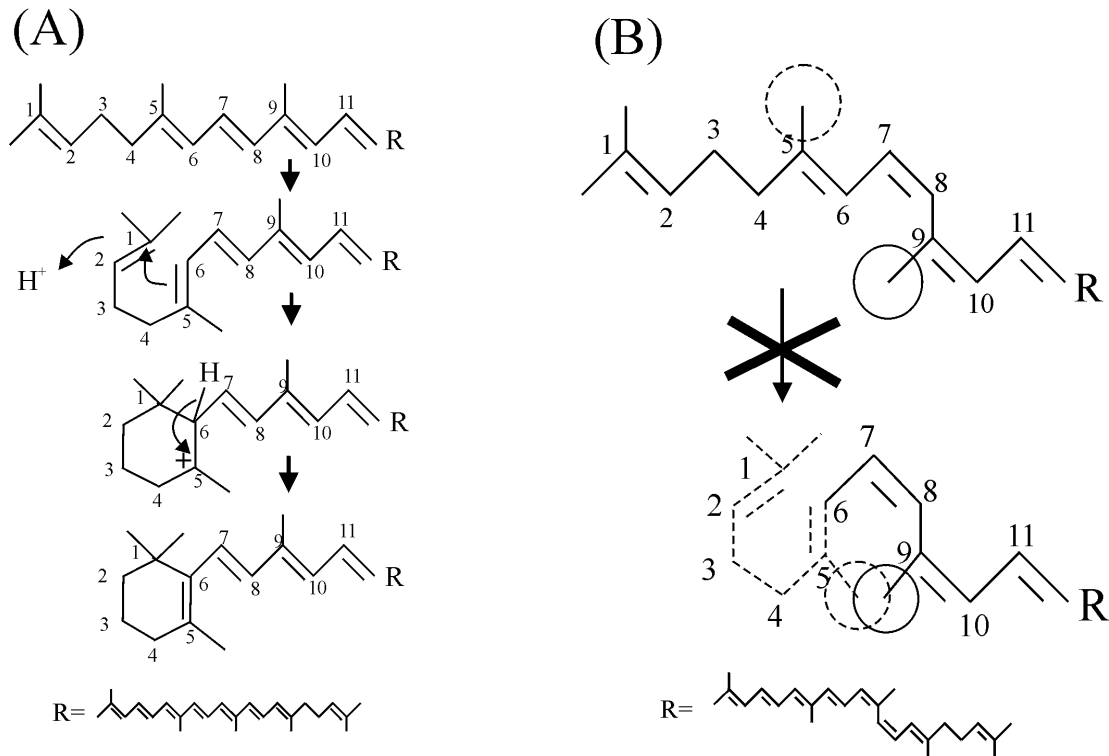
**Abbildung 4-5:** Entstehung der bei  $\zeta$ -Carotin zu findenden Doppelbindungen.

#### 4.9. Vergleich der Desaturierungsprodukte der *Capsicum*-ZDS mit denen der $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Synechocystis* und *Anabaena*, sowie mit denen der bakteriellen Phytoendesaturasen

In Cyanobakterien und Pflanzen wird die Reaktionssequenz von Phytoen zum Lycopin durch eine Phytoendesaturase und eine  $\zeta$ -Carotin-Desaturase katalysiert, die jeweils 2 Desaturierungsschritte durchführen. Phytoendesaturasen aus carotinoidbildenden Bakterien wie *Erwinia uredovora* oder *Rhodobacter capsulatus* führen dagegen alle 4 oder 3 Desaturierungsschritte ausgehend vom Phytoen durch. Die bakteriellen Phytoendesaturasen besitzen gegenüber den cyanobakteriellen, pflanzlichen  $\zeta$ -Carotindesaturasen bis auf einen N-terminalen Bereich (Dinukleotidbindestelle) keine Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz. Daher wird eine unterschiedliche phylogenetische Herkunft diskutiert (Sandmann, 1994).

Für eine gemeinsame phylogenetische Herkunft der pflanzlichen und cyanobakteriellen  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen spricht neben der Verwendung des gleichen Kofaktors auch die Art der Desaturierungsprodukte. Die Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum* als auch aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 bildeten bei funktioneller Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* Prolycopin (Abbildung 3-18, Tabelle 3.18). Für die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Arabidopsis thaliana* wurde ebenfalls die Bildung von Prolycopin beschrieben (Bartley et al., 1999). Die Carotinoide, die die bakteriellen Phytoendesaturasen bildeten, stellten dagegen im wesentlichen all trans-Lycopin und all trans-Neurosporin dar. Poly-cis-Carotinoide ließen sich nicht nachweisen. Die bakterielle Phytoendesaturase crtI aus *Erwinia uredovora* bildete aus Phytoen eine Reihe verschiedener Lycopinisomere u.a. 13-cis-, 9-cis-Lycopin mit all trans-Lycopin als Hauptcarotinoid. Die bakterielle Phytoendesaturase aus *Rhodobacter capsulatus* bildete als Hauptendprodukt all trans-Neurosporin und geringe Mengen all trans-Lycopin und 5 cis- oder 5,5'-dicis-Lycopin. Die cyanobakterielle ZDS aus *Anabaena*, die eine Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz zu den bakteriellen Phytoendesaturasen besitzt (crtI-Typ), bildete wie die bakteriellen Phytoendesaturasen kein Prolycopin. Unter den Produkten der *Anabaena*-ZDS fand sich all trans-Lycopin als Hauptprodukt.

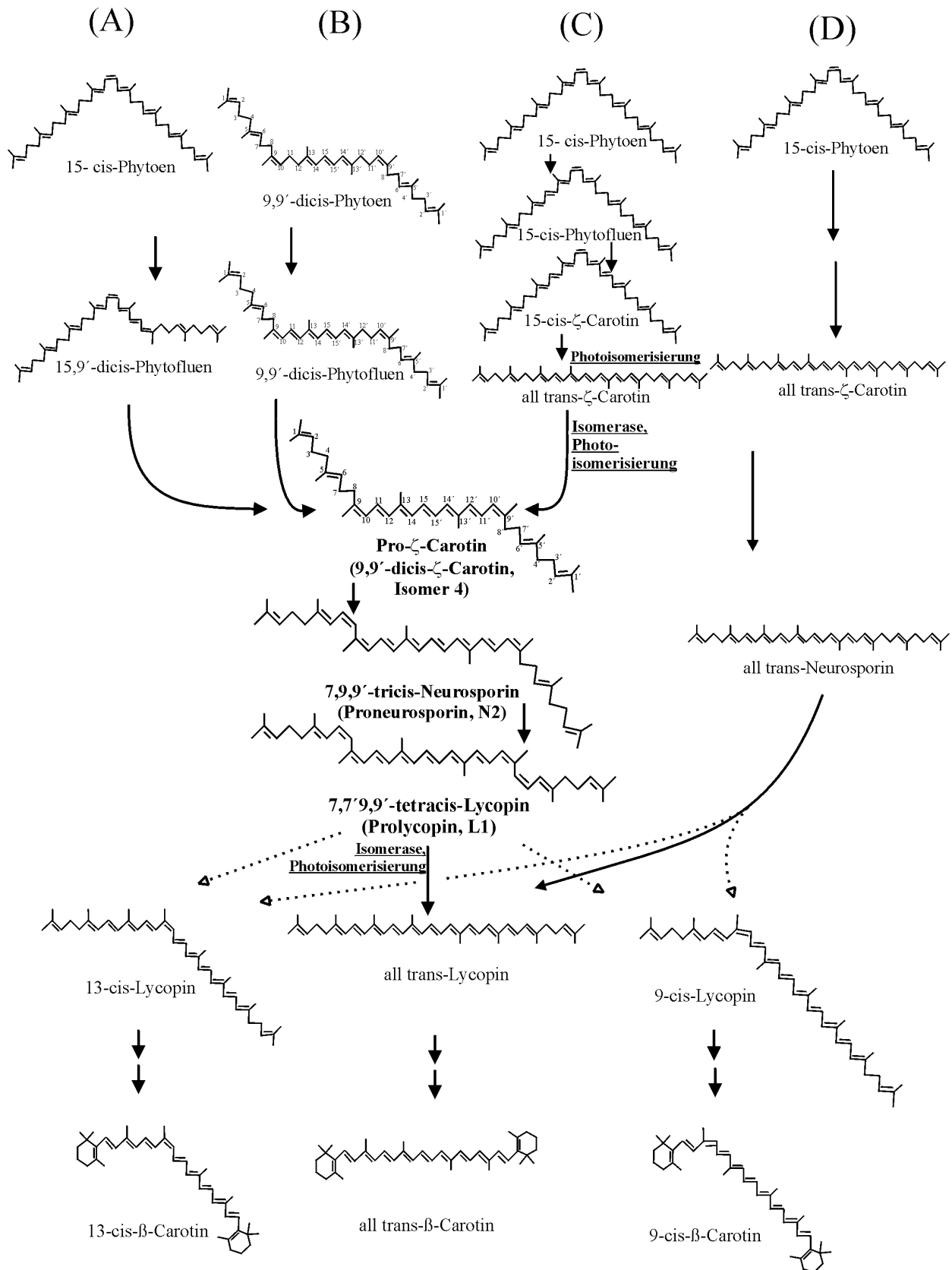
Die Bedeutung der Bildung von Prolycopin zeigte sich bei funktioneller Komplementierung der  $\beta$ -Carotin-Synthese in *E. coli* mit den  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen aus *Capsicum*, *Synechocystis* (beide pds-Typ) und *Anabaena* (crtI-Typ). Dabei wurde deutlich, daß das durch die *Capsicum*- und *Synechocystis*-ZDS gebildete Prolycopin nicht zu  $\beta$ -Carotin zyklisiert werden konnte. Es fanden sich nur geringe Mengen an all trans- $\beta$ -Carotin, dafür akkumulierte Prolycopin (L1) (Abbildung 3-21, Tabelle 3.21). Für die Zyklisierung von Lycopin zu  $\beta$ -Carotin ist eine Verknüpfung der C-Atome 1 und 6 miteinander erforderlich. Bei Prolycopin ist dies aus sterischen Gründen nicht möglich. Die Methylseitengruppen der C-Atome 5 und 9 verhindern aufgrund der 7-cis- und 9-cis-Konfiguration die Bildung der zur Zyklisierung notwendigen Konformation (B, Abbildung 4-7). Aus diesem Grund kam es bei diesen Komplementierungen zur Akkumulation von Prolycopin und von dem Neurosporin N1, dessen Molekülhälfte Prolycopin entspricht. Für eine Bildung von  $\beta$ -Carotin muß zunächst eine Isomerisierung von Prolycopin erfolgen.



**Abbildung 4-6:**  $\beta$ -Zyklisierung von Lycopin.

(A)  $\beta$ -Zyklisierung von **all trans-Lycopin** zu  $\gamma$ -Carotin. (B) Das Molekülende von **Prolycopin** kann aufgrund seiner Konfiguration nicht zyklisiert werden.

Bei funktioneller Komplementierung der  $\beta$ -Carotin-Synthese mit der ZDS aus *Anabaena* wurden  $\beta$ -Carotin-Isomere in einer Menge und Verteilung gebildet, wie sie in den **Zellen von *Synechocystis*** vorkommen. Folglich muß in *Capsicum* oder den Cyanobakterien wie *Synechocystis* mit einer  $\zeta$ -Carotin-Desaturase des pds-Typs, ein Mechanismus oder eine Isomerase vorhanden sein, der Prolycopin vor der Zyklisierung zu  $\beta$ -Carotin zu anderen Lycopinisomeren isomerisiert, die dann von der Lycopinzyklase umgesetzt werden können. Die Existenz von Mutanten wie *Tangella* oder *Scenedesmus obliquus* C-6D, die Prolycopin und andere poly-cis-Carotinoide akkumulieren, unterstützen diese Vermutung. Der Vergleich der Carotinoidverteilung und Zusammensetzung der bei Komplementierung der *Capsicum*-ZDS in *E. coli* gefundenen Carotinoide mit denen eines Extraktes aus der Grünalgenmutante *Scenedesmus obliquus* C-6D zeigte, daß die Mehrzahl der bei Komplementierung in *E. coli* gebildeten Carotinoidisomere inklusive Prolycopin und dem Neurosporin N1 auch im Extrakt der Grünalgenmutante vorhanden waren. Im Falle der Tomatenvarietät *Tangella* oder der Grünalgenmutante C-6D müßte dieser entsprechende Mechanismus der Isomerisierung fehlen oder gestört sein, weshalb es zur Akkumulation von poly-cis-Carotinoiden kommt. Die Grünalgenmutante *Scenedesmus obliquus* C-6D bildet die poly-cis-Carotinoide wie Prolycopin nur im Dunkeln (Ernst & Sandmann, 1988). Bei Wachstum im Licht akkumulieren keine poly-cis-Verbindungen, d.h. es erfolgt eine Photo-Isomerisierung von Prolycopin mit Chlorophyll als Photosensitizer.



**Abbildung 4-7:** Syntheseweg von 13-cis-, 9-cis und all trans- $\beta$ -Carotin. (A) Bildung von 9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin in der Tomaten-Mutante Tangella ohne Photoisomerisierung oder die Katalyse einer Isomerase (Clough & Pattenden, 1979; Goodwin, 1983); (B) Hypothetische Bildung von 9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin aus 9,9'-di-cis-Phytoen. Die 9,9'-cis-Doppelbindungen sind von der GGPP-Synthase gebildet worden; (C) Synthese von 9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin in Chromoplasten aus *Narcissus pseudonarcissus* (Beyer et al., 1994); (D) Bakterielle Carotinoidsynthese. Die Isomerisierung von 15-cis-Phytoen erfolgt während der Desaturierung. Eine Isomerase ist nicht beteiligt.

Die Carotinoid-bildenden Bakterien dagegen, die über eine Phytoendesaturase des crtI-Typs verfügen, benötigen eine solche Isomerase oder einen entsprechenden Mechanismus nicht, da es nicht zur Bildung von Prolycopin kommt.

Die Abbildung 4-7 stellt mehrere Möglichkeiten der Synthese von  $\beta$ -Carotin zusammen. Nach Analyse der Carotinoidzusammensetzung eines Carotinoidextraktes aus der Tomatenmutante Tangella, durch Clough & Pattenden (1979, 1983) erfolgt die Desaturierung von 15-cis-Phytoen unter Bildung der 11-, 11-trans-Doppelbindungen unter gleichzeitiger Isomerisierung der 9- und 9'-trans-Doppelbindungen zur cis-Konfiguration (A). Nachdem 4 verschiedene Phytoen-Isomere in der Komplementierung der GGPP-Synthase und Phytoensynthase über  $C_{30}$ -HPLC im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden, besteht die Möglichkeit, daß die 9-, 9'-cis-Doppelbindungen bereits bei dem Phytoen bestehen (B). Bei Desaturierung von 9,9'-dicis-Phytoen kommt es dann zur Bildung von 9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin. Von Beyer et al. (1994) wurde die Bildung von Pro- $\zeta$ -Carotin aus 15-cis-Phytoen für *Narcissus* postuliert (C). Dabei entsteht aus 15-cis-Phytoen zunächst 15-cis-Phytofluon und dann 15-cis- $\zeta$ -Carotin. Aus dem photolabilen 15-cis- $\zeta$ -Carotin entsteht durch Photoisomerisierung oder der Wirkung einer Isomerase, 9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin. Es ist nicht klar ob alle 3 Möglichkeiten in Pflanzen zutreffen, aber die  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum*, *Arabidopsis* (Bartley et al., 1999) und aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* benötigen 9,9'-dicis- $\zeta$ -Carotin, um unter Bildung von Prolycopin, beide Desaturierungen durchführen zu können. Die Bildung von Prolycopin erfordert jedoch einen weiteren Mechanismus, der Prolycopin isomerisiert, so daß die Zyklisierung zu  $\beta$ -Carotin möglich wird. Das Produkt der bakteriellen Phytoendesaturasen sind all trans-Carotinoide. So bildet die Phytoendesaturase aus *Erwinia uredovora* im wesentlichen all trans-Lycopin (Misawa et al., 1990), die Phytoendesaturase aus *Rhodobacter capsulatus* all trans-Neurosporin (Raisig et al., 1996). Sie bilden kein Prolycopin, so daß eine Isomerase nicht notwendig ist, um die Zyklisierung von Lycopin zu  $\beta$ -Carotin zu ermöglichen. Die Isomerisierung von 15-cis-Phytoen erfolgt bei den bakteriellen Phytoendesaturasen während der Desaturierung (D).

## 5. Mutagenese der *Capsicum*-ZDS

### 5.1. Auswirkung der Mutagenese auf die Aktivität der ZDS

Über die für die Aktivität der  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen wichtigen Bereiche der Aminosäuresequenz oder der Proteinstruktur liegen bisher keine Daten vor. Es ist lediglich eine in der Aminosäuresequenz N-terminal liegende potentielle Dinukleotidbindestelle

bekannt (Albrecht et al., 1995a). Das Ziel der Mutagenese der *Capsicum*-ZDS war es, durch zufällige Veränderung einzelner Aminosäuren und nachfolgender Analyse der Desaturierungsprodukte die Aminosäuren oder Bereiche der Aminosäuresequenz zu identifizieren, die für die Aktivität der ZDS von Bedeutung sind.

Die cDNA-Sequenz, die für die *Capsicum*-ZDS codiert, wurde einer auf PCR basierenden Zufallsmutagenese unterzogen und zur funktionellen Komplementierung der Lycopinsynthese in *E. coli* verwendet. 2 Klone mit funktionell veränderter ZDS wurden selektiert. Die cDNA-Sequenz dieser Klone wurde sequenziert. Die zugehörigen veränderten Aminosäuren wurden identifiziert, über gerichtete Mutagenese die einzelnen Mutationen in die DNA-Sequenz der ZDS gesetzt und die Wirkung der Einzelmutationen auf die ZDS-Aktivität untersucht.

Die funktionellen Komplementierung JM101/pACCRT-EBP + pUC8zds ergab einen deutlichen Zuwachs in den Gehalten der Desaturierungsprodukte von 84,28 ng/mg (ng Carotinoid pro mg gefriergetrocknete *E. coli*-Zellen) in dem Klon 25, gegenüber 47,69 ng/mg der Wildtyp-ZDS. Die ZDS des Klons 89 dagegen enthielt mit 0,94 ng/mg wesentlich weniger Carotinoidprodukte gegenüber der Komplementierung mit dem Wildtyp. Der Austausch von fünf Aminosäuren (205 Asn -> Ser, 361 Val -> Asp, 406 Asp -> Tyr, 536 Ile -> Leu, 576 Ser -> Pro) führten zu der Erhöhung der Aktivität bei dem Klon 25. Die ZDS aus dem Klon 89 mit drei ausgetauschten Aminosäuren (318 Leu -> Val, 361 Val -> Asp, 571 Glu -> Ala) war gegenüber der Wildtyp-ZDS dagegen weniger aktiv.

Die gemessene *in vitro*-Aktivität der ZDS aus dem Klon 25 war mit 0,0089  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  am größten gegenüber den Aktivitäten der Wildtyp-ZDS mit 0,0059  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  und der ZDS aus dem Klon 89 mit 0,0047  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ . Die Aktivitätsunterschiede waren geringer als die verschiedenen Carotinoidgehalte der Klone 25 und 89. Da für die *in vitro*-Aktivitätstest der ZDS der Zellüberstand von JM101/pUC8zds verwendet wurde, hätte eine unterschiedlich starke Expression der ZDS der Klone 25 und 89 für die unterschiedlichen gemessenen enzymatischen Aktivitäten oder Carotinoidgehalte der Klone 25 und 89 verantwortlich sein können. In den Zellüberständen von JM101/pUC8zds (ZDS der Klone 25, 89 und die Wildtyp-ZDS) betrug der relative Anteil der ZDS am Gesamtprotein von etwa 2,5 %. Es wäre möglich gewesen, daß die durch die Mutagenese neu entstandenen Codons zu seltenen in *E. coli* auftretenden Codons gehören und dadurch zu einer unterschiedlich starken Expression führen könnten. Die nach der Mutagenese neu gebildeten Codons waren jedoch keine seltenen in *E. coli* verwendeten Codons wie AGG oder AGA (Janke & Becker, 2000).



## 5.2. Akkumulation des Intermediats Proneurosporin bei der Desaturierung von $\zeta$ -Carotin durch die mutierte ZDS aus *Capsicum annuum*

Die Einzel-Mutationen der ZDS des Klons 25 führten zu höheren und zu niedrigeren spezifischen Aktivitäten gegenüber der Wildtyp-ZDS. Der Austausch der Aminosäure 205 Asparagin gegen Serin oder der Austausch der Aminosäure 576 Serin gegen Prolin führten zu einer geringeren Aktivität gegenüber der Wildtyp-ZDS. Der Austausch der Aminosäure 406 Asparaginsäure gegen Tyrosin oder 536 Isoleucin gegen Leucin dagegen ergaben eine höhere Aktivität gegenüber der Kontrolle. Die Einzelmutationen des Klons 89 ergaben für den Austausch der Aminosäure 318 Leucin gegen Valin eine geringere und für den Austausch der Aminosäure 571 Glutaminsäure gegen Alanin eine etwa gleich hohe Aktivität wie die Kontrolle.

Die höhere Aktivität der ZDS aus dem Klon 25 läßt sich damit nur über das Zusammenwirken aller 5 Mutationen erklären, da sowohl für die Aktivität förderliche als auch nicht förderliche Mutationen vorhanden waren. Die geringe Aktivität der ZDS aus dem Klon 89 dagegen scheint eine Folge des Austauschs der Aminosäure 318 Leucin gegen Valin zu sein.

Der alleinige Austausch der Aminosäure 205 Asn gegen Ser (Klon 614) und auch die zusätzliche Entfernung der Aminosäuren 199 Tyr und 200 Asp (Klon 614-2), führten zu einer deutlich geringeren ZDS-Aktivität von 0,33  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  und 0,71  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mg})$  was 8,1 % und 17,7 % der Aktivität der Wildtyp-ZDS entspricht. Erstmals kam es zu einer Akkumulation von Proneurosporin (N2), dem Intermediat der Prolycopinbildung. Die enzymatische Aktivität der ZDS verringerte sich ebenfalls durch Austausch der Aminosäure 321 Leu->Val auf 20,1 % der enzymatischen Aktivität der Wildtyp-ZDS. Ebenfalls konnte die Akkumulation von Proneurosporin (N2) gemessen werden (14,5 % Anteil an den Produkten). Durch den kombinierten Austausch der Aminosäure 208 Alanin gegen Prolin und der Aminosäure 205 Asparagin gegen Serin (ZDS des Klons 622), erhöhte sich dagegen die enzymatische Aktivität der ZDS von 8,1 % auf 41,6 % der Aktivität der Wildtyp-ZDS. Proneurosporin (N2) und 7,9-dicis-Neurosporin (N1) dominierten unter den Produkten mit einem Anteil von 46 % und von 16 %. Der Gesamtanteil aller Neurosporinisomere betrug 93 %. Dagegen trat Prolycopin nur zu 7 % auf. Andere Lycopinisomere waren nicht nachweisbar. Bei der Wildtyp-ZDS dagegen betrug der Anteil aller Lycopinisomere unter den Produkten 46,7 %. Die mutierte ZDS (Klon 622) führt im wesentlichen nur noch eine Desaturierung durch, von  $\zeta$ -Carotin zu Neurosporin. Die zweite Desaturierung von Neurosporin zu Lycopin wird nur zu einem geringen Teil durchgeführt.

Es stellt sich die Frage, wie als Folge des Austauschs zweier Aminosäuren bei der ZDS, im wesentlichen nur noch eine Desaturierung des symmetrischen Substratmoleküls Pro- $\zeta$ -Carotin von der ZDS durchgeführt wird. Die Akkumulation des Intermediats Proneurosporin (N2) bei der Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin durch die mutierte ZDS, ließe sich unter der Annahme erklären, daß die ZDS im aktiven Zentrum über zwei Bereiche verfügt, an denen jeweils eine Desaturierung des symmetrischen Pro- $\zeta$ -Carotinmoleküls erfolgt. Die Wildtyp-ZDS führt bei Bindung eines  $\zeta$ -Carotinmoleküls beide Desaturierungen sehr effizient unter Bildung des Endprodukts Prolycopin durch. Bis zur Durchführung der zweiten Desaturierung bleibt das Intermediat Proneurosporin vermutlich an das aktive Zentrum gebunden und wird nicht freigesetzt. Bei der mutierten ZDS wäre in Folge des Austausch der Aminosäuren 205 und 208 eine beider Desaturierungsstellen im aktiven Zentrum gestört und inaktiv. Bei Bindung eines  $\zeta$ -Carotin-Moleküls käme es wie bei der Wildtyp-ZDS zur Desaturierungsreaktion. Aufgrund von nur einem funktionsfähigen Bereich im aktiven Zentrum würde jedoch nur eine Desaturierung durchgeführt und das gebildete Intermediat Proneurosporin (N2) würde freigesetzt. Zur Durchführung der zweiten Desaturierung müsste das freigesetzte Proneurosporin erneut in der richtigen Orientierung mit der zu desaturierenden Seite des Moleküls an den funktionsfähigen Bereich im aktiven Zentrum gebunden werden. Da Proneurosporin nur eine zu desaturierende Stelle am C-Atom 9 im Molekül, Pro- $\zeta$ -Carotin dagegen zwei in den Positionen C-9 und C-9' besitzt, ist die Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin wahrscheinlicher und es käme so zur der beobachteten Akkumulation von Proneurosporin (N2).

Eine ähnliches Ergebnis erzielten Cunningham & Gantt (2000) durch den Austausch einer Aminosäure in der  $\epsilon$ -Zyklase aus *Arabidopsis thaliana*. Diese  $\epsilon$ -Zyklase katalysiert die Zyklisierung von einem Ende des symmetrischen Lycopinmoleküls unter Bildung von  $\delta$ -Carotin. Die Zyklisierung des anderen Endes des Lycopinmoleküls wird dagegen nicht durchgeführt. In Folge des Austausch einer Aminosäure über eine durchgeführte *in vitro*-Mutagenese, war diese  $\epsilon$ -Zyklase in der Lage, die Zyklisierung beider Enden des Lycopinmoleküls unter Bildung von  $\epsilon$ -Carotin zu katalysieren. Die Autoren vermuten, daß in Folge der Mutation die Dimerisierung des Enzyms ermöglicht wird. Je eine der Untereinheiten des Dimers soll dann jeweils eine Zyklisierung durchführen.

Die Frage ist daher, ob die ZDS alternativ zum zuvor genannten Modell, zur Durchführung beider Desaturierungen als Dimer vorliegen muß. In Folge des Austausch der zwei Aminosäuren 205 und 208 wäre die Durchführung der zweiten Desaturierungsreaktionen

möglicherweise aufgrund einer gestörten Dimerisierung nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die ZDS über die Gelfiltration, die native Gelelektrophorese und dem Two-Hybrid-System die Dimerisierung nachgewiesen. Über *in vitro*-Aktivitätstests konnte jedoch für die ZDS, sowohl als monomere und auch als dimere Form, die gleiche spezifische Aktivität gemessen werden. Es wurden ebenfalls die gleichen Verhältnisse unter den Desaturierungsprodukten gemessen, d.h. sowohl als Monomer und auch als Dimer führt die ZDS beide Desaturierungen gleich gut durch. Ebenso konnte in den *in vitro*-Enzymreaktionen mit der gereinigten ZDS, die zu gleichen Anteilen als Dimer und als Monomer vorliegt, nie die Akkumulation von Proneurosporin gemessen werden. Demzufolge ist die Dimerisierung der ZDS nicht die Voraussetzung zur Durchführung beider Desaturierungsreaktionen. Daher besteht die Möglichkeit, daß die monomere ZDS über zwei Bereiche im aktiven Zentrum verfügen, an denen jeweils eine Desaturierung durchgeführt wird.

Alle Veränderungen der Aminosäuresequenz nach der Aminosäure 318, zeigten keine so deutliche Auswirkung auf die Zusammensetzung der Carotinoidprodukte. Keine dieser Mutationen führten zur Akkumulation von Proneurosporin (N2). Ebenfalls wurde das Verhältnis von Neurosporin-Isomere zu Lycopin-Isomere kaum verändert.

Die Veränderung der Aminosäuresequenz durch Austausch der Aminosäuren 536 Isoleucin gegen Leucin (Klon 1606) zeigte keine deutliche Veränderung der Enzymaktivität, möglicherweise aufgrund ähnlicher Seitengruppen beider Aminosäuren. Ebenso wurde die spezifische Aktivität durch den Austausch der Aminosäure 571 Glutaminsäure gegen Alanin (Klon 1712) kaum verändert. Dagegen wurde die spezifische Aktivität der ZDS durch den Austausch der Aminosäure 406 Asparaginsäure gegen Tyrosin deutlich erhöht, auf 144 % der enzymatischen Aktivität der Wildtyp-ZDS. Bei der Mutation 1725 kam es aufgrund einer Rasterschubmutation zum Austausch von 3 Aminosäuren gegen Ende der Aminosäuresequenz mit einem Stopcodon nach der Aminosäure 578. Die spezifische Aktivität änderte sich kaum, vermutlich aufgrund des bereits nach Aminosäure 588 erfolgenden Stopcodons bei der Wildtyp-ZDS.

Die auf PCR beruhende Methoden der Zufallsmutagenese, besitzen oft den Nachteil, daß Transitionen (AT->GC, GC ->AT) häufiger vorkommen als Transversionen (AT->TA, GC->CG, AT->CG, GC->AT) und Mutationen von AT -> GC und AT -> TA in höherer Anzahl auftreten wenn Manganionen oder das Basenanalogon dITP allein verwendet werden. Die für die *Capsicum*-ZDS verwendete Methode der Zufallsmutagenese mittels PCR beruht auf der Erhöhung der Bindung falsch paarender dNTPs durch die Zugabe von Manganionen zur PCR-Reaktion unter Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase. In einer zweiten PCR-Reaktion wird

durch Zugabe des Basenanalogs dITP (2'-Desoxy-Inosin-5'-Triphosphat) die Rate der falsch paarenden Basen erhöht (Ohnuma et al., 1999; Goodman et al., 1983). Gegenüber anderen auf PCR basierenden Mutagenese-Methoden, die auf Zugabe von Manganionen allein (Leung et al., 1989) oder auf Zugabe von Manganionen in Kombination mit ungleichen Mengenverhältnissen der Nucleotide der PCR-Reaktion beruhen (Vartanian et al., 1996), kommt es bei der Methode nach Ohnuma et al. (1999) zu häufigeren GC->CG Transversionen.

Beim Einfügen von Mutationen unter Verwendung der Zufallsmutagenese ist die Anzahl der eingefügten Mutationen zu optimieren. Werden zu viele Mutationen gesetzt, sind viele der Klone inaktiv. Bei zu wenigen Mutationen werden keine Klone mit veränderten Eigenschaften gefunden. Die Anzahl der veränderten Basen sollte pro Gen zwischen 1,5 und 5 liegen (Harayama, 1998).

Die Mutagenese eines Carotinoidgens zur Identifizierung der für die Aktivität wichtigen Aminosäuren wurde bereits von Ohnuma et al. (1996) für die Untersuchung einer FPP-Synthase aus *Bacillus stearothomophilus* erfolgreich eingesetzt. Das Gen der FPP-Synthase wurde einer chemischen Mutagenese unterzogen und zur Selektion mutierter FPP-Synthase über funktionellen Komplementierung der Lycopinsynthese, in einen *E. coli*-Stamm zusammen mit einem Phytoensynthase-Gen und dem Gen einer bakteriellen Phytoendesaturase transformiert. Es wurden dabei Klone identifiziert, die anstelle von FPP in der Lage waren GGPP zu bilden. Durch die Analyse der veränderten Aminosäuresequenz konnten die für die GGPP-Bildung verantwortliche Aminosäure identifiziert werden.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

- **Reinigung der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Capsicum annuum***

Erstmals konnte eine  $\zeta$ -Carotin-Desaturase einer höheren Pflanze nach heterologer Expression in *E. coli* in nativer Form gereinigt und enzymatisch charakterisiert werden. Dazu wurde die cDNA der *Capsicum*-ZDS in einen Expressionsvektor kloniert, der die ZDS als rekombinantes Polypeptid mit 6 N-terminalen Histidinen exprimierte. Dadurch konnte das Enzym in nur zwei Schritten über eine Kombination von Ammoniumsulfatfällung und Metallionen-Affinitätschromatographie selektiv aus *E. coli* separiert werden. Die ZDS wurde ohne eine mutmaßliche Transitsequenz als ein Polypeptid von 59 kDa exprimiert. Das pH-Optimum der ZDS-Aktivität liegt bei 7,2 in der Nähe der rechnerisch ermittelten pI-Wertes von 7,4.

- **Die ZDS aus *Capsicum annuum* ist als Monomer aktiv**

Die ZDS führt zwei Desaturierungsschritte ausgehend von  $\zeta$ -Carotin zu Lycopin als ein monomeres Protein durch. Unter Verwendung des Two-Hybrid-Systems, einer Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen und einer Gelfiltration der nativen ZDS, konnte gezeigt werden, daß die ZDS als Monomer und als Dimer vorliegen kann. Die Dimerisierung der ZDS ist jedoch für deren enzymatischer Aktivität und für die Durchführung beider Desaturierungsschritte nicht notwendig.

- **Kinetische Untersuchungen und Kofaktor, Vergleich mit anderen Desaturasen**

Für die Substratcarotinoide  $\zeta$ -Carotin und Neurosporin, wurden die  $K_m$ -Werte von 8,4  $\mu\text{M}$  und 9,0  $\mu\text{M}$  bestimmt. Die *Capsicum*-ZDS zeigt von ihrer Aminosäuresequenz her eine große Ähnlichkeit zu den cyanobakteriellen  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen und eine geringere Ähnlichkeit zu den pflanzlichen Phytoendesaturasen. Eine diskutierte phylogenetische Verwandtschaft der  $\zeta$ -Carotin- und Phytoendesaturase aus höheren Pflanzen und Cyanobakterien wird durch die Verwendung des gleichen Kofaktors Plastochinon und durch die gemeinsame Hemmbarkeit mit den  $\zeta$ -Carotin-Desaturase-Hemmstoffen J852 und LS80707 unterstützt. Eine Kofaktoruntersuchung ergab, daß Plastochinon sowohl der Kofaktor der ZDS aus *Capsicum*, als auch der Phytoendesaturasen aus *Gentiana lutea* (gelber Entian), aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942, sowie der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist. Der  $K_m$ -Wert von Decyl-Plastochinon wurde für die *Capsicum*-ZDS zu 0,4  $\mu\text{M}$  bestimmt. Der Kofaktor der  $\zeta$ -Carotin-Desaturase Plastochinon, sowie die Entdeckung einer plastidären terminalen Oxidase (Carol et al., 1999) ermöglicht die Entwicklung eines Modells der Übertragung der bei der Desaturierung von  $\zeta$ -Carotin gewonnenen Elektronen über Plastochinon auf Sauerstoff, wie

es bereits für die pflanzliche Phytoendesaturase postuliert wurde (Carol & Kuntz, 2001). Hemmkinetische Untersuchungen für die *Capsicum*-ZDS ergaben, die  $I_{50}$ -Werte von 45,7  $\mu\text{M}$  für J852, 14,1  $\mu\text{M}$  für LS80707 und 144  $\mu\text{M}$  für Norflurazon, wobei für J852 die kompetitive Hemmung über die Wechselwirkung mit der Kofaktorbindestelle nachgewiesen werden konnte. Die Hemmstoffe J852 und LS80707 hemmen auch die Phytoendesaturase aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 mit  $I_{50}$ -Werten vergleichbarer Größe von 22,7  $\mu\text{M}$  für J852 und 33,6  $\mu\text{M}$  für LS80707. Für die Phytoendesaturasen aus der höheren Pflanze *Gentiana* und aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* konnte die kompetitive Hemmung durch Norflurazon über die Kofaktorbindestelle nachgewiesen werden.

- **Substratspezifität der *Capsicum*-Zds**

Untersuchungen zur Substratspezifität der *Capsicum*-ZDS ergaben, daß die Erkennungssequenz einen Bereich von C-Atom 11 bis 3', bzw. 3 bis 11' und das konjugierte Doppelbindungssystem von C11 bis C9' reichen muß. Weiterhin benötigt die *Capsicum*-ZDS bei dem Substrat  $\zeta$ -Carotin die C9 und C9' Doppelbindung in cis-Konfiguration. Die 7, 7' Doppelbindungen werden in cis-Konfiguration unter Bildung von Prolycopin eingefügt. Diese Bildung von Prolycopin konnte auch für die cyanobakterielle  $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 nachgewiesen werden. Damit unterscheiden sich die  $\zeta$ -Carotin-Desaturasen von den bakteriellen Phytoendesaturasen, für die keine Bildung von 7,7',9,9'-tetra-cis-Lycopin (Prolycopin) nachgewiesen werden konnte.

- **Isomerisierung von Prolycopin ist eine Voraussetzung zur Bildung von  $\beta$ -Carotin**

Für die Zyklisierung von Prolycopin zu  $\beta$ -Carotin ist die Isomerisierung zu all trans-Lycopin erforderlich, was durch eine noch unbekannte Isomerase oder einen unbekanntes Mechanismus erfolgen muß. Die identifizierten  $\beta$ -Carotin-Isomere umfassten neben all trans- $\beta$ -Carotin, 9 cis- und 13, 9-cis- $\beta$ -Carotin.

- **Mutagenese der *Capsicum*-Zds**

Eine durchgeführte Mutagenese der *Capsicum*-ZDS zeigte, daß für die Aktivität der ZDS vor allem ein Bereich um Aminosäure 205 wichtig ist. Der Austausch der Aminosäuren 205 Asparagin gegen Serin und 208 Alanin gegen Prolin führte zur Bildung einer  $\zeta$ -Carotindesaturase, die gegenüber dem Wildtyp im wesentlichen nur noch einen Desaturierungsschritt durchführt. Das Hauptprodukt dieser ZDS ist das Intermediat Neurosporin. Die Bildung von Lycopin erfolgt nur noch zu 7 %. Dies spricht für die Existenz zweier Bereiche im aktiven Zentrum der ZDS, an denen jeweils einer der zwei Desaturierungsschritte von  $\zeta$ -Carotin zu Neurosporin und von Neurosporin zu Lycopin durchgeführt wird.

**VI. LITERATUR**

- Albrecht, M., Klein, A., Hugueney, H., Sandmann, G. & Kuntz, M. (1995a). Molecular cloning and functional expression in *E. coli* of a novel plant enzyme mediating  $\zeta$ -carotene desaturation. *FEBS Lett.* 372: 192-202.
- Albrecht, M., Linden, H. & Sandmann, G. (1995b). Biochemical characterization of a purified  $\zeta$ -carotene desaturase from *Anabaena* PCC 7120 after expression in *E. coli*. *Eur. J. Biochem.* 236: 115-120.
- Albrecht, M., Ruther A. & Sandmann, G. (1997). Purification and biochemical characterization of a hydroxyneurosporene desaturase involved in the biosynthesis pathway of the carotenoid spheroidene in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 179: 7462-7467.
- Albrecht, M., Takaichi, S., Steiger, S., Zheng-Yu Wang & Sandmann, G. (2000). Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* 18: 843-846.
- Al-Babili, S., von Lintig, J., Haubruck, H. & Beyer, P. (1996). A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp 70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *Plant J.* 9 (5): 601-612.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3): 403-410.
- Arakawa, T. & Timasheff, S. N. (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* 47 (3): 411-414.
- Bao-Lu Chen & Arakawa, T. (1995). Stabilization of recombinant human keratinocyte growth factor by osmolytes and salts. *J. of Pharmaceut. Sci.* 85(4): 419- 422.
- Barclay, L. R. C., Edwards, C. E. & Vinqvist, M. R. (1999). Media effects on antioxidant activities of phenols and catechols. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 6226-6231.
- Bartley, G. E., Schmidhauser, T. J., Yanofsky, C. & Scolnik, P. A. (1990). Carotenoid desaturases from *Rhodobacter capsulatus* and *Neurospora crassa* are structurally and functionally conserved and contain domains homologous to flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* 265: 16020-16024.
- Bartley, G. E., Scolnik, P. A. & Beyer, R (1999). Two *Arabidopsis thaliana* carotene desaturases, phytoene desaturase and  $\zeta$ -carotene desaturase, expressed in *Escherichia coli*, catalyse a poly-cis pathway to yield pro-lycopen. *Eur J. Biochem.* 259: 396-403.
- Bejarano, E. R., Govind, N. S. & Cerda-Olmedo, E. (1987).  $\zeta$ -Carotene and other carotenes in a *Phycomyces* mutant. *Phytochem.* 26: 2251-2254.
- Beyer, P., Mayer, M. & Kleinig, H. (1989). Molecular oxygen and the state of geometric isomerism of intermediates are essential in the carotene desaturation and cyclization reaction in *Daffodil* chromoplasts. *Eur. J. Biochem.* 184: 141-150.
- Beyer, P., Nievelstein, V., Al-Babili, S., Bonk, M. & Kleinig, H. (1994). Biochemical aspects of carotene desaturation and cyclization in chromoplast membranes from *Narcissus pseudonarcissus*. *Pure & Appl. Chem.* 66 (5): 1047-1056.
- Blackwell, J. R. & Horgan, R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* 295: 10-12.

- Böger, P. and Sandmann, G. (1998). Carotenoid biosynthesis inhibitor herbicides - mode of action and resistance mechanisms. *Pesticide Outlook*, 9 (6): 29-35.
- Bonk, M., Hoffmann, B., Von Lintig, J., Schledz, M., Al-Babili, S., Hobeika, E., Kleinig, H. & Beyer, P. (1997). Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes *in vitro* reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur. J. Biochem.* 247: 942-950.
- Breitenbach, J., Fernandez-Gonzales, B., Vioque, A. & Sandmann, G. (1998). A higher-plant type  $\zeta$ -carotene desaturase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Mol. Biol.* 6: 725-732.
- Breitenbach, J., Kuntz, M., Takaichi, S. and Sandmann, G. (1999). Catalytic properties of an expressed and purified higher plant type  $\zeta$ -carotene desaturase from *Capsicum annuum*, *Eur. J. Biochem.* 265: 376-383.
- Britton, G. (1995 a). In: Carotenoids. Spectroscopy, 1B, 61 (Britton, G., Liaaen-Jensen, S. Pfander, H. eds.) Birkhäuser Verlag.
- Britton, G. (1995 b). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9: 1551-1558.
- Camara, B. & Monéger, R. (1982). Biosynthetic capabilities and localization of enzymatic activities in carotenoid metabolism of *Capsicum annuum* isolated chromoplasts. *Physiol. Vég.* 20: 757-773.
- Camara, B., Bardat, F. & Monéger, R. (1982). Sites of biosynthesis of carotenoids in *Capsicum* chromoplasts. *Eur. J. Biochem.* 127: 255-258.
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G., & Kuntz, M. (1999). Mutations in the *Arabidopsis* gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *The Plant Cell*, 11: 57-68.
- Carol, P. & Kuntz, M. (2001). A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends in Plant Sci.* 6 (1): 31-35.
- Chamovitz, D. , Misawa, N., Sandmann, G. & Hirschberg, J. (1992). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene coding for phytoene synthase, a carotenoid biosynthesis enzyme. *FEBS Lett.* 296 (3): 305-310.
- Chamovitz, D., Pecker, I. & Hirschberg, J. (1991). The molecular basis of resistance to the herbicide norflurazon. *Plant Mol. Biol.* 16: 967-974.
- Chang, A. C. Y. & Cohens, N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15 cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134 (3): 1141-1156.
- Chen, B. L. & Arakawa, T. (1996). Stabilization of recombinant human keratinocyte growth factor by osmolytes and salts. *Am. Chem. Soc. Am. Pharm. Associat.* 85 (4): 419-422.
- Chollet, R., Sandmann, G., Diethelm, R., Felix, H., Milzner, K. & Böger, P. (1990).  $\zeta$ -carotene accumulation and bleaching by new pyrimidine compounds. *Pestic. Sci.* 30: 326-403.
- Clough, J. M. & Pattenden, G. (1979). Naturally occurring poly-cis carotenoids. Stereochemistry of poly-cis lycopene and its congeners in 'Tangerine' tomato fruits. *J. C. S. Chem. Comm.* 616-619.
- Clough, J. M. & Pattenden, G. (1983). Stereochemical assignment of prolycopene and other poly- $\zeta$ -isomeric carotenoids in fruits of the tangerine tomato *Lycopersicon esculentum* var. 'Tangella'. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 3011-3018.



- Conn, P. F., Schalch, W. & Truscott, T. G. (1991). The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 11: 41-47.
- Cunningham, F. X. Jr. & Gantt, E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557-583.
- Cunningham, F. X. & Gantt, E. (2000). One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene  $\epsilon$ -cyclases. *PNAS* 98 (5): 2905-2910.
- Dailey, T. A. & Dailey, H. A. (1998). Identification of an FAD superfamily containing protoporphyrinogen oxidases, monoamine oxidases, and phytoene desaturase. Expression and characterization of phytoene desaturase of *Myxococcus xanthus*. *J. Biol. Chem.* 273(22): 13658-13662.
- Davies, B. H. (1976). In *Chemistry Biochemistry of Plant Pigments*, 2, Goodwin, T. W. (ed.), Chapter 19, Academic Press, London.
- Deli, J., Molnár, P., Matus, Z. & Tóth, G. (2001). Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during ripening; Biosynthesis of carotenoids in red paprika. *J. Agric. Food Chemistry* 49: 1517-1523.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. & Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein, associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 7: 555-569.
- Edge, R., McGarvey, D. J. & Truscott, T. G. (1997). The carotenoids as anti-oxidants-a review. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 41: 189-200.
- Elmadfa, I. & Majchrzak, D. (1998). Carotinoide und Vitamin A in Fischproben. *Z. Ernährungswiss.* 37:207-210.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. & von Heijne, G. (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Prot. Sci.* 8, 978-984.
- Ernst, S. & Sandmann, G. (1988). Poly-cis carotene pathway in the *Scenedesmus* mutant C-6D. *Arch. Microbiol.* 150: 590-594.
- Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-247.
- Foote, C. S. & Denny, R. W. (1968): Chemistry of singlet oxygen. VIII. Quenching by  $\beta$ -carotene. *J. Am. Chem. Soc.* 90: 6233-6235.
- Fraser, P. D., de las Rivas, J., Mackenzie & Bramley, P. M. (1991). *Phycomyces blakesleeanus* carB mutants: Their use in assays of phytoene desaturase. *Phytochemistry* 30 (12): 3971-3976.
- Fraser, P. D., Misawa, N., Linden, H., Yamano, S., Kobayashi, K. & Sandmann, G. (1992). Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. *J. Biol. Chem.* 267 (28): 19891-19895.
- Fraser, P. D., Linden, H. & Sandmann, G. (1993). Purification and reactivation of recombinant *Synechococcus* phytoene desaturase from an overexpressing strain of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 291: 687-692.
- Garfin D. E. (1990). Purification procedures: Electrophoretic methods, in *Methods in Enzymology* 182. Guide to protein purification. Deutscher M.PL. (ed.), Academic Press, San Diego, pp. 425-440.

- Goodman, M. F., Keener, S. & Guidotti, S. (1983). On the enzymatic basis for mutagenesis by manganese. *J. Biol. Chem.* 258 (6): 3469-3475.
- Goodwin, T. W. (1980). *The Biochemistry of the Carotenoids. 1, Plants'* 2nd edn. Chapman & Hall, New York, USA.
- Goodwin, T. W. (1983). Development in carotenoid biochemistry over 40 years. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 473-483.
- Gueffroy, D. E. (Editor) (1990). *Buffers, a guide for the preparation and use of buffers in biological systems*, Calbiochem Corporation, 9th ed..
- Hammond, B.R., Johnson, E. J., Russell, R. M., Krinsky, K. J., Edwards, R. B. & Snodderly, D. M. (1997). Dietary modifications of human macular pigment density. *Investigative Ophthalmology & Visual Sci.* 38 (1795-1801).
- Harris, E. L. V. & Angal, S. (Editors) (1989). *Protein purification methods: a practical approach*. IRL Press, Oxford, England.
- Harayama, S. (1998). Artificial evolution by DNA shuffling. *TIBTECH* 16: 76-82.
- Hausmann, A. & Sandmann, G (2000). A single five-step desaturase is involved in the carotenoid biosynthesis pathway to  $\beta$ -carotene and torulene in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology* 30: 147-153.
- Havaux, M. (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* 3: 147-151.
- Henderson, D. E. & Slickman, A. M. (1999). Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of Capsicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: A comparative study against BHT and Melatonin. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2563-2570.
- Hengartner, U., Bernhard, K., Meyer, K., Englert, G. & Glinz, E. (1992). Synthesis, isolation, and NMR-spectroscopic characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene and some acetylenic dihydro- and tetrahydrolycopenes.
- Hill, J., Donald, K. A., & Griffiths, D. E. (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucl. Acids Res.* 19: 5791.
- Hirayama, O., Nakamura, K., Hamada, S. & Kobayashi, Y. (1994). Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids* 29: 149-150.
- Hom, L. G. & Volkman, L. E. (1998). Nickel-induced oligomerisation of proteins containing 10-histidin tags. *Biotechniques* 25 (1): 20-22.
- Huguene, P., Römer, S., Kuntz, M. & Camara, B. (1992). Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and  $\zeta$ -carotene in *Capsicum* chromoplasts, *Eur. J. Biochem.* 209: 399-407.
- Janke, K. T. & Becker, W. M. (2000). Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Prot. Expr. Pur.* 19: 419-424.
- Jiang, Y. H., McGeachin, R. B. & Bailey C. A. (1994). Alpha-tocopherol, beta-carotene and retinol enrichment of chicken eggs. *Poult. Sci.* 73 (7): 1137-1143.
- Johnson, E. J., Hammond, B. R., Yeum, K.-J., Wang, X. D., Castaneda, C., Snodderly, D. M. & Russell, R. M. (2000). Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1555-1562.

- Jones, O. W., Earnest, J. P. & McNamee, M. G. (1987). Solubilization and reconstitution of membrane proteins. In: Biological membranes, a practical approach, Kap. 5, ed.: Findlay, J. B. C. & Evans, W. H.. IRC Press, Oxford University Press.
- Kajiwaru, S., Fraser, P. D., Kondo, K. & Misawa, N. (1997). Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 324 (2): 421-426.
- Kotani, H., Tanaka, A., Kaneko, T., Sato, S., Suguiwa, M. & Tabata, S. (1995). Assignment of 82 known genes and gene clusters on the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *DNA Res.* 2: 133-142.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-688.
- Leung, D. W., Chen, E. & Goeddel, D. V. (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1 (1): 11-15.
- Lichtenthaler, H. K. (1999). The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate pathway of isoprenoids biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 47-65.
- Linden, H., Misawa, N., Chamovitz, D., Pecker, I., Hirschberg, J. & Sandmann, G. (1991). Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes. *Z. Naturforsch.* 46c: 1045-1051.
- Linden, H., Vioque, A. & Sandmann, G. (1993). Isolation of a carotenoid biosynthesis gene coding for  $\zeta$ -carotene desaturation from *Anabaena* PCC 7120 by heterologous complementation. *FEMS Microbiol. Lett.* 106: 99-104.
- Linden, H., Misawa, N., Saito, T. & Sandmann, G. (1994). A novel carotenoid biosynthesis gene coding for zeta-carotene desaturase: functional expression, sequence and phylogenetic origin. *Plant Mol. Biol.* 24 (2): 369-379.
- Lucht M. J. & Bremer E. (1994). Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: Osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol. Rev.* 14: 3-20.
- Matsufuji, H., Nakamura, H., Chino, M., & Mitsuharu, T. (1998). Antioxidant activity of Capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *J. Agric. Food Chem.* 46: 3468-3472.
- Mayer, M. P., Beyer, P. & Kleinig, H. (1990). Quinone compounds are able to replace molecular oxygen as terminal electron acceptors in phytoen desaturation in chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus* L.. *Eur J. Biochem.* 191: 359-363.
- Messing, J. (1979). A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.* 2(2), 43.
- Messing, J. & Vieira, J. (1982). A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene* 19: 269-276.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P. M. & Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* 384: 240-242.
- 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*. *J. Bacteriol.* 172 (12): 6704-6712.
- Miskin, J. E., Abrams, C. C., Goatley, L. C., & Dixon, L. K. (1998). A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 281: 562-565.

- Mouly, P. P., Gaydou, E. M. & Corsetti, J. (1999). Characterization of paprika (*Capsicum annuum*) extract in orange juices by liquid chromatography of carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* 47: 968-976.
- Müller, R. K., Bernhard, K., Giger, A., Moine, G. and Hengartner, U. (1997). (E/Z)-Isomeric carotenes. *Pure & Appl. Chem.*, 69 (10): 2039-2046.
- Neudert, U., Martínez-Férez, I., Fraser, P. D. & Sandmann, G. (1998). Expression of an active phytoene synthase from *Erwinia uredovora* and biochemical properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1392: 51-58.
- Norris, S. R., Barrette, T. R., and DellaPenna, D. (1995). Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* 7: 2139-2149.
- Ohnuma, S., Nakazawa, T., Hemmi, H., Hallberg, A., Koyama, T., Ogura, K. & Nishino, T. (1996). Conversion from Farnesyl Diphosphat Synthase to Geranylgeranyl Diphosphate Synthase by random chemical mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 271 (17): 10087-10095.
- Ouchane, S., Picaud, M., Vernotte, C., Reiss-Husson, F. & Astier, C. (1997). Pleiotropic effects of puf interposon mutagenesis on carotenoid biosynthesis in *Rubrivivax gelatinosus*. *J. Biol. Chem.* 272 (3): 1670-1676.
- Pardo, A. D. & Schiff, J. A. (1980). Plastid and seedling development in SAN-9789 (4-chloro-5-(methylamine)-2-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-m-tolyl)-3-(2H)pyridazinone)-treated etiolated bean seedlings. *Can. J. Bot.* 58: 25.
- Parry, A. D. & Horgan R. (1991). Carotenoids and abscisic acid (ABA) biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* 82: 320-326.
- Pecker, I., Chamovitz, D., Linden, H., Sandmann, G. & Hirschberg, J. (1992). A single polypeptide catalysing the conversion of phytoene to  $\zeta$ -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 4962-4966.
- Powell, P. P., Dixon, L. K. & Parkhouse, R. M. E. (1996). An I $\kappa$ B homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *J. Virol.* 70: 8527-8533.
- Ridley, S. M. (1982). Carotenoids and herbicide action, in *Carotenoid Chemistry and Biochemistry*, Proc. 6<sup>th</sup> Int. Symp. Carotenoids, Britton, G.I & Goodwin, T. W., Eds., Pergamon Press, Oxford, 353.
- Raisig, A., Bartley, A., Scolnik, P. & Sandmann, G. (1996). Purification in an active state and properties of the 3-step phytoene-desaturase from *Rhodobacter capsulatus* overexpressed in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 119: 559-564.
- Raisig, A. & Sandmann, G. (1999). 4,4'-diapophytoene desaturase: Catalytic properties of an enzyme from the C<sub>30</sub> carotenoid pathway of *Staphylococcus aureus*. *J. of Bacteriol.* 181 (19): 6184-6187.
- Rose, R. E. (1988). The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucl. Acids Res.* 16: 355.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E. E. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sander, L. C., Epler Sharpless, K., Craft, N.E. & Wise, S.A. (1994). Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Anal. Chem.* 66: 1667-1674.

- Sandmann, G., Bramley, P. M. & Böger, P. (1985). New herbicidal inhibitors of carotene biosynthesis. *J. Pestic. Sci.* 10: 19.
- Sandmann, G. & Böger, P. (1989). Inhibition of carotenoid biosynthesis by herbicides, Chapter 2, in "Target Sites of Herbicide Action", edit. Böger, P. & Sandmann, G., CRC-Press, Boca Raton, FL, USA.
- Sandmann, G. (1994). Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem.* 223: 7-24.
- Sandmann, G. (1997). High level expression of carotenogenic genes for enzyme purification and biochemical characterization. *Pure & Applied Chemistry* 69 (10): 2163-2168.
- Sandmann, G. (2001). Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends in plant science* 6 (1): 14-17.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223-231.
- Schein, H. C. (1989). Produktion of soluble recombinant proteins in bacteria. *Biotech.* 7: 1141-1149.
- Schiestl, R. H. & Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Gen.* 16: 339-346.
- Schneider, C., Böger, P. & Sandmann, G. (1997). Phytoene desaturase: heterologous expression in an active state, purification, and biochemical properties. *Prot. Exp. Purif* 10: 175-179.
- Schnurr, G., Misawa, N. & Sandmann, G. (1996). Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. *Biochem. J.* 315: 869-874.
- Schulz, A., Oswald, O., Beyer, P. & Kleinig, H. (1993). SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS* 318 (2): 162-166.
- Serrano, P. (1988). H<sup>+</sup>-ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: Purification and reconstruction. *Methods Enzymol.* 157: 533-544.
- Shestopalov, A., Bogachev, A. V., Murtazina, R. A., Viryasov, M. B. & Skulachev, V. P. (1997). Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in *Escherichia coli*. Evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis. *FEBS Lett.* 404: 272-274.
- Simkin, A., Breitenbach, J., Kuntz, M. & Sandmann, G. (2000). *In vitro* and *in situ* inhibition of carotenoid biosynthesis in *Capsicum annuum* by bleaching herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4676-4680.
- Srubolmas, N., Panbangred, W., Sriuraivatana, S. & Meevootisom, V. (1997). Localization and characterisation of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 373-378.
- Steiger, S., Astier, C. & Sandmann, G. (2000). Substrate specificity of the expressed carotenoid 3,4-desaturase from *Rubrivivax gelatinosus* reveals the detailed reaction sequence to spheroidene and spirilloxanthin. *Biochem. J.* 349: 635-640.
- Takaichi, S. (1993). Usefulness of field desorption mass spectrometry in determining molecular masses of carotenoids, natural carotenoid derivatives and their chemical derivatives. *Org. Mass Spectrom.* 28: 785-788.

- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.
- Tinkler, J. H., Böhm, F., Schalch, W. & Truscott, T. G. (1994). Dietary carotenoids protect human cells from damage. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 26: 283-285.
- Tsukida, K. & Saiki, K. (1983). Thermal stereoisomerization of all-(E)- $\beta$ -carotene: (Z)- $\beta$ -carotenes and electrocyclic  $\beta$ -carotenes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 29: 111-122.
- Vartanian, J. P., Henry, M. & Wain-Hobson, S. (1996). Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic Acids Res.* 24 (14): 2627-2631.
- Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.
- Wieland, B., Feil, C., Gloria-Maercker, E., Thumm, G., Lechner, M., Bravo, J.-M., Poralla, K. & Götz, F. (1994). Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 176: 7719-7726.
- Wu, D. , Wright, D. A., Wetzel, C., Voytas, D. F. & Rodermel, S. (1999). The IMMUTANS variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *The Plant Cell* 11: 43-55.
- Woodall, A. A., Britton, G. & Jackson, M. J. (1997). Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochem. Biophys. Acta* 1336: 575-586.
- Xu, H., Petersen, E. I., Petersen, S. B. & El-Gewely, M. R. (1999). Random mutagenesis libraries: Optimization and simplification by PCR, *BioTechniques* 27: 1102-1108.
- Zechmeister, L. (1962). *Cis-trans isomeric carotenoids, vitamins A and arylpolyenes*. Springer Vienna.

## VII. LEBENSLAUF

<b>Name :</b>	Jürgen Günter Breitenbach	
<b>Wohnort :</b>	Thorwaldsenstraße 41 60596 Frankfurt am Main	
<b>geboren :</b>	31. Mai 1967, in Frankfurt am Main	
<b>Schulbildung :</b>	Besuch der Grundschule in Ffm. / Sachsenhausen (Textorschule).	
Herbst 1977 bis Juni 1986	Besuch des Carl-Schurz-Gymnasiums in Ffm./Sachsenhausen und Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife.	
<b>Zivildienst :</b>	´Mobile soziale Hilfsdienste´ des Sozialdienstes Frankfurt (Deutsches Rotes Kreuz).	
<b>Studium :</b>	Immatrikulation im an der Johann Wolfgang Goethe-Universität für den Studiengang Meteorologie (WS 1987/1988).	
Oktober 1989	Beginn des Studiums Biologie zum Wintersemester 1989/1990 an der JWG-Universität; Diplomhauptprüfung mit dem Hauptfach Botanik und den Nebenfächern Mikrobiologie und Biochemie bestanden am 29.11.1994 mit der Gesamtnote ´sehr gut´; Anfertigung der Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Sandmann am Botanischen Institut.	
Oktober 1995	Abschluß der Diplomarbeit mit der Gesamtnote ´sehr gut´.	

Thema der Diplomarbeit	"Funktionelle Expression der Carotinoid-Ketolase aus <i>Haematococcus pluvialis</i> und Analyse der gebildeten Folgeprodukte".
<b>Promotion:</b>	
April 1996	Beginn der Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Sandmann am Botanischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität.
Thema der Dissertation	"Funktionelle Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der $\zeta$ -Carotin-Desaturase aus <i>Capsicum annuum</i> (Paprika)".
Dezember 1997	Forschungsaufenthalt am Institute of Animal Health, Pirbright, England.

Ffm., den 20.05.2001



## Erklärung

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

Frankfurt am Main, den 23. 5. 2001

Jürgen Breitenbach

## Eidesstattliche Versicherung

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

‘Funktionelle Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der  $\zeta$ -Carotin-  
Desaturase aus *Capsicum annuum* (Paprika)’

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

Frankfurt am Main, den 23. 5. 2001

Jürgen Breitenbach

---