

**Gene der Carotinoid Biosynthese aus den
Coryneformen Bakterien *Brevibacterium linens* und
*Brevibacterium flavum***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Philipp Krubasik
aus Säckingen

Frankfurt 2000
(DF1)

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

Dekan: Prof. Dr. Gerhard Trommer

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Sandmann

Prof. Dr. Heinz Osiewacz

Datum der Disputation: 5. Juli 2000

INHALT

1 EINLEITUNG	1
1.1 Vorkommen und Funktion von Carotinoiden	1
1.2 Biosynthese der Carotinoide	2
1.3 Strategien um <i>crt</i> Gene zu klonieren	7
1.4 Coryneforme Bakterien	10
1.4.1 <i>Brevibacterium linens</i>	11
1.4.2 <i>Brevibacterium flavum</i>	12
1.5 Ziel der Arbeit	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Verwendete Bakterienstämme	14
2.1.1 Anzucht der Bakterienstämme	15
2.2 Verwendete Vektoren	15
2.2.1 <i>Corynebacterium</i> / <i>E. coli</i> Shuttle Vektor pC1	16
2.2.2 Komplementierungs-Konstrukt pACKCRT-EBI _{EU}	17
2.2.3 Modifizierte pQE Expressionsvektoren	17
2.3 Molekularbiologische Methoden	18
2.3.1 DNA-Isolation	18
2.3.1.1 Plasmid Minipräparation „Rapid“	18
2.3.1.2 Plasmid Präparation aus Coryneformen Bakterien	19
2.3.1.3 Isolation genomischer DNA	19
2.3.2 Transformation von <i>E. coli</i>	19
2.3.2.1 Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	19
2.3.2.2 Schnelltransformation	20
2.3.2.3 Elektroporation von <i>E. coli</i>	20

2.3.3 Transformation von <i>B. flavum</i>	20
2.3.4 Transformation von <i>C. glutamicum</i>	21
2.3.5 Cosmid Bibliothek von <i>B. linens</i>	22
2.3.6 Expressions-Bibliothek von <i>B. linens</i> in <i>B. flavum</i> Pigmentmutanten	22
2.3.7 Klonierungen	23
2.3.7.1 Deletion von ORF9 und von ORF7 + ORF8 + ORF9 in <i>B. flavum</i> durch homologe Rekombination	23
2.3.7.2 Klonierung von ORF7, ORF8 und ORF9 aus <i>B. flavum</i>	24
2.3.7.3 Deletionen des bifunktionellen Gens <i>crtYB</i> aus <i>Xynthophyllomyces dendrorhous</i>	24
2.3.8 Southern Blot	25
2.3.9 DNA-Sequenzanalyse	25
2.3.10 Oligonukleotidprimer	26
2.3.11 Inverse PCR	27
2.3.12 Software zur DNA-Sequenzauswertung	27
2.4 Carotinoidanalytik	28
2.4.1 Carotinoideextraktion	28
2.4.2 Carotinoideanalyse durch HPLC	28
2.5 Proteinbiochemische Methoden	29
2.5.1 Aufschluß von Bakterienzellen	29
2.5.2 <i>In-vitro</i> Test	29
2.5.3 SDS-Gelelektrophorese	30
2.6 Konventionen	30
2.7 Abkürzungen	30
3 ERGEBNISSE	32
3.1 Carotinoide Biosynthese in <i>Brevibacterium linens</i>	32
3.1.1 Erstellen einer Cosmid Bibliothek	32
3.1.1.1 Screenen der Cosmid Bibliothek	33
3.1.2 Erstellen einer Expressions-Bibliothek in <i>E. coli</i>	33

3.1.3 Verwendung degenerierter Primer um <i>crt</i> Gene zu klonieren	34
3.1.4 Komplementierung von <i>Brevibacterium flavum</i> Pigmentmutanten	35
3.1.4.1 Transformationsversuche zu <i>B. flavum</i> mit genomischer DNA aus <i>B. linens</i>	36
3.1.4.2 Erstellen und Screenen einer <i>B. linens</i> Expressions-Bibliothek in <i>B. flavum</i>	36
3.1.5 Sequenzanalyse des <i>crt</i> Genclusters aus <i>B. linens</i>	37
3.1.6 Sequenzvergleiche des <i>crt</i> Genclusters aus <i>B. linens</i>	39
3.1.7 Neuartige Lycopin Zyklasten CrtYc und CrtYd aus <i>B. linens</i>	45
3.1.8 Die β -Carotin Desaturase CrtU aus <i>B. linens</i>	49
3.1.8.1 Expression von <i>crtU</i> in <i>E. coli</i>	49
3.1.8.2 Expression von <i>crtU</i> in Corynebakterien	51
3.2 Pilzliches Fusionsgen mit Ähnlichkeiten zu den Lycopin Zyklasegenen aus <i>B. linens</i>	54
3.3 Carotinoid Biosynthese in <i>Brevibacterium flavum</i>	56
3.3.1 Analyse der Carotinoide aus <i>B. flavum</i>	56
3.3.1.1 Strukturaufklärung der Carotinoide von <i>B. flavum</i>	58
3.3.2 Sequenzanalyse des <i>crt</i> Genclusters aus <i>B. flavum</i>	61
3.3.3 Sequenzvergleiche des <i>crt</i> Genclusters aus <i>B. flavum</i>	63
3.3.4 Sequenzanalyse der Transposonmutanten von <i>B. flavum</i>	66
3.3.5 Funktioneller Nachweis der <i>crt</i> Gene aus <i>B. flavum</i>	67
3.3.5.1 Inaktivierung von ORF9 durch homologe Rekombination in <i>B. flavum</i>	67
3.3.5.2 Heterologe Komplementierung von <i>E. coli</i> mit ORF7, ORF8 und ORF9	69
3.3.5.3 Inaktivierung von ORF7, ORF8 und ORF9 durch homologe Rekombination in <i>B. flavum</i> und Komplementierung der deletierten Gene	70
4 DISKUSSION	72
4.1 Die Carotinoid Biosynthese in <i>B. linens</i>	72
Lichtregulierte Carotinoid Biosynthese durch CrtK?	73
Effektive Carotinoid Biosynthese durch IPP Isomerasegen im <i>crt</i> Gencluster	74
Die Gene der frühen Schritte der Carotinoid Biosynthese sind in <i>B. linens</i> und <i>B. flavum</i> ähnlich: GGPP Synthase, Phytoen Synthase und Phytoen Desaturase	75
Die β -Carotin Desaturase	78

4.2 Neuartige Lycopin Zyklasegene	82
4.3 Pilzliche Lycopin Zyklasegene	86
4.4 Neue Carotinoide und <i>crt</i> Gene in <i>B. flavum</i>: die Synthese von C₅₀ Carotinoiden	88
4.5 Expression der Gene Coryneformer Bakterien in <i>E. coli</i>	92
4.6 DNA-Photolyasen in Verbindung mit <i>crt</i> Genen?	93
4.7 Evolution der Lycopin Zyklasten	97
5 ZUSAMMENFASSUNG	100
6 LITERATUR	102

1 EINLEITUNG

1.1 Vorkommen und Funktion von Carotinoiden

Carotinoide sind eine wichtige und in der Natur weit verbreitete Stoffgruppe mit über 660 zur Zeit bekannten gelb, orange bis rot gefärbten Verbindungen. Ihre auffallendste Funktion liegt in der Färbung von Früchten und Blüten, aber auch Tiere wie einige Crustaceen, Fische und Vögel können durch Carotinoide gefärbt werden. In Pflanzen und photosynthetischen Bakterien können Carotinoide den spektralen Wirkungsbereich der Photosynthese erweitern, indem sie als Lichtsammelpigmente (akzessorische Pigmente) die Energie der Sonnenstrahlung aufnehmen und auf Chlorophyll übertragen (Demmig-Adams *et al.*, 1996). Mindestens genauso wichtig ist die Schutzwirkung der Carotinoide vor schädlichen photooxidativen Prozessen, die bei der Photosynthese auftreten. Die Gene mancher chromoplastenspezifischer Carotinoide können durch oxidativen Streß induziert werden (Bouvier *et al.*, 1998). In Pflanzen sind Carotinoide außerdem am Xanthophyll Zyklus, der zur Ableitung überschüssiger Energie der Photosynthese dient (Demmig-Adams und Adams, 1996), sowie an der Biosynthese des Phytohormons Abszissinsäure, dessen Vorstufe sie darstellen, beteiligt.

In Bakterien dienen Carotinoide neben dem Schutz vor UV- und sichtbarem Licht auch als Membranverstärker, eine Funktion die in Eukaryoten von Cholesterol und anderen Sterolen übernommen wird. Durch ihre lipophilen Eigenschaften und ihre Moleküllänge, die oft der Dicke einer biologischen Membran entspricht, können Carotinoide sich in diese einlagern und so die Fluidität der Membran verändern. Besonders geeignet hierfür sind Carotinoide mit polaren Endgruppen wie Hydroxycarotinoide, glycosilierte Carotinoide sowie deren Fettsäureester (Hara *et al.*, 1999).

Eine wichtige Rolle spielen Carotinoide auch für die Ernährung von Mensch und Tier. So ist β -Carotin das Pro-Vitamin A, welches im tierischen Organismus zu Vitamin A (all-*trans* Retinol) gespalten und anschließend über all-*trans* Retinal in 11-*cis* Retinal umgewandelt und mit Opsin zu Rhodopsin verbunden wird. Rhodopsin ist das lichtempfindliche Molekül vieler Photorezeptoren, so auch in den Stäbchen der Wirbeltieraugen, wo ein Vitamin A-Mangel zu Nachtblindheit führen kann. Abgesehen von der Umwandlung in Vitamin A können Carotinoide in den verschiedenen tierischen Organismen auch auf viele andere Weisen um-

ab- und eingebaut werden (Parker, 1996). Aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften und ihres Potentials freie Radikale einzufangen (Olson und Krinsky, 1995) werden Carotinoide als antikanzerogene und tumorsuppressive Stoffgruppe betrachtet (Mayne, 1996). In jüngster Zeit wird eine Genaktivierung durch Carotinoide und eine daraus folgende antikanzerogene Wirkung diskutiert (Bertram, 1999).

Da die Biosynthese von Carotinoiden nur in Pflanzen und einigen Pilzen und Bakterien stattfindet, müssen Tiere diese für sie essentiellen Verbindungen über die Nahrung aufnehmen. Wirtschaftliche Bedeutung erlangen Carotinoide somit in der Tierzucht, wo sie dem Futter zugemischt werden (Nelis und Leenheer, 1991), nicht nur um zum Beispiel bei Lachs und Forelle die rötliche Färbung des Fleisches zu verstärken (Simpson *et al.*, 1981) oder um bei Geflügel die Hautfärbung von Brathähnchen bzw. die Eigelbfärbung zu intensivieren (Marusich und Bauernfeind, 1981), sondern auch um die Gesundheit der Tiere -weniger Infektionen und Krankheiten - und damit deren Produktivität und die Produktqualität zu fördern (Schiedt, 1990).

In der medizinischen Anwendbarkeit von Carotinoiden liegt ein weiterer, auch wirtschaftlich bedeutsamer, Nutzen der Forschung an diesen Pigmenten. So ist es möglich durch die geschickte Kombination von Genen der Carotinoid Biosynthese in einem Wirtsorganismus neuartige Carotinoide zu synthetisieren, die bisher in der Natur nicht vorkamen (Sandmann *et al.*, 1999). Diese neuartigen Verbindungen können auf ihre medizinische Wirksamkeit hin überprüft werden und zur Entwicklung neuer Medikamente führen. Voraussetzung für solche Strategien ist, daß man eine Vielzahl unterschiedlicher Gene der Carotinoid Biosynthese vorher kloniert und charakterisiert hat, sowie daß geeignete Expressions- und Produktionssysteme zur Verfügung stehen.

1.2 Biosynthese der Carotinoide

Carotinoide gehören zu der Stoffgruppe der Terpenoide und werden ausgehend von dem C₅ Terpenoid-Grundbaustein Isopentenyl Pyrophosphat (IPP) synthetisiert. Dieser C₅ Körper kann über zwei unabhängige Biosynthesewege gebildet werden. Dem klassischen Syntheseweg über Mevalonat (Qureshi und Porter, 1981), der im Cytoplasma von Pflanzen und in Pilzen gefunden wurde, steht der alternative Syntheseweg über Deoxyxylulose-5-Phosphat (DOX-P) gegenüber (Rohmer *et al.*, 1996), von dem erst kürzlich aus pflanzlichen

Plastiden, Grünalgen (Lichtenthaler, 1998) und vielen Eubakterien (Putra *et al.*, 1998) berichtet wurde.

In dem ersten Schritt der nun folgenden Kettenbildung (Abb.1-1A) kondensiert ein Molekül IPP in einer Kopf-Schwanz Reaktion mit einem Molekül Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP) zu dem C₁₀ Körper Geranyl Pyrophosphat (GPP). Das hierbei als „Startermolekül“ benötigte allylische DMAPP entsteht aus IPP durch Isomerisierung mit Hilfe des Enzyms **IPP Isomerase** (Idi). Weitere Kettenverlängerungen mit je einem Molekül IPP führen zu Farnesyl Pyrophosphat (FPP, C₁₅) und Geranylgeranyl Pyrophosphat (GGPP, C₂₀). Die Enzyme dieser Schritte sind Prenyl Transferasen, die je nach Organismus verschiedene Syntheseschritte vollbringen. Das Enzym **GGPP Synthase** (CrtE) aus *Methanobacterium* z.B. kann DMAPP zu GGPP umsetzen, während die GGPP Synthase aus *Erwinia* GPP als Substrat verwendet und die GGPP Synthase aus *Phycomyces* sogar nur FPP als Substrat akzeptiert. Das bedeutet auch, daß es in *Erwinia* und *Phycomyces* weitere Prenyl Transferasen geben muß, die das Substrat für die GGPP Synthase liefern. Aus zwei Molekülen GGPP wird in dem folgenden Schritt in einer Kopf-Kopf Addition durch das Enzym **Phytoen Synthase** das erste, noch farblose, Carotin Phytoen über das Zwischenprodukt Präphytoen Pyrophosphat gebildet (C₄₀). Die Phytoen Synthasen aller Carotinoid bildenden Organismen sind homolog zueinander. Das für bakterielle Phytoen Synthasen kodierende Gen wird *crtB* genannt, in Pflanzen nennt man es *psy*. Durch das Enzym **Phytoen Desaturase** werden in Phytoen, das drei konjugierte Doppelbindungen besitzt, nun schrittweise bis zu vier weitere Doppelbindungen eingefügt. Hierbei entsteht ein System aus bis zu 11 konjugierten Doppelbindungen. Durch die zunehmende Anzahl der konjugierten Doppelbindungen verändert sich das Absorptionsverhalten der Moleküle und sie werden farbig. Bei diesen Desaturierungen werden formell jeweils zwei Wasserstoffatome abgespalten und eine Doppelbindung eingeführt. In den Carotinoid bildenden Bakterien wird durch das Produkt des Gens *crtI* auf diese Art Phytoen über Phytofluen, ζ-Carotin (zitronengelb) und Neurosporin (gelb) zu Lycopin (rot) umgesetzt. In einigen Bakterien, z.B. *Rhodobacter*, wird Phytoen jedoch nur bis zu Neurosporin desaturiert und anschließend durch weitere Enzyme modifiziert. In dem Pilz *Neurospora crassa* kann das Genprodukt von *al-1* sogar fünf Doppelbindungen in Phytoen einführen und so 3,4-Dehydrolycopin bilden (Schmidhauser *et al.*, 1990). In Cyanobakterien gibt es, wie auch in höheren Pflanzen, zwei verschiedene Desaturasen. Dies sind die Phytoen Desaturase (Pflanzen: Pds, Cyanobakterien: CrtP) und die ζ-Carotin (Zeta-Carotin) Desaturase (Pflanzen: Zds, Cyanobakterien: CrtQ), sie führen jeweils nur zwei Desaturierungsschritte durch.

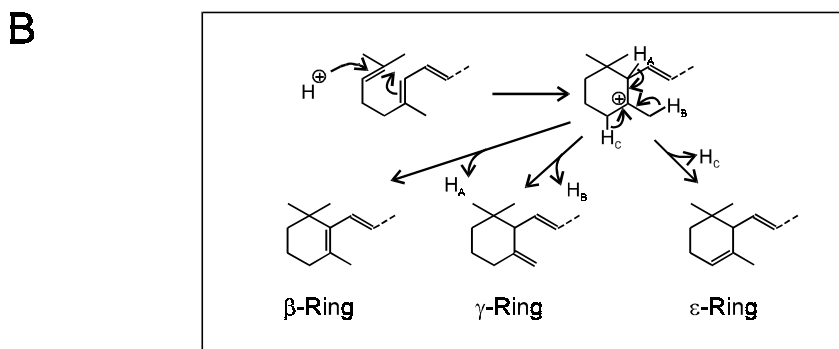
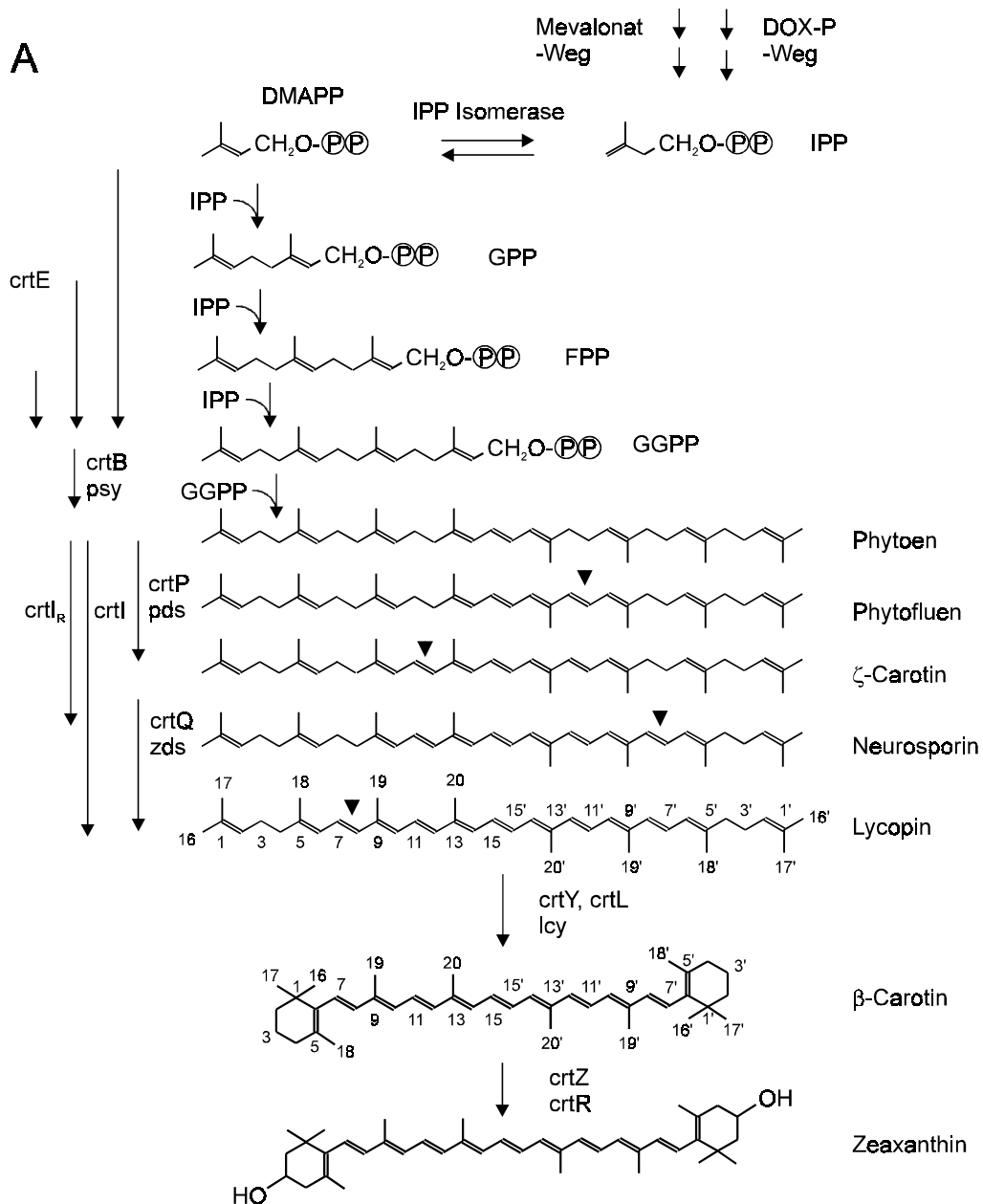


Abb.1-1: (A) Zusammenfassung des zentralen Carotinoid Biosyntheseweges zu Zeaxanthin. Die Namen der daran beteiligten Gene sind angegeben. Die konventionelle Numerierung der C-Atome ist für Lycopin und β-Carotin angegeben (Britton, 1995). Auf dem Kopf stehende Dreiecke geben Positionen der Desaturierungen an. Abkürzungen und weitere Erläuterungen im Text. (B) Mechanismus der Zyklisierung von Lycopin, nach Goodwin (1980).

Alle bekannten Phytoen Desaturasen aus Bakterien mit Ausnahme der Cyanobakterien sind homolog zueinander und werden dem crtI-Typ zugerechnet. Die Desaturasen der Cyanobakterien und Pflanzen sind ebenfalls homolog zueinander und werden als pds-Typ bezeichnet (Sandmann, 1994b). Sie unterscheiden sich von den crtI-Typ Desaturasen nicht nur in ihrer Sequenz, sondern auch in ihren biochemischen Eigenschaften. So benötigen pds-Typ Desaturasen NAD/NADP als Wasserstoffakzeptor, während bei den crtI-Typ Desaturasen FAD diese Funktion übernimmt. Die pds-Typ Desaturasen werden durch Hemmstoffe wie Phenylpyridazinone oder Phenylfuranone gehemmt, während die des bakteriellen Typs davon unbeeinflusst bleiben. Eine Ausnahme von der Zuordnung der Desaturase Gentypen zu den Organismengruppen stellt die ζ -Carotin Desaturase des Cyanobakteriums *Anabaena* PCC7120 dar, die dem bakteriellen crtI-Typ angehört. Durch das Enzym **Lycopin Zyklase** wird Lycopin an seinen Enden zyklisiert. Hierbei kann ein β -Iononring (Beta) oder ein ϵ -Iononring (Epsilon) gebildet werden (Abb. 1-1B). Dementsprechend unterscheidet man auch β -Zyklasen und ϵ -Zyklasen. Über das einseitig zyklisierte Intermediat γ -Carotin (Gamma-Carotin) erhält man das beidseitig zyklisierte β -Carotin mit zwei β -Iononringen. Werden ein β -Iononring und ein ϵ -Iononring eingeführt, entsteht α -Carotin (Alpha-Carotin). Das einseitig zu einem ϵ -Iononring zyklisierte Lycopin nennt man δ -Carotin (Delta-Carotin). In Bakterien überwiegt β -Carotin als Produkt der Zyklisierung, in Pflanzen meist α -Carotin und dessen Derivate (Goodwin, 1980). Alle bekannten Lycopin Zyklasen weisen Sequenzähnlichkeiten auf, wobei sich die bakteriellen Zyklasen (CrtY) von den Zyklasen der Cyanobakterien (CrtL) und der Pflanzen (Lcy) unterscheiden. Man vermutet eine Entstehung der Lycopin Zyklasen aus gemeinsamen Formen, sie sind also homolog (Hugueney *et al.*, 1995). Neben pflanzlichen β -Zyklasegenen (*lcyb*) wurde auch Gene pflanzlicher ϵ -Zyklasen (*lcye*) kloniert (Cunningham *et al.*, 1996). Aus Pilzen konnten bis zu Beginn dieser Arbeit noch keine Lycopin Zyklasegene isoliert werden.

In den bisherigen Syntheseschritten entstanden nur Kohlenwasserstoff-Verbindungen, die als Carotine bezeichnet werden. Enthält das Carotin zusätzlich Sauerstoff spricht man von Xanthophyllen. Carotine und Xanthophylle werden unter dem Oberbegriff Carotinoide zusammengefaßt. Oft werden Xanthophylle aus zyklischen Carotinen gebildet. So ist das Hydroxycarotinoid Zeaxanthin durch Hydroxylierung von β -Carotin an Position 3 und 3' entstanden. Pflanzliche (Sun *et al.*, 1996) und bakterielle (*crtZ*; Misawa *et al.*, 1990; Cyanobakterien: *crtR*; Masamoto *et al.*, 1998) β -Carotin Hydroxylasegene wurden kloniert. Durch Einführen einer Ketogruppe an Position 4 und 4' eines β -Carotins erhält man das Oxo-

carotinoid Canthaxanthin. Das Gen *crtW* der diesen Schritt katalysierenden Ketolase wurde aus *Agrobacterium aurantiacum* kloniert (Misawa *et al.*, 1995a). Wird eine Ketogruppe in Zeaxanthin eingeführt, was ebenfalls durch *CrtW* geschehen kann (Misawa *et al.*, 1995b), erhält man das wirtschaftlich bedeutsame Carotinoid Astaxanthin. Durch Einführen einer Epoxygruppe in Position 5, 6 und 5', 6' in ein Molekül Zeaxanthin erhält man das in Pflanzen vorkommende Epoxycarotinoid Violaxanthin. Das Gen *aba2* der Zeaxanthin Epoxidase wurde aus *Nicotina plumbaginifolia* (Marin *et al.*, 1996) und einigen anderen Pflanzen kloniert. Die Hydroxygruppen der Xanthophylle können als weitere Modifikation glycosiliert werden. Aus *Erwinia uredovora* wurde das Gen einer solchen Glycosilase (*crtX*) isoliert (Misawa *et al.*, 1990). Schließlich können diese Xanthophyll Glycoside mit einer Fettsäure verestert werden. Die so entstandenen Fettsäureester findet man z.B. in dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* (Yokoyama *et al.*, 1995).

Neben den bisher erwähnten Carotinoiden mit 40 Kohlenstoffatomen (C_{40}), die die überwiegende Anzahl an Carotinoiden ausmachen, gibt es auch solche mit einem C_{30} -Kohlenstoffgerüst. Diese Apocarotinoide wurden z.B. in verschiedenen *Heliobakterium*-Arten (Takaichi *et al.*, 1997) und in *Staphylococcus aureus* (Marshall und Wilmoth, 1981) gefunden. Aus letzterem wurden zwei, an der Carotinoid Biosynthese beteiligte Gene isoliert (Wieland *et al.*, 1994). Analog der bakteriellen C_{40} Carotinoid Synthese fand man die Gene einer C_{30} Carotinoid Synthase, der Diapophytoen Synthase (*crtM*), und einer Desaturase, der Diapophytoen Desaturase (*crtN*). Sie weisen jeweils Sequenzähnlichkeiten zu *crtB* und *crtI* auf.

Neben der Verkürzung der Moleküllänge kann in einigen Bakterien und Archaeobakterien das C_{40} Grundgerüst um bis zu zwei C_5 Isopreneinheiten auf C_{45} und C_{50} verlängert werden (Abb. 1-2). So findet man als typische C_{50} Carotinoide Decaprenoxanthin mit zwei substituierten ϵ -Ring in *Flavobacterium dehydrogenans* (Liaaen-Jensen und Weeks, 1966), C.p. 450 mit zwei substituierten β -Ring in *Corynebacterium poinsettiae* (Norgard, *et al.*, 1970), Sarcinaxanthin mit zwei substituierten γ -Ring in *Sarcina lutea* (Férézou, 1992), umbenannt in *Micrococcus luteus*, und das azyklische Bacterioruberin in verschiedenen *Halobacterium*-Arten (Weeks, 1971). Gene und Enzyme der C_{50} Carotinoid Biosynthese waren bis zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

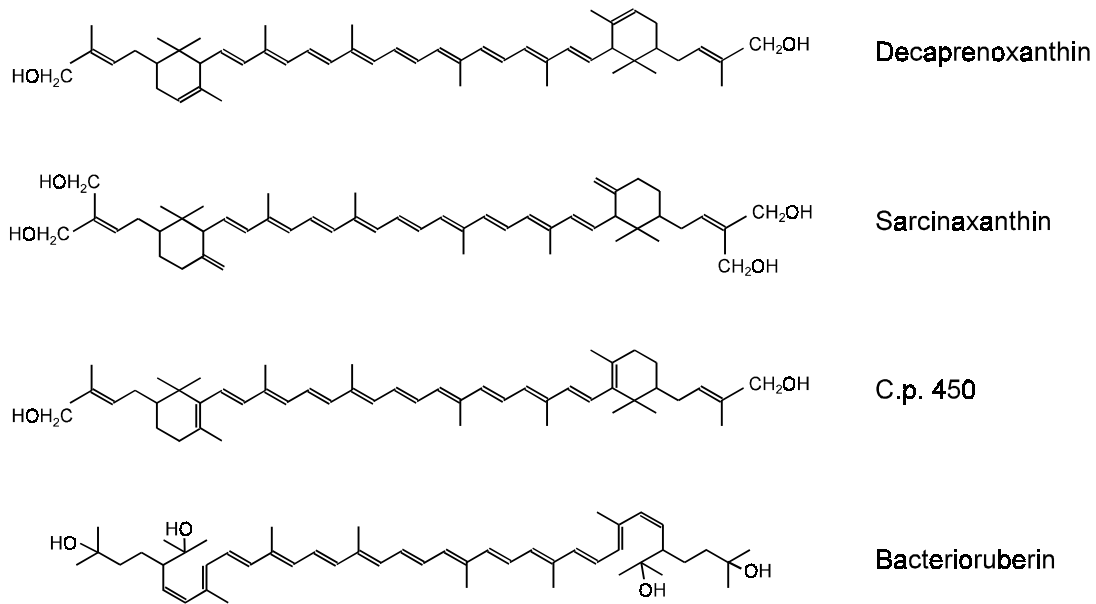


Abb. 1-2: Strukturformeln einiger C₅₀ Carotinoide.

1.3 Strategien um *crt* Gene zu klonieren

Die ersten Gene der Carotinoid Biosynthese (*crt*) wurden eher zufällig gefunden als durch gezielte Suche. Zur gezielten Suche nach den *crt* Genen eines Organismus bieten sich mehrere Strategien an, wobei man zwischen drei prinzipiell verschiedenen Vorgehensweisen unterscheiden kann (Abb 1-3).

1. Funktionelle Klonierung des Genclusters eines kompletten Biosyntheseweges
2. Funktionelle Klonierung einzelner Gene
3. Klonierung von Genen aufgrund von Sequenzähnlichkeiten (Hybridisierungsmethoden)

Einen umfassenden Überblick über Methoden, die zur Klonierung von *crt* Genen führten bietet Sandmann (1994a).

1. Funktionelles Klonieren eines Genclusters mit Hilfe einer Cosmid Bibliothek

Eine Cosmid Bibliothek besteht aus ca. 40 kb großen Fragmenten der genomischen DNA des zu untersuchenden Organismus. Diese DNA-Fragmente sind in Cosmide kloniert und werden in einem Wirts-Stamm, meist *E. coli*, gehalten. Durch eine genügend große Anzahl verschiedener Cosmid Klone kann so das gesamte Genom des zu untersuchenden Organismus in einer Bibliothek repräsentiert sein. Befindet sich auf einem dieser Cosmide das gesuchte *crt*

Gencluster, kann es zur Bildung von Carotinoiden und somit zur Färbung der ursprünglich farblosen *E. coli*-Zellen kommen. Das Cosmid des entsprechenden Klons kann anschließend isoliert und subkloniert werden, bis das DNA-Fragment auf die *crt* Gene reduziert ist. Diese Methode wurde erfolgreich angewendet, um das *crt* Gencluster von *Erwinia uredovora* zu isolieren (Misawa *et al.*, 1990).

Voraussetzung für einen Erfolg dieser Strategie sind jedoch drei Dinge. (1) Die *crt* Gene müssen in einem Cluster vorliegen. Dies ist, abgesehen von den Cyanobakterien, bei allen bekannten bakteriellen *crt* Genen der Fall. (2) Die Promotoren der *crt* Gene müssen vom Wirtsorganismus erkannt werden und zur Transkription der entsprechenden Gene führen. (3) Aus der mRNA müssen funktionelle Proteine gebildet werden, die Translation sowie ein eventuelles posttranslationales Prozessieren des Genproduktes muß also gewährleistet sein.

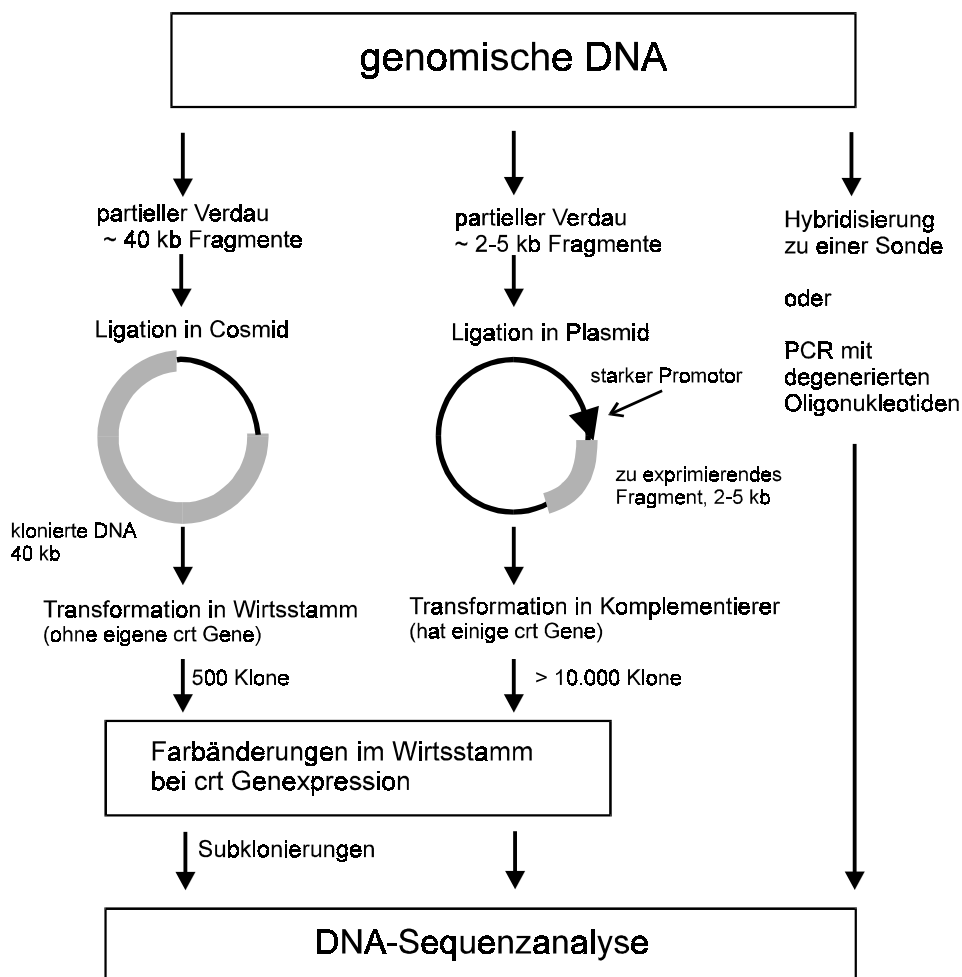


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Klonierungsstrategien für bakterielle *crt* Gene.

2. Funktionelles Klonieren einzelner Gene mit Hilfe einer Expressions-Bibliothek

Können die Punkte (1), geclusterte Gene, oder (2), Promotorerkennung, nicht erfüllt werden, bietet sich die Erstellung einer Expressions-Bibliothek an. Hierbei werden relativ kleine Fragmente der DNA des zu untersuchenden Organismus (genomische DNA bei Prokaryoten, cDNA bei Eukaryoten) in einen Plasmid Vektor unter die Kontrolle eines starken Promotors kloniert, der die Expression des Gens im Wirts Stamm sicherstellt. Mit dieser sogenannten Expressions-Bibliothek wird ein Wirts-Stamm komplementiert, der die Substrat-Carotinoide des zu suchenden Genprodukts akkumuliert (Komplementierer). Diese Strategie wurde erfolgreich angewendet um das Gen der ζ -Carotin Desaturase aus dem Cyanobakterium *Anabaena* PCC7120 zu klonieren (Linden *et al.*, 1993). Hierbei wurde ein gelb pigmentierter, ζ -Carotin bildender, *E. coli*-Stamm mit einer Expressions-Bibliothek von *Anabaena* komplementiert und ein roter, Lycopin bildender, Klon gefunden. Das in diesem Klon exprimierte Gen kodierte somit für ein ζ -Carotin zu Lycopin umsetzendes Enzym, die ζ -Carotin Desaturase.

Voraussetzung für den Erfolg dieser Strategie ist eine korrekte Translation und ein eventuelles posttranslationales Prozessieren des Genproduktes. Da dies vom Wirtsorganismus abhängt, kann dessen Auswahl für den Erfolg dieser Strategie entscheidend sein. Sind die beiden Organismen nicht verwandt, spricht man von **heterologer Komplementierung**. Hierbei werden meist *E. coli*-Stämme als Wirt verwendet, da dieses natürlicherweise carotinoidfreie Bakterium durch Transformation mit geeigneten *crt* Genen eine Vielzahl von Carotinoiden bilden kann. Außerdem stehen für *E. coli* eine große Anzahl von Vektoren und Transformationsprotokollen zur Verfügung. Bei einer **homologen Komplementierung** gehören DNA-Spender und Wirt der selben Art an, was die funktionelle Expression des gesuchten Genproduktes verbessert. Allerdings stehen oft keine geeigneten Komplementierer zur Verfügung oder es mangelt an geeigneten Vektoren und Transformationsmethoden für die entsprechenden Organismen.

Eine weitere elegante Methode einzelne *crt* Gene zu klonieren ist die **Transposonmutagenese**, da Mutanten sofort durch veränderte Pigmentierung selektioniert werden können. Durch entsprechende Methoden kann man sehr schnell das Transposon rückisolieren und die Transposon umgebende DNA analysieren. Voraussetzung ist jedoch, daß geeignete Transformationssysteme und Transposons zur Verfügung stehen.

3. Hybridisierungsmethoden zum Klonieren von Genen

Die bisher beschriebenen Strategien beruhen auf einer funktionellen Expression der *crt* Gene und einer damit verbundenen Farbänderung entsprechender Klone. Basierend auf Nukleinsäuresequenzähnlichkeiten gibt es auch die Möglichkeit über **DNA-Hybridisierungen** mit einer Sonde eines *crt* Gens neue Gene zu finden. Allerdings sind bakterielle *crt* Gene meist nicht besonders gut konserviert und hybridisieren oft nicht einmal zu den Genen nahe verwandter Arten. Pflanzliche *crt* Gene sind oft stärker konserviert. Basierend auf der Konsensussequenz der hypothetischen Genprodukte verschiedener Organismen lassen sich **degenerierte Oligonukleotide** entwickeln, mit denen durch PCR entsprechende Fragmente aus neuen Organismen amplifiziert werden können. Dies gelang bei der Klonierung einiger *crt* Gene aus Pflanzen. Der Nachteil dieser Methoden ist jedoch, daß nur Gene mit Ähnlichkeiten zu schon bekannten Genen gefunden werden.

1.4 Coryneforme Bakterien

Unter der Bezeichnung „Coryneforme Bakterien“ werden oft Gram-positive, stäbchen- oder keulenförmige Eubakterien mit hohem GC-Gehalt der DNA zusammengefaßt. Dies geschieht aber nicht nach phylogenetischen Gesichtspunkten. Aufgrund phylogenetischer Untersuchungen auf der Basis von 16S rRNA-Studien gehören Coryneforme Bakterien in die Ordnung der *Actinomycetales* aus der Klasse der Gram-positiven *Actinobacteria*. Die *Actinomycetales* werden, wie in Abbildung 4-1 dargestellt, in zehn Unterordnungen eingeteilt (Stackebrandt *et al.*, 1997). Darunter befinden sich die *Corynebacterineae* einschließlich der Familien *Corynebacteriaceae* und *Mycobacteriaceae*, die *Streptomycineae* mit der Familie *Streptomycetaceae* und die Unterordnung *Microoccineae* mit der Familie *Brevibacteriaceae*, um nur einige im Verlauf dieser Arbeit untersuchten und diskutierten Gruppen zu nennen.

In vielen Vertretern der Coryneformen Bakterien wurden Carotinoide gefunden deren Biosynthese bisher noch wenig untersucht wurde (Goodwin, 1980). Zu Beginn dieser Arbeit waren weder Enzyme noch Gene der Carotinoid Biosynthese dieser großen und auch wirtschaftlich bedeutsamen Organismengruppe bekannt.

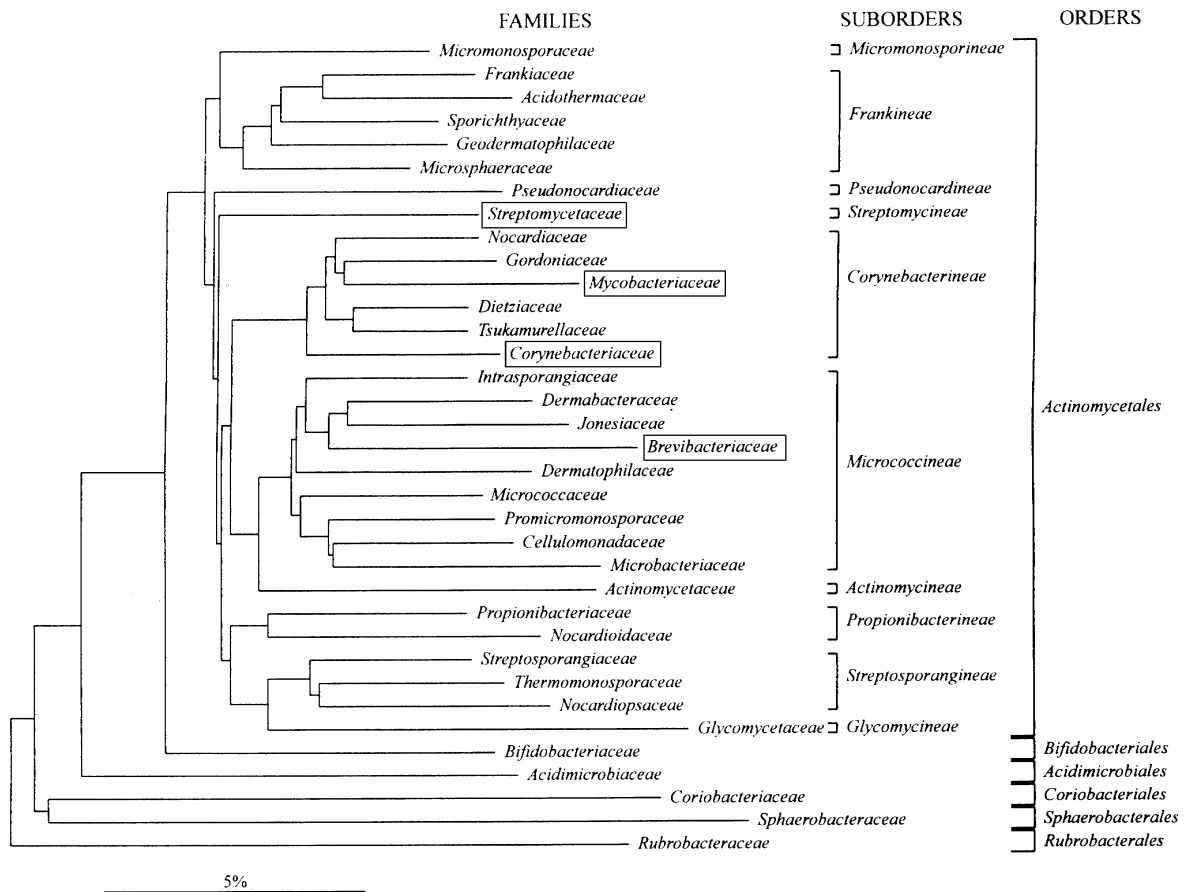


Abb. 1-4: Verwandtschaftsbeziehung innerhalb der Klasse der *Actinobacteria*, basierend auf 16S rDNA/rRNA Sequenzvergleichen. Der Maßstab repräsentiert den Austausch von 5 Nukleotiden pro 100 Nukleotiden. Die Abbildung wurde Stackebrandt *et al.* (1997) entnommen und leicht verändert.

1.4.1 *Brevibacterium linens*

Das Gram-positive Bakterium *Brevibacterium linens* (Abb. 1-5) gehört mit drei weiteren Organismen, *B. iodinum*, *B. casei* und *B. epidermidis*, zu der Gattung *Brevibacterium*. Sie wird sowohl biochemisch als auch aufgrund von 16S rRNA-Studien als eigenständige Gruppe von den anderen Gruppen der Coryneformen Bakterien abgegrenzt. *B. linens* ist der einzige pigmentierte Vertreter dieser Gattung, seine gelb-orange Färbung beruht auf der Synthese von Carotinoiden. Die Carotinoide von *B. linens* sind die selten in der Natur vorkommenden aromatischen Carotinoide Isorenieraten, 3-Monohydroxy-Isorenieraten und 3,3'-Dihydroxy-Isorenieraten (ϕ,ϕ -Carotin-3,3'-diol; Kohl *et al.*, 1983).

B. linens wird zur Herstellung von Käsen wie Romadour, Limburger und Stilton verwendet. Hierbei trägt der Organismus durch Bildung von Methanthiol aus Methionin entscheidend zum Aroma des Käses bei (Collins, 1992). Die typische Farbe dieser Käse geht auf die

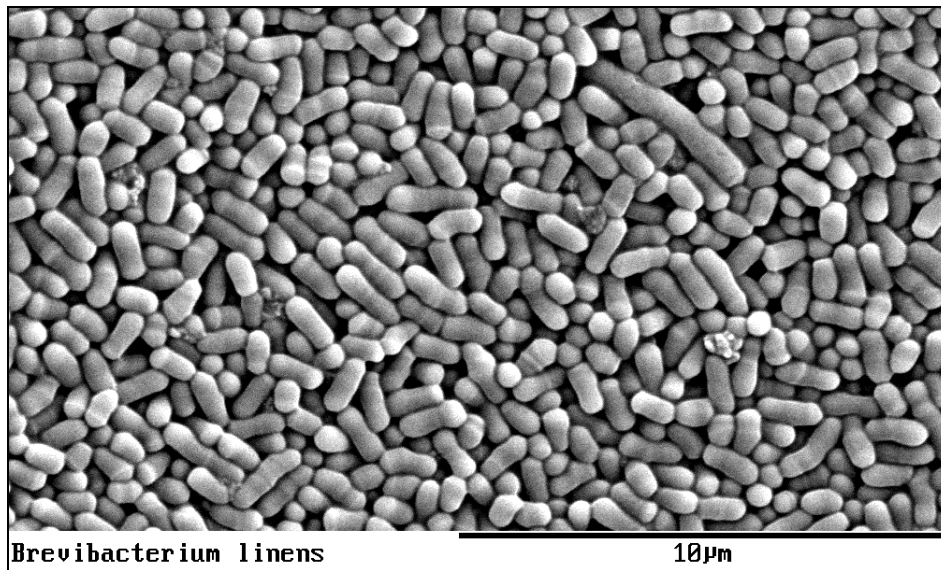


Abb. 1-5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme gefriergetrockneter Zellen von *B. linens*. (Aufgenommen von M. Ruppel, Universität Frankfurt)

Carotinoide von *B. linens* zurück. Die Haltbarkeit des Käses wird von *B. linens*-Stämmen durch die Bildung von Bacteriocin oder anderen antibakteriellen Substanzen, was die Ausbreitung anderer Bakterien hemmt, erhöht (Valdes-Stauber und Scherer, 1996; Boucabeille *et al.*, 1997).

Der GC-Gehalt der DNA von *B. linens* ist, wie bei allen Coryneformen Bakterien, relativ hoch und beträgt 64 Mol %. Transformationsmethoden, geeignete Vektoren oder Transposons stehen für *B. linens* nicht zur Verfügung.

1.4.2 *Brevibacterium flavum*

Brevibacterium flavum wird von einigen Autoren als ein Stamm von *Corynebacterium glutamicum* betrachtet. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *B. flavum*-Stamm MJ233 handelt es sich um einen aus Bodenproben isolierten Stamm (Mitsubishi Chemicals, Japan), der nicht in den öffentlich zugänglichen Kultursammlungen aufgeführt ist. Er wird über-

wiegend für die Isolation von Aminosäuren verwendet (Terasawa *et al.*, 1985) und wurde daher in Bezug auf seine Aminosäuresynthese gut untersucht.

Dieser Stamm ist transformierbar (Vertès *et al.*, 1993), es stehen geeignete Vektoren zur Verfügung und ein aus *C. glutamicum* stammendes Transposon (Vertès *et al.*, 1994b) wurde erfolgreich in *B. flavum* verwendet (Vertès *et al.*, 1994a). Bei dieser Transposonmutagenese erhielt man neben dem gelben Wildtyp auch einige farblose, rote und dunkelgelbe Mutanten. Ob es sich hierbei jedoch um Carotinoide handelte, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt und sollte untersucht werden.

1.5 Ziel der Arbeit

Es ist das Ziel dieser Arbeit die *crt* Gene aus *B. linens* zu isolieren und zu identifizieren. Von besonderem Interesse ist hierbei das vermutete Gen der β -Carotin Desaturase. Das hypothetische Enzym β -Carotin Desaturase soll für die Bildung von Isorenieraten aus β -Carotin, ein Syntheseschritt dessen Gene und Enzyme man noch nicht kennt, verantwortlich sein. Außerdem sollen die *crt* Gene von *B. linens* mit den Genen anderer Bakterien verglichen werden, da bisher noch keine *crt* Gene aus Gram-positiven Bakterien bekannt sind. Die Entwicklung einer geeigneten Klonierungsstrategie für die *crt* Gene Gram-positiver Bakterien mit hohem GC-Gehalt der DNA ist Voraussetzung für die Untersuchung der *crt* Gene aus *B. linens*.

Außerdem soll die Carotinoid Biosynthese von *B. flavum*, einem weiteren Coryneformen Bakterium untersucht werden. Dies schließt sowohl die Untersuchung der Carotinoid Zusammensetzung, als auch die Identifizierung der entsprechenden *crt* Gene von *B. flavum* ein.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Bakterienstämme

Die in Tabelle 2-1 zusammengestellten Stämme von *Escherichia coli* wurden verwendet.

Tab. 2-1: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Verwendungszweck	Quelle/Zitat
DH5 α	DNA-Isolation	Hanahan (1983)
XL-1 Blue MRF'	DNA-Isolation (Tet ^R)	Stratagene, La Jolla, USA
JM101	Komplementierung, Carotinoidproduktion	Messing (1979)
JM109	DNA-Isolation	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
JM110	Isolation nicht-methylierter DNA	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
HB101	DNA-Isolation	Bolivar und Backman (1979)
NM554	Erstellen einer Cosmid Bibliothek	Raleigh <i>et al.</i> (1988)

Die in Tabelle 2-2 aufgelisteten Stämme der Coryneformen Bakterien wurden verwendet.

Tab. 2-2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Bemerkung	Quelle/Zitat
<i>Brevibacterium linens</i> 20426 DSM	identisch zu ATCC 9175	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<i>Brevibacterium flavum</i> MJ233C		Kurusu <i>et al.</i> (1990)
<i>B. flavum</i> MJ233C MV40	rote Transposonmutante (Kn ^R)	Vertès <i>et al.</i> (1994a)
<i>B. flavum</i> MJ233C MV60	rote Transposonmutante (Kn ^R)	Vertès <i>et al.</i> (1994a)
<i>B. flavum</i> MJ233C MV70	rote Transposonmutante (Kn ^R)	Vertès <i>et al.</i> (1994a)
<i>B. flavum</i> MJ233C MV240	farblose Transposonmutante (Kn ^R)	Vertès <i>et al.</i> (1994a)
<i>B. flavum</i> MJ233C MV10	stark gelbe Transposonmutante (Kn ^R)	Vertès <i>et al.</i> (1994a)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> Res 167	ATCC 13032 gezielt restriktionsdefekt gemacht	Dr. Jörn Kalinowski, AG Prof. Pühler, Universität Bielefeld

Sämtliche *B. flavum*-Stämme wurden von Dr. Miki Kobayashi (Mitsubishi Chemicals, Japan) zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Anzucht der Bakterienstämme

E. coli wurde in LB-Medium (10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 1ml/l 1 M NaOH) bei 37 °C über Nacht angezogen. Für die Produktion von Carotinoiden wurde die Anzucht auf 2 bis 3 Tage bei 28 °C ausgedehnt. Antibiotika wurde nach Sambrook *et al.* (1989) zugegeben.

Sämtliche Coryneformen Bakterien wurden in LB-Medium bei 30 °C für 2 bis 3 Tage angezogen. Die Transposonmutanten von *B. flavum* wurden mit einer Endkonzentration von 25 mg/l Kanamycin im Medium angezogen. Bei Verwendung der Vektoren pC1 und pEC5 wurde Chloramphenicol mit einer Endkonzentration von 5 mg/l dem Medium zugesetzt, bei Vektor pEKEx2 wurde Kanamycin mit 25 mg/l eingesetzt. Die Selektion und Anzucht von *B. flavum* nach homologer Rekombination erfolgte durch Zugabe von Erythromycin zum Medium mit einer Endkonzentration von 10 mg/l.

2.2 Verwendete Vektoren

Die in Tabelle 2-3 aufgelisteten Vektoren und Konstrukte wurden verwendet.

Tab. 2-3: Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Kommentar	Resistenz	Quelle/Zitat
pUC18/19	Klonierungsvektor <i>E. coli</i>	Amp	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
SuperCos1	Cosmid zum Erstellen einer Cosmid Bibliothek	Amp	Stratagene, La Jolla, USA
pQE	Expressionsvektor mit 6 x Histidin-Tag	Amp (+ Cm)	Qiagen, Hilden, Deutschland
pPQE	modifizierter pQE mit deletiertem <i>cat</i> -Gen	Amp	Diese Arbeit, 2.2.3
pEKEx2	Expressionsvektor <i>C. glutamicum</i> (Shuttle <i>E. coli</i>)	Kn	Eikmanns <i>et al.</i> (1994)
pEC5	Shuttlevektor <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i>	Cm	Eikmanns <i>et al.</i> (1991)
pC1	Shuttlevektor <i>E. coli</i> - <i>B. flavum</i>	Cm	M. Kobayashi, Mitsubishi Chemicals, Japan, 2.2.1
pMON	modifizierter pBSK+, hat T-Überhang nach <i>XcmI</i> -Verdau, zur Klonierung von Taq-PCR-Produkten	Amp	Borokov and Rivkin (1997)
pMON-Em	pMON mit Erythromycin Resistenzgen in seiner T-Klonierungsstelle	Amp (Em)	Diese Arbeit, 2.3.7.1
pACCRT-EBI _{EU}	Ori von p15A, Lycopinproduzent	Cm	Schnurr <i>et al.</i> (1996)
pACKRT-EBI _{EU}	Ori von p15A, Lycopinproduzent	Kn	diese Arbeit, 2.2.2
pACCAR25ΔcrtE	<i>crt</i> Gencluster von <i>Erwinia uredovora</i> in pACYC184, <i>crtE</i> deletiert	Cm	Misawa, Kirin Brewery, Japan
pACCAR25ΔcrtB	wie vorheriger, jedoch <i>crtB</i> deletiert	Cm	Misawa
pACCAR25ΔcrtI	wie vorheriger, jedoch <i>crtI</i> deletiert	Cm	Misawa
pACCAR25ΔcrtY	wie vorheriger, jedoch <i>crtY</i> deletiert	Cm	Misawa
pACCAR16ΔcrtX	wie vorheriger, jedoch <i>crtX</i> deletiert	Cm	Misawa <i>et al.</i> (1995a)

2.2.1 *Corynebacterium* / *E. coli* Shuttle Vektor pC1

Der Shuttle Vektor pC1 (Abb. 2-1B) wurde freundlicherweise von Dr. Miki Kobayashi (Mitsubishi Chemicals, Japan) zur Verfügung gestellt. Da sich der Vektor im Rahmen dieser Arbeit als sehr nützlich erwies und häufig verwendet wurde, jedoch noch nicht veröffentlicht wurde, folgt hier eine kurze Beschreibung. Als Ausgangsplasmide dienten der *Corynebacterium* Vektor pAM330 (Miwa *et al.*, 1984), der auch unter dem Namen pBL1 (aus *Brevibacterium lactofermentum* isoliert) beschrieben wurde (Abb. 2-1A), und der *E. coli* Vektor pHSG398 (Takara Shuzo Co. Ltd., Japan), ein pUC18-Abkömmling mit Chloramphenicol Resistenzgen. Beide Vektoren wurden mit *Hind*III linearisiert und miteinander ligiert. Die Expression eines in die MCS klonierten Gens erfolgt in *B. flavum* durch den *lacZ* Promotor und lässt sich durch Induktion mit IPTG steigern. In umgekehrter Orientierung erfolgt eine schwache konstitutive Expression, die auf einen Promotor aus pAM330, wahrscheinlich von ORF8 (in dem die *Hind*III-Schnittstelle sitzt), zurückgeht.

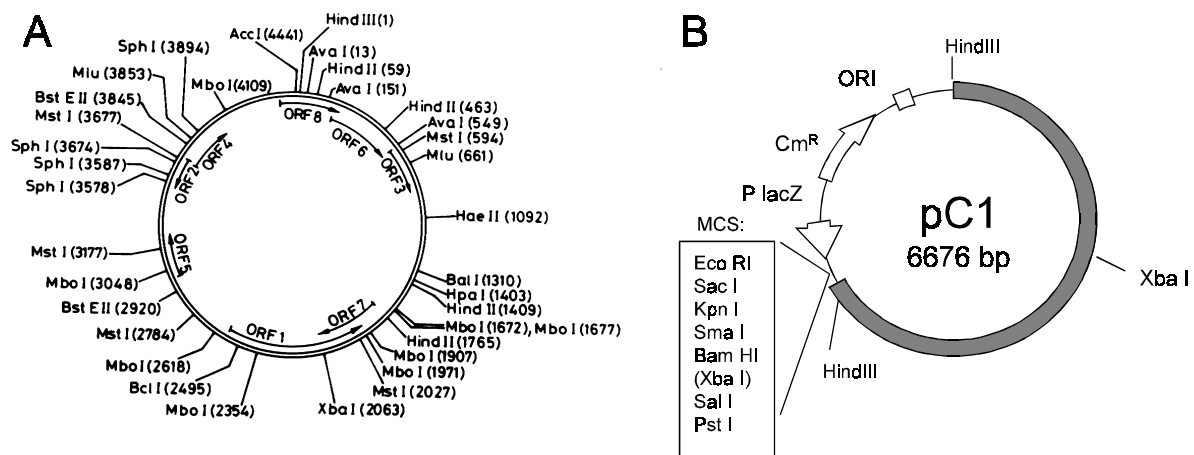


Abb. 2-1: Restriktionskarte von pC1 (B) und pBL1 (A). Der dunkel unterlegte Teil von pC1 geht auf pBL1 zurück, der helle Teil kommt von pHSG398. Die Karte von pBL1 wurde Marín (1989) entnommen.

2.2.2 Komplementierungs-Konstrukt pACKCRT-EBI_{EU}

Um einen Lycopin produzierenden Konstrukt mit einem kompatiblen Origin zu ColEI und einer anderen Resistenz als Chloramphenicol zu erhalten, wurde pACCRT-EBI_{EU} mit *EcoRI* geschnitten (einzige Schnittstelle im Cm^R Gen) und mit einer Kanamycin Resistenz-Kassette (Kn^R Gene Block, Pharmacia), die mit *EcoRI* aus pMV70 (Vertès *et al.*, 1994a) herausgeschnitten wurde, ligiert. Durch *XbaI/XhoI*-Verdau wurde die Orientierung der eingefügten Kassette überprüft, sie befindet sich in der selben Orientierung, die das Chloramphenicol Resistenzgen hatte. Das neue Plasmid pACKCRT-EBI_{EU} verleiht Resistenz zu Kanamycin, hat einen Origin, der sich von p15A ableitet und produziert Lycopin.

2.2.3 Modifizierte pQE Expressionsvektoren

Der Vektor pQE mußte für einige Anwendungen modifiziert werden, da er neben der bekannten Ampicillin-Resistenz auch noch ein Chloramphenicol-Resistenz Gen (*cat*) besaß, was Komplementierungen mit anderen Chloramphenicol resistenten Plasmiden (z.B. pACYC184-Abkömmlingen) beeinträchtigen kann. Die Plasmide pQE30 und pQE31 wurden *PvuII/NcoI* aufgeschnitten, mit Klenow Enzym behandelt und religiert. Plasmid pQE32 trug zwei *NcoI* Schnittstellen und wurde daher *PvuII/MscII* aufgeschnitten und religiert. Sämtliche verwendeten Schnittstellen lagen innerhalb des *cat* Gens. Die modifizierten Plasmide mit deletiertem *cat* Gen wurden pPQE30, pPQE31 und pPQE32 genannt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Alle gängigen Methoden wie DNA-Restriktionsverdauung, DNA-Trennung in Agarosegelen, DNA-Ligationen, wurden nach der Methodensammlung von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Elu-Quick (Schleicher & Schuell). Restriktionsenzyme wurden überwiegend von Eurogentec bezogen, T4 DNA Ligase von MWG, nicht-radioaktive Markierungs- und Detektionsreagentien von Boehringer Mannheim. Sofern nicht anders erwähnt, stammten PCR Chemikalien von Eurogentec, es wurde überwiegend „Gold Star“ Taq Polymerase von Eurogentec verwendet.

2.3.1 DNA-Isolation

2.3.1.1 Plasmid Minipräparation „Rapid“

Dies ist eine schnelle Methode zur Isolation von Plasmiden aus *E. coli*, die DNA in ausreichend guter Reinheit lieferte. Sie wurde für die meisten Routinepräparationen verwendet.

1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden in einem Eppendorfgefäß 30 Sekunden auf der höchsten Stufe einer Tischzentrifuge (16.000 x g) pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 50 µl H₂O bidest. resuspendiert. Daraufhin wurden 300 µl TENS (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA, 0,5% SDS, 0,1 M NaOH, auf pH 8 eingestellt) hinzugegeben, kurz gevortext, um die Zellen aufzuschließen, und anschließend 150 µl 3-5 M NaAcetat, pH 5,3 dazugegeben, um Proteine auszufällen. Es wurde erneut gevortext und die Probe 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch das folgende Zentrifugieren (5 min auf höchster Stufe einer Tischzentrifuge) wurden Proteine und sonstige Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in eine neues Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 800 µl Ethanol gefällt. Nach kurzem Schütteln der Probe wurde für 3 bis 5 Minuten zentrifugiert (höchste Stufe einer Tischzentrifuge), der Überstand verworfen und 500 µl 80 % Ethanol hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 1 bis 2 Minuten wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet 5 bis 15 Minuten in einem Exikator getrocknet. Die so isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend in 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8 resuspendiert.

2.3.1.2 Plasmid Präparation aus Coryneformen Bakterien

Um DNA aus *Brevibacterium* oder *Corynebacterium* zu isolieren, mußte zuerst die stabile Zellwand dieser Gram-positiven Bakterien aufgebrochen werden. Dazu wurden die pelletierten und in 50µl 10 mM Tris-HCl, pH 8 resuspendierten Zellen mit 10 µl Lysozym (10 mg/ml) bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Hierauf folgte eine normale Plasmid-Präparation, wie sie auch für *E. coli* angewandt wurde.

2.3.1.3 Isolation genomischer DNA

Für die Erstellung einer Gen-Bibliothek von *B. linens* wurde genomische DNA hohen Molekulargewichts und hoher Reinheit mit Hilfe von Genomic-tip 500/G (Qiagen) unter Befolgung der Herstellerangaben für Gram-positive Bakterien isoliert. Kleinere Mengen genomischer DNA nicht so hoher Qualität wurde nach Ausubel *et al.* (1995) mit CTAB isoliert.

2.3.2 Transformation von *E. coli*

2.3.2.1 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Um kompetente Zellen zu erhalten wurde von einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli*-Stamms 100 mL LB-Medium 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,4 bis 0,5 wachsen gelassen. Die Zellen wurden auf Eis heruntergekühlt und für 10 Minuten pelletiert (2600 x g). Das Pellet wurde in 20 ml TFB1-Puffer [30 mM K-Acetat, 50 mM MnCl₂, 400 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8, steril filtriert] resuspendiert und für 1,5 bis 2,5 Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 Minuten zentrifugiert (650 x g), das Pellet vorsichtig in 4 ml TFB2-Puffer [10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerin, pH 7,0, steril filtriert] aufgenommen und die kompetenten Zellen in 200 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert.

Um die so vorbereiteten Zellen zu transformieren wurden sie auf Eis aufgetaut und Plasmid-DNA zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 Minuten, und eine weitere Inkubation für eine Minute auf Eis, bevor 800 µl LB-Medium zugegeben wurden. Die Zellen wurden 1 Stunde bei 37 °C regeneriert und anschließend meist ein 100 µl-Aliquot auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

2.3.2.2 Schnelltransformation

Die hier beschriebene Schnelltransformation ist eine besonders einfache Methode kompetente *E. coli*-Zellen zu erhalten. Die so erhaltenen Zellen sind jedoch nicht so kompetent wie die durch andere Methoden erhaltenen Zellen. Daher wurde in der Schnelltransformation nur „supercoiled“ Plasmid-DNA eingesetzt, Ligationsprodukte eigneten sich hierfür nicht.

Je nach Größe wurden 5 bis 15 Kolonien mit einem Zahnstocher von einer Platte genommen und in 100 µl Schnelltransformationspuffer [0,1 M CaCl₂, 1 % PEG 6000 (w/v), pH 8] resuspendiert. Die Zellen wurden 5 Minuten auf Eis inkubiert, 3 bis 5 µl Plasmid-DNA zugegeben und weitere 8 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgte durch 30-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen für weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert und 900 µl LB-Medium zugegeben. Nach Regeneration der Zellen für 1 Stunde bei 37 °C wurden sie auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert.

2.3.2.3 Elektroporation von *E. coli*

Die höchsten Transformationsraten von *E. coli* wurden durch Elektroporation erreicht. Hierzu wurde das Elektroporationssystem Cellject Basic (Eurogentec) verwendet. Kompetente Zellen wurden durch mehrfaches Waschen mit H₂O bidest. nach Herstellerangaben hergestellt, die Transformation wurde ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 2 mm Küvetten bei einer Spannung von 2.400 V verwendet, der Widerstand parallel zur Probe betrug 132 Ohm, die Kapazität 40 µF.

2.3.3 Transformation von *B. flavum*

B. flavum wurde durch Elektroporation transformiert. Die dafür nötigen kompetenten Zellen wurden aus einer Über-Nacht-Kultur 1:100 auf 100 ml LB-Medium überimpft und bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Nach Zugabe von PenicillinG mit einer Endkonzentration von 1 U/ml wurden die Zellen weitere 2 Stunden bei 30 °C unter Schütteln angezogen. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis gekühlt und bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert (2.600 x g). Nach Waschen mit 20 ml 15% eisgekühltem Glycerin, und anschließender Zentrifugation wurden die kompetenten Zellen in 3 ml 15% Glycerin aufgenommen und in 120 µl-Aliquots bei -70 °C eingefroren.

Die Elektroporation erfolgte mit den auf Eis aufgetauten Zellen in 1 mm Küvetten (Bio-Rad) mit einem „Gene Pulser II“ (Bio-Rad) und angeschlossenem „Pulse Controller II“ (Bio-Rad). Die Spannung der Elektroporation betrug 1,95 kV, die Kapazität 25 μ F und der Parallelwiderstand 200 Ohm (Vertès *et al.*, 1993). Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt, 2 Stunden bei 30 °C regeneriert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

2.3.4 Transformation von *C. glutamicum*

C. glutamicum wurde mittels Elektroporation transformiert. Die dafür benötigten kompetenten Zellen wurden aus einer Über-Nacht-Kultur 1:100 auf einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml INH-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 2 g/l Glucose-Monohydrat, 25 g/l Glycin, 1 g/l Tween 80, 1,5 g/l Isonicotinsäurehydrazid) überimpft und unter Schütteln bei 30 °C inkubiert bis eine OD₅₈₀ von 0,2 bis 0,5 erreicht war. Die Zellen wurden 10 Minuten auf Eis gekühlt und bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert (2500 x g). Das Pellet wurde im gleichen Volumen eiskaltem 15% Glycerin resuspendiert, erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und in eiskaltem 15% Glycerin resuspendiert, so daß die Konzentration mindestens 10⁹ Zellen pro ml betrug (für *C. glutamicum* gilt: OD₅₈₀ 1 = 10⁸ Zellen pro ml). Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 30 Sekunden in einer Tischzentrifuge mit höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem 15% Glycerin gewaschen und jeweils 30 Sekunden zentrifugiert. Die Zellen wurden jeweils in 60 μ l 15% Glycerin (eiskalt) aufgenommen und bei -70°C eingefroren.

Die Elektroporation erfolgte mit den auf Eis aufgetauten Zellen in 2 mm Küvetten (Bio-Rad) mit einem „Gene Pulser II“ (Bio-Rad) und angeschlossenem „Pulse Controller II“ (Bio-Rad). Die Spannung bei der Elektroporation betrug 2,5 kV, die Kapazität 25 μ F und der Parallelwiderstand 400 Ohm. Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium für 2 Stunden bei 30 °C regeneriert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, daß sich *C. glutamicum* auch mit der für *B. flavum* beschriebenen Methode transformieren läßt.

2.3.5 Cosmid Bibliothek von *B. linens*

Eine Cosmid Bibliothek von *B. linens* wurde mit dem Cosmid Vektor SuperCos1 (Stratagene) erstellt. Nach Herstellerangaben wurde genomische DNA partiell mit *Sau3A* verdaut, und die erhaltenen Fragmente in die *Bam*HI-Schnittstelle von SuperCos1 ligiert. Die Ligationsprodukte wurden mit Hilfe des Verpackungskits „Gigapack III Gold Packaging Extract“ (Stratagene) entsprechend den Herstellerangaben in Phagenköpfe verpackt, und *E. coli* NM554 mit ihnen transfiziert.

Die Anzahl der zu screenenden Klone in Abhängigkeit von Insertgröße und Genomgröße wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-a/b)$$

Wobei N = Anzahl der benötigten Klone, P = Wahrscheinlichkeit, daß eine bestimmte Sequenz enthalten ist, a = die durchschnittliche Insertgröße und b = die Größe des zu screenenden Genoms ist (Clarke und Carbon, 1976).

2.3.6 Expressions-Bibliothek von *B. linens* in *B. flavum* Pigmentmutanten

Um eine Expressions-Bibliothek herzustellen wurden 0,3 µg genomischer *B. linens*-DNA partiell mit *Sau3A* geschnitten, auf einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA aus dem Bereich von 1,5 bis 6 kb mit GeneClean (Bio 101 Inc., La Jolla, USA) aus dem Gel eluiert. Diese DNA wurde mit 0,4 µg Plasmid pC1 (*Bam*HI-geschnitten und dephosphoryliert) ligiert und ultrakompetente *E. coli* HB101 (Takara) mit dem Ligationsprodukt transformiert. Die resultierenden Kolonien wurden mit LB-Medium von den Platten gewaschen und die Plasmid DNA mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kit (Qiagen-tip 500) nach Herstellerangaben isoliert. Dieser erste Transformationsschritt diente der Amplifikation der Bibliothek und war nötig, da die Transformationsrate von *E. coli* JM110 sehr niedrig ist. Ein Aliquot dieser Präparation wurde verwendet, um *E. coli* JM110 durch Elektroporation zu transformieren. Die daraus resultierenden Kolonien wurden wiederum von den Platten gewaschen und die Plasmide durch Qiagen Maxi-Kit isoliert. Dieser zweite Transformationsschritt wurde benötigt, um aus *E. coli* JM110 nicht-methylierte DNA zu erhalten, da sich *B. flavum* nur mit dieser erfolgreich transformieren ließ.

Die so ligierte, amplifizierte und nicht-methylierte DNA diente dazu, die *B. flavum*-Pigmentmutanten zu komplementieren.

2.3.7 Klonierungen

2.3.7.1 Deletion von ORF9 und von ORF7 + ORF8 + ORF9 in *B. flavum* durch homologe Rekombination

In *B. flavum* wurden Gene durch homologe Rekombination inaktiviert. Dabei wurde im Wesentlichen der Vorgehensweise von Inui *et al.* (1993) gefolgt, wo dies erstmalig für *B. flavum* beschrieben wurde. Das Prinzip beruht hierbei auf der Integration eines homologen Fragmentes in das Genom durch Rekombination. Das zu integrierende Fragment sitzt auf einem Plasmid, das in dem Wirtsorganismus nicht repliziert wird, außerdem befindet sich sein Resistenzmarker auf diesem Plasmid. In den meisten Fällen findet eine einfache Rekombination statt, bei der das gesamte Plasmid ebenfalls in das Genom integriert wird. Somit kann ein in dieser Region liegender ORF unterbrochen werden. Eine Resistenz gegenüber dem entsprechenden Antibiotikum dient als Selektionsmarker für eine erfolgreiche Integration.

Da sämtliche zur Verfügung stehende *B. flavum* Stämme Transposonmutanten waren und folglich eine Kanamycin Resistenz trugen, wurde ein weiterer Selektionsmarker zur Überprüfung erfolgreicher Rekombination verwendet. Hierzu wurde ein Erythromycin Resistenz Gen (Tauch *et al.*, 1995a) durch PCR mit den Primern Ery-fw und Ery-rv aus Plasmid pCV200 (Tauch *et al.*, 1995b) amplifiziert und in pMON kloniert, man erhielt pMON-Em. Für den Konstrukt zur Inaktivierung von ORF9 wurde in einer PCR-Reaktion mit den Primern DNOT-fw und DNOT-rv ORF9 amplifiziert und in pMON kloniert. Ein Klon mit rückwärts orientiertem ORF9 wurde durch *Ecl136II* aufgeschnitten und mit dem durch *EcoRV* und *Ecl136II* herausgeschnittenem Erythromycin Gen aus pMON-Em ligiert, so daß am 3'-Ende von ORF9 280 bp fehlten.

Der Konstrukt zur Inaktivierung von ORF7, ORF8 und ORF9 wurde hergestellt, indem das Fragment in einer PCR-Reaktion mit genomischer *B. flavum* DNA und den Primern BF4 und BF3 amplifiziert, mit Klenow-Enzym behandelt und in die *Ecl136II*-Schnittstelle von pMON-Em ligiert wurde. Anschließend wurde durch Verdau mit *NdeI*, Klenow Enzym Behandlung und Religation eine Leserasterverschiebung von ORF7 erreicht. Durch ebensolche Behandlung mit *PstI* wurde anschließend ORF8 unterbrochen.

Nach Passage durch *E. coli* JM110 wurde *B. flavum* MV10 mit diesen Konstrukten transformiert.

2.3.7.2 Klonierung von ORF7, ORF8 und ORF9 aus *B. flavum*

Um die Funktionen von ORF7, ORF8 und ORF9 aus *B. flavum* zu überprüfen, wurde das entsprechende Fragment in einer PCR-Reaktion mit den Primern BF-2 und DNOT-rv mit genomischer *B. flavum* DNA als Templat amplifiziert, in pMON kloniert und die Orientierung des Inserts durch Restriktionsverdau überprüft. Ein rückwärts (in Bezug auf *lacZ*) orientierter Klon wurde mit *XhoI* linearisiert, mit Klenow Enzym behandelt, *EcoRI*-geschnitten und in Vektor pC1, der zuvor mit *EcoRI* und *Ecl136II* aufgeschnitten wurde, kloniert. Die 3 Gene befanden sich nun unter Kontrolle des *lacZ* Promotors von pC1.

Um die Funktion einzelner und mehrerer Gene testen zu können, wurden die ORFs in verschiedenen Kombinationen deletiert. ORF7 wurde durch *NdeI*-Verdau, Klenow Enzym Behandlung und Religation deletiert, ORF8 wurde durch *BstXI* Verdau, Klenow Enzym Behandlung und Religation deletiert und ORF9 wurde durch *SacI* Verdau, Klenow Enzym Behandlung und Religation deletiert. In allen Fällen erfolgte eine Verschiebung des Leserasters.

2.3.7.3 Deletionen des bifunktionellen Gens *crtYB* aus *Xyinthophyllomyces dendrorhous*

Der Konstrukt pPRcrtYB, ein cDNA Klon (AJ133646) auf dem Plasmid pBSK (Stratagene), wurde von J. Verdoes (Wageningen Agricultural University, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Aus pPRcrtYB wurde die cDNA *BamHI/KpnI* in pPQE32 kloniert, um die dort vorhandenen Stop-Codons in allen 3 Leserastern zu nutzen, man erhielt pPQEcrYB. Im Folgenden wurden mehrere Deletionskonstrukte von pPQEcrYB erstellt, um so Informationen über die Funktion unterschiedlicher Bereiche des exprimierten Proteins zu bekommen. Die Deletion in dem Konstrukt pPQEcrYB/1878 (Deletion ab Position 1878) wurde durch *HindIII*-Verdau und Religation des Vektors hergestellt. Für das Plasmid pPQEcrYB/1480 (Deletion ab Position 1480) wurde mittels PCR mit den Primern gs1 (5'-ACG GGA AAG CTT TCG GTA, Position 1480 in *crtYB* cDNA) und gs2 (5'-CCC TTT CGT CTT CAC CTC, oberhalb der Multiplen Klonierungsstelle von pPQE32) und pPQEcrYB als Templat ein Fragment amplifiziert. Dieses wurde mit Klenow Enzym behandelt, mit *BamHI* geschnitten und in Vektor pPQE32 ligiert, der zuvor mit *HindIII* linearisiert, mit Klenow Enzym behandelt und *BamHI* geschnitten wurde. Plasmid pPQEcrYB/1280 (Deletion ab Position 1280) wurde hergestellt indem pPQEcrYB mit *SphI* und *HindIII* geschnitten, mit Klenow Enzym behandelt und religiert wurde. Der Konstrukt

pPQEcrYB\514 (Deletion bis Position 514) wurde hergestellt, indem Vektor pPQEcrYB mit *AccI* verdaut und der dabei entstandene Überhang teilweise durch Klenow Enzym Behandlung mit dATP im Reaktions-gemisch aufgefüllt wurde. Anschließend wurde dieses Fragment mit *KpnI* verdaut. Das so erhaltene Fragment wurde in pPQEcrYB ligiert der zuvor mit *BamHI* verdaut wurde, dessen dabei entstandener Überhang durch Klenow Enzym Behandlung mit dATP, dGTP und dTTP im Reaktionsansatz teilweise aufgefüllt wurde und der anschließend ebenfalls mit *KpnI* verdaut wurde.

2.3.8 Southern Blot

Zur Identifizierung spezifischer DNA-Sequenzen wurde die von Southern (1975) beschriebene Transfertechnik angewendet. Die Durchführung erfolgte wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben mit der Abweichung, daß der Blot in umgekehrter Reihenfolge aufgebaut wurde, was zu einer verkürzten Transferdauer führte.

Der Blot wurde folgenderweise aufgebaut: auf eine 3-5 cm dicke Schicht saugfähigen Papiers wurden 2 Blatt trockenes Filterpapier (Whatman 3 MM) gefolgt von 3 Blatt mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0) angefeuchtetem Filterpapier gelegt. Darauf wurde der in 20 x SSC angefeuchtete Nitrozellulosefilter (Boehringer Mannheim) und das Agarosegel gelegt (Oberseite nach oben). Zwei Blatt feuchtes (20 x SSC) Filterpapier, gefolgt von einer Glasplatte, bildeten den Abschluß. Das oberste Blatt war so geschnitten, daß es in ein seitlich stehendes, mit 20 x SSC gefülltes, Gefäß hing und so den Nachfluß des Transferpuffers sicherstellte.

2.3.9 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung wurde von Scientific Research & Development GmbH, am Biozentrum der Uni-Frankfurt in Niederrursel durchgeführt. Es wurde der ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) verwendet. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde zuvor durch Tip-20 Säulchen (Qiagen) isoliert und anschließend auf 0,025 µm Membranfilterplättchen (Millipore) dialysiert. Lange DNA-Fragmente wurden im Genomic Walking sequenziert, d. h. nach einer erfolgreichen

Sequenzierungsreaktion wurden neue Primer basierend auf dem Ende dieser Sequenz synthetisiert und damit eine weitere Sequenzierungsreaktion durchgeführt.

Sollten PCR-Produkte direkt sequenziert werden, wurden sie mit dem QIAquick PCR-Reinigungskit (Qiagen) gereinigt.

2.3.10 Oligonukleotidprimer

Die Oligonukleotidprimer für PCR und DNA-Sequenzierung wurden von ARK Scientific GmbH Biosystems (Darmstadt) synthetisiert. Entsprechend der Lieferantenangaben wurden die Primer in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris, pH 8 resuspendiert (Endkonzentration 100 μ M). In Tabelle 2-4 sind die wichtigsten der im Text erwähnten Oligonukleotide aufgeführt.

Tab. 2-4: Die wichtigsten der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, die Sequenzen sind jeweils in 5'→3' Orientierung angegeben.

Name	Sequenz	Bemerkung
crtiatp1	GAG AAT TCA (AGCT)CA (AGCT)TA (AGT)CC (AGCT)CG (AGCT)CC	degenerierter Primer
crtibrevi	GAG AAT TCC (AGCT)CA (AGCT)CA (AGCT)GG (CT)GT (AGCT)GG	degenerierter Primer
BL-Uanf	GGG GAT CCA ATG ACA CAG CGT CGC CGT CCG CGT GAT CGC	<i>Bam</i> HI-Schnittstelle integriert
BL-Uend	GGG AAG CTT CAA CGA CGG CGA CGG ATG AGC	<i>Hind</i> III-Schnittstelle integriert
C1-fw	AAT TCG AGC TCG GTA CCC GG	
C1-rv	TGC CTG CAG GTC GAC TCT AG	
BLcrt-R	GTG GTA CCG GTT GGT CCA CCG TCG	<i>Kpn</i> I-Schnittstelle integriert
BLcrt-F	TGT TGG TAC CGT GGC GTC TGG CGG	<i>Kpn</i> I-Schnittstelle integriert
Reverse	CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG	
M-13	GTA AAA CGA CGG CCA GT	
6fw2	TCT GTG CTC ATG CTG TGG	
R-Tn31831	GCT CTA GGT TTC CGT AAT TTG	
L2-Tn31831	CAA CAC CTT CTT CAC GAG GCA GAC C	
BF-3	CCA AAA CAG CCA GTC AAT C	
BF-4	AGG TAC TCT CCT AGT TCT C	
BF-2	ATC CCT GAC CTC ACT GAC	
BF-6	CCC TAT GTT CCC TAA CTA TC	
BF-10iv	GGC TGC ACA ATC ATG CAC	
DNOT-rv	AAA GCA GAG TTA TAT CTG ATG	
DNOT-fw	GAA GCC GTA GTC ATG ATG G	
33fw	ACG CCT AGG CAC AAC GAG	
33rv	CGA CCT AGG TCA TGA CAG	
34fw	AGC CTA GGA ACC GGA AGG	
34rv	GGC CTA GGT CTC TGT GTC	
Ery-fw	CAC ACA TTT TGA CCC TTA AC	
Ery-rv	AGA GAG GAA GGA GTC ACC	

2.3.11 Inverse PCR

Inverse PCR wurde angewendet, um von einem bekannten DNA-Fragment ausgehend Nachbarregionen der genomischen DNA zu sequenzieren (Silver, 1993). Dazu wurden 2 µg genomischer DNA mit einer ausreichenden Menge eines Restriktionsenzym über Nacht inkubiert, Phenol-Chloroformextrahiert, mit Ethanol gefällt und in 300 µl Volumen über Nacht zur Ligation angesetzt. Die Ligationsprodukte wurden mit Ethanol gefällt und in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8 resuspendiert. Von der so vorbereiteten DNA wurden 5 µl in einer 50 µl PCR-Reaktion eingesetzt. Es wurde LA Taq (Takara) nach Herstellerangaben verwendet, zusätzlich wurde dem Ansatz 10 µl 5 fach konzentrierte Q-Solution (Qiagen) zugesetzt.

2.3.12 Software zur DNA-Sequenzwertung

Die durch Sequenzanalysen erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programms DNASIS 0.1 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd) zusammengesetzt und editiert. Ähnlichkeitsvergleiche der sequenzierten Fragmente mit Sequenzen aus Datenbanken (letzter Stand Dezember 1999) wurden mit Hilfe des Programms BLAST 2.0 (Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt. Es wurden blastx und blastp mit ihren voreingestellten Parametern verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). ORFs konnten durch das Programm Frame (Bibb *et al.*, 1984), das speziell für Organismen mit hohem GC-Gehalt der DNA geschrieben wurde, bestätigt werden. Aminosäuresequenzvergleiche durch „alignment“ wurden mit dem Programm Clustal X erstellt (Thompson *et al.*, 1997). Die einzelnen Aminosäuren der so angeordneten Sequenzen konnten entsprechend dem Grad ihrer Übereinstimmung durch das Programm Boxshade v3.2 farbig unterlegt werden (Kay Hofmann, Bioinformatics Group, ISREC, Lausanne, Schweiz und Michael D. Baron, Institute for Animal Health, Pirbright, England). Ein paarweiser Sequenzvergleich über die gesamte Länge von zwei Polypeptiden wurde mit dem Programm Align (Myers und Miller, 1988) mit den voreingestellten Werten durchgeführt (<http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>). Dabei wurde die Matrix BLOSUM50 verwendet. Der durch Align ermittelte Wert „% Identität“ wurde in dieser Arbeit übernommen, auch wenn es sich hierbei genaugenommen um „% der Aminosäuren, die an der selben relativen Position in den beiden verglichenen Polypeptiden nach Alignment vorkommen“ handelt. Ein weiterer paarweiser Sequenzvergleich auf Aminosäureebene wurde durch einen Homologie

Plot mit dem Programm Dotplot 2.0 (Ramin Nakisa, Imperial College of Science, Technology and Medicine, London, England) durchgeführt. Die Molmasse der abgeleiteten Genprodukte wurde mit dem Programm ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) des Schweizer Instituts für Bioinformatik errechnet (Appel *et al.*, 1994). Die Aminosäuresequenzen der hypothetischen Proteine wurden mit Hilfe des Programms ProfileScan mit Proteinprofilen aus Datenbanken verglichen (http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html). Mögliche Membran durchspannende Regionen der hypothetischen Proteine wurde mit dem Programm DAS (Cserzo *et al.*, 1997) vorhergesagt (<http://www.biokemi.su.se/~server/DAS>).

2.4 Carotinoanalytik

2.4.1 Carotinoextraktion

Die zu extrahierenden Zellen, meist aus 50 ml-Kulturen, wurden durch Zentrifugation (2.600 x g) geerntet, in etwas Wasser resuspendiert und mit 10 ml Methanol bei 60 °C für 20 Minuten aufgeschlossen. Nach Abkühlen des Extrakts wurden die Carotinoide mit Äther in Petrolbenzin (1:9 v/v) ausgeschüttelt und im Rotationsverdampfer oder im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeengt.

2.4.2 Carotinoanalyse durch HPLC

Zur Auftrennung und Detektion der Carotinoide wurde ein HPLC-System verwendet. Eine HPLC-Pumpe (ERC HPLC-Pump 64) mit einem Entgaser (ERC 3315) war über eine Trennsäule (Nucleosil C₁₈, 3µ) an einen Diode Array Detektor (Kontron DAD 440) angeschlossen. Als Laufmittel wurde Acetonitril : Methanol : Isopropanol = 85 : 10 : 5 (Linden *et al.*, 1991) verwendet. Die in Aceton oder Methanol gelösten Carotinoide wurden mit einer Kloehn 50 µl Spritze über ein Rheodyne-Injektionsventil mit einer 20 µl-Schleife auf die Säule aufgebracht. Die Aufzeichnung der HPLC-Läufe für bis zu vier verschiedene

Wellenlängen erfolgte über einen angeschlossenen Personal Computer mit dem Programm Ramona (Version 11.5, Nuclear Interface GmbH, Münster). Die quantitative Auswertung der HPLC-Läufe erfolgte durch Integration der Peakflächen mit Hilfe des Programms Ramona. Die mit dem Diode Array Detektor aufgezeichneten Spektren konnten mit Hilfe des Programms Waters (Version 1.61, Universität Konstanz) gespeichert werden.

Bei der Bestimmung neuer Carotinoide wurden Standards bekannter Carotinoidzusammensetzung verwendet. Diese Standards waren Decaprenoxanthin aus *Pseudomonas* sp. KK10206C (Miki *et al.*, 1994), Decaprenoxanthin Monoglucosid und Decaprenoxanthin Diglucosid aus *Arthrobacter* sp. M3 (Arpin *et al.*, 1972) sowie Lycopin, 1-Hydroxylycopin und 1,1'-Dihydroxylycopin aus *E. coli*[pACCRT-EBI_{EU}, pUCCRT-C] (Albrecht *et al.*, 1997).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Aufschluß von Bakterienzellen

Bakterien wurden durch Zentrifugation (2.600 x g) geerntet, in 1/20 ihres Kulturvolumens resuspendiert und bei 4 °C in einer 40 ml Zelle mit einer French Press Zellpresse (Aminco) aufgeschlossen. Der Druck betrug beim Aufschluß von *E. coli*-Zellen 40 MPa, beim Aufschluß von Coryneformen Bakterien betrug er 80 MPa. Dieser Vorgang wurde drei mal wiederholt. Anschließend wurde das Homogenat durch Zentrifugation (4°C, 20 min, 50.000 x g) in eine lösliche (Überstand) und in eine membranelle Fraktion (Prezipitat) getrennt.

2.5.2 In-vitro Test

Um die in *E. coli* oder *C. glutamicum* heterolog exprimierten Proteine in einem zellfreien System auf ihre Funktion zu untersuchen, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in 1/20 ihres Kulturvolumens 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,5 aufgenommen und mit einer French Press aufgeschlossen. Jeweils 0,5 ml Homogenat, Überstand und Prezipitat (siehe 5.2.1) wurden mit je 0,5 ml Substrat vermischt und bei 28 °C im Dunkeln über Nacht

geschüttelt. Als Substrat dienten Carotinoid produzierende, auf 1/20 ihres Kulturvolumens eingeeingte und durch French Press aufgeschlossene *E. coli*-Stämme.

2.5.3 SDS-Gelelektrophorese

Die analytische, denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proben, meist ganze Bakterienzellen, wurden 1:20 eingeeingt und 20 µl mit gleichem Volumen Auftragspuffer 10 Minuten gekocht und auf das Gel aufgetragen. Als Molmassenstandard wurde ein Gemisch aus sechs verschiedenen Proteinen mit den molaren Massen von 205, 116, 97, 66, 45 und 29 kDa verwendet (SDS-6H, Sigma).

2.6 Konventionen

- Wird in dieser Arbeit im Zusammenhang mit Klonierungen von „vorwärts“ und „rückwärts“ gesprochen, so bezieht sich das auf die gleiche oder entgegengesetzte Leserasterorientierung des *lacZ* Promotors eines Plasmids und des unter seiner Kontrolle stehenden Inserts.
- Ein Bakterienstamm mit einem bestimmten Plasmid wird durch eine Klammer [] dargestellt. So beschreibt z.B. *E. coli* JM101[pACCRT16] den *E. coli*-Stamm JM101 mit dem Plasmid pACCRT16.
- ORF1 bezeichnet ein Gen, Orf1 bezeichnet das entsprechende Genprodukt.

2.7 Abkürzungen

Amp	Ampicillin (Antibiotikum)
bp	Basenpaare
cfu	Kolonie bildende Einheiten
Cm	Chloramphenicol (Antibiotikum)

<i>crt</i>	Gen der Carotinoid Biosynthese
CTAB	Hexadecyltrimethyl-ammonium-bromid
DMAPP	Dimethylallyl Pyrophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Erythromycin (Antibiotikum)
FPP	Farnesyl Pyrophosphat
g	Gramm
GGPP	Geranylgeranyl Pyrophosphat
H ₂ O bidest.	zweifach destilliertes Wasser
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
IPP	Isopentenyl Pyrophosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kn	Kanamycin (Antibiotikum)
MCS	Multiple Klonierungsregion
MeOH	Methanol
min	Minute/n
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPa	Megapascall
nm	Nanometer
ORF	Offenes Leseraster
PCR	Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde/n
Tet	Tetrazyklin (Antibiotikum)
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
x g	Erdbeschleunigung

3 ERGEBNISSE

3.1 Carotinoid Biosynthese in *Brevibacterium linens*

Brevibacterium linens gehört zu den wenigen Bakterien, die das seltene Carotin Isorenieraten und sein Derivat Hydroxyisorenieraten bilden. Da die Biosynthese dieser Carotinoide aber vollkommen unbekannt war, sollten die Gene der Carotinoid Biosynthese (*crt*) aus *B. linens* isoliert werden. Von besonderem Interesse war hierbei das vermutete β -Carotin Desaturasegen, das für die Umsetzung von β -Carotin zu Isorenieraten verantwortlich sein sollte. Außerdem konnte man hoffen, bei dem zu findenden *crt* Gencluster erstmalig die *crt* Gene eines Gram-positiven Bakteriums untersuchen zu können.

Entsprechend der in Kapitel 1.3 beschriebenen Möglichkeiten der Klonierung von *crt* Genen wurde mit der Erstellung einer Cosmid Bibliothek begonnen, um so das gesamte Gencluster von *B. linens* funktionell in *E. coli* zu klonieren.

3.1.1 Erstellen einer Cosmid Bibliothek

Aus genomischer DNA von *B. linens* wurde eine Cosmid Bibliothek erstellt. Mit den in Phagenköpfe verpackten Cosmiden wurden verschiedene *E. coli*-Stämme auf ihre Transfektionsrate getestet. Der Titer, gemessen in „Kolonie bildenden Einheiten“ (cfu), betrug für die unterschiedlichen Stämme:

<i>E. coli</i> XL1 Blue	16	cfu/ μ l
<i>E. coli</i> AG1	46	cfu/ μ l
<i>E. coli</i> NM554	300	cfu/ μ l

Aufgrund der höheren Effizienz wurde *E. coli* NM554 mit dem Rest der Phagen transfiziert und man erhielt 150.000 unabhängige Klone. Anschließend wurde die Bibliothek amplifiziert und als Dauerkultur bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der Titer der amplifizierten Bibliothek betrug 4×10^5 cfu/ μ l. Bei einer geschätzten Genomgröße von 4.000 kb und einer Insertgröße der Cosmide zwischen 31 kb und 45 kb sollte das gesamte Genom von *B. linens* mit 99 % -iger Wahrscheinlichkeit in 500 Kolonien repräsentiert sein.

Um zu überprüfen, ob die Cosmid Bibliothek viele unterschiedliche Klone enthielt, wurde ein Aliquot der Bibliothek ausplattiert, 15 Klone in 5 ml-Kulturen angezogen und die Cosmid-DNA nach der Methode einer Plasmid-Minipräparation isoliert. Nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI und Auftrennung auf einem Agarosegel erhielt man für alle Klone unterschiedliche Muster der DNA-Fragmente. Somit konnte man von einer großen Diversität der Bibliothek ausgehen. In Verbindung mit der hohen Anzahl der unabhängigen Klone, die man beim Erstellen der Bibliothek erhielt, repräsentiert sie somit mit hoher Wahrscheinlichkeit das gesamte Genom von *B. linens*.

3.1.1.1 Screenen der Cosmid Bibliothek

Da in allen bisher untersuchten Fällen der bakteriellen Carotinoid Biosynthese, ausgenommen die der Cyanobakterien, die *crt* Gene in einem Cluster vorlagen, wurde versucht ein vollständiges *crt* Gencluster in der Cosmid Bibliothek zu finden. Dabei sollte ein positiver Klon der Bibliothek dadurch identifiziert werden, daß er sich farblich von den anderen Kolonien der Bibliothek unterschied. Das *crt* Gencluster von *B. linens* würde also die Synthese von gelben oder roten Carotinoiden in einer ursprünglich farblosen *E. coli*-Kolonie der Cosmid Bibliothek verursachen.

Nachdem Teile der Bibliothek ausplattiert und die Platten nach 2-tägigem Wachstum bei 28 °C nach farbigen Kolonien abgesucht wurden, konnten jedoch unter mehreren tausend Klonen keine gelb oder rot gefärbten Kolonien gefunden werden.

Da 500 Kolonien der Bibliothek ausreichend gewesen sein sollten, um auf die beschriebene Art einen positiven Klon zu finden wurde nun eine andere Strategie verfolgt.

3.1.2 Erstellen einer Expressions-Bibliothek in *E. coli*

Daß in der Cosmid Bibliothek keine farbigen Klone gefunden wurden, kann daran gelegen haben, daß (a) der entsprechende *B. linens* Promotor nicht von *E. coli* erkannt wurde und es folglich nicht zur Expression der *crt* Gene kam, daß (b) die Gene der Carotinoid Biosynthese nicht in einem Cluster vorlagen, oder daß (c) ein oder mehrere Gene aufgrund z.B. unterschiedlicher „Codon Usage“ in *E. coli* nicht funktionell exprimiert wurden. Die unter den ersten beiden Punkten genannten Probleme sollten durch Erstellen einer Expressions-Bibliothek umgangen werden.

In einer Expressions-Bibliothek wurden 2 bis 3,5 kb große Fragmente der *B. linens* DNA unter der Kontrolle des starken *lacZ* Promotors in *E. coli* exprimiert. Dazu wurde genomische DNA von *B. linens* mit *Sau3A* partiell verdaut und auf einem Agarosegel größenfraktioniert. Nach Elution der DNA aus dem Bereich von 2 bis 3,5 kb wurde sie in den mit *Bam*HI geschnittenen und dephosphorilierten Vektor pUC18 ligiert. Mit dieser Bibliothek wurden *E. coli*-Stämme transformiert, die Konstrukte unterschiedlich deletierter *crt* Gencluster trugen. Bei erfolgreicher Komplementation durch ein exprimiertes *crt* Gen der Bibliothek kann dies leicht durch eine Farbänderung der entsprechenden Kolonie ausfindig gemacht werden (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Zum Komplementieren einer Expressions-Bibliothek verwendete Plasmid-Konstrukte, die Genprodukte der jeweils deletierten Gene und die Farbänderungen der Kolonien bei erfolgter Komplementierung.

Komplementierungs-Plasmid	komplementiertes Genprodukt	Farbänderung bei Komplementierung
pACCAR25 Δ crtE	GGPP Synthase	farblos zu gelb
pACCAR25 Δ crtB	Phytoen Synthase	farblos zu gelb
pACCAR25 Δ crtI	Phytoen Desaturase	farblos zu gelb
pACCAR25 Δ crtY	Lycopin Zyklase	rot zu gelb

Beim Überprüfen von mindestens 10.000 Transformanten pro Komplementierungsplasmid wurden keine Kolonien mit den gesuchten Farbänderungen gefunden. Bei einer Insertgröße der Expressions-Bibliothek von 2 kb ist ein 4.000 kb großes Genom zu 99%-iger Wahrscheinlichkeit in 9.200 Klonen repräsentiert. Somit war die Anzahl der untersuchten Klone hoch genug, um das gesamte Genom von *B. linens* in der Expressions-Bibliothek repräsentiert zu haben.

3.1.3 Verwendung degenerierter Primer um *crt* Gene zu klonieren

Da die Komplementierung von *E. coli* nicht zur Identifizierung der *crt* Gene aus *B. linens* führte, wurde nun ein rein molekularbiologischer Ansatz zur Klonierung dieser Gene verfolgt. Mit entsprechend gewählten Primern sollte ein möglichst stark konserviertes *crt* Gen amplifiziert werden, das als Sonde verwendet werden könnte, um das umliegende *crt* Gencluster zu identifizieren.

Bei einem Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der bekannten *crt* Gene wiesen die bakteriellen Desaturasen die höchsten Ähnlichkeiten zueinander auf. Die größten Ähnlichkeiten bestanden zwischen den Phytoen Desaturasen von *Erwinia uredovora* und *Erwinia herbicola* mit 41% Identität und 71% Ähnlichkeit auf Aminosäureebene. Die Desaturasen weisen zwei konservierte Regionen in ihrer Sequenz auf. Die eine, am N-terminalen Ende gelegene Region, ist wahrscheinlich eine Dinukleotidbindestelle; die Funktion der zweiten, C-terminal gelegenen, Region ist unbekannt (Armstrong *et al.*, 1993). Basierend auf der Aminosäuresequenz dieser konservierten Regionen wurden die degenerierten Oligonukleotide *crtiatp1* und *crtibrevi* synthetisiert und in PCR-Reaktionen mit genomischer DNA aus *B. linens* eingesetzt. Nach einigen Optimierungsschritten wurden PCR-Fragmente von ca. 1,3 kb erhalten, eine Fragmentgröße wie sie aufgrund der Primerposition in den Ausgangssequenzen erwartet wurde. Aus diesem Fragment wurde eine Sonde hergestellt und es konnte über Southern Blot bestätigt werden, daß das durch die degenerierten Oligonukleotide amplifizierte Fragment aus dem Genom von *B. linens* stammt. Nachdem das PCR-Produkt in den Vektor pUC18 kloniert und seine Nukleinsäuresequenz bestimmt wurde, konnte jedoch bei einer blastx-Suche in den Sequenz-Datenbanken keinerlei signifikante Ähnlichkeit dieses Fragments zu *crt* Genen oder anderen bekannten Genen festgestellt werden. Da es sich somit bei diesem Fragment nicht um das Gen einer Phytoen Desaturase handeln konnte, war dieser auf den konservierten Regionen von *crt* Genen beruhende Ansatz fehlgeschlagen. Ein möglicher Grund dafür war, daß ausschließlich Gensequenzen aus Gram-negativen Organismen zur Erstellung der degenerierten Oligonukleotide für dem Gram-positiven Organismus *B. linens* zur Verfügung standen.

3.1.4 Komplementierung von *Brevibacterium flavum* Pigmentmutanten

Nachdem Komplementierungsversuche des Gram-negativen *E. coli* (GC-Gehalt 51%) mit der DNA des Gram-positiven *B. linens* (GC-Gehalt 64%) für die Identifizierung der *crt* Gene von *B. linens* erfolglos blieben, wurden geeignete, näher verwandte Organismen für Komplementierungen mit *crt* Genen gesucht. Hierfür bot sich *Brevibacterium flavum*, das wie *B. linens* ein Coryneformes Bakterium ist, von dem Pigmentmutanten vorhanden waren (Vertès *et al.*, 1994a) und das sich transformieren ließ, an. Nachdem erste Untersuchungen bestätigten, daß *B. flavum* Carotinoide synthetisiert und daß seine durch Transposoninsertion erhaltenen

Pigmentmutanten eine veränderte Carotinoid Zusammensetzung haben (siehe Kapitel 3.3), wurde ein System entwickelt, um *B. flavum* mit der DNA des nahe verwandten *B. linens* zu komplementieren.

3.1.4.1 Transformationsversuche zu *B. flavum* mit genomischer DNA aus *B. linens*

B. flavum besitzt ein *mrr*- und *mcr*-ähnliches Restriktionssystem (Vertès *et al.*, 1993). Dies bedeutet, daß fremd-DNA von *B. flavum* nur erfolgreich aufgenommen wird, wenn diese nicht methyliert ist. Erreicht wurde dies, indem die zur Transformation verwendete Plasmid-DNA zuvor aus einem methylierungsdefizienten Stamm wie *E. coli* JM110 (*mcr*-, *mrr*-) isoliert wurde. Allerdings konnten nur niedrige Transformationsraten für *E. coli* JM110 erreicht werden. Durch Hitzeschock-Transformation erhielt man 10^3 Transformanten pro μg pC1-Vektor, während die Transformationsrate der Elektroporation bei 10^4 Transformanten pro μg Vektor lag.

Beim Durchführen dieser Arbeiten zeigte sich auch, daß die in nicht-methylierten Vektor pC1 ligierte genomische DNA aus *B. linens* nur dann von *B. flavum* erfolgreich aufgenommen wird, wenn dieser Konstrukt zuvor aus *E. coli* JM110 isoliert wurde. In *B. linens* liegt die genomische DNA folglich methyliert vor und wird durch das Restriktionssystem von *B. flavum* abgebaut.

3.1.4.2 Erstellen und Screenen einer *B. linens* Expressions-Bibliothek in *B. flavum*

Nach den in Kapitel 3.1.4.1 beschriebenen Vorversuchen wurde die folgende Strategie für die Erstellung einer *B. linens* Expressions-Bibliothek in *B. flavum* ausgearbeitet.

1. Ligation der *B. linens*-DNA in einen Shuttle/Expressionsvektor.
2. Amplifikation des Ligationsproduktes durch Transformation eines sehr kompetenten *E. coli*-Stamms.
3. Modifizierung des DNA-Methylierungszustandes durch Passage der Plasmidkonstrukte durch *E. coli* JM110.
4. Transformation von *B. flavum*.

Durch Transformation von *E. coli* HB101 mit dem Ligationsprodukt des Shuttle-Vektors pC1 und größenfraktionierter genomischer DNA aus *B. linens* erhielt man 36.000 Kolonien. Aus

einer entsprechenden Ligation ohne Insert-DNA erhielt man unter gleichen Bedingungen 4.800 Kolonien, so daß ungefähr 31.200 Insert tragende, unabhängige Klone vorlagen. Die Kolonien wurden von den Platten gewaschen und Plasmid DNA aus den Zellen isoliert. Die Transformation von *E. coli* JM110 mit einem Aliquot dieser Präparation ergab 25.000 Kolonien, die wieder von den Platten gewaschen wurden und deren Plasmide erneut isoliert wurden. Mit der so ligierten, amplifizierten und nicht-methylierten DNA wurden die *B. flavum*-Pigmentmutanten MV70 und MV240 transformiert.

Transformationen der roten Mutante *B. flavum* MV70 (Kapitel 3.3) ergaben nur rote Kolonien, also keine Komplementation der Carotinoid Biosynthese. Bei Transformationsversuchen der pigmentlosen Mutante MV240 wurde unter mehreren tausend farblosen Transformanten ein gelber Klon gefunden. Nach Isolation des Plasmids aus diesem Klon wurde *B. flavum* MV240 erneut mit diesem Plasmid transformiert. Sämtliche dieser Transformanten wurden gelb, was die komplementierende Eigenschaft des nun pC1CRT genannten Plasmids bestätigte.

Durch Restriktionsanalyse von pC1CRT wurde eine Größe von 1,8 kb für das Insert bestimmt. Sequenzanalyse des Inserts mit den Primern C1-fw und C1-rv, die direkt oberhalb und unterhalb der *Bam*HI-Klonierungsstelle binden und in das Insert hineinlesen, und eine anschließende Datenbanksuche ergab Sequenzähnlichkeiten des komplementierenden Inserts in pC1CRT zu Phytoen Synthesen verschiedener Organismen.

3.1.5 Sequenzanalyse des *crt* Genclusters aus *B. linens*

Da, mit Ausnahme der cyanobakteriellen, sämtliche bisher bekannten bakteriellen *crt* Gene als Gencluster vorliegen, wurde nun versucht über das in pC1CRT gefundene Gen der Phytoen Synthese den Rest des *crt* Genclusters von *B. linens* zu erhalten und zu sequenzieren.

Durch Hybridisieren einer Sonde aus dem 1,8 kb-Fragment von pC1CRT mit einer Cosmid Bibliothek von *B. linens* wurde auf ca. 400 Cosmid-Klone ein positiver Klon detektiert. Aus 20 positiven Klonen wurden die Cosmide isoliert, mit *Eco*RI geschnitten und sieben Cosmide mit unterschiedlichen Restriktionsmustern ausgewählt (Abb. 3-1A). Von diesen Cosmiden wurde ein Southern Blot angefertigt (Abb. 3-1B). Als Sonde diente wiederum das 1,8 kb-Fragment aus pC1CRT. Bis auf zwei Ausnahmen hybridisierte die Sonde zu je einem 2,5 kb- und einem 8 kb-Fragment; Cosmid 15 wies nur die 8 kb-Bande auf, während Cosmid 19 statt

der 8 kb-Bande eine 7 kb-Bande aufwies. Nach Ligation der 8 kb-Bande aus Cosmid 17 in *EcoRI*-geschnittenen Vektor pUC18 wurde das resultierende Plasmid im „Genomic Walking“ sequenziert. Anschließend wurden ebenso weitere Teile der Cosmide 17 und 19, sowie durch inverse PCR erhaltene Fragmente sequenziert. Parallel dazu wurde mit den Sequenzen eine blastx Datenbanksuche durchgeführt, die Richtung und Ausmaß der weiteren Sequenzierungen bestimmte. Insgesamt wurde so ein 14.398 bp großes Fragment doppelsträngig sequenziert, auf dem 14 offene Leseraster (ORFs) mit Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus Datenbanken gefunden wurden. Die Nukleinsäuresequenz wurde bei GenBank hinterlegt und trägt die Zugangsnummer AF139916.

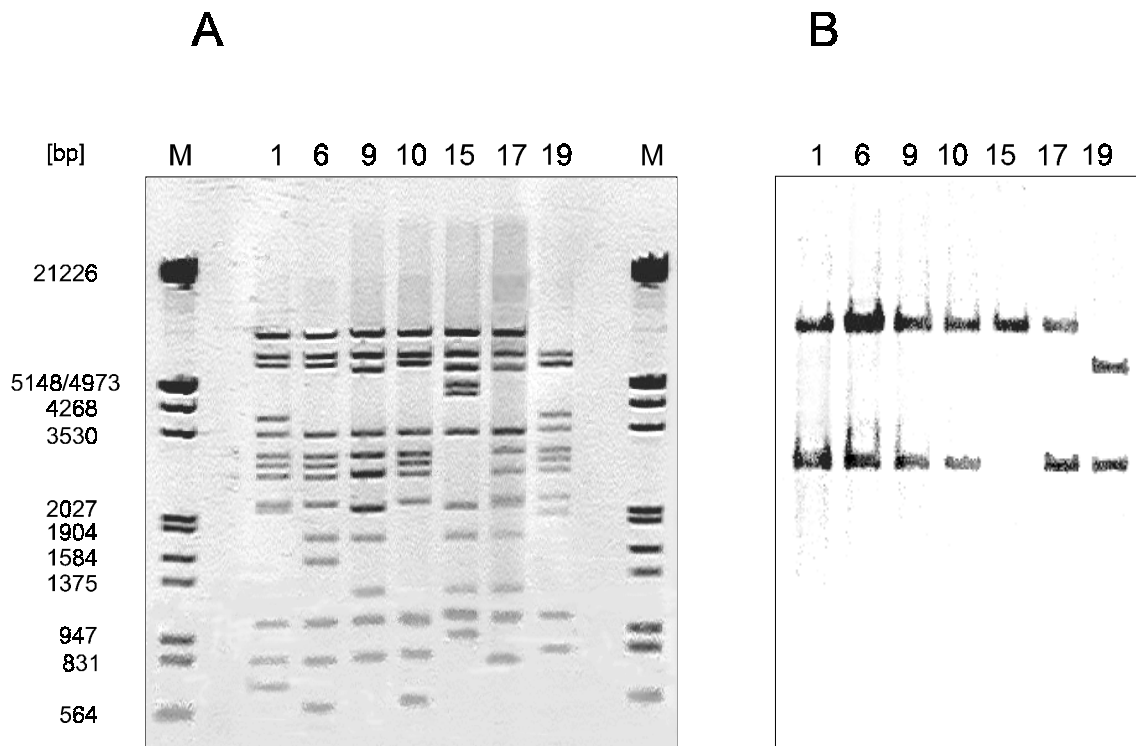


Abb. 3-1: (A) Agarosegel eines *EcoRI*-Restriktionsverdau von sieben verschiedenen Cosmiden der *B. linens* Cosmid Bibliothek. Die Cosmide wurden aus Kolonien isoliert, die zu einer Sonde aus pC1CRT hybridisierten. (B) Southern Blot von A mit dem pC1CRT Insert als Sonde. 1, 6, 9, 10, 15, 17, 19: Bezeichnung der Cosmid-Klone; M: DNA-Längenstandard in bp, erhalten durch *EcoRI/HindIII*-Verdau von λ -DNA.

3.1.6 Sequenzvergleiche des *crt* Genclusters aus *B. linens*

Auf dem sequenzierten DNA-Fragment aus *B. linens* wurden 14 ORFs mit Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus Datenbanken identifiziert. In Abbildung 3-2 sind die ORFs und ihre Anordnung dargestellt. Die Größe und die errechnete Molmasse der abgeleiteten Polypeptide sowie die besten Treffer der blastx Datenbanksuchen sind in Tabelle 3-2 zusammengefaßt.

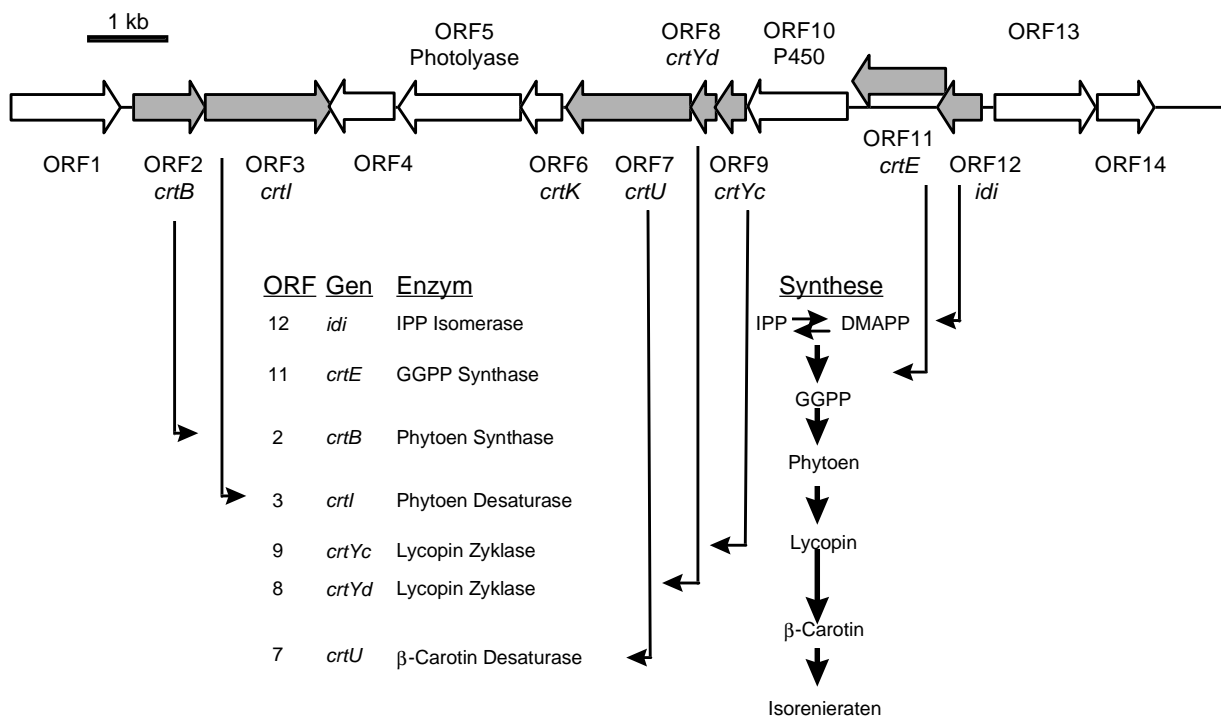


Abb. 3-2: Organisation des sequenzierten *crt* Genclusters aus *B. linens*. Die Orientierung der ORFs ist durch die Pfeile dargestellt, die an der Synthese von Carotinoiden beteiligten Gene sind grau unterlegt. Die Genprodukte und deren Syntheseschritte sind ebenfalls angegeben.

ORF1 ist an seinem 5'-Ende unvollständig, der Start des Leserasters liegt außerhalb der sequenzierten Region. Es besteht aber eine Ähnlichkeit dieses Fragments zu einem hypothetischen Protein unbekannter Funktion aus *E. coli*.

Das von **ORF2** abgeleitete Genprodukt ist den Phytoen Synthasen unterschiedlicher Organismen ähnlich. Konservierte Regionen verschiedener Phytoen Synthasen sind auch in dem abgeleiteten Polypeptid vorhanden (Abb. 3-3). ORF2 codiert somit für eine Phytoen Synthase und wird, analog zu bekannten Genen, *crtB* genannt. Bei der erfolgreichen

Komplementation der farblosen Mutante *B. flavum* MV240, deren Phytoensynthese blockiert ist (Kapitel 3.3), war ORF2 aus *B. linens* der einzige vollständige ORF auf dem komplementierenden Plasmid pC1CRT. Somit konnte das ORF2 Genprodukt auch funktionell als Phytoen Synthese nachgewiesen werden.

B.l	141	DEHRAVYVYGSAEVVGMLCLKVFLL--N16--ARQLGAFQONINFLRDLADD	SLRLGRSYLTAETR
B.l	140	DSFTTYVYGSAEVTGLLCLSVFN--N16--ARSLGAFQKINFLRDLADD	QQNLGRFYFPDNTQ
S.g	137	EELGRYMHGSAAVI GLQMLPVLC--N11--AAALGVAFQLTNFLRDVGEDLD	RGRLYLPTELL
M.t	129	SAL EBYLLGSSEVVG LFMASIMG--N8--ARYLGRAMQYVNFIRDIAEDIE	LGRLYFPMDL
N.c	427	KDLENYAIYVAGTVGELCIALII--N18--ACRMGTALQYVNIARDIVVDAR	IGRVYLPITWL
R.c	121	SDVQAYSARVAAAAGAMMCVLMR--N9--ACDLGLAMQMSNIARDVGEDAR	AGRLFLPTDWM
E.u	116	DDTLRYCYHVAGVVGLMMAQIMG--N9--ACDLGLAFQLTNIARDIVDDAH	AGRCYLPASWL
M.x	153	EELDLVYCYRVAGVVGLMLTPVLC--N9--AADLGRAMQLTNLRDVRDLE	RGRVYLPAEEL
S.6803	162	EELDLVYCYRVAGTVGLMSSAVLC--N21--AIALGVANQLTNILRDVGEDVE	RGRVYLPLEDL
L.e	234	DELVLYCYVYVAGTVGLMSVPIMG--N15--ALALGLIANQLTNILRDVGEDAR	RGRVYLPQDEL
A.t	245	DDLVLYCYVYVAGTVGLMSVPMVG--N15--ALALGLIANQLTNILRDVGEDAR	RGRVYLPQDEL

Abb. 3-3: Konservierte Regionen von Orf2 aus *B. linens* (B.l), Orf 5 aus *B. flavum* (B.f) und anderen Phytoen Synthesen aus *Streptomyces griseus* (S.g), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (M.t), *Neurospora crassa* (N.c), *Rhodobacter capsulatus* (R.c), *Erwinia uredovora* (E.u), *Myxococcus xanthus* (M.x), *Synechocystis* sp. PCC6803 (S.6803), *Lycopersicon esculentum* (L.e) und *Arabidopsis thaliana* (A.t). Die Positionen der Aminosäuren im Polypeptid sind durch Zahlen angegeben. Liegen mindestens sechs identische Aminosäuren an einer Position vor, sind sie schwarz unterlegt, ähnliche Aminosäuren sind grau unterlegt.

Das von **ORF3** abgeleitete Genprodukt ist den Phytoen Desaturasen vieler Organismen ähnlich. Konservierte Regionen bakterieller Phytoen Desaturasen vom crtI-Typ sind ebenfalls in Orf3 vorhanden (Abb. 3-4). Das Gen wurde folglich *crtI* genannt und kodiert eine Phytoen Desaturase des bakteriellen crtI-Typs.

B.l-CrtI	7	VIGGCAAGLATAALLARECHSVDLFEQNSTLGG	497	QSAMFRQONASKKVDGLYYAGATTAPGVGIPMCLIS
B.f-CrtI	17	VIGAGVAGLATSALLARDGWQVTVLEKNTDVGGR	507	QSAFLRGRNSSRKVDNLFYSGATTVPGVGIPMCLIS
M.x-CrtI	12	VVGACVGGGLAAARLAHQCFDVOVFEKTOGPGGR	476	QIGPFRPSNQDARVKNLFFVGASTPCTGIPVILIS
M.t-CrtI	24	IVGAGFGGTSAAALLAQKCLEVTVIEKNEGPGGR	484	QTALWRP SHKSKKVKNLYYTCHYTHPGIGVPMTLIS
E.u-CrtI	6	VIGAGFGGLALAIRLQAACIPVLLLEQRDKPGGR	472	QSAWFRPHNRDKTITNLYLVGACTHPGAGIPGVIGS
R.c-CrtI	13	VIGAGLGGGLAAAMRLGAKGYKVTVVDRDLDRPGGR	484	QSAWFRPHNASEEVDGLYLVGACTHPGAGVPSVIGS
S.a-CrtN	5	VIGAGVTGLAAARLASQCHEVTIFEKNNNVGGR	479	QSNYFRPQNVSRDYKDLVYFAGASTHPGAALPIVLIS
S.g-CrtI	13	VVGACLAGLAAALHLGACRRVTVVEREDVPGGR	474	QTGPFRRPNLVRGTVNAVLACCGTTPGVGVPTVLIS
X.d-CrtI	14	IVGCGIGGLATAARLAKEGFQVTVFEKNDYSGGR	501	QVLGFRPSTRHPKYDKLFFVGASTHPCTGVPVILAG
N.c-All	12	IVGAGAGGLAFAARLAKAVDVTVLEKNDFTGGR	494	NVLAFRPRTKAQGMDNAYFVGASTHPCTGVPVILAG
A.7120-Zds	6	IVGAGPGGLATAAIRLAGLYQVEIFFAAERVGGR	475	QLGPFRRPPIRSENIAGLYWICGAVHPGSGLLTILEA
R.s-CrtD	10	VVGAGMGGLASAIRLARACEVTLLEAREAPGGR	462	LASLKRPLART-ALPGLWLAGGGAHPGAGVPMMAALS

Abb. 3-4: Konservierte Regionen von Orf3 aus *B. linens* (B.l-CrtI), Orf6 aus *B. flavum* (B.f-CrtI) und anderen crtI-Typ Phytoen Desaturasen aus *Myxococcus xanthus* (M.x-CrtI), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (M.t-CrtI), *Erwinia uredovora* (E.u-CrtI), *Rhodobacter capsulatus* (R.c-CrtI), *Streptomyces griseus* (S.g-CrtI), *Xanthophyllomyces dendrorhous* (X.d-CrtI), *Neurospora crassa* (N.c-All), der ζ-Carotin Desaturase aus *Anabaena* PCC7120 (A.7120-Zds), der Methoxyneurosporin Desaturase aus *Rhodobacter sphaeroides* (R.s-CrtD) und der Diapophytoen Desaturase aus *Staphylococcus aureus* (S.a-CrtN).

Das abgeleitete Genprodukt von **ORF4** zeigte bei Datenbanksuchen die höchste Ähnlichkeit zu einem Sulfolipid Biosynthese Protein (Benning und Somerville, 1992). Die Funktion von ORF4 ist unklar und steht möglicherweise nicht im Zusammenhang mit der Synthese von Carotinoiden.

Das Genprodukt von **ORF5** hat hohe Ähnlichkeiten zu Mitgliedern der Photolyase-Blaulicht Photorezeptor Familie. Diese Familie umfaßt sowohl Blaulicht Rezeptoren als auch Photolyasen. Eine umfassende Diskussion dieser Proteinfamilie in Zusammenhang mit ORF5 erfolgt in Kapitel 4.6.

Das Genprodukt von **ORF6** weist bei Datenbanksuchen hohe Ähnlichkeiten zu CrtK aus dem *crt* Cluster von *Rhodobacter sphaeroides* und zu einem mitochondriellem Benzodiazepin Rezeptor aus Säugetieren auf. In *R. sphaeroides* ist CrtK an der sauerstoff- und licht-abhängigen Regulation der Carotinoidbiosynthese beteiligt (Yaliseev und Kaplan, 1995). Demnach könnte Orf6 an der lichtabhängigen Regulation der Carotinoid Biosynthese beteiligt sein, die für einige Stämme von *B. linens* beschrieben wurde (Mulder *et al.*, 1966; Crombach, 1974).

Das Genprodukt von **ORF7** hat hohe Ähnlichkeiten zu dem Gen *crtU* aus dem *crt* Gencluster von *Streptomyces griseus* (Schumann *et al.*, 1996). In *S. griseus* wurde *crtU* kürzlich als Gen der β -Carotin Desaturase identifiziert, dessen Genprodukt an der Umsetzung von β -Carotin zu Isorenieraten beteiligt ist (Krügel *et al.*, 1999). Da sowohl *B. linens* als auch *S. griseus* das aromatische Carotin Isorenieraten bilden wird gefolgert, daß ORF7 eine β -Carotin Desaturase kodiert. ORF7 wird *crtU* genannt.

Die hypothetischen Genprodukte von **ORF8** und **ORF9** sind relativ klein und haben ähnliche Aminosäuresequenzen. Es bestehen Ähnlichkeiten zu den hypothetischen Genprodukten unbekannter Funktion von je zwei benachbarten ORFs aus *Mycobacterium marinum* und *Myxococcus xanthus* (CAA79961, CAA79962). Diese ORFs liegen in *Mc. marinum* und *Mx. xanthus* jeweils in der unmittelbaren Umgebung von *crt* Genen.

Das Genprodukt von **ORF10** wurde aufgrund von Sequenzähnlichkeiten als ein Cytochrom P450 Enzym identifiziert. Eine klar konservierte C-terminale Häm-Binderegion, typisch für P450 (Graham-Lorence und Peterson, 1996), wurde durch ProfileScan (PS00086) identifiziert (Abb.3-5).

-GSAATGLS-341-**FSDGAHTCPG**-350-QPLALYET-

Abb. 3-5: Die C-terminale Häm-Binderegion von ORF10 aus *B. linens* ist in fetten Buchstaben wiedergegeben, die Zahlen geben die Position der ersten und letzten Aminosäure dieses Motivs in Orf10 an.

ORF11 konnte aufgrund seiner Sequenzähnlichkeiten als Gen der Geranylgeranyl Pyrophosphat (GGPP) Synthase identifiziert werden und wurde folglich *crTE* genannt. Die konservierten Bereiche der GGPP Synthasen, wie sie von Carattoli *et al.* (1991) und von Ogura *et al.* (1997) für Prenyl Transferasen beschrieben wurden, sind in ORF11 ebenfalls vorhanden (Abb. 3-6).

		I	II	III
B.l	81	GGKLRPRMLL--N17--ACA---MQLLHIALVTHDDV--IDNDTIRRG	EATIS--N19--WGIATSILG	GDLLILTLSH
B.f	68	GGKLRPRMLL--N20--AAA---LELLEHFSLLVHDDV--IDGDLYRRG	KLNFI--N23--WAQSNGLLM	CNLF
R.c	38	GGARLRPTILV--N17--AVA---LELMHCASLVHDDLPAFDNADIRRG	KPSLH--N2---YNEPLAVLAGD	SLLIRGF
E.u	51	PGKLRPRMLLL--N18--ACA---VEMVHAASLILDDMPCDDAKLRRG	RPTIH--N2---YGEHVAILA	AAVALLSKAF
S.a	41	GGKLRPLIILT--N16--GAA---IEVLHFTLVHDDI--MDQDNIRRG	LPTVH--N2---YGLPLAILAGD	LHAKAF
S.g	82	GGKLRPRLLW--N17--GVA---LELIQSCALVHDDV--MDRSRLRRG	QAMH--N18--FGASA	AVLAGDLALVWAD
M.x	63	PAKLRPALVM--N19--AAG---LELLEHFTLVHDDV--ADQAE	LRGAPLH--N7---AGEDL	AVVGDHIFARAL
N.c	130	PGKDIRSQMVK--N16--TKV---ISMLEHIASLVVDDVE--DNSVLR	RRGFVAH--N2---FGIPQ	TINTSNVYFYAL
S6803	50	GGKLRPIILCT--N16--ACA---LEMIEHTMSLIEHDDLPSMDNDD	FRRGKPTNH--N2---YGEDT	AILLAGDGLLAYAF
A.t	114	GGKLRPVLCT--N18--RCA---VEMIEHTMSLIEHDDLPCMDNDD	LRGKPTNH--N2---FGEDV	AVLAGDALLSFSF
C.a	116	GGKRVPRMLCL--N16--ACA---VEMIEHTMSLIEHDDLPCMDNDD	LRGKPTNH--N2---YGEDV	AVLAGDSLAFAF
Oct	43	GGKLRPMLAV--N16--AAL---IEFIHATLVHDDV--VDES	DMRRGKATAN--N2---FGNAAS	VLVGDFIYTRAF
FPP-S	45	GGKLRGLSVI--N20--SALGWCI	EWLQAYFLVDDI--MDNSHT	RRGHP
			CWF--N3---KVGMI	APNDQVVLRNHIP

		IV	V	VI
B.l	206	GEHSDV--N14--LAMVDQ-KTAVYSE	QAPLLIAAVLAG--N16--GVLYQLR	DDVGLGFDERETGKSNVSD
B.f	201	GEFLDV--N14--LEMSRL-KTATYSE	FELPMRAAAILAE--N16--GLAMQLO	DDYLSTFGDAAEHGKDAFSD
R.c	152	GOAWES--N5---LAAYHQAKTG-ALFFIA	TATQMGATAAG--N13--GSAFQI	ADDLKDALMSAEAMKPAQODIANERP
E.u	165	GOFKDL--N12--DMTNHF-KTS-TLFC	ASMQMASIVAN--N16--GOAFQL	LDLTDGMTDT---GKDSNQDAG--KST
S.a	150	GOAVDM--N13--DMISR-KTA-ALFSA	SSSICALIAG--N16--GIAFQI	VDDILGLTADEKELGKPVFSD
S.g	206	GOYLDL--N13--LRTACL-KSASYS	VERPLAIGALAG--N16--GIAFQL	RDDLLGVFGDPALTGKPS
M.x	176	GOYLDL--N15--LRVAHL-KTARYG	FQAPLVCAAMLG--N16--GLAVQL	RDDLLGLFGDSNVACKAADGDFLQ
N.c	242	GOGMDL--N14--DEMVSN-KTG-GLR	RLGIKLMOAESR--N12--GLIFQI	ADYHNLWNREYTANKGMCEDL
S6803	163	GOVLDL--N12--LTFIHTHTG-ALLE	ASVLTGAILAG--N16--GIAFQV	VDDILDITATQEBELGKTACKD
A.t	229	GOVVDI--N14--DEFIHLHKA-ALLE	ASAVLCAIVG--N16--GLIFQV	VDDILDVTKSSEELGKTACKDL
C.a	229	GOVADI--N12--DEFIHVHKA-ALLE	SSVVLGAILG--N16--GLIFQV	VDDILDVTKSSEELGKTACKDL
Oct	148	GOLMNV--N9---YMRVIYSKA-RL	FBAQAQCSGILAG--N16--GIAFQ	LDDLDYNADGEQLGKNVGD
FPP-S	160	GOMIDL--N18--RRIVQY-KTAYY	SEYLPVACALLMG--N16--GTYFQV	DDYLD

Abb. 3-6: Sequenzvergleich mehrerer GGPP Synthasen und anderer Prenyl Transferasen mit Orf11 (CrTE) aus *B. linens* und Orf3 (CrTE) aus *B. flavum*. GGPP Synthasen aus *B. linens* (B.l), *B. flavum* (B.f), *Rhodobacter capsulatus* (R.c), *Erwinia uredovora* (E.u), *Sulfolobus acidocaldarius* (S.a), *Streptomyces griseus* (S.g), *Myxococcus xanthus* (M.x), *Neurospora crassa* (N.c), *Synechocystis* sp. PCC6803 (S.6803), *Arabidopsis thaliana* (A.t) und *Capsicum annuum* (C.a). Oct: Octaprenyl Transferase aus *Escherichia coli*, FPP-S: FPP Synthase aus *Lupinus albus*. I-VI: Konservierte Regionen der Prenyl Transferasen (Ogura *et al.*, 1997).

Das Genprodukt von **ORF12** wurde aufgrund seiner Sequenzähnlichkeiten als Isopentenyl Pyrophosphat (IPP) Isomerase identifiziert, das Gen wurde *idi* genannt. Sequenzvergleiche zwischen mehreren IPP Isomerasen und Orf12 machen deutlich, daß die konservierten Regionen der IPP Isomerasen ebenfalls in Orf12 vorhanden sind (Abb. 3-7). Die zwei Aminosäuren, Cys 139 und Glu 207, die für die katalytische Aktivität der IPP Isomerisierung benötigt werden (Street *et al.*, 1994), sind ebenfalls in Orf12 konserviert.

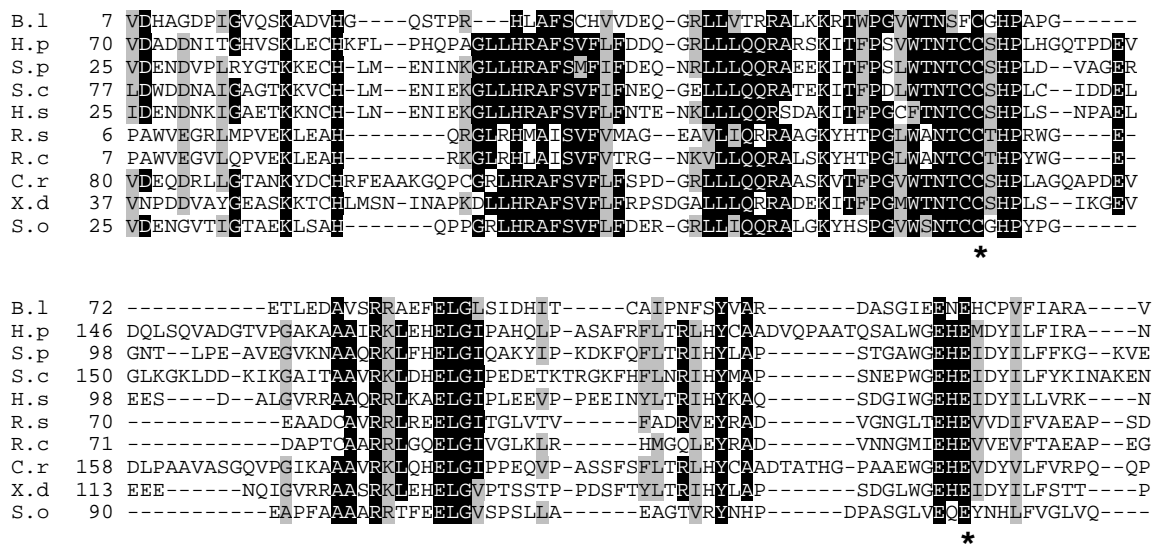


Abb. 3-7: Sequenzvergleich von Orf12 aus *B. linens* (B.l) und verschiedenen IPP Isomerasen aus *Haematococcus pluvialis* (H.p), *Schizosaccharomyces pombe* (S.p), *Saccharomyces cerevisiae* (S.c), *Homo sapiens* (H.s), *Rhodobacter sphaeroides* (R.s), *Rhodobacter capsulatus* (R.c), *Chlamydomonas reinhardtii* (C.r), *Xanthophyllomyces dendrorhous* (X.d) und *Streptomyces coelicolor* (S.o). Die für die katalytische Aktivität benötigten Aminosäuren Cystein 139 und Glutaminsäure 207 (Street *et al.*, 1994) sind durch Sterne gekennzeichnet.

Die hypothetischen Genprodukte von **ORF13** und **ORF14** wiesen keine Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannter Funktion auf. Über ihre Funktion kann somit aufgrund von Sequenzvergleichen keine Aussage gemacht werden.

Tab. 3-2: ORFs des sequenzierten DNA-Fragmentes aus *B. linens* und die berechneten Größen und Molmassen ihrer hypothetischen Genprodukte sowie die besten blast-Treffer der Datenbanksuchen. AA: Anzahl der Aminosäuren, MG: Molmasse in kDa. Ident.: Identität der Aminosäuresequenz zwischen ORF und den in Datenbanken gefundenen Sequenzen. Genp.: Bezeichnung der vermutlichen Genprodukte. Blast-Score und E value sind blast-spezifische Werte.

ORF	Genp.	AA	MG	bester blast-Treffer	Blast-Score	E value	Ident. (%)
1		(a)	(a)	Hypothetisches Protein, <i>Escherichia coli</i> , (BAA35583)	196	2×10^{-49}	(a)
2	CrtB	299	32,7	Phytoen Synthase, <i>Mycobacterium marinum</i> , (AAB71428)	97	2×10^{-19}	28,6
3	CrtI	528	57,7	Phytoen Desaturase, <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> , (AAB86273)	266	2×10^{-70}	33,2
4		270	29,8	Sulfolipid Biosynthese Protein sqdC, <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , (C45729, gi: 538857)	46	3×10^{-04}	25,5
5	Phr	487	54,6	Blaulich Photorezeptor, <i>Adiantum capillus-veneris</i> , (BAA32807)	233	3×10^{-60}	26,7
				DNA-Photolyase, <i>Synechocystis</i> PCC6803, (Q55081)	223	2×10^{-57}	31,7
6	CrtK	172	18,8	CrtK (TspO), ähnlich zu 17 kD Säugetier mitochondriellem Benzodiazepin Rezeptor, <i>Acidiphilium rubrum</i> , (BAA76530)	102	10^{-21}	35,4
7	CrtU	517	57,0	β -Carotin Desaturase, <i>Streptomyces griseus</i> , (CAA64853)	395	10^{-109}	48,3
				hypothetisches Protein, <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, (BAA17934)	99	5×10^{-20}	25,3
8	CrtYd	107	12,5	unbekannte Fkt., <i>Mycobacterium marinum</i> , (AAB71430)	111	10^{-24}	27,1
9	CrtYc	125	13,9	unbekannte Fkt., <i>Mycobacterium marinum</i> , (AAB71429)	100	5×10^{-21}	39,4
10	P450	409	45,5	Cytochrom P450, <i>Mycobacterium leprae</i> , (CAA15483)	58	10^{-07}	21,9
11	CrtE	385	41,6	GGPP Synthase, <i>Streptomyces griseus</i> , (AAA91949)	135	6×10^{-31}	28,1
12	Idi	182	20,0	hypothetisches Protein, <i>Escherichia coli</i> , (AAA83070)	167	4×10^{-41}	46,2
				IPP Isomerase, <i>Streptomyces coelicolor</i> , (CAB40700)	99	2×10^{-20}	33,5
13		418	47,4	hypothetisches Protein, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , (CAB03640)	564	10^{-160}	63,2
14		231	25,6	hypothetisches Protein, <i>Streptomyces coelicolor</i> , (CAB43948)	57	10^{-07}	20,9
				Prot. mit Ähnlichkeit zu Transkriptionsregulator der MarR Familie, <i>Bacillus subtilis</i> , (CAB12670)	52	3×10^{-06}	21,2

(a) Wurde nicht bestimmt, da es sich um einen unvollständigen ORF handelte.

3.1.7 Neuartige Lycopin Zyklasen CrtYc und CrtYd aus *B. linens*

In dem sequenzierten Gencluster von *B. linens* wurden die Gene der frühen Carotinoid Biosyntheseschritte, GGPP Synthase, Phytoen Synthase und Phytoen Desaturase, durch Sequenzvergleiche identifiziert. Sequenzähnlichkeiten von bekannten Lycopin Zyklasegenen bestanden zu keiner Region des Genclusters. Da die Zyklisierung von Lycopin zu β -Carotin in *B. linens* jedoch erwartet wurde, wurden Teile des sequenzierten Genclusters subkloniert und die Lycopin akkumulierende Mutante *B. flavum* MV40 (siehe 3.3.1) damit transformiert. Durch die Komplementation von MV40 sollte ein eventuell vorhandenes Lycopin Zyklasegen identifiziert werden.

Durch PCR mit genomischer *B. linens*-DNA und den Primern BLcrt-R (Position 4340) und BLcrt-F (Position 12262) wurde der Teil des Genclusters amplifiziert, in dem acht ORFs (ORF4 bis ORF12, Abb 3-2) mit teilweise noch unbekannter Funktion, in der selben Orientierung vorlagen. In der PCR wurde LA-Taq Polymerase (Takara) aufgrund ihrer höheren Synthesegenauigkeit eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde direkt in pMON kloniert und der resultierende Konstrukt pMON-4 genannt. Durch Herausschneiden des 7,9 kb großen Inserts aus pMON-4 mit *KpnI* (integrierte Schnittstellen in den Primern) und Ligation in den mit *KpnI* geschnittenen Shuttle-Vektor pEC5 erhielt man pEC5-D. Die mit pEC5-D transformierten *B. flavum* MV40 Zellen wiesen eine gelbe Färbung auf und durch anschließende HPLC-Analyse der gebildeten Carotinoide konnte bestimmt werden, daß *B. flavum* MV40[pEC5-D] nicht mehr Lycopin, sondern β -Carotin akkumulierte.

Um ein offensichtlich auf diesem Fragment lokalisiertes Lycopin Zyklasegen zu identifizieren, wurden mehrere Fragmente von pMON-4 in den Shuttle-Vektor pC1 subkloniert (Abb. 3-8). *B. flavum* MV40 wurde mit diesen Konstrukten transformiert und die Bildung von β -Carotin in den einzelnen Transformanten untersucht.

Durch Klonierung eines 3,6 kb *BamHI*-Fragments aus pMON-4 in pC1 erhielt man pC1-6 (vorwärts, d.h. der *lacZ* Promotor und die wahrscheinliche Leserichtung der ORFs des Inserts haben die selbe Orientierung) und pC1-4 (rückwärts). Von den *B. flavum* MV40 Transformanten beider Konstrukte wurde Lycopin zu β -Carotin umgesetzt. Bei pC1-6 war der Umsatz jedoch höher als bei pC1-4 mit umgekehrter Orientierung des Inserts. Um das Gen der Lycopin Zyklase weiter einzugrenzen, wurde ein 1,9 kb *EcoRI/SacI*-Fragment aus pMON-4 in die *EcoRI/SacI*-Schnittstellen von pC1 kloniert, man erhielt pC1-E/S. Wiederum wurde von der entsprechenden Transformante, *B. flavum* MV40[pC1-E/S], Lycopin zu β -Carotin

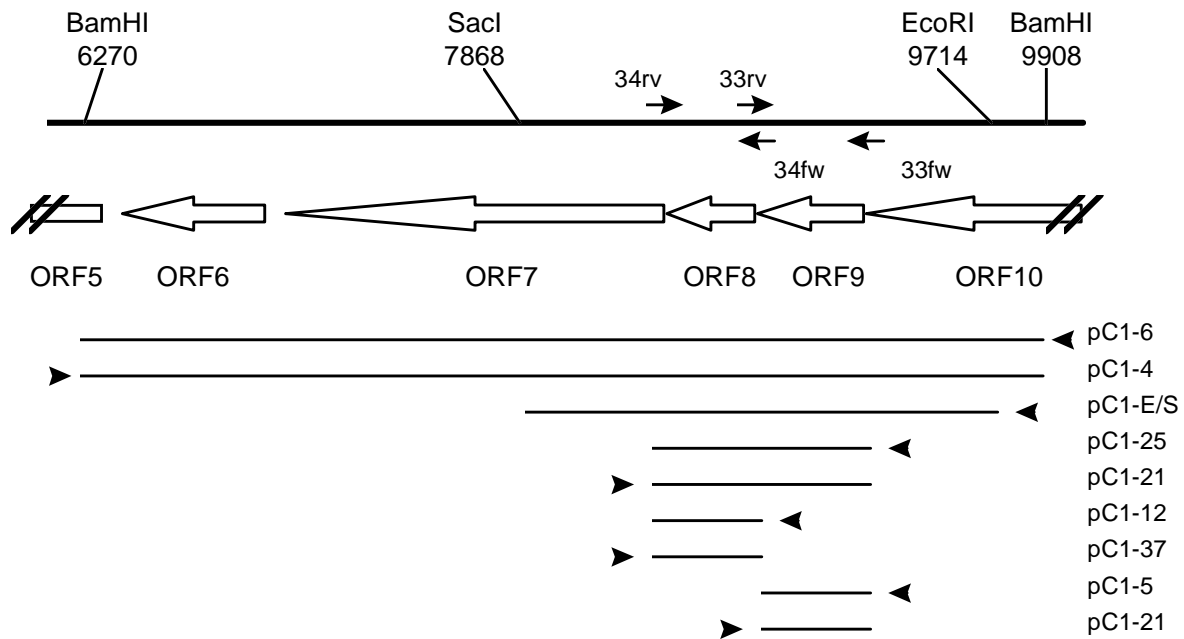


Abb. 3-8: Ausschnitt aus dem *crt* Gencluster von *B. linens*. ORFs sind durch Pfeile angegeben, die zum Klonieren verwendeten Restriktionsschnittstellen sind mit der Position in der Sequenz angegeben. Die angegebenen Oligonukleotide (34rv/33rv/34fw/33fw) wurden in einer PCR zur Amplifikation der entsprechenden ORFs verwendet. Im unteren Teil der Abbildung sind die in Plasmid pC1 klonierten Fragmente mit ihren Namen angegeben, die Pfeilspitzen deuten die Transkriptionsrichtung des *lacZ* Promotors aus pC1 an.

umgesetzt. Somit war das gesuchte Lycopin Zyklasegen auf ORF8 und ORF9 eingeschränkt. Nach Synthese entsprechender Oligonukleotide wurden diese zwei ORFs durch PCR mit genomischer DNA aus *B. linens* amplifiziert und die Produkte in pMON kloniert. ORF8 wurde mit den Primern 34fw und 34rv, ORF9 mit den Primern 33fw und 33rv, sowie ORF8+ORF9 mit den Primern 33fw und 34rv erhalten. Die Schnittstellen der MCS (*EcoRI/SacI* bzw. *KpnI/SacI*) von pMON wurden genutzt, um die so erhaltenen Fragmente in ebenso geschnittenen Shuttle-Vektor pC1 zu klonieren. So erhielt man alle drei Fragmente in jeweils beiden Orientierungen in pC1. Diese waren pC1-12 (ORF8 vorwärts), pC1-37 (ORF8 rückwärts), pC1-5 (ORF9 vorwärts), pC1-21 (ORF9 rückwärts), pC1-25 (ORF8+ORF9 vorwärts) und pC1-31 (ORF8+ORF9 rückwärts). Die wichtigsten Ergebnisse der HPLC-Analyse der mit diesen Konstrukten transformierten *B. flavum* MV40 Zellen sind in Abbildung 3-9 dargestellt. Die Mutante *B. flavum* MV40 mit einem Kontrollplasmid pC1 (Abb. 3-9A) akkumulierte Lycopin (Peak 1) mit den Absorptionsmaxima 446, 472 und 505 nm im HPLC-Laufmittel und geringe Mengen des Zwischenprodukts Neurosporin (Peak 2) mit Absorptionsmaxima bei 420, 440 und 470 nm. Transformanten mit ORF8 oder ORF9 hatten keinen veränderten Carotinoidgehalt gegenüber der Kontrolle (Abb. 3-9B und

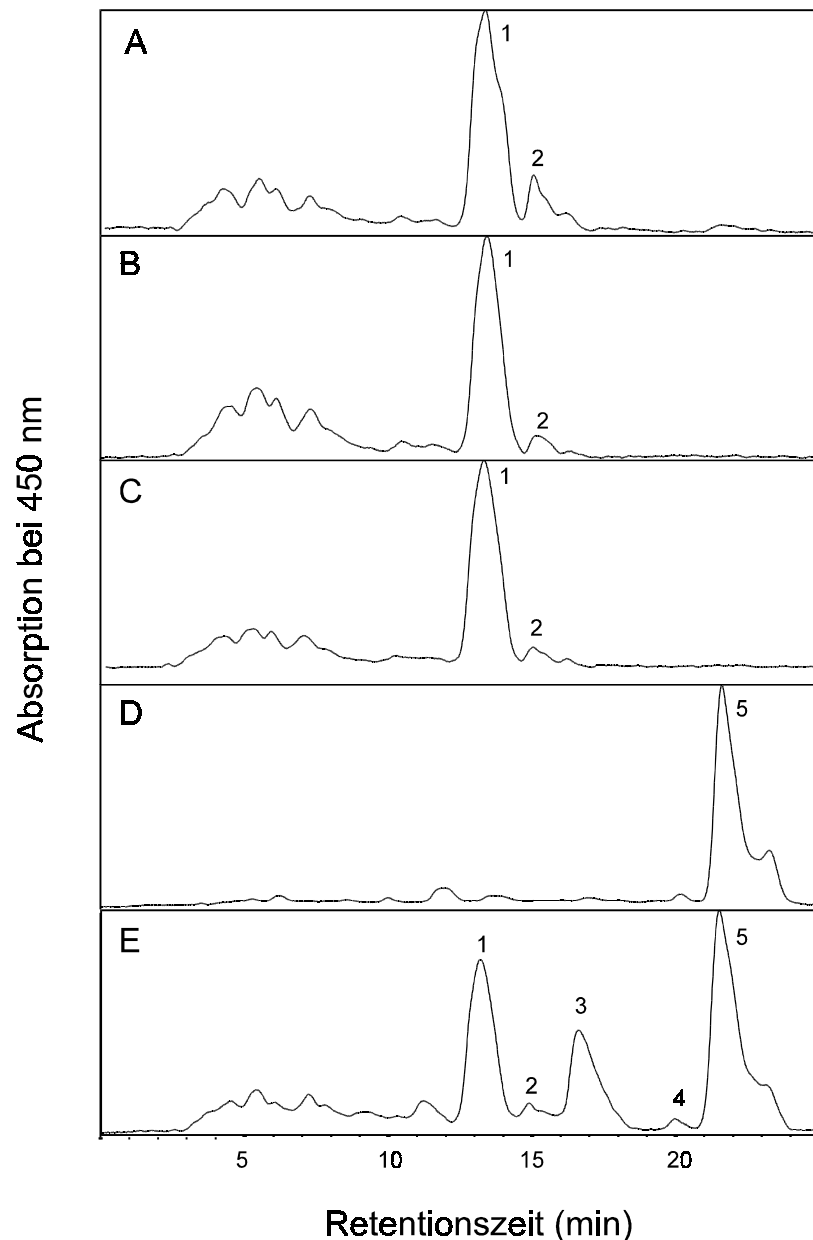


Abb. 3-9: HPLC-Elutionsprofile der Carotinoide aus der mit unterschiedlichen Plasmiden komplementierten *B. flavum*-Mutante MV40. (A) Kontrolle: MV40 mit Plasmid pC1; (B) MV40 mit Plasmid pC1-5, ORF9 vorwärts orientiert; (C) MV40 mit Plasmid pC1-12, ORF8 vorwärts orientiert; (D) MV40 mit Plasmid pC1-25, ORF9+ORF8 vorwärts orientiert; (E) MV40 mit Plasmid pC1-31, ORF9+ORF8 rückwärts orientiert. Peak 1: Lycopin, Peak 2: Neurosporin, Peak 3: γ -Carotin, Peak 4: β -Zeaxanthin, Peak 5: β -Carotin.

3-9C). Transformanten, die jedoch ORF8 und ORF9 trugen (Abb. 3-9D), akkumulierten große Mengen β -Carotin (Peak 5) mit Absorptionsmaxima bei 428, 454 und 482 nm im HPLC-Laufmittel. Lycopin war nicht mehr nachweisbar. In umgekehrter Orientierung kloniert, waren ORF8 und ORF9 nicht mehr unter der Kontrolle des starken *lacZ* Promotors, sondern unter der Kontrolle eines schwächeren unbekannt Promotors aus dem pBL-Teil von pC1 (siehe 2.2.1). Hierbei wurden mehr Intermediate der Lycopinzyklisierung akkumuliert (Abb. 3-9E).

So fand sich das einseitig zyklisierte Lycopin, γ -Carotin (Peak 3) mit Absorptionsmaxima bei 435, 460 und 495 nm im HPLC-Laufmittel, und das zyklisierte Neurosporin, β -Zeacarotin (Peak 4) mit Absorptionsmaxima bei 410, 430 und 455 nm. Der Zusammenhang dieser Zyklisierungsprodukte ist in Abbildung 3-10 dargestellt. Die beiden ORFs, deren Geneprodukte an der Zyklisierung von Lycopin beteiligt sind, wurden *crtYc* (ORF9) und *crtYd* (ORF8) genannt.

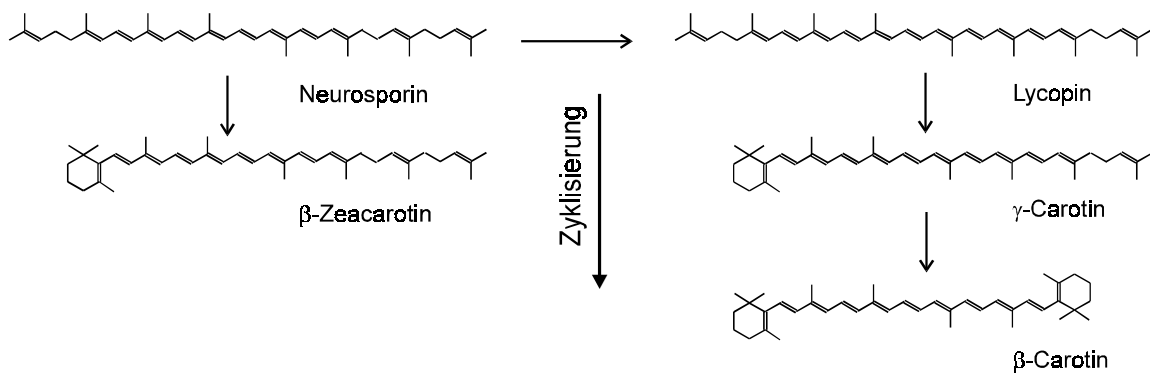


Abb. 3-10: Strukturformeln der bei der Komplementierung von *B. flavum* MV40 mit den Zyklasegenen *crtYc* (ORF9) und *crtYd* (ORF8) nachgewiesenen Carotine und deren biosynthetischer Zusammenhang.

Eine Komplementierung des Lycopin bildenden *E. coli*-Stamms JM101[pACKCRT-EBI_{EU}] mit pC1-25 führte ebenfalls zur Bildung von β -Carotin.

3.1.8 Die β -Carotin Desaturase CrtU aus *B. linens*

Der Desaturierungsschritt von β -Carotin zu Isoenieraten war ein neuer, bisher noch nicht untersuchter Reaktionsschritt der Carotinoid Biosynthese. Daher wurde versucht das dafür verantwortliche Gen funktionell nachzuweisen. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten von ORF7 zu Carotin Desaturasegenen und zu dem gleichzeitig gefundenen Gen *crtU* aus *Streptomyces griseus*, von dem angenommen wurde, daß es für eine β -Carotin Desaturase kodierte, wurde ORF7 auf verschiedene Arten exprimiert.

3.1.8.1 Expression von *crtU* in *E. coli*

Durch PCR mit den Primern BL-Uanf und BL-Uend und genomischer DNA aus *B. linens* wurde ORF7 (*crtU*) amplifiziert. Die Nukleinsäuresequenz von *crtU* besitzt jedoch einige für *E. coli* seltene Codons (Kane, 1995). Durch Modifizierung der Primer konnte die *crtU*-Sequenz an ihrem 5'-Ende und ihrem 3'-Ende auf *E. coli*-typische „Codon Usage“ umgeschrieben werden (Abb.3-11). Die von dieser modifizierten Nukleinsäuresequenz abgeleitete Aminosäuresequenz wurde dadurch nicht verändert. So konnte die Anzahl der für *E. coli* seltenen Codons um sechs reduziert werden.

```

BL-Uanf      GGG GAT CCA ATG ACA CAG CGT CGC CGT CCG CGT GAT CGC
5' - TAA GGA CAC CCA ATG ACA CAG AGA CGC CGT CCC AGA GAT CGC TTC -3'
           M   T   Q   R   R   R   P   R   D   R   F   ->

BL-Uend      GG GAA GCT TCA ACG ACG GCG ACG GAT GAG C
3' - G CCC GAG TAG TCC TCT GCA GCT ACT GGT ACG GGG CA -5'
5' - C GGG CTG ATC AGG AGT CGT CGA TGA CCA TGC CCC GT -3'
->  G   L   I   R   R   R   R   *

```

Abb. 3-11: Nukleinsäuresequenz der Anfangs- und Endregion von ORF7 aus *B. linens* und die daraus entwickelten Oligonukleotide BL-Uanf und BL-Uend sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz dieser Regionen. In die Oligonukleotide integrierte *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstellen sind kursiv dargestellt, veränderte Basenpaare der Oligonukleotide sind fett wiedergegeben. Von der Region um die BL-Uend-Bindestelle sind beide DNA-Stränge dargestellt.

Durch Klonierung des so erhaltenen PCR-Fragments über in die Primer integrierte *BamHI*- und *HindIII*-Schnittstellen in pPQE30/31/32 erhielt man *crtU* in allen drei Leserastern des Expressions-Vektors (pPQE30crtU, pPQE31crtU, pPQE32crtU). Nach Transformation von

E. coli JM101 mit diesen Konstrukten und Anzucht der Transformanten unter Induktion mit 0,5 mM IPTG, wurden die Proteine der *E. coli*-Zellen über SDS-PAGE aufgetrennt. Hierbei war die Bildung eines zusätzlichen Proteins im erwarteten Leseraster von pPQE31 zu beobachten (Abb. 3-12). Das Polypeptid hatte eine apparente Molmasse von 66 kDa und entsprach etwa der aus der Nukleinsäuresequenz von *crtU* errechneten Molmasse von 57 kDa. Komplementierungsversuche des β -Carotin bildenden *E. coli*-Stamms JM101 [pACCAR16 Δ crtX] mit dem Konstrukt pPQE31crtU zeigten jedoch, daß das so gebildete Polypeptid nicht funktionell aktiv war, da keine Synthese von Isorenieraten aus β -Carotin erfolgte. In einem *in-vitro* Test konnte ebenfalls kein Umsatz von β -Carotin zu Isorenieraten durch das in *E. coli* heterolog exprimierte Protein beobachtet werden.

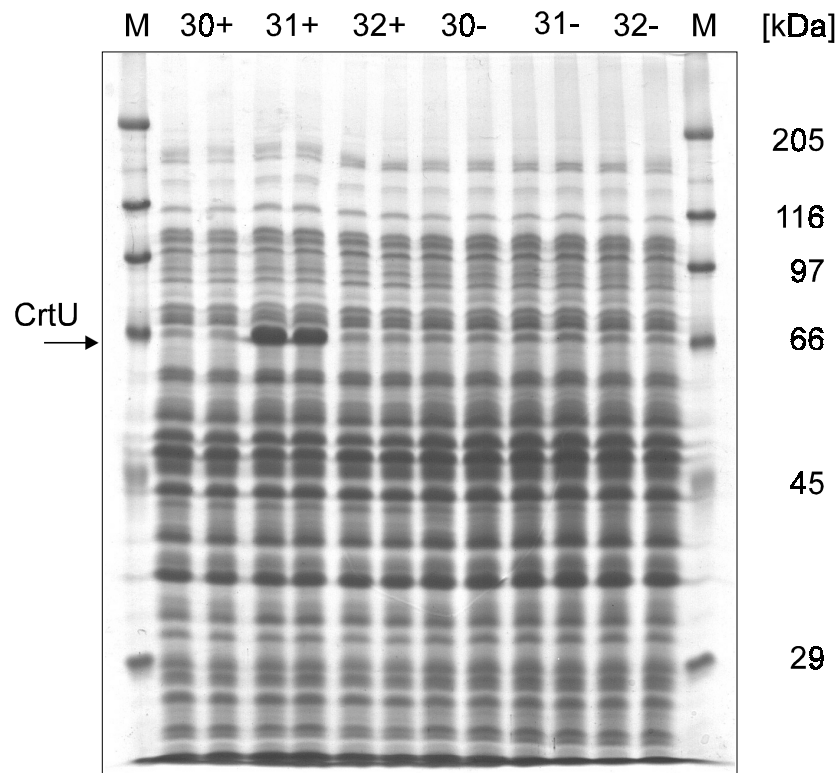


Abb. 3-12: SDS-PAGE des Zellhomogenates von *E. coli* mit den Plasmiden pPQE30crtU (30), pPQE31crtU (31) und pPQE32crtU (32). Anzucht der Kulturen mit (+) und ohne (-) Induktion durch 0,5 mM IPTG. M: Molmassenstandard in kDa.

3.1.8.2 Expression von *crtU* in Corynebakterien

Um eine mögliche fehlerhafte Expression von *crtU* durch *E. coli* auszuschließen, wurde das Gen nun in *B. linens* nahe verwandten Corynebakterien exprimiert. Durch PCR mit den Primern 6fw2 und BL-Uend und genomischer DNA aus *B. linens* wurde *crtU* und seine vermutliche Ribosomen Bindestelle amplifiziert und in pMON kloniert. Aus einem Klon mit vorwärts orientiertem *crtU*, pMON-*crtU*, wurde das Gen mit dem gesamten *lacZ* Promotor durch *PvuII* herausgeschnitten und in den mit *BamHI* geschnittenen und mit Klenow Enzym behandelten Konstrukt pC1-25 (siehe 3.1.7) ligiert. Der resultierende Konstrukt pC_{crtYU} trug die beiden Lycopin Zyklasegene *crtYc* und *crtYd* unter der Kontrolle eines *lacZ* Promotors und *crtU* ebenfalls unter der Kontrolle eines eigenen *lacZ* Promotors. Nach Transformation von *B. flavum* MV40 mit diesem Konstrukt und Anzucht unter Induktion mit 0,5 mM IPTG wurden die Carotinoide dieser Zellen extrahiert und durch HPLC analysiert (Abb. 3-13). Während die Kontrolle mit *crtYc* und *crtYd* (pC1-25) β -Carotin akkumulierte (Abb. 3-13A, Peak 3), wurde in der Transformante mit zusätzlichem *crtU* (pC_{crtYU}) überwiegend Isorenieraten (Peak 1) mit den gleichen Absorptionsmaxima wie β -Carotin gefunden (Abb. 3-13B). Außerdem konnten geringe Mengen des Zwischenproduktes β -Isorenieraten (Peak 2), das ebenfalls die gleichen Absorptionsmaxima besaß, nachgewiesen werden (Peak 2), das ebenfalls die gleichen Absorptionsmaxima besaß, nachgewiesen werden.

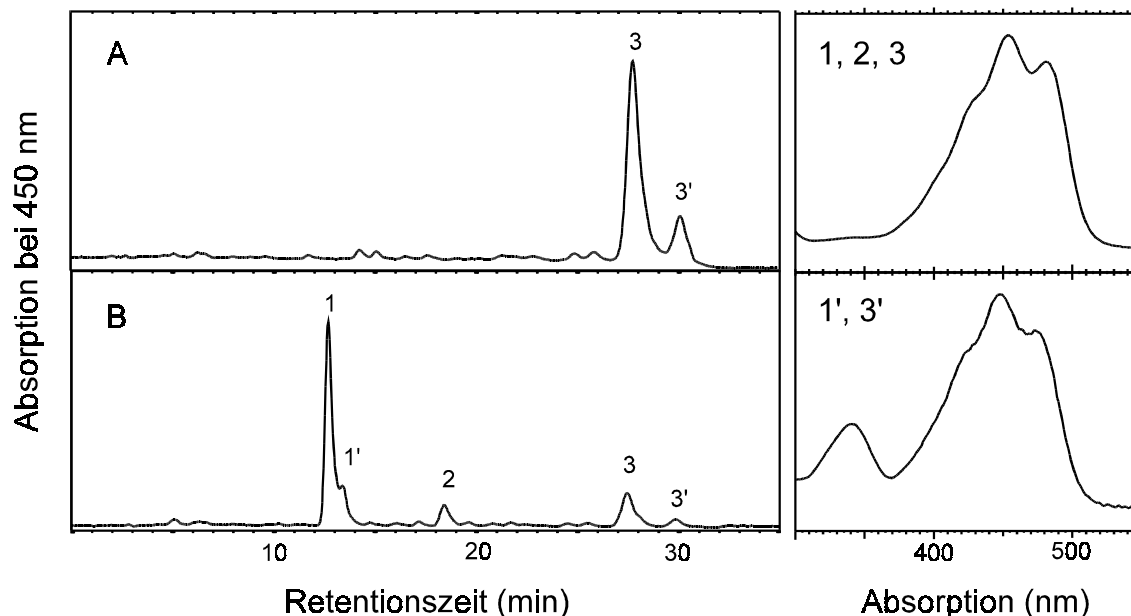


Abb. 3-13: HPLC-Elutionsprofile der Carotinoidextrakte aus Komplementierungen von *B. flavum* MV40 mit (A): ORF8 und ORF9 (pC1-25) und (B): ORF8, ORF9 und ORF7 (pC_{crtYU}). Peak 1: Isorenieraten, Peak 2: β -Isorenieraten, Peak 3: β -Carotin, Peak 1' und 3': die jeweiligen *cis*-Isomere. Auf der rechten Seite der Abbildung sind die Absorptionsspektren der Verbindungen im HPLC-Laufmittel mit Absorptionsmaxima von 428, 454 und 482 nm (*all-trans*-Isomere) bzw. 422, 448 und 472 nm (*cis*-Isomere) dargestellt.

Die durch CrtU katalysierte Umwandlung vom β -Carotin zu Isorenieraten über β -Isorenieraten ist in Abbildung 3-14 dargestellt.

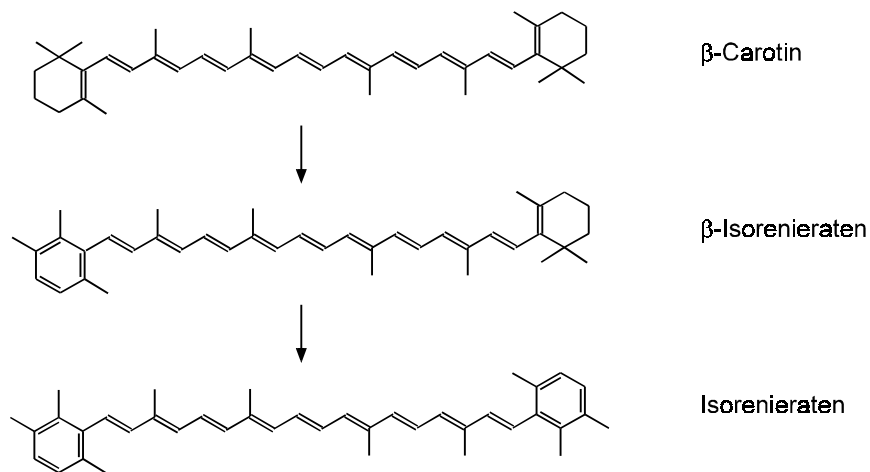


Abb. 3-14: Durch die β -Carotin Desaturase CrtU katalysierte Reaktion von β -Carotin über β -Isorenieraten zu Isorenieraten.

Eine starke Überexpression von *crtU* wurde erreicht, indem das Gen aus pMON-crtU mit *Bam*HI/*Eco*RI in den ebenso geschnittenen Expressions-Vektor pEKEx2 kloniert, und *Corynebacterium glutamicum* damit transformiert wurde. Nach Anzucht der Transformanten, Induktion mit 0,05 mM IPTG und Auftrennung des Zellhomogenats über SDS-PAGE wurde ein zusätzliches Polypeptid mit einer apparenten Molmasse von 66 kDa beobachtet (Abb. 3-15). Das durch *crtU* gebildete Polypeptid befand sich in der Membran-Fraktion (Pellet) des Zellhomogenats. Eine verstärkte Akkumulation des heterolog gebildeten Proteins in der löslichen Fraktion konnte durch Anzucht von *C. glutamicum* bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 30 °C bis 15 °C nicht erreicht werden. Aus vielen Untersuchungen in dieser Arbeitsgruppe ist jedoch bekannt, daß eine Anzucht von *E. coli* bei niedrigeren Temperaturen (22 bis 28 °C) meist zur Akkumulation eines heterolog gebildeten Proteins in der löslichen Zellfraktion führt. Bisher zeigten nur die heterolog gebildeten Proteine der löslichen Zellfraktion eine Enzymaktivität im *in-vitro* Test.

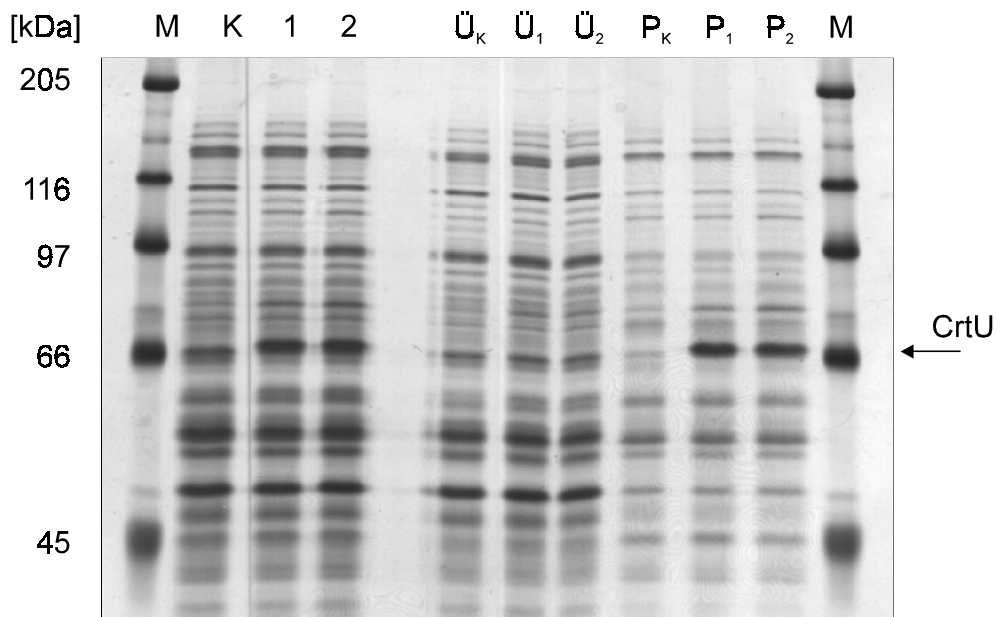


Abb. 3-15: SDS-PAGE von ganzen *C. glutamicum* Zellen mit dem Plasmid pEKEx2 und *crtU*. Anzucht der Kulturen mit Induktion durch 0,05 mM IPTG. M: Molmassenstandard in kDa, K: Homogenat von *C. glutamicum*[pEKEx2] Kontrolle, 1: Homogenat von *C. glutamicum*[pEKEx2crtU] bei 28 °C angezogen, 2: Homogenat von *C. glutamicum*[pEKEx2crtU] bei 23 °C angezogen, Ü_K: Überstand von K nach Zentrifugation, Ü₁: Überstand von 1 nach Zentrifugation, Ü₂: Überstand von 2 nach Zentrifugation, P_K: Pellet von K nach Zentrifugation, P₁: Pellet von 1 nach Zentrifugation, P₂: Pellet von 2 nach Zentrifugation.

3.2 Pilzliches Fusionsgen mit Ähnlichkeiten zu den Lycopin Zyklasegenen aus *B. linens*

Der Hefepilz *Xanthophyllomyces dendrorhous* ist wahrscheinlich ein Basidiomycet (Golubev, 1995) und wird zur Produktion von Carotinoiden verwendet (An *et al.*, 1989). Von Dr. J. Verdoes (Universität Wageningen, Holland) wurden verschiedene Carotinoid produzierende *E. coli*-Stämme mit einer cDNA-Bibliothek von *X. dendrorhous* komplementiert. Hierbei wurde ein Klon gefunden, der sowohl *crtB*-Deletionen als auch *crtY*-Deletionen komplementieren konnte. Da die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses cDNA-Klons in ihrer C-terminalen Region Ähnlichkeiten zu Phytoen Synthasen hatte, in ihrer N-terminalen Region jedoch Ähnlichkeiten zu den oben beschriebenen Lycopin Zyklasen CrtYc und CrtYd aus *B. linens* aufwies, wurde dieses pilzliche Gen im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

Nach Umklonierung der cDNA in den Vektor pPQE32 konnte durch Komplementierung von *E. coli* JM101[pACCAR25ΔcrtB], der daraufhin Zeaxanthin bildete, und durch Komplementierung von *E. coli* JM101[pACCRT-EBI_{EU}], der dann Lycopin bildete, die Phytoen Synthase- und die Lycopin Zyklaseaktivität des Genproduktes dieses bifunktionellen Gens bestätigt werden. Dieser Bifunktionalität wurde Ausdruck gegeben, indem das Gen dieser Phytoen Synthase/Lycopin Zyklase *crtYB* genannt wurde. Um die zwei unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten möglicherweise bestimmten Sequenzabschnitten zuzuordnen, wurden nun Regionen dieses CrtYB Proteins deletiert. Hierzu wurde die cDNA an ihrem 5'- oder ihren 3'- Ende verkürzt. In der 3'-Region mit Ähnlichkeiten zu bakteriellen Phytoen Synthasegenen wurde die cDNA auf 81 %, 62 % und 52 % ihrer Gesamtlänge verkürzt (Abb. 3-16A). Die Phytoen Synthaseaktivität dieser Konstrukte wurde durch Bildung von Zeaxanthin Diglucosid in *E. coli* JM101[pACCAR25ΔcrtB] gemessen. Während der Konstrukt mit der geringsten Verkürzung (pPQEcrtYB/1878) eine auf 16 % verringerte Phytoensynthese im Vergleich zum Ausgangskonstrukt (pPQEcrtYB) hatte, ging in den übrigen Konstrukten die Phytoen Synthaseaktivität vollständig verloren (Abb. 3-16B).

Um die Region in CrtYB zu bestimmen, die für die Lycopin Zyklaseaktivität verantwortlich ist, wurde *E. coli* JM101[pACCRT-EBI_{EU}] mit den verschiedenen *crtYB*-Deletionskonstrukten komplementiert und die Bildung der Zyklisierungsprodukte gemessen (Abb. 3-16C). Während die intakte *crtYB*-cDNA 80 % des Lycopins zu γ -Carotin und

vorzugsweise zu β -Carotin zyklisierte, wurden von dem ab Position 1878 deletierten Konstrukt knapp 30 % des Lycopins zyklisiert. Der Anteil des monozyklischen Carotins war hierbei höher als der des dizyklischen Carotins. Mit den kürzeren Konstrukten war keine Lycopin Zyklase-aktivität mehr nachweisbar. Das 5'-Ende der *crtYB*-cDNA hat Sequenzähnlichkeiten zu den Lycopin Zyklasen *crtYc* und *crtYd* aus *B. linens*. Eine Verkürzung an diesem Ende von *crtYB* bis an Position 514 führte zum vollständigen Verlust der Lycopin Zyklaseaktivität. Diese Deletion beeinflusste aber auch die Phytoen Syntheseaktivität, sie ging jedoch nicht vollständig verloren und betrug noch 28 % der Kontrolle.

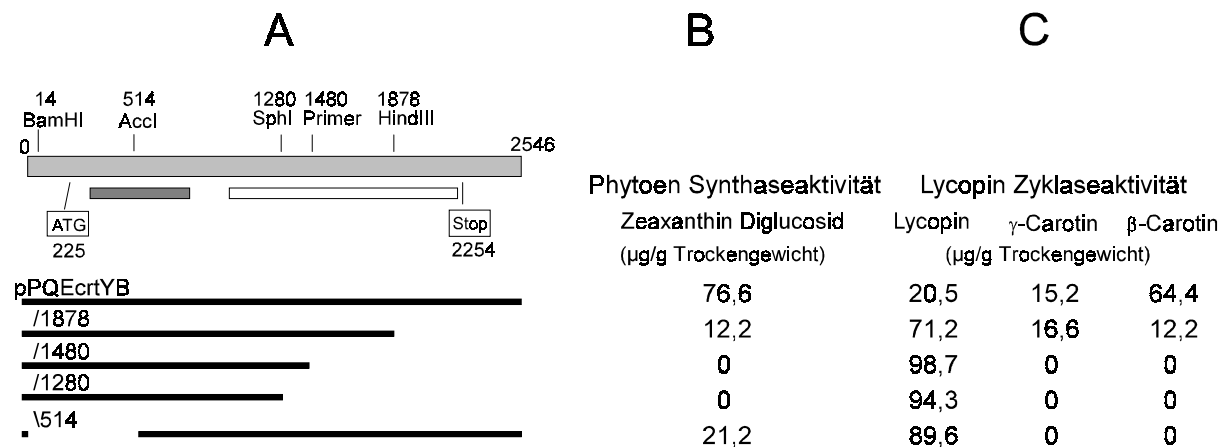


Abb. 3-16: Analyse der Phytoen Synthase- und Lycopin Zyklaseaktivität verschiedener Deletionskonstrukte von *crtYB*. (A) Restriktionskarte der *crtYB*-cDNA, die Nummern über den Restriktionsschnittstellen beziehen sich auf ihre Position in der cDNA. Die offenen Kästen unter der Restriktionskarte markieren Bereiche von *crtYB*, die Sequenzähnlichkeiten zu anderen Genen aufweisen; dunkelgrau: *crtYc* und *crtYd* aus *B. linens*; weiß: Phytoen Synthasegene. Darunter sind die zur Lokalisierung der Enzymaktivitäten verwendeten Deletionskonstrukte angegeben. (B) Die Phytoen Synthaseaktivität der angegebenen Deletionskonstrukte wurde durch Messung der Zeaxanthin Diglucosidbildung in *E. coli* JM101[pACCAR25 Δ crtB] bestimmt. (C) Die Lycopin Zyklaseaktivität wurde durch Messung der γ -Carotinbildung und der β -Carotinbildung in *E. coli* JM101[pACCRT-EBI_{EU}] bestimmt.

3.3 Carotinoid Biosynthese in *Brevibacterium flavum*

Mit *Brevibacterium flavum* und seinen verschiedenfarbigen Pigmentmutanten (Vertès *et al.*, 1994a) stand ein weiterer Gram-positiver Organismus aus der Gruppe der Coryneformen Bakterien zur Verfügung, dessen Carotinoid Biosynthese jedoch vollkommen unbekannt war. Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, ob *B. flavum* Carotinoide bildet. Andererseits war bekannt, daß gerade von Organismen aus der Gruppe der Coryneformen Bakterien eine Vielzahl unterschiedlicher Carotinoide gebildet wird. Aus diesem Grund, und da die Mutanten zur Komplementierung mit *B. linens*-DNA verwendet werden sollten (siehe 3.1.4), erfolgte eine Charakterisierung der Pigmentmutanten sowie des Wildtyps von *B. flavum*.

3.3.1 Analyse der Carotinoide aus *B. flavum*

Um die Carotinoidzusammensetzung von *B. flavum* und seinen fünf zur Verfügung stehenden Transposonmutanten (Vertès *et al.*, 1994a) zu untersuchen, wurde gefriergetrocknetes Zellmaterial extrahiert. Der gelb gefärbte Wildtyp sowie die kräftig gelbe Mutante MV10 und die farblose Mutante MV240 wurden mit Methanol extrahiert. Die rot gefärbten Mutanten MV40, MV60 und MV70 wurden mit Aceton extrahiert, da man Lycopin als ihr Pigment vermutete. Die aus der kräftig gelben Mutante MV10 extrahierten Pigmente cochromatographierten in der HPLC-Analyse (Abb. 3-17) mit einem Standard aus Decaprenoxanthin (Peak 3), Decaprenoxanthin Monoglucosid (Peak 2) und Decaprenoxanthin Diglucosid (Peak 1). Die aufgenommenen Spektren der drei Verbindungen waren identisch, hatten Maxima bei 418, 440 und 470 nm im HPLC-Laufmittel und stimmten mit denen des Standards überein. Der Wildtyp von *B. flavum* hatte die gleiche Carotinoidzusammensetzung wie MV10, jedoch hatte der letztgenannte die dreifache Menge an Carotinoiden akkumuliert. In den rötlichen Mutanten MV40 und MV60 wurde nur ein Carotinoid gefunden. Retentionszeit und aufgenommene Spektren mit Maxima bei 446, 472 und 504 nm im HPLC-Laufmittel waren identisch zu einem Standard aus all-*trans* Lycopin (Hauptpeak 4) und einem *cis*-Isomer, das 1,3 Minuten später von der Säule eluiert wurde. In der rötlichen Mutante MV70 wurden neben Lycopin (Peak 4) zwei weitere Verbindungen mit lycopinartigen Spektren und Retentionszeiten, die mit denen von 1-Hydroxylycopin (Peak 6) und 1,1'-Dihydroxylycopin (Peak 5)

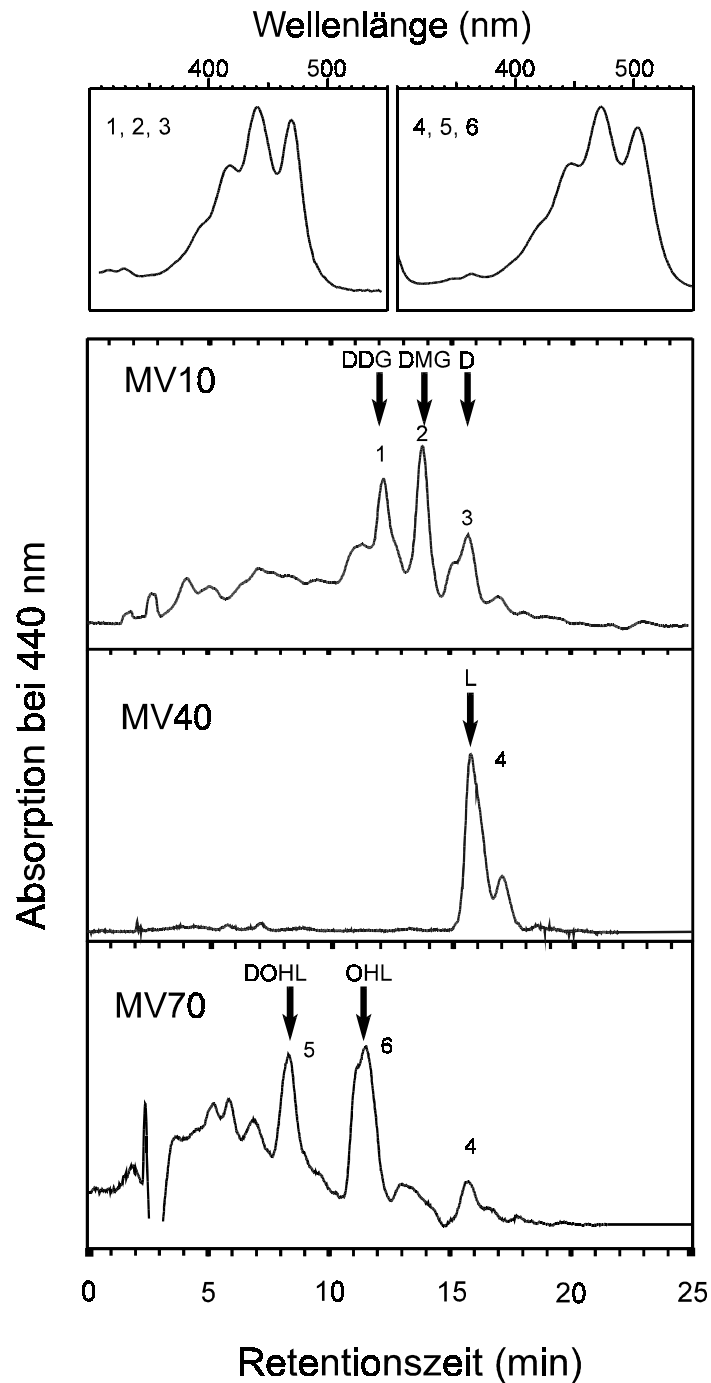


Abb. 3-17: HPLC-Analyse der Carotinoide aus den *B. flavum*-Mutanten MV10 (gelb), MV40 (rot), und MV70 (rot) sowie deren Coelution mit isolierten Standards. Peak 1: Decaprenoxanthin Diglucosid, Peak 2: Decaprenoxanthin Monoglucosid, Peak 3: Decaprenoxanthin, Peak 4: Lycopin, Peak 5: Flavuxanthin (später identifiziert), Peak 6: Nonaflavuxanthin (später identifiziert). Die Retentionszeiten der Standards sind durch Pfeile angegeben, DDG: Decaprenoxanthin Diglucosid, DMG: Decaprenoxanthin Monoglucosid, D: Decaprenoxanthin, L: Lycopin, DOHL: 1,1'-Dihydroxylycopin, OHL: Hydroxylycopin. Die Absorptionsspektren der einzelnen Peaks sind im oberen Teil der Abbildung dargestellt.

übereinstimmten, gefunden. In der farblosen Mutante MV240 konnten keine Carotinoide, auch nicht das farblose Phytoen, detektiert werden.

Die Ergebnisse der Carotinoidbestimmung der *B. flavum* Pigmentmutanten und des Wildtyps sind in Tabelle 3-3 zusammengefaßt.

Tab. 3-3: Carotinoidgehalt und Hauptcarotinoide von *B. flavum* und seiner Transposonmutanten

<i>B. flavum</i>	Phänotyp	Carotinoid	Menge[$\mu\text{g/g}$ Trockengewicht]
Wildtyp	gelb	Decaprenoxanthin Diglucosid	66,3
MV10	intensiv gelb	Decaprenoxanthin Diglucosid ^a	190,8
MV40	rot	Lycopin	2,7
MV60	rot	Lycopin	2,5
MV70	rot	Lycopin	1,1
		Nonaflavuxanthin ^b	1,4
		Flavuxanthin ^b	2,5
MV240	farblos/weiß	keine Carotinoide	

^a Detaillierte Beschreibung der Carotinoidzusammensetzung von MV10 in Kapitel 3.3.1.1

^b Beschreibung der Strukturaufklärung in Kapitel 3.3.1.1

3.3.1.1 Strukturaufklärung der Carotinoide von *B. flavum*

Die Strukturaufklärung der Carotinoide von *B. flavum* wurde von Dr. Takaichi (Nippon Medical School, Kawasaki, Japan) durch Field Desorption Massenspektrometrie (Takaichi, 1993) vorgenommen. In *B. flavum* MV10 wurde folgende Carotinoidzusammensetzung bestimmt:

- 88 % Decaprenoxanthin Diglucosid
- 5 % Decaprenoxanthin und unbekannte Verbindung
- 4 % Decaprenoxanthin Monoglucosid
- 3 % Decaprenoxanthin Diglucosid Diester

Außerdem wurden Phytoen, Neurosporin, Lycopin und Sarcinin anhand von Absorptionsspektren, Molekulargewicht und HPLC-Retentionszeit, basierend auf Takaichi (2000) bestimmt (Tab. 3-4). Die bisher noch in keinem Organismus beschriebene C₄₅ Verbindung 2-(3-Methyl-2-butenyl)- ϵ , ψ -carotin wurde ebenfalls als Intermediat identifiziert und ihr der Trivialname Nonapren gegeben (Molmasse: 604 Da, Rt: zwischen Lycopin und Sarcinin, Absorptionsspektrum: n = 10). Aufgrund der so identifizierten Carotinoide wurde der in Abbildung 3-18 dargestellte Biosyntheseweg für *B. flavum* vorgeschlagen.

Tab. 3-4: Tabelle der in *B. flavum* identifizierten Carotinoide, deren Benennung nach IUPAC (Weedon und Moss, 1995), Absorptionsmaxima, Molmasse und Retentionszeit soweit bekannt. #: Nummerierung der Peaks aus HPLC-Analyse in Abbildung 3-17.

#	Carotinoide (Trivialname und Benennung nach IUPAC)	λ_{max} (nm)			Molmasse (Da)	Rt (min)
4	Lycopin ψ , ψ -Carotin	446	472	504	536	15,8
6	Nonaflavuxantin 2-(4-Hydroxy-3-methyl-2-butenyl)- ψ , ψ -carotin	446	472	504	620	11,8
5	Flavuxanthin 2,2'-Bis(4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl)- ψ , ψ -carotin	446	472	504	704	8,3
3	Decaprenoxanthin 2,2'-Bis(4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl)- ϵ , ϵ -carotin	418	440	470	704	15,8
2	Decaprenoxanthin Monoglucosid	418	440	470	866	13,9
1	Decaprenoxanthin Diglucosid	418	440	470	1028	12,1
	Nonapren 2-(3-Methyl-2-butenyl)- ϵ , ψ -carotin				604	
	Sarcinin 2,2'-Bis(3-methyl-2-butenyl)- ϵ , ϵ -carotin	418	440	470	672	

Die Molmasse der Carotinoide aus der Mutante MV70 wurde mit 704 für Verbindung aus Peak 5 (Abb. 3-17, Retentionszeit ähnlich zu Dihydroxylycopin) und mit 620 für die Hydroxylycopin ähnliche Verbindung aus Peak 6 bestimmt. Für beide Verbindungen wurde die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen $n = 11$ bestimmt. Durch Acetylierung (Eugster, 1995) konnte ermittelt werden, daß die Verbindung aus Peak 6 eine, bzw. die aus Peak 5 zwei primäre Hydroxygruppen besitzt. Aus diesen Angaben konnte auf die Struktur der beiden neuen Carotinoide 2-(4-Hydroxy-3-methyl-2-butenyl)- ψ , ψ -carotin, ein C_{45} Carotinoide, das den Trivialnamen Nonaflavuxanthin erhielt, und 2,2'-Bis(4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl)- ψ , ψ -carotin ein C_{50} Carotinoide, dem der Trivialname Flavuxanthin gegeben wurde, geschlossen werden (Tab. 3-4). Die Mutante MV70 setzt somit wahrscheinlich Lycopin zu azyklischen Carotinoide um (Abb. 3-19). Die Akkumulation dieser azyklischen Carotinoide in MV70 sind ein erster Hinweis auf den Mechanismus der Kettenverlängerung von C_{40} über C_{45} zu C_{50} wie er in Abbildung 4-9 vorgeschlagen wird.

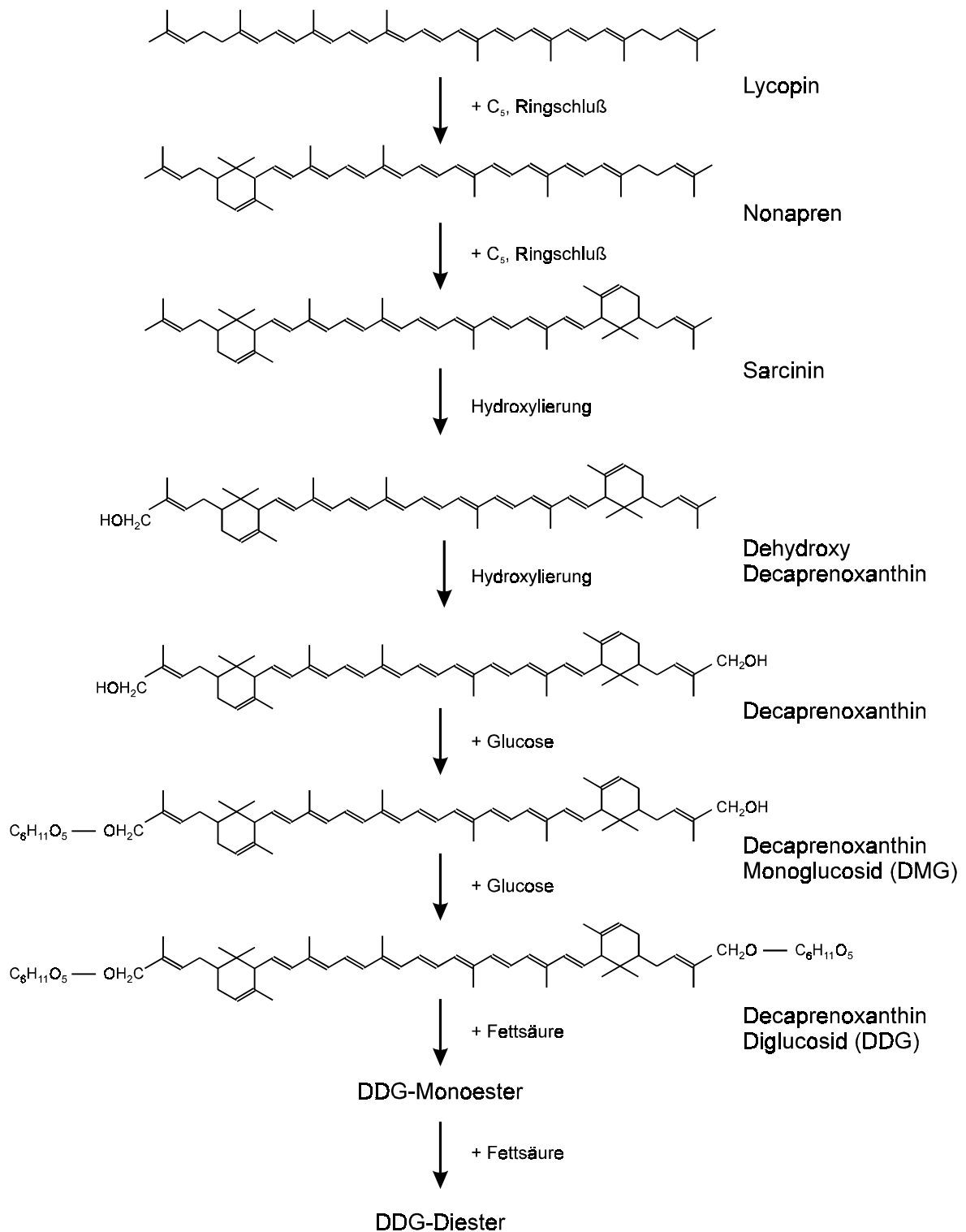


Abb. 3-18: Carotinoid Biosynthese in *B. flavum* ab Lycopin. Der Vorschlag basiert auf den in *B. flavum* identifizierten Carotinoiden. Bis auf Dehydroxydecaprenoxanthin wurden alle Verbindungen in *B. flavum* nachgewiesen.

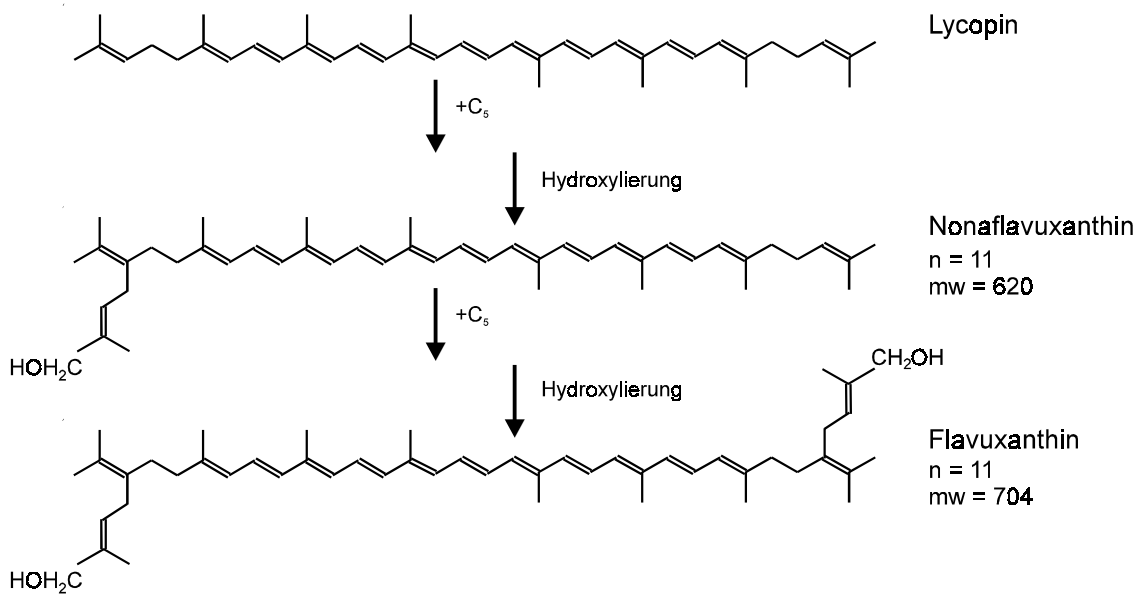


Abb. 3-19: Carotinoid Biosynthese in der Mutante *B. flavum* MV70, ausgehend von Lycopin.

3.3.2 Sequenzanalyse des *crt* Genclusters aus *B. flavum*

Nachdem die durchgeführte Carotinoidanalytik ergab, daß *B. flavum* das C₅₀ Carotinoid Decaprenoxanthin bildet, wurde nun versucht das entsprechende *crt* Gencluster zu identifizieren. Dies war von besonderem Interesse, da bisher noch keine an der Bildung von C₅₀ Carotinoiden beteiligten Gene oder Enzyme bekannt waren.

Ausgangspunkt für die Sequenzierung und Beschreibung des *crt* Genclusters aus *B. flavum* waren die Plasmide pMV10 und pMV240. Sie wurden von Vertès *et al.* (1994a) hergestellt, indem genomische DNA der Mutanten MV10 und MV240 mit Restriktionsenzymen geschnitten, in einen pUC-Vektor ligiert, und *E. coli* mit dem Ligationsprodukt transformiert wurde. Die Selektion der Transformanten erfolgte mit Kanamycin, dem auf dem Transposon vorkommenden Resistenzmarker. Somit enthielten sämtliche Klone das Plasmid pUC mit dem Transposon und einem Fragment des sie in der Mutante umgebenden bakteriellen Chromosoms.

Erste Sequenzierungen der Plasmide pMV10 und pMV240 im Rahmen dieser Arbeit zeigten, daß das Transposon nicht Kanamycin Resistenzgen (Kn^R) und Transposasegen (*tnpA*) in der

selben Orientierung trug wie es beschrieben war (Vertès *et al.*, 1994a), sondern daß Kn^R und *trpA* in entgegengesetzten Orientierungen zwischen den linken Inverted Repeat (L-IR) und den rechten Inverted Repeat (R-IR) kloniert waren (Abb. 3-20).

Mit den Sequenzierprimern L2-Tn31831 und R-Tn31831 wurden die Plasmide im Folgenden von den Transposoninsertionsstellen ausgehend im „Genomic Walking“ sequenziert. In entgegengesetzter Richtung wurde von der bekannten Plasmidsequenz ausgehend mit den Primern Reverse und M-13 sequenziert. Durch PCR konnte die Lücke auf dem DNA-Strang zwischen pMV10 und pMV240 geschlossen werden. Weitere DNA Templat Stränge konnten durch inverse PCR gewonnen werden (Abb. 3-21). Parallel zu den Sequenzierarbeiten wurden ständige blastx Datenbanksuchen durchgeführt und so Richtung und Ausmaß weiterer Sequenzierungen bestimmt. Interessante Nukleinsäurebereiche wurden zumindest einmal je Strang sequenziert. In Abbildung 3-21 sind zwei DNA-Fragmente dargestellt, die im Gemon von *B. flavum* dicht beisammen liegen. Zwischen dem kleineren 5.434 bp Fragment und dem größeren 11.391 bp Fragment liegt ein nur wenige Nukleotide langer Bereich dessen Sequenz nicht bestimmt wurde, da aufgrund der blastx Suchen hier keine interessanten ORFs erwartet wurden. Sequenzanalysen mit hoher Zuverlässigkeit liegen für das kleine Fragment von Position 1 bis 4.811 und für das große Fragment von Position 1.498 bis 10.730 vor. Diese Sequenzabschnitte sind bei GenBank unter den Zugangsnummern AF159509 (für das 4.811 bp-Fragment) und AF159510 (für das 9.233 bp-Fragment) hinterlegt.

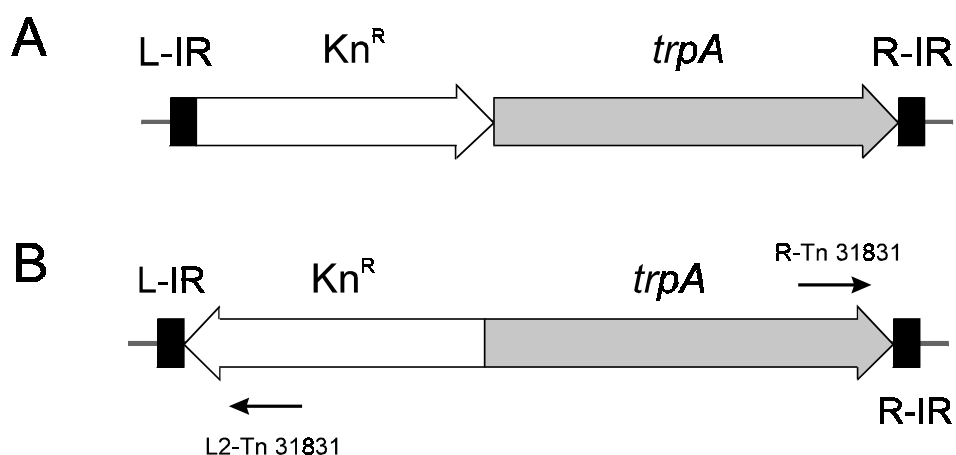


Abb. 3-20: Vermuteter (A) und tatsächlicher (B) Aufbau des Transposons aus pMV10 und pMV240. L-IR: linker Inverted Repeat, R-IR: rechter Inverted Repeat, Kn^R : Kanamycin Resistenzgen, *trpA*: Transpososagen, L2-Tn31821 und R-Tn31831 sind die zum Sequenzieren verwendeten Oligonukleotide.

3.3.3 Sequenzvergleiche des *crt* Genclusters aus *B. flavum*

Aufgrund der blastx Datenbanksuchen wurden auf den sequenzierten DNA-Abschnitten von *B. flavum* 11 ORFs mit Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus den Datenbanken bestimmt. Ihre Anordnung und Orientierung ist in Abbildung 3-21 dargestellt.

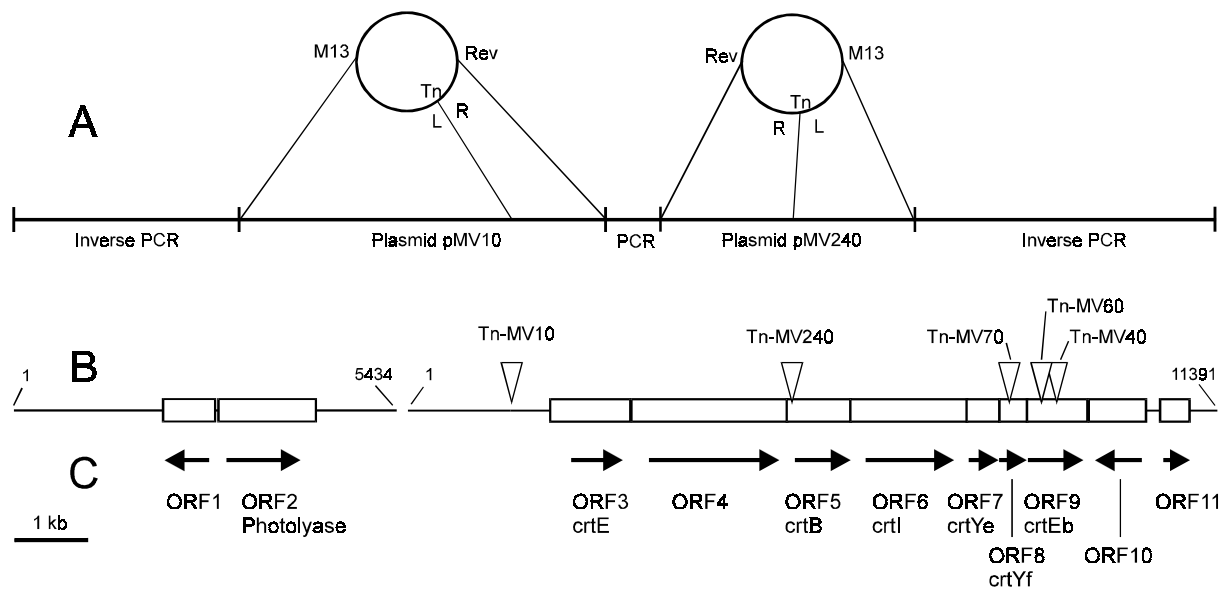


Abb. 3-21: Untersuchte DNA-Fragmente aus *B. flavum*. (A) Herkunft der DNA für die Sequenzierreaktionen. (B) ORFs mit Ähnlichkeiten zu ORFs aus Datenbanken, auf den Kopf stehende Dreiecke deuten auf die Orte der Transposoninsertion bei den entsprechenden Transposonmutanten hin. (C) Die Pfeile geben die Orientierung der ORFs wieder, die Namen der an der Carotinoid Biosynthese beteiligten Gene sind angegeben.

Die wahrscheinliche Anzahl der Aminosäuren der Genprodukte, deren errechnete Molmasse und der jeweils beste blastx Treffer der Datenbanksuchen ist in Tabelle 3-5 zusammengefaßt. Folgende ORFs wurden gefunden:

ORF1 mit unbekannter Funktion und einer generellen Glycosyltransferase Domäne (Profile Scan PS50167) an seinem N-terminalem Ende (Aminosäuren 8-103).

Das Genprodukt von **ORF2** weist hohe Ähnlichkeiten zu Mitgliedern der Photolyase-Blaulicht Photorezeptor Familie auf. Diese Familie umfaßt sowohl Blaulicht Photorezeptoren als auch Photolyasen. Dieser ORF aus *B. flavum* ist dem ORF5 aus *B. linens* sehr ähnlich. Eine umfassende Diskussion dieser beiden ORFs ist in Kapitel 4.6 zu finden.

Das Genprodukt von **ORF3** hat Ähnlichkeiten zu GGPP Synthasen (CrtE) verschiedener Organismen, konservierte Aminosäuren der GGPP Synthasen sind ebenfalls in ORF3 vorhanden (Abb. 3-6). Das folglich *crtE* genannte Gen kodiert für eine GGPP Synthase.

ORF4 hat bei blastx Suchen hohe Ähnlichkeit zu einem „Antibiotic Resistance Related Protein“ ActII-3 aus *Streptomyces coelicolor* aufgewiesen (Fernández-Moreno *et al.*, 1991). ActII-3 ist möglicherweise am Export von Antibiotika in *Streptomyces* beteiligt. Außerdem gibt es Ähnlichkeiten von ORF4 zu nicht näher bestimmten Transportproteinen verschiedener *Mycobacterium*-Arten. Eine Beteiligung des ORF4-Genproduktes aus *B. flavum* an der Biosynthese von Carotinoiden scheint aufgrund der Sequenzdaten unwahrscheinlich.

Das Genprodukt von **ORF5** hat Ähnlichkeiten zu Phytoen Synthasen verschiedener Organismen, konservierte Aminosäuremuster der Phytoen Synthasen sind ebenfalls in ORF5 vorhanden (Abb. 3-3). ORF5 kodiert somit für eine Phytoen Synthase und wird *crtB* genannt.

Das Genprodukt von **ORF6** hat Ähnlichkeiten zu Phytoen Desaturasen verschiedener Organismen, konservierte Aminosäuremuster der bakteriellen crtI-Typ Desaturasen sind ebenfalls in ORF6 erhalten (Abb. 3-4). Das entsprechende Gen kodiert somit für eine Phytoen Desaturase des crtI-Typs und wird *crtI* genannt.

ORF7 und **ORF8** haben Ähnlichkeit zu zwei benachbarten ORFs unbekannter Funktion aus der unmittelbaren Umgebung von *crt*-Genen aus *Mycobacterium marinum* und *Myxococcus xanthus*. Außerdem sind sie den beiden neuartigen Lycopin Zyklasegenen *crtYc* und *crtYd* aus *B. linens* sehr ähnlich. Bereiche konservierter Aminosäuren lassen sich für alle Genprodukte finden.

Das Genprodukt von **ORF9** hat Ähnlichkeiten zu einer Bakteriochlorophyll Synthase BchG, die für die Veresterung von Chlorophyllid mit GGPP zu Bakteriochlorophyll a verantwortlich ist (Xiong *et al.*, 1998), sowie zu verschiedenen Octaprenyltransferasen. Aufgrund der Sequenzdaten könnte ORF9 für ein Enzym kodieren, das an Reaktionen mit Isoprenoiden beteiligt ist.

ORF10 konnte durch Datenbanksuchen keine Funktion zugeordnet werden, da keine Ähnlichkeiten zu Genen bekannter Funktion bestanden. In Bezug zu den vorherigen sieben ORFs liegt ORF10 in entgegengesetzter Orientierung auf dem DNA-Strang.

ORF11 ist möglicherweise ein unvollständiger Leserahmen mit Ähnlichkeit zu einem Carotinoid Bindeprotein (P39660).

Tab. 3-5: Tabelle der ORFs der analysierten DNA-Fragmente aus *B. flavum*, die berechnete Anzahl an Aminosäuren und die Molmasse ihrer hypothetischen Genprodukte sowie die besten blast-Treffer der Datenbanksuchen. AA: Anzahl der Aminosäuren, MG: Molmasse in kDa; blast score und E value sind blast-spezifische Werte.

ORF	Genprodukt	AA	MG	bester blast-Treffer	blast score	E-value
1		251	28,5	gsd, unbekannte Fkt., <i>Mycobacterium avium</i> , (CAA11574)	63	2×10^{-9}
2	Photolyase	482	55,1	Blaulicht Photorezeptor, <i>Arabidopsis thaliana</i> , (CAA67508)	239	3×10^{-62}
				DNA-Photolyase, <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (Q55081)	231	10^{-59}
3	CrtE	382	43,0	GGPP Synthase, <i>Streptomyces griseus</i> , (AAA91949)	110	2×10^{-23}
4		730	77,3	Antibiotic Transport-Associated Protein actII-3, <i>Streptomyces coelicolor</i> , (Q53902)	383	10^{-105}
5	CrtB	304	34,2	Phytoen Synthase, <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> , (AAB86274)	70	2×10^{-11}
6	CrtI	548	59,5	Phytoen Desaturase, <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> , (AAB86273)	331	9×10^{-90}
7	CrtYe	149	16,8	Protein unbek. Fkt, <i>Mycobacterium marinum</i> , (AAB71429)	45	4×10^{-4}
8	CrtYf	130	14,5	hypothetisches Protein (Orf8), <i>Myxococcus xanthus</i> , (CAA79962)	43	0,001
9	CrtEb	287	31,7	konserviertes Protein, <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> , (AAB86275)	81	9×10^{-15}
				Bacteriochlorophyll Synthase BchG, <i>Heliobacillus mobilis</i> , (AAC84024)	50	3×10^{-5}
				1,4 Dihydroxy-2-Naphtholat Octaprenyltransferase, <i>Bacillus subtilis</i> (P39582)	43	0,004
10		287	31,3	Hypothetisches Protein, <i>Streptomyces coelicolor</i> , (CAA18528)	126	2×10^{-28}

3.3.4 Sequenzanalyse der Transposonmutanten von *B. flavum*

Durch Sequenzierung der aus den *B. flavum*-Transposonmutanten isolierten genomischen DNA konnten die Insertionsorte der Transposons bestimmt werden. So erhielt man Hinweise auf die für die veränderte Carotinoidzusammensetzung der Mutanten verantwortlichen Gene. In Abbildung 3-22 ist die unmittelbare Nukleinsäuresequenz am rechten und linken Inverted Repeat des Transposons für *B. flavum* MV10 und MV240 sowie nur die des rechten Inverted Repeat für MV40, MV60 und MV70 dargestellt. Die Zielsequenz, die bei diesem Transposon aus 8 Nukleotiden besteht und nach dessen Insertion verdoppelt wird, flankiert das Transposon.

In der Mutante *B. flavum* MV10, die einen erhöhten Carotinoid-Gehalt hat, liegt die Transposoninsertion ca. 400 bp vor ORF3. Kein identifizierter ORF ist direkt unterbrochen, wahrscheinlich liegt das Transposon hier in einem Bereich, der für die Regulation der Carotinoid Biosynthese verantwortlich ist. In der carotinoidfreien Mutante *B. flavum* MV240 sitzt das Transposon in ORF5, der aufgrund seiner Sequenzähnlichkeiten als das Gen der Phytoen Synthase (*crtB*) identifiziert wurde. Die beiden Lycopin akkumulierenden Mutanten MV40 und MV60 tragen das Transposon an unterschiedlichen Stellen in ORF9. Bei der zusätzlich Flavuxanthin und Nonaflavuxanthin akkumulierenden Mutante MV70 wurde das Transposon in ORF8 lokalisiert. Die Orte der Transposoninsertion sind ebenfalls in Abbildung 3-21 durch auf dem Kopf stehende Dreiecke dargestellt.

MV10	TATCAGGGG <u>CACTTAGC</u> <i>GGCCCTTCCGG</i> . . . <i>AGGAAGAGCC</i> <u>CACTTAGC</u> TCCATATAAC
MV240	TGAAGCCTT <u>GGATGAGG</u> <i>GGCCCTTCCGG</i> . . . <i>AGGAAGAGCC</i> <u>GGATGAGG</u> CCCGGTTGTA
MV40	<i>AGGAAGAGCC</i> <u>GATAAAAGGG</u> CGGTTCTTT
MV60	<i>AGGAAGAGCC</i> <u>CGAAAAGTT</u> CCACAGCA
MV70	<i>AGGAAGAGCC</i> <u>CCCAAACCA</u> TGAGGTTAT
	L-IR R-IR
	-----B.flavum----- -----Transposon----- -----B. flavum-----

Abb. 3-22: Nukleinsäuresequenz der Transposoninsertionsstellen der verschiedenen *B. flavum* Transposonmutanten. Die jeweils äußersten 11 Nukleotide des Transposons sind kursiv dargestellt (L-IR: linker Inverted Repeat des Transposons, R-IR: rechter Inverted Repeat des Transposons), die Zielsequenz der Transposoninsertion in der DNA von *B. flavum* ist unterstrichen, sie besteht bei diesem Transposon aus 8 Nukleotiden und liegt nach Insertion auf beiden Seiten des Transposons vor.

3.3.5 Funktioneller Nachweis der *crt* Gene aus *B. flavum*

Durch Sequenzvergleiche konnten die Gene der GGPP Synthase (*crtE*, ORF3), der Phytoen Synthase (*crtB*, ORF5) und der Phytoen Desaturase (*crtI*, ORF6) in *B. flavum* identifiziert werden (siehe 3.3.3). Somit waren die Schritte der Carotinoidbiosynthese bis Lycopin aufgeklärt. Aus den durchgeführten Carotinoidanalysen ging jedoch hervor, daß *B. flavum* C₅₀ Carotinoide bildet (siehe 3.3.1). Da Gene oder Enzyme der C₅₀ Carotinoid Biosynthese bisher noch nicht bekannt waren, wurden die restlichen ORFs der sequenzierten DNA-Fragmente von *B. flavum* auf eine Beteiligung an der Carotinoid Biosynthese hin untersucht.

Da ORF7 und ORF8 aus *B. flavum* den beiden neuartigen Lycopin Zyklasegenen *crtYc* und *crtYd* aus *B. linens* (ORF9 und ORF8) sehr ähnlich waren, und ORF9 Ähnlichkeiten zu verschiedenen Prenyl Transferasegenen aufwies, wurden hier mögliche neue *crt* Gene vermutet. Als weiterer Hinweis dienten die Transposoninsertionen, die in ORF9 (MV40 und MV60) zu der Akkumulation von Lycopin und in ORF8 (MV70) zu der Akkumulation von Lycopin, Flavuxanthin und Nonaflavuxanthin führten. Diese drei möglichen neuen Gene der Carotinoid Biosynthese wurden im Folgenden untersucht.

3.3.5.1 Inaktivierung von ORF9 durch homologe Rekombination in *B. flavum*

Um die Funktion von ORF9 in *B. flavum* zu untersuchen, wurde das hypothetische Gen durch homologe Rekombination in *B. flavum* MV10 inaktiviert. Neben einem homologen Fragment zu einem Teil von ORF9 befand sich ein Erythromycin-Resistenzgen auf dem Plasmid pMON. Dieses Plasmid wird in *B. flavum* nicht repliziert. Somit kann eine Erythromycin-resistenz der mit diesem Plasmid transformierten Zellen nur ausgebildet werden, wenn eine Integration des Gens in das Genom stattgefunden hat. Nach Transformation von MV10 mit diesem Konstrukt wurden Klone mit erfolgreicher Integration durch Erythromycin selektioniert. Durch PCR mit beidseitig von ORF9 gelegenen Oligonukleotiden wurde eine Insertion des Plasmids in dieser Region bestätigt. Anschließende Sequenzanalyse der genomischen DNA in der Region der erfolgten Integration bestätigte die Unterbrechung von ORF9 (Abb. 3-23). Die Analyse des Pigmentgehalts durch HPLC der mit Methanol extrahierten Zellen ergab, daß *B. flavum* mit deletiertem ORF9 Lycopin als einziges Carotinoid akkumulierte. Dies bestätigte die Ergebnisse der Carotinoidanalyse aus den

Transposonmutanten MV40 und MV60. Diese Mutanten akkumulierten ebenfalls Lycopin und ORF9 war bei ihnen durch Transposoninsertion inaktiviert.

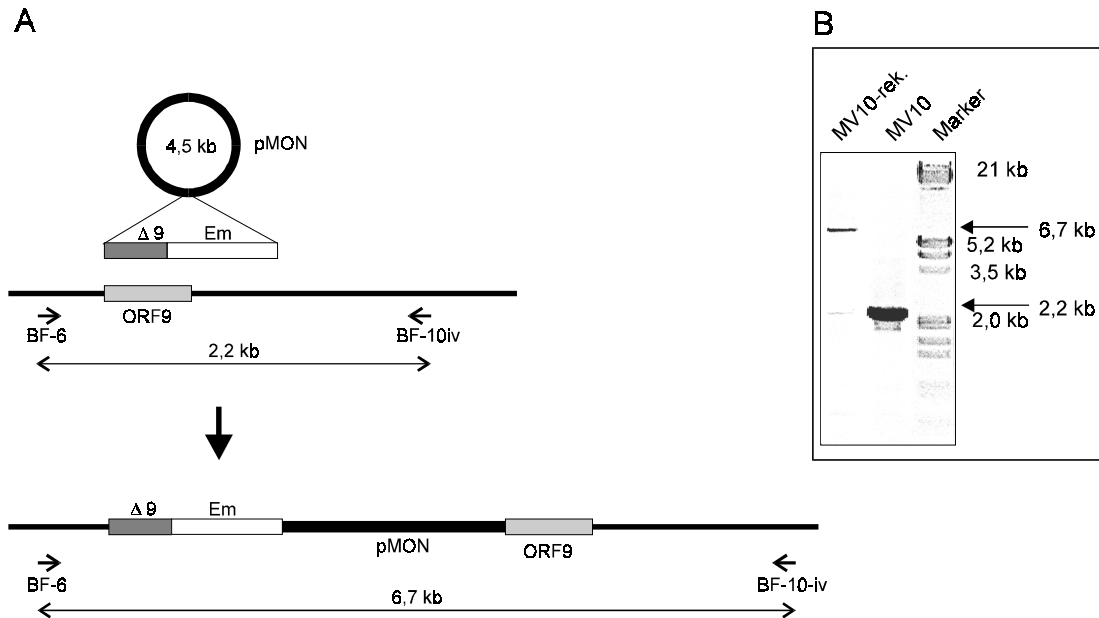


Abb. 3-23: (A) Schematische Darstellung der homologen Rekombination in *B. flavum* durch „single crossover“ und die daraus folgende Inaktivierung von ORF9. Die Transkription auf dem abgebildeten Strang verläuft von links nach rechts und wird durch die Rekombination an ORF9 und die daraus folgende Insertion des Plasmids unterbrochen (auf dem Plasmid sind einige Transkriptionsstop Signale lokalisiert). Em: Erythromycin-Resistenzgen, Δ9: unvollständiger ORF9, die Binderegion und Leserichtung der Oligonukleotide BF-6 und BF-10iv ist durch Pfeile angegeben sowie die Länge der daraus erwarteten PCR-Produkte. (B) Auf einem Agarosegel aufgetrennte Produkte einer PCR mit den Oligonukleotiden BF-6 und BF-10iv und genomischer DNA aus *B. flavum* vor (MV10) und nach (MV10-rek) der homologen Rekombination.

3.3.5.2 Heterologe Komplementierung von *E. coli* mit ORF7, ORF8 und ORF9

Um die Funktion von ORF7, ORF8 und ORF9 aus *B. flavum* zu testen, wurde *E. coli* JM101 [pACK-crtEBI_{EU}] mit verschiedenen, auf Plasmid pC1 basierenden, Konstrukten transformiert. Diese pC1-Konstrukte enthielten die drei zu testenden Gene in unterschiedlichen Kombinationen (Abb 3-24A). Nach Anzucht der Transformanten (0,5 mM IPTG) wurden ihre Carotinoidextrakte mittels HPLC analysiert (Abb.3-25) und quantitativ ausgewertet (Abb. 3-24B). Konstrukte mit Deletionen des ORF9 wiesen keine Veränderung gegenüber der Kontrolle pC1 auf, es wurde Lycopin akkumuliert. In Konstrukten mit intaktem ORF9, aber deletiertem ORF7 und/oder deletiertem ORF8 wurde neben 20 % Lycopin auch 80 % Flavuxanthin akkumuliert. In dem Konstrukt mit intakten ORF7, ORF8 und ORF9 war Lycopin nicht mehr nachweisbar, dafür aber Decaprenoxanthin (26 %) sowie Decaprenoxanthin Monoglucosid (44 %) und Decaprenoxanthin Diglucosid (30 %).

Trotz der Sequenzähnlichkeiten zu den neuartigen Lycopin Zyklasegenen *crtYc* und *crtYd* aus *B. linens* können die Genprodukte von ORF7 und ORF8 aus *B. flavum* Lycopin nicht zyklisieren. Daher werden diese neuen Gene *crtYe* (ORF7) und *crtYf* (ORF8) genannt. ORF9 wird *crtEb* genannt.

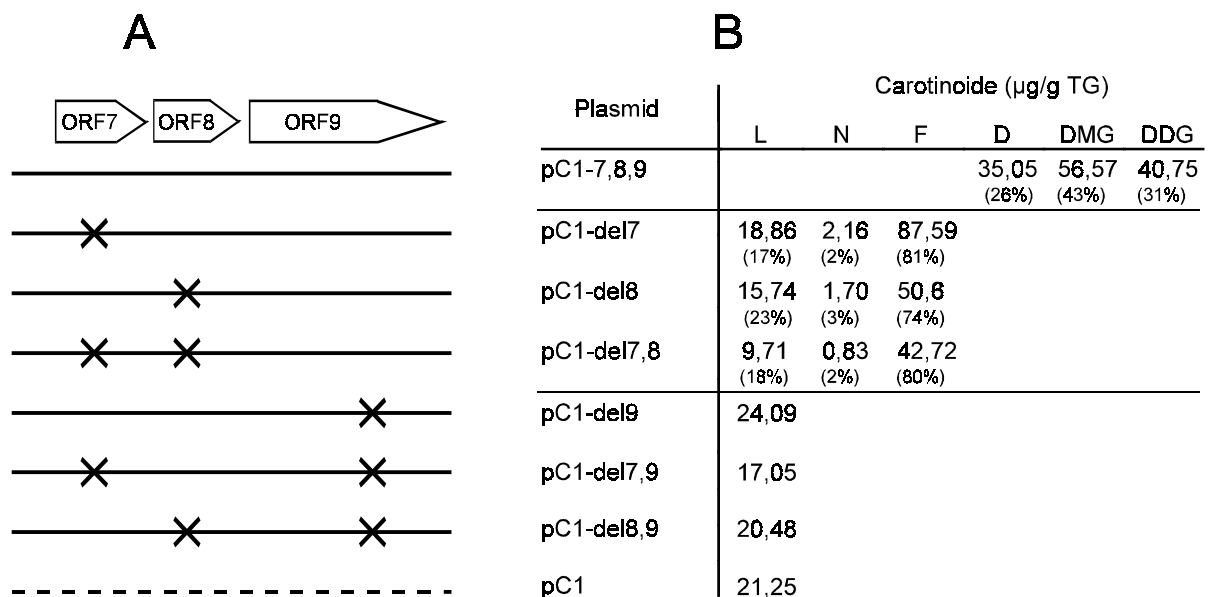


Abb. 3-24: (A) Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte von ORF7, ORF8 und ORF9 auf dem Plasmid pC1. Ein Kreuz gibt eine Leserasterverschiebung, und somit eine Deletion des entsprechenden Leserasters an. (B) Quantitative Carotinoidanalyse von *E. coli* JM101[pACK-crtEBI_{EU}] mit den entsprechenden Konstrukten. L: Lycopin, N: Nonflavuxanthin, F: Flavuxanthin, D: Decaprenoxanthin, DMG: Decaprenoxanthin Monoglucosid, DDG: Decaprenoxanthin Diglucosid.

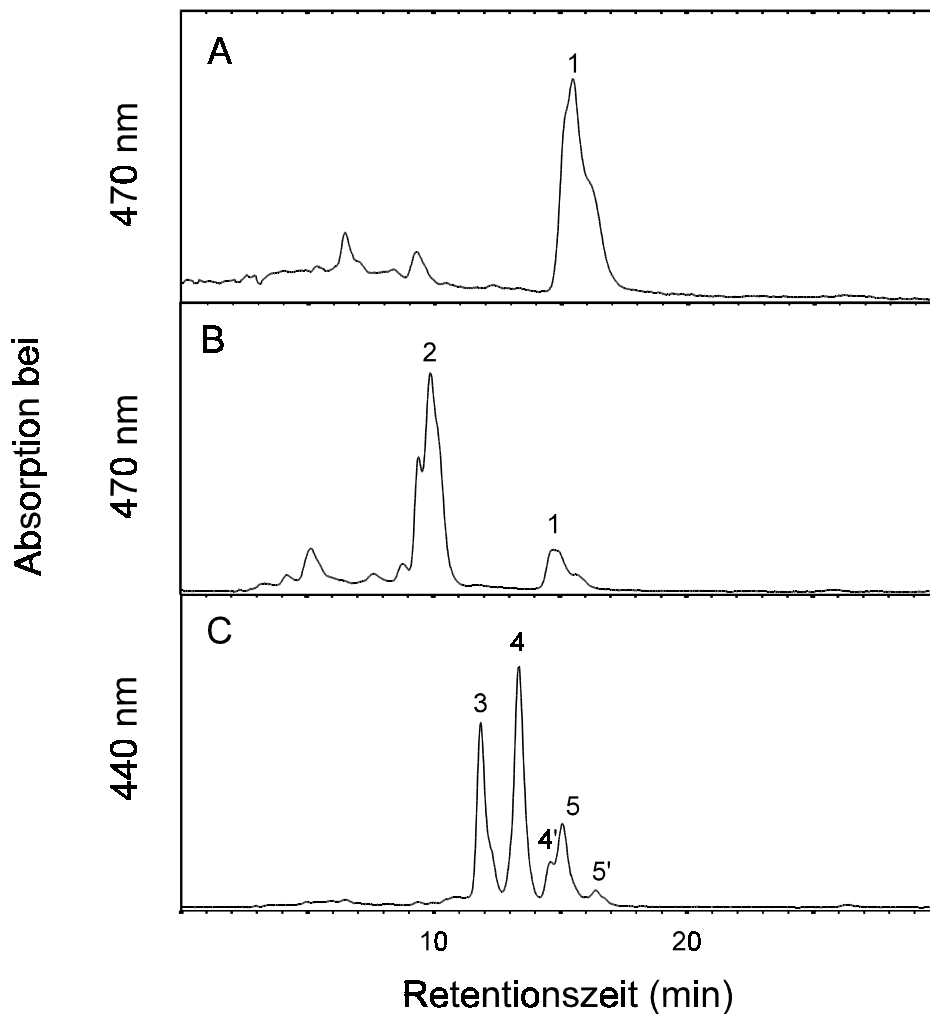


Abb. 3-25: HPLC-Elutionsprofile der Carotinoide aus verschiedenen *E. coli* JM101[pACKcrt-EBI_{EU}] Transformanten mit (A) pC1 (Kontrolle), (B) pC1- del7,8 und (C) pC1-7,8,9. Peak 1: Lycopin, Peak 2: Flavuxanthin, Peak 3: Decaprenoxanthin Diglucosid, Peak 4: Decaprenoxanthin Monoglucosid, Peak 5: Decaprenoxanthin, Peak 5': *cis*-Decaprenoxanthin, Peak 4': vermutlich *cis*-Decaprenoxanthin Monoglucosid.

3.3.5.3 Inaktivierung von ORF7, ORF8 und ORF9 durch homologe Rekombination in *B. flavum* und Komplementierung der deletierten Gene

Zur Bestätigung der in *E. coli* erhaltenen Ergebnisse wurden die drei ORFs 7, 8 und 9 in *B. flavum* deletiert. Anschließend wurde ihre Funktion durch Einbringen einzelner oder mehrerer ORFs auf einem Plasmid überprüft. Hierzu wurde ein Konstrukt von pMONT erstellt auf dem sich das 3'-Ende von ORF7, ORF8 und das 5'-Ende von ORF9, sowie ein Erythromycin Resistenzgen befanden (Abb. 3-26). In ORF7 und ORF8 wurde zusätzlich je eine Verschiebung des Leserasters eingeführt. Nach Transformation von *B. flavum* MV10 wurden Klone mit erfolgter Integration des Konstruktes durch Erythromycin selektiert. Die erfolgreiche Integration, und somit die Unterbrechung der ORFs, konnte durch Sequenzierung

der genomischen DNA eines entsprechenden Klons, MV10-C6, bestätigt werden. Durch Transformation von MV10-C6 mit Plasmid pC1, das verschiedene Kombinationen der drei ORFs trug (siehe Abb. 3-24), wurde die Funktion der Genprodukte in *B. flavum* bestimmt. Die Ergebnisse der heterologen Expression in *E. coli* (siehe 3.3.5.2) konnten hierbei bestätigt werden. In der Deletionsmutante MV10-C6 mit Plasmid pC1 als Kontrolle konnte ausschließlich Lycopin nachgewiesen werden. In den Transformanten mit Konstrukten bei denen ORF9 deletiert war (pC1-del9, pC1-del7,9, pC1-del8,9) wurde ebenfalls nur Lycopin akkumuliert. Jedoch war in diesen Transformanten der Anteil an *cis*-Lycopin mit 30-40 % vom Gesamtlycopin höher als in der Kontrolle, bei der *cis*-Lycopin 18 % des Gesamtlycopins ausmachte. Transformanten, die Plasmide mit intaktem ORF9 trugen (pC1-del7, pC1-del8, pC1-del7,8) akkumulierten Lycopin, Flavuxanthin und Nonaflavuxanthin während die Transformante mit dem Plasmid aller drei intakten ORFs (pC1-7,8,9) Decaprenoxanthin und seine glycosilierten Formen bildete.

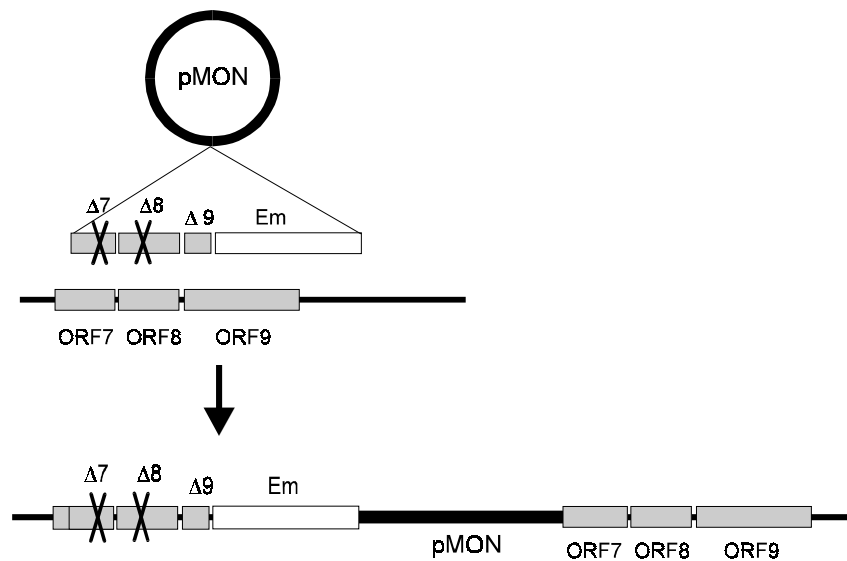


Abb. 3-26: Schematische Darstellung der homologen Rekombination in *B. flavum* durch „single crossover“ und die daraus folgende Inaktivierung von ORF7, ORF8 und ORF9. Die Transkription auf dem abgebildeten DNA-Strang verläuft von links nach rechts. Em: Erythromycin Resistenzgen, Δ7: ORF7 mit Leserasterverschiebung, Δ8: ORF8 mit Leserasterverschiebung, Δ9: unvollständiger ORF9.

4 DISKUSSION

4.1 Die Carotinoid Biosynthese in *B. linens*

In der vorliegenden Arbeit wurde das *crt* Gencluster von *B. linens* identifiziert und beschrieben. Mit ORF12 (IPP Isomerase), ORF11 (GGPP Synthase), ORF2 (Phytoen Synthase), ORF3 (Phytoen Desaturase), ORF9 und ORF8 (Lycopin Zyklasten) sowie ORF7 (β -Carotin Desaturase) wurden sämtliche Gene der an der Synthese von Isorenieraten beteiligten Enzyme identifiziert. Isorenieraten ist eines der Hauptcarotinoide von *B. linens* (Kohl *et al.*, 1983). Die Identifizierung der Gene erfolgte aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu *crt* Genen anderer Organismen. Die Gene der Phytoen Synthase, der neuartigen Lycopin Zyklasten und der β -Carotin Desaturase wurden zusätzlich durch funktionelle Komplementierung nachgewiesen. Das Gen des am letzten Schritt der Carotinoid Biosynthese von *B. linens* beteiligten Enzyms, das die Hydroxylierung von Isorenieraten zu Hydroxyisorenieraten katalysiert, konnte jedoch nicht identifiziert werden. Obwohl das hypothetische Genprodukt von ORF10 mit Sequenzähnlichkeiten zu Cytochrom P450 Enzymen die gesuchte Hydroxylase sein könnte, konnte eine hydroxylierende Funktion für das ORF10 Genprodukt nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt das Hydroxylasegen nicht auf dem *crt* Gencluster, sondern an einer anderen Stelle des *B. linens*-Genoms.

Basierend auf der Nukleinsäuresequenz konnten auf den untersuchten DNA-Fragmenten von *B. linens* keine Promotorregionen vorhergesagt werden. Die Anordnung der Strukturgene in dem *crt* Gencluster läßt aber zumindest auf zwei Promotoren, jeweils oberhalb („upstream“) von ORF2 und ORF12, schließen (siehe Abb. 3-2). Diese würden somit zwei Operons in entgegengesetzten Orientierungen bilden. Eine Organisation von *crt* Genen in zwei Operons ist bei den meisten bakteriellen *crt* Genclustern zu beobachten (Armstrong, 1994). Da zwischen ORF6 und ORF7 ein Bereich von 45 Nukleotiden und zwischen ORF4 und ORF5 ein Bereich von 66 Nukleotiden nicht translatiert wird, könnten auch in diesen Regionen weitere Promotoren vermutet werden. Diese Promotoren könnten die Expression von ORF6 (*crtK*), ORF5 (DNA-Photolyase) und ORF4, die alle nicht direkt an der Carotinoid Biosynthese beteiligt sind, kontrollieren. Promotoren aus Coryneformen Bakterien sind generell nur schwach konserviert. So wurde bei einem Vergleich von 33 Promotorsequenzen

aus *Corynebacterium glutamicum* eine nur sehr schwach konservierte Konsensussequenz gefunden, sie war deutlich weniger konserviert als die vieler anderer Bakterien (Pátek *et al.*, 1996).

Lichtregulierte Carotinoid Biosynthese durch CrtK?

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF6 aus *B. linens* weist hohe Ähnlichkeiten zu CrtK aus verschiedenen Bakterien zu und einem Membran-lokalisiereten Benzodiazepin Rezeptor (Mbr) aus Säugetieren auf. *crtK* Gene wurden in den *crt* Genclustern von *Rhodobacter capsulatus* (Armstrong *et al.*, 1989) und *R. sphaeroides* (Lang *et al.*, 1995) sowie in den Photosynthese Genclustern von *Heliobacillus mobilis* (Xiong *et al.*, 1998) und *Acidiphilium rubrum* (Masuda *et al.*, 1999) gefunden. Es konnte jedoch niemals eine enzymatische Aktivität des *crtK* Genproduktes nachgewiesen werden. Yeliseev und Kaplan (1995) zeigten aber, daß *crtK* in *R. sphaeroides* an der, für diesen Organismus typischen, sauerstoff- und lichtabhängigen Regulation der Bakteriochlorophyll und Carotinoid Biosynthese beteiligt ist. Daher wurde *crtK* in *tspO*, Tryptophan-Rich Sensory Protein, umbenannt. In *R. sphaeroides* hat die Deletion von *tspO* eine verstärkte Expression der *crt* Gene zur Folge, während bei Überexpression von *tspO* die *crt* Genexpression reduziert wird. Ein an einer tierischen Membran-lokalisierter Benzodiazepin Rezeptor (Mbr) kann bei Expression in *R. sphaeroides* TspO (CrtK) in seiner Funktion ersetzen (Yeliseev *et al.*, 1997). Da sich die Genprodukte von *tspO* (*crtK*) und *mbr* in Sequenz und Funktion sehr ähnlich sind, wird eine evolutionäre Beziehung dieser beiden Gene diskutiert. In *R. sphaeroides* ist TspO in der äußeren Membran lokalisiert und es wurde eine Signaltransduktionskette von dort bis zur Bildung der DNA-Transkriptionsfaktoren vorgeschlagen (Yeliseev und Kaplan, 1999).

Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten und der Lokalisation von ORF6 aus *B. linens*, der sich wie *crtK* von *R. capsulatus* im *crt* Gencluster befindet, wäre es denkbar, daß ORF6 an einer lichtabhängigen Regulation der Carotinoid Biosynthese beteiligt ist. Eine durch Licht induzierte Carotinoid Bildung wurde für einige *B. linens*-Stämme beschrieben (Mulder *et al.*, 1966; Crombach, 1974). Der in dieser Arbeit verwendete Stamm zeigt jedoch keine lichtregulierte Carotinoid Biosynthese. Möglicherweise wurde der Regulationsmechanismus durch Mutationen in der Signaltransduktionskette unterbrochen, *crtK* blieb aber als ein Teil dieses Mechanismus erhalten.

Effektive Carotinoid Biosynthese durch IPP Isomerasegen im *crt* Gencluster

Basierend auf Sequenzähnlichkeiten von ORF12 aus *B. linens* mit Genen anderer Organismen wurde ORF12 als Gen der IPP Isomerase (*idi*) identifiziert. Dieses Enzym katalysiert die Isomerisierung des C₅ Körpers Isopentenyl Pyrophosphat (IPP) zu Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP), das als Startermolekül in der Terpenoid Biosynthese benötigt wird. Es ist bekannt, daß eine gesteigerte IPP Isomerase Expression eine erhöhte Carotinoid Biosynthese zur Folge haben kann (Kajiwara *et al.*, 1997). In dem in dieser Arbeit untersuchten Organismus *B. linens* ist jedoch erstmalig das Gen der IPP Isomerase direkt in einem *crt* Gencluster lokalisiert worden. ORF11, der dem IPP Isomerasegen direkt folgt und um 100 bp überlappt, kodiert für eine GGPP Synthase (*CrtE*). Die Anordnung von *idi* und *crtE* in einem Operon läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß *CrtE* den C₅ Körper DMAPP als allylisches Substrat verwendet und es durch wiederholte Addition von IPP direkt zu GGPP umwandelt. Dieser Typ von GGPP Synthase wurde für *Sulfolobus acidocaldarius* (Ohnuma *et al.*, 1994) und die Plastiden von Pflanzen (Camara *et al.*, 1989) beschrieben und erfordert keine weiteren Enzyme um GGPP für die Carotinoid Biosynthese zur Verfügung zu stellen. Andere GGPP Synthasen, z.B. aus *Erwinia uredovora* (Wiedemann *et al.*, 1993) und dem Pilz *Phycomyces* (Brinkhaus und Rilling, 1988), verwenden den C₁₅ Körper Farnesyl Pyrophosphat (FPP) als allylisches Substrat an das sie ein Molekül IPP anhängen, um den C₂₀ Körper GGPP zu erhalten. In diesem Fall ist ein weiteres Enzym, eine FPP Synthase nötig, um das für die Carotinoid Biosynthese benötigte GGPP zu bilden. Das Gen einer weiteren Prenyl Transferase wurde jedoch auf dem untersuchten Gencluster von *B. linens* nicht nachgewiesen.

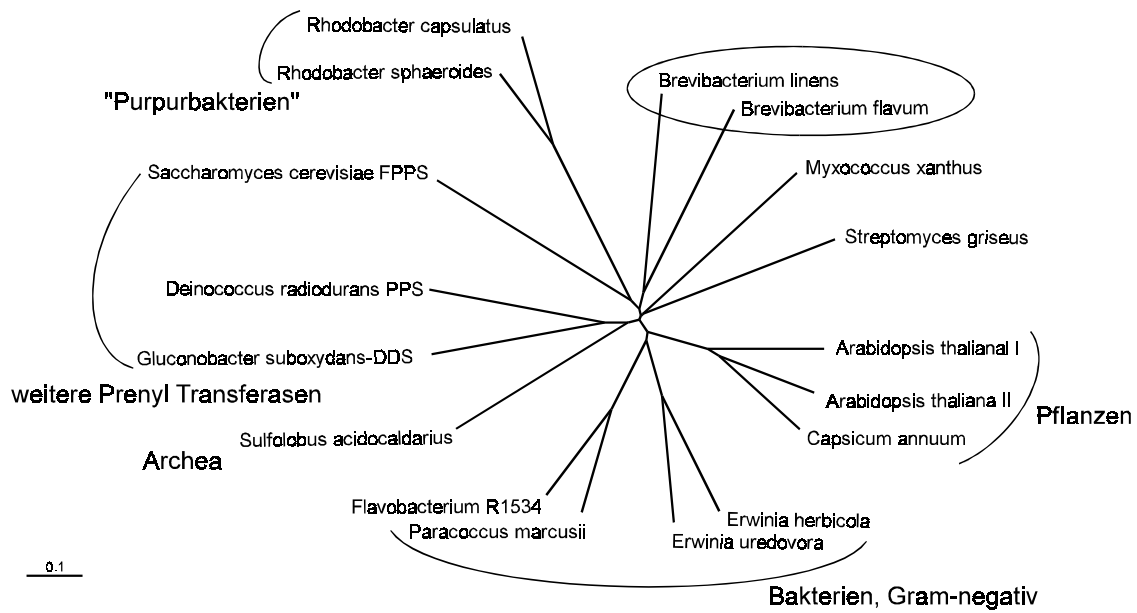
Um die Bildung von natürlicherweise in einigen Coryneformen Bakterien vorkommenden Carotinoiden zu steigern, würde sich die heterologe Expression der beiden Gene *idi* und *crtE* aus *B. linens* eignen. In den so modifizierten Organismen würde GGPP direkt aus IPP gebildet werden und so vermehrt unmittelbare Vorstufen der Carotinoid Biosynthese zur Verfügung stehen. Dies hätte sicherlich in den meisten Carotinoid synthetisierenden Bakterien eine verstärkte Akkumulation von Carotinoiden zur Folge.

Die Gene der frühen Schritte der Carotinoid Biosynthese sind in *B. linens* und *B. flavum* ähnlich: GGPP Synthase, Phytoen Synthase und Phytoen Desaturase

Die Gene der GGPP Synthase (*crtE*), der Phytoen Synthase (*crtB*) und der Phytoen Desaturase (*crtI*) aus *B. linens* und *B. flavum* konnten aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten zu entsprechenden Genen aus anderen Organismen bestimmt werden. Ein funktioneller Nachweis von *crtB* aus *B. linens* erfolgte durch Komplementierung einer farblosen und phytoenfreien Mutante von *B. flavum*. Nach Komplementierung mit *crtB* bildete diese Mutante wieder Carotinoide und färbte sich gelb. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der drei frühen Gene der Carotinoid Biosynthese *crtE*, *crtB* und *crtI* aus *B. linens* sind denen aus *B. flavum* sehr ähnlich. Abbildung 4-1 macht deutlich, daß die *crt* Gene aus *B. linens* die größte Ähnlichkeit zu den *crt* Genen aus *B. flavum* haben, die entsprechenden *crt* Gene anderer Bakterien sind ihnen weniger ähnlich. Dies steht auch in Übereinstimmung mit der engen phylogenetischen Verwandtschaft von *B. linens* und *B. flavum*. In allen bisher untersuchten Organismen sind die Gene der frühen Biosyntheseschritte sehr gut konserviert (Armstrong *et al.*, 1990). Bei den Desaturasegenen ist jedoch eine Unterteilung in *pds*-Typ Desaturase und *crtI*-Typ Desaturase zu beobachten. In Cyanobakterien und Pflanzen werden überwiegend *pds*-Typ Desaturasen gefunden, während die übrigen Bakterien *crtI*-Typ Desaturasen besitzen (Sandmann, 1994a). Die abgeleitete Aminosäuresequenz der in *B. linens* und *B. flavum* gefundenen Gene der Phytoen Desaturasen entsprechen in guter Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen den bakteriellen Desaturasen vom *crtI*-Typ.

In den meisten bekannten Fällen von in Genclustern organisierten bakteriellen *crt* Genen ist trotz der recht unterschiedlichen Organisation zu beobachten, daß *crtI* direkt von *crtB* gefolgt wird (Armstrong, 1994). Für alle verfügbaren *crt* Gencluster, die aus *Rhodobacter capsulatus* (Armstrong *et al.*, 1989), *R. sphaeroides* (Lang *et al.*, 1994), *Erwinia uredovora* (Misawa *et al.*, 1990), *E. herbicola* Eho10 (Hundle *et al.*, 1994), *E. herbicola* Eho13 (To *et al.*, 1994) *Mycobacterium marinum* (Ramakrishnan *et al.*, 1997), *Agrobacterium auraticum* (Misawa *et al.*, 1995b), *Flavobacterium* sp. R1543 (Pasamontes *et al.*, 1997), *Streptomyces griseus* (Schumann *et al.*, 1996) und *S. coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996) stammen, konnte diese Beobachtung bestätigt werden. In den Cyanobakterien *Synechocystis* sp. PCC6803 und *Synechococcus* sp. PCC7942 folgt auf das Gen der Phytoen Desaturase ebenfalls das Gen der Phytoen Synthase (Armstrong, 1994). Die übrigen *crt* Gene dieser Cyanobakterien sind jedoch nicht in einem Gencluster organisiert. In den in dieser Arbeit untersuchten *crt* Genclustern von

GGPP Synthasen



Phytoen Synthasen

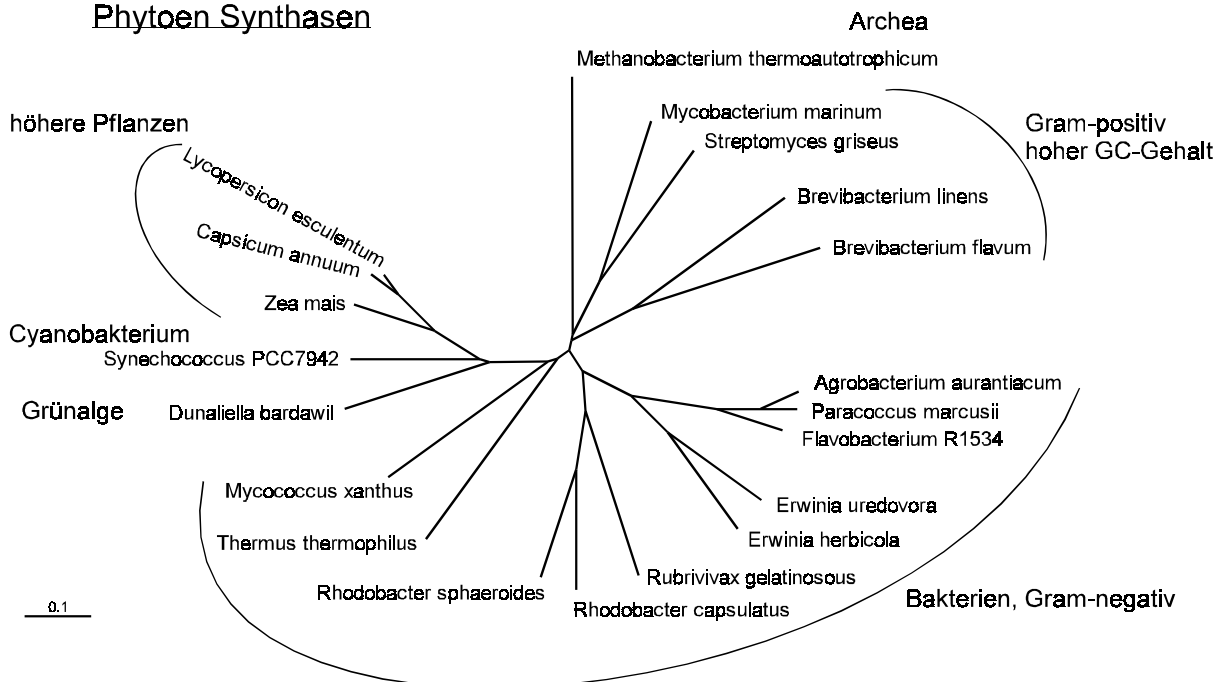
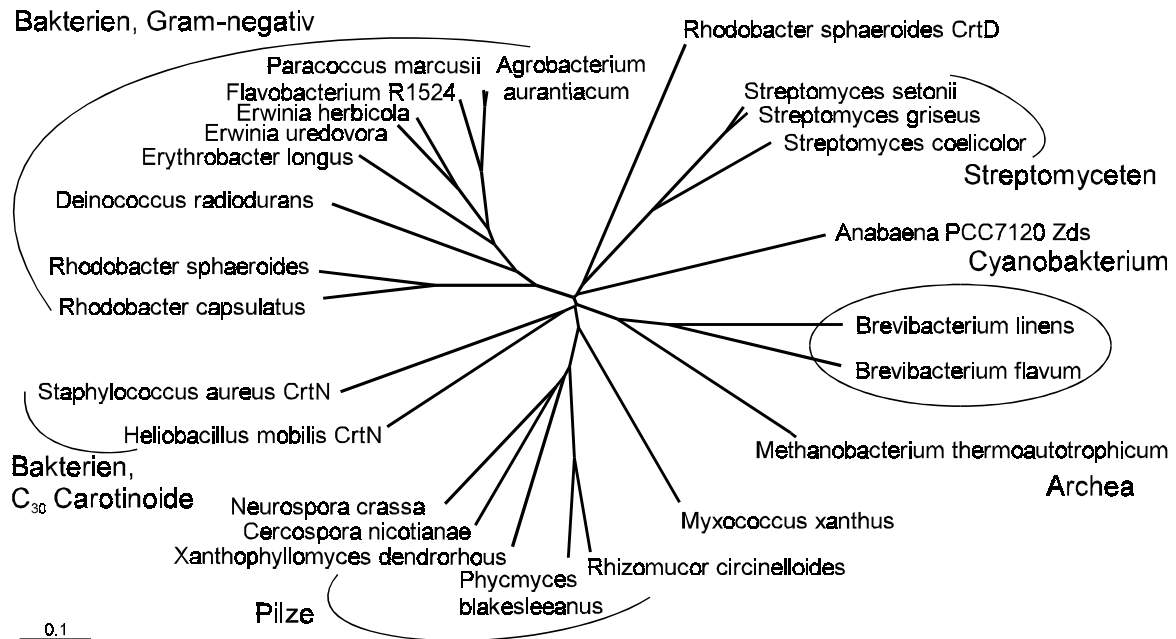


Abb. 4-1: Phylogenetische Bäume der GGPP Synthasen (keine Angabe: GGPP Synthase, FPPS: FPP Synthase, PPS: Polyprenyl Synthase, DDS: Decaprenyldiphosphat Synthase), Phytoen Synthasen und crtI-Typ Phytoen Desaturasen (keine Angabe: Phytoen Desaturase, CrtN: Diapophytoen Desaturase, CrtD: Methoxyneurosporin Desaturase, Zds: ξ -Carotin Desaturase) basierend auf ihren Aminosäuresequenzen. Die Errechnung der Bäume erfolgte mit 1000 Wiederholungen. Die Skalen geben 0,1 Aminosäureaustausche an einer Position an.

crtI-Typ Desaturasen



Fortsetzung Abb. 4-1

B. linens und *B. flavum* wurde jedoch erstmalig die umgekehrte Anordnung vorgefunden. Das heißt, daß in beiden Organismen *crtI* direkt auf *crtB* folgt.

Die Bildung von *crt* Genclustern hat sicherlich den Vorteil einer besseren Regulierbarkeit der Biosynthese von Carotinoiden, besonders wenn dies in Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen passiert (Armstrong, 1997). Eine Erklärung für die in allen Bakterien beobachtete direkte Abfolge der Gene der Phytoen Desaturase und der Phytoen Synthase ist jedoch nicht bekannt. Wieso sind diese Gene immer gemeinsam angeordnet, während die übrigen *crt* Gene keiner festen Abfolge in einem *crt* Gencluster unterliegen?

Die β -Carotin Desaturase

Das Gen der β -Carotin Desaturase *crtU* aus *B. linens* wurde durch heterologe Expression in einem β -Carotin akkumulierenden *B. flavum*-Stamm klar identifiziert. Außerdem konnte gezeigt werden, daß nur CrtU für die Umsetzung von β -Carotin zu Isorenieraten benötigt wird. Dies ist bemerkenswert, da bei dieser Umsetzung in die beiden β -Ringe von β -Carotin je zwei weitere Doppelbindungen eingeführt werden und zusätzlich je eine der zwei Methylgruppen von Position C-1 bzw. C-1' an Position C-2 bzw. C-2' verschoben wird (Moshier und Chapaman, 1973). Es findet also sowohl eine Desaturierung als auch eine Methylgruppenverschiebung bei der durch CrtU katalysierten Umwandlung statt. Das Gen der β -Carotin Desaturase aus *B. linens* hat eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *crtU* aus *Streptomyces griseus*, das ebenfalls als Gen der β -Carotin Desaturase identifiziert wurde (Krügel *et al.*, 1999). Auf dem aus *S. griseus* isolierten Gencluster befanden sich neben den Genen *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY* und *crtU* das Gen *crtT* mit Sequenzähnlichkeiten zu Genen von Methyl Transferasen und das Gen *crtV* mit Sequenzähnlichkeiten zu Genen von Methyl Esterasen. Man vermutete eine Beteiligung dieser zwei Genprodukte an der Bildung von Isorenieraten aus β -Carotin (Schumann *et al.*, 1996). Um die Funktion dieser Genprodukte zu bestimmen, wurde eine Mutante von *S. griseus*, deren gesamtes *crt* Gencluster deletiert war, mit verschiedenen Deletionskonstrukten dieses *crt* Clusters transformiert. So konnte gezeigt werden, daß die Deletion von *crtU* zur Unterbrechung der Isorenieraten Bildung und somit zur Akkumulation von β -Carotin führte. Die Deletion von *crtT* oder *crtV* hatte keinen nachweisbaren Einfluß auf die Bildung von Carotinoiden; ihre Genprodukte sind somit wahrscheinlich nicht an der Bildung von Isorenieraten beteiligt (Krügel *et al.*, 1999). Jedoch kann bei diesen Versuchen mit *S. griseus* nicht vollkommen ausgeschlossen werden, daß ein weiteres außerhalb des deletierten *crt* Genclusters sitzendes Gen an der Methylgruppenverschiebung und Desaturierung von β -Carotin gemeinsam mit *crtU* beteiligt ist. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte heterologe Expression von *crtU* aus *B. linens* in einer Lycopin akkumulierenden Mutante von *B. flavum* wurde jedoch bestätigt, daß das *crtU* Genprodukt ausreicht, um β -Carotin zu desaturieren und gleichzeitig eine Methylgruppe zu verlagern. Da der Wildtyp der *B. flavum*-Mutante von Lycopin ausgehend C_{50} Carotinoide bildet und keine Carotinoide mit aromatischen Gruppen in ihm vorkommen, kann die Beteiligung eines Enzyms aus *B. flavum* an der hier erfolgten Bildung von Isorenieraten ausgeschlossen werden.

Wie Vergleiche der Aminosäuresequenz in Form eines Homologie-Plots von CrtU aus *B. linens* mit CrtU aus *B. flavum*, einem hypothetischen Protein sll0254 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 sowie einer crtI-Typ und einer pds-Typ Carotin Desaturase zeigen, besteht zwischen den beiden CrtU Proteinen eine große Ähnlichkeit. Eine schwächere aber dennoch deutliche Ähnlichkeit besteht zwischen CrtU und sll0254 (Abb. 4-2).

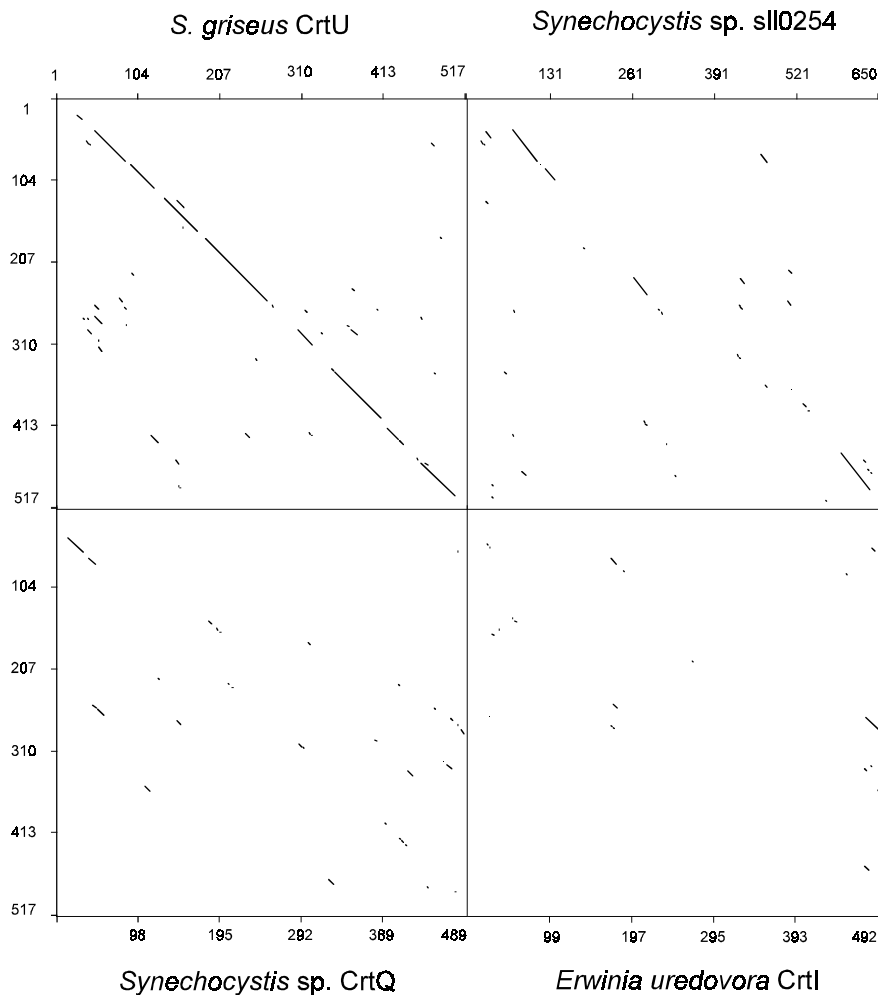


Abb. 4-2: Homologie Plot von CrtU aus *B. linens* (vertikal) gegen die β -Carotin Desaturase aus *Streptomyces griseus* (horizontal), ein Protein unbekannter Funktion (sll0254) aus *Synechocystis* sp. PCC6803, die pds-Typ ξ -Carotin Desaturase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 und die crtI-Typ Phytoen Desaturase aus *Erwinia uredovora*. Es wurden 13 identische Aminosäuren innerhalb eines Fensters von 23 Aminosäuren als Punkt wiedergegeben.

An ihren N-terminalen Enden besitzen alle untersuchten Proteine eine stark konservierte Dinukleotid Binderegion. Diese mögliche Kofaktor Bindestelle ist für alle Carotin Desaturasen (Armstrong *et al.*, 1993) und anderen Enzyme der FAD Superfamilie charakteristisch (Dailey und Dailey, 1998). In ihren C-terminalen Bereichen weisen CrtU- und Pds-Proteine klar konservierte Regionen auf, die den CrtI-Proteinen fehlen. Umgekehrt haben die CrtI-Proteine in diesen Bereichen konservierte Muster, die den CrtU- und Pds-Proteinen fehlen (Abb. 4-3). Dies legt die Vermutung nahe, daß die nur in Cyanobakterien und Pflanzen vorkommenden pds-Typ Desaturasen mit CrtU-Proteinen verwandt sind und sich beide aus gemeinsamen Formen entwickelt haben könnten.

B.l-CrtU	32	RVTII GAGIAGLAAAAILAEHGA E V T V I E K T D Y L G G R V G A W P V D D E R ----- T M S R G F H A F F R O Y Y N L R D L
S.g-CrtU	36	AVAVVGGGIAGIAAATLLAERGV R V T L Y B E P C L G G R L S G W P T E L T D G T T ----- V T M S R G F H A F F R O Y Y N L R G L
S.6803-s110254	60	SVVVV GAGTAGLASAYELSKRGFRV T L L E R S P N L G G K V A G W P I O V G E E T ----- F Q M E H G F H G F F P O Y Y N L K S I
S.7942-Pds	2	RVATAGAGLAGLSCAKYLADACH T P I V Y B R R D V L G G K V A A W K D E D C D ----- W Y E T C L H I F F G A Y P N L Q L
D.b-Pds	73	RVVITAGAGLAGLSAAKYLSDACH I P I V L B A R D V L G G K V A A W K D E D C D ----- W Y E T C L H I F F G A Y P N L Q R L
S.6803-CrtQ	2	RVAIVGAGLAGMATAVELVDACH E V E L Y B A R S F I G G K V G S W V D G D G N ----- H I E M G L H V F F G C Y Y N L F N L
S.6803-Pds	2	RVVITAGAGLAGLCAKYLADACFT P V V L B R R D V L G G K I A A W K D E D C D ----- W Y E T C L H I F F G A Y P N L Q L
A.t-Zds	58	KVAITGAGLAGMSTAVELLDQGH E V D I Y D S R T F I C A K V G S F V D R R G N ----- H I E M G L H V F F G C Y Y N L F R L
E.u-CrtI	3	PTTVIGAGFGGLALAIRLQAAC I P V I L L E Q R D K P G G R A Y V Y E D Q G F T F D A G P T V I T D P S A I E E L F A L A G K O L K E Y
R.c-CrtI	10	RAVVI GAGLGGLAAAMRLGAKCYK V I V V D R L D R P G G R G S S I T K G G H R F D L G P T I V T V P D R L R E L W A D C G R D F D K D
S.g-CrtI	10	HVVVV GAGLAGLAAALHLLGAC R R V T V V E R E D V P G G R A G L L E S G G F R I D T G P T V L T M P D L V E D A F A A V G E R M A D R
A.7120-Zds	4	KVAIVGAGPGGLATAIRLAGL G Y O V E I F A A E R V G G R M R G F E V D S Y A F D I G P T I L Q L P H L Y K E L F E E A G L N F A D Y
B.l-CrtU	446	RPEPSTPI PGLV VAGDYVRCNTPVALMERAATTG Y L A A N
S.g-CrtU	446	RPGVRS PDPAVTVAGDMVRTEL PVALMERAATSG Y L A A N
S.6803-s110254	588	RPETET PVANLLEFAGDWKMPFP CGLMERAATSS G L L S A N
S.7942-Pds	414	RPDQASP TIANFFLTGDYTMQRY-LASMEGAVLSG K L T A Q
D.b-Pds	481	RPSQKTP IENFYLAGDYTKQKY-LASMEGAVFSG K L L A C E
S.6803-CrtQ	435	RPSQAT P TIANFFLAGSYTQQDY-IDSMEGATLSG R Q A A Q
S.6803-Pds	414	RPDORTS V ENFYLAGDFTMQKY-LGSMEGAVLSG K Q C A Q
A.t-Zds	491	RPDQKTP IKNFFLAGSYTKQDY-IDSMEGATLSG R Q A S S
E.u-CrtI	426	DQLNAYHGS AFSV EPVLTQSAWFRPHNRDKT I I N L Y L V G
R.c-CrtI	438	DRYL S P L G A C F S L E P R I L Q S A W F R P H N A S E E V D C L Y L V G
S.g-CrtI	428	TAQGHAA G T P F S V A H T F P Q I G P F R P R N L V R G T V N A V L A G
A.7120-Zds	429	DDYRVHLGAVFNLSHNL T Q L G P F R P P I R S E N I A C L Y W I G

*

Abb. 4-3: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von CrtU aus *B. linens* (B.l-CrtU), CrtU aus *Streptomyces griseus* (S.g-CrtU), einem Protein unbekannter Funktion aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (S.6803-s110254), der pds-Typ Phytoen Desaturase aus *Synechococcus* PCC7942 (S.7942-Pds), der pds-Typ Phytoen Desaturase aus *Dunaliella bardawil* (D.b-Pds), der pds-Typ ζ -Carotin Desaturase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (S.6803-CrtQ), der pds-Typ Phytoene Desaturase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (S.6803-Pds), der pds-Typ ζ -Carotin Desaturase aus *Arabidopsis thaliana* (A.t-Zds), der crtI-Typ Phytoen Desaturase aus *Erwinia uredovora* (E.u-CrtI), der crtI-Typ Phytoen Desaturase aus *Rhodobacter capsulatus* (R.c-CrtI), der crtI-Typ Phytoen Desaturase aus *Streptomyces griseus* (S.g-CrtI) und der crtI-Typ ζ -Carotin Desaturase aus *Anabena* sp. PCC7120 (A.7120-Zds). Nur die zwei an stärksten konservierten Regionen der Proteine sind dargestellt, Nummern geben die Aminosäurepositionen in den Polypeptiden an. Übereinstimmende Aminosäuren zu CrtU von entweder *B. linens* oder *S. griseus* sind schwarz unterlegt, nur in pds-Typ oder crtI-Typ Desaturasen konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Ein in allen Desaturasen, ausgenommen CrtU und s110254, konserviertes Phenylalanin (F) ist durch einen Stern markiert.

In der selben Region, die auch als aktives Zentrum des Enzyms diskutiert wird (Armstrong *et al.*, 1989), fällt eine in allen Phytoen und ζ -Carotin Desaturasen, jedoch nicht in den CrtU-Proteinen konservierte Aminosäure Phenylalanin auf (Abb. 4-3). Möglicherweise liegt hier ein Motiv für die unterschiedliche Substraterkennung bzw. Aktivität der Desaturasen. CrtU ist die einzige bekannte Carotin Desaturase, die Doppelbindungen in einen β -Ring einführt. Alle anderen Desaturasen führen Doppelbindungen in azyklische Teile eines Moleküls ein.

Da die Dinukleotid Binderegion in allen Desaturasen stark konserviert ist, wurden Datenbanksuchen auch mit der an ihren N-terminalen Ende um 100 Aminosäuren verkürzten CrtU-Sequenz durchgeführt. So sollten Genprodukte mit über die Dinukleotid Binderegion hinausgehenden Ähnlichkeiten zu CrtU gefunden werden. Hierbei fand man das schon erwähnte Protein sll0254 unbekannter Funktion aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Die Ähnlichkeit zwischen CrtU und sll0254 beruht nicht nur auf der Dinukleotid Binderegion, sondern auch auf relativ gut konservierten Regionen in den C-terminalen Bereichen der Proteine. In der Mitte seiner Aminosäuresequenz hat sll0254 jedoch keine Ähnlichkeit zu CrtU. Hier befinden sich zusätzliche Aminosäure Sequenzabschnitte die in CrtU, und auch in anderen Carotin Desaturasen, nicht vorkommen. Die Funktion des sll0254 Genproduktes muß sich von der CrtU-Funktion unterscheiden, da in *Synechocystis* Carotinoide mit aromatischen Endgruppen nicht vorkommen (Bramley und Sandmann, 1985). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß das sll0254 Genprodukt an der Synthese von Carotinoiden beteiligt ist, da bisher noch nicht alle *crt* Gene aus *Synechocystis* identifiziert werden konnten. Vor allem die Synthese von Myxoxanthophyll aus Lycopin, die Desaturierungs- und Hydroxylierungsreaktionen einschließt, ist noch nicht aufgeklärt.

4.2 Neuartige Lycopin Zyklasegene

Die Genprodukte der im *crt* Gencluster von *B. linens* identifizierten Lycopin Zyklasegene ORF9 und ORF8 katalysieren die Zyklisierung von Lycopin zu β -Carotin. Durch heterologe Komplementierung konnte gezeigt werden, daß die zwei Genprodukte nur gemeinsam aktiv sind. Bei der Expression nur eines der beiden Gene fand keine Umsetzung von Lycopin statt, es wurden auch keine Zwischenprodukte der Lycopinzyklisierung gebildet. Bei der gleichzeitigen Expression beider Gene wurde die Bildung von β -Carotin und des Intermediats γ -Carotin beobachtet. Es konnte ebenfalls eine Zyklisierung von Neurosporin zu β -Zeacarotin beobachtet werden, was auf eine niedrige Substratspezifität, so wie es auch für die bisher bekannten Lycopin Zyklenen beschrieben wurde (Takaichi *et al.*, 1996), hindeutet. Dies ist der erste bekannte Fall in dem die Produkte von zwei unterschiedlichen Genen gemeinsam an der Umsetzung eines Carotinoids beteiligt sind und möglicherweise ein Heterodimer bilden. Die Bildung von Homodimeren aus Enzymen der Carotinoid Biosynthese wird hingegen häufig diskutiert. So wurde vermutet, daß die Phytoen Desaturase aus *Synechococcus* als Homodimer vorliegt (Chamovitz *et al.*, 1993). Die GGPP Synthase aus *Capsicum* Chromoplasten soll ebenfalls ein Homodimer sein (Dogbo und Camara, 1987) und es gibt indirekte Hinweise, daß in dem Pilz *Phycomyces* Homodimere an der Zyklisierung von Lycopin beteiligt sind (De la Guardia *et al.*, 1971).

Abgesehen von ihren Syntheseleistungen und der offensichtlich geringen Substratspezifität haben diese neuen Lycopin Zyklenen aus *B. linens* mit allen bisher bekannten bakteriellen und pflanzlichen Lycopin Zyklenen keine Gemeinsamkeiten. Während die neuen Zyklenen aus *B. linens* aus zwei relativ kleinen Polypeptiden von 125 bzw. 107 Aminosäuren mit einer errechneten Molmasse von 12,5 bzw. 13,9 kDa bestehen, haben die bisher bekannten Zyklenen eine Molmasse von über 43 kDa (Schnurr *et al.*, 1996) und bestehen aus nur einem Polypeptid von ca. 400 Aminosäuren. Zusätzlich besitzen die Genprodukte der pflanzlichen Zyklenen eine Transitsequenz von ca. 100 Aminosäuren (Cunningham und Gantt, 1998). Es werden drei konservierte Regionen für alle Zyklenen beschrieben, eine Dinukleotid Binderegion wie sie auch in Carotin Desaturasen gefunden wird (Armstrong *et al.*, 1993) und zwei Zyklase Motive (Cunningham *et al.*, 1996). Obwohl bei den Zyklisierungsreaktionen keine Nettooxidation oder -reduktion vorkommt, konnte gezeigt werden, daß die

Enzymaktivität des *crtY* Genproduktes aus *Erwinia uredovora* durch NADH oder NADPH beträchtlich gesteigert wird (Schnurr *et al.*, 1996). Man vermutet daher, daß NAD(P)H an die Dinukleotid Binderegion des Enzyms bindet und es so in eine geeignete Konformation bringt. Die neuen Lycopin Zyklasten aus *B. linens* haben keine Sequenzähnlichkeiten zu den bisher bekannten Lycopin Zyklasten. Außerdem treten keine der konservierten Motive der bisher bekannten Zyklasten in den neuen Zyklasten auf. Bei den Zyklasten aus *B. linens* handelt es sich somit um eine völlig neue Klasse von Lycopin Zyklasten, die daher *crtYc* (ORF9) und *crtYd* (ORF8) genannt werden. Hierbei steht *crtY* für die Lycopin Zyklastaktivität der beiden Genprodukte und *c* bzw. *d* für den neuen Zyklastentyp, der den „klassischen“ bakteriellen Lycopin Zyklasten *crtYa* gegenüber steht.

In dem *crt* Gencluster von *B. flavum*, dem zweiten in dieser Arbeit untersuchten Organismus, befinden sich ORF7 und ORF8 mit Sequenzähnlichkeiten zu den beiden Lycopin Zyklastegenen aus *B. linens*. Da gezeigt werden konnte, daß sie ebenfalls an Zyklisierungsreaktionen, jedoch nicht an der Zyklisierung von Lycopin, beteiligt sind, werden sie *crtYe* (ORF7 aus *B. flavum*) und *crtYf* (ORF8 aus *B. flavum*) genannt (siehe 4.4).

Bei Datenbanksuchen fanden sich zwei weitere ORFs, ORF7 und ORF8 aus dem *crt* Gencluster von *Myxococcus xanthus* (Botella *et al.*, 1995), mit Sequenzähnlichkeiten zu *crtYc* und *crtYd*. Eine Funktion konnte diesen Genen bisher jedoch nicht zugewiesen werden. In *Mycobacterium marinum* gibt es ebenfalls zwei ORFs unbekannter Funktion, die Sequenzähnlichkeiten zu *crtYc* und *crtYd* haben. Sie liegen in der Nähe eines funktionell identifizierten Phytoen Synthasegens (Ramakrishnan *et al.*, 1997). Da *Mc. marinum* das beidseitig zyklisierte β -Carotin als eines seiner Pigmente bildet (Tanaka *et al.*, 1968) und *Mx. xanthus* verschiedene einseitig zyklisierte Carotinoide wie Myxobacton und 4-Ketotorulen bildet (Reichenbach und Kleinig, 1984; Hodgson und Murillo, 1993), muß in beiden Organismen eine Zyklisierung von Lycopin erfolgen. Die Zyklastogene dieser Organismen konnten jedoch noch nicht identifiziert werden und es scheint somit wahrscheinlich, daß die jeweils zu *crtYc* und *crtYd* ähnlichen ORFs für die Lycopin Zyklasten dieser Organismen kodieren. Die Anordnung von *crtYc* und *crtYd* auf dem bakteriellen Chromosom von *B. linens* ist identisch mit der Anordnung der ähnlichen, wahrscheinlich homologen Gene von *B. flavum*, *Mx. xanthus* und *Mc. marinum*. In allen drei Organismen wird *crtYc* (bzw. *crtYe*) von *crtYd* (bzw. *crtYf*) gefolgt, die Transkriptionsrichtung verläuft von *crtYc* nach *crtYd*. In *Mycobacterium aurum* wurden kürzlich ebenfalls zwei ORFs mit Sequenzähnlichkeiten zu

crtYc und *crtYd* und einer Lycopin Zyklaseaktivität ihrer Genprodukte identifiziert (M. Viveiros, Institute of Hygiene and Tropical Medicine, Lissabon, Portugal, persönliche Mitteilung). *B. linens*, *B. flavum*, *Mc. marinum* und *Mc. aurum* sind als Mitglieder der Ordnung der *Actinomycetales* phylogenetisch eng verwandt (Stackebrandt *et al.*, 1997), während *Mx. xanthus* ein Vertreter der Gruppe der Gram-negativen Bakterien ist. Interessanterweise wurde in *Streptomyces griseus*, einem weiteren Vertreter der *Actinomycetales*, ein Lycopin Zyklasegen vom klassischen crtYa-Typ gefunden (Schumann *et al.*, 1996). Es handelt sich bei diesen neuartigen Genen der Lycopin Zyklase also um eine weit verbreitete Gruppe von zwei relativ kleinen Genen, deren Produkte nur gemeinsam eine Lycopin Zyklaseaktivität aufweisen.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *crtYc* und *crtYd* sind sich sehr ähnlich und besitzen eine konservierte Region in der Mitte des Polypeptids. Außerdem können für beide Genprodukte je drei Transmembran-Regionen in ähnlichen Polypeptidbereichen vorhergesagt werden. Eine in allen Genprodukten konservierte Region liegt zwischen zwei dieser Transmembran-Bereiche (Abb. 4-4). Diese Beobachtungen gelten auch für die homologen Proteine aus *Mx. xanthus* (Botella *et al.*, 1995), *Mc. marinum* und *B. flavum*. Basierend auf diesen Sequenzen läßt sich das konservierte Motiv w-x-y-x₁₃₋₁₆-P-x-E-E/D-x-x-F-f, das auffallend viele Aminosäuren mit aromatischen und carboxylierten Gruppen besitzt, ableiten.

B.l-CrtYc	1	-----MSAFEYLLLMGACLLITLPLELFSARVYRRPKLLIGSLIPIIL
Mc.mar-33	1	-----MSDRWQYLLVLLACLAIITAPLEVFGAG-VYRRPRLLRSVLPVAA
B.f-CrtYe	1	-----MAFIYLGTTLLVLIGCMALCDHRWKLAFRRPLRAIVSVGAAYI
Mx.xan-Orf7	1	-----MTYARFLGLFVVVPIFLAWRYRRTFTARSLAEMGLLLIVVYA
B.l-CrtYd	1	-----MLPEYTVMTVVGIVIVIGLEIFVFRSG-IFRRGQYWAALAICLAF
Mc.mar-34	71	SGDPHLRPVDPQRGQHHPRPAPPTMTGLGYTLPAVLAVAGVGALELLVLRGTG-LFRRPAYWLSMVIVLGF
B.f-CrtYf	1	-----MTYILISIPFLAIALVLFALKLQAG-TPKLLPITAVSALT LCS
Mx.xan-Orf8	1	-----MMETKWAYLIHLLGWTLPVITAFQLVVLVVRHYKERSGAVLKAVLPPAFI
B.l-CrtYc	45	VFSLWDI I A --- IDR DHW T Y N Q Q F V T G I H I - G N L P L E E L V F - F I V I P I C A L L S Y E A V G T V L K F V A K K S G T
Mc.mar-33	45	AFLVWDEI A --- VAARVW T Y D P R Y I S C L N V P F Q V P I E E V L F - F L V I P I C A L L T L N A V S T I L D R L R R R ---
B.f-CrtYe	44	GFLLDI F G I --- I T G T F Y R G D S A F M S G I N L A P H M P I E E L F F L F F L C Y I T L N L T S A A A L W L K A P L P E K P G R
Mx.xan-Orf7	44	ATSPWNI A --- V K W G L W G F D P E R I W G I K L - G Y L P L E E Y L F - F A L Q T L L V G L W A Q A R L A R A L A P D A Q A S R
B.l-CrtYd	45	QCLVDGWLTK--LSDPIVRYNPSQFLNVRFPWDIPIEDFGFGFAMITSVLMLWQWLNRSRKDTQ-----
Mc.mar-34	140	QVPVDGWLTK--LSAPIVSYNERQITGLRFPFDIPIEDFLFGFAMVTAVLLLWERQREPEGEPAPPSQAGC
B.f-CrtYf	43	LTIIFDNL M --- V W A D L F G Y G D T Q H L G I W L G - L I P L E D L F Y P L F A V L L I P A L W L P G N M F K R R K R P H H S L
Mx.xan-Orf8	49	MGLYLSIADHLAISTGIWNFGEGKHLGVYLG-VVPLEE V V F - F L I T S V L V S L G L A L F T G L V A L L G E A R S

Abb. 4-4: Sequenzvergleich von CrtYc (B.l-CrtYc) und CrtYd (B.l-CrtYd) aus *B. linens* mit CrtYe (B.f-CrtYe) und CrtYf (B.f-CrtYf) aus *B. flavum* sowie den je zwei ähnlichen ORFs aus *Mycobacterium marinum* (Mc.mar-33) und (Mc.mar-34) und *Myxococcus xanthus* (Mx.xan-7) und (Mx.xan-8). Vermutliche Transmembran-Regionen der Polypeptide sind grau unterlegt.

Durch Hemmstoffbindestudien und Mutageneseversuche an klassischen Lycopin Zyklasten erhielt man Hinweise, daß Aminosäuren mit carboxylierten und aromatischen Gruppen am katalytischen Mechanismus der Zyklisierung beteiligt sind (Bouvier *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, daß durch Austausch der beiden aromatischen Aminosäuren in dem Motiv F-X-Y oder der sauren Aminosäuren im Motiv E-E die Lycopin Zyklaseaktivität der mutierten Polypeptide verloren geht. Die konservierten Bereiche der neuen Lycopin Zyklasten lassen eine gewisse Ähnlichkeit zu diesem Aminosäuremotiv erkennen (Abb. 4-5). Es ist daher möglich, daß diese konservierten Bereiche zum katalytischen Zentrum der neuen Lycopin Zyklasten gehören.

CrtYa	F - x - Y . . . x(11) . . . E - E
CrtYc/d	w - x - Y/F . . x(15-18). . E - E/D

Abb. 4-5: Vergleich der an der katalytischen Aktivität beteiligten konservierten Aminosäuren der klassischen Lycopin Zyklasten (CrtYa) (Bouvier *et al.*, 1997) mit ähnlichen konservierten Aminosäuren in den neuen Lycopin Zyklasten (CrtYc/d). F: Phenylalanin (aromatisch), Y: Tyrosin (aromatisch), E: Glutaminsäure (sauer), D: Asparaginsäure (sauer), w: Tryptophan (aromatisch), x: beliebige Aminosäure, Großbuchstabe: stark konservierte Aminosäure, Kleinbuchstabe: schwächer konservierte Aminosäure.

Mit der Information über die hypothetischen Transmembranen-Regionen und den konservierten Bereich läßt sich ein Modell der neuartigen Lycopin Zyklasten entwickeln. Das CrtYc oder CrtYd Polypeptid durchspannt hierbei die bakterielle Membran dreimal und das konservierte Motiv, mit seiner für die Enzymaktivität wichtigen Funktion, liegt an der Membranoberfläche vor (Abb. 4-6).

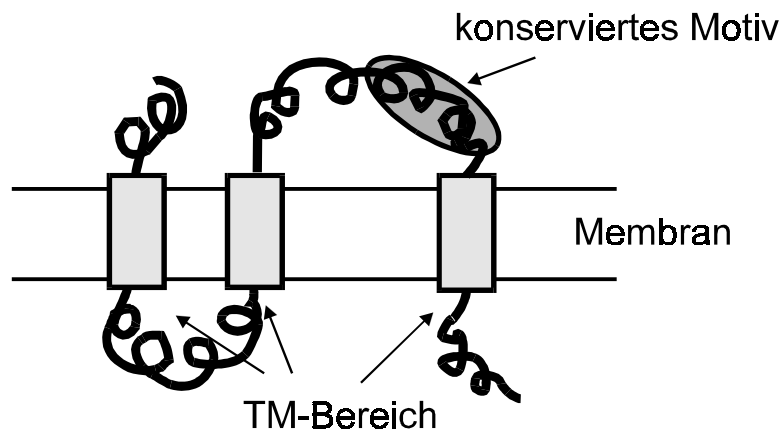


Abb. 4-6: Modell der möglichen Anordnung eines Proteins der neuen Lycopin Zyklasten in der bakteriellen Membran. TM: Transmembran-Bereich des Polypeptids.

4.3 Pilzliche Lycopin Zyklasegene

Das in dieser Arbeit beschriebene Gen der bifunktionellen Lycopin Zyklase/Phytoen Synthase *crtYB* aus dem Basidiomyceten *Xanthophyllomyces dendrorhous* ist der erste Nachweis eines Lycopin Zyklasegens in Pilzen. Durch Verkürzungen der *crtYB*-cDNA an ihren 5'- und 3'-Ende konnte gezeigt werden, daß in dem C-terminalen Teil des Genproduktes, mit Sequenzhomologien zu Phytoen Synthasen, auch das Zentrum der Phytoen Synthaseaktivität liegt. Der N-terminale Teil von CrtYB, mit Sequenzhomologien zu *crtYc* und *crtYd* aus *B. linens*, wird hingegen für die Lycopin Zyklaseaktivität benötigt.

Ein weiteres pilzliches Gen, *al-2* aus dem Ascomyceten *Neurospora crassa*, ist *crtYB* aus *X. dendrorhous* ähnlich. Dies schließt auch die Ähnlichkeit des 5'-Endes zu *crtYc* und *crtYd* ein. Von dem *al-2* Genprodukt ist bisher jedoch nur eine Phytoen Synthaseaktivität bekannt (Schmidhauser *et al.*, 1994). Bei Datenbanksuchen erhielt man ein drittes pilzliches Gen aus dem Zygomyceten *Mucor circinelloides* (CAB60272) mit Sequenzähnlichkeiten zu *crtYB*. In diesem Organismus wurde aufgrund von klassischen genetischen Studien zuvor schon eine entweder gemeinsame Translation von Lycopin Zyklase (*carR*) und Phytoen Synthase (*carP*) oder eine Fusion dieser beiden Gene (*carRP*) vermutet (Velayos *et al.*, 1997). Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung eines bifunktionellen Gens an der Zyklisierung von Lycopin in Pilzen erhielt man aus dem Zygomyceten *Phycomyces* (Torres-Martínez *et al.*, 1980). Aufgrund von Rekombinationsversuchen mit Pigmentmutanten wurde vermutet, daß ein Gen mit einem Teil für eine Lycopin Zyklase kodiert (*carR*, Mutante akkumuliert Lycopin) und mit dem anderen Teil für ein Protein, das am Substrattransfer innerhalb eines hypothetischen Enzymkomplexes beteiligt sein soll, kodiert (*carA*, carotinoidfreie Mutante). Nach der Entdeckung von *crtYB* ist jedoch viel eher zu vermuten, daß *carA* von *Phycomyces* dem *crtB*-Teil von *crtYB* entspricht, also einer Phytoen Synthase. Dies ist eine weitere Bestätigung des anscheinend in allen Pilzen verbreiteten *crtYB*-Gentyps. Es wurden somit Lycopin Zyklase-/Phytoen Synthasegene vom Typ des *crtYB* in allen drei großen Gruppen der Pilze gefunden und man kann vermuten, daß dies der allgemein verbreitete pilzliche Gentyp ist. Da *crtYB* selbst in Zygomyceten, aus denen sich Ascomyceten und Basidiomyceten entwickelt haben, schon gefunden wird, ist auf eine frühe Entstehung dieses einzigartigen Fusionsgens zu schließen.

Das insgesamt 600 Aminosäuren große Genprodukt von *crtYB* trägt an seiner N-terminalen Region einen Bereich von etwa 250 Aminosäuren mit Sequenzähnlichkeiten zu CrtYc und CrtYd. Das konservierte Motiv aus CrtYc und CrtYd findet sich hier zweimal in einem solchen Abstand, daß dieser Bereich aus CrtYc und CrtYd aufgebaut sein könnte (Abb. 4-7). Der C-terminale Bereich hat deutliche Sequenzähnlichkeiten zu Phytoen Synthasen.

Dieses zusammengesetzte Gen *crtYB* der Pilze könnte aus der Fusion der beiden Lycopin Zyklasegene *crtYc* und *crtYd* mit einem Phytoen Synthasegen, ähnlich wie es für *crtB* in *Rubrivivax gelatinosus* beschrieben wurde, entstanden sein (Ouchane *et al.*, 1997). In *R. gelatinosus* wurde durch photooxidativen Stress eine „illegitime“ Rekombination der DNA ausgelöst, so daß ein inaktives *crtB* Gen aktiviert wurde und der entsprechende Stamm wieder Carotinoide bilden konnte. Die neuartigen Lycopin Zyklasegene des in *B. linens* gefundenen *crtYc/crtYd*-Typs wären somit mögliche Vorgänger des pilzlichen Lycopin Zyklase/Phytoen Synthase Fusionsgens.

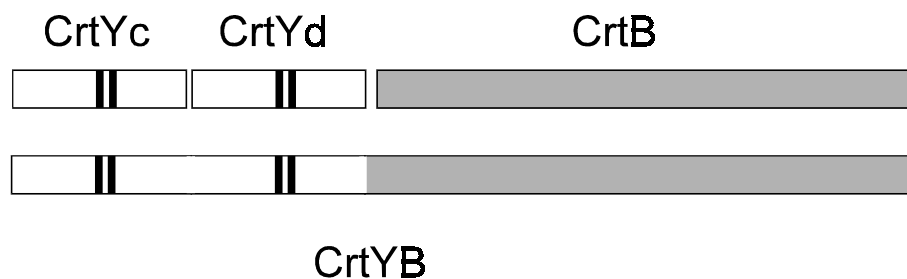


Abb. 4-7: Schematische Darstellung der Regionen ähnlicher Sequenzabschnitte der neuen Lycopin Zyklasen CrtYc und CrtYd sowie der Phytoen Synthase CrtB und des Produktes des pilzlichen Fusionsgens *crtYB*.

4.4 Neue Carotinoide und *crt* Gene in *B. flavum*: die Synthese von C₅₀ Carotinoiden

Durch die Analyse der Carotinoide von *B. flavum* konnte der Carotinoid Biosyntheseweg dieses Bakteriums erstmalig beschrieben werden. *B. flavum* bildet das C₅₀ Carotinoid Decaprenoxanthin, die Glycoside Decaprenoxanthin Monoglucosid und Decaprenoxanthin Diglucosid sowie geringe Mengen der entsprechenden Fettsäureester. Außerdem wurden die neuen, bisher noch nicht beschriebenen Carotinoide Nonapren [2-(3-Methyl-2-butenyl)- ϵ , ψ -carotin], Nonaflavuxanthin [2-(4-Hydroxy-3-methyl-2-butenyl)- ψ , ψ -carotin] und Flavuxanthin [2,2'-Bis(4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl)- ψ , ψ -carotin] als Intermediate identifiziert.

Als erstes natürlich vorkommendes C₅₀ Carotinoid wurde Decaprenoxanthin als das Hauptcarotinoid von *Flavobacterium dehydrogenans* beschrieben (Liaaen-Jensen und Weeks, 1966). Aus diesem Organismus stammen bisher auch die meisten Hinweise auf die Biosynthese von C₅₀ Carotinoiden (Weeks, 1971). So ist schon lange bekannt, daß C₅₀ Carotinoide aus C₄₀ Vorstufen durch Substitution einer Isopentenylgruppe an Position C-2 und C-2' gebildet werden. In *F. dehydrogenans* konnte man alle typischen C₄₀ Carotinoide bis zum Lycopin finden und es wurde eine Kettenverlängerung nach Lycopin bzw. im Zusammenhang mit der Zyklisierung von Lycopin vermutet. Basierend auf Markierungsexperimenten, Hemmstoffstudien und Mutantanalysen wurde der Biosyntheseweg von azyklischen C₄₅ und C₅₀ Carotinoiden postuliert, bei dem Lycopin an C-2 und C-2' prenyliert wird und diese Seitenketten anschließend hydroxyliert werden (Kushwaha und Kates, 1979). Die Biosynthese zyklischer C₅₀ Carotinoide wurde hingegen noch nicht eingehend untersucht (Pfander, 1994).

Der in dieser Arbeit, aufgrund der in *B. flavum* und seinen Transposonmutanten identifizierten Carotinoide, ausgearbeitete Biosyntheseweg von Decaprenoxanthin ist der bisher detaillierteste Vorschlag zur Bildung von zyklischen C₅₀ Carotinoiden. Es kommt hinzu, daß durch die gezielte Sequenzanalyse der DNA verschiedener *B. flavum*-Transposonmutanten das *crt* Gencluster eines C₅₀ Carotinoid bildenden Organismus erstmals identifiziert werden konnte. Das *crt* Gencluster von *B. flavum* besteht aus sieben Genen [*crtE*, ORF4, *crtB*, *crtI*, ORF7 (*crtYe*), ORF8 (*crtYf*) und ORF9 (*crtEb*)], die alle in der selben Orientierung,

wahrscheinlich als ein Operon, vorliegen. Die Anordnung der Gene läßt einen Promotor oberhalb von ORF3 vermuten. In dieser Region ist auch das Transposon der Carotinoid überproduzierenden Mutante MV10 integriert, was auf eine regulatorische Funktion dieses DNA-Abschnittes schließen läßt. ORF4, mit Sequenzähnlichkeiten zu membranassoziierten Transportproteinen, ist offensichtlich nicht an der Carotinoid Biosynthese beteiligt. Das *crt* Gencluster aus *B. flavum* mit deletiertem ORF4 reichte aus, um in *E. coli* Carotinoide zu bilden (M. Kobayashi, Mitsubishi Chemicals, Japan, persönliche Mitteilung). Die restlichen sechs ORFs sind ausreichend, um die Hauptcarotinoide von *B. flavum* in *E. coli* heterolog zu bilden. Die ersten drei Gene *crtE*, *crtB* und *crtI* und die durch ihre Produkte gebildeten Carotinoide entsprechen der für viele Bakterien beschriebenen Carotinoid Biosynthese. Die letzten drei Gene, ORF7, ORF8 und ORF9 sind ausreichend, um in *E. coli* ausgehend von Lycopin die Hauptpigmente von *B. flavum*, Decaprenoxanthin, Decaprenoxanthin Monoglucosid und Decaprenoxanthin Diglucosid, bilden zu lassen. Erstaunlicherweise können die gemeinsam exprimierten Genprodukte von ORF7 und ORF8, die Sequenzähnlichkeiten zu den Lycopin Zyklasen *crtYc* und *crtYd* aus *B. linens* haben, Lycopin nicht zyklisieren. Nur im Zusammenspiel mit ORF9 wird das C₅₀ Carotinoid Decaprenoxanthin gebildet. Trotz hoher Sequenzähnlichkeiten von ORF7 und ORF8 zu *crtYc* und *crtYd* aus *B. linens* besitzen die Genprodukte von ORF7 und ORF8 aus *B. flavum* eine andere Funktion als die Genprodukte aus *B. linens*. Daher werden sie *crtYe* (ORF7) und *crtYf* (ORF8) genannt. Der folgende ORF9 wird *crtEb* genannt. Das in *E. coli* exprimierte Genprodukt von *crtEb* kann Lycopin in das azyklische C₄₅ Carotinoid Nonaflavuxanthin und das azyklische C₅₀ Carotinoid Flavuxanthin umsetzen. Hierbei wird jeweils eine Isoprenoid Einheit an C-2 bzw. C-2' des Lycopins angehängt. Es entsteht ein Molekül, das wie Decaprenoxanthin ohne Ringschluß aussieht. Das durch ORF9 (*crtEb*) kodierte Enzym ist demzufolge eine Lycopin Elongase, die ein Lycopinmolekül um zwei Isopreneinheiten verlängern kann.

Bisher wurde vermutet, daß der Mechanismus der Bildung zyklischer C₅₀ Carotinoide dem der Zyklisierung von Lycopin sehr ähnlich ist (siehe Abb. 1-1). Anstatt des elektrophilen Angriffs eines Protons an Position C-2 eines Lycopinmoleküls sollte der elektrophile Angriff durch ein Isopren-Kation erfolgen. So sollte es zu einer Kettenverlängerung mit gleichzeitiger Zyklisierung kommen (Goodwin, 1980). Die in dieser Arbeit gefundenen Carotinoide Nonaflavuxanthin und Flavuxanthin belegen aber, daß die Addition der Isopentenyl Seitenkette und die Zyklisierung zwei unabhängige Schritte sind. Möglicherweise akzeptieren die Zyklasen CrtYe und CrtYf aus *B. flavum* nur das um ein oder zwei C₅ Einheiten zu Nonaflavuxanthin und Flavuxanthin verlängerte Lycopin als Substrat. Dieses wird durch die Lycopin Elongase CrtEb aus Lycopin gebildet (Abb. 4-8).

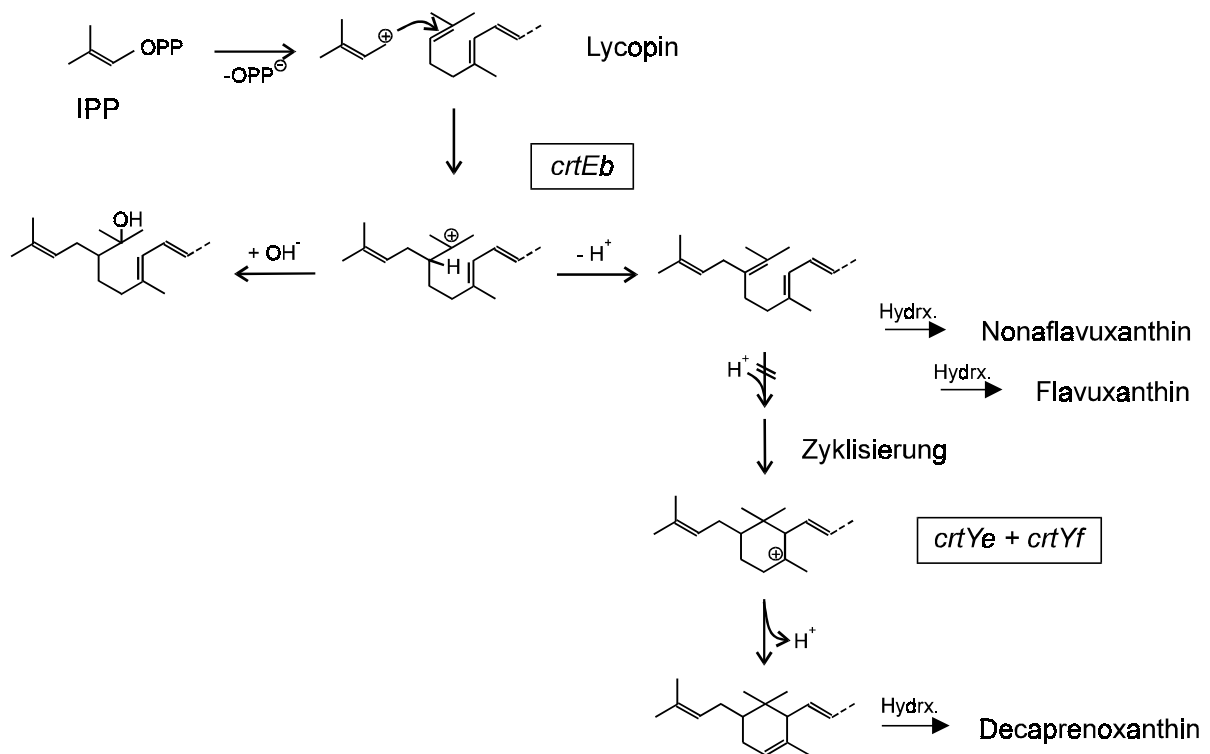


Abb. 4-8: Bildung von Decaprenoxanthin aus Lycopin und Darstellung des Zweischritt-Mechanismus von Lycopinelongation und anschließender Zyklisierung. Der vorgeschlagene Mechanismus beruht auf den aus *B. flavum* isolierten Carotinoiden und den identifizierten *crt* Genen. Hydrx.: Hydroxylierung.

Das Genprodukt von *crtEb* ist also, da es für die Addition einer C₅ Prenylgruppe an C-2 von Lycopin verantwortlich ist, eine Art Prenyl Transferase. Tatsächlich konnten bei Sequenzvergleichen zwischen FPP Synthasen, GGPP Synthasen, Octaprenyl Transferasen und CrtEb auch schwach konservierte Aminosäurebereiche in allen Proteinen gefunden werden (Abb. 4-9). Es handelt sich dabei um das Motiv DDXXD der konservierten Regionen I und III von Prenyl Transferasen (Carattoli *et al.*, 1991). Bezogen auf die gesamte Gensequenz, sind die Sequenzähnlichkeiten von *crtEb* zu anderen Prenyl Transferasegenen jedoch nicht hoch. Große Sequenzähnlichkeiten bestehen nur zu der Bakterienchlorophyll Synthase BchG aus *Heliobacillus mobilis* (Xiong *et al.*, 1998), die eine Veresterung eines Tetrapyrrolrings, dem Bakteriochlorophyllid a, mit einem Phytolrest, GGPP oder Geranylgeranyl-PP, katalysiert (Oster *et al.*, 1997). In dieser Reaktion wird ein kettenförmiges Isoprenoid Molekül mit hoher Strukturähnlichkeit zu Carotinoiden mit einem Chlorophyllid verbunden. Die Gemeinsamkeit der beiden Enzyme CrtEb und BchG ist also die Verwendung ähnlicher Substrate. Eine Verwandtschaft zwischen Chlorophyll Synthasen und anderen Prenyl Transferasen wird diskutiert (Lopez *et al.*, 1996).

	Domäne I		Domäne III
M.t-Ptr	56 ASIFIYGC--VNDWWEET--DILNPKK		176 CHVAAMHIFSAVPDTEYDRIA
B.f-CrtEb	49 YNIAMYG--INDVFDYES--DIRNPRK		174 LWGMANQILGAVQDVNADREA
S.6803-Ptr	56 GNVYIVG--LNQLWDVDI--DRINKPN		184 VFTVAIAIFKDVDPMEGDRQF
H.m-BchG	73 PLVLGMGQSINDYYDADV--DAINEPD		198 IGSHGFMTMNDFKSVEGDKQW
B.s-Dnot	65 IQIATNL--FNEYDFKRGLDTAESVG		194 ILVGAINLSNNIRDIIEEDKKG
Rat-FPPS	91 ELLQAFFLVLDDIMDSS----YTRRGI		233 EMGEFFQIQDDYLDLFGDPSV
R.c-crtE	72 HCASLVH---DDLPAFDN--ADIRRGK		200 -IGSAFQIADDLKDALMSAEA
E.u-crtE	86 HAASLIL---DDMPCMD--AKLRRGR		220 DLGQAFQLLDDLTDGMTDTGK
	DDxxD		DDxxD
	oder DDxxxxD		

Abb. 4-9: Sequenzvergleiche zwischen CrtEb aus *B. flavum* (B.f-CrtEb) und einer Prenyl Transferase aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (M.t-Ptr), einer Prenyl Transferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (S.6803-Ptr), einer Bakteriochlorophyll Synthase aus *Heliobacillus mobilis* (H.m-BchG), einer Octaprenyl Transferase aus *Bacillus subtilis* (B.s-Dnot), einer FPP Synthase der Ratte (Rat-FPPS), einer GGPP Synthase aus *Rhodobacter capsulatus* (R.c-CrtE) und einer GGPP Synthase aus *Erwinia uredovora* (E.u-CrtE). Vergleich mit den konservierten Domänen I und III der Prenyl Transferasen (Carattoli *et al.*, 1991).

Erstaunlicherweise entstanden bei den Expressionsversuchen mit *crtYe*, *crtYf* und *crtEb* in *E. coli* große Mengen von C₄₅ und C₅₀ Xanthophyllen sowie deren Glycosiden. Eigentlich sollten bei einer Prenylierung von Lycopin Carotine, also sauerstofflose Kohlenwasserstoffverbindungen, entstehen. Ob diese Hydroxylierung und Glycosylierung durch unspezifische aber dennoch sehr effektive Enzyme von *E. coli* katalysiert wird, konnte bisher nicht geklärt

werden. Allerdings konnte eine quantitativ so auffällige Modifizierung von Carotinoiden durch *E. coli* noch nie beobachtet werden und es stellt sich die Frage, ob CrtYe, CrtYf und vor allem CrtEb nicht auch die folgenden Hydroxylierungs- und Glycosylierungsreaktionen katalysieren. Für diese Vermutung würde auch sprechen, daß man auf dem *crt* Gencluster von *B. flavum* und in dessen Nähe auf dem bakteriellen Chromosom keine Gene mit Sequenz-ähnlichkeiten zu bekannten Hydroxylasegenen oder Glycosylasegenen fand. Eine endgültige Antwort auf die Frage der Hydroxylierung und Glycosylierung durch CrtYe, CrtYf und CrtEb ist wohl nur durch einen *in-vitro* Test zu erhalten.

4.5 Expression der Gene Coryneformer Bakterien in *E. coli*

Von entscheidender Bedeutung für die Klonierung der *crt* Gene aus Coryneformen Bakterien war die erfolgreiche Expression dieser Gene in heterologen Systemen. Die Expression in *E. coli* erwies sich hierbei als sehr schwierig. Besser war es die Gene in näher verwandten Organismen zu exprimieren. Hierbei führte die Expression von *B. linens*-Genen in *B. flavum* zum Erfolg. Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich mit Ausnahme von *crtYc* und *crtYd* selbst einzeln in spezielle Expressions-Vektoren klonierte *B. linens*-Gene in *E. coli* nicht funktionell exprimieren ließen. Im Gegensatz hierzu stehen Expressionsversuche von *B. flavum*-Genen bei denen alle *crt* Gene funktionell in *E. coli* exprimiert wurden. Ein möglicher Grund der unterschiedlichen Exprimierbarkeit der Gene aus *B. linens* und aus *B. flavum* könnte der unterschiedlich hohe GC-Gehalt der DNA dieser Bakterien sein. Der GC-Gehalt der sequenzierten und insgesamt 14 kb großen DNA-Fragmente von *B. linens* beträgt 61,8 %. Die Werte für den GC-Gehalt des gesamten Genoms von *B. linens* liegen bei 60 bis 64 % (Jones und Keddie, 1986). Die sequenzierten DNA-Fragmente von *B. flavum* mit einer Gesamtgröße von 14,4 kb haben mit 48,7 % einen deutlich niedrigeren GC-Gehalt als *B. linens* und entsprechen eher dem von *E. coli* (51%). Oft wird ein hoher GC-Gehalt und eine damit verbundene ungewöhnliche „Codon Usage“ als Grund schlechter Genexpression in *E. coli* genannt. So auch bei der Expression von Genen aus *Streptomyces*-Arten deren GC-Gehalt bei über 70 % liegt (Wright und Bibb, 1992). Man sieht aber auch, daß ein ähnlicher GC-Gehalt von zu exprimierendem Gen und Expressionssystem nicht immer für eine funktionelle Genexpression entscheidend ist, da die *B. linens*-Gene (62 % GC) in *B. flavum* (49 % GC) exprimiert wurden. Es spielen offensichtlich weitere Faktoren, wie

korrektes Falten und Prozessieren der gebildeten Polypeptide sowie möglicherweise das Vorhandensein geeigneter Kofaktoren, eine Rolle für die Funktionalität eines heterolog gebildeten Proteins.

4.6 DNA-Photolyasen in Verbindung mit *crt* Genen?

Durch den UV-Anteil am sichtbaren Licht kann es zur Schädigung von DNA kommen. Dies geschieht meist durch die Bildung von Zyklobutan Pyrimidin Dimeren (CPDs) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon Photoprodukten [(6-4) Photoprodukte]. Diese strukturellen Veränderungen der DNA können einerseits Replikation und Transkription verhindern und dadurch zum Zelltod führen andererseits mutagen oder karzinogen wirken (Carell, 1995). DNA-Photolyasen sind Enzyme, die an UV-geschädigte DNA binden und unter Verwendung der Energie des sichtbaren Lichts (Absorption eines Blaulicht Photons, 350-450 nm) diese DNA-Schäden reparieren können (Sancar, 1996)

Sowohl in den sequenzierten DNA-Abschnitten von *B. linens* (ORF5) als auch von *B. flavum* (ORF2) fand sich jeweils ein ORF dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zu Mitgliedern der Proteinfamilie der Photolyase-Blaulicht Photorezeptoren hat. Diese Proteinfamilie läßt sich in drei Gruppen unterteilen (Kanai *et al.*, 1997). **CPD Photolyasen** sind weit verbreitet und können CPDs reparieren (Sancar, 1994). Sie haben wie wahrscheinlich alle Mitglieder dieser Familie zwei verschiedene Chromophore. Das erste Chromophor, Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder 8-Hydroxy-5-deazaflavin (8-HDF), dient als Photoantenne und absorbiert ein Blaulicht Photon. Dessen Anregungsenergie wird auf FAD, den Kofaktor an der Reaktionsstelle des Enzyms, übertragen. Daraufhin überträgt das angeregte Flavin ein Elektron auf ein CPD, was zur Aufspaltung des Dimers an der DNA führt. Basierend auf Sequenzähnlichkeiten werden CPD Photolyasen in zwei Klassen eingeteilt. **Klasse I** kommt in Prokaryoten vor, je nach verwendetem Kofaktor wird diese Klasse in **MTHF-Typ** und **8-HDF-Typ** unterteilt. Die Photolyasen der **Klasse II** kommen überwiegend in Eukaryoten vor. Die zweite Gruppe sind die erst vor wenigen Jahren entdeckten **(6-4) Photolyasen** (Todo *et al.*, 1993). Sie reparieren (6-4) Photoprodukte. Die dritte Gruppe dieser Proteinfamilie sind die **Blaulicht Photorezeptoren**. Sie sind wichtige Lichtrezeptoren in frühen Entwicklungsstadien von Pflanzen. Das erste Gen eines Blaulicht

Photorezeptors wurde aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (Ahmad und Cashmore, 1993), Gene mit ähnlichen Sequenzen wurden inzwischen in mehreren höheren Pflanzen gefunden (Ahmad und Cashmore, 1996). Blaublicht Photorezeptoren weisen hohe Sequenzähnlichkeiten zu Photolyasen auf und benötigen auch die selben Kofaktoren wie diese. In ihrer C-terminalen Region unterscheiden sie sich jedoch von Photolyasen, da sie dort zusätzliche Abschnitte von 150 bis 300 Aminosäuren besitzen, die Photolyasen nicht haben. Trotz der hohen Sequenzähnlichkeiten zu Photolyasen besitzen Blaublicht Photorezeptoren keine DNA-Reparaturaktivität (Malhotra *et al.*, 1995).

Aufgrund der folgenden Sequenzmerkmale konnte eine Einordnung der hypothetischen Genprodukte von ORF5 aus *B. linens* und ORF2 aus *B. flavum* in die Photolyase-Blaublicht Photorezeptor Proteinfamilie vorgenommen werden (Abb. 4-10A).

1. FAD-Bindestelle: Fast alle konservierten Aminosäuren der FAD-Bindestellen (Kanai *et al.*, 1997) sind auch bei den beiden hypothetischen Genprodukten aus *B. linens* und *B. flavum* konserviert (F).

2. MTHF-Bindestelle: Eine in allen MTHF-Typ Photolyasen konservierte Glutaminsäure (536) aus der MTHF-Binderegion (E) ist bei den hypothetischen Genprodukten aus *B. linens* und *B. flavum* ebenfalls konserviert, jedoch ist diese Aminosäure auch bei einigen 8-HDF-Typ Photolyasen konserviert.

3. CPD-Bindestelle: Fast alle konservierten Aminosäuren der wahrscheinlichen CPD-Bindestellen sind auch in den hypothetischen Genprodukten aus *B. linens* und *B. flavum* konserviert (C).

Gegen eine Einstufung der beiden ORFs als Gene von Blaublicht Photorezeptoren sprechen die fehlenden, für Blaublicht Photorezeptoren charakteristischen, C-terminalen Aminosäureabschnitte. Ebenso sind die Aminosäuren der CPD Bindestelle konserviert, vor allem Tryptophan 227 (Ahmad und Cashmore, 1993). Diese sind in Photorezeptoren nicht konserviert.

Diese Einordnung, basierend auf konservierten und für die Funktion charakteristischen Aminosäuren, wird zusätzlich durch einen phylogenetischen Baum unterstützt. Hierbei wurden die Aminosäuresequenzen von Mitgliedern der Photolyase-Blaublicht Photorezeptor Familie über ihre gesamte Länge verglichen und entsprechend ihrer Ähnlichkeit angeordnet (Abb. 4-10B). Es zeigt sich, daß die beiden Genprodukte aus *B. linens* und *B. flavum* die höchste Ähnlichkeit zu der Klasse I, MTHF-Typ CPD Photolyase aus *E. coli* haben.

A

				F		FFFF	
B. f-Orf2	208	P----	FWATTLVK	ECAP	CEKNASEK	I	FDFLEH-LQDY
B. l-Orf5	216	ASGPRWQ	DTIAGHW	SPGLRAAE	DQIDDL	SAI-IDGY	TTTKDVP
E. c-Phr	190	N---YPR	QSFDTA	HFVVEE	KAAIAQ	LRQFCQ	NGAGEYE
S. g-Phr	189	V-----	ENLSPG	LARG	EEAGR	KLVTSW	LNGPMADY
A. t-Blr	201	SE--KGS	NALLAR	AWSP	CWSNGD	KAATTF	INGPLLE
D. m-64	210	KRPEELG	PNKFP	GGETE	ALRRME	ESKDEI	WVARFEK
M. x-Phr	140	D-----	HSVAPI	QERG	CRKAGL	DALQAF	VHQRL
						EGYDE	GRNDP
						G	LAR-Q
						S	NLS
						F	FFF
B. f-Orf2	262	EIS----	IHRVWA	EETA-	AIDS-	-----	EGTELF
B. l-Orf5	275	ELSPRQ	-LLQA	ARTTS-	SLTQ-	-----	DDRAAW
E. c-Phr	246	GLSPRQ	CLHRL	LAEQP	QALDG-	-----	GAGSVL
S. g-Phr	242	TVSAAE	LVRARE	KGG-	-----	-----	LGGEAF
A. t-Blr	258	EVSVRK	VFHLV	RIKQV	AWANE	GNEAGE	ESVNL
D. m-64	269	CLASRL	LFNQ	LKEIK	IKRQ	PKHS-	-----
M. x-Phr	193	NLFAGE	AARAA	IRARG	AQDAS-	-----	VQGFLE
						-----	LVRRE
							LGFNY
							CF
							CFHTE
							GPQQL
							SVAS
B. f-Orf2	311	QFNRF	GWSWD	PSEK	IKLN	TPST	PLIPTK
B. l-Orf5	327	EFHNF	-----	PYED	-----	-----	DDAL
E. c-Phr	300	AWTDR	-----	VQWQ	SN-	-----	PAHL
S. g-Phr	291	RHDRW	-----	RSD	-----	-----	ADEM
A. t-Blr	318	HLKFF	-----	PWAV	-----	-----	ENYF
D. m-64	324	YCMQI	-----	PWQEH	-----	-----	PDHE
M. x-Phr	246	LPPWAK	ETL	TRHQ	KAR-	-----	EHRYS
							KOLET
							ARAD
							GLWN
							AAQR
							ELVER
B. f-Orf2	371	SMHNR	VRMV	VASFL	TK---	NLQI	HRHCE
B. l-Orf5	365	WMHNR	VRMVT	ASFL	TK---	NLQHW	WFCEQ
E. c-Phr	339	WMHNR	LRMIT	ASFL	VK---	DLID	WREGE
S. g-Phr	327	WMHNR	ARMLA	ASFL	TK---	TYVD	WREG
A. t-Blr	356	WLHNR	IRVV	SSFV	VK---	VLQ	PWRW
D. m-64	362	WIHLR	ARH	AVAF	CFTR	GD--	DLWIS
M. x-Phr	293	RHHYLR	MLWG	KKIL	EWTP	SPQE	ALQRI
							AFLN
							DNDK
							YAVD
							GRDP
							PASV
							ANFM
							WVLC
							LHDR
							PRFQ
							ERQ

B

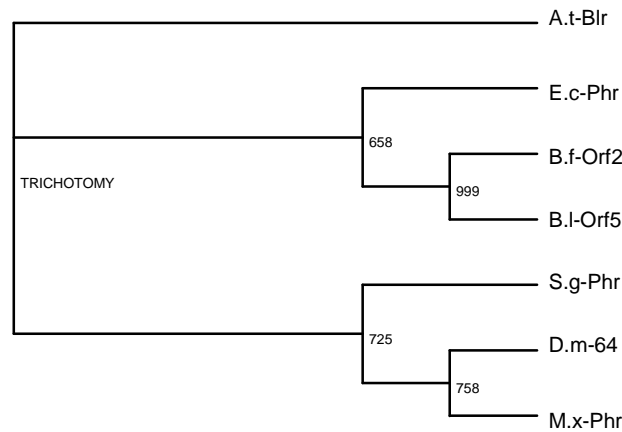


Abb. 4-10: (A) Sequenzvergleich der DNA-Photolyasen aus *B. linens* (B.l-Phr) und *B. flavum* (B.f-Phr) mit Mitgliedern der Photolyase Blaulicht-Photorezeptor Proteinfamilie. E.c-Phr: MTHF Typ Klasse I CPD Photolyase aus *Escherichia coli* (P00914); S.g-Phr: 8-HDF Typ Klasse I CPD Photolyase aus *Streptomyces griseus* (P12768); A.t-Blr: Blaulicht Photorezeptor aus *Arabidopsis thaliana* (S66907); D.m-64: (6-4) Photolyase aus *Drosophila melanogaster* (D83701); M.x-Phr: Klasse II CPD Photolyase aus *Myxococcus xanthus* (U44437). Nur der zentrale Teil des Sequenzvergleichs ist gezeigt, Aminosäurepositionen innerhalb der Polypeptide sind durch Zahlen angegeben. Aminosäuren, die in allen Sequenzen konserviert sind, sind schwarz unterlegt, in mindestens vier Polypeptiden konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Konservierte Aminosäuren, die charakteristisch für die verschiedenen Gruppen dieser Proteinfamilie sind (Kanai *et al.*, 1997), sind durch Buchstaben über den Sequenzen angegeben. F: Konservierte Aminosäure der FAD Binderegion, C: Konservierte Aminosäure der wahrscheinlichen CPD Binderegion, E: konservierte Glutaminsäure 536 der MTHF-Typ Photolyasen. (B) Stammbaum basierend auf dem Vergleich aus A. „Bootstrap-Werte“ aus 1000 Berechnungen sind an den Verzweigungen angegeben.

Bei den beiden ORFs aus *B. linens* und *B. flavum* handelt es sich somit wahrscheinlich um die Gene für CPD Photolyasen der Klasse I, möglicherweise vom MTHF-Typ. Diese Photolyasen sind in Eubakterien weit verbreitet. Sie verwenden FAD als Kofaktor und MTHF als zweiten Kofaktor, der als Photoantenne dient.

Die in *B. linens* vorgefundene Anordnung des Gens einer Photolyase in einem *crt* Gencluster wurde bisher noch nicht beschrieben. Jedoch fanden sich bei Datenbanksuchen vergleichbare Anordnungen. In dem Gram-positiven, thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* befindet sich direkt im Anschluß an ein *crtB* Gen (Hoshino *et al.*, 1993) das Gen einer Photolyase (Kato *et al.*, 1997). Beide ORFs überlappen um ein Nukleotid, so daß beide Gene wahrscheinlich unter der Kontrolle des selben Promotors stehen. Dies bedeutet auch, daß ihre Expression durch das selbe Signal kontrolliert wird. Eine ähnliche Organisation liegt in *Streptomyces coelicolor* vor (Redenbach *et al.*, 1996). Hier befindet sich das Gen einer DNA-Photolyase direkt vor dem *crt* Gencluster und überlappt sogar um 200 bp mit *crtE*, dem ersten Gen dieses Clusters. Da sowohl Carotinoide als auch Photolyasen vor schädlichen Folgen von UV-Strahlung schützen, liegt hier eine sinnvolle Kombination von zwei Schutzmechanismen gegen die negativen Folgen von zu hoher Lichteinstrahlung vor. Diese Vermutung wird durch Berichte einer lichtabhängigen Induktion der Carotinoid Biosynthese in einigen Stämmen von *B. linens* (Mulder *et al.*, 1966; Crombach, 1974) sowie in mehreren *Streptomyces*-Arten (Kato *et al.*, 1995) unterstützt. In *B. flavum* ist das Gen der Photolyase nicht direkt im *crt* Gencluster lokalisiert. Es liegt aber immerhin in der Nähe der *crt* Gene auf dem bakteriellen Chromosom.

4.7 Evolution der Lycopin Zyklasen

Alle klassischen Lycopin Zyklasen weisen Sequenzähnlichkeiten zueinander auf. Auch wenn pflanzliche und cyanobakterielle Lycopin Zyklasen stärker konserviert sind (Cunningham *et al.*, 1994), wird doch ein gemeinsamer phylogenetischer Ursprung mit den bakteriellen Lycopin Zyklasen vermutet (Hugueney *et al.*, 1995). Ein phylogenetischer Baum macht die Verwandtschaftsbeziehungen der Lycopin Zyklasen deutlich (Abb. 4-11).

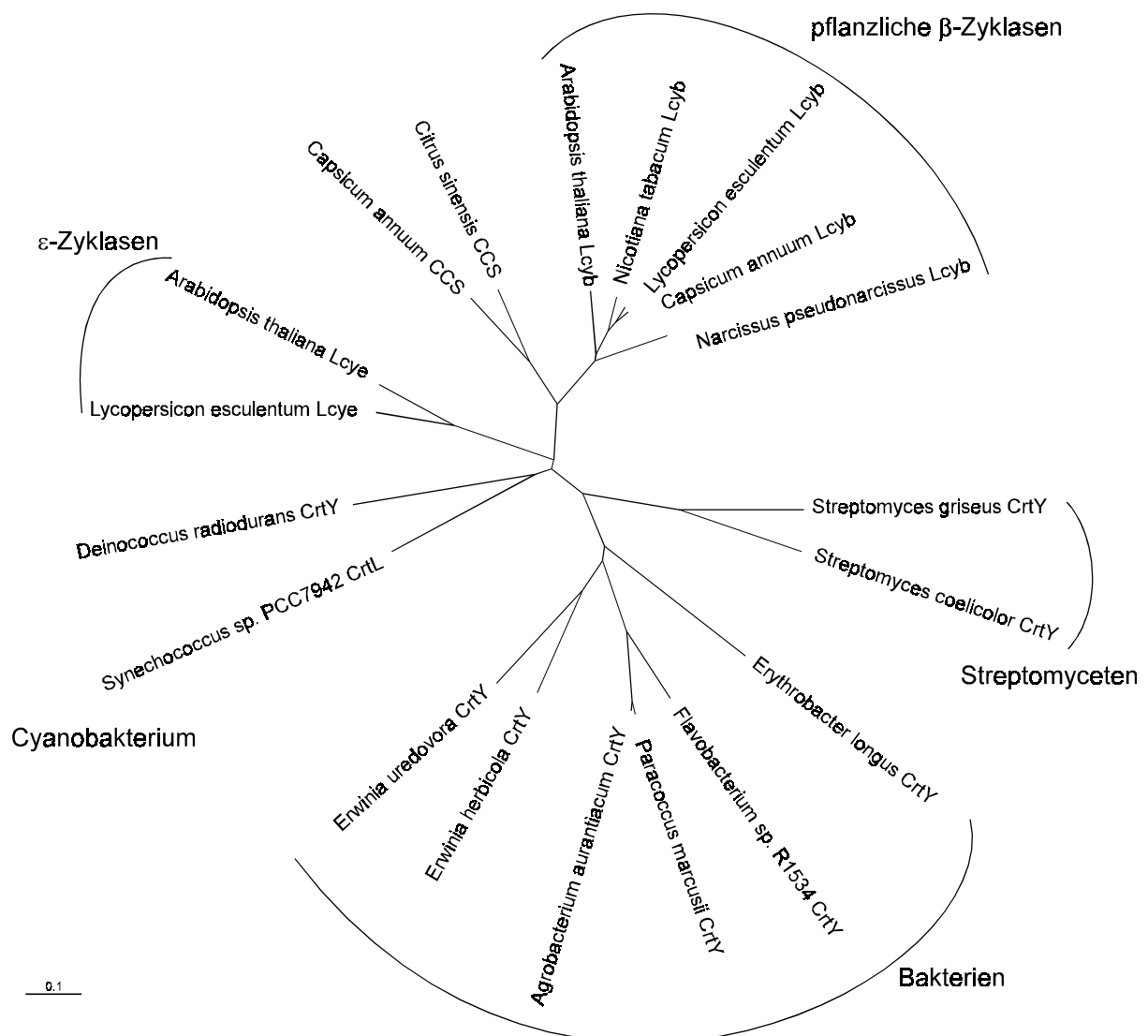


Abb. 4-11: Phylogenetischer Baum der klassischen Lycopin Zyklasen verschiedener Organismen. CrTY: bakterielle Lycopin Zyklasen, CrTL: cyanobakterielle Lycopin Zyklase, Lcyb: pflanzliche Lycopin β-Zyklase, Lcye: pflanzliche Lycopin ε-Zyklase, CCS: Capsanthin-Capsorubin Synthase. CCS aus *C. sinensis* (AAF18389) wurde aufgrund von Sequenzähnlichkeiten bestimmt, Capsanthin oder Capsorubin wurde in *C. sinensis* nicht nachgewiesen. Die Berechnung des Baums erfolgte mit 1000 Wiederholungen. Die Skala gibt 0,1 Aminosäureaustausche an einer Position an.

Zu dieser Gruppe der klassischen Lycopin Zyklasten gehört auch die Capsanthin-Capsorubin Synthase (CCS) aus *Capsicum annuum* (Bouvier *et al.*, 1994). Ihre Zuordnung erfolgt nicht nur aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu Lycopin Zyklasten, sondern auch aufgrund ihrer Syntheseleistungen (Bouvier *et al.*, 1997). Das Enzym setzt Antheraxanthin bzw. Violaxanthin zu Capsanthin bzw. Capsorubin um, wobei ein ähnlicher Mechanismus vermutet wird wie bei der Zyklisierung von Lycopin. Außerdem kann die CCS Lycopin zu β -Carotin zyklisieren. Man vermutet, daß das für *C. annuum* artspezifische Gen der CCS aus einem duplizierten und mutierten Lycopin Zyklasegen hervorging.

Die neuen, erstmalig in *B. linens* gefundenen Lycopin Zyklasten stellen eine konvergente Entwicklung zu den klassischen Lycopin Zyklasten dar. Beide Zyklase-Typen sind in Bakterien zu finden, wobei der klassische Typ überwiegend in Gram-negativen Bakterien vorkommt und der neue Typ in den Gram-positiven *Actinomycetales* überwiegt. Ausnahmen bilden das Gram-negative Bakterium *Mx. xanthus* mit Genen des neuen Zyklasetyps und die zu den *Actinomycetales* gehörenden Streptomyzeten *S. griseus* und *S. coelicolor* mit dem Gen einer klassischen Lycopin Zyklase. Möglicherweise sind diese Ausnahmen durch horizontalen Gentransfer zu erklären. Die pilzlichen Fusionsgene der Lycopin Zyklasten/Phytoen Synthasen könnten aus den Genen der neuartigen Lycopin Zyklasten der *Actinobacteria* entstanden sein. Da dieser Gentyt in allen großen Gruppen der Pilze zu finden ist, entstand er wahrscheinlich schon zu einem frühen Zeitpunkt in der Entwicklung der Pilze. Die pflanzlichen Lycopin Zyklasegene sind hingegen über die der Cyanobakterien aus den klassischen bakteriellen Genen entstanden.

Eine fast parallele Entwicklung kann man bei den Genen der Phytoen Desaturasen beobachten. Den *pds*-Typ Genen der Cyanobakterien und Pflanzen stehen die konvergent entwickelten *crtI*-Typ Gene der übrigen Bakterien und Pilze gegenüber (Sandmann, 1994b). Der einzige Vertreter eines *pds*-Typ Gens aus nicht zu den Cyanobakterien gehörenden Bakterien ist möglicherweise das Gen *crtU* der β -Carotin Desaturase. Es ist denkbar, daß sich die *pds*-Typ Gene aus *crtU* entwickelten.

Neben den klassischen Lycopin Zyklasten und den neuartigen in dieser Arbeit beschriebenen Lycopin Zyklasten muß es mindestens noch einen weiteren Zyklase-Typ geben, da in dem vollständig sequenzierten Genom von *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kotani *et al.*, 1995) keine

Gene der beiden Zyklase-Typen gefunden wurde. Dieses Cyanobakterium muß aber das Gen einer Lycopin Zyklase besitzen, da es β -Carotin synthetisiert (Bramley und Sandmann, 1985). Die Lycopin Zyklasten stellen somit eine erstaunlich formenreiche Enzymgruppe dar, deren Gene mehrfach unabhängig voneinander entwickelt wurden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Identifizierung von Genen der Carotinoid Biosynthese (*crt*) aus den Coryneformen Bakterien *Brevibacterium linens* und *Brevibacterium flavum* beschrieben. Hierbei konnten sechs neue *crt* Gene durch funktionelle Komplementierung bestimmt werden. Außerdem wurde erstmalig die Carotinoid Biosynthese von *B. flavum*, darunter auch drei neue Carotinoide, beschrieben.

- Voraussetzung für die Klonierung der *crt* Gene aus *B. linens* war die Entwicklung eines geeigneten Komplementierungssystems. Dieses System wurde in Carotinoidmutanten von *B. flavum* entwickelt. So konnte eine *B. linens* Expressions-Bibliothek nach Passage durch mehrere *E. coli*-Stämme, unter Umgehung des starken *B. flavum*-Restriktionssystems, in *B. flavum*-Carotinoidmutanten auf *crt* Genexpression hin untersucht werden.
- Durch Komplementierung der Carotinoidmutanten von *B. flavum* konnte das Gen der Phytoen Synthase (*crtB*) aus *B. linens* funktionell kloniert werden. Mit diesem Gen als Sonde wurde aus einer *B. linens*-Cosmid Bibliothek das gesamte *crt* Gencluster isoliert. Auf dem sequenzierten DNA-Fragment von *B. linens* befanden sich 14 offene Leseraster mit Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus Datenbanken. Durch Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Genen konnte die Gene einer GGPP Synthase (*crtE*), einer Phytoen Synthase (*crtB*) und einer Phytoen Desaturase (*crtI*) bestimmt werden. Außerdem wurden erstmalig die Gene einer IPP Isomerase und einer DNA-Photolyase in einem *crt* Gencluster identifiziert. Durch heterologe Expression in *B. flavum* konnte das neue Gen einer β -Carotin Desaturase (*crtU*) funktionell nachgewiesen werden. Dieses Gen kodiert für ein Enzym, das β -Carotin in das aromatische Carotin Isorenieraten umsetzt. Ebenfalls durch heterologe Expression in *B. flavum* wurden zwei neue Gene (*crtYc* und *crtYd*) gefunden, deren Genprodukte gemeinsam die Zyklisierung von Lycopin zu β -Carotin katalysieren. Die errechnete Molmasse dieser beiden Lycopin Zyklasten ist mit 12,5 und 13,9 kDa ungewöhnlich klein.
- Die zwei Lycopin Zyklastogene aus *B. linens* kodieren für eine neue Klasse von Lycopin Zyklasten. Es bestehen keine Sequenzähnlichkeiten dieser neuen Gene zu bisher bekannten Lycopin Zyklastengen oder zu anderen Genen bekannter Funktion.

- Durch die partielle Deletion einer cDNA mit Lycopin Zyklase- und Phytoen Synthaseaktivität (*crtYB*) aus dem Pilz *Xanthophyllomyces dendrorhous* konnte gezeigt werden, daß die Zentren der beiden Aktivitäten in unterschiedlichen Regionen des gebildeten Polypeptids sitzen. Die Phytoen Synthaseaktivität des Genproduktes geht auf einen Bereich des Polypeptids zurück, der Sequenzähnlichkeiten zu Phytoen Synthasen anderer Organismen aufweist. Das Zentrum der Lycopin Zyklaseaktivität liegt in dem N-terminalen Bereich des Polypeptids, der interessanterweise Sequenzähnlichkeiten zu den beiden Lycopin Zyklasten aus *B. linens* aufweist. Dieses Fusionsgen *crtYB* ist das erste bekannte Gen einer pilzlichen Lycopin Zyklase. Die Entwicklung der pilzlichen *crtYB* Fusionsgene aus *crtB* und Lycopin Zyklasegenen des in *B. linens* gefundenen Typs wird diskutiert.
- Die Hauptcarotinoide von *B. flavum* wurden als die C₅₀ Carotinoide Decaprenoxanthin, Decaprenoxanthin Monoglucosid und Decaprenoxanthin Diglucosid bestimmt. Bei der Analyse von *B. flavum*-Pigmentmutanten wurden außerdem die neuen Carotinoide Nonapren [2-(3-Methyl-2-butenyl)-ε, ψ-carotin], Flavuxanthin [2,2'-Bis(4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl)-ψ, ψ-carotin] und Nonaflavuxanthin [2-(4-Hydroxy-3-methyl-2-butenyl)-ψ, ψ-carotin] als Intermediate identifiziert. Basierend auf den nachgewiesenen Carotinoiden konnte der vermutliche C₅₀ Carotinoid Biosyntheseweg für *B. flavum* vorgeschlagen werden.
- Durch Sequenzanalyse von *B. flavum*-Transposonmutanten konnten erstmalig *crt* Gene der C₅₀ Carotinoid Biosynthese isoliert werden. Auf dem *crt* Gencluster von *B. flavum* konnten die Gene *crtE*, *crtB* und *crtI* aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Genen bestimmt werden. Heterologe Expression in *E. coli* und Geninaktivierung durch homologe Rekombination in *B. flavum* zeigten, daß die Produkte von drei weiteren Genen ausreichen, um die C₅₀ Carotinoide von *B. flavum* zu bilden. Das Produkt eines neuen Lycopin Elongasegens (*crtEb*) verlängert Lycopin an Position C-2 und C-2' um jeweils eine C₅ Isopreneinheit und bildet ein azyklisches C₅₀ Carotinoid. Dieses wird von den Produkten der neuen C₅₀ Zyklasegene *crtYe* und *crtYf* zu einem zyklischen C₅₀ Carotinoid umgesetzt. Die Ergebnisse zeigen, daß entgegen früherer Vorstellungen, die Addition einer Isopreneinheit und die Zyklisierung bei der Bildung von zyklischen C₅₀ Carotinoiden zwei getrennte Schritte sind.

6 LITERATUR

- Ahmad, M. and Cashmore, A.R. (1993) *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366:162-166
- Ahmad, M. and Cashmore, A.R. (1996) Seeing blue: the discovery of cryptochrome. *Plant Mol. Biol.* 30:851-861
- Albrecht, M., Takaichi, S., Misawa, N., Schnurr, G., Böger, P., and Sandmann, G. (1997) Synthesis of atypical cyclic and hydroxy carotenoids in *Escherichia coli* transformants. *J. Biotech.* 58:177-185
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402
- An, G-H., Bielich, J., Auerbach, R., and Johnson, E.A. (1989) Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnology* 9:70-73
- Appel, R.D., Bairoch, A., and Hochstrasser, D.F. (1994) A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* 19:258-260
- Armstrong, G. A., Alberti, M., Leach, F., and Hearst, J. E. (1989) Nucleotide sequence, organisation, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* 216:254-268
- Armstrong, G.A., Alberti, M., and Hearst, J.E. (1990) Conserved enzymes mediate the early reactions of carotenoid biosynthesis in nonphotosynthetic and photosynthetic prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9975-9979
- Armstrong, G. A., Hundle, B. S., and Hearst, J. E. (1993) Evolutionary conservation and structural similarities of carotenoid biosynthesis gene products from photosynthetic and nonphotosynthetic organisms. *Meth. Enzymol.* 214:297-311
- Armstrong, G.A. (1994) Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176:4795-4802
- Armstrong, G.A. (1997) Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:629-659
- Arpin, N., Liaaen-Jensen, S., and Trouilloud, M. (1972) Bacterial carotenoids XXXVIII C₅₀-carotenoids 9. Isolation of decaprenoxanthin mono- and diglucoside from an *Arthrobacter* sp. *Acta Cem. Scand.* 26:2524-2526
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1995) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. USA

- Benning, C., and Somerville, C.R. (1992) Identification of an operon involved in sulfolipid biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 174:6479-6487
- Bertram, J.S. (1999) Carotenoids and gene regulation. *Nutr. Rev.* 57:182-191
- Bibb, M.J., Findlay, P.R., and Johnson, M.W. (1984) The relationship between composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* 30:157-166
- Bolivar, F. and Backman, K. (1979) Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 68:245
- Borokov, A.Y. and Rivkin, M.I. (1997) Xcm I-Containing Vector for direct cloning of PCR products. *BioTech.* 22:821-814
- Botella, J.A., Murillo, F.J., and Ruiz-Vazquez, R. (1995) A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Eur. J. Biochem.* 233:238-248
- Boucabeille, C., Mengin-Lecreulx, D., Henckes, D., Simonet, J., and van Heijenoort, J. (1997) Antibacterial and hemolytic activities of linenscin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linens* OC2. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:295-301
- Bouvier, F., Hugueney, P., d'Harlingue, A., Kuntz, M., and Camara, B. (1994) Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J.* 6:45-54
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., and Camara, B. (1997) Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 346:53-64
- Bouvier, F., Backhaus, R.A., and Camara, B. (1998) Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 273:30651-30659
- Brinkhaus, F.L. and Rilling, H.C. (1988) Purification of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Phycomyces blakesleanus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 266:607-612
- Britton, G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9:1551-1558
- Camara, B., Bousquet, J., Cheniclet, C., Carde, J.P., Kuntz, M., Evrar, J.L., and Weil, J.H. (1989) In: *Physiology, biochemistry, and genetics of nongreen plastids*. Boyer, C.D., Shannon, J.C., and Hardison, R.C. (eds.) American Soc. Plant Phys., Washington DC, pp. 141-156
- Carattoli, A., Romano, N., Ballario, P., Morelli, G., and Macino, G. (1991) The *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (albino 3) reveals highly conserved regions among prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* 266:5854-5859
- Carell, T. (1995) Sunlight-damaged DNA repaired with sunlight. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34:2491-2494

- Chamovitz, D., Sandmann, G., and Hirschberg, J. (1993) Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutants of cyanobacteria reveals that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 268:17348-17353
- Clarke, L. and Carbon, J. (1976) A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9:91
- Collins, M.D. (1992) The genus *Brevibacterium*. In: *The Prokaryotes*. Balows, A. (ed.), 2nd ed., Vol. 2, Springer, NY, pp. 1351-1354
- Crombach, W.H.J. (1974) Morphology and physiology of coryneform bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 40:361-376
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., and Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot. Eng.* 10:673-676
- Cunningham, F.X., Sun, Z., Chamovitz, D., Hirschberg, J., and Gantt, E. (1994) Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942. *Plant Cell* 6:1107-1121
- Cunningham, F.X., Jr., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K.A., DellaPenna, D., and Gantt, E. (1996) Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell.* 8:1613-1626
- Cunningham, F.X. and Gantt, E. (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:557-583
- Dailey, T.A. and Dailey, H.A. (1998) Identification of a FAD superfamily containing protoporphyrinogen oxidases, monoamine oxidases and phytoen desaturase. *J. Biol. Chem.* 273:13658-13662
- De la Guardia, M.D., Aragón, C.M.G., Murillo, F.J., and Cerdá-Olmedo, E. (1971) A carotenogenic enzyme aggregate in *Phycomyces*: Evidence from quantitative complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:2012
- Demmig-Adams, B. and Adams, W.W,III (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1:21-26
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.,M. and Adams, W.W.III (1996) Carotenoids 3: *in vivo* function of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10:403-412
- Dogbo, O. and Camara, B. (1987) Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 920:140-148
- Eikmanns, B.J., Kleinertz, E., Liebl, W., and Sahm, H. (1991) A family of *Corynebacterium glutamicum* / *Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* 102:93-98

- Eikmanns, B.J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüdtke, K., and Sahm, H. (1994) Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiol.* 140:1817-1828
- Eugster, C.H. (1995) Chemical derivatization: Microscale tests for the presence of common functional groups in carotenoids. In: *Carotenoids: Isolation and analysis*. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H. (eds.), Vol. 1A, pp 71-80, Birkhäuser, Basel
- Férézou, J.P. (1992) C50 bicyclic carotenoids: Sarcinaxanthin synthesis. *In Methods in Enzymology*. Packer, L. (ed.), Vol. 213, pp 75-86, Academic Press Inc.
- Fernández-Moreno, M.A., Caballero, J.L., Hopwood, D.A., and Malpartida, F. (1991) The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* 66:769-780
- Golubev, W. (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Pfaffia rhodozyma*). *Yeast* 11:101-110
- Goodwin, T.W. (1980) *The biochemistry of the carotenoids*. Vol. 1, Chapman and Hall, London.
- Graham-Lorence, S. and Peterson, J.A. (1996) P450s: Structural similarities and functional differences. *FASEB J.* 10:206-214
- Hanahan, D. (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557
- Hara, M., Yuan, H., Yang, Q., Hoshino, T., Yokoyama, A., and Miyake, J. (1999) Stabilization of liposomal membranes by thermozeaxanthins: carotenoid-glucoside esters. *Biochim. Biophys. Acta* 1461:147-154
- Hodgson, D.A. and Murillo, J.F. (1993) Genetics of regulation and pathways of synthesis of carotenoids. In: *Myxobacteria II*, Dworkin, M. and Kaiser, D. (eds.), pp. 157-181, American Soc. Microbiol., Washington
- Hoshino, T., Fujii, R., and Nakahara, T. (1993) Molecular cloning and sequence analysis of the *crtB* gene of *Thermus thermophilus* HB27, an extreme thermophile producing carotenoid pigments. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3150-3153
- Hugueney, P., Badillo, A., Cehn, H-C., Klein, A., Hirschberg, J., Camara, B., and Kuntz, M. (1995) Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J.* 8:417-424
- Hundle, B., Alberti, M., Nievelstein, V., Beyer, P., Kleinig, H., Armstrong, G.A., Burke, D.H., and Hearst, J.E. (1994) Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho10 carotenoid genes expressed in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 245:406-416
- Inui, M., Vertès, A., Kobayashi, M., Kurusu, Y., and Yukawa, H. (1993) Cloning and sequence determination of the acetohydroxy acid synthase genes from *Brevibacterium flavum* MJ233 by using the polymerase chain reaction. *DNA Seq.* 3:303-310

- Jones, D. and Keddie, R.M. (1986) Genus *Brevibacterium*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Sneath, P.H.A., Mair, N.A., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (eds.), Vol. 2, pp. 1301-1313, Williams and Wilkins, Baltimore
- Kajiwara, S., Fraser, P.D., Kondo, K., and Misawa, N. (1997) Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 324:421-426
- Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H., Ryo, H., and Todo, T. (1997) Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J. Mol. Evol.* 45:535-548
- Kane, J.F. (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.* 6:494-500
- Kato, R., Hasegawa, K., Hidaka, H., Kuramitsu, S., and Hoshino, T. (1997) Characterization of a thermostable DNA photolyase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB27. *J. Bacteriol.* 179:6499-6503
- Kohl, W., Achenbach, H., and Reichenbach, H. (1983) The pigments of *Brevibacterium linens*: aromatic carotenoids. *Phytochem.* 22:207-210
- Kotani, H., Tanaka, A., Kaneko, T., Sato, S., Sugiura, M., and Tabata, S. (1995) Assignment of 82 known genes and gene clusters on the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *DNA Res.* 2:133-142
- Krügel, H., Krubasik, P., Weber, K., Saluz, H.P., and Sandmann, G. (1999) Functional analysis of genes from *Streptomyces griseus* involved in the synthesis of isorenieratene, a carotenoid with aromatic end groups. *Biochim. Biophys. Acta* 1439:57-64
- Kurusu, Y., Kainuma, M., Inui, M., Satoh, Y., and Yukawa, H. (1990) Electroporation-transformation system for coryneform bacteria by auxotrophic complementation. *Agric. Biol. Chem.* 54:443-447
- Kushwaha, S.C. and Kates, M. (1979) Studies of the biosynthesis of C₅₀ carotenoids in *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* 25:1292-1297
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-688
- Lang, H.P., Cogdell, R.J., Gardiner, A.T., and Hunter, C.N. (1994) Early steps in carotenoid biosynthesis: Sequences and transcriptional analysis of the genes of *Rhodobacter sphaeroides* and overexpression and reactivation of crtI in *Escherichia coli* and *R. sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 176:3859-3869
- Lang, H.P., Cogdell, R.J., Takaichi, S., and Hunter, C.N. (1995) Complete DNA sequence, specific Tn5 insertion map, and gene assignment of the carotenoid biosynthesis pathway of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 177:2064-2073.
- Liaaen-Jensen, S. and Weeks, O.B. (1966) *Norwegian J. Chem. Mining, Metall.* N26:130

- Lichtenthaler, H.K. (1998) The plants' 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. *Lipids* 100:128-138
- Linden, H., Misawa, N., Chamovitz, D., Pecker, I., Hirschberg, J., and Sandmann, G. (1991) Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenoids. *Z. Naturforsch.* 46c:160-166
- Linden, H., Vioque, A., and Sandmann, G. (1993) Isolation of a carotenoid biosynthesis gene coding for ζ -carotene desaturase from *Anabaena* PCC7120 by heterologous complementation. *FEMS Microbiol. Lett.* 106:99-104
- Lopez, J.C., Ryan, S., and Blankenship, R.E. (1996) Sequence of the *bchG* gene from *Chloroflexus aurantiacus*: Relationship between chlorophyll synthase and other polyprenyltransferases. *J. Bacteriol.* 178:3369-3373
- Malhorta, K., Kim, S., Batschauer, A., Dawut, L., and Sancar, A (1995) Putative photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochem.* 34:6892-6899
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B. (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 15:2331-2342
- Marshall, J.H. and Wilmoth, G.J. (1981) Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *J. Bacteriol.* 147:900-913
- Martín, J.F. (1989) Molecular genetics of amino acid producing corynebacteria. Banmberg, Hunter, and Rhodes (eds.). *Soc. Gen. Microbiol. Symp.* 44. Cambridge University Press
- Marusich, W.L. and Bauernfeind, J.C. (1981) Oxycarotenoids in poultry feeds. In: Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Bauernfeind J.C. (ed.), pp. 319-462, Academic Press, New York
- Masamoto, K., Misawa, N., Kaneko, T., Kikuno, R., and Toh, H. (1998) β -Carotene hydroxylase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol.* 39:560-564
- Masuda, T., Inoue, K., Masuda, M., Nagayama, M., Tamaki, A., Ohta, H., Shimada, H., and Takamiya, K. (1999) Magnesium insertion by magnesium chelatase in the biosynthesis of zinc bacteriochlorophyll a in an aerobic acidophilic bacterium *Acidiphilium rubrum*. *J. Biol. Chem.* 274: 33594-33600
- Mayne, S.T. (1996) Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.* 10:690-701.
- Messing, J. (1979) A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.* 2:43

- Miki, W., Otaki, N., Yokoyama, A., Izumida, H., and Shimidzu, N. (1994) Okadaxanthin, a novel C₅₀-carotenoid from a bacterium, *Pseudomonas* sp. KK10206C associated with marine sponge, *Halichondria okadi*. *Experientia* 50:684-686
- Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., and Harashima, K. (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:6704-6712
- Misawa, N., Kajiwarra, S., Kondo, K., Yokoyama, A., Satomi, Y., Saito, T., Miki, W., and Ohtani, T. (1995a) Canthaxanthin biosynthesis and the conversion of methylene to keto groups in a hydrocarbon β -carotene by a single gene. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 209:867-876
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwarra, S., Saito, T., Ohtani, T., and Miki, W. (1995b) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* 177:6575-6584
- Miwa, K., Matsui, H., Terabe, M., Nakamori, S., Sano, K., and Momose, H. (1984) Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 48:2901-2903
- Moshier, S.E. and Chapman, D.J. (1973) Biosynthetic studies on aromatic carotenoids. *Biochem. J.* 136:395-404
- Mulder, E.G., Adamse, A.D., Antheunisse, J.A., Deinema, M.A., Woldendrop, J.W., and Zevenhuizen, L.M.T.P. (1966) The relationship between *Brevibacterium* and the bacteria of the genus *Arthrobacter*. *J. Appl. Bact.* 29:44-71
- Myers, E. and Miller, W. (1988) Optimal alignments in linear space. *CABIOS* 4:11-17
- Nelis, H.J. and De Leenheer, A.P. (1991) Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bacteriol.* 70:181-191
- Norgard, S., Aasen, A.J., and Liaaen-Jensen, S. (1970) Bacterial Carotenoids. C₅₀-carotenoids 6. Carotenoids from *Corynebacterium pionsettiae* including four new C₅₀-diols. *Acta Chem. Scand.* 24:2183-2197
- Ogura, K., Koyama, T., and Sagami, H. (1997) Polyprenyl diphosphate synthases. *Subcell. Biochem.* 28:57-87
- Ohnuma, S., Suzuki, M., and Nishino, T. (1994) Archaeobacterial ether-linked lipid biosynthesizing gene. Expression cloning, sequencing and characterization of geranylgeranyl-pyrophosphate synthase. *J. Biol. Chem.* 269:14792-14797
- Olson, J.A. and Krinsky, N.I. (1995) Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *FASEB J.* 9:1547-1558
- Oster, U., Bauer, C.E., and Rüdiger, W. (1997) Characterization of chlorophyll *a* and bacteriochlorophyll *a* synthases by heterologous expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272:9671-9676

- Ouchane, S., Picaud, M., Vernotte, C., and Astier, C. (1997) Photooxidative stress stimulates illegitimate recombination and mutability in carotenoid-less mutants of *Rubrivivax gelatinosus*. *EMBO J.* 16:4777-4787
- Parker, R.S. (1996) Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.* 10:542-551
- Pasamontes, L., Hug, D., Tessier, M., Hohmann, H.P., Schierle, J., and van Loon, A.P. (1997) Isolation and characterization of the carotenoid biosynthesis genes of *Flavobacterium* sp. Strain R1534. *Gene* 185:35-41
- Pátek, M., Eikmanns, B.J., Pátek, J., and Sahm, H. (1996) Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiol.* 142:1297-1309
- Pfander, H. (1994) C₄₅- and C₅₀-carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 66:2369-2374
- Putra, S.R., Disch, A., Bravo, J., and Rohmer, M. (1998) Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some gram-negative bacteria and mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 164:169-175
- Qureshi, N. and Porter, J.W. (1981) Conversion of acetyl-coenzyme a to isopentenyl pyrophosphate. In: *Biosynthesis of isoprenoid compounds*. Porter and Spurgeon (eds.) Vol. 1, pp. 47-93
- Raleigh, E.A., Murray N.E., Revel, H., Blumenthal, R.M., Westaway, D., Reith, A.D., Rigby, P.W., Elhai, J., and Hanahan D. (1988) McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. *Nucleic Acids Res.* 16:1563-1575
- Ramakrishnan, L., Tran, H.T., Federspiel, N., and Falkow, S. (1997) A *crtB* homolog essential for photochromogenicity in *Mycobacterium marinum*: isolation, characterization, and gene disruption via homologous recombination. *J. Bacteriol.* 179:5862-5868
- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H., and Hopwood, D.A. (1996) A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* 21:77-96
- Reichenbach, H. and Kleinig, H. (1984) Pigments of myxobacteria. In: *Myxobacteria: Development and cell interactions*. Rosenberg, E. (ed.), pp. 127-137, Springer, New York
- Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., and Sahm, H. (1996) Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 118:2564-2566
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sancar, A. (1994) Structure and function of DNA photolyase. *Biochem.* 33:2-9
- Sancar, A. (1996) No „end of history“ for photolyases. *Science* 272:48-49
- Sandmann, G. (1994a) Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem.* 223:7-24
- Sandmann, G. (1994b) Phytoene desaturase: Genes, enzymes and phylogenetic aspects. *J. Plant Physiol.* 143:444-447
- Sandmann, G., Albrecht, M., Schnurr, G., Knörzer, O., and Böger, P. (1999) The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *TIBTECH* 17:233-237
- Schiedt, K. (1990) New aspects of carotenoid metabolism in animals and plants. In: *Carotenoids: chemistry and biology*. Krinsky, N.I., Mathews-Roth, M.M., and Taylor, R. F. (eds.), pp. 247-268, Plenum Press, New York
- Schmidhauser, T.J., Lauter, F.R., Russo, V.E.A., and Yanofsky, C. (1990) Cloning, sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotene biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 10:5064-5070
- Schmidhauser, T., Lauter, F., Schumacher, M., Zhou, W., Russo, V.E.A., and Yanofsky, C. (1994) Characterization of *al-2*, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*: Cloning, sequence analysis and photoregulation. *J. Biol. Chem.* 269:12060-12066
- Schnurr, G., Misawa, N., and Sandmann, G. (1996) Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. *Biochem. J.* 315:869-874
- Schumann, G., Nürnberger, H., Sandmann, G., and Krügel, H. (1996) Activation and analysis of cryptic *crt* genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* 252:658-666
- Silver, J. (1993) Inverse polymerase chain reaction. In: *PCR a practical approach*. McPherson, M.J., Quirke, P., and Taylor, G.R. (eds.), pp. 137-146, Oxford University Press, Oxford, England
- Simpson, K.L., Katayama, T., and Chichester, C.O. (1981) Carotenoids in fish feed. In: *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. Bauernfeind, J.C. (ed.), pp. 463-538, Academic Press, New York
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward-Rainey, N.L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bact.* 47:479-491
- Street, I.P., Coffman, H.R., Baker, J.A., and Poulter, C.D. (1994) Identification of Cys139 and Glu207 as catalytically important groups in the active site of isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. *Biochem.* 33:4212-4217

- Sun, Z., Gantt, E., and Cunningham, F.X. (1996) Cloning and functional analysis of the β -carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 271:24349-24352
- 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
- Takaichi, S., Sandmann, G., Schnurr, G., Satomi, Y., Suzuki, A., and Misawa, N. (1996) The carotenoid 7,8-dihydro- ψ end group can be cyclized by the lycopene cyclases from the bacterium *Erwinia uredovora* and the higher plant *Capsicum annuum*. *Eur. J. Biochem.* 241:291-296
- Takaichi, S., Inoue, K., Akaike, M., Kobayashi, M., Oh-oka, H., and Madigan, M.T. (1997) The major carotenoid in all known species of helobacteria is the C₃₀ carotenoid 4,4'-diaponeurosporene, not neurosporene. *Arch. Microbiol.* 168:277-281
- Takaichi, S. (2000) Separation and identification of carotene pigments upon isocratic elution of a C₁₈ column using high-performance liquid chromatography connected to a photodiode-array detector. (In press)
- Tanaka, A., Nagasaki, T., and Fukui, S. (1968) *J. Ferm. Tech.* 46:477
- Tauch, A., Kassing, F., Kalinowski, J., and Pühler, A (1995a) The *Corynebacterium xerosis* composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated IS1249, flanking the erythromycin resistance gene *ermCX*. *Plasmid* 34:119-131
- Tauch, A., Kassing, F., Kalinowski, J., and Pühler, A (1995b) The erythromycin resistance gene of the *Corynebacterium xerosis* R-plasmid pTP10 also carrying chloramphenicol, kanamycin, and tetracycline resistances is capable of transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid* 33:168-179
- Terasawa, M., Yukawa, H., and Takayama, Y. (1985) Production of L-aspartic acid from *Brevibacterium* by the cell re-using process. *Proc. Biochem.* 21:124-128
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882
- To, K.Y., Lai, E.M., Lee, L.Y., Lin, T.P., Hung, C.H., Chen, C.L., Chang, Y.S., and Liu, S.T. (1994) Analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Erwinia herbicola* Eho13. *Microbiol.* 140:331-339
- Todo, T., Takemori, H., Ryo, H., Ihara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Sato, K., and Nomura, T. (1993) A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Nature* 272:109-112
- Torres-Martínez, S., Murillo, F.J., and Cerdá-Olmedo, E. (1980) Genetics of lycopene cyclization and substrate transfer in β -carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Genet. Res.* 36:299-309.

- Valdes-Stauber, N. and Scherer, S. (1996) Nucleotide sequence and taxonomical distribution of the bacteriocin gene *lin* cloned from *Brevibacterium linens* M18. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1283-1286
- Velayos, A., López-Matas, M.A., Ruiz-Hidalgo, M.J., and Eslava, A.P. (1997) Complementation analysis of carotenogenic mutants of *Mucor circinelloides*. *Fungal Genet. Biol.* 22:19-27
- Vertès, A.A., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y., and Yukawa, H. (1993) Presence of *mrr*- and *mcr*-like restriction systems in coryneform bacteria. *Res. Microbiol.*, 144:181-185
- Vertès, A.A., Asai, Y., Masayuki, I., Kobayashi, M., Kurusu, Y., and Yukawa, H. (1994a) Transposon mutagenesis of coryneform bacteria. *Mol. Gen. Genet.* 254:397-405
- Vertès, A.A., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y., and Yukawa, H. (1994b) Isolation and characterization of IS31831, a transposable element from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* 11:739-746
- Weedon, B.C.L. and Moss, G.P. (1995) Structure and nomenclature. In: Carotenoids: isolation and analysis. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H. (eds.), Vol. 1A, pp 27-70, Birkhäuser, Basel
- Weeks, O.B. (1971) Biosynthesis of C₅₀ carotenoids. In: Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry. Goodwin, T.W.(ed.), pp. 291-313, Academic Press, New York
- Wiedemann, M., Misawa, N., and Sandmann, G. (1993) Purification and enzymatic characterization of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Erwinia uredovora* after expression in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 306:152-157
- Wieland, B., Feil, C., Gloria-Maercker, E., Thumm, G., Lechner, M., Bravo, J., Porolla, K., and Götz, F. (1994) Genetic and biochemical analysis of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4' diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 176:7719-7726
- Wright, F. and Bibb, M.L. (1992) Codon usage in the G + C rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113:55-65
- Xiong, J., Inoue, K., and Bauer, C.E. (1998) Tracking molecular evolution of photosynthesis by characterization of a major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14851-14856
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103
- Yeliseev, A.A. and Kaplan, S. (1995) A sensory transducer homologous to the mammalian peripheral-type benzodiazepine receptor regulates photosynthetic membrane complex formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J. Biol. Chem.* 270:21167-21175

- Yeliseev, A.A., Krueger, K.E., and Kaplan, S. (1997) A mammalian mitochondrial drug receptor functions as a bacterial "oxygen" sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5101-5106
- Yeliseev, A.A., and Kaplan, S. (1999) A novel mechanism for the regulation of photosynthesis gene expression by the TspO outer membrane protein of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J. Biol. Chem.* 274:21234-21243
- Yokoyama, A., Sandmann, G., Hoshino, T., Adachi, K., Sakai, M., and Shizuri, Y. (1995) Thermozeaxanthins, new carotenoid-glycoside-esters-from thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. *Tetrahedron Lett.* 36:4901-4904

VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden bereits publiziert:

Krügel, H., Krubasik, P., Weber, K., Saluz, H.P., and Sandmann, G. (1999) Functional analysis of genes from *Streptomyces griseus* involved in the synthesis of isorenieratene, a carotenoid with aromatic end groups. *Biochim. Biophys. Acta* 1439:57-64

Verdoes, J.C., Krubasik, P., Sandmann, G., and van Ooyen, A.J.J. (1999) Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet.* 262:453-461

Krubasik, P. and Sandmann, G. (2000) A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Mol. Gen. Genet.* 263: 423-432

Viveiros, M., Krubasik, P., Sandmann, G., and Houssaini-Iraqi, M. (2000) Structural and functional analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Mycobacterium aurum* A+. *FEMS Microbiol. Lett.* 187: 95-101

Krubasik, P. and Sandmann, G. (2000) Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem. Soc. Transact.* (im Druck)

Krubasik, P., Takaichi, S., Kobayashi, M., and Sandmann, G. (2000) Detailed biosynthetic pathway to decaprenoxanthin diglucoside in *Brevibacterium flavum* and identification of novel intermediates. *Arch. Microbiol.* (zur Veröffentlichung eingereicht)

Krubasik, P., Takaichi, S., Kobayashi, M., and Sandmann, G. (2000) A carotenogenic gene cluster with genes involved in the synthesis of C50 carotenoids and proposal of a mechanism of C50 carotenoid formation. (in Vorbereitung)

LEBENS LAUF

Adresse : Hamburger Allee 68
60486 Frankfurt am Main
Tel.: 069/7077822
krubasik@em.uni-frankfurt.de

Geburt : 17. Juni 1966 in Säckingen

Schulbildung

1972 - 1980 : Geschwister-Scholl-Grundschule und Gymnasium in Mannheim
1980 - 1986 : Werner-Heisenberg-Gymnasium in Bad Dürkheim
6. Juni 1986 : Abiturprüfung und Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

Grundwehrdienst : 1.7.86 - 30.9.87

Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen von Oktober '87 bis Mai '94

Hauptfach : Pflanzenphysiologie
Nebenfächer : Mikrobiologie, Pharmazeutische Biologie, Organische Chemie
Jan. - Dez. 1991 : Austauschstudent an der University of Queensland, Australien
Mai - Dez. 1993 : Diplomarbeit an der Long Ashton Research Station, AFRC Institute of Arable Crops Research bei Peter Hedden, Bristol, England
Diplomarbeit : „Expression eines Gibberellin bildenden Enzyms aus *Cucurbita maxima* (Kürbis) - die 20-Oxidase“ (molekularbiologische und physiologische Untersuchungen zur Gibberellinbiosynthese)
Abschluß : Diplom am 2. Mai 1994

Promotion

1.7.94 - 15.9.95 : Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Konstanz am Lehrstuhl für Physiologie und Biochemie der Pflanzen bei Prof. Dr. P. Böger
seit 1.9.95 : Wissenschaftlicher Angestellter des Botanischen Instituts der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Doktorand bei Prof. Dr. G. Sandmann
Aug. - Nov. 1996 : Forschungsaufenthalt bei Mitsubishi Chemical Corporation, Tokyo, Japan