

ERHÖHUNG DER MIKROBIELLEN UND MOLEKULAREN  
DIVERSITÄT VON CAROTINOIDEN

von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von  
Isabelle Melanie Kauffmann  
aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid  
Mitberichter: Prof. Dr. Christoph Syldatk  
Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2002

Institut für technische Biochemie der Universität Stuttgart  
2002



---

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Angabe der verwendeten Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Stuttgart, den 21. Mai 2002

## **DANKSAGUNGEN**

Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid danke ich für die Überlassung des Themas, seine immerwährende Diskussionsbereitschaft, seine Unterstützung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am ITB.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Claudia Schmidt-Dannert, für ihre Gastfreundschaft und die Möglichkeit, einen Teil der Arbeit in ihrem Labor an der University of Minnesota (Minneapolis, USA) durchzuführen; für die Überlassung der verschiedenen Expressionsvektoren und für die zahlreichen Tipps im Umgang mit Carotinoiden.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Jutta Schmitt für ihre ständige Gesprächsbereitschaft und die hilfreichen Anregungen bedanken, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Der Firma BASF AG für danke ich für die finanzielle Förderung der Arbeit, außerdem möchte ich mich bei PD Dr. Hauer und Dr. Matuschek für ihr ständiges Interesse an dem Fortgang dieser Arbeit danken.

Herrn Volker Nödinger danke ich für die Durchführung der Sequenzierungen sowie für die zahlreichen Hilfestellungen im Laboralltag.

Mein besonderer Dank gilt den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Genetik für das hervorragende Arbeitsklima, sowie allen Mitarbeitern des ITB.

Ganz besonders möchte ich mich meinen Eltern und meinem Freund Marco für ihr Verständnis und die stetige Unterstützung bedanken.

## INHALTSVERZEICHNIS

1 ABSTRACT.....	11
2 ZUSAMMENFASSUNG.....	13
3 EINLEITUNG.....	15
3.1 CAROTINOIDE.....	15
3.1.1 <i>Allgemeines</i> .....	15
3.1.2 <i>Biosynthese der Carotinoide</i> .....	15
3.1.2.1 <i>Isoprenoid Biosynthese</i> .....	16
3.1.2.2 <i>Carotinoid Biosynthese</i> .....	16
3.1.3 <i>Vorkommen und Funktion der Carotinoide</i> .....	18
3.1.4 <i>Industrielle Nutzung</i> .....	19
3.1.5 <i>Carotinogene Gene</i> .....	21
3.1.6 <i><math>\beta</math>-Carotin Ketolase aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803</i> .....	23
3.2 DNA-ISOLIERUNG AUS BODENPROBEN.....	24
3.3 GERICHTETE EVOLUTION.....	27
3.3.1 <i>Veränderung von Enzymen durch gerichtete Evolution</i> .....	27
3.3.2 <i>Methoden zur zufälligen Mutagenese</i> .....	29
3.3.3 <i>Evolutives Design durch Rekombination</i> .....	30
3.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	31
4 MATERIAL UND METHODEN.....	33
4.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME.....	33
4.2 GERÄTE.....	35
4.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	36
4.4 NÄHRMEDIEN, PUFFER, LÖSUNGEN.....	37
4.4.1 <i>Medien</i> .....	37
4.4.2 <i>allgemein verwendete Puffer</i> .....	38
4.5 BAKTERIENSTÄMME, PLASMIDE.....	39
4.5.1 <i>Bakterienstämme:</i> .....	39
4.5.2 <i>Plasmide</i> .....	39
4.6 PRIMER.....	40
4.7 STAMMERHALTUNG.....	40
4.7.1 <i>Stammerhaltung auf festen Nährböden</i> .....	40

4.7.2	<i>Anlegen von Glycerinkulturen</i> .....	40
4.8	ANZUCHT IN FLÜSSIGMEDIEN.....	41
4.8.1	<i>Messung der Zelldichte</i> .....	41
4.8.2	<i>Herstellung von Rohextrakten</i> .....	41
4.9	BIOCHEMISCHE METHODEN .....	42
4.9.1	<i>SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese</i> .....	42
4.9.2	<i>Anfärbung und Mikroskopie von Bakterien-Ausstrich-präparaten</i> .....	45
4.10	MOLEKULARGENETISCHE METHODEN .....	46
4.10.1	<i>Spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i> .....	46
4.10.1.1	Positionsspezifische Mutagenese .....	46
4.10.1.2	Error-prone Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	47
4.10.1.3	DNA shuffling.....	48
4.10.2	<i>Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i> .....	51
4.10.3	<i>Auftrennung im Agarosegel</i> .....	52
4.10.4	<i>Fragmentisolierung aus Agarosegelen</i> .....	53
4.10.5	<i>Ligation von DNA mit der T4-DNA-Ligase</i> .....	54
4.10.6	<i>Transformation in E.coli (PEG/DMSO-Methode, (Chung et al., 1989)</i> .....	54
4.10.6.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	54
4.10.6.2	Transformation .....	55
4.10.7	<i>Komplementationsscreening</i> .....	55
4.10.8	<i>Isolierung von Nukleinsäuren</i> .....	55
4.10.8.1	Mini-Plasmid-DNA-Isolation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).....	55
4.10.8.2	Midi-Plasmid-DNA-Isolation mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen) .....	56
4.10.8.3	Isolierung genomischer DNA.....	56
4.10.8.4	Isolierung von DNA aus Bodenproben .....	57
4.10.8.4.1	Methode modifiziert nach Zhou (Zhou et al., 1996).....	57
4.10.8.4.2	DNA Isolierung nach Moré (More et al., 1994) .....	58
4.10.8.4.3	DNA Isolierung nach Tsai (Tsai und Olson, 1992b) .....	58
4.10.8.4.4	DNA Isolierung nach Diversa (Short und Mathur, 1998).....	59
4.10.8.4.5	DNA-Isolierung nach Porteous (Porteous et al., 1994) .....	60
4.10.8.4.6	DNA-Isolierung nach Volossiouk (Volossiouk et al., 1995).....	61
4.10.8.4.7	DNA-Isolierung nach Picard (Picard et al., 1992) .....	62

4.10.9 Direkte Reinigung von DNA aus Bodenproben modifiziert nach (Höss und Pääbo, 1993) .....	62
4.10.10 Fällung von DNA .....	64
4.11 SEQUENZIERUNG VON DNA .....	64
4.12 ANALYTIK VON CAROTINOIDEN .....	66
4.12.1 Extraktion von Carotinoiden aus E.coli Flüssigkulturen .....	66
4.12.2 Analytik von Carotinoiden mittels Dünnschicht-chromatographie .....	66
4.12.3 Reinigung von Carotinoiden mit Silicagel-Säulen .....	66
4.12.4 Massenspektrometrische Analytik von Carotinoiden .....	67
5 ERGEBNISSE .....	68
5.1 ERHÖHUNG DER MIKROBIELLEN DIVERSITÄT VON CAROTINOIDEN .....	68
5.1.1 DNA Isolierung aus Bodenproben .....	68
5.1.2 Versuche mit verschiedenen Reinkulturen .....	70
5.1.3 Kombination der Methoden .....	72
5.1.4 Optimierung der Methode nach Moré .....	75
5.1.5 Herstellung von Genbanken und Komplementationsscreening .....	76
5.1.6 Voraussetzung für die Herstellung von Genbanken mit anschließendem Komplementationsscreening .....	77
5.1.7 Herstellung der Genbanken mit Boden DNA .....	77
5.1.8 Validierung des Assaysystems .....	78
5.2 ERHÖHUNG DER MOLEKULAREN DIVERSITÄT VON CAROTINOIDEN .....	81
5.2.1 Veränderung der Monooxygenasen crtA aus Rhodobacter sphaeroides und Rhodobacter capsulatus durch DNA shuffling .....	82
5.2.1.1 Expressionskassetten zur Biosynthese der benötigten Substrate .....	82
5.2.1.2 Spheroiden-Monooxygenasen aus Rhodobacter sphaeroides (RSA) und Rhodobacter capsulatus (RCA) .....	83
5.2.2 DNA shuffling der crtA-Gene aus Rhodobacter sphaeroides und Rhodobacter capsulatus .....	90
5.2.3 Screening auf Klone mit veränderter Carotinoid-zusammensetzung .....	90
5.2.4 Mutanten-Bibliotheken .....	91
5.2.4.1 Chimärenbildung beim DNA shuffling der homologen Gene RCA und RSA .....	91
5.2.5 Veränderung der $\beta$ -Carotin-Ketolase crtO aus Synechocystis sp. PCC6903 .....	92
5.2.5.1 Konstruktion der Expressionskassetten zur Bildung des benötigten Substrats .....	92
5.2.5.2 $\beta$ -Carotin-Ketolase crtO aus Synechocystis sp. PCC6903 .....	94

5.2.6	<i>Carotinoide aus JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + pUC-SYO</i>	96
5.2.7	<i>Screening auf Bildung von Canthaxanthin</i>	97
5.2.8	<i>Variation der error-prone PCR-Bedingungen</i>	97
5.2.9	<i>Bestimmung der Mutationsrate</i>	99
5.2.10	<i>Mutanten-Bibliotheken</i>	100
5.2.11	<i>DC-Analytik der Mutanten</i>	102
5.2.12	<i>Nukleotidsequenz der Mutanten</i>	103
5.2.13	<i>Weitere Untersuchungen der <math>\beta</math>-Carotin Ketolase aus Synechocystis sp. PCC6803</i>	103
6	DISKUSSION	107
6.1	ERHÖHUNG DER MIKROBIELLEN DIVERSITÄT VON CAROTINOIDEN	107
6.1.1	<i>DNA-Isolierung aus Bodenproben</i>	108
6.1.2	<i>Optimierung der Methode nach Moré durch direkte Silica-Reinigung</i>	110
6.1.3	<i>Kombination der Aufschluß-Methoden</i>	111
6.1.4	<i>Screening nach neuen Carotinoiden</i>	112
6.1.5	<i>Validierung des Assaysystems zum Screening nach neuen Carotinoiden</i>	112
6.2	ERHÖHUNG DER MOLEKULAREN DIVERSITÄT VON CAROTINOIDEN	114
6.2.1	<i>Die Spheroiden-Monooxygenasen aus Rhodobacter capsulatus und Rhodobacter sphaeroides</i>	114
6.2.2	<i>DNA shuffling der Spheroiden Monooxygenasen aus Rhodobacter capsulatus und Rhodobacter sphaeroides</i>	115
6.2.3	<i>Die <math>\beta</math>-Carotin-Ketolase (CrtO) aus Synechocystis sp. PCC6803</i>	117
6.2.4	<i>Veränderung der Substratspezifität der <math>\beta</math>-Carotin-Ketolase aus Synechocystis sp. PCC6803</i>	118
6.2.5	<i>Weitere Untersuchungen zur Bildung von Canthaxanthin mit crtO aus Synechocystis sp. PCC6803</i>	120
7	LITERATURVERZEICHNIS	122
8	LEBENS LAUF	132



**ABKÜRZUNGEN**

Ac	Aceton
APS	Ammoniumpersulfat
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Cm	Chloramphenicol
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-triphosphat
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynucleosid-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. herbicola</i>	<i>Erwinia herbicola</i>
<i>E. uredovora</i>	<i>Erwinia uredovora</i>
EDTA	Ethylendiaminteraessigsäure
g	Gramm
Hex	n-Hexan
IPTG	Isopropyl- $\lambda$ -thio-galactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacP	Lac-Promotor
LB	Luria-Bertani-medium
LC	Liquid chromatography
m	Meter
mA	Milliampère

## ABKÜRZUNGEN

---

min	Minute
MS	Massenspektrometrie
(m/v)	Masse pro Volumen
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD <sub>Wellenlänge</sub>	Optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
pH	Potentia hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen (H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> )
NADPH	β-Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
sp.	Spezies
Std	Stunde
TAE	Tris-Eisessig-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol.	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
λ	Wellenlänge
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol

## 1 ABSTRACT

Carotenoids compose a widely distributed class of structurally and functionally diverse yellow, orange and red natural pigments. They are currently produced for the use as food colorants, nutrient supplements, for pharmaceutical and cosmetic purposes, and for animal feed. However, the availability of structurally diverse carotenoids is limited as only a restricted number of carotenoids can be isolated from natural sources, synthesized chemically or produced by fermentation.

Subject of this work was the enhancement of the microbial diversity of carotenoids by screening soil DNA libraries for the production of carotenoids. The first step was the comparison of various methods for the isolation of DNA from soil, differing in the principle of cell disruption. The aim was the selective isolation of DNA from actinomycetes (or generally Gram-positive bacteria) and non-actinomycetes for cloning in different hosts as the expression of actinomycete genes in *E. coli* is often limited due to different promoters and codon-usage. By a combination of the two different DNA extraction methods according to Zhou and Moré it was possible to isolate DNA from Gram-negative bacteria in the first step and G + C-rich Gram-positive bacteria in the second step. The G + C-rich DNA isolated in the second step is suitable for cloning in *Streptomyces*. Moreover, the method according to Moré was optimized by direct silica purification of the isolated DNA without prior DNA precipitation with ethanol.

Construction of the library was done by cloning DNA from soil isolated by the method of Zhou in pUC vectors and transformation in *E. coli* cells harbouring the carotenoid genes *crtB* and *crtE* from *Erwinia uredovora*. Expression of these genes leads to the formation of phytoene, the first and colourless carotenoid in the carotenoid pathway. Genes from soil DNA, whose gene products can use phytoene as substrate lead to a yellow to red coloration of the respective clones caused by the production of carotenoids. These were supposed to be identified by visual complementation screening. 70 000 clones were screened but none of the clones showed a yellow or red pigmentation.

As systematic errors could have occurred the method was validated. Therefore to 5 g of soil sample 1 ml of *Erwinia uredovora* culture (corresponding to  $5,5 \times 10^8$  cells) was added. After extraction of DNA by the method of Zhou the library was prepared as described above and the clones were screened for coloration. Four out of 7 000 clones showed a yellow-orange

pigmentation caused by the production of  $\beta$ -carotene.  $\beta$ -carotene was produced because the cloned gene fragment contained the adjacent genes *crtI* and *crtY* from *Erwinia uredovora*. Complementation of these genes with the two genes *crtE* and *crtB*, resulted in the synthesis of  $\beta$ -carotene.

The second subject of this work was the enhancement of the molecular diversity of carotenoids. By DNA shuffling of two homologous genes from *Rhodobacter capsulatus* (RCA) and *Rhodobacter sphaeroides* (RSA) coding for the spheroidene monooxygenase (*crtA*) the properties of the enzyme should be altered to produce a carotenoid with a maximum number of oxo-groups as main product. This would lead to a deep-red pigmentation of the corresponding clone. *E. coli* cells harbouring the genes *crtE*, *crtB* and *crtI*-C14 (a mutant of *crtI* derived from DNA shuffling of two homologous *crtI* genes from *E. uredovora* and *E. herbicola*) produce a mixture of lycopene and 3,4,3',4'-tetrahydrolycopene. These carotenoids lead to a pink pigmentation of the corresponding *E. coli* clone and serve as substrate for *crtA*. Both enzymes convert these substrates to different oxo-products as the clones, transformed with the different *crtA* genes show a different coloration

The mutant library created by DNA shuffling consisted of 24 000 clones but mainly due to the screening system no one of these showed a different coloration compared to clones carrying the wild type enzymes.

In a further experiment the carotenoid pathway in *E. coli* was further extended by the additional cloning of *crtY* from *E. uredovora* into a vector carrying the genes coding for *CrtB*, *CrtE* and *CrtI*-C14. Cells containing this plasmid construct showed a yellow-orange pigmentation due to the production of  $\beta$ -carotene.  $\beta$ -carotene-ketolase (*CrtO*) from the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC6803 (SYO) can convert  $\beta$ -carotene to the orange keto-product echinenone and minor amounts of canthaxanthin. By complementation screening of a mutant library of SYO created by error-prone PCR, clones with an altered substrate specificity should result in the formation of canthaxanthin as main product. These clones would differ from the echinenone-producing orange clones by a pink-red pigmentation. Screening of 35 000 clones yielded no clone with an altered coloration. However, further investigations revealed that by variation of the cultivation conditions canthaxanthin can be obtained as main product, even by the wild type SYO enzyme.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Carotinoide sind meist gelbe bis rote Farbstoffe, die in der Natur weit verbreitet sind. Sie werden derzeit als Tierfutterzusatz, Nahrungsergänzungsmittel und für pharmazeutische und kosmetische Produkte eingesetzt. Jedoch ist das Angebot strukturell verschiedener Carotinoide für medizinische Zwecke gering, und nur eine begrenzte Anzahl von Carotinoiden ist chemisch herzustellen, aus natürlichen Quellen zu isolieren oder zu fermentieren.

Zunächst wurde in dieser Arbeit versucht, die mikrobielle Diversität von Carotinoiden zu erhöhen, indem Genbanken aus Boden-DNA auf Carotinoidbildung gescreent wurden.

Dazu wurden verschiedene, sich im Aufschlußprinzip unterscheidende Methoden zur Extraktion von DNA aus Bodenproben miteinander verglichen. Dabei sollte erreicht werden, daß DNA aus Actinomyceten von DNA aus Gram-negativen Mikroorganismen abgetrennt werden kann, da die Expression von Actinomyceten Genen in *E. coli* wie auch die Expression von Genen aus Gram-negativen Organismen in Actinomyceten aufgrund unterschiedlicher Promotoren und Codon-usage oft problematisch ist. Durch die Kombination der Methoden nach Zhou und Moré konnte dies erreicht werden. Darüber hinaus wurde für die nach Moré isolierte DNA ein direktes Reinigungsprotokoll etabliert, wodurch die DNA ohne vorherige Fällung direkt mit Silica aus dem Lysat isoliert und gereinigt werden kann.

Die anschließende Klonierung der nach Zhou isolierten DNA wurde in *E. coli* Zellen durchgeführt, die die beiden Carotinoid Gene *crtB* und *crtE* aus *Erwinia uredovora* auf einem Plasmid enthielten. Diese Zellen bilden bereits das farblose Carotinoid Phytoin. Durch Komplementationsscreening sollten nun Klone identifiziert werden, die weitere Gene für die Carotinoid Biosynthese tragen und deren Genprodukte Phytoin als Substrat nutzen können. So wäre die Identifizierung über eine Gelb- oder Rotfärbung des entsprechenden Klons möglich. Beim Screening von 70 000 Klonen konnte keiner identifiziert werden, der eine Gelb- oder Rotfärbung aufwies.

Um eventuell auftretende systematische Fehler auszuschließen, wurde der Bodenprobe zur Validierung der Methode 1 ml *E. uredovora*-Kultur (entsprechend  $5,5 \times 10^8$  Zellen) zugegeben, aus der anschließend DNA isoliert und die Genbank erstellt wurde. Beim Komplementationsscreening wurden unter 7 000 gescreenten Klonen vier identifiziert, die eine Gelborangefärbung aufwiesen, die von der Bildung von  $\beta$ -Carotin herrührt. Diese  $\beta$ -

Carotin-Bildung war darauf zurückzuführen, daß die beiden Gene *crtI* und *crtY*, die im Genom von *E. uredoovora* benachbart liegen, kloniert worden waren. Dies führt bei Komplementation mit den beiden Genen *crtE* und *crtB*, die in *E. coli* vorgelegt worden waren, zur Biosynthese von  $\beta$ -Carotin.

Zur Erhöhung der molekularen Diversität von Carotinoiden wurde zunächst durch DNA shuffling zweier homologer Gene, die für Spheroiden Monooxygenasen codieren, versucht, die Substratspezifität dahingehend zu verändern, daß als bevorzugtes Produkt Carotinoide entstehen, die eine möglichst hohe Anzahl an Ketogruppen tragen. Die beiden Spheroiden Monooxygenasen (*crtA*) aus *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides* können die Carotinoide, die bei Expression der in *E. coli* vorgelegten Gene *crtB*, *crtE* und *crtI*-C14 (eine *crtI*-Mutante, die durch DNA shuffling zweier homologer *crtI*-Gene erzeugt worden war) gebildet werden, als Substrat nutzen und zu Oxo-Produkten umsetzen. Die Genprodukte von *crtE*, *crtB* und *crtI*-C14 führen in *E. coli* zur Bildung eines Gemisches aus Lycopin und 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin was eine Pinkfärbung des entsprechenden Klons hervorruft. Bei den entsprechenden Oxo-Derivaten handelt es sich um unterschiedliche Produkte, da Klone, die die Gene *crtB*, *crtE* und *crtI*-C14 und den entsprechenden *crtA*-Wildtyp exprimieren, unterschiedliche Färbungen aufweisen. Es wurden 24 000 Klone der durch DNA shuffling erzeugten Mutantenbibliothek gescreent, wobei keiner im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen eine veränderte Färbung aufwies.

In einem weiteren Ansatz wurde der Carotinoid Biosyntheseweg in *E. coli* durch die auf einem Plasmid codierten Gene *crtB*, *crtE*, *crtI*-C14 und *crtY* bis zum  $\beta$ -Carotin verlängert. Klone mit diesem Plasmid weisen eine Gelborangefärbung auf, die auf die Bildung von  $\beta$ -Carotin zurückzuführen ist. Die  $\beta$ -Carotin-Ketolase CrtO aus *Synechocystis sp.* PCC6803 (SYO) kann  $\beta$ -Carotin zu dem Ketocarotinoid Echinenon umsetzen. Durch Komplementationsscreening einer durch error-prone PCR erzeugten Mutantenbibliothek von SYO sollten Mutanten erzeugt werden, die zur Bildung von Canthaxanthin anstatt Echinenon führen. Diese sind durch eine veränderte Färbung bei visuellem Screening identifizierbar. In dieser Arbeit wurden 35 000 Klone gescreent, wobei keiner eine Farbänderung aufwies. Bei näherer Untersuchung zeigte sich allerdings, daß durch veränderte Kultivierungsbedingungen auch der SYO-Wildtyp in der Lage ist, Canthaxanthin als Hauptprodukt zu produzieren.

### 3 EINLEITUNG

#### 3.1 CAROTINOIDE

##### 3.1.1 ALLGEMEINES

Carotinoide sind meist gelbe bis rote fettlösliche Farbstoffe (Pigmente), die in der Natur weit verbreitet sind. Sie kommen in Bakterien, Pilzen, Algen und grünen Pflanzen vor.

Carotinoide sind Isoprenoide, die eine charakteristische Polyen-Kette mit konjugierten Doppelbindungen besitzen. Bisher sind mehr als 600 Carotinoid-Strukturen bekannt (Straub, 1987), wobei es sich bei den meisten um Tetraterpene handelt, deren Grundkohlenstoffgerüst aus 40 C-Atomen besteht. Darüber hinaus sind auch Triterpene und Pentaterpene (Carotinoide mit 30 bzw. 50 C-Atomen) bakteriellen Ursprungs beschrieben. Carotinoide werden weiter unterschieden in Carotine (z. B.  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Carotin), die ausschließlich aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen bestehen und in Xanthophylle (z. B. Zeaxanthin, Astaxanthin), die Sauerstofffunktionen enthalten. In der Natur kommen außerdem weitere Derivate mit Alkohol-, Säure- und Esterfunktionen vor.

Die Farbigkeit der Carotinoide ist auf die Anwesenheit mehrerer konjugierter Doppelbindungen zurückzuführen, die als Chromophore wirken.

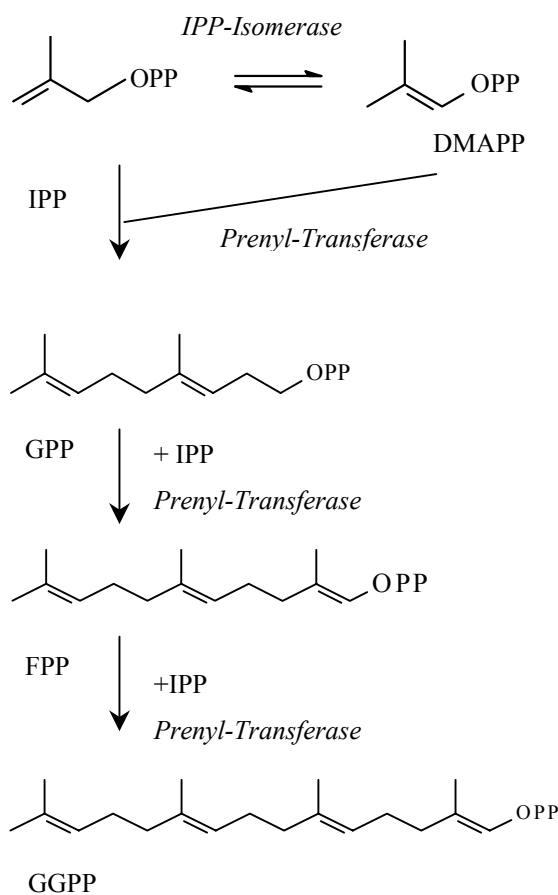
Carotinoide zeigen im UV/Vis-Spektrum einen Hauptabsorptionspeak ( $\lambda_{\max}$ ) und 2 weitere mehr oder weniger deutliche Peaks (Feinstruktur). Mit steigender Anzahl der Doppelbindungen steigt  $\lambda_{\max}$ . Carbonylgruppen beeinflussen das Spektrum derart, dass durch ihre Anwesenheit  $\lambda_{\max}$  steigt, das Chromophor also verlängert wird, dafür aber die Feinstruktur fast vollständig verloren geht. Andere Substituenten, wie Hydroxyl- oder Glykosyl-Gruppen beeinflussen das Spektrum wenig oder gar nicht.

##### 3.1.2 BIOSYNTHESE DER CAROTINOIDE

Carotinoide entstammen der Isoprenoid Biosynthese, wobei Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) der erste Baustein der Carotinoid Biosynthese ist.

### 3.1.2.1 ISOPRENOID BIOSYNTHESE

Ausgehend von Acetyl-CoA wird Isopentenylpyrophosphat (IPP) gebildet. Dieses wird zunächst durch eine Isomerase reversibel zu Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) isomerisiert. DMAPP und IPP sind die Substrate für eine Prenyl-Transferase, dabei dient DMAPP als „Primer“ Molekül zur Kondensation mit IPP zum C<sub>10</sub> Zwischenprodukt Geranylpyrophosphat (GPP). Durch die anschließende weitere Addition von IPP-Molekülen wird zunächst das C<sub>15</sub>-Zwischenprodukt Farnesylpyrophosphat (FPP) und im nächsten Schritt das C<sub>20</sub>-Zwischenprodukt Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) gebildet. Der Biosyntheseweg von Geranylgeranylpyrophosphat ist in Abb. 1 schematisch dargestellt .



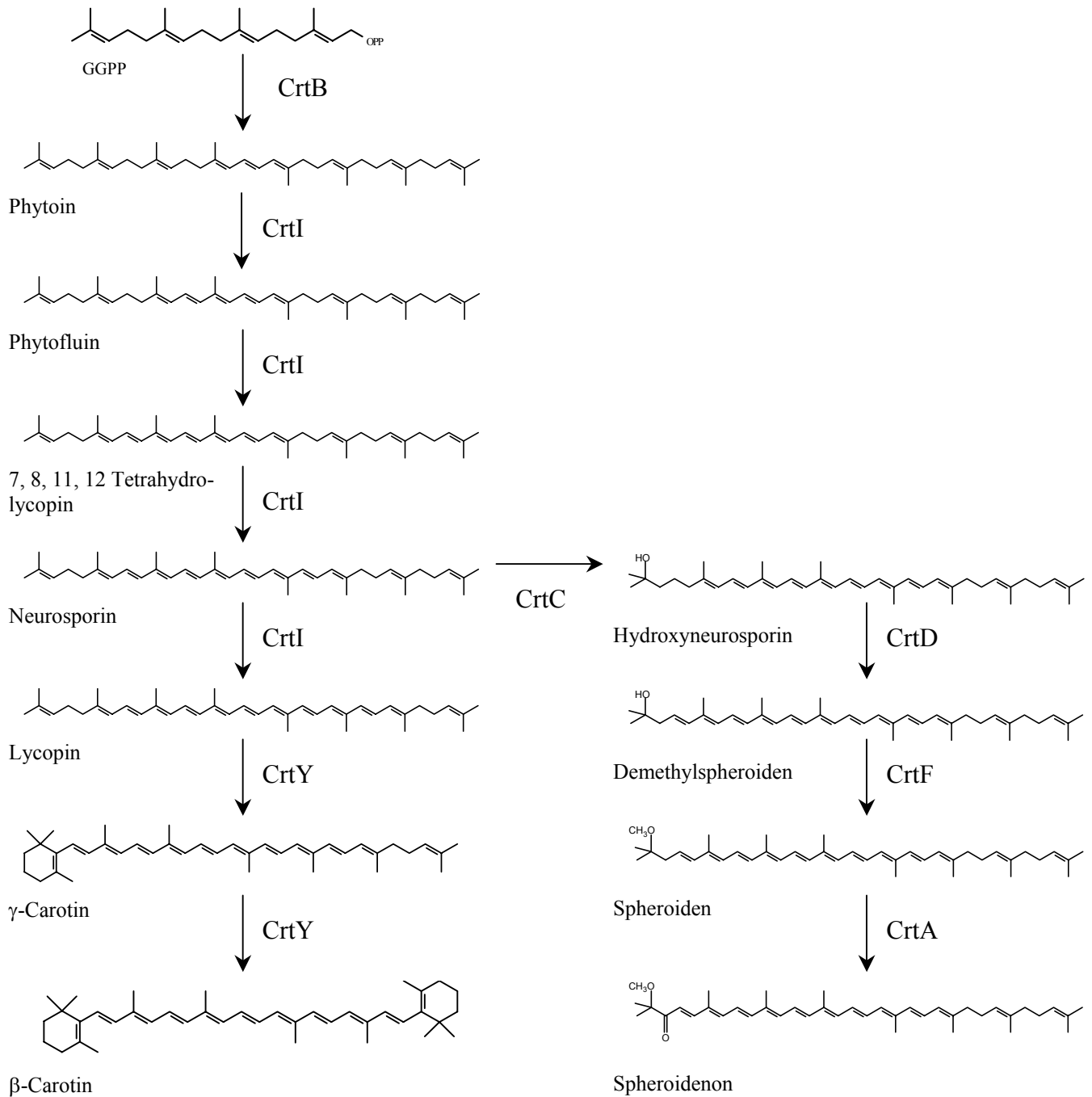
**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Isoprenoid Biosynthese

### 3.1.2.2 CAROTINOID BIOSYNTHESE

Die Synthese von Phytoin ist der erste spezifische Schritt der C<sub>40</sub>-Carotinoid Biosynthese. Dabei findet eine Kopf-zu-Kopf-Kondensation zweier Geranylgeranylpyrophosphat-Moleküle statt. Diese Reaktion wird von der Phytoin-Synthase (CrtB) katalysiert.



In den folgenden Schritten katalysiert die Phytoin-Dehydrogenase (CrtI) fünf Dehydrogenierungen um das erste farbige Carotinoid Lycopin zu bilden (Abb. 2). Danach verzweigt sich der Weg. Entweder können Zyklisierungsreaktionen durch die Lycopin-Zyklase (CrtY) stattfinden oder das Carotinoid bleibt azyklisch und kann dann zu hydroxylierten oder oxygenierten Derivaten umgesetzt werden. Die Biosynthese von  $\beta$ -Carotin ausgehend von GGPP ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Carotinoid Biosynthese

### 3.1.3 VORKOMMEN UND FUNKTION DER CAROTINOIDE

Carotinoide sind in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen weit verbreitet. Dabei kommen Carotinoide sowohl in phototrophen Bakterien, als auch in nicht-phototrophen Bakterien, Hefen und Pilzen vor, wo sie für die gelbe, orange oder rote Färbung verantwortlich sind. In diesen Organismen dienen die Carotinoide dem Schutz vor Schäden durch UV-Strahlung und Sauerstoff (Britton *et al.*, 1995).

In autotrophen Pflanzen vollzieht sich die Biosynthese der Carotinoide in den Chromo- und Chloroplasten. In allen grünen Geweben sind Carotinoide an der Ausnutzung des Lichts für die Photosynthese beteiligt. Außerdem dienen sie in den Reaktionszentren dem Schutz vor lichtbedingter Oxidation. Andernfalls wäre Photosynthese in einer aeroben Umgebung nicht möglich (Britton *et al.*, 1995).

Tiere können Carotinoide zwar nicht *de novo* bilden, nehmen aber durch ihre pflanzliche Nahrung Carotinoide auf, die sie zu ihren Zwecken modifizieren können. Eindrucksvolle Beispiele sind manche Fische wie Goldfisch oder Lachs, die Carotinoide (v. a. Astaxanthin) in der Haut oder im Gewebe akkumulieren oder das pink-rote Gefieder von Flamingos, deren Färbung von Ketocarotinoiden herrührt (Britton *et al.*, 1995).

Bei Geflügel findet man Lutein (aus grünen Blättern), Zeaxanthin (aus gelbem Mais), Cryptoxanthin und Capsanthin im Eigelb und in der Haut.

In marinen Invertebraten wird die Pigmentierung oft von Carotinoid-Protein-Komplexen verursacht, die in gebundener Form blaue, lila oder grüne Färbung zeigen. So weist Hummer lebend eine blaue Färbung auf. Beim Kochen jedoch wird er rot, da das Astaxanthin vom denaturierten Protein freigesetzt wird (Britton *et al.*, 1995).

Für den menschlichen und tierischen Organismus ist  $\beta$ ,  $\beta$ -Carotin die Hauptquelle für Vitamin A, dabei wird  $\beta$ ,  $\beta$ -Carotin durch eine 15, 15'Dioxygenase gespalten, wobei Vitamin A entsteht (Britton *et al.*, 1995). Dementsprechend wird  $\beta$ ,  $\beta$ -Carotin als Provitamin A bezeichnet.

Des Weiteren wird den Carotinoiden eine wichtige Funktion im Schutz vor Krankheiten wie Krebs, Herzleiden oder AIDS zugeschrieben. In epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass die Aufnahme von größeren Mengen an Tomaten und  $\beta$ -Carotin mit dem verminderten Auftreten einiger Krebsarten invers korreliert (Franceschi *et al.*, 1994; Ribago-Mercado *et al.*, 1995; Sengupta & Das, 1999; Peto *et al.*, 1981; (Giovannucci *et al.*, 1995). Carotinoide wirken als Antioxidantien und bieten damit einen Schutz vor oxidativer Zerstörung und anderen Prozessen, bei denen die Schädigung durch freie Radikale ausgelöst wird (Sohal *et*

al., 1993; Stadtman, 1992; (Ames *et al.*, 1993).

### 3.1.4 INDUSTRIELLE NUTZUNG

Carotinoide werden als Tierfutterzusatz, als Lebensmittelfarbstoff, in Pharmazeutika und Kosmetika eingesetzt (Bauernfeind, 1981) (Klauri und Bauernfeind, 1981).

Vor allem als Nahrungsmittelfarbstoff haben Carotinoide eine große kommerzielle Bedeutung, da in Untersuchungen gezeigt wurde, dass der Kauf und Verzehr von Nahrungsmitteln in hohem Maße vom Farbempfinden des Verbrauchers beeinflusst wird.

Durch den Zusatz von Carotinoid-Konzentraten zum Futter von Tieren werden Lebensmittel indirekt gefärbt. Dies geschieht z.B. bei der Zucht von Lachsen, die durch das Fehlen der natürlichen Futterorganismen keine Carotinoide aufnehmen können und so ihre natürliche Farbe verlieren würden, wenn nicht Carotinoide dem Futter beigemischt würden.

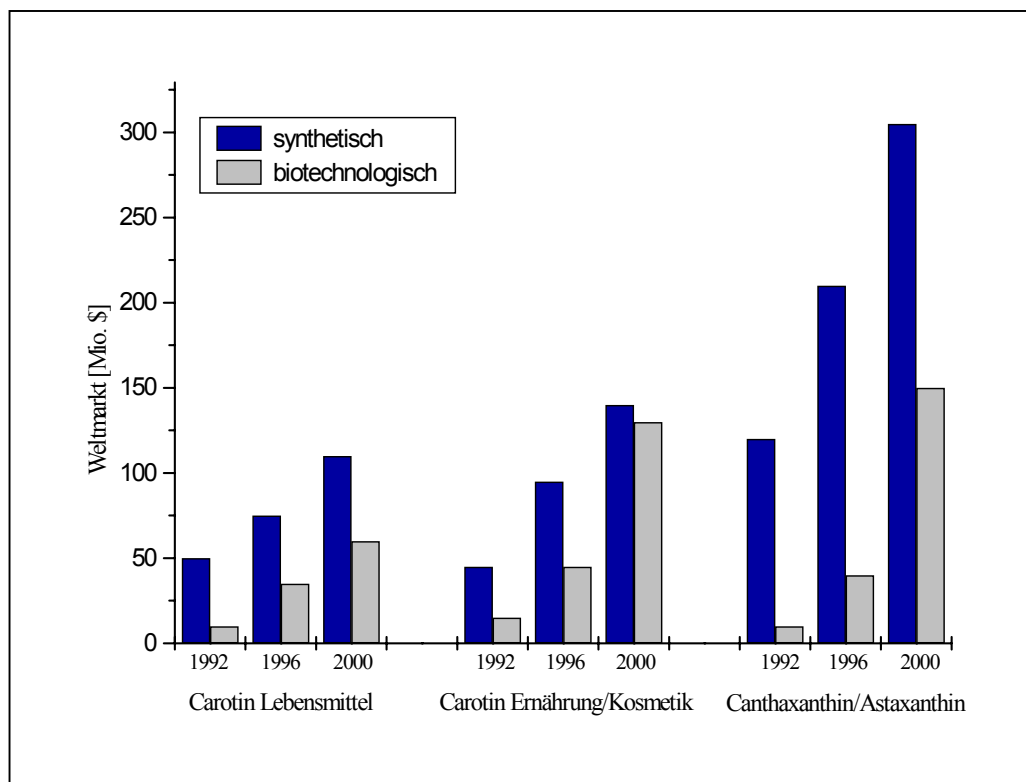
Darüber hinaus werden viele Lebensmittel wie Margarine, Eiscreme, Käsezubereitungen, Soßen, Getränke, Fleisch, Süß- und Teigwaren direkt mit Carotinoiden gefärbt.

Die als Färbemittel hauptsächlich eingesetzten Carotinoide sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Carotinoide aus natürlichen Extrakten (aus (Johnson und Schroeder, 1996))

<i>Verbindung</i>	<i>Haupt-Carotinoide</i>
Anatto ( <i>Bixa orellano</i> )	Bixin, Norbixin
Karottenöl	$\alpha$ -Carotin, $\beta$ -Carotin
Orangenschalen	Luteinester
Palmenöl	Carotine, Lutein
Paprika ( <i>Capsicum annuum</i> )	Capsanthin, $\beta$ -Carotin, Cryptoxanthin, Capsorubin
Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	Lycopin, $\beta$ -Carotin
Saffran ( <i>Crocus sativus</i> )	Crocin, $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin
Gelber Mais ( <i>Zea mays</i> )	Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Carotine
Alfalfa Schrot	Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Violaxanthin, Neoxanthin
Ringelblumenextrakte ( <i>Tagetes erecta</i> )	Lutein (-ester), $\beta$ -Carotin

Die meisten in der Futter-, Kosmetik-, Pharma- und Lebensmittelindustrie benötigten Carotinoide werden durch chemische Synthese hergestellt. Beispielsweise wird  $\beta$ -Carotin seit 1954 kommerziell hergestellt (Pfander, 1992). Sechs synthetische Carotinoide oder apo-Derivate sind kommerziell besonders wichtig:  $\beta$ -Apocarotinal,  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure-ethylester, Citranaxanthin(5',6'-Dihydro-5'-apo-18'-nor- $\beta$ -carotin-6'-on),  $\beta$ -Carotin, Canthaxanthin und Astaxanthin. Der Marktwert für synthetische Carotinoide wurde für 1997 auf über \$500 Millionen geschätzt.



**Abbildung 3:** Trends in der Entwicklung der Weltmarktpreise von synthetisch und fermentativ gewonnenen Carotinoiden (1992-2000) (Evans *et al.*, 1990)

Bisher werden industriell genutzte Carotinoide fast ausschließlich durch chemische Synthese oder durch Extraktion aus Pflanzen gewonnen. Allerdings kommen diese Carotinoide auch in der Natur in Bakterien, Pilzen und Mikroalgen vor. Inzwischen werden mikrobielle Carotinoid-Produkte aus *Dunaliella*, *Haematococcus* und *Phaffia rhodozyma* kommerzialisiert. In den letzten Jahren wurde der mikrobiellen Synthese ein verstärktes Interesse entgegengebracht, da die Meerestierzucht immer weiter ansteigt und Astaxanthin eine wichtige Quelle für die Pigmentierung von Lachsen und Crustaceen aus Zuchtgewässern ist.

Verschiedene Algen, Cyanobakterien und andere Bakterien können als Produzenten für Carotinoide eingesetzt werden. So eignen sich *Blakeslea trispora* oder *Dunaliella salina* als Quelle für  $\beta$ -Carotin. Andere Bakterien wie *Mycobacterium*, *Xanthobacter*, *Erwinia* und *Flavobacterium* produzieren Zeaxanthin. Dabei können aus *Flavobacterium* durch verschiedene Fermentationsprozesse 10 – 335 mg/l Kultur Zeaxanthin gewonnen werden (Ninet und Renault, 1979).

Astaxanthin wird hauptsächlich aus der Grünalge *Haematococcus pluvialis* und verwandten Spezies, sowie aus der Hefe *Phaffia rhodozyma* isoliert. Wild-Isolate von *Phaffia rhodozyma* können 500  $\mu$ g Carotinoide /g Zellen enthalten, wobei der Anteil an Astaxanthin 40 – 95 % beträgt (Andrews *et al.*, 1976). Zur Fermentation wurden Stämme entwickelt, deren Astaxanthin-Anteil > 3 mg/g Zellen erreicht.

### **3.1.5 CAROTINOGENE GENE**

Bis jetzt wurden über 150 Gene, die für 24 verschiedene Enzyme codieren, die an der Carotinoid Biosynthese beteiligt sind (Crt), aus Bakterien, Pflanzen, Algen und Pilzen isoliert. Auch vollständige Carotinoid Biosynthesewege wurden bereits aus einigen Bakterien kloniert, bei denen die Gene in Clustern vorliegen. Diese Gene können zur Produktion einer Vielzahl verschiedener Carotinoide eingesetzt werden (Sandmann *et al.*, 1999).

In Tabelle 2 sind einige der an der Carotinoid Biosynthese beteiligten Enzyme aufgeführt. Die Gene, die für frühe Carotinoid Biosynthese Enzyme codieren (*crtE*, *crtB*, *crtI*) stellen mehr als die Hälfte aller klonierten *crt*-Gene dar. Sie stammen auch aus Pflanzen (rote Paprika (Hugueney *et al.*, 1992), Soja (Bartley *et al.*, 1991) oder Tomaten (Pecker *et al.*, 1992). Lycopin- $\beta$ -zyklasen, die die  $\beta$ -Ring Bildung zum  $\beta$ -Carotin katalysieren, wurden aus einigen Bakterien und Pflanzen kloniert (s. Tab. 2). Weiterhin wurden einige Ring-modifizierende Enzyme wie  $\beta$ -Carotin C(3) Hydroxylasen, die eine Hydroxylgruppe an C3 einführen oder  $\beta$ -Carotin C(4)-Ketolasen, die Ketogruppen an C4 des  $\beta$ -Rings einfügen, kloniert (s. Tab. 2). Um die Bandbreite der strukturell verschiedenen Carotinoide, die in rekombinanten Mikroorganismen produziert werden, zu erweitern, können *crt*-Gene zu neuen Biosynthesewegen kombiniert werden (Schmidt-Dannert, 2000).

**Tabelle 2:** Einige an der Carotinoid Biosynthese beteiligte Enzyme

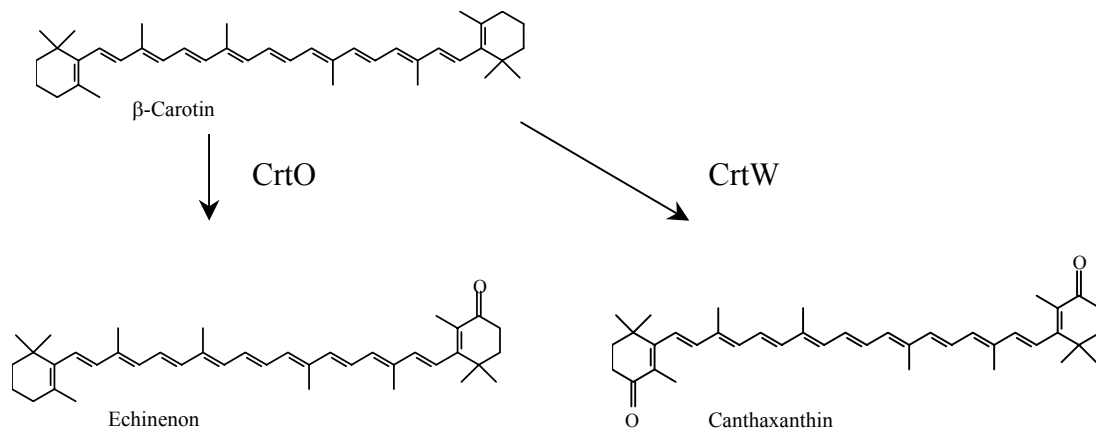
<i>Gen</i>	<i>Enzym</i>	<i>Organismus</i>	<i>Referenz</i>
crtA	Spheroiden-Monooxygenase	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	(Armstrong <i>et al.</i> , 1989)
		<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	(Lang <i>et al.</i> , 1995)
crtB	Phytoin-Synthase	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	(Misawa <i>et al.</i> , 1995b)
		<i>Erwinia herbicola</i>	(To <i>et al.</i> , 1994)
		<i>Erwinia uredovora</i>	(Misawa <i>et al.</i> , 1990)
		<i>Flavobacterium sp</i> R1534	(Pasamontes <i>et al.</i> , 1997)
		<i>Myxococcus xanthus</i>	(Botella <i>et al.</i> , 1995)
		<i>Rhodobacter capsulatus</i>	(Armstrong <i>et al.</i> , 1989)
		<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	(Lang <i>et al.</i> , 1994)
		<i>Synechocystis sp.</i> PCC6803	(Martinez-Ferez <i>et al.</i> , 1994)
crtC	Hydroxyneurosporin-Hydroxylase	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	(Armstrong <i>et al.</i> , 1989)
		<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	(Lang <i>et al.</i> , 1995)
crtD	Methoxyneurosporin-Desaturase	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	(Armstrong <i>et al.</i> , 1989)
		<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	(Lang <i>et al.</i> , 1995)
crtE	GGDP-Synthase	<i>Erwinia herbicola</i>	(To <i>et al.</i> , 1994)
		<i>Erwinia uredovora</i>	(Misawa <i>et al.</i> , 1990)
		<i>Flavobacterium sp</i> R1534	(Pasamontes <i>et al.</i> , 1997)
		<i>Myxococcus xanthus</i>	(Botella <i>et al.</i> , 1995)
crtF	Methoxyneurosporin-O-Methyltransferase	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	(Armstrong <i>et al.</i> , 1989)
		<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	(Lang <i>et al.</i> , 1995)
crtI	Phytoin-Desaturase	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	(Misawa <i>et al.</i> , 1995b)
		<i>Erwinia herbicola</i>	(To <i>et al.</i> , 1994)
		<i>Erwinia uredovora</i>	(Misawa <i>et al.</i> , 1990)
		<i>Flavobacterium sp</i> R1534	(Pasamontes <i>et al.</i> , 1997)
		<i>Myxococcus xanthus</i>	(Fontes <i>et al.</i> , 1993)
		<i>Rhodobacter capsulatus</i>	(Armstrong <i>et al.</i> , 1989)
		<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	(Lang <i>et al.</i> , 1994)
		<i>Synechocystis sp.</i> PCC6803	(Fernandez-Gonzalez <i>et al.</i> , 1997)
crtW	$\beta$ -Carotin-Ketolase (crtW-Typ)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	(Kajiwara <i>et al.</i> , 1995)
		<i>Anabaena sp.</i>	(Kaneko <i>et al.</i> , 2001)
		<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	(Misawa <i>et al.</i> , 1995b)
crtY	Lycopin- $\beta$ -Zyklase	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	(Misawa <i>et al.</i> , 1995b)
		<i>Erwinia herbicola</i>	(To <i>et al.</i> , 1994)
		<i>Erwinia uredovora</i>	(Misawa <i>et al.</i> , 1990)
		<i>Flavobacterium sp</i> R1534	(Pasamontes <i>et al.</i> , 1997)
crtZ	$\beta$ -Carotin-Hydroxylase	<i>Erwinia herbicola</i>	(Hundle <i>et al.</i> , 1993)
		<i>Erwinia uredovora</i>	(Misawa <i>et al.</i> , 1990)
		<i>Flavobacterium sp</i> R1534	(Pasamontes <i>et al.</i> , 1997)

### 3.1.6 $\beta$ -CAROTIN KETOLASE AUS *SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803*

In dem Cyanobakterium *Synechocystis sp. PCC6803* werden hauptsächlich vier Carotinoide in nennenswerter Menge gebildet, dabei handelt es sich um Myxoxanthophyll,  $\beta$ -Carotin, Echinenon und Zeaxanthin (Martinez-Ferez *et al.*, 1994b; (Bramley und Sandmann, 1985). *Synechocystis sp. PCC6803* ist die bisher einzige Spezies, die Echinenon in nennenswerten Mengen bildet (Bramley und Sandmann, 1985). Für die Biosynthese von Echinenon wird eine Ketolase benötigt, die nur an einem der beiden  $\beta$ -Ringe des  $\beta$ -Carotins eine Ketogruppe anhängt. Bisher wurden die Gene von mehreren verwandten  $\beta$ -Carotin Ketolasen (*crtW*) aus verschiedenen Bakterien (*Alcaligenes* PC-1 (Misawa *et al.*, 1995a), *Agrobacterium aurantiacum* (Misawa *et al.*, 1995b), *Paracoccus marcusii* (Harker und Hirschberg, 1997) und *Bradyrhizobium sp. ORS278* (Hannibal *et al.*, 2000), dem Cyanobakterium *Anabaena* (Kaneko *et al.*, 2001) und der Grünalge *Haematococcus pluvialis* (Misawa *et al.*, 1995a ; Kajiwara *et al.*, 1995; Lotan und Hirschberg, 1995) kloniert und sequenziert. Diese Ketolasen katalysieren die direkte Umwandlung von Methyl- zu Ketogruppen ohne eine Hydroxylgruppe als Intermediat (Misawa *et al.*, 1995a). Diese verwandten Enzyme katalysieren jedoch die gleichzeitige Einführung von Ketogruppen an Position 4 beider Ionon Ringe um das symmetrische Diketo-Carotinoid Canthaxanthin zu bilden. Echinenon, mit nur einer Ketogruppe, ist dabei nur als Intermediat in kleinen Mengen nachweisbar. Die Biosynthese von Echinenon und Canthaxanthin ist in Abb. 4 dargestellt.

In der Genomsequenz von *Synechocystis sp. PCC6803* wurde ein offener Leserahmen (slr0088) gefunden, der eine hohe Homologie zu bakteriellen  $\beta$ -Carotin Desaturasen aufweist. Nach der Klonierung zeigte sich jedoch, dass der ORF slr0088 keinerlei Desaturase-Aktivität besitzt, sondern eine  $\beta$ -Carotin Ketolase ist, die asymmetrisch mit dem Substrat reagiert (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997). Diese  $\beta$ -Carotin Ketolase ist strukturell mit keiner der bisher beschriebenen, symmetrisch agierenden Ketolasen verwandt und katalysiert eine andere Reaktion. Daher wird diese Ketolase als *CrtO* bezeichnet, um sie von den bisher charakterisierten Ketolasen (*CrtW*) zu unterscheiden (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997). Bei heterologer Expression von *crtO* in *E. coli*, wird - wenn gleichzeitig die Gene *crtB*, *crtE*, *crtI* und *crtY* exprimiert werden, die ihrerseits zur Bildung von  $\beta$ -Carotin führen - als hauptsächliches Ketocarotinoid Echinenon nachgewiesen. Jedoch handelt es sich bei 10% der gebildeten Ketocarotinoide um Canthaxanthin. *CrtO* kann hauptsächlich  $\beta$ -Carotin als Substrat verwenden und zu Echinenon umsetzen. Die Substratspezifität scheint jedoch nicht ganz strikt zu sein, da ein kleiner Teil des Echinenons weiter zu Canthaxanthin umgesetzt wird.

Dieser Effekt beruht jedoch auf der hohen Expressionsrate und ist auf die heterologe Umgebung in *E. coli* beschränkt (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997).



**Abbildung 4:** Biosynthese der Ketocarotinoide

### 3.2 DNA-ISOLIERUNG AUS BODENPROBEN

Die direkte Isolierung bakterieller Nukleinsäuren aus Bodenproben spielt in den letzten Jahren eine zunehmende Rolle beim Auffinden nicht kultivierbarer Mikroorganismen (Liesack, W. und Stackebrandt, 1992) und zeigt die genotypische Diversität und ihre Veränderung in mikrobiellen Ökosystemen (Torsvik *et al.*, 1990a und b). Auch beim Screening nach neuen Biokatalysatoren spielt die direkte Gewinnung von DNA aus Umweltproben, wie Boden oder Sediment eine immer größere Rolle. Lebende Mikroorganismen können nur teilweise durch klassische Anreicherungsverfahren aus Umweltproben isoliert werden. Das liegt zum Einen daran, dass durch klassische Extraktion von Zellen nur ein Teil dieser – etwa 34% - erhalten werden kann (Holben *et al.*, 1988). Außerdem ist der Großteil der Mikroorganismen in Umweltproben, oft bis zu 90 – 99%, nicht kultivierbar (Torsvik *et al.*, 1998).

Da hier ein beträchtliches biotechnologisches Potential liegt, wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von Protokollen zur DNA-Isolierung aus Umweltproben entwickelt.

Dabei können entweder zuerst die Zellen von der Matrix abgetrennt und anschließend lysiert werden (Holben *et al.*, 1988) oder die Zellen werden direkt innerhalb der Umweltprobe aufgeschlossen (Ogram *et al.*, 1987).

Werden im ersten Schritt die Zellen von der Matrix abgetrennt, ist es möglich, aufgrund von



unterschiedlichen Schwimmdichten, ausschließlich prokaryotische Zellen zu extrahieren. Allerdings ist ein Großteil der Bodenbakterien bei hohen Konzentrationen an divalenten Kationen stark an die Bodenpartikel gebunden. Zunächst müssen deshalb die Boden-Aggregate dispergiert und anschließend zentrifugiert werden. Dadurch werden Zellen von den Bodenpartikeln aufgrund von Größe, Schwimmdichte oder beidem getrennt.

Aus den extrahierten prokaryotischen Zellen ist es einfacher, große DNA-Fragmente zu gewinnen, als wenn DNA aus der Umweltprobe direkt gewonnen wird. Durch direkte DNA-Isolierung aus Bodenproben kann die Ausbeute an isolierter DNA im Vergleich zur kombinierten Methode jedoch 10 mal höher sein.

Die Fragmentgröße der isolierten DNA ist ein wichtiges Kriterium für die Qualität der Aufschlussmethode. Häufig wird eine Fragmentlänge von 10 – 25 kb erreicht (Selenska und Klingmuller, 1991), was für die meisten Untersuchungen ausreichend ist, auch für viele Gen-Cluster.

Allgemein bestehen die Protokolle zur DNA-Isolierung aus Umweltproben aus folgenden Schritten:

1. Lyse der Zellen
2. Trennung der DNA von anderen Zellbestandteilen wie Polysacchariden und Proteinen
3. Trennung der DNA von Bodenpartikeln und Reinigung der DNA von Bodenbestandteilen
4. DNA-Fällung
5. weitere Reinigungsschritte

Oft wird versucht, die DNA-Ausbeute durch starke, physikalische Behandlungen wie Glasperlenaufschluß oder Ultraschallbehandlung zu steigern, dies kann jedoch die DNA scheren, so daß Fragmente von 5 – 10 kb oder noch kleiner entstehen (Liesack, W. und Stackebrandt, 1992). Solche DNA kann aufgrund von Chimärenbildung unter Umständen nicht mehr für Analysen der Diversität mittels PCR eingesetzt werden (Liesack, W. *et al.*, 1991).

Es gibt eine Vielzahl von Protokollen mit verschiedenen Ansätzen. Bereits der Zellaufschluß kann enzymatisch durch Lysozym, oder Proteinase K, oder mechanisch mit Glasperlen, Frier-Tau-Zyklen oder Mörsern in flüssigem Stickstoff durchgeführt werden. Auch Kombinationen sind möglich. Die Abtrennung von Proteinen und anderen hydrophoben Bestandteilen kann durch Acetat-Fällung oder durch Extraktion mit Phenol oder Chloroform erfolgen. Die Nukleinsäuren werden meist mit Alkohol gefällt. Die verschiedenen Ansätze sind in Tab. 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Verschiedene Ansätze zur DNA Isolierung aus Bodenproben

<i>Zellaufschluß</i>	<i>Weiterbehandlung</i>	<i>DNA-Gewinnung</i>	<i>Referenz</i>
<b>Mechanischer Aufschluß</b>			
Glasperlen, SDS	NH <sub>4</sub> -Acetat Fällung	Ethanol-Fällung	(More <i>et al.</i> , 1994)
Mörsern mit Sand, Frier-Tau Zyklen, SDS, Proteinase K	Phenol Extraktion	Säule	(Wikstrom <i>et al.</i> , 1996)
Mörsern in flüssigem N <sub>2</sub> , SDS	Phenol Extraktion	Ethanol-Fällung	(Volossiouk <i>et al.</i> , 1995)
Ultraschall, Hitze, Frier-Tau Zyklen		Ethanol-Fällung	(Picard <i>et al.</i> , 1992)
<b>Enzymatischer Aufschluß</b>			
Proteinase K, SDS, Hitze	Chloroform Extraktion	Isopropanol-Fällung	(Zhou <i>et al.</i> , 1996)
Lysozym, SDS, Frier-Tau Zyklen	Phenol Extraktion	Isopropanol-Fällung	(Tsai und Olson, 1991)
Lysozym, Guanidin Isothiocyanat		Isopropanol-Fällung	(Porteous <i>et al.</i> , 1994)

Ein weiteres Kriterium für die Qualität der Aufschlussmethode ist, ob DNA aus allen Organismen isoliert werden kann, also auch die aus Gram-positiven Bakterien wie z.B. Actinomyceten, oder ob nur ein Teil der im Boden vorhandenen Spezies lysiert wird.

Ein weiterer kritischer Schritt bei der DNA-Extraktion aus Bodenproben ist die Reinigung der DNA, da diese zunächst stark mit Huminstoffen kontaminiert ist. Huminstoffe sind makromolekulare, saure Substanzen aus dem Boden, die bei der Humifizierung entstehen. Diese verhalten sich bei den meisten Fraktionierungsschritten genau so wie DNA. Huminstoffe sind problematisch, weil sie beispielsweise Restriktionsendonukleasen (Holben *et al.*, 1988), sowie die Taq-Polymerase inhibieren (Tsai und Olson, 1992b) und auch die Effizienz von DNA-DNA-Hybridisierungen erniedrigen (Steffan *et al.*, 1988). Daher muss für die Reinigung der DNA eine Methode gewählt werden, bei der Huminstoffe möglichst quantitativ entfernt werden, wobei die Verluste an DNA nicht zu hoch sein dürfen. Meist werden kommerziell erhältliche Kits oder Säulen zur Reinigung von DNA eingesetzt, als Beispiele sind hier zu nennen: Sephadex G250 (Tsai und Olson, 1992b), Elutip-d (Tsai und Olson, 1991), Gene Clean (Jacobsen und Rasmussen, 1992), Qiagen tip 500 (Tebbe und

Vahjen, 1993). Außerdem kann die DNA auch über CsCl-Gradienten gereinigt werden (Bruce *et al.*, 1992; Jacobsen und Rasmussen, 1992).

### 3.3 GERICHTETE EVOLUTION

#### 3.3.1 VERÄNDERUNG VON ENZYMEN DURCH GERICHTETE EVOLUTION

Enzyme sind in ihrer Effizienz und Präzision den konventionellen industriellen Katalysatoren weit überlegen. Dennoch fehlen natürlich vorkommenden Enzymen oft bestimmte Eigenschaften wie Thermostabilität, Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln, eine erhöhte spezifische Aktivität sowie veränderte Substratspezifität oder Enantioselektivität, die für eine kommerzielle Anwendung notwendig wären. Trotz der Bemühungen, den Zusammenhang zwischen Sequenz, Struktur und Funktion aufzuklären, war das “rationale Design”, also die spezifische Veränderung von Enzymen (Protein engineering), bisher nur in wenigen Beispielen erfolgreich. Wenn der Zusammenhang zwischen Sequenz und Funktion nicht bekannt ist, hat sich die *in vitro* Evolution von Enzymen als eine schnelle und effektive Methode erwiesen, Enzyme den entsprechenden Anforderungen anzupassen (Kuchner und Arnold, 1997). Einige erfolgreiche Beispiele sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Bei der gerichteten Evolution wird zunächst eine Mutanten- Bibliothek des entsprechenden Gens angelegt. Gen-Varianten, die hinsichtlich der gewünschten Eigenschaft verbessert sind, werden durch Selektion oder Screening identifiziert. Drei Voraussetzungen für das evolutive Design sind:

1. eine durchführbare Evolutions-Strategie
2. ein geeignetes Screening oder Selektionsverfahren für die gewünschten Eigenschaften
3. ein geeigneter Wirtstamm für die funktionelle Expression

Das Ziel besteht darin, den Weg zu finden, der zu einer Verbesserung der gewünschten Eigenschaften führt.

**Tabelle 4:** Zusammenfassung einiger Experimente zur Veränderung von Enzymen durch evolutives Design

<i>Enzym</i>	<i>Ziel</i>	<i>Methode</i>	<i>Referenz</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase	Veränderte Substratspezifität	Mutator Stamm	(Bornscheuer <i>et al.</i> , 1998, 1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase	Erhöhte Enantioselektivität	Mutator Stamm, error-prone PCR	(Henke und Bornscheuer, 1999)
<i>Bacillus subtilis</i> Esterase	Höhere Aktivität in DMF gegenüber pNB	error-prone PCR, DNA shuffling, saturation mutagenesis	(Arnold und Moore, 1997; Moore und Arnold, 1996)
<i>Coprinus cinereus</i> Häm- Peroxidase	Thermo- und pH- Stabilität u. -Aktivität	error-prone PCR, DNA shuffling, saturation mutagenesis	(Cherry <i>et al.</i> , 1999)
<i>Arthrobacter</i> sp. Hydantoinase	Umkehrung der Enantioselektivität	error-prone PCR, DNA shuffling, saturation mutagenesis	(May <i>et al.</i> , 2000)
SUBTILISIN S41	Erhöhung der Thermostabilität	error-prone PCR, DNA shuffling, saturation mutagenesis	(Miyazaki und Arnold, 1999; Miyazaki <i>et al.</i> , 2000)
Phytoin Desaturase / Lycopin Zyklase	Herstellung neuer Carotinoide	error-prone PCR, DNA shuffling, saturation mutagenesis	(Schmidt-Dannert <i>et al.</i> , 2000)
Verschiedene Subtilisine	Allgemeine Verbesserung	family shuffling	(Ness <i>et al.</i> , 1999)
<i>Bacillus thermocatenulatus</i> Lipase	Änderung der Substratspezifität	error-prone PCR	(Kauffmann und Schmidt- Dannert, 2001)

### 3.3.2 **METHODEN ZUR ZUFÄLLIGEN MUTAGENESE**

Eine Möglichkeit zur Mutagenese ist die Einführung von zufälligen Punktmutationen in DNA-Fragmente. Zufällige Mutationen können durch error-prone PCR (Leung *et al.*, 1989), chemische Mutagenese, UV-Bestrahlung, Mutator-Stämme, falsche Nukleotide oder durch Rekombination geschaffen werden (Arnold und Moore, 1997).

Error-prone PCR ist diejenige Mutagenese-Methode, die am besten untersucht ist (Cadwell und Joyce, 1994; Leung *et al.*, 1989). Die error-prone PCR ist die beste Möglichkeit, Mutationen auf dem gesamten Gen zu verteilen. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, daß die Taq-Polymerase keine 3'→5'-Exonuklease-(Proofreading) aktivität besitzt (Tindall und Kunkel, 1988). Dabei kann die Mutationsrate durch veränderte  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen und ein unbalanciertes Verhältnis der dNTPs kontrolliert werden (Leung *et al.*, 1989). Ein anderer Ansatz ist der Ersatz von  $Mg^{2+}$  durch  $Mn^{2+}$  oder der Einsatz suboptimaler  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen bei unausgewogenem dNTP-Verhältnis.

Das zu mutierende Gen dient als Template für die error-prone PCR-Reaktion, dabei wird ein Nukleotid gegenüber den anderen drei im etwa fünf- bis zehnfachen Unterschub eingesetzt, außerdem kann eine Erhöhung der Mutationsrate durch veränderte  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen erfolgen. Durch den Mangel des limitierenden Nukleotids wird dieses dann durch ein anderes substituiert. Eigentlich sollte es genügen, zwei Reaktionen mit jeweils einer Limitierung (z. B. -A und -G) durchzuführen, um alle möglichen Mutanten zu erhalten. In der Praxis aber hat sich gezeigt, daß sich die Polymerase nicht gegenüber jedem Nukleotid gleich verhält und manche Basen-Limitierungen mutagener sind als andere. Weiterhin hat sich gezeigt, dass bei dieser Methode weit mehr Transitionen als Transversionen entstehen (Rellos und Scopes, 1993).

Mit zunehmender Größe des Gens steigt die Anzahl möglicher Varianten, daher muß die Mutationsrate so gewählt werden, dass etwa ein Austausch pro 1000 bp bzw. pro Gen auftritt. Damit liegt die Mutationsrate in einem für das Screening angemessenen Bereich. Aufgrund einer zu großen Variantenbibliothek sinken die Chancen, die verbesserten Enzyme zu identifizieren.

Da die meisten Mutationen zu inaktiven Enzymen führen, sollte die Mutationsrate außerdem so eingestellt werden, dass nicht mehr als 10 – 20% der Klone inaktiv sind.

### **3.3.3 EVOLUTIVES DESIGN DURCH REKOMBINATION**

Die Anpassung von Enzymen an bestimmte Anforderungen kann auch durch Rekombination erreicht werden. Dabei werden Parental-Stränge mit verschiedenen Eigenschaften, bei denen es sich um homologe Sequenzen oder Fragmente mit zuvor zufällig eingeführten Punktmutationen handelt, einer *in vitro* Rekombination unterworfen. Die verschiedenen Methoden sind im Folgenden dargestellt.

Beim DNA shuffling wird *in vitro* DNA Rekombination durchgeführt. Eine Anzahl von Parentalgenen wird mit *DNaseI* behandelt, was in einem Pool kurzer Fragmente resultiert. Diese werden durch wiederholtes Thermocycling mit Hilfe von thermostabiler DNA-Polymerase wieder in Gene mit voller Länge vereinigt (Stemmer, 1994a, b). Beim DNA shuffling entstehen Mutanten-Bibliotheken, deren Mutationen durch die unterschiedliche Kombinationen aus Fragmenten homologer Sequenzen entstehen.

Eine weitere Rekombinations-Methode ist die "Random Priming Recombination". Hier werden mit Hilfe von Oligonukleotiden mit zufälliger Sequenz DNA-Fragmente hergestellt, die zu verschiedenen Bereichen der Template Sequenz homolog sind. Durch die fehlerhaften Basenpaarungen treten wenige Punktmutationen auf. Die kurzen DNA-Fragmente können aufgrund ihrer komplementären Basen gegenseitig als Primer dienen und so durch wiederholtes Thermocycling rekombinieren. Dadurch können schnell vorteilhafte Mutationen angehäuft werden. Nach der Klonierung in einen Expressionsvektor kann das Screening durchgeführt werden (Shao *et al.*, 1998).

Eine weitere Methode zur Rekombination ist der "staggered extension Process" (StEP). Dabei wird mit dem Template eine PCR mit randständigen Primern durchgeführt. Dabei werden Zyklen mit Denaturierung und extrem abgekürzten Annealing- und Extensionszeiten durchgeführt, wobei die wachsenden Fragmente aufgrund von Sequenzähnlichkeiten an verschiedene Templates anlagern und sich daran verlängern. Dadurch entstehen "Rekombinations-Cassetten". Durch das "Template-switching" enthalten die Fragmente Informationen verschiedener Parental-Stränge (Zhao *et al.*, 1998).

### 3.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die mikrobielle und molekulare Diversität von Carotinoiden erhöht werden.

Es ist möglich, Gene der Carotinoid Biosynthese aus phylogenetisch verschiedenen Spezies zu kombinieren. Die entsprechenden Enzyme lagern sich als membrangebundener Multienzymkomplex zusammen, an welchem die Carotinoid Biosynthese wahrscheinlich stattfindet (Britton, 1998). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass *crtI* aus *Erwinia* in *Rhodobacter sphaeroides* (*crtI*) eingebracht, zunächst zur Bildung von Lycopin, und ausgehend davon zu Spirilloxanthin und Ketospirilloxanthin führt. Diese Carotinoide treten normalerweise in *Rhodobacter sphaeroides* nicht auf (Garcia-Asua *et al.*, 1998), da CrtI aus *Rhodobacter sphaeroides* Phytoin zu Neurosporin umsetzt, welches dann weiter zu Spheroiden und Spheroidenon umgesetzt wird.

Zur Erhöhung der mikrobiellen Diversität von Carotinoiden sollte zunächst DNA aus Bodenproben isoliert und in ein pUC-Derivat ligiert werden. Diese Konstrukte sollten in *E. coli* transformiert werden, die bereits Gene für die ersten Schritte der Carotinoid Biosynthese auf einem pUC-kompatiblen Vektor enthalten. Die beiden in *E. coli* vorgelegten Gene (*crtB* und *crtE*) codieren für die GGPP-Synthase und die Phytoin-Synthase, dadurch wird das farblose Zwischenprodukt Phytoin gebildet. Anschließend sollten die Klone auf Farbigkeit gescreent werden. Dabei werden diejenigen Klone farbig, die Gene enthalten, die an der Carotinoid Biosynthese beteiligt sind, alle anderen bleiben farblos. Nach Identifikation der Carotinoid Biosynthese Gene sind diejenigen von Interesse, die zu „neuen“ Carotinoiden führen oder neue Vertreter bereits bekannter Enzyme sind.

Zur Erhöhung der molekularen Diversität von Carotinoiden sollten zugängliche Biosynthesegene kombiniert und bestimmte Enzymfunktionen durch zufällige Mutagenese (error-prone PCR, DNA shuffling) verändert werden. Durch anschließendes Screening sollten diejenigen Mutanten selektiert werden, die zu veränderten Carotinoiden führen. Die Spheroiden-Monooxygenasen *crtA* aus den Organismen *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides* katalysieren die Umsetzung von Spheroiden zu Spheroidenon, können aber auch Lycopin bzw. Didehydrolycopin als Substrat nutzen. Sie weisen eine Homologie auf DNA-Ebene von ca. 60% auf. Diese beiden homologen Gene sollten durch gene shuffling so rekombiniert werden, dass die resultierenden Mutanten mehr Ketogruppen als die jeweiligen Wildtypen in Lycopin bzw. Didehydrolycopin einführen.

Die  $\beta$ -Carotin-Ketolase *crtO* aus *Synechocystis sp.* PCC6803, deren Genprodukt zu

Echinenon führt, sollte durch error-prone PCR so verändert werden, dass als Hauptprodukt Canthaxanthin entsteht. Dabei handelt es sich zwar um ein Carotinoid, dessen Gene für die Biosynthese bereits kloniert wurden, jedoch könnte dann Canthaxanthin aus  $\beta$ -Carotin durch eine Ketolase hergestellt werden, die sich strukturell völlig von den bisher beschriebenen Ketolasen (CrtW) unterscheidet. Dies würde den Einsatz von CrtO zur Herstellung von Canthaxanthin ermöglichen, da die Ketolasen CrtW bereits beschrieben sind und so patentrechtlich nicht mehr genutzt werden können.



## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME

Applied Biosystems, Weiterstadt:	Sequencing Kit Big Dye™ Terminator RR Mix
ARK Scientific Biosystems, Düsseldorf:	Primer für PCR
BASF AG, Ludwigshafen:	Canthaxanthin Echinenon
Bio Rad Laboratories, Richmond, USA:	SDS-PAGE-Standard
DIFCO-Laboratories, Detroit, USA:	Trypton Hefe-Extrakt Nutrient broth Casein Pepton
Eppendorf, Hamburg:	Taq-Polymerase-Kit
Fluka Chemie, Buchs, Schweiz:	Agar Ampicillin (Na-Salz) Bromphenolblau Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> ) β,β-Carotin Coomassie Brilliant Blue R-250 Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) Ethidiumbromid Guanidinthiocyanat Hefe-Extrakt Hexadecylmethylammonium bromid (CTAB) Lysozym Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> ) Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> ) N-Methyl-N-Trimethyl-heptafluorbutyramid Natriumacetat Natriumcitrat Natriumchlorid (NaCl) Polyethylenglycol (PEG) 6000

	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)
	Silicagel 60
	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Gibco BRL GmbH, Eggenstein:	Agarose
	1 kb-ladder (Standard für Agarosegele)
	100 bp-ladder
	Desoxynucleosid-triphosphate (dNTPs)
INTERACTIVA Biotechnologie, Ulm:	Primer für ortsgerichtete Mutagenese
MBI Fermentas, St. Leon-Rot:	Alkalische Phosphatase (CIAP)
	Restriktionsendonukleasen
	T4-DNA Ligase
	Taq-Polymerase
Promega, Madison, Wisconsin, USA:	Wizard DNA Clean-up System
	Wizard PCR Preps DNA-Purification System
Qiagen GmbH, Hilden:	QIAprep-spin Miniprep-Kit
	QIAGEN Plasmid Midi Kit
	QIAquick Gel Extraction Kit
	QiaExII-Gelextaktions Kit
Riedel-de Haen, Seelze :	Aceton
	Butanol
	n-Hexan
	Essigsäure
	Ethanol
	Isopropanol
	Methanol
Roche, Mannheim:	DNaseI
Roth GmbH, Karlsruhe :	Rotiphorese ® NF-10x TBE-Puffer
	Rotiphorese ® NF-Harnstoff
	Rotiphorese ® NF-Acrylamid/Bisacrylamid- Lösung 40% (19:1)
	Rotiphorese® Acrylamid-Lösung 30%
	Phenol, TE-gesättigt
	Phenol/Chloroform, TE-gesättigt

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen:	Aminosalicylat
	Guanidinhydrochlorid
	Nalidixinsäure
	Silica
Stratogene, Heidelberg:	Pfu-Polymerase
	Pfu-Polymerase Puffer

## 4.2 GERÄTE

Agarose-Gelelektrophorese	DNA Sub Cell™, Mini Sub™ DNA Cell, BioRad	
	Mini Sub™ Cell GT	
	Video Copy Processor P66E	Mitsubishi
	BWM 9X Monitor	Javelin Electronics
	UV-Leuchttisch	MWG-Biotech
Brutschränke	WTE	Binder
	UM 500	Memmert
Dialyse	Millipore Filter, 0,025 µm	Millipore
DNA-Sequenzierer	377 DNA Sequencer	Applied Biosystems
	Macintosh Quadra 650	Apple Macintosh
Inkubatoren	HT - Schüttelinkubator (30°C, 37°C)	Infors AG
	Certomat R Schüttelinkubator	Braun
Mikroskop	Axiolab E	Zeiss
Mikrowellengerät	Micro-Chef FM A935	Moulinex
Netzgeräte	Power Pac 3000, Power Pac 300, Model	BioRad
	200/2.0 Power Supply	
Objektive	Achroplan 10x/0,25, 40x/0,65, 100x/1,0	Zeiss
PAGE	Minigel-Twin G42	Biometra®
	Model 583 Gel Dryer	BioRad
PCR-Geräte	DNA Mastercycler	Eppendorf
pH-Meter	Digital pH Meter pH525	WTW
Photometer	UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec	Pharmacia Biotech
	3000)	
	BioPhotometer	Eppendorf

Retsch Mühle	MM 2000	Retsch
Speed Vac	Concentrator 5301	Eppendorf
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultraschallgeräte	Sonifier 250	Branson
	Sonorex Super RK 514 H	Bandelin
”Vortexer”	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen	Basic, MC1 Research RC 210 D	Sartorius
	Precision Advanced	OHAUS®
Wasserbad	HAAKE DC 10	Fison
	HAAKE B 3	
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417 C	Eppendorf
	Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf
	Eppendorf Centrifuge	Eppendorf
	Universal 30 F	Hettich
	Sorvall RC - 5B (Rotor: SA 600)	Du Pont Instruments

### 4.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

DC-Platten, Kieselgel 60 F <sub>254</sub>	Merck KGaA
Eppendorf-Reaktions-Gefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Filterpapier	BioRad
½ Mikro-Einmalplastikküvetten (10 x 4 x 45 mm)	Ratiolab
PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Labortechnik
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl	Eppendorf

## 4.4 NÄHRMEDIEN, PUFFER, LÖSUNGEN

### 4.4.1 MEDIEN

#### LB<sub>0</sub> (Luria-Bertani) Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1l

auf pH 7,5 einstellen

für Platten wird 15 g/l Agar zugesetzt.

#### LB-Cas

Casein	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1l

auf pH 7,5 einstellen

#### M9-Minimal-Medium

5 x M9-Salzlösung

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	64 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
NaCl	2,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	5,0 g
H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	

## MATERIAL UND METHODEN

---

5 x M9-Salze	200 ml
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	2 ml
20 % Glucose	20 ml
CaCl <sub>2</sub> (1 M)	0,1 ml
Thiamin-HCl (1 M)	1 ml
Prolin	20,0 mg
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
auf pH = 7.4 einstellen	

### TY/Glycerin-Medium

Trypton	1%
Hefeextrakt	0,5%
auf pH 7,2 einstellen	

TY-Medium und Glycerin getrennt autoklavieren und noch heiß im Verhältnis 1:1 mischen.

### Antibiotika für Medien

<i>Antibiotikum</i>	<i>Stammlösung</i>	<i>Arbeitskonzentration</i>
Nalidixinsäure	20 mg/ml in 0,1 N NaOH	50 µg/ml
Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Chloramphenicol	50 mg/ml in Ethanol	50 µg/ml

## **4.4.2 ALLGEMEIN VERWENDETE PUFFER**

### TE 10.1

Tris/HCl, pH 8	10mM
EDTA, pH 8	1mM

### Natruimphosphat Puffer

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 M

Beide Lösungen mischen bis pH = 7,5 erreicht ist

## 4.5 BAKTERIENSTÄMME, PLASMIDE

### 4.5.1 BAKTERIENSTÄMME:

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Resistenz</i>	<i>Referenz</i>
<i>E.coli</i> JM109	<i>endA1, gyrA96, hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>), mcrB<sup>+</sup>, recA1, relA1, supE44, thi-1, Δ(lac-proAB), F(trad36, proAB, lacI<sup>q</sup>ΔM15)</i>	Nal <sup>R</sup>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>Rhodococcus</i> LU9002			BASF AG
<i>Pseudomonas</i> LU2023			BASF AG
<i>Arthrobacter</i> LU9144			BASF AG

### 4.5.2 PLASMIDE

<i>Plasmid</i>	<i>relevanter Genotyp</i>	<i>Resistenz</i>	<i>Referenz</i>
pACYC184	p15A	Cm	(Chang und Cohen, 1978)
pACYCmod	p15A, Δ <i>Xba</i> I	Cm	Schmidt-Dannert, unveröffentlicht
pAC-crtE <sub>EU</sub> -crtB <sub>EU</sub>	pACYCmod, <i>lac-crtB, lac-crtE</i>	Cm	(Schmidt-Dannert <i>et al.</i> , 2000)
pA3.10.10A	pACYCmod <i>lac-crtB, lac-crtE, lac-crtI</i>	Cm	(Schmidt-Dannert <i>et al.</i> , 2000)
pAC-crtE <sub>EU</sub> -crtB <sub>EU</sub> -I14	pACYCmod <i>lac-crtB, lac-crtE, lac-crtI14</i>	Cm	(Schmidt-Dannert <i>et al.</i> , 2000)
pAC-crtE <sub>EU</sub> -crtB <sub>EU</sub> -I14-crtY <sub>EU</sub>	pACYCmod <i>lac-crtB, lac-crtE, lac-crtI14, lac-crtY</i>	Cm	diese Arbeit
pAC-crtE <sub>EU</sub> -crtB <sub>EU</sub> -I14-crtY2	pACYCmod <i>lac-crtB, lac-crtE lac-crtI14, lac-crtY2</i>	Cm	diese Arbeit
pUC19	ColE1	Amp	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pUCmodII	pUC19, Δ <i>lacO</i>	Amp	(Schmidt-Dannert <i>et al.</i> , 2000)
pUC-RSA	pUCmodII, <i>lac-crtA</i>	Amp	Schmidt-Dannert, unveröffentlicht
pUC-RCA	pUCmodII, <i>lac-crtA</i>	Amp	Schmidt-Dannert, unveröffentlicht
pUC-SYO	pUCmodII, <i>lac-crtO</i>	Amp	Schmidt-Dannert, unveröffentlicht

## 4.6 PRIMER

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>
1900V	5'-CCTAAGYYGAGGC-3'
1028R	5'-CCTTCTCCCGAAGTTACGG-3'
pUCout-F	5'-TGAGCGAGGAAGCGG-3'
pUCout-R	5'-GCGTTTCGGTGATGACGG-3'
pUCin-F	5'-CCGACTGGAAAGCGG-3'
pUCin-R	5'-ACAAGCCCGTCAGGG-3'
pUC-Sal-F	5'-GACGCGTCGACCCGACTGGAAAGCGG-3'
pUC-Sal-R	5'-GACGCGTCGACATATGCGGTGTGAAATACCG-3'
pUC-Bgl-F	5'-GAAGATCTCCGACTGGAAAGCGG-3'
pUC-Bgl-R	5'-GAAGATCTATATGCGGTGTGAAATACC-3'
pA3.10.10A -Bgl1	5'-CCCTGTGGAACACCTAGATCTGCATTAACGAAGC-3'
pA3.10.10A-Bgl2	5'-GCTTCGTTAATACAGATCTAGGTGTTCCACAGGG-3'
pUCmod fw	5'-GCGTAAGGAGAAAATACCG-3'
pUCmod rev	5'-CCGGCTCGTATGTTGTGTGG-3'
SYO1	5'-CAATTATTGGACGGATTTGC-3'
SYO2.1	5'-TCAAACGGGTATTGGTGG-3'
SYO3	5'-CCCTGGGCAGCACACC-3'

## 4.7 STAMMERHALTUNG

### 4.7.1 STAMMERHALTUNG AUF FESTEN NÄHRBÖDEN

Die Stämme werden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum nach dem Anwachsen bei 37°C über Nacht mit Parafilm verschlossen und im Kühlraum bei 10°C gelagert. Alle 8 Wochen werden die Zellen auf frische Agarplatten überimpft.

### 4.7.2 ANLEGEN VON GLYCERINKULTUREN

Zur Langzeitlagerung werden Einzelkolonien von der Agar-Platte in 4 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 - 1,0 bei 37°C



inkubiert. Danach werden die Kulturen bei 4500 Upm 5 min abzentrifugiert, das Pellet in 2 x 1 ml TY/Glycerin-Medium resuspendiert und in Reaktionsgefäßen bei -20°C bzw. -70°C gelagert.

## **4.8 ANZUCHT IN FLÜSSIGMEDIEN**

Ausgehend von Einzelkolonien auf Agarplatten werden 4 ml-LB-Vorkulturen mit Selektionsantibiotikum angelegt und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Daraus werden 200 ml- oder 50 ml- LB-Hauptkulturen in 1000 ml- oder 250 ml- Erlenmeyerkolben 1:100 angeimpft und im Schüttler bei 30°C für 48 Std inkubiert.

### **4.8.1 MESSUNG DER ZELLDICHTE**

Das Wachstum von *E.coli* JM109 wird durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 600 nm gegen Medium als Referenz verfolgt.

Für *E.coli* JM109-Kulturen gilt im Bereich  $OD_{600} = 0-0,3$ :  $1 OD_{600} = 5 \times 10^8$  Zellen / ml.

Kulturen, deren  $OD_{600}$  über 0,3 stieg, werden in der Messung mit LB auf  $OD_{600} < 0,3$  verdünnt.

### **4.8.2 HERSTELLUNG VON ROHEXTRAKTEN**

Die Zellen werden wie in 4.8 beschrieben kultiviert. Danach werden 2 ml der Kultur 1 min bei 14 000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µl 50 mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert. Jeweils 50 µl werden abgenommen, der Rest wird im Sonifier 2 min aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 14 000 Upm für 30 min werden Zelltrümmer und unlösliche Proteine entfernt. Der Überstand wird als geklärter Rohextrakt eingesetzt.

## 4.9 BIOCHEMISCHE METHODEN

### 4.9.1 SDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE

#### *Prinzip:*

Mittels PAGE können Proteine in analytischem oder präparativem Maßstab nach ihrer Größe (SDS- PAGE) aufgetrennt werden. Dabei wandern die Proteine unter dem Einfluß des angelegten elektrischen Feldes durch die Poren des Polyacrylamidgels, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe des Proteins, der Porengröße des Gels, der Ladung und der angelegten Spannung abhängen. Die Proteine werden zur Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht durch Bindung des Detergenz SDS proportional zu ihrer Größe negativ geladen (ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste) und denaturiert.

#### *Puffer und Lösungen*

##### **SDS-Probenpuffer (2x)**

Tris	100 mM
DTT	200 mM
SDS	4 %
Bromphenolblau	0,2 %
Glycerin	20 %
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

##### **SDS-Laufpuffer(5x)**

Tris	15 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1l

**4x-Sammelgel-Puffer**

Tris	12,11 g
SDS	0,8 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 200 ml
Mit HCl auf pH 6,8 einstellen	

**4x-Trenngel-Puffer**

Tris	36,46 g
SDS	0,8 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 200 ml
Mit HCl auf pH 8,8 einstellen	

**Sammelgel (4%)**

Acrylamidlösung 30 % (m/v)	0,52 ml
4x-Sammelgel-Puffer	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,47 ml
TEMED	4 µL
APS 10 % (m/v)	40 µl

**Trenngel (12,5 %)**

Acrylamidlösung 30 % (m/v)	3.33 ml
4x-Sammelgel-Puffer	2 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,67 ml
TEMED	4 µL
APS 10 % (m/v)	40 µl

**Coomassie-Färbelösung**

Coomassie-Brilliant Blue R-250	1 g
Methanol	300 ml
Essigsäure	100 ml
dH <sub>2</sub> O	600 ml

**Entfärbelösung**

Methanol	300 ml
Essigsäure	100 ml
dH <sub>2</sub> O	600 ml

*Herstellung des SDS-Gels und Durchführung der Elektrophorese*

Zunächst wird zwischen die beiden gründlich gereinigten, durch Abstandshalter getrennten, zusammengeklammerten Glasplatten luftblasenfrei die Trenngellösung bis ca. 2,5 cm unter den oberen Rand gegossen und mit ca. 200 µl Isobutanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels (20 min bei Raumtemperatur) wird das Isobutanol abgegossen, die Sammelgellösung auf das mit dH<sub>2</sub>O gespülte Trenngel gegossen und der Probenaschenkamm eingesetzt. Nach weiteren 20 min werden die Klammern, der Abstandshalter und der Probenaschenkamm vorsichtig entfernt und die Probenaschen gründlich mit dH<sub>2</sub>O gespült. Das so vorbereitete Gel wird zur Durchführung der Elektrophorese in die bereits mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur eingesetzt, wobei darauf zu achten ist, daß am unteren Gelrand keine Luftblasen zwischen den Glasplatten eingeschlossen werden.

Die Proteinproben werden vor dem Auftragen 1:1 mit 2x-SDS-Probenpuffer verdünnt, 5 min bei 95°C denaturiert und rasch auf Eis abgekühlt. Als Molekulargewichtsstandard werden 10 µl LMW-Standard (siehe Tabelle 5) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgt bei 25 mA pro Gel bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreicht hat bzw. bereits aus dem Gel in den Elektrophoresepuffer gewandert ist. Die Dauer der Elektrophorese kann in Abhängigkeit der zu trennenden Proteine variiert werden. Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine im Gel gefärbt.

*Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen*

Nach beendeter Elektrophorese werden die Glasplatten und der Abstandshalter entfernt, das Gel mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend mindestens so lange in der Entfärbelösung entfärbt, bis deutliche Proteinbanden sichtbar sind bzw. das Gel klar ist. Zur Aufbewahrung wird das Gel luftblasenfrei zwischen ein Filterpapier und Klarsicht-Folie gelegt und 2 h im Geltrockner bei 80°C im Vakuum getrocknet.

**Tabelle 5:** Molekulargewichte des LMW-Standards

<i>Marker</i>	<i>Protein</i>	<i>Molekulargewicht (kDa)</i>
Low	Phosphorylase B	97,4
	BSA	66,3
	Ovalbumin	45,0
	Carboanhydrase	31,0
	Trypsininhibitor	21,5
	Lysozym	14,4

#### **4.9.2 ANFÄRBUNG UND MIKROSKOPIE VON BAKTERIEN-AUSSTRICH-PRÄPARATEN**

Die Anwesenheit von Inclusion Bodies kann durch Coomassie Brilliant Blue angefärbte Ausstrichpräparate mikroskopisch nachgewiesen werden.

Zunächst werden wenige µl der jeweiligen Bakterienkultur auf Objektträgern hitzefixiert. Zur Anfärbung werden die Objektträger 10 min in Coomassie Färbelösung (s. 4.9.1) und dann 5 min in H<sub>2</sub>O geschwenkt. Dann werden zur Entfärbung die Objektträger mit den Präparaten 3 min in 50% Ethanol geschwenkt und anschließend kurz mit H<sub>2</sub>O abgespült. Danach wird ein Deckglas aufgelegt und die Präparate bei einer 1000-fachen Vergrößerung mikroskopiert.

## 4.10 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN

### 4.10.1 SPEZIFISCHE AMPLIFIKATION VON DNA-FRAGMENTEN MITTELS DER POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)

#### *Prinzip:*

Die PCR, entwickelt 1985 von K. Mullis, dient zur spezifischen Amplifikation einer Ausgangs-DNA (*Template*). Dabei wird ein Zyklus von 3 Reaktionsschritten bis zu 40 mal wiederholt. Der erste Reaktionsschritt eines jeden Zyklus ist die *Denaturierung* des Template-DNA-Doppelstranges bei ca. 95°C. Dabei entstehen DNA-Einzelstränge, an die sich im 2. Reaktionsschritt, dem *Annealing*, bei 45°C - 65°C (abhängig von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer/Template-Kombination) jeweils ein Primer anlagert. Im 3. Schritt- der *Extension*- werden durch Verlängerung der Primer am 3'-Ende mittels thermostabiler Polymerasen bei 72°C zwei neue Stränge synthetisiert, die bei den folgenden Zyklen wieder als Template zur Verfügung stehen. Das gewünschte DNA-Fragment wird letztendlich fast exponentiell vermehrt, weshalb eine sehr geringe Template-Menge ausreichend ist.

#### *Lösungen:*

##### dNTP-Mix

dATP (100 mM)	2,5 µl
dCTP (100 mM)	2,5 µl
dGTP (100 mM)	2,5 µl
dTTP (100 mM)	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	90 µl

#### 4.10.1.1 POSITIONSSPEZIFISCHE MUTAGENESE

##### *Prinzip:*

Um spezifisch Aminosäuren auszutauschen, werden Punktmutationen in das entsprechende Gen eingeführt. Dazu wird eine PCR durchgeführt, wobei Primer verwendet werden, die in ihrer Mitte den gewünschten Basenaustausch tragen. Damit besitzen am Ende der Reaktion alle DNA Stränge die entsprechende Mutation mit Ausnahme der Template DNA. Diese ist - da sie durch Plasmidisolierung aus Zellen gewonnen wird - ( keine Plasmide aus *dam* / *dcm* –

Stämmen verwenden) im Gegensatz zu den *in vitro* gebildeten Tochtersträngen methyliert. Dies macht man sich zunutze, indem man den PCR-Ansatz anschließend mit *DpnI* behandelt, das spezifisch nur methylierte DNA angreift, dadurch bleiben nur Stränge intakt, die *in vitro* entstanden– und somit nicht methyliert sind.

*Durchführung:*

Für die positionsspezifische Mutagenese wird der “Quik-change –Kit” der Fa. Stratagene verwendet. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wird folgendermaßen abgewandelt:

*Pipettierschema:*

10 x Pfu Puffer	10 µl
Primer forward (5 µmol/µl)	2,5 µl
Primer reverse (5 µmol/µl)	2,5 µl
dNTP-Mix (jedes 2,5 mM)	2 µl
Plasmid (1 ng)	8 µl 1:10 verdünnt
DMSO	10 µl
Pfu-Polymerase (5U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Anschließend wird der Reaktionsansatz mit 2 µl *DpnI* (10U/µl) versetzt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach werden zur Entfernung von Salzen, die die Transformation negativ beeinflussen könnten, 15 µl des Ansatzes auf einen Dialyse- Filter aufgetragen und mindestens 1 Stunde gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert. Anschließend wird der dialysierte Ansatz vollständig in *E.coli* JM109 transformiert.

#### **4.10.1.2 ERROR-PRONE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**

*Prinzip:*

Zur Herstellung von Mutanten soll die Mutationsrate unter Verwendung der Taq-Polymerase mit Hilfe der error-prone PCR erhöht werden. Die dabei verwendeten Primer binden etwa 200 bp außerhalb des zu mutierenden Gens im Vektor, so daß eine statistische Verteilung der Mutationen auf dem gesamten Gen gewährleistet ist.

Für die Amplifikation jedes Templates werden vier Ansätze pipettiert, wovon sich in jedem eines der vier Nukleotide im zehnfachen Unterschluß befindet.

Nach der PCR-Reaktion werden die Reaktionsansätze vereinigt.

*Durchführung:*

Pipettierschema:

10 x Polymerase-Puffer mit 10 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
MnCl <sub>2</sub> (1 mM)	10 µl
Primer pUCoutF (100µmol/µl)	1 µl
Primer pUCoutR (100µmol/µl)	1 µl
dNTP-Mix (drei Nukleotide 2,5 mM, ein Nukleotid 0,25 mM)	8 µl
Template Plasmid (5 – 15 ng)	1 µl
Taq-Polymerase (5U/ µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Temperaturprogramm:

<i>Programmschritt</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Extension</i>	<i>Zyklenzahl</i>
1	95°C, 5 min			1
2	95°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 2 min	25
3	95°C, 1 min	52°C, 2 min	72°C, 10 min	1

#### 4.10.1.3 DNA SHUFFLING

Das DNA shuffling ist eine Methode um *in vitro* DNA zu rekombinieren. Dazu werden die entsprechenden Parental-Gene mittels PCR mit ca 300 bp oberhalb und unterhalb liegenden Primern amplifiziert und anschließend mit *DNaseI* unspezifisch verdaut. Mit diesen ca. 50 – 100 bp großen Fragmenten wird eine Assembly-PCR ohne Primer durchgeführt. Dabei kommt es zu Strang-Austauschen. Im letzten Schritt wird die neu rekombinierte DNA mittels PCR mit „nested primers“ amplifiziert.



*Durchführung:*

PCR-Amplifikation der verschiedenen Templates:

10 x Polymerase-Puffer mit 10 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
Primer pUCoutF (100 µmol/µl)	1 µl
Primer pUCoutR (100 µmol/µl)	1 µl
dNTP-Mix (jedes Nukleotid 2,5 mM)	8 µl
Template Plasmid (5-15 ng)	1 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Für jedes Template werden 2 Reaktionen durchgeführt.

Temperaturprogramm:

<i>Programmschritt</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Extension</i>	<i>Zyklenzahl</i>
1	95°C, 5 min			1
2	95°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 2 min	25
3	95°C, 1 min	52°C, 2 min	72°C, 10 min	1

Die entstandenen PCR-Produkte werden jeweils vereinigt und mit dem Wizard PCR-Purification Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Anschließend wird der DNaseI-Verdau folgendermaßen durchgeführt:

DNaseI wird in 10 mM Tris HCl pH 7,5 1:200 verdünnt und 10 min im Thermocycler bei 15°C inkubiert.

Der Reaktionsansatz wird wie folgt pipettiert:

PCR-Produkt 1	20 µl
PCR-Produkt 2	20 µl
MnCl <sub>2</sub> (1 mM)	2,5 µl
100 mM Tris-HCl, pH 7,5	2,5 µl

und im Thermocycler bei 15°C 10 min inkubiert.

Durch Zugabe von 2 µl der verdünnten DNaseI und kurzes Vortexen wird die Reaktion

gestartet. Nach Inkubation für 2 min 45 sec bei 15°C wird die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA und 20 µl DNA-Auftragspuffer (ohne Bromphenolblau) und sofortiges Abkühlen auf Eis gestoppt.

Der Reaktionsansatz wird sofort auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die Elektrophorese wie in 4. 10.3 beschrieben durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wird der Bereich zwischen 50 und 100 bp aus dem Gel geschnitten und mit dem QiaExII-Kit eluiert. Die eluierte DNA wird dann in die Assembly-PCR eingesetzt.

Master-Mix:

10 x PCR-Puffer mit 10 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
dNTP-Mix	10 µl
Taq-Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 60 µl

Je 12 µl Master-Mix werden mit 4, 6 oder 8 µl DNaseI-verdauter DNA versetzt und mit sterilem H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von je 20 µl gebracht.

Temperaturprogramm:

<i>Programmschritt</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Extension</i>	<i>Zyklenzahl</i>
1	96°C, 5 min			1
2	94°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 1 min + 5 sec/Zyklus	40
3	94°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 10 min	1

Anschließend werden die PCR-Produkte in eine PCR mit weiter innen liegenden Primern als zu Beginn eingesetzt:

Pipettierschema:

10 x Polymerase-Puffer mit 10 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
Primer pUCinF (100 µmol/µl)	1 µl
Primer pUCinR (100 µmol/µl)	1 µl
dNTP-Mix (jedes Nukleotid 2,5 mM)	8 µl
Template (2 µl der Assembly Produkte)	2 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Temperaturprogramm:

<i>Programmschritt</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Extension</i>	<i>Zyklenzahl</i>
1	95°C, 4 min			1
2	95°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 1.45 min	25
3	95°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 5 min	1

#### **4.10.2 SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN**

Restriktionsendonukleasen ermöglichen es, DNA an bestimmten Erkennungssequenzen zu schneiden. Für analytische Kontrollen erfolgt dies in einem Reaktionsvolumen von 10 µl gemäß dem folgenden Pipettierschema:

Mini- oder Midi-Präp-DNA	3 µl
Restriktionsenzym	1 - 2 U
10x-Restriktionspuffer	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Dabei ist darauf zu achten, daß der für das jeweilige Restriktionsenzym optimale Restriktionspuffer verwendet wird (Herstellerangaben). Der Reaktionsansatz wird 1 – 3 Std bei 37°C bzw. der für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Temperatur inkubiert.

Um größere Mengen bestimmter DNA-Fragmente zur späteren Verwendung zu erhalten, wird der Restriktionsverdau mit 30 µl DNA aus Mini- oder Midi-Präparationen in 100 µl Reaktionsvolumen durchgeführt.

### **4.10.3 AUFTRENNUNG IM AGAROSEGEL**

*Prinzip:*

Die analytische oder präparative Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe (Molekulargewicht) erfolgt durch Elektrophorese in einem Agarosegel. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle im angelegten elektrischen Feld zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Porengröße der Matrix (Agarose), der angelegten Spannung und dem Molekulargewicht der DNA-Moleküle abhängt.

Um die aufgetrennten DNA-Moleküle sichtbar zu machen, wird den Agarosegelen Ethidiumbromid zugegeben, welches in die DNA interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert.

*Lösungen:*

DNA-Auftragspuffer (10x)

Harnstoff	4 M
EDTA	10 mM
Glycerin	50%
Bromphenolblau	0.1%
ddH <sub>2</sub> O ad 100 ml	

Gelelektrophoresepuffer (TAE(50x), pH 8)

Tris	15 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA	18,6 g
H <sub>2</sub> O	ad 1l

Agarose-Gellösung:

Agarose	1% (m/v)
1x-TAE-Puffer	ad 1 l

*Herstellung des Gels und Durchführung der Elektrophorese:*

Die Agarose wird durch Aufkochen im Mikrowellengerät in 1x TAE-Puffer gelöst und bei 80°C aufbewahrt.

Die auf ca. 60°C abgekühlte Gellösung wird 1:10 000 mit (v/v) Ethidiumbromidlösung (1% (v/v)) versetzt und in die Gelkammer mit eingesetztem Probenaschenkamm gegossen. Das polymerisierte Gel wird mit der Gelkammer in die Elektrophoresekammer gesetzt, mit 1x-TAE-Puffer überschichtet und mit den DNA-Proben (5 Vol DNA + 1 Vol Auftragspuffer) beladen. Als Längenstandard wird 1kb-Ladder verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei max. 120 V für 30 min.

Zur Detektion werden die DNA-Banden im Gel auf dem UV-Leuchttisch zur Fluoreszenz angeregt und das Bandenmuster photographiert. Dabei ist zu beachten, daß das positiv geladene Ethidiumbromid entgegengesetzt zur DNA in Richtung der Kathode wandert, und dadurch kleinere DNA-Moleküle bei gleicher Konzentration ein schwächeres Signal geben.

#### ***4.10.4 FRAGMENTISOLIERUNG AUS AGAROSEGELEN***

Um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe zu isolieren, wird nach der PCR oder dem Restriktionsverdau eine Gelelektrophorese durchgeführt. Nach dem Elektrophoreselauf wird auf dem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell das Agarosestück aus dem Gel geschnitten, welches das gewünschte DNA-Fragment enthält. Das ausgeschnittene Gelstück kann nun bei -20°C eingefroren oder die DNA daraus sofort mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit isoliert werden.

#### **4.10.5 LIGATION VON DNA MIT DER T4-DNA-LIGASE**

*Prinzip:*

T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5`-Phosphat- und 3`-Hydroxy-Enden der DNA. Dies ermöglicht das Verbinden zweier linearer DNA-Moleküle oder die Zyklisierung eines linearen Moleküls.

*Durchführung:*

Zur Ligation werden in einem Eppendorfgefäß Vektor und Insert -Fragmente, die zuvor aus einem Agarosegel eluiert wurden und deren Konzentration durch Vergleich mit dem Standard abgeschätzt worden war, so gemischt, daß die zu ligierenden Fragmente in äquimolarer Konzentration vorliegen. Es werden 2 µl Ligase-Puffer (10x) und 1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben und auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wird 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **4.10.6 TRANSFORMATION IN *E.COLI* (PEG/DMSO-METHODE,(Chung et al., 1989))**

##### **4.10.6.1 HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN**

*Puffer und Lösungen:*

**TSS-Medium (Transformation-Storage Solution)**

LB <sub>0</sub>	89 ml
PEG 6000	10 g
DMSO	5 ml
MgCl <sub>2</sub> (1M)	10 ml

Aus einer LB-Übernachtskultur von *E.coli* JM109 mit Selektionsantibiotikum werden 50 ml LB 1:100 angeimpft und bei 37°C bis OD<sub>600</sub> = 0,4 - 0,6 inkubiert. Die Kultur wird bei 3500 Upm 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Sediment in 2 ml eiskaltem TSS resuspendiert. Die Zellen werden in 200 µl-Aliquots aufgeteilt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei - 80°C gelagert.

#### **4.10.6.2 TRANSFORMATION**

Zur Transformation werden zu je 200 µl der kompetenten Zellen 20 µl des jeweiligen Ligationsansatzes gegeben, kurz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Transformationsansatz 45 sec bei 42°C inkubiert und 800 µl LB zugegeben. Die Ansätze werden dann bei 37°C 50 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend zentrifugiert man die Zellen bei 9000 Upm für 2 min ab (Eppendorffzentrifuge) und resuspendiert sie im rücklaufenden Tropfen Medium. Danach wird auf Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C.

#### **4.10.7 KOMPLEMENTATIONSSCREENING**

*E.coli* JM109 mit pAC-crt<sub>EU</sub>-crt<sub>BEU</sub> oder pAC-crt<sub>EU</sub>-crt<sub>BEU</sub>-I14 oder pAC-crt<sub>EU</sub>-crt<sub>BEU</sub>-I14-crt<sub>Y<sub>EU</sub></sub> werden wie in 4.10.6.1 beschrieben unter Zusatz von 50 µg/ml Chloramphenicol im Kulturmedium kompetent gemacht und die Transformation wie in 4.10.6.2 beschrieben durchgeführt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden die Kolonien auf Nitrocellulose-Filter überführt und diese mit den Kolonien nach oben auf frische Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsantibiotika gebracht. Nach Inkubation bei 25 - 30°C im Dunkeln für 24 – 48 Std wird visuell auf Farbunterschiede gescreent.

#### **4.10.8 ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN**

##### **4.10.8.1 MINI-PLASMID-DNA-ISOLATION MIT DEM QIAPREP SPIN MINIPREP KIT (QIAGEN)**

Für Anwendungen, die besonders reine Plasmid-DNA erfordern (PCR-Reaktionen, Sequenz-Reaktionen, präparative Restriktionsverdau, etc.) wird diese Plasmid-Präparationsmethode verwendet, die auf der alkalischen Lyse von Zellen (Birnboim und Doly, 1979) und der spezifischen Bindung von DNA an Ionenaustauschersäulen beruht.

Nach Abtrennung der Zellen einer ÜN-Kultur durch Zentrifugation (14000 Upm, 1 min) und Verwerfen des Kulturüberstandes erfolgt die weitere Durchführung der Plasmidisolierung exakt nach Angaben des Herstellers.

#### 4.10.8.2 MIDI-PLASMID-DNA-ISOLATION MIT DEM PLASMID MIDI KIT (QIAGEN)

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wird diese Methode verwendet, die auf denselben Prinzipien beruht, wie die unter 4.10.8.1 beschriebene Mini-Präparation. Eine 50 ml ÜN-Kultur dient als Ausgangsmaterial und wird 10 min bei 5000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Plasmid-Isolation aus dem Zellpellet wird gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

#### 4.10.8.3 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA

##### *Lösungen*

##### **Lysepuffer**

Tris	30 mM
EDTA	50 mM
NaCl	50 mM

Auf pH = 8 einstellen

##### *Durchführung*

Zur Isolierung genomischer DNA werden 2 – 10 ml Zellen in einem Falcon-Tube abzentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 1 ml Lysepuffer und 10 µl Lysozym (100 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Dann werden 200 µl 10% (w/v) SDS zugegeben, gevortext und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Lysat 2 mal mit je 1 Vol Phenol/Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,6 Vol Isopropanol und 1/10 Vol 3 M Na-Acetat, pH 5 und anschließende Inkubation bei 4°C ÜN wird die DNA ausgefällt. Dann wird 20 min bei 14 000 Upm bei 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wird dieses in 100 µl TE resuspendiert.



#### 4.10.8.4 ISOLIERUNG VON DNA AUS BODENPROBEN

##### 4.10.8.4.1 METHODE MODIFIZIERT NACH ZHOU (Zhou *et al.*, 1996)

*Puffer und Lösungen:*

##### **Extraktionspuffer**

Tris	100 mM
EDTA	100 mM
Na-Phosphat, pH 8	100 mM
NaCl	1,5 mM
CTAB	1 %

Auf pH = 8 einstellen

##### *Durchführung*

0,5 g Bodenprobe wird mit 1,3 ml Extraktionspuffer versetzt, durch Vortexen gut gemischt und 3 „Frier-Tau“-Zyklen durch abwechselnde Inkubation in flüssigem Stickstoff und im 65°C-Wasserbad unterworfen. Nachdem die Probe wieder auf max. 37°C abgekühlt ist, werden 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben, gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 150 µl 20% (w/v) SDS zugegeben, gemischt und der Ansatz 30 min – 1 Std bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14 000 Upm für 10 min wird der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das Pellet durch Resuspendieren in 1,25 ml Extraktions-Puffer und 125 µl 20% (w/v) SDS, Inkubation bei 65°C für 10 min und anschließende Zentrifugation bei 14 000 Upm für 10 min bei 4°C gewaschen. Die Überstände werden vereinigt und 2 mal mit je 1 Vol Chloroform extrahiert.

Die wässrige Phase wird mit 0,7 Vol Isopropanol 1 Std bei –20°C gefällt und 20 min bei 14 000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, in der Speed Vac getrocknet und in 50 µl TE aufgenommen.

#### 4.10.8.4.2 DNA ISOLIERUNG NACH MORÉ (More *et al.*, 1994)

*Puffer und Lösungen:*

**SDS-Puffer**

Tris-HCl, pH 8	500 mM
NaCl	100 mM
SDS	10%

*Durchführung*

0,5 g Bodenprobe wird mit 500 µl 100 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8 gemischt. Dann werden 2 g Glasperlen (Ø 0,1 mm – 0,3 mm) und 250 µl SDS-Puffer zugegeben und gemischt. Der Ansatz wird 10 min in der Retsch-Mühle (Amp. 80) behandelt und anschließend 3 min bei 14 000 Upm abzentrifugiert.

Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 2/5 Vol 7,5 M Na-Acetat und anschließende Inkubation für 5 min auf Eis werden Proteine ausgefällt. Nach Zentrifugation für 3 min bei 14 000 Upm wird die DNA aus dem Überstand mit 2,5 Vol Ethanol 1 Std bei –20°C ausgefällt. Anschließend wird 25 min bei 14 000 Upm bei 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets in der SpeedVac wird dieses in 50 µl TE aufgenommen.

#### 4.10.8.4.3 DNA ISOLIERUNG NACH TSAI (Tsai und Olson, 1992b)

*Puffer:*

**Lysepuffer:**

NaCl	150 mM
EDTA	10 mM

Auf pH 8 einstellen.

**10% SDS-Puffer:**

NaCl	100 mM
Tris-HCl, pH 8	500 mM
SDS	10%

*Durchführung :*

0,5 g Bodenprobe werden 2 mal mit je 2 ml 120 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8, durch 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln und anschließende Zentrifugation für 10 min bei 14 000 Upm gewaschen. Das Pellet wird in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Lysozym (100 mg/ml) wird der Ansatz bei 37°C im Schüttler für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wird 1 ml 10% SDS-Puffer zugegeben und der Ansatz 3 Frier-Tau-Zyklen durch abwechselnde Inkubation in flüssigem Stickstoff und 65°C im Wasserbad unterworfen.

Dann wird mit 1 Vol Phenol/Chloroform extrahiert und die wässrige Phase nochmals mit 1 Vol Chloroform extrahiert.

Die DNA wird dann aus der wässrigen Phase mit 0,7 Vol Isopropanol für 1 Std bei –20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 14 000 Upm, waschen des Pellets mit 70% Ethanol und anschließendem Trocknen wird das Pellet in 100 µl TE aufgenommen.

4.10.8.4.4 DNA ISOLIERUNG NACH DIVERSA (Short und Mathur, 1998)

*Puffer:*

**Puffer 1**

Tris-HCl, pH 8	500 mM
NaCl	100 mM
Na- Citrat	1 mM

**Lysepuffer :**

Tris-HCl, pH 8	200 mM
NaCl	100 mM
SDS	4 %
Aminosalicylat	10 %

*Durchführung:*

1 g Bodenprobe wird mit 1 ml Puffer 1 und 50 µl Lysozym (100 mg/ml) versetzt, durch vortexen gut gemischt und 1 Std bei 37°C im Schüttler inkubiert. Dann werden 100 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und weitere 30 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Lysepuffer werden 3 Frier-Tau Zyklen durch abwechselnde Inkubation in flüssigem Stickstoff und 65°C im Wasserbad durchgeführt.

Dem Ansatz wird 1 Vol TE-gesättigtes Phenol/Chloroform zugegeben, gemischt und bei 4000 Upm für 10 min abzentrifugiert. Die wässrige Phase wird weiter mit Chloroform extrahiert und dann einer Fällung mit 0,7 Vol Isopropanol für 1 Std bei –20°C unterworfen. Nach waschen des Pellets wird dieses in der Speedvac getrocknet und in 100 µl TE aufgenommen.

4.10.8.4.5 DNA-ISOLIERUNG NACH PORTEOUS (Porteous *et al.*, 1994)

*Puffer:*

**Puffer A**

EDTA, pH 8	100 mM
NaCl	250 mM

**Puffer B**

EDTA, pH 8	250 mM
NaCl	100 mM
SDS	4 % (w/v)

*Durchführung:*

0,5 g Bodenprobe werden mit 1,75 ml Puffer A durch vortexen gemischt und 3 min im Ultraschallbad behandelt. Dann werden 20 µl Lysozym (100 mg/ml) zugegeben und 1,5 Std bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend werden 1,75 ml Puffer B und 250 µl 5 M Guanidin-HCl zugegeben und der Ansatz im Wasserbad unter gelegentlichem Schütteln für 1,5 Std bei 68°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4000 Upm für 10 min bei 4°C wird aus dem Überstand die DNA mit 0,7 Vol Isopropanol für 1 Std bei –20°C gefällt.

Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, in der Speedvac getrocknet und anschließend in 50 µl TE aufgenommen.

#### 4.10.8.4.6 DNA-ISOLIERUNG NACH VOLOSSIOUK (Volossiuk *et al.*, 1995)

##### *Puffer*

##### **MMP-Lösung**

0,1 g Magermilchpulver werden in 25 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen

##### **SDS-Extraktionspuffer**

NaCl	140 mM
Na-Acetat, pH 5,1	50 mM
SDS	0,3 %

##### *Durchführung:*

0,5 g Bodenprobe werden mit flüssigem Stickstoff mehrere Minuten gemörsert, bis sie pulverisiert ist. Das Pulver wird in ein Reaktionsgefäß gegeben und in 500 µl MMP-Lösung durch vortexen resuspendiert. Anschließend wird die Probe 10 min bei 14 000 Upm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein Falcon-Tube überführt und mit 4 ml SDS-Extraktionspuffer versetzt und durch vortexen gemischt. Der Ansatz wird mit 1 Vol TE-gesättigtem Phenol extrahiert. Die wässrige Phase wird abgenommen und die DNA daraus mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt. Nach waschen des Pellets mit 70% Ethanol und Trocknen in der Speedvac wird es in 50 ml TE aufgenommen.

4.10.8.4.7 DNA-ISOLIERUNG NACH PICARD (Picard *et al.*, 1992)

*Puffer:*

**TENP-Puffer:**

Tris-HCl, pH 8	50 mM
EDTA	20 mM
NaCl	100 mM
PVPP	1% (w/v)

*Durchführung :*

0,5 g Bodenprobe werden mit 2,5 ml TENP-Puffer versetzt, gevortext, und 3 min mit Ultraschall behandelt. Nachdem der Ansatz 10 min bei 14 000 Upm bei 4°C zentrifugiert wurde, wird das Pellet 5 mal in der Mikrowelle für je 1 min aufgekocht und anschließend in 1,5 ml TENP-Puffer resuspendiert. Dann werden 3 Frier Tau Zyklen durch abwechselnde Inkubation in flüssigem Stickstoff und 95°C warmem Wasser durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand in ein frisches Gefäß überführt und das Pellet 4 mal mit je 250 µl TENP-Puffer gewaschen.

Die DNA wird aus den gepoolten Überständen mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, in der Speedvac getrocknet und in 50 µl TE resuspendiert.

**4.10.9 DIREKTE REINIGUNG VON DNA AUS BODENPROBEN MODIFIZIERT NACH (Höss und Pääbo, 1993)**

*Puffer:*

**Puffer1**

Guanidin Thiocyanat	5 M
Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	25 mM
EDTA	20 mM
Triton X-100	1,3%

**Waschpuffer**

Guanidin Thiocyanat	5 M
Tris-HCl, pH 8	100 mM
NaCl	25 mM

**Vorbehandlung von Silica:**

Zunächst werden in einem 50-ml Falconröhrchen 4,8 g Silica in 40 ml ddH<sub>2</sub>O durch vortexen suspendiert. Der Ansatz wird 24 Std bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich das Silica absetzt. Dann werden 35 ml des Überstands abgenommen, mit ddH<sub>2</sub>O wieder auf 40 ml aufgefüllt und 30 min inkubiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und in ein frisches Gefäß überführt. Der Ansatz wird wieder auf 40 ml mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt, gevortext und 6 Std bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden davon 36 ml abgenommen und in ein frisches Gefäß überführt. Dem Sediment werden 48 µl 30% HCl zugegeben, durch vortexen gut gemischt und in 200-µl Aliquots aufgeteilt.

*Durchführung:*

Zur direkten Reinigung von DNA aus Bodenproben wird der bei der Methode nach Moré erhaltene Überstand nach der Acetat-Fällung mit 2 Vol Puffer1 und 1/10 Vol vorbehandeltem Silica versetzt, durch Vortexen gut gemischt und kurz bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 3000 Upm wird der Überstand verworfen, 2 Vol Waschpuffer zugegeben und durch vorsichtiges vortexen gemischt. Dann wird für 3 min bei 3 000 Upm zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. Das Pellet wird durch Zugabe von 70% Ethanol, und Zentrifugation für 3 min bei 3 000 Upm ein weiteres mal gewaschen. Nach Trocknen des Pellets werden zur Elution der DNA 100 µl TE zugegeben, gemischt und 10 min bei 55°C im Thermomixer inkubiert. Der Ansatz wird 1 min bei 14 000 Upm zentrifugiert und der Überstand, in dem die DNA enthalten ist, in ein frisches Gefäß überführt.

#### **4.10.10 FÄLLUNG VON DNA**

Zur Fällung wird die DNA mit 2,5 Vol Ethanol (100%) und 1/10 Vol 3 M Na-Acetat, pH 5,0 versetzt, 20 min bei -20°C inkubiert und 20 min bei 14000 Upm zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge). Nach dem Abziehen des Überstands wird das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in der Speedvac getrocknet. Anschließend wird das Pellet in 15 µl TE-Puffer aufgenommen.

#### **4.11 SEQUENZIERUNG VON DNA**

##### *Prinzip:*

Die Sequenzierung von DNA erfolgt nach der von Fred Sanger 1977 entwickelten enzymatischen Ketten-Abbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Dabei werden unterschiedlich lange DNA-Fragmente durch kontrollierte Unterbrechung der Replikation mittels spezifischer Terminatoren (2', 3'- Didesoxynukleosid - 5'-triphosphate, ddNTPs), die zusätzlich zu den 2'- Desoxynukleotiden zum Reaktionsansatz gegeben werden, erzeugt. Da die ddNTPs an ihrer 3'- Position keine OH-Gruppe besitzen, kann ein entstehendes DNA-Fragment nach dem statistischen Einbau dieses Terminators nicht mehr durch Ausbildung weiterer Phosphodiester-Bindungen zum nächsten anzuhängenden 2'- Desoxynukleotid verlängert werden, und es kommt zum Kettenabbruch. In der Praxis werden 4 separate Reaktionen, jede mit einem anderen ddNTP als Terminator angesetzt und anschließend nebeneinander in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese der im Originalprotokoll durch radioaktiv markierte dNTPs sichtbar gemachten, neu synthetisierten Fragmente, kann von der Sequenzleiter direkt die DNA-Sequenz abgelesen werden. Bei der automatischen DNA-Sequenzierung mit dem *377A-DNA-Sequencer* von Applied Biosystems werden ddNTPs verwendet, die mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Diese Vierfarbentechnik erhöht sowohl den Durchsatz pro Gel als auch die Geschwindigkeit der Datenerfassung, die bereits während des Gellaufs durch einen angeschlossenen Rechner erfolgt.

Die Verwendung thermostabiler Polymerasen erlaubt die zur PCR (Mullis *et al.*, 1986) analoge *zyklische Sequenzierung*, bei der die enzymatischen Sequenzreaktionen mit einem Primer über mehrere Zyklen durchgeführt werden, was geringere Mengen Ausgangs-DNA erfordert, die Automatisierung vereinfacht und die Sequenzierung doppelsträngiger DNA



ermöglicht.

*Durchführung:*

Der Cycle-Sequencing-Reaktionsansatz wird mit dem Sequencing Kit Big Dye™ Terminator RR Mix angesetzt. Da im Terminator Ready Reaction Kit bereits die benötigten Mengen dNTPs, Terminatoren, Salze, Puffer und Polymerase zusammen vorliegen, muß lediglich die zu sequenzierende DNA, der entsprechende Sequenzier-Primer und Wasser zugegeben werden.

Damit wird der endgültige Reaktionsansatz wie folgt auf Eis pipettiert:

Kit Big Dye™ Terminator RR Mix	4 µl
Sequenzier-Primer (5 pmol/µl)	2 µl
DNA	200 -500 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Sequenzierreaktion erfolgt im Thermocycler unter den folgenden Bedingungen:

<i>Programmschritt</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Extension</i>	<i>Zykluszahl</i>
1	95°C, 4 min	-	-	1
2	95°C, 40 sec	55°C, 40 sec	60°C, 4 min	25
3	-	-	60°C, 4 min	1

Die Aufarbeitung der PCR-Produkte, die Herstellung des Polyacrylamid-Gels und die Beladung des Gels erfolgte durch den technischen Assistenten nach Angaben des Herstellers (ABI)

Die Elektrophorese erfolgt nach den vom Hersteller empfohlenen Programmparametern (2500 V, 40 mA, 30 W) und wird aufgrund der Dauer von 14 h über Nacht durchgeführt. Die bereits vom Rechner erfassten und prozessierten Sequenzdaten können anschließend mittels geeigneter Software ausgewertet werden.

## **4.12 ANALYTIK VON CAROTINOIDEN**

### ***4.12.1 EXTRAKTION VON CAROTINOIDEN AUS E. COLI FLÜSSIGKULTUREN***

Flüssigkulturen von Carotinoid-produzierenden *E. coli* werden bei 14 000 Upm für 1 min bzw. 4 000 Upm für 10 min für größere Ansätze abzentrifugiert. Die Zellpellets werden in 100 - 200 µl Aceton je 1 ml Flüssigkultur resuspendiert. Dann wird 1 Vol n-Hexan zugegeben und gründlich durch vortexen gemischt. Nach Zugabe von 100 µl – 500 µl H<sub>2</sub>O wird erneut für 1 min bei 14 000 Upm bzw. 5 min bei 4 000 Upm zentrifugiert und die obere Hexanphase, die die Carotinoide enthält, abgenommen und in ein frisches Gefäß überführt. Dieser Extrakt wird entweder direkt für die Aufnahme von UV/VIS-Spektren eingesetzt oder für weitere analytische oder präparative Zwecke unter Stickstoff eingeengt.

### ***4.12.2 ANALYTIK VON CAROTINOIDEN MITTELS DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE***

Um Carotinoid-Gemische zu untersuchen werden diese mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Dazu wird die jeweilige Referenzsubstanz (β-Carotin, Canthaxanthin oder Echinenon) auf eine DC-Platte aufgetragen. Die DC-Platte wird zuerst in einer Lösung aus n-Hexan:Aceton (25:1) bis zu 2/3 der Gesamtlaufstrecke entwickelt. Nach dem Trocknen der Platte wird eine zweite Entwicklung in n-Hexan:Aceton (5:1) durchgeführt.

### ***4.12.3 REINIGUNG VON CAROTINOIDEN MIT SILICAGEL-SÄULEN***

Um Carotinoid-Gemische aufgrund ihrer Polarität zu trennen, wird eine Reinigung mit Silicagel-Säulen durchgeführt. Dazu werden wenige Gramm Silicagel 60 in einigen ml n-Hexan suspendiert und in eine kleine, unten mit Glaswolle verschlossene Säule luftblasenfrei gegossen. Nachdem das n-Hexan soweit abgetropft ist, dass die Silica-Matrix nur noch mit wenigen mm Hexan überschichtet ist, wird die Säule unten dicht verschlossen.

Das wie in 4.12.1 gewonnene Carotinoid Extrakt wird nun vorsichtig auf die Säule gegeben, die Säule unten wieder geöffnet und zunächst so viel 1<sub>Ac</sub> : 25<sub>Hex</sub> zugegeben, bis der erste Farbstoff so weit nach unten gelaufen ist, dass er gesammelt werden kann. Danach wird das Laufmittel gewechselt (1<sub>Ac</sub>: 5<sub>Hex</sub>). Wieder wird dieses Laufmittel solange benutzt, bis die

nächste Farbstofffraktion gesammelt werden kann. Danach wird das Laufmittel ein weiteres mal gewechselt (1<sub>Ac</sub>:2<sub>Hex</sub>) und die 3. Fraktion gesammelt.

Die Analytik erfolgte für die jeweiligen gesammelten Fraktionen mittels UV/VIS-Spektroskopie.

#### ***4.12.4 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYTIK VON CAROTINOIDEN***

Die Massenspektrometrie von Carotinoiden wurde im Analysenlabor der BASF AG durchgeführt. Dabei wurden die Proben mittels LC-MS Kopplung untersucht. Als Ionisationsmethode kam die chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (ACPI) unter Verwendung positiver Ionen zum Einsatz. Die Massenspektrometrie fand unter niedriger Auflösung statt (Niederauflösungs-Massenspektrometrie, NMS).

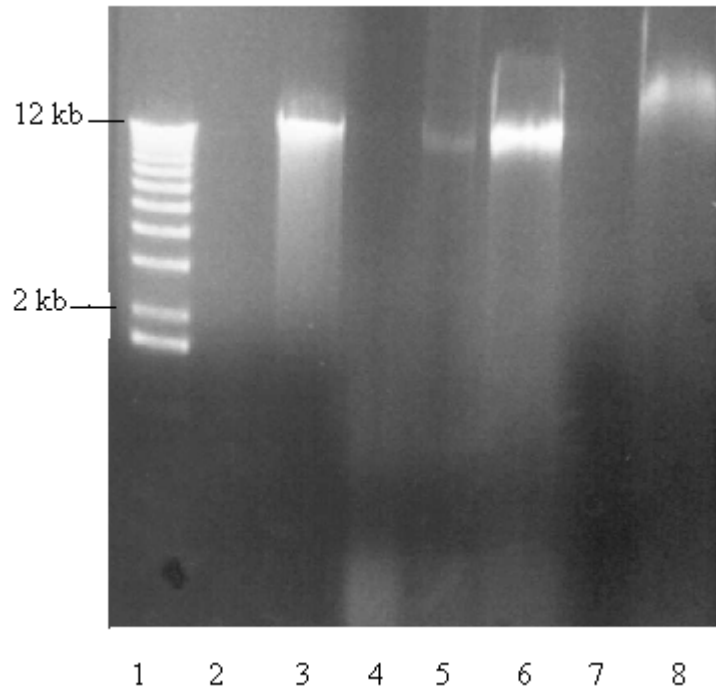
## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 ERHÖHUNG DER MIKROBIELLEN DIVERSITÄT VON CAROTINOIDEN

#### 5.1.1 DNA ISOLIERUNG AUS BODENPROBEN

Zur direkten Isolierung von DNA aus Bodenproben gibt es eine Vielzahl von Protokollen, die sich hinsichtlich der Art des Zellaufschlusses und der weiteren Aufarbeitung unterscheiden. Zunächst wurden dazu verschiedene Methoden zur Isolierung von DNA aus Bodenproben hinsichtlich der Ausbeute und der Fragmentierung der DNA verglichen. Hierzu standen unterschiedliche Bodenproben (Südfrankreich, Stuttgart-Vaihingen, Kompost) zur Verfügung. Die Bodenproben wurden jeweils mehrere Wochen im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass sich die Zusammensetzung der Bodenprobe und der darin vorhandenen Mikroorganismen nicht zu sehr ändert (Tebbe & Vahjen, 1993; Steffan *et al.*, 1988). Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde die Bodenprobe (Stuttgart-Vaihingen) zunächst im Exsikkator getrocknet und anschließend gemörsert. Davon wurden jeweils 0,5 g in jeden Ansatz eingesetzt. Die eingesetzten Methoden unterschieden sich in der Art des Zellaufschlusses und der weiteren Reinigung. So wurde bei den Methoden nach Zhou, Tsai und Diversa der Zellaufschluß durch eine Kombination chemischer (SDS), enzymatischer (Lysozym, Proteinase K) und mechanischer Behandlung (Frier-Tau-Zyklen) vorgenommen. Die weitere Reinigung erfolgte durch Extraktion mit Chloroform (Zhou) bzw. Phenol/Chloroform (Tsai, Diversa) und Fällung der DNA. Bei der Methode nach Porteous werden die Zellen durch Einwirkung von Lysozym, SDS und Hitze aufgeschlossen und die Proteine durch Guanidin-HCl entfernt. Die Methoden nach Moré und Volossiouk beruhen auf einer Kombination mechanischer und chemischer (SDS) Behandlung, wobei bei Moré der Aufschluß mit Glasperlen erfolgt, bei Volossiouk durch mörsern in flüssigem Stickstoff. Im folgenden werden Proteine durch Acetat-Fällung (Moré) abgetrennt oder durch Phenolextraktion (Volossiouk). Die Methode nach Picard beruht auf einem rein mechanischen Zellaufschluss (aufkochen, Frier-Tau Zyklen), anschließend wird durch Waschen mit PVPP-haltigem Puffer eine gewisse Reinigung erreicht. Die Original-Protokolle wurden alle so abgewandelt, dass mit gleichen Mengen an Bodenprobe (0,5 g) gearbeitet werden konnte (s. 4.10.8.4.1 – 4.10.8.4.7). Die isolierte DNA wurde jeweils im gleichen Volumen (100 µl TE) aufgenommen um vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

Um die Ausbeuten der jeweiligen Methoden miteinander zu vergleichen und die Fragmentierung der DNA zu beurteilen, wurden jeweils 10 µl der isolierten DNA in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Mittels verschiedener Methoden isolierte Boden-DNA  
 1, 1-kb-ladder; 2, Aufschluß-Diversa; 3, Aufschluß-Moré; 4, Aufschluß-Picard; 5, Aufschluß-Porteous; 6, Aufschluß-Tsai; 7, Aufschluß-Volossiouk; 8, Aufschluß-Zhou

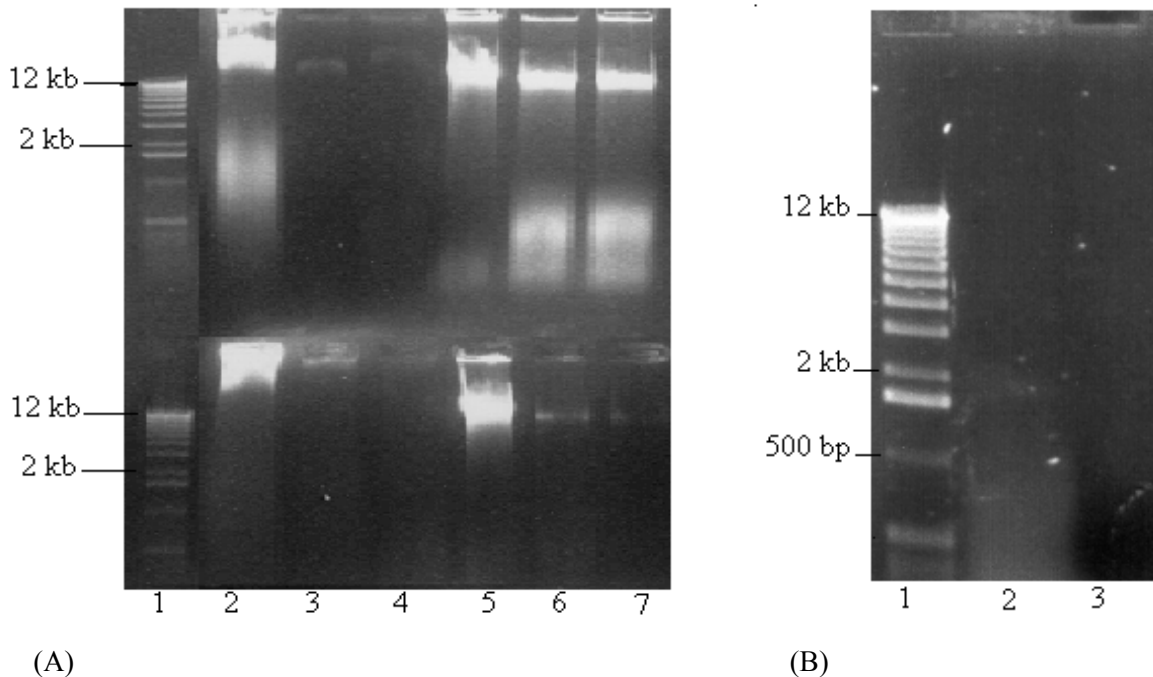
Die Reinheit der DNA konnte bereits augenscheinlich miteinander verglichen werden. Hierbei zeigte sich, dass die Methoden nach Volossiouk und Moré die höchste Reinheit aufwiesen, alle anderen Proben waren stark mit Huminstoffen verunreinigt, was deutlich an der dunkelbraunen Färbung der DNA-Lösung zu sehen war. In Abb. 5 ist in den Spuren 2, 4 und 7 (Aufschluß nach Diversa, Picard und Volossiouk) praktisch keine DNA zu sehen. In Kontrollexperimenten konnte zwar gezeigt werden, dass beim Aufschluss nach Volossiouk auch hohe DNA Ausbeuten erzielt werden können, jedoch war dies nicht reproduzierbar. Auch die Scherung der DNA unterschied sich stark. Auch der Aufschluß nach Porteous (Spur 5) ergab nur unbefriedigende DNA-Ausbeuten. Dagegen wurden mit den Methoden nach Moré, Tsai und Zhou (Spuren 3, 6 und 8) recht hohe DNA-Ausbeuten erreicht. Die Fragmentierung der isolierten DNA war hierbei gering, da nur eine schwache Degradierung der DNA zu beobachten war. Damit zeigte sich, dass die Methoden zur DNA- Isolierung nach Zhou, Tsai und Moré – da DNA mit hoher Ausbeute isoliert werden kann und die Fragmentierung gering ist, prinzipiell dazu geeignet sind, zur DNA-Isolierung für die

Herstellung von Genbanken eingesetzt zu werden. Im Folgenden wurde mit den Methoden nach Zhou und Moré weitergearbeitet, da sich bei diesen Methoden das Aufschlussprinzip stark voneinander unterscheidet, sich die Methoden nach Tsai und Zhou jedoch ähneln. Da die durch die Methode nach Zhou gewonnene DNA eine geringere Fragmentierung aufwies als die nach Tsai gewonnene DNA, wurde im Folgenden die Methode nach Zhou verwendet.

### **5.1.2 VERSUCHE MIT VERSCHIEDENEN REINKULTUREN**

Da die erhaltene DNA zum Screening nach neuen Biokatalysatoren in verschiedenen Wirtsorganismen exprimiert werden sollte (*E. coli*, *Streptomyces*), war es darüber hinaus notwendig, die Protokolle dahingehend zu untersuchen, aus welchen Spezies DNA isoliert werden kann. Die Gram-positiven Actinomyceten stellen eine interessante Quelle für neue Enzyme dar.

Actinomyceten zeichnen sich durch eine sehr kompakte Peptidoglycan-Schicht aus und sind daher nicht allen DNA-Isolierungsmethoden zugänglich. Ziel war es, mindestens eine Methode zu finden, mit der auch Actinomyceten aufgeschlossen werden können und eine, bei der dies nicht möglich ist. Somit könnte man entscheiden, welche DNA-Isolierungsmethode angewandt werden soll, um die erhaltene DNA anschließend in bestimmten Wirten zu exprimieren. Dazu wurde DNA aus verschiedenen Reinkulturen von *Pseudomonas* LU2023 (Gram-negativ), *Arthrobacter* LU9144 (Actinomyceten) und *Rhodococcus* LU 9002 (Actinomyceten) unter Verwendung der Methoden nach Zhou und Moré isoliert. In einem zweiten Versuch wurde jeder Reinkultur 0,5 g autoklavierte Bodenprobe zugegeben, um Effekte der Bodenmatrix in die Betrachtung mit einzuschließen. Die zugegebene Bodenprobe wurde zuvor autoklaviert, damit die darin enthaltene DNA degradiert wird. Abb. 6B zeigt, daß aus autoklavierter Bodenprobe (ohne Zusatz von DNA) tatsächlich keine DNA im Agarosegel nachweisbar ist. So kann davon ausgegangen werden, dass keine störenden Effekte auftreten oder das Ergebnis durch die im Boden enthaltene DNA verfälscht wird. Die erhaltene DNA wurde in einem 1% igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 6A).



**Abbildung 6:** (A) DNA aus Reinkulturen und Reinkulturen mit Bodenmatrix  
 Oben: Reinkulturen ohne Bodenmatrix, Unten: Reinkulturen mit Bodenmatrix  
 1, kb-ladder; Spuren 2–4, Methode nach Zhou; Spuren 5–7, Methode nach Moré; 2, 5, *Pseudomonas*; 3, 6, *Arthrobacter*; 4, 7, *Rhodococcus*.  
 (B) DNA aus autoklavierter Bodenprobe  
 1, kb-ladder; 2, Methode nach Zhou; 3, Methode nach Moré

DNA aus dem Gram-negativen Bakterium *Pseudomonas* kann sowohl nach dem Protokoll nach Zhou als auch nach dem Protokoll nach Moré, auch in Anwesenheit von Bodenpartikeln effizient isoliert werden (Abb. 6A, oben: 2, 5, unten: 2, 5). Wird die Methode nach Zhou zur Isolierung von DNA aus *Pseudomonas* angewandt, so ist bei geringer Fragmentierung eine hohe Ausbeute zu erzielen. Aus *Arthrobacter* sowie aus *Rhodococcus* kann mit dieser Methode jedoch praktisch keine DNA isoliert werden, weder aus den Reinkulturen allein (Abb. 6, oben 3, 4) noch in Anwesenheit der Bodenpartikel (Abb. 6, unten, 3, 4). Wird DNA aus den beiden *Actinomyceten*-Stämmen mit der Methode nach Moré isoliert, so zeigt sich, dass bei Verwendung der Reinkulturen allein die DNA sehr effizient isoliert werden kann (Abb.6 oben: 6, 7). Bei Zugabe der Boden -Matrix jedoch wird die Effizienz bei der DNA-Isolierung aus *Actinomyceten* stark reduziert (Abb. 6, unten: 6, 7).

Damit stellt die Methode nach Moré eine Möglichkeit dar, DNA aus *Actinomyceten* zu isolieren, jedoch sollten aufgrund der schlechteren Effizienz zur Herstellung von Genbanken relativ große Mengen an Bodenprobe eingesetzt werden.

### 5.1.3 KOMBINATION DER METHODEN

Wie in 5.1.2 gezeigt wurde, ist es mit der Methode nach Moré prinzipiell möglich, DNA aus Actinomyceten zu isolieren, mit der Methode nach Zhou jedoch nicht. Dies kann man sich zunutze machen, wenn es um die Klonierung der isolierten DNA in verschiedene Wirte geht. *E. coli* erkennt nur ca. 20% der Promotoren aus Actinomyceten. Beim Erstellen von Genbanken und dem Screening nach neuen Enzymaktivitäten ist es wichtig, eine hohe Effizienz sowohl bei der Klonierung als auch bei der Expression zu erzielen. Daher ist es ungünstig, DNA aus Actinomyceten in *E. coli* zu klonieren um ein Screening nach neuen Biokatalysatoren durchzuführen, weil vermutlich bis zu 80% der Gene allein aufgrund der nicht erkannten Promotoren nicht exprimiert werden können, wenn das entsprechende Gen unter der Kontrolle des eigenen Promotors ist. Desweiteren stellt der hohe G+C-Gehalt der Actinomyceten sowohl wegen der Bildung von Sekundärstrukturen als auch durch die veränderte Codon-usage ein Problem bei der Expression in *E. coli* dar. So wäre es vorteilhaft, bereits bei der DNA-Isolierung aus Bodenproben ausschließen zu können, dass DNA aus Actinomyceten isoliert wird, wenn die DNA anschließend in *E. coli* kloniert werden soll. Ausgehend von einem Gemisch verschiedener Spezies könnte so erreicht werden, DNA aus Nicht-Actinomyceten mit der Methode nach Zhou abzutrennen und in *E. coli* zu klonieren. Die in der Probe verbleibenden Actinomyceten können anschließend mit der Methode nach Moré aufgeschlossen werden. Die so gewonnene DNA kann dann in Wirte, die zur Expression von Actinomyceten-DNA geeignet sind (beispielsweise *Streptomyces*) kloniert werden.

Um DNA aus *Pseudomonas* von *Rhodococcus* und *Arthrobacter* DNA abzutrennen, wurden die Methoden nach Zhou und Moré kombiniert.

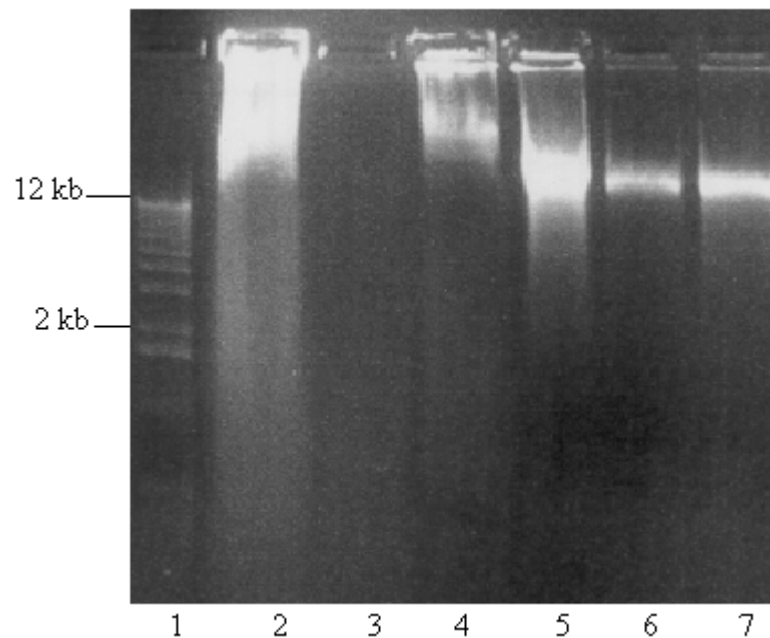
Jeweils 0,5 g autoklavierter Erde wurden folgende Volumina einer Übernachtskultur der verschiedenen Stämme zugefügt:

1. 1,8 ml *Pseudomonas*
2. je 900 µl *Arthrobacter* und *Rhodococcus*
3. je 600 µl *Pseudomonas*, *Arthrobacter* und *Rhodococcus*.

Alle Proben wurden zunächst mit der Methode nach Zhou aufgeschlossen (Abb. 7, Spuren 2-4). Anschließend wurden die restlichen, intakten Zellen, die sich noch in der Probe befanden, unter Anwendung des Protokolls nach Moré, aufgeschlossen. (Abb. 7, Spuren 5-7). Wie aus Abb. 7, Spur 2 und 4 ersichtlich ist, können durch Frier-Tau-Zyklen, Proteinase K und SDS-



Behandlung nur *Pseudomonas*-Zellen effizient lysiert werden. In Abb. 7, Spur 3 ist keine DNA zu sehen, in diesem Ansatz befanden sich keine *Pseudomonas*-Zellen in der Probe. Werden die Zellen mit der Methode nach Moré durch Glasperlen und SDS aufgeschlossen (Abb. 7, Spur 5-7), kann sowohl DNA aus *Pseudomonas* (Abb. 7, Spur 5, 7) wie auch aus *Rhodococcus* und *Arthrobacter* (Abb. 7, Spur 6, 7) isoliert werden. Da der Aufschluß nach Zhou auch bei den Proben, die *Pseudomonas* Zellen enthalten, nicht ganz vollständig ist, bzw. zunächst ein Teil der *Pseudomonas* DNA noch an den Bodenpartikeln haftet, wird auch im anschließenden Schritt noch *Pseudomonas* DNA isoliert.

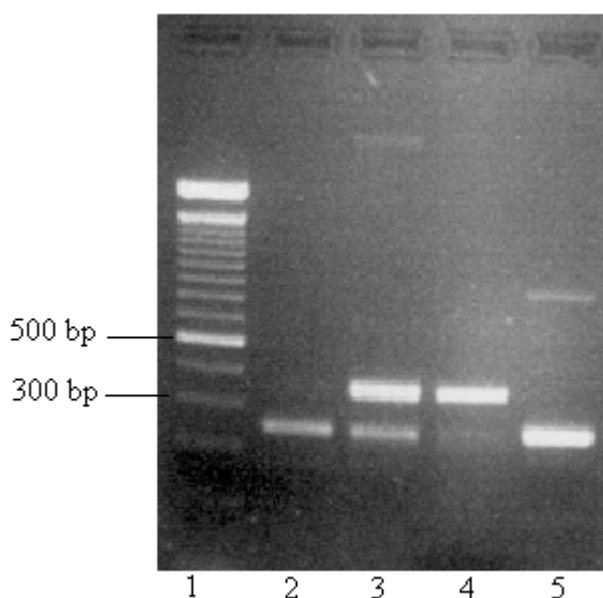


**Abbildung 7:** DNA-Isolierung durch Kombination der DNA-Isolierungsmethoden nach Zhou und Moré  
 1, kb-ladder; 2, 5 *Pseudomonas*; 3, 6 *Arthrobacter* + *Rhodococcus*;  
 4, 7 *Arthrobacter* + *Pseudomonas* + *Rhodococcus*;  
 Spuren 2-4: Methode nach Zhou; Spuren 5-7: Kombination der Methoden nach Zhou und Moré

Der Aufschluß der verschiedenen Zelltypen kann durch PCR-Analyse der 23S-rDNA mit spezifischen Primern nachgewiesen werden. Dabei werden spezifische Primer verwendet, durch welche die Domäne III der 23S-rDNA amplifiziert wird. Bei Eubakterien wird ein Fragment von 250 bp Größe amplifiziert, im Falle von Actinomyceten besitzt dieses Fragment eine 100 bp Insertion, im Falle von  $\alpha$ -Proteobakterien eine 80 bp-Deletion. Als Template diente DNA, die aus einem Gemisch aller drei Stämme in autoklavierter Bodenprobe nach i)

nur Zhou; ii) Zhou + Moré isoliert worden war. Als Kontrolle diente genomische DNA aus *Streptomyces* und *E. coli*. Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 8). In Abb. 8, Spur 2 ist nur eine Bande mit einer Größe von 250 bp zu sehen. Diese Bande hat dieselbe Größe wie das PCR Produkt, bei dem genomische DNA aus *E. coli* als Template eingesetzt wurde (Abb. 8, Spur 5).

Wenn die verbleibenden intakten Zellen in der Probe anschließend mit der Methode nach Moré aufgeschlossen wurden und die isolierte DNA als Template in eine PCR mit denselben Primern eingesetzt wurde, hat das Hauptprodukt eine Größe von 350 bp (Abb. 8, Spur 3), besitzt also die 100 bp-Insertion, die für Actinomyceten charakteristisch ist. Wird zur Kontrolle genomische DNA aus *Streptomyces* als Template eingesetzt, so erhält man eine Bande derselben Größe (Abb. 8, Spur 4). Damit konnte gezeigt werden, dass im zweiten Schritt auch die *Arthrobacter* und *Rhodococcus*-Zellen aufgeschlossen wurden. Die Trennung erfolgt jedoch nicht ganz strikt, so ist in Abb. 8, Spur 3 außer der 350 bp-Bande auch eine Bande von 250 bp sichtbar, d.h., die *Pseudomonas*-DNA wurde nicht vollständig abgetrennt. Die Kombination der beiden Methoden nach Zhou und Moré ist folglich dazu geeignet, um zunächst auszuschließen, dass DNA von Actinomyceten isoliert wird. Im zweiten Schritt wird dann DNA aus Gram-positiven Bakterien angereichert.



**Abbildung 8:** PCR-Amplifikation der Domäne III der 23S-rDNA mit Template DNA die aus einem Gemisch aus *Pseudomonas*, *Arthrobacter* und *Rhodococcus* in autoklavierter Erde isoliert wurde

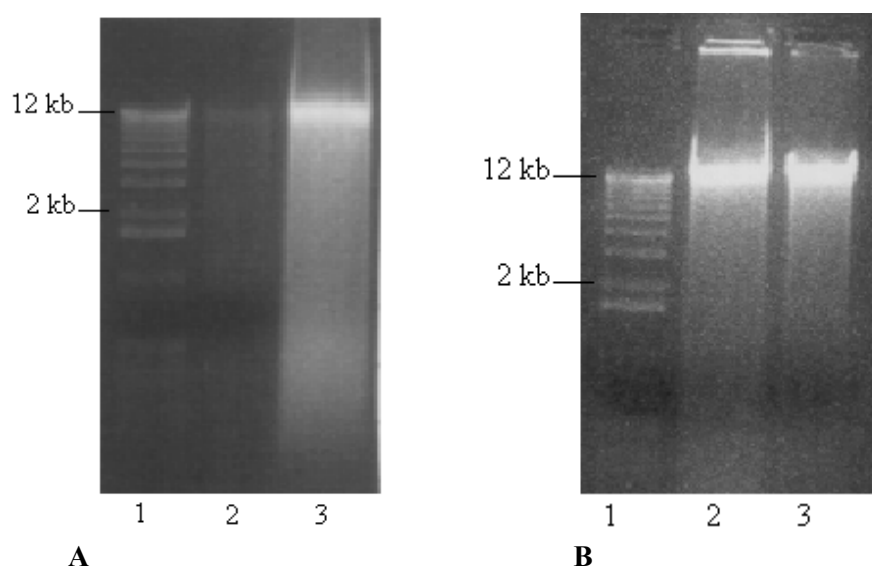
1, kb-ladder; 2, Template DNA isoliert nach Zhou; 3, Template DNA anschließend isoliert nach Moré; 4, Template genomische DNA aus *Streptomyces*; 5, Template genomische DNA aus *E. coli*

#### 5.1.4 OPTIMIERUNG DER METHODE NACH MORÉ

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Reinheit der gewonnenen DNA. Meist sind die Proben stark mit Huminstoffen aus dem Boden verunreinigt. Huminstoffe sind deshalb problematisch, weil sie Restriktionsspaltungen und die Taq-Polymerase hemmen und auch bei Hybridisierungsexperimenten einen störenden Einfluss haben (Holben *et al.*, 1988; Tebbe und Vahjen, 1993; Tsai und Olson, 1992a). Die Huminsäuren sind dabei schwer von DNA abtrennbar, weil Nukleinsäuren und Huminsäuren ähnliche Eigenschaften aufweisen. Um die Reinheit der gewonnenen DNA zu erhöhen, wurde DNA direkt mit Silica gereinigt (4.10.9). DNA bindet bei hohen Salzkonzentrationen an Silica und kann nach dem Waschen bei niedrigen Salzkonzentrationen wieder eluiert werden.

Eine Bodenprobe wurde jeweils mit Hilfe der Methode nach Zhou oder Moré aufgeschlossen, wobei bei der Methode nach Zhou die wässrige Phase nach der Chloroformextraktion und bei der Methode nach Moré der Überstand nach der Acetat-Fällung in die direkte Reinigung eingesetzt wurde.

Im Vergleich zu der nach dem ursprünglichen Protokoll aufgereinigten DNA (Fällung) zeigte sich, dass mit der Methode nach Zhou bei der direkten Reinigung im Vergleich zur Fällung sehr hohe Verluste auftreten (Abb. 9A). Bei der Methode nach Moré hingegen zeigt sich, dass durch die direkte Reinigung dieselbe Ausbeute zu erzielen ist, wie bei der Fällung der DNA (Abb. 9B). Darüber hinaus weist die Silica-gereinigte DNA eine höhere Reinheit auf, was durch die weniger starke Braunfärbung der DNA-Lösung zu erkennen ist.



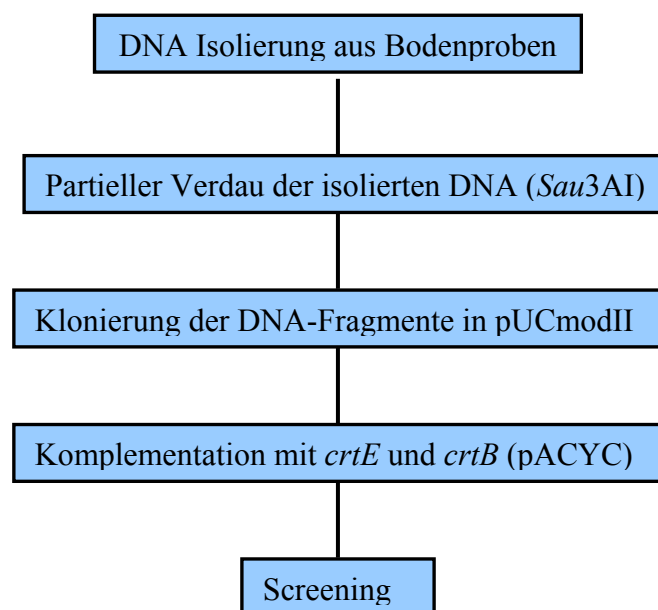
**Abbildung 9:** Vergleich isolierte DNA aus Bodenprobe nach Fällung und Silica Reinigung  
A: Zhou: 1, kb-ladder; 2, Silica- Reinigung; 3, Isopropanol-Fällung  
B: Moré: 1, kb-ladder; 2, Silica- Reinigung; 3, Isopropanol-Fällung

Die direkte Reinigung mit Silica ist eine geeignete Methode um mit der Methode nach Moré reine DNA in hoher Ausbeute zu erhalten. Für die Methode nach Zhou scheint die direkte Silica-Reinigung jedoch nicht geeignet zu sein.

### 5.1.5 HERSTELLUNG VON GENBANKEN UND KOMPLEMENTATIONSSCREENING

Die DNA, die wie in 5.1 beschrieben aus Bodenproben isoliert wurde, wurde im Folgenden für die Erstellung von Genbanken eingesetzt.

Dazu waren zunächst Gene der Carotinoid Biosynthese, die zu der gewünschten Vorstufe führen, auf einem low-copy Plasmid (pACYC) in *E. coli* vorgelegt worden. Diese Zellen wurden dann mit einem pUC-Derivat, das die Boden-DNA enthält cotransformiert. pACYC besitzt einen p15A-Replikationsursprung, welcher mit dem ColE1-Replikationsursprung des pUC-Derivats kompatibel ist. Da beide Plasmide unterschiedliche Resistenzmarker tragen (pACYC: Chloramphenicol, pUC19/pUCmodII: Ampicillin) ist es möglich, dass beide Plasmide unter Selektionsdruck in derselben Zelle vorhanden sind. Das anschließende Screening erfolgte durch Überführen der Kolonien auf Nitrocellulose Filter. Die gesamte Vorgehensweise zur Erstellung von Genbanken und anschließendem Screening ist in Abb. 10 dargestellt.



**Abbildung 10:** Schema zur Vorgehensweise zur Erstellung von Genbanken aus Boden DNA mit anschließendem Komplementationsscreening

### 5.1.6 VORAUSSETZUNG FÜR DIE HERSTELLUNG VON GENBANKEN MIT ANSCHLIEßENDEM KOMPLEMENTATIONSSCREENING

Das in *E. coli* JM109 vorgelegte Plasmid pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub> (Abb. 11) ist ein pACYC184-Derivat mit den beiden Genen *crtB* (=EUB) und *crtE* (=EUE) aus *Erwinia uredovora*, die jeweils unter Kontrolle des modifizierten (konstitutiven) *lac*-Promotors stehen. In *E. coli* ermöglichen sie die Synthese des farblosen Carotinoids Phytoin (Abb. 2). Die Phytoin-Bildung von pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub> wurde indirekt durch Kontroll-cotransformation mit dem Phytoin-Desaturase-Gen in pUC-EUI und die daraus resultierenden Rosafärbung der Klone nachgewiesen.

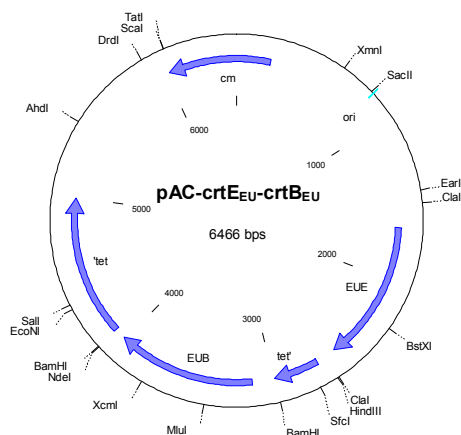


Abbildung 11: Vektor pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>

### 5.1.7 HERSTELLUNG DER GENBANKEN MIT BODEN DNA

Zur Herstellung von Genbanken wurde die mit der Methode nach Zhou isolierte Boden-DNA unterschiedlicher Herkunft (Teich-Sediment, Kompost, Bodenprobe aus Süd-Frankreich) mit *Sau3AI* partiell verdaut, um eine statistische Verteilung der DNA-Fragmente zu erhalten. Nach Auftrennung im Agarosegel wurde aus dem „Schmier“ der Größenbereich zwischen 3 und 10 kb ausgeschnitten und eluiert. Anschließend wurden die Fragmente in den *Bam*HI-verdauten CIAP-behandelten Vektor pUC19 ligiert. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* JM109, die bereits das Plasmid pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub> (Abb. 11) enthielten, cotransformiert. So

konnten allerdings nur wenige Transformanden erhalten werden. Daher wurde in einem zweiten Ansatz die DNA mit *NcoI* komplett verdaut und die Fragmente der Größe 3-10 kb in pUCmodII, der mit *NcoI* und CIAP behandelt worden war, ligiert und im weiteren Verlauf wie oben beschrieben verfahren.

Nach der Transformation der Zellen und Inkubation über Nacht auf LB-Cm-Amp-Platten bei 37°C wurden die Transformanden auf Nitrocellulose-Filter überführt, diese mit den Kolonien nach oben auf frische LB-Cm-Amp-(mit IPTG bei pUC19)- Platten gelegt und 2 Tage bei 25 – 30°C im Dunkeln inkubiert.

Werden durch Cotransformation mit Boden-DNA Gene eingebracht, die an der Carotinoid Biosynthese beteiligt sind und die Phytoin als Substrat nutzen können, wird dieses zu einem farbigen Produkt umgesetzt. Daher sollte der entstehende Klon eine Färbung aufweisen, die im gelben bis roten Bereich liegt.

Auf diese Weise wurden ca. 70 000 Klone gescreent, wobei bei keinem der Klone eine Färbung nachgewiesen werden konnte. Es wurden also keine Gene der Carotinoid Biosynthese aus Bodenproben gefunden.

### **5.1.8 VALIDIERUNG DES ASSAYSYSTEMS**

Um zu prüfen, ob die gesamte Vorgehensweise, von der Isolierung der DNA über die Klonierung in *E. coli* bis hin zum visuellen Plattenscreening überhaupt funktioniert, wurden der Bodenprobe (Süd-Frankreich) Zellen einer Reinkultur von *Erwinia uredovora* zugesetzt. *Erwinia uredovora* ist ein Gram-negatives Bakterium, das als Hauptprodukt Zeaxanthin-diglucosid bildet und die Gene *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ* und *crtX* trägt.

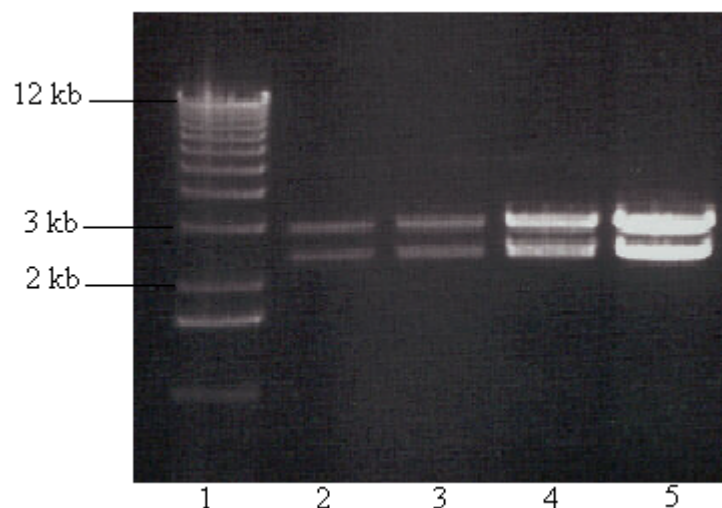
Zu 5 g Bodenprobe wurde 1 ml *E. uredovora* Reinkultur (OD<sub>600</sub>= 1,1) gegeben und die DNA-Isolierung wie in 4.10.8.4.1 beschrieben im zehnfachen Maßstab durchgeführt. Die isolierte DNA wurde mittels dem Wizard-DNA-Purification System® der Fa. Promega gereinigt und mit *NcoI* vollständig gespalten. Fragmente zwischen 3 und 8 kb wurden in den ebenfalls *NcoI* und CIAP- behandelten Vektor pUCmodII ligiert. Anschließend wurden die Ligationsansätze in *E.coli* JM109 transformiert, die bereits das Plasmid pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub> trugen und auf LB-Cm-Amp-Platten ausplattiert.

Die Transformanden wurden nach Inkubation bei 37°C über Nacht auf Nitrocellulose überführt und mit den Kolonien nach oben auf frische LB-Cm-Amp-Platten gebracht. Diese Platten wurden 48 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Unter 7 000 gescreenten

Klonen fanden sich vier, die eine Gelbfärbung aufwiesen (724.1, 724.2, 725.1, 725.2), die vermutlich auf die Anwesenheit von  $\beta$ -Carotin zurückzuführen ist.

Um die Insert-Größen der klonierten DNA-Fragmente zu bestimmen, wurden zunächst die Plasmide aus Übernachtskulturen der Klone isoliert. In den Klonen sind jeweils zwei Plasmide enthalten, pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub> hat eine Größe von 6,4 kb, das pUCmodII-Derivat mit Insert kann eine Größe zwischen 5,5 kb und 10,5 kb aufweisen. Dieses Plasmid ist jedoch in wesentlich höherer Kopienzahl vorhanden und unterscheidet sich im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel unter UV-Licht durch die Fluoreszenzstärke von pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>. Die Plasmide wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und das jeweils stärker fluoreszierende Plasmid aus dem Gel eluiert.

Dieses Plasmid wurde, um die Größe des Inserts zu bestimmen, einer Spaltung mit dem Restriktionsenzym *Nco*I unterworfen (Abb. 14).

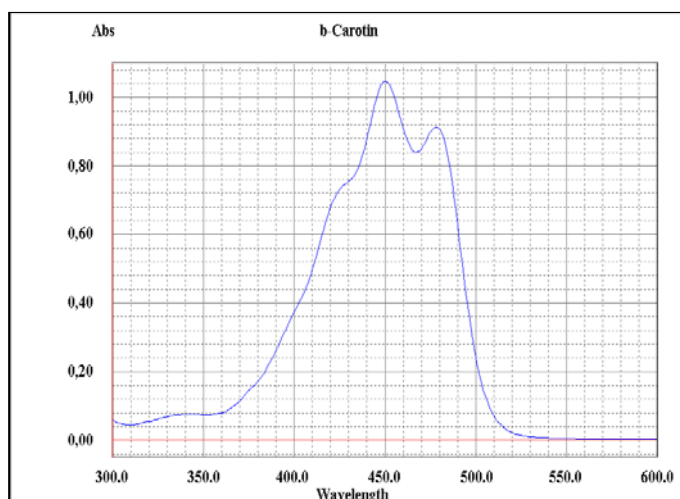


**Abbildung 12:** *Nco*I-Verdau der Plasmid DNA der  $\beta$ -Carotin bildenden Klone  
1, kb-ladder; 2, 724-1; 3, 724-2; 4, 725-1; 5, 725-2

Bei allen vier Klonen hatte das Insert eine Größe von ca. 3 kb (Abb. 14), dies entspricht der Größe eines *Nco*I-Fragments auf dem die beiden Gene *crtI* und *crtY* im Genom von *Erwinia uredovora* liegen. Da es dennoch möglich war, dass die beiden Gene aus einem anderen Mikroorganismus stammen, wurden die Plasmide mit den Primern pUCmodRev und pUCmodFw ansequenziert. Diese beiden Primer binden unmittelbar vor bzw. nach dem Polylinker des Plasmids pUCmodII.

Mit den sequenzierten Bereichen wurde ein BLAST-Alignment (Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt, um die gefundenen Sequenzen auf Homologien zu bekannten Sequenzen zu untersuchen. Die BLAST-Suche mit jeweils 500 bp der Enden der Fragmente aller vier sequenzierten Klone ergab 100% Identität zu dem Carotinoid Biosynthese Gen Cluster aus *Erwinia uredovora*.

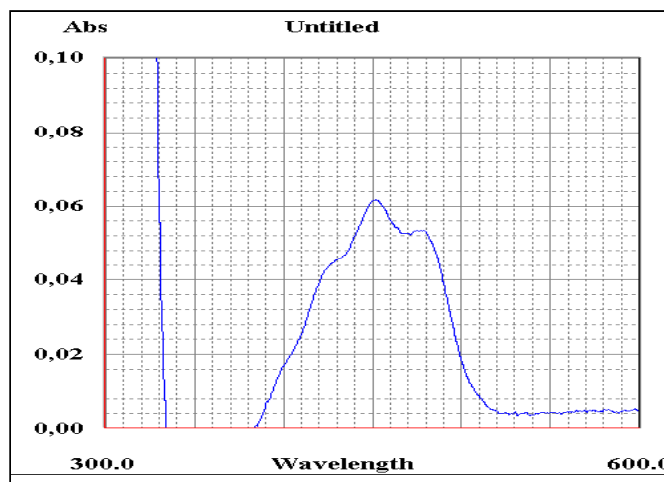
Um die von diesen Klonen gebildeten Carotinoide zu identifizieren, wurden alle vier Klone in je 5 ml LB-Cm-Amp Medium kultiviert und nach 24-stündiger Inkubation bei 30°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Pigmente aus den Zellen mit Aceton und Hexan wie in 4.12.1 beschrieben extrahiert und UV/VIS-Spektren aller vier Hexanextrakte aufgenommen. Zum Vergleich wurde ein Spektrum von  $\beta$ -Carotin in Hexan als Referenz aufgenommen (Abb. 13.A).



(A)

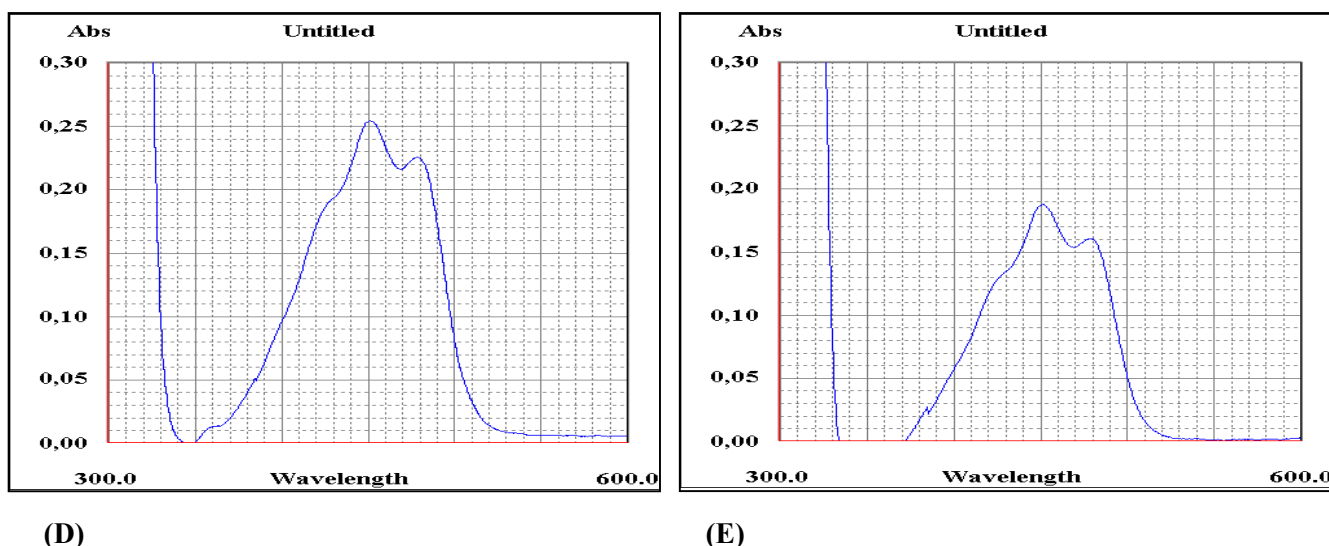


(B)



(C)





**Abbildung 13:** UV/VIS-Spektren von (A):  $\beta$ -Carotin; Hexanextrakte aus (B): 724.1; (C): 724.2; (D): 725.1; (E): 725.2.

Wie aus den UV/VIS-Spektren in Abb. 13 B-E zu erkennen ist, weisen alle vier untersuchten Klone dasselbe UV/VIS-Spektrum auf. Die jeweiligen Absorptionsmaxima liegen bei 450 nm, was dem Absorptionsmaximum von  $\beta$ -Carotin in Hexan entspricht. Die Form dieser Spektren stimmen mit dem dem von  $\beta$ -Carotin in Hexan überein (Abb13.A).

Damit wurde gezeigt, dass es grundsätzlich möglich ist, mit dieser Screening Methode Carotinoid-Gene zu finden. Darüberhinaus wurde indirekt gezeigt, dass die auf pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub> codierten Gene *crtB* und *crtE* funktionell exprimiert werden und in den Zellen Phytoin gebildet wird, das als Substrat für weitere eingeführte Carotinoid-Gene dienen kann.

## 5.2 ERHÖHUNG DER MOLEKULAREN DIVERSITÄT VON CAROTINOIDEN

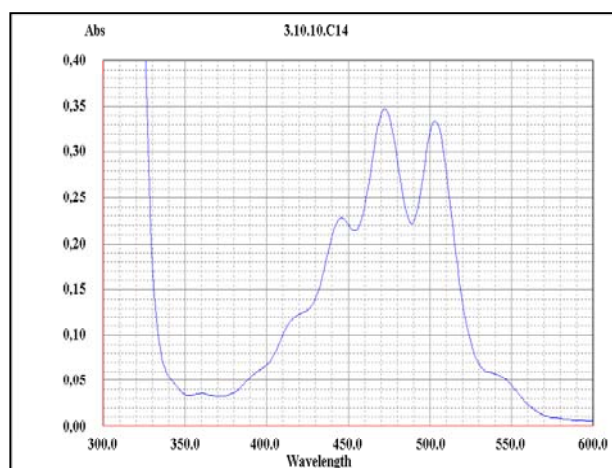
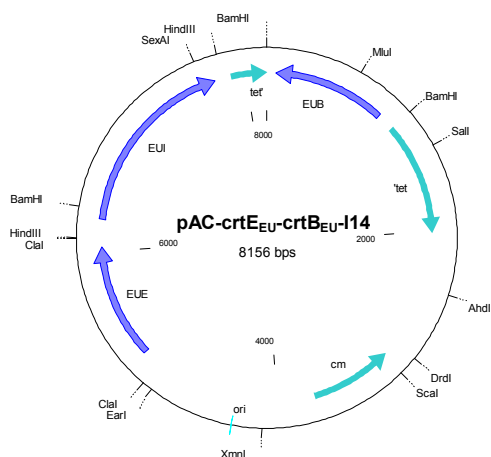
Da es nicht gelungen war, die mikrobielle Diversität durch Komplementationsscreening von Genbanken aus Boden-DNA zu erhöhen, wurde versucht, die molekulare Diversität von Carotinoiden bzw. Carotinoid Biosynthese-Genen zu erhöhen. Dazu sollten bereits klonierte Gene, die an der Carotinoid-Biosynthese beteiligt sind, durch gerichtete Evolution so verändert werden dass andere bzw. neue Produkte entstehen. Wie bei der Erstellung der Genbanken aus Boden-DNA wurden auch hier die entsprechenden Substrate *in vivo* gebildet, indem die für die Biosynthese des jeweiligen Substrats benötigten Gene in *E. coli* auf einem Plasmid vorgelegt wurden.

## 5.2.1 VERÄNDERUNG DER MONOOXYGENASEN CRTA AUS RHODOBACTER SPHAEROIDES UND RHODOBACTER CAPSULATUS DURCH DNA SHUFFLING

### 5.2.1.1 EXPRESSIONSKASSETTEN ZUR BIOSYNTHESE DER BENÖTIGTEN SUBSTRATE

In vorhergehenden Arbeiten (Schmidt-Dannert *et al.*, 2000) waren bereits die Gene *crtE*, *crtB* und *crtI*-C14 in pACYC184 kloniert worden und das resultierende Plasmid wurde pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 genannt (Abb. 14A). CrtE und crtB führen zur Bildung des farblosen Phytoins, das von CrtI zu Lycopin umgesetzt wird. *CrtI*-C14 ist die *crtI*-Mutante, mit der anstelle von Lycopin ein Gemisch aus 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin und Lycopin gebildet wird (Schmidt-Dannert *et al.*, 2000). Dabei war jedes Gen aus dem Vektor pUCmodII mit dem modifizierten lac-Promotor amplifiziert worden. Dadurch ist gewährleistet, dass jedes Gen unter der Kontrolle seines eigenen, konstitutiven Promotors steht.

Die Genprodukte des Plasmids pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 (Abb. 14 A) führen in *E. coli* JM109 zur Biosynthese von einem Gemisch aus Lycopin und 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin (Schmidt-Dannert *et al.*, 2000) und führen so zu einer Pinkfärbung des entsprechenden Klons. Der Hexanextrakt der aus diesen Zellen extrahierten Carotinoide weist das in Abb. 14 B dargestellte UV/VIS-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\max} = 472$  nm auf.

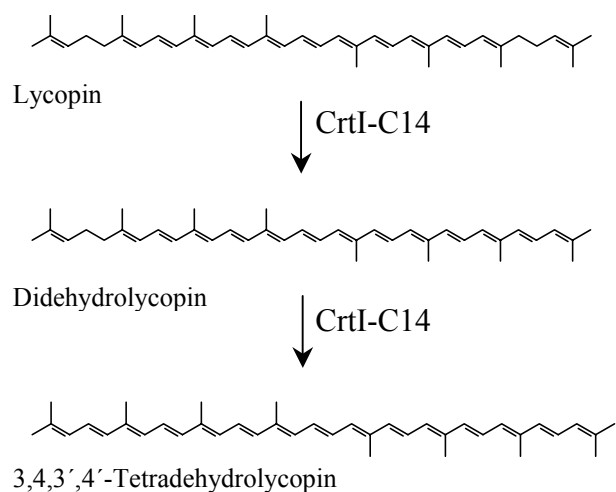


(A)

(B)

**Abbildung 14:** (A): Plasmidkarte von pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14; (B): UV/VIS-Spektrum des Hexanextrakts aus JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14

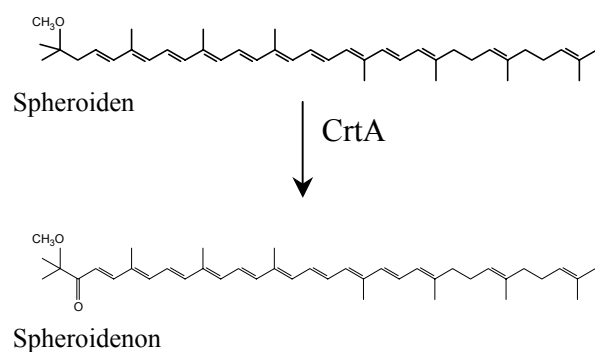
Die Biosynthese von 3, 4, 3', 4'Tetradehydrolycopin ausgehend von Lycopin ist in Abb.15 dargestellt.



**Abbildung 15:** Biosynthese von 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin

### 5.2.1.2 SPHEROIDEN-MONOOXYGENASEN AUS *RHODOBACTER SPHAEROIDES* (RSA) UND *RHODOBACTER CAPSULATUS* (RCA)

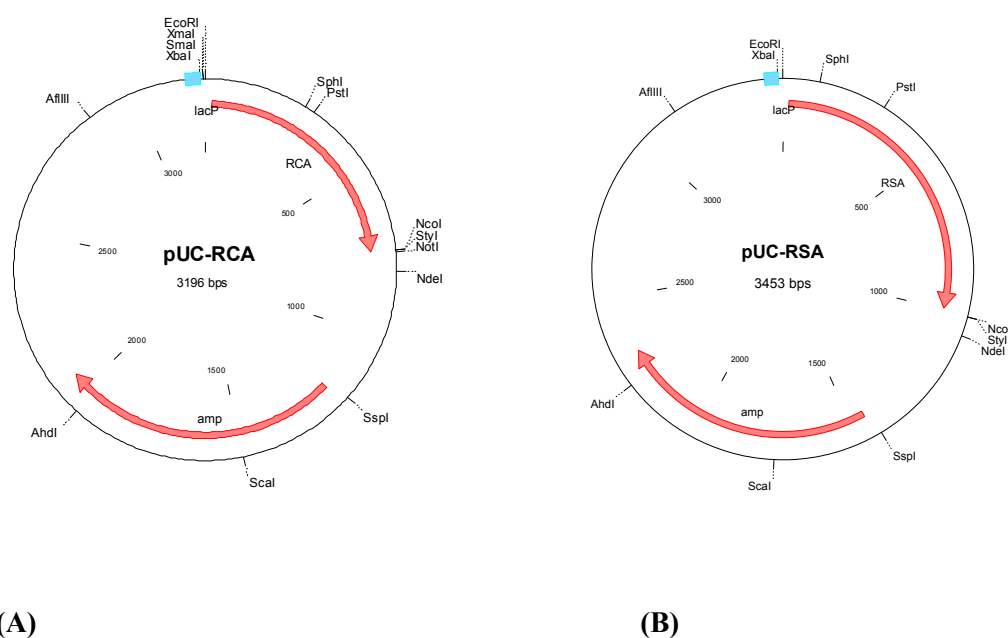
Die Spheroiden-Monooxygenasen CrtA aus *Rhodobacter sphaeroides* (RSA) und *Rhodobacter capsulatus* (RCA) katalysieren in den *Rhodobacter* -Wildtypstämmen die Oxidation von Spheroiden zu Spheroidenon (Abb. 16).



**Abbildung 16:** Von CrtA katalysierte Reaktion in *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides*

Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Enzyme keine sehr hohe Substratspezifität aufweisen, da viele der bisher beschriebenen modifizierenden Enzyme ein relativ breites Substratspektrum aufweisen (Albrecht *et al.*, 1997; Ausich, 1994; Hunter *et al.*, 1994; Takaichi *et al.*, 1996).

Die beiden Gene *crtA* waren in vorhergehenden Arbeiten aus genomischer DNA von *Rhodobacter capsulatus* (RCA) und *Rhodobacter sphaeroides* (RSA) amplifiziert und in pUCmodII kloniert worden und stehen ebenfalls unter Kontrolle des konstitutiven lac-Promotors. Dabei hat das RCA-Gen eine Größe von 725 bp, das RSA-Gen eine Größe von 975 bp (s. Abb. 17 A, B).

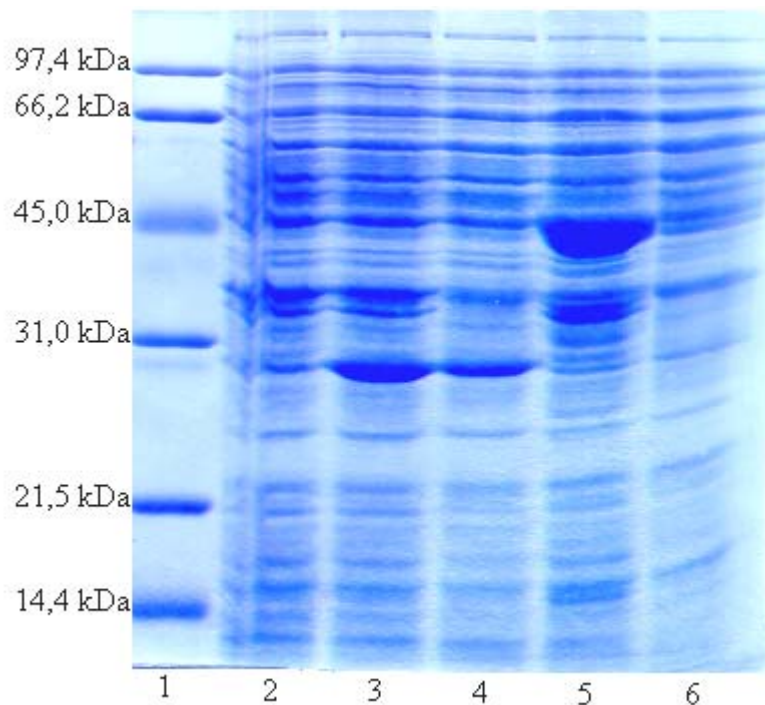


**Abbildung 16:** Klonierungsvektoren (A) pUC-RCA und (B) pUC-RSA

pUC-RSA und pUC-RCA wurden in JM109-Zellen transformiert. Jeweils eine Kolonie wurde gepickt und wie in 4.8 beschrieben, kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in Tris-HCl aufgenommen, dann wurde ein Aliquot abgenommen und der Rest wie in 4.8.2 beschrieben weiterbehandelt. Zur Kontrolle wurde mit dem Ansatz JM109 mit pUCmodII analog verfahren.

Der Rohextrakt und der geklärte Rohextrakt wurden jeweils 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. 15 µl wurden auf ein 12,5%iges SDS Gel aufgetragen. Nach Gellauf und Coomassie-Färbung wurden die Banden untersucht (Abb. 18).

Bei den beiden Enzymen handelt es sich um 29 kDa (RCA) (Abb. 18, Spur 3) und 39 kDa (RSA) (Abb. 18, Spur 5) große Enzyme, die beide in dem Vektor pUCmodII in *E. coli* exprimiert werden können. Dabei liegt die Spheroiden-Monooxygenase aus *Rhodobacter capsulatus* teilweise in Lösung vor (Abb. 18, Spur 4), bei der Spheroiden Monooxygenase aus *Rhodobacter sphaeroides* liegt nur ein sehr geringer Teil löslich vor (Abb. 18, Spur 6). Die schlechte Löslichkeit dieser Enzyme ist auf das Vorhandensein von Inclusion-Bodies zurückzuführen, welche durch mikroskopische Untersuchung Coomassie-angefärbter Ausstrichpräparate nachgewiesen werden konnten. Bei Vorhandensein von Inclusion-Bodies sind diese mikroskopisch durch ihre Blaufärbung sichtbar, wohingegen in Kontroll-Zellen ohne Inclusion-Bodies keine blauen Einschlüsse zu erkennen sind.



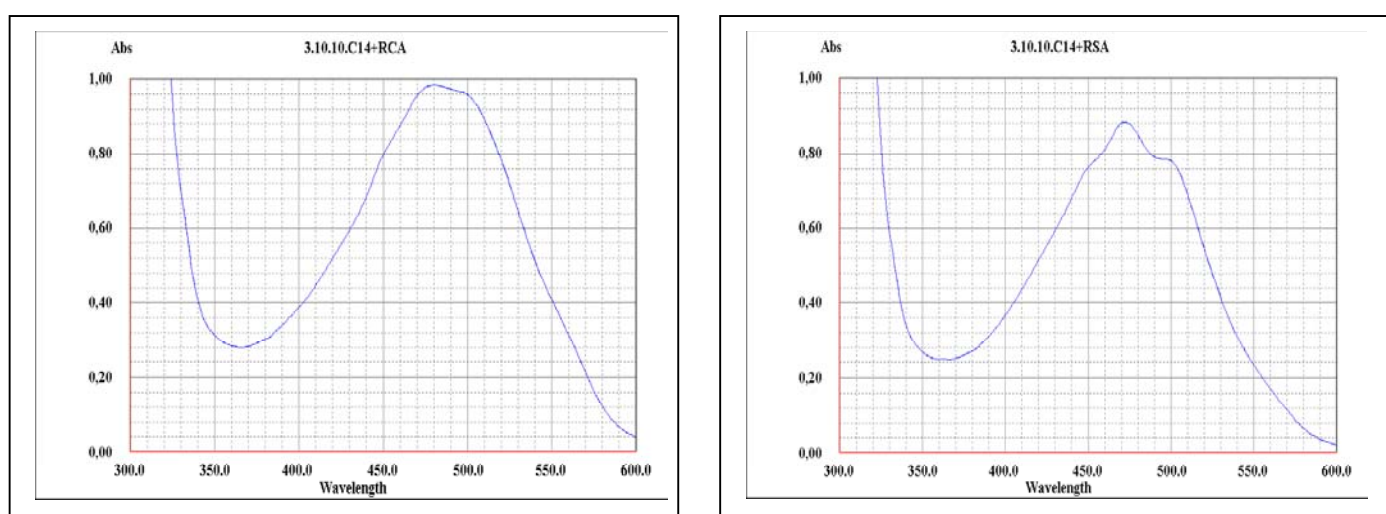
**Abbildung 18:** SDS PAGE RSA und RCA

1, LMW-Marker; 2, JM109-pUCmodII Gesamtprotein; 3, JM109-pUC-RCA Gesamtprotein; 4, JM109-pUC-RCA lösliche Fraktion; 5, JM109-pUC-RSA Gesamtprotein; 6, JM109-pUC-RSA lösliche Fraktion

Zunächst wurde geprüft, ob die Carotinoide, die in *E. coli* durch die Genprodukte von pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 gebildet werden, als Substrat für die beiden Monooxygenasen RCA und RSA dienen könnten.

pUC-RSA und pUC-RCA wurden in JM109, die bereits das Plasmid pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 enthielten, cotransformiert und auf LB-Cm-Amp ausplattiert. Die Kolonien wiesen eine

Rotfärbung auf, die sich deutlich von dem pink der Klone mit dem Plasmid pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 unterschied. Dabei wiesen Klone mit pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 und pUC-RCA eine intensivere Färbung auf als Klone mit pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 und pUC-RSA. Einzelkolonien, die rot gefärbt waren, wurden gepickt und aus den entsprechenden Übernachtskulturen 50 ml LB-Cm-Amp beimpft. Nach 16 stündiger Inkubation bei 37°C im Schüttler wurden die Kulturen weitere 48 Std bei 30°C inkubiert und die Carotinoide wie in 4. 12. 1 beschrieben extrahiert. Dann wurden UV/VIS-Spektren der Hexanextrakte aufgenommen (Abb. 19 A,B) und diese mit dem UV/VIS-Spektrum des Hexanextrakts von JM109-pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 (Abb. 19 B) verglichen.



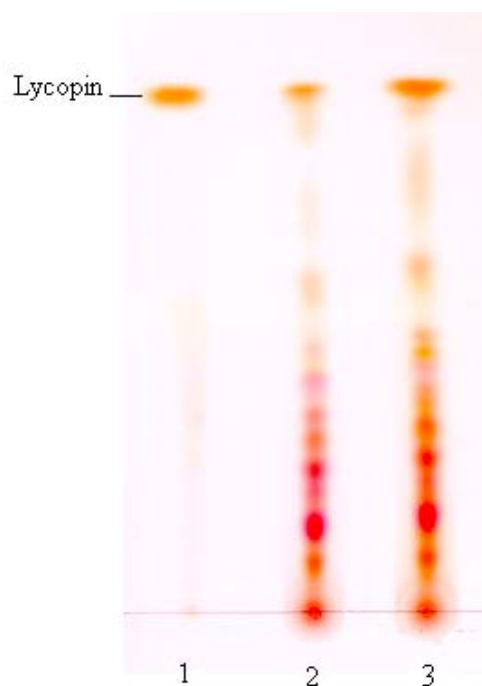
(A)

(B)

**Abbildung 19:** UV/VIS-Spektren der Hexanextrakte von (A): JM109-pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + pUC-RCA und (B): JM109-pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + pUC-RSA

Die beiden UV/VIS-Spektren in Abb. 19 unterscheiden sich deutlich von dem Spektrum in Abb. 14. Die Absorptionsmaxima liegen bei  $\lambda_{\max} = 478$  nm für RCA und  $\lambda_{\max} = 470$  nm für RSA. Das bedeutet, dass ein Gemisch aus Lycopin, Didehydrolycopin und 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin von beiden Enzymen als Substrat genutzt und umgesetzt werden kann. Die beiden Spektren unterscheiden sich sowohl in ihren Absorptionsmaxima als auch in ihrer Feinstruktur, dies läßt darauf schließen, dass entweder unterschiedliche Produkte entstehen und / oder die Substrat- Mischung unterschiedlich gut umgesetzt wird.

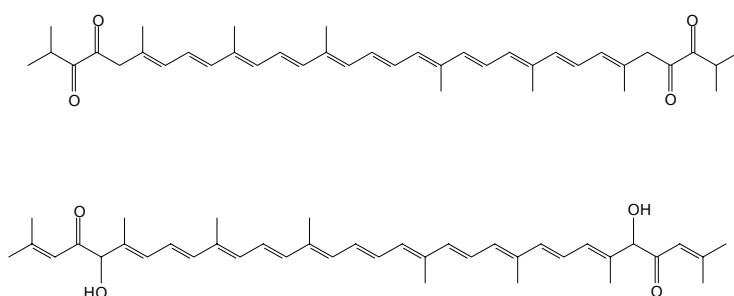
Um die von JM109 pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 und RCA bzw. RSA gebildeten Carotinoide näher zu betrachten, wurden diese mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Abb. 20).



**Abbildung 20:** DC der Hexanextrakte aus JM109-pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + RCA und RSA  
 1, Kontrolle JM109 pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14; 2, JM109 pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + RCA; 3,  
 JM109 pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + RSA

Wie aus Abb. 20 ersichtlich, handelt es sich bei den von JM109 pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 mit RCA gebildeten Produkten um Carotinoide, die größtenteils eine höhere Polarität aufweisen, als die von JM109 pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 mit RSA gebildeten Carotinoide.

Dabei ist deutlich zu sehen, daß durch die beiden Enzyme RCA und RSA eine sehr große Anzahl an Produkten entsteht. Der Hauptbestandteil der aus JM109-pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + RSA extrahierten Carotinoid-Mischung weist dasselbe Laufverhalten auf wie die aus JM109 - pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 extrahierten Carotinoide. Dabei handelt es sich um eine unpolare Verbindung. Durch LC-MS-Analyse des Hauptbestandteils wurde eine monoisotopische relative Molekülmasse von 536 ermittelt, was der Masse von Lycopin entspricht. Bei dem Hauptprodukt, das von JM109-pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + RCA gebildet wird, handelt es sich wie aus dem DC ersichtlich, um eine polarere Verbindung. Diese besitzt eine durch LC-MS ermittelte monoisotopische relative Molekülmasse von 596. Aus dieser Masse kann auf die Summenformel C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub> geschlossen werden. Ausgehend von Lycopin kann es sich daher um die in Abb. 21 dargestellten Strukturen oder Isomeren davon handeln.



**Abbildung 21:** mögliche durch RCA gebildete Produkte

Aus dem Sequenzalignment der beiden Gene *crtA* aus *Rhodobacter capsulatus* (RCA) und *Rhodobacter sphaeroides* (RSA) (Abb. 20) wird ersichtlich, dass beide Gene auf DNA-Ebene eine Homologie von ca. 60% aufweisen und so für das gene-shuffling prinzipiell eingesetzt werden können. Verglichen mit RCA weist RSA einen um ca. 100 Aminosäuren verlagerten C-terminalen Sequenzabschnitt auf, jedoch liegt dieser Überhang am 3' Ende des Gens und hat dadurch möglicherweise keinen bedeutenden Einfluss auf das DNA shuffling.

	1				50
RCA	ATGCCTGT	CG CCTCACTCAG	CCTGTTCCGT	TTCGACGGCA	CAAGCTCGCT
RSA	ATGCAGACTG	TCACGCTCAG	TATCTTCCGG	TTCAACGAGT	TCGAAAAGCG
Consensus	ATGCagaccG	cCaCaCTCAG	caTcTTCCGg	TTCaACGaca	caaaaaaGCg
	51				100
RCA	GCCTGGGTC	ATCAGCCAGA	TGATCCTGTC	CCGCCGCCCC	CTGAACGACG
RSA	GCTCTGGGTG	CTTGGTCAGA	TGACCGCAAA	CAAGCTGGGC	ATGCACTACC
Consensus	GCcCTGGGTc	aTcaGcCAGA	TGAcCccaaa	CaacCgcccc	aTGaACgACc
	101				150
RCA	AGCCGCGGGT	GAAGTTCTAC	AAACTGTGCG	GATCGGGCAC	CGGCGAGGGC
RSA	TGCCGAAGGC	GAAATTCTGG	AAGATGTTCC	GCTCGGGCAC	GGGTcAGGGC
Consensus	aGCCGaaGGc	GAAaTTCTac	AAaATGTgCG	GaTCGGGCAC	cGGccAGGGC
	151				200
RCA	TTCACGCCGA	AGCCGAAGT	GCGCGTCTGG	GCGATCATGG	CGGCTTTCGA
RSA	TTCACGCCGA	AGCCCAAGT	GCACGTCTGG	AGCATCCTTG	CGGTCTGGCC
Consensus	TTCACGCCGA	AGCCcAAGT	GCaCGTCTGG	accATCaTgG	CGGccTgcca
	201				250
RCA	CACCGAGGCC	GATGCCCGCG	ACGTGACCGC	GAACCACCCG	GTCTGGAAGC
RSA	GGACGAGGAG	ACCGCGCGGC	GGGAAGTGCC	CGAATCGCCG	ATCTACCAGC
Consensus	caaCGAGGac	aacGCcCGcc	acGaaaccGC	caAaacCCG	aTCTTacaAGC
	251				300
RCA	GCTGGCGGGC	GcATGCGGCG	GAAACGCTGG	TGCTGCATCT	GCAGCCGCTT
RSA	GCTGGACCAA	GATGGCCGAC	GAGAGCTACA	CGGTGCTCCT	GCAGCCACCC
Consensus	GCTGGaccaa	GaagGcCGac	GAAaAcccaca	cGcTGCacCT	GCAGCCcacc
	301				350
RCA	TCGGCGCGCG	GCACCTGGGG	CGGCGTCAAT	CCGTTCCCTGC	CCGAACAGGT
RSA	AGCGCCTGGG	GCAAATGGGA	CGGCAAGGAG	CCGTTCCGAGC	CGGTGAAACC
Consensus	accGCcCGcG	GCAaATGGGa	CGGCaacaAg	CCGTTCCaGC	CcGaaaAacc
	351				400
RCA	GGCCGAGCCA	AGCCCGGACG	AGCCCGTGGT	GGCGCTGACC	CGCGCCGCGA
RSA	CGCCTCGGAC	GTGCGG----	--CCGATCGC	CGCCCTCACC	CGGGCCACGG
Consensus	cGCCgaGcaa	agcCcg....	..CCcaTcGc	cGcCCTcACC	CGcGCCaCGA



ERGEBNISSE

	401					450
RCA	TCAAGCCGCA	CAAGGCCAAT	GCCTTCTGGT	CGCGCGTGCC	GAAGATTTC	
RSA	TCAAGTTCTG	GAAGGCCGAG	CGGTTCTGGG	CGCGCGAGCC	TGCCATCTCG	
Consensus	TCAAGccccca	cAAGGCCaAg	cccTTCTGGg	CGCGCGaGCC	gaacATcTc	
	451					500
RCA	GAGAAAGTCG	GCGAGGATCA	GAACCTGATG	TTCAAGATCG	GGATCGGGGA	
RSA	CACATGATCG	GCCGGAACAA	GGACGTGGTC	TTCAAGATCG	GCGTGGGGGA	
Consensus	cAcAaaaTCG	GCcAGaAcaA	GaACcTgATc	TTCAAGATCG	GcaTcGGGGGA	
	501					550
RCA	AATTCCTT	TTCCATCAAG	TGACTTTCTC	GATCTGGCCG	GATGTGGCAA	
RSA	AGTGCCGTTC	GTCCAGCAGG	TTACCTTCTC	GATCTGGCCG	GACGCCCGCT	
Consensus	AaTgCCcTc	gTCCAgCAAg	TgACcTTCTC	GATCTGGCCG	GACgccccaa	
	551					600
RCA	AGATGAACGC	CTTCGCCCGC	GCGACACG-	--CCGCATGG	CAAGGCCATC	
RSA	CGATGGAGGA	GTTCCGCCCGC	GCGCCGGCG	GCCCCGCATGG	CGAGGCCGATC	
Consensus	aGATGaAcGa	cTTCGCCCGC	GCGaCacc.	..CCGCATGG	CaAGGCCATC	
	601					650
RCA	CGTGCTGCGC	GTGAAGAAGG	T'TGGTTCAAC	GAAGAACTCT	ATGCCCGGTT	
RSA	AAGGCCGTGC	GCGCCGAGAA	CTGGTTCAAG	GAGGAGCTTT	ATGCCCGCTT	
Consensus	aagGCcGcGC	GcGaaGAAAA	cTGGTTCAAc	GAaGaaCTcT	ATGCCCGcTT	
	651					700
RCA	CCGTTTGCTT	GGGACCGAGG	GAAGCTGGAT	GGGCAAGGAC	CCGCTCG---	
RSA	CCAGATTCTC	GGAACGATTG	GTAAGTGGGA	GGGCAAGGAC	CCGGTGGGCG	
Consensus	CCagaTgCTc	GGaACcaagG	GaAacTGGaa	GGGCAAGGAC	CCGcTcG...	
	701					750
RCA	-----	-----	-----	-----	-----	
RSA	AGGCGCTGAC	CGCACGCCCC	TCCGAGGCTC	CGAAACCCGC	TCCGGCACCG	
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	
	751					800
RCA	-----	-----	-----	-----	-----	
RSA	GCGGCAGCCC	AGCCCGCCCC	GGCGGCCGAA	GCTCCGAAGC	CTGCCCCGGC	
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	
	801					850
RCA	-----	-----	-----	-----	-----	
RSA	GCCGTCGCG	GAGAAGCCCG	CTCTCGCCGT	CGAGATGCCG	AAGCCCGCCG	
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	
	851					900
RCA	-----	-----	-----	-----	-----	
RSA	AGCCGCCGAA	GCCCCTGGTC	GAGGCCCGA	AACCCGCTTC	CGCTCCCGTG	
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	
	901					950
RCA	-----	-----	-----	-----	-----C	
RSA	GCCTCGAAGC	CGATGCCGCA	GGCGGGGAAG	CCGAACCTCA	AGGGCAAGCC	
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....C	
	951			981		
RCA	CAGCAAAGTC	TTGGAAAGGG	AAACTGCATG	A		
RSA	CGGCAAGGGC	GGCCGCAAAG	AGAACGCCTG	A		
Consensus	CaGCAAAGgC	ggccaaAaaG	AaAacGCaTG	A		

Abbildung 22: Sequenzalignment von *crtA* aus *Rhodobacter sphaeroides* (RSA) und *crtA* aus *Rhodobacter capsulatus* (RCA)

### **5.2.2 DNA SHUFFLING DER CRTA-GENE AUS RHODOBACTER SPHAEROIDES UND RHODOBACTER CAPSULATUS**

Zum Gene-shuffling wurden zunächst die beiden Gene RCA und RSA aus den Klonierungsvektoren pUC-RCA bzw. pUC-RSA mit den Primern pUCoutF und pUCoutR amplifiziert. Die Primer liegen jeweils ca. 300 bp oberhalb und unterhalb des zu amplifizierenden Gens. So sind beim anschließenden DNA shuffling die Austausch der Parental-Stränge über die gesamte Länge des Gens, mit Ausnahme des 300-bp-Endes des RSA, gewährleistet.

Das DNA shuffling wurde wie in 4.10.1.3 beschrieben, durchgeführt.

Zur Amplifikation der Assembly-Produkte wurden Primer verwendet, die weiter innen liegen als pUCoutR und pUCoutF, aber dennoch an der Vektorsequenz binden.

Nach erfolgter Amplifikation der shuffling-Produkte wurden die PCR-Produkte, die sich über einen Größenbereich von 800 bp bis 1 kb erstreckten, mit dem Wizard-PCR-Purification Kit gereinigt, mit *EcoRI* und *NcoI* verdaut und in den mit denselben Restriktionsenzymen und CIAP-behandelten Vektor pUCmodII ligiert.

Die Ligationsansätze wurden in JM109 transformiert, die bereits das Plasmid pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14, das zu einem Gemisch aus Lycopin, Didehydrolycopin und 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin führt, enthielten und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ligationsansatz transformiert, der kein Insert enthielt. Die Transformanten wurden auf Nitrocellulose-Filter übertragen und 24 Std bei 30°C inkubiert.

### **5.2.3 SCREENING AUF KLONE MIT VERÄNDERTER CAROTINOID-ZUSAMMENSETZUNG**

Das Screening auf Monooxygenase-Aktivität wurde visuell auf Nitrocellulose-Filtern durchgeführt.

Klone, die pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 und pUC-RCA oder pUC-RSA enthalten, sollten eine Rotfärbung zeigen, die von der Bildung unterschiedlicher Keto-Derivate von Lycopin oder Didehydrolycopin herrühren sollte.

Durch Mutagenese sollte erreicht werden, dass die Ketolase-Aktivität erhöht wird und dabei die Substratspezifität möglichst stark erweitert wird. Dies würde in der Einführung einer möglichst hohen Anzahl an Ketogruppen in die jeweiligen Substrate resultieren. Dabei würde

das Chromophor verlängert und damit das Absorptionsmaximum in den längerwelligen Bereich verschoben. Die Klone weisen dann eine intensivere Rotfärbung auf.

Ca. 50% der Klone wiesen eine Pinkfärbung auf, dabei handelte es sich um exakt dieselbe Farbe, die auftrat, wenn pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 allein in JM109 exprimiert wurde. Bei diesen Klonen war die Oxygenase inaktiviert worden.

#### **5.2.4 MUTANTEN-BIBLIOTHEKEN**

Insgesamt wurden 24 000 Klone der durch gene-shuffling generierten Mutantenbibliothek von RSA und RCA auf veränderte Carotinoid-Bildung gescreent. Dabei wies keiner eine dunklere Färbung auf, als wenn die jeweiligen Wildtypen in JM109 mit pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 transformiert wurden. Es war nicht gelungen, durch gene-shuffling Mutanten zu erzeugen, die sich visuell von den jeweiligen Wildtypen unterschieden.

##### **5.2.4.1 CHIMÄRENBILDUNG BEIM DNA SHUFFLING DER HOMOLOGEN GENE RCA UND RSA**

Um zu prüfen, ob beim DNA shuffling tatsächlich eine Chimärenbildung stattgefunden hat, wurden aus der *crtA*-Mutantenbibliothek zehn zufällig gepickte Klone sequenziert.

Nach dem Alignment der jeweiligen Sequenzen mit den beiden Wildtypsequenzen, das mit Hilfe von MULTALIN (Corpet, 1988) durchgeführt wurde, zeigte sich, dass es sich bei neun von zehn Klonen um *crtA* aus *Rhodobacter capsulatus* handelte, jedoch bei diesen neun Klonen eine sehr hohe Anzahl an Punktmutationen (teilweise über 50 Mutationen) auftrat. Bei fast allen sequenzierten Klonen fand sich lediglich ein 9 bp-Fragment, das aus *Rhodobacter sphaeroides* stammte, dies war in allen untersuchten Klonen dasselbe und hatte die Sequenz <sup>346</sup>AAACCCGCC<sup>354</sup>. Bei einem Klon handelte es sich um eine tatsächliche Chimäre, die ersten 539 bp stammten aus *Rhodobacter sphaeroides*, der Rest war eindeutig der Sequenz von *crtA* aus *Rhodobacter capsulatus* zuzuordnen. Somit entsprach die Gesamtlänge dem Gen von RCA.

### **5.2.5 VERÄNDERUNG DER $\beta$ -CAROTIN-KETOLASE *crtO* AUS *SYNECHOCYSTIS* SP. *PCC6903***

#### **5.2.5.1 KONSTRUKTION DER EXPRESSIONSKASSETTEN ZUR BILDUNG DES BENÖTIGTEN SUBSTRATS**

Um den Carotinoid Biosynthese Weg weiter zu verlängern, wurde in pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 ein weiteres Gen (*crtY*) kloniert. Dieses Gen codiert für die Lycopin- $\beta$ -Zyklase aus *Erwinia uredovora*, welche Lycopin zu  $\beta$ -Carotin umsetzt. Die Klonierung dieses Gens in den Vektor pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 ist in Abb. 23 dargestellt. Dazu wurde *crtY* (EUY) mit den Primern pUC-Sal-F und pUC-Sal-R, die vor dem modifizierten lac-Promotor und nach dem Terminator binden, aus pUC-EUY amplifiziert. Das PCR-Produkt (1,2 kb) wurde mit *SalI* geschnitten und in den Vektor pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14, der ebenfalls mit *SalI* und CIAP behandelt worden war, ligiert (Abb. 23). Das entstehende Plasmid wurde pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> genannt (Abb. 23).

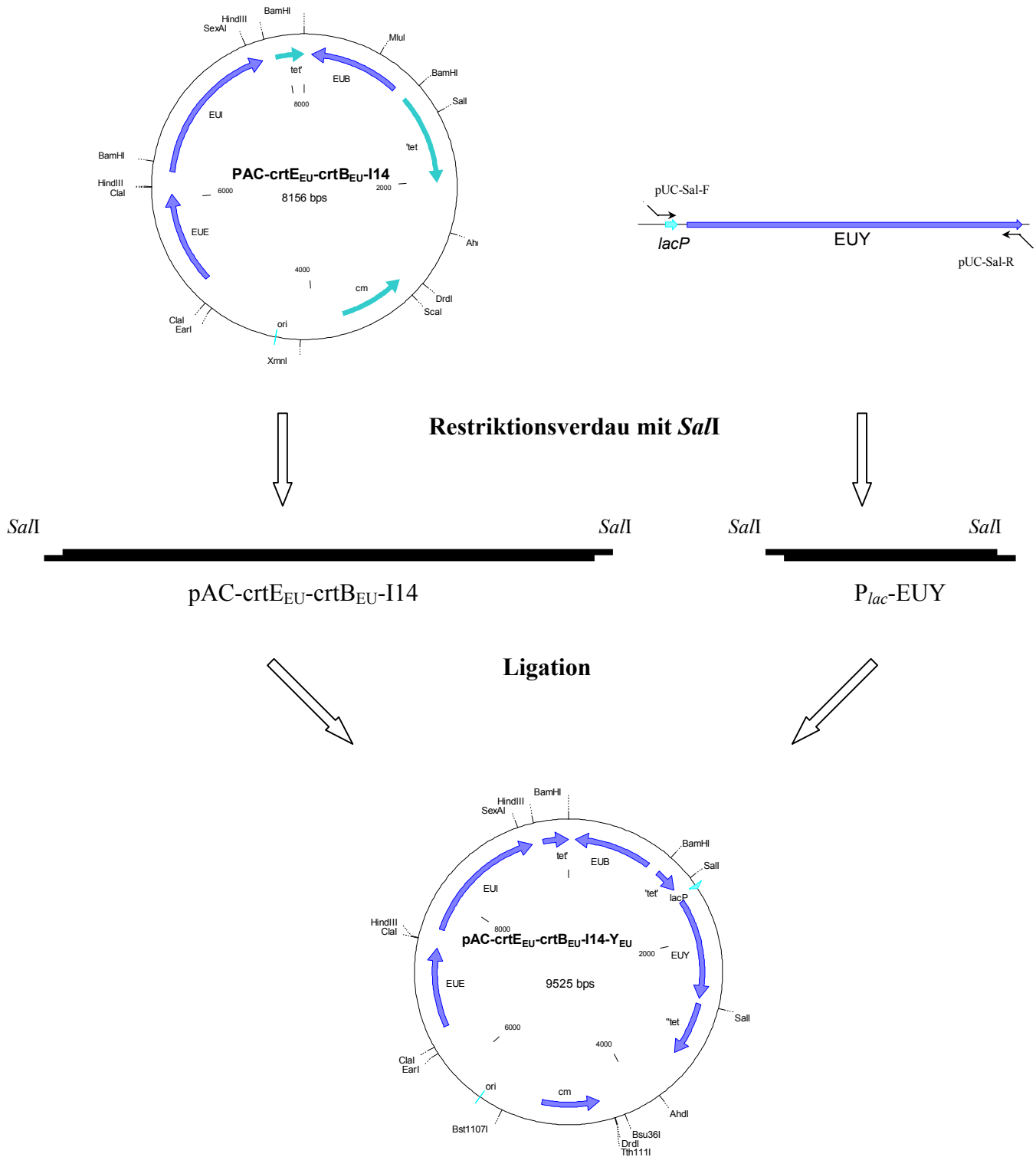
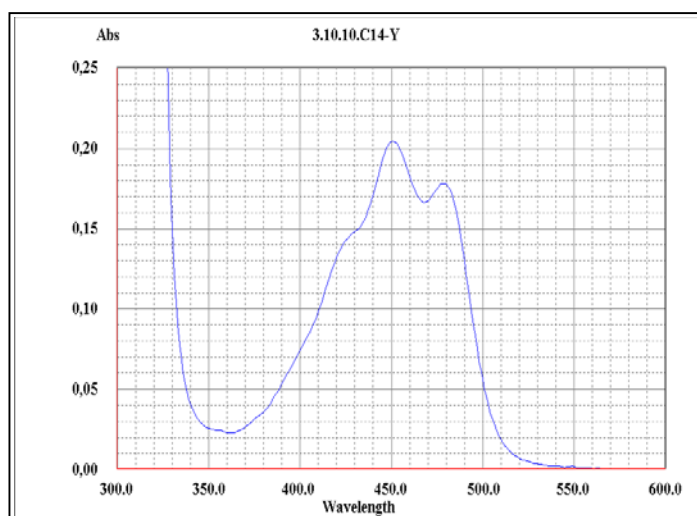


Abbildung 23: Schema zur Klonierung von EUY in pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14

Klone, die pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> enthalten, weisen eine Gelborangefärbung auf. Das UV/VIS-Spektrum des Hexanextraktes der Carotinoide, die in *E. coli* JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> gebildet werden, ist in Abb. 24 dargestellt.



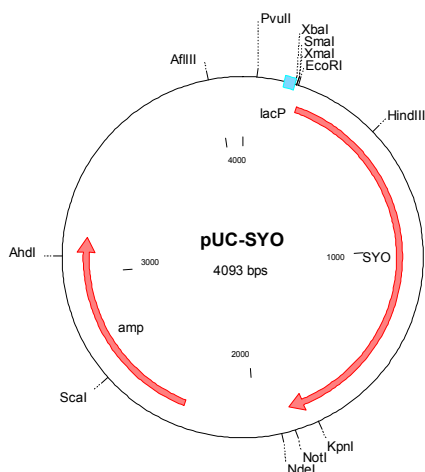
**Abbildung 24:** Hexanextrakt aus JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub>

Wie aus dem UV/VIS-Spektrum zu erkennen ist, liegt  $\lambda_{\max}$  bei 450 nm. Der Vergleich von Abb. 24 mit Abb.13A in der das UV/VIS-Spektrum von reinem  $\beta$ -Carotin in Hexan dargestellt ist, zeigt, dass die beiden Spektren identisch sind. Auch bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung entsprach das Laufverhalten des Carotinoid-Extrakts aus JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> dem von  $\beta$ -Carotin. In JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-Y<sub>EU</sub> wird demnach  $\beta$ -Carotin gebildet.

### 5.2.5.2 $\beta$ -CAROTIN-KETOLASE CRTO AUS SYNECHOCYSTIS SP. PCC6903

Die  $\beta$ -Carotin-Ketolase *crtO* aus *Synechocystis sp.* PCC6803 (SYO) katalysiert die Oxygenierung von  $\beta$ -Carotin zu Echinenon. Als Nebenprodukt entsteht in sehr geringer Menge das di-keto-Carotinoid Canthaxanthin (Abb. 4) (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997). SYO ist mit keiner der bisher charakterisierten Ketolasen (*crtW*) aus Algen und Bakterien strukturell oder auf Sequenzebene verwandt. Diese Ketolasen katalysieren die Oxygenierung an C4 und C4' von  $\beta$ -Carotin, was zur Bildung des di-keto-Carotinoids Canthaxanthin führt. Bei *CrtO* aus *Synechocystis sp.* PCC6803 handelt es sich um ein 59 kDa großes Enzym, das in *E. coli* funktionell exprimiert werden kann (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997).

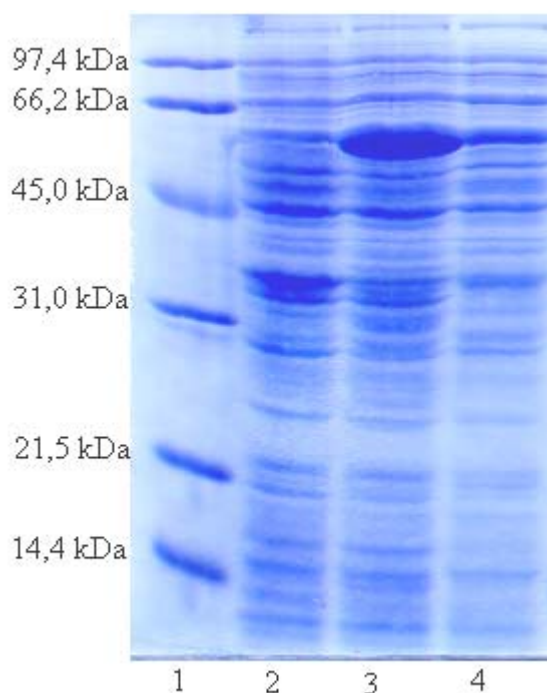
Zunächst wurde die Expression des Ketolase-Gens *crtO* in *E. coli* untersucht. Das Plasmid pUC-SYO (Abb. 25) war in vorhergehenden Arbeiten durch Amplifikation des *crtO*-Gens aus genomischer DNA von *Synechocystis sp.* PCC6803 und anschließender Ligation in den Vektor pUCmodII hergestellt worden (Schmidt-Dannert, unveröffentlicht). Durch die Verwendung von pUCmodII sollte eine konstitutive Expression möglich sein.



**Abbildung 25:** Plasmidkarte von pUC-SYO

pUC-SYO wurde in JM109-Zellen transformiert. Eine Kolonie wurde gepickt und die Kultivierung und Expression wurde wie in 4.8 beschrieben durchgeführt. Nachdem die Zellen abzentrifugiert und in Tris-HCl aufgenommen worden waren, wurde ein Aliquot abgenommen und der Rest wie in 4.8.2 beschrieben weiterbehandelt. Mit dem Kontrollansatz (JM109 mit pUCmodII) wurde analog verfahren.

Der Rohextrakt und der geklärte Rohextrakt wurden jeweils 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. 15 µl wurden auf ein 12,5%iges SDS Gel aufgetragen. Nach Gellauf und Coomassie-Färbung wurden die Banden untersucht (Abb. 26). Auf dem SDS-Gel ist in Spur 3 deutlich eine Bande bei 59 kDa zu sehen, die in Spur 2 fehlt. Die Expression von SYO findet also unter Kontrolle des konstitutiven lac-Promotors statt. Nur ein sehr geringer Teil der in *E. coli* exprimierten Ketolase liegt löslich vor (Abb. 26, Spur 4). Der größte Anteil der in *E. coli* exprimierten Ketolase (SYO) ist unlöslich (Abb. 26, Spur 3) und liegt wahrscheinlich membrangebunden vor, da bei mikroskopischer Untersuchung des Coomassie angefärbten Ausstrichpräparats Inclusion bodies nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten.



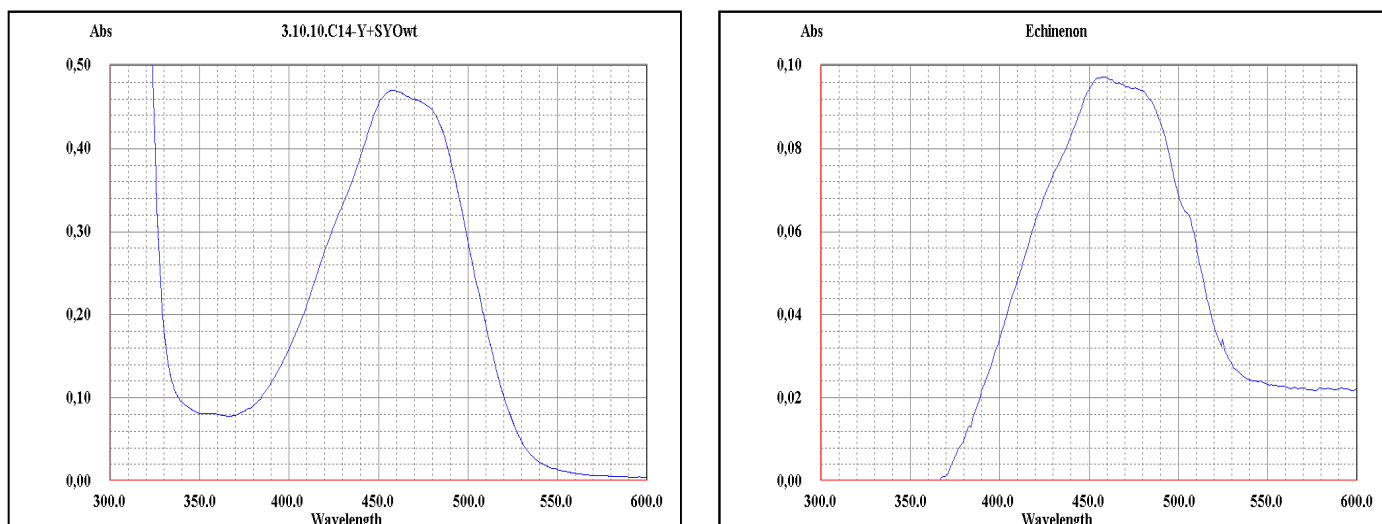
**Abbildung 26:** SDS-PAGE der *E. coli* Zellysate nach Expression von SYO in JM109  
1, LMW-Standard; 2, Rohextrakt pUCmodII; 3, Rohextrakt pUC-SYO; 4, Überstand SYO

Durch error-prone PCR des SYO-Gens und anschließendes Komplementationesscreening der erzeugten Mutantenbibliothek in pUCmodII mit pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> (Abb. 23) sollten Varianten isoliert und charakterisiert werden, die neben  $\beta$ -Carotin auch Echinenon als Substrat verwenden können und so zu Canthaxanthin als Hauptprodukt führen.

### 5.2.6 CAROTINOIDE AUS JM109-PAC-CRTE<sub>EU</sub>-CRTB<sub>EU</sub>-I14-CRTY<sub>EU</sub> + PUC-SYO

Zur Kontrolle wurden JM109-pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + pUC-SYO in LB-Cm-Amp angeimpft und 48 Std bei 30°C im Schüttler inkubiert. Nach Zellernte und Extraktion der Carotinoide mit Aceton und Hexan wurde ein UV/VIS-Spektrum in Hexan aufgenommen (Abb. 27A) Dieses Spektrum entspricht dem von Echinenon (Reinsubstanz (Abb. 27B)) in Hexan. Die Spektren beider Proben zeigen ein Absorptionsmaximum  $\lambda_{\max} = 455$  nm. Zur Kontrolle der Reinsubstanz war diese in Aceton gelöst und ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen worden. Dieses Spektrum hatte ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\max} = 460$  nm, was der Literaturangabe (Britton *et al.*, 1995) entspricht.





(A)

(B)

**Abbildung 26:** UV/VIS-Spektren des Hexanextraktes von (A): JM109-pAC-crt<sub>EU</sub>-crt<sub>BEU</sub>-I14-crt<sub>Y<sub>EU</sub></sub> + pUC-SYO und (B):Echinon

### 5.2.7 SCREENING AUF BILDUNG VON CANTHAXANTHIN

Das Screening auf Ketolase-Aktivität wurde visuell auf Nitrocellulose-Filtern durchgeführt. Klone, die den SYO-Wildtyp in Komplementation mit pAC-crt<sub>EU</sub>-crt<sub>BEU</sub>-I14-crt<sub>Y<sub>EU</sub></sub> trugen, zeigten eine Orangefärbung, die von der Bildung von Echinon herrührt. Wird jedoch durch Mutagenese erreicht, dass eine zweite Ketogruppe eingeführt wird, also mehr Canthaxanthin gebildet wurde, so erscheint der entsprechende Klon eher rötlich – rosa, weil durch die Verlängerung des Chromophors das Absorptionsmaximum in den längerwelligen Bereich verschoben wird.

### 5.2.8 VARIATION DER ERROR-PRONE PCR-BEDINGUNGEN

Zunächst wurde das SYO-Gen aus dem Plasmid pUC-SYO (s. Abb. 25) unter mutagenen PCR-Bedingungen wie in 4.10.1.2 beschrieben, mit den Primern pUCoutF und pUCoutR, die ca. 300 bp oberhalb und unterhalb des SYO-Gens liegen, amplifiziert.

Die Lage der Primer gewährleistet einerseits die Verteilung der Mutationen innerhalb des Ketolase-Gens, andererseits kann so der vollständige Verdau des Fragments mit den zur Klonierung eingesetzten Restriktionsenzymen überprüft werden. Die Primer liegen so weit

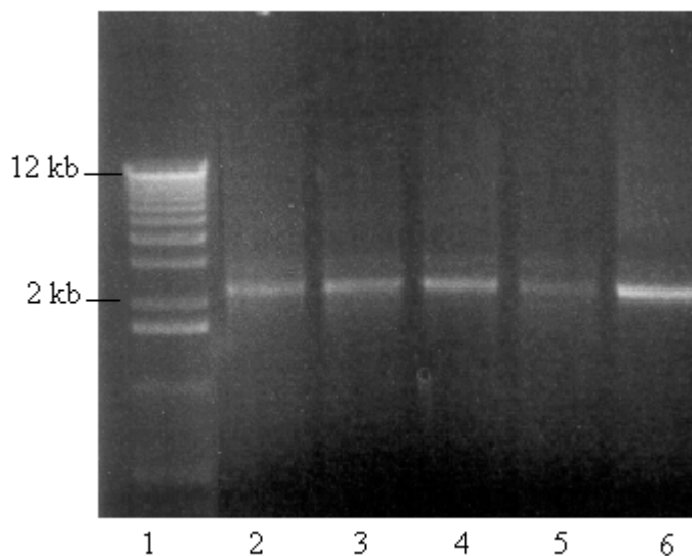
außerhalb des Gens, dass 300 bp-Fragmente und eine Größenänderung des PCR-Fragments nach dem Restriktionsverdau auf dem Agarosegel zu beobachten ist.

Für die PCR wurden jeweils vier Reaktionen eingesetzt, wovon bei jeder im Nukleotid Mix ein Nukleotid im zehnfachen Unterschuss vorlag.

Mit diesen Ansätzen konnte jedoch bei einer Annealingtemperatur von 52°C extrem wenig PCR-Produkt erhalten werden, wohingegen im Kontrollansatz (alle dNTPs 2,5 mM) ein Amplifikat der richtigen Größe erhalten wurde. Daher wurden die mutagenen Bedingungen verändert. Es wurden vier Reaktionen angesetzt, bei denen jeweils eines der vier Nukleotide im fünffachen Unterschuss vorlag, d.h. jeweils drei Nukleotide 2,5 mM und eines der Nukleotide 0,5 mM.

Außerdem wurde, um die Mutationsrate zu erhöhen, den PCR-Ansätzen  $MnCl_2$  in verschiedenen Konzentrationen (10  $\mu M$ , 25  $\mu M$ , 50  $\mu M$ , 100  $\mu M$ ) zugegeben.

Unter diesen Bedingungen war es möglich, bei allen Ansätzen ein PCR-Produkt der richtigen Größe zu erhalten (Abb. 28)



**Abbildung 28:** 1% Agarosegel: Amplifikation des SYO-Gens unter mutagenen Bedingungen (jeweils ein Nukleotid im fünffachen Unterschuss, mit 100  $\mu M$   $MnCl_2$ )  
 1, kb-ladder; 2, -A-Mix; 3, -C-Mix; 4, -G-Mix; 5, -T-Mix; 6, Kontrolle mit allen dNTPs in gleicher Konzentration

Nach erfolgter PCR wurden jeweils die vier Ansätze mit derselben  $MnCl_2$ -Konzentration gepoolt, mit *EcoRI* und *NotI* verdaut und in den mit denselben Restriktionsenzymen und CIAP behandelten Vektor pUCmodII ligiert. So bleiben Promotor und Terminator des

Vektors erhalten. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* JM109 transformiert, die bereits das Plasmid pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> enthielten, auf LB-Cm-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Genprodukte von pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> führen zur Bildung von  $\beta$ -Carotin und damit zu einer Gelbfärbung des entsprechenden Klons. Die Transformanden wurden auf Nitrocellulose-Filter übertragen und anschließend 24 Std. bei 30°C inkubiert. JM109-pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub>, die kein pUC-Derivat aufgenommen haben, wachsen aufgrund des Selektionsdrucks des Ampicillins nicht an. Durch Kontrolltransformation (Ligation ohne Insert) wurde gezeigt, dass keine Religanden entstanden waren. Religanden des Vektors würden auch dazu führen, dass die entsprechenden Klone gelborange bleiben, da die Ampicillinresistenz zwar gegeben ist, jedoch die Ketolase für den weiteren Umsatz des  $\beta$ -Carotins fehlt. Die Gelborangefärbung der Klone ist somit allein darauf zurückzuführen, dass die Ketolase durch Mutagenese inaktiviert wurde und so das  $\beta$ -Carotin, das zu der Gelborangefärbung führt, nicht weiter umsetzen kann. Bei einer MnCl<sub>2</sub>-Konzentration von 100  $\mu$ M wiesen ca. 20% der Klone eine Gelbfärbung und damit eine Inaktivierung der Ketolase auf. Die „Inaktivierungsrate“ liegt somit in dem Bereich, bei dem von einer Mutation pro Gen ausgegangen werden kann. Dies sollte für das SYO-Gen geeignet sein.

### **5.2.9 BESTIMMUNG DER MUTATIONSRATE**

Um die Mutationsrate zu bestimmen, wurden neun zufällig gepickte Klone der wie in 5.2.8 hergestellten Mutantenbibliothek sequenziert.

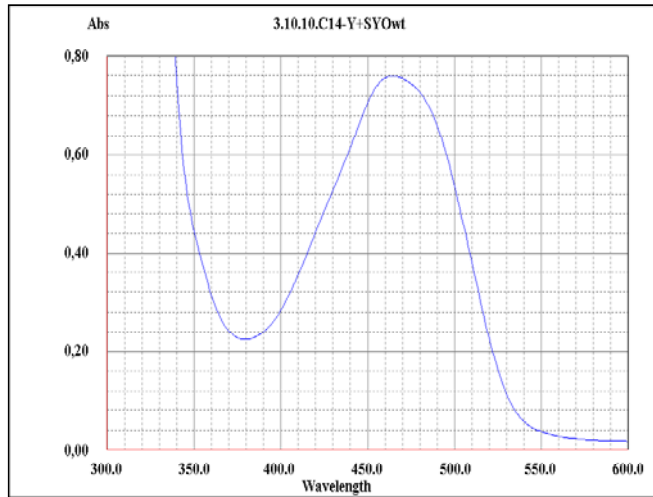
Dabei zeigte sich, dass bei 14 661 sequenzierten bp 33 Mutationen eingeführt wurden, dies entspricht einer Mutationsrate von einer Mutation pro 444 bp. Ein Klon besaß eine Mutation, zwei Klone wiesen zwei Mutationen auf, ein weiterer Klon wies vier Mutationen auf, ein weiterer fünf. Ein Klon besaß neun Mutationen und einer zehn. Da Mutationen eingeführt wurden, sollten in der Mutantenbibliothek auch Varianten mit veränderten Eigenschaften vorhanden sein.

### 5.2.10 MUTANTEN-BIBLIOTHEKEN

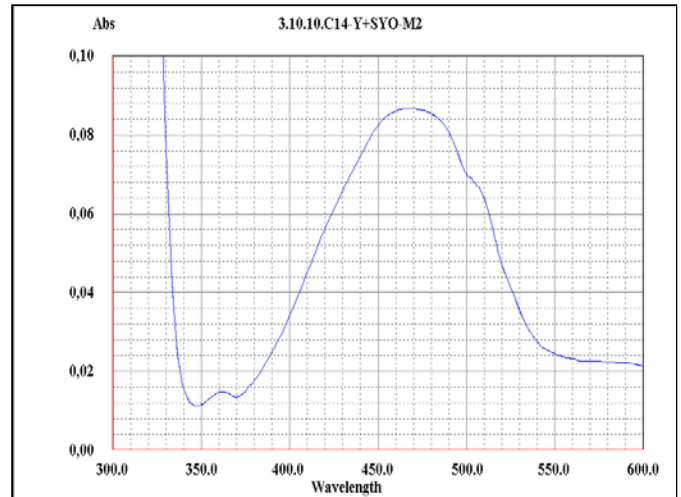
Unter 35 000 gescreenten Klonen trat bei keinem eine Farbänderung von orange nach rot/rosa auf. Daher kann davon ausgegangen werden, dass keiner die Eigenschaft besaß, Canthaxanthin anstatt Echinenon als Hauptprodukt zu bilden. Dies legte den Schluß nahe, dass mehr Mutationen involviert sein müssen, um die Substratspezifität zu ändern, daher wurde eine error-prone PCR durchgeführt, deren Produkte direkt ohne vorherige Klonierung einem DNA shuffling unterworfen wurden. So sollten Mutationen kombiniert werden, die eine so starke Änderung der Ketolase hervorrufen, dass sie in der Lage ist, Canthaxanthin anstatt Echinenon zu bilden.

Das SYO-Gen wurde unter error-prone Bedingungen (ein Nucleotid im fünffachen Unterschub, Zugabe von 100  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>) amplifiziert und die PCR-Produkte mit DNaseI verdaut. Anschließend wurde eine Assembly-PCR durchgeführt, durch welche die DNase-Fragmente rekombinieren. Danach wurde eine PCR mit weiter innen liegenden Primern durchgeführt, um das SYO-Gen in voller Länge zu amplifizieren. Die Klonierung in pUCmodII und das anschließende Screening erfolgte wie oben beschrieben.

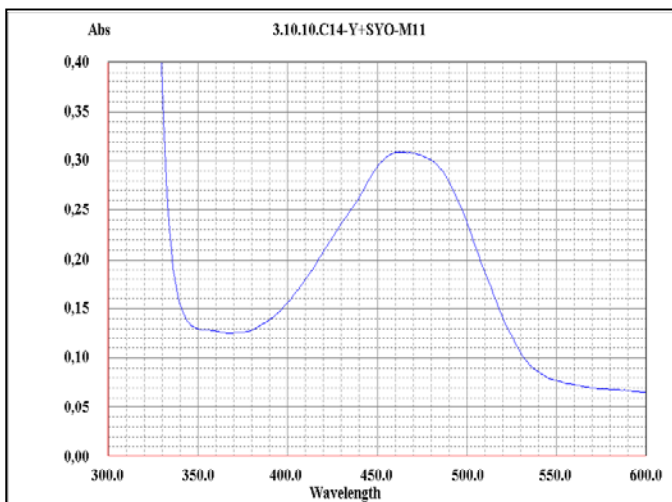
3 000 auf diese Weise erzeugte Klone wurden gescreent. Ca. 99% der Klone wiesen eine deutliche Gelborangefärbung auf, die auf die Inaktivierung der  $\beta$ -Carotin-Ketolase zurückzuführen ist. Die wenigen Klone, jedoch, die noch Ketolase-Aktivität zeigten, wiesen eine im Vergleich zu der zuvor durch error-prone PCR erzeugten Bibliothek veränderte Färbung auf. Zwölf dieser Klone wurden gepickt und in je 5 ml LB-Cm-Amp zunächst über Nacht bei 37°C inkubiert. Dies sollte zu einem verbesserten Zellwachstum führen, wodurch eine höhere Zellmasse erreicht werden kann. Dadurch könnten nach Expression der crt-Gene bei 30°C für zwei Tage die Zellpellets intensiver gefärbt und kleine Farbunterschiede eventuell leichter sichtbar sein. Wie in Abschnitt 5.2.1.2 gezeigt, ist es möglich, Carotinoid-bildende Zellen zunächst bei 37°C zu inkubieren und die eigentliche Carotinoid-Bildung bei niedrigerer Temperatur durchzuführen. Zur Kontrolle wurden mit pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> und dem SYO-Wildtyp cotransformierte *E. coli* vom Glycerolstock aus auf dieselbe Weise kultiviert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, die Pigmente mit Aceton und n-Hexan extrahiert und ein UV/VIS-Spektrum in Hexan aufgenommen (Abb. 29 A - D).



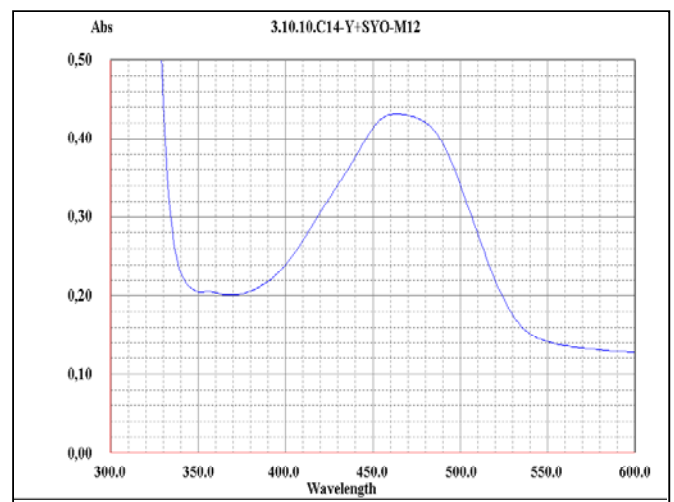
(A)



(B)



(C)



(D)

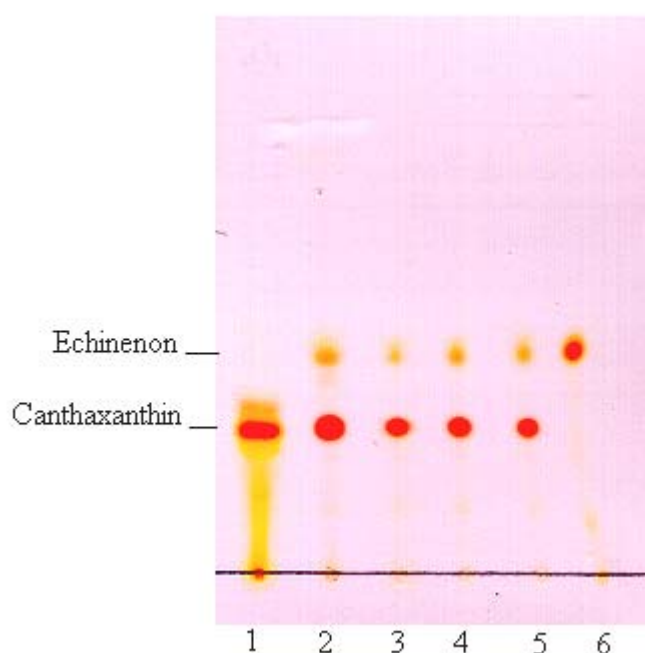
**Abbildung 29:** UV/VIS-Spektrum von (A) Hexanextrakt aus JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + pUCSYO-WT (B) Hexanextrakt aus pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub>+SYO M2; (C) Hexanextrakt aus pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub>+SYO M11; (D) Hexanextrakt aus pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub>+SYO M12

Wie aus den Abbildungen 29 A-D ersichtlich ist, sind alle Spektren, interessanterweise auch das des SYO-Wildtyps praktisch identisch. Die Klone M2, M11 und M12 wie auch der SYO-Wildtyp zeigen alle gegenüber dem UV/VIS-Spektrum in Abb. 29A ein verändertes Spektrum, bei dem  $\lambda_{\max}$  weniger scharf und in den längerwelligen Bereich bei 460 nm - 470 nm verschoben ist (Abb. 29B). Zuvor war eindeutig gezeigt worden, dass der SYO-Wildtyp unter den vorherigen Bedingungen Echinenon als Hauptprodukt bildet (Abb. 27A), was auch den publizierten Daten (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997) entspricht. Jedoch wird von diesen

Klonen und vom SYO-Wildtyp aufgrund veränderter Kultivierungsbedingungen Echinenon nicht mehr als Hauptprodukt gebildet.

### 5.2.11 DC-ANALYTIK DER MUTANTEN

Um zu prüfen, welches Gemisch von Pigmenten in den Mutanten M2, M11 und M12 vorliegt, wurden die Pigmente mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, nachdem die Hexanextrakte der Mutanten M2, M11, M12 und der SYO Wildtyp unter Stickstoff eingengt wurden. Dabei handelte es sich um Extrakte, die nach Kultivierung bei 37°C über Nacht und anschließender Kultivierung bei 30°C für zwei Tage hergestellt wurden. Als Referenz wurden Canthaxanthin und Echinenon (Reinsubstanzen) aufgetragen (Abb. 30). Als Laufmittel wurde zunächst n-Hexan:Aceton 25:1 eingesetzt bis die Lauffront 2/3 der Strecke gelaufen war, dann wurde n-Hexan:Aceton 5:1 als Laufmittel verwendet.



**Abbildung 30:** Dünnschichtchromatogramm der durch SYO-Mutanten gebildeten Carotinoide mit Canthaxanthin und Echinenon als Referenz (Kultivierung 37°C über Nacht, dann zwei Tage 30°C).

1, Canthaxanthin; 2, JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + SYO-WT; 3, JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + SYO-M2; 4, JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + SYO-M11; 5, JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + SYO-M12; 6, Echinenon

Bei allen vier Proben sind deutlich zwei Spots erkennbar. Bei dem Spot mit der größeren Laufstrecke handelt es sich um Echinenon (s. Abb 30, Spur 6). Bei dem Spot mit der kleineren Laufstrecke handelt es sich aufgrund der höheren Polarität um Canthaxanthin (s. Abb. 30, Spur 1). Es wird deutlich, dass bei allen drei Mutanten und dem SYO-Wildtyp das Verhältnis Canthaxanthin : Echinenon ca. 2:1 beträgt, also ein beträchtlicher Anteil Canthaxanthin gebildet wird.

### **5.2.12 NUKLEOTIDSEQUENZ DER MUTANTEN**

Die Mutanten M2, M11 und M12 wurden dennoch zur Identifizierung von eventuell eingeführten Punktmutationen sequenziert. Durch eine entsprechende Auswahl der Sequenzierprimer wurde eine Überlappung der sequenzierten Bereiche erreicht.

In keinem der Klone konnte eine Mutation im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz festgestellt werden.

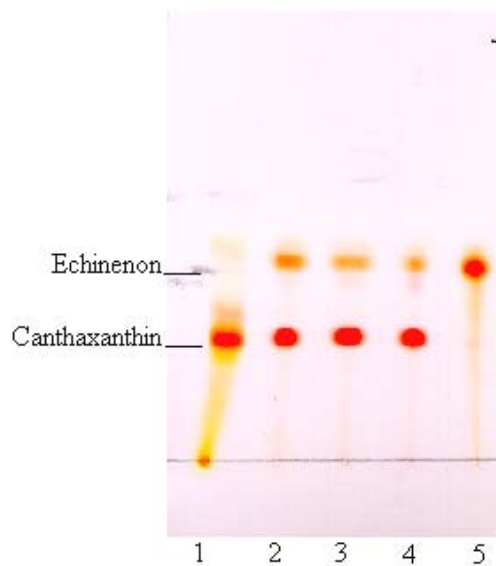
Dies legt den Schluß nahe, dass die vermehrte Bildung von Canthaxanthin auf die in diesem Screening veränderten Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sind.

### **5.2.13 WEITERE UNTERSUCHUNGEN DER $\beta$ -CAROTIN KETOLASE AUS *SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803***

Da nun eindeutig gezeigt worden war, dass der SYO-Wildtyp  $\beta$ -Carotin auch zu Canthaxanthin umsetzen kann, wurden die Bedingungen, die zu einer vermehrten Canthaxanthin-Bildung führen, näher untersucht.

Da bei Verwendung von gepuffertem LB-Medium allgemein eine etwas stärkere und besser reproduzierbare Färbung von carotinoid-bildenden Klonen zu beobachten war als bei ungepuffertem Medium, wurde zunächst geprüft, ob der pH-Wert des Mediums (LB) einen Einfluß auf die Canthaxanthin-Bildung hat. Dazu wurde die Kultivierung von JM109-pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + pUC-SYO bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. LB-Medium wurde mit jeweils 20 mM Na-Phosphatpuffer auf die pH-Werte 6,5, 7,5 und 8,5 eingestellt. So ist eine Pufferung des Mediums gewährleistet und es kann zu keinen pH-Verschiebungen durch die Stoffwechselftigkeit von *E. coli* kommen. Die verschiedenen Ansätze wurden nach 16 stündiger Inkubation bei 37°C weitere 48 Std bei 30°C kultiviert.

Nach anschließender Extraktion der Carotinoide wie in 4.12.1 beschrieben, wurden die Pigmente mittels DC aufgetrennt (Abb. 31).



**Abbildung 31:** DC der Hexanextrakte aus JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + pUC-SYO nach Kultivierung bei unterschiedlichen pH-Werten  
1, Canthaxanthin, 2, pH 6,5; 3, pH 7,5; 4, pH 8,5; 5, Echinenon

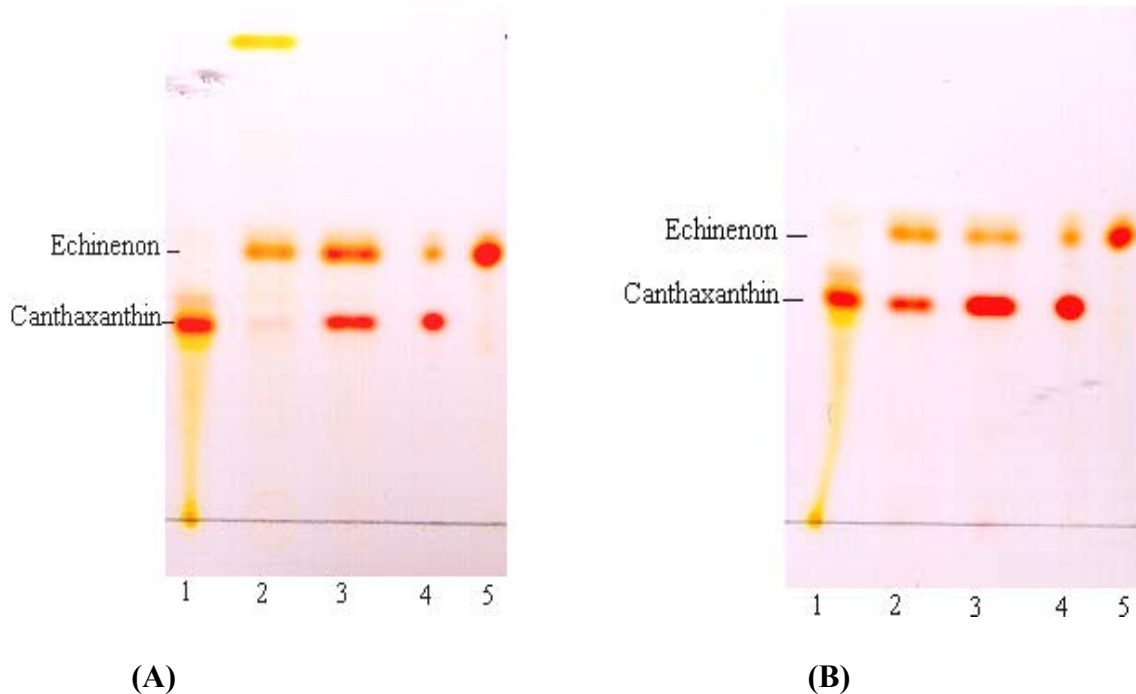
In Abb. 31 ist zu sehen, dass die Zusammensetzung der Carotinoid-Gemische bei allen drei Ansätzen nahezu identisch ist. Das bedeutet, dass der pH-Wert des Kultivierungs-Mediums keinen nennenswerten Einfluß auf die Bildung von Canthaxanthin hat.

Danach wurden verschiedene Medien und veränderte Kultivierungsbedingungen untersucht. Dazu wurde JM109-pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + pUC-SYO in verschiedenen Medien kultiviert.

- a. LB (ungepuffert)
- b. LB-Cas
- c. M9-Minimal-Medium (C-Quelle Glucose)

Dabei wurde jede Kultur doppelt angesetzt, jeweils ein Ansatz wurde 64 Std bei 30°C inkubiert (A), der jeweils andere Ansatz wurde zunächst 16 Std. bei 37°C kultiviert und danach 48 Std bei 30°C. Nach anschließender Extraktion der Pigmente wurden diese im DC aufgetrennt (Abb. 32).





**Abbildung 32:** DC der Hexanextrakte von JM109 pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + pUC-SYO nach unterschiedlicher Kultivierung  
 1, Canthaxanthin; 2, LB-Medium; 3, LB-Cas-Medium; 4, Minimalmedium; 5, Echinenon  
 (A): 64 Std. 30°C, (B): 16 Std. 37°C, dann 48 Std. 30°C

Bereits die Zellpellets unterschieden sich optisch durch ihre Farbigkeit, dabei waren die Zellen, die in LB unter den Bedingungen A kultiviert worden eher orange, die Zellen, die in LB-Cas unter den Bedingungen B kultiviert wurden, wiesen den intensivsten Rotton auf. Alle anderen waren lachsfarben. Durch den optischen Vergleich der Spots ist in Abb. 32 deutlich zu sehen, dass unter beiden Kultivierungsbedingungen der Canthaxanthin-Anteil relativ zu Echinenon unter Verwendung von LB-Cas und Minimalmedium höher ist, als unter Verwendung von LB. In Abb. 32, Spur 2 (A) ist nur sehr wenig Canthaxanthin zu sehen. Es ist ein deutlicher Spot auf der Höhe von Echinenon zu sehen und weiter oben ein gelber Spot, bei dem es sich aufgrund der geringen Polarität um  $\beta$ -Carotin handeln könnte. Auch in Abb 32, Spur 2 (B) ist die Canthaxanthin-Menge relativ zur Echinenon-Menge geringer als bei den beiden anderen Proben.

Durch die Variierung der Kultivierungsbedingungen (Verwendung von LB-Cas als

Kultivierungsmedium unter den Bedingungen (B)) können also aus *E. coli* JM109-pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> + pUC-SYO beträchtliche Mengen an Canthaxanthin gewonnen werden.

## 6 DISKUSSION

Carotinoide werden derzeit als Tierfutterzusatz, Nahrungsergänzungsmittel und für pharmazeutische und kosmetische Produkte eingesetzt. Dabei werden die meisten industriell genutzten Carotinoide ( $\beta$ -Carotin, Astaxanthin und Canthaxanthin) durch chemische Synthese hergestellt (Johnson und Schroeder, 1996). Der Nachfrage und dem Markt für Carotinoide steht jedoch eine Veränderung bevor in Hinblick darauf, dass Carotinoide auf das Tumorstadium hemmend wirken und eine wichtige Rolle bei der Vorbeugung chronischer Krankheiten spielen. Neben der antioxidativen Wirkung wurden weitere unerwartete Eigenschaften von Carotinoiden entdeckt, die das Interesse an dem pharmazeutischen Potential dieser Stoffe steigerten. Das Angebot strukturell verschiedener Carotinoide für medizinische Zwecke ist gering, darüber hinaus ist nur eine begrenzte Anzahl von Carotinoiden chemisch herzustellen, aus natürlichen Quellen zu isolieren oder zu fermentieren (Schmidt-Dannert, 2000).

Bisher wurden über 150 *crt*-Gene, die für 24 Crt-Enzyme codieren, aus Bakterien, Algen Pilzen und Pflanzen isoliert. Diese Gene können eingesetzt werden um eine Vielzahl verschiedener Carotinoide in rekombinanten Mikroorganismen herzustellen.

In der vorliegenden Arbeit sollten einerseits neue Carotinoid Biosynthese-Gene aus unkultivierbaren Mikroorganismen isoliert werden. Andererseits sollten bereits klonierte Carotinoid Biosynthese Gene durch „gerichtete Evolution“ so verändert werden, dass neue Carotinoide daraus resultieren.

### 6.1 ERHÖHUNG DER MIKROBIELLEN DIVERSITÄT VON CAROTINOIDEN

Unkultivierbare Mikroorganismen stellen ein fast unerschöpfliches Potential für die Auffindung neuer Biokatalysatoren dar, da nur 0,1 – 5% der Mikroorganismen beschrieben bzw. bisher kultivierbar sind (Bakken, 1985; Bull, 1992).

Es wurden bereits neue Esterasen, Lipasen und Amylasen aus unkultivierbaren Mikroorganismen isoliert, indem die DNA direkt aus Bodenproben isoliert wurde und damit Expressionsgenbanken erzeugt wurden (Henne *et al.*, 1999; Henne *et al.*, 2000; Rondon *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit sollten durch Komplementationsscreening mit den frühen Enzymen der Carotinoid Biosynthese CrtB und CrtE die zum farblosen Produkt Phytoin führen, Teile aus

Gen-Clustern gefunden werden, die zur Bildung neuer Carotinoide führen.

### **6.1.1 DNA-ISOLIERUNG AUS BODENPROBEN**

Zunächst sollten verschiedene Protokolle zur Isolierung von DNA aus Bodenproben (Short und Mathur, 1998) hinsichtlich der zu erreichenden Ausbeute, der Reinheit der DNA und der Fragmentierung verglichen werden. Dabei zeigte sich, dass durch die Methode nach Zhou DNA in hoher Ausbeute isoliert werden kann und der Fragmentierungsgrad gering ist. Jedoch ist die isolierte DNA zunächst stark mit Huminstoffen verunreinigt, welche Restriktionsspaltungen und PCR-Reaktionen in hohem Umfang stören. Die Verunreinigung mit Huminstoffen ist durch die Braunfärbung der DNA-Lösung sichtbar. Wird die DNA aus Bodenproben mit Hilfe der Methode nach Moré isoliert, so war DNA in hoher Ausbeute und verhältnismäßig hoher Reinheit zu isolieren. Hier war jedoch der Fragmentierungsgrad der DNA aufgrund der Scherkräfte, die durch die Bewegung der Glasperlen in der Mühle herrschen, höher. Dennoch war die isolierte DNA nicht so stark geschert, dass eine anschließende Klonierung unmöglich wäre.

Des Weiteren hat sich bei der Methode nach Tsai gezeigt, dass DNA effizient und wenig fragmentiert aus Bodenproben isolierbar ist. Hier trat jedoch auch eine stärkere Scherung der DNA auf als bei der Methode nach Zhou, wobei die prinzipiellen Schritte des Zellaufschlusses bei beiden Methoden (enzymatische Lyse, Frier-Tau-Zyklen, SDS-Behandlung) ähnlich waren.

Die Methoden nach Picard, Diversa, Porteous und Volossiuk wurden nicht weiter untersucht. Bei der Methode nach Picard war die Fragmentierung der DNA zu stark, um die isolierte DNA für die Erstellung von Genbanken einsetzen zu können. Mit der Methode, die im Patent der Firma Diversa beschrieben war, konnte kaum DNA isoliert werden, auch die DNA-Isolierungsmethode nach Porteous brachte zu geringe Ausbeuten, um mit der DNA weiterarbeiten zu können. Die Methode nach Volossiuk ergab in Kontrollexperimenten oftmals sehr hohe Ausbeuten an DNA, jedoch zeigte sich bei mehrmaliger Wiederholung der Versuche, dass sowohl die Ausbeute als auch der Fragmentierungsgrad der DNA nicht reproduzierbar war. Die Fragmentierung war in einigen Fällen dabei so stark, dass die isolierte DNA nicht mehr für die Erstellung von Genbanken geeignet war. Um mit der isolierten DNA Genbanken erstellen zu können, sollten die Fragmente eine Mindestgröße von 10 kb aufweisen, damit überhaupt die Möglichkeit besteht, dass die DNA Fragmente nach der

Restriktionsspaltung an beiden Enden geschnitten und somit ligierbar sind.

Bei der Untersuchung der bakteriellen Diversität in Bodenproben durch 16S rDNA-Analyse oder „ribosomal intergeneric spacer analysis“ (RISA) hat sich gezeigt, dass die gefundene Zusammensetzung der Bakterien-DNA von der jeweils angewandten DNA-Extraktionsmethode beeinflusst wird (Martin-Laurent *et al.*, 2001). Um zu prüfen, ob Mikroorganismen selektiv mit einer der Methoden aufgeschlossen werden können, wurden zunächst Reinkulturen von *Rhodococcus*, *Arthrobacter* und *Pseudomonas* zur DNA-Isolierung mittels der Methoden nach Zhou und Moré eingesetzt. Dabei wurde *Pseudomonas* als Vertreter für Gram-negative Bakterien gewählt, *Arthrobacter* und *Rhodococcus* als Vertreter für GC-reiche, Gram-positive Bakterien (Actinomyceten).

Die modifizierte Methode nach Zhou ist für die Isolierung von DNA aus den meisten Böden geeignet, da DNA sehr effizient isoliert werden kann. Dabei werden die Zellen mit Hilfe von SDS und hohen Salzkonzentrationen aufgeschlossen. Jedoch scheint diese Methode für den Aufschluß einiger Gram-positiver Bakterien nicht geeignet zu sein (Zhou *et al.*, 1996). Dieser Befund wurde experimentell bestätigt. Es war nicht möglich –trotz zusätzlicher Behandlung durch Frier-Tau-Zyklen, *Arthrobacter* und *Rhodococcus*-Reinkulturen aufzuschließen. Erwartungsgemäß waren Reinkulturen mit dem Zusatz von Bodenpartikeln ebenfalls nicht aufzuschließen. Jedoch konnte unter Anwendung der Methode nach Zhou DNA aus *Pseudomonas* sehr effizient isoliert werden. Mit der Methode nach Moré ist bei Verwendung der Reinkulturen ohne Zusatz von Bodenpartikeln aus allen drei getesteten Stämmen DNA mit hoher Effizienz isolierbar. Durch die starke mechanische Wirkung der Glasperlen in der Kugelmühle werden selbst die massiven Zellwände der Actinomyceten aufgebrochen. Wurden die realen Verhältnisse nachgestellt, indem zu den Reinkulturen autoklavierte Erde gegeben wird, so zeigte sich, dass aus *Pseudomonas* die DNA weiterhin sehr effizient isoliert werden konnte. Aus *Arthrobacter* und *Rhodococcus*-Zellen verringerte sich die DNA-Ausbeute jedoch stark. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Bodenpartikel die Glasperlen „abbremsen“ und diese nicht mehr so massiv auf die Zellen einwirken können, dass die Zellwand zerstört wird.

Somit wurde gezeigt, dass mit der Methode nach Moré auch die GC-reichen, Gram-positiven Actinomyceten aufgeschlossen werden können, was mit der Methode nach Zhou nicht möglich ist.

Dennoch kann man nicht davon ausgehen, mit der Methode nach Moré alle im Boden lebenden Mikroorganismen aufzuschließen zu können. Viele der im Boden befindlichen

Bakterien werden zwar aufgeschlossen, die sehr kleinen Zellen (1,2  $\mu\text{m}$  – 0,3  $\mu\text{m}$  Länge) bleiben jedoch intakt (More *et al.*, 1994). Ein beträchtlicher Anteil der Boden-Bakterien (50%) jedoch hat einen Durchmesser von  $< 0,5 \mu\text{m}$  (Olsen und Bakken, 1987). Daher kann man auch nicht allein anhand der zugefügten Mikroorganismen Rückschlüsse auf die Empfindlichkeit aller unkultivierbaren Zellen im Boden gegenüber der Aufschlussmethode machen. Weiterhin ist zu bedenken, dass selbst bei einer Extraktionseffizienz von 99,9%, ausgehend von  $10^9$  Zellen / g Bodenprobe,  $10^6$  Zellen intakt bleiben (More *et al.*, 1994).

### **6.1.2 OPTIMIERUNG DER METHODE NACH MORÉ DURCH DIREKTE SILICA-REINIGUNG**

Huminstoffe sind hochmolekulare Verbindungen, die aromatische Ringe, Stickstoff in zyklischer Form und in Peptidketten enthalten (Paul und Clark, 1989). Bei der Extraktion von DNA werden sie mit extrahiert, da sie ähnliche physiko-chemische Eigenschaften aufweisen (Holben, 1994). Sie sind problematisch, da sie in PCR-Reaktionen die Taq-Polymerase inhibieren (Smalla *et al.*, 1993; Tsai und Olson, 1992b), Restriktionsspaltungen stören (Porteous *et al.*, 1994), die Transformationseffizienz reduzieren (Tebbe und Vahjen, 1993) und die Spezifität von DNA-Hybridisierungen senken (Steffan und Atlas, 1988).

Eine direkte Reinigung der DNA konnte bei der Methode nach Zhou nicht erfolgreich durchgeführt werden. Dies kann einerseits auf ungünstige Salzkonzentrationen oder zu hohe SDS-Konzentrationen beim Binden der DNA an die Silica-Matrix zurückzuführen sein oder aber eventuell auf ein ungünstiges Volumenverhältnis von Matrix zu Puffer.

Bei der Methode nach Moré konnte eine direkte Reinigung der DNA ohne vorhergehende Fällung erfolgen. Die isolierte DNA wies eine hohe Reinheit auf, die DNA Lösung war weitgehend klar und die Ausbeute war vergleichbar mit der, die durch Ethanol-fällung erreicht wurde. Des Weiteren wurde der Zeitaufwand durch die direkte Reinigung verringert, da die Inkubationszeit durch die DNA Fällung entfällt.

Die Kontamination mit Huminstoffen kann auch reduziert werden indem die DNA nicht direkt aus der Bodenprobe isoliert wird sondern zunächst die Probe in einem Nycodenz-Gradienten zentrifugiert wird und so die Bakterien von den Bodenpartikeln getrennt werden. Erst dann wird die DNA aus den Bakterien isoliert. Dabei wird zwar die DNA Ausbeute verringert, jedoch ist das Spektrum der mikrobiellen Diversität mit dem, das bei direkter DNA Isolierung erhalten wird, vergleichbar (Courtois *et al.*, 2001).

### 6.1.3 KOMBINATION DER AUFSCHLUß-METHODEN

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die beiden DNA-Isolierungs-Protokolle nach Zhou und Moré aufeinanderfolgend durchzuführen. Dabei wird zunächst die DNA mit der Methode nach Zhou isoliert und anschließend können die verbleibenden intakten Zellen, bei denen es sich vorwiegend um Gram-positive Organismen handelt, mit der Methode nach Moré aufgeschlossen werden. Diese Ergebnisse wurden mit autoklavierter Erde und zugefügten Reinkulturen von *Arthrobacter*, *Rhodococcus* und *Pseudomonas* durchgeführt. Der Nachweis, aus welchen Mikroorganismen die mit der jeweiligen Methode isolierte DNA stammt, wurde mittels Amplifikation der Domäne III der 23S rDNA geführt. Bei Amplifikation der Domäne III der 23S rDNA mit dem Primerpaar 1900V und 1028R wird bei Eubakterien ein 250 bp-Fragment amplifiziert, welches im Falle der Actinomyceten eine 100 bp-Insertion trägt. Nach Isolierung der DNA aus dem Gemisch aller 3 Stämme nach der Methode nach Zhou konnte hauptsächlich das 250 bp-Fragment bei der anschließenden Amplifikation der Domäne III der 23S rDNA nachgewiesen werden. Wurde aus den restlichen, noch intakten Zellen anschließend die DNA nach Moré isoliert, so ließen sich bei der folgenden PCR zwei Fragmente isolieren, eines mit 250 bp Länge und eines mit 350 bp Länge. So konnte gezeigt werden, dass durch eine Kombination im ersten Schritt DNA isoliert wird, die vorwiegend aus Gram-negativen Organismen, bzw. den meisten Eubakterien stammt. In der verbleibenden Probe sind nun G+C-reiche Gram-positive Mikroorganismen angereichert. Dies kann man sich zunutze machen, wenn es anschließend um die Erstellung von Expressions-Genbanken in verschiedenen Wirts-Organismen geht. *E. coli* erkennt beispielsweise nur ca. 20% der Promotoren von Genen aus Actinomyceten (Strohl, 1992), das bedeutet, dass in einer Expressionsgenbank die vorwiegend aus Actinomyceten-Genen besteht, bis zu 80% der Gene, die unter ihrem eigenen Promotor stehen, nicht exprimiert werden können, weil der Promotor von *E. coli* nicht erkannt wird. Die Actinomyceten-Gene sind zwar in *E. coli* exprimierbar, sofern sie unter einem Fremd-Promotor stehen, jedoch ist auch hier die Expressionsleistung aufgrund des hohen G+C-Gehalts der Actinomyceten Gene meist nicht sehr hoch. Durch die Kombination der beiden Aufschlussmethoden nach Zhou und Moré ist es möglich, im ersten Schritt DNA mit der Methode nach Zhou aus Bodenproben zu isolieren, welche zur Klonierung in *E. coli* eingesetzt werden kann. Anschließend kann die DNA aus den verbleibenden intakten Zellen mit der Methode nach Moré isoliert werden. Dabei handelt es sich dann vorwiegend um

G+C-reiche Gram-positive Organismen. Mit dieser DNA können dann Expressionsgenbanken beispielsweise in *Streptomyces* hergestellt werden.

#### **6.1.4 SCREENING NACH NEUEN CAROTINOIDEN**

Mit DNA, die aus Bodenproben isoliert wurde, sollte eine Expressionsgenbank erstellt werden und ein Screening nach neuen Carotinoiden, bzw. den entsprechenden Enzymen der Carotinoid Biosynthese durchgeführt werden. Dazu wurden in *E. coli* die ersten beiden Gene der Carotinoid-Biosynthese *crtE* und *crtB* aus *Erwinia uredovora* im Vektor pACYC184 vorgelegt (pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>). Durch die von diesen beiden Genen codierten Enzyme GGPP-Synthase und Phytoin-Synthase wird das farblose Phytoin gebildet. Zellen, die dieses Plasmid allein tragen, zeigen also keine Färbung. Die aus Boden isolierte, mit *NcoI* geschnittene DNA wurde in pUCmodII kloniert und in pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub> tragende *E.coli* JM109 transformiert. Bei der Expression von Carotinoid-Genen aus der Boden-DNA, die Phytoin als Substrat nutzen und umsetzen, weisen die Zellen eine Gelb-, Orange- oder Rotfärbung auf.

Beim Screening der Komplementations-Genbank aus Bodenproben befand sich unter ca. 70 000 gescreenten Klonen keiner, der eine Färbung aufwies.

#### **6.1.5 VALIDIERUNG DES ASSAYSYSTEMS ZUM SCREENING NACH NEUEN CAROTINOIDEN**

Es sollte gezeigt werden, dass es generell möglich ist, DNA aus Bodenproben zu isolieren und damit eine Expressionsgenbank in JM109 pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub> zu erstellen, in der neue Carotinoid-Biosynthese Gene durch visuelles Screening nach Carotinoiden (Färbung der Kolonien) identifiziert werden können. Dazu wurde der ganze Ablauf von der Isolierung der DNA über die Klonierung bis hin zum Screening mit 5 g Bodenprobe durchgeführt, der 1 ml *Erwinia uredovora*-Zellen (OD=1,2) zugegeben wurde. Dieser Stamm enthält die Carotinoid-Biosynthese-Gene *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ* und *crtX* in einem Cluster und produziert das Carotinoid Zeaxanthin-diglycosid (Misawa *et al.*, 1990).

Beim Screening von ca. 7 000 Klonen wurden vier Klone gefunden, die eine Gelbfärbung aufwiesen, die bei allen vier auf die Bildung von  $\beta$ -Carotin zurückzuführen ist. Die Inserts



aller vier Klone hatten dieselbe Größe und nach dem Ansequenzieren zeigte sich, dass sie alle als Insert die Carotinoid-Biosynthese-Gene aus *Erwinia uredovora* enthielten (*crtI*, *crtY*). Damit wurde gezeigt, dass das methodische Vorgehen zunächst nicht der Grund dafür war, dass keine neuen Carotinoid-Biosynthese Gene gefunden worden waren. Es ist also möglich, aus Gram-negativen Mikroorganismen mit der Methode nach Zhou DNA zu isolieren, die über *NcoI* in pUCmodII kloniert werden kann und anschließend ein Komplementationsscreening mit pAC-crt<sub>EU</sub>-crt<sub>BEU</sub> durchzuführen, bei dem positive Klone eindeutig durch ihre Farbigkeit identifizierbar sind.

Bei näherer Betrachtung fällt allerdings auf, in welcher Größenordnung sich die Kolonienzahl befinden muß, um einen positiven Klon zu erhalten. Der Bodenprobe waren 1 ml Zellen der OD<sub>600</sub> = 1,1 zugefügt worden. Wenn man davon ausgeht, dass 1OD  $\cong$   $5 \times 10^8$  Zellen entspricht, waren in dem Ansatz, der aufgeschlossen wurde,  $5,5 \times 10^8$  *Erwinia uredovora* Genome enthalten, wenn man von 100% Aufschluß ausgeht und angenommen wird, dass keine DNA an den Bodenpartikeln verbleibt. Von der isolierten Gesamt-DNA (1 ml) wurden zunächst 50 µl gereinigt und für die Klonierung verwendet, damit wurden  $2,75 \times 10^7$  Genome in die Erstellung der Genbank eingesetzt. Da bereits nach Auffinden von vier positiven und 7000 gescreenten Klonen das Screening abgebrochen wurde, wird zur Vereinfachung von  $10^7$  Genomen ausgegangen. Dabei findet man statistisch einen positiven Klon unter 1750. Befinden sich in einer Probe nur 100 Genome, die Gene für die Carotinoid Biosynthese tragen, so müsste man  $1,75 \times 10^8$  Klone screenen, um einen Positiven zu finden. Dies zeigt, dass die Anzahl der gescreenten Klone zu Beginn ( $7 \times 10^4$ ) bei Weitem nicht ausreicht, um neue Gene zu finden, die an der Carotinoid-Biosynthese beteiligt sind. In Anbetracht dieser Anzahl zu screenender Klone liegt die Frage nahe, ob es überhaupt sinnvoll ist, neue Carotinoid-Biosynthese Gene auf diese Weise zu isolieren. Außerdem ist es abhängig von der verwendeten Schnittstelle möglich, dass ein Gen auf zwei Klonen liegt und so gar nicht identifiziert wird. Die Klonierung von DNA aus Bodenproben ist sinnvoll, wenn es darum geht, neue Enzyme zu finden, die häufig vorkommen, beispielsweise Esterasen, Lipasen oder Amylasen. Diese Enzyme kommen in den meisten bisher kultivierten Mikroorganismen vor und so besteht auch eine hohe Chance, diese Enzyme aus nicht-kultivierbaren Mikroorganismen auf diese Weise zu isolieren. Bereits hier ist eine sehr hohe Zahl von Klonen zu screenen, um die entsprechenden Enzyme zu finden. Beispielsweise konnten unter 286 000 gescreenten Klonen drei neue Esterasen und unter 730 000 Klonen eine neue Lipase gefunden werden, dabei lagen die Inserts im Größenbereich von 2,2 bis 6,6 kb (Henne *et al.*, 2000). In einer weiteren Arbeit wurde auf die Verwertung von 4-Hydroxybutyrat gescreent,

bei einer Insert-Größe von fünf bis acht kb. Dabei wurden unter 930 000 Klonen fünf positive gefunden (Henne *et al.*, 1999). In einem anderen Beispiel wurden unter Einsatz von Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) insgesamt ca 100 Mbp gescreent und dabei zwei Lipasen und acht Amylasen gefunden (Rondon *et al.*, 2000). Carotinoide jedoch werden verglichen mit Lipasen nur von einem kleinen Teil der bisher kultivierten Mikroorganismen gebildet, so ist auch die Wahrscheinlichkeit wesentlich geringer, Gene aus dem Biosynthese-Gen-Cluster zu klonieren. Außerdem reicht es hier nicht aus, nur ein Gen zu klonieren, sondern es ist wichtig, große DNA Fragmente zu klonieren, was die Wahrscheinlichkeit weiter reduziert, weil in dieser Arbeit aus Gründen der biologischen Sicherheit nur Fragmente von max. zehn kb kloniert werden konnten. Die Biosynthese Gen-Cluster sind jedoch oft größer als zehn kb. Eine weitere Schwierigkeit besteht im Anlegen von Genbanken mit sehr großen Inserts. DNA, die direkt aus Bodenproben isoliert wurde, weist oft zu geringe Fragmentgrößen auf, um ganze Stoffwechsel-Operons direkt zu klonieren. Daher ist ein Lösungsansatz das direkte Klonieren von DNA aus Anreicherungskulturen, die zuvor auf die gewünschte Eigenschaft selektiert wurden (Entcheva *et al.*, 2001).

## **6.2 ERHÖHUNG DER MOLEKULAREN DIVERSITÄT VON CAROTINOIDEN**

Um die molekulare Diversität von Carotinoiden zu erhöhen, sollten bereits bekannte Carotinoid Biosynthese-Gene durch gerichtete Evolution so verändert werden, dass neue Produkte entstehen, bzw. Produkte, die sonst durch andere Enzyme gebildet werden.

### **6.2.1 DIE SPHEROIDEN-MONOXYGENASEN AUS RHODOBACTER CAPSULATUS UND RHODOBACTER SPHAEROIDES**

In vorhergehenden Arbeiten waren die beiden *crtA*-Gene aus *Rhodobacter capsulatus* (RCA) und *Rhodobacter sphaeroides* (RSA) in den Expressionsvektor pUCmodII kloniert worden. Zunächst wurde untersucht, ob die beiden Gene in *E. coli* JM109 exprimiert werden.

Dabei zeigte sich, dass beide Genprodukte die theoretisch errechnete Molmasse aufweisen (RCA  $\cong$  27 kDa, RSA  $\cong$  37 kDa). Bei RSA handelt es sich um ein vorwiegend hydrophiles Protein, dem jegliche Membran-Bindungsstelle fehlt (Lang *et al.*, 1995). Auch bei der Analyse der RCA-Sequenz mittels Kyte-Doolittle und Hopp-Woods Algorithmen zeigte sich,

dass es sich bei RCA um ein eher hydrophiles Enzym handelt. Dies ist außergewöhnlich, da die Enzyme der Carotinoid Biosynthese meist membrangebunden sind (Sandmann, 1994) und auch durch SDS-PAGE gezeigt wurde, dass die beiden crtA-Enzyme RCA und RSA bei heterologer Expression in *E. coli* vorwiegend in unlöslicher Form vorliegen. In mikroskopischen Untersuchungen gefärbter Ausstrichpräparate konnte gezeigt werden, dass durch die Überproduktion in *E. coli* Inclusion Bodies gebildet wurden. Jedoch lag bei beiden Enzymen nicht das gesamte heterolog exprimierte Protein in Form von Inclusion-bodies vor. Beide Enzyme wurden in *E. coli* funktionell exprimiert, d.h. es kann sowohl aufgrund der Form der UV/VIS-Spektren von pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14, pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + pUC-RCA und pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + pUC-RSA, als auch aufgrund der dünnschicht-chromatographisch nachgewiesenen Existenz von Oxo-Produkten darauf geschlossen werden, dass die Substrate Lycopin oder Didehydrolycopin zu entsprechenden Oxo-derivaten umgesetzt werden können. Die Analyse der von JM109- pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + pUC-RCA bzw. pUC-RSA gebildeten Carotinoide mittels LC-MS deutet darauf hin, dass es sich bei dem von JM109- pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + pUC-RCA gebildeten Hauptprodukt um ein vierfach oxygeniertes Carotinoid handelt, wohingegen die monoisotopische relative Molekülmasse des aus JM109- pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 + pUC-RSA isolierten Hauptcarotinoids der Masse von Lycopin entspricht. Von RSA werden jedoch auch verschiedene Oxo-Produkte, jedoch in etwas geringerer Menge gebildet. Damit weist RSA eine geringere Aktivität als RCA auf, was wahrscheinlich auf die schlechtere Löslichkeit zurückzuführen ist.

### **6.2.2 DNA SHUFFLING DER SPHEROIDEN MONOOXYGENASEN AUS RHODOBACTER CAPSULATUS UND RHODOBACTER SPHAEROIDES**

Da die beiden Gene RCA und RSA homolog sind, wurde zunächst versucht, durch DNA shuffling Mutanten zu erzeugen, die eine möglichst hohe Anzahl an Oxo-Gruppen in Lycopin oder Didehydrolycopin einführen und das Chromophor möglichst weit verlängern. Damit sollte erzielt werden, dass daraus eine dunkelrote Färbung des entsprechenden Klons resultiert.

DNA shuffling ist eine gängige Methode um Mutanten aus einem Pool miteinander zu rekombinieren (Stemmer, 1994a, b) oder durch family shuffling (Cramer *et al.*, 1998) homologe Gene nach Rekombination den gewünschten Anforderungen anzupassen. In der Literatur sind zahlreiche Beispiele beschrieben, in denen durch DNA shuffling hergestellte

Mutanten verbesserte Eigenschaften aufweisen (Miyazaki *et al.*, 2000; Ness *et al.*, 1999). Außerdem ist das DNA shuffling von homologen Genen vorteilhaft, da die entstehenden Varianten meist funktionell sind. Die Kombination neutraler Mutationen kann neue Funktionen schaffen, was auch als „konstruktive neutrale Evolution“ (Stoltzfus, 1999) oder als „Selektive Neutralität“ (Demetrius, 1997) bezeichnet wird.

Nach dem Screening von 24 000 Klonen wurde dieses eingestellt, da keine Mutante aufgetreten war, die eine dunklere Rotfärbung des entsprechenden Klons im Vergleich zu den WT-Klonen hervorgerufen hat.

Gründe dafür können sein, dass entweder keine Mutationen eingeführt worden waren bzw. keine Chimärenbildung stattgefunden hatte oder dass die Screeningmethode nicht geeignet ist, da die Farbänderung nicht groß genug ist und „positive“ Klone nicht vom Wildtyp unterschieden werden können.

Bereits die Frage, ob eine Chimärenbildung überhaupt stattgefunden hat, konnte als problematisch bewertet werden. Beide Gene weisen innerhalb des homologen Bereichs eine Identität von ca. 60% auf, jedoch ist RSA um ca. 300 bp länger als RCA. Diese „Verlängerung“ wurde nicht in die Betrachtung der Homologie mit einbezogen, da diese randständig ist. Jedoch sind normalerweise 70% Sequenzidentität und 10-15 bp-Stücke ununterbrochener Sequenzidentität Voraussetzung für erfolgreiches paarweises DNA shuffling (Schmidt-Dannert, 2001).

Dazu wurden zunächst zehn zufällig gepickte Klone sequenziert. Bei lediglich einem dieser Klone war eine tatsächliche Chimärenbildung zu beobachten. Alle anderen untersuchten Klone wiesen die Sequenz von RCA auf, in die aber zahlreiche Punktmutationen eingeführt worden waren. Zudem trat bei allen diesen Klonen ein bestimmtes 9 bp-Fragment auf, das von RSA stammte. Die Chimärenbildung hat zu nur einem geringen Anteil stattgefunden, da bereits die Voraussetzungen für das DNA shuffling suboptimal waren. In der Literatur sind jedoch weitere Beispiele beschrieben, bei denen durch DNA shuffling generierte positive Mutanten keine Chimären waren sondern lediglich Punktmutationen aufwiesen (Schmidt-Dannert *et al.*, 2000).

Ein weiteres Problem stellte die Screeningmethode dar. Bereits JM109-Zellen mit pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14 produzieren ein Gemisch von Carotinoiden (Lycopin, Didehydrolycopin und 3,4,3',4'-Tetrahydrolycopin). Werden nun die Gene für RSA bzw. RCA cotransformiert, so kann über die Form der UV/VIS-Spektren lediglich die Aussage gemacht werden, dass Ketogruppen eingeführt worden sein müssen, da die Feinstruktur nicht mehr gegeben ist. Jedoch kann keine Aussage darüber getroffen werden, wo die Ketogruppe(n)

eingeführt wurden, welches der Carotinoide als Substrat dient und was das genaue Produkt ist. Eine Veränderung der Eigenschaften von *crtA* könnte zwar zu einem Carotinoid mit mehr Ketogruppen geführt haben, jedoch könnte dieses Carotinoid in dem Gemisch eventuell nicht in so großem Maße gebildet worden sein und so der entsprechende Klon visuell nicht von den anderen unterschieden worden sein. Dazu müsste eine andere Screening-Strategie verfolgt werden, beispielsweise ein Screeningverfahren das auf dünnschichtchromatographischer Trennung der Carotinoide beruht. So wäre es möglich, die Carotinoid Gemische der einzelnen Klone aufzutrennen und weitere Spots könnten leicht identifiziert werden. Allerdings ist hier fraglich, ob auf diese Weise eine hohe Anzahl von Klonen gescreent werden können. Auch andere, für Carotinoid- Analyse üblichen Methoden wie HPLC, CD, MS oder NMR eignen sich nicht für das High-Throughput Screening.

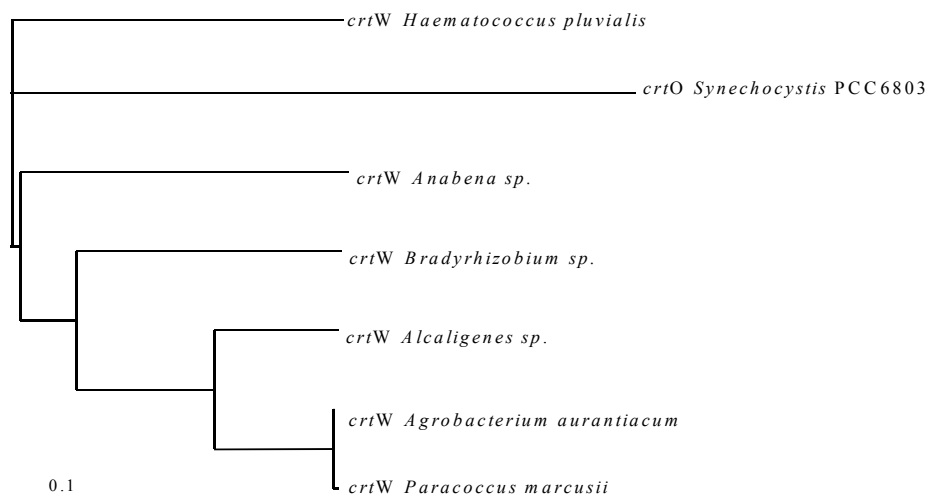
### **6.2.3 DIE $\beta$ -CAROTIN-KETOLASE (*CRTO*) AUS *SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803***

In *Synechocystis sp. PCC6804* werden vier Carotinoide gebildet, Myxoxanthophyll,  $\beta$ -Carotin, Echinenon und Zeaxanthin (Martinez-Ferez *et al.*, 1994). Dabei setzt die  $\beta$ -Carotin-Ketolase *crtO* (SYO)  $\beta$ -Carotin in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu Echinenon um (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997). Dieses Enzym weist auf Sequenzebene eine hohe Homologie zu bakteriellen Phytoin-Desaturasen auf, besitzt jedoch keinerlei Desaturase-Aktivität (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997).

Das SYO-Gen war in früheren Arbeiten in pUCmodII kloniert worden. Die Expression dieses Gens in *E. coli* JM109 führt zu einem 59 kDa- Genprodukt, dies entspricht der erwarteten Größe der  $\beta$ -Carotin-Ketolase SYO. Des Weiteren liegt dieses Protein, wie aus dem SDS-Gel ersichtlich, nicht löslich vor. Dies könnte auf die Bildung von Inclusion Bodies zurückzuführen sein, allerdings konnten mikroskopisch keine Inclusion bodies nachgewiesen werden. Außerdem werden für *in-vitro* Ketolase Enzymtests *Synechocystis*-Membranen eingesetzt (Bramley und Sandmann, 1985), Dies legt den Schluß nahe, dass das Enzym membrangebunden vorliegt. Dies ist wahrscheinlich auch in *E. coli* der Fall, da das Enzym *in-vivo*  $\beta$ -Carotin zu Echinenon umsetzt.

#### 6.2.4 VERÄNDERUNG DER SUBSTRATSPEZIFITÄT DER $\beta$ -CAROTIN-KETOLASE AUS *SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803*

In der Literatur sind bereits  $\beta$ -Carotin-Ketolasen beschrieben, die  $\beta$ -Carotin über Echinenon zu Canthaxanthin umsetzen, diese stammen aus der Grünalge *Haematococcus pluvialis* (Kajiwara *et al.*, 1995), aus marinen Bakterien (Misawa *et al.*, 1995a; Misawa *et al.*, 1995b), Cyanobakterien (Kaneko *et al.*, 2001) oder aus anderen Eubakterien (Harker und Hirschberg, 1997) und werden mit *crtW* bezeichnet. Die bakteriellen  $\beta$ -Carotin-Ketolasen *crtW* weisen wie in Abb. 32 veranschaulicht, keinerlei Homologie zu der  $\beta$ -Carotin-Ketolase *crtO* aus *Synechocystis sp. PCC6803* auf. Außerdem katalysiert *CrtW* aus *Alcaligenes sp.* und *Agrobacterium aurantiacum* die direkte Umsetzung der Methyl- in Keto-Gruppen (Misawa *et al.*, 1995a).



**Abbildung 32:** Phylogenetischer Stammbaum der  $\beta$ -Carotin Ketolasen

*CrtO* ist in der Lage, bei heterologer Expression Canthaxanthin in sehr geringen Mengen zu bilden (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997). Damit ist grundsätzlich eine wichtige Voraussetzung vorhanden, in einer Mutantenbibliothek eine verbesserte Mutante zu finden, da es vorteilhaft ist, von einem Enzym auszugehen, das möglichst nahe an der Zielfunktion liegt (Arnold, 1998).

Zunächst wurden in dieser Arbeit die error-prone Bedingungen für das SYO-Gen variiert. Mit

dem ersten Ansatz, bei dem jeweils eines der Nukleotide im zehnfachen Unterschub vorliegt (Rellos und Scopes, 1993), konnten jedoch nur geringe Mengen an PCR-Produkt erhalten werden. Daher wurde das Protokoll dahingehend verändert, dass jeweils ein Nukleotid im fünffachen Unterschub vorliegt (Meijer *et al.*, 1996), zur Erhöhung der Mutationsrate aber  $Mn^{2+}$  in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wird. Eine Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$   $Mn^{2+}$  erwies sich als geeignet. Unter diesen Bedingungen war bei 20% der Klone die Ketolase inaktiviert worden. Meist werden die Mutationsraten so eingestellt, dass ein Aminosäureaustausch pro Enzym auftritt (Arnold, 1996). Es können auch höhere Mutationsraten eingestellt werden (bis zu fünf Aminosäureaustausche pro Klon) (Vartanian *et al.*, 1996). Jedoch sind vorteilhafte Mutationen selten und eine Kombination dieser sehr selten, außerdem führen die meisten Mutationen zu einer „Verschlechterung“ (Arnold, 1998). Nach Sequenzierung von neun zufällig gepickten Kolonien hat sich gezeigt, dass die Mutationsrate bei einer Mutation pro 444 bp liegt. Damit kann von etwa vier Mutationen pro SYO-Gen ausgegangen werden.

In dieser Arbeit wurde beim Screening von 35 000 Klonen keiner gefunden, dessen Färbung sich vom SYO-Wildtyp unterschied. Die  $\beta$ -Carotin-Ketolase *crtO* aus *Synechocystis sp.* PCC6803 konnte also durch error-prone PCR zunächst nicht so umgewandelt werden, dass bei der *crtO*-katalysierten Reaktion Canthaxanthin anstatt Echinenon als Hauptprodukt entsteht.

Bei der Erhöhung der Mutationsrate durch direktes DNA shuffling der durch error-prone PCR generierten Fragmente zeigte sich, dass die Mutationsrate so hoch wurde, dass bei 99% der Klone eine Inaktivierung der  $\beta$ -Carotin-Ketolase auftrat. Nur sehr wenige Klone wiesen noch eine Ketolase-Aktivität auf. Diese Klone wurden jedoch über Nacht bei 37°C und dann zwei Tage bei 30°C kultiviert, da davon ausgegangen wurde dass dies die Carotinoid-Zusammensetzung nicht beeinflusst. Die Hexanextrakte dieser Klone wurden untersucht, indem UV/VIS-Spektren aufgenommen und die Carotinoide dünnschichtchromatographisch getrennt wurden. Dabei war das Absorptionsmaximum der Hexanextrakte um ca. 10 nm in den längerwelligen Bereich verschoben, was darauf schließen ließ, dass Canthaxanthin gebildet wurde. Des Weiteren waren auf dem DC deutlich Spots zu sehen, die genau dasselbe Laufverhalten aufwiesen wie reines Canthaxanthin. Unter diesen Bedingungen zeigte aber auch das Spektrum des SYO-Wildtyps ein Absorptionsmaximum, das eher dem von Canthaxanthin entspricht, genauso war im DC der deutlichste Spot der, der auf Höhe des Canthaxanthins lief. Drei dieser Klone wurden trotzdem zur weiteren Untersuchung sequenziert. Die Sequenz entsprach aber dem SYO-Wildtyp, d.h. es wurde keine Mutation

eingeführt. Fernandez-Gonzalez *et al.* hatten zuvor gezeigt, dass in *Synechocystis sp.* PCC6803 kein Canthaxanthin gebildet wird und Echinenon aufgrund der Zusammenstellung der in *Synechocystis sp.* PCC6803 gebildeten Carotinoide auch in keiner Folgereaktion als Substrat dient (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997; Martinez-Ferez *et al.*, 1994). Da das zu Beginn aufgenommene Spektrum vom Hexanextrakt von pAC-crt<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> mit dem SYO Wildtyp unter den ursprünglich gewählten Kultivierungsbedingungen genau den publizierten Ergebnissen (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997) entsprach, war davon ausgegangen worden, dass der SYO Wildtyp  $\beta$ -Carotin tatsächlich nur zu Echinenon umsetzen kann. Da auch keine Homologie zu crtW aus anderen Organismen zu erkennen war, war vor der Erstellung der Mutantenbibliotheken davon ausgegangen worden, dass eine erhöhte Canthaxanthinbildung durch SYO allein durch Mutagenese zu erreichen ist.

Jedoch wurde in dieser Arbeit gefunden, dass der SYO-Wildtyp in der Lage ist, ausgehend von  $\beta$ -Carotin abhängig von den Kultivierungsbedingungen Canthaxanthin als Hauptprodukt zu bilden.

### **6.2.5 WEITERE UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON CANTHAXANTHIN MIT CRTO AUS SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803**

Da CrtO *in-vivo*  $\beta$ -Carotin zu Canthaxanthin umsetzen kann, wurden die Bedingungen, unter denen der SYO Wildtyp Canthaxanthin bildet, genauer untersucht. Wird SYO in *E. coli* heterolog exprimiert, so kann Canthaxanthin nur in sehr kleinen Mengen gebildet werden (10 % der Ketocarotinoide) (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997). Das dabei verwendete Medium (LB) besitzt einen pH-Wert von ca. pH 7 – 7,5. Außerdem konnte in *in-vitro* Versuchen bei pH 7,5 Canthaxanthin in kleinen Mengen erhalten werden (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997). In *Synechocystis sp.* PCC 6803 wird kein Canthaxanthin gebildet, das zur Kultivierung von *Synechocystis sp.* PCC6803 verwendete Medium (BG11) besitzt einen pH von 6,5. Damit lag zunächst die Vermutung nahe, dass der pH-Wert einen Einfluss haben könnte. Beim Vergleich der Kultivierung unter verschiedenen pH-Bedingungen zeigte sich jedoch, dass der pH-Wert keinen Einfluss auf die Bildung von Canthaxanthin hat.

Des Weiteren wurde der Einsatz verschiedener Kulturmedien untersucht. Zur optimierten Bildung von Carotinoiden wird häufig Casein als C-Quelle eingesetzt (Sandmann, *et al.*, 1999). Außerdem wurde M9-Minimalmedium in Betrachtung mit einbezogen, da ein verlangsamtes Zellwachstum eventuell die Carotinoid Synthese begünstigen könnte. Dazu



wurden in dem Vergleich LB-Medium, LB-Cas mit Casein anstatt Trypton und M9-Minimalmedium eingesetzt. Die Temperaturen für die Kultivierung wurden ebenfalls verglichen, da bei geringeren Temperaturen die Carotinoid-Mengen generell höher sind (Sandmann, *et al.*, 1999). In Vorversuchen hatte sich jedoch bereits gezeigt, dass bei Kultivierung in LB bei 25°C keine höheren Canthaxanthin-Mengen erzielt werden können, als bei Kultivierung bei 30°C.

Nach Vergleich der verschiedenen Kultivierungsbedingungen hat sich gezeigt, dass um eine möglichst hohe Ausbeute an Canthaxanthin aus dem in dieser Arbeit beschriebenen System zu erzielen, die Kultivierung zunächst 16 Std. bei 37°C und anschließend 48 Std. bei 30°C erfolgen sollte. Eventuell ist die unter diesen Bedingungen erhöhte Bildung von Canthaxanthin darauf zurückzuführen, dass das Enzym CrtO unter diesen Bedingungen stärker exprimiert wird und dann auch Echinenon als Substrat akzeptiert oder an beiden  $\beta$ -Ionon-Ringen des  $\beta$ -Carotins angreift. In früheren Publikationen wurde bereits darauf hingewiesen, dass aufgrund der heterologen Umgebung und der erhöhten Expression von SYO eine Canthaxanthin-Bildung, wenn auch in sehr geringem Ausmaß, überhaupt möglich ist, dabei wurden die Kultivierung bei 30°C für 2 Tage durchgeführt (Fernandez-Gonzales *et al.*, 1997).

Es wurde also gezeigt, dass es durchaus möglich ist, *in vivo* durch Coexpression von pAC-crtE<sub>EU</sub>-crtB<sub>EU</sub>-I14-crtY<sub>EU</sub> und pUC-SYO Canthaxanthin als Hauptprodukt zu erhalten. Bemerkenswert ist dabei, dass CrtO aus *Synechocystis* keinerlei Homologie zu den Ketolasen CrtW aufweist, also ein strukturell völlig verschiedenes Enzym zu demselben Produkt führen kann, wenn die Kultivierungsbedingungen entsprechend variiert werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- ALBRECHT, M., TAKAICHI, S., MISAWA, N., SCHNURR, G., BOGER, P. und SANDMANN, G. (1997). Synthesis of Atypical Cyclic and Acyclic Hydroxy Carotenoids in *Escherichia coli* Transformants. *J Biotechnol* **58**, 177-85.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. und LIPMAN, D. J. (1997). Gapped Blast and Psi-Blast: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K. und HAGEN, T. M. (1993). Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7915-22.
- ANDREWS, A., PHAFF, H. und STARR, M. (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a Red-Pigmented Fermenting Yeast. *Biochemistry* **15**, 1003 - 1007.
- ARMSTRONG, G. A., ALBERTI, M., LEACH, F. und HEARST, J. E. (1989). Nucleotide Sequence, Organization, and Nature of the Protein Products of the Carotenoid Biosynthesis Gene Cluster of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Gen Genet* **216**, 254-68.
- ARNOLD, F. H. (1996). Directed Evolution: Creating Biocatalysts for the Future. *Chem. Eng. Sci.* **51**, 5091-5102.
- ARNOLD, F. H. (1998). Design by Directed Evolution. *Acc Chem Res* **31**, 125-131.
- ARNOLD, F. H. und MOORE, J. C. (1997). Optimizing Industrial Enzymes by Directed Evolution. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **58**, 1-14.
- AUSICH, R. L. (1994). Production of Carotenoids by Recombinant DNA Technology. *Pure & appl. Chem* **66**, 1057 - 1062.
- BAKKEN, L. R. (1985). Separation and Purification of Bacteria from Soil. *Appl Environ Microbiol* **49**, 1482 - 1487.
- BARTLEY, G. E., VIITANEN, P. V., PECKER, I., CHAMOVITZ, D., HIRSCHBERG, J. und SCOLNIK, P. A. (1991). Molecular Cloning and Expression in Photosynthetic Bacteria of a Soybean cDNA Coding for Phytoene Desaturase, an Enzyme of the Carotenoid Biosynthesis Pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6532-6.
- BAUERNFEIND, J. C. (1981). *Carotenoids as Colorants and Vitamin a Precursors*,. Academic Press, New York.
- BIRNBOIM, H. C. und DOLY, J. (1979). A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.

- BORNSCHEUER, U. T., ALTENBUCHNER, J. und MEYER, H. H. (1998). Directed Evolution of an Esterase for the Stereoselective Resolution of a Key Intermediate in the Synthesis of Epothilones. *Biotechnol Bioeng* **58**, 554-9.
- BORNSCHEUER, U. T., ALTENBUCHNER, J. und MEYER, H. H. (1999). Directed Evolution of an Esterase: Screening of Enzyme Libraries Based on pH-Indicators and a Growth Assay. *Bioorg Med Chem* **7**, 2169-73.
- BOTELLA, J. A., MURILLO, F. J. und RUIZ-VAZQUEZ, R. (1995). A Cluster of Structural and Regulatory Genes for Light-Induced Carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Eur J Biochem* **233**, 238-48.
- BRAMLEY, P. M. und SANDMANN, G. (1985). *In Vitro* and *in Vivo* Biosynthesis of Xanthophylls by the Cyanobacterium *Aphanocpsa*. *Phytochemistry* **24**, 2919-2922.
- BRITTON, G. (1998). Overview of Carotenoid Biosynthesis. In *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism* (ed. G. Britton, H. Pfander und S. Liaaen-Jensen), pp. 13 - 147. Birkhäuser, Basel.
- BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. und PFANDER, H. (1995). Carotenoids Today and Challenges for the Future. In *Carotenoids*, vol. 1A: Isolation and analysis (ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen und H. Pfander), pp. 13 - 26. Birkhäuser Verlag, Basel.
- BRUCE, K. D., HIORNS, W. D., HOBMAN, J. L., OSBORN, A. M., STRIKE, P. und RITCHIE, D. A. (1992). Amplification of DNA from Native Populations of Soil Bacteria by Using the Polymerase Chain Reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3413-3416.
- BULL, A. T. (1992). Biodiversity as a Source of Innovation in Biotechnology. *Annu Rev Microbiol* **46**, 219 - 242.
- CADWELL, R. C. und JOYCE, G. F. (1994). Mutagenic PCR. *Cold Spring Harbour Laboratory press, Cold Spring Harbour, N. Y.*
- CHAMOVITZ, D., MISAWA, N., SANDMANN, G. und HIRSCHBERG, J. (1992). Molecular Cloning and Expression in *Escherichia coli* of a Cyanobacterial Gene Coding for Phytoene Synthase, a Carotenoid Biosynthesis Enzyme. *FEBS Lett* **296**, 305-10.
- CHANG, A. C. Y. und COHEN, S. N. (1978). Construction and Characterization of Amplifiable Multicopy DNA Cloning Vehicles Derived from the p15A Cryptic Miniplasmid. *J Bacteriol* **134**, 1141-1156.
- CHERRY, J. R., LAMSA, M. H., SCHNEIDER, P., VIND, J., SVENDSEN, A., JONES, A. und PEDERSEN, A. H. (1999). Directed Evolution of a Fungal Peroxidase. *Nat Biotechnol* **17**, 379-84.
- CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L. und MILLER, R. H. (1989). One-Step Preparation of Competent

- Escherichia coli: Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same Solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172 - 2175.
- CORPET, F. (1988). Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. *Nucleic Acids Res* **16**, 10881-90.
- COURTOIS, S., FROSTEGARD, A., GORANSSON, P., DEPRET, G., JEANNIN, P. und SIMONET, P. (2001). Quantification of Bacterial Subgroups in Soil: Comparison of DNA Extracted Directly from Soil or from Cells Previously Released by Density Gradient Centrifugation. *Environ Microbiol* **3**, 431-9.
- CRAMERI, A., RAILLARD, S.-A., BERMUDEZ, E. und STEMMER, W. P. (1998). DNA Shuffling of a Family of Genes from Diverse Species Accelerates Directed Evolution. *Nature* **391**, 288-291.
- DEMETRIUS, L. (1997). Selective Neutrality and Enzyme Kinetics. *J Mol Evol* **45**, 370-7.
- ENTCHEVA, P., LIEBL, W., JOHANN, A., HARTSCH, T. und STREIT, W. R. (2001). Direct Cloning from Enrichment Cultures, a Reliable Strategy for Isolation of Complete Operons and Genes from Microbial Consortia. *Appl Environ Microbiol* **67**, 89-99.
- EVANS, C. T., ADAM, D. und WISDOM, R. A. (1990). In *European Patent Application # 90311254.8*.
- FERNANDEZ-GONZALEZ, B., SANDMANN, G. und VIOQUE, A. (1997). A New Type of Asymmetrically Acting Beta-Carotene Ketolase Is Required for the Synthesis of Echinenone in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **272**, 9728-33.
- FONTES, M., RUIZ-VAZQUEZ, R. und MURILLO, F. J. (1993). Growth Phase Dependence of the Activation of a Bacterial Gene for Carotenoid Synthesis by Blue Light. *EMBO J.* **12**, 1265-75.
- GARCIA-ASUA, C., LANG, H. P., COGDELL, R. C. und HUNTER, C. N. (1998). Carotenoid Diversity: A Modular Role for the Phytoene Desaturase Step. *Trends Plant Sci* **3**, 445 - 449.
- GIOVANNUCCI, E., ASCHERIO, A., RIMM, E. B., STAMPFER, M. J., COLDIZ, G. A. und WILLETT, W. C. (1995). Intake of Carotenoids and Retinol in Relation to Risk of Prostate Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 1767-1776.
- HANNIBAL, L., LORQUIN, J., D'ORTOLI, N. A., GARCIA, N., CHAINTREUIL, C., MASSON-BOIVIN, C., DREYFUS, B. und GIRAUD, E. (2000). Isolation and Characterization of Canthaxanthin Biosynthesis Genes from the Photosynthetic Bacterium *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS278. *J Bacteriol* **182**, 3850-3.

- HARKER, M. und HIRSCHBERG, J. (1997). Carotenoid Biosynthesis Genes in the Bacterium *Paracoccus marcusii* MH1.
- HENKE, E. und BORNSCHEUER, U. T. (1999). Directed Evolution of an Esterase from *Pseudomonas Fluorescens*. Random Mutagenesis by Error-Prone PCR or a Mutator Strain and Identification of Mutants Showing Enhanced Enantioselectivity by a Resorufin-Based Fluorescence Assay. *Biol Chem* **380**, 1029-33.
- HENNE, A., DANIEL, R., SCHMITZ, R. A. und GOTTSCHALK, G. (1999). Construction of Environmental DNA Libraries in *Escherichia coli* and Screening for the Presence of Genes Conferring Utilization of 4- Hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3901-7.
- HENNE, A., SCHMITZ, R. A., BOMEKE, M., GOTTSCHALK, G. und DANIEL, R. (2000). Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3113-6.
- HOLBEN, W. E. (1994). *Isolation and Purification of Bacterial DNA from Soil*. Soil Science Society of America, Madison, USA.
- HOLBEN, W. E., JANSSON, J. K., CHELM, B. K. und TIEDJE, J. M. (1988). DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community. *Appl Environ Microbiol* **54**, 703 - 711.
- HÖSS, M. und PÄÄBO, S. (1993). DNA Extraction from Pleistocene Bones by a Silica-Based Purification Method. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3913 - 3914.
- HUGUENEY, P., ROMER, S., KUNTZ, M. und CAMARA, B. (1992). Characterization and Molecular Cloning of a Flavoprotein Catalyzing the Synthesis of Phytofluene and Zeta-Carotene in *Capsicum* Chromoplasts. *Eur J Biochem* **209**, 399-407.
- HUNDLE, B. S., O'BRIEN, D. A., BEYER, P., KLEINIG, H. und HEARST, J. E. (1993). In Vitro Expression and Activity of Lycopene Cyclase and Beta-Carotene Hydroxylase from *Erwinia herbicola*. *FEBS Lett* **315**, 329-34.
- HUNTER, C. N., HUNDLE, B. S., HEARST, J. E., LANG, H. P., GARDINER, A. T., TAKAICHI, S. und COGDELL, R. J. (1994). Introduction of New Carotenoids into the Bacterial Photosynthetic Apparatus by Combining the Carotenoid Biosynthetic Pathways of *Erwinia herbicola* and *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **176**, 3692-7.
- JACOBSEN, C. S. und RASMUSSEN, O. F. (1992). Development and Application of a New Method to Extract Bacterial DNA from Soil Based on Separation of Bacteria from Soil with Cation Exchange Resin. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2458 - 2462.
- JOHNSON, E. A. und SCHROEDER, W. A. (1996). Microbial Carotenoids. *Adv Biochem Eng*

- Biotechnol* **53**, 119-78.
- KAJIWARA, S., KAKIZONO, T., SAITO, T., KONDO, K., OHTANI, T., NISHIO, N., NAGAI, S. und MISAWA, N. (1995). Isolation and Functional Identification of a Novel cDNA for Astaxanthin Biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and Astaxanthin Synthesis in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol* **29**, 343-52.
- KANEKO, T., NAKAMURA, Y., WOLK, C. P., KURITZ, T., SASAMOTO, S., WATANABE, A., IRIGUCHI, M., ISHIKAWA, A., KAWASHIMA, K., KIMURA, T., KISHIDA, Y., KOHARA, M., MATSUMOTO, M., MATSUNO, A., MURAKI, A., NAKAZAKI, N., SHIMPO, S., SUGIMOTO, M., TAKAZAWA, M., YAMADA, M., YASUDA, M. und TABATA, S. (2001). Complete Genomic Sequence of the Filamentous Nitrogen-Fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Res* **8**, 205-13.
- KAUFFMANN, I. und SCHMIDT-DANNERT, C. (2001). Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* Lipase into an Efficient Phospholipase with Increased Activity Towards Long-Chain Fatty Acyl Substrates by Directed Evolution and Rational Design. *Protein Eng* **14**, 919-28.
- KLAUI, H. und BAUERNFEIND, J. C. (1981). *Carotenoids as Colorants and Vitamin a Precursors*. Academic Press, New York.
- KUCHNER, O. und ARNOLD, F. H. (1997). Directed Evolution of Enzyme Catalysts. *Trends Biotechnol* **15**, 523-30.
- LANG, H. P., COGDELL, R. J., GARDINER, A. T. und HUNTER, C. N. (1994). Early Steps in Carotenoid Biosynthesis: Sequences and Transcriptional Analysis of the *CrtI* and *CrtB* Genes of *Rhodobacter sphaeroides* and Overexpression and Reactivation of *CrtI* in *Escherichia coli* and *R. sphaeroides*. *J Bacteriol* **176**, 3859-69.
- LANG, H. P., COGDELL, R. J., TAKAICHI, S. und 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**, 2064-73.
- LEUNG, D. W., CHEN, E. und GOEDEL, D. V. (1989). A Method for Random Mutagenesis of a Defined DNA Segment Using a Modified Polymerase Chain Reaction. *Technique* **1**, 11 - 15.
- LIESACK, W. und STACKEBRANDT, E. (1992). Occurrence of Novel Groups of the Domain Bacteria as Revealed by Analysis of Genetic Material Isolated from an Australian Terrestrial Environment. *J Bacteriol* **174**, 5072-8.
- LIESACK, W., WEYLAND, H. und STACKEBRANDT, E. (1991). Potential Risks of Gene Amplification by PCR as Determined by 16s rDNA Analysis of a Mixed-Culture of

- Strict Barophilic Bacteria. *Microb. Ecol.* **21**, 191 - 198.
- MARTINEZ-FEREZ, I., FERNANDEZ-GONZALEZ, B., SANDMANN, G. und VIOQUE, A. (1994). Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the Gene Coding for Phytoene Synthase from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochim Biophys Acta* **1218**, 145-52.
- MARTIN-LAURENT, F., PHILIPPOT, L., HALLET, S., CHAUSSOD, R., GERMON, J. C., SOULAS, G. und CATROUX, G. (2001). DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2354-9.
- MAY, O., NGUYEN, P. T. und ARNOLD, F. H. (2000). Inverting Enantioselectivity by Directed Evolution of Hydantoinase for Improved Production of L-Methionine. *Nat Biotechnol* **18**, 317-20.
- MEIJER, P.-J., HOLMBERG, N., GRUNDSTRÖM, G. und BÜLOW, L. (1996). Directed Evolution of a TypeI Antifreeze Protein Expressed in *E. coli* with Sodium Chloride as Selective Pressure and Its Effect on Antifreeze Tolerance. *Protein Eng* **9**, 1051-1054.
- MISAWA, N., KAJIWARA, S., KONDO, K., YOKOYAMA, A., SATOMI, Y., SAITO, T., MIKI, W. und OHTANI, T. (1995a). Canthaxanthin Biosynthesis by the Conversion of Methylene to Keto Groups in a Hydrocarbon Beta-Carotene by a Single Gene. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 867-76.
- MISAWA, N., NAKAGAWA, M., KOBAYASHI, K., YAMANO, S., IZAWA, Y., NAKAMURA, K. und HARASHIMA, K. (1990). Elucidation of the *Erwinia uredovora* Carotenoid Biosynthetic Pathway by Functional Analysis of Gene Products Expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**, 6704-12.
- MISAWA, N., SATOMI, Y., KONDO, K., YOKOYAMA, A., KAJIWARA, S., SAITO, T., OHTANI, T. und 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**, 6575-84.
- MIYAZAKI, K. und ARNOLD, F. H. (1999). Exploring Nonnatural Evolutionary Pathways by Saturation Mutagenesis: Rapid Improvement of Protein Function. *J Mol Evol* **49**, 716-20.
- MIYAZAKI, K., WINTRODE, P. L., GRAYLING, R. A., RUBINGH, D. N. und ARNOLD, F. H. (2000). Directed Evolution Study of Temperature Adaptation in a Psychrophilic Enzyme. *J Mol Biol* **297**, 1015-26.
- MOORE, J. C. und ARNOLD, F. H. (1996). Directed Evolution of a Para-Nitrobenzyl Esterase for Aqueous-Organic Solvents. *Nat Biotechnol* **14**, 458-67.

- MORE, M. I., HERRICK, J. B., SILVA, M. C., GHIORSE, W. C. und MADSEN, E. L. (1994). Quantitative Cell Lysis of Indigenous Microorganisms and Rapid Extraction of Microbial DNA from Sediment. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1572-80.
- MULLIS, K. B., FALOONA, F. A., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. T. und EHRLICH, H. A. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- NESS, J. E., WELCH, M., GIVER, L., BUENO, M., CHERRY, J. R., BORCHERT, T. V., STEMMER, W. P. und MINSHULL, J. (1999). DNA Shuffling of Subgenomic Sequences of *Subtilisin*. *Nat Biotechnol* **17**, 893 - 896.
- NINET, L. und RENAULT, J. (1979). In *Micobiol Technology*.
- OGRAM, A., SAYLER, G. S. und BARKAY, T. (1987). The Extraction and Purification of Microbial DNA from Sediments. *J. Microbiol. Methods* **7**, 57 - 66.
- OLSEN, R. A. und BAKKEN, L. R. (1987). Viability of Soil Bacteria: Optimization of the Plate-Counting Technique. *Microb. Ecol.* **13**, 58-74.
- PASAMONTES, L., HUG, D., TESSIER, M., HOHMANN, H. P., SCHIERLE, J. und VAN LOON, A. P. (1997). Isolation and Characterization of the Carotenoid Biosynthesis Genes of *Flavobacterium* sp. Strain R1534. *Gene* **185**, 35-41.
- PAUL, E. A. und CLARK, F. E. (1989). In: *Soil Microbiology and Biochemistry*, pp. 108-110. Academic Press, Inc.
- PECKER, I., CHAMOVITZ, D., LINDEN, H., SANDMANN, G. und HIRSCHBERG, J. (1992). A Single Polypeptide Catalyzing the Conversion of Phytoene to Zeta- Carotene Is Transcriptionally Regulated During Tomato Fruit Ripening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4962-6.
- PFANDER, H. (1992). Carotenoids: An Overview. *Methods in Enzymology* **213**, 3-13.
- PICARD, C., PONSONNET, C., PAGET, E., NESME, X. und SIMONET, P. (1992). Detection and Enumeration of Bacteria in Soil by Direct DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2717-22.
- PORTEOUS, L. A., ARMSTRONG, J. L., SEIDLER, R. J. und WATRUD, L. S. (1994). An Effective Method to Extract DNA from Environmental Samples for Polymerase Chain Reaction Amplification and DNA Fingerprint Analysis. *Curr Microbiol* **29**, 301-7.
- RELLOS, P. und SCOPES, R. K. (1993). Polymerase Chain Reaction-Based Random Mutagenesis: Production and Characterization of Thermostable Mutants of *Zymomonas Mobilis* Alcohol Dehydrogenase2. *Prot. Eng. Purif.* **5**, 270 - 277.
- RONDON, M. R., AUGUST, P. R., BETTERMANN, A. D., BRADY, S. F., GROSSMAN, T. H.,



- LILES, M. R., LOIACONO, K. A., LYNCH, B. A., MACNEIL, I. A., MINOR, C., TIONG, C. L., GILMAN, M., OSBURNE, M. S., CLARDY, J., HANDELSMAN, J. und GOODMAN, R. M. (2000). Cloning the Soil Metagenome: A Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2541-7.
- SANDMANN, G. (1994). Carotenoid Biosynthesis in Microorganisms and Plants. *Eur J Biochem* **223**, 7-24.
- SANDMANN, G., ALBRECHT, M., SCHNURR, G., KNÖRZER, O. und BÖGER, P. (1999). The Biotechnological Potential and Design of Novel Carotenoids by Gene Combination in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **17**, 233-237.
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A. R. (1977). DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463 - 5467.
- SCHMIDT-DANNERT, C. (2000). Engineering Novel Carotenoids in Microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 255-61.
- SCHMIDT-DANNERT, C. (2001). Directed Evolution of Single Proteins, Metabolic Pathways and Viruses. *Biochemistry* **40**, 13125-13136.
- SCHMIDT-DANNERT, C., UMENO, D. und ARNOLD, F. H. (2000). Molecular Breeding of Carotenoid Biosynthetic Pathways. *Nat Biotechnol* **18**, 750-3.
- SELENSKA, S. und KLINGMULLER, W. (1991). DNA Recovery and Direct Detection of Tn5 Sequences from Soil. *Lett Appl Microbiol* **13**, 21 - 24.
- SHAO, Z., ZHAO, H., GIVER, L. und ARNOLD, F. H. (1998). Random-Priming in Vitro Recombination: An Effective Tool for Directed Evolution. *Nucleic Acids Res* **26**, 681-3.
- SHORT, J. M. und MATHUR, E. J. (1998). Production and Use of Normalized DNA Libraries. Diversa Corporation, United States Patent.
- SMALLA, K., CRESSWELL, N., MENDONCA-HAGLER, L. C., WOLTERS, A. und VAN ELSAS, J. D. (1993). Rapid DNA Extraction Protocol from Soil for Polymerase Chain Reaction-Mediated Amplification. *J. Appl. Bacteriol.* **674**, 78-85.
- STEFFAN, R. J. und ATLAS, R. M. (1988). DNA Amplification to Enhance Detection of Genetically Engineered Bacteria in Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2185-2191.
- STEFFAN, R. J., GOKSOYR, J., BEJ, A. K. und ATLAS, R. M. (1988). Recovery of DNA from Soils and Sediments. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2908-15.
- STEMMER, W. P. (1994a). DNA Shuffling by Random Fragmentation and Reassembly: In

- Vitro Recombination for Molecular Evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10747-51.
- STEMMER, W. P. (1994b). Rapid Evolution of a Protein in Vitro by DNA Shuffling. *Nature* **370**, 389-91.
- STOLTZFUS, A. (1999). On the Possibility of Constructive Neutral Evolution. *J Mol Evol* **49**, 169-81.
- STRAUB, O. (1987). List of Carotenoids. In *Key to Carotenoids* (ed. H. Pfander), pp. 11 - 296. Birkhäuser Verlag, Basel.
- STROHL, W. R. (1992). Compilation and Analysis of DNA Sequences Associated with Apparent Streptomycete Promoters. *Nucleic Acids Res* **20**, 961-974.
- TAKAICHI, S., SANDMANN, G., SCHNURR, G., SATOMI, Y., SUZUKI, A. und MISAWA, N. (1996). The Carotenoid 7,8-Dihydro-Psi End Group Can Be Cyclized by the Lycopene Cyclases from the Bacterium *Erwinia uredovora* and the Higher Plant *Capsicum annum*. *Eur J Biochem* **241**, 291-6.
- TEBBE, C. C. und VAHJEN, W. (1993). Interference of Humic Acids and DNA Extracted Directly from Soil in Detection and Transformation of Recombinant DNA from Bacteria and a Yeast. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2657-65.
- TINDALL, K. R. und KUNKEL, T. A. (1988). Fidelity of DNA Synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. *Biochemistry* **27**, 6008 - 6013.
- TO, K.-Y., LAI, E.-M., LEE, L.-Y., LIN, T.-P. und HUNG, C.-H. (1994). Analysis of the Gene Cluster Encoding Carotenoid Biosynthesis in *Erwinia herbicola* Eho13. *Microbiol.* **140**, 331-39.
- TORSVIK, V., DAAE, F. L., SANDAA, R. A. und OVREAS, L. (1998). Novel Techniques for Analysing Microbial Diversity in Natural and Perturbed Environments. *J Biotechnol* **64**, 53-62.
- TSAI, Y. L. und OLSON, B. H. (1991). Rapid Method for Direct Extraction of DNA from Soil and Sediments. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1070-4.
- TSAI, Y. L. und OLSON, B. H. (1992a). Detection of Low Numbers of Bacterial Cells in Soils and Sediments by Polymerase Chain Reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**, 754-7.
- TSAI, Y. L. und OLSON, B. H. (1992b). Rapid Method for Separation of Bacterial DNA from Humic Substances in Sediments for Polymerase Chain Reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2292-5.
- VARTANIAN, J.-P., HENRY, M. und WAIN-HOBSON, S. (1996). Hypermutagenic PCR Involving All Four Transitions and a Sizeable Proportion of Transversions. *Nucleic*

- Acids Res* **24**, 2627-2631.
- VOLOSSIOUK, T., ROBB, E. J. und NAZAR, R. N. (1995). Direct DNA Extraction for PCR-Mediated Assays of Soil Organisms. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3972-6.
- WIKSTROM, P., WIKLUND, A., ANDERSSON, A. C. und FORSMAN, M. (1996). DNA Recovery and PCR Quantification of Catechol 2,3-Dioxygenase Genes from Different Soil Types. *J Biotechnol* **52**, 107-20.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. und MESSING, J. (1985). Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13mp18 and Puc19 Vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- ZHAO, H., GIVER, L., SHAO, Z., AFFHOLTER, J. A. und ARNOLD, F. H. (1998). Molecular Evolution by Staggered Extension Process (Step) in Vitro Recombination. *Nat Biotechnol* **16**, 258-61.
- ZHOU, J., BRUNS, M. A. und TIEDJE, J. M. (1996). DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl Environ Microbiol* **62**, 316-22.

---

## 8. LEBENS LAUF

### ANGABEN ZUR PERSON

Name: Kauffmann  
Vorname: Isabelle Melanie  
Wohnort: 70327 Stuttgart, Riedlinger Str. 8A  
Geburtsdatum: 18. Juni 1974  
Geburtsort: Stuttgart  
Nationalität: deutsch

### SCHULBILDUNG

9/1980 – 7/1984 Sommerrainschule, Stuttgart-Sommerrain  
8/1984 – 9/1990 Johannes-Kepler-Gymnasium, Stuttgart Bad-Cannstatt  
9/1990 – 5/1993 Gymnasium Königin-Olga-Stift, Stuttgart

### WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG

10/1993 – 10/1998 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart mit Abschluss als Diplom-Biologin (technisch orientiert)  
2/1998 – 10/1998 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Technische Biochemie an der Universität Stuttgart unter Leitung von Prof. Dr. Rolf D. Schmid: *Veränderung der Substratspezifität der Lipase BTL-2 durch evolutives Design*  
10/1998 – 5/2002 Doktorarbeit am Institut für Technische Biochemie an der Universität Stuttgart unter Leitung von Prof. Dr. Rolf D. Schmid

### PUBLIKATION

**I. Kauffmann and C. Schmidt-Dannert (2001):** Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design.” Protein Eng **14** (11): 919-28.