

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Fachgebiet für Biomolekulare Lebensmitteltechnologie

# **Gewinnung von Aromastoffen durch enzymatische Spaltung von Carotinoiden mit der rekombinanten Dioxygenase AtCCD1**

Martin Schilling

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. (Zonguldak Univ./Türkei) H. Parlar  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab  
2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Die Dissertation wurde am 14.01.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.04.2008 angenommen.



---

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum August 2003 bis November 2007 in der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik des Karl-Winnacker-Instituts der DECHEMA e.V. in Frankfurt angefertigt.

Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht.

## Publikationen

Schilling, M., Haetzelt, F., Schwab, W., Schrader, J. (2008) Impact of surfactants on solubilization and activity of the carotenoid cleavage dioxygenase AtCCD1 in an aqueous micellar reaction system. *Biotechnol Lett* 30:701-706.

Schilling, M., Patett, F., Schwab, W., Schrader, J. (2007) Influence of solubility-enhancing fusion proteins and organic solvents on the *in vitro* biocatalytic performance of the carotenoid cleavage dioxygenase AtCCD1 in a micellar reaction system. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:829-36.

Patett, F., Schilling, M., Sell, D., Schmidt, H., Schwab, W., Schrader, J. (2006), Heterologous expression of carotenoid-cleaving dioxygenases from plants for the production of natural flavour compounds. In *Flavour Science: Recent Advances and Trends*, Vol. 43, 117-120.

## Vorträge

Schilling, M., Patett, F., Schwab, W., Schrader, J. (2006) Selective *in vitro* Carotenoid Cleavage Using a Recombinant Dioxygenase from *Arabidopsis thaliana* – AtCCD1. 6<sup>th</sup> European Symposium on Biochemical Engineering (ESBES), Salzburg, Austria.

## Posterpräsentationen

Schilling, M., Schrader, J. (2007) Regiospecific oxidative cleavage of carotenoids with the carotenoid cleavage dioxygenase AtCCD1. *Biotrans 2007* in Oviedo, Spanien.

Schilling, M., Patett, F., Sell, D., Schwab, W., Schrader, J. (2005) Flavour production with a recombinant carotenoid-cleavage dioxygenase. *Bioperspectives 2005* in Wiesbaden.

Schilling, M., Patett, F., Schwab, W., Schrader, J., Sell, D. (2004) Recombinant expression of plant carotenoid-cleaving dioxygenases for the production of natural flavours from carotenoid substrates. *Biocat 2004*. International Congress on Biocatalysis in Hamburg.

## Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab, möchte ich für die Betreuung der Arbeit, seine hilfreichen Anregungen und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bei meinem Gastaufenthalt im November 2003 danken. Bei Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Engel und Herrn Prof. Dr. Dr. Harun Parlar bedanke ich mich für die Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Herrn Dr. Jens Schrader gilt mein herzlicher Dank für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, mich am Karl-Winnacker-Institut der DECHEMA e.V. weiterzuentwickeln.

Allen Mitarbeitern des Karl-Winnacker-Institutes, insbesondere der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik, möchte ich für die freundschaftliche und ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bei allerlei Problemen danken. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Dr. Frauke Patett, die meinen Einstieg in die rekombinante Proteinexpression und Proteinbiochemie sehr erleichtert hat. Auch Marco Mirata und Hendrik Schewe aus dem „Doktorandenbüro“, mit denen ich die Höhen und Tiefen einer Doktorarbeit gemeinsam erlebt habe, möchte ich an dieser Stelle ausdrücklich für die gute Zusammenarbeit danken.

Senta Lauer und Julia Schumacher möchte ich danken, weil sie mit ihren Diplomarbeiten wichtige Erkenntnisse für diese Arbeit geliefert haben.

Herrn Prof. Gerhard Sandmann danke ich für die Bereitstellung der carotinoidproduzierenden *E. coli* Stämme. Herrn Dr. Christian Christiansen möchte ich für die Bereitstellung von kristallinen und formulierten Carotinoiden, sowie die wertvollen Hinweise zu physikochemischen Eigenschaften von Carotinoiden und deren Formulierung danken.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AiF), die das Projekt finanziell gefördert hat.

Schließlich möchte ich ganz besonders meinen Eltern und Maie für ihre vielfältige Unterstützung und ihren Beitrag zum Gelingen der Arbeit danken!

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
3.1	Enzyme des Carotinoidmetabolismus .....	5
3.1.1	Carotinoidbiosynthese .....	5
3.1.2	Carotinoidspaltung.....	9
3.2	Physikochemische Eigenschaften von Carotinoiden und Vermittlung in wässrige Systeme .....	13
3.2.1	Aggregation in Phospholipiddoppelschichten .....	14
3.2.2	Solubilisierung von Carotinoiden in mizellare Systeme.....	15
3.3	Rekombinante Expression eukaryotischer Proteine in <i>Escherichia coli</i> .....	17
<b>4</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>21</b>
5.1	Entwicklung des photometrischen Assays.....	21
5.1.1	Temperatur, pH-Optimum und Lagerstabilität im mizellaren System.....	25
5.1.2	Zusammenfassung und Diskussion .....	26
5.2	Verbesserung der rekombinanten Expression von AtCCD1 .....	28
5.2.1	Verbesserte Expression in <i>E. coli</i> .....	29
5.2.1.1	Erzeugung unterschiedlicher Proteinmodifikationen von AtCCD1 ...	29
5.2.1.2	Einfluss der Expressionsbedingungen.....	30
5.2.1.3	Aufreinigung und Charakterisierung der Proteinmodifikationen.....	33
5.2.2	Expression in <i>Pichia pastoris</i> .....	36
5.2.3	Zusammenfassung und Diskussion .....	38
5.3	Vermittlung der Substrate in wässrig mizellaren Systemen .....	43
5.3.1	Unterschiedliche Methoden zur Präparation mizellar solubilisierter Carotinoide .....	43
5.3.2	Einfluss von wassermischbaren, organischen Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität.....	44
5.3.3	Einfluss verschiedener nicht-ionischer Tenside auf die enzymatische Umsetzung.....	46
5.3.4	Produktinhibierung im mizellaren System .....	51
5.3.5	Vergleich der Spezifität von AtCCD1 mit der cooxidativen Spaltung durch eine Lipxygenase .....	51
5.3.6	Substratspektrum im mizellaren Reaktionssystem.....	53

---

5.3.7	Zusammenfassung und Diskussion .....	55
5.4	Alternative Vermittlungsformen der Carotinoide .....	62
5.4.1	<i>In vitro</i> Umsatz von emulgierten, carotinoidhaltigen Pflanzenextrakten ..	62
5.4.2	<i>De novo</i> $\beta$ -Ionon Synthese .....	65
5.4.3	<i>In vitro</i> $\beta$ -Carotinspaltung in Phospholipidvesikeln.....	66
5.4.4	Zusammenfassung und Diskussion .....	67
<b>6</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>69</b>
6.1	Material.....	69
6.1.1	Chemikalien .....	69
6.1.2	Medien, Puffer und Lösungen .....	69
6.1.2.1	Medien.....	69
6.1.2.2	Puffer und Lösungen .....	71
6.1.3	Mikroorganismen .....	74
6.1.4	Plasmide .....	74
6.1.5	Oligonukleotide und Marker .....	74
6.1.6	Enzyme und Antikörper.....	76
6.1.7	Kommerzielle Kits .....	76
6.2	Geräte.....	77
6.2.1	Photometrische Mikrotiterplattenmessungen .....	77
6.2.2	Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Diodenarraydetektion (HPLC/DAD) .....	77
6.2.3	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC/MS)	77
6.2.4	Sonstige Geräte .....	78
6.3	Software .....	78
6.4	Methoden.....	78
6.4.1	Molekularbiologische Methoden .....	78
6.4.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	78
6.4.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	79
6.4.1.3	Klonierung von PCR-Produkten.....	80
6.4.1.4	Herstellung kompetenter Zellen.....	80
6.4.1.5	Transformation kompetenter Zellen.....	81
6.4.1.6	Kolonie-PCR, Plasmidpräparation und Sequenzierung .....	82
6.4.1.7	Überprüfung der genomischen Integration bei <i>P. pastoris</i> .....	82
6.4.1.8	Herstellung von Glycerolkulturen.....	82
6.4.2	Proteinbiochemische Methoden.....	83
6.4.2.1	Proteinexpression.....	83
6.4.2.2	Gewinnung von Rohextrakten und Solubilisierung .....	83
6.4.2.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung .....	84
6.4.2.4	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay .....	84

---

6.4.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und densitometrische Gelanalyse.....	85
6.4.2.6	Western Blotting .....	86
6.4.3	Vermittlung der Substrate und Aktivitätsassays .....	86
6.4.3.1	Mizellare <i>in vitro</i> Vermittlung der Substrate .....	86
6.4.3.2	Herstellung von carotinoidbeladenen Phospholipidvesikeln .....	88
6.4.3.3	<i>In vivo</i> Farbkomplementierungsassay .....	88
6.4.4	Analytische Methoden.....	89
6.4.4.1	Spektrophotometrische Assays und Datenprozessierung .....	89
6.4.4.2	Flüssig- und gaschromatographische Analyse von Substratspaltung und Produktbildung.....	90
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>106</b>
8.1	Karten und Multiple Cloning Sites der verwendeten Plasmide .....	106
8.1.1	pET-29a .....	106
8.1.2	pGEX-4T .....	107
8.1.3	pET-43a .....	108
8.1.4	pPICZ A .....	109
8.1.5	pPICZ $\alpha$ A .....	110

**Abkürzungsverzeichnis:**

Abb.	Abbildung
ACO	<i>Apocarotenoid cleavage oxygenase</i>
AOX	Alkoholoxidase
Apocarotinal	$\beta$ -Apo-8'-Carotinal
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AtCCD1	<i>Arabidopsis thaliana carotenoid cleavage dioxygenase 1</i>
BCA	Bicinchinonsäure
BHT	Butylhydroxytoluol
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BSA	Rindeserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CCD	<i>Carotenoid cleavage dioxygenase</i>
CMC	<i>Critical micelle concentration</i> (kritische Mizellenkonzentration)
C-Terminus	Carboxyterminales Ende eines Polypeptids
DAD	Diodenarray-Detektor
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DHA	Dihydroactinidiolid
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GST	Glutathion-S-Transferase
His <sub>6</sub>	Hexahistidin-Tag
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
k <sub>cat</sub>	Wechselzahl (Umsatz an Substratmolekülen pro Enzymmolekül pro Zeit)
K <sub>M</sub>	Michaelis Konstante
LB	Luria-Bertani
Log P	Dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz
LOX	Lipoxygenase
max v	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit einer Reaktion

---

mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NCED	<i>Nine-cis-epoxycarotenoid cleavage dioxygenase</i>
N-Terminus	Aminoterminales Ende eines Polypeptids
NusA	<i>N-utilizing substance A</i> (Transkriptionsfaktor)
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, Serinprotease-Inhibitor
RP-18	Umkehrphase mit C <sub>18</sub> Alkylkette ( <i>reversed phase</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC	<i>Super optimal broth</i> (SOB) + Glukose
t <sub>max v</sub>	Zeitraum von Beginn der Reaktion bis zur maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bzw. Dauer der Lag-Phase
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
TIC	<i>Total ion current</i> (Totalionenstrom)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	( <i>p-tert-Octylphenoxy</i> )polyethoxyethanol
tRNA	Transfer RNA
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaureat
Tween 40	Polyoxyethylen-sorbitan-monopalmitat
Tween 60	Polyoxyethylen-sorbitan-monostearat
Tween 80	Polyoxyethylen-sorbitan-monooleat
U	<i>Unit</i> (µmol/min)
UV	Ultraviolett
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung (Michaelis-Menten Gleichung)
VP14	9-cis Epoxycarotinoid-spezifische Dioxygenase aus Mais
YNB	Hefe Stickstoffbasalmedium ( <i>Yeast Nitrogen Base</i> )

Anmerkung:

Die Namen von Gensequenzen (z. B. *AtCCD1*) erfolgten in kursiver Schreibweise, wohingegen die entsprechenden Proteine (AtCCD1) in normaler Schreibweise dargestellt wurden.

# 1 Zusammenfassung

Oxidative Spaltprodukte von Carotinoiden erfüllen wichtige biologische Funktionen in vielen Organismen. Die Struktur einer Reihe von pflanzlichen Aromastoffen deutet auf ihre Entstehung aus Carotinoidvorläufern hin, jedoch konnten die Enzyme, die eine spezifische oxidative Spaltung von Carotinoiden katalysieren, lange Zeit nicht isoliert werden. Ein Durchbruch gelang mit der Klonierung und funktionellen Charakterisierung des Gens der carotinoidspaltenden Dioxygenase Vp14 aus Mais im Jahr 1997. Seitdem wurden in vielen Organismen verwandte Enzyme gefunden und beim Verständnis der biologischen Bedeutung der Spaltprodukte Fortschritte erzielt.

Der biotechnologische Einsatz dieser Enzymfamilie zur Erzeugung von Aromastoffen und anderen Carotinoidspaltungsprodukten ist wirtschaftlich interessant, jedoch sind die Enzyme bisher kaum *in vitro* charakterisiert. Die schwierige rekombinante Expression dieser Enzyme und Probleme bei der Vermittlung der extrem hydrophoben Substrate in wässrige Systeme stellen hierbei die größten Hürden dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Verbesserung der rekombinanten Enzymgewinnung untersucht und Reaktionssysteme für die enzymatische *in vitro* Spaltung von Carotinoiden entwickelt. Als Modellenzym wurde AtCCD1 eingesetzt, eine Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana*, die ein breites Spektrum an Carotinoidsubstraten regioselektiv an der 9-10 und 9'-10' Doppelbindung spaltet.

Ein photometrischer Assay zur quantitativen Bestimmung der Enzymaktivität wurde mit einer mizellaren Lösung des Modells substrates  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal etabliert und zunächst für grundlegende Untersuchungen zur *in vitro* Stabilität des Enzyms genutzt.

Die Übertragung des Tests in den Mikrotiterplattenmaßstab ermöglichte die systematische Untersuchung der Expressionsbedingungen in *Escherichia coli*. Das Ziel war hierbei, die Aggregation des rekombinanten Proteins in inaktiver, unlöslicher Form zu reduzieren und dadurch die Enzymausbeute zu verbessern. Höhere Enzymaktivitäten in den Zellextrakten konnten durch eine verringerte Expressionstemperatur und die Solubilisierung von membranassoziiertem Enzym mit geeigneten Tensiden erreicht werden, während die Induktorkonzentration und das Medium lediglich einen geringen Einfluss hatten.

Der Einfluss der Fusion von AtCCD1 mit löslichkeitserhöhenden Trägerproteinen wurde untersucht, um den Anteil an aggregiertem Enzym weiter zu reduzieren. Dabei zeigte sich, dass die N-terminale Fusion mit den Trägerproteinen NusA (Transkriptionsfaktor) und GST (Glutathion-S-Transferase) zu verringerten molaren Aktivitäten von AtCCD1 führte. Im Fall von GST-AtCCD1 konnte dieser Effekt aber durch die verbesserte Expression des Fusionsproteins überkompensiert werden. Der Effekt wurde als eine erhöhte zelluläre Gesamtkonzentration an aktivem,

rekombinantem Enzym bei gleichzeitiger Verringerung der Faltungsqualität interpretiert. Eine unterschiedliche Verteilung zwischen Zytosol und Zellmembran der verschiedenen AtCCD1-Modifikationen konnte durch Solubilisierungsexperimente nachgewiesen werden.

Da die Amphiphilie des Enzyms vermutlich eine Rolle bei der Substratzugänglichkeit *in vivo* spielt, wurden die unterschiedlichen AtCCD1-Modifikationen auch für die Charakterisierung und Verbesserung des mizellaren *in vitro* Reaktionssystems eingesetzt. Die in Mizellenform vorliegenden Aggregate aus Tensiden und Carotinoidsubstraten zeigten ein wesentlich komplexeres Verhalten als molekulare Lösungen. Eine bis zu 18-fache Aktivierung des Enzyms konnte durch die Zugabe von wassermischbaren aliphatischen Alkoholen erzielt werden. Es wurde eine deutliche Korrelation zwischen optimaler Konzentration und Hydrophobizität des jeweiligen Alkohols aufgezeigt. Das Ausmaß der Aktivierung war auch von der Substrat- und Tensidkonzentration abhängig. Unterschiedliche optimale Ethanolkonzentrationen wurden für die verschiedenen AtCCD1-Modifikationen bestimmt. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass der aktivierende Effekt durch die Strukturierung des mizellaren Systems verursacht ist.

Die Einlagerung des Substrats in die Tensidmizelle sowie die Wechselwirkungen des Enzyms mit den beladenen Mizellen konnten durch den Einsatz verschiedener nicht-ionischer Tenside in Kombination mit den unterschiedlichen AtCCD1-Varianten als wichtige Faktoren für den enzymatischen Umsatz identifiziert werden. Beim Einsatz von nicht-ionischen Tensiden der Tween-Reihe wurden Lag-Phasen im enzymatischen Umsatz gemessen, deren Ursprung im Zusammenhang mit einer Reaktionssystem-abhängigen Substratinhibierung oder einer Produktaktivierung diskutiert wurde. Die Bedeutung der Substratzugänglichkeit und Strukturierung des mizellaren Systems konnte durch Inhibierungsversuche mit  $\beta$ -Ionon und die kinetische Charakterisierung des Enzyms mit verschiedenen Substraten untermauert werden.

Die hohe Regiospezifität der Spaltung und die damit verbundenen hohen Produktausbeute wurde durch den Vergleich mit einem cooxidativen enzymatischen System hervorgehoben.

Abschließend wurde die grundsätzliche Eignung von Emulsionen und Phospholipidvesikeln als alternative Vermittlungformen zum mizellaren Reaktionssystem untersucht. Eine enzymatische  $\beta$ -Ionon- und 3-Hydroxy- $\beta$ -Iononbildung konnte beim Einsatz emulgierter, carotinoidhaltiger Pflanzenextrakte nachgewiesen werden.  $\beta$ -Carotin war in dem mizellaren System für AtCCD1 nicht zugänglich. In einem *in vivo* Assay mit *E. coli* und einem *in vitro* Assay mit Phospholipidvesikeln konnte es jedoch umgesetzt werden.

Somit wurden Ergebnisse für den biotechnologischen Einsatz von CCDs erhalten, die die Grundlage für weiterführende Studien zur Etablierung eines Bioprozesses zur Produktion von bioaktiven Carotinoidspaltungsprodukten darstellen.

## 2 Summary

Oxidative cleavage products of carotenoids fulfill important biological functions in many organisms. The structure of a number of important plant derived aroma compounds suggests that they are derived from oxidative cleavage of carotenoid precursors, however, enzymes catalyzing the specific oxidative cleavage of carotenoids could not be isolated for a long time. A breakthrough was achieved in 1997, when the carotenoid cleaving dioxygenase Vp14 from maize was cloned and functionally characterized. Since then, homologous enzymes were found in many organisms and insights into their biological significance have been gained.

The biotechnological use of this enzyme family for the production of aroma compounds is economically attractive but these enzymes have not been thoroughly characterized *in vitro*. This is due to the fact that recombinant expression as well as the delivery of the extremely hydrophobic substrates in enzyme compatible, aqueous systems is difficult.

In the present thesis, improvement of recombinant expression of these enzymes and the development of suitable reaction systems for the enzymatic *in vitro* cleavage of carotenoids were investigated. AtCCD1, a dioxygenase from *Arabidopsis thaliana*, which cleaves a broad spectrum of carotenoid substrates at the 9-10 and 9'-10' double bond was used as a model enzyme. A photometric assay with a micellar solution of the model substrate  $\beta$ -apo-8'-carotenal was developed and used to determine *in vitro* stability of the enzyme.

Transfer of this assay to a microplate format allowed the systematic investigation of expression conditions in *E. coli* with the objective to reduce the formation of inactive inclusion bodies and to obtain higher enzyme yields. Reduction of expression temperature and solubilization of membrane associated AtCCD1 with suitable surfactants resulted in higher enzyme activities in cellular extracts whereas inductor concentration and medium variations had a less pronounced effect.

In order to further improve enzyme expression, AtCCD1 was fused with solubility enhancing carrier proteins. N-terminal fusion with the transcription factor NusA and glutathione-S-transferase (GST) resulted in a reduction of molar activity. However, in the case of the GST-AtCCD1 fusion this could be overcompensated by improved expression. This effect could be explained by an increased cellular concentration of the recombinant fusion enzyme in combination with a reduced folding quality. Differing affinities of the fusion proteins for the *E. coli* membrane could be demonstrated by solubilization experiments with surfactants.

The amphiphilic character of AtCCD1 most likely also plays an important role for *in vivo* substrate access. For this reason the different AtCCD1 modifications were also applied for the characterization and improvement of the micellar *in vitro* reaction system. The micellar aggregates of surfactants and substrate showed a markedly

more complex behavior than molecular substrate solutions. An up to 18-fold activation could be achieved by the addition of water miscible aliphatic alcohols. The concentration required for maximum activation was dependent on the hydrophobicity of the applied alcohol. In addition, the degree of activation depended on the substrate and surfactant concentration and variations in optimum ethanol concentrations could be found for the different AtCCD1 modifications. These results suggest that activation is caused by a structuring effect on the micellar system.

Kinetic studies with various surfactants and enzyme modifications showed that solubilization of the substrate in the surfactant micelle as well as micelle-enzyme interactions play an important role for substrate accessibility. Lag-phases in the reaction progress curves were obtained when the Tween series surfactants were used for substrate solubilization and were formally interpreted as a product activation or substrate inhibition. Inhibition studies with  $\beta$ -ionone and kinetic characterization with various carotenoid substrates further underlined the significance of substrate accessibility in micellar system.

High regiospecificity and product yields of the cleavage obtained with AtCCD1 were demonstrated when compared to a lipoxygenase catalyzed, cooxidative system.

The principal suitability of emulsions and phospholipid vesicles as alternative reaction systems for AtCCD1 could also be shown.  $\beta$ -ionone and 3-hydroxy- $\beta$ -ionone were enzymatically generated from carotenoid containing, emulsified plant extracts.  $\beta$ -Carotene could not be cleaved in the micellar system, whereas it was cleaved in an *in vivo* assay with a carotenoid accumulating *E. coli* strain and in an *in vitro* assay with phospholipid vesicles.

Taken together, these results provide a basis for the development of a bioprocess for the production of bioactive carotenoid cleavage products.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Enzyme des Carotinoidmetabolismus

##### 3.1.1 Carotinoidbiosynthese

Carotinoide sind aus der Terpenbiosynthese in Mikroorganismen und Pflanzen abgeleitete Pigmente, die eine Vielzahl biologischer Funktionen besitzen (Britton 1995, Meyer 2002). Die Mehrzahl der über 700 bekannten Carotinoide bestehen aus einem C<sub>40</sub> Grundgerüst und sind somit Tetraterpene (Abb. 1). Die an den Ionon-Ringen oxyfunktionalisierten Carotinoide, werden zur Gruppe der Xanthophylle zusammengefasst.

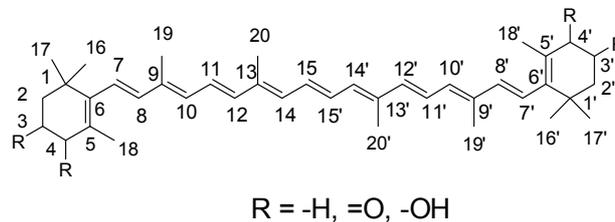


Abb. 1: Grundstruktur eines C<sub>40</sub> Carotinoids mit zwei β-Iononringen und nach IUPAC nummerierten C-Atomen.

Eine besonders wichtige Funktion für das Leben auf der Erde erfüllt das konjugierte π-Elektronensystem dieser Polyene als Radikalfänger während der Photosynthese in Bakterien und Pflanzen. Außerdem kann es durch seine Wechselwirkung mit Licht sowohl überschüssige Lichtenergie ableiten, als auch durch seine Funktion als „light harvester“ einen höheren Wirkungsgrad des Photosystems gewährleisten (Bergantino et al., 2003, Cunningham et al., 1998, Merchant et al., 2005).

Die Biosynthese der Carotinoide erfolgt ausgehend von den Vorläufern Dimethylallyldiphosphat und Isopentenylidiphosphat (IPP). Durch eine Kopf-Schwanz Verknüpfung dieser C<sub>5</sub>-Körper entsteht Geranyldiphosphat. Die schrittweise Addition weiterer IPPs ergibt zunächst Farnesylidiphosphat und dann das Diterpen Geranylgeranylidiphosphat (GGPP). Die modulare Synthese dieser Verbindung wird durch die GGPP Synthase (GGPS) katalysiert. Der erste dedizierte Schritt der Carotinoidbiosynthese erfolgt durch die Synthese des C<sub>40</sub> Grundgerüsts (Phytoen) aus zwei Molekülen GGPP durch die Phytoensynthase (PSY) (Abb. 2).



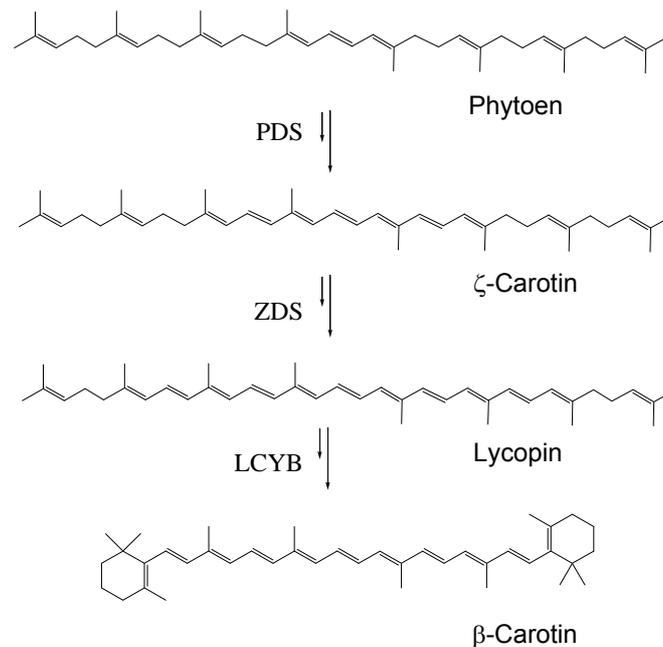


Abb. 3: Desaturierung und Cyclisierung des C<sub>40</sub> Grundgerüsts (Cunningham et al., 1998). PDS, Phytoen Desaturase; ZDS, ζ-Carotin Desaturase; LCYB, Lycopin β-Cyclase.

Die anschließende Synthese der Xanthophylle erfolgt durch die Oxyfunktionalisierung der Iononringe (Abb. 4). Die Hydroxylierung am 3- und 3'-C-Atom des β-Carotins durch eine β-Carotin Hydroxylase (BHY) führt zur Bildung des Zeaxanthins, das im Xanthophyll-Zyklus durch die Zeaxanthinepoxidase (ZEP) über das Intermediat Antheraxanthin zum Violaxanthin umgewandelt wird (Abb. 4). Die Rückreaktion wird durch die Violaxanthin Deepoxidase (VDE) katalysiert (Latowski et al., 2004, Latowski et al., 2002, Sandmann 2001).

Während die genannten Carotinoide ubiquitär in den Chloroplastenmembranen vorkommen, gibt es noch eine Anzahl weiterer Modifikationen, die teilweise pflanzenspezifisch und organspezifisch vorkommen, oder die bisher nur in Mikroorganismen gefunden wurden. Die Bildung des Capsanthins und des Capsorubins, den Hauptcarotinoiden der Paprika, wird z.B. durch die Capsanthin/Capsorubin-Synthase (CCS) aus Antheraxanthin bzw. Violaxanthin katalysiert (Bouvier et al., 1994). Astaxanthin ist ein weiteres kommerziell bedeutsames Carotinoid, das durch die Einführung zweier Keto- und Hydroxyfunktionen an den β-Iononringen des β-Carotins synthetisiert wird. Diese Reaktionen können durch ein oder zwei Enzyme katalysiert werden (Cunningham et al., 2005, Fraser et al., 1998, Ojima et al., 2006).

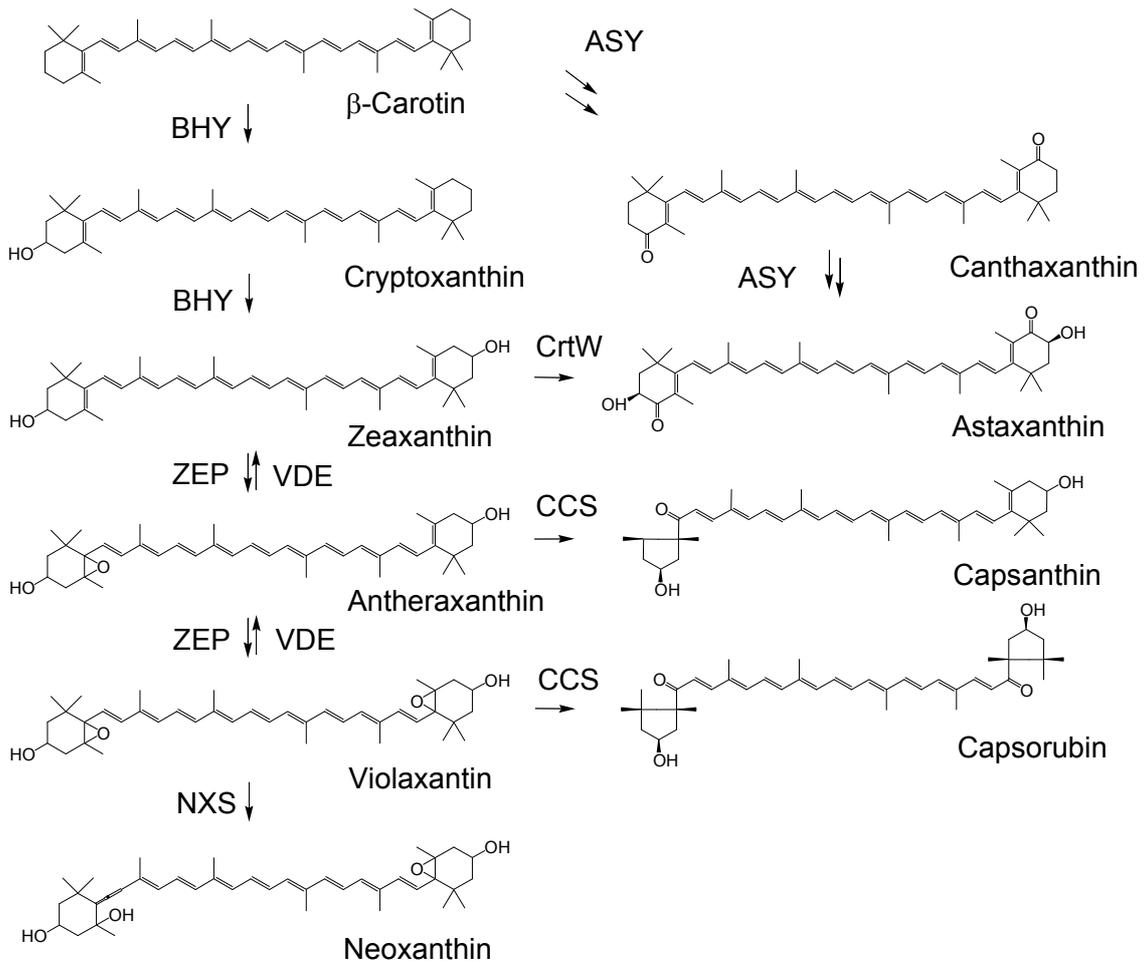


Abb. 4: Synthese von Xanthophyllen aus  $\beta$ -Carotin. Die Darstellung zeigt Xanthophylle mit besonderer biologischer oder wirtschaftlicher Bedeutung, deren Biosynthese teilweise in unterschiedlichen Organismen aufgeklärt wurde (Fraser et al., 2004b, Fraser et al., 1998, Ojima et al., 2006, Sandmann 2001). ASY, Astaxanthin Synthase; BHY,  $\beta$ -Carotin Hydroxylase; CrtW,  $\beta$ -Carotin Ketolase; CCS, Capsanthin/Capsorubin Synthase; NXS, Neoxanthin Synthase; VDE, Violaxanthin Epoxidase; ZEP, Zeaxanthin Epoxidase.

Die Identifikation der Carotinoidbiosynthesegene wurde durch die rasche Inaktivierung der beteiligten Enzyme bei der Aufreinigung erschwert. Dieses Problem konnte durch die Entwicklung eines *in vivo* Assays in *E. coli* gelöst werden. Durch die Expression der Carotinoidbiosynthesegene aus *Erwinia uredovora* stellt *E. coli* die Substrate für potentielle, carotinoidmodifizierende Enzyme bereit, die vor diesem Hintergrund coexprimiert werden und so *in vivo* charakterisiert werden können (Misawa et al., 1990, Perry et al., 1986). Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist die einfache Identifikation relevanter Gene nach der Transformation anhand der mit der Carotinoidmodifikation einhergehenden Farbänderung der Zellen. Dieser Aktivitätsassay wird deshalb auch als *in vivo* „Farbkomplementierungsassay“ (color complementation) bezeichnet (Cunningham et al., 2007).

### 3.1.2 Carotinoidspaltung

Während die Biosynthese der wichtigsten Carotinoide schon seit längerer Zeit molekulargenetisch nachvollzogen worden ist, stellt die weitere Modifikation von Carotinoiden durch die anschließende, regiospezifische oxidative Spaltung zu einer Vielzahl von Spaltungsprodukten (Apocarotinoiden) noch ein relativ neues Feld der Carotinoidforschung dar (Auldrige et al., 2006b, Bouvier et al., 2005, Bouvier et al., 2003).

Die Struktur einer Reihe wichtiger pflanzlicher Aromastoffe, wie beispielsweise den Iononen, deutet auf ihre Entstehung durch die oxidative Spaltung von Carotinoiden hin. Allerdings war lange Zeit nicht klar, ob diese Produkte durch Autoxidation, eine unspezifische enzymkatalysierte Cooxidation, oder durch eine spezifische, enzymkatalysierte Spaltung entstehen (Winterhalter et al., 2002). Die biotechnologische Produktion solcher Spaltprodukte war lange Zeit nur durch cooxidative Spaltung, z.B. mit einer Lipoxygenase, möglich (Ben Aziz et al., 1971, Waché et al., 2002). Hierbei werden reaktive Sauerstoffverbindungen enzymatisch erzeugt, die Carotinoide oxidativ spalten. Diese Reaktionen sind, ebenso wie die direkte Spaltung durch eine kürzlich charakterisierte, carotinoidspaltende Peroxidase aus dem Pilz *Lepista irina*, aufgrund der fehlenden Regiospezifität durch geringe Ausbeuten gekennzeichnet (Zorn et al., 2003b).

Das wohl bekannteste Carotinoidspaltungsprodukt ist das Retinal (Vitamin A), das für den Sehvorgang essentielle Chromophor des Lichtrezeptors Rhodopsin in der Netzhaut von Tieren.  $\beta$ -Carotin wurde schon früh als möglicher Vorläufer für dieses Vitamin identifiziert (Moore 1929). Die teilweise biochemische Charakterisierung eines Enzyms, das die regiospezifische, zentrale Spaltung des  $\beta$ -Carotins zu zwei Retinalmolekülen katalysiert, erfolgte unabhängig in zwei Arbeitsgruppen Mitte der 60er Jahren, jedoch gelang keine erfolgreiche Aufreinigung (Goodman et al., 1965, Goodman et al., 1967b, Goodman et al., 1966, Olson et al., 1965). Es sollte noch weitere 30 Jahre dauern, bis schließlich das erste Gen eines homologen Enzyms mittels Transposon-Tagging in einer Maismutante gefunden wurde (Schwartz et al., 1997, Tan et al., 1997). Dieses *vp14* genannte Gen codiert für eine Dioxygenase, die die Substrate 9-cis Neoxanthin und 9-cis Violaxanthin an der C11-C12 Doppelbindung zu einem Molekül Xanthoxin und einem C-25 Aldehyd spaltet (Schwartz et al., 1997). Xanthoxin ist der biochemische Vorläufer der Abszisin säure, einem wichtigen Pflanzenhormon, das unter anderem die pflanzliche Reaktion auf widrige Umweltbedingungen reguliert (Himmelbach et al., 1998).

Aufgrund der nun bekannten Sequenz eines spezifisch carotinoidspaltenden Enzyms wurden bis heute eine große Anzahl homologer Gene aus verschiedenen Organismen kloniert und die zugehörigen Enzyme funktionell exprimiert (Auldrige et al., 2006b). Die wie VP14 ausschließlich an der 9-cis Doppelbindung von Epoxy-carotinoiden spaltenden Dioxygenasen werden zur Gruppe der NCEDs (nine-cis epoxy-carotenoid dioxygenases) zusammengefasst. Weiterhin wurden auf dieser

Grundlage aber auch die Gene aus *Drosophila* und aus Säugern entdeckt, deren Enzyme die zentrale Spaltung des  $\beta$ -Carotins zu zwei Retinalmolekülen katalysieren (Redmond et al., 2001, von Lintig et al., 2000). Für die funktionelle Charakterisierung des *Diox1* Gens aus *Drosophila* wurde zum ersten Mal der für die Funktionsaufklärung der Carotinoidbiosyntheseenzyme häufig verwendete *in vivo* Komplementierungsassay eingesetzt, der seitdem regelmäßig zur Überprüfung der Funktion der carotinoidspaltenden Oxygenasen verwendet wird (Cunningham et al., 2007, von Lintig et al., 2000).

AtCCD1, das erste Enzym aus der mit der NCED verwandten Untergruppe der carotinoidspaltenden Dioxygenasen (carotenoid cleavage dioxygenases; CCDs), wurde ebenfalls durch die Suche nach homologen Sequenzen mit degenerierten Primern im *Arabidopsis thaliana* Genom gefunden (Schwartz et al., 2001). Diese Gruppe unterscheidet sich von den NCEDs durch ein relativ breites Spektrum an Carotinoidsubstraten, eine symmetrische Spaltung an beiden Seiten und die Position der Doppelbindung, an der die oxidative Spaltung stattfindet. In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl weiterer CCDs in verschiedenen Pflanzen gefunden, die wie AtCCD1 die 9-10 und 9'-10' Doppelbindung einer Reihe von Carotinoiden spalten. Eine interessante Ausnahme hinsichtlich der Regioselektivität der Spaltungsreaktion und der Substratspezifität stellt dabei die CsZCD aus Krokus (*Crocus sativus*) dar, die lediglich Zeaxanthin an der 7-8 und 7'-8' Schnittstelle spaltet und dadurch einen wichtigen Vorläufer für die Bildung des Safranals und des Safranfarbstoffes Crocetin erzeugt (Bouvier et al., 2003).

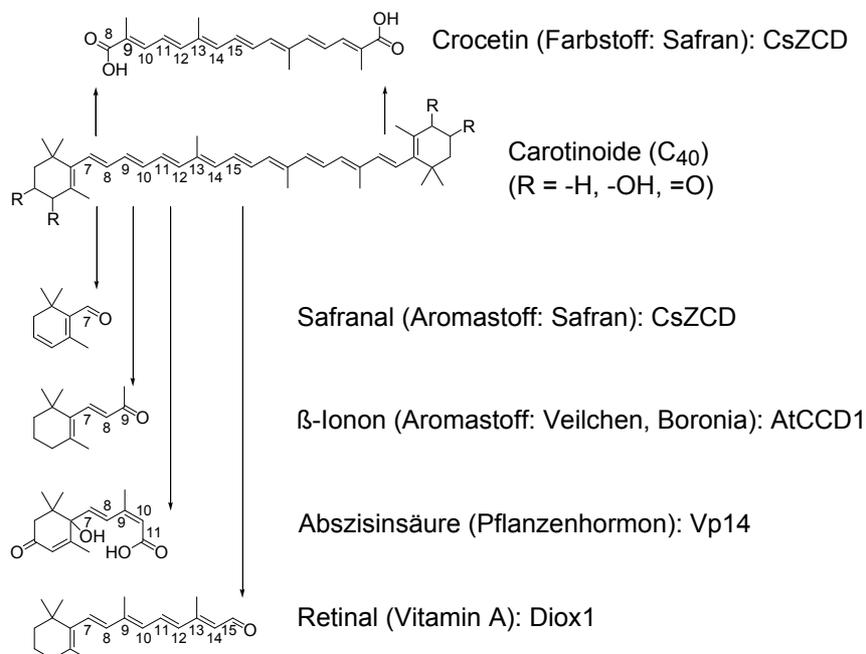


Abb. 5: Von Carotinoiden durch spezifische oxidative Spaltung entstehende Produkte und zugehörige Enzyme. Die Herkunft der verschiedenen Enzyme wird im Text beschrieben. CsZCD und Vp14 bilden nur die Vorläufer der dargestellten Produkte.

Den CCDs wird aufgrund ihrer Fähigkeit,  $\beta$ -Carotin in zwei Molekülen  $\beta$ -Ionon und einem C-14 Dialdehyd zu spalten, eine zentrale Rolle bei der Synthese dieser Aromastoffe in Pflanzen zugeschrieben. Dass die Emission von  $\beta$ -Ionon in Blüten stark mit der Transkription von CCD-mRNA korreliert ist, konnte nachgewiesen werden (Simkin et al., 2004).

Auf Grundlage der Sequenzen von *Vp14* und *AtCCD1* wurden auch weitere homologe Gene im *Arabidopsis*-Genom gefunden. Neben fünf NCEDs, die die gleiche Reaktion wie VP14 katalysieren, gibt es drei Gene, die näher mit *AtCCD1* verwandt sind und *AtCCD4*, *AtCCD7* und *AtCCD8* genannt wurden (Tan et al., 2003). Während *AtCCD7*  $\beta$ -Carotin assymetrisch an nur einer 9-10 Bindung spaltet und das dabei anfallende Apocarotinal von *AtCCD8* weiter zu einem Signalmolekül umgesetzt wird, ist die biologische Funktion von *AtCCD4* nach wie vor unklar (Auldrige et al., 2006a, Schwartz et al., 2004). Für das homologe Gen *CmCCD4a* aus Chrysanthemen konnte jedoch gezeigt werden, dass es eine Rolle bei der Entfärbung der gelblichen Blütenblätter durch die Spaltung von Blütencarotinoiden spielt (Ohmiya et al., 2006).

Neben den CCDs und NCEDs aus Pflanzen und den zentral spaltenden Oxygenasen aus Tieren wurden mittlerweile auch homologe Enzyme aus Pilzen und Cyanobakterien entdeckt, die ebenfalls zentral an der 15-15' Position spalten (Prado-Cabrero et al., 2007, Ruch et al., 2005). Während die Dioxygenase aus dem Pilz *Fusarium fujikuroi* jedoch Carotinoide und Apocarotinoide spaltet, katalysieren die cyanobakteriellen Enzyme ausschließlich den Umsatz von Apocarotinoiden (Scherzinger et al., 2006).

Der Reaktionsmechanismus der Enzymfamilie war trotz zahlreicher Untersuchungen und der vorläufigen Bezeichnung als Dioxygenasen lange Zeit unklar. So gab es eine Reihe von Studien, die einen Monooxygenasemechanismus nahelegten, während andere Studien auf einen Dioxygenasemechanismus hindeuteten (Kloer et al., 2006). Eine eindeutige Zuordnung ist problematisch, da der entstehende Aldehyd Sauerstoffatome mit Wasser austauscht und dadurch die Interpretation von  $^{18}\text{O}_2$  bzw.  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  Markierungsexperimenten erschwert wird. Die genaue Analyse der Sauerstoffaustauschkinetik lieferte jedoch überzeugende Argumente für einen Dioxygenasemechanismus (Schmidt et al., 2006).

Ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Enzymfamilie gelang durch die Aufklärung der Kristallstruktur des apocarotinoidspaltenden, cyanobakteriellen Enzyms ACO (Kloer et al., 2005). Die zuvor durch Mutagenesestudien nachgewiesene Bedeutung von vier Histidinresten, die ein  $\text{Fe}^{2+}$  im aktiven Zentrum koordinieren, konnte dadurch für diese Enzymfamilie bestätigt werden (Poliakov et al., 2005). Weiterhin konnte ein mit hydrophoben Aminosäureresten ausgekleideter Kanal, der das Substrat zum aktiven Zentrum leitet und für die Substratselektivität entscheidend ist, identifiziert werden (Abb. 6).

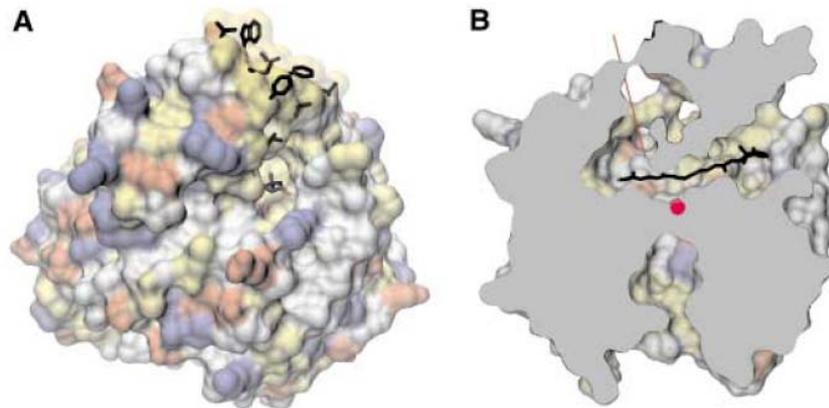


Abb. 6: Kristallstruktur der ACO aus *Synechocystis*. A: Die Oberfläche des Enzyms enthält einen Bereich mit hydrophoben Aminosäureresten, der für die Membranbindung und der damit verbundenen Substratzugänglichkeit verantwortlich gemacht wird. B: Schnitt durch die Enzymstruktur mit Darstellung des mit hydrophoben Resten ausgekleideten Substratkanals. Abbildung aus (Kloer et al., 2005).

Hinsichtlich der *in vivo* Zugänglichkeit der hydrophoben Substrate stellt sich die Frage, wie die löslichen Dioxygenasen Zugang zu den in der Membran gelösten Carotinoiden bekommen. Hierüber gaben mit VP14 und der CCD-Familie aus *Arabidopsis* durchgeführte Chloroplastenimportassays erste Hinweise (Tan et al., 2003, Tan et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass NCEDs in Chloroplasten importiert werden und dort zu unterschiedlichen Anteilen mit Membranen assoziieren, während AtCCD1 nicht importiert wird, aber mit der äußeren Chloroplastenmembran assoziiert. Eine mittels Sekundärstrukturanalyse identifizierte amphipathische Helix an der Enzymoberfläche wurde als notwendige aber nicht hinreichende Bedingung für eine Membranassoziation aufgezeigt (Tan et al., 2001). Ein hydrophober Bereich an der Enzymoberfläche wurde auch in der Struktur der ACO aus *Synechocystis* gefunden und für die Assoziation mit der Membran und der damit verbundenen Substratzugänglichkeit erklärt (Kloer et al., 2005).

In Analogie zu den Biosyntheseenzymen wurden für die Charakterisierung der Carotinoidspaltungsenzyme meist *in vivo* Assays oder qualitative *in vitro* Assays in tensidbasierten, mizellaren Systemen verwendet. Während in frühen Publikationen zur Carotinoidspaltung noch notwendige Faktoren für die *in vitro* Aktivität untersucht wurden (Goodman et al., 1967a), erschienen seit der Entdeckung von VP14 keine Publikationen zur *in vitro* Vermittlung von Substraten an Carotinasen. Dies ist vermutlich durch den grundlagenorientierten Charakter der Studien, die hohe Hydrophobizität der Substrate und die Verfügbarkeit eines einfachen *in vivo* Assays in *E. coli* bedingt (Cunningham et al., 2007). Eine Ausnahme stellen Untersuchungen mit einer apocarotinalspaltenden CCD aus *Nostoc* sp. dar, bei denen der Einfluss

verschiedener Tenside und Phospholipide auf die Enzymaktivität qualitativ untersucht wurde (Marasco et al., 2006).

Die Enzymfamilie ist jedoch potentiell als technischer Biokatalysator für die Produktion von wertvollen natürlichen Carotinoidspaltungsprodukten, wie z.B. den als Aromastoffen begehrten Iononen, interessant (Aguedo et al., 2004, Mimoun 1996, Winterhalter 1996). Hierbei ist der *in vitro* Einsatz der Enzyme der *in vivo* Iononsynthese in carotiniodsynthetisierenden, rekombinanten Organismen vorzuziehen, da die bisher mit rekombinanten Organismen erreichten Carotinoidkonzentrationen oft sehr gering sind und es dadurch vermutlich zu einer Substratlimitierung im *in vivo* System kommt (Fraser et al., 2004a, Sandmann 2001). Ein Verständnis der physikochemischen Eigenschaften der Substrate und möglicher Formen ihrer Vermittlung in wässrige Systeme ist deshalb für die Entwicklung von *in vitro* Reaktionssystemen und die Charakterisierung der Enzyme bedeutend.

### **3.2 Physikochemische Eigenschaften von Carotinoiden und Vermittlung in wässrige Systeme**

Neben den Schwierigkeiten bei der Aufreinigung der Biosynthese- und Spaltungsenzyme stellt die hohe Hydrophobizität der Substrate und deren Vermittlung in einem enzymkompatiblen Assay ein Problem für die *in vitro* Charakterisierung der beteiligten Enzyme dar (Cunningham et al., 2007). Carotinoide sind nicht wasserlöslich und die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln ist meist ebenfalls relativ gering (Britton 1995). Die Löslichkeitsgrenze für  $\beta$ -Carotin in THF, dem besten Lösungsmittel für dieses Carotinoid, liegt bei einer Konzentration von lediglich 10 g/L (Craft et al., 1992). In binären wässrig/organischen Lösungsmittelgemischen kommt es schon bei relativ geringen Wasseranteilen zur Aggregation der Carotinoide (Auweter et al., 1999, Benade 2001, Billsten et al., 2005, Horn et al., 2001, Korger 2005, Salares et al., 1977). Da die verschiedenen Aggregatstrukturen unterschiedliche batho- oder hypsochrome spektrale Verschiebungen aufweisen, aber ebenfalls farbig sind, wird dieser Effekt genutzt, um durch nanoskalige, kontrollierte Präzipitation, hydrokolloidstabilisierte Aggregate zu erzeugen, die in wässrigen Medien eingesetzt werden können (Auweter et al., 1999, Horn et al., 2001). Diese Vermittlungsform stabilisiert die Carotinoide auch gegenüber autoxidativem Abbau, der in molekularer Lösung in organischen Lösungsmitteln stattfindet (Henry et al., 1998, Mordi et al., 1991, Mordi et al., 1993). In Ölen sind Carotinoide jedoch relativ stabil, weshalb auch Öl-in-Wasser(O/W)-Emulsionen für die Formulierung von Carotinoiden in Lebensmitteln eingesetzt werden (Ribero et al., 2004).

### 3.2.1 Aggregation in Phospholipiddoppelschichten

Eine konzentrationsabhängige Aggregation der Carotinoide findet vermutlich auch in der Phospholipiddoppelschicht von Chloroplastenmembranen, dem Ort der Carotinoidbiosynthese, in Abhängigkeit der Phospholipidzusammensetzung und Polarität des Carotinoids statt. Dies konnte in phospholipidbasierten Modellmembranen gezeigt werden (Korger 2005, Yamamoto et al., 1978). Umgekehrt beeinflussen die eingelagerten, solubilisierten Carotinoide auch die physikochemischen Eigenschaften der Membran. Dabei spielt wiederum die Polarität der Carotinoide eine entscheidende Rolle. Die sich orthogonal zur Membranebene ausrichtenden, polaren Xanthophylle verfestigen die Membran, während das unpolare  $\beta$ -Carotin sich in die unpolare Region der Phospholipiddoppelschicht einlagert und dadurch die Hydrophobizität der Membran erhöht (Socaciu et al., 2002, Socaciu et al., 2000, Wisniewska et al., 2006).

Phospholipidvesikel als Modellsysteme für biologische Membranen bilden sich spontan, wenn Phospholipide mit Wasser in Kontakt kommen. Im Gegensatz zu Tensiden (vgl. 3.2.2) bilden die meisten Phospholipide kugelförmige Gebilde aus einer oder mehreren Doppelschichten, die einen wässrigen Kern einschließen. In den Phospholipiddoppelschichten können hydrophobe Substanzen gelöst werden (Sackmann 1995). Aufgrund ihres biomimetischen Charakters und der guten Biokompatibilität werden sie für die Vermittlung von hydrophoben Pharmazeutika, zur Nanoverkapselung von Lebensmittelzutaten und bei der Untersuchung von membranassoziierten und membranständigen Proteinen in der biochemischen Forschung eingesetzt (Berg et al., 2001, Taylor et al., 2005, Wen et al., 2006).

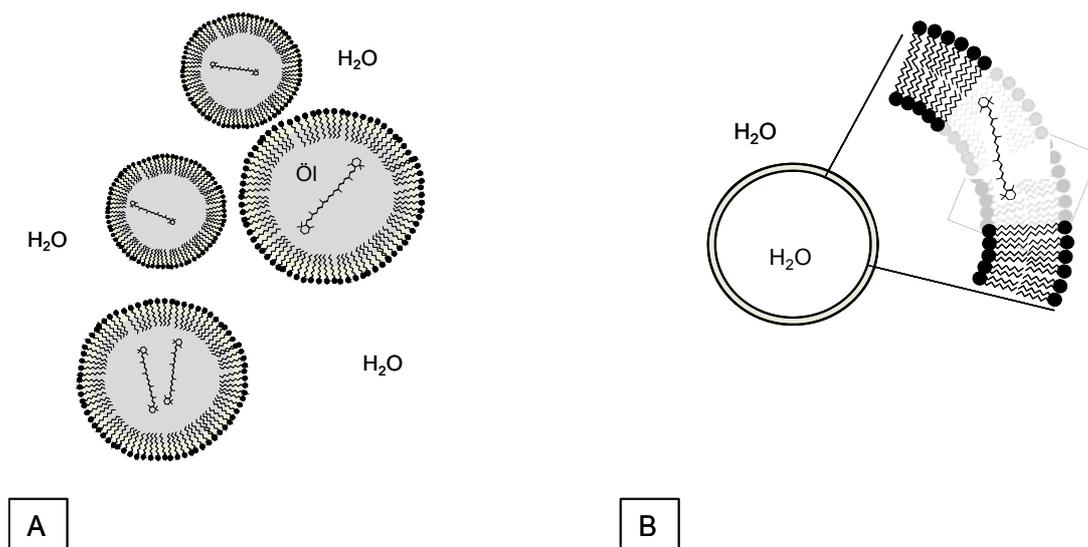


Abb. 7: Vermittlungsformen von Carotinoiden in wässrige Systeme. A: Öl-in-Wasser(O/W)-Emulsionen mit an der Grenzfläche angelagerten Tensiden. B: Carotinoidbeladenes unilamellares Phospholipidvesikel (Liposom).

### 3.2.2 Solubilisierung von Carotinoiden in mizellare Systeme

Eine weitere Möglichkeit der *in vitro* Vermittlung von Carotinoiden, neben der Herstellung von dispergierbaren Aggregaten, beladenen Phospholipidvesikeln und Emulsionen, ist die Solubilisierung in Tensidmizellen. Der Begriff Tenside umschreibt eine Klasse von chemischen Verbindungen, die aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil bestehen. Dieser amphiphile Charakter führt dazu, dass Tenside sich bevorzugt an die Grenzfläche zweier nicht mischbarer Phasen anlagern und dadurch die Grenzflächenspannung reduzieren. Aufgrund dieser Eigenschaft werden Tenside in einer Vielzahl von technischen Anwendungen eingesetzt (Fabry 1991, Tadros 2005).

Die alkalische Hydrolyse von Triglyceriden mittels Kali- oder Natronlauge (Verseifung) und das dabei anfallende Salz der Fettsäuren (Seife) stellt den ältesten Prozess zur technischen Herstellung von Tensiden dar. Mittlerweile ist eine große Anzahl weiterer Tenside synthetisiert worden, deren hydrophile und hydrophobe Bestandteile aus unterschiedlichen Bausteinen bestehen können. Eine grobe Unterteilung kann nach ihrem Ladungszustand vorgenommen werden. So wird zwischen anionischen, kationischen, zwitterionischen und nichtionischen Tensiden unterschieden (Fabry 1991).

Neben ihrer Eigenschaft, die Grenzflächenspannung z.B. zwischen zwei nicht mischbaren, flüssigen Phasen zu reduzieren und dadurch Emulsionen zu stabilisieren (Emulgatorfunktion), verfügen Tenside über eine Reihe weiterer physikochemischer Eigenschaften, die sie aus technologischer Sicht interessant machen. Sie finden in Reinigungsmitteln wie z.B. Waschmitteln Anwendung, wo sie die Benetzbarkeit hydrophober Materialien verbessern und die Solubilisierung von hydrophoben Substanzen erleichtern. In diesem Fall werden Tenside oft auch als Detergenzien bezeichnet (Rehage 2005). Diese Fähigkeit verdanken sie ihrer Eigenschaft, ab einer bestimmten Konzentration Tensidmizellen auszubilden. Je nach Polarität des gesamten Moleküls lagern sich die zuvor molekular gelösten Tensidmonomere beim Erreichen der kritischen Mizellenkonzentration (CMC) zu sphärischen Aggregaten, den Mizellen, zusammen. Hierbei ist der hydrophobe Teil des Tensids im Mizellkern, während die hydrophilen Enden diesen vom wässrigen Medium abschirmen. Die hydrophoben Kerne der Mizellen stellen eine sogenannte mizellare Pseudophase dar, in der hydrophobe Substanzen gelöst werden können (Dwars et al., 2005). Die Größe einer Mizelle wird durch die Aggregationszahl, also durch die Anzahl an Tensidmonomeren pro Mizelle bestimmt.

Im idealisierten Fall führt jede weitere Zugabe von Tensid oberhalb der CMC zur Ausbildung weiterer Mizellen und somit zu einem größeren Volumen der mizellaren Pseudophase, während ein der CMC entsprechender Anteil an Monomeren erhalten bleibt. Tatsächlich ist aber sowohl die CMC als auch die Aggregationszahl von der Gesamttensidkonzentration abhängig (Acharya et al., 1997, Bhattacharya et al., 2004). Faktoren wie die Ionenstärke des Mediums, die Temperatur sowie die

Konzentration von organischen Cosolventien beeinflussen die CMC ebenfalls (Aramaki et al., 1999, Carnero Ruiz et al., 2001, Zana 1995).

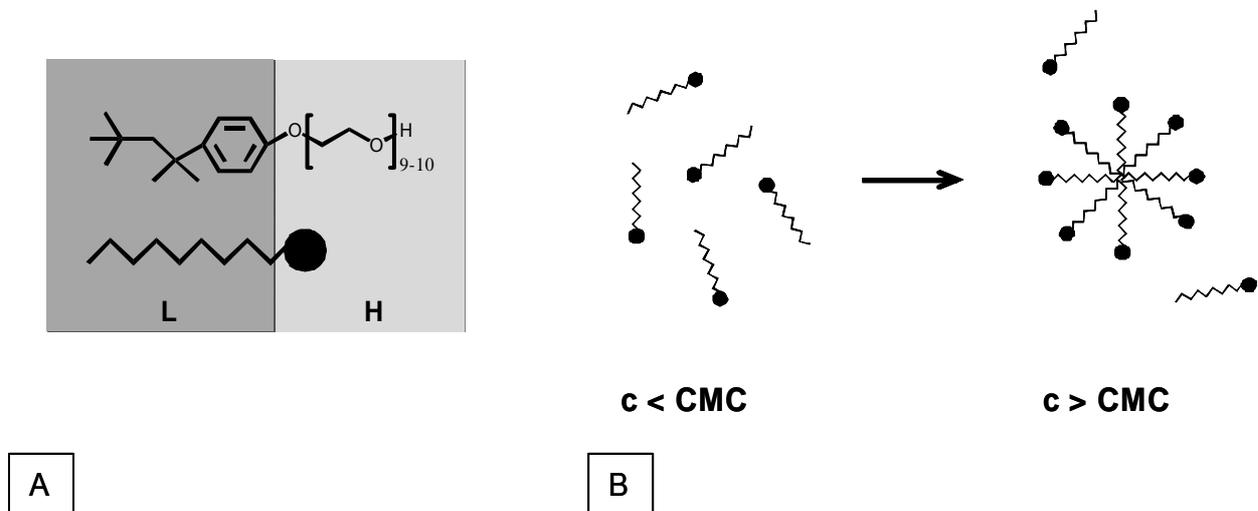


Abb. 8: A: Schematische Darstellung des amphiphilen Charakters eines Tensidmoleküls am Beispiel von Triton X-100. Der lipophile Teil (L) besteht aus einem *p*-tert-Octylphenolteil, das mit einer hydrophilen (H) Polyethylenglycolkette verethert wird.  
B: Schematische Darstellung der Mizellbildung bei Konzentrationen oberhalb der CMC.

Tensidmizellen sind nicht als statische, kugelförmige Gebilde zu verstehen. Vielmehr existieren zwei Gleichgewichtszustände, die sich in ihren Relaxationszeiten um Größenordnungen unterscheiden. Der Austausch von Tensidmonomeren zwischen einer Mizelle und dem Lösungsmittel wird durch die Relaxationszeit  $\tau_1$  beschrieben und liegt im Bereich von Mikrosekunden. Das dynamische Gleichgewicht zwischen Mizellzerfall und Mizellneubildung ist durch die Relaxationszeit  $\tau_2$  gekennzeichnet, die im Bereich von Millisekunden liegt, aber bei manchen Tensiden auch im Minutenbereich liegen kann (Patist et al., 2002b, Rharbi et al., 1999). Diese Gleichgewichtsprozesse beeinflussen auch die Austauschkinetik hydrophober, mizellar solubilisierter Substanzen zwischen Mizellen (Rharbi et al., 2001).

In der biochemischen Forschung finden Tenside bei der Solubilisierung von membranassoziierten und membranständigen Proteinen Verwendung (Garavito et al., 2001). Beim Solubilisierungsvorgang werden die Zellmembranen teilweise cosolubilisiert und die Proteine so in Tensid-/Phospholipidaggregaten gelöst (Seddon et al., 2004). Da bei der Solubilisierung eine Vielzahl von Parametern eine Rolle spielen können und der Erfolg letztendlich auch von dem untersuchten Protein abhängt, ist die Auswahl eines geeigneten Tensids nach wie vor ein empirischer Prozess (Banerjee et al., 1995).

Neben den beschriebenen Anwendungsgebieten von Tensiden werden wässrig, mizellare Lösungen auch als umweltfreundliche, alternative Reaktionssysteme in der

organischen Synthese untersucht (Dwars et al., 2005). Da die mizellare Struktur Ähnlichkeiten mit Phospholipidmembranen aufweist und nicht-ionische Tenside meist enzymkompatibel sind, werden solche Reaktionssysteme als biomimetische Systeme beschrieben und zur Vermittlung von hydrophoben Substraten an Enzyme verwendet (Carman et al., 1995a, Rehage 2005, Viparelli et al., 1999). Insbesondere im Bereich der Phospholipasen und Lipasen wurden gemischt mizellare Systeme aus Substraten und Tensiden für die Charakterisierung eingesetzt und dadurch wichtige Erkenntnisse über die an der mizellaren Grenzfläche ablaufenden Reaktionen erhalten (Berg et al., 2001, Deems 2000).

Wässrig mizellare Systeme eignen sich auch für die Solubilisierung von Carotinoiden, die in solchen Systemen auch gegenüber autoxidativem Abbau geschützt werden (Xu et al., 1999). Mizellare Vermittlungsformen wurden schon früh für die Charakterisierung von carotinoidspaltenden Enzymen eingesetzt (Olson et al., 1965). Der erste photometrische Assay für die quantitative Erfassung der cooxidativen  $\beta$ -Carotinspaltung mit einer Lipoxygenase aus Soja wurde Anfang der 70er Jahren beschrieben (Ben Aziz et al., 1971). Ähnliche Ansätze wurden für eine Reihe weiterer unspezifischer Carotenasen eingesetzt (Fleischmann et al., 2003, Zorn et al., 2003b). Auch bei der Charakterisierung der spezifisch spaltenden CCDs kamen Triton X-100 oder Tween basierte Assaysysteme zum Einsatz, jedoch erfolgte in den meisten Fällen keine Beschreibung des kinetischen Verhaltens. Systematische Studien zum Einfluss des mizellaren Systems auf den enzymatischen Umsatz von Carotinoiden liegen nicht vor. Gründe hierfür könnten die schwierige Handhabung der extrem hydrophoben Substrate, die geringe Aktivität der Enzyme, das komplexe Verhalten von mizellaren Lösungen, die Verfügbarkeit eines *in vivo* Assays sowie die oft grundlagenorientierte Natur der Arbeiten auf diesem Gebiet sein.

### **3.3 Rekombinante Expression eukaryotischer Proteine in *Escherichia coli***

Neben den genannten Problemen bei der *in vitro* Charakterisierung von CCDs stellt die schwierige Expression der Enzyme in *E. coli* ein weiteres Hindernis dar (Bouvier et al., 2003, Kloer et al., 2005, Schwartz et al., 2004). *E. coli* ist aufgrund seines schnellen Wachstums, der einfachen Handhabung und der Vielzahl an kommerziell verfügbaren molekularbiologischen Werkzeugen der am häufigsten verwendete Organismus für die rekombinante Expression von Proteinen. Die Expression eukaryotischer Proteine in *E. coli* ist jedoch häufig mit Schwierigkeiten verbunden und oft wird inaktives oder unlösliches Protein erhalten (Baneyx 1999). Ursache hierfür können die Überlastung des Translations- und Faltungsapparates der Zelle, ein ungeeignetes Faltungsmilieu und fehlende posttranslationale Modifikationen sein. Das in Einschlusskörpern (Inclusion Bodies) abgelagerte, fehlgefaltete und unlösliche Protein kann zwar noch biologische Aktivität besitzen, ist aber in den meisten Fällen

nur nach einer geeigneten Rückfaltungsprozedur nutzbar (Lilie et al., 1998, Villaverde et al., 2003). Da die Suche nach geeigneten Rückfaltungsbedingungen oft aufwändig ist, wurde ein breites Methodenspektrum entwickelt, um die Bildung von Inclusion Bodies in *E. coli* von vornherein zu minimieren (Hoffmann et al., 2004, Jana et al., 2005, Sorensen et al., 2005a). Hierzu zählen beispielsweise die optimale Gestaltung der Expressions- und Induktionsbedingungen (Donovan et al., 1996, Sorensen et al., 2005a), die Coexpression von Chaperonen (Lee et al., 2004) und die Codonoptimierung durch Gensynthese bzw. die Bereitstellung von seltenen tRNAs in *E. coli*. Zunehmend zum Einsatz kommen auch Fusionsproteine, die die Löslichkeit des rekombinanten Proteins verbessern sollen (Esposito et al., 2006b). Die Fusion eines gut löslichen Trägerproteins mit dem schlecht löslichen Passagierprotein erfolgt hierbei auf DNA-Ebene durch die Konstruktion eines geeigneten Vektors. Bei der Expression wird ein über eine Peptidbindung verknüpftes Fusionsprotein erhalten (Lu 2005). Meist wird bei der Konstruktion des Expressionplasmids direkt eine Schnittstelle für eine spezifische Protease zwischen den zwei Proteinen eingefügt, um das Zielprotein nach der Expression von dem Trägerprotein trennen zu können. Durch die kommerzielle Verfügbarkeit einer stetig wachsenden Anzahl an Plasmiden für die N- oder C-terminale Modifikation rekombinanter Proteine existiert mittlerweile eine Reihe von Studien, die die Leistungsfähigkeit von Trägerprotein für die Verbesserung der Proteinausbeute von schwierig zu exprimierenden Proteinen zeigen (Esposito et al., 2006a, Terpe 2003). Neben dem maltosebindenden Protein (MBP) finden die Glutathion S-Transferase (GST) und der Transkriptionsfaktor „*N utilizing substance A*“ (NusA) am häufigsten Verwendung und wurden bereits in Expressionsstudien mit hohem Durchsatz systematisch charakterisiert (Cabrita et al., 2006, Korf et al., 2005). Während die gut lösliche GST auch zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von Fusionsproteinen verwendet werden kann, wurde NusA ausschließlich aufgrund seiner guten Löslichkeit ausgewählt. Anhand eines auf der Aminosäuresequenz basierenden Löslichkeitsmodells, wurde NusA als eines der am besten löslichen Proteine im *E. coli* Proteom identifiziert (Davis et al., 1999). Der Mechanismus der Löslichkeitserhöhung durch Trägerproteine ist noch nicht verstanden, es wurden aber sowohl eine Chaperon-ähnliche Funktion als auch eine Stabilisierung durch Bildung löslicher Aggregate diskutiert (Fox et al., 2001, Nallamsetty et al., 2006). Ein Nachteil der Methode ist, dass noch nicht vorhergesagt werden kann, welches Trägerprotein die Löslichkeit eines bestimmten Passagierproteins erhöhen kann, bzw. ob überhaupt eine Verbesserung zu erwarten ist. Außerdem kann die Faltungsqualität und damit die biologische Aktivität des Passagierproteins durch die Fusion beeinträchtigt werden und es kann zur Präzipitation des Passagierproteins nach Trennung von dem Trägerprotein kommen (Nomine et al., 2001a).

## 4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Während die Anzahl an Publikationen zur Klonierung neuer CCDs aus unterschiedlichen Organismen in den letzten Jahren stetig gestiegen ist, stellen detaillierte Untersuchungen zur *in vitro* Charakterisierung dieser Enzyme die Ausnahme dar. Zum Einsatz isolierter CCDs als potentielle technische Biokatalysatoren zur Erzeugung von wirtschaftlich interessanten, natürlichen Carotinoidspaltungsprodukten, wie beispielsweise den Aromastoffen aus der Klasse der Ionone, liegen noch keine Erkenntnisse vor.

Ziel dieser Arbeit war es, die Eignung von CCDs zur biotechnologischen Erzeugung von Aromastoffen am Beispiel von AtCCD1 aus *Arabidopsis thaliana* aufzuzeigen. Besondere Hürden für den biotechnologischen Einsatz dieser Enzymfamilie sind die schwierige rekombinante Expression und die hohe Hydrophobizität der Carotinoidsubstrate. Folglich lagen die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit in der Verbesserung der Enzymgewinnung und der Entwicklung und Charakterisierung geeigneter Reaktionssysteme für die Spaltung der hydrophoben Substrate.

Während der rekombinanten Expression von AtCCD1 in *E. coli* kommt es, wie auch für andere CCDs beschrieben, zur Bildung von fehlgefalteten Proteinaggregaten („Inclusion Bodies“). Da der Großteil des Proteins in inaktiver Form vorliegt, ist die Proteinausbeute stark reduziert und die Gewinnung des Enzyms aufwändig. Dieses bei der heterologen Expression von Proteinen in *E. coli* häufig auftretende Problem kann durch verschiedene Maßnahmen reduziert werden. Für die effizientere Gewinnung von AtCCD1 sollte der Einfluss der Expressionsbedingungen, die Solubilisierung von membranassoziiertem Enzym mit Tensiden und die Fusion mit löslichkeitserhöhenden Trägerproteinen untersucht werden. Weiterhin wurde die Hefe *Pichia pastoris* als alternativer, eukaryotischer Organismus für die rekombinante Expression eingesetzt.

Für die Vermittlung der Carotinoide in wässrige, enzymkompatible Medien sollten mizellare Systeme auf Basis von nicht-ionischen Tensiden entwickelt und hinsichtlich der enzymatischen Umsetzbarkeit der in Mizellen solubilisierten Substrate charakterisiert werden. Im Gegensatz zu molekularen Lösungen liegen die Substrate in solchen Systemen als makromolekulare Aggregate mit Tensidmizellen vor. Obwohl die Systeme makroskopisch homogen erscheinen, spielt deshalb die Einlagerung der Substrate in die Tensidmizellen sowie die Wechselwirkung zwischen Enzym und beladenen Mizellen eine wichtige Rolle. Die systematische Untersuchung dieser Wechselwirkungen durch die kinetische Charakterisierung des Substratumsatzes sollte zum Verständnis der relevanten Einflussgrößen beitragen und dadurch die Verbesserung des Reaktionssystems ermöglichen. Hierbei wurden die für die Löslichkeitserhöhung erzeugten AtCCD1-Modifikationen eingesetzt, um die Bedeutung der Wechselwirkungen zwischen Enzym und Mizellen aus unterschiedlichen Tensidmonomeren aufzuklären. Schließlich sollte die

grundsätzliche Eignung von Emulsionen und Phospholipidvesikeln als Alternative zum mizellaren Reaktionssystem untersucht werden.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Entwicklung des photometrischen Assays

Für eine detaillierte Expressionsstudie und die biochemische Charakterisierung ist die Verfügbarkeit eines schnellen, quantitativen Assays zur Bestimmung der Enzymaktivität von großem Vorteil. Da die Spaltung des Substrats durch die Verkürzung des Chromophors mit Farbänderung verbunden ist, kann dadurch ein direkter spektrophotometrischer Aktivitätsnachweis erbracht werden. Die mizellare Solubilisierung von Carotinoiden, wie unter Punkt 5.3.1 beschrieben, ergab transparente Systeme, die spektrophotometrisch vermessen werden konnten. Für die Assayentwicklung wurde das Substrat  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal gewählt (Abb. 9) und verschiedene Modifikationen von AtCCD1 eingesetzt (vgl. 5.2.1.1).

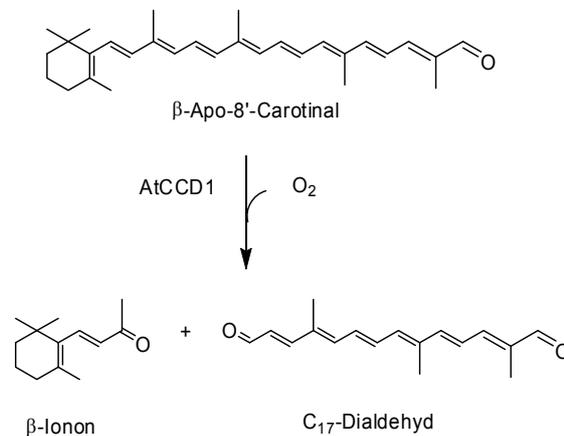


Abb. 9 Schema der oxidativen Spaltung des Modellsubstrates  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal zu  $\beta$ -Ionon und einem C<sub>17</sub>-Dialdehyd durch AtCCD1.

Die Veränderungen des Spektrums in einem Bereich zwischen 300 und 600 nm im Verlauf der Reaktion wurden spektrophotometrisch aufgezeichnet. Eine Reihe von Differenzspektren, die durch die AtCCD1 katalysierte Spaltung von  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal entstehen, sind in Abb. 10 A dargestellt. Hierbei lag das Maximum der Absorptionsänderung bei 505 nm, wenn man die durch die starke Absorption des Tritonphenolrings und des Proteins bei 280 nm verursachten Schwankungen außer Acht lässt. Der Assay hat bei dieser Wellenlänge also die höchste Empfindlichkeit. Dies konnte durch die Auftrennung von Substrat und Reaktionsprodukten mittels HPLC unter Verwendung einer RP-18 Phase untermauert werden. Das DAD-Chromatogramm der aufgetrennten Assaykomponenten zeigte, dass der Einfluss des Dialdehyds bei Wellenlängen größer 500 nm keine Störung des Assays durch eine Überlagerung von Substrat- und Produktabsorption mit sich brachte (Abb. 10 B). Die

Verschiebung der Wellenlänge vom Absorptionsmaximum (462 nm) zu Wellenlängen größer als 500 nm erlaubte also eine quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Apo-8'-Carotinalspaltung.

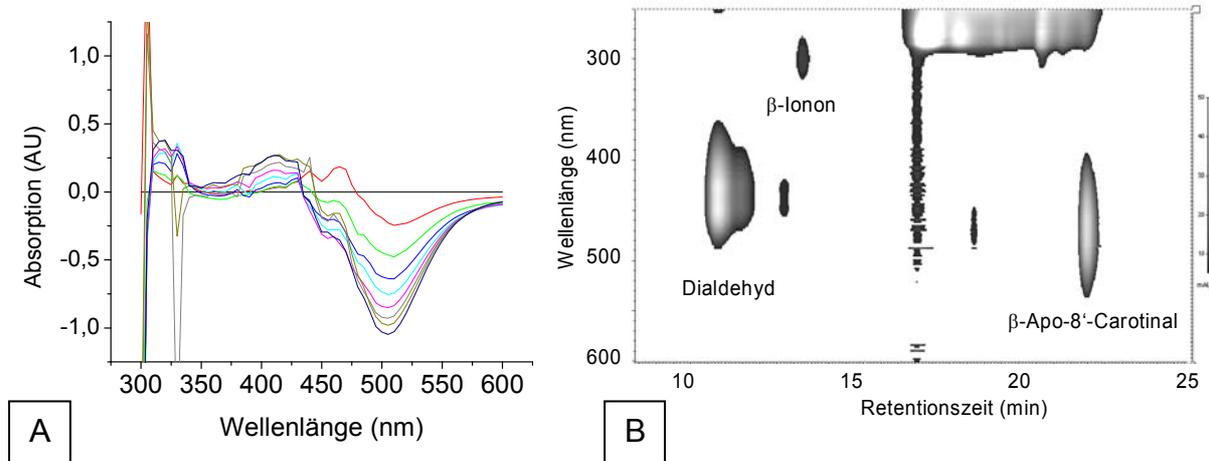


Abb. 10: A: Spektrophotometrische Analyse des zeitlichen Verlaufs der  $\beta$ -Apo-8'-Carotinalspaltung durch AtCCD1-His<sub>6</sub>. Spektren wurden alle fünf Minuten aufgezeichnet und das Anfangsspektrum davon abgezogen. Dargestellt sind die Differenzspektren.  
B: Auftrennung von Substrat und Reaktionsprodukten der  $\beta$ -Apo-8'-Carotinalspaltung mittels HPLC/DAD. Durch Verschiebung der Messwellenlänge aus dem Absorptionsmaximum des  $\beta$ -Apo-8'-Carotinals in den längerwelligen Bereich kann die Überlagerung von Substrat und Produktspektren im photometrischen Assay vermieden werden.

Für die Übertragung des Tests in das 96-well Mikrotiterplattenformat wurden die Wellenlängen 510 nm und 560 nm und ein Assayvolumen von 100  $\mu$ l gewählt. Für die meisten Assays wurde die Wellenlänge 510 nm verwendet, da hierbei eine höhere Empfindlichkeit gewährleistet ist. Für Konzentrationen von größer als 200  $\mu$ M  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal wurde eine Wellenlänge von 560 nm verwendet. Die Quantifizierung der Substratkonzentration erfolgte über eine Kalibrationsgerade. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne Enzym mitgeführt, um Absorptionsänderungen aufgrund einer nicht enzymkatalysierten Oxidation oder Carotinoidaggregation detektieren zu können. Bei Aktivitätsmessungen mit Zellextrakten in Gegenwart von Ethanolkonzentrationen größer als 10 % wurden Kontrollen ohne Carotinoid bei ansonsten gleicher Zusammensetzung des Assays mitgeführt, da es durch den höheren Anteil an organischem Lösungsmittel zur Präzipitation von Zellkomponenten und einer damit einhergehenden Absorptionzunahme kam. Die im Anfangswert auf eine Absorption von 0 normalisierten zeitlichen Verläufe eines Umsatzes und der zwei beschriebenen Kontrollen sind in Abb. 11 dargestellt. Die punktweise Subtraktion der Kontrollen von den Messpunkten ergab eine resultierende Kurve, deren Anfangssteigung für die Berechnung der Enzymaktivität verwendet wurde.

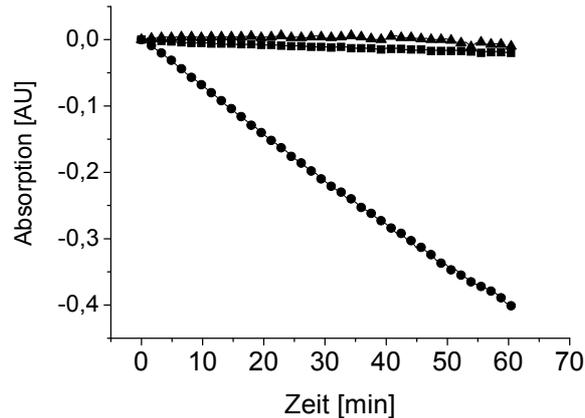


Abb. 11: Beispiel der photometrischen Messung der enzymatischen  $\beta$ -Apo-8'-Carotinalspaltung mit NusA-AtCCD1 und der Kontrollreaktionen bei 510 nm in einer Mikrotiterplatte. Ansatz mit Substrat und Enzym (●), Ansatz ohne Enzym (■), Ansatz ohne Substrat (▲). Die Kurven wurden vor der weiteren Prozessierung stets auf den Anfangswert 0 normalisiert.

Ein wichtiger Aspekt für jeden Enzymtest ist die Linearität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration bei einer gegebenen Substratkonzentration. Nichtlineares Verhalten kann verschiedene Gründe haben, erschwert aber in jedem Fall die Quantifizierung der Enzymkonzentration mittels Aktivitätsmessungen. Ein Grund kann eine Enzyminaktivierung während des Assayzeitraums sein, aufgrund derer das kinetische Verhalten falsch beurteilt wird. Um die Linearität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration und somit auch die Enzymstabilität zu untersuchen, wurde ein von Selwyn entwickelter und häufig verwendeter Test eingesetzt (Cornish-Bowden 2001, Selwyn 1965). Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Produktbildungsrate  $dp/dt$  während der gesamten Reaktion proportional zum Produkt der anfänglichen Enzymkonzentration  $e_0$  und einer Funktion der momentanen Substrat-, Produkt-, Inhibitorkonzentration und möglicher weiterer chemischer Verbindungen ist. Aufgrund der Stöchiometrie der Reaktion können diese Konzentrationen aber prinzipiell aus der Produktkonzentration zu einer bestimmten Zeit berechnet werden. Somit kann die Geschwindigkeitsgleichung folgendermaßen geschrieben werden:

$$\frac{dp}{dt} = e_0 f(p) \quad (1)$$

Hierbei ist  $f$  eine Funktion, die prinzipiell von der Geschwindigkeitsgleichung abgeleitet werden kann. Diese Funktion muss aber nicht bekannt sein. Wichtig ist

jedoch, dass sie unabhängig von  $e_0$  und  $t$  ist. So kommt man durch Integration zu folgender Gleichung:

$$e_0 t = F(p) \quad (2)$$

Hierdurch wird deutlich, dass sich die Graphen von  $p$  gegen  $e_0 t$  für unterschiedliche  $e_0$  überlagern sollten. Ist dies nicht der Fall, bedeutet dies, dass die Produktbildungsgeschwindigkeit nicht proportional zur Enzymkonzentration ist. Ursachen hierfür können die Inaktivierung des Enzyms im Verlauf des Assays oder andere Unregelmäßigkeiten sein.

Um die Eignung des mizellaren AtCCD1 Assays bezüglich dieses Kriteriums zu überprüfen, wurde eine affinitätschromatographisch aufgereinigte Präparation von NusA-AtCCD1 verwendet und in unterschiedlichen Konzentrationen in dem Triton X-100 basierten Assay bei ansonsten gleicher Zusammensetzung eingesetzt. Gleichung 2 gilt in der gleichen Form, wenn man die Produktkonzentration durch die Substratkonzentration ersetzt. Entsprechend wurden die eingesetzten Enzymkonzentrationen mit der zur jeweils gemessenen Absorption gehörigen Zeit multipliziert und gegen die jeweils gemessene Absorption aufgetragen (Abb. 12).

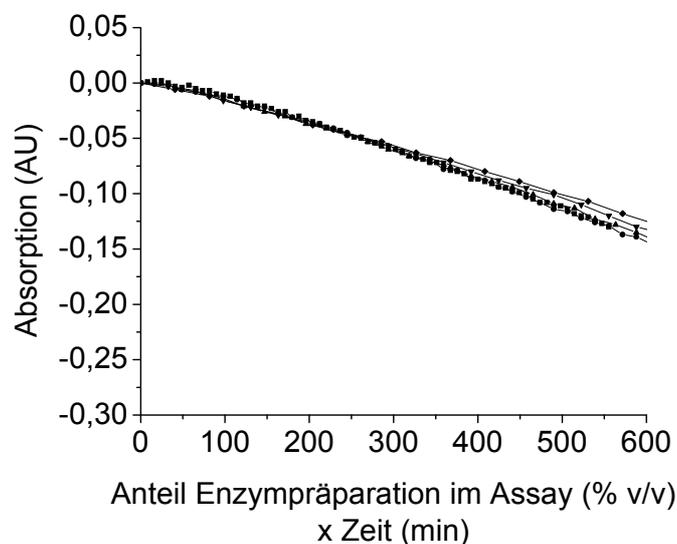


Abb. 12: Ergebnisse von Selwyn's Test. Eine Präparation von aufgereinigtem NusA-AtCCD1 wurde in verschiedenen Anteilen im Assay eingesetzt. Multiplikation dieses Anteils mit der Zeit und die Auftragung gegen die zugehörige Absorption ergab übereinanderliegende Verläufe. Enzymstabilität und Linearität zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit konnten dadurch geziegt werden.

### 5.1.1 Temperatur, pH-Optimum und Lagerstabilität im mizellaren System

Da Temperatur- und pH-Stabilität für die Charakterisierung und den Einsatz eines Enzyms als technischer Biokatalysator eine wichtige Rolle spielen, wurden diese Parameter ebenfalls im mizellaren System untersucht. Hierfür wurden Zellextrakte mit AtCCD1-His<sub>6</sub> verwendet. Verschiedene Puffer mit einer Pufferkonzentration von 0,1 M und einer Ionenstärke von 0,2 M wurden zu diesem Zweck eingesetzt. Bei dieser Pufferkonzentration und einem Anteil von 20 % Zellextrakt im Assay kam es nicht zu einer Veränderung des pH-Wertes durch puffernde Komponenten des Zellextraktes. Dies wurde durch Messung des pH-Wertes der Reaktionsmischung in größerem Volumen (10 ml) experimentell überprüft. Das auf diese Weise bestimmte Aktivitätsoptimum lag um einen pH-Wert von 7 (Abb. 13 A). Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit wurde durch die Absorptionsänderung über 30 Minuten bestimmt. Das auf diese Weise bestimmte Temperaturoptimum lag bei 35 °C (Abb. 13 B).

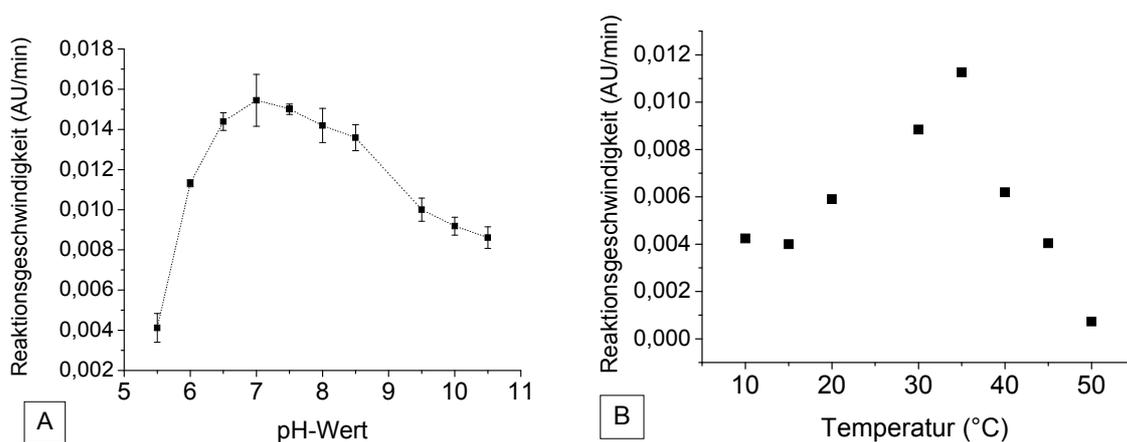


Abb. 13: A: Aktivität von AtCCD1-His<sub>6</sub> als Funktion des pH-Wertes im mizellaren Standardassay.  
B: Einfluss der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit/Enzymstabilität von AtCCD1-His<sub>6</sub>. Die Absorptionsänderung wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen.

Neben der Stabilität des Enzyms im Assay ist auch die Lagerstabilität für die Charakterisierung von Bedeutung. Da Tenside für die Solubilisierung des Enzyms von *E. coli* Zellmembranen eingesetzt wurden und teilweise durch Trenntechniken wie Dialyse oder Ultrafiltration schlecht zu entfernen sind, wurde die Lagerstabilität von AtCCD1 bei 4 °C in Zellextrakten in Puffer mit und ohne Tenside untersucht. Triton X-100 und Natriumcholat ergaben bei der Solubilisierung die besten Effekte und wurden deshalb in den Lagerversuchen mit GST-AtCCD1 eingesetzt (vgl. 5.2.1.2). Hierbei zeigte sich, dass Triton X-100 die Lagerstabilität im Vergleich zu reinem PBS nicht beeinflusst (ähnliche Halbwertszeiten), während Natriumcholat

zwar die höchste spezifische Aktivität nach der Solubilisierung ergab, jedoch auch das Enzym bei längerer Lagerung inaktiviert (Abb. 14 A). Bei Einsatz dieses Tensids zur Erhöhung der Enzymausbeuten in Zellextrakten ist also eine direkte Aufreinigung des Enzyms oder eine Abtrennung des Cholats mittels Ultrafiltration oder Dialyse ratsam. Bei Lagerversuchen mit aufgereinigtem Enzym wurde eine hohe Stabilität in PBS festgestellt. Über einen Zeitraum von 30 Tagen war kein signifikanter Aktivitätsverlust messbar.

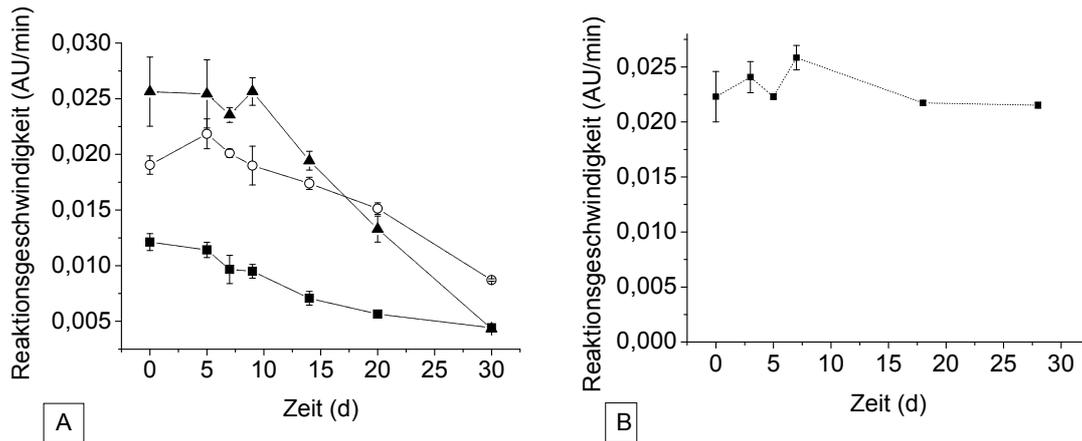


Abb. 14 A: Lagerstabilität von Zellextrakten von GST-AtCCD1 in PBS (■), 2 g/L Triton X-100 in PBS (○) und 10 g/L Natriumchololat in PBS (▲).  
B: Lagerstabilität von aufgereinigtem GST-AtCCD1 in PBS.

### 5.1.2 Zusammenfassung und Diskussion

Photometrische Assays für die Charakterisierung von oxidativ carotinoidspaltenden Enzymen in wässrig mizellaren Systemen wurden von verschiedenen Autoren beschrieben (Ben Aziz et al., 1971, Fleischmann et al., 2002, Fleischmann et al., 2003, Scherzinger et al., 2006, Zorn et al., 2003a). Dabei wurde meist eine unspezifische Spaltung bzw. eine regioselektive Spaltung an der 15-15' Doppelbindung untersucht, die mit einer vollständigen bzw. beinahe vollständigen Entfärbung durch die starke Verkürzung des konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems einhergeht. Im Gegensatz hierzu entsteht bei der durch AtCCD1 katalysierten Spaltung des  $\beta$ -Apo-8'-Carotinals ein C-17 Dialdehyd dessen UV/Vis-Spektrum sich in weiten Bereichen mit dem des Substrates überschneidet. Dadurch wird eine photometrische Quantifizierung der Substratspaltung im Absorptionsmaximum des Substrates erschwert. Durch eine Verschiebung der für den Assay verwendeten Wellenlänge auf 510 bzw. 560 nm findet keine spektrale Überlagerung statt, wie durch die Trennung von Substrat und Spaltungsprodukten mittels HPLC und Detektion der Produkte mittels DAD gezeigt werden konnte. Die Berechnung von Differenzspektren eines spektrophotometrisch verfolgten Umsatzes zeigte, dass die höchste Sensitivität des Assays bei 505 nm liegt. Der Assay eignet sich für alle

Carotinoide mit kleiner oder gleich 40 C-Atomen, solange der bei einer symmetrischen, exzentrischen Spaltung entstehende Dialdehyd stets kleiner oder gleich dem bei der  $\beta$ -Apo-8'-Carotinalspaltung entstehenden Dialdehyd ist. Die Spaltung von  $C_{40}$  Carotinoiden wie z.B. Zeaxanthin oder Astaxanthin ergibt einen  $C_{14}$  Dialdehyd mit einem um eine Doppelbindung verkürzten  $\pi$ -Elektronensystem im Gegensatz zum  $C_{17}$  Dialdehyd, der aus der Spaltung von  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal entsteht (vgl. 5.3.6). Dass  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal nur an der 9-10 und nicht an der 9'-10' Doppelbindung gespalten wird, konnte durch die intensive gelbe Farbe nach vollständiger Spaltung im Gegensatz zu den fast vollständig entfärbten  $C_{40}$  Carotinoiden geschlossen werden. Außerdem wurde kein zweites Spaltungsprodukt neben  $\beta$ -Ionon in GC/MS-Analysen gefunden.

AtCCD1 wies eine ausreichende Stabilität im Assaysystem auf, wie durch Selwyn's Test gezeigt werden konnte. Die Ermittlung von pH- und Temperaturoptimum erfolgte, um die weitere Charakterisierung des Enzyms unter optimalen Bedingungen durchführen zu können. Während das pH-Optimum für den praktischen Umgang mit dem Enzym wichtig ist und sogar mechanistische Hinweise geben kann, ist die Angabe eines Temperaturoptimums für Enzyme umstritten (Cornish-Bowden 2001). Obwohl Ausnahmen bekannt sind, ergibt sich das Temperaturoptimum nämlich meist aus einer Kombination aus beschleunigter Reaktionsgeschwindigkeit gemäß der Arrhenius Gleichung und einer thermischen Inaktivierung und ist zudem noch abhängig von der Messdauer (Eisenthal et al., 2006). Weiterhin ist anzunehmen, dass die Beeinflussung des mizellaren Systems durch die Temperatur einen indirekten Einfluss auf die kinetischen Parameter der enzymatischen Umsetzung hat. Beispielsweise ist bekannt, dass mizellare Kenngrößen wie CMC und Aggregationszahl temperaturabhängige Größen sind (Bhattacharya et al., 2004). Trotzdem ist die Kenntnis der Temperaturstabilität des Enzyms während der Assaydauer für die kinetische Charakterisierung wichtig, da eine Inaktivierung während des Assay vermieden werden soll. Das Temperaturoptimum wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten ermittelt, da der Assay auch über längere Zeiträume durchgeführt werden sollte. Bei der Bestimmung über einen kürzeren Zeitraum ist mit einem höheren Wert des Optimums zu rechnen (Eisenthal et al., 2006). Für den entwickelten Assay wurde eine Temperatur von 30 °C, also 5 °C unterhalb des bei maximaler Umsatzgeschwindigkeit gemessenen Wertes, verwendet, um temperaturbedingte Inaktivierungseffekte auszuschließen.

Die hohe Lagerstabilität von Zellextrakten und insbesondere von aufgereinigtem Enzym erwies sich als günstig für die Charakterisierung, da keine weiteren Vorkehrungen zur Stabilisierung getroffen werden mussten. Die Zugabe von zur Solubilisierung eingesetzten Tensiden in Konzentrationen oberhalb der CMC hatte im Fall von Triton X-100 keinen Einfluss auf die Lagerstabilität, während die Stabilität in Gegenwart von Natriumcholat verringert war. Die hohe Stabilität des aufgereinigten Enzyms lässt auf eine proteolytische Spaltung oder eine

Kopräzipitation mit anderen Zellbestandteilen in den Zellextrakten als Ursache für die Aktivitätsabnahme in Zellextrakten schließen. Da die gelagerten Extrakte vor jeder Messung nochmals zentrifugiert wurden, um präzipitierte Zellbestandteile abzutrennen, könnte die Aktivitätsverringering auch durch die Sedimentation von nicht komplett solubilisiertem Enzym verursacht sein. Dies wurde für das homologe Enzym VvCCD1 beschrieben (Mathieu et al., 2007a).

## 5.2 Verbesserung der rekombinanten Expression von AtCCD1

Für den Einsatz eines Enzyms als technischer Biokatalysator ist dessen effiziente Gewinnung von großer Bedeutung für die Wirtschaftlichkeit des darauf basierenden Prozesses. Außerdem werden die Charakterisierung des Enzyms und die Prozessentwicklung dadurch vereinfacht. Die Expression von AtCCD1-His<sub>6</sub> erfolgte zunächst von pET29-AtCCD1 in *E. coli* BL21(DE3) in LB-Medium bei 37 °C mit einer Induktorkonzentration von 0.2 mM Isopropylthiogalaktosid (IPTG). Induziert wurde in der frühen exponentiellen Phase des Wachstums bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,6 und die Expression erfolgte über drei bis fünf Stunden. Nach Zellernte und Ultraschallaufschluss wurde das Zelllysat durch Zentrifugation in eine unlösliche (Pellet) und eine lösliche Fraktion (Zellextrakt) getrennt. Beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass der Großteil des rekombinant überexprimierten Enzyms in unlöslicher Form im Zellpellet vorlag (Abb. 15). Dieses Phänomen wird bei der Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* häufig beschrieben (Hoffmann et al., 2004). Insbesondere bei der Überexpression eukaryotischer Proteine in *E. coli* sind die als Einschlusskörper (Inclusion Bodies) bezeichneten, meist fehlgefalteten und inaktiven Proteinaggregate häufig anzutreffen. Deshalb wurde ergänzend zum Einsatz alternativer Expressionssysteme mittlerweile ein breites Methodenspektrum entwickelt, um den Anteil an fehlgefaltetem Protein bei der Expression in *E. coli* zu verringern (Baneyx 1999, Sorensen et al., 2005a). In den meisten Fällen lässt sich jedoch nur schwer vorhersagen, welche Methode zur Lösung des jeweils vorliegenden Expressionsproblems am besten geeignet ist. Aus diesem Grund wurden verschiedene Ansätze untersucht, um eine höhere Ausbeute für AtCCD1 zu erzielen. Die Hefe *Pichia pastoris* wurde als eukaryotisches Expressionssystem als Alternative zur Expression in *E. coli* ermittelt. Weiterhin wurden verschiedene Modifikationen von AtCCD1 zur Verbesserung der Expression in *E. coli* durch molekularbiologische Methoden erzeugt. Der Einfluss der Expressionsbedingungen und der Solubilisierung durch verschiedene Tenside wurde für diese Proteinmodifikationen untersucht. Schließlich wurde der Einfluss dieser Modifikationen auf das katalytische Verhalten des Enzyms durch Aufreinigung und biochemische Charakterisierung quantifiziert.

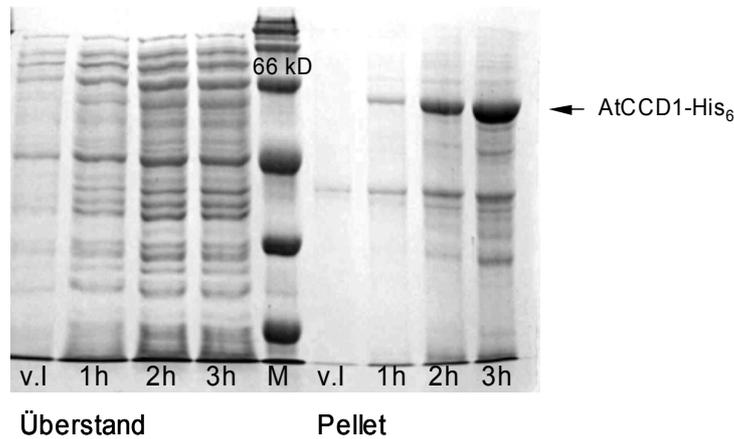


Abb. 15. SDS-PAGE Gel eines Expressionsprofils von AtCCD1-His<sub>6</sub> mit Auftragung der Zellextrakte und Zellpellets nach Aufschluss über einen Zeitraum von drei Stunden nach der Induktion mit 0,2 mM IPTG. Der Großteil des rekombinant überexprimierten Proteins befindet sich nach Zentrifugation des Lysates in der unlöslichen Fraktion im Zellpellet. M, Markerprotein; v.l., vor Induktion.

## 5.2.1 Verbesserte Expression in *E. coli*

### 5.2.1.1 Erzeugung unterschiedlicher Proteinmodifikationen von AtCCD1

Die Löslichkeit von rekombinant exprimierten Proteinen kann häufig durch die Fusion mit einem gut löslichen Trägerprotein verbessert werden (Cabrita et al., 2006). Hierfür ist eine Anzahl kommerzieller Plasmide für die Expression in *E. coli* verfügbar, die die meist N-terminale Fusion eines entsprechenden Trägerproteins an das zu exprimierende Passagierprotein durch molekularbiologische Methoden ermöglichen. Auf die gleiche Weise können auch kurze Peptide, sogenannte Tags, an das Protein gekoppelt werden, die eine spätere affinitätschromatographische Aufreinigung des rekombinanten Proteins ermöglichen.

Der Einfluss der Fusion des „Entgiftungsenzyms“ Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* (Sheehan et al., 2001) und des Transkriptionsfaktors NusA aus *E. coli* (Vogel et al., 1997) an den N-Terminus von AtCCD1 auf die Expression wurde untersucht. Diese Proteine haben sich als löslichkeitserhöhende Trägerproteine für viele schwer zu exprimierende Proteine bewährt (Korf et al., 2005). Die Fusionen zur Erhöhung des löslichen Anteils von AtCCD1 im Überstand sollten mit einer, mit kleineren Affinitätstags versehenen, sowie einer unmodifizierten AtCCD1-Variante verglichen werden. Ausgehend von dem beim Projektpartner (Prof. Wilfried Schwab, Biomolekulare Lebensmitteltechnologie, TU München) klonierten Konstrukt pGEX-4T-AtCCD1 wurde AtCCD1 in eine Reihe weiterer Expressionsplasmide kloniert, um den Einfluss unterschiedlicher Promotoren sowie unterschiedlicher N-terminaler und C-terminaler Proteinmodifikationen zu

untersuchen (Tabelle 1). Die Richtigkeit der Sequenz der klonierten Gene wurde durch Sequenzierung der Konstrukte sichergestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für die Expression verschiedener AtCCD1-Modifikationen in *E. coli*.

Plasmid	Prom.	Protein	Modifikation		M <sub>w</sub> (kD)
			N-term.	C-term.	
pET29a	T7				-
pET29a- <i>AtCCD1</i> -nm	T7	AtCCD1	-	-	60,9
pET29a- <i>AtCCD1</i>	T7	AtCCD1-His <sub>6</sub>	S-tag	His <sub>6</sub> -tag	66,0
pGEX-4T- <i>AtCCD1</i>	Tac	GST-AtCCD1	GST	-	87,2
pET43a- <i>AtCCD1</i>	T7	NusA-AtCCD1	NusA	His-tag	125,5

Bevor die detaillierte Charakterisierung der unterschiedlichen Modifikationen durchgeführt wurde, sollte zunächst allgemein der Einfluss der Expressionsbedingungen auf die spezifische Aktivität im Zellextrakt untersucht werden, um optimale Expressionsbedingungen für den Vergleich der Konstrukte zu gewährleisten.

### 5.2.1.2 Einfluss der Expressionsbedingungen

Eine Ursache für die Bildung von fehlgefaltetem Protein stellt oft die Überlastung der Translationsmaschinerie durch die Überexpression von starken Promotoren wie dem tac- oder dem T7-Promotor dar. Eine Verlangsamung des Wachstums und anderer zellulärer Vorgänge durch die Verringerung der Kultivierungstemperatur kann zur Verbesserung der Expression führen. Dies wurde für drei unterschiedliche Proteinmodifikationen von AtCCD1 untersucht (Abb. 16). Wie erwartet, ergab sich eine Erhöhung der spezifischen Aktivität im Zellextrakt mit abnehmender Kultivierungstemperatur. Hierbei war jedoch für das GST-AtCCD1 Fusionsprotein nur eine Erhöhung der spezifischen Aktivität bis 30° C zu beobachten und konnte durch weitere Temperaturabsenkung nicht weiter verbessert werden. Für das nativ von pET29-AtCCD1 exprimierte Enzym konnte keine Verbesserung der spezifischen Aktivität im Zellextrakt durch die Verringerung der Expressionstemperatur beobachtet werden.

Neben der Expressionstemperatur kann auch das Kultivierungsmedium einen großen Einfluss auf die Expression haben (Donovan et al., 1996). Aus diesem Grund wurde neben dem üblicherweise für die Kultivierung von *E. coli* eingesetzten LB-Medium (Luria-Bertani) das reichere und zudem gepufferte TB-Medium (Terrific Broth) verwendet. Mit diesem konnten deutlich höhere Zelldichten erzielt werden und auch die volumetrischen Ausbeuten an Enzym gesteigert werden (Abb. 17 A). Die

Ausbeuteerhöhung war allerdings nicht proportional zum Biomassezuwachs, so dass geringere spezifische Aktivitäten in den Zellextrakten erhalten wurden (Abb. 17 B).

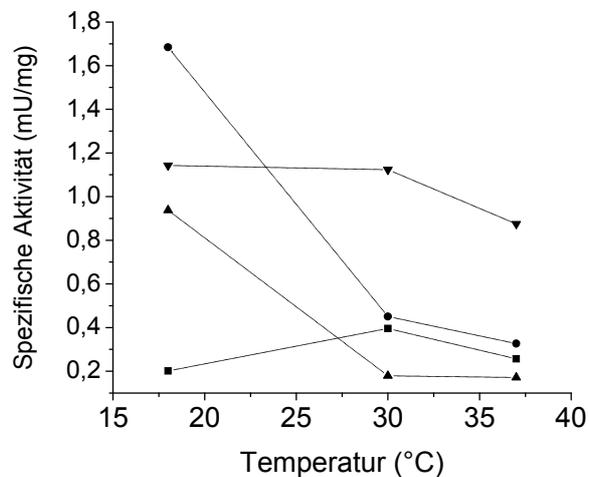


Abb. 16: Einfluss der Expressionstemperatur auf die spezifische Aktivität in Zellextrakten verschiedener AtCCD1-Modifikationen. AtCCD1 (■), AtCCD1-His<sub>6</sub> (●), GST-AtCCD1 (▼), NusA-AtCCD1 (▲). Die spezifische Aktivität wurde mittels des Standardassays bestimmt.

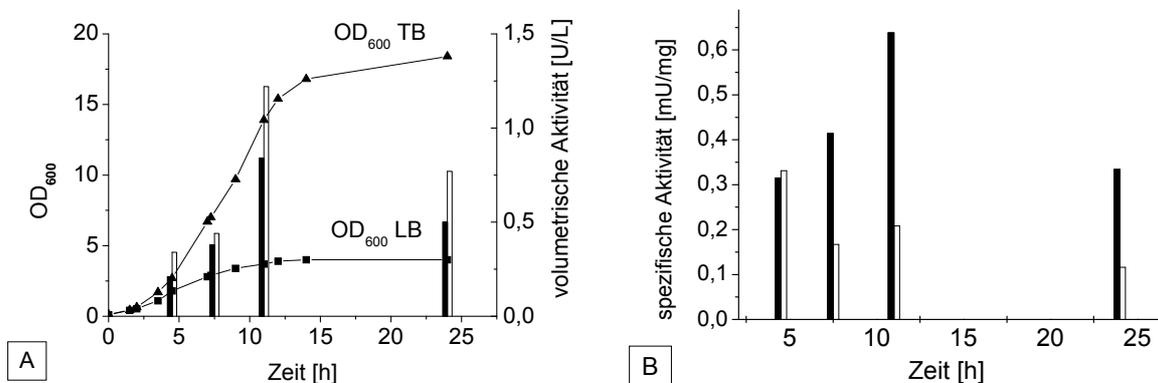


Abb. 17 A: Einfluss des Mediums auf Wachstumsverlauf des Expressionsstammes und die volumetrische Aktivität von AtCCD1-His<sub>6</sub>. OD<sub>600</sub>: LB (■) und TB (▲). Volumetrische Aktivität bezogen auf das Mediumvolumen: LB (schwarze Balken), TB (weiße Balken).  
 B: Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten bei Expression in den unterschiedlichen Medien: LB (schwarze Balken), TB (weiße Balken). Substratzugabe erfolgte über Ethanol zu einer 0,2% Tritonlösung mit Zellextrakt in einer Konzentration von 192  $\mu$ M.

Auch der Einfluss der Induktorkonzentration kann einen Einfluss auf die rekombinante Enzymexpression haben (Donovan et al., 1996). Aus diesem Grund wurden Konzentrationen von 0 bis 1 mM IPTG im Medium zur Induktion verwendet und der Einfluss auf die spezifische Aktivität im Zellextrakt gemessen (Abb. 18 A). Ohne Induktor war bei der Expression von dem pET Plasmid keine Aktivität zu messen. Dies war zu erwarten, da dieses System aufgrund seines kaskadenartigen Induktionsmechanismus als sehr dicht gilt (Studier 2005, Studier et al., 1986). Die maximale spezifische Aktivität wurde bei der geringsten IPTG Konzentration gemessen. Bei zunehmenden Konzentrationen war eine Verringerung der spezifischen Aktivitäten im Zellextrakt zu beobachten.

Da es sich bei AtCCD1 um ein membranassoziiertes Enzym handelt, wurde versucht, den Anteil an löslichem Protein im Zellüberstand durch die Solubilisierung von möglicherweise korrekt gefaltetem, aber membranassoziiertem Enzym zu erhöhen. Hierzu werden üblicherweise Tenside eingesetzt (Garavito et al., 2001). Die Auswahl eines geeigneten Tensids ist allerdings nach wie vor ein empirischer Prozess, da nicht vorhergesagt werden kann, ob es für die Solubilisierung geeignet ist, ohne dabei das Protein zu denaturieren. Allgemein scheinen jedoch nicht-ionische Tenside wie Triton X-100 für eine schonende Solubilisierung besonders geeignet (Seddon et al., 2004). Für die Solubilisierung von GST-AtCCD1 wurde das Zellysate mit unterschiedlichen Tensiden versetzt und 20 Minuten bei 25° C und 500 rpm auf einem Thermomixer geschüttelt. Hierbei wurden 0,2 % der nicht-ionischen und 2 % der ionischen Tenside eingesetzt. Nach Zentrifugation wurde die Aktivität im Überstand mit dem Triton X-100 basierten Standardassay bestimmt. Um den Einfluss des für die Solubilisierung eingesetzten Tensids im Assay zu bestimmen, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen die entsprechende Menge des jeweiligen Tensids direkt zum Assay gegeben wurde, ohne es zuvor für die Solubilisierung eingesetzt zu haben. Eine deutlich höhere Aktivität der Zellextrakte konnte durch die Solubilisierung mit Triton X-100 und den Gallensäurederivaten (Chaps, Natrium-Cholat und Natrium-Desoxycholat) erzielt werden (Abb. 18 B). Durch den Einsatz von Natrium-Cholat für die Solubilisierung konnte die spezifische Aktivität im Zellextrakt mehr als verdoppelt werden, während die nachträgliche Zugabe der jeweiligen Tenside zum Assay keine Verbesserung der Aktivität erbrachte.

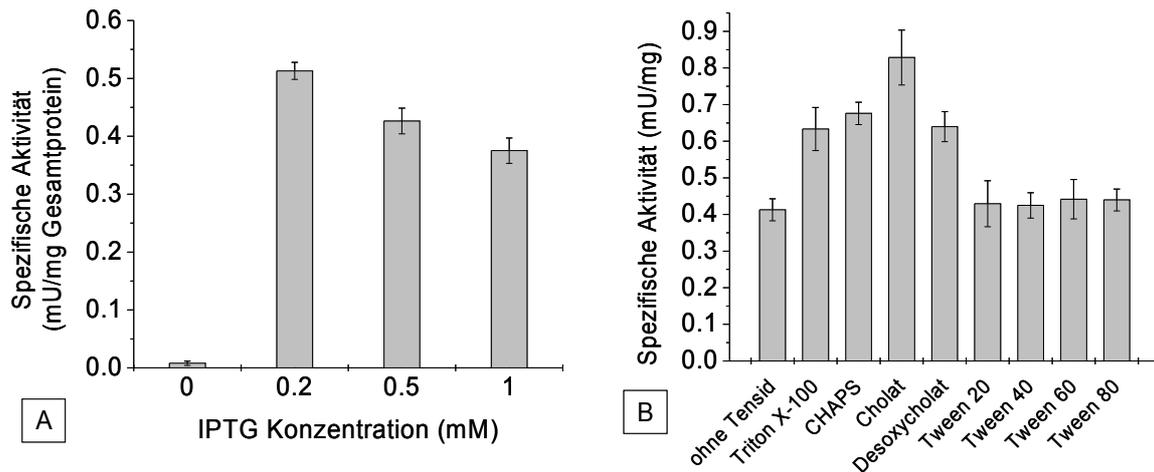


Abb. 18 A: Einfluss der Induktorkonzentration auf die spezifische Aktivität von AtCCD1-His<sub>6</sub> im Zellextrakt.  
 B: Solubilisierung von GST-AtCCD1 aus Zelllysaten mit verschiedenen Tensiden.

### 5.2.1.3 Aufreinigung und Charakterisierung der Proteinmodifikationen

Eine mögliche Verbesserung der Expression von AtCCD1 durch die unter Punkt 5.2.1.1 beschriebenen Enzymmodifikationen kann nicht alleine durch die spezifischen Aktivitäten im Zellextrakt beurteilt werden, da sich neben der verbesserten Löslichkeit auch veränderte  $k_{cat}$ - und  $K_m$ -Werte ergeben können. Um diese beiden Effekte zu unterscheiden, wurden die mit Affinitätstags versehene Fusionen AtCCD1-His<sub>6</sub>, GST-AtCCD1 und NusA-AtCCD1 affinitätschromatographisch aufgereinigt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Aufreinigungen unter gleichen Bedingungen stattfanden. Nach Elution von der Säule wurde in PBS umgepuffert, um Einflüsse unterschiedlicher Elutionspuffer auszuschließen. Die Bestimmung der  $k_{cat}$ - und  $V_{max}$ -Werte erfolgte über den photometrischen Assay im Mikrotiterplattenformat mit  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal. Die Berechnung der molaren Konzentration des Enzyms erfolgte über die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay und der densitometrischen Analyse der Reinheit der Präparation nach gelelektrophoretischer Trennung im SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 19). Die berechneten  $k_{cat}$ -Werte der mit den Trägerproteinen fusionierten AtCCD1-Varianten waren ungefähr dreimal geringer als die des mit kleineren Tags versehene AtCCD1-His<sub>6</sub> (Abb. 19 und Tabelle 2).

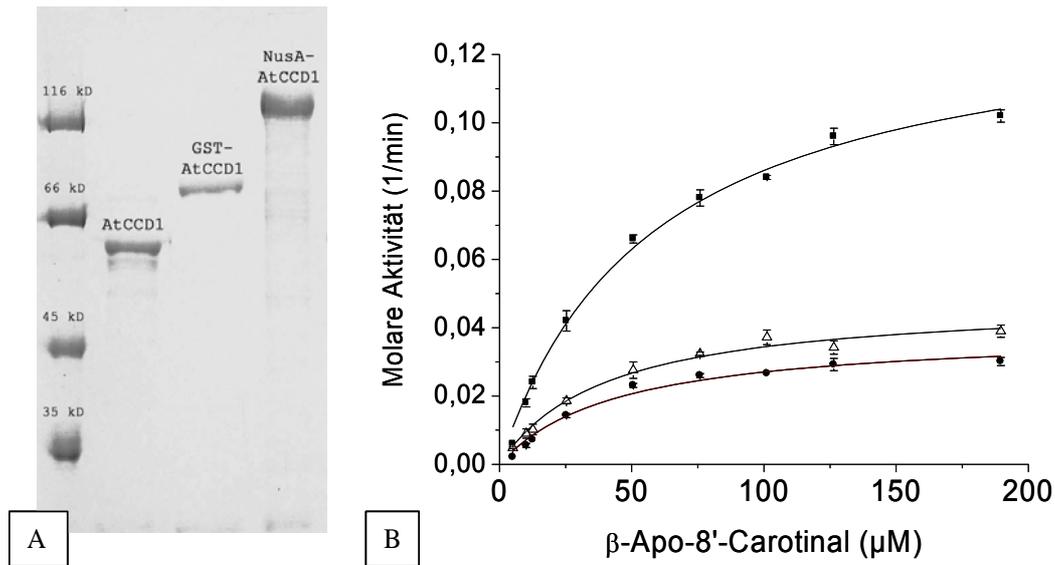


Abb. 19: A: SDS-PAGE der aufgereinigten AtCCD1 Modifikationen.  
 B: Nichtlineare Regression der Michaelis-Menten Gleichung an die kinetischen Daten (kinetische Parameter vgl. Tabelle 2). AtCCD1-His<sub>6</sub> (■), GST-AtCCD1 (●), NusA-AtCCD1 (Δ).

Um den Einfluss der verschiedenen AtCCD1-Modifikationen auf die spezifische Aktivität im Zellextrakt zu untersuchen, wurden die drei Konstrukte in *E. coli* BL21(DE3) unter gleichen Bedingungen exprimiert und die spezifischen Aktivitäten im Zellextrakt während der Expression durch Probennahme gemessen.

Während die maximalen spezifischen Aktivitäten bei der Expression von AtCCD1-His<sub>6</sub> und NusA-AtCCD1 beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase erreicht wurden, fand die Überexpression von GST-AtCCD1 noch mehrere Stunden während der stationären Phase statt. Nach Solubilisierung der membranassoziierten Enzymmodifikationen wurden für die Expression von GST-AtCCD1 die höchsten Aktivitäten im Zellextrakt erhalten (

Tabelle 2). Die verringerte molare Aktivität dieses Fusionsproteins konnte also durch die verbesserte Expression überkompensiert werden.

Tabelle 2: Maximale spezifische Aktivität in Zellextrakten im Laufe der Kultivierung/Expression, gemessen mit 10% Ethanol (Mittelwert von drei unabhängigen Kultivierungen) und  $K_m$ - und  $k_{cat}$ -Werte der verschiedenen AtCCD1 Modifikationen, gemessen ohne organisches Lösungsmittel im Assay.

AtCCD1-Modifikation	Max. spez. Aktivität im Zellextrakt (mU/mg)	$k_{cat}$ (1/min)	$K_m$ (µM)	$R^2$
AtCCD1-His <sub>6</sub>	0,90 (± 0,18)	0,132 (± 0,003)	56 (± 3)	0,99
GST-AtCCD1	1,81 (± 0,31)	0,040 (± 0,001)	47 (± 4)	0,99
NusA-AtCCD1	0,35 (± 0,15)	0,051 (± 0,001)	47 (± 3)	0,97

Die Aktivitätserhöhung durch die Solubilisierung mit Triton X-100 änderte sich wenig im Verlauf der Expression, allerdings war sie für die unterschiedlichen Konstrukte unterschiedlich groß. Für AtCCD1-His<sub>6</sub> und für GST-AtCCD1 konnte eine 1,6- bis 2-fache, für NusA-AtCCD1 nur eine 1,1- bis 1,4-fache Verbesserung der Aktivität im Zellextrakt gemessen werden (Abb. 20).

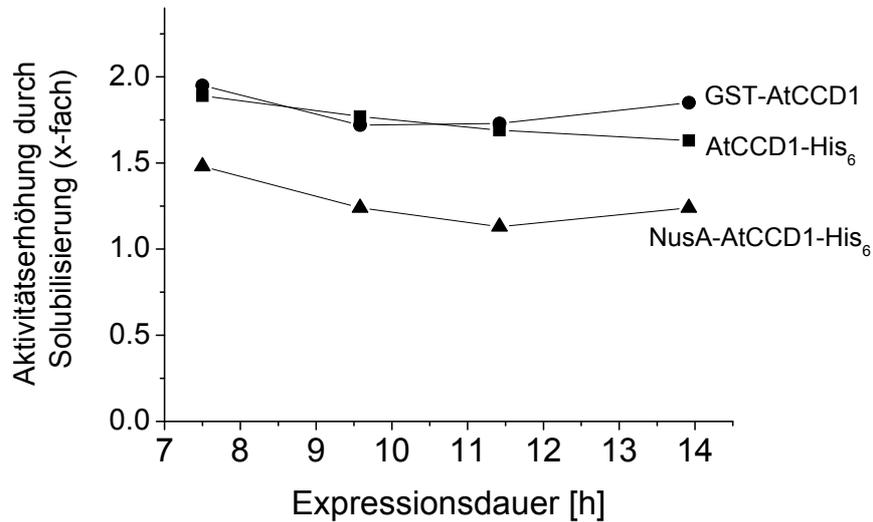


Abb. 20: Aktivitätserhöhung im Zellextrakt durch Solubilisierung mit 0,2 % Triton X-100 im Lysepuffer während der Expression.

Um den Einfluss der Trägerproteine auf das katalytische Verhalten von AtCCD1 weiter aufzuklären, wurden diese mit Thrombin abgespalten. Die Spaltung von GST-AtCCD1 resultiert dabei in einem bis auf zwei N-terminale Aminosäuren (Glycin und Serin) mit dem nativen Protein in der Primärstruktur identischen AtCCD1. Da bei dem mit einem N- und C-terminalen Tag versehenen AtCCD1-His<sub>6</sub> eine etwa dreifach höhere molare Aktivität gemessen worden war (Abb. 19 B), wurde durch die Abspaltung der GST von GST-AtCCD1 ebenfalls eine Aktivitätserhöhung erwartet. Die proteolytische Spaltung wurde mittels SDS-PAGE analysiert und eine Kontrolle ohne Thrombin bei der selben Temperatur inkubiert (Abb. 21). Zu allen Zeiten wurde die Aktivität des prozessierten Fusionsproteins mit der der Kontrolle verglichen, es konnte jedoch keine Änderung der Aktivität festgestellt werden. Auch für die Abspaltung von NusA und des C-terminalen His<sub>6</sub>-tags von NusA-AtCCD1 konnte keine Aktivitätsveränderung gemessen werden (nicht dargestellt).

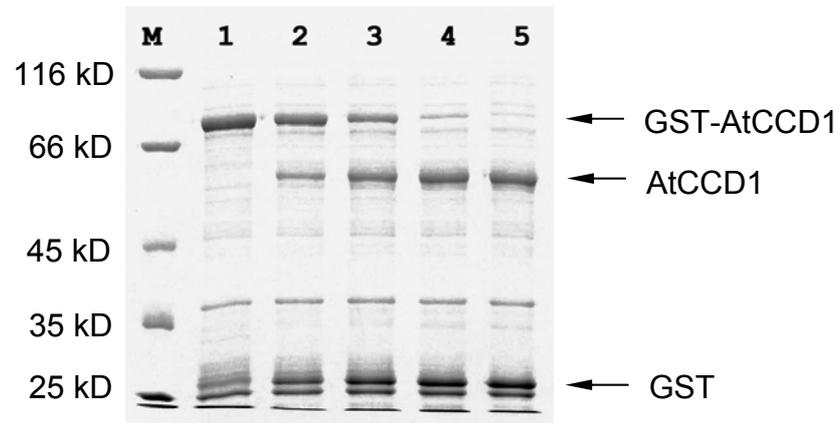


Abb. 21: Proteolytische Spaltung von teilaufgereinigtem GST-AtCCD1 mit Thrombin über fünf Stunden, dargestellt im SDS-Polyacrylamidgel (Spur 1-5 = 1-5 Stunden). Es ist eine spezifische und beinahe vollständige Spaltung zu den Fragmenten AtCCD1 und GST zu erkennen.

### 5.2.2 Expression in *Pichia pastoris*

Als Alternative zum Bakterium *E. coli* wurde ein eukaryotisches Expressionssystem eingesetzt: die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* (Cereghino et al., 2000). Im Gegensatz zu *E. coli* kann dieser Organismus posttranslationale Proteinmodifikationen wie z.B. Glykosilierungen durchführen, wodurch die Expression einer Reihe von Proteinen, die in *E. coli* nicht exprimierbar waren, in *P. pastoris* gelang (Atwal et al., 2005, Bretthauer et al., 1999, Cereghino et al., 2000). *AtCCD1* wurde in verschiedene Vektoren kloniert, von denen *AtCCD1* mit und ohne C-terminalem  $\alpha$ -Faktor (zur Sekretion) und mit und ohne C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag (zur Affinitätschromatographischen Aufreinigung) exprimiert werden sollte (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über die für die Expression unterschiedlicher *AtCCD1*-Modifikationen in *P. pastoris* erzeugten Plasmide.

Plasmid	Protein	Modifikation		M <sub>w</sub> (kD)
		N-term.	C-term.	
pPICZ				
pPICZ- <i>AtCCD1</i> ms	<i>AtCCD1</i>	-	-	60,9
pPICZ- <i>AtCCD1</i> os	<i>AtCCD1</i> -His <sub>6</sub>	-	c-myc Epitop-His <sub>6</sub>	63,6
pPICZ $\alpha$ - <i>AtCCD1</i> ms	$\alpha$ <i>AtCCD1</i>	$\alpha$ -Faktor	-	70,5
pPICZ $\alpha$ - <i>AtCCD1</i> os	$\alpha$ <i>AtCCD1</i> -His <sub>6</sub>	$\alpha$ -Faktor	c-myc Epitop-His <sub>6</sub>	73,6

Die Expression erfolgte gemäß Protokoll in einem Minimalmedium mit Glucose oder Glycerol zur Erzeugung von Biomasse. Beim Erreichen der stationären Phase wurde durch Methanolzugabe die Expression von AtCCD1 von dem AOX-Promotor induziert und für 1-2 Tage weiterkultiviert.

Zur Überprüfung der Sekretion von  $\alpha$ AtCCD1 ins Medium wurden 15 ml Medium abgenommen und mittels Ultrafiltration 100x aufkonzentriert. Es war jedoch kein Protein der entsprechenden Größe nach Trennung durch SDS-PAGE zu erkennen. Die Insertion von *AtCCD1* in das *Pichia* Genom wurde mittels Amplifikation mit AOX-Primern von isolierter genomischer DNA bestätigt. Bei der Insertion war es nicht zur Deletion (homologe Rekombination mit Crossover) von *AOX* gekommen und es waren PCR Produkte beider Gene vorhanden. In Zellextrakten waren nach Auftrennung mittels SDS-PAGE zwei Proteinbanden zu erkennen. Bei einer der Banden handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um AtCCD1-c-myc-His<sub>6</sub>. Dies konnte mittels Western Blotting mit einem Anti-His<sub>6</sub> Antikörper gezeigt werden.

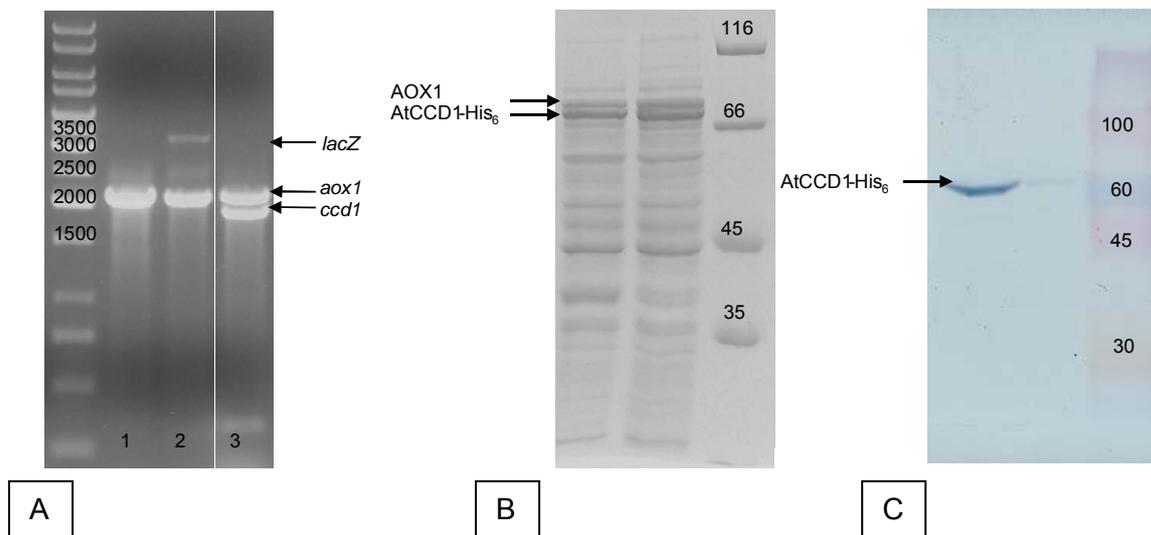


Abb. 22 Expression von AtCCD1 in *P. pastoris*.

A: PCR mit 3' und 5' AOX1-Primern, um die Integration von *AtCCD1* im Genom von *Pichia* nachzuweisen; Spur 1: nicht transformierte *P. pastoris* X-33; Spur 2: Induktions-Kontrollstamm GS115/pPICZ/lacZ; Spur 3: *P. pastoris* X-33 mit pPICZ*AtCCD1* transformiert;

B: SDS-PAGE (10%) eines Zellextrakts mit Trennung der vom Molekulargewicht nahe beieinander liegenden AtCCD1 und der Alkoholoxidase aus *P. pastoris* (es handelt sich um einen Mut<sup>+</sup>-Stamm);

C: Western Blot eines Zellextrakts mit Detektion durch einen Anti-His<sub>6</sub>(C-term)-HRP Antikörper.

Im Folgenden wurde die Carotinoidspaltungsaktivität der Zellextrakte untersucht. Mizellar solubilisiertes Retinal wurde zugegeben und die Reaktionsansätze bei 30 °C inkubiert. Dabei war innerhalb einer Stunde eine vollständige Entfärbung des

Substrates, sowohl bei Stämmen mit, als auch ohne AtCCD1, erkennbar. Die GC/MS Analyse der Reaktionsansätze ergab ein breites Spektrum an Carotinoidspaltungsprodukten, das typisch für die unspezifische Spaltung bei cooxidativen Reaktionen ist. 5,6-Epoxy- $\beta$ -ionon und Dihydroactinidiolid (DHA) stellten hierbei die Hauptprodukte dar (Abb. 23).

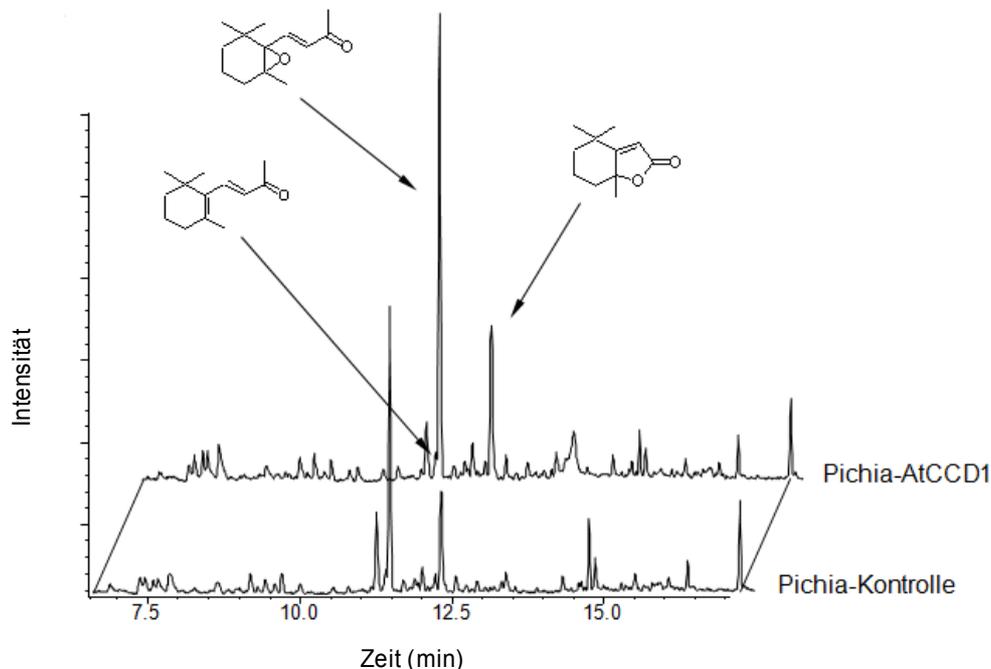


Abb. 23 GC/MS Chromatogramme eines Retinalumsatzes mit Zellextrakten von *Pichia pastoris* mit und ohne AtCCD1. 5,6-Epoxy- $\beta$ -ionon und Dihydroactinidiolid (DHA) sind typische Produkte einer unspezifischen Spaltung und wurden in ähnlichen Verhältnissen in Proben und Kontrollen gefunden.

Da eine spezifische Spaltungsaktivität vor dem Hintergrund der unspezifischen Cooxidation nur schlecht zu detektieren ist, wurde versucht, AtCCD1-His<sub>6</sub> aus *Pichia* affinitätschromatographisch aufzureinigen. Es wurde eine deutliche Bande bei der entsprechenden Größe erhalten, die sich jedoch ebenso wie im Fall der Zellextrakte weiter in zwei diskrete Banden aufteilen ließ. Mit dieser Präparation war jedoch keine Produktbildung zu messen, so dass entweder eine nicht funktionale Expression oder eine Inaktivierung während der Enzymgewinnung stattgefunden haben musste. Aufgrund der unter 5.2.1 beschriebenen, erfolgreichen Maßnahmen zur Verbesserung der Expression in *E. coli* wurden die Ursachen für die nicht funktionale Expression in *P. pastoris* nicht weiter verfolgt.

### 5.2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die Expression von AtCCD1 unter Standardbedingungen in *E. coli* führte zu einem großen Anteil an inaktivem Protein, das in Form von Inclusion Bodies im Zellpellet

vorlag. Die Bildung solcher fehlgefalteter Proteinaggregate wird unter anderem durch die hohe Konzentration an naszierendem, überexprimierten Protein und dessen exponierten hydrophoben Resten verursacht (Sorensen et al., 2005b). CCDs besitzen im nativen Zustand eine exponierte amphipathische Helix, die vermutlich die Wechselwirkung mit Zellmembranen und damit den Zugang zu den darin gelösten Substraten ermöglicht (Tan et al., 2001). Vermutlich führt diese Eigenschaft zur vermehrten Bildung von Inclusion Bodies. Um diesen Anteil zu verringern, wurde der Einfluss von Kultivierungs- und Expressionsbedingungen, sowie von Affinitätstags und löslichkeitserhöhenden Fusionsproteinen auf die spezifische AtCCD1-Aktivität im Zellextrakt untersucht.

Eine verringerte Expressionstemperatur ergab die stärkste Verbesserung der spezifischen Aktivität in den Zellextrakten im Vergleich zu Expressionsparametern, wie der Induktorkonzentration oder der Medienzusammensetzung. Allerdings galt dies nicht in gleichem Maß für alle untersuchten Enzymmodifikationen. Sowohl für das unveränderte AtCCD1 als auch für GST-AtCCD1 erbrachte eine Verringerung der Expressionstemperatur unter 30 °C keine höheren spezifischen Aktivitäten, während bei AtCCD1-His<sub>6</sub> und NusA-AtCCD1 eine deutliche Verbesserung in diesem Bereich erzielt werden konnte. Der für die Proteinaggregation verantwortliche hydrophobe Effekt verstärkt die Interaktion unpolarer Reste des sich faltenden Proteins und wirkt sich mit zunehmender Temperatur stärker aus (Chandler 2005, Hoffmann et al., 2004). Dadurch kommt es bei höheren Temperaturen zu einer verstärkten Bildung von Inclusion Bodies. Dieser Effekt scheint aber für die unterschiedlichen Proteinmodifikationen unterschiedlich stark ausgeprägt zu sein und könnte auf unterschiedliche Mechanismen bei der stabilisierenden Wirkung der Trägerproteine hindeuten.

Der Einsatz unterschiedlicher Tenside zur Solubilisierung von GST-AtCCD1 in Zelllysaten führte zu einer erhöhten spezifischen Aktivität im Zellextrakt. Eine Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität durch den Einsatz von Triton X-100 wurde auch von von anderen Autoren für homologe CCDs beschrieben (Bouvier et al., 2003, Schwartz et al., 2004). Die höhere spezifische Aktivität von GST-AtCCD1 wurde nicht durch die Gegenwart des Tensids im Triton-basierten Assay verursacht, wie durch geeignete Kontrollexperimente gezeigt werden konnte. Die ein Steroidgerüst enthaltenden Cholate und CHAPS ergaben deutlich höhere spezifische Aktivitäten als die nicht-ionischen Tenside der Tween Reihe, bei denen keine signifikante Aktivitätszunahme gemessen wurde.

Bei der Solubilisierung wird korrekt gefaltetes, aber membranassoziiertes Enzym von den Zellmembranen abgelöst bzw. die Zellmembranen teilweise aufgelöst (Garavito et al., 2001). Die Aktivitätserhöhung durch Solubilisierung von membranassoziiertem Enzym sollte also Auskunft über dessen Verteilungsverhalten zwischen Zytosol und Zellmembran geben. Basierend auf dieser Überlegung wurde die relative Zunahme der spezifischen Aktivität durch die Solubilisierung mit Triton X-100 von drei unterschiedliche AtCCD1-Modifikationen im Verlauf einer Expression untersucht. Die

Aktivitätserhöhung blieb im Verlauf der Expression nahezu konstant, jedoch unterschied sie sich deutlich zwischen den Konstrukten. Interessanterweise war der Einfluss der Solubilisierung bei NusA-AtCCD1 am geringsten. NusA wurde im Gegensatz zu GST ausschließlich auf Basis seiner guten Löslichkeit als Trägerprotein für die lösliche Expression von Passagierproteinen ausgewählt (Davis et al., 1999). Tatsächlich deutet die geringere Aktivitätszunahme durch die Solubilisierung im Vergleich mit den anderen AtCCD1-Modifikationen auf einen geringeren membranassoziierten Anteil an aktivem NusA-AtCCD1 hin. Obwohl die Löslichkeit von AtCCD1 also durch die Fusion mit NusA am stärksten erhöht war, wurden die geringsten spezifischen Aktivitäten nach der Solubilisierung aus den Zellysaten im Verlauf einer Expression gemessen. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten liegt darin, dass das hydrophobe Milieu von Zellmembranen die korrekte Faltung von membranassoziierten und membranständigen Proteinen begünstigen kann bzw. sogar Voraussetzung für eine korrekte Faltung ist (Bogdanov et al., 1999). So ist vorstellbar, dass die starke Löslichkeitserhöhung durch NusA zu einer schlechteren Faltung und damit zu einer geringeren Konzentration an aktivem Protein im Zellextrakt führt.

Die Expression des mit einem N-terminalen S-Tag und einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag versehenen AtCCD1-His<sub>6</sub> ergab eine ungefähr zwei- bis dreifach höhere spezifische Aktivität im Zellextrakt im Vergleich zu NusA-AtCCD1. Durch die Fusion mit GST konnte die spezifische Aktivität im Vergleich zu AtCCD1-His<sub>6</sub> nochmals verdoppelt werden. Die Aufreinigung und kinetische Charakterisierung der Fusionsproteine ergaben deutlich reduzierte  $k_{cat}$  Werte von GST-AtCCD1 und NusA-AtCCD1 im Vergleich zu AtCCD1-His<sub>6</sub>. Die Erhöhung der Enzymkonzentration im Zellextrakt durch diese Modifikationen wurde somit durch die Bestimmung der spezifischen Aktivität unterschätzt. Bei doppelter spezifische Aktivität im Zellextrakt und einer um ca. 70 % verringerten molaren Aktivität im Vergleich zu AtCCD1-His<sub>6</sub> wurde durch die Fusion mit GST eine ungefähr sechsmal höhere molare Enzymkonzentration im löslichen Überstand erhalten.

Um die verbesserte Ausbeute an löslichem Enzym ausnutzen zu können, wurde versucht, die molare Aktivität durch die proteolytische Abspaltung des Trägerproteins mit Thrombin wieder herzustellen. Überraschenderweise war keine Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit durch das Abspalten von NusA oder GST zu beobachten. Demnach ist die verringerte molare Aktivität nicht auf die Gegenwart des Trägerproteins, sondern vermutlich auf qualitative Unterschiede in der Faltung des Passagierproteins zurückzuführen. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass es durch die hohe Löslichkeit des Trägerproteins zu löslichen Fusionsproteinen kommen kann, bei denen das Passagierprotein ganz oder teilweise fehlgefaltet vorliegt. Die dabei entstehenden löslichen Aggregate aus Fusionsproteinen wurden als „soluble inclusion bodies“ bezeichnet (Nomine et al., 2001a, 2001b). Verringerte  $k_{cat}$ -Werte könnten also auf einen komplett inaktiven Anteil am löslichen Enzym, oder auf eine verschlechterte Faltung des gesamten löslichen Enzyms zurückzuführen sein. Im

Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Experimenten zur proteolytischen Abspaltung von ganz oder teilweise fehlgefaltetem Passagierprotein von dem Trägerprotein GST, kam es im vorliegenden Fall jedoch nicht zur sofortigen Präzipitation von AtCCD1 (Nomine et al., 2001a). Allerdings wurde dieser Effekt nur über einen Zeitraum von fünf Stunden und zudem ohne Ultrazentrifugation der Proben untersucht, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass es zu einer langsamen Präzipitation des abgespaltenen AtCCD1 kommt.

Weitere Hinweise, dass die Faltungsqualität eines Enzyms keine Frage von richtig oder falsch, sondern eher gradueller Natur ist, gibt die Untersuchung unterschiedlicher Expressionssysteme für dasselbe Protein. In Abhängigkeit vom eingesetztem Expressionsstamm kann es zu dramatischen Unterschieden in der molaren Aktivität von Enzymen kommen. Die Expression der menschlichen  $\beta$ -Carotin spaltenden Oxygenase BCO in Insektenzellen ergab z.B. eine 300- bis 1500-fach höhere spezifische Aktivität des aufgereinigten Proteins als die Expression eines homologen Enzyms aus der Maus in Form eines GST-Fusionsproteins in *E. coli* (Lindqvist et al., 2002). Aufgrund der Ähnlichkeit der Sequenzen ist dieser Unterschied vermutlich nicht intrinsisch, sondern wird vielmehr durch eine korrekte Prozessierung im eukaryotischen Expressionssystem verursacht. Aus diesem Grund wurde *P. pastoris* als alternatives Expressionssystem zu *E. coli* für verschiedene AtCCD1-Modifikationen untersucht. Die Expression ergab ein lösliches Protein im Überstand, dessen Größe der rekombinant exprimierten AtCCD1 entsprach. Die Identität von AtCCD1-His<sub>6</sub> wurde zusätzlich durch einen Western-Blot mit Anti-His<sub>6</sub>- (C-term)-HRP Antikörpern bestätigt. Die Integration von *AtCCD1* erfolgt mittels homologer Rekombination. Hierbei wurden jedoch ausschließlich Integrationen ohne Deletion des AOX-Gens erhalten (methanol utilization positive Phänotyp, Mut<sup>+</sup>). AOX und AtCCD1 besitzen sehr ähnliche Molekulargewichte, was die Analyse mittels SDS-PAGE erschwerte. Eine Auftrennung war jedoch in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel möglich. Obwohl AtCCD1 in löslicher Form exprimiert wurde, konnte keine spezifische Spaltung im Zellextrakt gemessen werden. Die Zugabe von mizellar solubilisiertem Retinal zu *Pichia* Zellextrakten führte jedoch zur Bildung eines breiten Spektrums an Carotinoidspaltprodukten. Dabei handelt es sich um Verbindungen, die auch bei der enzymatischen Cooxidation von  $\beta$ -Carotin durch Lipoxygenase oder Xanthinoxidase oder durch die direkte Oxidation durch eine spezifische Peroxidase entstehen (Waché et al., 2002, Wu et al., 1999, Zorn et al., 2003b). Da durch die Induktion mit Methanol in *P. pastoris* X-33 neben AtCCD1 ebenfalls die Alkoholoxidase AOX1 induziert wird, sind diese Produkte möglicherweise auf die unspezifische Oxidation von Retinal durch reaktive Spezies aus dem Methanolmetabolismus in den Peroxisomen zurückzuführen, die durch den Zellaufschluss freigesetzt wurden (Couderc et al., 1980, Kupcsulik et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit wäre ein natives Enzym aus *P. pastoris*, das für die unspezifische Oxidation des Substrats verantwortlich ist. Der Nachweis einer spezifischen Spaltung

durch AtCCD1 ist in beiden Fällen mit Rohextrakten aus *P. pastoris* X-33 schlecht durchführbar, da durch die unspezifische Oxidation nicht nur die Substrate umgesetzt werden, sondern auch das möglicherweise durch spezifische Spaltung angefallene Produkt weiter oxidiert wird. Dies wurde von Waldmann et al. für die Lipxygenase katalysierte Cooxidation von  $\beta$ -Ionon gezeigt (Waldmann et al., 1995). Eine von Bosser et al. für die radikalische Oxidation von  $\beta$ -Carotin durch Xanthinoxidase-erzeugte Radikale postulierte Reaktionsfolge deutet ebenfalls auf einen solchen Mechanismus hin (Bosser et al. 1995, Abb. 24).

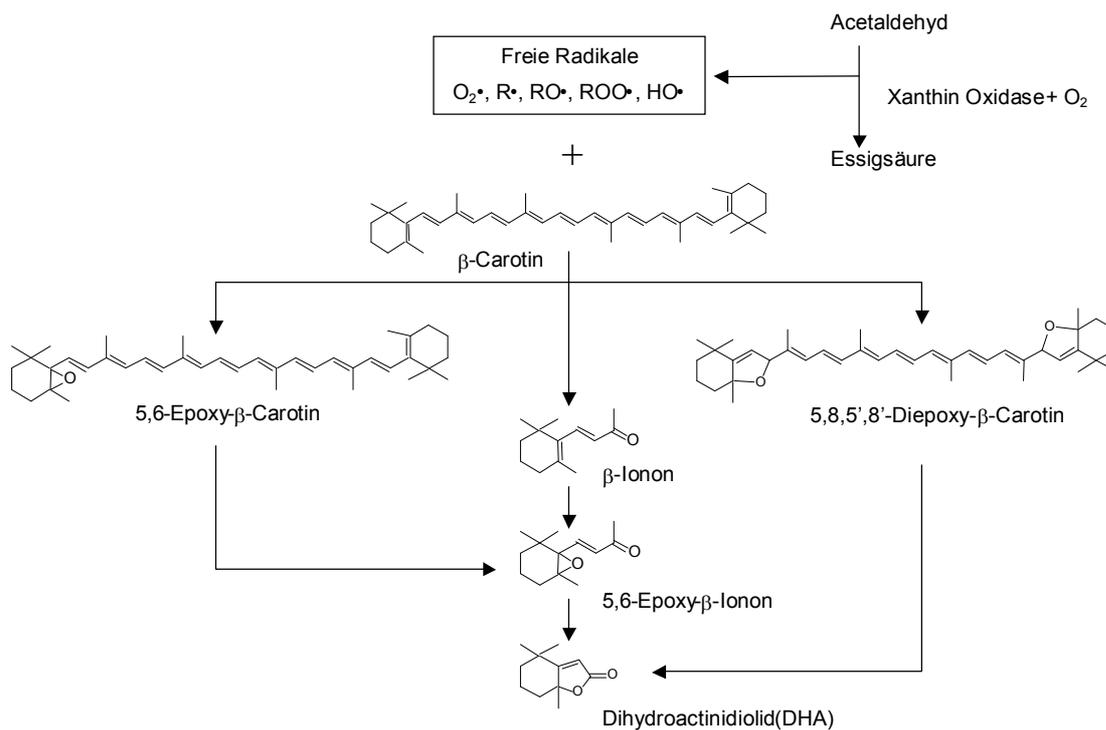


Abb. 24: Postuliertes Reaktionsschema der Xanthinoxidase katalysierten, cooxidativen Spaltung von  $\beta$ -Carotin und die daraus entstehenden Reaktionsprodukte (Bosser et al., 1995). Die in den *P. pastoris* Peroxisomen bei der Oxidation von Methanol entstehenden Radikale könnten für die unspezifische Spaltung von Retinal gemäß einem ähnlichen Mechanismus verantwortlich sein.

Um solche Effekte auszuschließen, wurde AtCCD1-His<sub>6</sub> aus *P. pastoris* affinitätschromatographisch aufgereinigt. Das aufgereinigte Enzym zeigte jedoch keine Aktivität. Eine mögliche Ursache für die fehlende Aktivität sind die C-terminalen Modifikationen der AtCCD1 Varianten mit His-Tag und c-myc-Epitop, aber auch mögliche Fehlfaltung oder posttranslationale Modifikationen wie Hyperglycosylierung, die zu einer Inaktivierung des Enzyms führen können (Bretthauer et al., 1999). Die parallel durchgeführten Maßnahmen zur Verbesserung der Expression in *E. coli* waren jedoch so erfolgreich, dass auf eine weitere Untersuchung des *P. pastoris* Expressionssystems verzichtet wurde.

### **5.3 Vermittlung der Substrate in wässrig mizellaren Systemen**

Sowohl für die biochemische Charakterisierung, als auch für den technischen Einsatz von CCDs zur Gewinnung von Carotinoidspaltprodukten, stellt die Vermittlung der wasserunlöslichen Carotinoide in wässrige bzw. enzymkompatible Medien ein zentrales Problem dar. Da Carotinoide seit längerer Zeit auch in großem Umfang für das Färben von wässrigen Lebensmitteln, speziell in der Getränkeindustrie, eingesetzt werden, ist die Formulierungstechnologie weit fortgeschritten (Auweter et al., 1999, Horn et al., 2001). Hierbei ist das Mikronisieren die Technik der Wahl, um Carotinoide „in Lösung“ zu bringen. Es handelt sich dabei um eine nanodisperse Fällung von in organischem Lösungsmittel molekular gelöstem Carotinoid durch das Mischen mit Wasser und anschließender Stabilisierung der nanoskaligen Aggregate durch ein Hydrokolloid. Diese Aggregate sind nach Sprühtrocknung gut wasserdispergierbar. Die Carotinoide liegen allerdings kristallin und durch die Hydrokolloidschutzschicht (Maltodextrine oder Gelatine) vor einer enzymatischen Umsetzung geschützt vor. Es ist davon auszugehen, dass die Substrate nicht in kristalliner Form für einen enzymatischen Umsatz vorliegen dürfen, da nur ein molekular gelöstes Substratmolekül in der Lage ist, zum aktiven Zentrum des Enzyms zu diffundieren. Der Einsatz von löslichkeitserhöhenden Cosolventien für die Vermittlung der Substrate ist aufgrund der extrem hydrophoben Natur der meisten Carotinoide keine Option. Es konnte gezeigt werden, dass Carotinoide in Abhängigkeit von ihrer Hydrophobizität schon bei Acetongehalten von kleiner als 80 % in binären Mischungen von Aceton und Wasser zu aggregieren beginnen (Billsten et al., 2005, Ruban et al., 1993, Salares et al., 1977). Dies ist weit von einer enzymkompatiblen Konzentration entfernt. Stattdessen wurden wässrige Tensidmizellen aus nichtionischen Tensiden für die Vermittlung der Substrate und die kinetische Charakterisierung von AtCCD1 eingesetzt.

#### **5.3.1 Unterschiedliche Methoden zur Präparation mizellar solubilisierter Carotinoide**

Die mizellare Solubilisierung von Carotinoiden erfolgte durch Lösen des jeweiligen Carotinoids in einem organischen Lösungsmittel, wie z.B. THF oder Ethanol und anschließendem Mischen mit einem nicht-ionischen Tensid. Alternativ können die Carotinoide auch direkt in einem flüssigen Tensid ohne organisches Lösungsmittel gelöst werden. Jedoch sind auf diese Art geringere Verhältnisse von Substrat zu Tensid zu erreichen. Anschließend wurde Puffer zugegeben, um eine mizellare, wässrige Lösung des jeweiligen Substrats herzustellen. Als weitere Möglichkeit die Substrate mizellar zu solubilisieren, wurde das entsprechende Tensid in Puffer vorgelegt und anschließend das in wassermischbarem, organischem Lösungsmittel gelöste Carotinoid zugegeben und durch rasches Mischen in mizellare Lösung

gebracht. Diese Methode führte aber häufig zu instabilen Systemen, insbesondere bei höheren Carotinoidkonzentrationen im Lösungsmittel. Dabei kam es zu einer mehr oder wenigen schnellen Präzipitation des Substrates in Abhängigkeit von Substrat und Lösungsmittelkonzentration.

Selbst Retinal, das hydrophilste der untersuchten Substrate, konnte durch den Einsatz von organischen Lösungsmitteln als Cosolvens nicht in molekulare, wässrige Lösung gebracht werden. Ebenso war eine Solubilisierung durch Tensidmizellen von kristallinem bzw. aggregiertem Substrat in wässrig/organischen, homogenen Lösungen nicht möglich.

### **5.3.2 Einfluss von wassermischbaren, organischen Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität**

Beim Vergleich der unter Punkt 5.3.1 beschriebenen unterschiedlichen Herstellungsmethoden wurden bei Zugabe von in organischem Lösungsmittel gelösten Carotinoid zu wässrigen Triton X-100 Mizellen höhere Aktivitäten gemessen als bei den Präparationen, die kein organisches Lösungsmittel in der endgültigen Zusammensetzung enthielten. Durch nachträgliche Zugabe von Ethanol zu  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal-beladenen Triton X-100 Mizellen wurde festgestellt, dass die Aktivierung durch das Lösungsmittel verursacht wurde. Um die Ursachen dieser Aktivierung zu verstehen, wurden verschiedene Konzentrationen einer Reihe aliphatischer Alkohole mit zunehmender Hydrophobizität zum Assay gegeben. Es wurde aufgereinigtes AtCCD1-His<sub>6</sub> eingesetzt, da der photometrische Assay bei höheren Alkoholkonzentration durch die Präzipitation von Proteinen und anderen Bestandteilen beim Einsatz von Zellextrakten gestört wurde. Dabei zeigte sich für jeden Alkohol bei steigender Konzentration zunächst eine Aktivitätserhöhung, gefolgt von einer Aktivitätsabnahme und schließlich Inaktivierung (Abb. 25 A). Das Aktivitätsoptimum verschob sich dabei zu niedrigeren Volumenanteilen von organischem Lösungsmittel in Abhängigkeit von dessen Hydrophobizität. Es konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Log P des jeweiligen Alkohols und dessen Volumenanteil bei maximaler Aktivität aufgezeigt werden (Abb. 25 B).

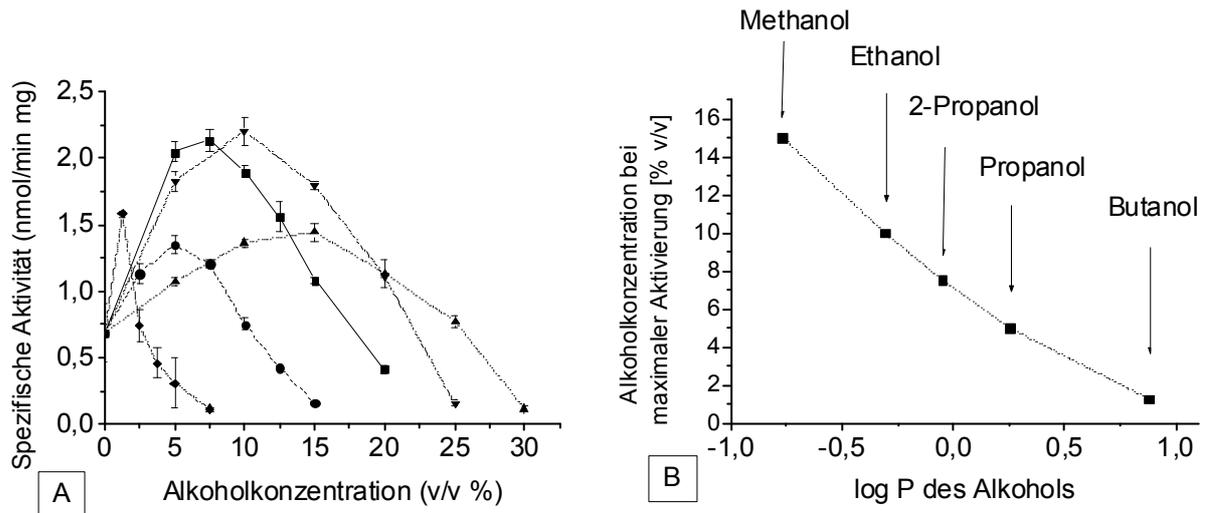


Abb. 25 A: Spezifische Aktivität von aufgereinigtem AtCCD1-His<sub>6</sub> bei zunehmender Konzentration aliphatischer Alkohole verschiedener Hydrophobizität im Reaktionssystem. Methanol (▲), Ethanol (▼), 2-Propanol (■), Propanol (●), Butanol (◆).  
 B: Abhängigkeit der für eine maximale Aktivierung benötigten Lösungsmittelkonzentration vom Log P des Lösungsmittels.

Im Anschluss wurde der Einfluss der Bestandteile des ternären Reaktionssystems aus Puffer/Ethanol/Triton X-100 auf die enzymatische Umsetzung genauer untersucht. Hierbei wurden die  $\beta$ -Apo-8'-Carotinalkonzentration und die Ethanolkonzentration bei einem konstanten Verhältnis von Substrat zu Triton X-100 (0,8 mol %) variiert und die Aktivität des affinitätschromatographisch aufgereinigten GST-AtCCD1 untersucht. Die optimale Ethanolkonzentration lag bei 15 % (v/v), also um 5 % höher als bei AtCCD1-His<sub>6</sub>. Mit zunehmender Tensid- bzw. Substratkonzentrationen kam es zu einer verstärkten Aktivierung durch Ethanolzugabe bei gleichbleibendem Ethanoloptimum (Abb. 26 A). Eine 18-fache ( $\pm 0,7$ ) Aktivierung wurde bei einer Tensidkonzentration von 15 g/l und einem molaren Substrat/Tensid-Verhältnis von 0,008 (Substratkonzentration 189  $\mu$ M) erzielt.

Der Einfluss des Trägerproteins auf das Ethanoloptimum von AtCCD1 wurde überprüft, um weitere Informationen über den Mechanismus der Aktivierung zu erhalten. Für diesen Versuch wurden Zellextrakte eingesetzt. Die optimale Ethanolkonzentration war durch die Fusion mit den Trägerproteinen erhöht und im Fall von NusA-AtCCD1 kam es auch zu einer stärkeren Aktivierung (Abb. 26 B). Für AtCCD1-His<sub>6</sub> und GST-AtCCD1 konnte durch diese Versuche gezeigt werden, dass das Optimum durch den Einsatz von Zellextrakten im Vergleich zum aufgereinigten Enzym um 5 % (v/v) erhöht wurde.

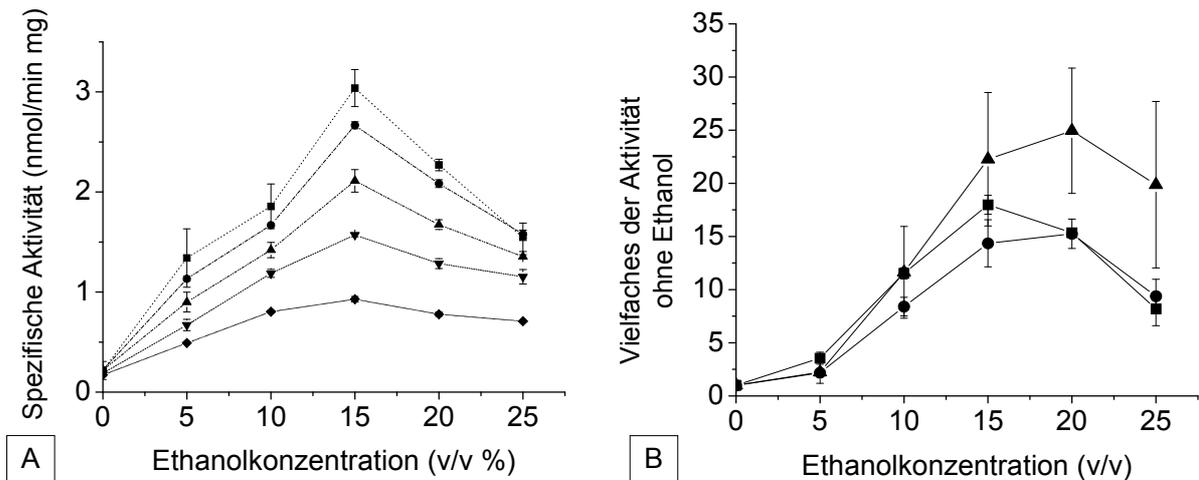


Abb. 26 A: Einfluss der Ethanolzugabe zu unterschiedlichen Substratkonzentrationen bei einem konstanten Substrat/Triton X-100-Verhältniss. Mit zunehmender Konzentration an Tensid und Substrat, kommt es zu einer verstärkten Aktivierung bei einem konstanten Ethanoloptimum von 15 % (v/v). Substratkonzentration ( $\mu\text{M}$ ): 12 ( $\blacklozenge$ ), 25 ( $\blacktriangledown$ ), 50 ( $\blacktriangle$ ), 126 ( $\bullet$ ), 189 ( $\blacksquare$ ). B: Unterschiedliche Ethanoloptima und Aktivierung unterschiedlicher AtCCD1-Modifikationen. AtCCD1-His<sub>6</sub> ( $\blacksquare$ ), GST-AtCCD1 ( $\bullet$ ), NusA-AtCCD1 ( $\blacktriangle$ ). Die großen Fehlerbalken bei NusA-AtCCD1 kommen durch die Fehlerfortpflanzung bei dem Vergleich der stark fehlerbehafteten geringen Aktivität ohne Ethanol mit den höheren Aktivitäten in Gegenwart von Ethanol zustande.

Bei Ethanolkonzentrationen über dem Optimum war bei allen Modifikationen eine mehr oder weniger schnelle Inaktivierung des Enzyms im Verlauf des Assays zu verzeichnen. Dadurch kam es im Gegensatz zu den niedrigeren Konzentrationen nicht zum vollständigen Umsatz des Substrates (vgl. Aktivierung durch Ethanol im Tween 20 System, Abb. 30). Obwohl keine systematischen Untersuchungen zur Enzymstabilität in Gegenwart von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln durchgeführt wurden, war durch die Analyse der Reaktionsverläufe, nicht nur eine stärkere Aktivierung, sondern zusätzlich eine höhere Stabilität von NusA-AtCCD1 über einen längeren Zeiträume zu erkennen.

### 5.3.3 Einfluss verschiedener nicht-ionischer Tenside auf die enzymatische Umsetzung

Der Einfluss der Tensidstruktur und der Mizellencharakteristika auf die Enzymaktivität wurde untersucht. Hierfür wurden Polysorbate (Tween®) mit unterschiedlich großen hydrophoben Resten für die Vermittlung von  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal eingesetzt und mit dem Triton X-100 System verglichen (Abb. 27, Tabelle 4). Das molare Verhältnis von Substrat zu Tensid wurde für alle Tenside gleich gehalten und der Einfluss auf die

Aktivität von tensidfreien Zellextrakten von AtCCD1, AtCCD1-His<sub>6</sub>, GST-AtCCD1 und von aufgereinigtem GST-AtCCD1 untersucht. Die unterschiedlichen Enzymmodifikationen wurden eingesetzt, um den Einfluss der Tags auf die für die Substratzugänglichkeit wichtige Interaktion zwischen Enzym und Mizelle zu untersuchen.

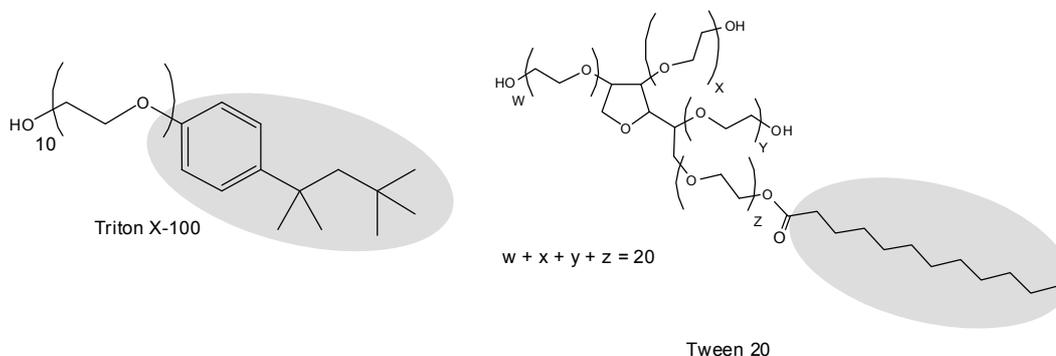


Abb. 27: Struktur der für die Substratvermittlung eingesetzten nicht-ionischen Tenside Triton X-100 und Tween 20. Der hydrophobe Teil ist grau unterlegt. Die Tenside der Tween-Reihe unterscheiden sich durch die Länge bzw. den Sättigungsgrad des hydrophoben Alkylrestes.

Tabelle 4: Eigenschaften der für die Substratvermittlung eingesetzten nicht-ionischen Tenside (Bhattacharya et al., 2004, Molina-Bolivar et al., 2002)).

Tensid	Zusammensetzung	CMC (mM)	Durchschnittl. $M_w$ eines Monomers
Triton X-100	$C_8H_{17} (OCH_2CH_2)_{10}OH$	0,27	647
Tween 20	$C_{12}H_{25} (OCH_2CH_2)_{20}OH$	0,050	1228
Tween 40	$C_{16}H_{33} (OCH_2CH_2)_{20}OH$	0,025	1284
Tween 60	$C_{18}H_{37} (OCH_2CH_2)_{20}OH$	0,023	1312
Tween 80	$C_{18}H_{35} (OCH_2CH_2)_{20}OH$	0,010	1310

Mit zunehmender Länge des hydrophoben Teils der Tween Tenside zeigte sich für AtCCD1 und GST-AtCCD1 eine zunehmende Lag-Phase bis zum Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit. Die Dauer der Lag-Phase ( $= t_{\max v}$ ) wurde als die Zeit definiert, die für das Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $\max v$ ) notwendig ist. AtCCD1-His<sub>6</sub> zeigte ein ähnliches Verhalten, allerdings war hierbei die Lag-Phase bei Tween 40 länger als bei Tween 60 (Abb. 28 A). Da eine Lag-Phase für eine enzymatische Reaktion ungewöhnlich ist, wurden besondere Vorkehrungen getroffen, um sicherzustellen, dass dieses Verhalten nicht durch ein sich langsam einstellendes physikochemisches Gleichgewicht des mizellaren Systems verursacht wurde. Denkbar wäre beispielsweise eine veränderte CMC durch das Mischen der Assaykomponenten und damit einhergehende Umlagerung

von Substrat und Tensiden. Da für die Tween Mizellen sowohl die Tensidkonzentration als auch die Cosolvenskonzentration einen Einfluss auf die Aggregationszahl haben, sind bei einer Verdünnung der TensidstammLösung und einer Zugabe von Ethanol solche Umlagerungseffekte zu erwarten (Bhattacharya et al., 2004). Allerdings wurde auch gezeigt, dass solche Relaxationseffekte im Extremfall auf einer Zeitskala von wenigen Minuten ablaufen und somit nicht als alleinige Ursache für die beobachteten Lag-Phasen in Frage kommen (Patist et al., 2002a). Trotzdem wurden die Reaktionslösungen vorgemischt und 30 Minuten in der Mikrotiterplatte bei Assaytemperatur inkubiert. Erst dann wurde das Enzym zugegeben, um den möglichen Einfluss solcher Effekte auszuschließen. Wie erwartet, zeigte sich keine Veränderung des zuvor beobachteten Verhaltens.

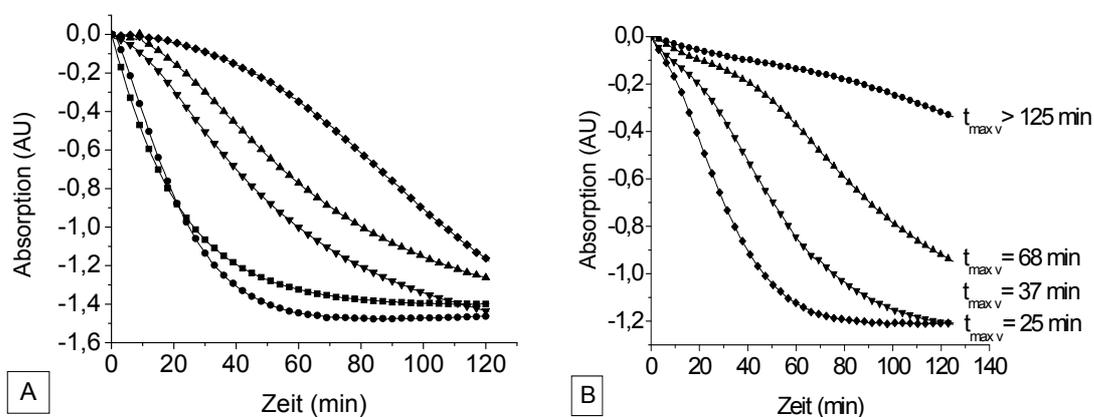


Abb. 28 A: AtCCD1-His<sub>6</sub> katalysierte Spaltung von in unterschiedlichen Tensiden solubilisiertem  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal. Alle Assays enthielten 120  $\mu$ M  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal, 10 % Ethanol (v/v) und 10 g/l des jeweiligen Tweens bzw. 5 g/l Triton X-100 in PBS. Derselbe Zellextrakt mit AtCCD1-His<sub>6</sub> wurde für alle Assays verwendet. Triton X-100 (■), Tween 20 (●), Tween 40 (▲), Tween 60 (▼), Tween 80 (◆).  
 B: Einfluss der Enzymkonzentration auf die Kinetik der Substratspaltung und der damit verbundenen Dauer der Lag-Phase (=  $t_{\max v}$ ). Die Assays enthielten 120  $\mu$ M  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal und 10 g/l Tween 20. Affinitätsaufgereinigtes GST-AtCCD1 wurde in verschiedenen Konzentration im Assay eingesetzt (mg/ml): 0,47 (●), 0,94 (▲), 1,87 (▼), 3,74 (◆).

Bei der Zellyse mittels Ultraschall entstehen Membranfragmente, die durch die Zentrifugation nicht vollständig abgetrennt werden. Als weitere Ursache für die Lag-Phasen wurde deshalb eine Solubilisierung des Enzyms von solchen Fragmenten während des Assays oder eine Solubilisierung von anderen im Zellextrakt vorhandenen Komponenten und eine dadurch verursachte Aktivierung untersucht. Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluss der Enzymkonzentration mit affinitätsaufgereinigtem GST-AtCCD1 ermittelt. Dabei wurden verkürzte Lag-Phasen mit zunehmender Enzymkonzentration aufgezeichnet (Abb. 28 B). Die Analyse der maximalen Geschwindigkeiten ergab einen linearen Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration im Assay und maximaler Reaktionsgeschwindigkeit.

Anschließend wurde der Einfluss der Substratkonzentration bei konstantem Substrat/Tensid-Verhältnis untersucht, um die Ursache für die Lag-Phasen besser zu verstehen. Die Dauer der Lag-Phase verkürzte sich hierbei mit abnehmender Substratkonzentration (Abb. 29 A und B). Durch die Berechnung der Substratkonzentration bei der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit konnte gezeigt werden, dass letztere stets erreicht wurde nachdem  $18 (\pm 3) \%$  des Substrats umgesetzt worden waren.

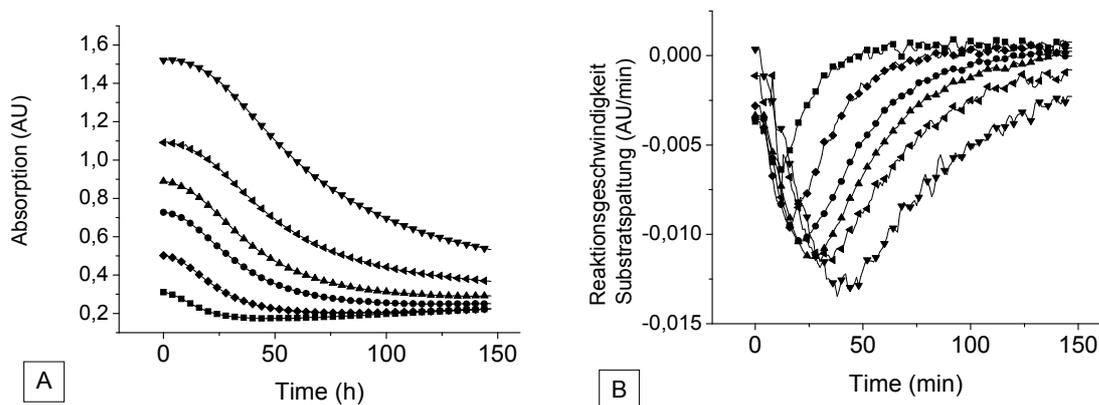


Abb. 29 A: Einfluss der Anfangskonzentration von  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal auf die Dauer der Lag-Phase im Tween 20 System. Ein Zellextrakt mit AtCCD1-His<sub>6</sub> wurde verwendet. Die Substratkonzentration wurde bei einem konstanten molaren Verhältnis von 0,015 zum Substrat variiert. Substratekonzentrationen: 12  $\mu$ M (■), 36  $\mu$ M (◆), 48  $\mu$ M (●), 60  $\mu$ M (▲), 84  $\mu$ M (◄) 120  $\mu$ M (▼).  
B: Numerische Differenzierung der Kurven aus A.

Die im Triton X-100 System stattfindende Aktivierung durch Cosolventien wurde auch im Tween System untersucht. Außerdem wurde das Substrat/Tensid-Verhältnis bei konstanter Substratkonzentration variiert. Bei abnehmendem Substrat/Tensid-Verhältnis wurde dabei eine verringerte maximale Reaktionsgeschwindigkeit bzw. eine verlangsamt Gesamtreaktion bei qualitativ ähnlichem, sigmoiden Verlauf gemessen (Abb. 30 A und Abb. 26 B). Da der Anteil an gespaltenem Substrat, bei dem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wurde, jedoch gleich blieb, kam es dadurch auch zu einer Verlängerung der Lag-Phase. Die Ethanolzugabe führte zu einer lediglich maximal 2-fachen Aktivierung des Enzyms im Tween 20 System, während im Triton X-100 System bei vergleichbarer Substratkonzentration eine 18-fache Aktivierung gemessen worden war (Abb. 30 B). Ab einer Ethanolkonzentration von 15 % (v/v) war keine weitere Zunahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, aber ein unvollständiger Umsatz des Substrates zu beobachten, was auf eine Inaktivierung des Enzyms während des Assays schließen lässt. Obwohl die proteolytische Abspaltung der GST von GST-AtCCD1 im Triton X-100 System keine Aktivierung der Oxygenase ergab, wurde der Einfluss des His<sub>6</sub>- und des GST-tags in den Tween Systemen ebenfalls untersucht. Die maximalen Geschwindigkeiten dieser Modifikationen wurden mit AtCCD1 verglichen, wobei

Zellextrakte verwendet wurden. Nur Reaktionen mit sigmoiden Verläufen, bei denen die maximale Reaktionsgeschwindigkeit eindeutig erreicht worden war, wurden verglichen. Dabei konnten unterschiedliche maximale Reaktionsgeschwindigkeiten nicht nur zwischen den Tensiden, sondern auch zwischen den AtCCD1-Modifikationen beobachtet werden (Abb. 31 A). Weiterhin wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von dem jeweils eingesetzten Tensid und der Enzymmodifikation bei unterschiedlichen Anteilen an umgesetztem Substrat erreicht (Abb. 31 B).

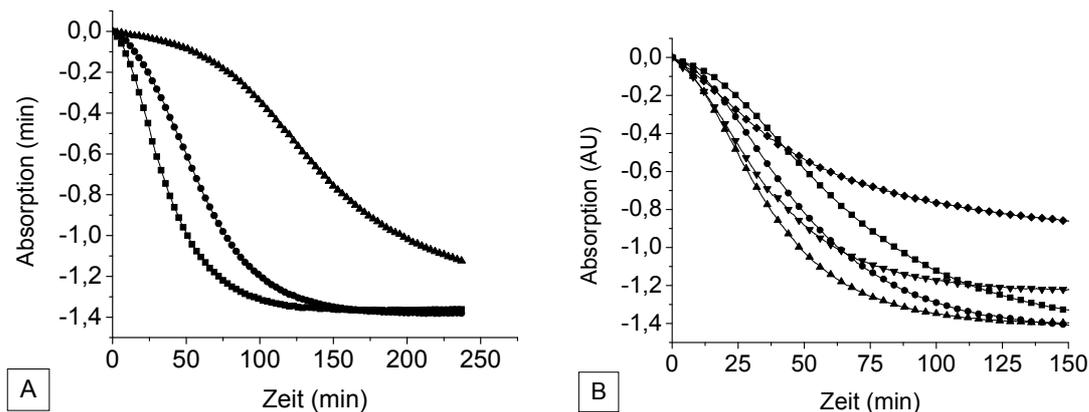


Abb. 30: Einfluss des Substrat/Tensid Verhältnisses und der Ethanolkonzentration auf die Dauer der Lag-Phase und die maximale Geschwindigkeit. Die Messungen wurden mit einem Zellextrakt mit AtCCD1-His<sub>6</sub> und 120  $\mu$ M  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal durchgeführt. A: Tween 20 Konzentration in g/L: 10 (■), 20 (●), 40 (▲). B: Ethanol Konzentration in % (v/v) 0 (■), 5 (●), 10 (▼), 15 (▲), 20 (◆).

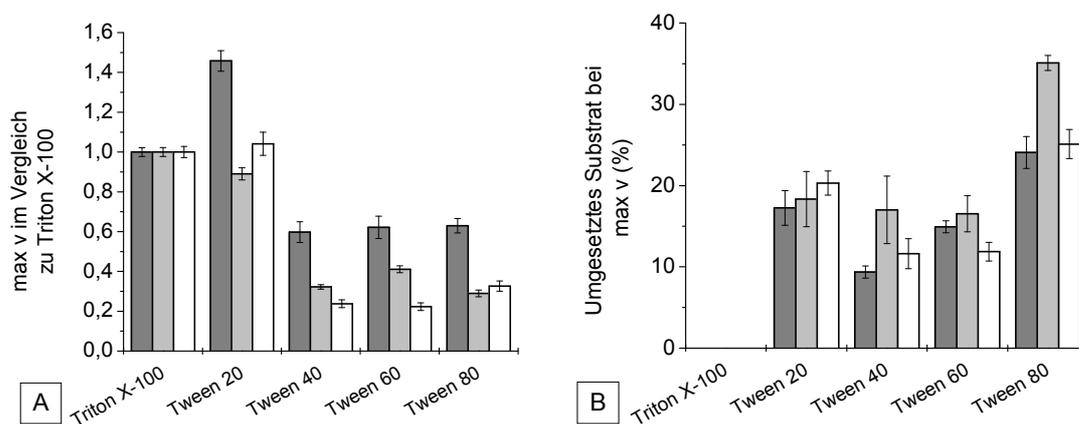


Abb. 31 A: Relative maximale Reaktionsgeschwindigkeit und B: Anteil an gespaltenem Substrat bei Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der drei AtCCD1-Modifikationen in Tween basierten Mizellen Systemen im Vergleich zu Triton X-100. AtCCD1 (dunkelgrau); AtCCD1-His<sub>6</sub> (hellgrau); GST-AtCCD1 (weiß).

### 5.3.4 Produktinhibierung im mizellaren System

Untersuchungen zur Inhibierung von AtCCD1 durch das Spaltungsprodukt  $\beta$ -Ionon wurden im Triton X-100 System durchgeführt. Das ebenfalls schlecht wasserlösliche Produkt wurde mit Ethanol zu mizellar solubilisiertem  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal gegeben, sorgfältig gemischt und für 15 Minuten bei 30° C inkubiert, bevor ein Zellextrakt mit NusA-AtCCD1 zugegeben wurde. Die Anfangsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen bei einem konstanten Substrat/Tensid-Verhältnis wurden gemessen, um eine mögliche Hemmung festzustellen. Während bei  $\beta$ -Iononkonzentrationen von größer als 100  $\mu\text{M}$  eine deutlich verringerte Reaktionsgeschwindigkeit zu beobachten war, schienen Konzentrationen bis zu 50  $\mu\text{M}$  einen aktivierenden Effekt zu haben. Andererseits war keine deutlich stärkere Inhibierung durch eine Konzentrationserhöhung auf 200  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Ionon festzustellen. Dieses vom Modell der kompetitiven Produktinhibierung abweichende kinetische Verhalten erschwert die Berechnung einer sinnvollen Inhibierungskonstante. Aus diesem Grund sind in Abb. 32 nur die Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration bei verschiedenen  $\beta$ -Iononkonzentrationen dargestellt.

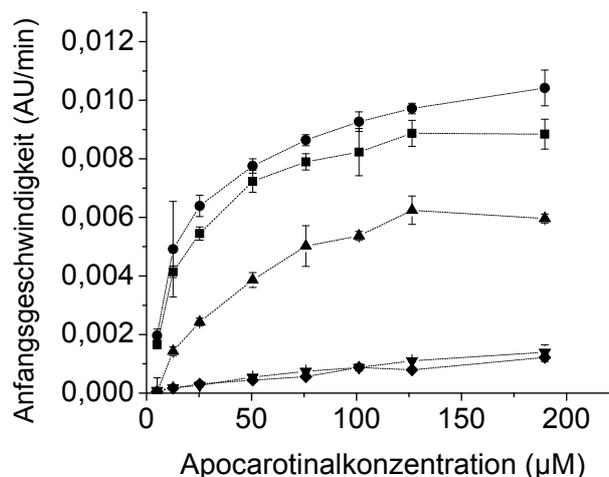


Abb. 32: Produktinhibierung durch  $\beta$ -Ionon im Triton X-100 basierten mizellaren System. Produktkonzentration zu Beginn der Reaktion ( $\mu\text{M}$ ): 0 (■), 25 (●), 50 (▲), 100 (▼), 200 (◆).

### 5.3.5 Vergleich der Spezifität von AtCCD1 mit der cooxidativen Spaltung durch eine Lipoxygenase

Bis zur Entdeckung der spezifisch spaltenden Dioxygenasen im Jahr 1997 standen nur enzymatisch/cooxidative Systeme zur Gewinnung natürlicher Spaltprodukte aus Carotinoiden zur Verfügung (Ben Aziz et al., 1971). Grundsätzlich wird bei der cooxidativen Spaltung zunächst enzymatisch aus einem Cosubstrat eine reaktive

Sauerstoffverbindung erzeugt, die über einen unspezifischen radikalischen Angriff das Carotinoidsubstrat oxidativ spaltet. Die am besten charakterisierte Reaktion ist die cooxidative Spaltung von  $\beta$ -Carotin durch die Erzeugung von Linolsäureperoxiden aus Linolsäure mittels einer Lipoxygenase aus Soja (Aziz et al., 1999, Wache et al., 2006, Waldmann et al., 1995, Wu et al., 1999). Diese Reaktion wurde auf die cooxidative Spaltung von  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal übertragen, um einen Vergleich bezüglich der Produktausbeute bzw. der Spezifität mit AtCCD1 aufzustellen. Äquimolare Konzentrationen von  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal wurden mit beiden Systemen umgesetzt. Die photometrische Messung ergab einen vollständigen Substratumsatz bei beiden Reaktionsansätzen. Die Extraktion der Reaktionsansätze mit Chloroform und anschließende GC/MS-Analytik zeigte jedoch eine deutlich niedrigere Produktausbeute und ein breites Produktspektrum bei der Lipoxygenase-katalysierten Cooxidation, während die Spaltung mit AtCCD1  $\beta$ -Ionon als dominierenden Hauptpeak ergab. Die bei der cooxidativen Reaktion zusätzlich entstandenen Produkte konnten nicht eindeutig identifiziert werden, der Vergleich mit der Substanzbibliothek deutete jedoch auf Fragmente der Linolsäure und des Polyengerüsts des Substrates hin. Die bei der Cooxidation von  $\beta$ -Carotin typischerweise entstehenden Epoxyionone und Dihydroactinidiolid wurden nur in sehr geringen Konzentrationen gefunden.

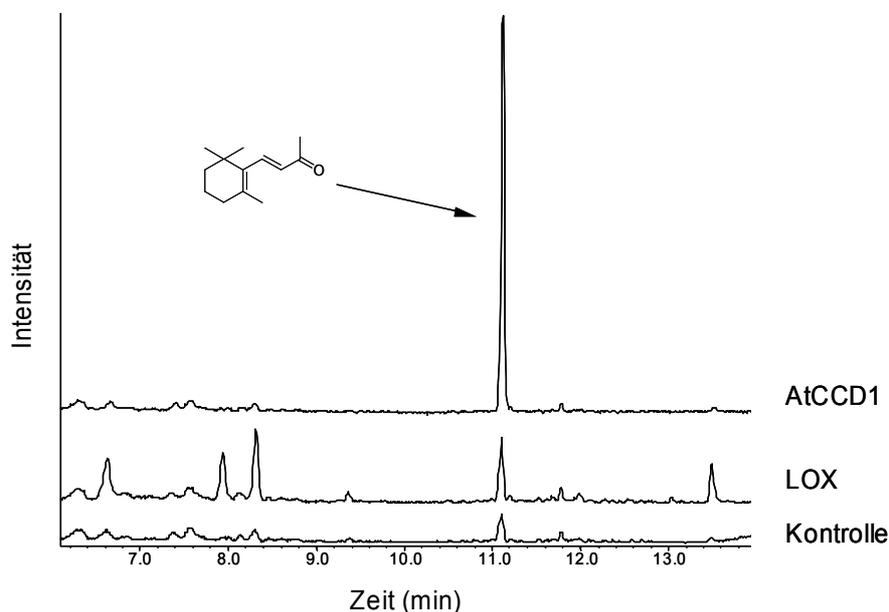
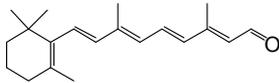
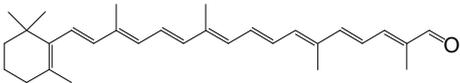
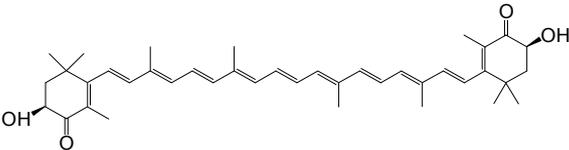
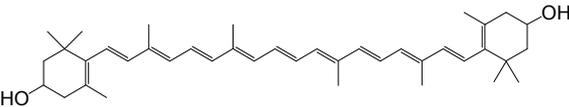
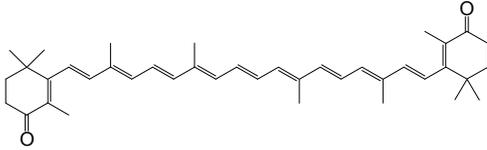
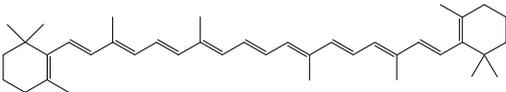


Abb. 33: Vergleich der Regiospezifität der  $\beta$ -Apo-8'-Carotinalspaltung durch AtCCD1 und der cooxidativen Spaltung mittels Soja Lipoxygenase (LOX).

### 5.3.6 Substratspektrum im mizellaren Reaktionssystem

Der Umsatz verschiedener Carotinoide wurde zumindest qualitativ von verschiedenen Autoren für eine Anzahl CCDs durch den Einsatz eines *in vivo* Komplementierungsassays oder die *in vitro* Umsetzung in mizellaren Systemen beschrieben (Auldridge et al., 2006c). Allerdings blieb es in vielen Fällen bei einer qualitativen Beschreibung, so dass kein vollständiges Bild bezüglich struktureller Präferenz und Einschränkungen gegeben ist. Die detailliertesten *in vitro* Studien zur regioselektiven, enzymatischen Spaltung von Carotinoiden wurden mit Vp14 aus Mais, sowie einer Reihe von apocarotinalspezifischen Oxygenasen aus *Synechocystis* und *Nostoc* sp. durchgeführt (Marasco et al., 2006, Ruch et al., 2005, Scherzinger et al., 2006, Schwartz et al., 2003). Diese Oxygenasen besitzen im Vergleich zu AtCCD1 eine höhere Substratspezifität, insbesondere ist  $\beta$ -Carotin weder *in vivo* noch *in vitro* spaltbar. Da die von unterschiedlichen Autoren eingesetzten Assays sich in vielerlei Hinsicht unterscheiden (z.B. Temperatur, Tensid, Tensidbeladung etc.), ist die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Veröffentlichungen häufig nicht gegeben. Von Schwartz et al. wurden für AtCCD1  $\beta$ -Carotin, Lutein, Zeaxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin qualitativ als Substrate beschrieben (Schwartz et al., 2001). Um den Einfluss der Kettenlänge und Sauerstoffmodifikationen bzw. Struktur der Iononringe und damit verbunden auch der Hydrophobizität des Substratmoleküles näher zu untersuchen, wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Substrate in einem molaren Substrat/Triton-Verhältnis von 0,001 eingesetzt. Der Umsatz von Retinal wurde spektrophotometrisch in einem Bereich von 300-500 nm vermessen, da es durch das verkürzte Chromophor bei 510 nm nicht absorbiert. Bei den Ansätzen mit Retinal konnte ein Umsatz weder photometrisch noch mittels GC/MS nachgewiesen werden.  $V_{\max}$  nahm bei den C-40 Carotinoiden mit abnehmendem Oxyfunktionalisierungsgrad ab. Ein Umsatz von  $\beta$ -Carotin konnte photometrisch nicht nachgewiesen werden. GC/MS Analyse der Extrakte von  $\beta$ -Carotinumsatz und -kontrolle ergab eine sich nicht signifikant von der chemischen Oxidation unterscheidende  $\beta$ -Iononbildung. Der Umsatz des als Modellsubstrat eingesetzten, kürzerkettigen  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal erfolgte schneller als der der anderen Substrate, mit Ausnahme des Astaxanthins.

Tabelle 5:  $K_m$  und  $V_{max}$  der untersuchten Substrate. Ein molares Substrat/Tensid-Verhältnis von 0,001 wurde für alle Substrate eingesetzt.

	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )
 Retinal	-	-
 $\beta$ -Apo-8'-Carotinal	$14,8 \pm 2$	$1,74 \pm 0,11$
 Astaxanthin	$33,8 \pm 3,2$	$4,82 \pm 0,21$
 Zeaxanthin	$9,8 \pm 0,7$	$0,95 \pm 0,02$
 Canthaxanthin	$8,9 \pm 1,3$	$0,77 \pm 0,04$
 $\beta$ -Carotin	-	-

Zusätzlich zu den in Tabelle 5 eingesetzten kristallinen Substraten wurde ein alkoholischer Extrakt aus Paprika (Oleo-resin) untersucht. Dieser wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Christian Christiansen von der Firma Wild Flavours, Berlin, zur Verfügung gestellt. Da es sich hierbei um eine nicht genau definierte Mischung an Carotinoiden handelt, wurde auf eine kinetische Charakterisierung verzichtet und nur die generelle Umsetzbarkeit der Paprikacarotinoide untersucht. Der Umsatz wurde entsprechend den Versuchen mit Substratvermittlung über Cosolvenzugabe in ein mizellares System durchgeführt (d.h. das Paprikaoleoresin wurde mit 10% zu einem Ganzzellextrakt mit 1% Triton X-100 gegeben). Die Hauptcarotinoide von Paprika sind Capsanthin und Capsorubin, die ein bzw. zwei  $\kappa$ -Ringe besitzen (Mínguez-Mosquera et al., 1993). Diese Carotinoide wurden in der Literatur noch nicht als mögliche Substrate beschrieben. Im untersuchten Oleoresin konnte photometrisch eine Absorptionsabnahme im Vergleich zur Kontrolle

gemessen werden. GC/MS Analytik ergab eine AtCCD1 katalysierte Bildung von Hydroxy- $\beta$ -Ionon und eines weiteren Peaks (Abb. 34). Das größte Fragment des zugehörigen Massenspektrums hatte eine Masse von 224 g/mol und könnte somit das Molekülion eines abgespaltenen  $\kappa$ -Ringes darstellen.

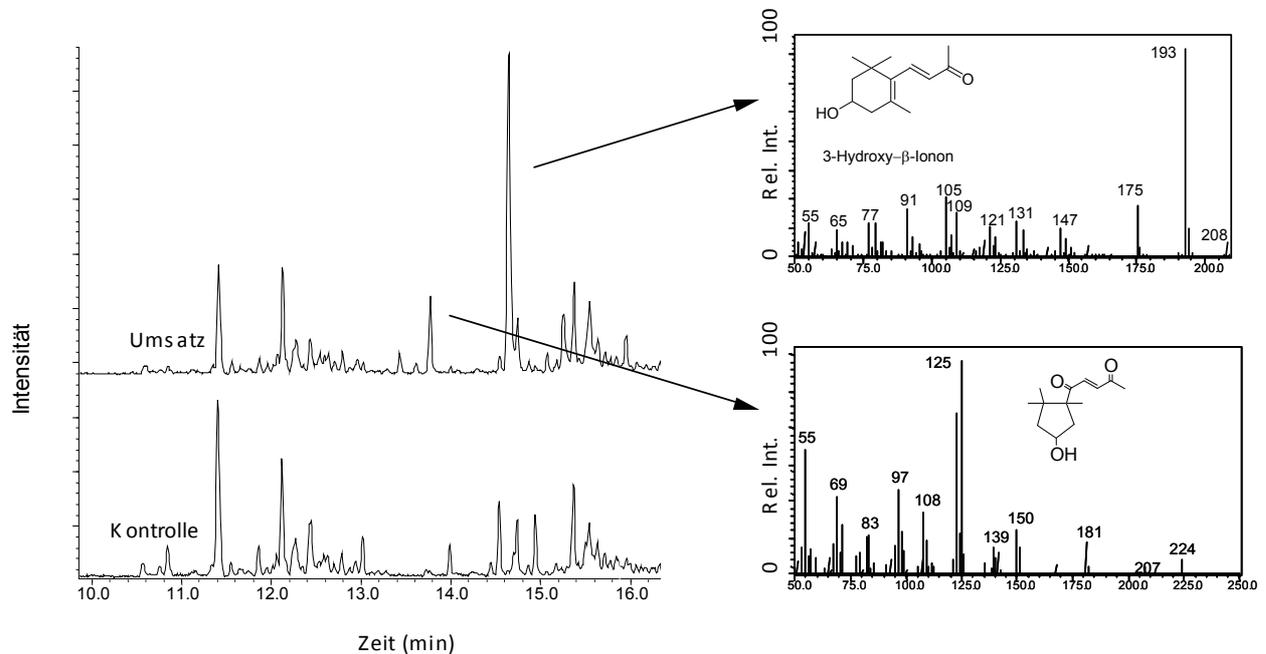


Abb. 34: GC/MS Analyse der Produkte, die durch AtCCD1 katalysierte Spaltung aus einem Paprikaextrakt freigesetzt wurden, sowie eines Kontrollansatzes ohne Enzym. Das Hauptprodukt konnte anhand seiner Retentionszeit und des zugehörigen Massenspektrums als 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon identifiziert werden. Bei dem zweiten Peak handelt es sich vermutlich um das Spaltprodukt mit einem  $\kappa$ -Ring (Masse Molekülion = 224) .

### 5.3.7 Zusammenfassung und Diskussion

Die Anzahl an Publikationen zum Thema oxidative, enzymatische Spaltung von Carotinoiden ist seit der Entdeckung der für die Abszissinsäurebiosynthese wichtigen Dioxygenase Vp14 aus Mais stetig gestiegen (Auldrige et al., 2006b, Bouvier et al., 2005). Jedoch befasst sich ein Großteil der Veröffentlichungen mit der Beschreibung homologer Gene aus unterschiedlichen Pflanzen oder Cyanobakterien und deren Charakterisierung in *in vivo* Systemen. Für seltener beschriebene *in vitro* Charakterisierungen wurden wässrig mizellare Systeme, meist auf Basis von Triton X-100 eingesetzt, jedoch in vielen Fällen nur ein qualitativer Nachweis der Aktivität erbracht. In relativ wenigen Fällen erfolgte eine kinetische Charakterisierung zur Berechnung von  $K_m$  und  $V_{max}$  im jeweiligen System. Vermutlich liegt der Grund hierfür in der schwierigen Handhabung der extrem hydrophoben Substrate (Cunningham et

al., 2007) und dem im Vergleich zu molekularen Lösungen komplexeren physikochemischen Verhalten von mizellaren Systemen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das kinetische Verhalten verschiedener AtCCD1-Modifikationen in wässrig mizellaren Systemen detailliert untersucht. Eine wichtige Voraussetzung hierfür war die Entwicklung eines schnellen, mikrotiterplattenbasierten Assays. Die Herstellung von gemischten Mizellen aus Carotinoid und Tensid erfolgte über verschiedene Methoden, die sich in der Mischreihenfolge der Komponenten unterscheiden, aber zu demselben kolloidalen System führen. Als einfachste Methode wurde das Mischen von Tensid mit einer Substratlösung in organischem Lösungsmittel (z.B. THF), gefolgt von der Zugabe von Puffer, ermittelt. Die Zugabe von in organischem Lösungsmittel gelöstem Substrat zu Puffer mit Tensidmizellen erwies sich als weniger geeignet, da es hierbei in Abhängigkeit von der Lösungsmittelmenge und Substratkonzentration im Lösungsmittel nicht zu einer ausreichenden mizellaren Solubilisierung, sondern zur Präzipitation des Substrats kam.

Zur Verbesserung der zunächst geringen Enzymaktivitäten wurde die Zugabe eines organischen Cosolvens untersucht. Hierbei konnte eine starke Aktivierung des Enzyms in Abhängigkeit von der Cosolvenskonzentration und des Log P des Cosolvens beobachtet werden. Eine Aktivierung durch die Zugabe von wassermischbaren, organischen Lösungsmitteln wurde auch für VvCCD1 und AtCCD7/AtCCD8 beschrieben (Mathieu et al., 2007b, Schwartz et al., 2004). Matthieu et al. (2007) zeigten für VvCCD1 ebenfalls unterschiedliche starke Aktivierungen und optimale Konzentrationen bei unterschiedlichen Lösungsmitteln, stellten jedoch nicht den Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität (Log P) des Lösungsmittels und optimaler Konzentration her. Cosolventien werden im Allgemeinen eingesetzt, um die Löslichkeit hydrophober Substanzen in einem wässrigen Medium zu erhöhen. Durch die Zugabe wird die Polarität des Lösungsmittels verringert und die Sättigungskonzentration der hydrophoben Substanz erhöht.

Im Fall der Carotinoide ist dieser Effekt vermutlich nicht verantwortlich für die beobachtete Aktivierung des Enzyms. Sogar die Hydrophobizität der polareren Xanthophylle oder der kurzkettigeren Apocarotinalen ist noch so hoch, dass es selbst im Fall von relativ hydrophoben Cosolventien wie Aceton ab Konzentrationen von kleiner 30 % v/v zur Präzipitation des Substrates kommt (Billsten et al., 2005). Es ist also nicht davon auszugehen, dass beim Einsatz der untersuchten Lösungsmittel die Substrate in molekularer Lösung vorlagen.

Als weiterer Grund für die Aktivierung kommt die Beeinflussung der Enzymkonformation durch das Cosolvens in Frage (Fadnavis et al., 2005, Salares et al., 1977, Wehbi et al., 2003). Da aber gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung auch von der Konzentration an carotinoidbeladenen Mizellen, vom verwendeten Tensid und von der eingesetzten Enzymmodifikation abhängig ist, spielt dieser

Faktor vermutlich eine untergeordnete Rolle. Vielmehr ist anzunehmen, dass eine Veränderung des mizellaren Systems durch die Cosolvenzugabe erfolgt, die zu höheren Enzymaktivitäten führt. Beispielsweise wurde gezeigt, dass es zu einer Verringerung der Viskosität, einer Erhöhung des Diffusionskoeffizienten und zu einer verringerten Aggregationszahl der Tenside durch Lösungsmittelzugabe in solchen Systemen kommt (Carnero Ruiz et al., 2001).

Eine wichtige Rolle spielt vermutlich auch die Erhöhung der CMC durch die Zugabe von Cosolventien (Aramaki et al., 1999, Carnero Ruiz et al., 2001). Die verringerte Polarität des Mediums durch den Lösungsmittelzusatz führt hierbei zu einer höheren Löslichkeit der Tensidmonomere und es kommt erst bei höheren Tensidkonzentrationen zur Ausbildung von Mizellen (Zana 1995). Die Gegenwart von organischem Lösungsmittel führt deshalb zu einer geringeren Mizellenkonzentration bei gegebener Tensidkonzentration. Die ausschließlich in Mizellen solubilisierten Carotinoide sind folglich durch die Cosolvenzugabe in einer geringeren Anzahl an Mizellen gelöst, was einem höheren Substrat/Tensid-Verhältnis pro Mizelle entspricht.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die ebenfalls an der Membran aktiven Phospholipasen gemacht. So wird der Einfluss des Substrat/Tensid-Verhältnisses durch das „Surface Dilution Model“ beschrieben (Carman et al., 1995b, Deems et al., 1975). Das kinetische Verhalten des Enzyms ist dabei nicht (ausschließlich) von der volumetrischen Substratkonzentration abhängig, sondern von der „Oberflächenkonzentration“ an der Grenzfläche zur Tensidmizelle, in der das Substrat solubilisiert ist. Die Oberflächenkonzentration wird durch das molare Verhältnis von Substrat zu Triton X-100 ausgedrückt. Auch die Aktivierung durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln ist für Phospholipasen beschrieben und könnte ähnliche Gründe wie im vorliegenden Fall haben (Wehbi et al., 2003).

Während die Erhöhung der CMC durch die Zugabe von Lösungsmitteln und die damit verbundene höhere Oberflächenkonzentration des Substrates in der Mizelle als Ursache für die Aktivierung vor diesem Hintergrund sehr einleuchtend erscheint, können dadurch nicht alle Beobachtungen schlüssig erklärt werden.

So ist zum Beispiel die zunehmende Aktivierung bei zunehmender Substratkonzentration und konstantem Substrat/Tensid-Verhältnis nicht durch diesen Effekt zu erklären. Vielmehr sollte sich eine Erhöhung der CMC um einen konstanten Wert durch Lösungsmittelzugabe bei zunehmender Tensidkonzentration immer weniger bemerkbar machen. Hier kommen vermutlich andere Einflüsse, wie die Verringerung von Viskosität und Diffusionswiderständen, zum Tragen.

Die Bestimmung der optimalen Lösungsmittelkonzentration sollte je nach Mechanismus der Aktivierung ähnlich problematisch wie die Bestimmung eines Temperaturoptimums sein, da hier zwei gegenläufige Effekte und die Dauer der Messung die Lage des Optimums bestimmen (Eisenthal et al., 2006). So wirkt sich zunächst die günstige Strukturierung des mizellaren Systems positiv auf die enzymatische Umsetzung aus. Ab einer bestimmten Konzentration kommt es aber

zur Denaturierung des Enzyms, ein Prozess der gemäß einer Reaktion 1. Ordnung abläuft. Dadurch geht die Inaktivierung in Abhängigkeit von der Messdauer mit in das Ergebnis ein.

Dies wird deutlich, wenn man die im Tween 20 System gemessene Aktivierung durch Ethanolzugabe und die daraus resultierenden Substratspaltungskurven betrachtet (Abb. 30 B). Während die Anfangsgeschwindigkeit bei 15 und 20 % (v/v) praktisch gleich ist, weist der unvollständige Substratumsatz bei 20 % (v/v) auf eine vollständige Inaktivierung des Enzyms im Verlauf des Assayzeitraums hin.

Dieser Zusammenhang zwischen Aktivierung und Inaktivierung ist vermutlich auch die Erklärung für die unterschiedlich starke Aktivierung und die erhöhten Ethanoloptima der mit Trägerproteinen fusionierten AtCCD1-Modifikationen. Der Effekt könnte also auf eine höhere Lösungsmittelstabilität der Fusionen zurückzuführen sein. Die Analyse der Reaktionsverläufe über die gesamte Assaydauer zeigte ebenfalls die höhere Lösungsmittelstabilität, insbesondere von NusA-AtCCD1.

Die Inaktivierung von Enzymen durch wassermischbare Lösungsmittel wird normalerweise dadurch erklärt, dass es durch die veränderte Polarität des Lösungsmittels zu einer teilweisen Entfaltung oder zumindest Konformationsänderung des Proteins kommt (Mozhaev et al., 1989). Durch verringerte Polarität des Mediums und die Verdrängung der stabilisierenden Wassermoleküle werden hydrophobe Reste, die normalerweise im Inneren eines Proteins liegen, an die Oberfläche gebracht und es kommt zur Aggregation und der damit verbundenen Inaktivierung (Schellman 2003, Schiffer et al., 1996). Die höhere Lösungsmittelstabilität des Fusionsproteins könnte durch eine Einschränkung der möglichen Konformationsänderungen durch die kovalente Bindung an ein Trägerprotein (sterische Stabilisierung) verursacht sein. Da NusA als Trägerprotein auch die Aggregation des ohnehin amphipathischen AtCCD1 verhindern soll, ist eine Stabilisierung gegenüber Cosolventien durch eine unterdrückte Aggregation denkbar. In Analogie hierzu ist auch eine Erhöhung der Thermostabilität von Enzymen durch die Fusion mit thermostabilen Proteinen aus Archaeen beschrieben worden (Huang et al., 2006). Einen ähnlichen Effekt scheint die Gegenwart von Komponenten des Zellextraktes zu haben. So konnte gezeigt werden, dass die Ethanoloptima von AtCCD1-His<sub>6</sub> und GST-AtCCD1 in Gegenwart des Zellextraktes höher als bei aufgereinigtem Enzym waren.

Neben der Verbesserung des Reaktionssystems durch den Zusatz von Cosolventien wurde auch der Einfluss des für die Mizellare Substratsolubilisierung eingesetzten Tensids untersucht. Hierfür wurde die homologe Reihe der nichtionischen Tweens (ethoxylierte Sorbitanester) mit dem Triton X-100 System verglichen.

In den Tween-basierten Mizellaren Systemen wurden in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Alkylrestes des Tensids, der Enzymkonzentration, der Ethanolkonzentration und dem Substrat/Tensid-Verhältnis Lag-Phasen der

enzymkatalysierten Spaltungsreaktion von  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal festgestellt. Der Begriff Lag-Phase wurde in diesem Zusammenhang für die Zeit zum Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit verwendet. Die Analyse der Reaktionsverläufe ergab, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit stets bei dem gleichen Anteil an umgesetztem Substrat bei einer gegebenen Enzym/Tensid-Kombination unabhängig von der Anfangskonzentration an Substrat erreicht wurde (Abb. 29). Durch eine höhere Enzym- bzw. Cosolvenskonzentration, bzw. ein höheres Substrat/Tensidverhältnis wurde dieser Anteil lediglich früher erreicht.

Beim Vergleich der verschiedenen AtCCD1-Modifikationen in den mizellaren Systemen ergaben sich unterschiedliche maximale Reaktionsgeschwindigkeiten bezogen auf Triton X-100. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von AtCCD1 war z.B. im Tween 20 System ca 45 % höher als im Triton X-100 System während sie bei AtCCD1-His<sub>6</sub> leicht reduziert war (Abb. 31 A). Eine sterische Hinderung der Wechselwirkung zwischen AtCCD1 und Mizelle durch den jeweiligen Tag wäre eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung. Somit könnten Modifikationen von AtCCD1 zu einer eingeschränkten Substratzugänglichkeit in Abhängigkeit des jeweils eingesetzten Systems führen.

Lag-Phasen von bis zu 60 Minuten in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration wurden auch für die oxidative Spaltung von Carotinoiden mit CCDs aus *Nostoc* sp. PCC 7120 in einem Tween 40 basierten Reaktionssystem beschrieben (Marasco et al., 2006). Hierbei erfolgte allerdings keine nähere Analyse dieses Effektes. Andere Autoren beobachteten Lag-Phasen von bis zu 86 Minuten bei der Hydrolyse von Phospholipiden durch Phospholipasen in Abhängigkeit der Grenzflächenstruktur des eingesetzten invers mizellaren Systems (Yamazaki et al., 2004). Weiterhin wurde auch für die Lipoxygenase-1 katalysierte Oxidation von Linolsäure eine substratkonzentrationsabhängige Lag-Phase beschrieben (Wang et al., 1993). Um dieses kinetische Verhalten zu beschreiben, wurden sowohl Modelle mit Substratinhibierung als auch mit Produktaktivierung entwickelt. Da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von AtCCD1 stets bei einem bestimmten Prozentsatz an gespaltenem Substrat in Abhängigkeit des jeweils verwendeten Tween Tensids erreicht wurde, kommen beide Mechanismen in Frage. Im Gegensatz zu den in der Literatur genannten Ursachen für die Lag-Phase bei der Lipoxygenase spielt hierbei vermutlich die Interaktion zwischen Enzym und Mizelle eine wichtige Rolle. Diese Schlussfolgerung liegt nahe, da der Prozentsatz sich zwischen den einzelnen Tween Tensiden und möglicherweise auch den verschiedenen Modifikationen unterscheidet und zudem keine Lag-Phase bei Triton X-100 beobachtet wurde. Grundsätzlich ist eine Lag-Phase bei Triton X-100 aber nicht auszuschließen. Möglicherweise kommt es zu deutlich kürzeren Lag-Phasen, die im verwendeten Assay nicht detektiert werden konnten.

Das komplexe Verhalten der Mizellen Systeme erschwerte auch die Untersuchungen zur Produktinhibierung durch  $\beta$ -Ionon. Zunächst wurde eine leichte Aktivierung, ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Ionon aber eine Inhibierung im Triton X-100 System festgestellt. Kompliziert werden die Untersuchungen des Enzyms im Mizellen Assay durch die Tatsache, dass das Produkt ebenfalls hydrophob ist und vermutlich in Abhängigkeit der Tensidkonzentration und der Cosolvenskonzentration teilweise in die Mizellare Pseudophase extrahiert wird (Fichan et al., 1999). Ein solches Verhalten konnte zumindest für aliphatische Alkohole mit zunehmender Hydrophobizität gezeigt werden (Schirmer et al., 2002). Im Gegensatz zu den Carotinoiden wäre dadurch ein von der Tensidkonzentration abhängiges Verhältnis von Produktmolekülen zu Tensidmolekülen in einer Mizelle vorhanden und die Oberflächenkonzentration des Produktes bei konstanter Oberflächenkonzentration des Substrates variabel. Weiterhin kommt hinzu, dass das Produkt in geringen Konzentrationen eine günstige Strukturierung des Mizellen Systems, ähnlich dem der Aktivierung durch Cosolventien, zu bewirken scheint. Um dieses Verhalten schlüssig zu erklären, müssen weitere Versuche durchgeführt werden.

Eine unterschiedlich gute Zugänglichkeit der Substrate könnte auch ein Grund für die gemessene Substratspezifität bzw. die Substrataffinität sein. Die kinetischen Untersuchungen zeigten, dass AtCCD1 sowohl verschiedene Variationen der Ringstruktur als auch der Kettenlänge toleriert. Diese Beobachtung stimmt mit dem ursprünglich von Schwartz et al. (2001) qualitativ untersuchten breiten Substratspektrum überein. Der  $K_m$  Wert für  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal war im Vergleich zu anderen Messungen verringert. Ursache hierfür ist vermutlich das kleinere molare Substrat zu Triton X-100 Verhältnis, da außer diesem Parameter nichts verändert wurde.

Voraussetzung für eine Umsetzung scheint eine gewisse Mindestlänge des Grundgerüsts zu sein, da Retinal nicht gespalten wurde. Diese Beobachtung könnte auf einen Substratkanal zum aktiven Zentrum des Enzyms hindeuten, wie er für die Kristallstruktur der Apocarotinal spaltenden ACO aus *Synechocystis* beschrieben ist (Kloer et al., 2005). Im Gegensatz zu dieser scheint aber weder die Gegenwart eines zweiten Ringes noch der Oxyfunktionalisierungsgrad der Ringe einen großen Effekt auf die Substratakzeptanz zu haben. Es wurden sowohl der  $\beta$ -Iononring des  $\beta$ -Apo-8'-Carotinals, als auch die in der Literatur bisher noch nicht beschriebenen 3-Hydroxy-4-Keto-Ionon-Ringe des Astaxanthins, sowie die  $\kappa$ -Ringe des Capsorubins und/oder des Capsanthins in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen akzeptiert. Kloer et al. postulierten, dass der  $\beta$ -Ionon Ring der Apocarotinal nicht in den Substratkanal der ACO passt, dadurch die Position der gespaltenen Doppelbindung festgelegt wird und Substrate mit zwei Ionon-Ringen deshalb nicht umgesetzt werden (Kloer et al., 2005, Kloer et al., 2006). Dieser Mechanismus kann also nicht die Regiospezifität von AtCCD1 erklären.

Aus mechanistischen Gesichtspunkten ist auch der Anteil der anfallenden Spaltungsprodukte beim Umsatz des Paprikaoleoresins interessant. Die Hauptcarotinoide des Paprika sind Capsorubin und Capsanthin, die zusammen mit den möglichen Spaltungsprodukten nach einer Spaltung an den 9-10 und 9'-10' Doppelbindungen in Abb. 35 dargestellt sind.

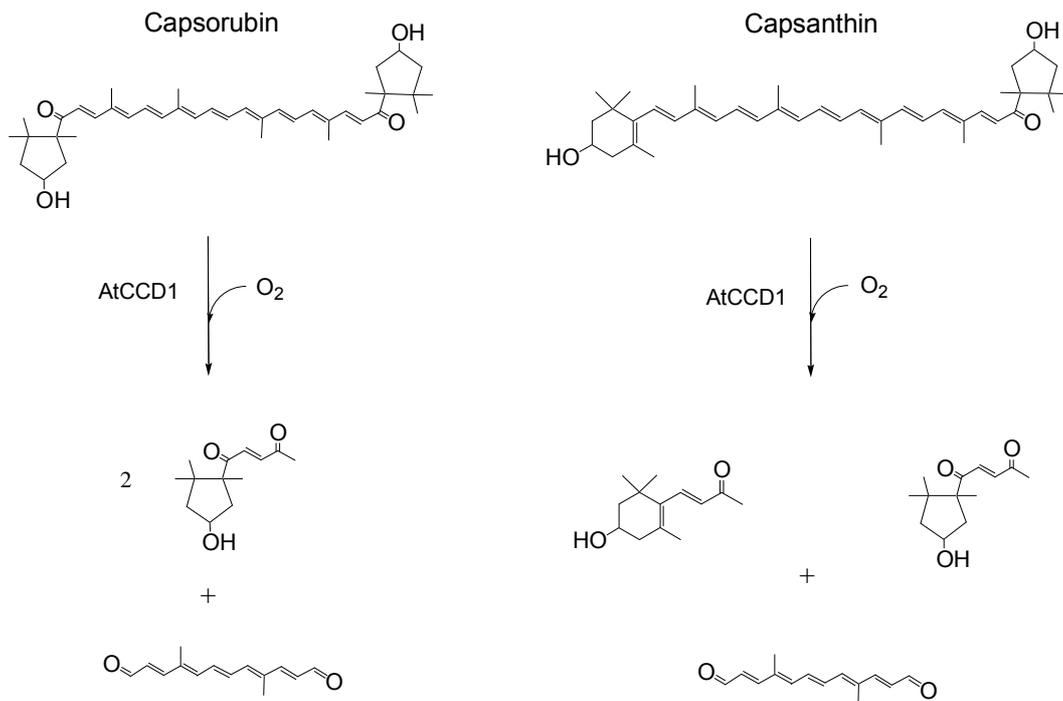


Abb. 35: Mögliche Spaltungsprodukte der Paprikacarotinoide Capsorubin und Capsanthin.

Obwohl das Spaltprodukt mit  $\kappa$ -Ring durch den enzymatischen Umsatz erzeugt wurde und diese Endmodifikation im Überschuss oder zumindest im gleichen Anteil wie das Hydroxy- $\beta$ -Ionon im Assay vorliegen sollte, wurde ein deutlich kleinerer Peak als für das Hydroxy- $\beta$ -Ionon massenspektrometrisch detektiert. Die Ursache hierfür lag nicht in einer unterschiedlich effizienten Chloroformextraktion, da die mittels verschiedener Methoden mit geschätzten Log P Werte (ChemDraw, Cambridgesoft) fast identisch waren und das Gleichgewicht eindeutig auf der Seite des Extraktionsmittels lag. Dies untermauert experimentell die Vermutung, dass die Substratspaltung sequentiell an den symmetrischen Spaltstellen des Substrates abläuft und nicht, wie zuvor vermutet worden war, durch die Bildung eines Enzymdimers zeitgleich geschieht (Kloer et al., 2006, Schwartz et al., 2001). Das unterschiedliche Verhältnis der Produkte könnte durch unterschiedliche Affinitäten von AtCCD1 für die verschiedenen Ringstrukturen, einen höheren Veresterungsgrad des  $\kappa$ -Rings von Capsanthin im Gegensatz zum Hydroxy- $\beta$ -Ionon Ring und ein damit

einhergehender Schutz vor einem enzymatischen Angriff, oder unterschiedliche Orientierungen der Ringe an der mizellaren Grenzfläche, verursacht sein.

Aufgrund des relativ breiten Spektrums an akzeptierten Substraten war es umso überraschender, dass keine sich von der chemischen Kontrolle unterscheidende  $\beta$ -Carotinspaltung im mizellaren System nachzuweisen war. Da  $\beta$ -Carotin aber im *in vivo* Assay und in Phospholipidvesikeln auch *in vitro* spaltbar ist (Schwartz et al., 2002, 5.4.2, 5.4.3) und  $V_{\max}$  mit zunehmender Hydrophobizität der Substrate abnimmt, kann angenommen werden, dass neben möglichen strukturellen Präferenzen die Substratzugänglichkeit im jeweils eingesetzten Reaktionssystem eine wichtige Rolle spielt. Da  $\beta$ -Carotin als einziges der untersuchten Substrate keine polare Sauerstoffgruppe enthält, neigt es stärker zur Aggregation und wird möglicherweise in einer für das Enzym nicht zugänglichen Weise in die Mizellen eingelagert (Korger 2005, Socaciu et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass sich  $\beta$ -Carotin im Gegensatz zu Zeaxanthin nicht an der Grenzschicht von Öltröpfchen in einer Emulsion anlagert, sondern sich hauptsächlich im hydrophoben Kern befindet (Borel et al., 1996). Wenn ein ähnlicher Vorgang in Mizellen stattfindet, könnte dies die fehlende Aktivität gegenüber  $\beta$ -Carotin erklären.

## 5.4 Alternative Vermittlungsformen der Carotinoide

In der Literatur wurden bisher ausschließlich mizellare Reaktionssysteme für den qualitativen und quantitativen *in vitro* Nachweis der spezifischen Carotinoidspaltung durch CCDs beschrieben. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit weiterentwickelt und für die *in vitro* Charakterisierung der AtCCD1 eingesetzt. Daneben kommen noch eine Reihe weiterer Vermittlungsformen in Frage, deren grundsätzliche Eignung untersucht wurde, wobei allerdings auf eine detaillierte Charakterisierung dieser Systeme verzichtet wurde.

### 5.4.1 *In vitro* Umsatz von emulgierten, carotinoidhaltigen Pflanzenextrakten

Ein weiteres interessantes Reaktionssystem stellen Emulsionen dar. Hierbei handelt es sich um Öl-in-Wasser bzw. Wasser-in-Öl Dispersionen, die meist durch den Einsatz von Tensiden (Emulgatoren) stabilisiert werden. Ihr physikochemisches Verhalten ist ebenfalls komplex, trotzdem finden sie breite Verwendung in verschiedenen industriellen Bereichen. Da ölbasierte Emulsionen biokompatibel sind, werden sie häufig für die Vermittlung von hydrophoben Lebensmittelzutaten und –zusatzstoffen verwendet. Beispiele hierfür sind die Formulierung von phytosterolreichen oder carotinoidhaltigen Emulsionen (Engel et al., 2004, Ribero et al., 2004).

Die grundsätzliche Eignung von Zellextrakten mit AtCCD1 zur Spaltung von Carotinoiden in Emulsionen wurde untersucht. Da die Formulierung und Charakterisierung solcher Systeme nicht trivial ist, wurde hierfür auf industrielle Formulierungen zurückgegriffen, die freundlicherweise von Herrn Dr. Christian Christiansen von der Firma Wild Flavours, Berlin, zur Verfügung gestellt wurden.

Zunächst wurde jedoch die Stabilität von AtCCD1 in Gegenwart einer nicht wassermischbaren, organischen Phase untersucht. Für diesen Zweck wurde das MCT-(medium chain triglyceride)-Öl Miglyol 812 eingesetzt. Affinitätschromatographisch aufgereinigtes AtCCD1-His<sub>6</sub> in PBS mit einer Triton X-100 Konzentration von 2 g/l im Puffer wurde mit Miglyol in einem 5:1 Phasenverhältnis gemischt und moderat bei Raumtemperatur geschüttelt, um eine grobe Emulsion herzustellen. Es wurden Proben über die Zeit genommen, die Phasen durch Zentrifugation getrennt und die Restaktivität in der wässrigen Phase mittels des photometrischen Assays bestimmt. Nach fünf Stunden Inkubation konnten noch 50% der Anfangsaktivität in der wässrigen Phase nachgewiesen werden.

Ein möglicher enzymatischer Umsatz in Emulsion wurde mit einer Citrusöl- und einer Marigoldemulsion untersucht. Beide wurden mit einem Zellextrakt von *E. coli* BL21pET43-AtCCD1 und BL21pET43 über mehrere Stunden bei 25 °C inkubiert. Von den Ansätzen mit Citrusölemulsion wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen, die Reaktionsprodukte mit Chloroform extrahiert und mittels GC/MS die Produktbildung untersucht. Es wurde eine deutliche  $\beta$ -Iononbildung im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen (Abb. 36). Da an dieser Stelle nur die grundsätzliche Eignung der Substratformulierungen für einen enzymatischen Umsatz untersucht werden sollte, wurde auf die Analyse der gespaltenen Substrate mittels HPLC verzichtet. Vermutlich handelt es sich aber um in Citrusölen in relativ hohen Konzentrationen vorkommende Apocarotinoide bzw. Cryptoxanthin (Kato et al., 2004).

Auf die gleiche Weise wurde eine Emulsion eines Marigoldextraktes (*Tagetes erecta*) untersucht. Extrakte von Marigold werden aufgrund ihres hohen Carotinoidgehaltes ebenfalls als natürliche Lebensmittelfarbstoffe eingesetzt. Lutein ist das in höchster Konzentration vorkommende Carotinoid (Hadden et al., 1999) und somit wurden 3-Hydroxy- $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon als Hauptprodukt einer Umsetzung mit AtCCD1 erwartet. Tatsächlich konnte nach 1,5 Stunden Umsatz die Bildung der Hydroxyionone nachgewiesen werden (Abb. 37).

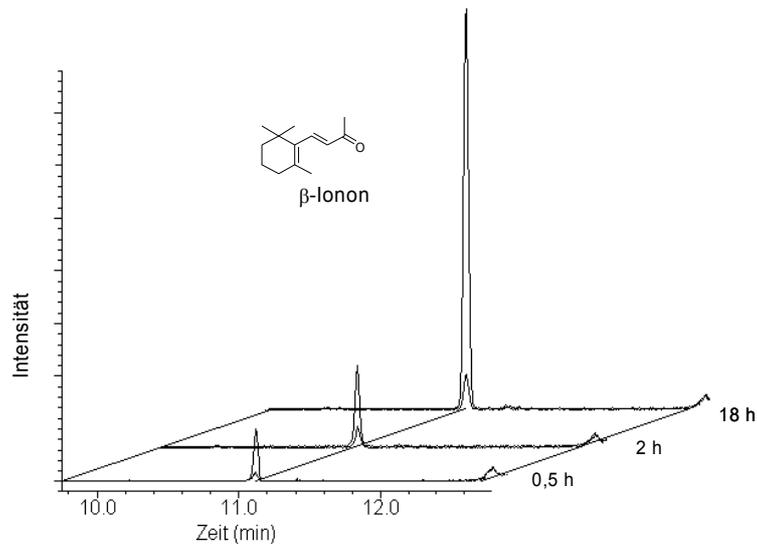


Abb. 36: GC/MS Analyse der Reaktionsprodukte, die nach Umsetzung der einer Citrusölemulsion mit NusA-AtCCD1 erhalten wurden, sowie einer Kontrolle. Dargestellt ist die für  $\beta$ -Ionon charakteristische Ionenspur  $m/z$  177 nach 30 Minuten, 2 und 18 Stunden. Die kleineren Peaks zum jeweiligen Zeitpunkt zeigen die Kontrolle mit *E. coli* Zellextrakt ohne AtCCD1. Die Darstellung über Ionenspuren wurde gewählt, da es sich bei den Citrusölemulsionen um ein sehr komplexes Gemisch verschiedener Terpene handelt.

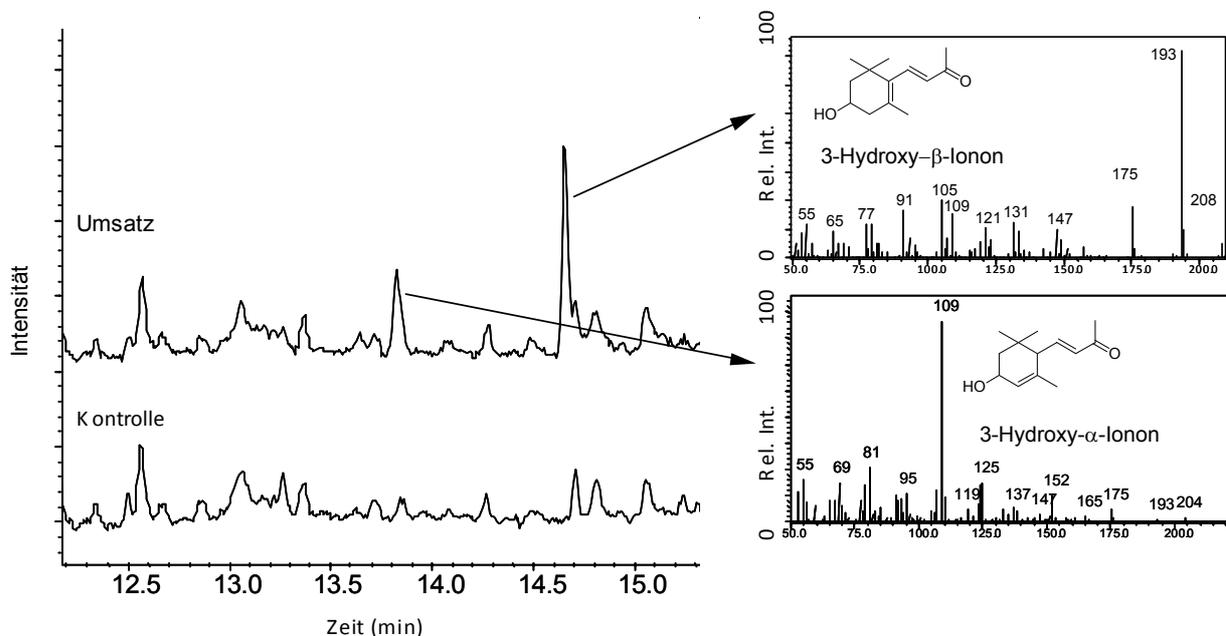


Abb. 37: GC/MS Analyse der Reaktionsprodukte, die nach Umsetzung eines öligen Marigold-Extraktes mit NusA-AtCCD1 erhalten wurden sowie einer Kontrolle.

### 5.4.2 De novo $\beta$ -Ionon Synthese

Das in der Literatur am häufigsten für die funktionelle Charakterisierung von Enzymen des Carotinoidmetabolismus beschriebene System ist der *in vivo* Komplementierungsassay in *E. coli* (Cunningham et al., 2007). Hierbei werden die Enzyme der Carotinoidbiosynthese aus *Erwinia herbicola* (jetzt *Pantoea agglomerans*) in *E. coli* mit dem jeweils zu charakterisierenden Protein coexprimiert und über die Farbänderung bzw. die Analytik der entstehenden Produkte auf dessen Funktion geschlossen. Dieses System wurde von von Lintig et al. (von Lintig et al., 2000) zum ersten Mal zur Identifizierung und Charakterisierung einer carotinoidspaltenden Oxygenase verwendet und wurde seitdem in vielen Veröffentlichungen zu diesem Zweck eingesetzt.

Die in der Literatur beschriebene Spaltung von  $\beta$ -Carotin durch AtCCD1 wurde durch den Komplementierungsansatz in *E. coli* überprüft. Hierfür wurden Stämme eingesetzt, die freundlicherweise von Prof. Gerhard Sandmann, Universität Frankfurt, zur Verfügung gestellt wurden. Diese tragen das Carotinoidbiosynthesecluster von *Erwinia herbicola* auf einem Plasmid. Nach Transformation von pGEX-4T und pGEX-4T-AtCCD1 wurden die erhaltenen Transformanten in LB-Medium bei 30 °C kultiviert und nach 20 Stunden Proben von den Kulturüberständen genommen und 1:4 mit Chloroform extrahiert. Dabei war eine deutliche  $\beta$ -Iononbildung bei dem GST-AtCCD1 exprimierenden Stamm im Gegensatz zur Kontrolle nachweisbar. Eine komplette Entfärbung der AtCCD1 exprimierenden Zellen war zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die  $\beta$ -Carotinspaltung *in vivo* zumindest genauso schnell wie die Biosynthese abläuft.

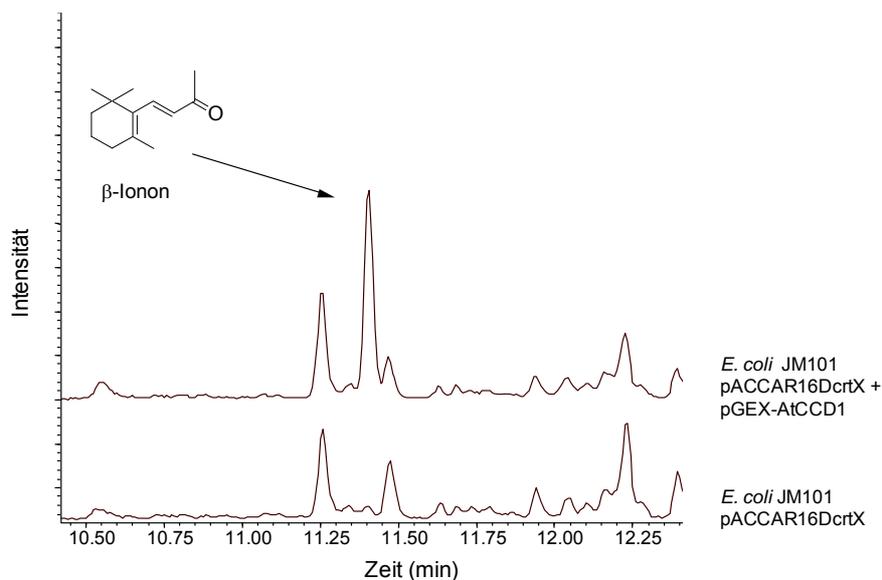


Abb. 38 GC/MS Analyse der Extrakte aus dem Kulturmedium des  $\beta$ -Carotin akkumulierenden *E. coli* Stammes JM101 pAC-CAR16DcrtX mit und ohne Coexpression von GST-AtCCD1 (1 ml des Mediums wurde mit 250  $\mu$ l Chloroform extrahiert).

### 5.4.3 In vitro $\beta$ -Carotinspaltung in Phospholipidvesikeln

Phospholipidbasierte, vesikuläre Systeme stellen einen interessanten biomimetischen Ansatz dar, der häufig für die Charakterisierung von membranassoziierten Enzymen und zur Rekonstitution von membrangebundenen Enzymen verwendet wird (Bonk et al., 1997). Die Zusammensetzung von Phospholipidvesikeln kann der Membran des jeweiligen zellulären Kompartiments nachempfunden und dadurch Bedingungen geschaffen werden, die den *in vivo* Bedingungen sehr nahe kommen (Latowski et al., 2004, Latowski et al., 2002). Allerdings ist das physikochemische Verhalten dieser Systeme und deren Handhabung deutlich komplizierter als das von Tensidmizellen, da sie je nach Herstellungsart eine Vielzahl an Strukturen ausbilden können und zudem thermodynamisch nicht stabil sind (Deems 2000, Sackmann 1995). Da  $\beta$ -Carotin *in vivo* im Gegensatz zu der mizellaren *in vitro* Vermittlungsform umgesetzt werden kann, wurde versucht, durch den Einsatz von Phospholipidvesikeln eine den *in vivo* Bedingungen ähnlichere Umgebung zu schaffen.

Hierfür wurden mit  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal und  $\beta$ -Carotin in gleichem molaren Verhältnis beladene Phospholipidvesikel auf Basis von Sojalecithin (~ 40 % Phosphatidylcholin) für die *in vitro* Spaltung mit Zellextrakten mit und ohne AtCCD1-His<sub>6</sub> eingesetzt und mehrere Stunden bei 30 °C inkubiert. Ein im Vergleich zur  $\beta$ -Apo-8'-Carotinalspaltung zwar schlechterer, aber sich eindeutig von der Kontrolle unterscheidender Umsatz des  $\beta$ -Carotins konnte mittels GC/MS nachgewiesen werden (Abb. 39).

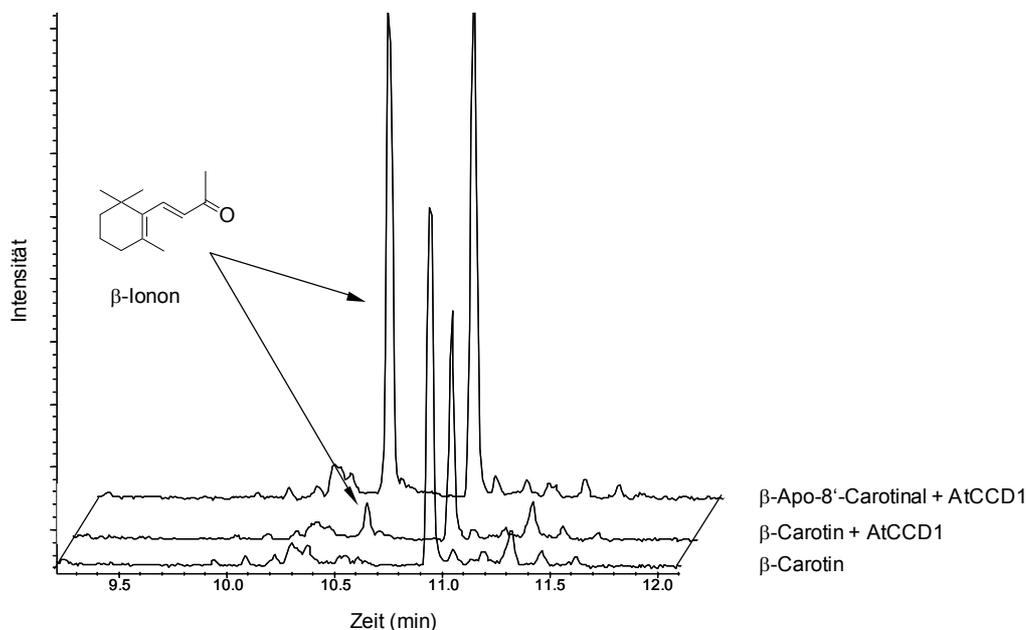


Abb. 39: GC/MS Analyse der Umsetzungen von  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal und  $\beta$ -Carotin in Phospholipidvesikeln mit AtCCD1-His<sub>6</sub> und einer Kontrolle ohne Enzym. Der Umsatz von  $\beta$ -Carotin lag im Gegensatz zum mizellaren System deutlich über der Kontrolle.

#### 5.4.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die grundsätzliche Eignung der alternativen Reaktionssysteme Emulsion und Phospholipidvesikel für AtCCD1 konnte aufgezeigt werden. Obwohl das Mizellare System für die biochemische Charakterisierung der Enzymfamilie der CCDs besser geeignet ist und möglicherweise auch ein geeignetes technisches Reaktionssystem zur enzymatischen Gewinnung von Carotinoidspaltungsprodukten wie z.B. dem  $\beta$ -Ionon darstellt, könnten diese Alternativen z.B. für die Verbesserung des  $\beta$ -Carotinsatzes Vorteile besitzen.

So ist der Einsatz von AtCCD1 zur Erzeugung von natürlichen Aromastoffen an der Grenzfläche von carotinoidhaltigen Emulsionen in zweierlei Hinsicht interessant: Zum einen könnte das Enzym beispielsweise direkt als technischer Hilfsstoff in der Verarbeitung von carotinoidhaltigen Lebensmitteln eingesetzt werden, um deren Aroma positiv zu beeinflussen. Außerdem könnten Emulsionen insofern interessante Reaktionssysteme für die enzymatische Carotinoidspaltung darstellen, als dass durch sie hohe volumetrische Substratkonzentrationen realisiert werden können (Ribero et al., 2004). Die Anlagerung der Substrate an der Öl/Wasser Grenzfläche ist vermutlich eine wichtige Voraussetzung für einen Umsatz, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass das Enzym in die Ölphase eindringt. In der Literatur gibt es hierfür widersprüchliche Angaben. So wird eine Anlagerung von  $\beta$ -Carotin an die Hexan/Wasser Grenzfläche beschrieben, wenn auch in einem geringeren Ausmaß als der ebenfalls untersuchte Ethylester der  $\beta$ -Apocarotinsäure (Joos et al., 2004). Im Gegensatz dazu konnte die Akkumulation von  $\beta$ -Carotin im Kern von Emulsionströpfchen gezeigt werden, während sich das hydrophilere Zeaxanthin an die Grenzschicht anlagerte (Borel et al., 1996). Ein AtCCD1 katalysierter Umsatz von Xanthophyllen konnte zweifelsfrei in mit Emulsionen aus öligen Marigoldextrakten durchgeführten Versuchen bewiesen werden. Ob die  $\beta$ -Iononbildung beim Einsatz der Citrusölemulsionen durch die Spaltung von  $\beta$ -Carotin oder von Apocarotinalen bzw. des ebenfalls in relativ hohen Mengen vorkommenden Cryptoxanthins (Kato et al., 2004, Kato et al., 2006) verursacht war, konnte durch die gaschromatographische Analyse der flüchtigen Produkte nicht gezeigt werden. Trotz des normalerweise hohen Xanthophyllanteils der Citruscarotinoide wurde kein Hydroxyionon gefunden, was auf einen hohen Veresterungsgrad dieser Substrate schließen lässt. Da die veresterten Xanthophylle vermutlich nicht durch CCDs umsetzbar sind, sollte eine enzymatische Spaltung der Esterbindung die Spaltung und die Produktausbeute durch oxidative Spaltung mit CCDs verbessern.

Die Bedeutung der Substratzugänglichkeit wurde auch durch die Reproduktion der literaturbeschriebenen *in vivo* Umsätze des  $\beta$ -Carotins durch AtCCD1 in *E. coli* und der sich daran anlehnenden Umsätze in Phospholipidvesikeln nochmals betont. Obwohl die Spaltung von  $\beta$ -Carotin im Vergleich zu  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal langsamer

abließ, war im Gegensatz zum tensidbasierten System ein deutlicher Umsatz im Vergleich zur chemischen Kontrolle zu erkennen. Verschiedene Publikationen zeigen, dass die Einlagerung von Xanthophyllen orthogonal zur Membranebene geschieht, während sich das vollkommen unpolare  $\beta$ -Carotin eher in den hydrophoben Mittelbereich eines Bilayers zurückzieht (Socaciu et al., 2002, Sujak et al., 2005, Wisniewska et al., 2006). Um Zugang zu letzterem zu bekommen, müsste das Enzym also in die Membran penetrieren, ein Vorgang der für Phospholipasen nachgewiesen ist und auch aufgrund eines hydrophoben Bereichs der Oberfläche für carotinoidspaltende Oxygenasen postuliert wurde (Bittova et al., 1999, Feng et al., 2002, Kloer et al., 2006). Dass eine solche Wechselwirkung an der Grenzschicht zu einer Tensidmizelle vermutlich nicht stattfinden kann, scheint naheliegend. Im Gegensatz dazu ist anzunehmen, dass die  $\beta$ -Carotinumsatzung durch eine Optimierung der Lipidvesikelzusammensetzung weiter verbessert werden kann. Für die Violaxanthinepoxidase aus Weizen wurde z.B. gezeigt, dass sie Galaktolipide, die invers-hexagonale Strukturen ausbilden, für ihre Aktivität benötigt und eine Membranbindung nur bei einem pH-Wert von unter 6,5 stattfindet (Latowski et al., 2004, Latowski et al., 2002). Eine Phytoensynthase aus *Narcissus pseudonarcissus* benötigt ebenfalls Galaktolipide für ihre Aktivität und ist inaktiv, wenn Phosphatidylcholin-basierte Liposomen eingesetzt werden (Schledz et al., 1996). Für Phospholipasen wurde die Oberflächenladung der Membran als wichtiger Faktor für die Aktivität bestimmt und die Aktivierung einer Lipoxygenase konnte durch die Veränderung der Membranfluidität erklärt werden (Pande et al., 2005, Tatulian 2001). Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Cofaktor für die Membranbindung benötigt wird. Für eine Reihe membranassoziierter Enzyme konnten beispielsweise Calciumionen als wichtiger Cofaktor für die Membranbindung bzw. -penetration identifiziert werden (Diez et al., 1990, Oldham et al., 2005, Sakane et al., 1991). So könnte der bessere *in vivo* Umsatz von  $\beta$ -Carotin durch AtCCD1 auf die Gegenwart solcher Faktoren im Cytoplasma von *E. coli* zurückzuführen sein, die durch den Zellaufschluss im *in vitro* Assay stark verdünnt werden. Eine der natürlichen Umgebung der Chloroplasten nachempfundene Phospholipidmischung und die Berücksichtigung der oben genannten Punkte könnte also im Vergleich zu den eingesetzten, wenig definierten Lecithinpräparationen aus Soja eine weitere Verbesserung des  $\beta$ -Carotin Umsatzes bewirken. Schließlich könnte die Ursache für einen effizienteren *in vivo* Umsatz auch in der Interaktion zwischen Biosyntheseenzymen und Oxygenasen liegen. Bei einer durch mehrere Enzyme katalysierten Reihe von Reaktionen wird allgemein angenommen, dass die Bildung eines Multienzymclusters und des damit einhergehenden „Substratchannelings“ die katalytische Effizienz des Enzymkomplexes insbesondere für Metaboliten mit geringer Konzentration verbessert (Candau et al., 1991, Jorgensen et al., 2005). Der Transfer des  $\beta$ -Carotins zwischen einer Lycopencyclase und einer CCD könnte also auch eine *in vivo* Lösung des Substratvermittlungsproblems darstellen.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma, Aldrich, Fluka, Riedel de Haën (alle Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen. Mit Ausnahme von kristallinem  $\beta$ -Carotin und  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal wurden kristalline Carotinoide bzw. Xanthophylle, ein alkoholischer Paprikaextrakt und Emulsionen von Citrusölen und Marigoldextrakten (*Tagetes erecta*) von der Wild Flavours Berlin GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt. Die gemäß Lebensmittelkennzeichnungverordnung angegebenen Inhaltsstoffe der für den Einsatz als Lebensmittelzutat formulierten Extrakte waren:

Inhaltsstoffe der Marigoldemulsion:

Totalextrakt aus *Tagetes*, Invertzuckersirup, Citronensäureester von Mono- und Diglyceriden von Fettsäuren,  $\alpha$ -Tocopherol.

Inhaltsstoffe der Citrusölemulsion:

Sorbitirup, Invertzuckersirup, Wasser, Polysorbat 80, Citrusöle, Xanthan,  $\alpha$ -Tocopherol

Inhaltsstoffe des Paprika Oleoresins:

Gesamtauszug aus roten Paprikafrüchten,  $\alpha$ -Tocopherol

#### 6.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

##### 6.1.2.1 Medien

*E. coli*

LB-Medium /LB-Agar	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl
	15 g/l Agar agar (für festes Medium)
	pH 7,0

---

Low Salt LB Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 15 g/l Agar agar (für festes Medium) pH 7,0
TB-Medium	12 g/l Trypton 24 g/l Hefeextrakt 4 ml Glycerol 2,31 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 12,54 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
SOC-Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 2,5 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM D-Glucose
<i>Pichia pastoris</i>	
YEPD-Medium	1% Hefeextrakt 2% Pepton 2% Glucose
YPDS	1% Hefeextrakt 2% Pepton 2% Glucose 1 M Sorbitol 2% Agar agar 100 µg/ml Zeocin
MD-Medium	1.34% YNB 4 x 10 <sup>-5</sup> % Biotin 2% Glucose
MGY-Medium	1.34% YNB 1% Glycerol 4 x 10 <sup>-5</sup> % Biotin
MM-Medium	1.34% YNB 4 x 10 <sup>-5</sup> % Biotin 0.5% Glucose

### 6.1.2.2 Puffer und Lösungen

#### Aufschluss und Assaypuffer

PBS-Puffer	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,3
SCED-Puffer ( <i>Pichia</i> )	10 mM Natriumcitrat 1 M Sorbitol 10 mM EDTA 10 mM DDT pH 7,5

#### Puffer für pH-Optimum

Die Pufferstärke wurde auf 0,1 M und durch Zugabe von NaCl eine Ionenstärke von 0,2 M eingestellt (beide Werte bei 25 °C). Die Berechnung erfolgt mittels eines Programms zur Bestimmung der thermodynamisch korrekten Pufferzusammensetzung ([www.bioinformatics.org/JaMBW/5/4/index.html](http://www.bioinformatics.org/JaMBW/5/4/index.html)).

pH	Puffersubstanz	NaCl
10	6,11 g/l Ethanolamin	9,93 g/l
9,5	6,11 g/l Ethanolamin	8,32 g/l
9	12,14 g/l Tris Base	10,91 g/l
8,5	12,14 g/l Tris Base	9,76 g/l
8	12,14 g/l Tris Base	8,12 g/l
7,5	12,14 g/l Tris Base	6,83 g/l
7,5	14,2 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-
7	20,09 g/l Bis-Tris	10,04 g/l
6,5	20,09 g/l Bis-Tris	8,45 g/l
6	20,09 g/l Bis-Tris	7,03 g/l
5,5	6 g/l Essigsäure	6,53 g/l
5	6 g/l Essigsäure	7,58 g/l
4,5	6 g/l Essigsäure	9,19 g/l
4	6 g/l Essigsäure	10,58 g/l

Elektrophoresepuffer*Agarose-Gelelektrophorese*

50x TAE-Puffer	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 0,05 M EDTA pH 8
6x Ladepuffer	0,25 % (m/v) Bromphenolblau 0,25 % (m/v) Xylencyanol FF 40 % (m/v) Saccharose

*SDS-PAGE*

5x Probenpuffer	0,25 M Tris-Base 0,5 M $\beta$ -Mercaptoethanol 10 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Bromphenolblau 50 % (v/v) Glycerin pH = 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-Base pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-Base pH 6,8
Laufpuffer	0,125 M Tris-Base 1,25 M Glycin 0,5 % (m/v) SDS pH 8,3
Färbelösung	0,05 % (m/v) Coomassie Brilliant Blau R-250 50 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	20 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure

*Western Blotting*

PBST	PBS 500 µl/l Tween 20
Transfer-Puffer	3,03 g/l Tris Base 14,4 g/l Glycin 20 % (v/v) Methanol
Blocking Puffer	2,5 % (w/v) BSA in PBST

Puffer für Affinitätschromatographie*His<sub>6</sub>-Tag Affinitätschromatographie*

Säulenpräparation	0,1 M NiSO <sub>4</sub>
Binde- und Waschpuffer	0,02 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 M NaCl pH 7,4
Elutionspuffer	0,02 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 M NaCl 0,5 M Imidazol pH 7,4
Nickelelution	0,05 M EDTA

*GST Affinitätschromatographie*

Binde- und Waschpuffer	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,3
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl 10 mM Glutathion (red.) pH 8

### 6.1.3 Mikroorganismen

<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt)
<i>E. coli</i>	Novablue (Novagen, Darmstadt)
<i>E. coli</i>	JM101 pAC-CAR16DcrtX
<i>Pichia pastoris</i>	X-33
<i>P. pastoris</i>	GS115/pPICZ/lacZ

### 6.1.4 Plasmide

Die für die Selektion auf Agarplatten eingesetzten Antibiotikakonzentrationen sind jeweils in Klammern angegeben.

<i>E. coli</i>	pET29a (30 µg Kanamycin/ml LB Agar)
	pET43a (50 µg Ampicillin/ml LB Agar)
	pGEX-4-T (50 µg Ampicillin/ml LB Agar)
<i>P. pastoris</i>	pPICZ (25 µg Zeocin/ml Low Salt LB Agar)
	pPICZ $\alpha$ (25 µg Zeocin/ml Low Salt LB Agar)

Plasmidkarten und Multiple Cloning Sites sind im Anhang dargestellt.

### 6.1.5 Oligonukleotide und Marker

#### Oligonukleotide

PCR-Primer wurden von der Operon Biotechnologies GmbH synthetisiert. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

#### *E. coli*

Für die Klonierung von AtCCD1 in die verschiedenen *E. coli* Expressionsplasmide eingesetzte Primer (Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen) :

Für pET29a-AtCCD1-nm

fwAtCCD1 Vspl: 5'-T ACA TTA ATG GCG GAG AAA CTC AGT G-3'

rvAtCCD1 Vspl: 5'-TA CAT TAA TGC TTA TAT AAG AGT TTG TTC C-3'

Für pET29a-*AtCCD1*fw*AtCCD1**EcoRI*: 5'-T GAA TTC ATG GCG GAG AAA CTC AGT G-3'rv*AtCCD1**NotI*: 5'-TGC GGC CGC TAT AAG AGT TTG TTC CTG G-3'Für pET43a-*AtCCD1*fw*AtCCD1**SacI*: 5'-C GAA TGA GCT CGT ATG GCG GAG AAA C-3'rv*AtCCD1**NotI*: 5'-C CTA TGC GGC CGC GCT GCC ACG TGG GAC CAG TAT  
AAG AGT TTG TTC C-3'

Bei dem Primer rv*AtCCD1**NotI* wurde eine für eine Thrombinschnittstelle codierende Sequenz vor der Restriktionsschnittstelle eingefügt, um den C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag nach der Expression proteolytisch abtrennen zu können (durch gestrichelte Linie gekennzeichnet).

## Sequenzierungsprimer für die pET-Plasmide

Für pET29-*AtCCD1*-nm und pET29-*AtCCD1*

T7-Prom. Primer: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Intern: 5'-TCTCCCAGGTCATATATTCC-3'

T7-Term. Primer : 5'-TATGCTAGTTATTGCTCTG-3'

Für pET43a-*AtCCD1*

Forward: 5'-CCA CCG CCA ACT GGT CTG GT-3'

Intern: 5'-TCT CCC AGG TCA TAT ATT CC-3'

Reverse: 5'-CAT CGG CGC TAC GGC GTT TC-3'

*P. pastoris*

Für die Klonierung von *AtCCD1* in die Vektoren pPICZ A und pPICZ $\alpha$  A eingesetzte Primer:

Für pPICZ-*AtCCD1*ms und pPICZ $\alpha$ -*AtCCD1*msfw\_*EcoRI*: 5' C GAC GAA TTC ATG GCG GAG AAA CTC AG 3'rv\_*Apal*\_ms: 5' CGT ACT GGG CCC TTA TAT AAG AGT TTG TTC 3'Für pPICZ-*AtCCD1*os und pPICZ $\alpha$ -*AtCCD1*osfw\_*EcoRI*: 5' C GAC GAA TTC ATG GCG GAG AAA CTC AG 3'rv\_*Apal*\_os: 5' CGT ACT GGG CCC TAT AAG AGT TTG TTC C 3'

Analytische Primer für die Überprüfung der Integration ins *Pichia* Genom und für die Sequenzierung der Konstrukte

5' AOX-Primer: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'  
 Intern: 5'-TCT CCC AGG TCA TAT ATT CC-3'  
 3' AOX-Primer: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

### **Marker**

Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas)  
 Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)  
 Roti-Mark Standard (Roth)  
 Chemichrome Western Control (Sigma)

### **6.1.6 Enzyme und Antikörper**

DNA Polymerasen: HIFI-Polymerase (Roche)  
 Taq Polymerase (Qiagen)

Restriktionsenzyme: *Apal*, *EcoRI*, *NdeI*, *NotI*, *SacI*, *VspI* (Fermentas)

Weitere Enzyme: T4-Ligase (Fermentas)  
 Shrimp alkalische Phosphatase (SAP, Fermentas)  
 Lyticase (Sigma)  
 Soja Lipoxygenase (Fluka)  
 Benzonase (Novagen)  
 Thrombin (Amersham Biosciences)

Antikörper: Anti-His<sub>6</sub>(C-term)-HRP-Antibody (Invitrogen)

### **6.1.7 Kommerzielle Kits**

Plasmidpräparation: Genelute Plasmid Miniprep Kit (Sigma)

Aufreinigung von DNA-Fragmenten: High-Pure PCR-Product Purification Kit (Roche)

Gelextraktion: Genelute Gel Extraction Kit (Sigma)

Proteinquantifizierung: BCA Protein Assay Kit (Pierce)

## 6.2 Geräte

### 6.2.1 Photometrische Mikrotiterplattenmessungen

Mikrotiterplattenreader: Genios, Tecan Austria

Filter: 510, 560 und 590 nm

Temperatur: 30 °C (AtCCD1- und LOX-Assay), 37 °C (BCA-Assay)

Software: Magellan, Tecan Austria

### 6.2.2 Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Diodenarraydetektion (HPLC/DAD)

System: Shimadzu SCL-10A

Pumpen: LC10AT

Detektor: SPD-M10A

Vorsäule: C18 All-Guard Cartridges (7,5 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm), Alltech

Säule: Prevail C18 (150 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm), Alltech

Laufmittel A: 50:50 Methanol:Wasser

Laufmittel B: Isopropanol

Fluss: 1 ml/min

Temperatur: 30 °C

DAD-Messbereich: 200-600 nm

Gradient: 0-12 min, 80 % A, 12-13 min 80-20 % A, 13-17,5 min 20% A, 17,5-18,5 min 80 % A, 18,5-25 min 80 % A

### 6.2.3 Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC/MS)

Gaschromatograph: Shimadzu GC17A

Säule: Valcobond VB-5 (5%Phenyl-95%Methylpolysiloxan, l = 30 m, I.D. = 0,25 mm, Film = 0,25 µm)

Injektor: Split-Splitless-Injektor (1:22), Temperatur : 220°C

Temperaturprogr.: 80°C - 8°C/min - 240°C, 5 min isokratisch

GC/MS Interfacetemperatur: 270°C

Scan range: 40 – 400 m/z

## 6.2.4 Sonstige Geräte

Spektrophotometer: Lambda25 UV/Vis Spektrophotometer, Perkin Elmer, temperierbar, 8 Messzellen

Thermocycler: Eppendorf Mastercycler Gradient

Ultraschall-Sonotrode: Branson Sonifier W-250 D

Zentrifugen: Eppendorf Centifuge 5415 R, Kontron Centrikon H-401

Elektroporator: Bio-Rad GenePulser XCell

Gelelektrophoreseapparaturen:

- Bio-Rad PowerPac Basic
- Bio-Rad Mini-Sub Cell GT (Agarosegelelektrophorese)
- Bio-Rad Mini-Protean 3 (SDS-PAGE)
- Mini-Trans-Blot Cell (Western Blotting)

## 6.3 Software

- GCMS solution Version 1.20, Shimadzu
- Class Vp (HPLC) Version 6.14, Shimadzu
- Magellan (Tecan Genios) Version 3.11, Tecan
- Unicorn (Äkta Explorer) Version 4.10, Amersham Biosciences
- BioDoc Analyze (Geldokumentation), Biometra
- Origin, Version 6.0, Originlabs
- Clone Manager, Version 7.0, Sci-Ed Software

## 6.4 Methoden

### 6.4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 6.4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das vom Projektpartner (Prof. Wilfried Schwab, Biomolekulare Lebensmitteltechnologie, TU München) erhaltene Plasmid pGEX-4-T-AtCCD1 wurde als Template für die Subklonierung von AtCCD1 in die verschiedenen Expressionsplasmide mittels PCR verwendet. Die Amplifikation zu analytischen Zwecken wurde mit der *Taq*-Polymerase (Qiagen) durchgeführt. Alle PCR-Klonierungsschritte wurden mit dem HIFI-Polymerasemix (Roche) durchgeführt.

Alle PCR-Mischungen wurden auf Eis gemäß folgender Zusammensetzung angesetzt:

#### Taq- und HIFI-Reaktionen

Template	1 µl
Primer 1 + 2 (10 mM)	Je 1 µl
H <sub>2</sub> O	22 µl
PCR-Master Mix	25 µl

Die PCR wurde anschließend mit folgenden Temperaturprogrammen durchgeführt:

#### *Taq*

	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Vordenaturierung	94	3 min	1
Denaturierung	94	0,5 min	} 30x
Primerhybridisierung	5 °C unter Primerschmelzpunkt	0,5 min	
Elongation	72	2 min	
Finale Elongation	72	10 min	1

#### *HIFI*

	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Vordenaturierung	94	2 min	1
Denaturierung	94	10 s	} 10x
Primerhybridisierung	5 °C unter Primerschmelzpunkt	0,5 min	
Elongation	72	1,5 min	
Denaturierung	94	10 s	} 20x
Primerhybridisierung	5 °C unter Primerschmelzpunkt	0,5 min	
Elongation	72	1,5 min + 5 s pro Zyklus	
Finale Elongation	72	10 min	1

#### 6.4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden TAE-gepufferte Gele mit 1,5 % (w/v) Agarose und 0,05 % Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurden mit 6× Ladepuffer versetzt und für 30 bis 45 Minuten

bei 80 V entwickelt. Das Ergebnis wurde mit einem Geldokumentationssystem festgehalten. Die Verwendung eines Größenstandards (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas) ermöglichte die Abschätzung der Größe und der Konzentration der DNA Fragmente.

#### 6.4.1.3 Klonierung von PCR-Produkten

Der enzymatische Verdau des jeweiligen Plasmids erfolgte wenn möglich als Doppelverdau gemäß den Herstellerangaben für die jeweilige Kombination an Restriktionsendonukleasen (Fermentas). Nach Verdau erfolgte die Dephosphorylierung des Plasmids durch Inkubation mit Shrimp Alkalischer Phosphatase. Das linearisierte Plasmid und die mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente, wurden mit einem kommerziellen Kit aufgereinigt (PCR-Cleanup, Roche) und mit sterilem H<sub>2</sub>O eluiert. Zur Abtrennung von bei einem Doppelverdau anfallenden Plasmidfragmenten mit mehr als 100 bp, wurde eine gelelektrophoretische Trennung mit anschließender Gelextraktion des gewünschten Fragments durchgeführt (Genelute Gel Extraction Kit, Sigma). Die Konzentration der aufgereinigten Fragmente wurde mittels Agarosegelelektrophorese und Gelanalyse abgeschätzt und die Fragmente in einem Verhältnis von mindestens 3:1 (Insert:Plasmid) gemischt. Die Ligation mit T4-Ligase erfolgte bei Raumtemperatur für 3 Stunden oder bei 4 °C über Nacht. Vor der Transformation wurde der Ligationsansatz 10 Minuten bei 95 °C inaktiviert.

#### 6.4.1.4 Herstellung kompetenter Zellen

##### *E. coli*

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurde eine Kultur bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,6 zunächst 20 Minuten auf Eis inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst mit sterilem H<sub>2</sub>O und dann zweimal mit sterilem 10 % Glycerol gewaschen. Hierbei wurden die Zellen jeweils bei 1500 g sedimentiert. Zuletzt wurden die Zellkonzentration auf eine OD<sub>600</sub> von ~100 eingestellt und die Zellen entweder direkt für die Transformation verwendet, oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C für eine spätere Verwendung gelagert.

##### *P. pastoris*

Für die Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris* wurde der entsprechende Stamm in einem 2 l Kolben mit 500 ml YPD bis zu einer OD<sub>600</sub> = 1,3 – 1,5 kultiviert und bei 1500 g bei 4 °C pelletiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und mit

eisgekühlten Lösungen durchgeführt. Das Pellet wurde zweimal mit 500 ml Wasser und dann mit 20 ml 1 M Sorbitol gewaschen und schließlich in 1 ml 1 M Sorbitol resuspendiert und für die Transformation eingesetzt.

#### 6.4.1.5 Transformation kompetenter Zellen

##### *E. coli*

Die Transformation erfolgte mittels Elektroporation. 20 µl kompetenter *E. coli* Zellen wurden in einer auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvette (1mm Spaltbreite) mit 1 µl Plasmidpräparation bzw. Ligationsansatz gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit 1,8 kV, 25 µF, 200 Ω. Nach direkter Zugabe von 1 ml 37 °C warmem SOC-Medium wurden die Zellen eine Stunde regeneriert, auf LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (6.1.4) ausplattiert und 14-20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für die Selektion auf Zeocin Resistenz für die pPICZ-Plasmide wurde Low Salt LB Agar verwendet.

##### *P. pastoris*

Die Plasmide für die Transformation der *P. pastoris* Stämme wurden wie oben beschrieben mittels PCR-Klonierung erzeugt, in *E. coli* Novablue transformiert und dort vermehrt. Nach Präparation aus *E. coli* (vgl. 6.4.1.6) wurden die Plasmide mit *SacI* linearisiert. Die Linearisierung wurde mittels Agarose Gelelektrophorese überprüft. Der Restriktionsverdau wurde hitzeinaktiviert und die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung und von 2,5 Volumen 100 % Ethanol ausgefällt. Durch Zentrifugation wurde die DNA pelletiert und mit 80 % Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde das linearisierte Plasmid in Wasser gelöst (1/10 des ursprünglichen Volumens) und für die Transformation verwendet. Die Konzentration der Präparation wurde durch den Vergleich mit Marker auf einem Agarosegel abgeschätzt.

5-10 µg des linearisierten Plasmids wurden mit 80 µl kompetenter *P. pastoris* Zellen in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette mit 2 mm Spaltweite gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit 2 kV, 25 µF, 200 Ω. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol zugegeben und 3 Stunden bei 30 °C ohne Schütteln inkubiert. Dann wurden 10, 50 und 100 µl des Ansatzes auf YPDS-Platten mit 100 µg/ml Zeocin ausplattiert und 3-10 Tage bei 30 °C inkubiert, bis Kolonien zu erkennen waren.

#### 6.4.1.6 Kolonie-PCR, Plasmidpräparation und Sequenzierung

Um die Ligation des Inserts in das Plasmid zu überprüfen, wurden 10-20 Kolonien von einer Platte mit transformierten *E. coli* mit sterilen Pipettenspitzen in PCR Gefäße überführt, auf einer LB-Agar Platte ausgestrichen und schließlich in eine Reagenzglas mit 10 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler kultiviert. Je 25 µl einer PCR-Reaktionsmischung mit den für die Klonierung des jeweiligen Konstruktes verwendeten Primern wurden in die PCR-Gefäße gegeben und die PCR gemäß dem in 6.4.1.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Wenn ein PCR-Produkt der richtigen Größe zu erkennen war, wurden Plasmidpräparationen (Genelute Plasmid Miniprep Kit, Sigma) aus den bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~ 2 kultivierten Klonen gemacht und zur Bestätigung des PCR-Ergebnisses ein analytischer Restriktionsverdau mit anschließender Gelanalyse gemacht. Das präparierte Plasmid wurde für die Expression in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Um größere Plasmidmengen für die Sequenzierung zu erhalten, wurde der jeweilige *E. coli* Novablue Stamm nochmals kultiviert und größere Mengen Plasmid präpariert. Die Sequenzierung wurde mit den unter 6.1.5 aufgeführten Primern von der Firma SRD, Frankfurt, durchgeführt.

#### 6.4.1.7 Überprüfung der genomischen Integration bei *P. pastoris*

Auf Zeocin-haltigem YPDS-Medium selektierte Kolonien wurden in 10 ml MD-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> = 5-10 kultiviert und durch Zentrifugation bei 1500 g geerntet. Die Zellen wurden mit sterilem Wasser gewaschen und bei – 20° C eingefroren. Das Pellet wurde mit 2 ml SCED Puffer aufgetaut und mit 0,1 – 0,3 mg Lyticase 50 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Zellen zu spheroblastieren. Von den spheroblastierten und teilweise schon lysierten Zellen wurde 1 µl als Template für eine analytische PCR mit AOX spezifischen Primern verwendet.

#### 6.4.1.8 Herstellung von Glycerolkulturen

*E. coli* und *P. pastoris* wurden in LB- bzw. YEPD-Medium bis zur mittleren exponentiellen Phase kultiviert und 900 µl davon zu 100 µl steriler 80 % (m/v) Glycerollösung in verschraubbaren Kunststoffkryogefäßen gegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Kultur in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80°C gelagert. BL21(DE3)-Expressionsstämme wurden nicht als Glycerolkulturen gelagert, sondern vor einer Expression frisch transformiert.

## 6.4.2 Proteinbiochemische Methoden

### 6.4.2.1 Proteinexpression

#### *E. coli*

Für Expressionsversuche wurden die entsprechenden Plasmide jeweils frisch transformiert. Von einer der erhaltenen Kolonien wurde eine Vorkultur in 10 ml LB Medium in einem Reagenzglas angesetzt und bei 37 °C kultiviert. Die Kultivierung erfolgte immer in Gegenwart des für die Erhaltung des Selektionsdrucks notwendigen Antibiotikums. Die Hauptkultur wurde in Erlenmeyerkolben verschiedener Größe mit 20 % Medium bezogen auf das Kolbenvolumen durchgeführt. Es wurde aus der exponentiellen Phase auf eine  $OD_{600} \leq 0,1$  angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,2$  kultiviert. Dann wurde die Temperatur des Inkubators auf die entsprechende Expressionstemperatur eingestellt und bei einer  $OD = 0,6 \pm 0,1$  mit der entsprechenden Menge IPTG induziert. Mit Ausnahme der Versuche zum Einfluss der IPTG-Konzentration wurde stets mit 0,2 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgt über unterschiedlich lange Zeiträume. Für die Bestimmung von Expressionsprofilen erfolgte die Expression in 400 ml LB Medium und es wurden 50 ml Proben zu verschiedenen Zeitpunkten genommen. Die Proben wurden sofort bei 5000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und bei -20 °C eingefroren.

#### *P. pastoris*

Nachdem die Integration von *AtCCD1* mittels Kultivierung auf Zeocin-haltigem Medium und PCR bestätigt worden war, wurden die Stämme entweder in MD- oder MGY-Medium in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 30 °C kultiviert, um Biomasse zu erzeugen. Bei einer  $OD_{600} = 4-6$  wurde das Medium durch MM-Medium ersetzt, um den AOX-Promotor zu induzieren. Die Kultur wurde für mindestens 24 Stunden weiterinkubiert und dann durch Zentrifugation geerntet. Bei längerer Kultivierungsdauer wurden täglich 0,5 % (v/v) Methanol nachgefüttert.

### 6.4.2.2 Gewinnung von Rohextrakten und Solubilisierung

#### *E. coli*

Die eingefrorenen Zellpellets wurden mit einer geeigneten Menge an PBS (meist eine 40x Aufkonzentrierung im Vergleich zum Medium) auf Eis aufgetaut. Die resuspendierten Zellen wurden nach Zugabe von 1 mM PMSF in einem Eisbad mittels Ultraschall aufgeschlossen. Hierfür wurde mit einer Sonotrode (Branson, Sonifier) mit einer Spitze mit 5 mm Durchmesser, einer Amplitude von 20 % und einer Beschallungsdauer von 4 Minuten (1 Sekunde Beschallung, 1 Sekunde Pause) beschallt. Zu dem auf diese Weise erhaltenen Lysat wurde 1 µl Benzonase zur

Verringerung der Viskosität gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Solubilisierungsexperimente wurde entweder ein entsprechendes Volumen einer 10x konzentrierten Stammlösung, oder das entsprechende Volumen PBS, zur Kontrolle zugegeben. Die Ansätze wurden im Thermomixer bei 4 °C und 400 rpm für 20 Minuten inkubiert. In allen Fällen wurde das Lysat zur Gewinnung der Zellextrakte bei 10.000 g für 15 Minuten zentrifugiert.

#### *P. pastoris*

Die eingefrorenen Zellpellets wurden mit einem Zehntel des ursprünglichen Kulturvolumens an PBS mit 1 mM PMSF auf Eis aufgetaut. Ein der Probe entsprechendes Volumen an Glasperlen (säuregewaschen,  $\varnothing = 0,5$  mm) wurde zu den resuspendierten Zellen gegeben und insgesamt acht mal 30 Sekunden gevortext und 30 Sekunden auf Eis gekühlt. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 10.000 rpm wurde ein zellfreier Extrakt erhalten, der für SDS-PAGE Analyse und Aktivitätstest eingesetzt wurde.

#### **6.4.2.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung**

Zellextrakte wurden durch einen 0,22  $\mu$ m Filter vor der Aufreinigung filtriert. Die affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte mit dem Äkta Explorer Chromatographiesystem (Amersham Biosciences). Für die Aufreinigung wurden die Zellextrakte im jeweiligen Bindepuffer gewonnen. Es wurden Methoden zur automatisierten Aufreinigung mittels GST- oder His<sub>6</sub>-Affinitätschromatographie entwickelt. Generell wurde hierbei der Zellextrakt 2-3 Mal mittels Probenpumpe über die entsprechende Affinitätssäule (1 ml oder 5 ml Säulenvolumen) gepumpt und der Durchfluss zurückgewonnen. Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina Bindepuffer gewaschen und schließlich das gebundene Protein mittels Elutionspuffer eluiert. Für die Elution des His<sub>6</sub>-getaggtten Proteins wurde ein Elutionsmittelgradient angelegt, um unspezifisch gebundenes Protein zu eluieren. Das Eluat wurde im Probensammler in 2 ml Fraktionen eluiert. Die Aufreinigung wurde bei 280 nm verfolgt und es wurden an verschiedenen Stellen Proben genommen, um den Aufreinigungserfolg beurteilen zu können. Die rekombinantes Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und direkt nach der Aufreinigung mittels Ultrafiltration (Amicon, 30 kDa Zentrifugenröhrchen, Millipore) in PBS umgepuffert (mindestens eine 100x Verdünnung des Elutionspuffers).

#### **6.4.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bicinchinonsäure-Assay (BCA) verwendet, da hierbei auch höhere Tensidkonzentrationen nicht stören.

Gesamtproteinkonzentrationen wurden in einer Mikrotiterplatte mit einem kommerziell erhältlichen BCA-Assay Kit (Pierce) mit Rinderserumalbuminstandards (BSA) als Referenz bestimmt. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 37°C, einer Inkubationsdauer von 20 Minuten und in Dreifachbestimmung durchgeführt. Dabei wurden bei jeder Messung BSA-Standards bis zu einer Konzentration von 2000 µg BSA/ml zur Erstellung einer Kalibriergeraden mitgeführt.

#### **6.4.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und densitometrische Gelanalyse**

Für die gelelektrophoretische Trennung von Zellextrakten und aufgereinigten Präparationen mittels SDS-PAGE wurden 10 % und 15 % SDS-Polyacrylamidgele mit folgender Zusammensetzung eingesetzt.

	10 % (15%) SDS-PA-Gel
<u>Trenngel</u>	
Puffer	1,25 ml
H <sub>2</sub> O	5,645 (4,4) ml
Polyacyl/Bisacrylamid (29:1, 40%)	2,5 (3,75) ml
10 % SDS	100 µl
1,5 % APS	500 µl
TEMED	5 µ
<u>Sammelgel</u>	
Puffer	1,67 ml
H <sub>2</sub> O	3,770 ml
Polyacyl/Bisacrylamid (29:1, 40%)	0,83 ml
10 % SDS	67 µl
1,5 % APS	333 µl
TEMED	5 µl

Zellextrakte wurden mit 5 x Probenpuffer versetzt, Zellpellets mit dem ursprünglichen Lysatvolumen an 1 x Probenpuffer versetzt und die Proben für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Gele wurden mit 10 µl Probe pro Tasche beladen und die elektrophoretische Trennung bei 200 V für 40 Minuten (10 % Gele) bzw. 60 Minuten (15 % Gele) durchgeführt. Anschließend wurden die Gele in einem Färbbad mit Färbelösung 1 Stunde gefärbt und anschließend für mindestens 1 Stunde mit mehrmaligem Tausch der Entfärbelösung entfärbt. Die Reinheit der aufgereinigten Proteine wurde mittels densitometrischer Gelanalyse bestimmt (Biodoc Analyse, Biometra). Linearität der densitometrischen Messung wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von Lysozym und BSA sichergestellt. So konnte der Anteil des

Zielproteins in den Fraktionen der Aufreinigungen bestimmt werden. Die Multiplikation mit der zuvor bestimmten BCA-Konzentration ergab die Konzentration des Zielproteins in der Fraktion. Hieraus wurde über die molare Masse des jeweiligen Proteins die molare Konzentration zur Berechnung der molaren Aktivitäten und von  $k_{\text{cat}}$  bestimmt.

#### 6.4.2.6 Western Blotting

Zum Nachweis des mit einem His<sub>6</sub>-Tag versehenen AtCCD1 aus *P. pastoris* wurden Western Blots mit Anti-His<sub>6</sub>(C-term)-HRP Antikörper (Invitrogen) durchgeführt. Nach der Trennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine mit der Mini-Trans-Blot Cell auf eine 0,45 µm Nitrocellulosemembran (Bio-Rad) gemäß dem Herstellerprotokoll überführt. Der Transfer erfolgte in Transfer-Puffer bei einer konstanten Spannung von 30 V für 16 Stunden. Die Membran wurde drei Mal mit destilliertem Wasser gespült und dann eine Stunde in Blocking Puffer geschwenkt. Anschließend wurde 2 x 5 Minuten mit PBST gewaschen und dann 25 ml Blocking Puffer mit 5 µl Anti-His<sub>6</sub>-HRP zugegeben und für ein bis zwei Stunden inkubiert. Dann wurde erneut 2 x 5 Minuten mit 20 PBST gewaschen und die Membran schließlich mit Detektionslösung (TMB Liquid Substrate System, Sigma) inkubiert, bis eine deutliche Färbung zu erkennen war. Die Färbereaktion wurde durch Spülen mit destilliertem Wasser unterbrochen.

### 6.4.3 Vermittlung der Substrate und Aktivitätsassays

#### 6.4.3.1 Mizellare *in vitro* Vermittlung der Substrate

##### *AtCCD1*

Drei unterschiedliche Methoden der mizellaren Solubilisierung der Carotinoide wurden eingesetzt.

1. Das Substrat wurde in einem organischen Lösungsmittel (z.B. Ethanol oder THF) gelöst. Diese Lösung wurde zu einem Tensidmizellen enthaltenden Puffer gegeben und durch sofortiges Mischen in mizellare Lösung gebracht.
2. Das Substrat wurde in einem organischen Lösungsmittel gelöst und dann mit reinem Tensid gemischt. Anschließend wurde bei Bedarf das Lösungsmittel durch Stickstoffbegasung und unter Vakuum entfernt. Schließlich wurde Puffer zugegeben und so das mizellar solubiliertes Substrat erhalten.
3. Das Substrat wurde direkt in Tensid gelöst. Durch Erhitzen im Wasserbad und Beschallung im Ultraschallbad wurde das Substrat beispielsweise direkt in Triton X-100 gelöst. Hierzu wurde Puffer gegeben, um wässrig mizellar solubiliertes Substrat zu erhalten.

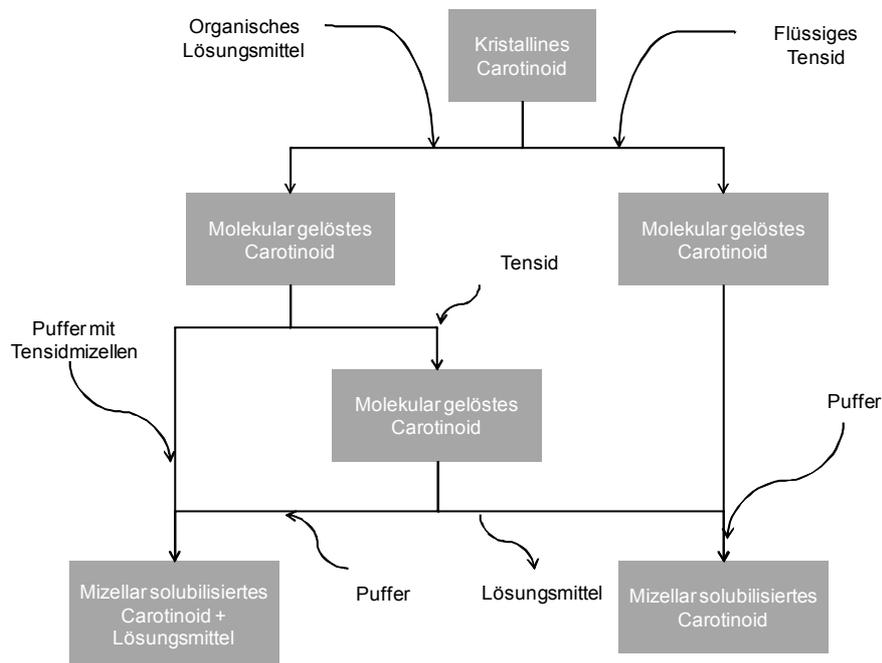


Abb. 40: Unterschiedliche Methoden zur mizellaren Solubilisierung von Carotinoiden in wässrigen Systemen.

Für die kinetische Charakterisierung des Enzyms wurden Stammlösungen von mizellar solubilierten Carotinoiden ohne organisches Lösungsmittel verwendet und die Substratkonzentration bei einem konstanten molaren Verhältnis von 0,008 mol Substrat pro mol Tensid gemäß dem Surface Dilution Model variiert (Deems 2000). Hierbei kommt es bei einer konstanten Substratkonzentration an der Grenzfläche zu einer Vergrößerung der Grenzfläche durch die zunehmende Mizellenkonzentration. Aktivitätsmessungen für die Expressionsstudien wurden stets mit dem gleichen Assay in Mikrotiterplatten bei 30 °C mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

10 % (m/v) Stammlösung 0,008 mol Apocarotinal /mol Triton (= 0,525 g/L Apocarotinal und 99,475 g/L Triton in PBS)	10 µl
PBS	60 µl
Ethanol	10 µl
Zellextrakt	20 µl
	100 µl

### Soja-Lipoxygenase (LOX)

Für die LOX-katalysierte cooxidative Spaltung von  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal wurde zusätzlich eine mizellare Stammlösung 10 g/l Linolsäure mit 90 g/l Triton hergestellt. Die Assaybestandteile wurden in folgender Reihenfolge gemischt und die Reaktion durch Zugabe von LOX (Sigma) gestartet:

10 % (m/v) Stammlösung 0,008 mol Apocarotinal /mol Triton (= 0,525 g/L Apocarotinal und 99,475 g/L Triton in PBS)	10 $\mu$ l
Stammlösung Triton + Linolsäure	10 $\mu$ l
PBS	50 $\mu$ l
Ethanol	10 $\mu$ l
LOX in PBS (7,2 U/ml)	20 $\mu$ l
	100 $\mu$ l

#### 6.4.3.2 Herstellung von carotinoidbeladenen Phospholipidvesikeln

Phospholipidvesikel mit Carotinoid wurden in Anlehnung an Methode 2 (6.4.3.1) hergestellt. Carotinoid und Soja-Lecithin (Sigma, > 40 % Phosphatidylcholin) wurden in THF gelöst und in einem Reagenzglas in einem Verhältnis von 0,5 mg  $\beta$ -Carotin zu 40 mg Soja-Lecithin gemischt. Das Lösungsmittel wurde mit Stickstoff entfernt, wobei die Temperatur durch ein Wasserbad über 10 °C gehalten wurde, um eine Präzipitation des Substrats in der Phospholipidumgebung zu vermeiden. Anschließend wurde Tris-Puffer (pH 7,4) bei Zimmertemperatur zugegeben, um eine 20 mg/ml Phospholipidsuspension zu erhalten. Es wurde intensiv für 5 – 10 Minuten gevortext, um die Phospholipide zu hydratisieren. Schließlich wurde mit der Sonotrode (Branson Sonifier) für 2 – 4 Minuten bei 10 % Amplitude mit Kühlung durch ein Wasserbad beschallt, bis eine transparente, leicht opake Lösung erhalten wurde. Diese Lösung wurde 1:1 mit einem Zellextrakt gemischt und die Produktbildung mittels GC/MS analysiert.

#### 6.4.3.3 *In vivo* Farbkomplementierungsassay

Die enzymatische *in vivo* Aktivität gegenüber  $\beta$ -Carotin in *E. coli* wurde mittels eines *in vivo* Komplementierungsassays ermittelt. Hierfür wurde der freundlicherweise von Herrn Prof. Gerhard Sandmann, Universität Frankfurt, zur Verfügung gestellte *E. coli* Stamm JM101 pAC-CAR16DcrtX eingesetzt. Dieser exprimiert die Carotinoidbiosyntheseenzyme von *Erwinia herbicola* und entwickelt eine orange-rote Farbe aufgrund der Akkumulation von  $\beta$ -Carotin. Von diesem Stamm wurden elektrokompente Zellen hergestellt und der Expressionsvektor pGEX-4T-AtCCD1 sowie der Kontrollvektor pGEX-4T transformiert. Beide Stämme wurden bei 30 °C in

LB-Medium für 20 Stunden ohne Induktion mit IPTG exprimiert. Die Zellen wurden sedimentiert und 1 ml Überstand mit 250 µl Chloroform extrahiert und mittels GC/MS analysiert. Die sedimentierten Zellen wurden in der gleichen Menge Puffer resuspendiert und mit Ultraschall lysiert. Von dem Lysat wurde 1 ml mit 250 µl Chloroform extrahiert und mittels GC/MS analysiert.

## 6.4.4 Analytische Methoden

### 6.4.4.1 Spektrophotometrische Assays und Datenprozessierung

Die spektrophotometrischen Zeitreihenmessungen wurden in einem Wellenlängenbereich zwischen 300 und 600 nm durchgeführt (Lambda 25, Perkin Elmer). Die kinetische Messung der Substratspaltung im mizellaren System erfolgte in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration bei 510 nm oder 560 nm in einem Assayvolumen von 100 µl in der Mikrotiterplatte und einer Temperatur von 30 °C. Ab Konzentrationen von größer als 200 µM Apocarotinal wurde bei 560 nm gemessen. Es wurde ein Messwert pro Kavität und Minute aufgenommen. Zunächst wurde durch Kontrollmessungen sichergestellt, dass Zellextrakte der Expressionsstämme mit den entsprechenden leeren Expressionsplasmiden (ohne AtCCD1) keine Carotinoidspaltungsaktivität zeigten. Danach wurden als photometrische Kontrollmessungen Ansätze ohne Zellextrakt zur Bestimmung der chemischen (Oxidation) bzw. physikochemischen (Präzipitation) Substratstabilität mitgeführt. Bei Einsatz von Zellextrakten und höheren Lösungsmittelkonzentrationen im Assay (z.B. Ethanol > 10 % (v/v)) wurden Ansätze ohne Substrat mitgeführt, um eine Kontrolle für die hierbei auftretenden Denaturierungserscheinungen von Extraktkomponenten und der damit verbundenen Absorptionzunahme zu haben. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Substratkonzentration wurde durch Kalibrationsgeraden mit Standardlösungen bestimmt.

Die Rohdaten der Messung wurden für die weitere Prozessierung nach Excel (Microsoft) exportiert. Da die maximalen Steigungen der Kontrollmessungen oft nicht zeitgleich mit den Umsätzen stattfanden, wurden zunächst die Kontrollmessungen punktweise von den Umsätzen mit Excel (Microsoft) abgezogen. Für die Bestimmung der maximalen Steigung der resultierenden Kurven wurde mit Origin (Originlabs) nach dem Savitzky-Golay Verfahren mit einem Polynom 2. Ordnung über fünf Punkte geglättet und numerisch differenziert (Savitzky et al., 1964). Der hieraus gewonnene Datensatz wurde zurück nach Excel exportiert und die maximale Steigung und deren Zeitpunkt über eine Maximumsuche (Funktion MAX) bestimmt. Der ermittelte Zeitpunkt wurde verwendet, um die zugehörige Absorption aus den Rohdaten zu bestimmen. Aus der Anfangsabsorption und der Absorption bei maximaler

Geschwindigkeit wurde der Anteil an umgesetztem Substrat zu diesem Zeitpunkt bestimmt.

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter wurde eine gewichtete nicht-lineare Regression mit der Michaelis-Menten Gleichung mit Origin durchgeführt. Als Gewichtungsfaktoren wurden die Standardabweichungen der Reaktionsgeschwindigkeit bei der jeweiligen Substratkonzentration verwendet.

#### **6.4.4.2 Flüssig- und gaschromatographische Analyse von Substratspaltung und Produktbildung**

Zusätzlich zur photometrischen Messung der Substratspaltung erfolgten während der Assayentwicklung Messungen mittels HPLC/DAD. Hierfür wurden mehrere mizellare Assays (vgl. 6.4.3.1) gleichzeitig gestartet, zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von HCl inaktiviert und anschließend mittels NaOH neutralisiert. Die Proben wurden 10 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um präzipitierte Zellextraktbestandteile zu sedimentieren, und dann mittels HPLC analysiert. Die Quantifizierung von  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal und von  $\beta$ -Ionon erfolgte über einen externen Standard.

Für den qualitativen Nachweis der Produktbildung wurden 1ml Umsätze mit 200  $\mu$ l Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und mittels GC/MS analysiert. Die Identifizierung der Produkte erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit einem Standard. Wenn kein Standard verfügbar war, wurde das Massenspektrum des jeweiligen Produktes mit einer Bibliothek von Massenspektren verglichen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Acharya, K. R., Bhattacharya, S. C., Moulik, S. P. (1997) The surfactant concentration-dependent behaviour of safranin T in Tween (20, 40, 60, 80) and Triton X-100 micellar media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 109:29
- Aguedo, M., Ly, M. H., Belo, I., Teixeira, J., Belin, J.-M., Waché, Y. (2004) The use of enzymes and Microorganisms for the production of aroma compounds from lipids. *Food Technology and Biotechnology* 42:327-336
- Aramaki, K., Olsson, U., Yamaguchi, Y., Kunieda, H. (1999) Effect of water-soluble alcohols on surfactant aggregation in the C<sub>12</sub>EO<sub>8</sub> system. *Langmuir* 15:6226-6232
- Atwal, A. S., Bisakowski, B., Richard, S., Robert, N., Lee, B. (2005) Cloning and secretion of tomato hydroperoxide lyase in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* 40:95-102
- Auldridge, M. E., Block, A., Vogel, J. T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D., McCarty, D. R., Klee, H. J. (2006a) Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant Journal* 45:982-93
- Auldridge, M. E., McCarty, D. R., Klee, H. J. (2006b) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology* 9:315-21
- Auldridge, M. E., McCarty, D. R., Klee, H. J. (2006c) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* 9:315-21
- Auweter, H., Haberkorn, H., Heckmann, W., Horn, D., Luddecke, E., Rieger, J., Weiss, H. (1999) Supramolecular Structure of Precipitated Nanosized  $\beta$ -Carotene Particles. *Angewandte Chemie International Edition* 38:2188-2191
- Aziz, S., Wu, Z., Robinson, D. S. (1999) Potato lipoxygenase catalysed co-oxidation of  $\beta$ -carotene. *Food Chemistry* 64:227-230
- Banerjee, P., Joo, J. B., Buse, J. T., Dawson, G. (1995) Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents. *Chemistry and Physics of Lipids* 77:65-78

- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10:411
- Ben Aziz, A., Grossman, S., Ascarelli, I., Budowski, P. (1971) Carotene-bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method. *Phytochemistry* 10:1445-1452
- Benade, J. Synthese von polaren und amphiphilen Carotinoiden und ihr Aggregationsverhalten in wässrigen Systemen. INAUGURAL-DISSERTATION, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2001.
- Berg, O. G., Gelb, M. H., Tsai, M. D., Jain, M. K. (2001) Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. *Chemical Reviews* 101:2613-54
- Bergantino, E., Segalla, A., Brunetta, A., Teardo, E., Rigoni, F., Giacometti, G. M., Szabo, I. (2003) Light- and pH-dependent structural changes in the PsbS subunit of photosystem II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:15265-70
- Bhattacharya, S. C., Palepu, R. M. (2004) Micellization of Nonionic Surfactants: Tweens - A Review. *Journal of Surface Science and Technology* 20:159-177
- Billsten, H. H., Sundstrom, V., Polivka, T. (2005) Self-assembled aggregates of the carotenoid zeaxanthin: Time-resolved study of excited states. *Journal of Physical Chemistry A* 109:1521-9
- Bittova, L., Sumandea, M., Cho, W. (1999) A structure-function study of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2. Identification of essential calcium ligands and hydrophobic membrane binding residues. *The Journal of Biological Chemistry* 274:9665-72
- Bogdanov, M., Dowhan, W. (1999) Lipid-assisted protein folding. *The Journal of Biological Chemistry* 274:36827-30
- Bonk, M., Hoffmann, B., Von Lintig, J., Schledz, M., Al-Babili, S., Hobeika, E., Kleinig, H., Beyer, P. (1997) Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes in vitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *European Journal of Biochemistry* 247:942-50
- Borel, P., Grolier, P., Armand, M., Partier, A., Lafont, H., Lairon, D. A.-B. V. (1996) Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *Journal of Lipid Research* 37:250-261
- Bosser, A., Papolorey, E., Belin, J. M. (1995) A simple way to (+/-)-Dihydroactinidiolide from  $\beta$ -ionone related to the enzymic co-oxidation of  $\beta$ -carotene in aqueous solution. *Biotechnol. Prog.* 11:689-692

- Bouvier, F., Hugueney, P., d' Harlingue, A., Kuntz, M., Camara, B. (1994) Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *The Plant Journal* 6:45-54
- Bouvier, F., Isner, J.-C., Dogbo, O., Camara, B. (2005) Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends in Plant Science* 10:187
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J., Camara, B. (2003) Oxidative Remodeling of Chromoplast Carotenoids: Identification of the Carotenoid Dioxygenase CsCCD and CsZCD Genes Involved in Crocus Secondary metabolite Biogenesis. *Plant Cell* 15:47-62
- Breitenbach, J., Sandmann, G. (2005) zeta-Carotene cis isomers as products and substrates in the plant poly-cis carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta* 220:785-93
- Bretthauer, R. K., Castellino, F. J. (1999) Review: Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 30:193-200
- Britton, G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* 9:1551-8
- Cabrita, L. D., Dai, W., Bottomley, S. P. (2006) A family of *E. coli* expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotechnology* 6:12
- Candau, R., Bejarano, E. R., Cerda-Olmedo, E. (1991) In vivo channeling of substrates in an enzyme aggregate for beta-carotene biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:4936-40
- Carman, G. M., Deems, R. A., Dennis, E. A. (1995a) Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics. *The Journal of Biological Chemistry* 270:18711-4
- Carman, G. M., Deems, R. A., Dennis, E. A. (1995b) Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics. *J Biol Chem* 270:18711-4
- Carnero Ruiz, C., Molina-Bolivar, J. A., Aguiar, J. (2001) Thermodynamic and Structural Studies of Triton X-100 Micelles in Ethylene Glycol-Water Mixed Solvents. *Langmuir* 17:6831-6840
- Cereghino, J. L., Cregg, J. M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24:45-66

- Chandler, D. (2005) Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* 437:640-7
- Cornish-Bowden, A., *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Revised edition ed.; Portland Press Ltd.: London, 2001; p 1-331.
- Couderc, R., Baratti, J. (1980) Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry* 44:2279-2289
- Craft, N. E., Joseph H. Soares, J. (1992) Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and beta-Carotene in Organic Solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:431-434
- Cunningham, F. X., Jr., Gantt, E. (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Reviews: Plant Physiology and Molecular Biology* 49:557-583
- Cunningham, F. X., Jr., Gantt, E. (2005) A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. *Plant Journal* 41:478-92
- Cunningham, F. X., Jr., Gantt, E. (2007) A portfolio of plasmids for identification and analysis of carotenoid pathway enzymes: *Adonis aestivalis* as a case study. *Photosynthesis Research* 92:245-59
- Davis, G. D., Elisee, C., Newham, D. M., Harrison, R. G. (1999) New Fusion Protein Systems Designed to Give Soluble Expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 65:382-388
- Deems, R. A. (2000) Interfacial enzyme kinetics at the phospholipid/water interface: practical considerations. *Analytical Biochemistry* 287:1-16
- Deems, R. A., Eaton, B. R., Dennis, E. A. (1975) Kinetic analysis of phospholipase A2 activity toward mixed micelles and its implications for the study of lipolytic enzymes. *J Biol Chem* 250:9013-20
- Diez, E., Mong, S. (1990) Purification of a phospholipase A2 from human monocytic leukemic U937 cells. Calcium-dependent activation and membrane association. *The Journal of Biological Chemistry* 265:14654-61
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., Glick, B. R. (1996) Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac Promotor. *Journal of Industrial Microbiology* 16:145-54
- Dwars, T., Paetzold, E., Oehme, G. (2005) Reactions in micellar systems. *Angewandte Chemie International Edition* 44:7174-99

- Eisenthal, R., Peterson, M. E., Daniel, R. M., Danson, M. J. (2006) The thermal behaviour of enzyme activity: implications for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 24:289-92
- Engel, R., Knorr, D. (2004) Herstellung flüssiger, wasserdispergierbarer Phytosterol-Formulierungen zur Verbesserung der Dosiswirkung in Lebensmittelsystemen. *Chemie Ingenieur Technik* 76:450-453
- Esposito, D., Chatterjee, D. K. (2006a) Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr Opin Biotechnol* 17:353-8
- Esposito, D., Chatterjee, D. K. (2006b) Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology* 17:353-8
- Fabry, B. (1991) Tenside. Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendungen. *Chemie in unserer Zeit* 25:214-222
- Fadnavis, N. W., Seshadri, R., Sheelu, G., Madhuri, K. V. (2005) Relevance of Frank's solvent classification as typically aqueous and typically non-aqueous to activities of firefly luciferase, alcohol dehydrogenase, and alpha-chymotrypsin in aqueous binaries. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433:454-65
- Feng, J., Wehbi, H., Roberts, M. F. (2002) Role of tryptophan residues in interfacial binding of phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *The Journal of Biological Chemistry* 277:19867-75
- Fichan, I., Larroche, C., Gros, J. B. (1999) Water Solubility, Vapor Pressure and Activity Coefficients of Terpenes and Terpenoids. *J. Chem. Eng. Data* 44:56-62
- Fleischmann, P., Studer, K., Winterhalter, P. (2002) Partial purification and kinetic characterization of a carotenoid cleavage enzyme from quince fruit (*Cydonia oblonga*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1677-1680
- Fleischmann, P., Watanabe, N., Winterhalter, P. (2003) Enzymatic carotenoid cleavage in star fruit (*Averrhoa carambola*). *Phytochemistry* 63:131-137
- Fox, J. D., Kapust, R. B., Waugh, D. S. (2001) Single amino acid substitutions on the surface of *Escherichia coli* maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. *Protein Science* 10:622-30
- Fraser, P. D., Bramley, P. M. (2004a) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43:228-65
- Fraser, P. D., Bramley, P. M. (2004b) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43:228-65

- Fraser, P. D., Shimada, H., Misawa, N. (1998) Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation; elucidated using a direct substrate in vitro assay. *European Journal of Biochemistry* 252:229-236
- Garavito, R. M., Ferguson-Miller, S. (2001) Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. *The Journal of Biological Chemistry* 276:32403-32406
- Goodman, D. S., Huang, H. S. (1965) Biosynthesis Of Vitamin A With Rat Intestinal Enzymes. *Science* 149:879-80
- Goodman, D. S., Huang, H. S., Kanai, M., Shiratori, T. (1967a) The Enzymatic Conversion of all-trans  $\beta$ -Carotene into Retinal. *The Journal of Biological Chemistry* 242:3543-3554
- Goodman, D. S., Huang, H. S., Kanai, M., Shiratori, T. (1967b) The Enzymatic Conversion of All-trans beta-Carotene into Retinal. *The Journal of Biological Chemistry* 242:3543-3554
- Goodman, D. S., Huang, H. S., Shiratori, T. (1966) Mechanism of the biosynthesis of vitamin A from beta-carotene. *J Biol Chem* 241:1929-32
- Hadden, W. L., Watkins, R. H., Levy, L. W., Regalado, E., Rivadeneira, D. M., van Breemen, R. B., Schwartz, S. J. (1999) Carotenoid Composition of Marigold (*Tagetes erecta*) Flower Extract Used as Nutritional Supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:4189-4194
- Henry, L. K., Catignani, G. L., Schwartz, S. J. (1998) Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and all-trans  $\beta$ -carotene. *Journal of American Oil Chemists' Society* 75:823-829
- Himmelbach, A., Iten, M., Grill, E. (1998) Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 353:1439-44
- Hoffmann, F., van den Heuvel, J., Zidek, N., Rinas, U. (2004) Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme and Microbial Technology* 34:235-241
- Horn, D., Rieger, J. (2001) Organische Nanopartikel in wässriger Phase. *Angewandte Chemie* 113:4460-4492
- Huang, H., Liu, J., de Marco, A. (2006) Induced fit of passenger proteins fused to Archaea maltose binding proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344:25-9
- Jana, S., Deb, J. K. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:289-98

- Joos, P., Tomoaia-Cotisel, A., Sellers, A. J., Tomoaia-Cotisel, M. (2004) Adsorption kinetics of some carotenoids at the oil/water interface. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* 37:83-91
- Jorgensen, K., Rasmussen, A. V., Morant, M., Nielsen, A. H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S., Moller, B. L. (2005) Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Current Opinion in Plant Biology* 8:280-91
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H., Yano, M. (2004) Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes during Maturation in Citrus Fruit. *Plant Physiology* 134:824-837
- Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Okuda, H., Yano, M. (2006) The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *Journal of Experimental Botany* 57:2153-2164
- Kloer, D. P., Ruch, S., Al-Babili, S., Beyer, P., Schulz, G. E. (2005) The structure of a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Science* 308:267-9
- Kloer, D. P., Schulz, G. E. (2006) Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:2291-303
- Korf, U., Kohl, T., van der Zandt, H., Zahn, R., Schleege, S., Ueberle, B., Wandschneider, S., Bechtel, S., Schnolzer, M., Otteleben, H., Wiemann, S., Poustka, A. (2005) Large-scale protein expression for proteome research. *Proteomics* 5:3571-80
- Korger, M. Aggregationsverhalten von Carotinoiden in Membranen unilamellarer Liposomen. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2005.
- Kupcsulik, B., Sevelle, B. (2004) Effect of Methanol concentration on the recombinant *pichia pastoris* mut<sup>S</sup> fermentation. *Per. Pol. Chem. Eng.* 48:73-87
- Latowski, D., Akerlund, H.-E., Strzalka, K. (2004) Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, requires lipid inverted hexagonal structures for its activity. *Biochemistry* 43:4417-4420
- Latowski, D., Kruk, J., Burda, K., Skrzynecka-Jaskier, M., Kostecka-Gugala, A., Strzalka, K. (2002) Kinetics of violaxanthin de-epoxidation by violaxanthin de-epoxidase, a xanthophyll cycle enzyme, is regulated by membrane fluidity in model lipid bilayers. *European Journal of Biochemistry* 269:4656-4665
- Lee, D. H., Kim, W. H., Kweon, D. H., Seo, J. H. (2004) Consortium of fold-catalyzing proteins increases soluble expression of cyclohexanone monooxygenase in

- recombinant *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology 63:549-552
- Lilie, H., Schwarz, E., Rudolph, R. (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. Current Opinion in Biotechnology 9:497-501
- Lindqvist, A., Andersson, S. (2002) Biochemical Properties of Purified Recombinant Human beta-Carotene 15,15'-Monooxygenase. The Journal of Biological Chemistry 239:42-23948
- Lu, Q. (2005) Seamless cloning and gene fusion. Trends in Biotechnology 23:199-207
- Marasco, E. K., Vay, K., Schmidt-Dannert, C. (2006) Identification of Carotenoid Cleavage Dioxygenases from *Nostoc* sp. PCC 7120 with Different Cleavage Activities. The Journal of Biological Chemistry 281:31583-93
- Mathieu, S., Bigey, F., Procureur, J., Terrier, N., Gunata, Z. (2007a) Production of a recombinant carotenoid cleavage dioxygenase from grape and enzyme assay in water-miscible organic solvents. Biotechnology Letters 29:837-41
- Mathieu, S., Bigey, F., Procureur, J., Terrier, N., Gunata, Z. (2007b) Production of a recombinant carotenoid cleavage dioxygenase from grape and enzyme assay in water-miscible organic solvents. Biotechnol Lett 29:837-41
- Merchant, S., Sawaya, M. R. (2005) The light reactions: a guide to recent acquisitions for the picture gallery. Plant Cell 17:648-63
- Meyer, K. (2002) Carotinoide - Bedeutung und technische Synthese. Chemie in unserer Zeit 36:178-192
- Mimoun, H. (1996) Catalytic Opportunities in the Flavor and Fragrance Industry. Chimia 50:620-625
- Mínguez-Mosquera, M. I., Hornero-Méndez, D. (1993) Separation and Quantification of the Carotenoid Pigments in Red Peppers (*Capsicum annuum* L.), Paprika, and Oleoresin by Reversed-Phase HPLC. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41:1616-1620
- Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima, K. (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 172:6704-12
- Molina-Bolivar, J. A., Aguiar, J., Peula-Garcia, J. M., Ruiz, C. C. (2002) Photophysical and light scattering studies on the aggregation behaviour of Triton X-100 in formamide-water mixed solvents. 100:3259-3269

- Moore, T. (1929) Vitamin A and carotene: The association of vitamin A activity with carotene in the carrot root. *Biochemical Journal* 23:803-11
- Mordi, R. C., Walton, J. C., Burton, G. W., Hughes, L., Ingold, K. U., Lindsay, D. A. (1991) Exploratory Study of  $\beta$ -Carotene Autoxidation. *Tetrahedron Letters* 32:4203-4206
- Mordi, R. C., Walton, J. C., Burton, G. W., Hughes, L., Ingold, K. U., Lindsay, D. A., Moffatt, D. J. (1993) Oxidative Degradation of  $\beta$ -Carotene and  $\beta$ -Apo-8'-carotenal. *Tetrahedron* 49:911-928
- Mozhaev, V. V., Khmelnitsky, Y. L., Sergeeva, M. V., Belova, A. B., Klyachko, N. L., Levashov, A. V., Martinek, K. (1989) Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures. Alpha-chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents. *European Journal of Biochemistry* 184:597-602
- Nallamsetty, S., Waugh, D. S. (2006) Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. *Protein Expression and Purification* 45:175-82
- Nomine, Y., Ristriani, T., Laurent, C., Lefevre, J. F., Weiss, E., Trave, G. (2001a) Formation of soluble inclusion bodies by hpv e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein. *Protein Expression and Purification* 23:22-32
- Nomine, Y., Ristriani, T., Laurent, C., Lefevre, J. F., Weiss, E., Trave, G. (2001b) A strategy for optimizing the monodispersity of fusion proteins: application to purification of recombinant HPV E6 oncoprotein. *Protein Engineering* 14:297-305
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S., Sumitomo, K. (2006) Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology* 142:1193-201
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J., Sandmann, G. (2006) Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Molecular Genetics and Genomics* 275:148-58
- Oldham, M. L., Brash, A. R., Newcomer, M. E. (2005) Insights from the X-ray crystal structure of coral 8R-lipoxygenase: calcium activation via a C2-like domain and a structural basis of product chirality. *J Biol Chem* 280:39545-52
- Olson, J. A., Hayaishi, O. (1965) The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 54:1364-70

- Pande, A. H., Qin, S., Tatulian, S. A. (2005) Membrane fluidity is a key modulator of membrane binding, insertion, and activity of 5-lipoxygenase. *Biophysical Journal* 88:4084-94
- Patist, A., Kanicky, J. R., Shukla, P. K., Shah, D. O. (2002a) Importance of micellar kinetics in relation to technological processes. *J Colloid Interface Sci* 245:1-15
- Patist, A., Kanicky, J. R., Shukla, P. K., Shah, D. O. (2002b) Importance of micellar kinetics in relation to technological processes. *Journal of Colloid and Interface Science* 245:1-15
- Perry, K. L., Simonitch, T. A., Harrison-Lavoie, K. J., Liu, S. T. (1986) Cloning and regulation of *Erwinia herbicola* pigment genes. *Journal of Bacteriology* 168:607-12
- Poliakov, E., Gentleman, S., Cunningham, F. X., Jr., Miller-Ihli, N. J., Redmond, T. M. (2005) Key role of conserved histidines in recombinant mouse beta-carotene 15,15'-monooxygenase-1 activity. *The Journal of Biological Chemistry* 280:29217-23
- Prado-Cabrero, A., Scherzinger, D., Avalos, J., Al-Babili, S. (2007) Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryotic Cell* 6:650-7
- Redmond, T. M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Gantt, E., Cunningham, F. X., Jr. (2001) Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *The Journal of Biological Chemistry* 276:6560-5
- Rehage, H. (2005) Selbstorganisation von Tensiden: Biomimetische Synthesen von Nanomaterialien. *Chemie in unserer Zeit* 39:36-44
- Rharbi, Y., Winnik, M. A. (2001) Solute exchange between surfactant micelles by micelle fragmentation and fusion. *Advances in Colloid and Interface Science* 89-90:25-46
- Rharbi, Y., Winnik, M. A., Hahn, K. G. (1999) Kinetics of Fusion and Fragmentation Nonionic Micelles: Triton X-100. *Langmuir* 15:4697-4700
- Ribero, H. S., Cruz, R. C. D. (2004) Hochkonzentrierte carotinoidhaltige Emulsionen. *Chemie Ingenieur Technik* 443-447
- Ruban, A. V., Horton, P., Young, A. J. (1993) Aggregation of higher plant xanthophylls: differences in absorption spectra and in the dependency on solvent polarity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 21:229-234

- Ruch, S., Beyer, P., Ernst, H., Al-Babili, S. (2005) Retinal biosynthesis in Eubacteria: in vitro characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology* 55:1015-24
- Sackmann, E., Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles. In *Handbook of Biological Physics*, Lipowsky, R.; Sackmann, E., Eds. 1995; Vol. 1, pp 213-303.
- Sakane, F., Yamada, K., Imai, S., Kanoh, H. (1991) Porcine 80-kDa diacylglycerol kinase is a calcium-binding and calcium/phospholipid-dependent enzyme and undergoes calcium-dependent translocation. *The Journal of Biological Chemistry* 266:7096-100
- Salares, V. R., Young, N. M., Carey, P. R., Bernstein, H. J. (1977) Excited state (excitation) interactions in polyene aggregates. Resonance Raman and absorption spectroscopic evidence. *Journal of Raman Spectroscopy* 6:282-288
- Sandmann, G. (2001) Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385:4-12
- Savitzky, A., Golay, M. J. E. (1964) Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry* 36:1627-1639
- Schellman, J. A. (2003) Protein Stability in Mixed Solvents: A Balance of Contact Interaction and Excluded Volume. *Biophysical Journal* 85:108-125
- Scherzinger, D., Ruch, S., Kloer, D. P., Wilde, A., Al-Babili, S. (2006) Retinal is formed from apo-carotenoids in *Nostoc* sp. PCC7120: in vitro characterization of an apo-carotenoid oxygenase. *Biochemical Journal* 398:361-9
- Schiffer, C. A., Dotsch, V. (1996) The role of protein-solvent interactions in protein unfolding. *Current Opinion in Biotechnology* 7:428-32
- Schirmer, C., Liu, Y., Touraud, D., Meziani, A., Pulvin, S., Kunz, W. (2002) Horse Liver Alcohol Dehydrogenase as a Probe for Nanostructuring Effects of Alcohols in Water/Nonionic Surfactant Systems. *Journal of Physical Chemistry B* 106:7414-7421
- Schledz, M., al-Babili, S., von Lintig, J., Haubruck, H., Rabbani, S., Kleinig, H., Beyer, P. (1996) Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *Plant Journal* 10:781-92

- Schmidt, H., Kurtzer, R., Eisenreich, W., Schwab, W. (2006) The carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. *The Journal of Biological Chemistry* 281:9845-51
- Schwartz, S. H., Qin, X., Loewen, M. C. (2004) The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *The Journal of Biological Chemistry* 279:46940-5
- Schwartz, S. H., Qin, X., Zeevaart, J. A. D. (2001) Characterization of a Novel Carotenoid Cleavage Dioxygenase from Plants. *The Journal of Biological Chemistry* 27:25208-25211
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A. D., McCarty, D. R. (1997) Specific Oxidative Cleavage of Carotenoids by VP14 of Maize. *Science* 276:1872-1874
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., McCarty, D. R., Welch, W., Zeevaart, J. A. D. (2003) Substrate specificity and kinetics for VP14, a carotenoid cleavage dioxygenase in the ABA biosynthetic pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1619:9-14
- Seddon, A. M., Curnow, P., Booth, P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666:105-17
- Selwyn, M. J. (1965) A simple test for inactivation of an enzyme during assay. *Biochimica et Biophysica Acta* 105:193-5
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., Dowd, C. A. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360:1-16
- Simkin, A. J., Underwood, B. A., Auldridge, M., Loucas, H. M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D. G., Klee, H. J. (2004) Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of  $\beta$ -ionone, a fragrance volatile of *Petunia* flowers. *Plant Physiology* 136:3504-3514
- Socaciu, C., Bojarski, P., Aberle, L., Diehl, H. (2002) Different ways to insert carotenoids into liposomes affect structure and dynamics of the bilayer differently. *Biophysical Chemistry* 99:1-15
- Socaciu, C., Jessel, R., Diehl, H. A. (2000) Competitive carotenoid and cholesterol incorporation into liposomes: effects on membrane phase transition, fluidity, polarity and anisotropy. *Chemistry and Physics of Lipids* 106:79-88

- Sorensen, H. P., Mortensen, K. K. (2005a) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115:113-28
- Sorensen, H. P., Mortensen, K. K. (2005b) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 4:1
- Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41:207-34
- Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189:113
- Sujak, A., Gabrielska, J., Milanowska, J., Mazurek, P., Strzalka, K., Gruszecki, W. I. (2005) Studies on canthaxanthin in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1712:17-28
- Tadros, T. F., *Applied Surfactants: Principles and Applications*. Wiley-VCH: Weinheim, 2005; p 634.
- Tan, B.-C., Joseph, L. M., Deng, W.-T., Liu, L., Li, Q.-B., Cline, K., McCarty, D. R. (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *The Plant Journal* 35:44-56
- Tan, B. C., Cline, K., McCarty, D. R. (2001) Localization and targeting of the VP14 epoxy-carotenoid dioxygenase to chloroplast membranes. *Plant Journal* 27:373-82
- Tan, B. C., Schwartz, S. H., Zeevaart, J. A. D., McCarty, D. R. (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12235-12240
- Tatulian, S. A. (2001) Toward understanding interfacial activation of secretory phospholipase A2 (PLA2): membrane surface properties and membrane-induced structural changes in the enzyme contribute synergistically to PLA2 activation. *Biophysical Journal* 80:789-800
- Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., Weiss, J. (2005) Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45:587-605
- Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:523-533

- Villaverde, A., Carrio, M. M. (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters* 25:1385-95
- Viparelli, P., Alfani, F., Cantarella, M. (1999) Models for enzyme superactivity in aqueous solutions of surfactants. *Biochemical Journal* 344:765-773
- Vogel, U., Jensen, K. F. (1997) NusA is required for ribosomal antitermination and for modulation of the transcription elongation rate of both antiterminated RNA and mRNA. *The Journal of Biological Chemistry* 272:12265-12271
- von Lintig, J., Vogt, K. (2000) Filling the Gap in Vitamin A Research. Molecular Identification of an Enzyme Cleaving beta-carotene to Retinal. *The Journal of Biological Chemistry* 275:11915-11920
- Wache, Y., Bosser-De Ratuld, A., Belin, J.-M. (2006) Dispersion of  $\beta$ -carotene in processes of production of  $\beta$ -ionone by cooxidation using enzyme-generated reactive oxygen species. *Process Biochemistry* 41:2337
- Waché, Y., Bosser-DeRatuld, A., Mai Ly, H., Belin, J. M. (2002) Co-oxidation of  $\beta$ -carotene in biphasic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20:197-201
- Waldmann, D., Schreier, P. (1995) Stereochemical Studies of Epoxides Formed by Lipoxygenase-Catalyzed Co-oxidation of Retinol,  $\beta$ -Ionone, and 4-Hydroxy- $\beta$ -ionone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:626-630
- Wang, Z. X., Killilea, S. D., Srivastava, D. K. (1993) Kinetic evaluation of substrate-dependent origin of the lag phase in soybean lipoxygenase-1 catalyzed reactions. *Biochemistry* 32:1500-9
- Wehbi, H., Feng, J., Roberts, M. F. (2003) Water-miscible organic cosolvents enhance phosphatidylinositol-specific phospholipase C phosphotransferase as well as phosphodiesterase activity. *Biochimica and Biophysica Acta* 1613:15-27
- Wen, A. H., Choi, M. K., Kim, D. D. (2006) Formulation of liposome for topical delivery of arbutin. *Archives of Pharmaceutical Research* 29:1187-92
- Winterhalter, P., Carotenoid-Derived Aroma Compounds: Biogenetic and Biotechnological Aspects. In *Biotechnology for Improved Foods and Flavors*, 637 ed.; Takeoka, G. R.; Teranishi, R.; Williams, P. J.; Kobayashi, A., Eds. American Chemical Society: Washington, 1996; pp 295-308.
- Winterhalter, P., Rouseff, R., *Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction*. 2002; Vol. 802, p 1-17.

- Wisniewska, A., Widomska, J., Subczynski, W. K. (2006) Carotenoid-membrane interactions in liposomes: effect of dipolar, monopolar, and nonpolar carotenoids. *Acta Biochim Pol* 53:475-84
- Wu, Z., Robinson, D. S. (1999) Co-oxidation of  $\beta$ -Carotene Catalyzed by Soybean and Recombinant Pea Lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:4899-4906
- Xu, X., Wang, Y., Constantinou, A. I., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P. E., van Breemen, R. B. (1999) Solubilization and stabilization of carotenoids using micelles: delivery of lycopene to cells in culture. *Lipids* 34:1031-6
- Yamamoto, H. Y., Bangham, A. D. (1978) Carotenoid organization in membranes. Thermal transition and spectral properties of carotenoid-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 507:119-27
- Yamazaki, K., Imai, M., Suzuki, I. (2004) Soybean lecithin hydrolysis using hog pancreas phospholipase A2 influenced by the hydrophobic character of W/O microemulsion systems. *Biochemical Engineering Journal* 19:171
- Zana, R. (1995) Aqueous surfactant-alcohol systems: a review. *Advances in Colloid and Interface Science* 57:1-64
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Berger, R. G. (2003a) Cleavage of  $\beta$ -carotene to flavor compounds by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26:331-336
- Zorn, H., Langhoff, S., Schreibner, M., Nimitz, M., Berger, R. G. (2003b) A peroxidase from *Lepista irina* cleaves  $\beta$ -carotene to flavor compounds. *Biological Chemistry* 384:1049-1056

## 8 Anhang

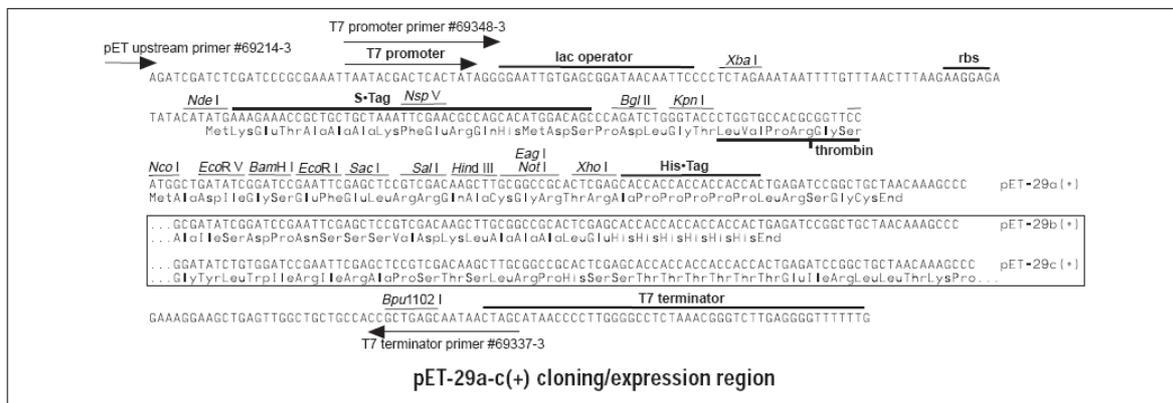
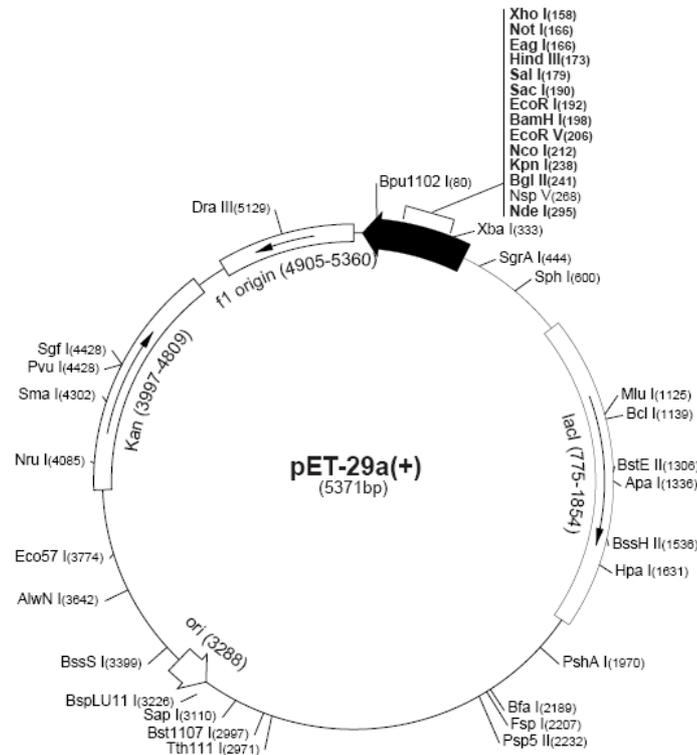
### 8.1 Karten und Multiple Cloning Sites der verwendeten Plasmide

#### 8.1.1 pET-29a

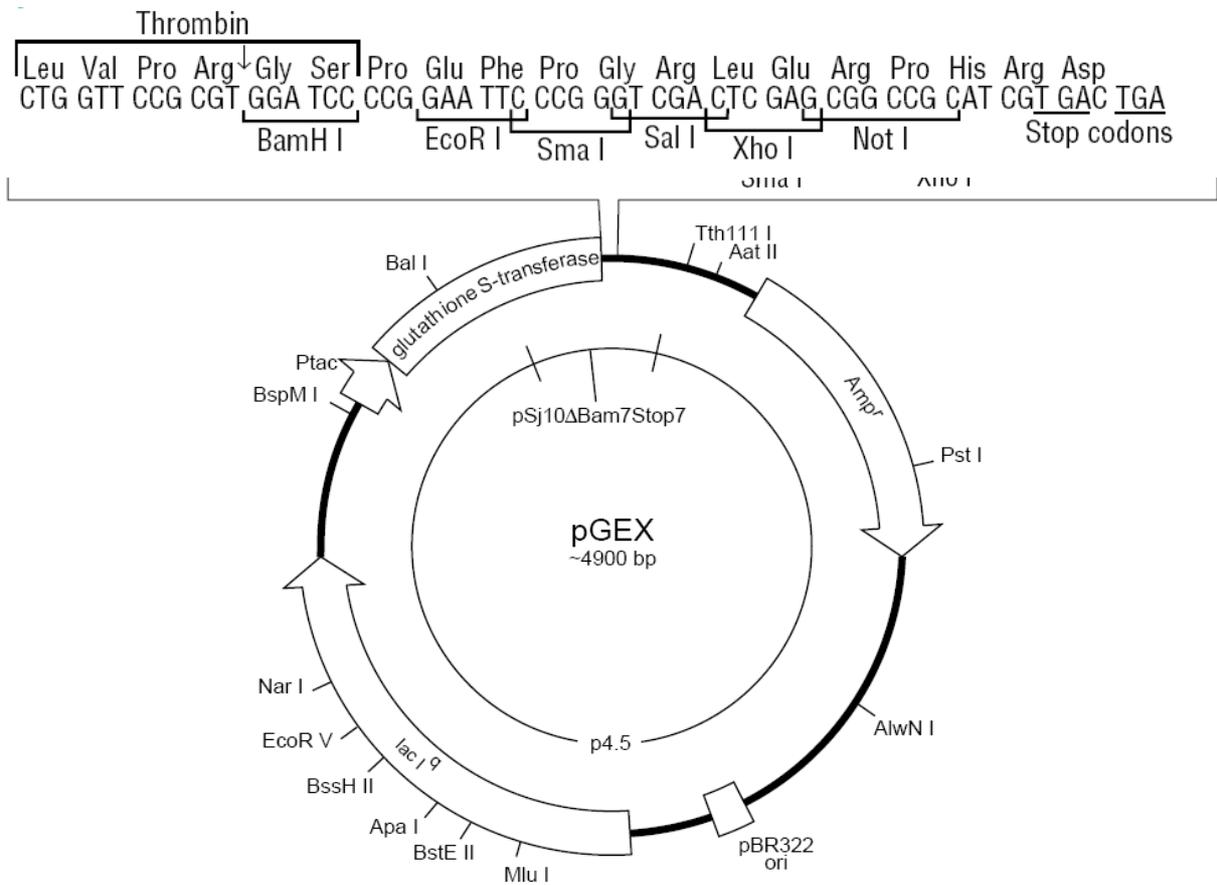
**pET-29a(+) sequence landmarks**

T7 promoter	368-384
T7 transcription start	367
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites ( <i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	775-1854
pBR322 origin	3288
Kan coding sequence	3997-4809
f1 origin	4905-5360

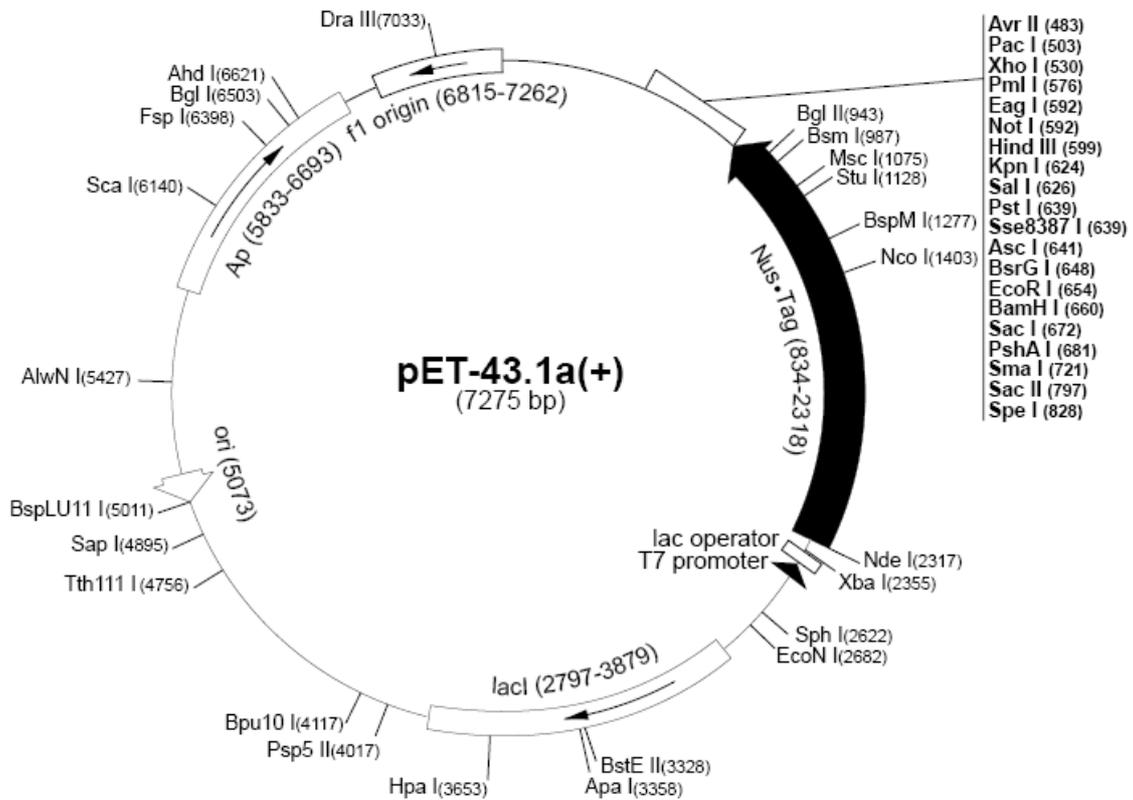
The maps for pET-29b(+) and pET-29c(+) are the same as pET-29a(+) (shown) with the following exceptions: pET-29b(+) is a 5370bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-29c(+) is a 5372bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*H I at 198.



### 8.1.2 pGEX-4T



### 8.1.3 pET-43a



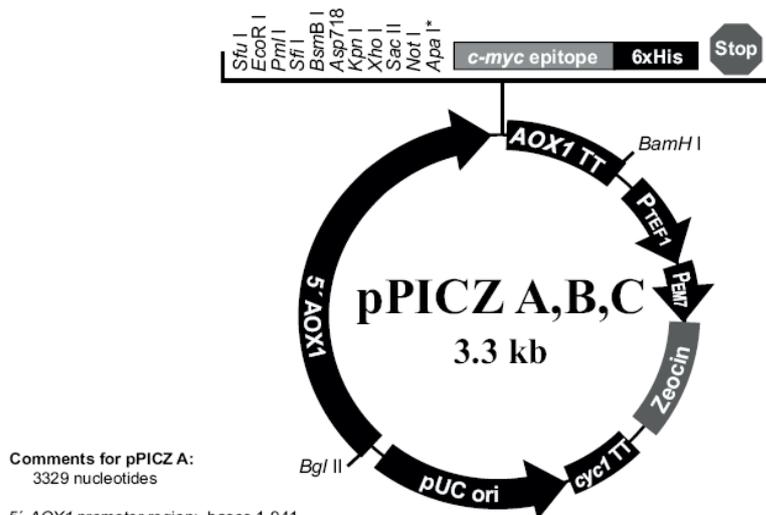
**pET-43.1a(+) cloning/expression regions**

Genetic map showing the arrangement of key elements and restriction sites in the pET-43.1a(+) plasmid. The map includes the T7 promoter, lac operator, lacI, and various restriction sites. Key elements are highlighted in boxes:

- lac operator** (6934-7318)
- T7 promoter** (6934-7318)
- lacI** (2797-3879)
- Nus-Tag** (834-2318)
- His-Tag** (1356-4480)
- S-Tag** (70528-3)
- thrombin** (70528-3)
- enterokinase** (70528-3)
- ColiDOWN primer** (70845-3)

Restriction sites shown include: Sca I, AlwN I, BspLU11 I, Sap I, Tth111 I, Bpu10 I, Psp5 II, Hpa I, BstE II, Apa I, Bgl II, Bsm I, Msc I, Stu I, BspM I, Nco I, Nde I, Xba I, Sph I, EcoN I, Bsp I, Pac I, Xho I, Pml I, Eag I, Not I, Hind III, Kpn I, Sal I, Pst I, Sse8387 I, Asc I, BsrG I, EcoR I, BamH I, Sac I, PshA I, Sma I, Sac II, Spe I, Pst I, Sal I, Kpn I, Hind III, Not I, Pml I, HSV-Tag, Xho I, His-Tag, Pac I, Avr II, ColiDOWN primer.

## 8.1.4 pPICZ A



Comments for pPICZ A:  
3329 nucleotides

5' AOX1 promoter region: bases 1-941  
5' end of AOX1 mRNA: base 824  
5' AOX1 priming site: bases 855-875  
Multiple cloning site: bases 932-1011  
c-myc epitope tag: bases 1012-1044  
Polyhistidine tag: bases 1057-1077  
3' AOX priming site: bases 1159-1179  
3' end of mRNA: base 1250  
AOX1 transcription termination region: bases 1078-1418  
Fragment containing TEF1 promoter: bases 1419-1830  
EM7 promoter: bases 1831-1898  
Sh ble ORF: bases 1899-2273  
CYC1 transcription termination region: bases 2274-2591  
pUC origin: bases 2602-3275 (complementary strand)

\* The restriction site between Not I and the myc epitope is different in each version of pPICZ:  
Apa I in pPICZ A  
Xba I in pPICZ B  
SnaB I in pPICZ C

```

5' end of AOX1 mRNA
811 AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA
                    |
                    5' AOX1 priming site

871 CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTTAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

          SfuI      EcoRI      PmlI      SfiI      BsmBI Asp718 | KpnI XhoI
931 ATTCGAAACG AGGAATTCAC GTGGCCCAGC CGGCCGTCTC GGATCGGTAC CTCGAGCCGC

          SacII NotI      ApaI      myc epitope
991 GGCGGCCGCC AGCTT GGGCCC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG
                    |
                    Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

                    Polyhistidine tag
1042 AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTTAGCCT TAGACATGAC
                    |
                    Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

1098 TG TTCCTCAG TTCAAGTTGG GCACTTACGA GAAGACCGGT CTTGCTAGAT TCTAATCAAG

          3' AOX1 priming site
1158 AGGATGTCAG AATGCCATTT GCCTGAGAGA TGCAGGCTTC ATTTTTGATA CTTTTTTATT

                    3' polyadenylation site
1218 TGTAACCTAT ATAGTATAGG ATTTTTTTTG TCATTTTGGT

```

