

**Etablierung der Peptid-Aptamertechnologie
zur Modifikation des Carotinoid-Stoffwechsels in Pflanzen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Tamara Zietek

aus Iserlohn

Berichterstatter:

PD Dr. Joachim Uhrig

Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung:

05.02.2010

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I | Abkürzungsverzeichnis | 1 |
| II | Einleitung..... | 4 |
| 1 | <i>Functional Food</i> | 4 |
| 2 | Der pflanzliche Carotinoid-Metabolismus..... | 5 |
| 2.1 | Der Carotinoid-Stoffwechsel | 5 |
| 2.2 | Die Enzyme Phytoensynthase, Lycopon- ϵ -Cyclase und Carotinoid- β -Ring-Hydroxylase | 9 |
| 2.3 | Carotinoid-Biotechnologie in Pflanzen..... | 11 |
| 3 | Die Peptid-Aptamer-Technologie..... | 13 |
| 3.1 | Zufallspeptid- <i>Libraries</i> und Trägerproteine | 14 |
| 3.2 | <i>Library-Screening</i> -Methoden..... | 15 |
| 3.3 | Anwendungsgebiete von Peptid-Aptameren..... | 16 |
| 4 | Zielsetzung..... | 18 |
| III | Material und Methoden | 19 |
| 1 | Material..... | 19 |
| 1.1 | Mikroorganismen und Pflanzenarten..... | 19 |
| 1.2 | Vektoren | 20 |
| 1.3 | Oligonukleotide (Primer)..... | 20 |
| 1.4 | Chemikalien und Reagenzien | 23 |
| 1.5 | Software | 25 |
| 2 | Methoden..... | 26 |
| 2.1 | Molekularbiologische Arbeiten | 26 |
| 2.2 | Proteinbiochemische Arbeiten..... | 30 |
| 2.3 | Mikrobiologische Arbeiten | 31 |
| 2.4 | Pflanzen-Arbeiten..... | 34 |
| 2.5 | Klonierungsarbeiten | 35 |
| 2.6 | Arbeiten mit Hefen für <i>Aptamer-Screening</i> | 38 |
| 2.7 | Analytische Verfahren | 40 |
| IV | Ergebnisse..... | 42 |
| 1 | Auswahl und funktionelle Charakterisierung der Zielenzyme | 42 |
| 1.1 | Klonierungen für bakterielle Expression der Zielenzyme..... | 43 |
| 1.2 | Nachweis der Enzymaktivitäten <i>in vivo</i> | 48 |

| | | |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2 | Identifizierung von Peptid-Aptameren..... | 57 |
| 2.1 | Klonierungen der <i>Baits</i> für <i>Yeast-Two-Hybrid-Screenings</i> | 57 |
| 2.2 | <i>Screening</i> von Zufallspeptid-Bibliotheken mittels <i>Y2H</i> | 59 |
| 2.3 | Bestätigung der Interaktionen in <i>S. cerevisiae</i> | 66 |
| 3 | Verifizierung bioaktiver Aptamere in <i>E. coli</i> | 67 |
| 3.1 | Etablierung eines polycistronischen Expressionssystems in <i>E. coli</i> | 68 |
| 3.2 | Polycistronische Expression der Aptamere <i>in vivo</i> | 76 |
| 3.3 | Verifizierung der Aptamer-Effekte auf die Zielenzyme <i>in vivo</i> | 80 |
| 4 | Verifizierung bioaktiver Aptamere <i>in planta</i> | 88 |
| 4.1 | Transiente Expression von Zielenzym und Aptamer in <i>N. benthamiana</i> | 88 |
| 4.2 | Verifizierung der EC/25Q6-Interaktion <i>in planta</i> | 91 |
| 5 | Überexpression von 25Q6 in transgenen <i>A. thaliana</i> -Linien | 94 |
| 5.1 | Erzeugung 25Q6-transgener <i>Arabidopsis</i> -Linien..... | 94 |
| 5.2 | Analysen der 25Q6-transgenen <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen | 95 |
| 6 | Analyse der endogenen Promotoren der Zielgene | 97 |
| 6.1 | Klonierung der endogenen Promotoren für Expressionsstudien..... | 97 |
| 6.2 | Analyse der Promotor-Aktivitäten via GUS-Expression in <i>A. thaliana</i> cv. Columbia..... | 101 |
| 6.3 | Analyse der Promotor-Aktivitäten via GUS-Expression in <i>S. lycopersicum</i> | 104 |
| 6.4 | <i>in silico</i> -Analysen regulatorischer Elemente | 107 |
| V | Diskussion | 111 |
| 1 | Peptid-Aptamere in der pflanzlichen Biotechnologie | 111 |
| 2 | Die Aktivitäten der Zielenzyme BH2, EC und PSY aus <i>A. thaliana</i> | 114 |
| 3 | Verifizierung bioaktiver Peptid-Aptamere | 120 |
| 3.1 | Analyse der Aptamere für die <i>A. t.</i> BH2 | 120 |
| 3.2 | Hemmung der <i>A. t.</i> EC-Aktivität durch Aptamer 25Q6 | 123 |
| 4 | Expression des Aptamers 25Q6 in transgenen <i>Arabidopsis</i> -Linien..... | 125 |
| 5 | Die endogenen Promotoren der Zielenzyme | 126 |
| 6 | Ausblick | 128 |
| VI | Zusammenfassung..... | 131 |
| VII | Abstract..... | 133 |
| VIII | Literaturverzeichnis..... | 134 |

I Abkürzungsverzeichnis

Neben SI-Einheiten, Elementensymbolen und dem Ein- oder Dreibuchstabencode für Aminosäuren wurden folgende Abkürzungen verwendet:

| | | |
|-----------------------|---|-----------------------------------------------------------------|
| 3-AT | = | 3-amino-1,2,4-triazol |
| <i>A. tumefaciens</i> | = | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| <i>A. thaliana</i> | = | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ABA | = | <i>abscisic acid</i> |
| AcN | = | Acetonitril |
| AD | = | Aktivierungsdomäne |
| AS | = | Aminosäure |
| <i>baR</i> | = | BASTA-Resistenzgen |
| BC | = | Lycopon-Betacyclase |
| BD | = | Bindedomäne |
| BH | = | Carotinoid-Beta-Ring-Hydroxylase |
| <i>BiFC</i> | = | <i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i> |
| bp | = | Basenpaare |
| <i>C. merolae</i> | = | <i>Cyanidioschyzon merolae</i> |
| CaMV | = | <i>Cauliflower mosaic virus</i> |
| CCD | = | <i>carotenoid cleavage dioxygenases</i> |
| cDNA | = | <i>copy desoxyribo nucleic acid</i> |
| CDP-MEP | = | 4-diphosphocytidyl-methylerythritol-2-phosphat |
| <i>cds</i> | = | <i>coding sequence</i> |
| c_{end} | = | Endkonzentration |
| CFP | = | <i>Cerulean Fluorescent Protein</i> |
| <i>CmCCD4a</i> | = | <i>Chrysanthemum morifolium carotenoid cleavage dioxygenase</i> |
| CMK | = | CDP-ME-Kinase |
| CMS | = | CDP-ME-Synthase |
| CRTISO | = | Carotinoid-Isomerase |
| <i>cv.</i> | = | <i>cultivar</i> (Sorte) |
| Da | = | Dalton |
| DMAPP | = | Dimethylallyldiphosphat |
| DMAPP | = | Dimethylallyldiphosphat |
| DNA | = | <i>desoxyribo nucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | = | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DTT | = | Dithiothreitol |
| DXP | = | Deoxyxylulose-5-phosphat |
| DXR | = | DXP-Reduktoisomerase |
| DXS | = | DXP-Synthase |
| <i>E. coli</i> | = | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>E. herbicola</i> | = | <i>Erwinia herbicola</i> |
| EC | = | Lycopon-Epsiloncyclase |

| | | |
|-----------------------|---|--------------------------------------------------------------|
| EDTA | = | Ethylendiamintetraacetat |
| EH | = | Carotinoid-Epsilon-Ring-Hydroxylase |
| EtAc | = | Ethylacetat |
| EtBr | = | Ethidiumbromid |
| EtOH | = | Ethanol |
| FKBP12 | = | FK506-binding protein 12 |
| FRB | = | <i>FKBP-Rapamycin binding domain</i> |
| <i>fw</i> | = | <i>forward</i> |
| GAP | = | Glyceraldehyd-3-phosphat |
| GFP | = | <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| GGDS | = | GGPP-Synthase |
| GGPP | = | Geranylgeranyl-diphosphat |
| GPP | = | Geranyldiphosphat |
| GST | = | Glutathion-S-Transferase |
| GUS | = | Glucuronidase |
| h | = | <i>hour</i> (Stunde) |
| HDR | = | HMBPP-Reduktase |
| HDS | = | HMBPP-Synthase |
| HMBPP | = | Hydroxymethylbutenyl-4-diphosphat |
| HPLC | = | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| IDI | = | IPP-Isomerase |
| IPP | = | Isopentenyl-diphosphat |
| kb | = | Kilobase |
| <i>L. sativa</i> | = | <i>Lactuca sativa</i> |
| LB | = | <i>Lysogeny broth</i> |
| LEW | = | Lewis |
| LHC II | = | <i>light harvesting complex II</i> |
| LiAc | = | Lithiumacetat |
| LIC | = | <i>Ligation Independent Cloning</i> |
| LiRP | = | <i>ligand regulated peptide</i> |
| MCS | = | ME-cPP-Synthase |
| ME | = | Methylerythritol |
| ME-cPP | = | Methylerythritol-2,4-cyclodiphosphat |
| MEP | = | Methylerythritol-4-phosphat |
| MetOH | = | Methanol |
| min. | = | Minute |
| mRNA | = | <i>messenger RNA</i> |
| MS | = | Murashige and Skoog |
| <i>N. benthamiana</i> | = | <i>Nicotiana benthamiana</i> |
| NSY | = | Neoxanthin-Synthase |
| nt | = | Nukleotid |
| OD _x | = | optische Dichte bei x nm |
| PAGE | = | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | = | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion) |

| | | |
|------------------------|---|----------------------------------------------------|
| PDS | = | Phytoendesaturase |
| PEG | = | Polyethylenglycol |
| PSY | = | Phytoensynthase |
| PVDF | = | Polyvinylidenfluorid |
| <i>rev</i> | = | <i>reverse</i> |
| RFP | = | <i>Red Fluorescent Protein</i> |
| RNAi | = | <i>RNA Interference</i> |
| RT | = | Raumtemperatur |
| <i>S. lycopersicum</i> | = | <i>Solanum lycopersicum</i> |
| <i>S. cerevisiae</i> | = | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SD | = | <i>shine dalgarno</i> |
| SDS | = | <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SINAT2 | = | <i>Seven in absentia of Arabidopsis 2</i> |
| STM | = | <i>stefin A triple mutant</i> |
| TAE | = | Tris-Essigsäure-EDTA |
| TE | = | Tris-EDTA |
| t_{exp} | = | <i>exposure time</i> |
| TF | = | Transkriptionsfaktor |
| TMD | = | Transmembrandomäne |
| t_{ret} | = | Retentionszeit |
| TrxA | = | Thioredoxin A |
| U | = | <i>Unit</i> |
| U1/U2 | = | Umsatzrate 1 / Umsatzrate 2 |
| ÜN | = | Über Nacht |
| UpM | = | Umdrehungen pro Minute |
| UTR | = | <i>untranslated region</i> |
| VDE | = | Violaxanthin-De-Epoxidase |
| VK | = | Vorkultur |
| v_{max} | = | maximale Geschwindigkeit |
| V_{Rkt} | = | Reaktionsvolumen |
| WT | = | Wildtyp |
| <i>Y2H</i> | = | <i>Yeast Two Hybrid</i> |
| YEB | = | <i>yeast extract-beef extract</i> |
| YFP | = | <i>Yellow Fluorescent Protein</i> |
| YPAD | = | <i>yeast extract-peptone-dextrose plus adenine</i> |
| ZDS | = | Zeta-Carotin-Desaturase |
| ZEP | = | Zeaxanthin-Epoxidase |

II Einleitung

1 *Functional Food*

Nahrungsmittel, die einen erhöhten Gehalt an gesundheitsrelevanten Inhaltsstoffen aufweisen, werden im Allgemeinen als *Functional Food* oder funktionelle Lebensmittel bezeichnet. Einen wichtigen Zweig des *Functional Food* stellen Nutzpflanzen dar, die bereits beim Anbau wertvolle Nährstoffe anreichern.

Nährstoffe, die bislang erfolgreich in Nutzpflanzen angereichert wurden, sind hauptsächlich Speicherproteine wie Glycinin (Katsube u. a., 1999), bestimmte essentielle Aminosäuren (Lai und Messing, 2002), Öle oder Fettsäuren (Liu u. a., 2002), Kohlenhydrate (Schwall u. a., 2000), Vitamine und Carotinoide (DellaPenna, 2007), sekundäre Pflanzenwirkstoffe (Shin u. a., 2006), sowie verschiedene Mineralien und Spurenelemente (White und Broadley, 2009). Häufig verwendete Zielpflanzen sind u.a. Reis, Mais, Kartoffel, Sojabohne, Raps und Tomate, es werden aber auch zunehmend exotischere Pflanzen wie Kiwi, Papaya oder Erdbeere modifiziert (Newell-McGloughlin, 2008). Besonders bekannte und auch in der Öffentlichkeit wahrgenommene Beispiele für *Functional Food* sind *Golden Rice* (Ye u. a., 2000), *Golden Corn* (Naqvi u. a., 2009) und ein orangener Blumenkohl (Lu u. a., 2006), alle drei mit erhöhtem β -Carotin-Gehalt, sowie eine dunkelviolette Tomate mit angereicherten Anthocyanen (Butelli u. a., 2008).

Aufgrund des zunehmenden öffentlichen und medizinischen Interesses an den antikanzerogen wirksamen Antioxidantien, gewinnt die Anreicherung von beispielsweise Carotinen und Carotinoiden, die der menschliche Organismus nicht selbst synthetisieren kann, in Nutzpflanzen zunehmend an Bedeutung. α - und β -Carotin neutralisieren freie Radikale, die die Zellen schädigen, Lycopren senkt das Risiko für Prostata-Krebs und Lutein und Zeaxanthin sind wichtig zur Erhaltung des Sehvermögens (Fraser und Bramley, 2004). Zahlreiche gentechnisch veränderte Sorten unterschiedlichster Pflanzenarten wurden bislang erzeugt, die einen deutlich erhöhten Carotinoid-Gehalt aufweisen (Fraser u. a., 2009; Lu und Li, 2008). Dazu gehören der optimierte *Golden Rice 2* mit einem β -Carotin-Gehalt von 37 $\mu\text{g/g}$ Trockenmasse, was einer 23-fachen Steigerung entspricht (Paine u. a., 2005), *Golden Potato* mit 47 $\mu\text{g/g}$, einer 3600-fachen Steigerung (Diretto u. a., 2007), *Golden Corn* mit einer 34-fachen Steigerung (Aluru u. a., 2008), *Orange Tomato* mit einer vierfachen Steigerung (Wurbs u. a., 2007) und *Golden Canola Seeds* mit einem 50-fach erhöhten Gesamt-Carotinoid-Gehalt (Shewmaker u. a., 1999).

Im Vergleich zu Nahrungsergänzungsmitteln haben Nutzpflanzen mit erhöhten Nährstoffgehalten den Vorteil, dass die Aufnahme der Nährstoffe in ihrem natürlichen Verband und in moderaten Mengen erfolgt. Die gesundheitsfördernde Wirkung von Tomaten wird beispielsweise nicht auf

Lycopen allein zurückgeführt, sondern entsteht durch das Zusammenwirken mehrerer Substanzen (Ellinger u. a., 2006). Durch die starke Konzentration der Nährstoffe in Nahrungsergänzungsmitteln besteht außerdem die Gefahr der Überdosierung. Für β -Carotin wurde gezeigt, dass eine hohe Zufuhr des Carotinoids bei Rauchern Lungenkrebs fördern kann (Tanvetyanon und Bepler, 2008).

Nutzpflanzen mit erhöhten Nährstoffgehalten dienen, neben der gewinnbringenden Vermarktung in Industriestaaten, primär dem Ziel, Menschen in der dritten Welt bzw. in Erdregionen mit schlechten Anbaubedingungen für Nutzpflanzen, eine ausreichende Versorgung mit lebensnotwendigen und gesundheitlich relevanten Metaboliten zu ermöglichen (Hall u. a., 2008). Ein Mangel an β -Carotin hat beispielsweise eine Macula-Degeneration bis hin zur Erblindung zur Folge (Beatty u. a., 2004). Jährlich sterben rund 1,2 Mio. Kinder im Alter von 1 – 4 Jahren aufgrund eines Mangels an Vitamin A, das der menschliche Körper aus β -Carotin synthetisiert, welches demzufolge auch oft als Provitamin A bezeichnet wird (Taylor und Ramsay, 2005). Für einen Erwachsenen wird von der US-Regierung eine tägliche Zufuhr von 700 – 900 μg β -Carotin empfohlen (Wurbs u. a., 2007).

Die Nutzung transgener Pflanzen wird kontrovers diskutiert und trifft in der (vor allem europäischen) Öffentlichkeit bislang auf geringe Akzeptanz (Newell-McGloughlin, 2008; White und Broadley, 2009). Eine zuverlässige Risiko-Abwägung der Folgen gentechnisch veränderter Pflanzen für Mensch und Umwelt ist aufgrund fehlender Langzeitstudien und komplexer experimenteller Parameter in der Tat schwierig (Magaña-Gómez und de la Barca, 2009). Zudem erschweren die bestehenden gesetzlichen Regularien die Vermarktung transgener Sorten, vor allem in Europa. Die Entwicklung neuartiger Ansätze ist daher durchaus sinnvoll. Einen alternativen Gentechnik-freien Ansatz zur unmittelbaren Modifikation pflanzlicher Stoffwechselwege könnte die in I13 beschriebene Peptid-Aptamer-Technologie liefern. Wenn es gelingen würde, bioaktive Peptide, die zu einer Verschiebung bestimmter metabolischer Prozesse und folglich zur Anreicherung spezifischer Metaboliten führen, von außen in die Pflanze einzubringen, könnten mithilfe dieser Technologie neue Wege eröffnet werden. Allerdings ist ein solcher Ansatz bis heute nicht gezeigt worden.

2 Der pflanzliche Carotinoid-Metabolismus

2.1 Der Carotinoid-Stoffwechsel

Carotinoide gehören chemisch gesehen zu der Substanzklasse der Terpene und stellen die in der Natur meistverbreiteten Pigmente dar. Ihr Farbspektrum reicht von Gelb über Orange bis Rot. Sie kommen als essentielle Bestandteile des Photosynthese-Apparats in allen photosynthetisch aktiven Organismen, und somit auch in allen Landpflanzen, vor. Dementsprechend sind Carotinoide in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten lokalisiert, wo sie als Teile des LHC II (*light harvesting*

complex II, Lichtsammelkomplex II) an der Lichtabsorption und Energieweiterleitung an die photosynthetischen Reaktionszentren beteiligt sind. In Blüten und Früchten befinden sich die hydrophoben Moleküle in den Chromoplastenmembranen oder im Stroma in sogenannten *oil-bodies* (Cunningham und Gantt, 1998). Neben ihrer Funktion innerhalb des Photosynthese-Apparats erfüllen Carotinoide weitere Aufgaben, z.B. sind sie verantwortlich für die Pigmentierung vieler Blüten und Früchte, stabilisieren Membranen und fungieren als Antioxidantien (Taylor und Ramsay, 2005). Carotinoide sind außerdem Vorstufen von Aromastoffen (Gao u. a., 2008; Mendes-Pinto, 2009) und Phytohormonen wie Abscisinsäure (ABA), die u. a. die Schließung der Stomata steuert und an der Regulation lichtabhängiger Prozesse beteiligt ist (Galvez-Valdivieso u. a., 2009; Milborrow, 2001), sowie den kürzlich entdeckten Strigolactonen, die sich inhibitorisch auf die Spross-Verzweigung auswirken (Dun u. a., 2009). Es wird nach aktuellem Forschungsstand vermutet, dass sowohl ABA als auch Strigolactone ausgehend von β -Carotin und DMAPP (Dimethylallyldiphosphat aus dem Mevalonat-Stoffwechsel) synthetisiert werden (Humphrey und Beale, 2006; Matusova u. a., 2005). Spezielle Enzyme, die für die Degradierung von Carotinoiden zuständig sind, dienen nicht nur der Synthese von Phytohormonen, sondern liefern zudem einen weiteren Mechanismus zur Regulation des Carotinoid-Gehalts in der Pflanze (Giuliano u. a., 2008). Diese Enzyme werden allgemein als CCDs (*carotenoid cleavage dioxygenases*) bezeichnet und degradieren durch Oxidation der Doppelbindungen langkettige Carotinoide (z.B. C40) zu kürzeren Apocarotinoiden (Floss und Walter, 2009). Sie wurden u.a. in *Arabidopsis* (Tan u. a., 2003), Mais (Sun u. a., 2008), Reis (Ilg u. a., 2009) und Blütenblättern von Chrysanthemen gefunden, in denen RNAi-Silencing der CmCCD4a (*Chrysanthemum morifolium carotenoid cleavage dioxygenase*) einhergeht mit einer Steigerung des Carotinoid-Gehalts (Ohmiya u. a., 2006).

Der Carotinoid-Stoffwechsel gehört zu den am besten untersuchten pflanzlichen Stoffwechselwegen, ist jedoch, vor allem hinsichtlich artspezifischer Isozyme und Regulation, aufgrund seiner Komplexität bis heute nicht vollständig aufgeklärt.

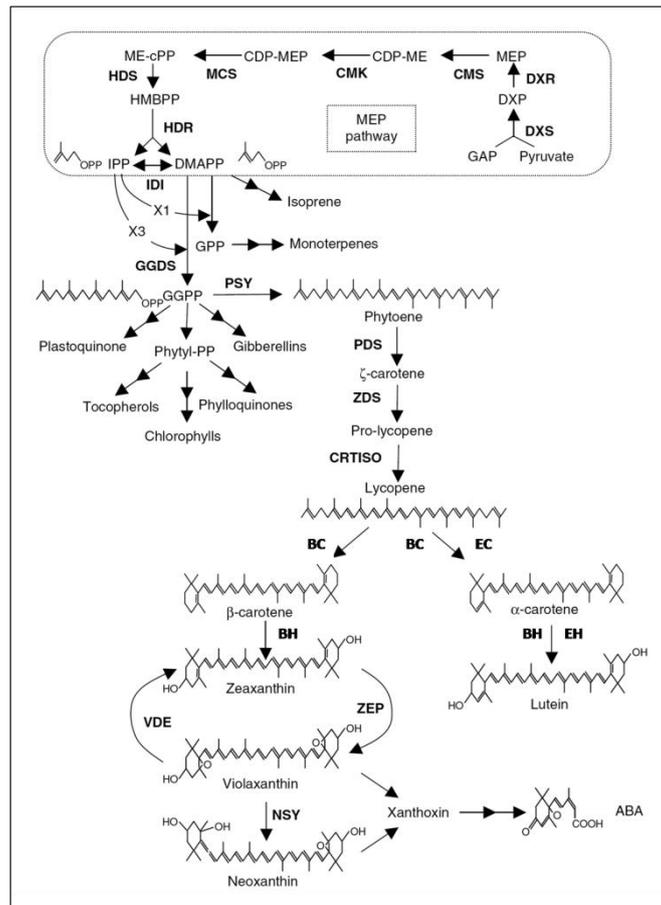


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Carotinoid-Stoffwechsels in Pflanzen, modifiziert nach Botella-Pavía und Rodríguez-Concepción 2006, Enzyme sind fett dargestellt. GAP: Glyceraldehyd-3-phosphat, DXP: Deoxyxylulose-5-phosphat, MEP: Methylerythritol-4-phosphat, CDP-ME: 4-diphosphocytidyl-methylerythritol, CDP-MEP: 4-diphosphocytidyl-methylerythritol-2-phosphat, ME-cPP: Methylerythritol-2,4-cyclodiphosphat, HMBPP: Hydroxymethylbutenyl-4-diphosphat, IPP: Isopentenylidiphosphat, DMAPP: Dimethylallyldiphosphat, GPP: Geranylidiphosphat, GGPP: Geranylgeranylidiphosphat, ABA: Abscisinsäure, DXS: DXP-Synthase, DXR: DXP-Reduktoisomerase, CMS: CDP-ME-Synthase, CMK: CDP-ME-Kinase, MCS: ME-cPP-Synthase, HDS: HMBPP-Synthase, HDR: HMBPP-Reduktase, IDI: IPP-Isomerase, GGDS: GGPP-Synthase, PSY: Phytoensynthase, PDS: Phytoendesaturase, ZDS: ζ-Carotin-Desaturase, CRTISO: Carotinoid-Isomerase, BC: Lycopene-β-Cyclase, EC: Lycopene-ε-Cyclase, BH: Carotinoid-β-Ring-Hydroxylase, EH: Carotinoid-ε-Ring-Hydroxylase, ZEP: Zeaxanthin-Epoxidase, VDE: Violaxanthin-De-Epoxidase, NSY: Neoxanthin-Synthase.

Die pflanzliche Carotinoid-Biosynthese (s. Abbildung 1) findet im Stroma der Plastiden statt, die am Stoffwechsel beteiligten Enzyme sind (Thylakoid-)membranständig oder membranassoziiert (Cunningham und Gantt, 1998). Der Metabolismus beginnt mit einem einleitenden Schritt, in dem das über den MEP (Methylerythritol-4-phosphat)-Syntheseweg bereitgestellte Geranylgeranyl-Diphosphat (GGPP) zu dem farblosen Phytoen umgesetzt wird. Dieser Reaktionsschritt hat eine zentrale Bedeutung und ist nach aktuellem Forschungsstand limitierend für die gesamte weitere Carotinoid-Synthese (s. auch II.2.2). Katalysiert wird die Reaktion von dem Enzym Phytoensynthase, von dem in zahlreichen Pflanzenarten bislang bis zu drei Isoformen entdeckt wurden (Li u. a., 2008; Welsch u. a., 2008). Das farblose Phytoen wird im weiteren Verlauf des Biosyntheseweges von der Phytoendesaturase (PDS) zu ζ-Carotin umgesetzt, dieses von der ζ-Carotin-Desaturase (ZDS) zu Pro-Lycopenen, welches wiederum von der Carotinoid-Isomerase (CRTISO) zum roten *all-trans*-Lycopenen

(Ψ,Ψ -Carotin) umgewandelt wird (Botella-Pavía und Rodríguez-Concepción, 2006). An dieser Stelle verzweigt sich der Stoffwechselweg, wobei durch unterschiedliche Zyklisierungs-Reaktionen der beiden Lycopon-Enden verschiedene Carotinoide entstehen. Das Enzym Lycopon- β -Cyclase (BC) addiert nacheinander zwei β -Ringe an Lycopon und katalysiert so in zwei Schritten die Bildung von β -Carotin (β,β -Carotin) über γ -Carotin (β,Ψ -Carotin). Die Lycopon- ε -Cyclase zyklisiert, analog zur BC, nacheinander die beiden Enden des Lycopon zu zwei ε -Ringen, wobei zunächst δ (β,Ψ)- und dann ε (ε,ε)-Carotin entsteht. Ausgehend von den beiden monozyklischen Zwischenstufen γ - und δ -Carotin entsteht, die heterozyklische Verbindung α -Carotin (β,ε -Carotin) (Cunningham u. a., 2007). ε -Carotin wurde bislang in Pflanzen nicht nachgewiesen – eine Ausnahme stellt das auch als Lactucaxanthin bezeichnete ε -Carotin aus Salat (*Lactuca sativa* cv. Romaine) dar, welches hier im Vergleich zu δ -Carotin sogar vorzugsweise gebildet wird (Cunningham und Gantt, 2001), sowie die EC aus *Adonis aestivalis* (Cunningham und Gantt, 2005). Durch Hydroxylierung der Ringe an den C3-Positionen entsteht aus β -Carotin mithilfe der Carotinoid- β -Ring-Hydroxylase (BH) via β -Cryptoxanthin das gelbe Zeaxanthin, während BH und Carotinoid- ε -Ring-Hydroxylase (EH) α -Carotin über Zeinoxanthin zu Lutein umsetzen, welches in der Pflanze akkumuliert wird. Die oxidierten Carotinoide werden als Xanthophylle klassifiziert und erfüllen innerhalb des LHC II wichtige Funktionen bei der Lichtabsorption. Zeaxanthin wird über die Zwischenstufe Antheraxanthin weiter metabolisiert zu Violaxanthin (Zeaxanthin-Epoxidase, ZEP) und dieses zu Neoxanthin (Neoxanthin-Synthase, NSY) (Kim u. a. 2009). Violaxanthin wird von der Violaxanthin-De-Epoxidase (VDE) wiederum zu Zeaxanthin umgesetzt, diese reversible Reaktion bezeichnet man als Xanthophyll-Zyklus. Es ist bekannt, dass die Pflanze diesen Zyklus nutzt, um auf Veränderungen in ihrer Umwelt zu reagieren (Demmig-Adams u. a., 1996). Violaxanthin und Neoxanthin dienen als Vorstufen für die oben bereits erwähnte Synthese von ABA (Botella-Pavía und Rodríguez-Concepción, 2006). Genaue Analysen der Isoformen unterschiedlicher Enzyme des Carotinoid-Stoffwechsels (z.B. PSY, BH, BC, GGPPS) lassen den Schluss zu, dass in vielen Blüten und Früchten ein chromoplastenspezifischer Carotinoid-Stoffwechsel abläuft, der sich von demjenigen in chloroplastenhaltigen Geweben wie Blättern unterscheidet (Galpaz u. a., 2006). Zur schnellen Identifikation und funktionellen Charakterisierung pflanzlicher Carotinoid-Stoffwechsel-Enzyme im heterologen System etablierte die Forschergruppe um Cunningham einen bakteriellen Assay (Cunningham und Gantt, 2007).

Bislang wenig untersucht ist die Regulation der am Carotinoid-Metabolismus beteiligten Enzyme auf genetischer Ebene. Strukturelle und funktionelle Analysen des PSY-Promotors zeigten Aktivität des Promotors im Dunkeln, sowie eine starke Aktivierung der Transkription durch Licht unterschiedlicher Wellenlängenbereiche (Welsch u. a., 2003). Kürzlich wurden der Transkriptionsfaktor (TF) RAP2.2 als negativer Regulator des PSY-Gens sowie sein Interaktionspartner SINAT2 (*Seven in absentia of Arabidopsis 2*) in *A. thaliana* identifiziert. Spezifische Bindemotive (ATCTA) für RAP2.2 wurden sowohl

im *PSY*- als auch im *PDS*-Promotor entdeckt. Die Überexpression von *RAP2.2* führt in transgenen *Arabidopsis* (Kalli und Wurzeln) zu gesenkten *PSY*- und *PDS*-Transkripten, sowie zu geringeren Carotinoid-Gehalten. *SINAT2* ist beteiligt am proteasomalen Abbau und dient somit möglicherweise wiederum als Regulator von *RAP2.2* (Welsch u. a., 2007). Vermutet wird aufgrund von Untersuchungen in Sonnenblume auch eine Art negative *feedback*-Regulation der *PSY*-Transkription durch das Substrat Phytoen selbst (Campisi u. a., 2006).

2.2 Die Enzyme Phytoensynthese, Lycopon- ϵ -Cyclase und Carotinoid- β -Ring-Hydroxylase

Die an Thylakoidmembranen von Chloro- und Chromoplasten assoziierte *PSY* katalysiert den ersten Schritt der Carotinoid-Biosynthese, der als entscheidende Schlüssel-Reaktion für den Verlauf des weiteren Carotinoid-Stoffwechsels angesehen wird (s. II.2.1). Dabei handelt es sich um die Kondensation zweier Moleküle GGPP zur ersten synthetisierten Carotinoid-Vorstufe Phytoen. GGPP entsteht beim plastidären Isoprenoid-Metabolismus und ist eine gemeinsame Vorstufe der Carotinoid- und Chlorophyllsynthese. Dementsprechend kommt der Regulation der *PSY* große Bedeutung bei, da ein Erschöpfen des GGPP-Pools der Pflanze vermieden werden muss, um die essentielle Chlorophyllsynthese nicht zu beeinträchtigen. Eine Abnahme des Chlorophyll-Gehalts in Blättern war die Folge der homologen *PSY*-Überexpression in Tomate (Fray u. a., 1995). Die *PSY*-Transkription, und folglich der zelluläre Carotinoid-Gehalt, unterliegt einer komplexen Licht- bzw. Phytochrom-abhängigen Regulation, wobei nur bei bestimmten Wellenlängen die Enzymaktivität gleichzeitig gesteigert wird. Bei langwelligem Rotlicht wird der mRNA-Gehalt erhöht, die *PSY* liegt jedoch in Prolamellar-Körpern in nahezu inaktiver Form vor, während das Enzym bei Weißlicht durch Relokalisation in die reifen Chloroplasten-Thylakoidmembranen aktiviert wird. Die *PSY*-Aktivität hängt also eng mit der Chloroplasten-Entwicklung zusammen und ist membranabhängig (Welsch u. a., 2000; Schledz u. a., 1996). In den meisten Pflanzenarten liegen mehrere Isoformen der *PSY* vor, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden - beispielsweise gibt es drei Phytoensynthesen in Gräsern und Reis (Welsch u. a., 2008; Li u. a., 2008, 2009). In Tomate wird die *PSY1* spezifisch in Früchten exprimiert, wobei die Expressionsrate und die Enzymaktivität abhängig vom Reifestadium sind. Im Gegensatz dazu wurden *PSY2*-Transkripte in allen Geweben der Pflanze nachgewiesen (Giorio u. a., 2008; Fraser u. a., 1999).

Die photosynthetisch aktiven Carotinoide zeichnen sich durch zwei endständige Ringsysteme aus. Die unterschiedliche Zyklisierung der beiden Lycopon- Ψ -Enden zu ϵ - und β -Ring ist der einzige Verzweigungs-Punkt im Carotinoid-Metabolismus. Das symmetrische Lycopon ist somit Substrat für

zwei verschiedene Enzyme: die BC, die β -Ringe generiert und die EC, die die Zyklisierung zu ε -Ringen katalysiert. Durch das Zusammenspiel der beiden Cyclasen entstehen zunächst die monozyklischen Zwischenstufen γ - und δ -Carotin, die von den gleichen Enzymen weiter umgesetzt werden zu den homozyklischen Carotinoiden β - und ε -Carotin, sowie zum heterozyklischen α -Carotin (s. II2.1). Die im Stroma lokalisierte, thylakoidmembranassoziierte EC leitet den Reaktionszweig zur Synthese des Endproduktes Lutein ein und ist das hauptverantwortliche Enzym für das zelluläre Verhältnis von α - zu β -Carotin (Cunningham und Gantt, 1998). In Mais wurden vier Polymorphismen des *EC*-Gens gefunden, die starke Variationen dieses Verhältnisses in der Maispflanze bewirken (Harjes u. a., 2008). Basierend auf den Untersuchungen von Siefermann-Harms u. a. (1981) postulieren Cunningham und Gantt, trotz einer Homologie der EC aus *Arabidopsis* und *Lactuca sativa* cv. Romaine von ca. 80 % auf AS-Ebene, dass das Enzym aus Salat die Fähigkeit besitzt, ε -Carotin zu synthetisieren (also zwei ε -Ringe an die Enden eines Lycopren-Moleküls anzufügen), das homologe Enzym aus *Arabidopsis* hingegen nicht (Cunningham und Gantt, 1998; Cunningham u. a., 1996). Cunningham und Kollegen berichten von einer einzelnen AS, die entscheidet, ob die EC aus *A. thaliana* und *L. sativa* zwei ε -Ringe an Lycopren addieren kann oder nur einen (Cunningham und Gantt, 2001).

Die einleitenden Enzyme für die Xanthophyll-Synthese sind die Hydroxylasen, wobei die in der Thylakoidmembran lokalisierte, membranständige BH die Hydroxylierung von β -Ringen katalysiert und die EH ε -Ringe hydroxyliert (Cunningham und Gantt, 1998). Sowohl für die EH als auch für die BH wurden in *A. thaliana* und zahlreichen anderen Pflanzenarten bislang zwei Isoformen gefunden. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Cyclasen EC und BC, die eine Homologie von 83 % auf Proteinebene aufweisen, zeigen EH und BH jedoch nur geringe Homologie (ca. 47 %) und gehören vollkommen unterschiedlichen Enzymklassen an: Die BH ist eine eisenhaltige Nicht-Häm-Monooxygenase, während es sich bei der EH um eine Cytochrom-P450-Monooxygenase handelt (Kim u. a., 2009). Für die vier Carotinoid-Hydroxylasen wurden funktionelle Überlappungen festgestellt: So zeigten *Arabidopsis*-Mutanten, in denen beide *BH*-Gene funktionell zerstört wurden, zwar deutlich niedrigere, aber immer noch signifikante β -Xanthophyll-Mengen (Tian u. a., 2003). Aktuelle Untersuchungen zufolge wird vermutet, dass die BH2 hauptsächlich für die Xanthophyll-Synthese in Samen verantwortlich ist, da die *BH2*-Genexpression hier besonders hoch ist und schnell induziert wird (Kim u. a., 2009). Die beiden BH-Isozyme synthetisieren bevorzugt β (β,β)-Xanthophylle, zeigen jedoch auch eine signifikante Hydroxylierung des β -Rings von α -Carotin. Zum ε -Ring von α -Carotin haben die beiden BH-Isozyme eine geringe Affinität, sind aber dennoch in der Lage, diesen zu hydroxylieren. Die EH-Enzyme katalysieren hauptsächlich die Synthese von α (β,ε)-Xanthophyllen,

unterscheiden sich jedoch eindeutig hinsichtlich ihrer bevorzugten Substrate. Das eine EH-Isomer setzt bevorzugt die β - und ε -Ringe von α -Carotin um, die Hydroxylierung der β -Ringe von β -Carotin findet indessen nur in geringem Maße statt. *Arabidopsis*-Mutanten, bei denen ein oder zwei der *EH*-Gene ausgeschaltet wurden, zeigten unter normalen Lichtbedingungen keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp, bei hohen Lichtintensitäten jedoch deutliche Stress-Symptome in Form von Blatt-Nekrose, bedingt durch erhöhte α -Carotin-Mengen in den Blättern (siehe hierzu auch Demmig-Adams und Adams, 1992). Das Ausschalten beider *BH*-Gene und eines *EH*-Gens hatte sowohl bei normalen als auch bei hohen Lichtintensitäten letale Auswirkungen auf die Dreifach-Mutante (Kim u. a., 2009). Die beiden *A. t.* *BH*-Isozyme zeigen hohe Homologie auf Proteinebene und scheinen funktionell redundant zu sein. Beide Gene werden in allen untersuchten *Arabidopsis*-Geweben simultan exprimiert, wobei der mRNA-Gehalt für *BH1* deutlich höher ist als für *BH2* (Tian u. a., 2003; Tian und DellaPenna, 2001). In Tomate hingegen wird die *BH2* hauptsächlich in Blüten und Früchten exprimiert, während in Blättern die *BH1* dominiert. Die weißen Blüten des *S. lycopersicum white flower mutant* sind zurückzuführen auf eine Mutation im *BH2*-Gen, während durch unveränderte Aktivität der *BH1* der Carotinoid-Gehalt in Blättern konstant bleibt (Galpaz u. a., 2006). In Kartoffeln scheint die Überexpression der *BH2* zu einem erhöhten β -Carotin-Gehalt in den Knollen zu führen (Diretto u. a., 2007).

2.3 Carotinoid-Biotechnologie in Pflanzen

Zur Erzeugung von Nutzpflanzen mit erhöhtem Carotinoid-Gehalt sowie zur Aufklärung des Carotinoid-Stoffwechsels wurden bis heute zahlreiche gentechnisch veränderte Pflanzen generiert und analysiert (s. auch II1). In der Grundlagenforschung werden die Untersuchungen zur funktionellen Analyse der am Carotinoid-Metabolismus beteiligten Enzyme in erster Linie mit Hilfe der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt.

In allen untersuchten Pflanzenarten wurden mehrere Isomere vieler zentraler Enzyme des Carotinoid-Stoffwechsels (z.B. *PSY*, *BH*, *EH*) entdeckt, die sich hinsichtlich Gewebe- und Entwicklungsspezifität unterscheiden und somit teilweise unterschiedliche Aufgaben im pflanzlichen Organismus erfüllen. Transgene Überexpression sowie *Silencing* via RNAi oder *antisense*-cDNA erfolgt zunehmend unter Verwendung gewebe- und organspezifischer Promotoren. Ein Vorteil hierbei ist die Vermeidung von schädlichen oder gar letalen Auswirkungen metabolischer Nebeneffekte, die durch Änderungen des Carotinoid-Stoffwechsels in der ganzen Pflanze auftreten können (Giuliano u. a., 2008).

Carotinoide werden nicht nur von Pflanzen, sondern auch von einigen Mikroorganismen hergestellt. Perry und Kollegen haben den Carotinoid-Stoffwechsel des Enterobakteriums *Erwinia herbicola*

aufgeklärt und die beteiligten Gene identifiziert (Perry u. a., 1986). Durch die Ausprägung eines oder gleich mehrerer dieser bakteriellen Carotinoid-Biosynthesegene in transgenen Pflanzen konnten Nutzpflanzen mit erhöhten Carotinoid-Gehalten erfolgreich generiert werden (Ravanello u. a., 2003). Die PSY-katalysierte Synthese von Phytoen dient bis heute als Hauptziel für Modifikationen des Carotinoid-Metabolismus. Die Insertion des bakteriellen *crtB*-Gens (Homolog des pflanzlichen PSY-Gens) in das Lein-Genom führte unter Verwendung des konstitutiven CaMV-35S-Promotors zu einer Expression des Transgens in den Leinsamen, was eine maximal 18-fache Steigerung des Gesamt-Carotinoidgehalts (156 µg/g Frischgewicht) bewirkte (Fujisawa u. a., 2008). In Raps führt die Samen-spezifische Expression desselben Gens ebenfalls zu einer Anreicherung an Carotinoiden, in diesem Fall sogar um das 50-fache, wobei hauptsächlich α - und β -Carotin-Gehalt gesteigert wurden. Lutein und Sterol-Mengen blieben unverändert (Shewmaker u. a., 1999). Die Erzeugung des transgenen *Golden Corn* mit 34-fach erhöhtem β -Carotin-Gehalt gelang durch Transformation der Maispflanze mit den bakteriellen Gene *crtB* und *crtI*. *crtI* kodiert eine PDS, die in den Bakterien die kompletten Desaturierungs-Reaktionen zur Herstellung von Lycopon katalysiert (Aluru u. a., 2008). Diretto und Kollegen integrierten gleich drei *E. herbicola*-Gene in das Genom der Kartoffel, *crtB*, *crtI* und *crtY* (Homolog des pflanzlichen BC-Gens) unter Verwendung eines knollenspezifischen Promotors, was eine 20-fach erhöhte Anreicherung von Carotinoiden insgesamt und eine 3600-fache Steigerung der β -Carotin-Menge ausschließlich in der Knolle zur Folge hatte (Diretto u. a., 2007). Die homologe p35S-Überexpression der *A. thaliana* PSY führt zu keinerlei Veränderungen in Keimlingen, während nicht photosynthetisch aktives Gewebe einen deutlich erhöhten Carotinoid-Gehalt aufweist (Kalli zehnfach, Wurzeln 100-fach), der mit veränderten Carotinoid-Verhältnissen einhergeht. Ein besonders starker Anstieg an β -Carotin im Vergleich zu Xanthophyllen ist zu beobachten, wobei die Carotinoide in Kristallen akkumuliert werden. Eine wurzelspezifische Überexpression des bakteriellen *crtB*-Gens in weißen Karotten (cv. Queen Anne's Lace) führt zur Orange-Färbung aufgrund einer Anreicherung diverser Carotinoide, insbesondere Phytoen und β -Carotin, ebenfalls unter Ausbildung kristalliner Carotinoid-Strukturen. Auch hier steigt der Xanthophyll-Gehalt kaum an (Maass u. a., 2009). In Tomate führt die Überexpression der fruchtspezifischen endogenen PSY zu einer Senkung des Chlorophyll-Gehalts in jungen Blättern und einer 30 %-igen Reduktion an Gibberellin A1, was einen zwergwüchsigen Phänotyp zur Folge hat (Fray u. a., 1995).

Während mehrfach gezeigt wurde, dass eine Überexpression des Enzyms BC erwartungsgemäß zu einer deutlichen Steigerung der Umsatzrate von Lycopon zu β -Carotin und somit zu einem erhöhten β -Carotin-Gehalt führt (Apel und Bock, 2009; Wurbs u. a., 2007), wurde die EC bislang nur wenig in transgenen Ansätzen untersucht. In *Arabidopsis* wurde der Lutein-Gehalt durch Überexpression der endogenen EC um bis zu 80 % gesteigert (Pogson und Rissler, 2000), im Gegensatz dazu lieferte knollenspezifisches Gen-Silencing in Kartoffel neben einem 2,5-fach erhöhten Gesamt-Carotinoid-

Gehalt eine 14-fach gesteigerte β -Carotin-Akkumulation. Ein Einfluss auf den Lutein-Gehalt konnte hier nicht gezeigt werden (Diretto u. a., 2006).

Analog zum *Silencing* der EC führten Diretto und Kollegen Experimente zu *Silencing* der beiden BH-Gene in Kartoffel-Knollen durch. Hierdurch wurden stärkere Effekte erzielt: Der Gesamt-Carotinoid-Gehalt stieg um das 4,5-fache, der β -Carotin-Gehalt sogar um das 38-fache. Interessanterweise blieb das Xanthophyll-Niveau in den Knollen trotz gesenktem Zeaxanthin-Gehalt konstant (Diretto u. a., 2007). *Silencing* der endogenen BH in *A. thaliana* lieferte hingegen transgene Linien mit gesenktem Xanthophyll- und gesteigerten β -Carotin-Gehalt (Pogson und Rissler, 2000). Überexpression von BH und BC unter der Kontrolle des fruchtspezifischen *PDS*-Promotors lieferte transgene Tomatenfrüchte, die β -Cryptoxanthin und Zeaxanthin akkumulierten (Dharmapuri u. a., 2002).

Eine Alternative zur bislang durchgeführten Transformation des nuklearen Genoms stellt die Transformation des Plastiden-Genoms mit carotinoidspezifischen Genen, oftmals aus *E. herbicola*, dar. Die Integration der Transgene in das Chloroplasten-Genom der Zielpflanze führt bei Chloro-bzw. chromoplastenspezifischer Überexpression zu sehr guten Umsatzraten des rekombinanten Enzyms (Wurbs u. a., 2007). Die Ergebnisse unterscheiden sich von denjenigen der Transformation des Kerngenoms. So konnten die Forscher um Bock durch plastidäre Überexpression der BC aus Narzisse in Tomate eine Erhöhung des gesamten Carotinoid-Gehalts sowie der Umsetzung von Lycoplen zu β -Carotin in den Früchten nachweisen, während bei analoger Ausprägung der *E. herbicola*-BC nur sehr schwache Veränderungen festgestellt wurden (Apel und Bock, 2009).

Einen weiteren neuartigen Ansatz zur Modulation des Carotinoid-Stoffwechsels in Pflanzen liefert die Transformation mit einem mutierten *Or*-Gen aus Blumenkohl. Das *Or*-Gen ist an der Regulation der Plastid-Differenzierung und somit an der Ausbildung von Chromoplasten beteiligt (Lu u. a., 2006). Endogene Expression des mutierten Gens in Blumenkohl, sowie heterologe Expression in Kartoffel liefern einen drastischen Anstieg an β -Carotin, deutlich erkennbar an einer Orange-Färbung des Fruchtfleisches (Li und Van Eck, 2007).

3 Die Peptid-Aptamer-Technologie

Als Aptamere bezeichnet man kleine Moleküle (kurze Nukleinsäuren oder Peptide), die aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur mit hoher Affinität und Spezifität an ein bestimmtes Zielmolekül, meist ein Protein, binden. Bioaktive Aptamere sind zudem in der Lage, die Funktion des interagierenden Zielproteins zu modulieren (Borghouts u. a., 2008).

3.1 Zufallspeptid-Libraries und Trägerproteine

Bei Peptid-Aptameren handelt es sich um 8 bis 20 AS lange Peptid-Moleküle zufälliger Sequenz, die aufgrund ihres Faltungsverhaltens eine stabile dreidimensionale Struktur ausbilden (Borghouts u. a., 2008). Die Identifizierung von Peptid-Aptameren, die spezifisch an ein bestimmtes Zielprotein binden, kann mithilfe der sogenannten *Yeast-Two-Hybrid-Technologie* erfolgen. In Form einer Zufallspeptid-Library werden in den verschiedenen Hefezellen bis zu 10^9 unterschiedliche Peptidsequenzen exprimiert. Häufig sind die Zufallspeptide in ein kleines monomeres Trägerprotein (*Scaffold*) integriert, was die Faltung des Peptids gewährleisten bzw. das Peptid *in vivo* stabilisieren soll. Ein geeignetes Trägerprotein muss mehrere Eigenschaften erfüllen: Es sollte in Prokaryoten und Hefezellen in hoher Zahl exprimiert werden, nicht toxisch und in der Zelle stabil sowie gut löslich sein. Weiterhin muss das Trägerprotein, im Falle einer internen Insertion, einen *loop* enthalten, in den das Zufallspeptid stabil integriert und für eine Interaktion präsentiert werden kann (Colas, 2008). Das 12 kDa große bakterielle Thioredoxin aus *E. coli* (TrxA) wurde bereits mehrfach erfolgreich für die Konstruktion von Peptid-Libraries verwendet. Die Insertion der Peptid-Sequenzen erfolgt hierbei in einen 4 AS langen *loop* und führt zur Inaktivierung des TrxA, sowie zur Präsentation des Peptids auf der TrxA-Oberfläche (Lu u. a., 1995). In den vergangenen Jahren wurden weitere optimierte Trägerproteine entwickelt, wie beispielsweise das 98 AS große STM (*stefin A triple mutant*)-Scaffold, welches von dem intrazellulären Protease-Inhibitor Stefin A (Cystatin A) abstammt und dessen hypervariable Region den Einbau 12 – 36 AS langer Peptide ermöglicht (Woodman u. a., 2005). STM ist *in vivo*, *in vitro* sowie thermisch stabil und außerdem biologisch inert, was zu einer deutlichen Reduktion unspezifischer Interaktoren in experimentellen Arbeiten führt (Evans u. a., 2008; Davis u. a., 2007). Durch die Insertion eines zusätzlichen Cystein-Rests im N-terminalen Bereich wurde das optimierte Trägerprotein STM^{Cys+} generiert, welches durch die Mutation eine stabile Präsentation des integrierten Peptids gewährleistet (Davis u. a., 2007). Ein modifiziertes GFP-Scaffold beinhaltet drei für eine Peptid-Präsentation geeignete *loops*, die Peptid-Fusion kann jedoch auch am N- oder C-Terminus des Proteins erfolgen. Da die fluoreszierenden Eigenschaften des GFP-Scaffolds hierbei erhalten bleiben, dient es zusätzlich der intrazellulären Lokalisation und der Quantifizierung der exprimierten Peptide (Abedi u. a., 1998; Paschke u. a., 2007; Peelle u. a., 2001). Eine neuartige Peptid-Library mit einem LiRP (*ligand regulated peptide*)-Scaffold aus den Domänen FKBP12, FRB und GST erlaubt die Regulation der Präsentation/Ausrichtung des eingebetteten Peptids über Bindung des zellpermeablen Liganden Rapamycin an das Scaffold, wodurch der Hintergrund im Screening deutlich reduziert wird (Miller, 2009).

3.2 Library-Screening-Methoden

Neben einer hohen Komplexität der Peptid-*Library* und der stabilen Expression der Peptide in einem geeigneten *Scaffold* stellt ein effizientes *Screening*-System einen weiteren kritischen Punkt bei der Suche nach spezifischen Peptid-Aptameren dar (Phizicky und Fields, 1995). Eine etablierte und vielfach optimierte Methode zur Identifizierung interagierender Peptide ist das *Yeast-Two-Hybrid-Screening*. Hierbei wird die Interaktion von Zielprotein (*Bait*) und Aptamer (*Prey*) *in vivo* detektiert, indem *Bait* und *Prey* mit der Binde- bzw. Aktivierungsdomäne des Gal4-TFs fusioniert werden, der im Falle einer Interaktion funktionell rekonstituiert und zur Expression eines Reportergens in der Hefezelle führt (Chien u. a., 1991; Fields und Song, 1989). Vielfach wurden Optimierungen des *Y2H-Screenings* vorgenommen, um die Zahl putativer Aptamere zu erhöhen und das *Screening* hochdurchsatzfähig zu machen oder besonders starke Interaktoren zu selektieren (Bickle u. a., 2006; Mason u. a., 2008; Lopez-Ochoa u. a., 2009). Beispielsweise kann durch Optimierung der Zelldichten der Hefekulturen die *Mating*-Effizienz (also die Effizienz der Zellfusion) der *Bait*- und *Prey*-exprimierenden Kulturen gesteigert werden (Soellick und Uhrig, 2001). Neben dem klassischen *Screening* interagierender Peptide wurden diverse phänotypische *Y2H*-Assays entwickelt, in denen gezielt Aptamere auf den gewünschten *in vivo*-Effekt hin selektiert wurden (Norman u. a., 1999; Geyer und Brent, 2000; Blum u. a., 2000; Kitamura u. a., 2009), s. auch II.3.3. Bei der Phagen-*Display*-Methode wird das Zufallspeptid auf der Phagenoberfläche präsentiert, das Zielprotein *in vitro* immobilisiert und mit den Phagen inkubiert. (Smith, 1985; Scott und Smith, 1990). Je nach Zielsetzung birgt dieses System jedoch den Nachteil, dass der Interaktionsnachweis nicht in einer intrazellularen eukaryotischen Umgebung stattfindet, wie es beim *Y2H-Screening* der Fall ist. Sollen die gefundenen Aptamere anschließend *in vivo* eingesetzt werden, so ist es beim *Y2H-Screening* wahrscheinlicher, dass die Peptide im lebenden Zielorganismus ihre Struktur und ggf. Funktionalität beibehalten (Borghouts u. a., 2008). Außerdem muss das Zielprotein beim *Y2H*-Assay nicht isoliert, gereinigt und immobilisiert werden. Nach einem ähnlichen Prinzip wie beim Phagen-*Display* erfolgt das *Screening* mit der FliTrxTM *Random Peptide Display Library* (Invitrogen), bei der die Zufallspeptide analog auf der Zelloberfläche (Flagellen) von *E. coli*-Bakterien präsentiert werden (Lu u. a., 1995).

Einen alternativen Ansatz zur Identifizierung interagierender Peptide ermöglicht das *Y2H-Screening* mit einer sogenannten *random fragment-Library*. Die Voraussetzung ist, dass für ein bestimmtes *Bait* ein interagierendes Protein bereits bekannt ist. Auf Basis dieses Proteins wird eine *Library* aus zufälligen C- und N-terminalen Protein-Fragmenten unterschiedlichster Längen erstellt. Mittels *Y2H-Screening* kann auf diese Weise die minimale interagierende Region (Mikrodomäne) eingegrenzt werden (Rudolph u. a., 2003).

3.3 Anwendungsgebiete von Peptid-Aptameren

Aufgrund der großen Fortschritte, die in den letzten Jahren hinsichtlich der Optimierung von Peptid-*Libraries* sowie der Etablierung hochdurchsatzfähiger *Screening*-Methoden gemacht worden sind, wurden etliche Aptamer-basierte Technologien und experimentelle Verfahren entwickelt, die in unterschiedlichsten Forschungsgebieten zum Einsatz kommen. Beispielsweise dienen Peptid-Aptamere, analog zu Antikörpern, der *in vitro*- und *in vivo*-Detektion eines bestimmten Zielproteins (Johnson u. a., 2008). Kürzlich wurde ein Peptid entdeckt, das in der Lage ist, die aktive Form seines Zielproteins von der inaktiven zu unterscheiden, wobei der Unterschied lediglich in der Phosphorylierung einer einzigen AS liegt (Davis u. a., 2009). Zur spezifischen Detektion bestimmter Zielproteine aus Zelllysaten wurde ein Aptamer-basiertes *Microarray*-System entwickelt, bei dem bereits verifizierte Aptamere auf kleinen, dicht gepackten Goldelektroden immobilisiert werden. Die Detektion erfolgt elektrochemisch über Änderungen des Stromwiderstandes bei spezifischer Bindung eines Proteins an die Aptamer-beschichteten Elektroden. Die homogene Immobilisierung gewährleistet eine zuverlässige Protein-Quantifizierung und ermöglicht eine Anwendung des Systems im nm-Maßstab (Evans u. a., 2008).

Bioaktive Peptid-Aptamere werden in diversen Forschungsbereichen eingesetzt, um die Funktion eines bestimmten Proteins/Enzyms in der lebenden Zelle zu modifizieren, wodurch Stoffwechselwege in lebenden Organismen moduliert werden können (Colas, 2008; Uhrig, 2006). In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Peptide, die eine Enzym-Funktion inhibieren und somit häufig therapeutische Zwecke erfüllen sollen (Hoppe-Seyler u. a., 2004). Bereits 1996 gelang es den Forschern um Colas, ein 20 AS langes Peptid zu finden, das die humane Cdk2 (*cyclin-dependent kinase 2*) inhibiert (Colas u. a., 1996). Sieben Aptamere wurden identifiziert, die die Serin-Protease NS3 des Hepatitis C-Virus hemmen und *in vivo* die Replikation des Virus blockieren (Trahtenherts u. a., 2008). Wesentlich schwieriger ist es, ein Aptamer zu finden, welches über Interaktion mit dem Zielenzym dessen Aktivität hochreguliert. In einem phänotypischen *Screening* wurde das 10 AS lange Peptid R5G42 identifiziert, das die Aktivität der humanen Proteinphosphatase Calcineurin A steigert und somit in Experimenten mit menschlichen Zellkulturen eine antiproliferative Wirkung zeigte (de Chasseu u. a., 2007). Die Aktivität der Protease Cathepsin E konnte mithilfe von Peptid-Aptameren um etwa 30 % gesteigert werden (Nouvion u. a., 2007; Kitamura u. a., 2009). Transkriptionsfaktoren stellen ebenfalls Ziele für Aptamer-Bindungen dar, wie z.B. der TF Stat3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), der hohe Aktivität in Tumorzellen aufweist. Die onkogene Wirkung von Stat3 in Tumorzellen konnte durch Aptamer-Bindung an die Stat3-Dimerisierungsdomäne oder die DNA-Bindedomäne unterbunden werden (Nagel-Wolfrum u. a., 2004). Die bioaktive Wirkung von Peptid-Aptameren, die mit dem VP22-Protein des Herpes simplex-Virus fusioniert wurden, basiert

auf der Aptamer-vermittelten Aggregation der Zielproteine zu perinuklearen *inclusion bodies* (Aggresomen) (Tomai u. a., 2006).

Peptid-Aptamere sind heutzutage bereits fester Bestandteil des mehrstufigen Entwicklungs-Prozesses medizinischer Wirkstoffe (Colas, 2008). Sogenannte *interfering peptides* unterbinden die Interaktion zwischen zwei Proteinen (Gaida u. a., 2009; Mason u. a., 2008). Im Aptascreen-Assay zur Identifizierung medizinischer Wirkstoffe werden zunächst Aptamere gesucht, die an das Zielprotein binden, anschließend werden aus einer chemischen *Library* Wirkstoffe selektiert, die die Aptamer-Protein-Interaktion unterbinden, also das Aptamer verdrängen. Ausgehend davon, dass sich auf der Zielprotein-Oberfläche bestimmte Epitope befinden, die für funktionelle Interaktionen zugänglich sind (sogenannte *druggable sites*), verspricht man sich von den isolierten Wirkstoffen einen bioaktiven bzw. therapeutischen Effekt. Das vollautomatisierte Aptascreen-System kann im Hochdurchsatz-Maßstab (max. 384-*well*) durchgeführt werden (Bardou u. a., 2009). Aptamere dienen auch als Hilfsmittel bei der Aufklärung zellulärer Interaktions-Netzwerke und der Identifizierung von Zusammenhängen bei metabolischen Prozessen in der Grundlagenforschung. Aptamere, die für ein bestimmtes Protein gefunden wurden, werden wiederum als *Baits* im *Y2H-Screening* eingesetzt, wobei aus einer *cDNA-Library* weitere interagierende Zielproteine selektiert werden (Norman u. a., 1999). Weiterhin kommen Peptid-Aptamere auch in der Material-Forschung zum Einsatz, wo sie beispielsweise für die Erzeugung neuer Hybrid-Materialien eingesetzt werden. Zur Identifizierung von Aptameren mit einer starken Bindeaffinität zu anorganischen Materialien (z.B. TiO_2), wird die *FliTrxTM-Library* (II3.2) verwendet und die Peptide auf Interaktion mit TiO_2 -beschichteten Si-Mikro-Halbleiterplättchen selektiert (Gronewold u. a., 2009).

In der pflanzlichen Biotechnologie kamen Peptid-Aptamere bislang nicht zum Einsatz. Dass kurze Peptide jedoch auch *in planta* eine bioaktive Wirkung haben können wurde bereits gezeigt. Eine 29 AS lange Mikrodomäne, die als Interaktor des N (*nucleocapsid*)-Hüllenproteins aus TMSV (*tomato spotted wilt tospovirus*) via *Y2H-Screening* identifiziert worden ist, führte bei Expression in *N. benthamiana* (in Fusion mit GUS) zur Resistenz der transgenen Pflanzen gegenüber mehreren Pflanzenviren (Uhrig, 2008; Rudolph u. a., 2003). Durch die Anwendung antiviraler Peptid-Aptamere können unerwünschte Nebenwirkungen wie ein reduziertes Pflanzenwachstum oder eine geringere Stresstoleranz, die bei der Anwendung konventioneller gentechnischer Methoden beobachtet wurden, umgangen werden (Uhrig, 2006).

4 Zielsetzung

Die Peptid-Aptamer-Technologie liefert einen neuartigen, attraktiven Alternativ-Ansatz zur *in vivo*-Modulation von Enzymaktivitäten. In der vorliegenden Arbeit sollen Peptid-Aptamere mit bioaktiver Wirkung eingesetzt werden, um den pflanzlichen Carotinoid-Stoffwechsel zu modifizieren. Als Ziele für eine Aptamer-Bindung wurden die am Carotinoid-Stoffwechsel beteiligten Enzyme β -Ring-Hydroxylase 2, Lycopren- ϵ -Cyclase und Phytoensynthase aus *A. thaliana* gewählt. Die Aktivitäten dieser Enzyme sollen jeweils durch Bindung eines bioaktiven Aptamers so moduliert werden, dass es in der Modellpflanze *A. thaliana* und später in der Nutzpflanze *S. lycopersicum* zu einer Steigerung des β -Carotin-Gehalts kommt, ohne dabei schädliche Nebenwirkungen in der Pflanze zu erzeugen.

Nach erfolgreichem Aktivitäts-Nachweis der drei Zielenzyme in *E. coli* und Identifizierung von Peptid-Aptameren über *Y2H-Screenings*, sollen die gefundenen Aptamere hinsichtlich ihrer bioaktiven Eigenschaften zunächst im bakteriellen System geprüft werden. Die Expression von Zielenzym und Aptamer, sowie die Interaktion gilt es *in planta* zu verifizieren. Eine Änderung des pflanzlichen Carotinoid-Profiles durch Expression der bioaktiven Aptamere soll in transgenen *A. thaliana*-Linien und anschließend in *S. lycopersicum* geprüft werden. Für eine organ- bzw. gewebespezifische Expression der Aptamere in der Pflanze wird zudem die Aktivität der putativen endogenen Promotoren der drei Zielenzyme in transgenen *Arabidopsis*-Linien und in Tomatenfrüchten mithilfe von GUS-Reporter-Expression untersucht und die ausgewählten Promotor-Bereiche hinsichtlich regulatorischer Elemente analysiert.

III Material und Methoden

1 Material

1.1 Mikroorganismen und Pflanzenarten

Für die durchgeführten Arbeiten wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Organismen (*E. coli*-Bakterien, Hefen, Agrobakterien und Pflanzen) verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Organismen (Bakterien, Hefen, Agrobakterien und Pflanzen) und die entsprechenden Genotypen oder Referenzen.

| Organismus | Genotyp oder Referenz |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> XL1 blue | <i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i> |
| <i>E. coli</i> DB 3.1 | <i>F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1</i> |
| <i>E. coli</i> TOP 10 | <i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻</i> |
| <i>E. coli</i> XL1 mutS | <i>F- endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 relA1 lac glnV44 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) mutS mutT mutD5 Tn10</i> |
| <i>S. cerevisiae</i> AH109 | <i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, MEL1 GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i> |
| <i>S. cerevisiae</i> Y187 | <i>MATα, ura3-52, his3-200, ade 2-101, trp1, leu2, trp 1-901, leu 2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ, MEL1</i> |
| <i>A. tumefaciens</i> EHA105 | Hood u. a. 1986 |
| <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 | Bevan und Chilton 1982 |
| <i>A. tumefaciens</i> GV3101 | Koncz und Schell, 1986 |
| <i>A. thaliana</i> cv. Columbia 0 | - |
| <i>S. lycopersicum</i> cv. Micro Tom | - |
| <i>N. benthamiana</i> | - |

1.2 Vektoren

DNA-Vektoren, die für sämtliche Klonierungsarbeiten verwendet wurde, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: DNA-Vektoren die für Klonierung und Expression in Bakterien, Hefen und Pflanzen.

| Vektor | Quelle |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Bakterielle Klonierungsvektoren | |
| pENTR/SD/D-TOPO | Invitrogen |
| pDONR201 | Invitrogen |
| Bakterielle Expressionsvektoren | |
| pGJ2720 | Phytowelt Green Technologies GmbH |
| pAC-BETAipi | Francis X Cunningham und Elisabeth Gantt 2005 |
| pAt-LCYe | F X Cunningham u. a. 1996 |
| Hefe-Expressionsvektoren | |
| pAS2-attR | Invitrogen |
| pACT2-attR | Invitrogen |
| Pflanzen-Expressionsvektoren | |
| pBatTL-RFP_N2 | Phytowelt Green Technologies GmbH |
| pBatTL-RFP_C2 | Phytowelt Green Technologies GmbH |
| pBatTL-nRFP_N2 | Joachim Uhrig, Universität zu Köln |
| pBatTL-nRFP_C2 | Joachim Uhrig, Universität zu Köln |
| pGJ2173 | Phytowelt Green Technologies GmbH |
| pNmR | Andrea Schrader, Universität zu Köln |
| pEGATE104 | Earley u. a. 2006 |
| pBatTL-GUS | Cordula Jürgens, Universität zu Köln |

1.3 Oligonukleotide (Primer)

Alle verwendeten Primer (Tabelle 3) wurden von der Firma Sigma Aldrich (USA) synthetisiert (Reinheitsgrad: RP1, *reverse-phase cartridge purification*). Die Schmelztemperatur der Primer wurde mithilfe des IDT-SciTools-OligoAnalyzer 3.1 (s. III1.5) berechnet.

Tabelle 3: Auflistung aller verwendeten Primer mit entsprechender Nukleotidsequenz in 5'-3'-Richtung und der berechneten Schmelztemperatur.

| Primer-Bezeichnung | Nukleotidsequenz |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Primer für Klonierungen | |
| AtEC_Prom_TOPO_fw | CACCGATATCGCTGCTCAACAACCTTGATTTG |
| AtEC_PromTOPO_rev | GCAGATCTTTTCTCCTCCAATAATTTG |
| AtPSY-TOPO_fw | CACCATGTCTTCTTCTGTAGC |
| AtPSY-TOPO_rev | GCGCTCATATCGATAGTCTTG |
| BH_Cterm-TOPO_fw | CACCATGGTTCACGATGGACTTG |
| BH_Cterm-TOPO_rev | GCGCTTAAGAGGTAGAAGAACCC |
| BH2_Prom_TOPO_fw | CACCGATATCGGTGATTTTCAGGAGAAG |
| BH2_Prom_TOPO_rev | GAAGATCTGGAAGGAGTTCGTTGAGG |
| BH2trunc-Inf_fw | CATCACCATTCCATGGAGATCTTGATGACGTCGCGGC |
| BH2trunc-Inf_rev | GTTAGCAGCCGGATCCTTAAGAGGTAGAAGAACCCTTGTTGTATAATTTGATTCTCC |
| EC_TOPO_fw | CACCATGGAGTGTGTTGGGGCTAGG |
| EC_TOPO_rev | GCGCTCATACTTTGAGATAGGTTTTATCATGG |
| ECtrunc-Inf_fw | CATCACCATTCCATGGCTAGCGGCGGCGAAGTTC |
| ECtrunc-Inf_rev | GTTAGCAGCCGGATCCTCATACTTTGAGATAGGTTTTATCATGGTTGCTCCGG |
| P1120-SD_TE_fw | GCCAGGAGGTAACAGCATGCGTATTTGC |
| P1121-SD_TE_rev | CTGTTACCTCCTGGCTTTTAGTAAGCCAGATCC |
| P1190-EC-Apt_fw | CCAGGAGGTAACAGCATGGATAAAGCGGAATTAATCCCGAGCCTCCAAAAAGAAGAGAAAAGG |
| P1191-EC-Apt_rev | GTTAGCAGCCGGATCCAACCTTGATTGGAGACTTGACCAAACCTCTGGCGAAGAAGTCCAAGC |
| P1192-EC-Apt-1170_fw | CCAGGAGGTAACAGCATGGGTGCTCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGCTGG |
| P1193-EC-Apt-1170_rev | GTTAGCAGCCGGATCCGACCAATGGCGAAGAAGTCCAAGCTTCTCGATCTAGAGGATCCTTATTC |
| P1239-EC-CFP_fw | CCAGGAGGTAACAGCATGGGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTC |
| P1240-EC-CFP_rev | CAGCGCGCAAATACGTTAGCAGCCGGATCCATATTTG |
| P1243-BH-CFP_fw | GATAACCAGGAGTGCAGCATGGTTAGCAAAGGAGAAGAAC |
| P1244-BH-CFP_rev | CAGCGCGCAAATACGCGGACTCAAGAGGATCCATATTTG |
| P1305-attB1_ECdel | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGCTAGCGGCGGCG |
| P1306-attB2_ECdel_ns | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACTTTGAGATAGGTTTTATCATGGTTGCTCCGG |
| P1360-CFPn-1274_fw | GGATGAACTATACAAATATGAGATCCTAGAAGTGGATCC |
| P1361-CFPn-1274_rev | TCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGTTCGACGGTATCGATAAG |
| P1395-CFPn-1170_fw | GGATGAACTATACAAATATGCCGAATTGACTTACAAATTAATCCTTAATGG |
| P1396-CFPn-1170_rev | TCGGGCTTTGTTAGCAGCCGTTAGCCTTTCAATGTCTCGAGGGC |
| P1421-attB1_SplitRFP | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCAC |
| P1422-attB2_SplitRFP | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCTTTCCGGGCTTTGTTAG |
| P1497-ChIP_Apt_fw | CAGGATCAGGTGCATGCAGGCCGGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCAC |
| P1498-ChIP_Apt_rev | GATTTGCGGACTCTAGAGGATCTTCTTTCCGGGCTTTGTTAG |
| PSY_Prom_TOPO_fw | CACCGATATCATGACCCACCCCTAAAC |
| PSY_Prom1_rev | GCAGATCTGTAGATGATGCTGTCTCTTCC |
| PSY_Prom713_rev | GCGCATTTAAATACTCAAGTTCTTGAGCGCG |

| | |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| PSYtrunc-Inf_fw | CATCACCATTCCATGGTAGCAAGTCCTTCTGGAGAGATAGC |
| PSYtrunc-Inf_rev | GTTAGCAGCCGGATCCTCATATCGATAGTCTTGAACCTGAAGTCTTTAGTACTG |
| Sequenzier-Primer | |
| 1018-ECseq | GCTTTATACATGTTTCGTCATTTTC |
| 1019-BH2seq | CATATGGGCTGTTTCTTGG |
| 3GAD | GTTTTTCAGTATCTACGATTC |
| 5GAD | CAAACCCAAAAAAGAGATC |
| gBD5 | GACAGCATAGAATAAGTG |
| P1185-pBat_fw | CTCGAGTTGAGAGTGAATATGAGAC |
| P1186-pBat_rv | CATTGGGATATATCAACGGTGG |
| P1251-pBat_rv | GAGAGACTGGTGATTTTTGCG |
| pADHs_fw | CAAAGACAGCACCAACAGATG |
| Pep1170s_rev | CGTATCTAACGATTTGACCCTTTTTC |
| pETr | CTAGTTATTGCTCAGCGG |
| revs | AACAGCTATGACCATG |
| T7 | GTAATACGACTCACTATAGGGC |
| tBD3 | GAAAGCAACCTGACCTACAGGAAAGAG |
| unis | GTAAAACGACGGCCAGT |
| Primer für Hefe-Colony-PCR nach Y2H | |
| Art_1 | CATAGCAACCCACTCCAGATCAGCCCCATCACACTAAGG |
| Art_2 | CCTACATCCTCACCAACCACATCTTCCACGCCCC |
| Art_3 | CGAAGAATAAGCCCAACCAACCCTGAGTAGTCAGCCCCC |
| Art_4 | CGCCCAAACCAACCTCTCAAACCACTCCCCAAATAATACTCGG |
| Art_A | GAACAGGTACCCGAACCAACCCAGCAG |
| P1013-1274_fw | CATCACCATTCCATGGAGATCCTAGAACTAGTGGATCCC |
| P1014-1274_rv | GTTAGCAGCCGGATCCGAGGTCGACGGTATCGATAAGC |
| P1015-1170_fw | CATCACCATTCCATGTACAAATTAATCCTTAATGGTAAAGAATTC |
| P1016-1170_rv | GTTAGCAGCCGGATCCCTTGATTGGAGACTTGACC |
| P1017-InfB42_fw | CATCACCATTCCATGGACTGGCTGAAATCGAATG |
| P1021-Art_C | GCCAACAGGTGCCCCAGGCACATGAG |
| P1362-AD5xl | GGACGGACCAAACCTGCGTATAACGCGTTTGGAACTACTACAGGGATG |
| P1363-AD3xl | GCGACCTCATGCTATACCTGAGAAAGCAACCTGACCTACAGGAAAGAG |
| Mutagenese-Primer | |
| P1028-SphI_ccdB_fw | GCATGCGGCAGCGTATTACAGTGACAGTTG |
| P1029-SphI_ccdB_rv | TACGCTGCCGCATGCCACACCTCTTTTTG |
| P1299-Inv_KK_fw | GCTCCCGGTACCGGCTGCTAACAAG |
| P1300-Inv_KK_rv | GCCGGTACCGGGAGCCTGACATTTATATTCC |

1.4 Chemikalien und Reagenzien

1.4.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien (analytischer Reinheitsgrad) wurden, von den Firmen Bio-Rad (USA), Boehringer (Mannheim), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Duchefa (Niederlande) und Sigma-Aldrich (USA) bezogen.

1.4.2 Nährmedien und Pflanzenerde

In Tabelle 4 sind sämtliche Nährmedien und Pflanzen-Erden mit Verwendungszweck dargestellt, sowie die entsprechenden Organismen, für die die Medien bzw. die Erden eingesetzt wurden.

Tabelle 4: Verwendete Nährmedien und Erde zum Kultivieren lebender Organismen.

| Medium | Organismus | Verwendungszweck |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LB-Medium | <i>E. coli</i> | Vollmedium für Anzuchten aller Art |
| YPAD | <i>S. cerevisiae</i> | Vollmedium für Anzuchten ohne Selektionsmarker |
| <i>Single-Dropout-Medium</i> | <i>S. cerevisiae</i> | Minimalmedium für Anzuchten auxotropher Hefen |
| YEB-Medium | <i>A. tumefaciens</i> | Vollmedium für Anzuchten aller Art |
| VM-Erde | <i>A. thaliana</i> | Einheitserde, Vermehrungserde für Aussaaten und Stecklinge, angepasster Tongehalt, geringer Nährstoffgehalt, beigemischtes Perlite |
| Minitray-Erde | <i>A. thaliana</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>S. lycopersicum</i> | Substrat für Trayplatten, feine Torfstruktur mit Tonmehl, Sand, zusätzlichen Spurenelementen und Eisen, niedrige Aufdüngung |

LB-Medium wurde hergestellt nach dem Protokoll von Bertani *et al.* (BERTANI, 1951).

YPAD-Medium wurde hergestellt aus 20 g Pepton/Trypton (Roth), 10 g Hefeextrakt (BD, Frankreich) und 100 mg Adenin (Sigma) auf 950 ml bidestilliertes Wasser. Der pH-Wert wurde auf 5,8 eingestellt. Nach Autoklavieren des Mediums wurde Glukose in einer Endkonzentration von 2 % zugegeben. Für Agar-Platten wurden 18 g Agar (Roth) pro Liter Medium verwendet.

Single-Dropout-Medium enthielt pro Liter Medium 6,7 g Yeast Nitrogen Base with (NH₄)₃SO₄ w/o amino acids (Difco), 600 mg DO Supplement^{LWH} (Clontech), 100 mg Adenin (Sigma) und 2 % Glukose (Endkonzentration). Je nach Auxotrophie der verwendeten Hefen wurden ggf. 20 mg Histidin (Duchefa), 50 mg Tryptophan (Duchefa), sowie 100 mg Leucin (Duchefa) zugegeben. Der pH-Wert betrug 5,8. Für Agarplatten wurden 18 g Agar/l (Roth) zugeben. Das für *Y2H-Screenings* verwendete SD-Medium enthielt zusätzlich 3 mM 3-AT (Sigma), sowie 0,5 % Gelrite (Sigma).

YEB-Medium bestand pro Liter aus 5g Fleischextrakt (Roth), 1g Hefeextrakt (BD, Frankreich), 5g Pepton/Tripton (Roth), 5g Glukose und 2 mM MgSO₄ (Merck). Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt. Für Agarplatten wurde 15 g/l Agar (Roth) eingesetzt.

1.4.3 Antibiotika

Tabelle 5 gibt alle zur Selektion transgener Bakterien verwendeten Antibiotika und die entsprechenden Arbeitskonzentrationen wieder. Die Antibiotika wurden von der Firma Sigma Aldrich (USA) bezogen.

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika und wie diese eingesetzt wurden.

| Antibiotikum | Organismus | Endkonzentration [mg/l] |
|-----------------|----------------------------------------|-------------------------|
| Ampicillin | <i>E. coli</i> | 100 |
| Kanamycin | <i>E. coli</i> | 25 |
| Chloramphenicol | <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> | 25 |
| Streptomycin | <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> | 300 |
| Spectinomycin | <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> | 100 |
| Rifampicin | <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> | 100 |

Transformierte Hefen wurden über Auxotrophie (W, L, H) selektiert, transgene Pflanzen mittels Resistenz gegenüber dem Herbizid BASTA (Bayer Crop Science).

1.4.4 Größenmarker

Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde bei DNA-Gelen der 1 kb DNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet, für Proteingele/Westernblots der Marker Precision Plus Protein Standard Dual Color (Bio Rad Laboratories GmbH, München).

1.4.5 Enzyme und Kits

Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs GmbH bezogen. Als DNA-Polymerase für PCR wurde die Phusion-Polymerase (Finnzymes) eingesetzt. Dephosphorylierungen wurden mit der Antarctic Phosphatase (New England BioLabs) durchgeführt, Ligationen mit der T4 DNA Ligase von New England Biolabs. Für Klonierungen mit dem Gateway-System von Invitrogen wurden der BP-Clonase II Enzyme Mix und der LR Clonase II Enzyme Mix verwendet.

Zur Amplifikation längerer DNA-Fragmente wurde das LongRange PCR Kit (Qiagen) verwendet. Die Isolation und Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte über das NucleoSpin Extract II-Kit (Macherey & Nagel). Außerdem wurden das GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) und das NucleoBond PC100 Plasmid DNA Purification Kit (Macherey & Nagel) für die Isolation von Plasmid-DNA, das pENTR/SD/D-TOPO-Cloning Kit (Invitrogen) für TOPO-Klonierungen, das Chameleon-Kit von Stratagene für DNA-Mutagenese, sowie das BM Chemiluminescence WB mouse/rabbit Kit von Roche für immunologische-Analysen (Westernblots) verwendet.

1.4.6 Zufallspeptid-Libraries

Als Zufallspeptid-Libraries wurden die Pep1274-Library verwendet, die der Matchmaker Random Peptide Library von Clontech entspricht, sowie die Pep1170-Zufallspeptid-Library (Fritz, 1996).

1.5 Software

Die *in silico*-Arbeiten und -Analysen wurden mit Hilfe der in Tabelle 6 gezeigten Programm durchgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Software mit den entsprechenden Quellen.

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| DISCUS Basic | DISCUS Software Company |
| Leica Application Suite (LAS) | Leica Microsystems |
| Leica Software Lite 2.05 (LCS) | Leica Microsystems |
| NanoDrop-Software V3.3.0 27 | Thermo Scientific |
| Clone Manager 9 Professional Edition | Scientific & Educational Software |
| eFP | Winter u. a. 2007 |
| AVT | Schmid u. a. 2005 |
| PLACE | Higo u. a. 1999 |
| Plant CARE | Lescot u. a. 2002 |
| AtcisDB | Molina und Grotewold 2005 |
| IDT SciTool Oligo Analyzer 3.1 | Integrated DNA Technologies, Inc. |
| Microsoft Office 2007 | Microsoft Corporation |
| Adobe Acrobat Reader 7.1.0 | Simple Software Solutions, Inc. |
| Adobe Photoshop Elements 3.0 | Simple Software Solutions, Inc. |
| TMHMM 2.0 | Möller, Croning, und Apweiler 2001 |
| T-Coffee | Notredame, Higgins, und Heringa 2000 |
| TargetP 1.1 | Emanuelsson u. a. 2000 |
| LOCtree/LOCKey (MultiLOC) | Nair und Rost 2005 |
| MultiLoc | Höglund u. a. 2006 |

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Arbeiten

2.1.1 PCR (*polymerase chain reaction*)

PCR wurde sowohl zur Amplifikation der in dieser Arbeit untersuchten Gene der Carotinoid-Biosyntheseenzyme und deren Promotoren (aus cDNA bzw. genomischer DNA von *A. thaliana*), als auch für die weiteren Umklonierungen der Inserts in diverse bakterielle, Hefe- und Pflanzen-Klonierungs- und Expressionsvektoren eingesetzt.

Die PCR-Ansätze mit einem Endvolumen von 50 µl enthielten typischerweise: 0,005 – 1 µg *template*-DNA (Plasmid-DNA: 5 - 10 ng; genomische oder cDNA: 1 µg), 1 U Phusion-Polymerase (Finnzymes), je 0,4 µM *forward*- und *reverse*-Primer, 0,2 mM dNTPs (Qiagen) und 10 µl 5x HF-Phusion-DNA-Polymerase-Puffer (Finnzymes).

Die verwendeten PCR-Programme arbeiteten mit einer initialen Denaturierung (Plasmid-*templates*: 1 min.; cDNA oder genomische DNA: 3 min.) bei 95 °C, 30 Amplifikationszyklen mit 1 min. 95 °C (Denaturierung), 1 min. Primer-*annealing* und 20 s 72 °C (Elongation), sowie einem finalen Elongationsschritt (10 min. 72 °C). Die verwendeten *annealing*-Temperaturen lagen 2 °C unter der niedrigsten berechneten Schmelztemperatur der verwendeten Primerkombinationen.

Zur Amplifikation besonders langer DNA-Fragmente (ca. ≥ 2 kb), die unter Einsatz der Phusion-Polymerase nicht erfolgreich amplifiziert werden konnten, wurde das LongRange PCR Kit (Qiagen) eingesetzt. Hierbei wurden Reaktionsansatz sowie PCR-Programm nach den Angaben des Herstellers („*Protocol for long-range PCR*“) durchgeführt.

2.1.2 *Colony*-PCR

Diese Methode wurde zur direkten Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Hefe- bzw. Bakterienzellen verwendet.

Zur Gewinnung der benötigten *template*-DNA aus Hefezellen wurde ein Teil der zu untersuchenden Hefekolonie von der Agar-Platte entnommen und lysiert. Die Lyse erfolgte durch Resuspendieren der Zellen in 25 µl 20 mM NaOH, 5 min. Inkubation bei RT, Mischung der Zellen für 15 s und anschließendem Erhitzen der Proben im Mikrowellengerät (45 s bei 800 W). Von den Lysaten wurden 2 µl als *template* für die PCR eingesetzt. Weiterhin wurden 5 µl *Taq*-Polymerase-Puffer 10x (Qiagen), 0,5 µl *Taq*-Polymerase 5 U/µl (Qiagen), je 0,5 µl Primer AD5xxl und AD3xl (jeweils 20 µM) und 1 µl dNTPs (10 mM) zugegeben, sowie mit bidestilliertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt.

Das PCR-Programm durchlief eine initiale Denaturierung (5 min. bei 94 °C), 40 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt (45 s, 94 °C) und einem kombinierten *annealing*-/Elongations-Schritt (2 min.,

72 °C), sowie eine finale Elongation für 5 min. bei 72 °C. Anschließend wurde der fertige Ansatz bei 4 °C inkubiert.

Transgene Agrobakterien wurden vor der Pflanzentransformation jeweils via PCR hinsichtlich des korrekten enthaltenen Konstrukts getestet. Zur Gewinnung von *template*-DNA aus Agrobakterien wurden 100 µl einer ÜN-Kultur (ausgehend von einer Einzelkolonie) pelletiert (5 min. 8000 x g) und das Zellsediment in 20 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert. Es folgte eine zehninütige Inkubation bei 95 °C und erneute Zentrifugation wie oben. Für ein Reaktionsvolumen von 25 µl wurden als *template* 5 µl des Überstandes eingesetzt.

2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung bzw. der Nachweis von DNA-Fragmenten erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurde eine 1 %-ige Agarose-Lösung in TAE-Puffer verwendet, der 5 µl einer EtBr-Lösung (10 mg/ml, Biomol GmbH) pro 300 ml Gellösung zugesetzt wurden. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 5 V/cm Länge des Gels unter Verwendung des Powersupply PHERO-stab. 300 (Biotech Fischer GmbH) durchgeführt. Als Laufmittel wurde TAE-Puffer verwendet. Als DNA-Größenmarker diente der 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:10 ($c_{\text{end}} = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$).

2.1.4 Reinigung von DNA

Für viele Klonierungs- sowie Sequenzierungsreaktionen wurden DNA-Fragmente (z.B. PCR-Produkte) und Plasmide gereinigt bzw. von überschüssigen Primern, Salzen und anderen Rückständen befreit.

Die Reinigung linearer DNA-Fragmente erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II-Kit (Macherey & Nagel). Hierbei wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers vorgegangen und je nach Probe entweder Protokoll 5 („DNA extraction from agarose gels“) oder Protokoll 6 („Direct purification of PCR products“) angewandt. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit 25 – 50 µl des Elutionspuffers aus dem verwendeten Kit.

2.1.5 Plasmid-Isolation

Die Isolation von Plasmiden aus transgenen *E. coli* wurde sowohl im kleinen Maßstab (Minipräp), als auch im mittleren Maßstab (Midipräp) durchgeführt, je nachdem, welche Menge an Plasmid-DNA benötigt wurde.

Für die Minipräp wurden, je nach Kopienzahl des zu isolierenden Plasmids, 1,5 oder 3 ml einer ÜN-Kultur der transgenen Bakterien (i.a. in LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum) eingesetzt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) nach den Angaben des Herstellers („Standard purification protocol“). Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit 50 µl des Elutionspuffers aus dem Kit.

Die Isolation größerer Plasmid-DNA-Mengen wurde mit dem NucleoBond PC100 Plasmid DNA Purification Kit (Macherey & Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt (Protokoll 7.2: „*High copy plasmid purification, Midi AX100*“). Das Elutionsvolumen betrug 50 – 100 μl .

2.1.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Messung von DNA-Konzentrationen wurde das NanoDrop 2000-Photometer (Thermo Fisher Scientific) mit der entsprechenden Analysesoftware eingesetzt (1 μl Probe, Doppelbestimmung). Als Referenz diente jeweils der Puffer, in dem die gemessene DNA gelöst war.

2.1.7 Restriktion

Restriktionen wurden sowohl zur Verifizierung von Plasmiden (Restriktionskartierung), als auch zur Erstellung von DNA-Fragmenten für klassische Klonierungen eingesetzt. Hierzu wurden Restriktions-Endonukleasen der Firma New England BioLabs inc. verwendet, sowie jeweils der laut Herstellerangaben für das verwendete Enzym optimale Puffer (jeweils 10x konzentriert, New England BioLabs inc.).

Das Reaktionsvolumen betrug 20 μl und enthielt ca. 500 ng des zu verifizierenden Plasmids, (je) 1 U Restriktionsenzym, sowie 2 μl des entsprechenden Restriktionspuffers (10x) in bidestilliertem Wasser. Die Ansätze wurden 1 h bei der laut Hersteller für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Sofern für die verwendeten Restriktionsenzyme möglich, wurde anschließend eine Hitzeinaktivierung (Temperatur und Inkubationszeit laut Hersteller) durchgeführt.

Wenn präparative Zwecke (i.a. rekombinante DNA-Arbeiten) den Einsatz größerer DNA-Mengen erforderten, wurden die Reaktionsvolumina entsprechend vergrößert, wobei die Endkonzentrationen der verwendeten Reagenzien konstant blieben.

2.1.8 Ligationsreaktionen

Diese Arbeiten wurden entsprechend den Protokollen aus Joseph Sambrook, Fritsch, und J. Sambrook 1989 durchgeführt. Verwendet wurden die T4 DNA Ligase (BioLabs), sowie der T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x konzentriert). Die Ligationsreaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min. bei 65 °C) gestoppt. Für die Transformation von *E. coli* (III.2.3.3.1 wurden ca. 200 ng Gesamt-DNA eingesetzt.

2.1.9 Herstellung von Gateway-Entry-Vektoren

Das Gateway-System (Invitrogen) basiert auf homologer Rekombination spezifischer DNA-Sequenzen mithilfe der Enzym-Gemische BP-Clonase- oder LR-Clonase-Enzyme Mix, wobei zunächst ein sogenannter Entry-Vektor erzeugt wird, der dann als Basis zur Herstellung einer Vielzahl sogenannter Destinationsvektoren dient. In dieser Arbeit wurde der Gateway LR Clonase II Enzyme Mix

verwendet. Zur Herstellung des *Entry*-Vektors können verschiedene rekombinante DNA-Methoden eingesetzt werden.

Generell erfolgte in dieser Arbeit die *Entry*-Vektor-Klonierung der cDNAs und Promotoren nach Amplifikation aus der pflanzlichen cDNA bzw. genomischen DNA mit Hilfe des pENTR/SD/D-TOPO-Cloning Kit (Invitrogen). Konstruktion der Primer sowie die TOPO-Klonierung selbst wurden nach den Angaben im zugehörigen Handbuch durchgeführt und der komplette Ansatz nach beendeter Reaktion in *E. coli* transferiert (s. III2.3.3.1).

Alternativ hierzu wurden in einigen Fällen die *Entry*-Vektoren über die BP-Reaktion des *Gateway*-Systems erstellt. In diesem Fall kam der BP-Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) zum Einsatz. Die benötigten zusätzlichen Sequenzen (*attB1* und *attB2*) wurden bei der Synthese des PCR-Produktes mithilfe speziell generierter *attB*-Primer angefügt. Die anschließende BP-Klonierung erfolgt gerichtet in einen Zielvektor, der *attP sites* (*attP1* und *attP2*) enthält. In dieser Arbeit wurde der *attP*-Vektor pDONR201 verwendet.

2.1.10 Klonierung mit dem *Gateway*-System (Invitrogen)

Zur weiteren Verwendung der klonierten *Arabidopsis*-Sequenzen (s. III2.1.9 in bakteriellen, pflanzlichen oder Hefe-Expressionssystemen) wurden die Inserts mithilfe des *Gateway*-Systems (Invitrogen) in verschiedene Destinationsvektoren (s. Tabelle 2) übertragen.

Die experimentelle Vorgehensweise erfolgte, sowohl bei der LR- als auch bei der BP-Reaktion, nach Vorschrift des Herstellers zur *Gateway Technology*. Die Inkubationszeit des Reaktionsansatzes betrug in beiden Fällen 3 – 4 h (T = 25 °C).

2.1.11 Klonierung über *Ligation Independent Cloning* (LIC)

Zur Klonierung der Zielgene in bakterielle Expressionsvektoren wurde das LIC nach (Hou u. a., 2008) angewandt. Die Funktionsweise des LIC beruht auf der *in vivo*-Rekombination homologer Sequenzen in geeigneten *E. coli*-Stämmen (z.B. XL1 blue). Hierzu müssen die Enden des zu klonierenden DNA-Fragments 15 – 21 nt Sequenz-Überlappung zu den Enden des verwendeten linearisierten Zielvektors aufweisen. Nach Aufnahme der Fragmente in *E. coli* werden diese Moleküle über homologe Rekombination Basen-genau miteinander verbunden und ergeben ein intaktes Plasmid.

Essentiell für eine akzeptable Ausbeute an Transformanden ist bei dieser recht ineffizienten Klonierungstechnik die Verwendung hochkompetenter Bakterienzellen bei der Transformation (s. auch III2.3.3.1. Vorteile der Methode sind, neben einer kostengünstigen und zügigen Durchführung, ein sehr hoher Anteil an positiven Transformanden (im Normalfall mindestens 90 %), was die Verifizierung der Klone deutlich beschleunigt und die Kosten weiter senkt. In den meisten Fällen genügte es, 2 - 3 Transformanden zu prüfen, um mindestens einen positiven Klon zu erhalten.

2.1.12 Zielgerichtete Mutagenese (*side directed mutagenesis, sdm*)

Über die Methode der gerichteten Mutagenese werden gezielt Basen-Austausche, -Insertionen und -Deletionen in Plasmide eingeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde dies zur Generierung neuer Restriktions-Schnittstellen verwendet, um so das Zielplasmid für weitere Klonierungsschritte vorzubereiten. In dieser Arbeit wurde das Chameleon-Kit von Stratagene verwendet und nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Erhaltene Klone wurden mittels Restriktionskartierung und DNA-Sequenzierung analysiert und verifiziert.

2.1.13 Dephosphorylierung von DNA

Dephosphorylierungen wurden mit der Antarctic Phosphatase (5 U/ μ l, New England BioLabs) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.1.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgte durch die Servicegruppe am MPIZ Köln (*Automatic DNA Isolation and Sequencing (ADIS)*) oder durch den kommerziellen Anbieter GATC-Biotech (Konstanz). Die Konzentration der Proben für die Sequenzierung betrug 30 – 150 ng/ μ l, wobei die DNA in TE-Puffer (mM Tris-Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA) oder Wasser gelöst wurde.

2.2 Proteinbiochemische Arbeiten

2.2.1 Herstellung von bakteriellen Gesamtproteinextrakten

Zum Nachweis der in *E. coli* rekombinant exprimierten Fusionsproteine mittels SDS-Gel / Immunoblot (III.2.2, III.2.3 wurden löslichen Gesamtproteinfraktionen präpariert und untersucht. Frisch transformierte Einzelkolonien wurden zur Inokulation von 25 ml LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotika) verwendet. Nach Inkubation für 18 h bei 37 °C wurden die Zelldichten abgeglichen, entsprechende Volumina (5 - 20 ml) der Bakterienkulturen 15 min. bei 3.500 x g pelletiert und das Sediment in 1 ml LEW-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mg/ml Lysozym, pH = 8) resuspendiert. Der Ansatz wurde für 45 min. unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min. bei 14.000 x g wurden 100 μ l des Ansatzes in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, mit 1 μ l MgCl₂ sowie je 0,5 μ l RNase und DNase versetzt und weitere 45 min. bei RT inkubiert. Für die SDS-PAGE wurden, je nach erwarteter Proteinkonzentration, 2 - 6,5 μ l des fertigen Lysats eingesetzt. Eine genaue Beschreibung der Probenpräparation für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist in III.2.2 wiedergegeben.

2.2.2 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels denaturierender PAGE, die mit dem Kit NuPAGE Novex Bis/Tris-Mini Gel 4-12 % der Firma Invitrogen durchgeführt wurde. Die Elektrophorese erfolgte in

einer XCell *SureLock* Mini-Cell (Invitrogen). Für die Probenpräparation ($V_{\text{ges}} = 10 \mu\text{l}$) wurden 2 bis maximal $6,5 \mu\text{l}$ des Proteinlysats mit $2,5 \mu\text{l}$ des Probenpuffers (4 x) aus dem verwendeten Kit und $1 \mu\text{l}$ DTT (500 mM) versetzt, sowie mit bidestilliertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Probe wurde anschließend 5 min. bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Größen-Marker diente der Precision Plus Protein Standard Dual Color von Bio Rad. Auf das SDS-Gel wurden $5 \mu\text{l}$ Marker aufgetragen. Die PAGE wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3 Immunoblot

Die in *E. coli* exprimierten Proteine wurden nach Zellyse und SDS-PAGE via Immunoblot detektiert. Hierzu wurden die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel (III.2.2 auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore) transferiert, die vor dem Protein-Transfer zunächst mit MetOH und dann mit Transfer-Puffer angefeuchtet wurde. Für den Transfer der Proteine erfolgte nach dem Semi-dry-blotting-Verfahren unter Verwendung der Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell (Bio Rad). Der Transfer verlief über 18 min. bei 12 V. Zur Detektion der Proteine kam der BM Chemiluminescence WB mouse/rabbit Kit (Roche), sowie der Lumi-Imager (Roche) zum Einsatz. Die Durchführung des Blots erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Vorinkubationszeit betrug 1 min., die Belichtungszeit t_{exp} wurde, je nach erwarteter Proteinmenge bzw. Signalintensität, variiert (30 – 90 s).

2.3 Mikrobiologische Arbeiten

2.3.1 Anzuchten

2.3.1.1 *E. coli*

Zur Herstellung von *E. coli*-Flüssigkulturen wurde LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit je einer frisch transformierten Einzelkolonie inokuliert und für 18 h inkubiert. Vorkulturen ($V = 3 \text{ ml}$) wurden ÜN bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 200 UpM angezogen, die Temperatur für die Anzucht der HK (25 – 50 ml) betrug entweder $28 \text{ }^\circ\text{C}$ für Expressionsanalysen (z.B. HPLC-Nachweis der Carotinoide, s. III.2.7.4 oder $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (z.B. für Plasmidpräps). Zur Inokulation der HK wurde ein Aliquot der VK 1 : 50 in frischem Medium verdünnt. Expressionskulturen wurden nach 24 h pelletiert, ansonsten erfolgte die Inkubation ÜN (ca. 16 h).

Für den *Color-Complementation-Assay* zum qualitativen optischen Nachweis der bakteriell synthetisierten Carotinoide wurden *E. coli* TOP10-Zellen (ggf. mit bereits enthaltenem Plasmid pAC-BETAipi) mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und ÜN bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine weitere Inkubation für drei Tage in Dunkeln bei RT.

2.3.1.2 *S. cerevisiae*

Hefen wurden für eine Flüssigkultur-Anzucht zunächst frisch ausplattiert. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurde eine Vorkultur im 10 ml-Maßstab mit YPAD (keine Selektion) oder dem Minimalmedium *Single Dropout* angezogen, dem, je nach Auxotrophie des Hefeklons, die AS Leucin, Tryptophan oder Histidin fehlten. Das Volumen der HK variierte je nach Verwendungszweck, wobei die HK mit einer dicht angewachsenen VK 1 : 50 angeimpft wurde. Alle Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyer-Kolben mit zehnfachem Kultur-Volumen angezogen. Die Inkubation erfolgte, soweit nicht anders beschrieben, ÜN bei 30 °C und 200 UpM.

2.3.1.3 *A. tumefaciens*

Für die Anzucht von Agrobakterien wurde YEB-Medium, ggf. mit entsprechenden Antibiotika, verwendet. Es wurde zunächst eine 5 ml-VK mit einer Einzelkolonie frisch ausgestrichener Agrobakterien angeimpft, die zuvor über PCR verifiziert wurde. Mit der VK wurde eine 50 ml-HK 1 : 50 angeimpft. Die Anzucht erfolgte ÜN bei 28 °C und 200 UpM.

2.3.2 Herstellung kompetenter Zellen

2.3.2.1 *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der TSS-Methode. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurde eine Vorkultur ÜN bei 37 °C und 200 UpM angezogen. Für die HK wurden 100 ml LB-Medium mit 500 µl der VK angeimpft und ca. 2,5 h bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,25 und 0,35 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min. bei 4 °C und 3.500 x g) pelletiert und anschließend in 10 ml kaltem TSS-GT-Medium resuspendiert. Die Ansätze wurden vereinigt und 10 min. auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden zu 100 µl in sterile Eppendorf-Gefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei – 70 °C gelagert.

2.3.2.2 *S. cerevisiae*

Die Herstellung kompetenter Hefezellen erfolgte modifiziert nach Schiestl und Gietz 1989. Von einer Agar-Platte mit dem frisch ausgestrichenen Hefestamm wurde mit einer Einzelkolonie eine Vorkultur (10 ml YPAD-Medium) im Erlenmeyer-Kolben angeimpft und ÜN bei 30 °C und 200 UpM kultiviert. Mit 1 ml der VK wurde eine 50 ml-Hauptkultur angeimpft und 4 – 5 h bei 30 °C und 200 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 1,2 angezogen. Die Kultur wurde 5 min. bei 3500 x g zentrifugiert, das Zellpellet in 25 ml sterilem Wasser resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Die gewaschenen Zellen wurden in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert, in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und 1 min. bei 3500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 550 µl sterilem 100 mM LiAc gelöst, die Zellsuspension zu

je 50 µl in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße aliquotiert und wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die kompetenten Hefezellen direkt transformiert (s. III2.3.3.2).

2.3.2.3 *A. tumefaciens*

Ausgehend von einer Einzelkolonie frisch ausplattierter *A. tumefaciens* wurde eine 5 ml-VK ÜN bei 28 °C und 200 UpM angezogen. Mit 2 ml der VK wurde eine 100 ml-HK angeimpft und ca. 5 h bei 28 °C und 200 UpM geschüttelt. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 3500 x g wurden die Zellen pelletiert und das Sediment in 4 ml YEB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 100 µl in sterile Eppendorf-Gefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei – 70 °C gelagert.

2.3.3 Transformation von Mikroorganismen

2.3.3.1 *E. coli*-Transformation

Für die Transformation von *E. coli* wurden 100 µl kompetente Zellen (s. III2.3.2.1 auf Eis aufgetaut, die zu transferierende DNA mit KCM-Lösung auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und hinzu pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz 10 min. auf Eis inkubiert, 1 min. bei 42 °C, erneut 1 min. auf Eis, dann mit 800 µl LB-Medium versetzt, vorsichtig gemischt und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Zur Selektion transgener Klone wurden 100 µl auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Die restliche Kultur wurde 5 min. bei 2150 x g pelletiert, der Medium-Überstand nicht vollständig abgenommen und die sedimentierten Zellen in dem restlichen Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert.

2.3.3.2 *S. cerevisiae*-Transformation

Für die Hefe-Transformation wurde, wie auch für die Erzeugung kompetenter Zellen, eine modifizierte LiAc-Methode (Gietz und Woods, 2006) angewandt, wobei frisch hergestellte kompetente Zellen verwendet (s. III2.3.2.2 wurden. Pro Aliquot der pelletierten, zuvor mit LiAc behandelten Hefezellen wurden (in der aufgezählten Reihenfolge) 240 µl 50%-iges PEG-4000, 36 µl 1M LiAc, 25 µl einzelsträngige Hering-Sperma-DNA (10 mg/ml), sowie 50 µl der zu transformierenden DNA-Lösung (200 - 500 ng DNA) zugegeben. Alle verwendeten Lösungen, außer der DNA-Lösung, wurden für die Transformation steril filtriert. Der Ansatz wurde gut gemischt und 25 min. bei 30 °C unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Es folgte eine 25-minütige Inkubation bei 42 °C, wobei nicht mehr gemischt wurde. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 3500 x g wurden die transformierten Hefe-Zellen in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert. 50 und 150 µl der Zellsuspension wurden jeweils auf selektiven *Single Dropout*-Agar-Platten (beim *Bait*-Plasmid pAS2 beispielsweise *Single Dropout*^{LW}) ausgestrichen und zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.3.3.3 *A. tumefaciens*-Transformation

Für die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurden 100 µl kompetente Zellen (s. III2.3.2.3 auf Eis aufgetaut, mit 1 µg Plasmid-DNA versetzt und gemischt. Der Ansatz wurde dann 1 min. in flüssigem Stickstoff und für 5 min. bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium wurden die transformierten Zellen 2 h bei 28 °C geschüttelt. Anschließend wurde 30 s bei 3500 UpM zentrifugiert, der Überstand (YEB-Medium) bis auf ca. 100 µl entfernt und das Zellpellet in dem Restmedium resuspendiert. Ausplattiert wurden die kompletten Agrobakterien auf selektiven YEB-Agar-Platten, die die benötigten Antibiotika enthielten.

2.3.4 Herstellung von Kryokulturen

Für die Herstellung von *E. coli*-Kryokulturen wurde eine VK des entsprechenden Bakterienklons angezogen und in einem Kryo-Röhrchen 500 µl der Kultur mit 500 µl sterilem 50 %-igem Glycerin gemischt. Die Kryokultur wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70 °C gelagert.

Kryokulturen von *S. cerevisiae* wurden hergestellt, indem 5 ml einer ÜN-Kultur pelletiert (5 min., 3500 x g) und die sedimentierten Zellen in 500 µl YPAD resuspendiert wurden. Nach Zugabe von 500 µl 50 %-igem Glycerin wurde der Ansatz gut gemischt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

Agrobacterium-Kryokulturen wurden aus 500 µl einer frisch angezogenen VK und 500 µl 50 %-igem Glycerin hergestellt. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Kryokultur zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und dann bei -70 °C gelagert.

2.4 Pflanzen-Arbeiten

2.4.1 Pflanzen-Anzuchten

A. thaliana-Pflanzen wurden, nach 4-tägiger Vernalisation bei 4 °C, im Gewächshaus unter Langtag-Bedingungen (12 h Licht, 6 - 22 Uhr) angezogen. Die Temperatur betrug tagsüber 20 °C und nachts 18 °C.

S. lycopersicum cv. Micro Tom wurden für die *Agrobacterium*-Infiltration im Gewächshaus unter Langtag-Bedingungen bei einer Temperatur von 25 °C angezogen. Sobald die Pflanzen grüne Früchte (spätes grünes Stadium) trugen, wurden diese abgepflückt und infiltrierte.

N. benthamiana-Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtag-Bedingungen (12 h Licht, 6 - 22 Uhr) bei einer Temperatur von 20 °C am Tag und 18 °C in der Nacht angezogen. Für die *Agrobacterium*-Infiltration der Blätter wurden 3 Wochen alte Pflanzen verwendet.

2.4.2 Pflanzen-Transformationen

Die stabile Transformation von *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte mithilfe transgener Agrobakterien. Angewandt wurde die *floral dip*-Transformationsmethode nach Clough und Bent 1998.

Früchte der Tomatensorte *S. lycopersicum* cv. Micro Tom wurden mittels *Agrobacterium*-Infiltration transient transformiert. Die angewandte *Agroinjection*-Methode stammt aus Orzaez u. a. 2006.

N. benthamiana wurden mittels *Agrobacterium*-Infiltration nach der Methode von Voinnet u. a. 2003 transient transformiert.

2.5 Klonierungsarbeiten

2.5.1 Klonierung der *Bait*-Expressionsvektoren für *Y2H-Screenings*

Die cDNAs der drei Zielenzyme BH2, EC und PSY wurden aus *A. thaliana*-cDNA via PCR amplifiziert. Zur Amplifikation der *EC*-cDNA wurden die Primer EC_TOPO_fw und EC_TOPO_rv verwendet, für das *PSY*-Gen die Primer AtPSY-TOPO_fw und AtPSY-TOPO_rv und für die verkürzte *BH2*-cDNA BH_Nterm-TOPO_fw und BH_Nterm-TOPO_rv (s. Tabelle 3). Nach Durchführung der PCR (III2.1.1 sowie erfolgreicher Verifizierung des PCR-Produktes via Agarose-Gelelektrophorese (0 wurde der Ansatz gereinigt (III2.1.4 und die Konzentration der gereinigten DNA-Lösung ermittelt (III2.1.6).

Die Klonierung der gereinigten *Bait*-PCR-Produkte erfolgte via TOPO-Klonierung in den bakteriellen Klonierungsvektor pENTR/SD/D-TOPO (III2.1.9, die Transformation von *E. coli* XL1 blue erfolgte gemäß Punkt III2.3.3.1. Mittels Restriktionskartierung (III2.1.7 wurden positive Klone identifiziert. Diese dienten, nach erfolgreicher Sequenzierung, als *Entry-Clones* für die in III2.1.10 beschriebene Herstellung der *Expression-Clones*. Als Destinationsvektor diente in allen drei Fällen der *Shuttle*-Vektor pAS2-attR, der in *E. coli* vermehrt werden kann und in Hefe als Expressionsplasmid für das *Bait* im *Y2H-Screening* (s. III2.6.1 dient. pAS2-attR kodiert u.a. die DNA-BD des *Gal4*-TFs, mit der das *Bait* für die *Y2H-Screenings* fusioniert wurde.

2.5.2 Klonierung der Expressionsvektoren für den bakteriellen *in vivo*-Funktionalitätsassay

Für die bakterielle Expression wurden alle drei Zielgene ohne Transitpeptid (TP)-Sequenzen kloniert (*in silico*-Vorhersage). Die cDNAs *ECdel*, *BH2del* und *PSYdel* („del“ steht für die entfernte TP-Sequenz) wurden mit den Primern Ectrunc-Inf_fw und EC-Inf_rv für EC, BH2trunc-Inf_fw und BH2trunc-Inf_rv für BH2, sowie PSYtrunc-Inf_fw und PSYtrunc-Inf_rv für PSY amplifiziert, wobei die *Entry-Clones* aus III2.5.1 als PCR-templates dienten. Die Klonierung erfolgte in allen drei Fällen via LIC (III2.1.11 in den bakteriellen Expressionsvektor pGJ2720, in den zuvor zwei neue Restriktions-Endonuklease-

Schnittstellen für die Klonierung von Inserts eingefügt wurden (s. hierzu III2.1.12. Am 5'-Ende der cDNAs erfolgte eine translationale Fusion mit einem *His-tag* (6x-*his*).

Da das zu verifizierende Aptamer und das interagierende Zielenzym auf einem Plasmid kodiert sein sollten, wurden die entstandenen Plasmide pGJ2720-ECdel und pGJ2720-BH2del als Basiskonstrukte für eine hochdurchsatzfähige Klonierung der Aptamere verwendet. Um die Effizienz der weiteren Klonierungsarbeiten zu erhöhen, wurden die Basiskonstrukte durch Einbau des zytotoxischen *ccdA/B*-Gens als zusätzlichen Selektionsmarker modifiziert. Die zytotoxische Wirkung trifft nicht auf *E. coli* DB3.1 zu, so dass dieser Stamm eingesetzt wird, um die Plasmide zu vermehren. Durch die Insertion einer Ziel-DNA wird das *ccdA/B*-Gen im resultierenden Plasmid ersetzt, wodurch das Plasmid seine toxische Wirkung verliert, während Klone, die den unveränderten Ausgangsvektor enthalten, aufgrund des *ccdA/B*-Gens nicht überlebensfähig sind.

Die PCR-Amplifikation des *ccdA/B*-Gens erfolgte mit dem Gateway-Vektor pENTR/SD/D-TOPO als *template* und den Primern P1028-SphI_ccdB_fw und P1029-SphI_ccdB_rv. Mittels LIC erfolgte die Integration des PCR-Fragments *downstream* der Zielenzym-cDNA, wobei über den *fw*-Primer gleichzeitig eine SD-Sequenz eingefügt wurde. Auf diese Weise wurde ein polycistronisches Expressionssystem geschaffen, in dem zwei rekombinante Gene unter der Kontrolle des *lac*-Promotors transkribiert werden können. Die generierten Konstrukte wurden als pGJ2720-BH2del-KK und pGJ2720-ECdel-KK (KK für „Killer-Konstrukt“) bezeichnet.

Das Cyan-fluoreszierende Protein (CFP) diene in dieser Arbeit als Aptamer-Trägerprotein und zugleich als Fluoreszenzmarker für ihre Expression. Zur Herstellung eines entsprechenden Basis-Vektors wurde die CFP-cDNA mit den Primern P1239-EC-CFP_fw und P1240-EC-CFP_rv für das ECdel-Konstrukt bzw. P1243-BH-CFP_fw und P1244-BH-CFP_rv für das BH2del-Konstrukt amplifiziert und als Teil der polycistronischen Transkriptionseinheit via LIC *upstream* von dem *ccdA/B*-Gen eingefügt. Im resultierenden Basis-Konstrukt sind Zielenzym- und CFP-Gen polycistronisch angeordnet, und die Aptamer-Sequenzen können als translationale Fusion mit CFP gegen Austausch des *ccdA/B*-Gens inseriert werden.

Die Klonierung der Aptamer-PCR-Produkte in diesen Vektor erfolgte ebenfalls mittels LIC. Die Aptamer-Sequenzen wurden auf Basis der PCR-Produkte aus der Hefe-*Colony*-PCR (III2.1.2 amplifiziert. Im Falle der *Pep1170-Library* wurden für alle Aptamere die Universalprimer P1395-CFPn-1170_fw und P1396-CFPn-1170_rev verwendet, bei der *Pep1274-Library* die Primer P1360-CFPn-1274_fw und P1361-CFPn-1274_rv. Mithilfe des jeweiligen *rev*-Primers wurde das Stoppkodon des CFP entfernt und die Fusion der Aptamer-Sequenz am 3'-Ende des CFP über einen kurzen Linker (10 AS für Aptamere aus *Pep1274*, 15 AS für *Pep1170*-Aptamere, originale Linker-Sequenz aus *Library*) gewährleistet.

2.5.3 Klonierungen der Pflanzenexpressionsvektoren für EC und Aptamer 25Q6

Die kodierende Sequenz des Zielenzym EC und des Aptamers 25Q6, welches im bakteriellen Funktionalitätsassay (III.2.5.2 eine Beeinflussung der EC-Aktivität zeigte, wurden in pflanzliche Expressionsvektoren kloniert, um die transiente Protein-Expression in der Pflanze nachzuweisen (*Agrobacterium*-Infiltration von *N. benthamiana*).

Für transiente Genexpressionsexperimente zur *in planta*-Lokalisierung der rekombinanten Proteine wurden Pflanzenexpressionsvektoren mit translationalen Fusionen der fluoreszierenden Reporterproteine CFP und RFP mit den Zielenzyme und Aptamersequenzen erzeugt. Die Klonierung erfolgte ausgehend von den *Entry-Clones* pENTR/SD/D-EC (Erzeugung s. III.2.1.9, sowie pDONR201-CFP bzw. pDONR201-CFP-25Q6 (Erzeugung via LR-Reaktion (s. III.2.1.10. Hierbei wurde die EC in voller Länge (also mit der TP-Sequenz) in den Vektor pNmR kloniert, während pEGATE104 als Zielvektor für CFP-25Q6 diente. Im fertigen Konstrukt pNmR-EC wurde das EC-Gen am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzmarker RFP fusioniert, CFP-25Q6 hingegen lag in pEGATE104-CFP-25Q6 am 5'-Ende mit YFP fusioniert vor.

Weitere Pflanzenexpressionsvektoren zur Chloroplasten-lokalisierter Expression der untersuchten Proteine wurden auf Basis des binären Vektors pGJ2173 hergestellt. Dieser Vektor enthält eine funktionale Expressionskassette mit einem Chloroplasten-TP (Jach u. a., 2001). Mit Hilfe der Primer P1497-ChIP_Apt_fw und P1498-ChIP_Apt_rev und der Plasmide pGJ2720-ECdel-CFP-25Q6 bzw. pGJ2720-ECdel-CFPn (s. III.2.5.2 wurden die kodierenden Sequenzen von CFP-25Q6, sowie von CFP (Negativkontrolle) über PCR amplifiziert und als translationale Fusionen mit dem Chloroplasten-TP inseriert. Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte mittels LIC (III.2.1.11, die Verifizierung positiver *E. coli* XL1 blue-Klone über Restriktionskartierung und Sequenzierung.

Zur *in planta*-Verifizierung der Interaktion zwischen EC und 25Q6 mittels des pflanzlichen *BiFC*-Assay wurden Expressionsvektoren konstruiert, in denen die kodierenden Regionen der untersuchten Proteine mit den *Split-RFP*-Sequenzen RFP_N2 und RFP_C2 fusioniert wurden. Die Klonierungen erfolgten mit dem *Gateway*-System (s. III.2.1.10 und den Zielvektoren pBatTL-RFP_N2 und pBatTL-RFP_C2 für eine Fusion am C-Terminus der EC verwendet, bzw. pBatTL-nRFP_N2 und pBatTL-nRFP_C2 für die Fusion am N-Terminus des CFP-25Q6-Fusionsproteins. Die Fusionen der Interaktionspartner wurden jeweils mit beiden *Split-RFP*-Fragmenten durchgeführt, da die Art der Fusionen einen Einfluss auf die Proteinexpression und den Interaktionsnachweis im Assay haben kann. Zur Erzeugung der benötigten *Entry*-Vektoren wurde die Sequenz *ECdel* mit den Primern P1305-attB1_ECdel und P1306-attB2_ECdel_ns auf Basis des Plasmids pGJ2720-ECdel amplifiziert und mittels BP-Reaktion in pDONR201 kloniert. Die PCR zur Amplifikation von CFP-25Q6 und der CFP-kodierenden Sequenz erfolgte mit den Primern P1421-attB1_SplitRFP und P1422-attB2_SplitRFP, die

Klonierung ebenfalls via BP-Reaktion in pDONR201. Über LR-Reaktion erfolgte die Umklonierung in die oben genannten pBatTL-Zielvektoren.

2.5.4 Klonierungen der endogenen Promotoren der Zielgene

Die ausgewählten Promotor-Sequenzen wurden aus genomischer *A. thaliana*-DNA amplifiziert (s. III.2.1.1. Die verwendeten Primer waren AtEC_Prom_TOPO_fw und AtEC_PromTOPO_rv für pEC (Chromosom 5, Position 23.076.765 bis Position 23.077.397), BH2_Prom_TOPO_fw und BH2_Prom_TOPO_rv für pBH2 (Chromosom 5, Position 21.338.051 bis Position 21.336.887), PSY_Prom_TOPO_fw und PSY_Prom713_rv für pPSY (Chromosom 5, Position 5.664.117 bis Position 5.662.090) und PSY_Prom_TOPO_fw und PSY_Prom1_rv für die verkürzte Variante pPSY_s (Chromosom 5, Position 5.664.548 bis Position 5.662.090). Die PCR-Produkte wurden via TOPO-Klonierung in den Zielvektor pENTR/SD/D-TOPO kloniert und im Anschluss mittels Gateway-LR-Reaktion in den Promotor-losen Pflanzenvektor pBatTL-GUS *upstream* des Reportergens *GUS* eingefügt. Die entstanden Pflanzenexpressionsplasmide pBatTL-pBH2_GUS, pBatTL-pEC_GUS, pBatTL-pPSY_GUS und pBatTL-pPSYs_GUS wurden über Restriktionskartierung und Sequenzierung verifiziert.

2.6 Arbeiten mit Hefen für Aptamer-Screening

2.6.1 Yeast-Two-Hybrid-Screening

Zur Identifikation interagierender Moleküle (*Preys*) aus einer Zufallspeptid-*Library* wurden *Yeast-Two-Hybrid-Screenings* mit den Zielproteinen (*Baits*) durchgeführt. Hierbei wurde eine modifizierte Methode nach MacFarlane und Uhrig 2008 angewandt.

Zunächst wurde eine *S. cerevisiae* *Bait*-Kultur, die das Zielprotein exprimiert, in 50 ml Medium *Single Dropout*^{-W}-Medium mit 4 % Glukose ÜN bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 angezogen. Angeimpft wurde mit einer Einzelkolonie des frisch ausplattierten Hefestamms. Für die *Library*-Kultur wurde ein 1,5 ml-Aliquot der *Library*-Kryokultur bei 42 °C aufgetaut und in 25 ml YPAD etwa 1 h lang bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 angezogen. Von *Bait*- und *Library*-Kultur wurden jeweils die Volumina entsprechend einer OD₆₀₀ = 10 miteinander gemischt und 5 min. bei 3500 x g zentrifugiert. Die Zellsedimente wurden in 10 ml YPAD mit 10 % PEG-6000 (Duchefa) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zum *Mating* (Fusion) der Hefen im 100 ml-Erlenmeyer-Kolben ÜN bei 30 °C und 80 UpM inkubiert. Die *Mating*-Kultur wurde 4 min. bei 3500 UpM sedimentiert und der Überstand entfernt. Von 500 ml *Single Dropout*^{-LWH}-Gelrite-Medium wurden ca. 15 ml abgenommen, um das Zellpellet darin zu resuspendieren, anschließend wurde die Zellsuspension den ursprünglichen 500 ml wieder

hinzugegeben. Nach kräftigem Schütteln des Ansatzes wurden zur Ermittlung des Titers (Anzahl der Hefeklone, die ein *Mating* vollzogen haben) 10 µl auf eine *Single Dropout*^{LW}-Agar-Platte ausgestrichen. Die Gelrite-Zellsuspension wurde auf ca. 15 Petrischalen verteilt, zugedeckt und bei 30 °C inkubiert. Die Titerplatte war bereits nach 2 Tagen auswertbar, auf den Interaktions-Platten wuchsen in der Regel innerhalb von 1 – 3 Wochen Hefekolonien. Die gewachsenen Hefekolonien wurden vorsichtig aus den Gelrite-Platten heraus pipettiert, in je 20 µl sterilem bidestilliertem Wasser resuspendiert und auf *Single Dropout*^{LWH}-Agar-Platten überimpft. Die Platte wurde drei bis vier Tage bei 30 °C inkubiert bis die Hefen ausreichend angewachsen waren (ungefähr Stecknadelkopf-Größe), um sie mittels Hefe-*Colony*-PCR (III2.1.2 zu analysieren.

2.6.2 *Gap Repair-Cloning in S. cerevisiae*

Positive Hefeklone, die im *Y2H-Screening* erhaltenen wurden, mussten hinsichtlich spezifischer Interaktion mit dem Zielprotein (*Bait*) verifiziert werden, um auszuschließen, dass es sich um Artefakte (falsche positive Peptide) handelt. Der Assay beruht auf der Fähigkeit der Hefen zur *in vivo*-Rekombination aufgenommener DNA-Moleküle (linear, mit homologen Enden), dem sogenannten *Gap Repair*. Die bei der Analyse der selektierten Hefekolonien aus dem *Y2H-Screening* über *Colony-PCR* (s. III2.1.2 erzeugten PCR-Produkte der *Preys* werden hierbei *de novo* in den linearisierten *Prey*-Grundvektor integriert (*in vivo*-Rekombination). Auf diese Weise werden sie translational mit der kodierenden Region der Aktivierungsdomäne (AD) des Gal4-TFs fusioniert. Der Hefe-Stamm, der das entsprechende *Bait*-Plasmid enthält, wird hierzu mit dem PCR-Produkt und einem linearisierten *Prey*-Vektor kotransformiert und unter selektiven Bedingungen inkubiert. Als Negativ-Kontrolle dient der linearisierte *Prey*-Vektor ohne PCR-Produkt.

Die Hefe-Transformation erfolgte gemäß III2.3.3.2. Pro Transformations-Ansatz wurden ca. 500 ng PCR-Produkt und ca. 40 ng linearisierter (*NcoI*, *XhoI*) und dephosphorylierter *Prey*-Vektor eingesetzt, wobei das Gesamtvolumen der DNA-Lösung für die Transformation 50 µl beträgt. Die transformierten Zellen wurden in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert und komplett auf *Single Dropout*^{LW}-Agar-Platten ausgestrichen (Selektion von Doppeltransformatanden). Man erhielt im Normalfall zwischen 30 und 500 Kolonien. Für den eigentlichen Interaktions-Nachweis wurden fünf bis zehn Kolonien nach drei Tagen Inkubation bei 30 °C in je 20 – 40 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf *Single Dropout*^{LWH} ausplattiert. Bei denjenigen Klonen, die nach 3 – 4 Tagen angewachsen sind, kann man von einer spezifischen Interaktion zwischen exprimiertem *Bait* und *Prey* ausgehen.

2.7 Analytische Verfahren

2.7.1 Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Axioplan 2 von Zeiss gemacht, wobei die Software DISCUS Basic verwendet wurden.

2.7.2 Fluoreszenzmikroskopie

Der Nachweis fluoreszierender Proteine bzw. Fusionsproteine in Bakterien- und Pflanzenzellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Zur Detektion des CFP-Signals wurde das Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 von Zeiss verwendet. RFP-Fluoreszenz wurde über das Leica MZ16 FA-Mikroskop detektiert. Fotografien wurden mithilfe der Leica Application Suite (LAS)-Software erstellt.

2.7.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zur genauen intrazellulären Lokalisation von fluoreszierenden (Fusions-)Proteinen wurde eine konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie durchgeführt. Hierzu wurde das Leica TCS SP2 AOBS-Mikroskop verwendet. Zur spezifischen Anregung der fluoreszierenden Moleküle diente ein He/Ne-Laser für RFP und ein Ar/Kr-Laser für CFP. Für das Erstellen von Fotografien wurde die Leica Software Lite 2.05 (LCS) verwendet.

Bei den Aufnahmen zum Nachweis der Expression von Zielenzym und Aptamer in Pflanzen wurde das Leica TCS-SP2 Confocal microscope verwendet, sowie die Bilderfassungs- und -bearbeitungs-Software Leica Software Lite 2.05. YFP wurde mit einem Ar/Kr-Laser angeregt, RFP mit einem He/Ne-Laser.

2.7.4 Carotinoid-Extraktion aus *E. coli*

Die Analyse der in transgenen *E. coli* produzierten Carotinoide erfolgte via HPLC-Analyse (s. III.2.7.5). Die Carotinoid-Extraktion aus bakteriellen Expressionskulturen wurde wie folgt durchgeführt: Es wurden, je nach Zelldichte, zwischen 13 und 20 ml einer Expressionskultur pelletiert, das Zellpellet in 1 ml Aceton resuspendiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 10 s bei 14000 x g zentrifugiert. Der Carotinoid-haltige Lösungsmittel-Überstand wurde abgenommen und 450 µl-Aliquots in 2 ml-Eppendorf-Gefäße überführt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum (Speed Vac-Zentrifuge) vollständig abgedampft. Die isolierten Carotinoide wurden für die HPLC-Messung zunächst in insgesamt 50 µl EtAc gelöst und dann mit 450 µl AcN versetzt. Es folgte eine zehninminütige Zentrifugation bei 14000 x g zur Sedimentierung bzw. Abtrennung von Schwebeteilchen und Überführung des Überstands in ein frisches Probengefäß.

2.7.5 HPLC-Analytik

Die HPLC-Analytik der bakteriellen Carotinoid-Extrakte (s. III2.7.4) erfolgte mittels HP Series II 1090 Liquid Chromatograph (Agilent Technologies, Böblingen) mit ternärem Pumpensystem und Dioden-Array-Detektor. Es wurden 250 µl der Probe injiziert. Zur Auftrennung wurde eine Zorbax SB-C18-Trennsäule (3,5 µm, 4,6x150 mm) von Agilent Technologies, Böblingen, bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Auftrennung der Carotinoide erfolgte zunächst über 2 min. isokratisch mit 20 % EtAc in AcN, danach über einen Gradienten von 20 % EtAc in AcN bis 50 % EtAc in AcN für 10 min. und anschließend für 3 min. isokratisch bei 50 % EtAc in AcN. Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm (Absorptionsbereich der Carotinoide) und wurde mittels HP ChemStation for LC Version A.05.02 durchgeführt.

2.7.6 BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*) in *N. benthamiana*

Die Durchführung des *BiFC*-Assays erfolgte nach (Jach u. a., 2006). Bevor die Interaktions-bedingte RFP-Fluoreszenz überprüft wurde, musste zunächst ein Abgleich der mikroskopischen Einstellungen vorgenommen werden. Dieser diente der Eliminierung eines unspezifischen Fluoreszenzsignals. Aufgrund von Überlappungen der Emissionsspektren von CFP und RFP ist ein geringer Teil der CFP-Emission (1 - 5 %, je nach gewählten Geräteeinstellungen) im RFP-Kanal detektierbar. Dieses Phänomen wird als „*bleedthrough*“ (durchbluten) bezeichnet. Zur Messung spezifischer RFP-Signale muss dieser Hintergrund durch Anpassungen der eingestrahlten Laserintensität und der Detektorempfindlichkeit bestmöglich reduziert werden. Hierzu wurde das transgene Blattgewebe zunächst ausschließlich mit dem 405 nm-Laser angeregt, wodurch die alleinige Anregung des CFP-Moleküls gewährleistet wird. Die mikroskopischen Einstellungen wurden so variiert, dass unter diesen Bedingungen im CFP-Kanal spezifisches CFP-Fluoreszenzlicht detektiert werden konnte, im RFP-Kanal jedoch keine Emission zu verzeichnen war. Der Abgleich wurde für jede mikroskopierte Zelle bzw. für jede Aufnahme neu durchgeführt. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass im RFP-Kanal detektiertes Licht tatsächlich ein spezifisches RFP-Signal darstellt, das aufgrund der Interaktion von ECdel und 25Q6 emittiert wird.

Unter diesen Bedingungen bzw. Einstellungen erfolgte dann letztendlich die parallele Anregung der fluoreszierenden Moleküle mittels zweier Laser, so dass eine spezifische Anregung des RFP- und des CFP-Moleküls gewährleistet war (s. III2.7.3).

IV Ergebnisse

Aus dem pflanzlichen Carotinoid-Stoffwechsel wurden geeignete Zielenzyme ausgewählt, deren via Peptid-Aptamer-Bindung modifizierte Aktivität (theoretisch) eine Anreicherung von β -Carotin in der Zielpflanze (Endziel der Arbeit) zur Folge haben kann. Nach erfolgreicher funktioneller Charakterisierung in *E. coli* wurden für diese Zielenzyme Peptid-Aptamere aus einer Zufallspeptid-Library selektiert. Die identifizierten Aptamere wurden in einem bakteriellen Assay hinsichtlich einer Modulation der enzymatischen Aktivität und einer Beeinflussung des Carotinoid-Stoffwechsels untersucht. Für ein bioaktives Aptamer wurde die Interaktion mit dem Zielenzym und die metabolische Auswirkung *in planta* (transienter *BIFC*-Assay) getestet. Weiterhin wurden strukturelle und funktionelle Analysen der putativen Promotoren der Zielenzyme durchgeführt.

1 Auswahl und funktionelle Charakterisierung der Zielenzyme

Basierend auf dem derzeitigen Kenntnisstand der Wissenschaft zum pflanzlichen β -Carotin-Stoffwechsel sind in einleitenden Arbeiten die Enzyme Phytoensynthase (PSY), β -Ring-Hydroxylase 2 (BH2) und Lycopon- ϵ -Cyclase (EC) als geeignete Ziele für die geplanten Arbeiten zur Modifikation des Carotinoid-Stoffwechsels ermittelt worden. Sie besetzen wichtige Positionen des Biosyntheseweges, und eine erfolgreiche Modifikation ihrer Aktivität durch spezifische Aptamere sollte sich signifikant auf die Zusammensetzung des Carotinoidspektrums auswirken. Abbildung 2 zeigt die von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen.

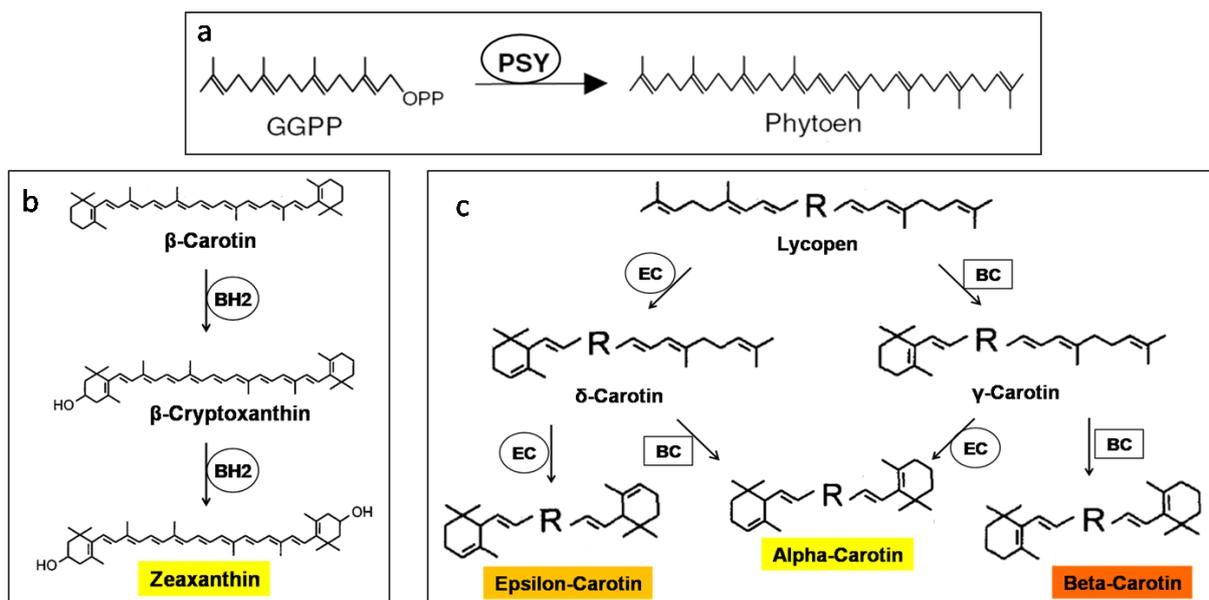


Abbildung 2: Ausschnitte aus dem pflanzlichen β -Carotin-Stoffwechsel. Dargestellt sind die von den drei Zielenzymen katalysierten Reaktionen: a) Die Umsetzung von Geranylgeranyl-Diphosphat (GGPP) zu Phytoen durch die Phytoensynthase (PSY) b) β -Carotin-Abbau über das Zwischenprodukt β -Cryptoxanthin zu Zeaxanthin durch die β -Ring-Hydroxylase (BH2) und c) die Lycopon- ϵ -Cyclase (EC)-katalysierte Umwandlung von Lycopon über δ -Carotin zu ϵ -Carotin, sowie von γ - zu α -Carotin.

Durch die Interaktion der Phytoensynthese mit einem spezifischen aktivitätssteigernden Aptamer sollte mehr Phytoen produziert und somit erhöhte Substratmengen für den weiteren Biosyntheseweg zur Verfügung stehen, wodurch folglich der β -Carotin-Gehalt der Zellen gesteigert werden sollte. Das Enzyme β -Ring-Hydroxylase 2 (BH2) setzt β -Carotin weiter zu Zeaxanthin um. Durch die Interaktion mit Aptameren soll die β -Ring-Hydroxylase inhibiert oder in ihrer Aktivität reduziert werden. Durch die Blockade dieser katabolen Reaktion soll eine Anreicherung des Ausgangsproduktes β -Carotin erreicht werden. In ähnlicher Weise sollte durch Herabsetzen oder Ausschalten der Lycopon- ϵ -Cyclase-Aktivität mit Hilfe geeigneter Aptamere der konkurrierende Reaktionsweg vom *all-trans*-Lycopon zu Lutein blockiert oder reduziert und so ebenfalls eine Erhöhung der β -Carotin-Produktion erzielt werden.

1.1 Klonierungen für bakterielle Expression der Zielenzyme

Die drei oben beschriebenen Zielenzyme PSY, BH2 und EC wurden als *Baits* für *Yeast-Two-Hybrid-Screenings* (Y2H) eingesetzt, um aus einer Zufallspeptid-*Library* interagierende Peptide (Aptamere) zu identifizieren (s. 2.1). Die Klonierung der drei Enzyme erfolgte aus *Arabidopsis thaliana*-cDNA. *A. thaliana* eignete sich in diesem Fall gut als Modellpflanze, da die Enzyme aus diesem Organismus bislang am besten untersucht und charakterisiert worden sind (s. z.B.). Außerdem konnte man erste Transformations-Experimente in dieser Pflanze einfacher durchführen als in Nutzpflanzen wie beispielsweise *Solanum lycopersicum* oder *Cucurbita*, nicht zuletzt wegen der einfachen Handhabung und des schnellen Generationszyklus von *Arabidopsis*. Die funktionelle Charakterisierung der Zielenzyme erfolgte in *E. coli*, wobei zunächst *in silico*-Analysen der Enzyme hinsichtlich enthaltener Transitpeptid-Sequenzen durchgeführt wurden.

Homologie-Betrachtungen auf Proteinebene (Alignment hinsichtlich chemischer Eigenschaften der Aminosäuren, genaue Analyse-Parameter siehe Notredame u. a., 2000) zeigten, dass alle drei Zielenzyme in *Arabidopsis* und diversen Nutzpflanzenarten hohe Homologien von ca. 95 % im Falle der EC, ca. 90 % für die BH und ca. 90 % für die PSY aufweisen (s. Abbildung 3).

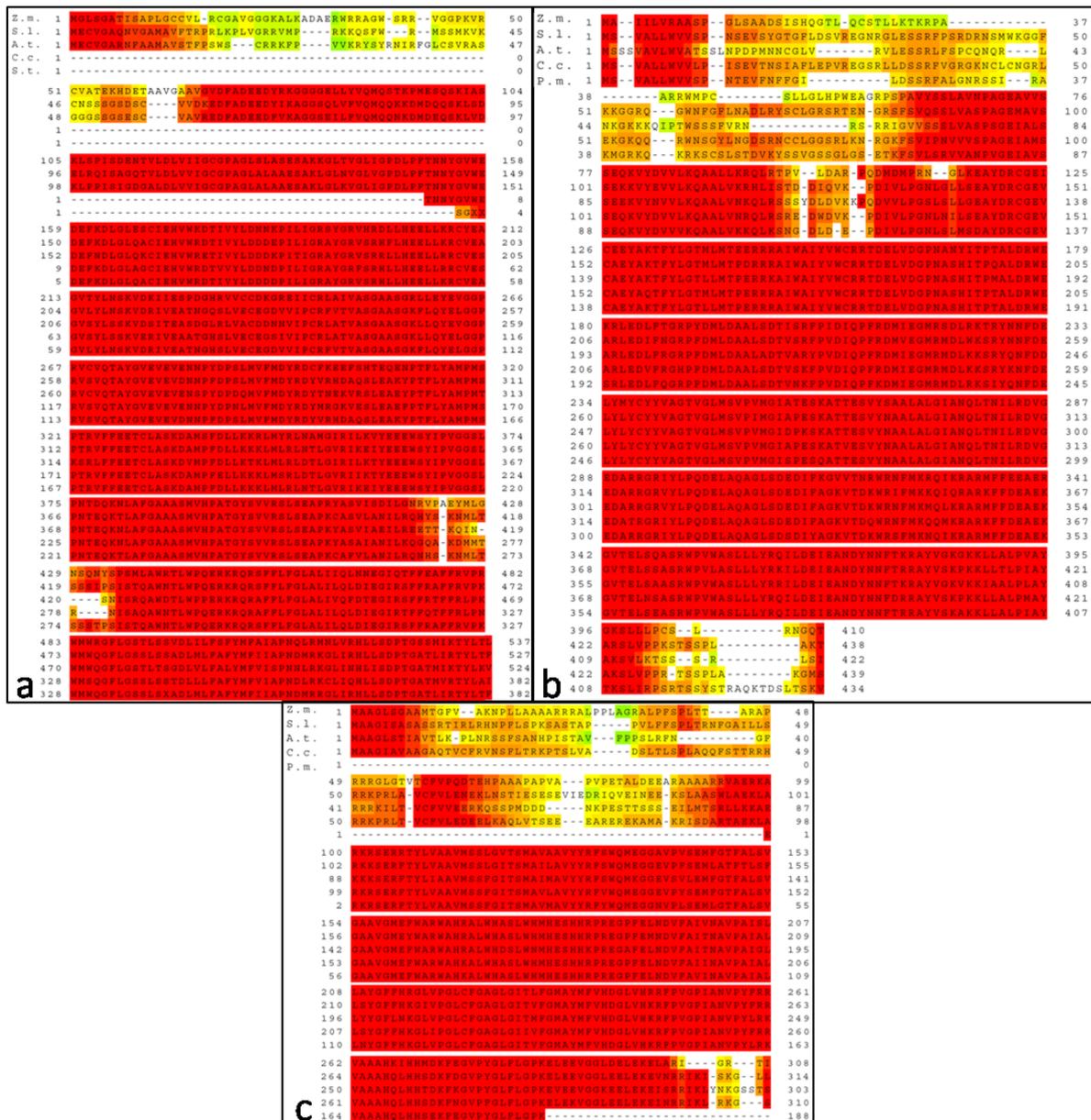


Abbildung 3: Homologie-Betrachtungen der Proteinsequenzen der drei Zielenzyme aus verschiedenen Nutzpflanzenarten. Alignments mit dem Programm T-Coffee (Notredame u. a., 2000). Entsprechend der oben aufgeführten Skalierung signalisieren die rot unterlegten Sequenz-Bereiche eine maximale Homologie, die blau unterlegten stehen für geringe Ähnlichkeit. a) EC aus *Zea mays*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana*, *Coffea caniphora* und *Solanum tuberosum* (von oben nach unten). b) PSY aus *Zea mays* (PSY1), *Solanum lycopersicum* (PSY2), *Arabidopsis thaliana*, *Coffea caniphora* und *Prunus mume*. c) BH aus *Zea mays*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana* (BH2), *Coffea caniphora* und *Prunus mume*.

Geringere Ähnlichkeiten zeigen einzig die N-terminalen Bereiche der Enzyme aus *Zea mays*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana*, *Coffea caniphora* und *Solanum tuberosum* (für EC) bzw. *Prunus mume* (für BH). Für die Zielenzyme aus *A. thaliana* sind dies in etwa die ersten 50 AS der EC, die ersten 75 AS der BH2, sowie die ersten 70 AS der PSY. Diese Protein-Abschnitte entsprechen den berechneten Transitpeptiden (TPs) der Chloroplasten-assoziierten Enzyme, die als Signale dafür dienen, dass das Protein zum entsprechenden Zielkompartiment in der Zelle zu transportieren. Dass die TP-Sequenzen sich in verschiedenen Arten unterscheiden, ist häufig der Fall (Bruce, 2001). In dem

bakteriellen Aktivitätsassay (IV1.2.1) zur Verifizierung einer funktionellen Aptamer-*Bait*-Interaktion wurden die Zielenzyme, zur Verbesserung der Expression und Löslichkeit in *E. coli*, ohne TPs kloniert. Fand man in dem bakteriellen Assay also ein bioaktives Aptamer, so konnte eine Bindung dieses Peptids im Bereich des TPs ausgeschlossen werden.

Um einen enzymatischen Funktionalitätsassay in *E. coli* durchzuführen, wurden die Zielenzyme BH2, EC und PSY (alle aus *A. thaliana*), die in den *Y2H-Screenings* als *Baits* verwendet wurden, in bakterielle Expressionsvektoren kloniert. Alle drei Zielenzyme sind laut Literatur in den Chloroplasten lokalisiert, wobei die BH2 als integrales Thylakoidmembranprotein und die EC und PSY als thylakoidmembranassoziiert und im Chloroplasten-Stroma lokalisiert beschrieben werden (Cunningham und Gantt, 1998). Mithilfe der Programme *TargetP* (Emanuelsson u. a., 2000), *LOctree/LOcKey* (Nair und Rost, 2005) und *MultiLoc* (Höglund u. a., 2006), allesamt Server zur Vorhersage von Transitpeptid-Sequenzen, wurde die subzelluläre Lokalisation überprüft, sowie die entsprechenden Chloroplasten-Transitpeptide (TP) identifiziert. Die vorhergesagten TP-Sequenzen wurden bei der anschließenden Klonierung für die bakterielle Expression entfernt, um Löslichkeit und Faltung der rekombinanten Proteine zu optimieren. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse aus den TP-Analysen der drei Zielenzyme zusammengefasst. Angegeben sind jeweils das vorausgesagte Zellkompartiment, in dem das Protein lokalisiert ist, sowie die Zuverlässigkeit der Voraussage (RI für *reliability index*) und die Länge des berechneten TPs, beginnend beim Startkodon.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Zielprotein-Analysen für EC, BH2 und PSY zur subzellulären Lokalisation sowie zu enthaltenen Transitpeptiden (TPs). Dargestellt sind die Gesamtlängen der Zielproteine in AS, sowie die Informationen aus den drei verwendeten *Prediction-Servern TargetP, LOctree/LOcKey* und *MultiLoc* bzgl. Lokalisation (Lok.) des Proteins (C für Chloroplast) und entsprechendem RI (*reliability index*), der besagt, wie verlässlich die Angabe zur Lokalisation ist (Maximum = 1). In der letzten Spalte ist die von *TargetP* berechnete Länge des TPs gezeigt, die für die Klonierung in *E. coli* berücksichtigt wurde.

| Protein | L (Protein) [AS] | TargetP | | LOctree/LOcKey | | MultiLoc | | L (TP) [AS] |
|---------|------------------|---------|-------|----------------|----|----------|------|-------------|
| | | Lok. | RI | Lok. | RI | Lok. | RI | |
| EC | 524 | C | 0,751 | C | 1 | C | 0,95 | 45 |
| BH2 | 303 | C | 0,905 | C | 1 | C | 0,9 | 74 |
| PSY | 422 | C | 0,911 | C | 1 | C | 0,97 | 70 |

Aus Tabelle 7 geht hervor, dass die drei Zielenzyme laut *in silico*-Analysen Chloroplasten-lokalisiert sind. Dies wurde von allen hier verwendeten Programmen mit einer hohen bis sehr hohen Wahrscheinlichkeit vorausgesagt.

Bei der Klonierung für die bakterielle Expression wurden die Zielenzyme am N-Terminus jeweils um die entsprechende Länge des TPs verkürzt, was durch die Bezeichnung „del“ (für deletiert) hinter dem Enzym-Namen ausgedrückt wird (s. Abbildung 4).

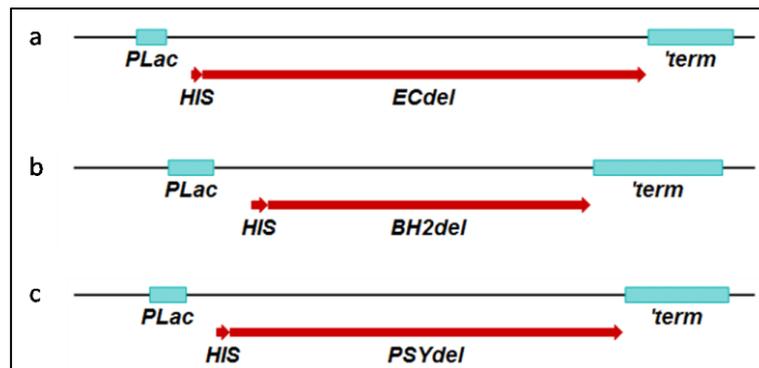


Abbildung 4: Klonierung der Zielenzyme in den Vektor pGJ2720 für bakterielle Expression, Ausschnitte aus den Plasmiden. Kloniert wurden alle cDNAs der Zielenzyme, am 5'-Ende verkürzt um die berechnete Sequenz des jeweiligen Transitpeptids (die Endung „del“ steht für deletiert). a) BH2del, 230 AS, cDNA 693 bp lang b) ECdel, 480 AS, 1443 bp und c) PSYdel, 350 AS, 1053 bp. Die Expression in *E. coli* wurde über den *Lac*-Promotor gesteuert, die cDNAs der Enzyme wurden am 5'-Ende zusätzlich mit einem 6xHIS-tag versehen, 'term' steht für den T7-Terminator.

Abbildung 4 zeigt Ausschnitte aus den bakteriellen Expressionsplasmiden, die Enzyme wurden am N-Terminus fusioniert mit einem 6xHis-tag. Die Plasmide tragen ein Ampicillin-Resistenz-Gen und werden über den ColE1-Replikationsursprung (pUC-ori) repliziert (*high copy*, ca. 300-500 Kopien pro Zelle).

Zur Überprüfung der Bioaktivität der gefundenen Aptamere wurde ein Funktionalitätsassay in *E. coli* entwickelt. Mithilfe des Plasmids pAC-BETAipi (Cunningham und Gantt, 2007) können Carotinoid-produzierende Bakterien generiert werden. Basierend auf pAC-BETAipi und durch bakterielle Koexpression eines der Zielenzyme verschieben sich die Carotinoid-Verhältnisse, sofern das Enzym in *E. coli* aktiv ist. Auf diese Weise wurde ein *in vivo*-Assay entwickelt, in dem die Aktivität der Zielenzyme aus *A. thaliana* in einem sogenannten *Color-Complementation*-Assay (Färbung der doppelt transgenen Bakterienkolonien entsprechend den akkumulierten Carotinoiden, Francis Cunningham und Elisabeth Gantt 2007) und mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) nachgewiesen werden konnte.

Wie in Abbildung 5 gezeigt, sind auf dem Plasmid pAC-BETAipi mehrere zentrale Enzyme des Carotinoid-Stoffwechsels kodiert. Die cDNAs stammen aus dem Cyanobakterium *Erwinia herbicola*. Einige *E. coli*-Stämme (z.B. TOP10, XL1blue) sind in der Lage, mithilfe dieses Plasmids Carotinoide zu produzieren und das Stoffwechsel-Endprodukt β -Carotin zu akkumulieren. Mit pAC-BETAipi transformierte Bakterien zeigten folglich eine intensive Orange-Färbung (s. Abbildung 6 b).

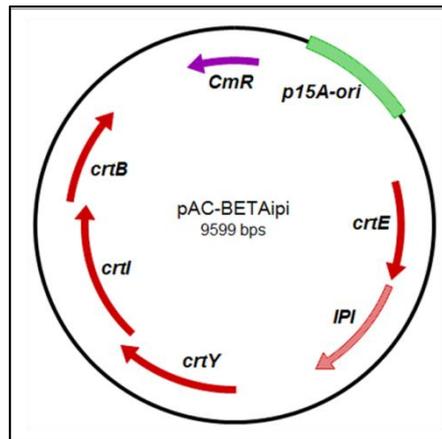


Abbildung 5: Plasmidkarte des Plasmids pAC-BETAipi. Das 9599 bp große Plasmid trägt ein Chloramphenicol-Resistenzgen (*CmR*) zur Selektion in *E. coli*, sowie einen *p15A-ori* für bakterielle Replikation. Fünf Gene aus *Erwinia herbicola* kodieren für zentrale Enzyme des Carotinoid-Stoffwechsels. *crtE*: GGPP-Synthase, *IPI*: Isopentenyl-Diphosphat-Isomerase, *crtY*: Lycopen- β -Cyclase, *crtI*: Phytoen-Desaturase, *crtB*: Phytoensynthase.

Für den Aktivitäts-Nachweis der Zielenzyme ECdel und BH2del (siehe IV.1.2) wurden *E. coli* TOP10 mit pAC-BETAipi und dem Plasmid, welches das Zielenzym kodiert (s. Abbildung 4 a, b) kotransformiert. Da pAC-BETAipi bereits die PSY aus *E. herbicola* kodierte, musste für einen Nachweis der *A. thaliana*-PSY-Aktivität das *crtB*-Gen zunächst funktionell zerstört werden, um anschließend eine erfolgreiche Komplementation durch das pflanzliche Enzym zu zeigen. Das *crtB*-Gen, das für die *E. herbicola*-PSY kodiert, wurde über Restriktion, Klenow-*fill in* und Religation funktionell zerstört (s. Abbildung 6 a).



Abbildung 6: Konstruktion von pAC-BETAipi_Δ*crtB*, einem modifizierten pAC-BETAipi-Plasmid für den Aktivitäts-Nachweis des Zielzyms PSY über einen Komplementation-Assay. (a) Ausschnitt aus dem *crtB*-Gen, das auf pAC-BETAipi die PSY aus *E. herbicola* kodiert. *BamHI*-Verdau, *Fill-in*-Reaktion und Religation des Plasmids bewirkten die Translation eines verkürzten Proteins, das nicht mehr funktionell war. (b) *E. coli* TOP10, die das intakte pAC-BETAipi trugen und aufgrund des akkumulierten β -Carotins intensiv orange gefärbt waren. (c) Wurden *E. coli* TOP10 mit dem modifizierten Plasmid pAC-BETAipi_Δ*crtB* transformiert, bei dem die *E. herbicola*-PSY funktionell zerstört ist, produzierten sie kein β -Carotin mehr und blieben farblos.

Durch die Modifikation des *crtB*-Gens kam es zu einer zusätzlichen Insertion von vier Nukleotiden, was eine Verschiebung des Leserahmens bewirkte. Demzufolge entstand statt der 309 AS großen Vollängen-PSY ein verkürztes, 155 AS langes Translations-Produkt, das nicht mehr funktionell war (Abbildung 6 a). Die transgenen Bakterien konnten folglich keine Carotinoide bilden und blieben aufgrund der unterbrochenen Stoffwechselkette farblos (Abbildung 6 c).

1.2 Nachweis der Enzymaktivitäten *in vivo*

1.2.1 Color-Complementation-Assays

Die Aktivität der drei Zielenzyme sollte in einem bakteriellen *in vivo*-Assay verifiziert werden. Je nachdem, welche Carotinoid-Stoffwechsel-Enzyme von den Bakterien exprimiert wurden, änderten sich die produzierten Carotinoide (akkumulierte Stoffwechselendprodukte) bzw. Carotinoid-Zusammensetzungen und -Verhältnisse. Die verschiedenen Carotinoide besitzen unterschiedliche Ringsysteme und weisen daher unterschiedliche Absorptionsmaxima auf, was sich auf die bei Tageslicht sichtbaren Farben auswirkt. Die Farbpalette der betrachteten Carotinoide reicht von hellgelb über orange bis rot (Cunningham u. a., 1996). Somit konnte man über die Änderung der Färbung Carotinoid-haltiger transgener *E. coli*-Kolonien Hinweise auf die synthetisierten Carotinoide und damit die Funktionalität der exprimierten Enzyme erhalten. In Tabelle 8 sind alle Carotinoide aufgelistet, die in den bakteriellen Assays zum Aktivitäts-Nachweis der drei Zielenzyme akkumuliert wurden. Die Farben der Carotinoide, sowie die jeweils im Molekül enthaltenen Ringsysteme sind angegeben, ebenso die Zielenzyme, in deren Funktionalitäts-Assay die Carotinoide auftraten.

Tabelle 8: Färbungen und Ringsysteme der Carotinoide, die in den Zielenzym-Funktionalitätsassays auftraten. Für ϵ -Carotin wurden keine Literaturangaben zur Färbung gefunden, Gelb wird aufgrund der chemischen Struktur vermutet.

| Akkumuliertes Carotinoid | Ringsysteme des Carotinoids | Farbe des Carotinoids | Auftreten in Zielenzym-Assay |
|-----------------------------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Zeaxanthin | β -3-ol, β -3-ol | Gelb | BH2 |
| β-Cryptoxanthin | β , β -3-ol | Gelb-Orange | BH2 |
| α-Carotin | ϵ , β | Gelb-Orange | EC |
| ϵ-Carotin | ϵ , ϵ | Gelb | EC |
| β-Carotin | β , β | Orange | PSY, EC, BH2 |

In F. X. Cunningham und E. Gantt (1998) sind die in Tabelle 8 aufgelisteten Carotinoide hinsichtlich Struktur und chemischer Eigenschaften genauer beschrieben.

Zur Prüfung der Funktionalität von EC Δ el und BH2 Δ el im *Color-Complementation-Assay* (s. Abbildung 7) wurden kompetente *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi mit pGJ2720-EC Δ el bzw. pGJ2720-BH2 Δ el kotransformiert und bis zur Farbentwicklung auf Nährmedien inkubiert. Als Kontrolle dienten

ausschließlich β -Carotin-akkumulierende *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi-Zellen, sowie der transgene Stamm *E. coli* TOP10 pGJ2720-ECdel. Durch das Fehlen des basalen, auf pAC-BETAipi kodierten Carotinoid-Stoffwechsels zeigten letztere keine Carotinoidproduktion.

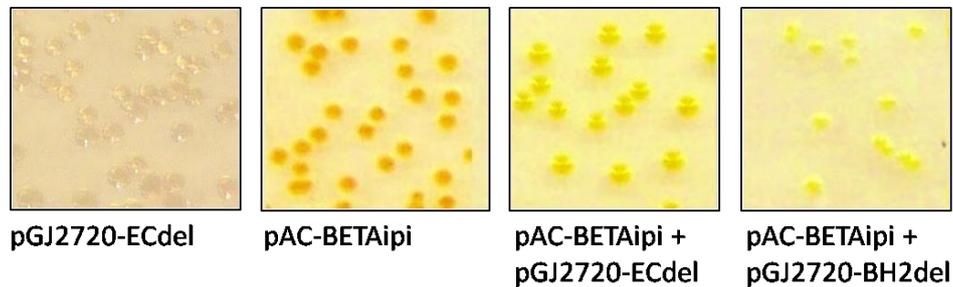


Abbildung 7: Color-Complementation-Assay zum Nachweis der Aktivität der Zielenzyme in *E. coli*. Abgebildet sind transgene *E. coli* TOP10, die die unter dem jeweiligen Bild aufgelisteten Plasmide enthielten. Alle Ansätze wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Diejenigen Klone, die ausschließlich das Zielenzym ECdel exprimierten (ohne pAC-BETAipi), waren farblos. V.l.n.r.: Die Bakterien, die nur pAC-BETAipi enthielten, waren intensiv orange. Kotretransformierte Bakterien mit pAC-BETAipi, die zusätzlich die ECdel exprimierten, waren gelb-orange. Diejenigen, die pAC-BETAipi enthielten und zusätzlich die BH2del exprimierten, waren hellgelb gefärbt und bildeten deutlich kleinere Kolonien als die übrigen Klone.

Bakterien, die ausschließlich mit pAC-BETAipi transformiert wurden (Kontrolle), waren intensiv orange gefärbt (Abbildung 7). Sie stellten erwartungsgemäß ausschließlich β -Carotin als Endprodukt her. Das Kontrollexperiment, bei dem *E. coli* TOP10 ausschließlich mit pGJ2720-ECdel transformiert wurden, lieferte wie erwartet vollkommen farblose Kolonien. Durch Koexpression der ECdel änderte sich die Farbe der Bakterien deutlich in Richtung gelb-orange, wodurch die Umwandlung der Carotinoid-Zwischenstufe Lycopene zu α - und ϵ -Carotin aufgrund der ECdel-Aktivität angezeigt wurde.

Bei Koexpression des Zielenzyms BH2del wurden die transgenen Bakterien hellgelb, was darauf hindeutet, dass das aufgrund von pAC-BETAipi gebildete β -Carotin von der aktiven BH2del zu Zeaxanthin umgesetzt wurde. Das Kontrollexperiment, bei dem *E. coli* TOP10 ausschließlich mit pGJ2720-ECdel transformiert wurden, lieferte wie erwartet vollkommen farblose Kolonien. Auffällig war bei BH2del-exprimierenden Bakterien die Bildung deutlich kleinerer Kolonien (Abbildung 8).

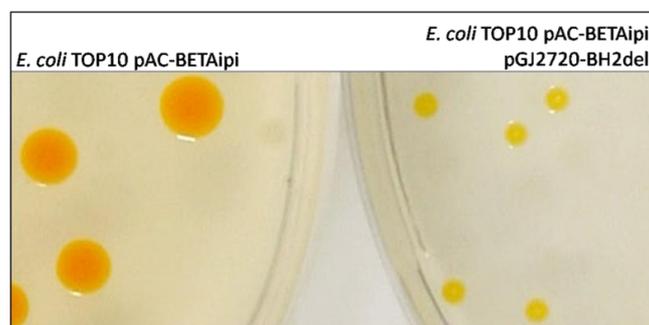


Abbildung 8: Transgene Carotinoid-produzierende Bakterienkolonien, Bildausschnitte von Agar-Platten nach Retransformationen. Links: *E. coli* TOP10, die das Plasmid pAC-BETAipi enthielten, rechts: *E. coli* TOP10 mit pAC-BETAipi und zusätzlichem Plasmid pGJ2720-BH2del, die Kolonien waren deutlich kleiner. Die beiden Ansätze wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt: Transformation kompetenter Zellen, anschließende Inkubation ÜN bei 37 °C, danach drei Tage bei RT, alle Inkubationsschritte im Dunkeln.

Inkubierte man frisch transformierte Bakterienkolonien einige Tage bei RT, so wuchsen beispielsweise *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi (Kontrolle) zu großen Kolonien an, während *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-BH2del im Vergleich dazu nur etwa ein Drittel bis ein Viertel der Größe erreichten (Abbildung 8). Dieses Phänomen lieferte einen Hinweis darauf, dass die Ausprägung des funktionellen Enzyms BH2del den Bakterien Schwierigkeiten bereitete bzw. den Zellstoffwechsel soweit beeinflusste, dass Zellwachstum oder Zellteilung stark verlangsamt abliefen.

Mithilfe des *Color-Complementation-Assays* konnte für ECdel und BH2del ein erster Hinweis auf eine funktionelle Expression der Zielenzyme in *E. coli* erhalten werden. Das Enzym Lycopon- ϵ -Cyclase aus *A. thaliana* ist in den Arbeiten von Cunningham und Kollegen bereits in ähnlicher Weise eingesetzt worden (Cunningham u. a., 1996). Das dort verwendete Plasmid pAt-LCYe enthält, im Gegensatz zum hier verwendeten Konstrukt pGJ2720-ECdel, die vollständige *A. thaliana* EC-cDNA und kodiert dementsprechend für das EC-Präprotein. In vergleichenden vorläufigen Studien sollte der Einfluss des Transitpeptids auf die Effizienz der Expressionskonstrukte bzw. die Funktionalität der kodierten EC-Varianten näher untersucht werden. Die Autoren stellten das Plasmid pAt-LCYe, welches (wie auch pGJ2720) das *AmpR*-Gen, einen *ColE1-ori* und den *lac*-Promotor verwendet, freundlicherweise zur Verfügung. In weiteren eigenen Arbeiten wurde pAt-LCYe zu diesen Vergleichsstudien mit pGJ2720-ECdel eingesetzt (Abbildung 9).

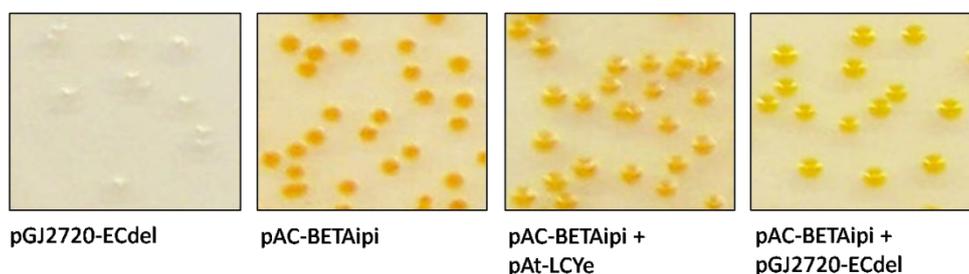


Abbildung 9: *Color-Complementation-Assay* zum Vergleich des in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmids pGJ2720-ECdel mit dem Konstrukt pAt-LCYe von Cunningham, das ebenfalls die EC-cDNA aus *A. t.* enthält, allerdings in voller Länge.

E. coli TOP10 pAC-BETAipi, die LCYe koexprimierten, zeigten im Vergleich zur Kontrolle *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi zwar eine leichte Farbänderung in Richtung gelb, die Farbe der Bakterienkolonien enthielt jedoch einen deutlich größeren Orange-Anteil als bei Koexpression von ECdel (Abbildung 9). Eine stärkere Gelb-Färbung war ein deutlicher Hinweis auf eine verbesserte enzymatische Umsetzung des orangenen β -Carotins zu den gelben bzw. gelb-orangen Carotinoiden α - und ϵ -Carotin durch die ECdel. Da sich die Plasmide in Bezug auf Replikationsursprung, Promotor und Antibiotikum-Resistenz nicht unterscheiden, konnten Gendosiseffekte aufgrund unterschiedlicher Kopienzahlen oder Transkriptionsraten als Ursache hierfür ausgeschlossen werden. Eine mögliche Ursache für das Phänomen war eine verbesserte Umsatzrate des rekombinanten Enzyms ECdel in dem heterologen

System *E. coli* aufgrund des entfernten Transitpeptids (folglich bessere Löslichkeit in der Bakterienzelle, s. hierzu auch IV 1. IV1.1.

Zum Nachweis der PSYdel-Aktivität wurden *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi_Δ*crtB*-Zellen (farblos, s. 3.1.1, Abbildung 6) mit pGJ2720-PSYdel kotransformiert und die Farbentwicklung der doppelt transgenen Zellen beobachtet. Ein entsprechendes Komplementations-Experiment ist in Abbildung 10 gezeigt.



Abbildung 10: Color-Complementation-Assay zum Nachweis der PSYdel-Aktivität in *E. coli*. Gezeigt sind (a) doppelt transgene *E. coli* TOP10 pAC-BETAipiΔ*crtB* pGJ2720-PSYdel gegenüber (b) *E. coli* TOP10 pAC-BETAipiΔ*crtB* (Negativ-Kontrolle) und (c) *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi (Positiv-Kontrolle). Unterschiede in der Färbung der frisch transformierten Bakterienkolonien zeigten eine Komplementation der *E. h.*-PSY durch das *A. t.*-Homolog.

Während die Negativ-Kontrolle *E. coli* TOP10 pAC-BETAipiΔ*crtB* farblos blieb (Abbildung 10 b), nahmen die Kolonien bei PSYdel-Koexpression eine deutliche Gelb-Orange-Färbung an (Abbildung 10 a). Die rekonstituierte Carotinoidbildung zeigte die erfolgreiche Komplementation des defekten *crtB*-Gens des Plasmids pAC-BETAipiΔ*crtB* durch das koexprimierte *A. thaliana* *Psy*-Gen an und wies damit die Funktionalität dieses Zielenzym in *E. coli* eindeutig nach. Die als Positiv-Kontrolle verwendeten *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi (mit intaktem *crtB*, Abbildung 10 c) zeigten in diesen Experimenten eine eindeutig intensivere Färbung, was auf eine höhere Gesamtproduktion an Carotinoid (β -Carotin) hindeutete. Die *E. herbicola*-PSY schien unter den gewählten Bedingungen in *E. coli* aktiver zu sein als die *A. thaliana*-PSYdel. Dies ist durchaus wahrscheinlich, da es sich sowohl bei *E. herbicola* als auch bei *E. coli* um prokaryotische Organismen handelt, bei denen sich Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel (insbesondere Mechanismen der Proteinfaltung und -modifikation) stärker ähneln als bei Bakterien und Pflanzen.

1.2.2 HPLC-Nachweise der Carotinoide

Der *Color-Complementation-Assay* konnte systembedingt nur erste Aussagen zur Funktionalität der verwendeten Enzyme liefern. Eine weitere Analyse der Ergebnisse war daher unerlässlich. Um die von *E. coli* angereicherten Carotinoide qualitativ und quantitativ genau zu analysieren, wurden die Carotinoide aus den transgenen Bakterien extrahiert und der Extrakt via HPLC untersucht.

Da die durch das Plasmid pAC-BETAipi gesteuerte bakterielle Carotinoid-Synthese die Basis für die Untersuchungen der Zielenzym-Aktivitäten darstellte, war es wichtig, nachzuweisen, dass hierbei tatsächlich β -Carotin als einziges Stoffwechselprodukt hergestellt wurde. In Abbildung 11 ist ein

Ausschnitt aus dem HPLC-Chromatogramm des untersuchten Carotinoid-Extraktes aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi mit den zugehörigen Absorptionsspektren bei 450 nm gezeigt.

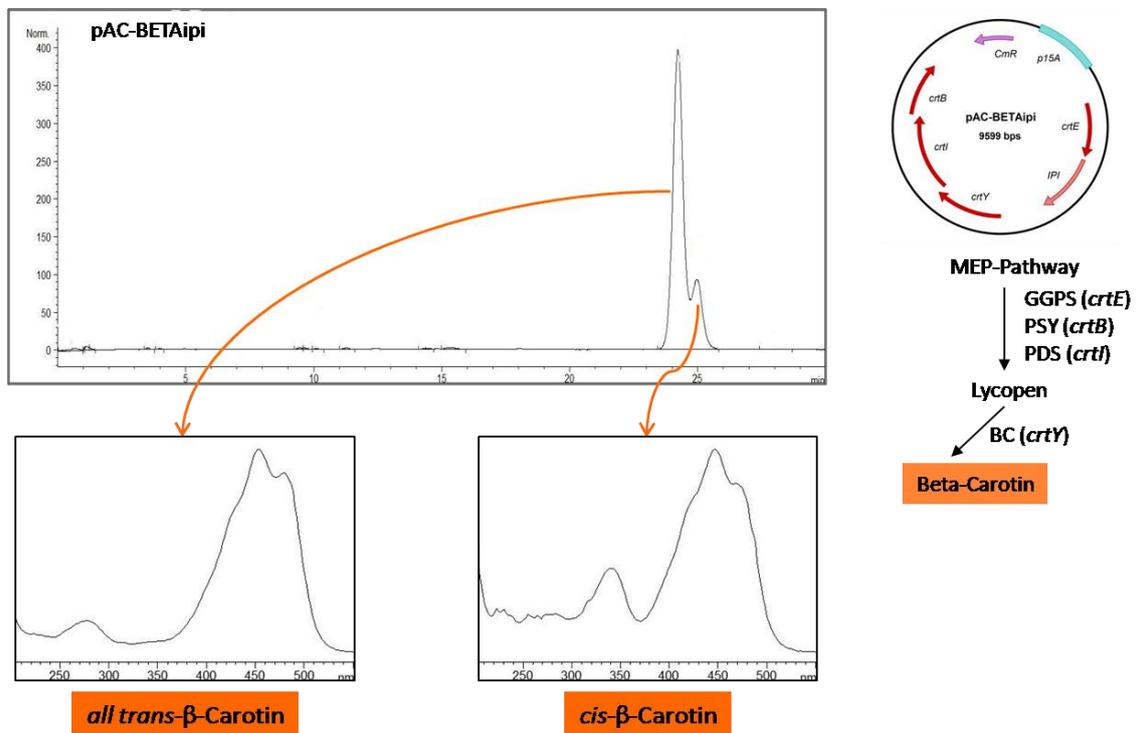


Abbildung 11: HPLC-Messung des Carotinoid-Extraktes aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi. Oben ist ein Ausschnitt aus dem Chromatogramm (bei 450 nm aufgenommen) abgebildet: Auf der x-Achse ist die Retentionszeit in min. angegeben, auf der y-Achse die normierte Einheit mAU (AU = *absorption units*). Die Retentionszeit t_R ist die Zeit, nach der eine Substanz von der Säule eluiert (je polarer die Substanz, desto kürzer die t_R). Jeder Peak im Chromatogramm entspricht einer bestimmten Substanz (in diesem Fall einem Carotinoid) in der Probe. Die Fläche eines Peaks ist proportional zur Menge der entsprechenden Substanz. Zu jedem Peak gibt es ein zugehöriges Absorptionsspektrum, anhand dessen man (durch Vergleich mit Literaturwerten für die Absorptionsmaxima) die aufgetrennte Substanz identifizieren kann. Die entsprechenden Spektren sind unter dem Chromatogramm dargestellt. Rechts oben ist das Plasmid pAC-BETAipi abgebildet, sowie der Carotinoid-Stoffwechsel, den die Bakterien mithilfe der auf dem Plasmid kodierten Enzyme vollziehen konnten.

Im Chromatogramm (Abbildung 11) traten bei einer Wellenlänge von 450 nm (Absorptionsbereich der Carotinoide) zwei dominante *Peaks* mit hohen Retentionszeiten t_R auf (s. hierzu auch Tabelle 9), was bedeutete, dass es sich um unpolare Substanzen handelte, die spät von der Säule eluierten. Durch den Vergleich der Absorptionsmaxima und der zugehörigen Absorptionsspektren mit Literaturwerten konnten die Substanzen eindeutig als *cis*- und *trans*- β -Carotin identifiziert werden (Cunningham und Gantt, 2005), wobei deutlich mehr *trans*- als *cis*-Isomer auftrat (exaktes Verhältnis variabel). Dies bestätigte die Erwartung, dass die pAC-BETAipi-enthaltenden Bakterien β -Carotin als einziges Carotinoid synthetisierten. Das Phänomen der *cis*-Isomerisierung von Carotinoiden trat auf, wenn die Bakterienkulturen oder die Proben zu viel Licht, zu hohen Temperaturen, oder zu lange der Luft ausgesetzt waren. Vergleichende HPLC-Analysen unter Verwendung von kommerziell erhältlichem β -Carotin als Referenzsubstanz bestätigten diese Ergebnisse (s. Abbildung 12).

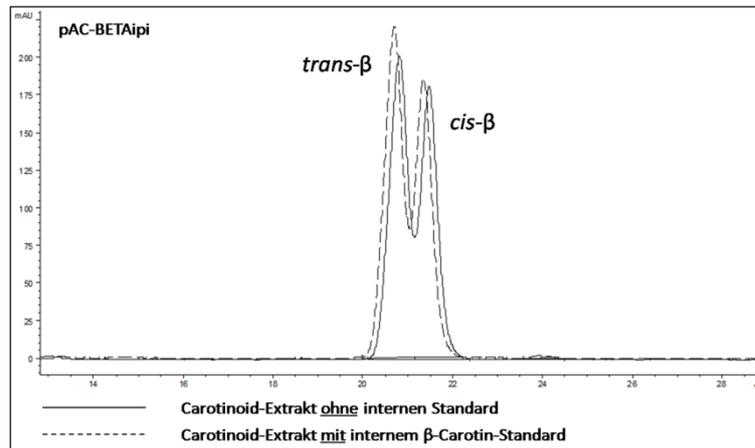


Abbildung 12: Verifizierung des β -Carotins im Carotinoid-Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi über einen internen β -Carotin-Standard. Der Extrakt wurde vor der Messung vier Stunden dem Tageslicht ausgesetzt. Die durchgezogene Linie zeigt das Chromatogramm des Extraktes ohne Zugabe eines Standards. Die gestrichelte Linie zeigt das Chromatogramm des gleichen Extraktes (gleiche Menge), zu dem eine geringe Menge β -Carotin-Standard zugegeben wurde.

Die Carotinoid-Extrakte, die einige Stunden bewusst dem Licht ausgesetzt wurden, zeigten eine vermehrte Isomerisierung von *trans*- zu *cis*- β -Carotin (Abbildung 16).

Zur Bestätigung der BH2del-Aktivität wurde der Carotinoid-Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-BH2del via HPLC analysiert (Abbildung 13).

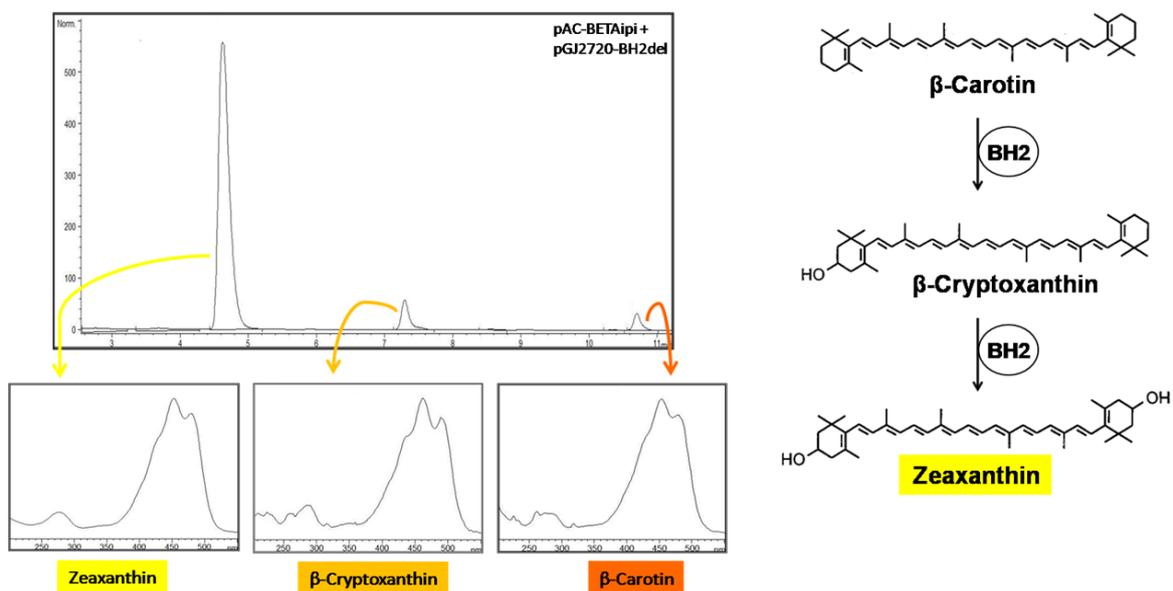


Abbildung 13: HPLC-Messung des Carotinoid-Extraktes aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-BH2del zum Nachweis der BH2-Aktivität in *E. coli*. Oben der Ausschnitt aus dem Chromatogramm (bei 450 nm), darunter die zu den drei aufgetrennten Carotinoiden gehörigen Absorptionsspektren. Rechts sind die Reaktionen aus dem β -Carotin-Stoffwechsel dargestellt, die von der BH2 katalysiert werden.

Das entsprechende Chromatogramm zum Nachweis der BH2del-Aktivität (Abbildung 13) wies drei Carotinoid-Peaks auf: Ein dominanter Haupt-Peak (ca. 80 % des Gesamt-Carotinoids, $t_R = 3,81$ min), sowie zwei kleinere Peaks mit Retentionszeiten von 6,17 min (ca. 15 %) und 9,63 min (ca. 4 %). Eine genaue quantitative Betrachtung der Carotinoid-Verhältnisse mit Rückschlüssen auf die

Enzymaktivität der BH2del erfolgt in Abschnitt IV3.1.2 (s. Tabelle 16). Wie in Abbildung 13 rechts dargestellt, erfolgte die durch das BH2-Enzym katalysierte Umwandlung von β -Carotin zu Zeaxanthin über das Zwischenprodukt β -Cryptoxanthin. Durch Auswertung der Absorptionsspektren zu den drei *Peaks* (Abbildung 13) konnten die gefundenen *Peaks* eindeutig diesen Substanzen zugewiesen werden. Der große Anteil an akkumuliertem Zeaxanthin in der Zelle erklärte die hellgelbe Farbe der Kolonien (s. Abbildung 7). Die gute Auftrennung bzw. die großen Laufzeitunterschiede der Substanzen beruhen auf deren Struktur (Abbildung 13 rechts): Zeaxanthin ist mit zwei Hydroxy-Gruppen das polarste der drei Moleküle, β -Cryptoxanthin mit einer OH-Gruppe ist deutlich weniger polar, und am unpolarsten ist β -Carotin, da es keine OH-Gruppe besitzt. Der postulierte Zeaxanthin-*Peak* wurde, wie zuvor der β -Carotin-*Peak*, mit einem internen Standard zusätzlich verifiziert. Bei einem Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-BH2del wurde nach Zugabe des internen Zeaxanthin-Standards ein deutlicher Anstieg der Fläche des postulierten Zeaxanthin-*Peaks* verzeichnet (Chromatogramm nicht gezeigt).

Zum Nachweis der ECdel-Aktivität wurde der Carotinoid-Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel mittels HPLC analysiert. Abbildung 14 zeigt das HPLC-Chromatogramm mit drei *Peaks*, die relativ dicht beieinander liegen.

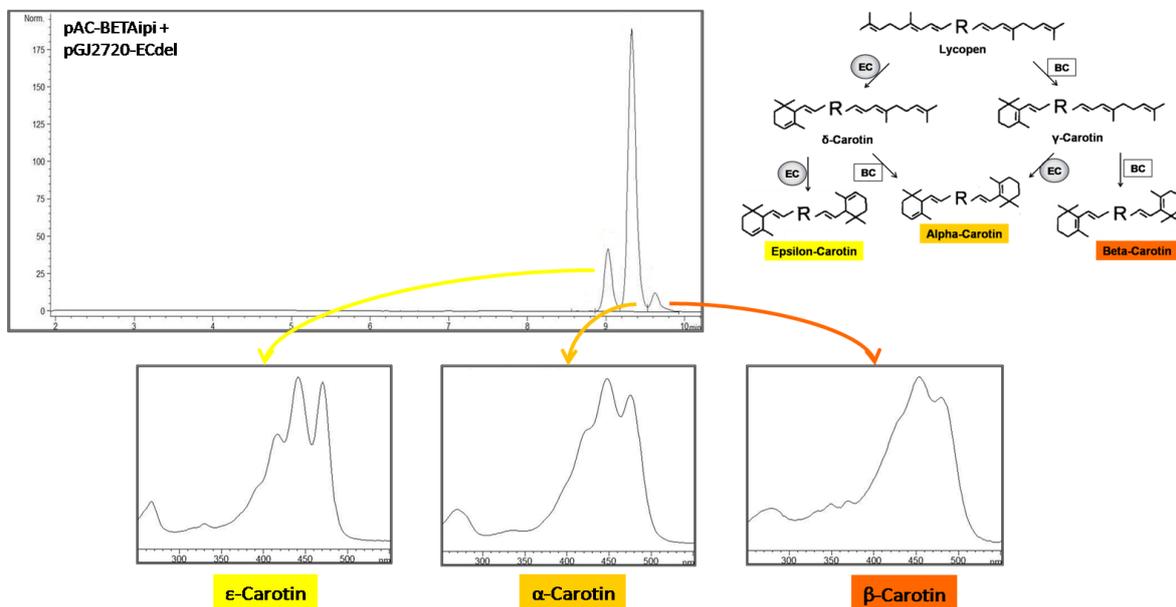


Abbildung 14: HPLC-Messung des Carotinoid-Extraktes zum Nachweis der EC-Aktivität in *E. coli*. Der Extrakt stammte aus doppelt transgenen *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel. Oben ist ein Ausschnitt aus dem Chromatogramm (bei 450 nm aufgenommen) abgebildet, darunter die Absorptionsspektren, die zu den drei aufgetrennten Substanzen gehören. Rechts neben dem Chromatogramm ist der Teil des β -Carotin-Stoffwechsels abgebildet, an dem die EC katalytisch beteiligt ist. Die Retentionszeit für β -Carotin in diesem Spektrum entspricht nicht derjenigen in dem Chromatogramm in Abbildung 11. Dies liegt daran, dass die HPLC-Parameter zwecks einer kürzeren Gesamtlaufzeit optimiert wurden.

Mithilfe der Absorptionsspektren in Abbildung 14 konnte der *Peak* bei $t_R = 8,99$ min. (ca. 70 %) ϵ -Carotin zugeordnet werden, der *Peak* bei $t_R = 8,29$ min. (ca. 20 %) α -Carotin (s. auch Tabelle 9) und

der *Peak* bei $t_R = 9,59$ min. (ca. 10 %) β -Carotin. Zur genauen Berechnung der Carotinoid-Verhältnisse über die *Peak*-Flächen s. Abschnitt IV.3.1.2 (s. Tabelle 15). Experimentell wurden der α - und der β -Carotin-*Peak* mithilfe interner Standards nachgewiesen (nicht aufgeführt).

Bei Betrachtung des relevanten Teils des Carotinoid-Stoffwechselweges erwartete man drei Produkte, die von den Bakterien akkumuliert werden konnten. Die Umsetzung von Lycopon zu diesen drei Carotinoiden war ein Zusammenspiel der BC, die auf pAC-BETAipi kodiert ist, und des Zielenzym EC, das als rekombinantes Protein koexprimiert wurde (Abbildung 14 rechts). Die BC addiert nacheinander zwei β -Ringe an Lycopon und katalysiert so in zwei Schritten die Bildung von β -Carotin über γ -Carotin. Daher akkumulierten pAC-BETAipi enthaltende Bakterien ausschließlich β -Carotin. Wurde nun die ECdel koexprimiert, zyklisierte sie, analog zur BC, nacheinander die beiden Enden des Lycopons zu zwei ε -Ringen, wobei zunächst δ - und dann ε -Carotin entstand. Letzteres wurde von den Bakterien akkumuliert und war ebenfalls im Chromatogramm als zweitgrößter *Peak* sichtbar. Aus den beiden monozyklischen Zwischenstufen γ - und δ -Carotin entstand die heterozyklische Verbindung α -Carotin, die im HPLC-Chromatogramm den eindeutig größten *Peak* darstellte. Der β -Carotin-*Peak*, der allein durch die Aktivität der BC zustande kam, war schließlich der kleinste der drei *Peaks*. Die durchgeführten HPLC-Messungen zeigten folglich, wie erwartet, dass sich bei ECdel-Koexpression in *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi am Ende des Carotinoid-Stoffwechsels ein Gleichgewicht aus den drei Carotinoiden α -, β - und ε -Carotin einstellte.

Um die Aktivität der PSYdel zu verifizieren, wurde der Carotinoid-Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi Δ crtB pGJ2720-PSYdel via HPLC untersucht (Abbildung 15). Als Negativ-Kontrolle diente der Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi Δ crtB.

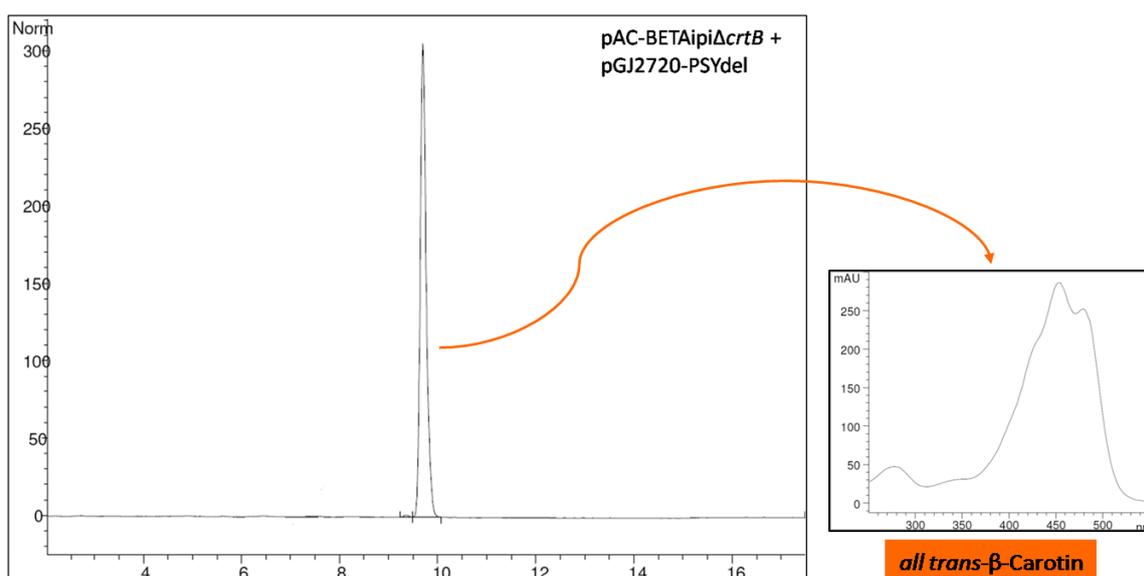


Abbildung 15: Nachweis der PSYdel-Aktivität via HPLC. Vermessen wurde der Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi Δ crtB pGJ2720-PSYdel (durchgezogene Linie), sowie aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi Δ crtB (Negativ-Kontrolle, gestrichelte Linie; nicht sichtbar, da keine Carotinoid-*Peaks* bei der gemessenen Wellenlänge vorhanden), um eine Komplementation durch die PSYdel zu belegen. β -Carotin konnte über Retentionszeit sowie Absorptionsmaxima identifiziert werden.

Die HPLC-Analyse in Abbildung 15 zeigt, dass *E. coli* TOP10 pAC-BETAipiΔ*crtB* pGJ2720-PSYdel β-Carotin produzierten, was die Ergebnisse der Komplementationsexperimente eindeutig bestätigte. Weitere Carotinoide bzw. Zwischenprodukte traten nicht auf. Wie erwartet produzierte die Negativkontrolle *E. coli* TOP10 pAC-BETAipiΔ*crtB* keine Carotinoide. Das akkumulierte GGPP ist bei 450 nm nicht sichtbar, daher verläuft das Chromatogramm der Kontrolle entlang der Basislinie und ist in Abbildung 15 nicht erkennbar.

In Tabelle 9 sind die Retentionszeiten und Absorptionsmaxima aller Carotinoide, die in den oben beschriebenen HPLC-Chromatogrammen identifiziert wurden, zusammengefasst. Weiterhin ist aufgeführt, ob ein Nachweis über einen internen Standard erfolgt ist.

Tabelle 9: HPLC-basierte Identifizierung der Carotinoide, die in den vermessenen Extrakten enthalten waren. Gezeigt sind die Retentionszeiten aus dem HPLC-Chromatogramm, sowie die Absorptionsmaxima im UV/VIS-Spektrum. Die Retentionszeiten wurden unter den in M&M beschriebenen HPLC-Bedingungen erhalten. In der letzten Spalte ist angegeben, ob die Substanz mithilfe eines internen Standards nachgewiesen wurde.

| Identifiziertes Carotinoid | Mittlere Retentionszeit ± mittlere Abweichung [min.] | Absorptionsmaxima [nm] | Nachweis über internen Standard |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Zeaxanthin | 3,787 ± 0,038 | 265/453/480 | ja |
| β-Cryptoxanthin | 6,135 ± 0,042 | 288/460/490 | nein |
| ε-Carotin | 8,981 ± 0,022 | 267/417/440/470 | nein |
| α-Carotin | 9,283 ± 0,022 | 269/446/476 | ja |
| β-Carotin (<i>all trans</i>-) | 9,580 ± 0,030 | 277/454/480 | ja |

Sowohl die Retentionszeiten als auch die Absorptionsmaxima aller via HPLC analysierten Carotinoide waren reproduzierbar (Tabelle 9). Die Mittelwerte der Retentionszeiten basieren auf je 53 Messwerten für Zeaxanthin und β-Cryptoxanthin, je 17 für α- und ε-Carotin und 70 für *all trans*-β-Carotin. Die Werte zeigen nur sehr geringe Abweichungen in den Messungen. Diejenigen Carotinoide, die nicht über einen internen Standard nachgewiesen wurden, waren zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente kommerziell nicht als Reinsubstanzen erhältlich.

2 Identifizierung von Peptid-Aptameren

2.1 Klonierungen der *Baits* für *Yeast-Two-Hybrid-Screenings*

Für die *Y2H-Screenings* wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen der Zielenzyme (*Baits*), wie im Methoden-Teil beschrieben, in den *Bait*-Shuttle-Vektor pAS2 kloniert (s. Abbildung 18). EC und PSY wurden in voller Länge kloniert. Da die BH2 ein integrales Membranprotein ist (Rost u. a., 1995), und somit in voller Länge schlecht geeignet für rekombinante Expression sowie *Y2H-Screenings*, wurde für dieses *Bait* nur der C-terminale Teil kloniert (AS 227 - 303), der sich *in planta* im Chloroplasten-Stroma befindet und für die Bindung von Eisen-Atomen zuständig ist. Aufgrund der Lokalisation im Stroma wäre dieser Enzym-Bereich, im Gegensatz zu den Transmembrandomänen, auch in der Pflanze zugänglich für ein plastidär ausgeprägtes Aptamer. Da dieser Bereich außerdem aufgrund der enthaltenen Eisen-bindenden Motive vermutlich an der Substrat-Bindung/-Umsetzung beteiligt ist, könnte eine Aptamer-Interaktion in dieser Region mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit einen funktionellen Effekt haben (Cunningham und Gantt, 1998). Die Positionen der Transmembrandomänen (TMDs), sowie des konservierten Motivs sind in Abbildung 16 schematisch dargestellt.

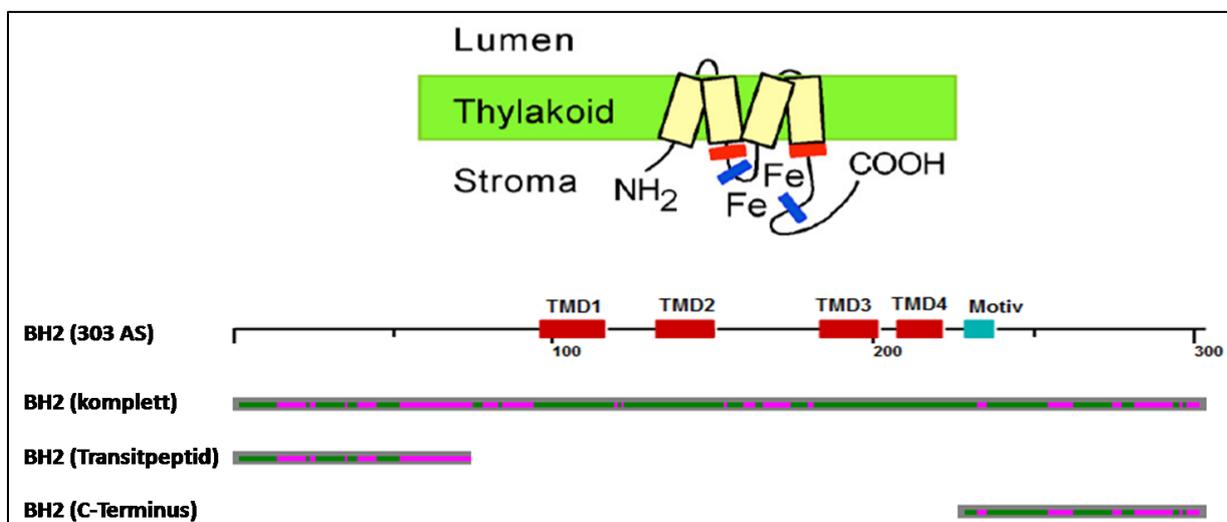


Abbildung 16: Oben: Schematische Darstellung der Lokalisation der BH2 aus *A. thaliana* in der Chloroplasten-Thylakoidmembran, modifiziert nach F. X. Cunningham und E. Gantt 1998. Darunter ist die 303 AS lange Proteinkette abgebildet, die vier Transmembrandomänen (TMD 1 - 4) sind rot eingezeichnet, das hochkonservierte Motiv ist blau markiert. Unten: Polaritäts-Analyse mit dem Programm *Clone Manager* für das Vollängen-Protein (303 AS), das Transitpeptid (74 AS), sowie den im Stroma lokalisierten C-Terminus, der als *Bait* für die *Y2H-Screenings* eingesetzt wurde (77 AS). Die dunkelgrünen Bereiche signalisieren unpolare Regionen, polare Sequenzabschnitte sind pink gekennzeichnet.

Die ersten 74 AS der BH2 wurden als Transitpeptid vorausgesagt, das den intrazellulären Transport des Enzyms in den Chloroplasten gewährleistet. Der (hauptsächlich hydrophobe) mittlere Teil des Proteins enthält vier Transmembran-Helices (TMHs) bzw. TMDs, die in die Thylakoidmembran des Chloroplasten eingebettet sind und eindeutig hydrophoben Charakter haben. Die übrigen Teile des

Proteins (TP, Bereiche zwischen den TMDs sowie der C-terminale Teil des Proteins) enthalten sowohl polare als auch unpolare Abschnitte. Hinter der letzten TMD befindet sich ein hochkonserviertes Motiv, das in dem klonierten *Bait* ebenfalls enthalten ist. Abbildung 17 sowie Tabelle 10 geben eine genauere Analyse der TMDs und des konservierten Motivs. Die Analysen der TP von EC und PSY sind in IV1.1 dargestellt.

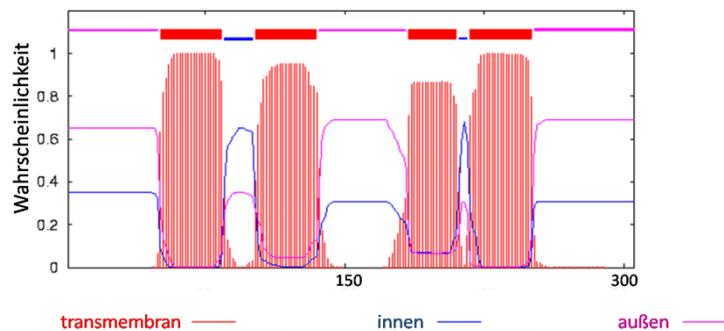


Abbildung 17: Berechnung der Positionen der vier TMDs der BH2 aus *A. thaliana* mit dem Programm *TMHMM* (Möller u. a., 2001). Die x-Achse zeigt den Verlauf der Proteinkette (volle Länge: 303 AS). Die vertikalen roten Linien stehen für transmembrane Bereiche des Proteins, die blaue Linie zeigt Bereiche, die sich innen befinden (also in diesem Fall im Lumen des Chloroplasten), die pinkle Linie steht für außen liegende Bereiche des Proteins (also im Stroma befindliche Regionen). Der entsprechende Wert auf der y-Achse zeigt die Wahrscheinlichkeit, mit der es sich tatsächlich um das berechnete Element handelt (max. = 1).

Für die BH2 wurden vom Programm *TMHMM* (Möller u. a., 2001) vier TMDs mit einer extrem hohen Wahrscheinlichkeit (s. Skalierung der y-Achse in Abbildung 16) vorausgesagt. Wie bereits in Abbildung 16 schematisch dargestellt, befindet sich der N-terminale Bereich des Enzyms, der auch das TP umfasst, im Stroma des Chloroplasten. Der erste *Loop* zwischen TMD 1 und 2 ist im Thylakoid-Lumen lokalisiert, der *Loop* zwischen TMD 2 und 3, der mit 33 AS der größte *Loop* der BH2 ist, befindet sich wiederum im Stroma. Der dritte *Loop* zwischen TMD 3 und 4 ist der kürzeste (4 AS) und im Lumen lokalisiert, während sich der BH2-C-Terminus, wie auch der N-Terminus des Proteins, im Stroma befindet.

Tabelle 10: Position und AS-Sequenzen der TMDs und des hochkonservierten Motivs der BH2 aus *A. thaliana*, berechnet mit dem Programm *TMHH*. Auffällig ist der hohe Anteil an hydrophoben AS bei allen vier in der Thylakoidmembran lokalisierten TMDs.

| Bereich | Position im Protein [AS] | AS-Sequenz | Anteil unpolarer AS [%] |
|--------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| TMD1 | 94 – 116 | FTYLIAAVMSSFGITSMAIMAVY | 70 |
| TMD2 | 128 – 150 | VSVLEMFGTFALSVGAAVGMFEW | 83 |
| TMD3 | 183 – 200 | VFAITNAVPAIGLLYYGF | 78 |
| TMD4 | 205 – 227 | LVPGLCFGAGLGITMFGMAYMFV | 91 |
| Motiv | 228 – 237 | HDGLVHKRFP | 50 |

Bei den Klonierungen für die *Y2H-Screenings* erfolgten die Fusionen der *Baits* mit der Bindedomäne des *Gal4*-Transkriptionsfaktors (*Gal4*-BD) am N-Terminus des Zielproteins. Zwischen der 148 AS langen *Gal4*-BD (17 kDa) und dem *Bait* befindet sich ein 40 AS langer *Linker*. Die Selektion für das *Bait*-Plasmid erfolgte über Ampicillin-Resistenz (für Klonierung und Vermehrung in *E. coli*) und über Tryptophan-Komplementierung (*Trp1*-Gen) entsprechend auxotropher Hefe-Stämme. Durch den hefespezifischen *ADH1*-Promotor wurde gewährleistet, dass das rekombinante Fusionsprotein allein in Hefe und nicht in *E. coli* exprimiert wurde. Abbildung 18 zeigt schematisch den Aufbau der drei erzeugten *Bait*-Konstrukte für die *Y2H-Screenings*.

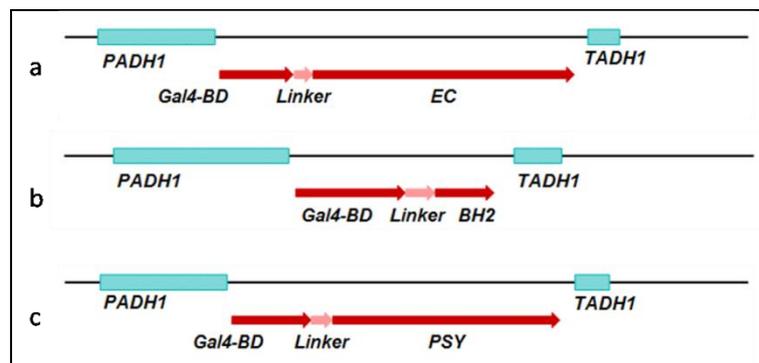


Abbildung 18: Klonierungen der Zielenzyme in den *Bait*-Vektor pAS2 für die *Y2H-Screenings*, Ausschnitte aus den Plasmiden. Kloniert wurden a) BH2 (C-terminaler Bereich, wie oben beschrieben), cDNA 237 bp b) EC, 1575 bp und c) PSY, 1269 bp, in N-terminaler Fusion mit der *Gal4*-BD, verbunden über einen Linker. Die Expression in Hefe erfolgte über den *ADH1*-Promotor, abgeschlossen wird die Expressionskassette mit dem *ADH1*-Terminator.

Bait- oder *Prey*-Proteine, die selbst mit der verwendeten Aktivierungs- bzw. Bindungsdomäne interagieren, werden als autoaktivierend bezeichnet, da sie (unabhängig von der Interaktion mit einem *Prey*) die Expression des Selektionsmarkers auslösen und so das Wachstum der Hefezellen unter selektiven Bedingungen ermöglichen. Autoaktivierung ist ein bekanntes Phänomen der *Y2H*-Methode, das einen unspezifischen Hintergrund an Hefekolonien hervorrufen kann, was das Auffinden echter *Bait-Prey*-Interaktionen erschwert. Keines der drei *Baits* PSY, BH2 und EC war nach entsprechenden Tests (s. III.2.6.1) autoaktivierend.

2.2 Screening von Zufallspeptid-Bibliotheken mittels *Y2H*

2.2.1 Kontrolleexperimente zur Autoaktivierung der *Baits*

Bait- oder *Prey*-Proteine, deren Ausprägung unabhängig von der Interaktion mit einem *Prey* oder *Bait* die Expression des Selektionsmarkers auslösen und so das Wachstum der Hefezellen unter selektiven Bedingungen ermöglichen, werden als autoaktivierend bezeichnet. Eine mögliche Ursache hierfür ist eine direkte Interaktion der Proteine mit der verwendeten Aktivierungs- bzw. Bindungsdomäne. Autoaktivierung ist ein bekanntes Phänomen der *Y2H*-Methode, die einen unspezifischen

Hintergrund an Hefekolonien hervorrufen kann, der das Auffinden echter *Bait-Prey*-Interaktionen erschwert.

Die in dieser Arbeit verwendeten *Baits* PSY, BH2 und EC sind daher in entsprechenden Tests (s. III.2.6.1 in Bezug auf Autoaktivierung analysiert worden. Die erhaltenen negativen Ergebnisse zeigten, dass keines dieser Proteine autoaktivierende Eigenschaften aufwies.

2.2.2 Aptamere

Zur Identifizierung von Peptid-Aptameren wurden in der Folge *Y2H-Screenings* mit zwei verschiedenen Zufallspeptid-*Libraries* durchgeführt, der *Pep1170-Library* und der *Pep1274-Library*. Die *Pep1170-Library* kodiert für Peptide mit einer Länge von 20 AS, die am C-Terminus an ein Trägerprotein (C-terminaler Teil der Alkoholdehydrogenase aus *S. cerevisiae*) fusioniert sind. Die *Pep1274-Library* (*MATCHMAKER Random Peptide Library*, Clontech) enthält Peptide von 16 AS Länge ohne C-terminale Fusion bzw. Extension. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse aller durchgeführten *Screenings* zusammengefasst.

Tabelle 11: Ergebnisse aller *Y2H-Screenings*, die für die *Baits* EC, BH2 und PSY durchgeführt wurden. Bei der Anzahl (N) der *Screening* ist eine Einheit (also ein *Screening*) definiert als 500 ml Selektionsmedium, wobei die Menge an eingesetzter *Bait*- wie auch *Library*-Hefekultur jeweils einer OD_{600} von 10, also ca. 10^8 Zellen, entspricht (s. III.2.6.1. Der angegebene Titer (in Millionen Hefeklonen pro 500 ml Gelrite-Selektionsmedium) ist der Durchschnittswert aus allen *Screenings*. Er ist proportional zur Effizienz des *Matings*. Als „selektierte Hefeklone“ werden die Hefekolonien bezeichnet, die nach dem *Screening* aus dem Gelrite-Selektionsmedium gepickt wurden und anschließend auf Agar-Selektionsmedium angewachsen sind. Der prozentuale Anteil an Artefakten basiert auf den Ergebnissen aus den *Artefakt-Colony-PCRs* und Sequenzierungen. „N (Aptamere)“ beschreibt die Anzahl uniquer Aptamer-Sequenzen, die aus der *Library* für das *Bait* erhalten wurden.

| Bait | Library | N (Screenings) | Titer [Mio.] | Selektierte Hefeklone | Anteil an Artefakten [%] | N (Aptamere) |
|------|---------|----------------|--------------|-----------------------|--------------------------|--------------|
| EC | Pep1170 | 9 | 16,9 | 615 | 98 | 5 |
| | Pep1274 | 12 | 4,5 | 440 | 77 | 7 |
| BH2 | Pep1170 | 6 | 12,9 | 385 | 97 | 6 |
| | Pep1274 | 13 | 3,9 | 314 | 80 | 25 |
| PSY | Pep1170 | 1 | 5,9 | 112 | 100 | 0 |
| | Pep1274 | 6 | 4,0 | 360 | 83 | 6 |

Bei der DNA-Sequenzanalyse der erhaltenen Klone zeigte sich, dass beide verwendeten *Libraries*, neben Peptiden der erwarteten Länge, auch verkürzte oder verlängerte Peptide enthielten. Detaillierte Betrachtungen der kodierenden Sequenzen dieser Peptide ließen den Schluss zu, dass dies vermutlich auf Ereignisse bei der *Library-Herstellung* zurückzuführen ist, die zu Leserasterverschiebungen (*frame shift mutations*) und damit zu verschobenen Stoppkodons geführt haben.

Insgesamt wurden für die drei Zielenzyme aus beiden *Libraries* 49 spezifische Aptamere identifiziert. Für die EC wurden 12, für die BH2 31 und für die PSY sechs Aptamere gefunden, die allein für das jeweilige *Bait* identifiziert wurden und damit die für den in dieser Arbeit verfolgten Ansatz notwendige hohe Spezifität aufwiesen. Die Ausbeute an Aptameren ist bei der Pep1274-*Library* deutlich höher als bei der Pep1170-*Library* (38 Aptamere insgesamt bei Pep1274 vs. 11 für Pep1170). Auffällig war die insgesamt verhältnismäßig geringe Ausbeute an spezifischen Aptameren in Anbetracht der hohen Titerwerte (Anzahl der Hefeklone in einem *Screening*, die sowohl *Bait*- als auch *Prey*-Plasmid-enthalten), sowie der relativ großen Zahl an interagierenden Hefeklonen, die aus den *Screenings* erhalten wurden. Der Grund hierfür war das Auftreten bestimmter Peptide, die extrem häufig als Interaktoren in den *Screenings* erhalten wurden. Diese Peptide waren jedoch nicht spezifisch für ein bestimmtes *Bait*, sondern kamen für alle drei Zielenzyme vor. Das Phänomen dieser sogenannten Artefakte wird in Abschnitt IV2.2.3 näher behandelt.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller Aptamere, die für EC, BH2 und PSY in den durchgeführten *Y2H-Screenings* gefundenen wurden, sind in Tabelle 12 aufgelistet. Einige der Aptamere traten in mehreren *Y2H-Screenings* nur einmal auf, andere wurden für das gleiche *Bait* mehrmals erhalten. Das mehrfache Auftreten eines Aptamers für ein und dasselbe *Bait* war ein Hinweis darauf, dass bereits alle spezifischen Aptamere in der verwendeten *Library* gefunden wurden.

Tabelle 12: Detaillierte Auflistung aller Aptamer-Aminosäuresequenzen und deren Länge in AS. Die letzte Spalte enthält die Information, wie häufig das jeweilige Aptamer in allen Screenings für das entsprechende Bait aufgetreten ist.

| Bait | Library | Aptamer | Aptamer-Aminosäuresequenz | L [AS] | Häufigkeit des Auftretens | | |
|---------|----------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------|----|---|
| EC | Pep1170 | 3505 | VGRRSTLWMYGGGMGR | 16 | 4 | | |
| | | 37D2 | SPRMWLHGFL | 10 | 1 | | |
| | | 37M3 | VMGRVLAFVIW | 11 | 1 | | |
| | | 37f7 | RLSLMLLRLLGW | 11 | 2 | | |
| | | 37i2 | KGISRTCGGWGRYWLVLVWW | 20 | 1 | | |
| | Pep1274 | 12.6 | AGLISRSLVGSSVRCRNSYVLCSLISQLHCLLSYLGSLALE | 42 | 1 | | |
| | | 12.42 | STWYPRWWSLLDGCIV | 16 | 1 | | |
| | | 17F2 | DVWTRGRQLGTVVCMW | 16 | 1 | | |
| | | 17G7 | WSEHTKGVLALCYFYG | 16 | 1 | | |
| | | 25A1 | LALFRLWMGYV | 11 | 1 | | |
| | | 25Q6 | GFVLGVLMNGFERWVL | 16 | 1 | | |
| | | 25W7 | MCLALTGVMRICVRGGRNSISSLSIPSTSRGGPPVNSPYSESYY NSLAVVLQRRDWENPDL | 61 | 2 | | |
| | | BH2 | Pep1170 | 22G2 | RVPSWVWLLARRTALRGVIG | 20 | 2 |
| 29D1 | DMVYSKVVVFRGAFRLCCN | | | 20 | 1 | | |
| 29E1 | CQARWGASRWRLAGLLEMWV | | | 20 | 2 | | |
| 29F5 | RRWGRSNRVLPMALSMLFST | | | 20 | 2 | | |
| 29G3 | RIGSMRERAGCGGSG | | | 15 | 1 | | |
| 36F5 | MRQRSKRSCMLYLLVMECFI | | | 20 | 1 | | |
| Pep1274 | 1D2 | | MEGAQRLWGTVWSRAM | 16 | 1 | | |
| | 1D3 | | PASLVLSVFRSI | 12 | 1 | | |
| | 2A6 | | RAVRRSRLQLQFVLGWL | 16 | 1 | | |
| | 2A10 | | YQGMWQVWGFLWRVSR | 16 | 1 | | |
| | 2A11 | | ALRLILVMSRGGGMRLRNS | 20 | 1 | | |
| | 15.6 | | KGGRGVAHALSLWYWW | 16 | 1 | | |
| | 18B5 | | DRECRFAMNVAWGRVFRNS | 19 | 1 | | |
| | 26A1 | | STWTGLVLWLLQYL | 15 | 1 | | |
| | 26A2 | | RRQRWGWNNKMDWSWV | 16 | 1 | | |
| | 26A3 | | RWSVMRLRGVYKPHL | 16 | 1 | | |
| | 26A4 | | TTEDALEWGANAWVRW | 16 | 1 | | |
| | 26B2 | | CWNWRAKCRVN | 11 | 1 | | |
| | 26D6 | | YGRGWRRCRREGDWER | 16 | 1 | | |
| | 26E3 | | SRTGVTKGVYQRRFEM | 16 | 1 | | |
| | 26E6 | | QSLLPVYGMLQLALMG | 16 | 1 | | |
| | 26F4 | | AAKRIGLGCIRRMFVFRNS | 19 | 1 | | |
| | 26I7 | | SRG | 3 | 1 | | |
| | 26K4 | | YNRTGHGQPEVKVR | 14 | 1 | | |
| | 26M4 | | LWSS | 4 | 1 | | |
| | 26M7 | | RRELFSS | 7 | 1 | | |
| | 26M8 | | ASCRNCGPWDAWTEST | 16 | 1 | | |
| | 26P2 | | GKRGARGGRHNAWRHL | 16 | 1 | | |
| | 26P5 | | RRERIGHL | 8 | 1 | | |
| | 26R6 | | PGKALYFLRRSSGWRA | 16 | 1 | | |
| | 26Z3 | | EIAVLTMDRMVWGRGLG | 16 | 1 | | |
| | PSY | | Pep1274 | 14.31 | MEGNKCV | 7 | 1 |
| | | | | 14.52 | AEEGSQTWV | 9 | 1 |
| 19E6 | | QEDRRVSRRWLLERIG | | 16 | 1 | | |
| 27G3 | | RSRGKCSRHDCCVFM | | 16 | 1 | | |
| 27K5 | | RVPVYGLLLKEMWGG | | 16 | 1 | | |
| 27U6 | | ALTSVG | | 6 | 1 | | |

Die insgesamt 49 gefundenen Aptamere unterscheiden sich stark hinsichtlich ihrer AS-Sequenzen und Längen (L = 3 bis 61 AS).

Für sehr kurze Peptide mit einer $L \leq 6$ AS sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass die Interaktion mit dem Zielenzym dessen Aktivität beeinflusst, also dass es sich um eine funktionelle Interaktion bzw. ein bioaktives Aptamer handelt. Der Grund hierfür ist, dass, je kürzer die AS-Kette, desto weniger Möglichkeiten zur Ausbildung von Sekundärstrukturen wie *Loops*, *Hairpins*, *Helices* oder β -Faltblättern vorliegen, die aufgrund ihrer sterischen Eigenschaften eine funktionelle Beeinflussung des Enzyms ermöglichen bzw. unterstützen können (s. hierzu auch II3.1). Aufgrund der insgesamt geringen Anzahl an Aptameren wurden kürzere Peptide wie 26I7 (L = 3 AS), 26M4 (L = AS) und 27U6 (L = 6 AS), trotz geringer Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Interaktion mit dem *Bait*, dennoch weiteren Analysen unterzogen. Die Aptamere 35O5, 37f7, 25W7, 22G2, 29E1 und 29F5 traten in den durchgeführten *Y2H-Screenings* mehr als einmal für das entsprechende *Bait* auf.

2.2.3 Artefakte

In Abschnitt IV2.2 wurde bereits das Auftreten der sogenannten Artefakte erwähnt. Als „Artefakte“ werden falsche positiven Aptamere bezeichnet. Sie wurden bei den *Y2H-Screenings* als Interaktoren für verschiedenste *Baits* erhalten, auch für solche, die funktionell und strukturell vollkommen unabhängig voneinander sind. Für eine Regulation des Carotinoid-Stoffwechsels sind die Artefakte nicht geeignet, da sie das wichtigste Kriterium, nämlich eine hohe Spezifität des Peptids in Bezug auf das Zielenzym, nicht erfüllen.

Auswertungen der Sequenzen interagierender Klone, die in den ersten *Screenings* erhalten wurden, zeigten, dass der größte Teil der Klone Artefakte enthielt, während spezifische Aptamer-Sequenzen nur einen sehr geringer Teil ausmachten (0 bis max. 20 %, s. auch Tabelle 11). Es zeigte sich ferner, dass bestimmte Artefakt-Sequenzen besonders häufig auftraten. Aus Zeit- und Kostengründen war es also unbedingt notwendig, die am häufigsten auftretenden Artefakte (s. Tabelle 14) im Vorfeld auszusondern.

Hierzu wurde zwecks Vorselektion die sogenannte „Artefakt-*Colony*-PCR“ etabliert. In dieser PCR wurden artefaktspezifische Primer verwendet, die für die häufigsten auftretenden Artefakte bestimmt wurden (s. auch Tabelle 3). Diese Artefakte, Art_1 – Art_4 für Pep1274, sowie Art_A und Art_C für Pep1170, sind in Tabelle 14 blau unterlegt. Diejenigen Klone, die bei der Artefakt-*Colony*-PCR ein Amplifikationsprodukt lieferten (s. Abbildung 19), wurden verworfen und nicht mehr sequenziert. Damit konnte die Zahl der notwendigen Sequenzierreaktionen deutlich reduziert und der Anteil an spezifischen Aptamer-Sequenzen bei der anschließenden Auswertung erhöht werden (siehe hierzu auch Tabelle 13).

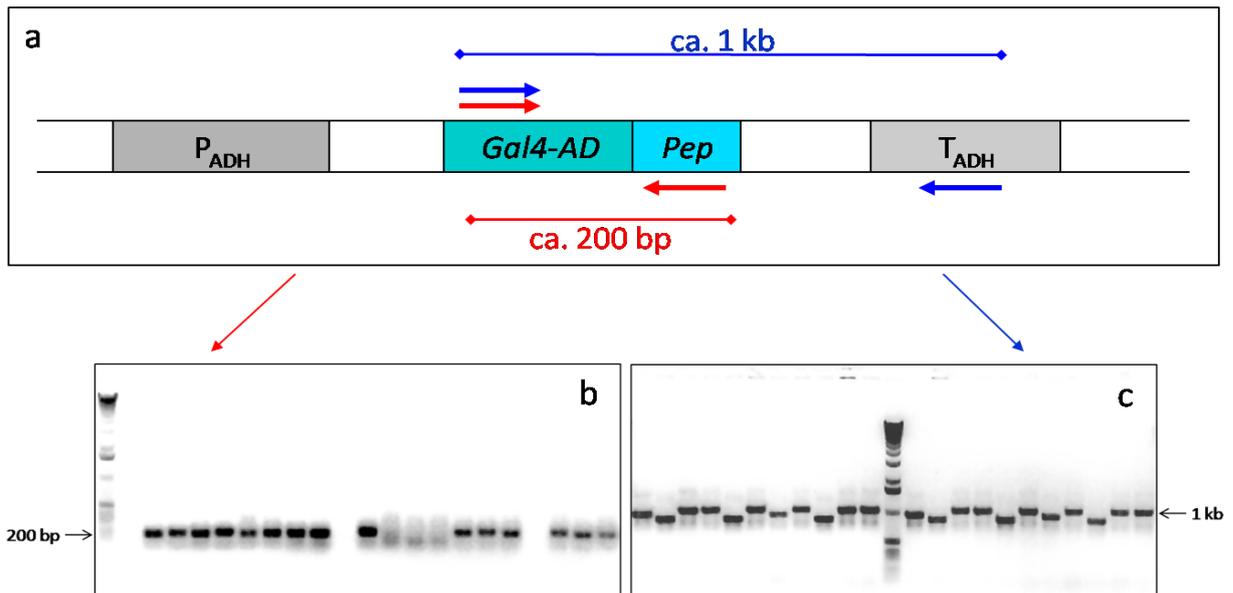


Abbildung 19: Nachweis der *Colony*-PCR-Produkte bei der Artefakt-*Colony*-PCR (b) und bei der anschließenden *Colony*-PCR zum Erhalt von Fragmenten für die Sequenzierung (c). In (a) wird anhand eines Ausschnittes aus dem *Pep1274-Library*-Plasmid die Entstehung der jeweiligen PCR-Produkte erläutert. Als *Forward*-Primer wurde in beiden Fällen *P-AD5xxl* verwendet. Als *Reverse*-Primer kamen bei der Artefakt-*Colony*-PCR (b) die artefaktspezifischen Primer *P-Art_1 – P-Art_4* (in (a) rot markiert) zum Einsatz, so dass Hefeklone, die eines dieser Artefakte enthalten, über ein ca. 200 bp großes PCR-Produkt identifiziert werden können. In (c) wurde der universelle *Reverse*-Primer *AD3xl* verwendet (in (a) blau markiert), so dass ein 1 kb großes Fragment für die Sequenzierung erhalten wurde. Die Ergebnisse stammen aus einem *Screening* der EC mit der *Pep1274-Library*.

Die in Abbildung 19 gezeigten Ergebnisse belegen die Tragfähigkeit dieses experimentellen Ansatzes. Artefakt-haltige Hefeklone konnten anhand eines 200 bp großen Produktes in der Artefakt-*Colony*-PCR eindeutig identifiziert und ausgesondert werden (Abbildung 19 b). Verbliebene Artefakt-freie Klone wurden einer weiteren *Colony*-PCR unterzogen, in der ein ca. 1 kb großes DNA-Fragment generiert wurde (Abbildung 19 c), welches via Sequenzierung hinsichtlich der enthaltenen Aptamer-Nukleotidsequenz analysiert wurde.

Tabelle 13: Gezeigt ist die Anzahl (N) der Artefakte (unterschiedliche Sequenzen), die in den beiden verwendeten Peptid-*Libraries* bislang identifiziert wurden. Die „Häufigkeit des Auftretens“ beschreibt, welcher Anteil der Klone, die in allen *Screenings* mit der jeweiligen *Library* erhalten wurde, Artefakte enthielt (ermittelt durch Artefakt-*Colony*-PCR und Sequenzierung). In der letzten Spalte ist gezeigt, wie viele Artefakt-enthaltende Klone aufgrund eines erhaltenen PCR-Produktes bei der Artefakt-*Colony*-PCR ausgeschlossen werden konnten.

| Library | N (Artefakte) | Häufigkeit des Auftretens insgesamt [%] | Durch Art.-Col.-PCR identifizierte Artefakte [%] |
|---------|---------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Pep1170 | 7 | 97,8 | 90,7 |
| Pep1274 | 19 | 79,9 | 70,8 |

Die in Tabelle 13 angegebenen Werte zur „Häufigkeit des Auftretens insgesamt [%]“ geben wieder, wie häufig alle identifizierten Artefakte (s. Tabelle 14) in den gesamten *Y2H-Screenings* mit den *Baits* EC, PSY und BH2 und der entsprechenden *Library* aufgetreten sind. Hinzu kommen noch diejenigen Klone, die eines der übrigen Artefakte aus Tabelle 14 enthielten und erst bei der anschließenden Sequenzierung der laut Artefakt-*Colony*-PCR negativen Klone ermittelt wurden. Für diese Artefakte,

die deutlich seltener vorkamen als Art_1 – 4 und Art_A und C, wurde aufgrund des vergleichsweise seltenen Auftretens (s. Tabelle 14) auf eine Vorselektion verzichtet, nicht zuletzt, da jeder zusätzliche Artefakt-Primer die Erfolgsquote einer Multiplex-PCR (um die es sich bei der Artefakt-Colony-PCR handelt) senkt.

Tabelle 14: Detaillierte Auflistung aller Artefakt-Aminosäuresequenzen und deren Länge in AS. Blau unterlegt sind diejenigen Peptide, die via Colony-PCR vorselektiert werden. Die „Häufigkeit des Auftretens“ beschreibt, wie oft das jeweilige Artefakt bei allen Sequenzierungen aufgetreten ist (prozentualer Anteil an allen in den Sequenzierungen aufgetretenen Artefakten). Berücksichtigt wurden in dieser Statistik ausschließlich die Screenings mit den drei Zielenzymen EC, BH2 und PSY. Art_F ist zwar in der Liste aufgeführt, jedoch ist die Häufigkeit null, da das Artefakt bei den drei Zielenzymen nicht vorkam, jedoch einige Male bei anderen Baits auftrat. Dasselbe gilt für Art_8 und Art_19.

| Artefakt | Aminosäuresequenz | L [AS] | Häufigkeit des Auftretens [%] |
|----------------|-------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------|
| Pep1170 | | | |
| Art_A | GRRSCWGWFGYLF | 14 | 49,2 |
| Art_B | MRQSRKRCMLYLLVMECFI | 20 | 6,2 |
| Art_C | RRLGHVRFRRQILMCLGHLLALEGHGGAQGRDRATPTAR | 39 | 35,6 |
| Art_D | SRLKVRVSVSCLGLLQAAM | 20 | 1,6 |
| Art_E | GYQRNRRLRMCKLLLLWGVH | 20 | 1,0 |
| Art_F | HGPHAPEDGEAQHRHDAVP | 20 | 0 |
| Art_G | HARYALAWL | 9 | 6,4 |
| Pep1274 | | | |
| Art_1 | LSVMGLIWSGLL | 12 | 22,5 |
| Art_2 | SWKGRERAWKMWLVRM | 16 | 13,1 |
| Art_3 | SSGRGLTTQGWLAYSS | 16 | 10,3 |
| Art_4 | EYYLGSGERLVWALF | 16 | 2,9 |
| Art_5 | RSMWHFGMGLMSRSVW | 16 | 7,0 |
| Art_6 | MIMWVLYGLQKGLRYA | 16 | 1,4 |
| Art_7 | HGVNRLWCMAGGGVIG | 16 | 3,8 |
| Art_8 | GWVGGPRLALAFF | 13 | 0 |
| Art_9 | SSRRRGPRVWGLMMIL | 16 | 11,3 |
| Art_10 | MWRLGMRVCHRWHYPYW | 16 | 4,8 |
| Art_11 | GVWTAWAVVWRCV | 13 | 0,9 |
| Art_12 | HLLARMGSSGYMW | 13 | 1,9 |
| Art_13 | CWAQGGFSSRHVFTWV | 16 | 2,3 |
| Art_14 | GQRGFKFTGWLGYLAY | 16 | 3,8 |
| Art_15 | ISLTKMWALASRNM | 14 | 2,3 |
| Art_16 | RCRLSGRFVHQLGG | 16 | 1,9 |
| Art_17 | ALPLRWLGGVRRWRSGCRNSISLSPSTSRGGPVPNSPYSES YNSLAVVYNNVTGKTLIYES | 63 | 7,5 |
| Art_18 | WLWLIVLGGCLRRRLRCRNSISLSPSTSRGGPVPNSPYSES SLAVVYNNVTGKTLIYES | 63 | 2,3 |
| Art_19 | RYTLIWL | 7 | 0 |

Trotz Vorselektion mit den spezifischen Artefakt-Primern traten bei der Sequenzierung auch noch einige Artefakt-Sequenzen für Art_1 – Art_4 sowie Art_A und Art_C auf, die in der Artefakt-Colony-PCR kein PCR-Produkt lieferten. In diesen Fällen hatte die vorangehende PCR aus technischen Gründen nicht funktioniert.

Festzuhalten ist: Wenn auch nicht alle Artefakte ausgeschlossen und die am häufigste vorkommenden in der Vorselektion nicht zu 100 % ausgesondert werden konnten, war die Artefakt-*Colony*-PCR ein essentielles Werkzeug, um für die hier verwendeten *Baits* überhaupt Aptamere identifizieren zu können. Der Artefakt-Anteil konnte dadurch signifikant minimiert werden, wodurch eine Anreicherung der echten Aptamere für die Sequenzierung erreicht wurde. Die Zahl der Klone, die zur Sequenzierung gegeben wurden, konnte auf diese Weise deutlich reduziert werden, was nicht nur zu einer deutlichen Senkung der Kosten (für die Sequenzierungs-Reaktionen), sondern auch des Arbeitsaufwandes (insbesondere für die Auswertung der Sequenzen) führte.

Es wurde nicht beobachtet, dass diejenigen Artefakte, die der einen *Library* zugeordnet sind, in einem *Screenings* mit der anderen *Library* auftraten. Die Artefakte Art_1 – Art_4 treten ausschließlich in der Pep1274-*Library* auf, während Art_A – Art_G spezifisch für Pep1170 sind.

2.3 Bestätigung der Interaktionen in *S. cerevisiae*

Eine Bestätigung der im *Y2H-Screening* gefundenen Interaktionen der Aptamere mit dem entsprechenden *Bait* erfolgte über *Gap-Repair-Cloning* in *S. cerevisiae*. Die mittels PCR amplifizierte kodierende Region des zu verifizierenden Aptamers (*Prey*) wurde hierbei über homologe *in vivo*-Rekombination in den *Prey*-Vektor pACT2 integriert, wobei am N-Terminus eine Fusion mit der *Gal4*-AD erfolgte. Die *Gal4*-AD-*Bait*- und *Gal4*-AD-*Prey*-Fusionsproteine wurden in Hefezellen koexprimiert. Alle in Tabelle 12 aufgelisteten Aptamere sind im *Gap-Repair*-Experiment unter selektiven Bedingungen (Selektion auf Interaktion) gewachsen. Die Negativ-Kontrolle (Kotransformation mit linearisiertem pACT2 ohne PCR-Produkt) zeigte wie erwartet kein Wachstum. Die gefundenen Protein-Interaktionen konnten somit eindeutig bestätigt werden.

3 Verifizierung bioaktiver Aptamere in *E. coli*

Das Ziel der Arbeit war es, Peptid-Aptamere zu finden, die nicht nur mit dem jeweiligen Zielenzym interagieren, sondern zudem deren Aktivität modifizieren (bioaktive Aptamere). Nachdem die Aktivitäten der drei Zielenzyme in *E. coli* nachgewiesen worden sind (s. 1.2), wurden die in den *Y2H-Screenings* gefundenen Aptamere (2.2) zusätzlich zum *Bait* koexprimiert und hinsichtlich ihrer bioaktiven Eigenschaften untersucht. Falls ein koexprimiertes Aptamer die Aktivität des Zielenzym beeinflusste, würde sich folglich der bakterielle Carotinoid-Stoffwechsel ändern, was zu einer Verschiebung der relativen Carotinoid-Gehalte im HPLC-Chromatogramm führen würde. Der bakterielle Assay ermöglichte eine simple und zuverlässige Methode, eine große Anzahl an Aptameren in relativ kurzer Zeit zu untersuchen. In Pflanzen wäre das Verifizieren aller gefundenen Aptamere deutlich aufwendiger und zeitintensiver.

Die als CFP-Fusionsproteine exprimierten Aptamere wurden zuerst über ein drittes Plasmid in *E. coli* eingebracht, so dass der Funktionalitätsassay mit dreifach transgenen Bakterien durchgeführt wurde. Die Zellen enthielten folglich pAC-BETAipi (Abbildung 5), außerdem das pGJ2720-Plasmid zur Expression des Zielenzym (Abbildung 4) und zusätzlich ein drittes Plasmid, auf dem das CFP-Aptamer-Fusionsprotein kodiert war. Erste Experimente zeigten, dass der Funktionalitätsassay so nicht aussagekräftig war, da die Transformation der Bakterien mit dem dritten Plasmid generell zu einer deutlichen Farbänderung der Bakterienkolonien in Richtung Orange führte. Dieser Effekt war unspezifisch, da er unabhängig von der klonierten Aptamersequenz auftrat. Auf diesem Weg wäre es also nicht möglich gewesen, eine spezifische Beeinflussung der Enzymaktivität durch ein Aptamer nachzuweisen.

Der endgültige bakterielle Aptamer-Assay wurde schließlich auf einem 2-Plasmid-System aufgebaut, bei dem Zielenzym und zu testendes Aptamer als CFP-Fusion auf einem einzigen Plasmid liegen. Die Expression von Zielenzym und Aptamer erfolgte hierbei polycistronisch. Zum Nachweis der Funktionalität des etablierten Expressionsvektorsystems wurden zunächst Untersuchungen mithilfe eines fluoreszierenden Reporterproteins durchgeführt. In der Folge wurden die so charakterisierten Basis-Expressionsvektoren für eine schnelle und effiziente Klonierung der Aptamere via LIC (s. III2.1.11) präpariert. Über HPLC-Analysen wurden Carotinoid-Extrakte der transgenen Aptamer-exprimierenden Bakterien mit der entsprechenden Negativ-Kontrolle (Bakterien, die kein Aptamer exprimieren) verglichen und die Chromatogramme hinsichtlich einer Veränderung des Carotinoid-Profiles ausgewertet. Auf diese Weise konnten Rückschlüsse auf eine funktionelle Beeinflussung des Enzyms durch das jeweilige Aptamer gezogen werden.

3.1 Etablierung eines polycistronischen Expressionssystems in *E. coli*

3.1.1 Klonierung der Expressionsvektoren

Als Grundlage für die Generierung der Basiskonstrukte zur polycistronischen Expression von Zielenzym und Aptamer in *E. coli* diente das Plasmid pGJ2720-ECdel (s. Abbildung 20 a). Nachdem via zielgerichteter Mutagenese passende Schnittstellen generiert wurden, konnte hinter das *ECdel*-Gen das Reportergen *RFP* bzw. *CFP* kloniert werden (Abbildung 20 b und c).

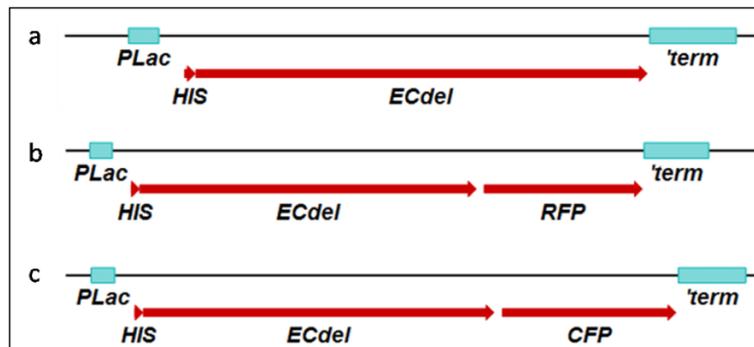


Abbildung 20: Klonierungen zur Etablierung der polycistronischen Expression zweier Gene in *E. coli* am Beispiel des Zielenzym *ECdel*, Ausschnitte aus den Plasmiden. (a) Plasmid pGJ2720-ECdel für die alleinige Expression der *ECdel*, welches für den *in vivo*-Nachweis der Enzymaktivität in *E. coli* (s. 1.2) verwendet wurde. (b) In pGJ2720-ECdel_RFP wurde hinter das *ECdel*-Gen das Reportergen *RFP* kloniert, um die polycistronische Expression über rotes Fluoreszenzlicht nachzuweisen. (c) pGJ2720-ECdel_CFP wurde analog zu (b) kloniert, wobei das *CFP* zum einen als zweiter Reporter und zum anderen als Aptamer-Fusionsprotein diente.

Das Basiskonstrukt pGJ2720-ECdel (Abbildung 20 a) diente in den Expressionsexperimenten als Negativ-Kontrolle. Die beiden Reporterkonstrukte (Abbildung 20 b und c) besaßen einen *lac*-Promotor, der die Expression sowohl des *ECdel*- als auch des Reportergens steuerte, sowie einen T7-Terminator. Es wurden zwei verschiedene Reportergene gewählt, um sicherzustellen, dass die polycistronische Expression unabhängig von der klonierten cDNA erfolgte. *CFP* sollte außerdem, in Analogie zu den Hefeexperimenten, als Fusions- bzw. Trägerprotein für die Aptamere dienen. *RFP* war aufgrund seiner rötlichen Färbung bei VIS-Licht nicht geeignet, da die Farbe der transgenen Bakterienkolonien im *Color-Complementation*-Assay durch das Protein für die Aptamer-Fusion nicht verfälscht werden sollte. Anderenfalls hätte eine eventuelle Farbänderung der Carotinoidproduzierenden Bakterien aufgrund eines funktionellen Aptamer-Effekts optisch nicht detektiert werden können. *CFP* hingegen war bei Tageslicht farblos, so dass der *Color-Complementation*-Assay durch das Protein nicht gestört wurde.

Die Integration der Reportergene erfolgte mittels Ligations-unabhängiger Klonierung, die auf homologer Rekombination in *E. coli* basierte. Mithilfe der überhängenden Enden des Inserts wurde eine zweite *SD* (*shine dalgarno*)-Sequenz eingefügt, die der Translation des polycistronisch exprimierten Reportergens diente (s. Abbildung 21).

```

AAA GTA TGA GGA TCT GGC TTA CTA AAA GCC CAG GAG GTA ACA GCA TGG CCT CG
                                     SD
>..ECdel.>>                                     >>..RFP....>
  k   v   -                                         m   a   s

```

Abbildung 21: Ausschnitt aus dem Reporterkonstrukt pGJ2720-ECdel_RFP für die polycistronische Expression in *E. coli*. Dargestellt ist das Ende der *ECdel*-cDNA und der Anfang des *RFP*-Gens (beide grün hervorgehoben), sowie der Bereich dazwischen, der die SD-Sequenz für die *RFP*-Translation enthält (gelb unterlegt).

Die Konstrukte für die bakterielle polycistronische Expression wurden so konstruiert, dass sich ca. 22 nt hinter dem Stoppkodon des ersten Gens die SD-Sequenz für das dahinter liegende Gen befindet (s. Abbildung 21). Die SD-Sequenz sollte etwa 7 nt vor dem zugehörigen Gen liegen und mindestens vier zusammenhängende Basen der Konsensus-Sequenz AGGAGG beinhalten (Lewin, 1997).

3.1.2 *in vivo*-Nachweis der polycistronischen Expression in *E. coli*

Für die experimentelle Überprüfung der klonierten Basiskonstrukte (IV3.1.1) wurden zwei verschiedene Reporter-genkonstrukte verwendet, um mögliche Einflüsse unterschiedlicher cDNAs auf die polycistronische Expression abschätzen zu können. Zudem sollte CFP, in Analogie zum Aufbau der Hefeexpressionsvektoren für das Aptamer-Screening, als Fusions- bzw. Trägerprotein für die Aptamere dienen. RFP war aufgrund seiner auch bei Tageslicht sichtbaren rötlichen Färbung als Trägerprotein nicht geeignet, da die Farbe der transgenen Bakterienkolonien im *Color-Complementation*-Assay durch das Aptamer-Trägerprotein verfälscht und demzufolge eventuelle Farbänderungen der Carotinoid-produzierenden Bakterien aufgrund eines funktionellen Aptamer-Effekts überlagert würden. CFP hingegen ist bei Tageslicht nicht sichtbar, so dass die Detektion von Aptamer-bedingten Effekten im *Color-Complementation*-Assay durch das Protein nicht gestört wurde.

Zunächst wurde die polycistronische Expression von *ECdel* und *RFP* überprüft. Hierzu wurde das Konstrukt pGJ2720-ECdel_RFP in *E. coli* TOP10 transformiert. Als Negativ-Kontrolle dienten Zellen, die pGJ2720-ECdel enthielten. Nach Inkubation ÜN bei 37 °C wurden die transgenen Bakterienkolonien fluoreszenzmikroskopisch untersucht (s. Abbildung 22).

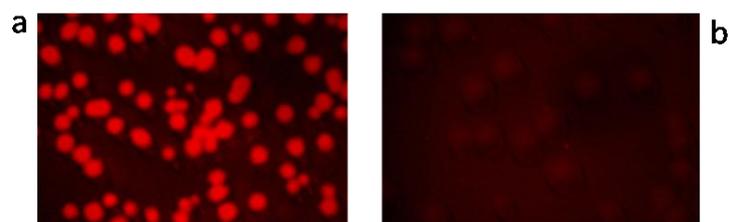


Abbildung 22: Polycistronische Expression des Reportergens RFP in *E. coli* TOP10, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. (a) *E. coli* TOP10 pGJ2720-ECdel_RFP (Konstrukt aus Abbildung 20 b). (b) Negativ-Kontrolle *E. coli* TOP10 pGJ2720-ECdel (Abbildung 20 a).

In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten die Kontroll-Bakterien (pGJ2720-ECdel) erwartungsgemäß keine (Abbildung 22 b). Im Gegensatz dazu war beim transformierten Stamm *E. coli* TOP10 pGJ2720-ECdel_RFP eine intensive RFP-Fluoreszenz zu detektieren (Abbildung 22 a). Die polycistronische Expression des RFP in *E. coli* war damit eindeutig nachgewiesen und belegte die Funktionalität des erzeugten Basisvektors zur polycistronischen Expression rekombinanter Proteine. In analoger Weise erfolgte der Nachweis der polycistronischen Expression von CFP (Abbildung 23). Allerdings wurde das Konstrukt pGJ2720-ECdel_CFP außer in *E. coli* TOP10 auch in *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi ausgeprägt, da diese als Zielzellen für den anschließenden Aptamer-Funktionalitätsassay dienten.

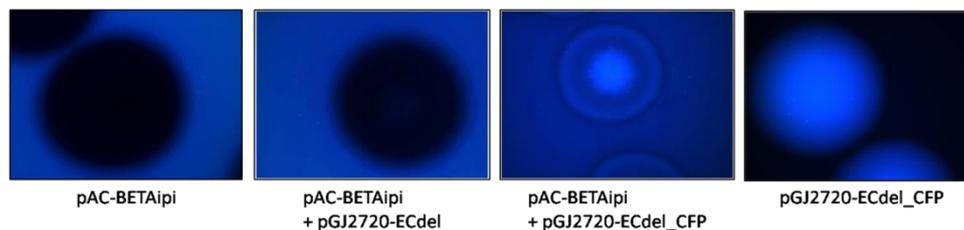


Abbildung 23: Polycistronische Expression von CFP in Bakterien, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Die abgebildeten Kolonien der transgenen *E. coli*-Bakterien enthielten die jeweiligen Plasmide entsprechend den Beschriftungen unter den Bildern. Die Belichtungszeit betrug 800 ms bei *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP (3. Bild von links), in den anderen Fällen 130 ms.

E. coli TOP10, die mit dem Reporterkonstrukt pGJ2720-ECdel_CFP transformiert wurden, zeigten in der Fluoreszenzmikroskopie intensive CFP-Fluoreszenz (Abbildung 23, 1.v.r.), was die erfolgreiche CFP-Expression nachwies. Zusammen mit dem RFP-Experiment zeigte dies, dass die polycistronischen Konstrukte unabhängig von der verwendeten cDNA funktional waren, was aufgrund der anschließenden Aptamer-Klonierungen in translationaler Fusion mit CFP essentiell war. In Carotinoidproduzierenden *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP wurde ebenfalls eine eindeutige, aber erheblich schwächere CFP-Fluoreszenz detektierbar (Abbildung 23, 1.v.r.). Auffällig war, dass die blaue Fluoreszenz hier nicht gleichmäßig über die Kolonie verteilt war, wie bei *E. coli* TOP10, sondern eher in der Mitte der Bakterienkolonie zentriert war, während sich zum Rand hin ein dunklerer Kranz ausbreitete. Die Kolonien der Negativ-Kontrollen *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi und *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP (Abbildung 23, 1. + 2.v.l.) erschienen im CFP-Kanal schwarz, während der Hintergrund (LB-Agar-Medium) aufgrund der bei diesen Aufnahmen verwendeten langen Belichtungszeiten intensiv blau erschien. Dies wies auf eine starke Lichtabsorption der Kolonien hin, die vermutlich auf die akkumulierten Carotinoide zurückzuführen war.

Zu den wesentlichen Voraussetzungen für eine makroskopische Auswertung des *Color-Complementation*-Assay bei Tageslicht zählt, dass die Koloniefärbung durch die polycistronische CFP-Expression nicht beeinflusst bzw. gestört wird. Dies wurde experimentell überprüft (Abbildung 24).

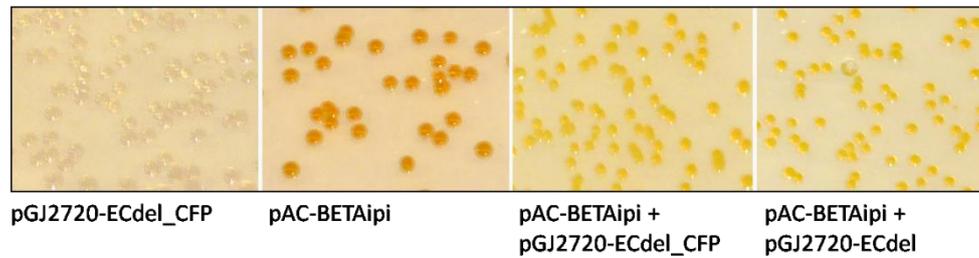


Abbildung 24: Bakterieller *Color-Complementation-Assay* zur Überprüfung der Koloniefärbung bei polycistronischer Expression von ECdel und CFP. Abgebildet sind Kolonien transgener *E. coli* TOP10, die jeweils der Beschriftung unter den Bildern entsprechende Plasmide enthielten.

Zur Überprüfung des Einflusses polycistronischer CFP-Expression auf die Farbe transgener Carotinoidproduzierender Bakterienkolonien im *Color-Complementation-Assay* wurden die Stämme *E. coli* TOP10-pAC-BETAipi/pGJ2720-ECdel_CFP und *E. coli* TOP10-pGJ2720-ECdel erzeugt und die Koloniefärbungen analysiert. Wie Abbildung 24 zeigt, wies die Kolonien der ECdel/CFP-exprimierenden Zellen dieselbe gelb-orangene Färbung auf wie bei alleiniger ECdel-Koexpression. CFP führte weder aufgrund der eigenen Färbung, noch durch indirekte Beeinflussung des bakteriellen Carotinoid-Stoffwechsels zu einer sichtbaren Änderung der Koloniefärbung. *E. coli* TOP10, die ausschließlich das CFP-Reporterkonstrukt enthielten, waren wie erwartet farblos, da sie keine Carotinoide akkumulierten.

In weiteren Experimenten wurden mögliche qualitative Änderungen der verschiedenen (durch die Zielenzyme hervorgebrachten) Carotinoid-Profile durch die polycistronische CFP-Expression näher analysiert. Damit wurden die notwendigen Grundlagen für die später erfolgende Prüfung von zielproteinspezifischen Aptameren in diesem System geschaffen, da die Maskierung ihrer Enzym-modifizierenden Eigenschaften ausgeschlossen werden konnte. In Abbildung 25 sind die HPLC-Chromatogramme zur alleinigen ECdel-Expression in *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi im Vergleich zur polycistronischen Expression von ECdel und CFP in denselben Zellen gezeigt. Für die Experimente wurden die Kulturvolumina auf gleiche Zellzahlen abgeglichen, so dass die Ergebnisse die Stoffwechselvorgänge innerhalb einer Zelle widerspiegeln.

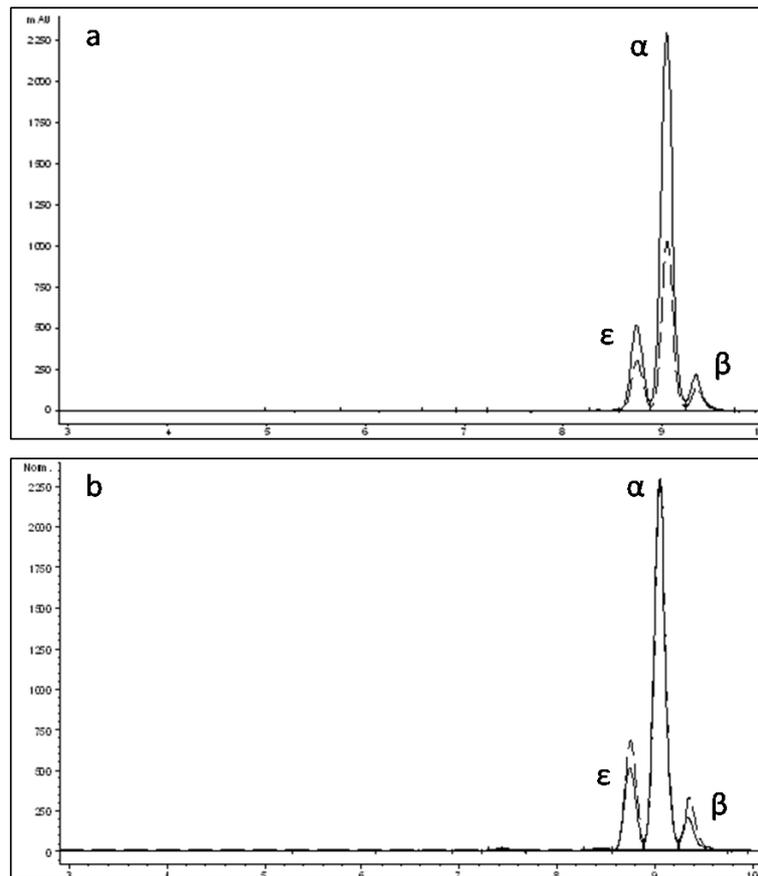


Abbildung 25: HPLC-Messungen zur Veränderung des Carotinoid-Profiles für die ECdel aufgrund polycistronischer Koexpression von CFP. Gezeigt sind Vergleichs-Chromatogramme des Carotinoid-Extrakts aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP (gestrichelte Linie) vs. *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel (Kontrolle, durchgezogene Linie). (a) zeigt den direkten Vergleich der HPLC-Chromatogramme, in (b) wurden die beiden Chromatogramme am höchsten Peak ausgerichtet bzw. angeglichen. ϵ , α und β stehen für die Carotinoid-Peaks der Reaktionsprodukte ϵ -, α - und β -Carotin.

Beim Vergleich der Carotinoid-Profile für ECdel- und ECdel-/CFP-Expression fällt auf, dass die Bakterien im Falle der polycistronischen Expression 106 % (\pm 4%) mehr Gesamt-Carotinoid (ϵ -, α - und β -Carotin) produzierten (Abbildung 25 a). ϵ - und β -Carotin-Gehalte änderten sich hierbei relativ gesehen stärker als die α -Carotin-Menge (Abbildung 25 b). Zur quantitativen Analyse der Carotinoid-Verhältnisse, basierend auf den Peak-Flächen, s. Tabelle 15.

Aus den durchgeführten HPLC-Messungen geht hervor, dass sich bei ECdel-Koexpression in *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi aufgrund des Zusammenwirkens von ECdel und BC (Lycopene- β -Cyclase) am Ende des Carotinoid-Stoffwechsels ein Gleichgewicht aus den drei Carotinoiden α -, β - und ϵ -Carotin einstellte. Um die Aktivitäten von *A. thaliana* ECdel und *E. herbicola* BC zu erfassen und zu relativieren, wurde die Fläche jedes einzelnen der drei Carotinoid-Peaks in Verhältnis zum Gesamt-Carotinoidgehalt gesetzt, der sich aus der Summe aller drei Peak-Flächen von α -, β - und ϵ -Carotin zusammensetzte (Tabelle 15). Da ϵ -Carotin ausschließlich mithilfe der EC gebildet wird, während an der Synthese von β -Carotin allein die BC beteiligt ist, spiegelte das Verhältnis der ϵ -Carotin- bzw. der β -Carotin-Peak-Fläche zum Gesamt-Carotinoidgehalt den relative Beitrag des jeweils katalysierenden Enzyms im bakteriellen Stoffwechselsystem wider. Durch Berechnung des

Verhältnisses von β - zu ε -Carotin-Menge konnten so die relativen Aktivitäten von ECdel und BC direkt in Verhältnis zueinander gesetzt werden. Der Begriff „Aktivität“ wird an dieser Stelle ohne Berücksichtigung der Mengen, in denen die beiden Enzyme in der Zelle vorliegen, verwendet.

Tabelle 15: Veränderung des bakteriellen Carotinoid-Profiles durch polycistronischer CFP-Expression für das Zielenzym ECdel. Aufgeführt sind die Carotinoid-Verhältnisse im Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel (hier als Kontrolle) sowie für *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP. In Zeile 3 sind die prozentualen Veränderungen der Carotinoid-Verhältnisse durch die polycistronische CFP-Expression im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Berechnungen erfolgten über die Flächen der entsprechenden Carotinoid-Peaks im HPLC-Chromatogramm (s. Abbildung 14). Die angegebenen Zahlen sind die Mittelwerte aus insgesamt sechs Experimenten, die absoluten mittleren Abweichungen sind ebenfalls angegeben.

| | ε -Carotin/ $\Sigma \alpha-, \beta-, \varepsilon$ -Carotin | α -Carotin/ $\Sigma \alpha-, \beta-, \varepsilon$ -Carotin | β -Carotin/ $\Sigma \alpha-, \beta-, \varepsilon$ -Carotin | β/ε |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| ECdel | 0,20 \pm 0,02 | 0,70 \pm 0,02 | 0,102 \pm 0,006 | 0,51 \pm 0,03 |
| ECdel/CFP | 0,17 \pm 0,03 | 0,76 \pm 0,03 | 0,075 \pm 0,006 | 0,45 \pm 0,04 |
| ECdel/CFP vs. ECdel | - 16 % | + 8 % | - 27 % | - 13 % |

In Tabelle 15 sind die relativen ε -, α - und β -Carotin-Mengen, sowie das Verhältnis von β - zu ε -Carotin für die Carotinoid-Extrakte aus *E. coli* TOP10-pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel (Kontrolle) und *E. coli* TOP10-pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP basierend auf den HPLC-Chromatogrammen (s. hierzu Abbildung 25) dargestellt. *E. coli* TOP10-pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel (Tabelle 15, Zeile 1) produzierten 20 % ε - und 10 % β -Carotin, während α -Carotin, welches sowohl von ECdel als auch von BC synthetisiert wurde, mit ca. 70 % den mit Abstand größten Carotinoid-Anteil ausmachte. Diese Werte ließen darauf schließen, dass die pflanzliche ECdel im vorliegenden System „aktiver“ war als die *E. herbicola* BC. Für *E. coli* TOP10-pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP stieg nicht nur die Gesamtcarotinoid-Menge (Abbildung 25), auch die relativen Anteile der Komponenten verschoben sich leicht. Die größten Differenzen ergeben sich für die β - und ε -Carotin-Gehalte, die um 27 % bzw. 16 % sanken. Demzufolge war beim β/ε -Wert eine Abnahme um 13 % zu verzeichnen (Tabelle 15, Ergebniszeile). Insgesamt ließ dies darauf schließen, dass der dominante Effekt der ECdel im bakteriellen Carotinoid-System durch die polycistronische CFP-Expression leicht verstärkt wurde. Als Negativ-Kontrolle für die anschließenden Aptamer-Funktionalitätsassays diente demzufolge das Konstrukt pGJ2720-ECdel_CFP.

Analog zur ECdel wurde auch der Einfluss der polycistronischen CFP-Expression auf das BH2del-basierte Carotinoid-Profil überprüft (Abbildung 26). Hierzu wurde der Carotinoid-Extrakt aus Bakterien, die BH2del und CFP polycistronisch exprimieren, via HPLC analysiert und mit dem Kontroll-Chromatogramm (alleinige BH2del-Expression in Carotinoid-produzierenden *E. coli*) verglichen.

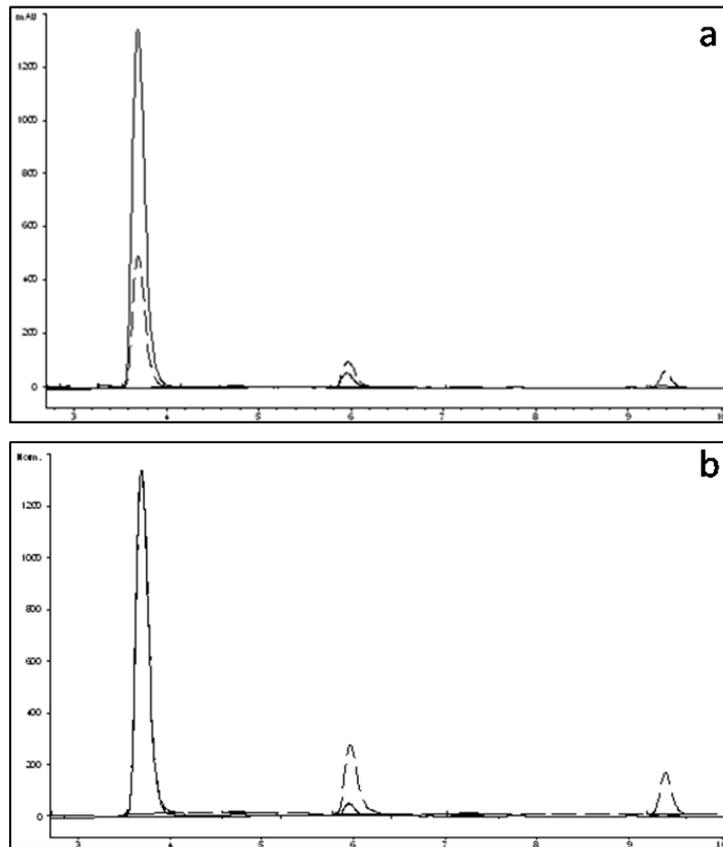


Abbildung 26: HPLC-Messungen zur Veränderung des Carotinoid-Profiles der BH2del aufgrund polycistronischer Koexpression von CFP. Gezeigt sind Vergleichs-Chromatogramme des Carotinoid-Extrakts aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-BH2del_CFP (durchgezogene Linie) vs. *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-BH2del (Kontrolle, gestrichelte Linie). (a) zeigt den direkten Vergleich der HPLC-Chromatogramme, in (b) wurden die beiden Chromatogramme am höchsten Peak ausgerichtet bzw. angeglichen.

Aus Abbildung 26 a geht hervor, dass sich durch die polycistronische Expression von BH2del und CFP der zelluläre Gesamt-Carotinoidgehalt, wie auch bei der ECdel, im Vergleich zur Kontrolle stark erhöhte ($123 \% \pm 2 \%$). Der Zeaxanthin-Gehalt stieg im Falle der polycistronischen Expression deutlich an, während β -Carotin- und β -Cryptoxanthin-Menge zurückgingen. Im normierten Vergleichschromatogramm (Abbildung 26 b) wurde dieses Phänomen noch deutlicher.

Die quantitative Auswertung der erhaltenen Daten ist in Tabelle 16 wiedergegeben. Die BH2 katalysiert zwei Reaktionen: Zum einen die Umsetzung des Substrats β -Carotin zum Zwischenprodukt β -Cryptoxanthin, zum anderen dessen Umwandlung zum Endprodukt Zeaxanthin. Durch HPLC-basierte Mengen-Vergleiche von β -Carotin, β -Cryptoxanthin und Zeaxanthin (s. Abbildung 26) konnte man die beiden BH2-katalysierten Teilreaktionen zueinander in Verhältnis setzen, sowie die Gesamt-Umsatzrate des Enzyms berechnen. Weiterhin wurde über eine eventuelle Änderung dieser Werte geprüft, in wieweit die polycistronische Expression von BH2del und CFP den bakteriellen Carotinoid-Stoffwechsel beeinflusste.

Tabelle 16: Vergleich der Carotinoid-Verhältnisse bei alleiniger BH2del-Expression (Kontrolle), sowie polycistronischer Expression von BH2del und CFP in *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi. „Zeaxanthin/gesamt“ gibt den prozentualen Anteil von Zeaxanthin am Gesamt-Carotinoidgehalt (β -Carotin + β -Cryptoxanthin + Zeaxanthin) wieder. Dargestellt sind die Absolutwerte, sowie die prozentualen Veränderungen, also der Einfluss der polycistronischen CFP-Expression, analog zu Tabelle 15. Die Werte wurden über die Flächen der HPLC-Peaks berechnet (s. Abbildung 13), zur Auswertung wurden sieben Chromatogramme aus unabhängigen Experimenten herangezogen.

| | β -Cryptoxanthin/ β -Carotin | Zeaxanthin/gesamt [%] |
|--------------------------|------------------------------------------|-----------------------|
| BH2del | 6 \pm 1 | 78 \pm 2 |
| BH2del/CFP | 5 \pm 1 | 96 \pm 1 |
| BH2del/CFP vs. BH2del | - 9 % | + 23 % |

Es ist nicht bekannt, mit welcher Geschwindigkeit die beiden von der BH2 katalysierten Reaktionen ablaufen, was bedeutet, dass die erste und die zweite Teilreaktion unterschiedliche Umsatzraten aufweisen können ($U_1 \neq U_2$). Der in Tabelle 16, Spalte 2 berechnete Wert ist proportional zu U_1/U_2 , wobei U_1 : Umsatzrate der ersten Reaktion und U_2 : Umsatzrate der zweiten Reaktion. Aus den Berechnungen ging hervor, dass in *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-BH2del ca. sechsmal mehr β -Cryptoxanthin als β -Carotin vorlag. Durch polycistronische CFP-Expression änderte sich dieser Wert in Anbetracht der relativ großen mittleren Abweichung nicht signifikant (Tabelle 16, Ergebniszeile). Das Verhältnis von Zeaxanthin zum Gesamt-Carotinoidgehalt (β -Carotin- + β -Cryptoxanthin- + Zeaxanthin-Menge) wurde ebenfalls berechnet (Tabelle 16, Spalte 2). Es entsprach der Gesamtumsatzrate der enzymatischen Reaktion. Die Umwandlung von β -Carotin zum Endprodukt Zeaxanthin erfolgte bei alleiniger Expression der BH2del mit einer Umsatzrate von knapp 80 %. Bei polycistronischer Expression von CFP stieg die Umsatzrate auf ca. 96 % an (Tabelle 16, Ergebniszeile). Während die relativen Carotinoid-Gehalte durch die CFP-Koexpression nicht sehr stark verändert wurden, war jedoch ein starker Einfluss auf das Wachstum der transgenen Bakterien durch das polycistronische Expressionssystem zu beobachten (Abbildung 27). Mit *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi als Kontrolle wurde die Änderung der OD_{600} unter Einfluss von ECdel- bzw. BH2del-Koexpression, sowie jeweils bei zusätzlicher polycistronischer CFP-Expression erfasst.

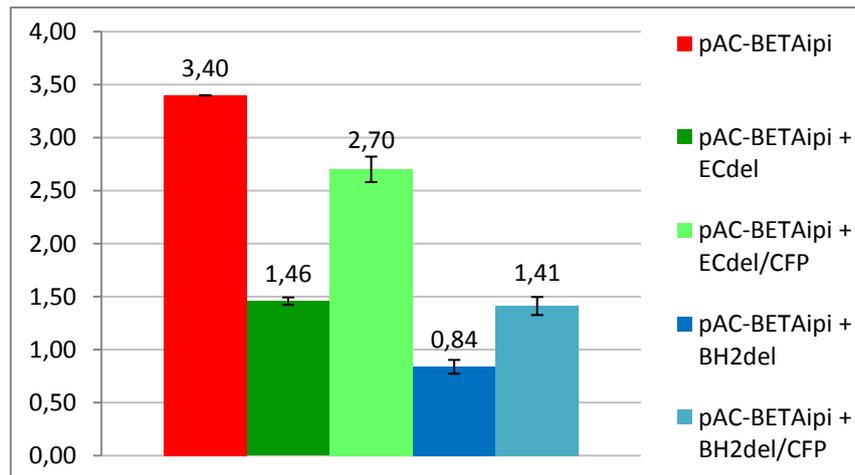


Abbildung 27: Änderung des Zellwachstums durch Koexpression der Zielenzyme ECdel und BH2del, sowie bei zusätzlicher polycistronischer CFP-Expression. Als Expressionsstamm dient *E. coli* TOP10, die enthaltenen Plasmide sind der Legende zu entnehmen. Dargestellt sind die OD₆₀₀-Werte der Kulturen bei der Zellernte nach 24-stündigem Wachstum bei 28 °C und 200 UpM im Dunkeln.

Wie in Abbildung 27 dargestellt, wurde durch Koexpression der Zielenzyme das bakterielle Zellwachstum stark reduziert (BH2del: - 75 %; ECdel: - 57 %). Bei Ausprägung der Konstrukte zur polycistronischen Expression kam es im Vergleich zur monocistronischen Zielenzym-Expression wiederum zu einem deutlichen Anstieg der bakteriellen Wachstumsraten. Auch hier fiel der Effekt im Falle der BH2del stärker aus (+ 85 %) als für die ECdel (+ 68 %). Trotz des Wachstums-verbessernden Effekts durch die polycistronische CFP-Expression lagen die OD₆₀₀-Werte jedoch immer noch deutlich unter der optischen Dichte von *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi.

3.2 Polycistronische Expression der Aptamere *in vivo*

3.2.1 Klonierung der Aptamere für bakterielle Expression

Nachdem die polycistronische Expression in Carotinoid-produzierenden *E. coli* erfolgreich etabliert worden ist, wurde das System für die Klonierung der Aptamere für den Funktionalitätsassay vorbereitet. Zur Vereinfachung der notwendigen, umfangreichen Klonierungsarbeiten wurden die Plasmide pGJ2720-ECdel_CFP und pGJ2720-BH2del_CFP zunächst durch Insertion des *ccdA/B*-Gens so modifiziert, dass sie die positive Selektion inserierter Aptamersequenzen erlaubten (III.2.5.2). Diese neuen Basiskonstrukte wurden in der Folge für die anstehenden Klonierungsarbeiten eingesetzt (Abbildung 28).

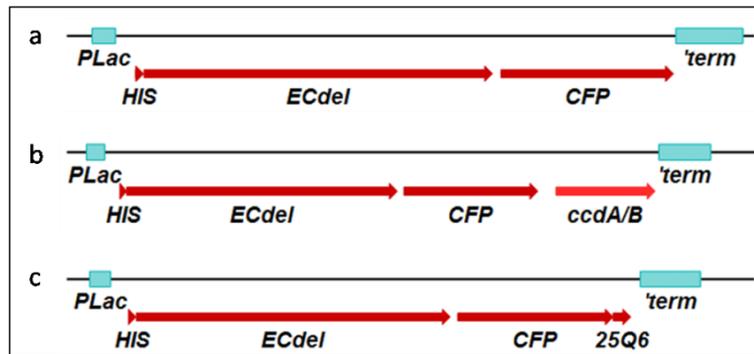


Abbildung 28: Klonierungen für die polycistronische Expression von Aptameren in *E. coli*. (a) pGJ2720-ECdel_CFP diente als Positiv-Kontrolle hinsichtlich der polycistronischen Expression und als Negativ-Kontrolle hinsichtlich eines durch ein Aptamer verursachten Effekts. (b) pGJ2720-ECdel_CFP_ccdA/B stellte das Basiskonstrukt für die doppelt selektive Hochdurchsatz-Klonierung der Aptamere für den Funktionalitäts-Assay dar. Das *ccdA/B*-Genprodukt war für die verwendeten *E. coli*-Stämme (TOP10 und XL1 blue) toxisch. (c) Bei der Aptamer-Klonierung wurde *ccdA/B* durch die Aptamer-Sequenz (in diesem Fall Aptamer 25Q6) ersetzt, so dass das Aptamer an den C-Terminus des CFP fusioniert wurde.

In Abbildung 28 ist die Klonierungsstrategie für die Aptamere anhand des Zielenzym ECdel demonstriert, für BH2del wurde analog vorgegangen. Ausgehend vom Reporterkonstrukt pGJ2720-ECdel_CFP (Abbildung 28 a) wurde hinter das *CFP*-Gen eine Expressionskassette mit dem *ccdA/B*-Gen zur Erhöhung der Selektivität in *E. coli* integriert. Das *ccdA/B*-Genprodukt ist für bestimmte *E. coli*-Stämme (z.B. TOP10 und XL1blue) toxisch (Bernard und Couturier, 1992), so dass diejenigen Klone, welche das modifizierte Plasmid pGJ2720-ECdel_CFPk (k für *kill*, Abbildung 28 b) enthielten, nicht überlebten (experimentell bestätigt, Daten nicht aufgeführt). Die Aptamer-Klonierung erfolgte mit pGJ2720-ECdel_CFPk als Basiskonstrukt via LIC. Abbildung 28 c zeigt als Beispiel eines fertigen Konstrukts für den Aptamer-Funktionalitätsassay das Plasmid pGJ2720-ECdel_CFP-25Q6, welches in *E. coli* die polycistronische Expression der ECdel, sowie des CFP-Aptamer-Fusionsproteins ermöglichte.

3.2.2 *in vivo*-Nachweis der polycistronisch exprimierten Aptamere

Der Nachweis der in *E. coli* polycistronisch ausgeprägten Aptamere erfolgt, analog zu den Reporterkonstrukten (s. IV3.1.2), über Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion des CFP-Aptamer-Fusionsproteins. Dies ist in Abbildung 29 beispielhaft anhand der vergleichenden Analyse der transgenen Stämme *E. coli* TOP10-pAC-BETAipi und *E. coli* TOP10-pGJ2720-ECdel_CFP-25Q6 dargestellt.

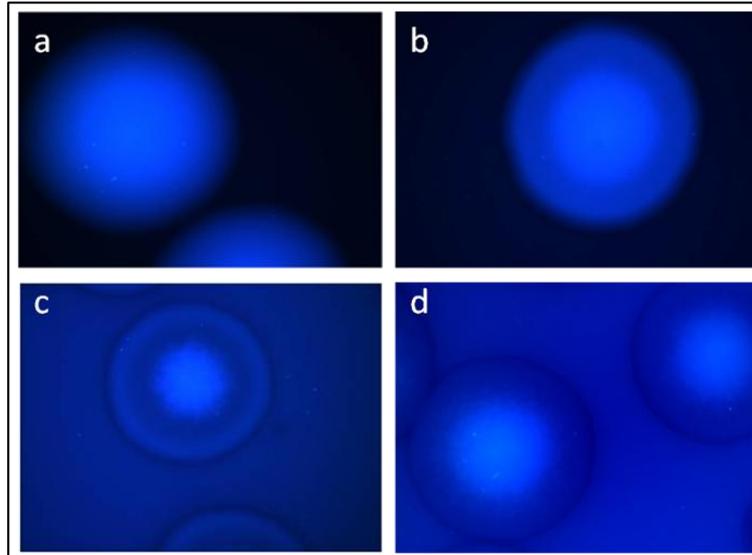


Abbildung 29: Polycistronische Expression von CFP und CFP-25Q6 in *E. coli*, jeweils mit und ohne pAC-BETAipi, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. (a) *E. coli* TOP10 pGJ2720-ECdel_CFP, Belichtungszeit 130 ms (b) *E. coli* TOP10 pGJ2720-ECdel_CFP-25Q6, 130 ms (c) *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP, 800 ms (d) *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP-25Q6, 1000 ms.

Bei Ausprägung des Kontroll- und des Aptamer-Konstrukts zeigte sich wiederum der bereits in IV3.1.2 (Abbildung 23) beobachtete, durch akkumulierende Carotinoide hervorgerufene Lichtabsorptionseffekt (Abbildung 29 c und d). Zellen, die keine Carotinoide produzierten (*E. coli* TOP10), erbrachten daher eine ca. zwölfmal stärkere CFP-Fluoreszenzausbeute (Abbildung 29 a und b). Die Vergleiche zeigten zudem, dass die Fluoreszenz bei alleiniger CFP Expression (Abbildung 29 a und c) mindestens fünf- bis sechsfach stärker war als bei dem CFP-25Q6-Fusionsprotein (Abbildung 29 b und d). Dies kann auf eine geringere Proteinsynthese, proteasomalen Abbau des Aptamer-Fusionsproteins oder auf einen *Quenching*-Effekt durch das am CFP-C-Terminus fusionierte Peptid hindeuten. Die Klärung dieser Fragestellung bedarf weiterer Experimente bezüglich Proteinmengen-Bestimmung. Das Phänomen der reduzierten Fluoreszenzausbeuten wurde bei allen CFP-Aptamer-Fusionsproteinen beobachtet (sowohl im Falle der BH2del als auch der ECdel), wenn auch, je nach Aptamer, in unterschiedlichem Maße (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 *in vitro*-Nachweis der polycistronischen Proteinexpression

Um die Ursachen für das schwächere Fluoreszenzsignal bei Koexpression des CFP-25Q6-Fusionsproteins im Vergleich zu CFP (siehe VI 3. 2) IV3.2.2) zu ermitteln, wurden Immunoblot-Analysen zur vergleichenden Proteinmengen-Bestimmung durchgeführt (Abbildung 30). Die CFP-Expression im Konstrukt pGJ2720-BH2del_CFP wurde ebenfalls untersucht. Als Negativkontrollen wurden Zelllysate aus *E. coli* TOP10-pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel und -BH2del verwendet. Gereinigtes HIS-GFP-Fusionsprotein diente als Positivkontrolle, da der verwendete Zweitantikörper sowohl GFP als auch CFP aufgrund ihrer fast identischen Struktur gleichermaßen bindet.

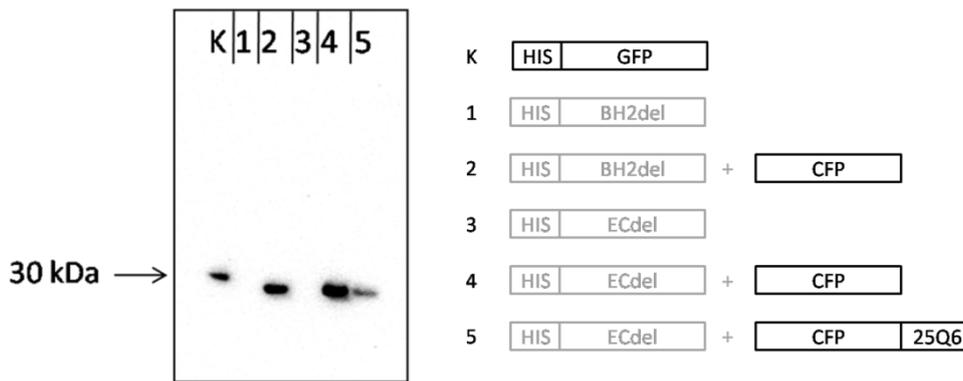


Abbildung 30: Immunoblot mit einem anti-GFP-Zweitantikörper zum Nachweis des polycistronisch exprimierten CFP auf Proteinebene. Untersucht wurden ungereinigte bakterielle Zellysate aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi, die über das zweite Plasmid jeweils die rechts dargestellten Proteine exprimierten (Nummerierung entspricht den Spuren im links abgebildeten Blot), die Zellzahlen wurden abgeglichen. Die in diesem Blot detektierten Proteine sind schwarz dargestellt, die nicht detektierten grau. Als Positiv-Kontrolle (K) diente ein gereinigtes HIS-GFP-Fusionsprotein. Die Proteindetektion erfolgte über Chemilumineszenz, die Belichtungszeit t_{exp} betrug 30 s.

Wie erwartet konnte CFP-Protein außer in der Positivkontrolle (Abbildung 30, Spur K) auch in den Lysaten aus *E. coli* TOP10-pAC-BETAipi pGJ2720-BH2del_CFP (Abbildung 30, Spur 2), *E. coli* TOP10-pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP (Abbildung 30, Spur 4) und *E. coli* TOP10-pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP-25Q6 (Abbildung 30, Spur 5) nachgewiesen werden. In den Negativkontrollen war kein CFP nachweisbar. Aus dem Experiment wurde ersichtlich, dass in den transgenen Bakterien ca. fünfmal mehr CFP als CFP-25Q6 vorhanden war, was mit den unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten, die bei den Bakterienkolonien beobachtet wurden, korrelierte. Ein Quenching-Effekt war damit auszuschließen. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass mehr CFP-Protein in der Zelle vorlag, wenn sich das CFP-Gen *downstream* von ECdel befand, als wenn es hinter das BH2del-Gen kloniert war (ca. zwei- bis dreimal so viel). Die zelluläre Proteinmenge bei der polycistronischen Expression in *E. coli* hing also nicht nur von einer Aptamer-Fusion des CFP ab, sondern auch von dem *upstream* gelegenen Gen.

Für die Wirkungsanalyse der Aptamere war das Verhältnis Zielenzym zu Aptamer wichtig. Eine konstante Menge an Zielenzym in der Zelle war essentiell, um Verschiebungen im Carotinoid-Profil eindeutig auf einen spezifischen Aptamer-Effekt zurückführen zu können und auszuschließen, dass eine veränderte zelluläre Enzym-Menge für eine veränderte Umsatzrate verantwortlich war. Eine niedrigere Enzymmenge konnte beispielsweise die gleichen Auswirkungen auf den Carotinoid-Stoffwechsel haben wie ein inhibierendes Aptamer.

Die bereits für die Detektion von CFP bzw. CFP-25Q6 (Abbildung 30) verwendeten Totalaufschlüsse wurden unter gleichen Bedingungen für den Nachweis der Zielenzyme mittels HIS-Immunoblot eingesetzt (Abbildung 31). Ein direkter Vergleich der Bandenintensitäten war jedoch nicht möglich, da der anti-HIS-Antikörper wesentlich schwächere Signale lieferte als der anti-CFP-Antikörper (t_{exp} in Abbildung 31 dreimal länger als in Abbildung 30).

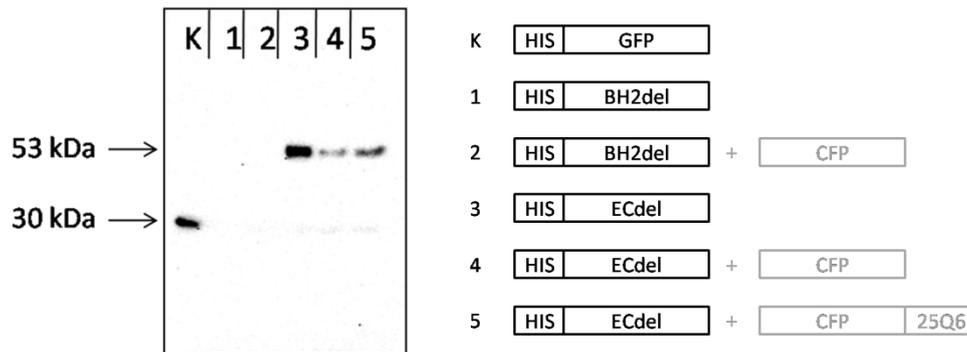


Abbildung 31: Immunoblot mit einem anti-HIS-Zweitantikörper zum Nachweis der Zielenzyme BH2del und ECdel auf Proteinebene. Die Probenauftragung war dieselbe wie beim CFP-Blot in Abbildung 30, die Positivkontrolle ebenfalls. Die Proteine, die über den HIS-tag detektiert wurden, sind schwarz dargestellt, die nicht detektierten grau. Die Proteindetektion erfolgte über Chemilumineszenz mit einer Belichtungszeit von $t_{\text{exp}} = 1 \text{ min. } 30 \text{ s}$.

Das Zielenzym ECdel konnte in allen drei Lysaten, in denen Expression erwartet wurde, bei der korrekten Größe von 53 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 31, Spuren 3-5). Bei alleiniger Ausprägung von ECdel (monocistronisch; Abbildung 31, Spur 3) war ca. fünfmal mehr Protein in der Zelle nachweisbar als bei der polycistronischen Expression von ECdel und CFP (Abbildung 31, Spur 4). Die zelluläre Menge an ECdel-Protein lag bei polycistronischer Expression von CFP im Vergleich zu CFP-25Q6 auf einem ähnlichen Niveau (Abbildung 31, Spuren 4 und 5). Zwar sind die Bandenintensitäten in den Spuren 4 und 5 in Abbildung 31 nicht exakt gleich, allerdings ist dies zu erklären durch leichte Schwankungen in der experimentellen Durchführung. BH2del ($M = 27 \text{ kDa}$) konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden, während die ebenfalls via HIS-tag detektierte Positiv-Kontrolle bei der erwarteten Größe von 30 kDa erschien (Spuren 1, 2 und K). Dies steht im Widerspruch zu den erhobenen funktionellen Daten, die eine nahezu vollständige Umsetzung von β -Carotin zu Zeaxanthin durch das Enzym belegten. Die Ursache hierfür ist unklar. Vermutlich war eine extrem geringe Präsenz an BH2del-Protein in der Zelle für diese Umsetzung ausreichend (s. Tabelle 16). Andererseits sind technische Ursachen nicht auszuschließen, beispielsweise die proteolytische Abspaltung des HIS-tag vom reifen BH2del-Protein.

3.3 Verifizierung der Aptamer-Effekte auf die Zielenzyme *in vivo*

Mithilfe des bakteriellen Funktionalitätsassays sollten die im *Y2H-Screening* gefundenen Aptamere auf ihre bioaktive Wirkung hin untersucht werden. Im System Hefe wurde nachgewiesen, dass die Peptide mit den Zielenzymen interagieren, und in *E. coli* ist es gelungen, die aktiven Zielenzyme wie auch die Aptamere nachweislich zu exprimieren. Mit dem HPLC-basierten bakteriellen Funktionalitätsassay ist eine zuverlässige und sensitive Methodik etabliert worden, die Aktivität der Enzyme zu erfassen und vergleichend zu betrachten. Im weiteren Verlauf war es so möglich, Aptamer-induzierte Aktivitäts-Änderungen der Zielenzyme zu detektieren. Als Basis dienten die via

HPLC ermittelten Carotinoid-Profile, die aufgrund der unbeeinflussten Aktivität von ECdel bzw. BH2del (im Zusammenwirken mit den auf pAC-BETAipi codierten Enzymen) erhalten wurden.

3.3.1 Untersuchung der Aptamere für BH2

Wie in Abbildung 13 gezeigt, führte die Koexpression von pAC-BETAipi-kodierten Enzymen und BH2del zum Hauptprodukt Zeaxanthin, sowie zu einem sehr geringen Anteil zu den nicht vollständig umgesetzten Zwischenprodukten β -Cryptoxanthin und β -Carotin.

Zur Quantifizierung der Enzymaktivität von BH2del wurde zum einen, über den Anteil an Zeaxanthin am Gesamt-Carotinoidgehalt, die Gesamtumsatzrate der BH2del bestimmt, zum anderen wurden die Umsatzraten der beiden von BH2del katalysierten Teilreaktionen über deren Edukte β -Carotin und β -Cryptoxanthin in Relation zueinander gesetzt (s. Tabelle 16). Zur Verifizierung bioaktiver Aptamere wurden diese Werte nun unter polycistronischer Expression der BH2del und des jeweiligen CFP-Aptamer-Fusionsproteins mit der Negativ-Kontrolle (polycistronische Expression von BH2del und CFP) verglichen. Hierzu wurden die HPLC-Analysen der Carotinoid-Extrakte doppelt transgener *E. coli* TOP10 vergleichend analysiert (Abbildung 32).

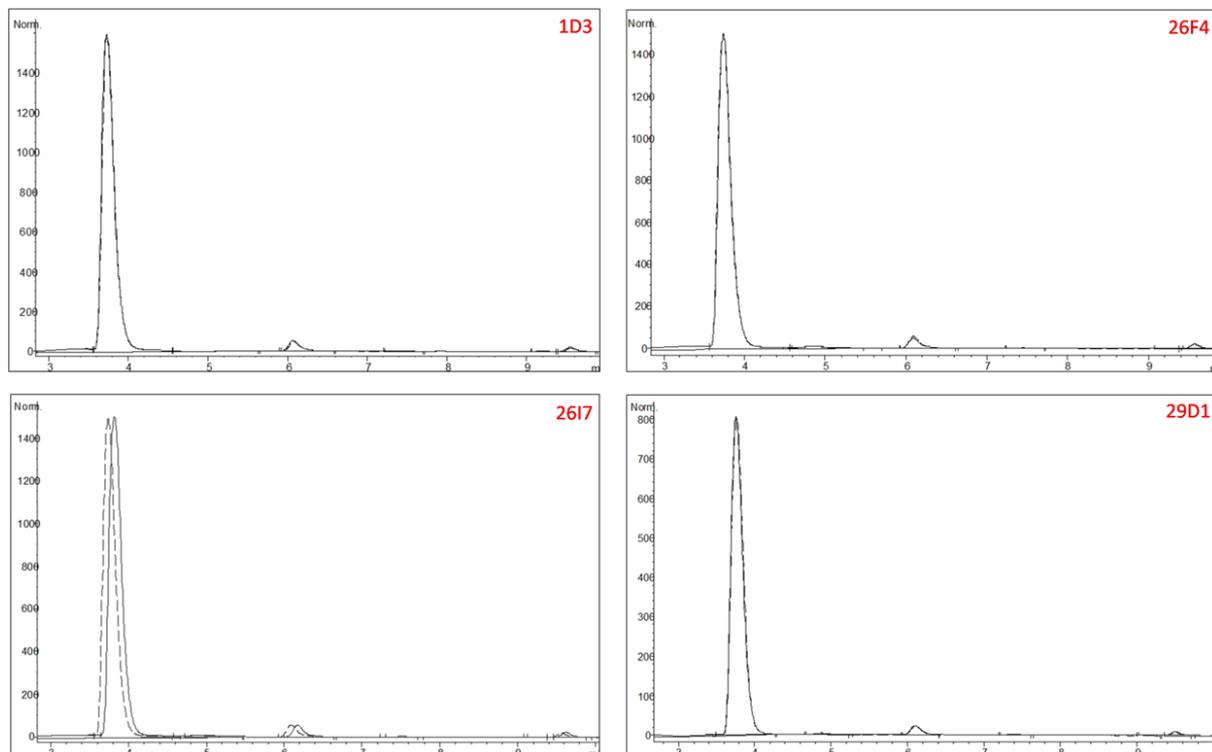


Abbildung 32: Einige ausgewählte HPLC-Chromatogramme zur funktionellen Überprüfung der Aptamere für die BH2. Abgebildet sind die Chromatogramme zur Verifizierung der Aptamere 1D3, 26E3, 26I7 und 29D1 (getestetes Aptamer jeweils rot im Chromatogramm eingetragen). Vermessen wurden jeweils Carotinoid-Extrakte aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi mit dem jeweiligen Aptamer-Konstrukt (analog zum Konstrukt in Abbildung 28 c), sowie die Negativ-Kontrolle *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-BH2del_CFP (analog zu Abbildung 28 a). Alle vier Aptamere zeigten keine direkt sichtbaren relativen Veränderungen der Carotinoid-Peaks für Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin und β -Carotin im Vergleich zur Kontrolle.

Von den insgesamt 31 Aptameren, die in den *Y2H-Screenings* mit der BH2 identifiziert worden sind (s. Tabelle 12), wurden 27 Sequenzen erfolgreich kloniert und im HPLC-Funktionalitätsassay getestet (Tabelle 17). In Abbildung 32 sind die Vergleichs-Chromatogramme vierer Aptamere für die BH2del exemplarisch dargestellt. Gemessen wurden die Carotinoid-Extrakte aus Aptamer-exprimierenden *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-BH2del_CFP[-D3/-26E3/-26I7/-29D1] vs. Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-BH2del_CFP (Negativ-Kontrolle). Diese vier Aptamere, wie auch die übrigen 23 analysierten, zeigten keine im Vergleichs-Chromatogramm sichtbare Beeinflussung der BH2del-Aktivität, die Carotinoid-*Peaks* bzw. das Carotinoid-Profil sahen auf den ersten Blick identisch wie die Kontrolle aus. Dennoch war es möglich, dass ein Aptamer durch (nicht optimierte) Bindung an ein Enzym dessen Funktion nur geringfügig beeinflusste. Ein solcher „sanfter“ Effekt wäre im Vergleichs-Chromatogramm nicht direkt sichtbar.

Aus diesem Grund erfolgte über die genauen Flächen der *Peaks* eine Auswertung der Carotinoid-Verhältnisse analog zu Tabelle 16. Über den β -Carotin- und β -Cryptoxanthin-*Peak* wurden die Umsatzraten der ersten und zweiten Teilreaktion (Mengenverhältnis β -Cryptoxanthin/ β -Carotin proportional zu Verhältnis der Umsatzraten von Teilreaktion 1 zu 2) relativiert, während über den anteiligen Zeaxanthin-Gehalt die Gesamtumsatzrate bestimmt wurde. Die ermittelten Werte wurden mit denen der Negativ-Kontrolle verglichen, somit konnte ein eventueller Effekt des jeweiligen Aptamers auf die BH2del abgeleitet werden. In Tabelle 17 sind die prozentualen Veränderungen des Carotinoid-Profiles für die Extrakte aus den 27 Aptamer-exprimierenden Bakterienklonen (polycistronische Expression von BH2del und CFP-Aptamer-Fusionsprotein in *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi) im Vergleich zur Negativkontrolle (polycistronische Expression von BH2del und CFP in *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi) aufgeführt.

Tabelle 17: Veränderungen der Carotinoid-Verhältnisse durch bakterielle Koexpression der Aptamere für die BH2 (Aptamere nach Namen sortiert). Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle (*E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-BH2deI_CFP). Als Grundlage für die Berechnungen dienten die entsprechenden HPLC-Vergleichsspektren, s. hierzu Abbildung 32. Die Quantifizierung erfolgte analog zu den Berechnungen in Tabelle 16. Die letzte Zeile beschreibt die mittlere Abweichung für die prozentuale Veränderung eines Aptamers im Vergleich zur Kontrolle (zwei oder drei unabhängige Messungen für dasselbe Aptamer). Es handelt sich um den Durchschnittswert der mittleren Abweichungen für alle vermessenen Aptamere. Die beiden Aptamere, die den größten Effekt auf die Gesamtumsatzrate zeigten, sind gelb markiert, orange unterlegt sind die beiden, die das Verhältnis der Teilreaktionen am stärksten beeinflussen.

| Aptamer | β -Cryptoxanthin/ β -Carotin [% vs. Kontrolle] | Zeaxanthin/gesamt [% vs. Kontrolle] |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 1D2 | -15 | +2,3 |
| 1D3 | +3 | +0,3 |
| 2A6 | +14 | +0,5 |
| 2A10 | +9 | +0,8 |
| 18B5 | +8 | +0,2 |
| 26A1 | +40 | +0,4 |
| 26A2 | -24 | -0,1 |
| 26A3 | +13 | +0,6 |
| 26A4 | +11 | +0,5 |
| 26B2 | +20 | +0,4 |
| 26D6 | -15 | +1,3 |
| 26E3 | +16 | -0,1 |
| 26E6 | +6 | ± 0 |
| 26F4 | -1 | +0,4 |
| 26I7 | -11 | +0,2 |
| 26K4 | +18 | -0,2 |
| 26M4 | +22 | -0,2 |
| 26M7 | +1 | +2,7 |
| 26M8 | ± 0 | -0,1 |
| 26P2 | -8 | +1,0 |
| 26P5 | -2 | +2,4 |
| 26R6 | +14 | -0,3 |
| 26Z3 | -32 | -0,3 |
| 29D1 | +8 | -0,1 |
| 29E1 | -10 | -0,4 |
| 29F5 | -20 | -0,5 |
| 36F5 | +1 | -0,7 |
| durchschnittliche Mittelabweichung | ± 5 | $\pm 0,3$ |

Bei Betrachtung der Ergebnisse in Tabelle 17 fällt zunächst auf, dass der prozentuale Anteil an Zeaxanthin, der die Gesamtumsatzrate der BH2-katalysierten Reaktion wiedergab, sich durch Koexpression der Aptamere nur geringfügig änderte und unter Berücksichtigung der mittleren Abweichung am Rande der Nachweisgrenze lag. Im Gegensatz dazu bewirkten die meisten Aptamere jedoch eine starke Änderung des Verhältnisses von erster zu zweiter Teilreaktion. Dies deutete darauf hin, dass ein Aptamer in der Lage ist, den Verlauf der beiden Teilreaktionen unterschiedlich

stark zu beeinflussen. Die Ursache hierfür könnte unter Umständen eine abweichende Konformation der BH2 bei der ersten und der zweiten Teilreaktion sein und demzufolge ein unterschiedlicher Einfluss des Aptamers. Weiterhin fiel auf, dass die Beeinflussung des U1/U2-Wertes (U = Umsatzrate, U1/U2 proportional zu β -Cryptoxanthin/ β -Carotin) nicht direkt mit einer starken Veränderung der Gesamtumsatzrate (Zeaxanthin/Gesamtcarotinoid) korrelierte. Beispielsweise waren die größten Aptamer-Effekte bezüglich der Gesamtumsatzrate für 26M7, 26P5, 1D2, 26D6 und 26P2 zu verzeichnen, wobei die Gesamtumsatzrate (proportional zur BH2del-Aktivität) in all diesen Fällen anstieg. Das Verhältnis U1/U2 wurde hingegen am stärksten von den Aptameren 26A1, 26Z3, 26A2, 26M4, 26B2 und 26F5 beeinflusst. 26A1, 26B2 und 26M4 bewirkten eine Erhöhung des U1/U2-Wertes, 26Z3, 26A2 und 26F5 hingegen führten zu einer Senkung des U1/U2-Wertes. Diejenigen Aptamere, die U1/U2 stark beeinflussten, bewirkten hingegen kaum eine Veränderung der Gesamtumsatzrate. Einzig die beiden Aptamere 1D2 und 26D6 führten, unter Berücksichtigung der mittleren Abweichung, zu einer Abnahme des U1/U2-Wertes, während der Gesamtumsatz stieg. Dieses Phänomen deutete darauf hin, dass die BH2del-Aktivität im zweiten Reaktionsschritt, also bei der Umsetzung von β -Cryptoxanthin zu Zeaxanthin, erhöht wurde. Für eine Erhöhung des β -Carotin-Gehaltes in Pflanzen waren die gefundenen Aptamere ungeeignet, da unter den gegebenen experimentellen Bedingungen bzw. Nachweisverfahren keine signifikante Beeinflussung der enzymatischen Gesamtreaktion festgestellt werden konnte.

3.3.2 Untersuchung der Aptamere für EC

Für die ECdel wurden sieben der insgesamt zwölf gefundenen Aptamere im HPLC-Assay getestet (s. Tabelle 12 und Tabelle 18). Für ein inhibitorisch wirksames Aptamer erwartete man eine Zunahme an ϵ - und eine Abnahme an α - und β -Carotin.

Analog zur BH2del wurden Carotinoid-Extrakte der Aptamer-exprimierenden Bakterien im Vergleich zur Kontrolle (*in vivo*-ECdel-Aktivität ohne Aptamer-Koexpression) analysiert. Abbildung 33 zeigt beispielhafte Vergleichs-HPLC-Chromatogramme der Extrakte aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP-17F2 und -25W7, jeweils vs. *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP (Negativ-Kontrolle). Die *Peak*-Flächen sind proportional zu den Mengen der entsprechenden Substanzen ϵ -, α -, und β -Carotin.

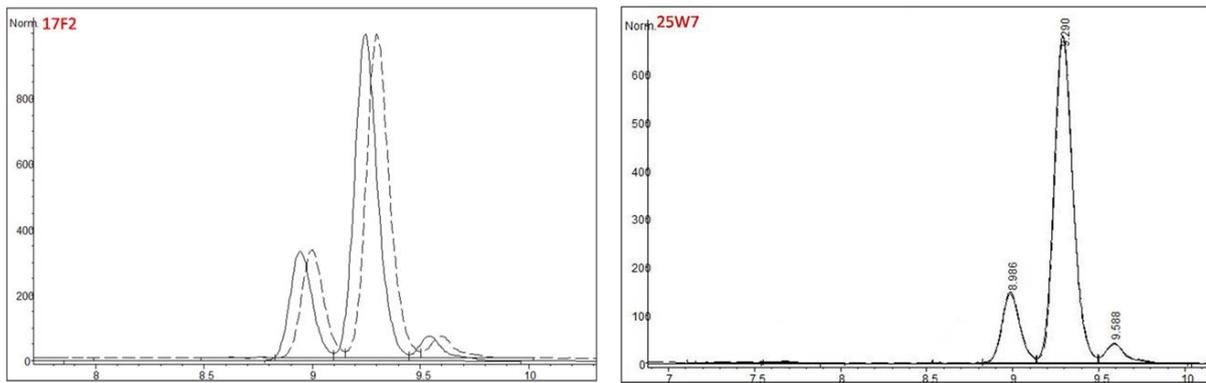


Abbildung 33: Beispielhafte HPLC-Chromatogramme zur funktionellen Überprüfung der Aptamere 17F2 und 25W7 für die EC (getestetes Aptamer jeweils rot im Chromatogramm eingetragen). Dargestellt sind jeweils Chromatogrammausschnitte der Carotinoid-Extrakte aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi mit dem jeweiligen Aptamer-Konstrukt entsprechend Abbildung 28 c (durchgezogene Linie) gegen die Negativ-Kontrolle *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi mit dem Kontroll-Konstrukt aus Abbildung 28 a (gestrichelte Linie). Die Aptamere 17F2 und 25W7 bewirkten keine sichtbaren relativen Veränderungen der Carotinoid-Peaks für ϵ -, α - und β -Carotin im Vergleich zur Kontrolle.

Für das Zielenzym EC wurden insgesamt sieben Aptamere im bakteriellen Funktionalitätsassay getestet (Tabelle 14). Die beiden Vergleichschromatogramme in Abbildung 33 sind beispielhaft für Aptamere, die in dem bakteriellen Funktionalitätsassay keine signifikante Beeinflussung der EC-Enzymaktivität bewirken. In diesen Fällen waren die beiden Chromatogramme von Aptamer und Kontrolle, abgesehen von experimentell bedingten, minimalen Laufzeitunterschieden, nahezu identisch (zur genauen Quantifizierung über die *Peak*-Flächen s. Tabelle 18). Demgegenüber stach das Aptamer 25Q6 im Funktionalitätsassay deutlich heraus (Abbildung 34). Dieses Aptamer bewirkte einen starken Effekt auf das Carotinoid-Profil im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (CFP ohne Aptamer).

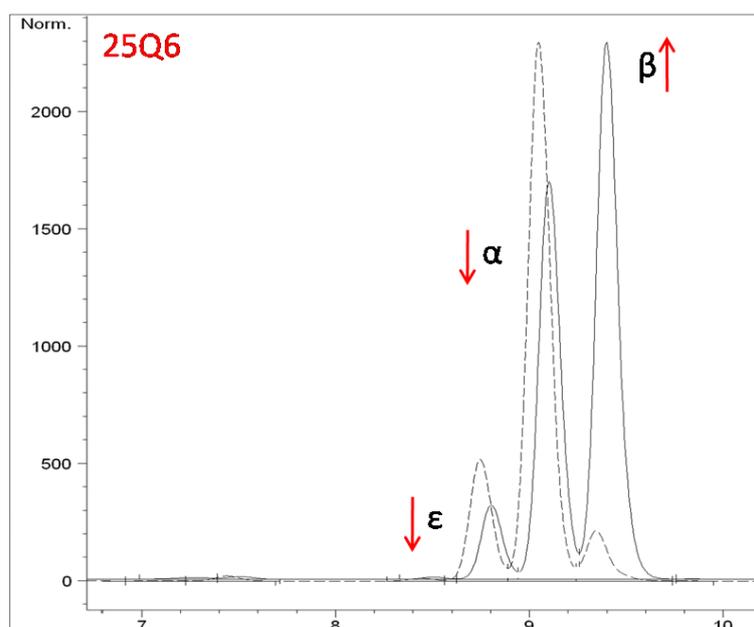


Abbildung 34: HPLC-Vergleichschromatogramm zur Funktionalitäts-Überprüfung des Aptamers 25Q6. Die gestrichelte Linie entspricht dem Kontroll-Carotinoid-Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP, die durchgezogene Linie dem Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP-25Q6. Der linke *Peak* entspricht ϵ -Carotin, der mittlere α -Carotin und der rechte β -Carotin. Die roten Pfeile signalisieren die Veränderungen der Carotinoid-Mengen durch Koexpression des Aptamers 25Q6 im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.

Im Vergleich zur Negativ-Kontrolle war in Anwesenheit von 25Q6 eine eindeutige Abnahme der beiden Reaktionsprodukte ϵ - und α -Carotin zu verzeichnen, sowie eine drastische Zunahme des dritten Reaktionsproduktes β -Carotin. Der Effekt des Aptamers auf den bakteriellen Carotinoid-Stoffwechsel war so stark, dass das ursprünglich am schwächsten gebildete Produkt β -Carotin zum Hauptprodukt der Gesamtreaktionskette wurde. Dies war exakt das Ergebnis, welches man für den Fall einer Aptamer-bedingten Hemmung der EC erwartet hatte.

Für die exakte quantitative Auswertung der HPLC-Vergleichschromatogramme (Abbildung 33) wurden die Verhältnisse der *Peak*-Flächen von ϵ -, α - bzw. β -Carotin jeweils in Verhältnis zum Gesamt-Carotinoidgehalt (α - + β - + ϵ -Carotin) gesetzt und die Veränderungen dieser Verhältnisse bei Aptamer-Koexpression im Vergleich zur Kontrolle betrachtet. Weiterhin wurde das Verhältnis von β - zu ϵ -Carotin berechnet, um die Aktivitäten der beiden an der Gesamtreaktion beteiligten Enzyme EC und BC in Verhältnis zu setzen. Die BC-Aktivität blieb unabhängig von einer Aptamer-Expression konstant. Allerdings konnte das Stoffwechsel-Zwischenprodukt Lycopon, welches ohne Aptamer (also wenn sich das BC/EC-Reaktions-Gleichgewicht im bakteriellen Stoffwechselsystem eingestellt hatte) von beiden Enzymen umgesetzt wurde, zu einem größeren Teil von der BC umgesetzt werden, wenn die EC durch 25Q6 inhibiert war. Daher war eine Veränderung des Wertes für β -/ ϵ -Carotin aufgrund einer Aptamer-Koexpression proportional zur Veränderung der EC-Aktivität. Alle berechneten Werte für die getesteten Aptamere sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Änderungen der Carotinoid-Verhältnisse durch bakterielle Koexpression der Aptamere für die EC. Berechnet wurden dieselben Verhältnisse wie in Tabelle 15. Die Berechnungen basieren auf den *Peak*-Flächen in den HPLC-Chromatogrammen (s. Abbildung 33), als Kontrolle diente der Extrakt aus *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi pGJ2720-ECdel_CFP. Die durchschnittliche mittlere Abweichung wurde wie in Tabelle 17 berechnet (mind. drei unabhängige Messungen für dasselbe Aptamer). Die Werte für 25Q6 sind rot markiert, da hier die stärksten Effekte in Bezug auf ECdel verzeichnet wurden.

| Aptamer | ϵ -Carotin/ Σ α -, β -, ϵ - [% vs. Kontrolle] | α -Carotin/ Σ α -, β -, ϵ - [% vs. Kontrolle] | β -Carotin/ Σ α -, β -, ϵ - [% vs. Kontrolle] | β/ϵ |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 12.6 | -14 | +5,8 | ± 0 | +21 |
| 17F2 | -3 | -0,8 | +9 | +13 |
| 17G7 | -10 | +2,8 | +8 | +26 |
| 17G8 | -12 | +2,7 | ± 0 | +13 |
| 25A1 | -7 | +7,0 | -6 | +9 |
| 25Q6 | -58 | -48 | +615 | +1582 |
| 25W7 | -7 | +2,4 | -8 | -1 |
| durchschnittliche Mittelabweichung | $\pm 3,0$ | $\pm 0,8$ | $\pm 2,7$ | $\pm 5,1$ |

Wie bereits im HPLC-Chromatogramm zu erkennen ist (s. Abbildung 34), beeinflusste 25Q6 das Carotinoid-Profil mit Abstand am stärksten. Bezogen auf den zellulären Gesamt-Carotinoidgehalt konnte eine Abnahme des ϵ -Carotin-Gehalts um knapp 60 % beobachtet werden, sowie eine Senkung des α -Carotin-Gehalts um knapp 50 %. Die Menge an β -Carotin hingegen stieg um das mehr als

sechsfache im Vergleich zur Kontrolle. Das Verhältnis von β - zu ε -Carotin nahm demzufolge ca. 16-fach zu. Außer für 25Q6 konnte bei keinem weiteren Aptamer ein vergleichbar starker reproduzierbarer Effekt auf die EC-Aktivität nachgewiesen werden. Bei den Aptameren 12.6 und 17G7 konnte man von einer schwachen bioaktiven Wirkung der Aptamere ausgehen, bei den restlichen Aptameren handelte es sich möglicherweise um unspezifische Effekte, die nicht auf eine Beeinflussung des Stoffwechsels durch das Aptamer zurückzuführen sind.

Für die weiteren Experimente, die auf eine Verifizierung der bioaktiven Aptamer-Wirkung *in planta* abzielten, wurde ausschließlich Aptamer 25Q6 eingesetzt, da es den stärksten inhibitorischen Effekt auf das Zielenzym ausübte.

4 Verifizierung bioaktiver Aptamere *in planta*

Das *Y2H-Screening* sowie der bakterielle Funktionalitätsassay dienten der schnellen Identifizierung interagierender Peptide bzw. bioaktiver Aptamere. Diese Testsysteme unterscheiden sich jedoch in ihrem zellulären Aufbau und ihren biochemischen Eigenschaften von den geplanten Zielorganismen, den Pflanzen. Es musste nachgewiesen werden, dass die Ergebnisse aus Hefe und *E. coli* auf ein pflanzliches System übertragbar sind, in dem andere zelluläre Bedingungen herrschen und die eine abweichende Expression/Faltung/Stabilität von Zielenzym und Aptamer-Fusionsprotein bewirken können. Zunächst musste gewährleistet sein, dass sowohl Enzym als auch Aptamer in der pflanzlichen Zelle exprimiert werden konnten und mithilfe fluoreszierender Fusionsproteine nachweisbar und lokalisierbar waren. Hierzu wurden über Infiltration transgener *Agrobakterien* in *N. benthamiana*-Blättern transiente Genexpressionsstudien mit ausgewählten Zielenzymen und korrespondierenden Aptameren durchgeführt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Weitere Experimente hatten den Nachweis der *in planta* Interaktion zwischen Enzym und Aptamer zum Ziel. Dies erfolgte über weitere Tabak-Infiltrationsexperimente in Verbindung mit *bimolecular fluorescence complementation (BiFC)*-Assays. Schließlich wurde die Überprüfung eines Aptamer-Effekts auf den *in planta*-Carotinoid-Stoffwechsel angegangen. Hierzu wurden stabile Transformationen der Modellpflanze *A. thaliana* und der Nutzpflanze *S. lycopersicum* mit Konstrukten zur Aptamer-Überexpression durchgeführt.

4.1 Transiente Expression von Zielenzym und Aptamer in *N. benthamiana*

Aptamer 25Q6 konnte in *S. cerevisiae* als Interaktor der EC identifiziert werden. Im bakteriellen Funktionalitätsassay zeigte das Aptamer eine funktionelle Beeinflussung der enzymatischen Aktivität der EC.

Zum Nachweis der *in planta*-Expression von EC und 25Q6 wurden entsprechende Pflanzenexpressionsvektoren kloniert, transgene *Agrobakterien* generiert, die die in Abbildung 35 aufgezeigten Plasmide enthielten, und die Expression der Gene in Experimenten zur transienten Genexpression überprüft.

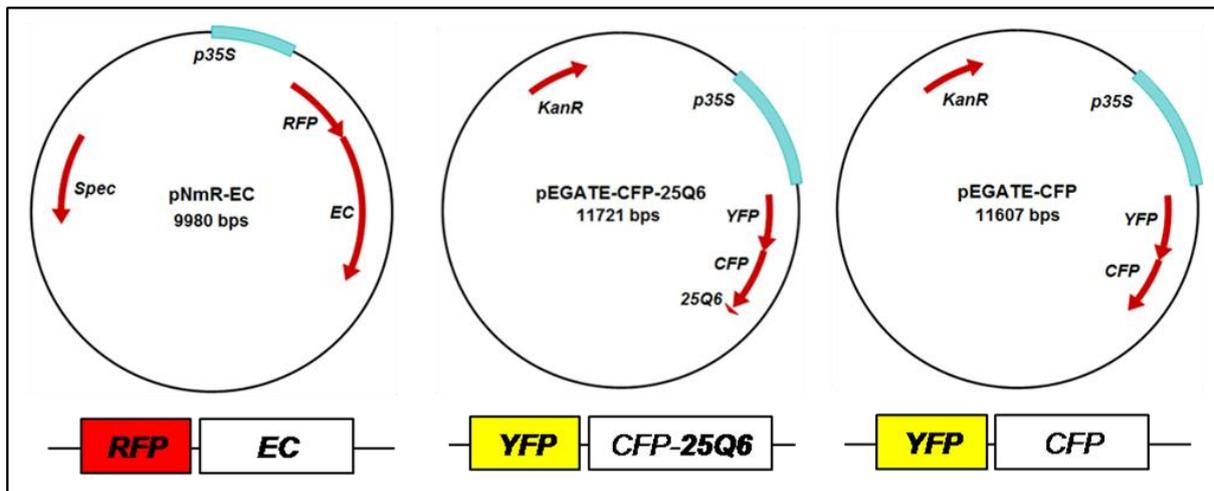


Abbildung 35: Plasmide für die Expression der *Baits* und Aptamere in *N. benthamiana*. Links: pNmR-EC zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion der EC via RFP-Fusion. Mitte: pEGATE-CFP-25Q6 für den Nachweis des CFP-Aptamer-Fusionsproteins über YFP-Fluoreszenz. Rechts: Kontrollkonstrukt pEGATE-CFP für die Expression des YFP-CFP-Fusionsproteins (ohne Aptamer).

Agrobacterium tumefaciens EHA105 wurden jeweils mit den Plasmiden pNmR-EC, pEGATE-CFP-25Q6 und pEGATE-CFP (Negativ-Kontrolle) transformiert (Abbildung 35). Das Plasmid pNmR-EC diente der Expression des Zielzyms EC, das am N-Terminus mit dem Fluoreszenzmarker RFP fusioniert war und somit über rotes Fluoreszenzemission detektiert bzw. lokalisiert werden konnte. pEGATE-CFP-25Q6 wurde für die Expression des CFP-Aptamer-Fusionsproteins in N-terminaler Fusion mit YFP verwendet, mit pEGATE-CFP erfolgte analog die Expression des YFP-CFP-Fusionsproteins als Kontrolle für das Aptamer. Bei allen drei Plasmiden unterlag die Genexpression der Kontrolle durch den konstitutiven und starken 35S-Promotor des cauliflower-mosaic-virus (CaMV). Es sollte die Koexpression von RFP-EC und YFP-CFP-25Q6 bzw. YFP-CFP als Kontrolle verifiziert werden, um die Expressionsmuster direkt vergleichen zu können und ggf. eine subzelluläre Kolo-kalisation zu detektieren. Als zusätzliche Kontrolle wurde das alleinige RFP (ohne Fusion mit der EC) im pNmR-Vektor exprimiert.

Die transgenen *Agrobacterium*-Stämme wurden in Blätter von *N. benthamiana* infiltriert und das transformierte Gewebe nach zwei-tägigem Wachstum der infiltrierten Pflanzen unter Langtag-Bedingungen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (KLSM) untersucht. In Abbildung 36 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen transformierter Pflanzenzellen gezeigt.

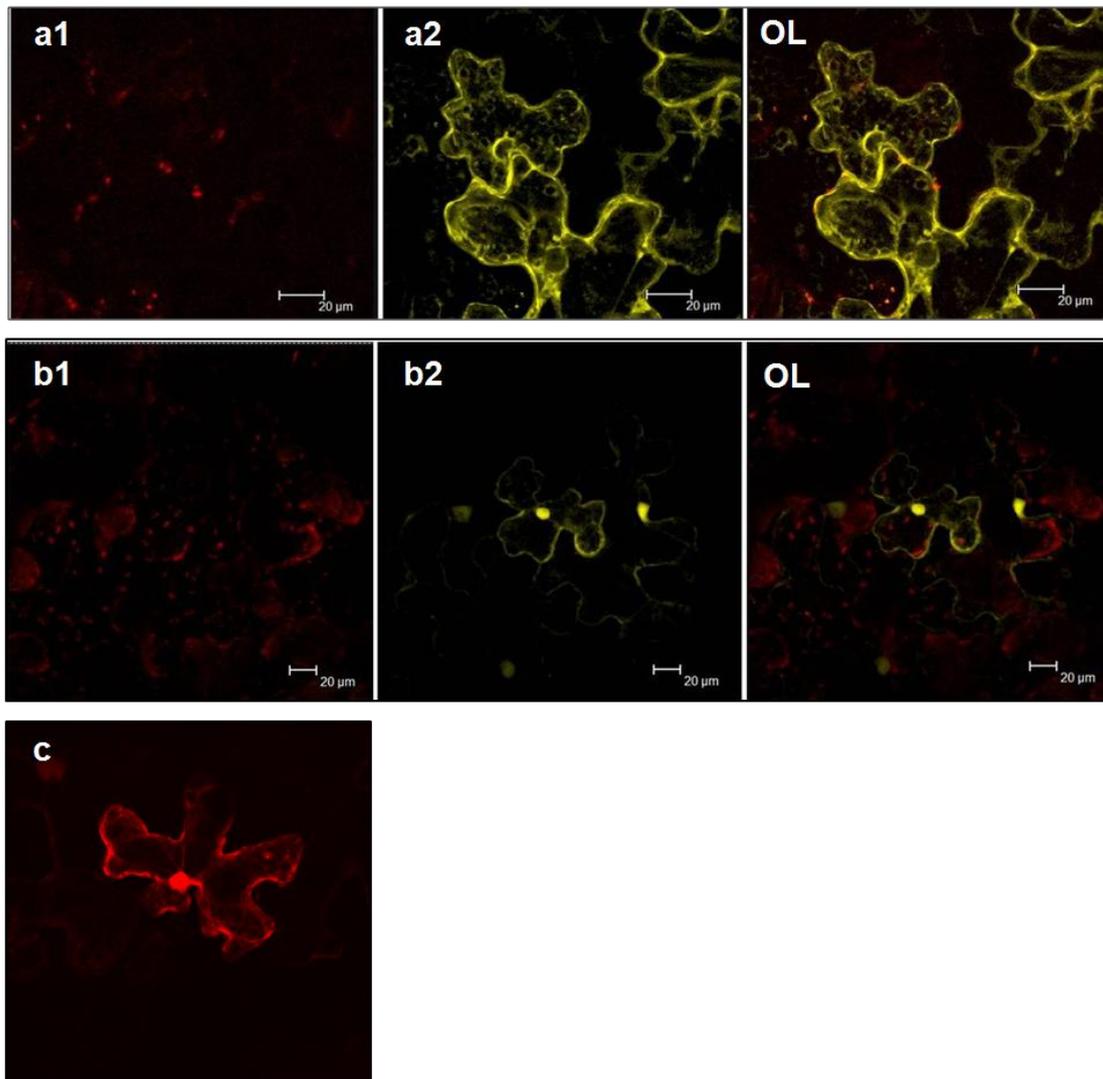


Abbildung 36: Koexpression von Zielenzym und Aptamer *in planta*, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen *Agrobacterium*-infiltrierter Tabak-Blätter (*N. benthamiana*). Die Aufnahmen wurden via konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, zwei Tage nach der Infiltration mit transgenen *A. tumefaciens* EHA105 gemacht. Fluoreszenzlicht wurde detektiert im RFP-Kanal (a1, b1, c) und im YFP-Kanal (a2, b2), OL: *overlay* der Bilder 1 und 2. (a) Koexpression von pNmR-EC und pEGATE-CFP-25Q6. (b) Negativ-Kontrolle: Koexpression von pNmR-EC und pEGATE-CFP ohne Aptamer. (c) Positiv-Kontrolle für das Fluorophor RFP, Plasmid pNmR-RFP für alleinige RFP-Expression ohne *Bait*-Fusion.

Bei Koexpression von Enzym und Aptamer (Abbildung 36 a) wurden sowohl EC als auch 25Q6 zytosolisch ausgeprägt. Die EC lag in geringen Mengen vor und war in Form von Punkten im Zytosol der Epidermiszellen zu erkennen, was auf eine lokale Anhäufung des Proteins hindeutete. Im Gegensatz dazu traten die Fluoreszenzsignale des Aptamer-Fusionsproteins (YFP-CFP-25Q6) eher gleichverteilt im Zytoplasma auf. Es waren jedoch auch hier einige punktuelle Anhäufungen zu erkennen. Im entsprechenden *overlay*-Bild wird deutlich, dass EC und 25Q6 in diesen Punkten kolokalisiert waren, was einen ersten Hinweis auf eine Interaktion *in planta* lieferte.

Ein weiterer Hinweis ergab sich aus der Beobachtung, dass weder das EC-RFP- noch das Aptamer-YFP-Fusionsprotein im Zellkern lokalisiert waren (Abbildung 36 a), was bei nicht-fusionierten fluoreszierenden Proteinen (CFP, GFP, RFP) typischerweise der Fall ist, wie die durchgeführte RFP-Kontrolle beispielhaft zeigte (Abbildung 36 c). Das Aptamer-lose YFP-CFP-Fusionsproteins des

Kontroll-Ansatzes (Abbildung 36 b) zeigte ebenfalls Kernlokalisierung. Die fehlende Kernlokalisierung der Aptamer-Fusionsproteine konnte nicht mit ihrer Größe (59 kDa) begründet werden, da diese sich kaum von der Größe des Kontrollproteins YFP-CFP (57 kDa) unterscheidet. Eine mögliche Erklärung ist die Interaktion des Aptamers mit der zytosolisch lokalisierten rekombinanten EC und/oder dem zytosolischen endogenen EC-Präprotein aus *N. benthamiana*. Das zelluläre Expressionsmuster der EC beim Kontrollansatz (Abbildung 36 b1) ähnelte demjenigen bei Aptamer-Koexpression (Abbildung 36 a1). Bei der Kontrolle lag jedoch keine Kolo-kalisation von RFP-EC und YFP-CFP vor (s. OL).

Die experimentellen Daten belegten eindeutig, dass sowohl das Zielenzym EC als auch das Aptamer 25Q6 in *N. benthamiana* zytosolisch exprimiert wurden. Damit war eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendung bioaktiver Aptamere zur Modifikation des pflanzlichen Carotinoid-Stoffwechsels erfüllt.

4.2 Verifizierung der EC/25Q6-Interaktion *in planta*

Diese Fragestellung wurde mit Hilfe der sogenannten *BiFC* (*bimolecular fluorescence complementation*)-Methode analysiert (Jach u. a., 2006). Dabei werden translationale Fusionen der verschiedenen Interaktionspartner mit N- oder C-terminalen Teilfragmenten des RFP (*Split*-RFP; Plasmide s. Abbildung 37) in transienten Genexpressionsstudien einzeln und in Kombination zur Ausprägung gebracht und die transformierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die beiden *Split*-RFP-Teile (RFP_N2 und RFP_C2, also das N- bzw. C-terminale Fragment des monomeren RFP) allein besitzen nicht die Fähigkeit zur Fluoreszenz. Findet nun eine Wechselwirkung zwischen den beiden zu verifizierenden Interaktoren statt, so kommt es aufgrund der dadurch bedingten räumlichen Annäherung der beiden *Split*-RFP-Fragmente zur Rekonstitution des monomeren RFP. Über die damit ermöglichte Emission roten Fluoreszenzlichts kann die vorliegende Interaktion der Liganden detektiert werden.

4.2.1 Klonierung von EC und 25Q6 für den pflanzlichen *BiFC*-Assay

Zur Herstellung der benötigten Expressionsvektoren wurde die ECdel am C-Terminus mit *Split*-RFP_N2 fusioniert, während das CFP-25Q6-Protein am N-Terminus mit dem *Split*-RFP_C2 versehen wurde (Abbildung 37).

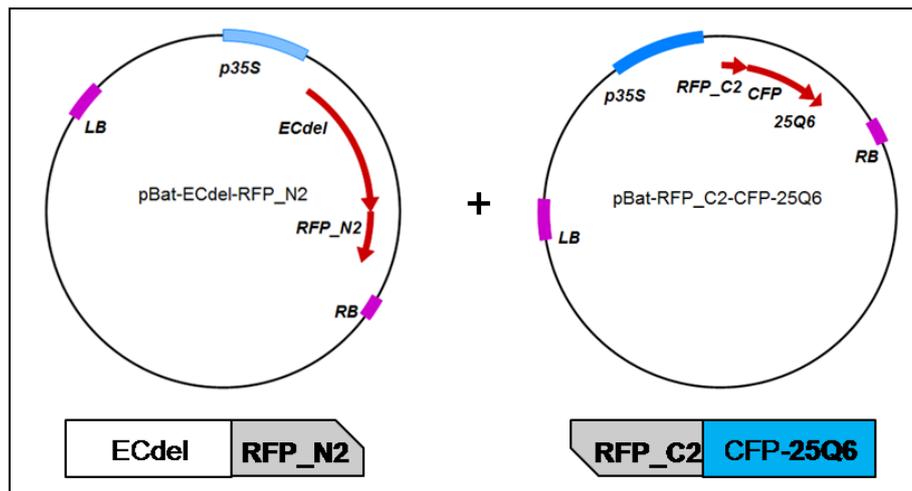


Abbildung 37: Plasmide für den *BiFC*-Assay zur Verifizierung der Interaktion von EC und 25Q6 *in planta*. Links: pBat-ECdel-RFP_N2 für die C-terminale Fusion des Baits mit dem *Split*-RFP_N2-Fragment. Rechts: In pBat-RFP_C2-CFP-25Q6 wird das CFP-Aptamer-Fusionsprotein am N-Terminus mit dem *Split*-RFP_C2-Fragment fusioniert.

Aufgrund der C-terminalen Fusion der EC mit RFP_N2 wurde das Zielenzym in diesem Fall wieder als ECdel, also ohne Transitpeptid, kloniert. Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgt in allen Fällen über den 35S-Promotor.

4.2.2 Nachweis der Interaktion zwischen EC und 25Q6 via *BiFC*

Die *Split*-RFP-Plasmide wurden in *A. tumefaciens* EHA105 transferiert und die transgenen Agrobakterien in *N. benthamiana*-Blätter infiltriert. Nach vier Tagen wurde das infiltrierte Gewebe mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Abbildung 38).

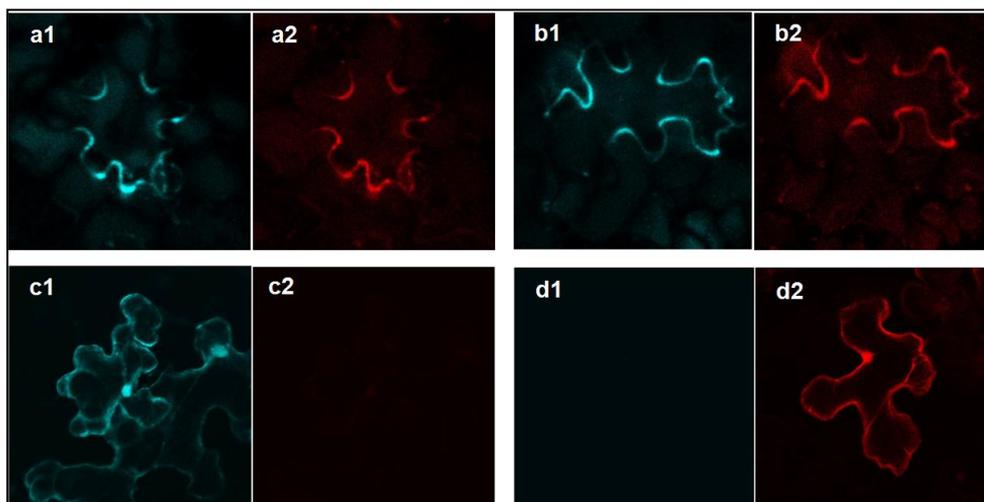


Abbildung 38: *BiFC*-Assay zur Verifizierung der Interaktion von Aptamer 25Q6 mit der EC, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen *Agrobacterium*-infiltrierter Tabak-Blätter (*N. benthamiana*). Die Aufnahmen wurden via konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie vier Tage nach der Infiltration mit transgenen *A. tumefaciens* EHA105 gemacht. Die Anregung der fluoreszierenden Moleküle erfolgte mit zwei Lasern: $\lambda = 405$ nm (CFP-Anregung) und $\lambda = 561$ nm (RFP-Anregung). Die Lichtemission wurde im CFP-Kanal detektiert (a1-d1), sowie im RFP-Kanal (a2-d2), alle Einstellungen für 1 und 2 sind jeweils identisch. Einzig die Belichtungszeiten für die Positiv-Kontrollen c und d wurden im Vergleich zu a und b herabgesetzt, da die Fluoreszenz der Kontrollen deutlich intensiver war. (a) und (b) Expression der *Split*-RFP-Fusionsproteine ECdel-RFP_N2 und RFP_C2-CFP-25Q6. (c) Negativ-Kontrolle, Expression von ECdel-RFP_N2 und RFP_C2-RFP. (d) RFP-Positiv-Kontrolle, Expression von ECdel-RFP_N2 und RFP_C2-RFP.

Bei Koexpression von ECdel und Aptamer 25Q6 konnte über blaue Fluoreszenz im CFP-Kanal zum einen die zytosolische Aptamer-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 38 a1 und b1), zum anderen wurde auch im RFP-Kanal ein Signal detektiert, was auf eine positive Interaktion hindeutet (Abbildung 38 a2 und b2). Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrollprobe (Koexpression von ECdel-RFP_N2 und RFP_C2-CFP) trotz intensiver CFP-Fluoreszenz (Abbildung 38 c1) im RFP-Kanal aufgrund fehlender Interaktion kein Signal (Abbildung 38 c2), während die RFP-Positiv-Kontrolle die erwartete intensive RFP-Fluoreszenz (Abbildung 38 d2) und kein Signal im CFP-Kanal aufwies (Abbildung 38 d1). Mit Hilfe des *BiFC*-Assays konnte die Interaktion zwischen ECdel und Aptamer 25Q6 in pflanzlichen Zellen somit eindeutig nachgewiesen und bestätigt werden.

5 Überexpression von 25Q6 in transgenen *A. thaliana*-Linien

Zur Klärung der Frage, ob das gefundene bioaktive, EC-spezifische Aptamer 25Q6 eine ausreichende Hemmung oder Schwächung der enzymatischen EC-Aktivität im pflanzlichen System bewirkt und somit zu einer Erhöhung des pflanzlichen β -Carotin-Gehalts führt, wurden Arbeiten mit transgenen *Arabidopsis*-Linien durchgeführt.

5.1 Erzeugung 25Q6-transgener *Arabidopsis*-Linien

Zur Herstellung stabiler Transformanten von *A. thaliana* wurde ein geeignetes CFP-25Q6-Pflanzenexpressions-Plasmid erzeugt (Abbildung 39).

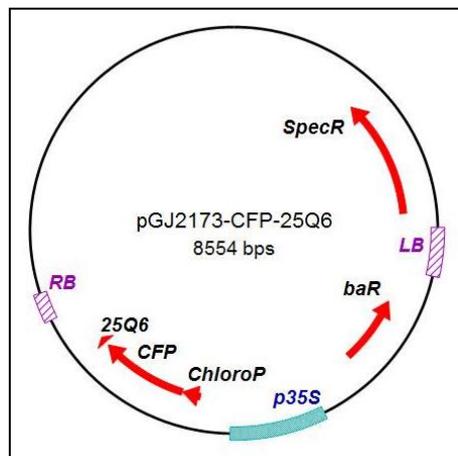


Abbildung 39: Plasmid pGJ2173-CFP-25Q6 für die Transformation von *A. thaliana*.

CFP-25Q6 wurde am N-Terminus mit dem Chloroplasten-Transitpeptid ChloroP (Jach u. a., 2006) translational fusioniert (Abbildung 39), um eine chloroplastidäre Lokalisation des Aptamers zu erreichen. Für das verwendete TP wurde von Jach und Kollegen gezeigt, dass es in Tabak-Zellen eine Lokalisation des rekombinanten Fusionsproteins in Chloroplasten bewirkt. Die Expression von CFP-25Q6 in *Arabidopsis* erfolgte unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Auf diese Weise sollte die Expression identifizierter bioaktiver Aptamere in stabilen transgenen *Arabidopsis*-Linien, sowie eine Aptamer-bedingte Beeinflussung des Carotinoid-Stoffwechsels in verschiedenen Organen untersucht werden können.

Als Negativ-Kontrollkonstrukt wurde analog pGJ2173-CFP (ohne Aptamer-Fusion) erstellt, wobei CFP ebenfalls am N-Terminus mit ChloroP fusioniert wurde.

5.2 Analysen der 25Q6-transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen

Um zu überprüfen, ob die Expression des ChloroP-CFP-fusionierten Aptamers 25Q6 einen sichtbaren und vor allem spezifischen Effekt auf die transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (Erzeugung siehe IV5.1) hatte, wurden die T2-Generationen dreier unabhängiger Linien zunächst phänotypisch betrachtet (Abbildung 40). Als Negativkontrolle dienten *A. thaliana* Wildtyp (WT)-Pflanzen. Als weitere Kontrolle wurden analog drei transgene *Arabidopsis*-Linien herangezogen, die das alleinige CFP-Protein (ebenfalls ChloroP-fusioniert) exprimierten.

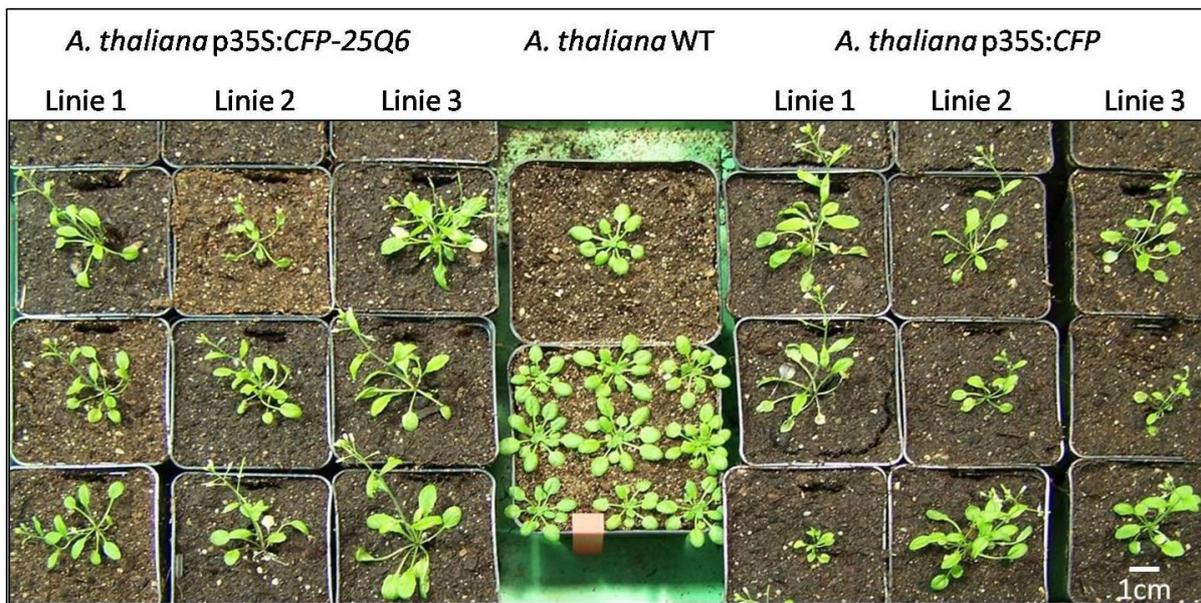


Abbildung 40: Phänotypische Betrachtungen der T2-Generationen CFP-25Q6- und CFP-transgener *Arabidopsis*-Linien. Gezeigt sind je drei Pflanzen dreier unabhängiger Linien, sowie *A. thaliana* cv. Columbia-WT-Pflanzen (Negativkontrolle, Mitte), Alter der Pflanzen: 3 Wochen.

Die transgenen Pflanzen unterschieden sich phänotypisch deutlich vom *A. thaliana* WT (Abbildung 40). Die CFP-25Q6 und CFP-exprimierenden Pflanzen zeigten im Vergleich zum WT ein deutlich früheres Eintreten in die generative Phase (ca. 2 Wochen früher). Neben der frühzeitigen Spross- und Blütenbildung war eine geringere Anzahl an Rosettenblättern auffällig (Quantifizierung wurde nicht vorgenommen). Alle drei untersuchten transgenen Linien der CFP- und der CFP-25Q6-exprimierenden Pflanzen zeigten dasselbe Verhalten. Die Phänotypen sind daher vermutlich auf die Expression des rekombinanten, als Fusionsprotein verwendeten CFP zurückzuführen. Ein Aptamer-spezifischer phänotypischer Effekt kann somit ausgeschlossen werden.

Zur Überprüfung der Expression sowie der chloroplastidären Lokalisation des CFP-25Q6-Fusionsproteins wurden die T2-Generationen der drei oben beschriebenen, transgenen *Arabidopsis*-Linien fluoreszenzmikroskopisch untersucht (s. Abbildung 41). Als Negativkontrollen wurden auch

hier *A. thaliana* WT-Pflanzen eingesetzt, während die CFP-transgenen *Arabidopsis* in diesem Fall als Positivkontrolle für die fluoreszenzmikroskopischen Expressions-Analysen dienen.

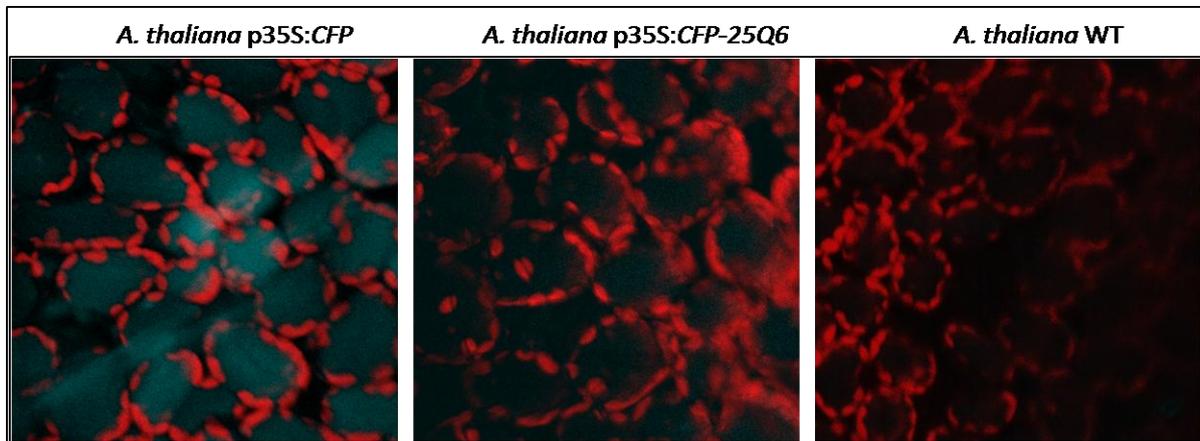


Abbildung 41: Überprüfung der Expression des CFP-25Q6-Fusionsproteins in transgenen *Arabidopsis*-Linien, fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der rekombinanten Expression in Blättern 3 Wochen alter *Arabidopsis*-Pflanzen der T2-Generation. Links: Positivkontrolle p35S:CFP, Mitte: p35S:CFP-25Q6, rechts: Negativkontrolle *A. thaliana* cv. Columbia Wildtyp. Rot: Eigenfluoreszenz der Chloroplasten (Anregung bei 405 nm, Emissionswellenlänge 620 - 670 nm), blau: CFP-Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 405 nm, Emissionswellenlänge 440 - 470 nm).

In allen drei untersuchten *A. thaliana* p35S:CFP-Linien war ein schwaches CFP-Fluoreszenzsignal in Blatt-Epidermiszellen der transgenen Pflanzen erkennbar (Positivkontrolle, Abbildung 41 links), eine Lokalisation in den Chloroplasten, die aufgrund des fusionierten TPs ChloroP (s. Abbildung 39) erfolgen sollte, wurde jedoch nicht eindeutig festgestellt. In den CFP-25Q6-transgenen Linien (Abbildung 41 rechts, Mitte) war das nachweisbare CFP-Signal schwächer als bei der CFP-Kontrolle. Dieses Phänomen der deutlich (bis zu fünfmal) schwächeren Fluoreszenz bzw. Expression des Aptamer-Fusionsproteins im Vergleich zur CFP-Kontrolle deckt sich mit den zuvor beschriebenen Beobachtungen in anderen *in vivo*-Experimenten (s. hierzu IV3.2.2 und IV4.2.2), sowie mit dem Protein-Nachweis aus *E. coli*-Lysaten (Immunoblot-Ergebnisse, s. IV3.2.3). Auch für CFP-25Q6 konnte keine Lokalisation des rekombinanten Proteins in Chloroplasten detektiert werden. Sowohl bei den CFP- als auch bei den CFP-25Q6-transgenen Pflanzen zeigten alle untersuchten Linien dasselbe fluoreszenzmikroskopische Bild. Die Negativkontrolle zeigte erwartungsgemäß kein CFP-Signal.

Insgesamt war festzustellen, dass mit den verwendeten Konstrukten (s. Abbildung 39) nur eine sehr schwache rekombinante Expression in der Pflanze und keine erfolgreiche Lokalisation in Chloroplasten nachgewiesen werden konnten.

6 Analyse der endogenen Promotoren der Zielgene

Wie in IV5.1 beschrieben, erfolgte die Expression des Aptamers 25Q6 in der Modellpflanze *A. thaliana* zunächst mithilfe des starken, konstitutiven Promotors CaMV-35S (p35S), der in einer Vielzahl pflanzlicher Gewebe aktiv ist und eine ubiquitäre Expression des Aptamers *in planta* sichern sollte. Da in transgenen *Arabidopsis*-Linien unter der Kontrolle von p35S jedoch nur eine sehr schwache Expression sowohl des CFP-Aptamer-Fusionsproteins, als auch des alleinigen CFP-Proteins (Kontrolle) nachgewiesen wurde (s. Abbildung 41), ist der verwendete konstitutive Überexpressionspromotor möglicherweise nicht geeignet oder kontraproduktiv für die Ausprägung des CFP-fusionierten Aptamers in *Arabidopsis*.

Der Einsatz der endogenen Promotoren bot indes eine Möglichkeit, Gewebe, Zeitpunkt und Höhe der Aptamer-Expression in der Pflanze gezielt dem Expressionsmuster des interagierenden Zielproteins (also des *Baits*) anzupassen. Auf diese Weise könnten beispielsweise Modifikation und Lokalisation (Chloroplast) des rekombinanten Aptamer-Fusionsproteins dem Zielenzym angepasst, die Aptamer-Enzym-Interaktion begünstigt und somit der Effekt auf den Carotinoid-Stoffwechsel intensiviert werden. Voraussetzung für den Einsatz der ausgewählten putativen Promotor-Bereiche für eine stabile *in planta*-Expression war der Nachweis ihrer Funktionalität, insbesondere da diese in der Literatur bislang nur wenig untersucht worden ist. Hierzu wurden aufgrund von *in silico*-Analysen der intergenischen Regionen des *A. thaliana*-Genoms Bereiche festgelegt, die sich *upstream* von den Zielgenen befinden und vermutlich die für die Promotoraktivität notwendigen regulatorischen Elemente umfassen. Diese Sequenzen wurden amplifiziert, kloniert und hinsichtlich ihrer Promotor-Aktivität mithilfe transkriptioneller Fusionen mit einem Reporter gen getestet. Diese putativen Promotoren werden im Folgenden einfachheitshalber als „Promotoren“ bezeichnet (*BH2*-Promotor *pBH2*, *EC*-Promotor *pEC*, sowie zwei verschieden lange Varianten des *PSY*-Promotors *pPSY* und *pPSY_s*, wobei *s* für *short* steht). Die über die endogenen Promotoren gesteuerte Reporter-Expression wurde zur Überprüfung der Gewebespezifität zunächst im homologen System *A. thaliana* anhand entsprechender transgener Linien untersucht. Da die Aptamere jedoch letztendlich in Nutzpflanzen ausgeprägt werden sollten, wurde die Funktionalität (Aktivität, Gewebespezifität, relative Promotorstärke) der ausgewählten Promotor-Regionen auch im heterologen System *S. lycopersicum* in einem transienten Assay getestet. Mit allen Promotoren außer *pPSY_s* konnte in beiden Pflanzen-Arten Reporter-Aktivität nachgewiesen werden.

6.1 Klonierung der endogenen Promotoren für Expressionsstudien

In der Literatur sind die Promotoren der drei Zielgene *BH2*, *EC* und *PSY* in *A. thaliana* bislang kaum beschrieben. Einzig zum *PSY*-Promotor wurden bereits einige Untersuchungen hinsichtlich

struktureller und funktioneller Eigenschaften durchgeführt (Welsch u. a., 2003). Um die Promotorregionen festzulegen, wurden die genomischen Sequenzen im Bereich der Zielgene auf Chromosom 5 von *A. thaliana* analysiert (Abbildung 42 bis Abbildung 44, TAIR SeqViewer). Da sich der Promotor eines Gens definitiv vor (bzw. *upstream* von) dem Start des Zielgens und hinter dem Ende des *upstream* gelegenen Gens befindet (wobei Überlappungen mit dem *upstream* gelegenen Gen nicht ausgeschlossen werden können), wurde der komplette Bereich zwischen den beiden Genen für die Klonierung ausgewählt. Die Längen der klonierten Promotor-Sequenzen entsprechen daher der Größe der intergenischen Regionen. Diese Bereiche sind in den Abbildung 42 bis Abbildung 44 dargestellt.



Abbildung 42: Ausschnitt der DNA-Sequenz des Chromosoms 5 aus *A. thaliana*, auf dem sich das *BH2*-Gen befindet. Gezeigt ist der *sense*-Strang des Chromosoms. Die Exon-Sequenzen des *BH2*-Gens sowie des *upstream* gelegenen Gens sind gelb dargestellt, die Translations-Startcodons des jeweils ersten Exons sind blau unterlegt. Weiterhin eingezeichnet ist der 5'UTR des *BH2*-Gens (rot). Der Bereich, der den *BH2*-Promotor enthält, liegt zwischen dem 5'UTR des *BH2*-Gens und dem Startkodon des *upstream* gelegenen Gens.

Da die Transkriptionsstartpunkte teilweise nicht exakt beschrieben worden sind und die 5'UTRs möglicherweise auch wichtige regulatorische Elemente, insbesondere für die Translation, enthalten (van der Velden und Thomas, 1999), wurden sie für die Promotor-Klonierungen mit einbezogen.

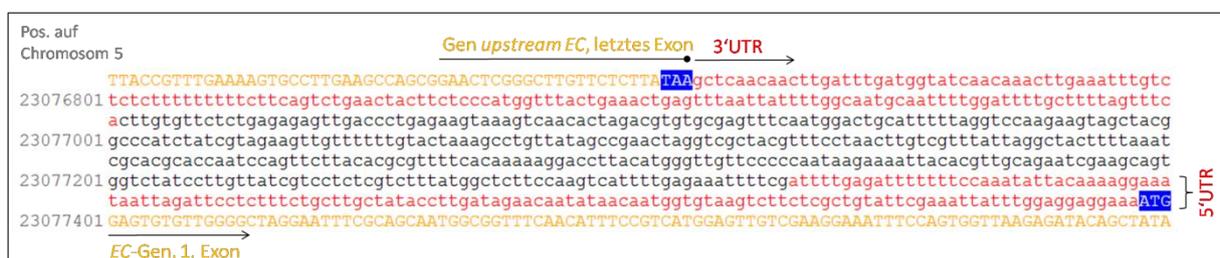


Abbildung 43: Ausschnitt aus Chromosom 5 von *A. thaliana* mit Anfang des *EC*-Gens, Ende des Gens *upstream* von *EC*, sowie dem DNA-Bereich dazwischen, der den *EC*-Promotor enthält. Die Exon-Sequenzen der Gene sind gelb dargestellt, die UTRs rot. Stopp- und Startkodons für die Translation sind blau unterlegt.

Beim putativen *EC*-Promotor wurde außerdem auch der 3'UTR (3' *untranslated region* = 3'-untranslatierter Bereich) des *upstream* von *EC* gelegenen Gens in die klonierte Sequenz mit

| | | | |
|------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|------|
| cacgagtcagctcgagagtcgcatctcgccagtcaa | aaactaaattaaaaaac | tatata gacccaaaaaat | -136 |
| aaaaataacgacttttgtatatt tata ctggcaagat | tctcattaa | aaccagcaaaaaaaaaaaaaaaaaaagac | -66 |
| caaagaaggaagaaaatttgagtggtgagaat | tttacgatagaggaagagacagcatcatct | aCTTg | 4 |
| tgTTGTCTGTGTACATATATTACAGTAAGCGTTGC | AATATAACTTTGAGGATCTTCTCACATTAATGGCT | | 74 |
| GTCAAACCTTTTGTCTTCCTTTTGATTAATTTAG | TGTTTGACAATTCCTCCTCCTTCTCCTTCTTCTTC | | 144 |
| CAAAGTTTTGTGCGCAGTATCTATTGTTCTTACAGA | GAGAAAAGGt | agcttttgtgtccatcactcattttg | 214 |
| Cgctcgtttggttaagcttcatctgccatgtggtt | cactgtttt | gaacttttgggctcctatacctaatt | 284 |
| Gttgatgtaacacacagatacataatctaatttgt | tttcgagtg | gaaatagttgaaccagttgagtata | 354 |
| Ttagccaatacagattagaggatttacttgbttttt | ctcttttcatgtcttcatttgccttttgaagatcct | | 424 |
| Tcctctttatgttgtgtctcttcgctattttact | tgcttgaagaattgagtttctcatctcgttaaaa | | 494 |
| Tttggctttatatacagatttagagatctcgattc | ctaactctacttttttgtattcaatttgcaggAAG | | 564 |
| AGCTTTAGTCTTTTACCAGTTTGATCCAATTCTGG | GTTTCACTGAAAAAAGTTGGGAGTTTGATTCTTCA | | 634 |
| TAACTGTAGAAGAAACAGAGTCAACAGAAGAAAAC | TAAAAAAGTTGAGATTTTTCTCTCACGCGCTCAAG | | 704 |
| pPSY ← +716 | | | |
| AACTTGAGTATG | | | 716 |

Abbildung 45: Ausschnitt aus Chromosom 5 von *A. thaliana* (modifiziert nach Ralf Welsch u. a. 2003), inverse Darstellung des *antisense*-Strangs. Gezeigt ist der Bereich vor dem Translationsstartkodon, also dem Beginn des 1. Exons. Die Intron-Sequenz ist in Kleinbuchstaben und kursiv dargestellt, der 5'UTR bzw. der übrige transkribierte DNA-Bereich in Großbuchstaben. Die nicht kursiven Kleinbuchstaben geben die nicht transkribierte genomische DNA upstream des *PSY*-Transkriptionsstarts wieder. +1 steht für den Transkriptionsstartpunkt, das Translationsstartkodon ist unterstrichen. Putative TATA-Boxen sind fett gedruckt und höhergestellt. Farblich eingetragen sind die Stellen im Genom, bis zu welchen sich beiden die ausgewählten Promotorbereiche erstrecken. Daraus wird ersichtlich, um welchen Teil *pPSY_s* (rot) im Vergleich zu *pPSY* (blau) verkürzt ist. *pPSY_s* reicht bis zum Transkriptionsstart (nach Welsch *et al.*), *pPSY* bis zum Translationsstart.

Die von Welsch *et al.* (Lit.) durchgeführte Analyse des DNA-Bereichs *upstream* vom *PSY*-Transkriptionsstart unterscheidet sich hinsichtlich der Festlegung des Transkriptionsstarts von den Aussagen, die über den TAIR SeqViewer erhalten wurden. Laut TAIR SeqViewer beginnt entsprechend Abbildung 44 der 5'UTR-Bereich (Anfang des Transkripts) weiter *upstream* des Translationsstart. Dies würde laut der Nummerierung in Abbildung 45 der Position -64 entsprechen. Für die Klonierung von *pPSY_s* wurde die Sequenz von Position -1 an bis zum *upstream* von *PSY* gelegenen Gen kloniert. Bei *pPSY_s* wurde der 5'UTR (bzw. laut TAIR SeqViewer ein Teil des 5'UTR), sowie die kodierende Sequenz für das erste *PSY*-Intron weggelassen. Gegenüberstellung der beiden Promotor-Sequenzen gibt Aufschluss darüber, in wieweit der *PSY*-5'UTR wichtig für die Regulation der Genexpression ist.

Die Klonierung der ausgewählten Promotor-Bereiche erfolgte in den Pflanzenexpressionsvektor pBatTL-GUS. Hierbei handelte es sich um einen Promotor-losen Vektor, der das *GUSB*-Gen (kodierende Sequenz des Enzyms β -Glucuronidase) enthält (s. Abbildung 46).

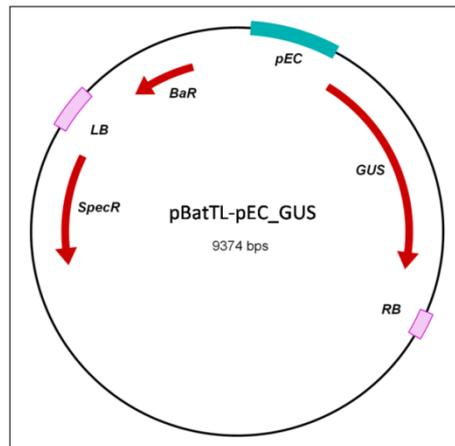


Abbildung 46: Plasmidkarte des Pflanzenexpressionsplsmids pBatTL-pEC_GUS. Die Funktionalität des EC-Promotors wird über pEC-gesteuerte Expression des Reportergens GUS in der Pflanze überprüft. LB steht für *left border*, RB für *right border*, BaR ist das BASTA-Resistenzgen, SpecR vermittelt die Resistenz gegen das Antibiotikum Spectinomycin.

Ausschnitte aus den Expressionskassetten der erstellten Plasmide sind in Abbildung 47 gezeigt. Kloniert wurden die Promotorsequenzen pBH2 (1164 bp), pEC (642 bp), pPSY (2028 bp), sowie der verkürzte PSY-Promotor pPSY_s (1315 bp).

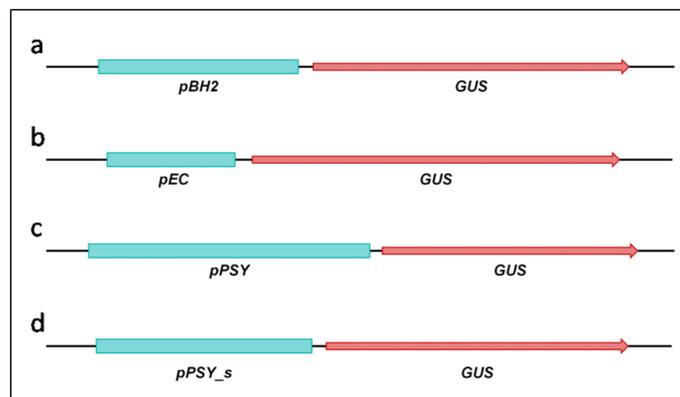


Abbildung 47: Ausschnitt aus den Expressionskassetten der Pflanzenexpressionsplasmide pBatTL-pBH2_GUS (a), pBatTL-pEC_GUS (b), pBatTL-pPSY_GUS (c), pBatTL-pPSY_s_GUS (d), mithilfe derer die Aktivitäten der endogenen Promotoren der Zielenzyme in der Pflanze getestet werden können.

Mithilfe von Agrobakterien wird die jeweilige Expressionskassette (Abbildung 47) aus dem Plasmid ins pflanzliche Genom integriert, so dass in den transgenen Pflanzen eine GUS-Expression stattfindet, die von dem jeweiligen Promotor pBH2, pEC, pPSY oder pPSY_s gesteuert wird.

6.2 Analyse der Promotor-Aktivitäten via GUS-Expression in *A. thaliana* cv. Columbia

Zur experimentellen Analyse der Stärke und Gewebespezifität der klonierten Promotor-Sequenzen wurden entsprechende GUS-Reportergenkonstrukte erzeugt (Abbildung 46) und *Agrobacterium*-vermittelte Pflanzentransformationen mit *A. thaliana* durchgeführt. Acht BASTA-selektierte BH2:GUS-transgene Linien der T1-Generation wurden im Alter von acht Wochen auf

Reportergenexpression hin untersucht (Abbildung 48). *pPSY_s*, die verkürzte Version des *PSY*-Promotors, stellte sich in *A. thaliana* unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen als inaktiv heraus. In der Folge wurden *pPSY_s*-enthaltende *Arabidopsis*-Pflanzen als Negativkontrollen beim Überprüfen der übrigen Promotoren eingesetzt (s. Abbildung 48 unten).



Abbildung 48: Nachweis der Stärke des *BH2*-Promotors *pBH2* über *GUS*-Expression (obere Reihe). *GUS*-Staining von Blüte, Blatt, Schote mit enthaltenen Samen und Keimling, entsprechend den Bild-Beschriftungen. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen. Als Negativ-Kontrolle (untere Reihe) dient eine stabile transgene *A. thaliana*-Linie, die das Konstrukt *pPSY_s:GUS* trägt, in dem der verkürzte *PSY*-Promotor nicht aktiv ist.

Der *BH2*-Promotor zeigte bei allen untersuchten Pflanzenlinien eine sehr schwache Expression des *GUS*-Reportergens (Abbildung 48 oben). In der Blüte sowie in Stängel und Stängelblättern (nicht gezeigt) war kein *GUS*-Protein detektierbar. Im Vergleich mit der Negativ-Kontrolle (*pPSY_s:GUS*, Abbildung 48 unten) war eine schwache Expression in Rosettenblättern sowie in den Samen der Schoten im späten Entwicklungsstadium zu erkennen. Die Samen waren bei den *pBH2:GUS*-enthaltenden Pflanzen innerhalb der Schoten als dunkle Punkte erkennbar (Lichtmikroskop), was bei keinem anderen Promotor-Konstrukt beobachtet werden konnte. Dies deutete auf die zu erwartende starke *pBH2*-gesteuerte *GUS*-Expression in den Samen bzw. Embryos hin. Die Schoten an sich zeigten keine *GUS*-Färbung, schwache *GUS*-Expression war an einigen Stellen des Wurzel-Gewebes des Keimlings zu sehen. Weiterhin wurde *pBH2*-Aktivität im Keimling verzeichnet, vor allem in den Keimblättern und etwas schwächer in einigen der weiteren Blätter.

Die Transformation von *A. thaliana* mit *pEC:GUS* wurde analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise bei *pBH2* durchgeführt. Auch für *pEC* wurden die T1-Generationen achter transgener BASTA-selektierter Pflanzenlinien hinsichtlich der *pEC*-gesteuerten *GUS*-Expression in verschiedenen Pflanzenteilen untersucht. Die Ergebnisse des *GUS*-Stainings sind in Abbildung 49 dargestellt.

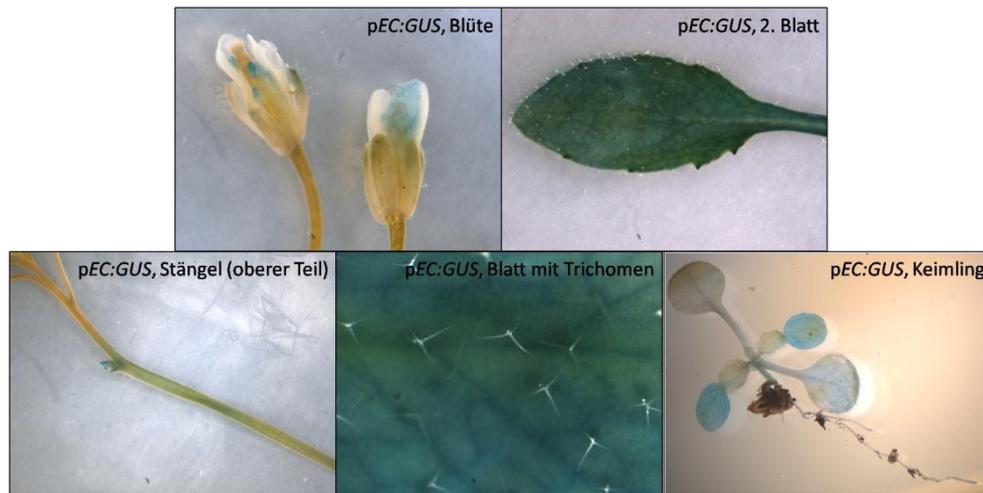


Abbildung 49: Aktivität des *EC*-Promotors *pEC* in verschiedenen Geweben von *A. thaliana*. Gezeigt ist der Nachweis der *pEC*-gesteuerten *GUS*-Expression in Blüte, Blatt, Stängel und Keimling, entsprechend den Bild-Beschriftungen. Als Negativ-Kontrolle diente dieselbe Pflanzenlinie wie in Abbildung 48.

Unter der Kontrolle des *EC*-Promotors (Abbildung 49) konnte eine wesentlich stärkere Expression des *GUS*-Reportergens festgestellt werden als bei *pBH2* (Abbildung 48). Im ganzen zweiten Blatt konnte eine starke Promotor-Aktivität nachgewiesen werden, ebenso wurde *GUS*-Expression in den Blütenblättern, den Staubblättern und dem oberen Teil des Stängels detektiert. Die Trichome der Blätter blieben farblos, was bedeutete, dass *pEC* hier nicht aktiv war. Auch in den Schoten und Samen wurde keine Expression festgestellt (nicht abgebildet). Im Keimling war *pEC* deutlich aktiver als *pBH2*, auch hier fand die Expression hauptsächlich in den Kotyledonen statt und außerdem in den ersten Blättern, sowie im Hypokotyl und in der Keimlings-Wurzel – allerdings ausschließlich im Meristem-Gewebe. Als Negativkontrollen für den *GUS*-Nachweis dienten dieselben Pflanzen wie bei dem *GUS-Staining* der transgenen *pBH2*-enthaltenden Pflanzen (Abbildung 48), so dass sie nicht erneut aufgezeigt werden.

Das *pPSY*-enthaltende Pflanzenexpressionsplasmid wurde, wie bei *pBH2* und *pEC* auch, in *A. tumefaciens* transferiert und *A. thaliana* mit den transgenen Argobakterien transformiert. Die T1-Generationen von acht transgenen BASTA-resistenten Pflanzenlinien, welche die *pPSY:GUS*-Expressions-kassette enthielten, wurden hinsichtlich *GUS*-Expression in verschiedenen Pflanzenteilen untersucht. Die Ergebnisse des *GUS-Stainings*, also des Reporter-Nachweises auf Proteinebene, ist in Abbildung 50 gezeigt.

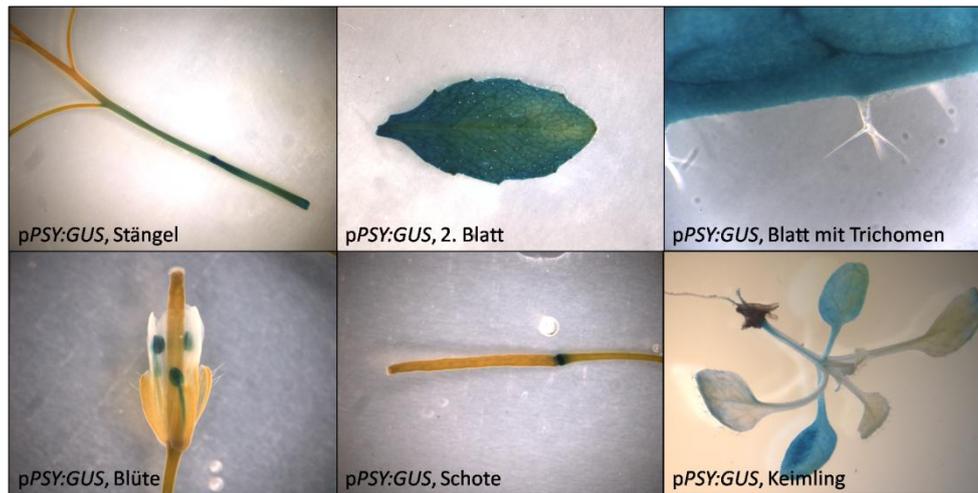


Abbildung 50: GUS-Staining zum Nachweis der Stärke des *PSY*-Promotors in unterschiedlichen *A. thaliana*-Organen über GUS-Expression. Gezeigt ist der Nachweis der Promotor-Aktivität in Stängel, Blatt, Blüte, Schote und Keimling. Die Negativ-Kontrolle war dieselbe wie in Abbildung 48 und ist hier nicht nochmals abgebildet.

Abbildung 50 zeigt die Pflanzenteile der transgenen *A. thaliana*-Linien, in denen *pPSY*-Aktivität via GUS-Expression nachgewiesen werden konnte. Entsprechend den Bild-Beschriftungen konnte eine intensive GUS-Färbung im oberen Teil des Stängels detektiert werden, sowie in Blättern (2. Blatt abgebildet). Die Trichome enthielten kein GUS-Protein. In den Staubblättern der Blüten wurde ebenfalls intensive GUS-Expression verzeichnet. Weiterhin wurde eine hohe GUS-Aktivität am unteren Teil der Schoten festgestellt (Schoten-Träggewebe, entspricht dem Blütenboden), nicht jedoch in der Schote selbst. Auch im Keimling wies der *PSY*-Promotor die eindeutig stärkste Expressionsrate der untersuchten Promotoren auf, in Keimblättern sowie Stängel (insbesondere das innere Leitgewebe) wurde der Reporter in besonders hohen Mengen ausgeprägt. Sehr starke GUS-Expression fand auch in der kompletten Wurzel und im Hypokotyl des Keimlings statt.

Abschließend ist festzuhalten, dass der *PSY*-Promotor den durchgeführten GUS-Expressionsanalysen zufolge der stärkste der drei untersuchten Promotoren ist und der *BH2*-Promotor, abgesehen von der hohen Aktivität in den Samen, der mit Abstand schwächste.

6.3 Analyse der Promotor-Aktivitäten via GUS-Expression in *S. lycopersicum*

Neben der Prüfung des 25Q6-CFP-Fusionsproteins in transgenen *A. thaliana*-Linien (dem homologen System der Zielenzyme), war die stabile Transformation von *S. lycopersicum* als agronomisch wichtiger Nutzpflanze mit selbigem Aptamer-Konstrukt ein weiteres Ziel zur Charakterisierung und Evaluierung der Aptamer-basierten Enzym-Modifikationsstrategie. Dies diente insbesondere dazu, die Übertragbarkeit der Wirksamkeit des entwickelten Aptamers auf das homologe Enzym einer anderen Pflanze zu überprüfen.

Das Ziel ist eine Änderung des Carotinoid-Gehalts in Tomatenfrüchten. Ein transgener Ansatz sollte daher idealerweise eine fruchtspezifische Aptamer-Expression hervorrufen. Zur Überprüfung der Aktivität der *A. thaliana*-Promotoren in Tomatenfrüchten (heterologes System) wurde das von Orzaez u. a. (2006) publizierte Testverfahren etabliert und angewendet.

Hierzu wurden abgetrennte Früchte von *Solanum lycopersicum* cv. Micro Tom verschiedener Reifestadien (Farben: grün, gelb, rot zum Zeitpunkt der *Agrobacterium*-Infiltration) mit transgenen *A. tumefaciens* infiltriert, die die Pflanzenexpressionsplasmide pBatTL-pBH2_GUS, pBatTL-pEC_GUS, pBatTL-pPSY_GUS, sowie pBatTL-pPSY_s_GUS (s. Abbildung 46 und Abbildung 47) enthielten. Als Negativ-Kontrolle diente pBatTL-p35S_RFP. Die Tomaten-Infiltration erfolgte nach Orzaez u. a. (2006). Nach viertägiger Inkubation der Tomatenfrüchte bei 25 °C unter Langtag-Bedingungen wurden die Tomatenfrüchte in Scheiben geschnitten und hinsichtlich der Promotor-Aktivität bzw. der Expression des *GUS*-Reportergens untersucht. Für jedes Konstrukt wurden je zehn Früchte pro Reifestadium untersucht. Die Ergebnisse des *GUS*-Stainings sind in Abbildung 51 dargestellt.

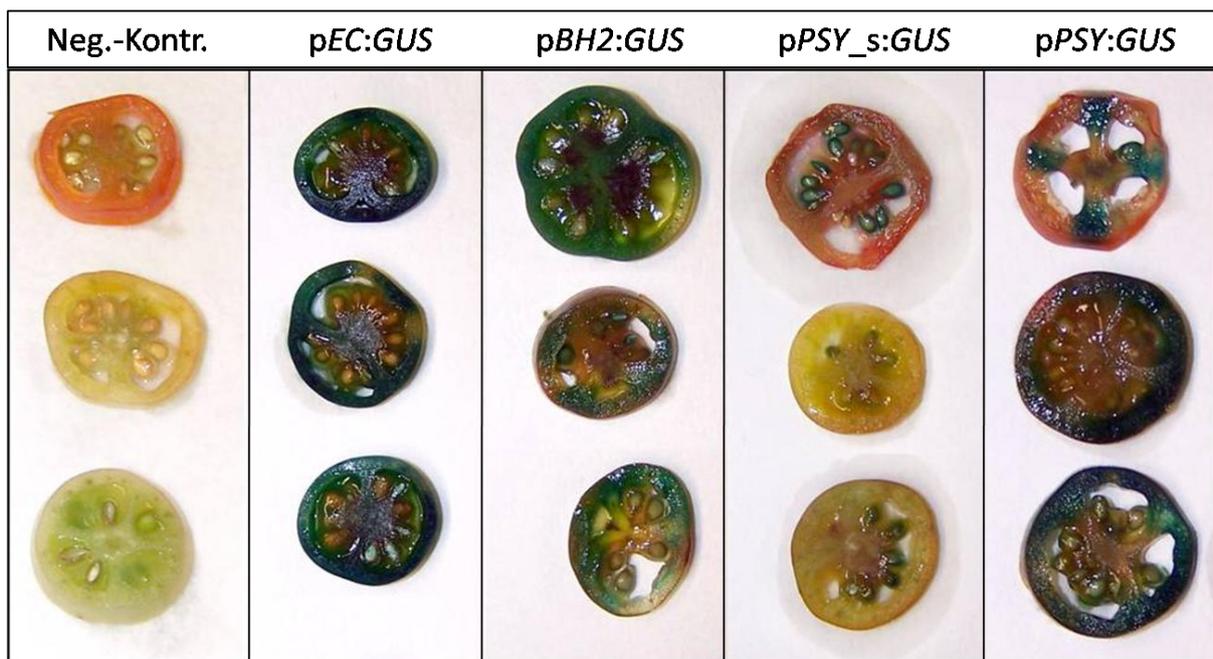


Abbildung 51: Ergebnisse des *GUS*-Stainings von Tomatenfrüchten der Pflanze *S. lycopersicum* cv. Micro Tom nach Infiltration mit transgenen *Agrobacterien*. In den Tomaten ausgeprägt wurde das Reportergen *GUS* unter der Kontrolle der Promotoren pBH2, pEC, pPSY und pPSY_s. Als Negativ-Kontrolle wurde RFP unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert.

Wie in Abbildung 51 zu erkennen ist, waren die drei Promotoren pBH2, pEC und pPSY in den Tomatenfrüchten aktiv. Wie bereits erwähnt wurden grüne, gelbe und rote Tomatenfrüchte infiltriert, um zu überprüfen, ob die Promotor-Aktivitäten abhängig sind vom Entwicklungsstadium der Frucht. In Abbildung 51 entstammt jeweils die oberste der drei dargestellten Tomatenscheiben einer roten Frucht, die mittlere einer gelben und die unterste einer grünen Frucht. Da die Früchte vor

dem GUS-Staining vier Tage unter den oben genannten Bedingungen inkubiert wurden, hat sich ihre Farbe durch Nachreifen verändert, so dass die Tomaten in Abbildung 51 nicht mehr die ursprüngliche Färbung aufweisen. Auch durch das GUS-Staining wurde die ursprüngliche Färbung der Früchte verändert.

Die schwächste Expression des GUS-Reporters fand, wie in *A. thaliana* auch, bei pBH2 statt. Bei den getesteten Tomaten konnte eine durchgängige Abhängigkeit der Expressionsstärke vom Entwicklungsstadium der Frucht beobachtet werden. Der Promotor zeigte in den voll ausgereiften roten Früchten (oben) die stärkste Aktivität, hier war Expression im Fruchtfleisch, in den Septa sowie in Placenta und Columnella zu beobachten. Nach Infiltration in grüne (unten) und gelbe Früchte (Mitte) konnte nur im Fruchtfleisch GUS-Expression beobachtet werden. Die stärkste Expression zeigte in den Tomaten der EC-Promotor. Dieses Ergebnis unterschied sich von demjenigen aus den *Arabidopsis*-Experimenten – dort war der PSY-Promotor der mit Abstand Stärkste von allen.

pEC war in allen drei Reifestadien und in sämtlichen sichtbaren Geweben der Tomatenfrüchte aktiv: Intensive GUS-Färbung konnte im Fruchtfleisch, in den Samen, in der Epidermis und in der Gallertartigen Substanz um die Samen beobachtet werden, ebenso in Septa, Placenta und Columnella. Der verkürzte Promotor pPSY_s, der in *A. thaliana* keine Aktivität zeigte, war auch in den Tomatenfrüchten nicht funktionell. Einige der untersuchten Früchte zeigten eine sehr schwache GUS-Färbung um die Samen, allerdings wurde dies nicht bei allen Tomaten beobachtet, so dass es sich bei diesem Phänomen höchstwahrscheinlich um eine unspezifische Färbung bzw. eine Art Hintergrund handelte. Unter der Kontrolle von pPSY, der längeren Variante des PSY-Promotors, konnte in den Früchten eine starke GUS-Expression verzeichnet werden. Die Aktivität von pPSY zeigte die deutlichste Abhängigkeit vom Entwicklungs- bzw. Reifestadium der Frucht zum Zeitpunkt der *Agrobacterium*-Infiltration. Wie in Abbildung 51 ganz rechts zu erkennen, zeigte der PSY-Promotor bei der ursprünglich grünen (unten) und gelben Frucht (Mitte) starke Aktivität im kompletten Fruchtfleisch, wohingegen in der Tomate, die bei der Infiltration bereits rot war (oben), schwächere GUS-Expression festzustellen war. Die Blau-Färbung war weniger intensiv und beschränkte sich auf diejenigen Bereiche im Fruchtfleisch, die in die Septa (Scheidewände) übergehen. In den Septa sowie im Placenta- und Columnella-Gewebe zeigte pPSY keine Aktivität, auch nicht in den Samen. Die Negativ-Kontrolle (Abbildung 51, ganz links), bei der die Tomatenfrüchte mit Agrobakterien transformiert wurden, die RFP über den 35S-Promotor exprimieren, konnte wie erwartet keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass alle drei untersuchten Promotoren in *S. lycopersicum* funktionell waren, deckte sich mit den Ergebnissen der *in silico*-Analyse bezüglich regulatorischer Elemente, in der mehrere tomatenspezifische TATA-Boxen gefunden wurden, die eine Transkription initiieren könnten (s. Tabelle 19). Insgesamt ist festzustellen, dass von allen drei Promotoren der EC-Promotor für eine

rekombinante Expression in *S. lycopersicum* am besten geeignet ist, da er in allen Geweben der Frucht, sowie in sämtlichen Reifestadien aktiv war.

6.4 *in silico*-Analysen regulatorischer Elemente

Die klonierten putativen Promotorsequenzen wurden mithilfe der Programme *PLACE*, *Plant Care* und *AtcisDB* (Molina und Grotewold, 2005; Lescot u. a., 2002; Higo u. a., 1999) auf die Anwesenheit bekannter regulatorischen cis-Elemente hin untersucht, wobei die 5'UTR-Sequenzen von der Analyse ausgeschlossen wurden, da diese vermutlich hauptsächlich an der posttranskriptionalen Regulation bzw. an der Regulation der Proteinbiosynthese beteiligt sind (Pickering und Willis, 2005).

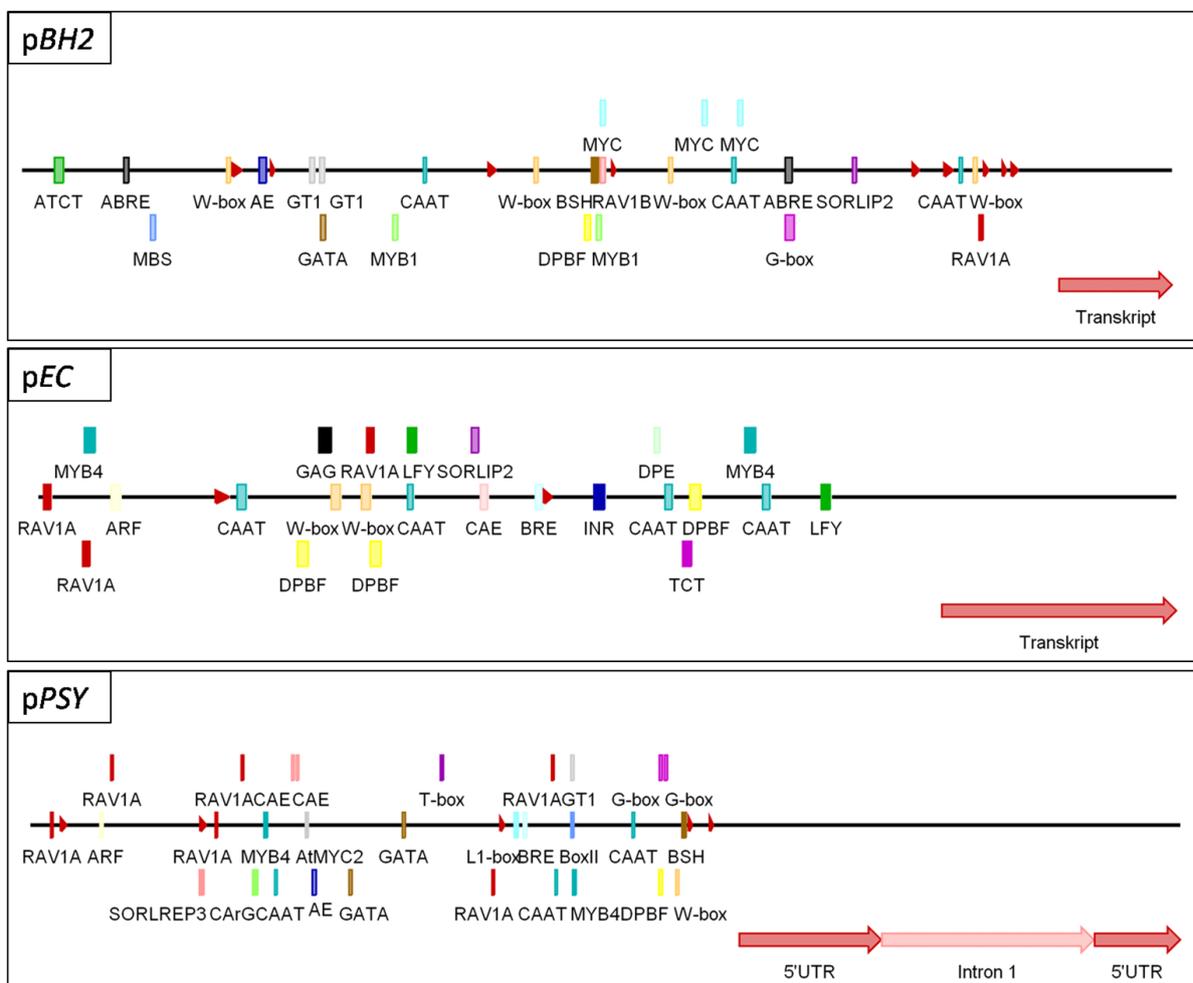


Abbildung 52: Analyse der putativen endogenen Promotor-Sequenzen hinsichtlich bekannter regulatorischer Elemente für *A. thaliana*. Entsprechend der Beschriftung ist oben die *BH2*-Promotorsequenz gezeigt, in der Mitte der *EC*-Promotor und unten der *PSY*-Promotor (volle Länge). Eingetragen sind die jeweils gefundene Motive, Boxen und TF-Bindestellen. In Tabelle 19 sind die Sequenzen / Konsensussequenzen aller Elemente aufgelistet, sowie die Funktionen, die sie in der Pflanze erfüllen. Für Promotoren ist jeweils der Anfang des längsten identifizierten Transkripts mit den entsprechenden 5'UTR-Bereichen (*pBH2*: 115bp, *pEC*: 133bp und *pPSY*: 778bp) eingezeichnet (rote Pfeile). Die identifizierten regulatorischen Elemente sind angegeben. Putative *A. thaliana*-TATA-Boxen sind als kurze rote Pfeile dargestellt.

In Abbildung 52 sind die drei endogenen Promotoren *pBH2*, *pEC* und *pPSY* schematisch dargestellt, sowie die regulatorische Elemente eingetragen, die innerhalb der Sequenzen gefunden wurden.

In Tabelle 19 sind die in Abbildung 52 eingetragenen regulatorischen Elemente mit entsprechender Sequenz, Position und zugehöriger Beschreibung der Funktion, die sie in der Pflanze erfüllen, aufgelistet. Außer den *Arabidopsis*-spezifischen Motiven sind hier auch TATA-Boxen für *S. lycopersicum* eingetragen, da die Funktionalität der endogenen Promotoren nicht nur im heterologen Organismus *A. thaliana*, sondern auch in *S. lycopersicum* untersucht werden soll.

Tabelle 19: Auflistung aller regulatorischen Elemente, die innerhalb der untersuchten Promotoren *pBH2*, *pEC* und *pPSY* gefunden wurden. Gezeigt sind Bezeichnung und Funktion des Elements, sowie in welchem Promotor die Konsensussequenz gefunden wurde und an welcher Position. Elemente, die an der Regulation der Genexpression durch Licht beteiligt sind, sind grün unterlegt. Gelb gekennzeichnet sind solche Motive, die eine Reaktion auf Abscisinsäure vermitteln.

| Regulatorisches Element | Ziel-Promotor | Sequenz und Position | Funktion |
|-------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TATA-Box, <i>A. t.</i> | <i>pBH2</i> | TATATAA, 1002-1008 TATA, 993-996 TATAA, 974-978 TATTATAAA, 934-942 TTTATAT, 902-908 TATA, 598-601 | Kern-Element in Promotoren, ca. 30 nt <i>upstream</i> des Transkriptionsstarts gelegen; kontrolliert Transkriptionsrate und bestimmt Position und Anzahl der Transkriptionsstartstellen |
| | <i>pEC</i> | TTATA, 286-290 | |
| | <i>pPSY</i> | TTTATA, 1204-1199 TATATA, 1162-1167 TATATAT, 830-836 | |
| TATA-Box, <i>S. l.</i> | <i>pBH2</i> | TTTTTA, 998-1003 TTTTA, 613-617 | Siehe TATA-Box, <i>A. t.</i> |
| | <i>pEC</i> | TTTTA, 338-342 TTTTTA, 221-226 | |
| | <i>pPSY</i> | TAAAA, 1225-1221 TAAAAA, 1184-1179 TAAAAAA, 1160-1154 | |
| CAAT-Box | <i>pBH2</i> | CAAT, 949-952 ATTGG, 723-719 CAAT, 407-410 | Typisches <i>cis-acting element</i> in Promotor- und <i>Enhancer</i> -Regionen, ca. 50 nt <i>upstream</i> der TATA-box |
| | <i>pEC</i> | CCAAT, 409-413 CCAAT, 354-358 CAAT, 209-212 GGCAAT, 113-118 | |
| | <i>pPSY</i> | ATTGG, 1066-1062 CCAAT, 926-930 CCAAT, 432-436 | |
| W-Box | <i>pBH2</i> | TTGAC, 963-967 GTCAA, 655-659 GTCAA, 523-519 GTCAA, 212-208 | löst Reaktion auf Verwundung und Pathogene aus, bindet TFs des Typs WRKY |
| | <i>pEC</i> | GTCAA, 184-188 TTGACC, 166-171 | |
| | <i>pPSY</i> | GTCAA, 1140-1144 | |
| AE-Box | <i>pBH2</i> | AAGTTTCT, 248-241 | <i>activating element</i> , Teil eines DNA-Moduls für Reaktion auf Licht |
| | <i>pPSY</i> | ATGTTTCT, 498-505 | |
| G-Box | <i>pBH2</i> | GCCACGTGGA, 773-782 | Teil des <i>rbca</i> -DNA-Moduls für Reaktion auf Licht |

| | | | |
|------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| L1-Box | pPSY | TACATTTA, 861-854 | L1-spezifische Genexpression im Meristem |
| T-Box | pPSY | CAAAGT, 729-724 | Promotor-Motiv Chloroplasten-lokalisierter Proteine |
| LFY | pEC | CAGTGG, 442-447 CAATGG, 209-214 | bindet LFY-TFs, reguliert blütenspezifische Genexpression |
| GAG | pEC | GAGAGAGT, 159-166 | Teil des <i>rbcA</i> -DNA-Moduls für Reaktion auf Licht |
| TCT | pEC | TCTTAC, 364-369 | Teil des <i>gapB</i> -DNA-Moduls für Reaktion auf Licht |
| ATCT | pBH2 | AGATCAGATT, 43-34 | Teil des <i>gapA</i> -DNA-Moduls für Reaktion auf Licht |
| GT1/BoxII | pBH2 | TTTATC, 307-302 TTAACC, 297-292 | Element für Reaktion auf Licht, bindet GT1-Kernproteinfaktor |
| | pPSY | TTAACC, 959-954 | |
| RAV1A/B | pBH2 | CAACA, 969-973 CACCTG, 586-591 | Bindung von ABI3VP1-TFs über zwei DNA-Bindestellen |
| | pEC | CAACA, 186-190 CAACA, 26-30 CAACA, 4-8 | |
| | pPSY | TGTTG, 924-920 TGTTG, 819-815 CAACA, 373-377 CAACA, 327-331 CAACA, 143-147 CAACA, 37-41 | |
| | | | |
| SORLIP2 | pBH2 | GGCCC, 845-841 | Schlüssel-Element für Licht-regulierte Genexpression |
| | pEC | GGCCC, 249-245 | |
| SORLREP3 | pPSY | TGTATATAT | Schlüssel-Element für Licht-regulierte Genexpression |
| CaRG | pPSY | CCTTATTTGG, 402-393 | Regulation der Blütenentwicklung |
| DPBF | pBH2 | CTTGTGT, 576-570 | bindet bZIP-TFs, beteiligt an Lichtregulation, Reaktion auf Abscisinsäure |
| | pEC | ACACGCG, 368-374 ACACTAG, 188-194 CTTGTGT, 153-147 | |
| | pPSY | ACACGAG, 1109-1115 | |
| ARF | pEC | TGTCTC, 42-47 | Reaktion auf Auxin |
| | pPSY | TGTCTC, 124-129 | |
| BSH | pBH2 | AAATTTAAA, 577-584 | bindet Homeobox-Proteine, Reaktion auf Wasserbedingten Stress und Abscisinsäure |
| | pPSY | AAATTTAAA, 1150-1157 | |
| CAE | pEC | ATCTA, 250-254 | <i>cis-acting element</i> , typisch für Promotoren der Carotinoid-Stoffwechsel-Gene |
| | pPSY | ATCTA, 470-474 ATCTA, 462-466 | |
| GATA | pBH2 | TTATCA, 308-303 | bindet GATA-TFs, verantwortlich für lichtregulierte Transkription |
| | pPSY | TTATCA, 662-657 TTATCA, 568-563 | |
| MYC | pBH2 | CACCTG, 586-591 CATCTG, 689-694 CATGTG, 725-730 | Reaktion auf Abscisinsäure, Lichtregulation, bindet bHLH-TF, Teil von <i>rd22</i> -Modul |
| AtMYC2 | pPSY | CACATG, 486-491 | Reaktion auf Trockenstress und Abscisinsäure, bindet AtMYC2-TFs, Teil des <i>rd22</i> -Moduls |
| MYB1 | pBH2 | TAACCA, 293-298 AAACCA, 376-381 AAACCA, 582-587 | Reaktion auf Abscisinsäure, bindet MYB-TF, Teil von <i>rd22</i> -Modul |
| | | | |
| | | | |
| MYB4 | pEC | GGTTGTT, 405-399 AACAAAC, 27-33 | bindet MYB-TFs, Regulation des Zellzyklus und des sekundären Pflanzenstoffwechsels, Reaktion auf Umweltstress |
| | pPSY | ACCAAAC, 957-963 GTTTGT, 419-413 | |
| MBS | pBH2 | CAGTTA, 136-131 | Reaktion auf Abscisinsäure, bindet MYB-TF, Teil von |

| <i>rd29B</i> -Modul | | | |
|------------------------|-------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABRE | <i>pBH2</i> | GCCACGTG, 780-773 TACGTG, 104-109 | beteiligt an Reaktion auf Abscisinsäure und Licht, Teil von <i>rd29B</i> -Modul, bindet bZIP-TF |
| BRE^u | <i>pEC</i> | GCCTG, 281-285 | TFIIB-Bindestelle <i>upstream</i> der TATA-Box |
| BRE^d | <i>pPSY</i> | ATATTGT, 870-876 | TFIIB-Bindestelle <i>downstream</i> der TATA-Box |
| INR | <i>pEC</i> | CTAACTT, 314-320 | <i>initiation region</i> , Transkriptionsstartpunkt |
| DPE | <i>pEC</i> | CACG, 351-348 | TFIID-Bindestelle |

Beim *EC*-Promotor konnten putative Teile des Kernpromotors identifiziert werden, wie ein Transkriptionsstartpunkt (*initiation region*, INR) und Bindestellen der für die Transkriptions-Initiation notwendigen Transkriptionsfaktoren TFIID (DPE) und TFIIB (BRE). In allen drei Promotoren wurden mehrere putative TATA-Boxen gefunden. In *S. lycopersicum* ist die Konsensussequenz der TATA-Box (TTTAA) leicht abweichend von derjenigen für *A. thaliana* (TATA). In allen drei Promotoren konnten solche tomatenspezifische TATA-Boxen identifiziert werden. Dies lieferte einen ersten Hinweis, dass die aus *A. thaliana* stammenden Promotoren im heterologen Organismus *S. lycopersicum* ebenfalls funktional sein könnten. Dies war eine wesentliche Voraussetzung zur möglichen Anwendung dieser Promotoren für eine Transgen-Expression in der Nutzpflanze Tomate.

Aus Tabelle 19 geht weiterhin hervor, dass die drei Promotoren eine große Zahl an Motiven enthalten, die an der lichtgesteuerten Genregulation beteiligt sind (in Tabelle 19 grün unterlegt). Beispielsweise enthalten sowohl *pBH2* als auch *pPSY* das GT1-Motiv, das GATA-Motiv und eine AE-Box, die die Reaktion der Pflanze auf Licht steuern, sowie Teile des *rbcA*-Genmoduls, welches durch Licht aktiviert wird (G-Box, GAG-Motiv). Weiterhin enthalten *pBH2* und *pEC* ein ATCT- bzw. TCT-Motiv, beides Teile der *gapA/B*-DNA-Module, welche ebenfalls durch Licht reguliert werden, sowie das Schlüsselement SORLIP2. Ebenso ein Schlüsselement der Lichtregulation ist SORLREP3, das in *pPSY* auftritt.

Auffällig ist, dass insbesondere *pBH2* viele Elemente enthält, die an der Regulation der Genexpression via Abscisinsäure (ABA) beteiligt sind (Tabelle 19, gelb markiert), wie z.B. die Motive ABRE und MBS, beides Teile des *rd29*-DNA-Moduls, sowie MYC und MYB1, beides Elemente aus dem *rd22*-DNA-Modul. Weitere Elemente in *pBH2*, die die Reaktion auf ABA steuern, sind die Homeobox-Bindestelle BSH und die bZIP-Erkennungssequenz DPBF, die beide ebenfalls im *PSY*-Promotor vorkommen. *pPSY* enthält generell einige Elemente, die auf eine Reaktion auf Wasser- oder Trockenheits-bedingten Umweltstress hindeuten (z.B. AtMYC2 oder MYB4). ABA ist ein Phytohormon, das in hohen Mengen von der Pflanze neu synthetisiert wird, sobald diese einen Wasserverlust oder ein Defizit im Wasserhaushalt der Zellen feststellt. ABA bewirkt eine Schließung der Stomata (vermutlich über Unterbindung der K⁺-Aufnahme), so dass einem weiteren Wasserverlust der Pflanze vorgebeugt wird.

V Diskussion

Die Modifikation von Carotinoid-Biosynthesewegen, insbesondere im Hinblick auf die pflanzliche β -Carotin-Produktion, ist das zentrale Thema dieser Arbeit. Mithilfe der Peptid-Aptamer-Technologie soll eine Anreicherung von β -Carotin, zunächst in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* und anschließend in der Nutz- und Zielpflanze *Solanum lycopersicum*, erfolgen. Die drei Enzyme PSY, EC und BH, die innerhalb dieses komplex regulierten Stoffwechsels zentrale Schlüsselrollen spielen (II2.1), wurden als Ziele für eine Aptamer-Bindung gewählt. Auf diese Weise sollte die Aktivität der Zielenzyme so modifiziert werden, dass es im Verlauf des Stoffwechsels zu einer Anreicherung von β -Carotin kommt. Bioaktive Peptid-Aptamere werden bereits in vielen Forschungsgebieten und für unterschiedliche, meist medizinisch-therapeutische, Zwecke eingesetzt (s. II3.3). Für Pflanzen wurde bislang einzig ein antiviral wirksames Peptid beschrieben (Rudolph u. a., 2003), wobei es sich jedoch um eine Mikrodomäne handelt, die nicht zufällig, sondern basierend auf strukturellen und funktionellen Kenntnissen des Zielproteins entwickelt wurde (siehe hierzu auch II3.3 und V1).

In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen erstmalig erfolgreich gezeigt werden, dass bioaktive Peptid-Aptamere mit einer vollkommen zufälligen AS-Sequenz in der Lage sind, die Aktivität pflanzlicher Enzyme zu beeinflussen und auf diese Weise einen Stoffwechselweg zu modifizieren, wodurch eine gezielte Anreicherung bestimmter Metaboliten erfolgt. Entscheidend ist, dass die hier angewandte, neuartige Strategie nicht auf Peptiden basiert, die speziell auf eine bestimmte funktionelle Domäne oder Bindestelle des Zielproteins hin entwickelt wurden. Die bioaktiven Aptamere entstammen einer Zufallspeptid-Bibliothek, und für die gewählten pflanzlichen Zielenzyme liegen keine detaillierten funktionellen oder strukturellen Daten vor. Die in dieser Arbeit etablierte experimentelle Strategie ist auf andere Proteine (und Proteinfamilien) übertragbar, deren Struktur und Funktion nicht bekannt sein müssen, und die Zufallspeptid-Bibliothek kann zur Identifizierung bioaktiver Peptid-Aptamere, unabhängig von Zielprotein und -organismus, eingesetzt werden.

1 Peptid-Aptamere in der pflanzlichen Biotechnologie

Die Erzeugung von Nutzpflanzen mit erhöhten Nährstoffgehalten erfolgt entweder durch klassische Züchtung oder durch Gentechnik. Etliche Nutzpflanzen wie Reis oder Mais mit erhöhtem Carotinoid- oder β -Carotin-Gehalt wurden bereits erfolgreich durch das Einbringen artfremder Gene (aus anderen Pflanzenarten oder Bakterien, siehe auch II2.3) in das Genom der Zielpflanze erzeugt, beispielsweise *Golden Rice*, *Golden Rice 2* oder *Golden Corn* (Aluru u. a., 2008; Naqvi u. a., 2009; Paine u. a., 2005; Ye u. a., 2000).

Die Umsetzung einer auf Peptid-Aptameren basierten Technologie stellt einen neuartigen Ansatz dar, der hohes Potential hat und eine attraktive Alternative zur klassischen Züchtung und zu den

konventionellen Ansätzen in der Pflanzen-Gentechnik darstellen kann. In der vorliegenden Arbeit sollten spezifische Peptid-Aptamere mit bioaktiver Wirkung identifiziert werden, um über die Interaktion mit einem der drei Schlüsselenzyme dessen Funktion und somit den Carotinoid-Stoffwechsel zu modulieren. Durch Expression eines bioaktiven Aptamers könnte auf diese Weise eine Anreicherung von β -Carotin in der Zielpflanze erreicht werden, ohne dabei schädliche Nebenwirkungen wie Zwergwuchs oder einen Mangel an Chlorophyll in grünen Geweben der Pflanze zu erzeugen, was bei klassischen gentechnischen Ansätzen der Fall sein kann (Fray u. a., 1995).

Im Gegensatz zu Ansätzen der konventionellen Pflanzen-Gentechnik, bei denen Enzymaktivitäten durch Gen-*Silencing* vollständig inaktiviert werden, bietet die Ausprägung bioaktiver Aptamere in transgenen Pflanzen den großen Vorteil, Enzymaktivitäten zu schwächen, ohne dass die Funktion vollständig aufgehoben wird. Auf diese Weise können Stoffwechselwege sanft moduliert oder auch pflanzliche Enzyme untersucht werden, deren vollständige Inaktivierung *in vivo* negative oder letale Auswirkungen auf die Pflanze hätte, was die Analyse entsprechender Phänotypen schwierig oder unmöglich macht.

Die oben erwähnten unerwünschten Nebenwirkungen, die gelegentlich bei der klassischen Gentechnik entstehen, können beispielsweise mithilfe der RNAi-Technologie vermieden werden. Viele Nutzpflanzen mit erhöhten Nährstoffgehalten wurden bereits erfolgreich auf diese Weise erzeugt (siehe II.2.3). Durch Verwendung fruchtspezifischer Promotoren in Kombination mit der RNAi-Technik konnten beispielsweise durch Suppression des *DET1 (DE-ETIOLATED1)*-Gens, welches an der Repression diverser lichtabhängiger Signalkaskaden beteiligt ist, die Carotinoid- und Flavonoid-Gehalte in Tomatenfrüchten erhöht werden. Indessen blieben die Transkripte in den übrigen untersuchten Pflanzenorganen unverändert (Davuluri u. a., 2005). Trotz der vielen Vorteile von RNAi wurde jedoch für die längeren siRNAs beobachtet, dass sie über einen interzellularen Transportmechanismus systemisch in der Pflanze ausgeprägt werden (Hamilton u. a., 2002). Die Ausprägung von Peptid-Aptameren erfolgt hingegen zellautonom, was einen weiteren Vorteil bei vielen Anwendungen bieten kann. Eine zentrale Eigenschaft von RNAi ist die hohe Spezifität in Bezug auf die Zielsequenz. Bereits der Austausch einer einzelnen Base kann entscheidend für die Bindung sein. Dies ist in vielen Fällen ein großer Vorteil, kann jedoch bei Genen mit hoher Mutationsrate, z.B. bei viralen Genen, wiederum von Nachteil sein (Uhrig, 2006). Für Peptid-Aptamere, die hingegen ein spezifisches Epitop bzw. Motiv oder eine funktionelle Domäne auf der Oberfläche des Zielproteins binden, besteht die Möglichkeit der Übertragbarkeit der bioaktiven Aptamer-Wirkung auf andere Isozyme oder innerhalb von Proteinfamilien, die das Bindemotiv enthalten. Solche funktionelle

Domänen können bereits als *Baits* im *Y2H-Screening* eingesetzt werden, ähnlich wie der C-terminale Bereich der *A. t.* BH2 in der vorliegenden Arbeit. Die antivirale Wirkung eines Peptid-Aptamers, das *in planta* für das N-Protein des TSWV (*tomato spotted wilt tospovirus*) identifiziert wurde, war auch auf andere Tospoviren übertragbar (Rudolph u. a., 2003; Uhrig, 2003). Im Gegensatz zur Ausprägung viraler Proteine in Pflanzen, die zwar ebenfalls Virus-Resistenz vermitteln und ein breites Wirkspektrum liefern kann, haben Peptid-Aptamere oder auch Mikrodomänen den Vorteil, dass ihre dominant negative Wirkung durch die Maskierung funktioneller Epitope oder Bindedomänen des Zielproteins spezifischer und berechenbarer ist (Uhrig, 2006).

Peptid-Aptamere können vergleichbare Bindespezifitäten und -affinitäten wie Antikörper aufweisen (siehe auch II.3.3). Auch Antikörper (*single chain antibodies*) wurden bereits erfolgreich in der Pflanzen-Biotechnologie eingesetzt, um Virus-Resistenzen gegen mehrere verschiedene Pflanzenviren zu vermitteln (Prins u. a., 2005). Ein Vorteil von Aptameren ist jedoch, dass, bei Verwendung von *in vivo-Screening*-Methoden wie *Y2H*, bereits die Identifikation bzw. Selektion, sowie der Interaktions- und ggf. Funktionalitätsnachweis in lebenden Zellen erfolgen (s. hierzu II.3.2). Im Gegensatz dazu sind Antikörper extrazellulär wirksam, was keine Funktionalität bei der Anwendung in lebenden Zellen garantiert. Aptamere sind unabhängig von intrazellulären Modifikationen funktional, was ein *Screening* der Peptide im heterologen System Hefe und eine Übertragbarkeit auf andere Organismen wie Bakterien, Pflanzen oder Säugerzellen ermöglicht (Colas u. a., 1996; Norman u. a., 1999; Rudolph u. a., 2003). Auch das in der vorliegenden Arbeit dargestellte Aptamer 25Q6 wurde in Hefe identifiziert und konnte in *E. coli* als funktionell verifiziert, sowie seine Interaktion mit dem Zielenzym in Pflanzen bestätigt werden.

Die Spezifität bezüglich des Zielenzym stellt einen zentralen Faktor zur Umsetzung der in dieser Arbeit verfolgten Strategie dar. Davis und Kollegen identifizierten Peptid-Aptamere, die in der Lage sind, selektiv die aktive Form eines Zielenzym zu binden und nicht die inaktive, wobei sich die beiden Zustände lediglich über die Phosphorylierung einer einzigen AS unterschieden (Davis u. a., 2009). Ein zweiter entscheidender Faktor ist die Bioaktivität der Peptid-Aptamere: ihre Fähigkeit, die enzymatische Aktivität der Zielenzyme zu modifizieren. Beide Faktoren, Bindespezifität und Bioaktivität, können nur experimentell ermittelt werden und stellen dementsprechend wesentliche Schritte zur Umsetzung des in dieser Arbeit verfolgten Ansatzes dar. Eine notwendige Voraussetzung hierzu ist wiederum die funktionelle Charakterisierung der Zielenzyme selbst.

2 Die Aktivitäten der Zielenzyme BH2, EC und PSY aus *A. thaliana*

Als Ziele für eine Verschiebung des metabolischen Flusses in Richtung β -Carotin mithilfe bioaktiver Peptid-Aptamere wurden, wie dargestellt, die Enzyme PSY, EC und BH2 aus *A. thaliana* ausgewählt. Der von Cunningham und Kollegen entwickelte bakterielle Assay, in dem durch simultane Expression der *E. herbicola* GGPP, PSY, PDS und BC Carotinoid-produzierende *E. coli* generiert werden (Cunningham und Gantt, 2007), erwies sich ideal geeignet als heterologes System zum schnellen und zuverlässigen Nachweis der Enzymaktivitäten. Wie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente außerdem zeigten, bietet dieser Assay die zusätzliche Möglichkeit zur funktionellen Analyse der koexprimierten Peptid-Aptamere in selbigem System, da eine funktionelle Änderung des Enzyms durch das Aptamer ein verändertes Carotinoid-Profil zur Folge hat.

Laut *in silico*-Analysen besitzen alle drei Zielenzyme am N-Terminus TP-Sequenzen, die in der pflanzlichen Zelle der Lokalisation bzw. dem Transport der Proteine in die Thylakoidmembranen der Plastiden dienen (Bruce, 2000). Die heterologe Expression eukaryotischer Proteine, insbesondere komplexer membranassoziierter oder integraler Membranproteine, im Prokaryoten *E. coli* kann zu Problemen hinsichtlich einer korrekten Proteinfaltung und -Modifikation führen (Dyson u. a., 2004), was wiederum zu schlechten Proteinlöslichkeiten und damit zu proteasomalem Abbau oder zur Aggregation (*inclusion bodies*) in der Bakterienzelle führen kann (Sørensen und Mortensen, 2005). Zur Verbesserung der Löslichkeit bzw. Expression der rekombinanten Enzyme in *E. coli* wurden diese ohne die prognostizierten TP-Sequenzen kloniert.

Die durch Koexpression der ECdel aus *A. thaliana* im verwendeten bakteriellen System erhaltenen neuen Stoffwechselprodukte α - und ε -Carotin belegen eindeutig die Funktionalität des pflanzlichen Enzyms. Da die beiden Cyclasen EC und BC aufgrund der gemeinsamen Substrate Lycopon, δ -Carotin und γ -Carotin in Konkurrenz zueinander stehen, kann weiterhin geschlussfolgert werden, dass die enzymatische Umsetzung der Metaboliten durch die *A. t.* ECdel gegenüber der Umsetzung durch die *E. h.* BC im vorliegenden System überwiegt. Die Enzym-Aktivitäten konkret zu relativieren ist an dieser Stelle nicht möglich, da man hierzu eine Quantifizierung der Proteinmengen vornehmen müsste, was aufgrund fehlender Marker-Fusionen (*tags*) der Gene auf pAC-BETAipi bzw. nicht vorhandener Antikörper nicht realisierbar ist. Die Zwischenprodukte δ - und γ -Carotin wurden nicht nachgewiesen. Sie werden möglicherweise so schnell von den Cyclasen umgesetzt, dass sie nicht akkumuliert, sondern direkt zu den homo- und heterozyklischen Endprodukten weiter metabolisiert werden. Wenn auch die erhaltenen Daten keine Aufstellung von Reaktionskinetiken zulassen, so kann dennoch anhand der Mengenverhältnisse der drei akkumulierten Carotinoide eine Endpunktbestimmung des eingestellten Reaktionsgleichgewichtes vorgenommen werden. Es ist nicht

klar, zu welchem Anteil die gemeinsamen Substrate von EC und BC umgesetzt werden. α -Carotin ist das Produkt beider Cyclasen, während β - und ε -Carotin jeweils ausschließlich von BC bzw. EC synthetisiert werden. Um eine Aussage über die Aktivität bzw. die Änderung der Aktivität der EC zu treffen, ist es entscheidend, das Verhältnis dieser beiden Carotinoide zu betrachten. Der β/ε -Wert betrug bei Expression der rekombinanten *A. t.* ECdel in β -Carotin-produzierenden *E. coli* etwa 0,5. Das bedeutet, dass der Umsatz durch die ECdel in dem vorliegenden heterologen System höher ist - ausgehend davon, dass α -Carotin aufgrund der heterozyklischen Struktur gleichermaßen von *E. h.* BC und *A. t.* ECdel produziert wird.

Überraschend war, dass ε -Carotin überhaupt als Produkt erhalten wurde, also dass die *A. t.* ECdel beide Enden des Lycopens zu ε -Ring umsetzte. Die bisherige Literatur beschreibt die EC aus *A. thaliana* als Monocyclase, die lediglich ein Ende des Lycopren-Moleküls zyklisieren kann, nicht aber das andere. Diese Ansicht basiert in erster Linie auf der Tatsache, dass ε -Carotin bislang in keiner untersuchten Pflanzenart detektiert worden ist (Botella-Pavía und Rodríguez-Concepción, 2006). Die einzigen Ausnahmen stellen *Lactuca sativa* und *Adonis aestivalis* dar, weshalb ε -Carotin häufig auch als Lactucaxanthin bezeichnet wird (Siefermann-Harms u. a. 1981). Die Forscher um Cunningham konnten im bakteriellen Assay einzig das monozyklische δ -Carotin als Reaktionsprodukt der *A. t.* EC nachweisen (Cunningham und Gantt, 2001; Cunningham u. a., 1996). Folglich wurde postuliert, dass die EC aus Salat die einzige pflanzliche EC mit Bicyclase-Eigenschaft sei (Cunningham und Gantt, 1998). In Siefermann-Harms u. a. (1981) wird eine AS-Sequenzhomologie von etwa 77 % angegeben, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Homologie-Betrachtungen mit dem Programm T-Coffee, die die chemischen Eigenschaften der AS berücksichtigen, zeigte sogar eine Homologie von 97 % auf Proteinebene. Die 3 % geringere Homologie befinden sich hauptsächlich im Bereich der TPs. Die Bicyclase-Eigenschaft der BC ist unumstritten, da ihr homozyklisches Produkt β -Carotin, sowie dessen Derivate und Abbauprodukte in sämtlichen untersuchten Pflanzenarten nachgewiesen wurden (Giuliano u. a., 2008).

Interessanterweise verhält es sich bei der *A. t.* BC genau entgegengesetzt zur EC. Während in den bakteriellen Assays von Cunningham und Kollegen für die *A. t.* EC das bityklische ε -Carotin nicht nachgewiesen werden konnte, so wurde weder für die *E. h.* noch für die *A. t.* BC das monozyklische Zwischenprodukt γ -Carotin detektiert. Lycopren-produzierende Bakterien, die ausschließlich die *E. h.* BC koexprimierten, synthetisierten bei den Experimenten der Cunningham-Gruppe als einziges Stoffwechselprodukt β -Carotin. Die Koexpression von *E. h.* BC und *A. t.* EC lieferte ebenfalls fast ausschließlich β -Carotin, wobei zu einem sehr geringen Anteil (ca. 5 %) α -Carotin detektiert wurde. Wurden hingegen beide Cyclasen aus *A. t.* koexprimiert, so erhielt man als Hauptprodukt die monozyklische EC-Zwischenstufe δ -Carotin, sowie das von beiden Enzymen zyklisierte α -Carotin und

einen sehr kleinen Anteil an β -Carotin (Cunningham u. a., 1996). Diese und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen eine Vermutung zu, die bislang noch nicht in Erwägung gezogen wurde, nämlich dass die beiden Cyclasen evtl. bevorzugt als Heterodimer arbeiten. Modelle zu thylakoidmembranassoziierten Multienzymkomplexen der Carotinoid-Biosynthese-Enzyme wurden bereits in der Literatur diskutiert (Cunningham und Gantt, 1998). Eine EC/BC-Dimerisierung würde erklären, warum in der vorliegenden Arbeit ε -Carotin und große Mengen an α -Carotin erhalten wurden, während Cunningham und Kollegen nur geringe Mengen an α -Carotin und gar kein ε -Carotin nachwies. Die hier verwendete *A. t.* ECdel ist aufgrund des abgetrennten TP's höchstwahrscheinlich besser in *E. coli* löslich, so dass mehr aktives Enzym in der Zelle zur Verfügung steht. Eine vergleichbare Ursache wird auch in Cunningham u. a. 1996 in Erwägung gezogen. Durch den geringeren Anteil an löslichem Protein sinkt die effektive Umsatzrate der von Cunningham verwendeten *A. t.* EC, so dass kein ε -Carotin produziert wird. Bei Koexpression von *A. t.* EC und *E. h.* BC kommt zu der schlechten Löslichkeit der EC eine ineffiziente Dimerisierung mit der BC aus *E. h.* hinzu, da das bakterielle Enzym nur geringe Homologie zur *A. t.* BC aufweist (63 % bei T-Coffee-Analyse). Die Folge ist eine nur minimale Ausbeute an α -Carotin. Bei Koexpression der beiden *A. t.*-Cyclasen in den Experimenten von Cunningham wird zwar δ -Carotin gebildet, die Menge an löslicher EC reicht jedoch nicht aus, um den zweiten Ring anzufügen, da durch die verbesserte Dimerisierung mit der *A. t.* BC signifikante Mengen an α -Carotin produziert werden. In der vorliegenden Arbeit steht durch die verbesserte Löslichkeit der pflanzlichen ECdel mehr aktives Enzym in der Zelle zur Verfügung. Demzufolge wird durch die (postulierte) Dimerisierung mit der *E. h.* BC eine hohe Menge an α -Carotin synthetisiert, was wiederum zur Folge hat, dass weniger BC für die Bildung von β -Carotin zur Verfügung steht und dieses nur zu einem geringen Teil produziert wird. ε -Carotin wird ebenfalls nur zu einem verhältnismäßig geringen Anteil gebildet.

Es ist nicht auszuschließen, dass die Pflanze den Carotinoid-Metabolismus über die Expressionsrate der EC so reguliert, dass als bevorzugte Produkte primär α - und β -Carotin synthetisiert werden. Obwohl ε - und β -Ring sich strukturell lediglich durch die Position einer Doppelbindung unterscheiden, basiert die Synthese essentieller Metaboliten, wie des wichtigen Carotinoids Lutein, sowie weiterer Xanthophylle und etlicher Pflanzenhormone, auf den β -Ring-haltigen Carotinoiden (Einleitung II2.2). In *Zea mays* wurde die EC als hauptverantwortliches Enzym für die Regulation des Verhältnisses von α - zu β -Carotin identifiziert, wobei die Varianz dieses Verhältnisses zu 58 % auf vier Polymorphismen des EC-Gens zurückzuführen ist. Bei diesen Polymorphismen handelt es sich sowohl um einen einzelnen AS-Austausch, als auch um Mutationen im Promotor, im 3'-UTR, sowie in einem Intron (Harjes u. a., 2008). Dies spiegelt die enorme Komplexität der Regulation des pflanzlichen Carotinoid-Metabolismus wieder.

Cunningham und Kollegen identifizierten eine einzelne AS, die als molekularer Schalter dienen und die enzymatische Bicyclase-Eigenschaft vermitteln soll (Cunningham und Gantt, 2001). Durch Austausch der korrespondierenden AS konnte in Lycopren-produzierenden *E. coli* gezeigt werden, dass die Mutante *A. t.* EC H448L ϵ -Carotin synthetisierte, während die *L. s.* EC L448H nur noch einen ϵ -Ring an Lycopren addierte. Die Mutante *A. t.* EC H448R zyklisierte ebenfalls beide Lycopren-Enden. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Bicyclase-Eigenschaft der EC durch eine polare oder positiv geladene AS an dieser Position vermittelt wird. Im Gegensatz dazu besitzt die hier untersuchte *A. t.* BC, die eine 83 %-ige Homologie auf Proteinebene (T-Coffee) zur *A. t.* EC hat, trotz Bicyclase-Eigenschaft, an der korrespondierenden Stelle einen unpolaren Isoleucin-Rest. Daraus kann geschlossen werden, dass die beschriebene AS vermutlich nicht der einzige Schlüssel zur Vermittlung der enzymatischen Bicyclase-Eigenschaft ist. Cunningham u. a. stellten alternativ die Vermutung auf, dass die EC unter nativen Bedingungen u.U. als Homodimer aktiv ist. Durch den Austausch der AS könne die Dimerisierung unterbunden und die Zyklisierungseigenschaften der EC infolgedessen verändert werden (Cunningham und Gantt, 2001). In dieser Arbeit wurde die gleiche *A. t.* EC-cDNA verwendet wie in den Arbeiten von Cunningham, mit dem Unterschied, dass die prognostizierte TP-Sequenz entfernt wurde. In Anbetracht der damit erhaltenen Ergebnisse ist die von Cunningham beschriebene Möglichkeit jedoch auszuschließen, da ϵ -Carotin unabhängig von einem AS-Austausch der EC gebildet wurde.

Insgesamt ist zu bedenken, dass es sich bei dem vorliegenden Assay um ein heterologes System handelt, das zwangsläufig andere Voraussetzungen schafft als die pflanzliche Zelle. Der prokaryotische Organismus *E. coli* unterscheidet sich von der eukaryotischen Pflanzenzelle stark hinsichtlich seiner DNA- und Protein-Biochemie, sowie des zellulären Aufbaus. Auch Regulationsmechanismen auf genetischer Ebene, die zu Verschiebungen des Carotinoid-Profiles führen, stehen in *E. coli* nicht zur Verfügung. Abschließend ist festzuhalten, dass es für das Ziel dieser Arbeit entscheidend war, ein System zu etablieren, in dem die EC eine reproduzierbare Funktionalität aufweist, damit anschließend Aptamer-bedingte Aktivitäts-Veränderungen zuverlässig detektiert werden können. Für diesen Zweck stellte der bakterielle Funktionalitäts-Assay ein ideales Testsystem dar.

Die Ergebnisse der heterologen Expression der BH2del in Carotinoid-produzierenden Bakterien ließen auf eine gute Aktivität der rekombinant exprimierten BH2del schließen. Wie auch im Falle der ECdel konnte man für die BH2del zwar keine Reaktionskinetiken ermitteln, jedoch eine Endpunkt-Bestimmung vornehmen, die die Aktivität des Enzyms im vorliegenden bakteriellen System beschreibt. Die Gesamt-Umsatzrate des Enzyms betrug für die BH2del etwa 80 %. Um die Umsatzraten der beiden Teilreaktionen zu ermitteln und zu relativieren, wurde außerdem das

Verhältnis der Edukte bzw. Substrate der Teilreaktionen berechnet. Für U1/U2 ergab sich ein Wert von 5, was bedeutet, dass die Umsatzrate der ersten Teilreaktion fünfmal höher ist als die der zweiten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Literatur (Sun u. a., 1996). Sun und Kollegen exprimierten die *A. t.* BH1 (volle Länge) in β -Carotin-produzierenden *E. coli* und erhielten ebenfalls Zeaxanthin als eindeutiges Hauptprodukt (95 - 99 %), sowie einen geringen β -Cryptoxanthin-Anteil (1 - 5 %). β -Carotin wurde nicht nachgewiesen (Sun u. a., 1996). Die Ursache hierfür könnte sein, dass die bei BH2del entfernte prognostizierte TP-Sequenz zu lang war und eine dadurch bedingte schlechtere Faltung der *A. t.* BH2del eine geringere Aktivität zur Folge hatte. Sun und Kollegen exprimierten neben der vollständigen *A. t.* BH1 auch zwei N-terminal verkürzte Protein-Varianten. Für das um 69 AS gekürzte Enzym erhielten die Forscher ein vergleichbares Carotinoid-Profil wie mit dem Volllängen-Protein, während für die um 129 AS verkürzte Variante β -Cryptoxanthin als Hauptprodukt (ca. 75 %) erhalten wurde, eine geringe Menge an Zeaxanthin (ca. 18 %), sowie β -Carotin (ca. 7 %).

In den durchgeführten Experimenten war eine deutlich schlechtere Wachstumsrate des Expressionsstamms *E. coli* TOP10 pAC-BETAipi im Falle der BH2del-Koexpression zu beobachten. Auch Cunningham und Kollegen berichten von einer deutlichen Senkung der bakteriellen Wachstumsrate nach IPTG-Induktion der rekombinanten Expression der BH (bezeichnet als CrtR) aus der roten Alge *Cyanidioschyzon merolae* (Cunningham u. a., 2007). Eine deutliche Abnahme der Wachstumsrate war auch bei der Expression der *A. t.* ECdel zu beobachten, jedoch fiel er hier weniger stark aus. Es ist bekannt, dass die Expression größerer, korrekt gefalteter und aktiver eukaryotischer Proteine in Bakterien nicht trivial ist und zu Problemen führen kann, weshalb für diese Zwecke häufig Hefen eingesetzt werden (Demain und Vaishnav, 2009). Eukaryoten wie Pflanzen haben aufgrund des komplexeren Zellaufbaus und der komplexeren Biochemie höher entwickelte bzw. andere Mechanismen zur Expression und Modifikation von Proteinen, beispielsweise andere Chaperone (Kolaj u. a., 2009). Das bakterielle Wachstum wird durch die rekombinante Expression von BH2del und ECdel höchstwahrscheinlich reduziert, da in *E. coli* aufgrund der komplexen Struktur, Faltung und Modifikation des rekombinanten Proteins der übrigen Zellstoffwechsel verlangsamt wird.

Für die Koexpression von Aptamer und Zielenzym in Carotinoid-produzierenden Bakterien wurde ein polycistronisches Expressionssystem etabliert. Die polycistronische Expression des *downstream* vom Zielenzym-Gen gelegenen *CFP* hatte, im Vergleich zur monocistronischen Zielenzym-Expression, eine verbesserte Wachstumsrate der Bakterien zur Folge. Auch dieser Effekt fiel für die ECdel schwächer aus als für die BH2del. Interessanterweise gingen die verbesserte bakterielle Wachstumsrate und die geringere zelluläre Zielenzym-Menge bei der polycistronischen Expression mit einer enormen Steigerung des zellulären Gesamt-Carotinoid-Gehalts einher, wobei das Phänomen erneut im Falle

der BH2del stärker auftrat. Durch Immunoblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die polycistronische CFP-Expression im Vergleich zur monocistronischen Expression in einer etwa fünfmal geringeren zellularen Menge an ECdel resultiert. Diese Beobachtung stützt die Vermutung, dass die Abnahme der bakteriellen Wachstumsrate mit der Expression des rekombinanten Proteins korreliert. Die Funktionalität der BH2del wurde in *E. coli* zwar eindeutig gezeigt, jedoch konnte kein erfolgreicher Nachweis des rekombinanten Enzyms auf Proteinebene erreicht werden. Dies liegt möglicherweise an einer proteolytischen Abspaltung des His-tags vom reifen Protein oder daran, dass die geringe Menge an zellulärer BH2del unter der Nachweisgrenze des Immunoblots liegt. U.U. müssten für einen erfolgreichen Nachweis größere Volumina an Bakterienkulturen für den Protein-Nachweis verwendet und das Proteinlysate aufkonzentriert werden.

Sowohl für BH2del als auch für ECdel ist im polycistronischen Expressionssystem zudem eine Steigerung der enzymatischen Umsatzrate im Vergleich zur monocistronischen Expression zu verzeichnen, was wiederum mit der erhöhten zellularen Gesamtcarotinoid-Menge korreliert. Dies bedeutet, dass eine geringere Proteinbiosynthese in dem vorliegenden System eine erhöhte Aktivität des rekombinanten Enzyms zur Folge hat. Cunningham und Kollegen berichten von einem kontraproduktiven Effekt bei bakterieller Expression der CrtR aus *C. merolae* in Carotinoid-produzierenden *E. coli* nach IPTG-Induktion der rekombinanten Proteinexpression. Die *C. m.* CrtR zeigte keine Umsetzung des Substrats, während die CrtR aus dem *Cyanobacterium Synechocystis* (Cunningham u. a., 2007). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass eine höhere Proteinmenge die Bildung von *inclusion bodies* (s.o.) begünstigt, wodurch weniger funktionelles Protein in der Zelle zur Verfügung steht.

Anhand von Komplementation-Experimenten mit einem im Rahmen dieser Arbeit erzeugten mutierten pAC-BETAipi-Plasmid konnte die die Aktivität des rekombinanten Zielenzym *A. t.* PSYdel eindeutig nachgewiesen werden. Ein wesentlicher Unterschied bei der Expression des *Arabidopsis*-Enzyms war die ausschließliche Bildung von *all-trans*- β -Carotin, während die Expression der *E. h.* PSY einen geringen Anteil des *cis*-Isomers zur Folge hatte. Dies ist insofern erstaunlich, da β -Carotin nicht das direkte Produkt der PSY ist, sondern erst im weiteren Verlauf des Stoffwechsels unter Beteiligung weiterer Enzyme entsteht. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Verhältnis der *cis*-/*trans*-Isomere der Carotinoide bereits im ersten Schritt der Carotinoid-Biosynthese determiniert wird. Auch in den Arbeiten von Cunningham und Kollegen treten immer wieder mehrere Stereo-Isomere der in *E. coli* gebildeten Carotinoide auf (Cunningham u. a., 2007). Es ist zu bedenken, dass alle beschriebenen Beobachtungen sich nur auf das verwendete heterologe Expressionssystem beziehen und nicht ohne weiteres auf den pflanzlichen Metabolismus übertragbar sind. HPLC-Analysen der in den genannten Komplementations-Experimenten erhaltenen Carotinoid-Profile

fürten zum Nachweis geringer Mengen an *trans*-Phytoen ($t_{\text{Ret}} = 10,7$ min., $\lambda_{\text{max}} = 277, 288, 298$ nm; Daten nicht gezeigt). Die Phytoen-Menge betrug in etwa 3 % der Menge an β -Carotin, welches bei 450 nm detektiert wurde, während der Phytoen-Nachweis bei $\lambda = 280$ nm erfolgte. Bei Expression der *E. h.* PSY (pAC-BETAipi) wurde unter gleichen experimentellen Bedingungen kein Phytoen akkumuliert (Daten nicht gezeigt). Das von der *A. t.* PSYdel synthetisierte Phytoen wird also von dem Folgeenzym (*E. h.* PDS) in den Bakterien nicht vollständig weiter verarbeitet. Dies weist darauf hin, dass die *A. t.* PSYdel eine höhere Umsatzrate hat als die *E. h.* PSY und die katalysierte Reaktion in dem vorliegenden heterologen Expressionssystem nicht der Geschwindigkeits-bestimmend Schritt ist.

3 Verifizierung bioaktiver Peptid-Aptamere

Peptid-Aptamere sind kurze, artifizielle Peptide, die mit sehr hoher Spezifität an ein Zielprotein binden. Das Ziel der Arbeit war die Identifizierung solcher Aptamere, die durch die Interaktion mit einem Zielenzym dessen Aktivität inhibieren oder erhöhen (Einleitung II4).

Mit dem in IV3.2 beschriebenen polycistronischen Expressionssystem in *E. coli* wurde eine zuverlässige und reproduzierbare Nachweismethode zur Erfassung und Relativierung der Aktivitäten der pflanzlichen Zielenzyme etabliert. Somit wurden ideale Voraussetzungen für die funktionelle Analyse der im *Y2H-Screening* identifizierten Peptid-Aptamere geschaffen. Die Aptamere wurden an ihrem N-Terminus mit CFP fusioniert, welches in erster Linie als Trägerprotein diente, um eine stabile Ausrichtung bzw. Faltung der Peptide *in vivo* zu gewährleisten (s. hierzu auch II3.1). Außerdem besteht die Gefahr, dass kurze Peptide ohne Fusionsprotein in *E. coli* abgebaut werden (Li, 2009).

3.1 Analyse der Aptamere für die *A. t.* BH2

In Abbildung 53 sind mögliche Einflüsse eines BH2del-inhibierenden Aptamers skizziert, sowie die damit verbundenen Auswirkungen auf die Carotinoid-Zusammensetzung, die man infolge des Aptamer-Effekts in *E. coli* erwarten würde.

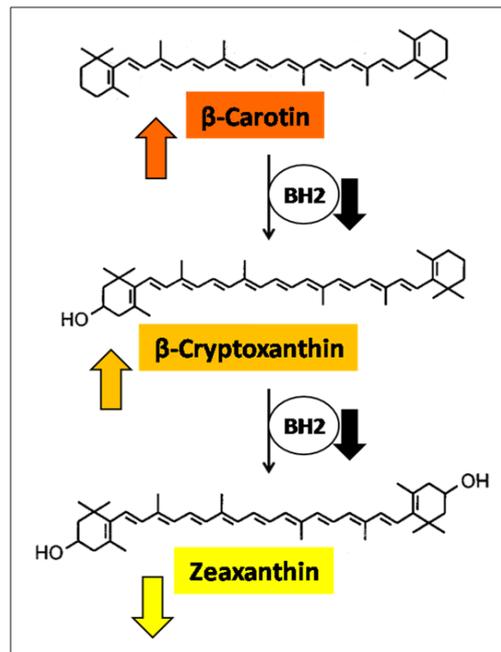


Abbildung 53: Reaktionen des Carotinoid-Stoffwechsels, die von BH2 katalysiert werden. Die schwarzen nach unten gerichteten Pfeile symbolisieren eine Senkung der BH2-Aktivität, wie sie durch Bindung eines bioaktiven Aptamers auftreten könnte. Die bunten Pfeile stehen für eine Ab- bzw. Zunahme der jeweiligen Carotinoid-Menge aufgrund der geringeren BH2-Aktivität.

Im Falle einer Hemmung der BH2del durch ein Aptamer würde man, wie in Abbildung 53 dargestellt, eine Zunahme des Eduktes β -Carotin und des Zwischenproduktes β -Cryptoxanthin erwarten, sowie eine Abnahme des Endproduktes Zeaxanthin. In welchem Maße die β -Carotin- und β -Cryptoxanthin-Mengen ansteigen, hängt davon ab, wie stark die Aptamer-Bindung die einzelnen Reaktionsschritte beeinflusst.

Für die BH2del wurden insgesamt 27 Aptamere auf einen bioaktiven Effekt hin geprüft. Die Gesamtumsatzrate des Enzyms wurde durch die koexprimierten Aptamere unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nur sehr schwach beeinflusst. Die stärksten Effekte auf die Gesamtumsatzrate zeigten Aptamer 26M7 (+ 2,7 %) und 26P5 (+ 2,4 %). In beiden Fällen, wie auch bei den anderen Aptameren, ist eine Zunahme der Gesamtumsatzrate zu verzeichnen, was bedeutet, dass die BH2del-Aktivität insgesamt gesteigert wird. Ein aktivierender Einfluss eines Peptids auf ein Enzym ist zwar vorstellbar und wurde in der Literatur bereits beschrieben, jedoch ist dies ein höchst seltenes Ereignis. Bislang berichten nur zwei Forschergruppen von der Identifikation solcher Peptid-Aptamere (Einleitung II3.3).

Während die BH2del-Gesamtumsatzrate durch Koexpression der Aptamere unverändert blieb oder leicht anstieg, so variierten die Änderungen der Umsatzraten der beiden Teilreaktionen stark: Unter Berücksichtigung der mittleren Abweichung zeigten 13 Aptamere einen Anstieg des Verhältnisses von β -Cryptoxanthin zu β -Carotin (also des U1/U2-Wertes), während acht Aptamere zu einer Senkung des Wertes führten. Für 26A1 und 26M4 beispielsweise wurde ein 40- bzw. 24-prozentiger

Anstieg von U_1/U_2 verzeichnet, 26Z3 und 26A2 hatten eine 32- bzw. 24-prozentige Abnahme zur Folge. In welchem Maße die β -Carotin- und β -Cryptoxanthin-Mengen jeweils ansteigen, hängt davon ab, wie stark die Aptamer-Bindung die einzelnen Reaktionsschritte beeinflusst. Wie bereits in II.2.2 erläutert, verläuft die Umsetzung der beiden Substrate β -Carotin und β -Cryptoxanthin durch die BH2del unterschiedlich effizient - vermutlich aufgrund verschieden starker Substrataffinitäten. Die Aptamer-Bindung kann also durchaus den Verlauf der ersten Teilreaktion anders beeinflussen als den Verlauf der zweiten Reaktion. Eine Senkung von U_1/U_2 könnte somit bedeuten, dass entweder die erste Teilreaktion durch das Aptamer inhibiert wird oder aber, dass die Umsatzrate der zweiten Teilreaktion verbessert wird oder dass beides der Fall ist. Analog verhält es sich für den Fall einer Steigerung von U_1/U_2 . Wichtig ist es in diesem Zusammenhang, zusätzlich die Änderung der Gesamtumsatzrate zu betrachten. Für Aptamer 26M4 steigt U_1/U_2 beispielsweise um 24 %, während die Gesamtumsatzrate unverändert bleibt. Daraus kann geschlossen werden, dass der erhöhte U_1/U_2 -Wert aufgrund einer Steigerung der Umsatzrate der ersten Reaktion zustande kommt, da bei einer Inhibition der zweiten Teilreaktion weniger Zeaxanthin gebildet würde, was wiederum in einer Senkung der Gesamtumsatzrate resultieren müsste. Geht man allerdings von einer Endpunktbestimmung aus, so ist es auch möglich, dass durch ein Verlangsamen der enzymatischen Reaktion aufgrund der Aptamerbindung das Endprodukt, trotz Inhibition einer der beiden Teilreaktionen, maximal akkumuliert wird. Eine Inhibition durch ein Aptamer ist, wie bereits erwähnt, deutlich wahrscheinlicher als eine Aktivierung, zumal die Zahl der getesteten Aptamere verhältnismäßig gering ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe des bakteriellen BH2del-Aptamer-Funktionalitäts-Assay eine Teilreaktions-spezifische Aptamer-Wirkung gezeigt werden. Bisher wurden in der Literatur lediglich Aptamer-bedingte Hemmungen der effektiven Gesamtumsatzrate von Enzymen beschrieben (s. hierzu II.3.3). Die für die BH2del-Aptamere erhaltenen Ergebnisse belegen zusätzlich, dass Peptid-Aptamere in der Lage sind, die Aktivität des Zielenzym so spezifisch zu beeinflussen, dass dessen Substrataffinitäten gegenüber zwei verschiedenen Substratmolekülen unterschiedlich geändert werden. Lage und Struktur des aktiven Zentrums sowie der exakte katalytische Reaktionsmechanismus der *A. t.* BH2 sind bislang noch nicht aufgeklärt worden. Möglicherweise nimmt die BH2del bei den beiden katalysierten Teilreaktionen unterschiedliche Konformationen an, was, selbst bei geringen strukturellen Abweichungen, dazu führen könnte, dass die Aptamere die eine Konformation besser binden oder funktionell beeinflussen als die andere. Aufgrund der hochspezifischen Eigenschaften von Peptid-Aptameren in Bezug auf die Struktur des Zielmoleküls ist dies durchaus denkbar (s. hierzu II.3.3). Eine weitere Möglichkeit ist, dass ein Aptamer mit einem Bereich der BH2del interagiert, der für die Bindung von β -Carotin wichtiger ist als für die Bindung von β -Cryptoxanthin oder umgekehrt, zumal die beiden Substratmoleküle sich in ihren chemischen

Eigenschaften, allein aufgrund der wesentlich höheren Polarität von β -Cryptoxanthin, deutlich unterscheiden. Anhand der durchgeführten Ergebnisse kann nicht sicher gesagt werden, ob der Wirkung der Aptamere ein kompetitives oder allosterisches Wirkprinzip zugrunde liegt. Hierzu müssten weiterführende Experimente zur Reaktionskinetik durchgeführt werden.

Im Gegensatz zur ECdel stammen die meisten Aptamere für die BH2del aus der Pep1170-*Library*. Während in der Pep1274-*Library* die Peptid-Sequenzen an den C-Terminus der Gal4-AD fusioniert sind, liegen sie in der Pep1170-*Library* in ein Trägerprotein (C-terminale Domäne der ADH aus *S. cerevisiae*) eingebettet vor (Fritz, 1996). Zwar wurde in der Literatur bereits von der erfolgreichen Umklonierung eines bioaktiven Peptids von einem Trägerprotein in ein anderes berichtet, welches dadurch seine Funktionalität beibehält, allerdings befand sich dieses Aptamer in beiden Trägerproteinen in einem hypervariablen Bereich innerhalb der *Scaffolds* (Davis u. a., 2007). Möglicherweise ändert sich durch die endständige Fusion der Pep1170-Aptamere mit CFP deren dreidimensionale Struktur, wodurch die Interaktion des Peptids mit dem Zielprotein geschwächt oder gar zerstört würde. Das würde die schwachen Effekte im bakteriellen Funktionalitätsassay erklären. Eine Klonierung der Pep1170-Aptamere zusammen mit dem Original-Trägerprotein aus der *Library* ist in diesem Zusammenhang sinnvoll, um eine falsche oder instabile Faltung des Peptids auszuschließen.

Es ist zu bedenken, dass die Bioaktivität bei Aptameren nicht zwangsläufig auftritt, sondern eher einen Spezialfall darstellt. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Aptamer-Bindung an einem regulatorisch relevanten Bereich des Zielproteins erfolgt, ist gering. Dementsprechend ist zu erwarten, dass immer nur ein geringer Teil der gefundenen bindenden Aptamere auch bioaktiv sind. Ein inhibitorischer Effekt ist grundsätzlich wahrscheinlicher als eine aktivierende Aptamer-Wirkung auf das Zielenzym. Diese Punkte treffen gleichermaßen auf die EC zu.

3.2 Hemmung der *A. t.* EC-Aktivität durch Aptamer 25Q6

Die Umsetzung von Lycopon zu ϵ -, α - und β -Carotin basiert auf einem Zusammenspiel der beiden Enzyme EC und BC (Abbildung 54).

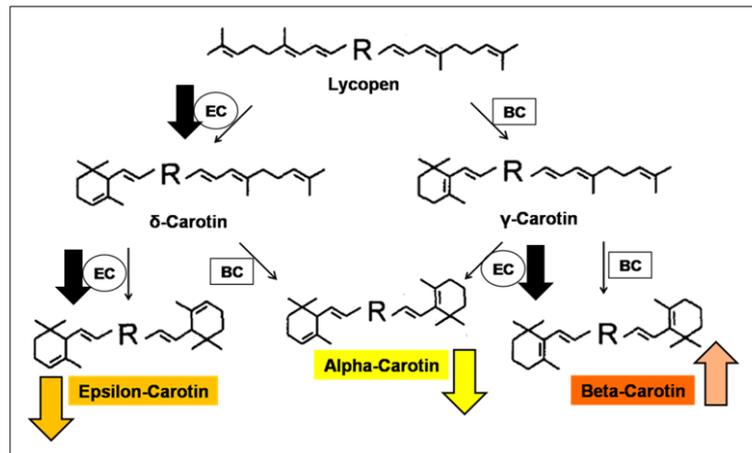


Abbildung 54: Ausschnitt aus dem Carotinoid-Stoffwechsel. Gezeigt ist der Teil des Stoffwechsels, an dem die EC beteiligt ist. Die schwarzen, nach unten gerichteten Pfeile deuten eine Senkung der EC-Aktivität durch ein bioaktives Aptamer an, der bunten Pfeile stehen für eine Senkung des jeweiligen Carotin-Gehalts in Folge einer partiellen EC-Inhibition.

ε -Carotin ist hier das einzige Produkt, an dessen Synthese ausschließlich die EC beteiligt ist. Würde es durch Aptamer-Bindung zu einer Senkung der EC-Aktivität kommen, so würde sich dies in jedem Fall durch einen reduzierten ε -Carotin-Gehalt bemerkbar machen (Abbildung 54).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, konnten insgesamt sieben putative EC-spezifische Aptamere identifiziert werden, wovon allerdings nur eines (Aptamer 25Q6) drastische Änderungen des bakteriellen Carotinoid-Profiles bewirkte. Die Gehalte an ε - und α -Carotin werden halbiert, während der β -Carotin-Gehalt sechsfach ansteigt, und der β/ε -Wert als Maß für die EC-Aktivität nimmt um knapp 1600 % zu. Diese Ergebnisse lassen eindeutig auf eine stark inhibitorische Wirkung von 25Q6 auf die ECdel schließen. Bis auf 25W7 deuten die übrigen Aptamere durch einen reduzierten β/ε -Wert ebenfalls auf eine Inhibition der ECdel-Aktivität hin, jedoch sind die Effekte bei weitem nicht so stark wie bei 25Q6. Mehrere direkte und indirekte Evidenzen belegen die Interaktion von 25Q6 und ECdel *in planta*. Über Fluoreszenzmarker wurde eine zytoplasmatische Kollokalisierung der rekombinanten Zielenzyme in der Pflanzenzelle nachgewiesen werden, und mittels *BifC* konnte die Interaktion *in planta* letztlich bestätigt werden.

In den *in planta*-Experimenten, sowie im bakteriellen Expressionssystem fiel auf, dass die CFP-Kontrolle deutlich stärker (ca. fünffach) ausgeprägt wurde als das CFP-25Q6-Fusionsprotein. Die Ursache für die geringere zelluläre Menge des Aptamer-CFP-Fusionsproteins ist unklar. Möglicherweise unterliegt das Fusionsprotein in beiden Expressionssystemen einem erhöhten proteolytischen Abbau.

A. thaliana-Pflanzen wurden mit dem CFP-25Q6-Aptamer stabil transformiert. Falls 25Q6 die *A. t.* EC tatsächlich *in vivo* inhibiert, so müsste dies eine Änderung des Carotinoid-Profiles der transgenen Pflanzen zur Folge haben. Sollte sich in *A. thaliana* der inhibitorische Effekt von 25Q6 bestätigen, so ist zu erwarten, dass die bioaktive Wirkung des Aptamers auf die Tomatenpflanze übertragbar ist. Dies gründete zum einen auf der Tatsache, dass die beiden EC aus *A. thaliana* und *S. lycopersicum* auf

Proteinebene zu 96 % homolog sind (T-Coffee-Analyse), wobei der nicht-homologe Bereich hauptsächlich in der TP-Sequenz liegt. Letzteres ist nicht überraschend, da bekannt ist, dass pflanzliche TP-Sequenzen sich hinsichtlich ihrer Aminosäure-Primärstruktur deutlich unterscheiden können (Bruce, 2001). Ein weiteres Argument für die Übertragbarkeit der bioaktiven Aptamer-Wirkung auf die Tomatenpflanze ist die Tatsache, dass die gezeigten Nachweise der *A. t.* ECdel-Inhibition durch 25Q6 im bakteriellen Funktionalitäts-Assay unter Verwendung des reifen Proteins (ohne TP-Sequenz) erzielt wurden. Die Bindung von 25Q6 erfolgt daher mit großer Wahrscheinlichkeit im homologen Bereich der Proteine. Phylogenetische Analysen zeigen außerdem eine hohe Verwandtschaft der beiden EC-Enzyme (Cunningham und Gantt, 2001).

4 Expression des Aptamers 25Q6 in transgenen *Arabidopsis*-Linien

Für die Experimente zur *in planta*-Expression des erfolgreich isolierten und eindeutig charakterisierten bioaktiven Aptamers 25Q6 wurde zunächst der starke konstitutive CaMV-35S-Promotor verwendet. Dieser Überexpressions-Promotor ist sehr gut in *Arabidopsis* untersucht und sollte nahezu in der ganzen Pflanze aktiv sein (Holtorf u. a., 1995), wodurch eine ubiquitäre Expression des Aptamers, sowie eine hohe Transkriptionsrate erreicht werden sollten. Dadurch würde man erwarten, dass ein Aptamer-induzierter Effekt in der Pflanze besonders stark bzw. dominant ausfallen würde.

Für das verwendete Transitpeptid ChloroP wurde gezeigt, dass es eine Lokalisation des rekombinanten Fusionsproteins in Chloroplasten von Tabak-Zellen aus Suspensionskultur bewirkt (Jach u. a., 2006). Das TP wurde ausgewählt, da Tabak aus der gleichen Pflanzenfamilie (Solanaceae) stammt wie die Nutz- und Zielpflanze *Solanum lycopersicum*, in der letztendlich für eine biotechnologische Anwendung eine Aptamer-Expression erfolgen soll.

Die Verwendung des 35S-Promotors, sowie des ChloroP-TPs führte zu einer nur sehr schwachen CFP-25Q6- und CFP-Expression in stabilen *A. thaliana*-Linien. Die gewünschte Lokalisation in Chloroplasten konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass sich alle unabhängigen transgenen Linien beider Konstrukte (CFP und CFP-25Q6) gleich verhielten, kann geschlossen werden, dass weder Positionseffekte vorliegen, noch, dass es sich um einen Aptamer-spezifischen Effekt handelt. Die phänotypischen Veränderungen werden daher vermutlich durch die rekombinante CFP-Expression verursacht.

Eine korrekte chloroplastidäre Lokalisation des rekombinant exprimierten Aptamers *in planta* ist essentiell für dessen Interaktion mit dem reifen, Chloroplasten-lokalisierten Zielprotein EC und folglich für die erwartete Enzym-Inhibition. Zur Aptamer-Expression in der Modellpflanze ist dementsprechend die Verwendung eines in *Arabidopsis* verifiziertes Chloroplasten-TP zu überlegen

(siehe Lee u. a., 2008). Für die Expression in *S. lycopersicum* müsste u.U. ein anderes TP verwendet werden - hier könnte ChloroP dann wiederum die erwünschte Lokalisation bewirken.

5 Die endogenen Promotoren der Zielenzyme

Trotz der Vorteile, die die Verwendung konstitutiver Promotoren wie des CaMV-35S-Promotors bieten kann, ist letztlich nicht auszuschließen, dass bei erfolgreicher Expression und funktioneller Interaktion des Aptamers mit dem Zielenzym neben einer Steigerung des β -Carotin-Gehalts auch unerwünschte Nebeneffekte, wie beispielsweise der bereits erwähnte Zwergwuchs, in der Pflanze auftreten können (s. hierzu Fray u. a., 1995).

Die Verwendung der endogenen Promotoren *pEC*, *pBH2* und *pPSY* bietet die Möglichkeit, die rekombinante Aptamer-Expression in Bezug auf Organ-/Gewebe-/Entwicklungsspezifität sowie Expressionshöhe an das Expressionsprofil des interagierenden Zielenzym anzupassen. Viele untersuchte Nutzpflanzen verfügen über bis zu drei Isozyme der PSY, EC und BH, die häufig organspezifisch ausgeprägt werden (II2.2). In *A. thaliana* liegen nach aktuellem Kenntnisstand für die Ziele PSY und EC keine Isozyme vor, für die BH wurden bislang die zwei Isoformen BH1 und BH2 gefunden (Kim u. a., 2009). Mithilfe der endogenen Promotoren könnte gewährleistet werden, dass die Interaktion ausschließlich mit exakt dem Isozym stattfindet, das in den Hefe- und bakteriellen Experimenten verwendet wurde und für das die bioaktive Wirkung gezeigt wurde.

Die Expression von Aptameren unter der Kontrolle der Zielenzym-Promotoren hat ähnliche Vorteile wie die Verwendung organspezifischer Promotoren bei gentechnischen Ansätzen (Giuliano u. a., 2008; Tanaka und Ohmiya, 2008, siehe auch II2.3). Der β -Carotin-Gehalt könnte so in den Speicherorganen wie der Frucht, Knolle oder Wurzel erhöht werden, während die restlichen Teile der Pflanze (z.B. grüne Gewebe) davon unberührt bleiben. Unerwünschte Nebeneffekte, wie eine Abnahme des pflanzlichen Chlorophyll-Gehalts oder bestimmter Carotinoid-abstammender Phytohormone, die u.a. zu Zwergwuchs (Fray u. a., 1995) oder einer erhöhten Photosensitivität in den Blättern (Kim u. a., 2009) führen, könnten so vermieden werden (Details hierzu siehe II2).

Die endogenen Promotoren zeigten in den GUS-Expressionsanalysen in *A. thaliana* deutliche Unterschiede hinsichtlich Promotor-Stärke sowie Gewebe- bzw. Organspezifität. Zwar sind die drei Promotoren hinsichtlich Struktur und Funktion bislang kaum untersucht worden, es liegen jedoch, basierend auf *Microarray*-Daten, detaillierte Informationen zu den Expressionsprofilen der Gene in *A. thaliana* vor (Winter u. a., 2007; Schmid u. a., 2005). Die eigens durchgeführten Experimenten zur GUS-Reporter-Expression (s. Abbildung 48, Abbildung 49 und Abbildung 50) decken sich mit den Transkriptom-Analysen. mRNA-Analysen in Mesophyll- und Stomata-Zellen junger Blätter zeigten, dass der *BH2*-mRNA-Gehalt in Anwesenheit des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) in beiden

Gewebe ca. dreifach gesteigert wird, die Menge an *PSY*-Transkript in den Mesophyll-Zellen um etwa die Hälfte abnimmt und die *EC*-Transkription unbeeinflusst bleibt. Die Beobachtung der ABA-Abhängigkeit der Transkriptionsraten der drei Gene deckt sich mit den eigens durchgeführten *in silico*-Analysen regulatorischer Elemente innerhalb der Promotorregionen (s. Abbildung 52 und Tabelle 19).

pBH2 zeigte sowohl in *Arabidopsis* als auch in *S. lycopersicum* die mit Abstand schwächste Expression, während *pPSY* in *Arabidopsis* der stärkste Promotor war und *pEC* in Tomate. Die hohe Aktivität des *PSY*-Promotors ist ein weiterer Hinweis auf die zentrale Bedeutung dieses Enzyms innerhalb des Carotinoid-Stoffwechsels und seine ausgeprägte Regulation auf genetischer Ebene (Einleitung II.2.1). In *S. lycopersicum* ist sowohl für *pBH2* als auch für *pPSY* eine deutliche Abhängigkeit der Aktivität vom Entwicklungsstadium der Tomatenfrucht festzustellen. Die Ergebnisse der Promotoranalysen in Tomatenfrüchten legen den Schluss nahe, dass eine Aptamer-Expression mithilfe der endogenen Promotoren auch in *S. lycopersicum* sinnvoll sein kann. Der verkürzte Promotor *pPSY_s* war weder in *Arabidopsis* noch in *S. lycopersicum* aktiv. Folglich muss der DNA-Bereich, in dem sich *pPSY* und *pPSY_s* unterscheiden (5'-UTR und ein Teil des ersten Introns), essentielle regulatorische Elemente beinhalten, die für die Promotor-Aktivität, zumindest unter den gegebenen experimentellen Bedingungen, entscheidend sind. Die starke Regulation, der das *PSY*-Gen unterliegt, ist ein weiteres Indiz für die zentrale Bedeutung, die die *PSY*-katalysierte Reaktion innerhalb des Carotinoid-Stoffwechsels einnimmt und dafür, dass es sich dabei um einen limitierenden Schritt innerhalb des Metabolismus handelt. Folglich ist die *PSY* auch ein ideales Zielenzym für eine Modifikation der Carotinoid-Biosynthese mithilfe von Peptid-Aptameren.

pBH2 zeigte einzig in den Samen eine starke Expression. Dies deckt sich zum einen mit publizierten Expressionsprofilen (Schmid u. a., 2005; Winter u. a., 2007), zum anderen mit den Beobachtungen von Kim und Kollegen, dass das Isozym *A. t. BH2* speziell in den Samen ausgeprägt wird (Kim u. a., 2009).

Die Analyse der regulatorischen Elemente innerhalb der endogenen Promotoren, sowie Untersuchungen anderer Forschergruppen weisen auf eine komplexe Regulation der Expression der Carotinoid-Biosynthese-Gene durch Umweltsignale wie Licht, Trockenheit usw. hin (Kim u. a., 2009; Welsch u. a., 2003). Die Pflanze reagiert über regulatorische Promotor-Elemente indirekt auf ihre Umwelt, indem sie die Expression der Zielgene variiert (Welsch u. a., 2007, 2000). Diese Regulations-Mechanismen sind bislang noch nicht aufgeklärt worden. Durch Verwendung der endogenen Promotoren ist zu erwarten, dass die Expressions-Höhe der Aptamere der gleichen Regulation unterliegt wie das interagierende Enzym. Dies könnte insbesondere von Vorteil sein, wenn aufgrund bestimmter externer Signale die Expressionsrate des Zielenzym ansteigt. Beispielsweise wird laut mRNA-Analysen anderer Forschergruppen die *BH2*-Expression unter ABA-Induktion erhöht (Schmid

u. a., 2005; Winter u. a., 2007). In so einem Fall wäre es besonders wichtig, dass der Anstieg der rekombinanten Aptamer-Expression in der Pflanze quantitativ angepasst wird, damit die Menge an Aptamer ausreicht, um das Zielenzym quantitativ zu binden. Auf diese Weise sollte durch stetige „Sättigung“ des Zielenzym mit dem funktionellen Aptamer eine konstante bioaktive Wirkung und somit ein gleichbleibender metabolischer Effekt gewährleistet werden.

In allen drei Fällen wurden mehrere regulatorische Elemente gefunden, die auf eine Lichtregulation der Genexpression schließen lassen, wie sie mehrfach in der Literatur beschrieben ist (Einleitung II2.1). Sowohl im *pBH2* als auch *pPSY* wurden mehrere Elemente zur ABA-abhängigen Regulation gefunden. Der Zusammenhang zwischen BH2-Expression und ABA deckt sich mit Transkriptom-Analysen, bei denen ein dreifacher Anstieg des mRNA-Gehalts unter Einfluss von ABA verzeichnet wurde (Winter u. a., 2007). Auch durch phänotypische Analysen von *Arabidopsis*-BH-Mutanten wurde ein Zusammenhang gezeigt (Tian und DellaPenna, 2004). Die Ergebnisse deuten auf eine Art *feedback*-Mechanismus hin, in dem ABA als Derivat des BH2-Reaktionsprodukts β -Carotin u.U. wiederum die *BH2*-Transkription steuert. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für die *feedback*-Regulation der *PSY*-Transkription durch das Produkt Phytoen selbst beschrieben (Campisi u. a., 2006). Da die BH2-katalysierte Reaktion, insbesondere in Anbetracht des nachfolgenden Xanthophyll-Zyklus (Einleitung II2.1), eine zentrale Rolle im Carotinoid-Metabolismus spielt, ist eine solche *feedback*-Regulation an dieser Stelle wahrscheinlich. Aufgrund der bereits erwähnten hohen Bedeutsamkeit der *PSY*-katalysierten Reaktion ist auch hier eine *feedback*-Regulation durch das Carotinoid-Stoffwechselprodukt ABA denkbar.

6 Ausblick

25Q6 konnte in dieser Arbeit erfolgreich als inhibitorisches Aptamer für das Zielenzym EC aus *A. thaliana* identifiziert und charakterisiert werden und steht damit für die weitere Umsetzung und Realisierung der Eingangs erläuterten neuartigen Technologie (II3.3) zur Stoffwechsel-Modifikation zur Verfügung. Die Erfolgchancen hierfür könnten naturgemäß durch die Verfügbarkeit weiterer bioaktiver Aptamere deutlich erhöht werden. Neben der Durchführung weiterer *Screening*-Experimente unter Verwendung neuer *Peptid-Libraries* bietet die experimentelle Bearbeitung der übrigen in dieser Arbeit identifizierten Aptamere einen ersten Ansatzpunkt. So könnten diejenigen Aptamere für EC und BH2, die keine oder eine schwache Beeinflussung der Enzymaktivität im bakteriellen Funktionalitätsassay zeigten, einer *Random*-Mutagenese (ungerichteter Austausch der einzelnen AS) unterzogen werden. Dadurch kann eine Optimierung der Interaktion mit dem Zielenzym erreicht und demzufolge eine schwache oder nicht nachweisbare bioaktive Wirkung verstärkt werden. Für die Aptamere aus der *Pep1170-Library* ist außerdem für den bakteriellen

Funktionalitätsassay eine Expression der Peptide innerhalb des Original-Trägerproteins (also genau wie das Peptid in der *Library* vorliegt) zu überlegen (s. V3.1).

Nach der Identifikation und funktionellen Verifizierung von 25Q6 ist der nächste wichtige Schritt die Bestätigung der bioaktiven Wirkung des EC-inhibierenden Aptamers in der Modellpflanze *A. thaliana* und, bei erfolgtem Nachweis einer β -Carotin-Anreicherung, die Transformation der Nutzpflanze *S. lycopersicum*. Wenn 25Q6 auch in der Tomatenpflanze eine bioaktive Wirkung zeigt, wäre damit nicht nur erstmalig gezeigt, dass Zufallspeptid-Aptamere in Pflanzen überhaupt eine bioaktive Wirkung haben können, sondern, dass dieser Effekt auch über die Artengrenzen hinweg bestehen kann bzw. auf andere Pflanzenarten übertragbar ist.

Um die inhibierende Wirkung von Aptamer 25Q6 auf die EC *in planta* nachzuweisen, müssen neue Pflanzen-Expressionsplasmide für die Transformation von *A. thaliana* generiert werden. Zwecks Verbesserung der Expressionsrate des Aptamer-Fusionsproteins in *A. thaliana* ist, aufgrund des beobachteten funktionellen Effekts des rekombinanten CFP in transgenen Arabidopsis (s. hierzu V4), ein Austausch des Marker- bzw. Trägerproteins zu überlegen. Sinnvoll wäre außerdem die Verwendung der endogenen Promotoren sowie der prognostizierten Transitpeptide der Zielenzyme zwecks Anpassung des Aptamer-Expressionsmusters an das interagierende Zielenzym und einer korrekten plastidären Lokalisation. An dieser Stelle ist eine Optimierung bzw. Maximierung der Bindeaffinität der Aptamere an das jeweilige Zielenzym (*Random*-Mutagenese, siehe oben) in Kombination mit der Verwendung des entsprechenden endogenen Promotors zu überlegen. Auf diese Weise könnte ein starker Aptamer-Effekt *in planta* erzielt werden (was auch durch Verwendung des 35S-Promotors erreicht werden sollte, siehe V4) und gleichzeitig das Expressionsmuster des Aptamers demjenigen des interagierenden Zielenzym angepasst werden (siehe V5). Weitere Analysen der endogenen Promotoren unter verschiedenen Umweltbedingungen sollten durchgeführt werden, um den Einfluss von beispielsweise Trockenheit, Lichtintensität, -Wellenlänge und -Dauer auf die Promotor-Aktivität zu prüfen.

Zusätzliche Ansatzpunkte ergeben sich durch die Verwendung weiterer *Baits*, insbesondere alternativer Teilfragmente der Zielproteine. Für das Zielenzym BH2, dessen C-Terminus für die *Y2H-Screenings* eingesetzt wurde, ist die Verwendung des *Loops* zwischen TMD 2 und 3 als *Bait* für die *Y2H-Screenings* sinnvoll. Aufgrund zweier Eisen-bindender Histidin-Motive, die möglicherweise an der Substrat-Bindung bzw. -Umsetzung beteiligt sind (Cunningham und Gantt, 1998), kann über eine Aptamer-Interaktion innerhalb dieser Region mit großer Wahrscheinlichkeit auch eine inhibitorische Wirkung erzielt werden.

Die prognostizierten TP-Sequenzen, die für die bakterielle EC- und BH2-Expression zwecks besserer Löslichkeit entfernt worden sind, wurden als weitere *Baits* für *Y2H-Screenings* mit den beiden in

dieser Arbeit beschriebenen Zufallspeptid-*Libraries* eingesetzt. Ein Aptamer, welches mit der TP-Sequenz eines der drei Zielenzyme interagiert, könnte aufgrund sterischer Hinderung oder Maskierung bestimmter Erkennungssequenzen *in planta* den Import des Proteins in den Chloroplasten be- oder verhindern. In diesem Fall müsste das Aptamer nicht einmal die enzymatische Funktion beeinflussen. Da die Carotinoid-Biosynthese in Plastiden abläuft und die beiden Zielenzyme membranständig bzw. -assoziiert sind (Cunningham und Gantt, 1998), könnten die entsprechenden katalysierten Reaktionen aufgrund der Fehl-Lokalisation des Zielenzym nicht mehr ablaufen, was zu dem gleichen Effekt führen müsste wie eine Inaktivierung des Enzyms, nämlich einer Anreicherung von β -Carotin.

Durch die erfolgreiche Entwicklung und Etablierung einer experimentellen Strategie zur Identifikation bioaktiver Peptid-Aptamere für die Modifikation des pflanzlichen Carotinoid-Gehalts werden neue experimentelle Ansätze und Strategien zu weitergehenden Modifikationen des Carotinoid-Stoffwechsels ermöglicht. Insbesondere durch die Übertragbarkeit der Technologie auf andere Enzyme des Carotinoid-Stoffwechsels können mithilfe bioaktiver Aptamere auch andere gewünschte Carotinoide wie beispielsweise Lycopon oder Zeaxanthin anzureichern.

VI Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit galt es, mithilfe der Peptid-Aptamer-Technologie ausgewählte Schlüsselenzyme des pflanzlichen Carotinoid-Stoffwechsels funktionell zu beeinflussen und so eine Anreicherung von β -Carotin zu erzielen. Als Zielenzyme wurden hierfür die drei plastidär lokalisierten Enzyme Phytoensynthase, β -Ring-Hydroxylase 2 und Lycopon- ϵ -Cyclase aus dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ausgewählt.

Nach Etablierung eines geeigneten bakteriellen Testsystems zur Carotinoid-Biosynthese konnten Funktion und Aktivität dieser Zielenzyme in *E. coli* eindeutig verifiziert werden. In Koexpressions-Experimenten kam es zu Zielprotein-abhängigen Verschiebungen der Carotinoid-Profile, und die entsprechenden Stoffwechselendprodukte wurden mittels *Color-Complementation-Assay* (Farbänderung der transgenen Bakterien) und HPLC-Analytik detektiert.

Die Verwendung der funktionell charakterisierten Zielenzyme als *Baits* in *Yeast-Two-Hybrid-Screenings* führte zur erfolgreichen Identifikation spezifischer, interagierender Peptid-Aptamere aus verschiedenen Zufallspeptid-*Libraries*. Deren mögliche bioaktive Wirkung auf das jeweilige Zielenzym wurde in Koexpressions-Experimenten im bakteriellen Testsystem überprüft. Via HPLC-Analytik konnten so Aptamer-abhängige Veränderungen der Carotinoid-Metaboliten-Verhältnisse mit hoher Sensitivität detektiert und eindeutig nachgewiesen werden. Für das Zielenzym Lycopon- ϵ -Cyclase (EC) wurde das 16 AS lange, bioaktive Aptamer 25Q6 mit stark inhibitorischer Wirkung identifiziert. Im Falle der β -Ring-Hydroxylase (BH2) wurde für 21 Aptamere ein vermutlich inhibierender Einfluss auf eine der beiden enzymatisch katalysierten Teilreaktionen nachgewiesen.

Transiente Genexpressions- und BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*)-Studien in *Nicotiana benthamiana* bewiesen zweifelsfrei die funktionelle Expression und Interaktion von EC und 25Q6 *in planta*. Weitere Untersuchungen zur chloroplastidären Expression des 25Q6-Aptamers in transgenen *Arabidopsis*-Linien dienten der Bestimmung seiner bioaktiven Wirkung in Pflanzenzellen. Unter Verwendung des 35S-Promotors, des ChloroP-Transitpeptids und des Fluoreszenzmarkers CFP als Aptamer-Fusionsprotein konnte in transgenen *Arabidopsis*-Linien nur eine sehr schwache rekombinante Aptamer-Expression festgestellt werden. Die gewünschte chloroplastidäre Lokalisation konnte nicht nachgewiesen werden. Es wurden nicht aptamerspezifische, phänotypische Veränderungen der transgenen Pflanzenlinien festgestellt, die vermutlich durch CFP verursacht wurden.

Zur funktionellen Charakterisierung der drei Zielgen-Promotoren wurden die vollständigen intergenischen *upstream*-Regionen transkriptionell mit dem *GUS*-Reporter gen fusioniert und die Promotoraktivitäten über *GUS*-Expression in transgenen *Arabidopsis*-Linien hinsichtlich Stärke und Gewebe- bzw. Organspezifität analysiert. Alle drei Promotoren waren in *A. thaliana* aktiv, wobei sich

die Expressionsstärken und -muster deutlich unterschieden. Eine verkürzte Variante des *PSY*-Promotors, bei der ein Teil des *PSY*-5'-UTRs und des ersten Introns fehlten, zeigte keine Reporter-Expression. Die Promotoren wurden desweiteren in transienten GUS-Expressionsanalysen in Früchten der Nutz- und Zielpflanze Tomate (*Solanum lycopersicum*) untersucht. Auch in dem heterologen System waren alle drei Promotoren aktiv und zeigten verschiedene Expressionsprofile. Der verkürzte *PSY*-Promotor war auch in den Tomatenfrüchten nicht aktiv.

VII Abstract

In order to change metabolic fluxes towards increased β -carotene synthesis three central enzymes of the plant carotenoid pathway were selected as targets for modification of the enzymatic activity via binding of bioactive peptide aptamers: phytoene synthase, lycopene- ϵ -cyclase and β -ring hydroxylase from *Arabidopsis thaliana*.

To prove functionality of these enzymes we performed complementation studies employing an assay based on transgenic *E. coli* capable of producing carotenoids. Coexpression of the active target enzymes led to changes in carotenoid metabolism and distribution, which was detected by a color complementation assay (visible shift of the colony-color) as well as by HPLC analysis.

Yeast-Two-Hybrid screenings were performed using random peptide libraries and the three target enzymes as baits for identification of peptide aptamers. A functional *in vivo* assay in carotenoid producing *E. coli* was used to screen specifically interacting aptamers for their bioactive properties by coexpressing the aptamer and interacting target enzyme. Aptamers influencing the target enzyme activity were detected by changes in the carotenoid metabolic profile via HPLC analysis. The 16 amino acid bioactive aptamer 25Q6 was shown to strongly inhibit lycopene- ϵ -cyclase (EC) activity. 21 aptamers were found to specifically inhibit one of the two reactions catalyzed by β -ring hydroxylase.

Transient expression of aptamer 25Q6 and *A. thaliana* EC as well as their interaction by bimolecular fluorescence complementation assay *in planta* were confirmed in *Nicotiana benthamiana*. Due to plastid localization of all three target enzymes, transgenic *Arabidopsis* lines were generated expressing 25Q6 peptide targeted to the chloroplasts. Using the 35S-promoter, the chloroplast localized CFP-aptamer fusion protein showed only weak recombinant expression and proper localization could not be detected. Phenotypic changes of the transgenic lines compared to *A. thaliana* WT were observed, but obviously not due to aptamer-specific effects.

For functional analysis of the endogenous promoters of the three target genes the intergenic regions upstream the genes were cloned. In addition, an alternative shorter fragment of *PSY* promoter was selected partially lacking the 5'UTR and the first intron of the *PSY* gene. In order to verify promoter strength and tissue specificity *A. thaliana* plants were transformed with reporter constructs containing *GUS* under control of the cloned promoter sequences. All three full length promoters showed to be active in *A. thaliana*, whereas expression patterns strongly varied. The shorter variant of *PSY* promoter was inactive.

Additionally, transient *GUS* expression analysis was performed to prove activity of the three *A. thaliana* promoters in the heterologous system tomato (*Solanum lycopersicum*). Transient transformation of tomato fruits showed reporter expression levels were quite comparable to those of the *A. thaliana* experiments, while the shortened *PSY* promoter again was inactive.

VIII Literaturverzeichnis

Abedi MR, Caponigro G, Kamb A (1998) Green fluorescent protein as a scaffold for intracellular presentation of peptides. *Nucleic Acids Research* 26: 623-630.

Aluru M, Xu Y, Guo R, Wang Z, Li S, White W, Wang K, Rodermeil S (2008) Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *Journal of Experimental Botany* 59: 3551-3562.

Apel W, Bock R (2009) Enhancement of Carotenoid Biosynthesis in Transplastomic Tomatoes by Induced Lycopene-to-Provitamin A Conversion. *Plant Physiol.* 151: 59-66.

Bardou C, Borie C, Bickle M, Rudkin BB, Colas P (2009) Peptide aptamers for small molecule drug discovery. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 535: 373-388.

Beatty S, Nolan J, Kavanagh H, O'Donovan O (2004) Macular pigment optical density and its relationship with serum and dietary levels of lutein and zeaxanthin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 430: 70-76.

Bernard P, Couturier M (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* 226: 735-745.

BERTANI G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62: 293-300.

Bevan MW, Chilton MD (1982) T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids. *Annual Review of Genetics* 16: 357-384.

Bickle MBT, Dusserre E, Moncorgé O, Bottin H, Colas P (2006) Selection and characterization of large collections of peptide aptamers through optimized yeast two-hybrid procedures. *Nature Protocols* 1: 1066-1091.

Blum JH, Dove SL, Hochschild A, Mekalanos JJ (2000) Isolation of peptide aptamers that inhibit intracellular processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 2241-2246.

Borghouts C, Kunz C, Groner B (2008) Peptide aptamer libraries. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 11: 135-145.

Botella-Pavía P, Rodríguez-Concepción M (2006) Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum* 126: 369-381.

Bruce BD (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends in Cell Biology* 10: 440-447.

Bruce BD (2001) The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1541: 2-21.

Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock H, Matros A, Peterek S, Schijlen EGWM, Hall RD, Bovy AG, Luo J, Martin C (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology* 26: 1301-1308.

- Campisi L, Fambrini M, Michelotti V, Salvini M, Giuntini D, Pugliesi C (2006) Phytoene Accumulation in Sunflower Decreases the Transcript Levels of the Phytoene Synthase Gene. *Plant Growth Regulation* 48: 79-87.
- de Chasse B, Mikaelian I, Mathieu A, Bickle M, Olivier D, Nègre D, Cosset F, Rudkin BB, Colas P (2007) An antiproliferative genetic screening identifies a peptide aptamer that targets calcineurin and up-regulates its activity. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 6: 451-459.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 9578-9582.
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 16: 735-743.
- Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R (1996) Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 380: 548-550.
- Colas P (2008) The eleven-year switch of peptide aptamers. *Journal of Biology* 7: 2.
- Cunningham FX, Gantt E (2001) One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 2905-2910.
- Cunningham FX, Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E (1996) Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell* 8: 1613-1626.
- Cunningham FX, Gantt E (1998) GENES AND ENZYMES OF CAROTENOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 557-583.
- Cunningham F, Gantt E (2007) A portfolio of plasmids for identification and analysis of carotenoid pathway enzymes: *Adonis aestivalis* as a case study. *Photosynthesis Research* 92: 245-259.
- Cunningham FX, Gantt E (2005) A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 41: 478-492.
- Cunningham FX, Lee H, Gantt E (2007) Carotenoid biosynthesis in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eukaryotic Cell* 6: 533-545.
- Davis JJ, Tkac J, Humphreys R, Buxton AT, Lee TA, Ko Ferrigno P (2009) Peptide aptamers in label-free protein detection: 2. Chemical optimization and detection of distinct protein isoforms. *Analytical Chemistry* 81: 3314-3320.
- Davis JJ, Tkac J, Laurenson S, Ferrigno PK (2007) Peptide Aptamers in Label-Free Protein Detection: 1. Characterization of the Immobilized Scaffold. *Analytical Chemistry* 79: 1089-1096.
- Davuluri GR, van Tuinen A, Fraser PD, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, Brummell DA, King SR, Palys J, Uhlig J, Bramley PM, Pennings HMJ, Bowler C (2005) Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology* 23: 890-895.

- DellaPenna D (2007) Biofortification of plant-based food: Enhancing folate levels by metabolic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 3675-3676.
- Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* 27: 297-306.
- Demmig-Adams B, Gilmore A, Adams W (1996) Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10: 403-412.
- DEMMIG-ADAMS B, III WWA (1992) Carotenoid composition in sun and shade leaves of plants with different life forms. *Plant, Cell and Environment* 15: 411-419.
- Dharmapuri S, Rosati C, Pallara P, Aquilani R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G (2002) Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits. *FEBS Letters* 519: 30-34.
- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G (2007) Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS One* 2: e350.
- Diretto G, Tavazza R, Welsch R, Pizzichini D, Mourgues F, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G (2006) Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biology* 6: 13.
- Diretto G, Welsch R, Tavazza R, Mourgues F, Pizzichini D, Beyer P, Giuliano G (2007) Silencing of beta-carotene hydroxylase increases total carotenoid and beta-carotene levels in potato tubers. *BMC Plant Biology* 7: 11.
- Dun EA, Brewer PB, Beveridge CA (2009) Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends in Plant Science* 14: 364-372.
- Dyson MR, Shadbolt SP, Vincent KJ, Perera RL, McCafferty J (2004) Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnology* 4: 32.
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 45: 616-629.
- Ellinger S, Ellinger J, Stehle P (2006) Tomatoes, tomato products and lycopene in the prevention and treatment of prostate cancer: do we have the evidence from intervention studies? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 9: 722-727.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* 300: 1005-1016.
- Evans D, Johnson S, Laurenson S, Davies AG, Ko Ferrigno P, Walti C (2008) Electrical protein detection in cell lysates using high-density peptide-aptamer microarrays. *Journal of Biology* 7: 3.
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.

- Floss DS, Walter MH (2009) Role of carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1) in apocarotenoid biogenesis revisited. *Plant Signaling & Behavior* 4: 172-175.
- Fraser P, Kiano J, Truesdale M, Schuch W, Bramley P (1999) Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Molecular Biology* 40: 687-698.
- Fraser PD, Bramley PM (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265.
- Fraser PD, Enfissi EMA, Bramley PM (2009) Genetic engineering of carotenoid formation in tomato fruit and the potential application of systems and synthetic biology approaches. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483: 196-204.
- Fray RG, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, Bramley PM, Grierson D (1995) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant Journal* 8: 693-701.
- Fritz C (1996) Methods of selecting a target peptide that binds to a target protein.
- Fujisawa M, Watanabe M, Choi S, Teramoto M, Ohyama K, Misawa N (2008) Enrichment of carotenoids in flaxseed (*Linum usitatissimum*) by metabolic engineering with introduction of bacterial phytoene synthase gene crtB. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105: 636-641.
- Gaida A, Hagemann UB, Mattay D, Räuber C, Müller KM, Arndt KM (2009) Selection of peptides interfering with protein-protein interaction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 535: 263-291.
- Galpaz N, Ronen G, Khalfa Z, Zamir D, Hirschberg J (2006) A Chromoplast-Specific Carotenoid Biosynthesis Pathway Is Revealed by Cloning of the Tomato white-flower Locus. *Plant Cell* 18: 1947-1960.
- Galvez-Valdivieso G, Fryer MJ, Lawson T, Slattery K, Truman W, Smirnoff N, Asami T, Davies WJ, Jones AM, Baker NR, Mullineaux PM (2009) The high light response in *Arabidopsis* involves ABA signaling between vascular and bundle sheath cells. *The Plant Cell* 21: 2143-2162.
- Gao H, Zhu H, Shao Y, Chen A, Lu C, Zhu B, Luo Y (2008) Lycopene accumulation affects the biosynthesis of some carotenoid-related volatiles independent of ethylene in tomato. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 991-996.
- Geyer CR, Brent R (2000) Selection of genetic agents from random peptide aptamer expression libraries. *Methods in Enzymology* 328: 171-208.
- Gietz RD, Woods RA (2006) Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 313: 107-120.
- Giorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C (2008) Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) - new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *The FEBS Journal* 275: 527-535.
- Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor MA (2008) Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Biotechnology* 26: 139-145.

- Gronewold TMA, Baumgartner A, Weckmann A, Knekties J, Egler C (2009) Selection process generating peptide aptamers and analysis of their binding to the TiO₂ surface of a surface acoustic wave sensor. *Acta Biomaterialia* 5: 794-800.
- Hall RD, Brouwer ID, Fitzgerald MA (2008) Plant metabolomics and its potential application for human nutrition. *Physiologia Plantarum* 132: 162-175.
- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal* 21: 4671-4679.
- Harjes CE, Rocheford TR, Bai L, Brutnell TP, Kandianis CB, Sowinski SG, Stapleton AE, Vallabhaneni R, Williams M, Wurtzel ET, Yan J, Buckler ES (2008) Natural Genetic Variation in Lycopene Epsilon Cyclase Tapped for Maize Biofortification. *Science* 319: 330-333.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research* 27: 297-300.
- Höglund A, Dönnies P, Blum T, Adolph H, Kohlbacher O (2006) MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition. *Bioinformatics (Oxford, England)* 22: 1158-1165.
- Holtorf S, Apel K, Bohlmann H (1995) Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 29: 637-646.
- Hood EE, Helmer GL, Fraley RT, Chilton MD (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology* 168: 1291-1301.
- Hoppe-Seyler F, Crnkovic-Mertens I, Tomai E, Butz K (2004) Peptide aptamers: specific inhibitors of protein function. *Current Molecular Medicine* 4: 529-538.
- Hou J, Liu X, Zheng Y, Liu J (2008) An efficient cloning of DNA fragments by a method based on uracil-DNA glycosylase and endonuclease IV. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70: 1196-1198.
- Humphrey AJ, Beale MH (2006) Strigol: Biogenesis and physiological activity. *Phytochemistry* 67: 636-640.
- Ilg A, Beyer P, Al-Babili S (2009) Characterization of the rice carotenoid cleavage dioxygenase 1 reveals a novel route for geranyl biosynthesis. *The FEBS Journal* 276: 736-747.
- Jach G, Binot E, Frings S, Luxa K, Schell J (2001) Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (dsRED) as a reporter for plant gene expression. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 28: 483-491.
- Jach G, Pesch M, Richter K, Frings S, Uhrig JF (2006) An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nat Meth* 3: 597-600.
- Johnson S, Evans D, Laurenson S, Paul D, Davies AG, Ferrigno PK, Wälti C (2008) Surface-immobilized peptide aptamers as probe molecules for protein detection. *Analytical Chemistry* 80: 978-983.
- Katsube, Kurisaka, Ogawa, Maruyama, Ohtsuka, Utsumi, Takaiwa (1999) Accumulation of soybean glycinin and its assembly with the glutelins in rice. *Plant Physiology* 120: 1063-1074.

- Kim J, Smith JJ, Tian L, Dellapenna D (2009) The evolution and function of carotenoid hydroxylases in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* 50: 463-479.
- Kitamura K, Yoshida C, Kinoshita Y, Kadowaki T, Takahashi Y, Tayama T, Kawakubo T, Naimuddin M, Salimullah M, Nemoto N, Hanada K, Husimi Y, Yamamoto K, Nishigaki K (2009) Development of systemic in vitro evolution and its application to generation of peptide-aptamer-based inhibitors of cathepsin E. *Journal of Molecular Biology* 387: 1186-1198.
- Kolaj O, Spada S, Robin S, Wall JG (2009) Use of folding modulators to improve heterologous protein production in Escherichia coli. *Microbial Cell Factories* 8: 9.
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics MGG* 204: 383-396.
- Lai J, Messing J (2002) Increasing maize seed methionine by mRNA stability. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 30: 395-402.
- Lee DW, Kim JK, Lee S, Choi S, Kim S, Hwang I (2008) Arabidopsis nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs. *The Plant Cell* 20: 1603-1622.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research* 30: 325-327.
- Lewin B (1997) *Genes VI*. Oxford University Press
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel ET (2008) PSY3, a New Member of the Phytoene Synthase Gene Family Conserved in the Poaceae and Regulator of Abiotic Stress-Induced Root Carotenogenesis. *PLANT PHYSIOLOGY* 146: 1333-1345.
- Li F, Tsfadia O, Wurtzel ET (2009) The phytoene synthase gene family in the Grasses: subfunctionalization provides tissue-specific control of carotenogenesis. *Plant Signaling & Behavior* 4: 208-211.
- Li F, Vallabhaneni R, Yu J, Rocheford T, Wurtzel ET (2008) The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiology* 147: 1334-1346.
- Li L, Van Eck J (2007) Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink. *Transgenic Research* 16: 581-585.
- Li Y (2009) Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in Escherichia coli. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 54: 1-9.
- Liu Q, Singh S, Green A (2002) High-oleic and high-stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *Journal of the American College of Nutrition* 21: 205S-211S.
- Lopez-Ochoa L, Nash TE, Ramirez-Prado J, Hanley-Bowdoin L (2009) Isolation of Peptide aptamers to target protein function. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 535: 333-360.

- Lu S, Li L (2008) Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 778-785.
- Lu S, Van Eck J, Zhou X, Lopez AB, O'Halloran DM, Cosman KM, Conlin BJ, Paolillo DJ, Garvin DF, Vrebalov J, Kochian LV, Küpper H, Earle ED, Cao J, Li L (2006) The cauliflower Or gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation. *The Plant Cell* 18: 3594-3605.
- Lu Z, Murray KS, Van Cleave V, LaVallie ER, Stahl ML, McCoy JM (1995) Expression of thioredoxin random peptide libraries on the Escherichia coli cell surface as functional fusions to flagellin: a system designed for exploring protein-protein interactions. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* 13: 366-372.
- Maass D, Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R (2009) Carotenoid crystal formation in Arabidopsis and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PloS One* 4: e6373.
- MacFarlane SA, Uhrig JF (2008) Yeast two-hybrid assay to identify host-virus interactions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 451: 649-672.
- Magaña-Gómez JA, de la Barca AMC (2009) Risk assessment of genetically modified crops for nutrition and health. *Nutrition Reviews* 67: 1-16.
- Mason JM, Müller K, Arndt KM (2008) iPEP: peptides designed and selected for interfering with protein interaction and function. *Biochemical Society Transactions* 36: 1442-1447.
- Matusova R, Rani K, Verstappen FW, Franssen MC, Beale MH, Bouwmeester HJ (2005) The Strigolactone Germination Stimulants of the Plant-Parasitic Striga and Orobanche spp. Are Derived from the Carotenoid Pathway. *Plant Physiol.* 139: 920-934.
- Mendes-Pinto MM (2009) Carotenoid breakdown products the-norisoprenoids-in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483: 236-245.
- Milborrow BV (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52: 1145-1164.
- Miller RA (2009) Ligand-regulated peptide aptamers. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 535: 315-331.
- Molina C, Grotewold E (2005) Genome wide analysis of Arabidopsis core promoters. *BMC Genomics* 6: 25.
- Möller S, Croning MD, Apweiler R (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics (Oxford, England)* 17: 646-653.
- Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F, Groner B (2004) The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells. *Molecular Cancer Research: MCR* 2: 170-182.
- Nair R, Rost B (2005) Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization. *Journal of Molecular Biology* 348: 85-100.

- Naqvi S, Zhu C, Farre G, Ramessar K, Bassie L, Breitenbach J, Perez Conesa D, Ros G, Sandmann G, Capell T, Christou P (2009) Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 7762-7767.
- Newell-McGloughlin M (2008) Nutritionally improved agricultural crops. *Plant Physiology* 147: 939-953.
- Norman TC, Smith DL, Sorger PK, Drees BL, O'Rourke SM, Hughes TR, Roberts CJ, Friend SH, Fields S, Murray AW (1999) Genetic selection of peptide inhibitors of biological pathways. *Science (New York, N.Y.)* 285: 591-595.
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* 302: 205-217.
- Nouvion A, Thibaut J, Lohez OD, Venet S, Colas P, Gillet G, Lalle P (2007) Modulation of Nr-13 antideath activity by peptide aptamers. *Oncogene* 26: 701-710.
- Ohmiya A, Kishimoto S, Aida R, Yoshioka S, Sumitomo K (2006) Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CmCCD4a) Contributes to White Color Formation in Chrysanthemum Petals. *Plant Physiol.* 142: 1193-1201.
- Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH, Granell A (2006) Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology* 140: 3-11.
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL, Drake R (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* 23: 482-487.
- Paschke M, Tiede C, Höhne W (2007) Engineering a circularly permuted GFP scaffold for peptide presentation. *Journal of Molecular Recognition* 20: 367-378.
- Peelle B, Lorens J, Li W, Bogenberger J, Payan DG, Anderson DC (2001) Intracellular protein scaffold-mediated display of random peptide libraries for phenotypic screens in mammalian cells. *Chemistry & Biology* 8: 521-534.
- Perry KL, Simonitch TA, Harrison-Lavoie KJ, Liu ST (1986) Cloning and regulation of *Erwinia herbicola* pigment genes. *Journal of Bacteriology* 168: 607-612.
- Phizicky EM, Fields S (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews* 59: 94-123.
- Pickering BM, Willis AE (2005) The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16: 39-47.
- Pogson BJ, Rissler HM (2000) Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 355: 1395-1403.
- Prins M, Lohuis D, Schots A, Goldbach R (2005) Phage display-selected single-chain antibodies confer high levels of resistance against Tomato spotted wilt virus. *The Journal of General Virology* 86: 2107-2113.

- Ravanello MP, Ke D, Alvarez J, Huang B, Shewmaker CK (2003) Coordinate expression of multiple bacterial carotenoid genes in canola leading to altered carotenoid production. *Metabolic Engineering* 5: 255-263.
- Rost B, Casadio R, Fariselli P, Sander C (1995) Prediction of helical transmembrane segments at 95% accuracy. *Protein Sci* 4: 521-33.
- Rudolph C, Schreier PH, Uhrig JF (2003) Peptide-mediated broad-spectrum plant resistance to tospoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 4429-4434.
- Sambrook J, Fritsch EF, Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- Sandmann G, Römer S (2006) Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering* 8: 291-302.
- Schiestl RH, Gietz RD (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics* 16: 339-346.
- Schledz M, Al-Babili S, Lintig JV, 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. *The Plant Journal* 10: 781-792.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* 37: 501-506.
- Schwall GP, Safford R, Westcott RJ, Jeffcoat R, Tayal A, Shi YC, Gidley MJ, Jobling SA (2000) Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nature Biotechnology* 18: 551-554.
- Scott JK, Smith GP (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science (New York, N.Y.)* 249: 386-390.
- Shewmaker, Sheehy, Daley, Colburn, Ke (1999) Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 20: 401-412X.
- Shin Y, Park H, Yim S, Baek N, Lee C, An G, Woo Y (2006) Transgenic rice lines expressing maize C1 and R-S regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm. *Plant Biotechnology Journal* 4: 303-315.
- Siefermann-Harms D, Hertzberg S, Borch G, Liaaen-Jensen S Lactucaxanthin, an β -carotene-3,3'-diol from *Lactuca sativa**1. *Phytochemistry* 20: 85-88.
- Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)* 228: 1315-1317.
- Soellick TR, Uhrig JF (2001) Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses. *Genome Biology* 2: RESEARCH0052.
- Sørensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115: 113-128.

- Sun Z, Gantt E, Cunningham FX (1996) Cloning and functional analysis of the beta-carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 24349-24352.
- Sun Z, Hans J, Walter MH, Matusova R, Beekwilder J, Verstappen FWA, Ming Z, van Echtelt E, Strack D, Bisseling T, Bouwmeester HJ (2008) Cloning and characterisation of a maize carotenoid cleavage dioxygenase (ZmCCD1) and its involvement in the biosynthesis of apocarotenoids with various roles in mutualistic and parasitic interactions. *Planta* 228: 789-801.
- Tan B, Joseph LM, Deng W, Liu L, Li Q, Cline K, McCarty DR (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 35: 44-56.
- Tanaka Y, Ohmiya A (2008) Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 190-197.
- Tanvetyanon T, Bepler G (2008) Beta-carotene in multivitamins and the possible risk of lung cancer among smokers versus former smokers: a meta-analysis and evaluation of national brands. *Cancer* 113: 150-157.
- Taylor M, Ramsay G (2005) Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiologia Plantarum* 124: 143-151.
- Tian L, DellaPenna D (2001) Characterization of a second carotenoid β -hydroxylase gene from *Arabidopsis* and its relationship to the LUT1 locus. *Plant Molecular Biology* 47: 379-388.
- Tian L, DellaPenna D (2004) Progress in understanding the origin and functions of carotenoid hydroxylases in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 430: 22-29.
- Tian L, Magallanes-Lundback M, Musetti V, DellaPenna D (2003) Functional Analysis of β - and ϵ -Ring Carotenoid Hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 1320-1332.
- Tomai E, Butz K, Lohrey C, von Weizsäcker F, Zentgraf H, Hoppe-Seyler F (2006) Peptide Aptamer-mediated Inhibition of Target Proteins by Sequestration into Aggresomes. *Journal of Biological Chemistry* 281: 21345-21352.
- Trahtenherts A, Gal-Tanamy M, Zemel R, Bachmatov L, Loewenstein S, Tur-Kaspa R, Benhar I (2008) Inhibition of hepatitis C virus RNA replicons by peptide aptamers. *Antiviral Research* 77: 195-205.
- Uhrig JF (2006) *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*, chapter 53. Global Science Books, London
- Uhrig J (2008) Protein-mediated Resistance to Plant Viruses. *Biotechnology and Plant Disease Management*: 358.
- Uhrig JF (2003) Response to Prins: broad virus resistance in transgenic plants. *Trends in Biotechnology* 21: 376-377.
- van der Velden AW, Thomas AA (1999) The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31: 87-106.

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 33: 949-956.

Welsch R, Beyer P, Huguency P, Kleinig H, von Lintig J (2000) Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211: 846–854.

Welsch R, Wust F, Bar C, Al-Babili S, Beyer P (2008) A Third Phytoene Synthase Is Devoted to Abiotic Stress-Induced Abscisic Acid Formation in Rice and Defines Functional Diversification of Phytoene Synthase Genes. *PLANT PHYSIOLOGY* 147: 367-380.

Welsch R, Maass D, Voegel T, Dellapenna D, Beyer P (2007) Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of Arabidopsis leaves. *Plant Physiology* 145: 1073-1085.

Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer P, Von Lintig J (2003) Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from Arabidopsis thaliana. *Planta* 216: 523-534.

White PJ, Broadley MR (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets--iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *The New Phytologist* 182: 49-84.

Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends in Biochemical Sciences* 28: 182-188.

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS One* 2: e718.

Woodman R, Yeh JT, Laurenson S, Ferrigno PK (2005) Design and Validation of a Neutral Protein Scaffold for the Presentation of Peptide Aptamers. *Journal of Molecular Biology* 352: 1118-1133.

Wurbs D, Ruf S, Bock R (2007) Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 49: 276-288.

Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000) Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science (New York, N.Y.)* 287: 303-305.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen – die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von (Name des anleitenden Dozenten oder der anleitenden Dozentin) betreut worden.

Tamara Zietek

Mein Dank gilt:

Herrn PD Dr. Joachim Uhrig für die Vergabe dieser Arbeit und die umfassende wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Dr. Peter Welters für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bei der Firma Phytowelt.

Herrn Dr. Guido Jach für die fachliche Betreuung, freundliche Unterstützung und große Hilfsbereitschaft während der Promotion, sowie für das Korrekturlesen.

Andrea Schrader für die großartige Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und den wissenschaftlichen Austausch, sowie für das Korrekturlesen.

Jessica Jung für ihre engagierte Mitarbeit und zuverlässige Hilfe bei den experimentellen Arbeiten.

Frau Dr. Kathrin Schullehner für ihre freundliche Unterstützung und für das Korrekturlesen, sowie Markus Westphal für das mehrfache Retten meiner Computer.

Der gesamten molekularbiologischen Arbeitsgruppe der Firma Phytowelt für die großartige Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima, sowie allen Phytowelt-Mitarbeitern für ihre Unterstützung.

Den Mitarbeitern des Botanik III-Lehrstuhl der Universität zu Köln, insbesondere Bastian Welter für die große Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten.

Meinem Freund Jörn Trümmner und all meinen großartigen Freunden für die wichtige persönliche Unterstützung während der Promotion.

Meiner Patentante Krystyna Ullmann für ihre selbstlose und aufopfernde Hilfe in schweren Zeiten.

Insbesondere meiner Mutter... für alles.