

Herstellung eines  
*Phaffia rhodozyma* – Stamms  
mit verstärkter Astaxanthin-Synthese  
über gezielte genetische Modifikation chemisch mutagenisierter Stämme

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich 15  
der Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Sören Gassel  
aus Hanau

Frankfurt, 2014



Vom Fachbereich 15 der

Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: .....

Gutachter: .....

Datum der Disputation: .....

„Meeeeoooooww“ - Cinderella

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	8
Konventionen .....	11
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>12</b>
1.1 Carotinoide: Struktur und natürliche Funktion .....	12
1.2 Carotinoide in Industrie und Medizin .....	14
1.2.1 Industrielle Bedeutung von Carotinoiden .....	14
1.2.2 Medizinische Bedeutung von Carotinoiden .....	16
1.3 Terpenoid-Biosynthese .....	18
1.4 <i>Phaffia rhodozyma</i> / <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	22
1.4.1 Allgemeine Informationen .....	22
1.5 Carotinoid-Biosynthese in <i>Phaffia rhodozyma</i> .....	24
1.6 Astaxanthin .....	29
1.6.1 Chemische Struktur und spektrale Eigenschaften .....	29
1.6.2 Medizinische Bedeutung von Astaxanthin .....	30
1.6.3 Industrielle Bedeutung von Astaxanthin .....	31
1.7 Genetische Modifikation von <i>Phaffia rhodozyma</i> .....	33
1.8 Ziel dieser Dissertation .....	33
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.1 Material .....	35
2.1.1 Verwendete Computersoftware .....	35
2.1.2 Carotinoidstandards .....	35
2.1.3 Verwendete Geräte und Chemikalien .....	36
2.2 Methoden .....	38
2.2.1 Kulturbedingungen der Organismen .....	38
2.2.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	38
2.2.1.2 <i>Phaffia rhodozyma</i> .....	38
2.2.1.3 Verwendete Stämme .....	40
2.2.1.4 Herstellung von Dauerkulturen .....	43
2.2.2 DNA-spezifische Methoden .....	44
2.2.2.1 Restriktion von DNA .....	44
2.2.2.2 Amplifikation von DNA durch PCR .....	45

2.2.2.3	Reinigung von DNA.....	46
2.2.2.4	Analyse von DNA mittels Gelelektrophorese .....	47
2.2.2.5	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	48
2.2.2.6	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	48
2.2.2.7	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	48
2.2.2.8	Plasmid-„Midi“-Präparation aus <i>E. coli</i> .....	49
2.2.2.9	Verwendete Plasmide .....	49
2.2.2.10	Bestimmung von Gen-Kopienzahlen über „Realtime-PCR-Analyse“	50
2.2.3	<i>Phaffia rhodozyma</i> -spezifische Methoden .....	52
2.2.3.1	Herstellung elektrokompenter <i>Phaffia rhodozyma</i> -Zellen .....	52
2.2.3.2	Transformation von <i>Phaffia rhodozyma</i> mittels Elektroporation.....	52
2.2.3.3	Carotinoid-Extraktion aus <i>Phaffia rhodozyma</i> .....	53
2.2.3.4	Quantifikation des Gesamtcarotinoide .....	54
2.2.3.5	Chromatographische Analyse des Gesamtcarotinoide mittels HPLC	54
2.2.3.6	Isolation von genomischer DNA aus <i>Phaffia rhodozyma</i> .....	54
2.2.3.7	Mikroskopie von <i>Phaffia rhodozyma</i> .....	55
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>
3.1	Evaluation und Optimierung der Mutanten AXJ-20, AXG-13 und TTH-2 .....	57
3.2	Untersuchung der Wachstumsform auf Sporulationsmedium .....	61
3.3	Herstellung der Carotinoidstandards .....	64
3.4	Isolation einer Spezies mit neuartigen Carotinoiden .....	67
3.5	Exploratorische Transformationsversuche der Mutanten .....	71
3.6	Untersuchung zur Stabilität der Transformanten .....	77
3.6.1	PR1-104 als Testsystem für Transformationsstabilität.....	78
3.7	Herstellung eines Astaxanthin-Hochproduzierenden <i>Phaffia</i> -Stamms .....	84
3.7.1	Charakterisierung neuer Isolate von AXG-13 und AXJ-20 .....	84
3.7.2	Strategie der genetischen Modifikation .....	85
3.7.3	Überexpression von <i>crtYB</i> und <i>asy</i> .....	86
3.7.4	Überexpression von <i>HMG1</i> und <i>crtE</i> .....	89
3.7.5	Carotinoidzusammensetzung der Transformanten .....	93
3.7.6	Zusätzliche Erhöhung der <i>asy</i> -Kopienzahl.....	95
3.7.7	Bestimmung der Kopienzahl der integrierten Plasmide .....	99
3.7.8	Stabilität der Pigmentierung in den neuen Transformanten in Kultur .....	101
3.7.8.1	Einfluss der Lagerung in Dauerkultur bei -80°C auf die Stabilität .....	102

3.7.8.2 Einfluss von Antibiotika auf die Pigmentierung .....	104
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>105</b>
4.1 Herstellung eines Astaxanthin-Hochproduzenten .....	106
4.1.1 Exploratorische Phase .....	107
4.1.2 Erweiterte Optimierung der Astaxanthinsynthese .....	109
4.2 Einfluss der Anzahl integrierter Transformationsplasmide .....	114
4.3 Identifizierung auffälliger Carotinoide in AXJ-20/crtYB .....	117
4.4 Stabilität der Mutanten und Transformanten .....	119
4.4.1 Stabilität und Eigenschaften der chemischen Mutanten .....	119
4.4.2 Stabilität der Transformanten .....	121
4.4.3 Stabilität der Stämme aus Dauerkulturen.....	127
4.5 Ausblick .....	129
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>130</b>
<b>6. Publikationen .....</b>	<b>145</b>
<b>7. Zusammenfassung der Doktorarbeit .....</b>	<b>146</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnisse .....</b>	<b>148</b>
8.1 Allgemeine Abbildungen.....	148
8.2 Abbildungen des Anhangs.....	149
<b>9. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>150</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>151</b>
<b>11. Erklärung .....</b>	<b>152</b>
<b>12. Anhang .....</b>	<b>153</b>
12.1 <i>Rhodococcus sp. CIP</i> Phänotyp.....	153
12.2 HPLC-Analysen der Astaxanthin-Hochproduzenten .....	154
12.2.1 AXJ-20-Stammlinie.....	154
12.2.1 AXG-13-Stammlinie.....	155
12.2.3 Spektren der detektierten Carotinoide in den Transformanten .....	156
12.3 Karten der Transformationsvektoren .....	157
12.3.1 Plasmidkarte pPR13F .....	157

12.3.2 Plasmidkarte pPR2TNHasy.....	158
12.3.3 Plasmidkarte pPR13Fasy.....	159
12.3.4 Plasmidkarte pPR2TNH-tHMG1/crtE .....	160
12.3.5 Plasmidkarte pPR2TNo-asy .....	161
12.3.6 Plasmidkarte pPRcDNA1bkt830 .....	162
12.4 Pigmentoptimierung in PR1-104/bkt#2.....	163
12.5 Carotinoidsynthese der Mutanten verschiedener Bereitstellungen .....	164
12.6 Rohdaten der Carotinoidanalysen .....	165
12.7 Rohdaten der Realtime-PCR-Analysen.....	168
12.7.1 Effizienzbestimmungen .....	168
12.7.2 C(t)-Werte der „Realtime-PCR-Analysen“ .....	168

## Abkürzungsverzeichnis

---

°C	Grad Celsius
Ω	Ohm
AACT	Acetyl-Coenzym-A-Thiolase
Abb.	Abbildung
AMD	Altersbedingte Makulardegeneration
<i>asy</i> /ASY	Astaxanthinsynthase nach Ojima et al. 2006
AST	Astaxanthin
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
b.B.	bei Bedarf
<i>bkt</i>	β-Carotin-Ketolase
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare
bwt	„birth-weight“
cm	Zentimeter
<i>crtE</i> / CRTE	Geranylgeranyldiphosphat-Synthase
<i>crtYB</i> /CRTYB	Phytoensynthase ( <i>crtB</i> )/ Lycopinzyklase ( <i>crtY</i> )
<i>crtI</i> / CRTI	Phytoen-Desaturase
<i>crtR</i> / CRTR	Cytochrom-P450-Reduktase
<i>crtS</i> / CRTS	Astaxanthinsynthase aus <i>P. rhodozyma</i> nach Alvarez et al. 2006
<i>crtZ</i> / CRTZ	Hydroxylase aus <i>E.uredovora</i>
CYP	Cytochrom P450
DAD	Diode-Array-Detektor
DK	Dauerkultur
DMAPP	Dimethylallyl-Diphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DXP	Desoxyxylulose-5-phosphat
dw	Trockengewicht (engl. „dry weight“)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. uredovora</i>	<i>Erwinia uredovora</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethyl-Methan-Sulfonat
et al.	et <i>alteri</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid

---



---

FPP	Farnesyl-Diphosphat
g	Gramm
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPP	Geranyldiphosphat
GSM	Minimalmedium für <i>P. rhodozyma</i>
<i>H. pluvialis</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HMG1	Hydroxymethylglutaryl-Reduktase
HMGs	Hydroxymethylglutaryl-Synthase
HPLC	„High-Pressure-Liquid-Chromatography“
Hyg	Hygromycin
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
<i>Idi</i> / IDI	Isopentenylidiphosphat-Isomerase
<i>ispA</i>	Farnesyl-Diphosphat-Synthase
IPP	Isopentenylidiphosphat
kb /kbp	Kilobasen / Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
LB	Bakterielles Kultivierungsmedium (engl. „Lysogeny Broth“)
LDL	„low-density-lipoprotein“
LHC	Lichtsammelkomplex (engl. „light harvesting complex“)
L	Liter
M	Mol
Mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min.	Minuten
Mio	Millione
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
Mrd	Milliarde
mV	Millivolt
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

---

---

µmol /µM	Mikromol
N	Normalität
NAT	Nourseothricin
n.d.	nicht detektiert
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NTG	N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxy(-gruppe)
ORF	Offener Leserahmen (engl. „open-reading-frame“)
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. „Polymerase-chain-reaction“)
PK	Positivkontrolle
pmol	Pikomol
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. „rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TC	Gesamtcarotinoid (engl. „total carotenoid“)
TES	Spurenelementlösung (engl. „trace elements solution“)
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
ÜE	Überexpression
UV	Ultraviolett
V	Volt
<i>X. dendrorhous</i>	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>
YPD	Komplexmedium für <i>P. rhodozyma</i>

---

## Konventionen

In der vorliegenden Dissertation werden Gene in kursiver Formatierung beschrieben (z.B. *crtYB*), Genprodukte dagegen in Blockschrift (z.B. CRTYB) dargestellt.

Das Gen, bzw. das Enzym Astaxanthinsynthase wird in dieser Arbeit, konform der 3-Buchstabenkonvention für eukaryotische Carotinoidegene, als *asy*, bzw. ASY nach Ojima et al. 2006 beschrieben, nicht als *crtS* bzw. CRTS nach Alvarez et al. 2006. Die Astaxanthin-P450-Reduktase wird aus gleichen Gründen *asr* (ASR) abgekürzt (Schmidt et al. 2010), nicht mit *crtR* nach Alcaíno et al. 2008, da *crtR* bereits einer cyanobakteriellen  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase zugeordnet wurde (Masamoto et al. 1998).

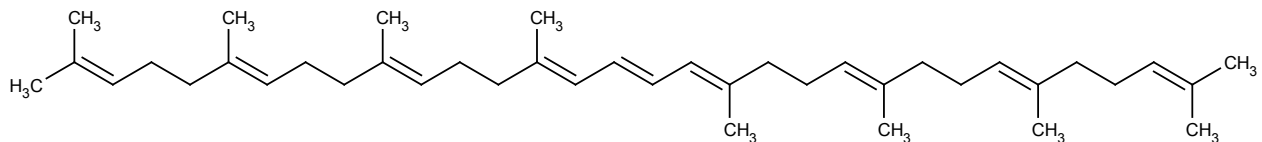
Der in dieser Dissertation bearbeitete Organismus wird nach seiner anamorphen Fortpflanzungsform *Phaffia rhodozyma* bezeichnet (Johnson 2003), nicht nach seiner teleomorphen Form *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Johnson 2003, Golubev 1995).

In dieser Arbeit wird unter der Bezeichnung Gesamtastaxanthin, Astaxanthinmenge oder Astaxanthingehalt stets die Summe von *all-trans*-Astaxanthin und 9-*cis*-Astaxanthin beschrieben. Es wird bei der Erfassung der Astaxanthinmenge nicht zwischen den isomeren Formen unterschieden.

# 1 Einleitung

## 1.1 Carotinoide: Struktur und natürliche Funktion

Carotinoide sind langkettige Kohlenwasserstoffverbindungen (C<sub>40</sub> oder C<sub>30</sub>), welche in allen nicht-tierischen Organismen synthetisiert werden können, jedoch in allen Lebensformen zu finden sind. Tiere sind zu einer *de-novo*-Synthese von Carotinoiden nicht fähig und müssen ihren Bedarf an dieser Stoffklasse über die Nahrung aufnehmen. Eine Ausnahme stellt eine Blattlausart dar, welche Carotinoide *de-novo* herstellen kann. Die notwendigen Gene für die Synthese wurden durch lateralen Gentransfer aus Pilzen erworben (Moran und Jarvik 2010). Man unterscheidet grundsätzlich zwischen Carotinen und Xanthophyllen, wobei Xanthophylle hierbei per Definition Sauerstoffgruppen an der Kohlenstoffkette gebunden haben, während Carotine über solche kovalenten Seitengruppen nicht verfügen. Das farblose Carotinoid Phytoen zum Beispiel (Abb. 1) gehört zu den Carotinen und stellt in Eukaryoten und in den meisten Prokaryoten das erste C<sub>40</sub>-Carotinoid dar, welches im Biosyntheseweg entsteht (Sandmann 2002).



**Abb. 1: Grundstruktur Phytoen.**

Die Abbildung zeigt die Strukturformel von Phytoen, das erste Carotinoid im Biosyntheseweg von Eukaryoten. Es handelt sich um eine C<sub>40</sub>-Kohlenstoffkette mit nur drei konjugierten Doppelbindungen.

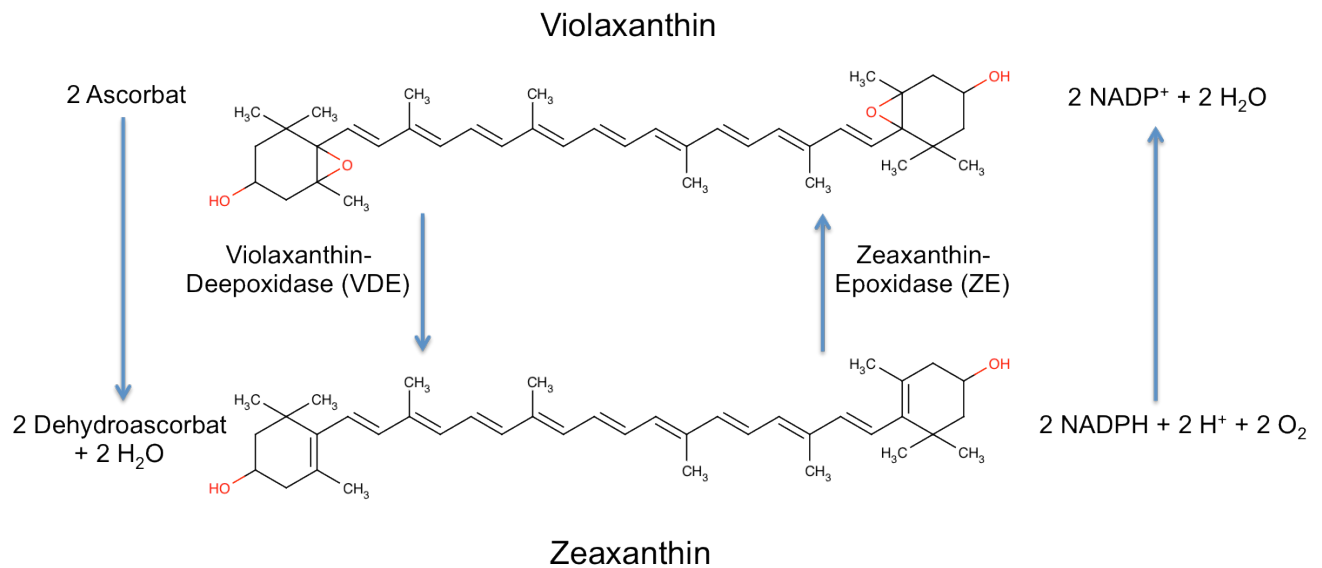
Die natürlichen Funktionen der Carotinoide sind äußerst vielseitig. So ist ihre Farbigkeit grundsätzlich definiert durch die spektralen Eigenschaften der mit Doppelbindungen mehrfach gesättigten Kohlenstoffkette. Hierdurch erscheinen uns Carotinoide als gelb bis rot gefärbte Pigmente. Carotinoide absorbieren Licht allgemein in einem Wellenlängenbereich von 400 nm bis etwa 500 nm und weisen ein Emissionsspektrum zwischen 600 nm und 700 nm auf. Durch diese spektralen Eigenschaften erklärt sich unsere Farbwahrnehmung dieser Pigmente.

## 1 Einleitung

Carotinoide sind aufgrund ihrer Zusammensetzung als reine Kohlenwasserstoffe oder in Verbindung mit polareren Seitengruppen grundsätzlich unpolare Moleküle, weshalb sie aufgrund dieser Hydrophobie membranständig oder an Lipiden in der Zelle lokalisiert sind (Frank et al. 1999). Es sind derzeit über 800 verschiedene Verbindungen dieser Stoffklasse bekannt, etwa 700 davon entstehen tatsächlich auf natürliche Weise in Organismen, während der Rest durch chemische Synthese hergestellt wurde (Britton et al. 2004).

Carotinoide schützen den Organismus auf zellulärer Ebene vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Sandmann 2002). Die Fähigkeit überschüssige Energie zu „quenchen“, als Wärme abzugeben und somit ROS vorzubeugen, ist eine Folge des konjugierten Doppelbindungssystem (Iannone et al. 1998, Sies et al. 1992, Krinsky 1989). Carotinoide fungieren auch als Hilfspigment während der Photosynthese in Pflanzen membrangebunden als Teil der akzessorischen Lichtsammelkomplexe (LHC) photochemische Energie in die Reaktionszentren der Photosysteme zu leiten. Ein besonders charakteristisches Beispiel für die Rolle der Carotinoide als Schutzpigment ist der Xanthophyllzyklus in Pflanzen (Abb. 2). Wird die Pflanze Starklicht ausgesetzt, so kommt es zu einer Überbelastung der Chlorophylle in den Lichtsammelkomplexen. Die aufgenommene Anregungsenergie kann nicht mehr über die akzessorischen Elemente weitergeleitet werden, wodurch es zu einer Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie beispielsweise Singulett-Sauerstoff kommen kann. Konsequenz der Überstimulation ist weiterhin eine Überlastung des Protonengradienten der ATP-Synthase in der Thylakoidmembran der Chloroplasten, worauf es zu einer Akkumulation von Protonen und somit zu einer Ansäuerung des Thylakoidlumens kommt. Diese Ansäuerung aktiviert eine Deepoxidase, welche Violaxanthin unter Oxidation von Ascorbat und Entstehung von  $H_2O$  zu Zeaxanthin über einen Zwischenschritt umwandelt. Die Rückreaktion zur Regeneration von Violaxanthin findet über eine enzymvermittelte Epoxidation von Zeaxanthin über die Zeaxanthin-Epoxidase statt. Die überschüssige Energie wird noch vor der Entstehung von ROS durch die Deepoxidation von Violaxanthin und somit des Verbrauchs von Protonen und einer Abgabe von Wärme abgefangen (Jahns et al. 2009).

# 1 Einleitung



**Abb. 2: Xanthophyll-Zyklus in Pflanzen.**

Abgebildet ist ein vereinfachtes Schema des Xanthophyllzyklus, wie er in Chloroplasten der Pflanzen bei Lichtstress aktiviert wird. Nach Aktivierung der Violaxanthin-Epoxidase durch einen sinkenden pH-Wert im Lumen des Chloroplasten als Folge des erhöhten Protonengradienten, wird über Oxidation von Ascorbat  $\text{H}_2\text{O}$  gebildet, um den Protonenstrom aus der erhöhten Aktivität der LHCs abzufangen. Es entsteht bei dieser Reaktion Zeaxanthin und Wasser. Die Regeneration von Violaxanthin erfolgt durch die Zeaxanthin-Epoxidase (Jahns et al. 2009).

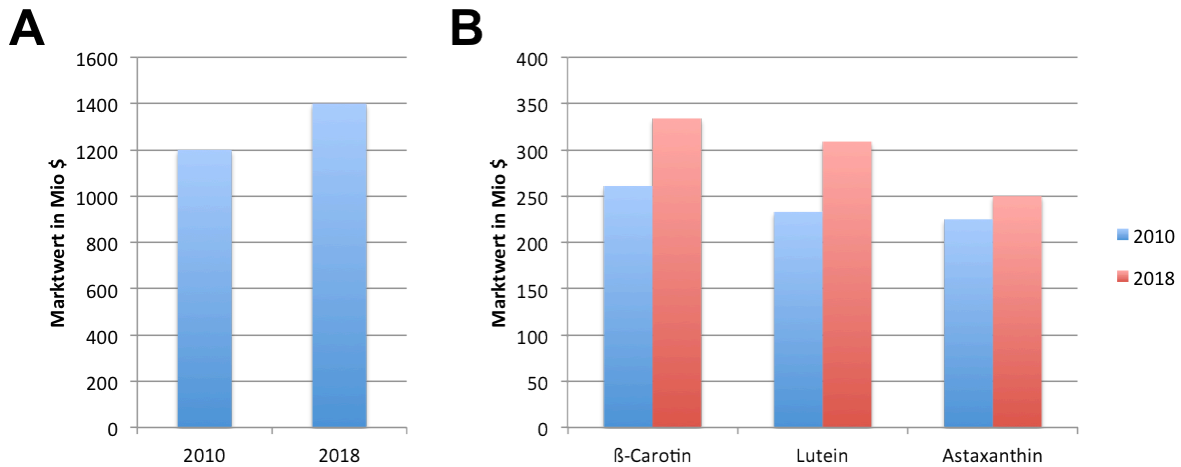
## 1.2 Carotinoide in Industrie und Medizin

### 1.2.1 Industrielle Bedeutung von Carotinoiden

Carotinoide sind zu einem globalen Milliardengeschäft geworden. Weltweit steigt der Bedarf an Carotinoiden als Substanz für die unterschiedlichsten Anwendungen, wie beispielsweise als Lebensmittelzusätze, Nahrungsergänzungsmittel, Futtermittelbestandteile oder als Provitamin A. Der weltweite Gesamtumsatz von Carotinoiden (Abb. 3) belief sich im Jahr 2010 auf 1,2 Mrd. US-Dollar, mit einer jährlichen Wachstumsrate von 2,3 % und einer Voraussage von 1,4 Mrd. US-Dollar Umsatz bis zum Jahr 2018.  $\beta$ -Carotin hat vor allem als Lebensmittelfarbstoff den größten Anteil am weltweiten Gesamtumsatz der Carotinoide. 2010 lag der Marktwert bei 261 Mio. US-Dollar, Analysten gehen von einem 3,1 % Wachstum aus und erwarten im Jahr 2018 einen Marktwert von über 330 Mio. US-Dollar. Den zweithöchsten Marktwert besitzt Lutein, welches ebenfalls als Lebensmittelfarbstoff Verwendung mit 233 Mio. US-Dollar und einer Prognose von über 300 Mio. US-Dollar für 2018. Das, vor allem in der industriellen Fischzucht verwendete, Xanthophyll

## 1 Einleitung

Astaxanthin besaß im Jahr 2010 einen Marktwert von 225 Mio. US-Dollar, bis 2018 wird ein Anstieg um 10 % des weltweiten Marktwertes von 250 Mio. US-Dollar erwartet (BCC Research 2011).



**Abb. 3: Weltweiter Gesamtmarktwert und Marktwert der drei umsatzstärksten Carotinoide.**

Das Diagramm zeigt den Gesamtmarktwert aller Carotinoide weltweit (**A**) und die aktuellen Marktwerte der drei am stärksten gehandelten Carotinoide auf dem Weltmarkt (**B**). Das Gesamtvolumen des weltweiten Carotinoidhandels lag im Jahr 2010 bei 1,2 Mrd. Dollar und wird für das Jahr 2018 auf 1,4 Mrd. Dollar geschätzt (**A**). Im Jahr 2010 (**B**, blau) verzeichnete  $\beta$ -Carotin mit einem Volumen von 261 Mio. Dollar den stärksten Umsatz, gefolgt von Lutein (233 Mio. Dollar) und das immer wichtiger werdende Astaxanthin (225 Mio. Dollar). Bis zum Jahr 2018 wird nach Analysen ein kräftiges Wachstum erwartet. So erwartet man für  $\beta$ -Carotin einen Marktwert von über 330 Mio. Dollar, für Lutein über 300 Mio. Dollar und für Astaxanthin ein Wachstum um 25 Mio. Dollar auf 250 Mio. Dollar (Grafik nach BCC Research 2011).

Carotinoide werden größtenteils durch chemische Synthese hergestellt, wobei die Möglichkeiten zur biotechnologischen Produktion fortwährend geprüft und teilweise auch angewandt werden.  $\beta$ -Carotin wird als Farbstoff oder Provitamin A aus wirtschaftlichen Gründen vornehmlich chemisch synthetisiert. Das zweitumsatzstärkste Carotinoid Lutein wird hingegen komplett aus einer Tagetes-Art extrahiert (Fernández-Sevilla et al. 2010) Die chemische Synthese von Astaxanthin konkurriert mit der biotechnologischen Produktion durch Mikroorganismen, wobei die Wirtschaftlichkeit noch immer zu Gunsten der chemischen Synthese liegt (Schmidt et al. 2010).

### 1.2.2 Medizinische Bedeutung von Carotinoiden

Carotinoide spielen längst nicht mehr nur eine Rolle als Lebensmittelzusatz, Farbstoff oder Kosmetikprodukt. Die weiter oben bereits dargestellten, antioxidativen Eigenschaften der Xanthophylle besitzen ein großes Potential für die Entwicklung medizinischer Behandlungsmethoden einer ganzen Reihe von Krankheiten und Mangelerscheinungen. Die positiven Effekte auf die Physiologie des Menschen beruhen einzig auf die Fähigkeit der Carotinoide reaktive Sauerstoffspezies wirkungsvoll zu eliminieren.

Ein Beispiel, welchen Effekt Carotinoide auf die menschliche Physiologie haben kann, ist die altersbedingte Makuladegeneration (AMD). Der „gelbe Fleck“ im menschlichen Auge, welcher als „Makula lutea“ bezeichnet wird, stellt den Punkt des schärfsten Sehens dar. Die Symptome der AMD beschreiben einen Abbau des Epithels und den eingelagerten Sinneszellen, was zu einer fortschreitenden Erblindung bis hin zum Totalverlust der Sehfähigkeit führt. Die gelbliche Färbung dieser besonderen Region im Auge erhält der „Makula lutea“ durch die in die Zellmembran eingelagerte Carotinoide Zeaxanthin und Lutein, wobei eine externe Aufnahme von zusätzlichem Lutein die Pigmentdichte stärker erhöht als eine Zugabe von Zeaxanthin. Man geht davon aus, dass Lutein und Zeaxanthin die Strukturen der „Makula lutea“ vor den Auswirkungen von photooxidativen Prozessen, welche in dieser Region der Netzhaut vermehrt auftreten, durch die antioxidativen Eigenschaften des konjugierten Doppelbindungssystems und der sauerstoffhaltigen Gruppen schützen. Die genauen Hintergründe der Schutzfunktion und wie groß der positive Einfluß der Carotinoide auf die AMD wirklich sind, ist bis heute jedoch noch nicht ausreichend bekannt (Jager et al. 2008).

Auch auf viele Gefäßkrankheiten, welche im Zuge der Alterung auftreten, können Carotinoide, insbesondere die Xanthophylle eine positive Auswirkung haben. Arteriosklerose ist eine Gefäßkrankheit, bei welcher es zu einer gefährlichen Einlagerung von Fetten in die Gefäßwände kommt. Eine wichtige Rolle bei der Entstehung dieser Verengung bildet das „low-density-lipoprotein“ (LDL). LDL bindet wasserunlösliche, jedoch für den Stoffwechsel kritische, Bestandteile im Blut und erwirkt somit eine Transportfähigkeit von Fettsäuren, Cholesterinen oder Vitaminen. Kommt es zu einer Oxidationsreaktion von LDL durch reaktive Sauerstoffspezies, führt



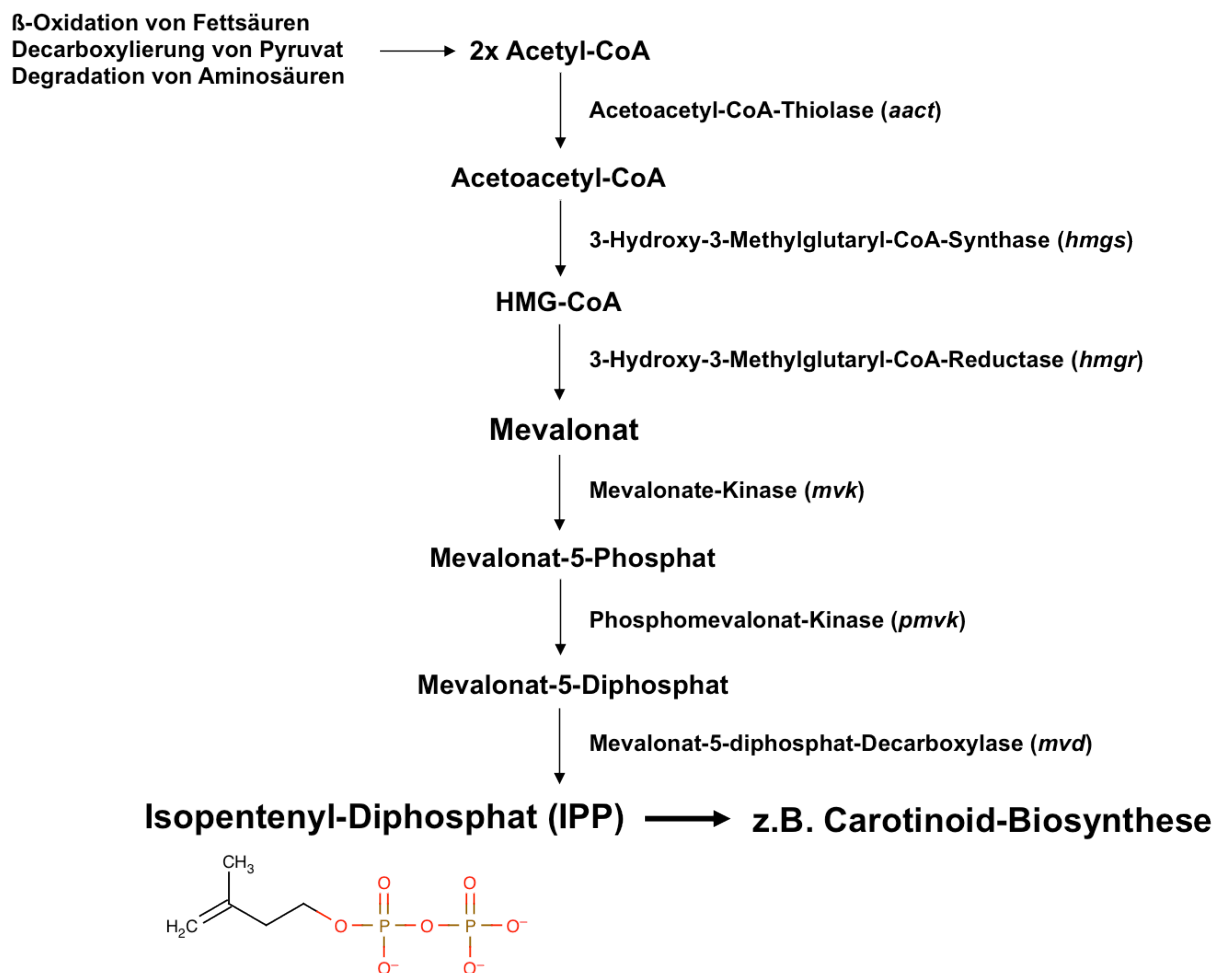
## 1 Einleitung

dies zu einem Funktionsverlust des LDL. Oxidiertes Lipoprotein wird darauf in das Bindegewebe der Gefäße aufgenommen und eingelagert, wodurch es zu einer Akkumulation und letztendlich zu Arteriosklerose kommt (Giordano et al. 2012). Unterschiedliche Studien bestätigen eine direkte Beziehung zwischen der Konzentration von Carotinoiden und Gefäßdicken (Wolak und Esther 2013).

Als drittes Beispiel dafür, wie intensiv sich die medizinische Forschung mit der Wirkung von Carotinoiden auf verschiedene Krankheitsbilder auseinandersetzt, zeigt eine Betrachtung der Krebsforschung bzw. krebstherapeutischen Behandlungen. In einer Arbeit der Arbeitsgruppe Xie et al. von 2013 beschreiben die Autoren die cytotoxischen Auswirkungen von Fucoxanthin auf Krebszellen der HeLa-Zelllinie. Offensichtlich trägt Fucoxanthin dosisabhängig zu autophagischen Prozessen in den abnormen Zellen bei. Lycopin stellt ein weiteres Carotinoid mit starken anticarcinogenem Potential dar. Der Effekt geht wiederum zurück auf die antioxidativen Eigenschaften bestimmter Carotinoide, welche durch Reaktion mit gefährlichen Sauerstoffradikalen, Schäden an z.B. Nukleinsäuren oder Proteinen vermindern. Es gibt eine ganze Reihe an Studien, welche Lycopin eine zellwachstumshemmende Wirkung auf Krebszellen attestiert. Es inhibiert nachweislich das Wachstum verschiedener Tumore der unterschiedlichsten Gewebe wie Leber, Lunge, Prostata, Brust oder auch Darmepithelien (Trejo-Solis et al. 2013). Ein ebenso wirkungsvolles Carotinoid in Verbindung mit carcinogener Transformation stellt das Zeaxanthin dar. In einer Studie konnte eine signifikante, dosisabhängige Sarkomwachstumshemmung festgestellt werden (Firdous et al. 2013).

### 1.3 Terpenoid-Biosynthese

C40-Carotinoide werden aus zwei Molekülen Geranylgeranyl-Diphosphat (GGPP, C20), welche durch eine Reihe von Kondensationsschritten aus vier Molekülen Isopentenyl-Diphosphat (IPP, C5) aufgebaut werden, zu einem C40-Grundmolekül, dem Phytoen, synthetisiert. IPP wird bei Pilzen, Algen und Bakterien entweder im Isoprenoidstoffwechsel über den Mevalonatweg im Cytosol aus Acetyl-CoA (Chang et al. 2013, Sallaud et al. 2009) oder bei Pflanzen über den Deoxyxylulose-5-phosphat-Weg (Sallaud et al. 2009) im Plastid für die weitere Umwandlung zum Terpen bereitgestellt. Pilze beziehen ihr IPP aus dem Mevalonatweg (Abb. 4).



**Abb. 4: Isoprenoidbiosynthese über den Mevalonat-Weg (MEP) in Pilzen.**

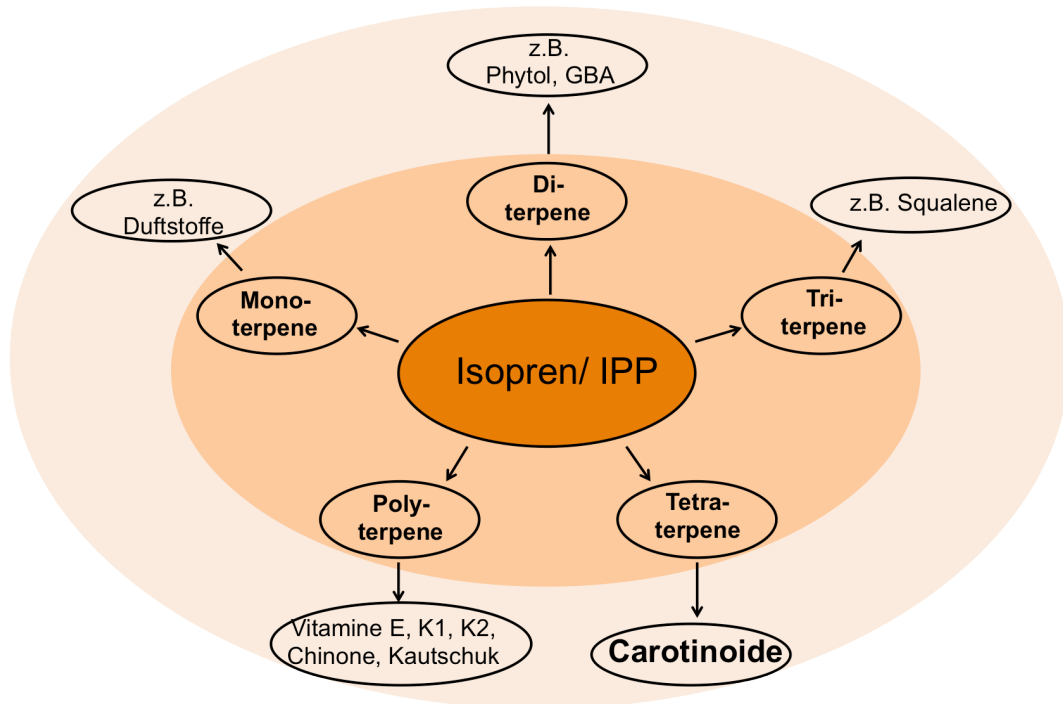
Drei Moleküle Acetyl-CoA sind notwendig für die Synthese des C6-Körpers Mevalonat als Zwischenprodukt über HMG-CoA in diesem Stoffwechselweg. Durch zwei folgende Phosphorylierungen (Mevalonat-Kinase, Phosphomevalonat-Kinase) mit anschließender Decarboxylierung durch eine Mevalonat-5-Diphosphat-Decarboxylase entsteht ein Molekül Isopentenyl-Diphosphat, welches als Grundbaustein für Carotinoide in der Terpenoidbiosynthese benötigt wird.

## 1 Einleitung

Aus zwei Molekülen Acetyl-CoA wird über Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA), katalysiert durch die HMG-CoA-Reduktase, Mevalonat hergestellt. Mevalonat wird durch zwei Phosphorylierungen (durch die Mevalonat-Kinase MVK und die Phosphomevalonatkinase PMVK) und anschließender Decarboxylierung von Mevalonat-5-Diphosphat durch die Mevalonat-5-Diphosphat-Decarboxylase zu einem Molekül (C<sub>5</sub>) Isopentenyl-Diphosphat umgewandelt (Chang et al. 2013). Eine schematische Übersicht über den Ablauf des Mevalonatwegs ist der Abb. 4 zu entnehmen.

IPP ist Grundbaustein für die Synthese von z. B. Mono-, Di-, Tri-, Tetra- oder Polyterpenen und Derivaten (Abb. 5). Monoterpene sind C<sub>10</sub>-Moleküle (2x IPP), aus welchen in Pflanzen beispielsweise Duftstoffe für ätherische Öle synthetisiert werden (Loza-Tavera 1999). Die Grundstruktur der Triterpene ist eine C<sub>30</sub>-Kette. Sie entsteht durch die Kondensation von zwei Molekülen Farnesyl-Diphosphat (C<sub>15</sub>). Squalen (Zhang et al. 1993) ist ein Triterpen welches durch die Squalen-Synthetase (Popják und Agnew 1979) aus FPP synthetisiert wird und ein Substrat für die Synthese von hormonähnlichen Substanzen wie Vitamin D (Dusso et al. 2005), Cholesterol (Ačimovič und Rozman 2013), die Synthese von Ergosterol in Pilzen oder andere wichtige Sterole (Kristan und Rizner 2012, Schroepfer 1982, Wriessnegger und Pichler 2013) ist. Die Synthese von Tetraterpenen erfolgt über die Kondensation von zwei Molekülen Geranylgeranyl-Diphosphat (GGPP). Die Gruppe der Tetraterpenen wird durch die Carotinoide repräsentiert. Polyterpene sind Terpenoide, welche aus mehr als acht Isopreneinheiten aufgebaut sind. Die natürliche Synthese von Kautschuk oder Gummi ist ein Beispiel für Polyterpene (Archer und Audley 1987), aber auch Chinone wie z.B. Ubichinon oder die Vitamine D, K1 und K2 leiten sich von Polyterpenoiden ab (Britton 1989).

## 1 Einleitung

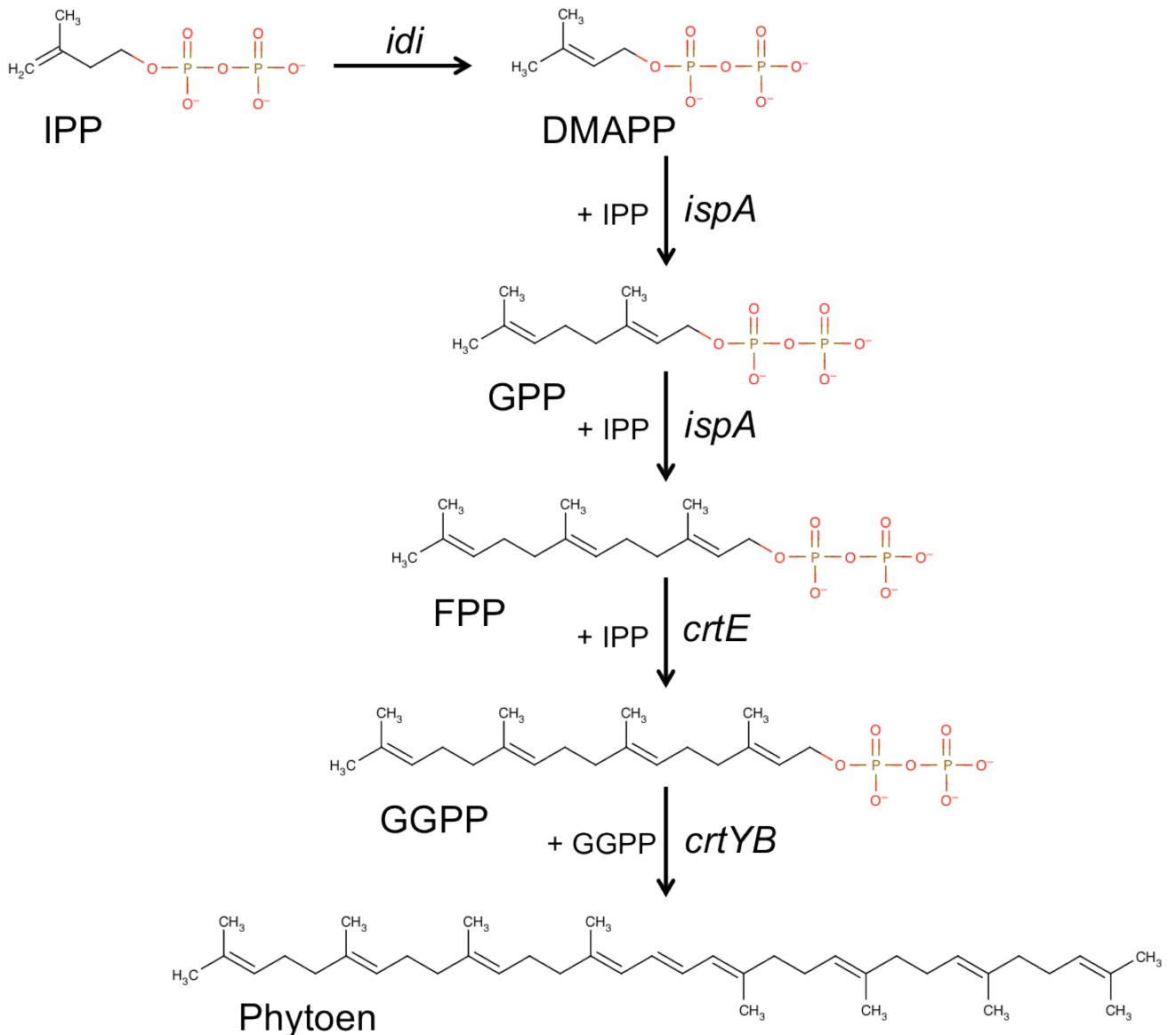


**Abb. 5: Verwendung von Isopren**

IPP ist Grundbaustein für die Synthese verschiedener Gruppen von Terpenen. Monoterpene bestehen aus zwei Isopreneinheiten und sind unter anderem Duftstoffe in ätherischen Ölen. Die C<sub>20</sub>-Kette GGPP ist die Grundeinheit für alle Diterpene. Aus Diterpenen werden Phytole (z.B. für Chlorophyll) oder auch Phytohormone wie die Gibberelline synthetisiert. GGPP ist zudem Grundbaustein für Tetraterpene. Triterpene werden aus zwei Molekülen FPP gebildet. Squalen ist z.B. ein Triterpen, welches für die Synthese von Sterolen wie Cholesterol oder das für Pilze wichtige Ergosterol benötigt wird. Die Gruppe der Tetraterpenen bestehen aus acht Isopreneinheit und werden durch die Carotinoide repräsentiert. Polyterpene sind aus mehr als acht Isopreneinheiten aufgebaut. Wichtige Polyterpenoide sind z.B. Naturkautschuk, die Vitamine E, K1 und K2 oder Chinone wie Ubichinon.

Die Doppelbindung in Isopentenyl-Diphosphat (IPP) als Endprodukt des Mevalonatweges wird im Terpenoidbiosyntheseweg von Pilzen durch eine Isomerisierungsreaktion, vermittelt durch das Enzym IPP-Isomerase (*idi*), auf C<sub>2</sub>/C<sub>3</sub> umlagert. An das Produkt dieser Reaktion, Dimethylallyl-Diphosphat (DMAPP), werden drei IPP-Moleküle addiert (Abb. 6). Die ersten beiden Additionsreaktionen an DMAPP werden katalysiert durch die FPP-Synthase (*ispA*). Als Zwischenprodukte treten hier Geranyl-Diphosphat (GPP) und Farnesyl-Diphosphat (FPP) auf. Durch Addition eines weiteren Moleküls IPP durch die GGPP-Synthase (*crtE*) entsteht Geranylgeranyl-Diphosphat (GGPP) mit einer C<sub>20</sub>-Grundstruktur. Aus der Kondensation zweier Moleküle GGPP durch die bifunktionelle Phytoensynthase (*crtYB*) entsteht das erste Carotinoid, dem farblosen Phytoen. In Abb. 6 ist der typische Terpenoidbiosyntheseweg eines Pilzes wie *Phaffia rhodozyma* abgebildet.

## 1 Einleitung



**Abb. 6: Terpenoidbiosynthese in Pilzen.**

Ausgehend vom Endprodukt des Mevalonatweges wird IPP von der IPP-Isomerase IDI zu Dimethylallyl-Diphosphat (DMAPP) isomerisiert. Über drei Additionsreaktionen von IPP an DMAPP über die Intermediate Geranyl-Diphosphat (GPP) und Farnesyl-Diphosphat (FPP), katalysiert durch die FPP-Synthase ISPA und der GGPP-Synthase CRTE, entsteht Geranylgeranyl-Diphosphat (GGPP). Das erste Carotinoid Phytoen ist das Produkt einer Kondensationsreaktion durch die Phytoen-Synthase CRTYB, in welcher zwei Moleküle GGPP die Substrate darstellen (geändert nach Schmidt et al. 2010).

## 1.4 *Phaffia rhodozyma* / *Xanthophyllomyces dendrorhous*

### 1.4.1 Allgemeine Informationen

*Phaffia rhodozyma* wurde zunächst aus harzigem Birkensaft an Wundstellen in kälteren klimatischen Zonen Mitte der 1960er Jahre isoliert. Der Pilz zeichnet sich durch eine rosa- bis rotgefärbte Pigmentierung aus. Der Entdecker und Namensgeber der Spezies, Hermann Pfaff, klassifizierte *Phaffia* als eigenständigen Genus (Pfaff 1972). *Phaffia rhodozyma* wächst hefeartig in Einzelkolonien, ist jedoch kein Ascomycet wie *Saccharomyces*, sondern ist den Basidiomyceten zugeordnet (Miller et al. 1976) (Tab. 1). Golubev entdeckte in einer Studie 1995 die Ausprägung von Holobasidien auf Sporulationsmedium bei *Phaffia rhodozyma*, welcher bis zu diesem Zeitpunkt vegetativ wachsend beschrieben wurde. Er klassifizierte diese teleomorphe, sich sexuell fortpflanzende, Form von *Phaffia rhodozyma* als neuen Genus *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Golubev 1995). In der vorliegenden Arbeit wird allerdings die Bezeichnung *Phaffia rhodozyma* als Kennzeichnung für die anamorphen Wachstumsbedingungen verwendet, da keine Experimente mit der teleomorphen Form durchgeführt wurden.

Tab. 1: Systematische Klassifizierung von *P. rhodozyma* / *X. dendrorhous*.

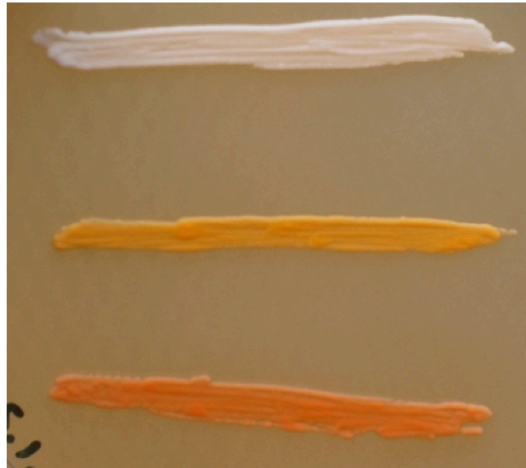
Reich	Pilze
Abteilung	Basidiomycota
Klasse	Tremellocytes
Ordnung	Cystofilobasidiales
Familie	Cystofilobasidiaceae
Genus	<i>Phaffia</i>
Art	<i>Phaffia rhodozyma</i>

Optimale Bedingungen für schnelles Wachstum und hohe Carotinoidbiosynthese stellen für *P. rhodozyma* Temperaturen zwischen 20°C und 22°C dar (Johnson und Lewis 1979). Diese Temperaturspanne kommt den natürlichen Bedingungen am Nächsten. Ab Temperaturen über 22°C kommt es zu einem verlangsamten Wachstum, über 25°C ist kein Wachstum mehr zu beobachten.

Charakteristisches Merkmal von *Phaffia* ist die kräftige Rotfärbung des Pilzes. Diese Färbung resultiert von einer ausgeprägten Carotinoidbiosynthese, dessen Endprodukt

## 1 Einleitung

Astaxanthin darstellt. *Phaffia* ist einer der sehr wenigen Organismen weltweit, welcher Astaxanthin (3R,3'R-Astaxanthin) *de-novo* synthetisieren kann. Entwickelt hat sich diese Fähigkeit möglicherweise aus der Anpassung an starke Lichteinflüsse, welche unvermeidbar erscheint, da *Phaffia* bevorzugt an Harzen von Birkenstämmen (Johnson 2003) wächst und somit täglich der direkten Sonneneinstrahlung exponiert ist.



**Abb. 7: Verschiedene *Phaffia*-Stämme.**

Diese Fotografie zeigt drei *Phaffia*-Stämme mit unterschiedlicher Färbung, bzw. Carotinoidkonfiguration. Von oben nach unten: **PR1-102** (Girard et al. 1994); eine GGPP akkumulierende Mutante, **PR1-104** (Girard et al. 1994); eine  $\beta$ -Carotin akkumulierende Mutante, sowie der *Phaffia* Wildtyp **CBS6938** (Andrewes et al. 1976).

Aufgrund seiner Fähigkeit Astaxanthin zu synthetisieren rückte *Phaffia* schon früh in den Fokus der Carotinoidforschung, was zu einer Vielzahl an Mutanten führte, um ein Verständnis für die enzymatischen Eigenschaften zu erhalten und die erforderlichen Mechanismen der allgemeinen Carotinoidbiosynthese aufzuklären.

Abb. 7 zeigt drei verschiedene *Phaffia rhodozyma*-Stämme mit unterschiedlichen Ausprägungen ihrer Carotinoidbiosynthese. In der Fotografie oben dargestellt ist die Mutante PR1-102 (Girard et al. 1994), welche keine Pigmentierung aufweist und defizitär in der Phytoensynthese (*crtYB*) scheint. In der Mitte ist der Stamm PR1-104 (Girard et al. 1994) abgebildet, welcher eine charakteristische gelbe Pigmentierung zeigt und  $\beta$ -Carotin akkumuliert. Der letzte der drei abgebildeten *Phaffia*-Stämme ist der Wildtyp mit der Bezeichnung CBS6938. Er zeigt die pink-rote Pigmentierung, welche vom Endprodukt der Carotinoidbiosynthese in *Phaffia*, Astaxanthin, herrührt.

### 1.5 Carotinoid-Biosynthese in *Phaffia rhodozyma*

Die Carotinoidbiosynthese in *Phaffia rhodozyma* weist einige Besonderheiten im Vergleich mit anderen carotinoidproduzierenden Organismen auf. Zunächst wird, wie weiter oben bereits beschrieben, das erste, farblose, Carotinoid Phytoen durch die Phytoensynthase (CRTYB) aus zwei Molekülen Geranylgeranyldiphosphat gebildet. In Abb. 8 ist die Carotinoidbiosynthese in *Phaffia* schematisch dargestellt. CRTYB stellt hierbei eine Besonderheit der Pilze dar, denn es handelt sich um ein bifunktionelles Enzym, welches neben der Phytoensynthase (CRTB) auch eine Lycopinzyklasedomäne (CRTY) besitzt (Velayos et al. 2000, Breitenbach et al. 2012, Arrach et al. 2001). Das Fusionsgen *crtYB* entwickelte sich aus den Genen *crtYc* und *crtYd* von Archaeobakterien, deren Genprodukte nur als Heterodimer Lycopin zyklisieren können (Krubasik und Sandmann 2000). In allen anderen Organismen sind diese beiden Enzyme (CRTY und CRTB) strukturell und funktionell von einander getrennt (Verdoes et al. 1999).

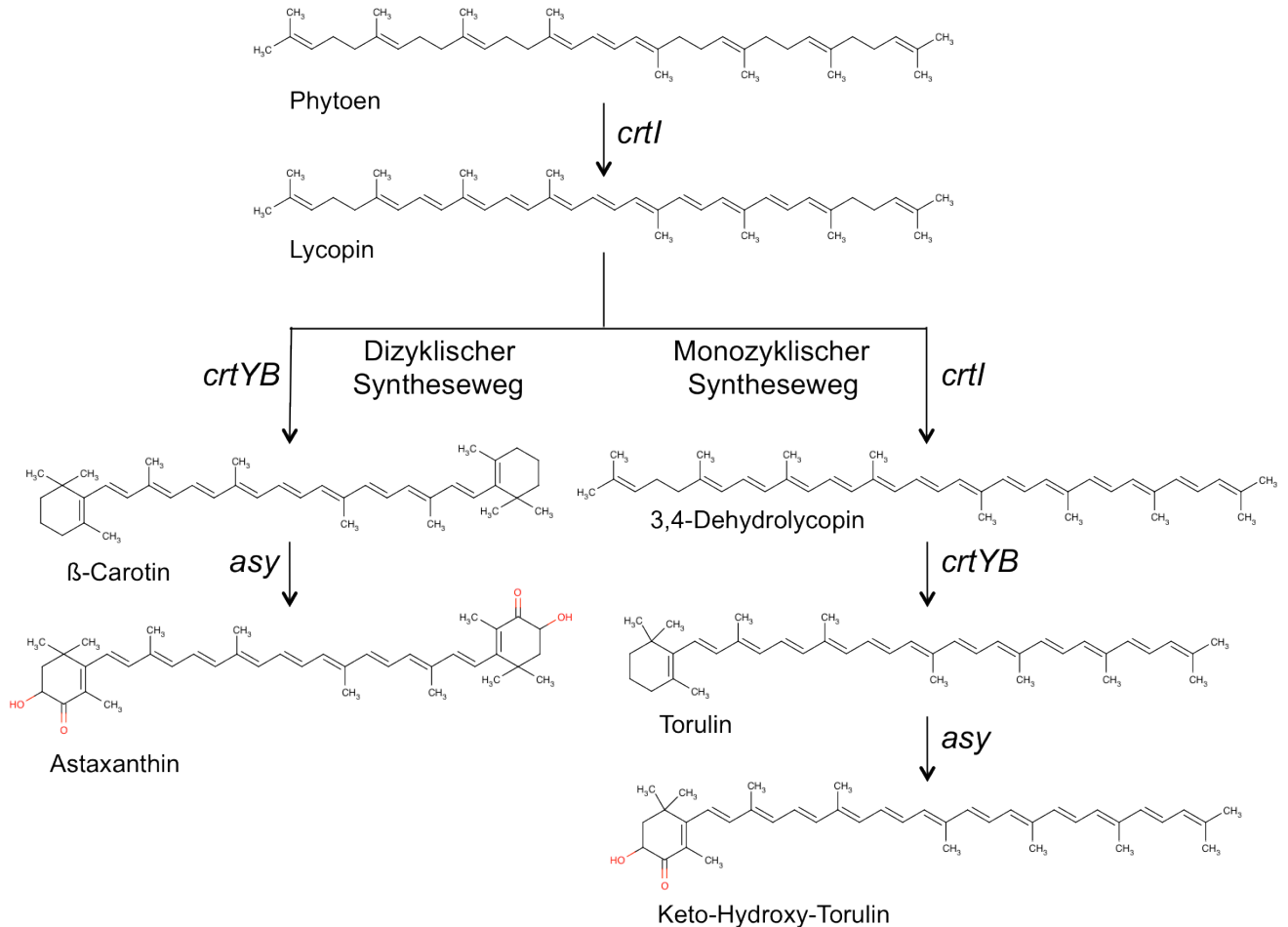
Phytoen wird darauf folgend durch die Phytoen-Desaturase (CRTI) weiter zu Lycopin desaturiert. In *Phaffia* gibt es ab dieser Stufe des Synthesewegs zwei Möglichkeiten der weiteren Umwandlung von Lycopin (An et al. 1999). Das Carotinoid ist Substrat für die Lycopinzyklase (CRTYB), sowohl als auch für die Lycopindesaturase (CRTI). Beim dicyklischen Syntheseweg kommt es durch CRTYB zu einer Zyklisierungsreaktion an beiden Seiten des Lycopins, wodurch  $\beta$ -Carotin entsteht. Die Astaxanthin-Synthase (ASY) ist hier eine Besonderheit im Carotinoid-Biosyntheseweg von *Phaffia*. ASY katalysiert alle weiteren Modifikationen des  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin (Abb. 8) durch zwei Ketolierungs- und zwei Hydroxylierungsschritte.

Wird Lycopin über CRTI zu 3,4-Dehydrolycopin desaturiert, so kann es an dieser Seite des Moleküls nicht mehr zum Ringschluß kommen, was bedeutet, dass die Produkte dieses daraus folgenden monozyklischen Synthesewegs, nicht mehr für den dicyklischen Zweig des Synthesewegs zur Verfügung stehen (Visser et al. 2003). Durch die Lycopinzyklase CRTYB entsteht an einem Ende des 3,4-Dehydrolycopin über einen Ringschluss Torulin. Die Astaxanthinsynthase ASY führt am Ring des Torulins eine Ketolierung und eine Hydroxylierung durch, wodurch das Endprodukt des monozyklischen Synthesewegs, 4-Keto-3-Hydroxy-Torulin, entsteht. Welcher der beiden Synthesewege (mono- oder dicyklisch) favorisiert wird, hängt vor allem mit den Wachstumsbedingungen zusammen (An et al. 1999, Visser et al. 2003). Die wichtigsten Faktoren für die Astaxanthinsynthese sind Licht und Sauerstoff



# 1 Einleitung

(Domínguez-Bocanegra et al. 2007). Licht stimuliert die Carotinoidbiosynthese und der Sauerstoff ist zusätzlich notwendig für die Hydroxylierungsreaktionen durch die Astaxanthin-Synthase. Sauerstoff ist hierbei ein limitierender Faktor (Johnson und Lewis 1979) in der Synthese von Xanthophyllen und somit mit verantwortlich für die Aktivität des Enzyms.

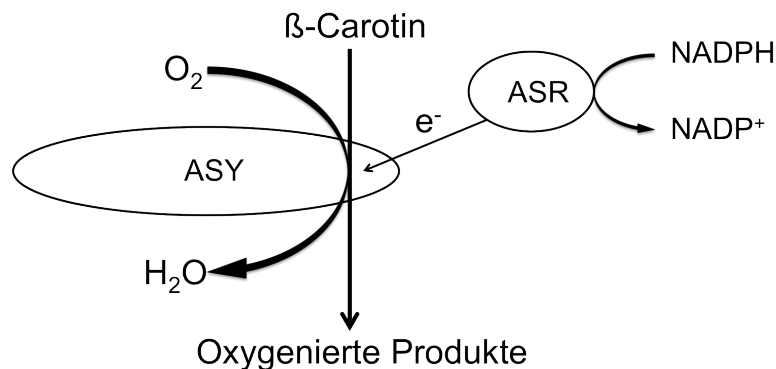


**Abb. 8: Die Carotinoidbiosynthese in *Phaffia rhodozyma*.**

Das Schaubild zeigt schematisch den Ablauf der Carotinoidbiosynthese in *Phaffia rhodozyma* ab dem ersten Carotinoid Phytoen, welches zuvor von der Phytoen-Synthase CRTYB aus zwei Molekülen GGPP hergestellt wurde (hier nicht gezeigt). Das Tetraterpen Phytoen wird durch die Phytoen-Desaturase CRTI zu Lycopin weiter umgewandelt. Von Lycopin ausgehend kann der Syntheseweg über den mono- oder den dizyklischen Zweig ablaufen. Die Lycopin-Desaturase CRTI sorgt für eine weitere Doppelbindung, worauf 3,4-Didehydrolycopin entsteht. Dieses kann nun durch die Lycopinzyklase CRTYB in Torulin umgewandelt werden, welches wiederum durch die Astaxanthin-Synthase zu 4-Keto-3-Hydroxy-Torulin modifiziert werden kann. Intermediate und Endprodukt aus dem monozyklischen Zweig können nicht mehr in den dizyklischen Weg überführt werden. Über den dizyklischen Weg wird β-Carotin durch die Lycopinzyklase CRTYB synthetisiert, welches dann von der Astaxanthin-Synthase ASY zum Endprodukt Astaxanthin durch insgesamt sechs Hydroxylierungsreaktionen umgewandelt wird.

## 1 Einleitung

Die P450-Monooxygenase Astaxanthin-Synthase ASY benötigt für ihre Funktion die Hilfe einer Cytochrom-P450-Reduktase ASR (CRTR, Alcaíno et al. 2008). Durch eine Reduktion von NADPH zu NADP<sup>+</sup> durch ASR werden Elektronen auf die ASY für die Oxygenierung des Substrates übertragen (Ojima et al. 2006). Abb. 9 zeigt schematisch den Mechanismus der Oxygenierungsreaktion des  $\beta$ -Carotin durch ASY.



**Abb. 9: Schema zum Mechanismus der Substratoxygenierung durch ASY**

Für die Oxygenierung von  $\beta$ -Carotin benötigt die Astaxanthinsynthase ASY die Übertragung von Elektronen von einer P450-Reduktase ASR. Die Elektronen stammen aus der Reduzierung des Reduktionsäquivalentes NADPH zu NADP<sup>+</sup> (Abbildung nach Ojima et al. 2006).

In Studien an *asr*-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die Deletion zu einer Dysfunktionalität der Astaxanthin-Synthase ASY und somit zur Akkumulation von  $\beta$ -Carotin führt. Nebenbei wurde auch die gesamte Carotinoidbiosynthese stark vermindert (Alcaíno et al. 2008).

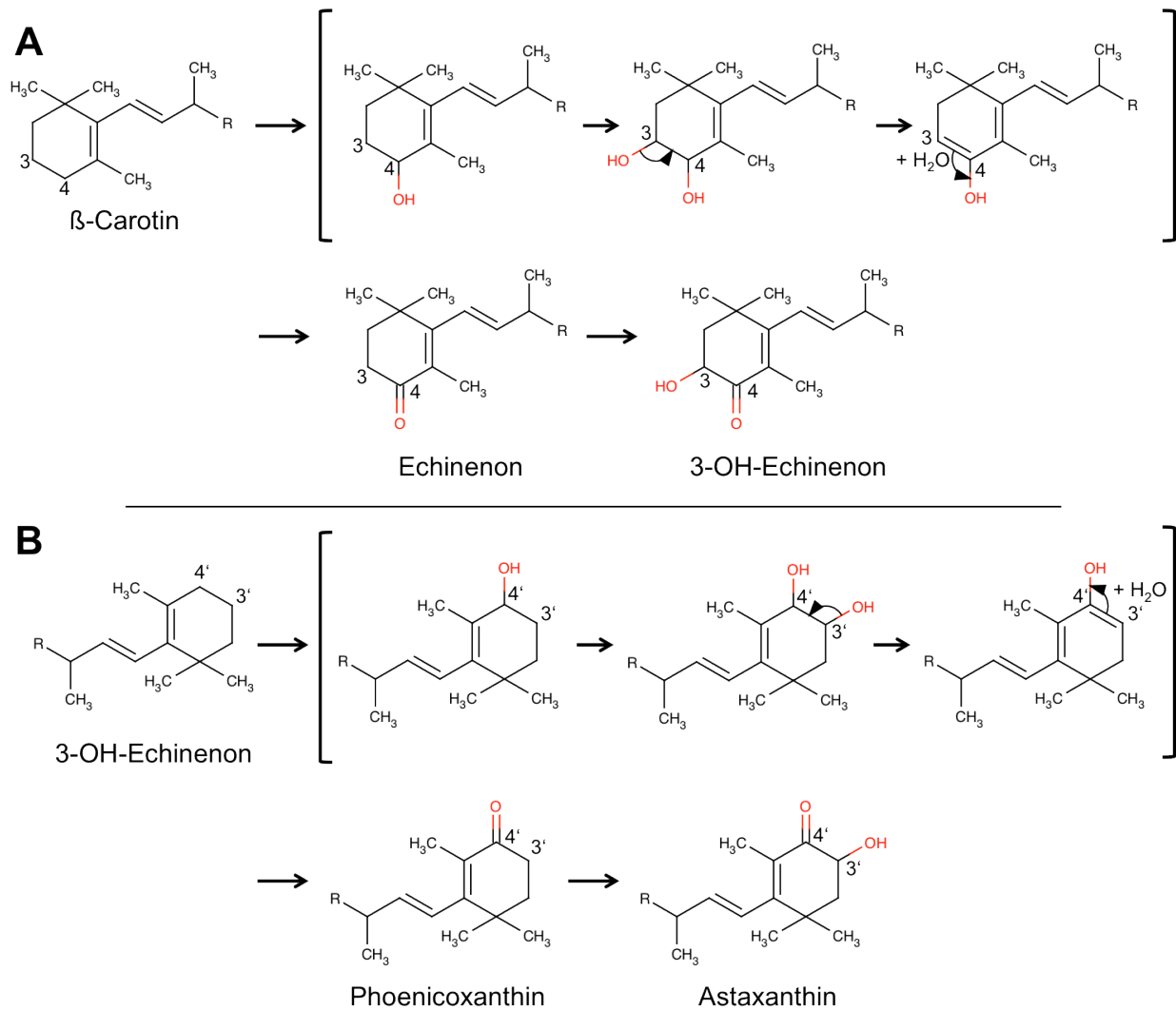
Die Astaxanthin-Synthase ASY (Ojima et al. 2006, nach Alvarez et al. 2006 auch *crtS* genannt) ist von enormen wissenschaftlichen und vor allem industriellen Interesse, da dieses Enzym das einzige ist, das  $\beta$ -Carotin über die Intermediate Echinenon, 3-OH-Echinenon und Phoenicoxanthin bis in Astaxanthin überführen kann (Abb. 10). Der offene Leserahmen (ORF) des Gens der Astaxanthin-Synthase in *Phaffia* besitzt eine Länge von 3166 bp und beinhaltet 17 nichtkodierende Bereiche. Das Gen kodiert für ein 62,6 kDa schweres Protein, deren Aminosäuresequenz homolog zu Proteinen der Familie der Cytochrom-P450-Hydroxylasen ist. Die Funktion als Hydroxylase konnte hierbei durch Komplementation von verschiedenen *Phaffia*-Mutanten nachgewiesen werden (Alvarez et al. 2006). Hydroxylase- und „Ketolase“-funktion der ASY arbeiten nicht autonom von einander. Eine Komplementationsstudie an *Mucor circinelloides*

## 1 Einleitung

zeigte die Hydroxylaseaktivität der ASY durch die Synthese der hydroxylierten  $\beta$ -Carotin-Derivate  $\beta$ -Cryptoxanthin und Zeaxanthin (Martin et al. 2008).

In *Phaffia* akkumulieren diese hydroxylierten Intermediate nicht. Für die Konversion von  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin werden von der ASY sechs Hydroxylierungsreaktionen durchgeführt. Der Reaktionsablauf beginnt mit einer Hydroxylierung an Position 3 des ersten Ringes des  $\beta$ -Carotin-Moleküls. Eine zweite Hydroxylierung an Position 4 ist strukturell instabil und führt über Entstehung von  $H_2O$  zur Eliminierung der entstandenen Hydroxygruppe, wobei die Elektronen zur Doppelbindung für die entstehende Ketogruppe an Position 4 umgelagert werden (Abb. 10). Das entstandene Echinenon wird über eine Hydroxylierung an Position 3 des Moleküls zu 3-OH-Echinenon umgewandelt. Die gleichen Reaktionsschritte werden am zweiten Ring, ausgehend von 3-OH-Echinenon, an den Positionen 3' und 4' durchgeführt. Nachdem eine Ketogruppe durch Hydroxylierung an Position 3' (Schritt 4) und 4' (Schritt 5) des zweiten Rings entsteht (Phoenicoxanthin), wird im letzten und sechsten Schritt der  $\beta$ -Carotin-Konversion Astaxanthin durch die dritte Hydroxylierungsreaktion an Position 3' hergestellt (Ojima et al. 2006). Durch diese Abfolge der Reaktionen kommt es durch die ASY zuerst zur Entstehung des ketolierten Intermediats Echinenon, bevor es zu hydroxylierten Zwischenstufen kommt. In anderen Organismen wird die Ketolierung durch Ketolasen katalysiert. Die Ketolierung von  $\beta$ -Carotin in *Haematococcus pluvialis* erfolgt durch das Enzym BKT vor den Hydroxylierungsschritten. BKT kann bereits hydroxylierte Intermediate nur sehr schlecht metabolisieren. Das cyanobakterielle CRTO ist eine Monoketolase und katalysiert ebenfalls die 4-Ketolierung des  $\beta$ -Carotin zu Echinenon. CRTO kann bereits hydroxylierte Substrate ebenfalls nur sehr schlecht umwandeln (Zhong et al. 2011). Die cyanobakterielle  $\beta$ -Carotin-Diketolase CRTW (Schöpf et al. 2013) und BKT aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Zhong et al. 2011) hingegen sind dazu in der Lage Zeaxanthin zu Astaxanthin mit hoher Spezifität umzusetzen. Die katalytische Aktivität der ASY führt über die zusätzliche 4-4'-Hydroxylierung direkt zur Synthese von Astaxanthin. Dies ist einzigartig unter den bekannten Hydroxylasen oder Ketolasen.

# 1 Einleitung



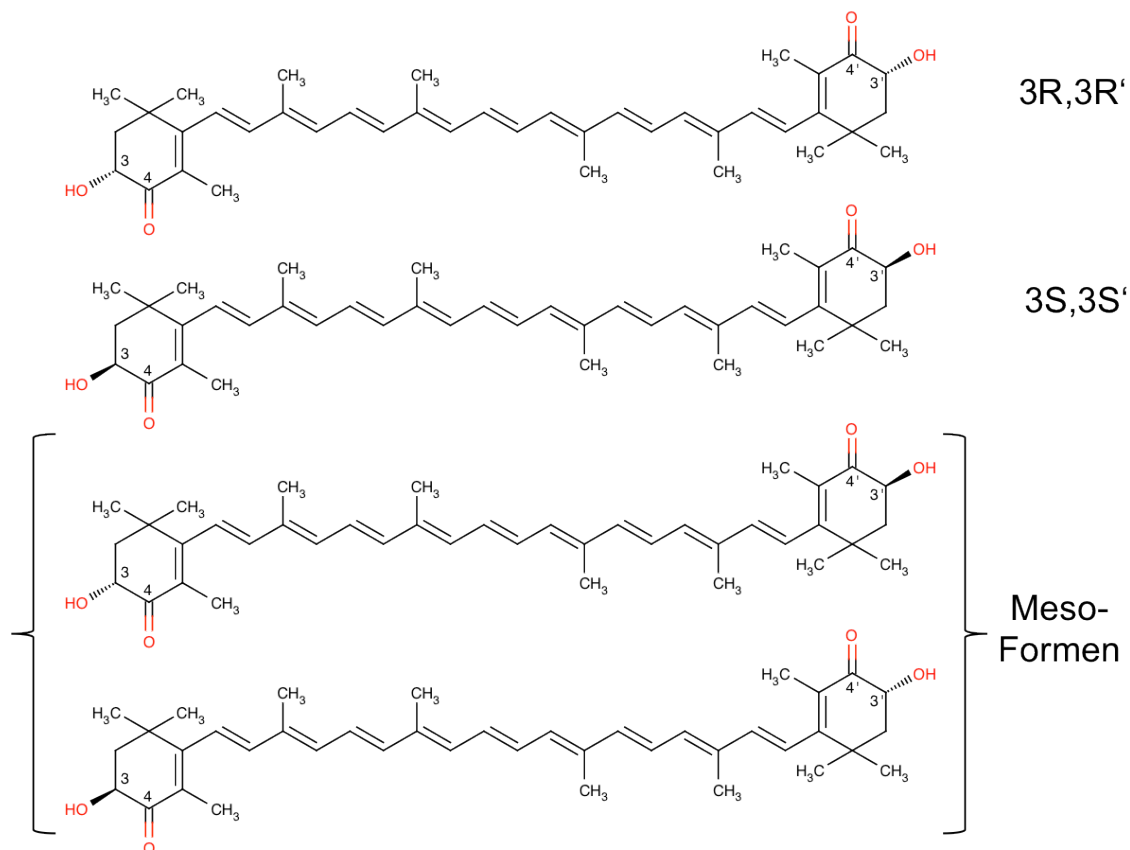
**Abb. 10: Mechanismus der Hydroxylierung von  $\beta$ -Carotin und Entstehung der Ketogruppe**

Die Grafik zeigt den Ablauf der Hydroxylierungsreaktionen, welche durch die ASY katalysiert werden.  $\beta$ -Carotin wird an Position 3 des ersten Rings hydroxyliert (**A**). Eine zweite Hydroxylierung an Position 3 führt zu einem instabilen Molekül, worauf die 3-Hydroxygruppe unter Entstehung von Wasser eliminiert wird und die entstandene Doppelbindung zur Ketogruppe an Position 4 zu Echinenon umgelagert wird. Position 3 wird darauf hydroxyliert und es entsteht 3-OH-Echinenon. Am zweiten Ring (**B**) werden die gleichen Schritte an den Positionen 3' und 4' durchgeführt, wobei die Hydroxylierungen zu Astaxanthin über das Intermediat Phoenicoxanthin geschieht (nach Ojima *et al.* 2006).

## 1.6 Astaxanthin

### 1.6.1 Chemische Struktur und spektrale Eigenschaften

Astaxanthin, 3-3'-Dihydroxy-4-4'-Diketo- $\beta$ -Carotin, ist ein an beiden Ringen des  $\beta$ -Carotin ketolisiertes und hydroxyliertes Xanthophyll (Abb. 11). An der jeweiligen Hydroxygruppe sitzt sterisch gesehen jeweils ein chirales Zentrum, weswegen von diesem Molekül drei Stereoisomere vorkommen. Hierzu zählen die beiden *all-trans* meso-Formen 3S,3'R und 3R,3'S sowie die *cis*-isomeren 3R,3'R und 3S,3'S Konfigurationen (Abb. 11). Bei der chemischen Synthese entsteht ein Gemisch der Stereoisomere, *Haematococcus* synthetisiert die 3S-3'S-Form und *Phaffia* stellt die 3R-3'R-Form her (Ambati et al. 2014). Die spektralen Charakteristika beschreiben für *all-trans*-Astaxanthin ein Absorptionsmaximum bei 470 nm; die Maxima der beiden *cis*-Isomere 9-*cis*- und 13-*cis*-Astaxanthin liegen bei etwa 465 nm (Britton et al. 2004).



**Abb. 11: Isomere Formen von Astaxanthin (3-3'-Dihydroxy- $\beta$ , $\beta$ -Carotin-4-4'-dion).**

Abgebildet sind die Strukturformeln der chiralen Formen des Carotinoids Astaxanthin. Der Grundkörper bildet  $\beta$ -Carotin, an dessen beide Ringen durch Substitutionsreaktionen jeweils eine Keto- und eine Hydroxygruppe eingeführt wurden. Zwei chirale Zentren an C3 und C3' weisen neben den *meso*-Formen 3S,3'R und 3R,3'S eine 3R,3'R sowie eine 3S,3'S *cis*-isomere Form auf.

### 1.6.2 Medizinische Bedeutung von Astaxanthin

Astaxanthin erringt aufgrund seiner antioxidativen und medizinischen Bedeutung immer weitere Beachtung. Die Struktur des Astaxanthinmoleküls mit den zwei Keto- und Hydroxygruppen, haben ein großes antioxidatives Potential. Diese Eigenschaft von Astaxanthin ist zehnmal höher als von  $\beta$ -Carotin (Miki 1991) und 100 mal höher als von  $\alpha$ -Tocopherols (Vitamin E). Aktuelle Arbeiten bescheinigen Astaxanthin ein breites Spektrum an positiven Einflüssen auf die menschliche Gesundheit. So konnte an Ratten nach einer Gabe von 200  $\mu\text{g}/\text{kgbw}$  Astaxanthin-Mono- und Astaxanthin-Diesterverbindungen die Entwicklung von Hautkrebs nach starker UV-Bestrahlung um 88 %-96 % reduziert werden. Gleichzeitig sank das Niveau von zellulären, freien Radikalen um das 10-fache (Rao et al. 2013). Auch eine Rolle bei der Wundheilung stellt Astaxanthin ein potentiell Antioxidativum dar (Mizuta et al. 2013). In der frühen Phase der Wundheilung kommt es zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Als Maß für die Menge an ROS wurde die Expression von 4-Hydroxy-2-Nonenal, einem oxidativem Stressmarker, in zwei Gruppen von, an den Stimmbändern verletzten Ratten, beobachtet. In der Gruppe, welchen 100 mg/kg/Tag Astaxanthin verabreicht wurden, zeigte sich eine signifikante Erniedrigung des oben genannten Stressmarkers. Zudem konnte durch „Realtime-PCR-Analysen“ nachgewiesen werden, dass Astaxanthin die Hochregulierung verschiedener Wachstumsfaktoren des Fibroblastengewebes stimulierte (Mizuta et al. 2013). Astaxanthin eignet sich zur medizinischen Applikation auch durch antibakteriellen, photoprotektiven, entzündungshemmenden oder anti-carcinogenen Wirkungen (Guerin et al. 2003, Higuera-Ciapara et al. 2006 und Hussein et al. 2006).

### 1.6.3 Industrielle Bedeutung von Astaxanthin

Es gibt weltweit nur eine kleine Zahl an Organismen, die fähig sind, Astaxanthin de-novo zu synthetisieren. Zu diesen Organismen zählen die Grünalge *Haematococcus pluvialis* (Zhang et al. 1999), die Süßwasseralge *Chlorella sorokiniana* (Raman und Mohamad 2012), einige marine Algen wie z.B. *Tetraselmis* sp. (Raman und Mohamad 2012), das gram-negative, aerobe, Bakterium *Paracoccus carotinifaciens* (Tsubokura et al. 1999), sowie der Pilz *Phaffia rhodozyma* (Andrewes et al. 1976). Tiere, in deren Gewebe oder Gefieder Astaxanthin aufzufinden ist, haben das Carotinoid über die Nahrung aufgenommen und in ihrem Organismus inkorporiert. Klassische Beispiele hierfür sind der Wildlachs, dessen rotes Fleisch von eingelagertem Astaxanthin herrührt und die Gefiederfarbe der Flamingos, welche erst nach Aufnahme von Astaxanthin über die Nahrung die charakteristische rote Farbe aufweist. Auch die rötliche Färbung in den Chitinpanzern verschiedener Crustaceen geht auf die Einlagerung von aus der Umwelt aufgenommenem Astaxanthin zurück. Die vergleichsweise geringe Verfügbarkeit von Astaxanthin stellte vor allem die Futtermittelindustrie vor das Problem, da für bestimmte Produkte das Carotinoid unerlässlich ist. Der teuerste Bestandteil des Futters zur Lachsaufzucht in Lachsfarmen ist die Supplementation von Astaxanthin, da weißes Lachsfleisch auf dem Markt von Kunden nicht angenommen wird und darum schlechter verkäuflich ist. Aus diesem Grund wird Astaxanthin primär vor allem in der Aquakultur verwendet. Astaxanthin wird zu 97 % des weltweiten Bedarfs durch chemische Synthese hergestellt. Bis heute konnte keine Alternative im Bereich der biotechnologischen Herstellung entwickelt werden, welche wirtschaftlich mit der chemischen Synthese konkurrieren könnte. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit sucht man dennoch weiterhin die biotechnologische Produktion konkurrenzfähig zur chemischen Synthese zu gestalten. Als die bislang aussichtsreichste Alternative erscheint hierbei durch verbesserte Anzuchtbedingungen und technologische Fortschritte die kommerzielle Anzucht der Grünalge *Haematococcus pluvialis*. Die bis heute höchste publizierte, von *H. pluvialis* produzierte, Menge an Astaxanthin liegt bei 9,2 mg/gdw. Dagegen liegt die bis heute höchste publizierte in-vivo produzierte Menge von *Phaffia rhodozyma* bei etwa 6,6 mg/gdw, eine Menge, welche in einem 14 Liter Batch-Fermentationsprozess unter optimierten Bedingungen erreicht wurde (Jacobsen et al. 1999).

## 1 Einleitung

In der Literatur wird eine Vielzahl an *Phaffia*-Stämme beschrieben, welche durch chemische Mutagenisierung (EMS oder NTG) oder UV-Bestrahlung zu Astaxanthin-Hochproduzenten selektiert wurden (siehe Tab. 2). Schon im Jahr 1993 wurde eine Mutante hergestellt, welche einen Astaxanthingehalt von 1430 µg/gdw aufwies (Meyer und du Preez 1993). Die Mutante mit dem höchsten Astaxanthingehalt von 6660 µg/gdw nach Fed-Batch-Kultivierung wurde im Jahr 1999 von Jacobsen et al. publiziert.

**Tab. 2: Übersicht über Syntheseleistung verschiedener Astaxanthin-Hochproduzenten.**

Die Tabelle zeigt eine Zusammenstellung einiger publizierter *Phaffia*-Astaxanthin-Hochproduzenten. Die Daten stammen aus Batch- oder Fed-Batch-Kultivierungen der Mutanten.

Stammbezeichnung	Astaxanthin µg/gdw	Quelle
UBV-AX3	6660	Jacobson et al. 1999
VKPM Y2976	5061	De la Fuente et al. 2005
VKPM Y2476	4773	De la Fuente et al. 2010
ZJUT003	2770	Zheng et al. 2006
E5042	2510	Liu und Jang-Yong 2008
ZJUT46	2090	Hu et al. 2005
N9	1430	Meyer und du Preez 1993
Aj-6-1	1228	Kim et al. 2003

Der *Phaffia rhodozyma* Wildtyp CBS6938 erreicht unter industriellen Bedingungen eine Biosyntheseleistung zwischen 200 und 400 µg/gdw Astaxanthin. Um allerdings z. B. für eine biotechnologische Verwendung ökonomisch zu sein, muss der Gehalt um das zehn bis 50-fache gesteigert werden (Visser et al. 2003).



### 1.7 Genetische Modifikation von *Phaffia rhodozyma*

Schon früh wurden geeignete Protokolle zur erfolgreichen Transformation von *Phaffia rhodozyma* entwickelt, nicht zuletzt wegen des enormen wirtschaftlichen Interesses, welches *Phaffia* als potentiellen, biotechnologischen verwendbaren Organismus zur Synthese von Astaxanthin in den Fokus der Forschung rückte. *Phaffia rhodozyma* besitzt eine Genomgröße von etwa 25 Mbp, verteilt auf neun Chromosomen (Cifuentes et al. 1997). Zunächst erzielte man erfolgreiche Transformationsversuche über episomale Plasmidsysteme mit nicht-homologen Sequenzen. Die Transformationseffizienz war jedoch gering und die Transformation sehr instabil (Adrio und Veiga 1995). In *Saccharomyces cerevisiae* dagegen konnten erfolgreich Plasmide über homologe Rekombination in das Genom mittels repetitiver rDNA-Sequenzen integriert werden (Lopes et al. 1989). Auch in *Phaffia* sind diese Sequenzen auffindbar und es wurde ein Transformationssystem auf Basis der homologen Rekombination linearisierter Plasmide über rDNA-Sequenzen entwickelt (Wery et al. 1997). Durch die Verfügbarkeit vieler, in ihrer Carotinoidbiosynthese, beeinflussten *Phaffia*-Mutanten bei gleichzeitiger Klonierung verschiedener Gene der Carotinoidbiosynthese, entstand mit *Phaffia rhodozyma* ein Modellorganismus zur Erforschung funktioneller Bereiche des Terpenoidstoffwechsel und der Synthese von Carotinoiden.

### 1.8 Ziel dieser Dissertation

Mit weltweit steigendem Bedarf an Carotinoiden, steigt auch das Interesse, Lösungen zu ökonomischeren Produktionswegen zu finden, bzw. bestehende Produktionswege wie die chemische Synthese den Möglichkeiten zur biotechnologischen Herstellung gegenüberzustellen und deren Wirtschaftlichkeit einzuschätzen.

*Phaffia rhodozyma*, als biotechnologisch nutzbarer Organismus mit ausgeprägter *de-novo*-Astaxanthinbiosynthese, stellt ein potentielles Konkurrenzmodell für die chemische Synthese von Astaxanthin dar. Obwohl geeignete Astaxanthin-Hochproduzenten verfügbar sind, liegt die Ausbeute im direkten Vergleich zur chemischen Synthese bislang außerhalb der wirtschaftlichen Eignung für eine biotechnologische Nutzung zur Synthese von Astaxanthin.

## 1 Einleitung

„DSM Nutritional Products“ stellte für diese Arbeit vier *Phaffia rhodozyma*-Stämme mit gesteigerter Astaxanthinsynthese zur Verfügung, welche alle durch eine Reihe von chemischen Mutagenisierungen auf Basis des *Phaffia* Wildtyps ATCC96574 hergestellt wurden. Die Stämme ATX-30 (Astaxanthingehalt 0,5 g/L) und TTH-2 sind spontan aufgetretene Mutanten des Stammes ATCC96574, welche nach visueller Selektion isoliert wurden. Der Stamm TTH-2 erreicht nach Angaben von „DSM Nutritional Products“ eine Astaxanthinmenge von 0,64 g/L. TTH-2 wurde anschließend durch NTG-Behandlung chemisch mutagenisiert und es konnte nach zweiter Generation der Stamm AXG-13 mit einem Astaxanthingehalt von 0,78 g/L isoliert werden. Nach weiterer Mutagenisierung wurde der letzte Stamm, AXJ-20, der Mutagenisierungsexperimente isoliert. Dieser Stamm zeichnet sich durch einen Astaxanthingehalt von 0,98 g/L aus (unveröffentlichte Daten).

Die vier mutagenisierten *Phaffia*-Stämme ATX-30, TTH-2, AXG-13 und AXJ-20, welche über eine erhöhte Carotinoidproduktion verfügten, sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst charakterisiert und Limitierungen in der Carotinoidsynthese identifiziert werden. Zum ersten Mal soll durch eine Kombination aus konventioneller Mutagenisierung und gezielter genetischer Modifikation („Metabolic Engineering“) die Astaxanthinsynthese noch weiter gesteigert werden. Im Verlauf der Transformationen sollen weitere limitierende Schritte im Carotinoidbiosyntheseweg identifiziert und diese durch Folgetransformationen weiterer Schlüsselgene ausgeglichen werden um eine höchstmögliche Synthese von Astaxanthin zu erreichen.

Die Überprüfung der Transformanten geschieht über PCR und HPLC.

Zudem soll die Kopienzahl der integrierten Expressionsplasmide in den Transformanten über „Realtime-PCR-Analyse“ bestimmt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Computersoftware

Tab. 3: Verwendete Computersoftware.

Bezeichnung	Entwickler	Zweck
Clarity Lite	DataApex	HPLC-Chromatogramme
CloneManager	Sci-Ed Software	Plasmidkarten, Sequenzen
ClustalX	Thompson et al. 1997	Phylogenie-Analyse
Excel	Microsoft	Tabellen, Graphen
MarvinSketch	ChemAxon	Strukturformelherstellung
Powerpoint	Microsoft	Abbildungen
RotorGene6	Corbett	„Realtime-PCR-Analysen“
Treeview	<a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>	Phylogenie-Darstellung
WinWaters	Universität Konstanz	Spektren-Dokumentation
Word	Microsoft	Textverarbeitung
Zotero	OpenSource-Projekt, <a href="http://www.zotero.org/">http://www.zotero.org/</a>	Literatur-Management

#### 2.1.2 Carotinoidstandards

Für die Identifizierung der Carotinoide wurden unterschiedliche Quellen verwendet. Für die Zuordnung von Astaxanthin und Canthaxanthin wurden synthetische Produkte erworben (Tab. 4), zur korrekten Zuordnung der restlichen Carotinoide wurde mit Komplementationen über *E.coli* gearbeitet. Die Herstellung dieser Standards wird in Kapitel 3.3 auf Seite 61 detailliert erläutert.

Tab. 4: Quelle der synthetischen Carotinoidstandards.

Carotinoid	Bezugsquelle
Astaxanthin	Sigma-Aldrich
Canthaxanthin	Sigma-Aldrich

## 2. Material und Methoden

### 2.1.3 Verwendete Geräte und Chemikalien

Tab. 5: Geräteliste

Verwendungszweck	Bezeichnung/ Modell	Hersteller
Elektroporation	Gene Pulser II, Pulse Controller II, Capacitance Extender II	Bio-Rad
Feinwaage	ALS 160-4	Kern
Gelelektrophorese	Selbstbau	
Geldokumentation	E-Box VX2	Vilber
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf
Homogenisierung	Schwingmühle MM200	Retsch
HPLC-Technik	Nucleosil (C18RP), 3 µm Korngröße, 100 C18	Machery & Nagel
	Degasser 3113	ERC GmbH
	Digital/ Analogwandler	DATA Apex
	Pumpe K-1001	Knauer
	Säulenofen 560-CIL	ERC GmbH
	Diode-Array-Detektor DAD 440	Kontron
Lyophilisierung	Alpha 1-4 LD-Plus	Christ
Magnetrührer	Ikamag Reo	IKA
PCR-Geräte	peqSTAR 96 Universal	Peqlab
	TechGene	Techne
	Rotor-Gene 3000	Corbett
pH-Meter	ph-mV-Meter (analog)	Knick
Photometer	Nanodrop ND-1000	Peqlab
	Novaspec II	Pharmacia LKB
Pipetten (µl)	PIPETMAN Classic	Gilson
Schüttelinkubator	Aquatron	Infors HAT
Spannungsgeber	Powerpac 200	Bio-Rad
Sterilisation	GE 666 EC-1	Getinge
	Laboklav	Webeco
„Vortex“	Vortex Genie 2	Scientific Ind.
Wasserbäder	UC-5B	Julabo
Zentrifugation	5415D mit Rotor F-45-18-11	Eppendorf
	5417R mit Rotor FA-45-24-11	Eppendorf
	Sorvall RC6-Plus mit SLA-1500, SLA-3000 und SS34	Thermo Scientific
	Labofuge 400R mit Rotor 75008179	Heraeus

## 2. Material und Methoden

**Tab. 6: Chemikalienliste**

<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acetonitril	VWR	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth
Agarose	Peqlab	KH-Phtalat	Carl Roth
4-Aminobenzoesäure	Applichem	Methanol	Universität Frankfurt
Ampicillin	Carl Roth	MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth
Biotin (Vitamin B7)	Merck	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	Carl Roth
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	Carl Roth	MnSO <sub>4</sub> *1H <sub>2</sub> O	Carl Roth
Chloramphenicol	Roche	Myo-Inositol	Carl Roth
Chloroform	Merck	NaCl	Carl Roth
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	Merck	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Merck
DMSO	Carl Roth	NaOH	Carl Roth
dNTPs	Thermo Scientific	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	Carl Roth
Essigsäure	Carl Roth	NH <sub>4</sub> Cl	Merck
Ethanol p.a.	Carl Roth	Nikotinsäure (Vitamin B3)	Carl Roth
Ethanol vergällt	Universität Frankfurt	Nourseothricin	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth	Pantothersäure (Vitamin B5)	Applichem
Di-Ethyl-Ether	Carl Roth	Phenol, gesättigt (DNA/RNA)	Carl Roth
(Na <sub>2</sub> )-EDTA	Carl Roth	Pepton aus Casein	Carl Roth
α-D(+)-Glucose-Monohydrat	Carl Roth	Pepton aus Soja	Carl Roth
Geneticinsulfatlösung	Carl Roth	Petroleumbenzin Sdp. 40°-60°C	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth	2-Propanol	Carl Roth
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Carl Roth	Pyridoxin (Vitamin B6)	Carl Roth
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Merck	Saccharose	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth	SDS	Sigma-Aldrich
Hygromycin-B-Lösung	Carl Roth	Thiamin (Vitamin B1)	Merck
Isoamylalkohol	Merck	Tris-Base	Carl Roth
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth	Zitronensäure	Merck
KI	Merck	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	Merck

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Kulturbedingungen der Organismen

##### 2.2.1.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* wurde entweder auf festem LB-Agar-Medium (16% Agar) über Nacht bei 37°C oder in verschiedenen Volumina flüssigem LB-Mediums inkubiert (LB nach Bertani 1951). Zur Herstellung von Carotinoidstandards wurde *E. coli* 2-3 Tage bei 28°C in flüssigem LB-Medium in unterschiedlichen Volumina inkubiert. Die Verwendung dem Stamm entsprechender Selektionsmarker ist der Tab. 9 zu entnehmen. Die Zusammensetzung des Mediums kann Tab. 7 entnommen werden.

Tab. 7: Zusammensetzung LB-Medium (nach Bertani 1951).

Bestandteil	Menge
NaCl	10 g/L
Pepton aus Soja	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
Agar (b.B.)	16 g/L

##### 2.2.1.2 *Phaffia rhodozyma*

*Phaffia rhodozyma* wurde grundsätzlich bei einer Temperatur zwischen 18°C und 20°C kultiviert. Für analytische Carotinoidbestimmungen im Zusammenhang mit einer Maximierung der Astaxanthin- (oder Xanthophyll-) Syntheseleistung wurde das Minimalmedium GSM (nach de Boer et al. 1993) verwendet. Anzuchsversuche für andere Zwecke, wie DNA-Isolation oder Transformation, wurden ausschließlich in YPD-Medium (Ojima et al. 2006) durchgeführt. Für die Kultivierung von *Phaffia rhodozyma* auf festem Nährmedium wurde YPD-Agar-Medium verwendet. Die Zusammensetzung der Kultivierungsmedien kann Tab. 8 entnommen werden. Analytische Kulturen (für Carotinoidextraktion) wurden in einem Volumen von 50 ml in einem Verhältnis von 1:10 aus einer 4-5 Tage gewachsenen Vorkultur (5 ml) des korrespondierenden Mediums angeimpft unter Verwendung eines 500 ml Erlenmeyerkolbens mit vier Schikanen. Die Schikanen sollen hierbei eine optimale und kontinuierliche Sauerstoffdurchmischung des Kulturmediums gewährleisten. Die Anzuchsdauer betrug in allen Fällen acht Tage. Zur Anzucht der Astaxanthin-

## 2. Material und Methoden

Hochproduzenten (Mutanten wie Transformanten) für eine anschließende Carotinoideextraktion wurde ausschließlich mit GSM-Medium gearbeitet. Für die Isolation von genomischer DNA wurden die Stämme in 30 ml YPD-Vollmedium 6-8 Tage kultiviert. Für alle Stämme wurde ein, dem Stamm entsprechender, Selektionsdruck in Form eines oder mehrerer Antibiotika hinzugefügt. Eine Übersicht über die verwendeten Antibiotika ist der Tab. 9 zu entnehmen.

**Tab. 8: Kultivierungsmedien von *Phaffia rhodozyma*.**

YPD-Medium nach Ojima et al. 2006, GSM-Medium nach de Boer et al. 1993.

YPD-Medium (Komplexmedium)		GSM-Medium (Minimalmedium)	
Bestandteil	Menge	Bestandteil	Menge
Hefeextrakt	10 g/L	NH <sub>4</sub> Cl	4,83 g/L
Pepton aus Casein	20 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
Glucose	20 g/L	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,88 g/L
Agar (b.B.)	16 g/L	NaCl	0,06 g/L
		CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
		KH-Phtalat	20 g/L
		Glucose	30 g/L
		GSM-TES	0,3 ml/L
		GSM-Vitaminlösung	1,5 ml/L
GSM-TES (Spurenelementlösung)		GSM-Vitaminlösung	
Bestandteil	Menge	Bestandteil	Menge
4N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 ml/L	4N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17,5 ml/L
Zitronensäure	50 g/L	Myo-Inositol	40 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	90 g/L	Vitamin B3 (Nikotinsäure)	2 g/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	16,7 g/L	Vitamin B5 (Pantothersäure)	2 g/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2,5 g/L	Vitamin B1 (Thiamin)	2 g/L
MnSO <sub>4</sub> ·1H <sub>2</sub> O	1,6 g/L	p-Aminobenzoessäure	1,2 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2 g/L	Vitamin B6 (Pyridoxin)	0,2 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2 g/L	Vitamin B7 (Biotin)	0,032 g/L
KI	0,5 g/L		

## 2. Material und Methoden

In der folgenden Tab. 9 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Selektionsmarker mit ihren Anwendungsparameter zusammengefasst.

**Tab. 9: Verwendete Selektionsmarker.**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Arbeitskonzentration</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Referenz</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
Ampicillin	180 µg/ml	Carl Roth	Nguyen-Distèche et al. 1974
Chloramphenicol	130 µg/ml	Carl Roth	Shaw 1975
Tetrazyklin	25 µg/ml	Carl Roth	Sambrook et al. 1989
<b><i>Phaffia rhodozyma</i></b>			
Geneticin (G418)	100 µg/ml	Carl Roth	Liscovitch et al. 1991
Hygromycin	60 µg/ml	Carl Roth	Egelhoff et al. 1989; Goldstein und McCusker 1999
Nourseothricin	9 µg/ml	Carl Roth	Goldstein und McCusker 1999

### 2.2.1.3 Verwendete Stämme

#### ***Escherichia coli:***

- Der Stamm JM110 (K12) wurde zur Transformation mit anschließender Plasmidisolierung verwendet. JM110 ist ein Methylase-defizienter ( $Dam^-$  und  $Dcm^-$ ) Stamm (Yannisch-Peron et al. 1985).
- Der Stamm DH5-alpha (Hanahan 1983) wurde für Komplementationen zur Herstellung verschiedener Carotinoidstandards verwendet.
- Der Stamm XL1-blue (Stratagene, La Jolla, USA) wurde für Plasmidaufarbeitungen verwendet, sofern das aus diesem Stamm isolierte Plasmid nicht mit methylierungssensitiven Enzymen weitergearbeitet wurde.



## 2. Material und Methoden

### **Phaffia rhodozyma:**

- CBS6938 (Andrewes et al. 1975) bezeichnet den in dieser Arbeit verwendeten Wildtyp von *Phaffia rhodozyma*.
- Die Astaxanthin-hochproduzierenden *Phaffia*-Stämme AXJ-20 und AXG-13 wurden für die Transformation verschiedener Plasmide zur Steigerung des Gesamtcarotinoid- und Astaxanthingehaltes verwendet. Die Stämme wurden von „DSM Nutritional Products“ bereitgestellt.
- Die Stämme ATX-30 und TTH-2 wurden in der Evaluationsphase analysiert. Auch diese Stämme wurden von „DSM Nutritional Products“ bereitgestellt.
- Der Stamm PR1-104 (Girard et al. 1994), eine nach chemischer Mutagenisierung isolierte Mutante, wurde als Testplattform zur Untersuchung der Transformationseffizienz und Stabilität eingesetzt.

Eine Zusammenfassung aller in dieser Arbeit bearbeiteten Stämme ist in Tab. 10 dargestellt. In Tab. 10 sind zusätzlich noch die in dieser Arbeit hergestellten Transformanten verzeichnet.

## 2. Material und Methoden

**Tab. 10: In dieser Arbeit bearbeitete Organismen.**

<b><i>Escherichia coli</i></b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Quelle</b>
Dh5- $\alpha$	Carotinoidstandards	Hanahan 1983
XL1-blue	Plasmidisolaton	Stratagene, La Jolla, USA
JM110	Plasmidisolaton	Yannisch-Peron et al. 1985
<b><i>Phaffia rhodozyma</i></b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Quelle</b>
CBS6938	Wildtyp, Transformation	Andrewes et al. 1976
PR1-104	Mutante, Transformation	Girard et al. 1994
PR1-104- <i>bkt</i>	ÜE-Transformante: <i>bkt</i>	Diese Arbeit
PR1-104- <i>asy</i>	ÜE-Transformante: <i>asy</i>	Diese Arbeit
ATX-30	Mutante, Evaluation	„DSM Nutritional Products“
TTH-2	Mutante, Evaluation	„DSM Nutritional Products“
AXG-13	Mutante, Transformation	„DSM Nutritional Products“
AXJ-20	Mutante, Transformation	„DSM Nutritional Products“
AXJ-20/ <i>crtYB</i>	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i>	Diese Arbeit
AXJ-20/ <i>crtYB/asy</i>	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i> , <i>asy</i>	Diese Arbeit
AXJ-YBASY-37	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i> , <i>asy</i>	Diese Arbeit
AXJ- <i>crtE-tHMGC</i> CoA-26	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i> , <i>asy</i> , <i>crtE</i> , <i>SctHMG1-CoA-R</i>	Diese Arbeit
AXJ- <i>crtE-tHMGC</i> CoA-28	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i> , <i>asy</i> , <i>crtE</i> , <i>SctHMG1-CoA-R</i>	Diese Arbeit
AXJ- <i>asy</i> -4	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i> , <i>asy</i> , <i>crtE</i> , <i>SctHMG1-CoA-R</i> , <i>asy</i>	Diese Arbeit
AXJ- <i>asy</i> -6	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i> , <i>asy</i> , <i>crtE</i> , <i>SctHMG1-CoA-R</i> , <i>asy</i>	Diese Arbeit
AXG-YBASY-5	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i> , <i>asy</i>	Diese Arbeit
AXG- <i>crtE-tHMGC</i> CoA-21	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i> , <i>asy</i> , <i>crtE</i> , <i>SctHMG1-CoA-R</i>	Diese Arbeit
AXG- <i>crtE-tHMGC</i> CoA-22	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i> , <i>asy</i> , <i>crtE</i> , <i>SctHMG1-CoA-R</i>	Diese Arbeit
AXG- <i>asy</i> -1	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i> , <i>asy</i> , <i>crtE</i> , <i>SctHMG1-CoA-R</i> , <i>asy</i>	Diese Arbeit
AXG- <i>asy</i> -3	ÜE-Transformante: <i>crtYB</i> , <i>asy</i> , <i>crtE</i> , <i>SctHMG1-CoA-R</i> , <i>asy</i>	Diese Arbeit

## 2. Material und Methoden

### **2.2.1.4 Herstellung von Dauerkulturen**

#### **Escherichia coli:**

Für *E. coli*-Dauerkulturen wurden 500 µl einer über Nacht bei 37°C in LB-Flüssigmedium gewachsenen Kultur mit 500 µl einer 80 % Glycerinlösung sorgfältig gemischt und bei -80°C gelagert.

#### **Phaffia rhodozyma:**

750 µl einer 5-6 Tage gewachsenen *Phaffia*-Flüssigkultur wurden zentrifugiert (6000 rpm, 1 min., RT, Eppendorf 5415D) und einmal mit frischem YPD-Flüssigmedium gewaschen. Anschließend wurde das resuspendierte Zellsediment mit 250 µl einer 80 % Glycerinlösung sorgfältig gemischt und bei -80°C gelagert.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.2 DNA-spezifische Methoden

Tab. 11 zeigt eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten DNA-modifizierenden Enzyme und DNA-Größenstandards.

**Tab. 11: Zusammenfassung der verwendeten Enzyme und DNA-Größenstandards**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Restriktionsendonucleasen	Thermo Scientific
DNA-Polymerase („Dreampaq“)	Thermo Scientific
GeneRuler 1kb+ DNA-Größenstandard	Thermo Scientific
GeneRuler 1kb DNA-Größenstandard	Thermo Scientific

#### 2.2.2.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von Plasmid-DNA wurde unter den vom Hersteller vorgegebenen Bedingungen für das entsprechende Enzym durchgeführt (Tab. 12). Die Restriktion wurde standardmäßig über Nacht durchgeführt.

**Tab. 12: Standardzusammensetzung zweier Restriktionsansätze**

	<b>Analytische Restriktion</b>	<b>Präparative Restriktion</b>
<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Konzentration</b>
10x Puffer	1x	1x
Enzym	0,25 U/ $\mu$ l	0,5 U/ $\mu$ l
DNA	0,2 – 1 $\mu$ g	10-20 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O	Ad 20 $\mu$ l	Ad 50 $\mu$ l

## 2. Material und Methoden

### 2.2.2.2 Amplifikation von DNA durch PCR

PCR-Reaktionen (z.B. für den genetischen Nachweis positiver *Phaffia rhodozyma*-Transformanten) wurden nach folgendem Standard-Reaktionsansatz mit der DNA-Polymerase „DreamTaq“ von Thermo Scientific durchgeführt (Tab. 13). Das verwendete Standardprogramm ist in Tab. 14 zusammengefasst.

**Tab. 13: Standardzusammensetzung der PCR-Reaktionsvolumen**

Komponente	Konzentration
10x PCR-Puffer	1x
10 mM dNTPs	0,2 mM
Oligonukleotid 1	12,5 pmol
Oligonukleotid 2	12,5 pmol
DNA	Max 10 ng
DNA-Polymerase	0,05 U/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Ad 25 $\mu$ l

**Tab. 14: Standardprogramm der PCR-Reaktionen**

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Initiale Denaturierung	95°C	5 min.
2 Denaturierung (20x)	95°C	60 s
3 Anlagerung (20x)	46°C-72°C	60 s
4 Elongation (20x)	72°C	60 s/ kbp
5 Finale Elongation	72°C	6 min.
6 Lagerung	4°C	

## 2. Material und Methoden

In der folgenden Tab. 15 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 15: Verwendete Oligonukleotide.**

Name	Sequenz (5'-3')	Zweck
Res-for	TGGGCACCGAACGAGAACAG	Nachweis G418-Resistenz
G418-rev	TGGTCGAATGGGCAGGTAGC	Nachweis G418-Resistenz
Hyg-for	GCGACGTCTGTGCGAGAAGTTTCTG	Nachweis Hyg-Resistenz
Hyg-rev	GTGAGCAGGCTCCCGTTTCCTTAT	Nachweis Hyg-Resistenz
NAT-for	GAATTCATGACCACTCTTGACGACACG	Nachweis NAT-Resistenz
NAT-rev	CTCGAGTCAGGGGCAGGGCATGCTC	Nachweis NAT-Resistenz
crtYB-RT-for	AGGGCTGATCCCTCGATAACC	Kopienzahlbestimmung
crtYB-RT-rev	GTCTCGATAGGCGTCTTCCG	Kopienzahlbestimmung
crtE-RT-for	GCAGATCCGTTCTCGAAAG	Kopienzahlbestimmung
crtE-RT-rev	AGGACACGTCAGACTATCTC	Kopienzahlbestimmung
Asy-RT-for	GAGTGCTCAGAATTGCTACC	Kopienzahlbestimmung
Asy-RT-rev	TTGGGACCATCGACTTAACG	Kopienzahlbestimmung
16S-for	GAAGAGTTTGATCATGGCTCA	16S-rDNA-Sequenzierung
16S-rev	ACGACAGCCATGCAGCACCT	16S-rDNA-Sequenzierung

### 2.2.2.3 Reinigung von DNA

Die Reinigung von Plasmid-DNA erfolgte grundsätzlich über eine Phenol-Chloroform-Behandlung. Hierfür wurden zur wässrigen DNA-Lösung ein Volumen Phenol zugegeben, geschüttelt und zentrifugiert, (1 Min., 6000 rpm, Eppendorf 5415D, RT), die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und ein Volumen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (Verhältnis 25:24:1) hinzugegeben. Der Ansatz wurde wiederum geschüttelt, wie zuvor zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß übertragen. Die vorgereinigte Lösung wurde weiter mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol behandelt und ein weiteres mal zentrifugiert. Die polare Phase wurde anschließend mit 2,5 Volumen -20°C kalten 100% Ethanol (p.a.) und 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat vorsichtig gemischt und mindestens über Nacht bei -20°C gefällt. Am Folgetag wurde die Probe 60 Minuten bei 0°C und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das DNA-Sediment wurde mit 500 µl -20°C kalten 80%-Ethanol (p.a.)

## 2. Material und Methoden

gewaschen und 30 Minuten bei 0°C und 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, verworfen und das DNA-Sediment bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde in der entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> rückgelöst um eine Endkonzentration von 1 µg/µl zu erreichen.

### **2.2.2.4 Analyse von DNA mittels Gelelektrophorese**

DNA-Moleküle wurden über eine Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach in 1x TAE-Puffer (Tab. 16) bei einer Spannung von 4-6 V/cm aufgetrennt. Es wurden TAE-Gele bestehend aus 1 % Agarose verwendet. Die Färbung der DNA erfolgte 20 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml EtBr), die Dokumentation anschließend unter UV-Bestrahlung auf einem Transilluminatorsystem des Typs „E-Box VX2“ der Firma Vilber.

**Tab. 16: 50x TAE-Puffer**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Tris	242 g/L
Eisessig	57,1 ml/L
0,5M EDTA	100 ml/L

## 2. Material und Methoden

### **2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentration von Plasmid-DNA erfolgte photometrisch unter Verwendung des Geräts „Nanodrop ND-1000“ der Firma Peqlab. Isolate genomischer DNA aus *Phaffia rhodozyma* wurden densitometrisch ausgewertet, indem 1 µl der isolierten DNA in der Geldokumentation mit einem bekannten Größenstandard (GeneRuler 1kb+) unter Verwendung der Software „Image J“ verglichen wurde.

### **2.2.2.6 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen**

*Escherichia coli* wurde zur Herstellung elektrokompetenter Zellen zunächst in einer 5 ml LB-Vorkultur über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde eine 100 ml LB-Kultur mit den Zellen angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600}=0,5-0,8$  wachsen gelassen. Nach Erreichen der gewünschten OD wurden die Zellen kalt zentrifugiert (4°C, 10 Minuten, 6000 rpm) und das Zellsediment drei Mal mit einem Volumen eiskaltem  $H_2O_{bidest}$  gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml eiskaltes  $H_2O_{bidest}$  aufgenommen und wiederum zentrifugiert. Das Zellsediment wurde darauf in 500 µl einer 10%-igen Glycerinlösung gelöst und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

### **2.2.2.7 Elektrotransformation von *E. coli*-Zellen**

Zur Transformation von *E. coli* mittels Elektroschock wurde je ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden zwischen 100 ng und 200 ng Plasmid-DNA gegeben und der Ansatz anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Probe wurde in eine sterile Elektroporationsküvette (Spaltdicke 2 mm) übertragen und ein elektrischer Puls von 2,5 kV bei 25 µF und 200 Ω Innenwiderstand ausgelöst. Nach sofortiger Zugabe von 750 µl LB-Medium wurde die Probe bei 37°C eine Stunde zur Regeneration inkubiert, bevor 20-100 µl (je nach Stamm und Plasmid) des Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten, mit geeignetem Antibiotikum, ausplattiert wurden. Die LB-Agar-Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.



## 2. Material und Methoden

### 2.2.2.8 Plasmid-„Midi“-Präparation aus *E. coli*

Zur Isolation größerer Mengen an Plasmid-DNA nach Vervielfältigung in *E. coli* wurde das Kit „PureYield Midiprep System“ der Firma „Promega“ nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.2.2.9 Verwendete Plasmide

In der folgenden Tab. 17 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zusammengefasst.

Tab. 17: Zusammenfassung der verwendeten Plasmide.

Name	Vermittelte Gene in Überexpression	Vermittelte Resistenz	Quelle
<b><i>Phaffia rhodozyma</i></b>			
pPR13Fasy	<i>Phaffia crtYB</i> , <i>Phaffia asy</i>	Geneticin	Gassel et al. 2014
pPR2TNH-tHMG-CoA/crtE	<i>S. c. tHMG1-CoA-Reduktase</i> , <i>Phaffia crtE</i>	Hygromycin	Gassel et al. 2014
pPR2TNo-asy	<i>Phaffia asy</i>	Nourseothricin	Gassel et al. 2014
pPR13F	<i>Phaffia crtYB</i>	Geneticin	Verdoes et al. 2003
pPR2TNH-asy	<i>Phaffia asy</i>	Hygromycin	unveröffentlicht
pPRcDNA1bkt830	<i>Bkt</i> aus <i>Haematococcus pluvialis</i>	Geneticin	Ojima et al. 2006
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
pACCAR16ΔcrtX	<i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> aus <i>E. uredovora</i>	Chloramphenicol	Misawa et al. 1995
pPQE30bkt	<i>Bkt</i> aus <i>C. reinhardtii</i>	Ampicillin	unveröffentlicht
pBBR1-MCS2crtZ	<i>crtZ</i> aus <i>E. uredovora</i>	Kanamycin	unveröffentlicht

## 2. Material und Methoden

### 2.2.2.10 Bestimmung von Gen-Kopienzahlen über „Realtime-PCR-Analyse“

Für die Bestimmung der Anzahl der Integrationen von Plasmiden nach Transformation mit *Phaffia rhodozyma* wurde genomische DNA isoliert (siehe 2.2.3.6 auf Seite 54) und die Konzentration der DNA densitometrisch nach einer Gelelektrophorese (1% Agarose) mit der Software „ImageJ“ ermittelt.

Die Tabellen Tab. 18 und Tab. 19 zeigen die Zusammensetzung der Reaktionsvolumina und das verwendete PCR-Profil für die Realtime-PCR-Analysen. Als Fluoreszenzmarker wurde SYBR-Green (Arya et al. 2005) in einem Universal Mix der Firma Peqlab (KAPA SYBR FAST) verwendet.

**Tab. 18: Zusammensetzung der Proben für die „Realtime-PCR-Analyse“**

Komponente	Konzentration
KAPA SYBR FAST Universal Mix (2x)	1x
Oligonukleotid 1	25 pmol
Oligonukleotid 2	25 pmol
DNA	1 pg – 10 ng
H <sub>2</sub> O bidest	ad 20 µl

**Tab. 19: Standardprogramm der „Realtime-PCR-Analysen“**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	3 min
Denaturierung (40x)	95°C	3 s
Anlagerung + Elongation (40x)	60°C	20 s
Schmelzkurve (0,5 °C Intervall)	50 °C – 99 °C	-

Für die Berechnung der relativen Kopienzahl der integrierten Plasmide nach Pfaffl (2001) wurde die Effizienz der PCR-Reaktion für jedes Oligonukleotidpaar bestimmt. Es wurden DNA-Verdünnungen von 1 ng bis 0,01 ng in der Reaktion eingesetzt. Die C(t)-Werte wurden logarithmisch gegen die DNA-Verdünnung aufgetragen und die Steigung der Regressionsgerade berechnet. Die Effizienz wurde über die Formel F1 berechnet.

## 2. Material und Methoden

### F1: Berechnung der Effizienz

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{Steigung}}}$$

Die relativen Kopienzahlen wurden über die Formel F2 aus der Differenz der C(t)-Werte für ein Amplifikat zur Basis der Effizienz der PC-Reaktion berechnet.

### F2: Berechnung der Kopienzahl

$$\text{Ratio} = E^{\Delta C(t)^{\text{Kontrolle-Transformante}}}$$

Die „Realtime-PCR-Analysen“ wurden mit einem PCR-Gerät des Typs Rotor-Gene 3000 der Firma Corbett durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.3 *Phaffia rhodozyma*-spezifische Methoden

#### 2.2.3.1 Herstellung elektrokompetenter *Phaffia rhodozyma*-Zellen

Zur Herstellung von für Transformationen mittels Elektroschock geeigneten *Phaffia rhodozyma*-Zellen, wurde eine 100 ml YPD-Flüssigkultur 1:10 mit einer dicht bewachsenen *Phaffia rhodozyma* Vorkultur angeimpft. Je nach Stamm wurde den Kulturen die jeweils entsprechende Menge Antibiotikum hinzugefügt. Die 100 ml-Flüssigkultur wurde bei einer optischen Dichte von  $OD_{600}=1,2$  geerntet. Das Zellsediment wurde in 25 ml einer 50 mM Kaliumphosphatlösungen-DTT-Lösung (Tab. 20) rückgelöst und 15 Minuten auf einem Schütteltisch bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (4°C, 10 min, 4500 rpm Heraeus Labofuge) wurden die Zellen insgesamt zweimal in 25 ml eiskaltem STM-Puffer (Tab. 20) gewaschen, bevor sie in 250 µl STM-Puffer rückgelöst wurden. Die vorbereiteten Zellen wurden stets auf Eis gehalten.

Tab. 20: STM-Puffer, Kaliumphosphatpuffer

STM-Puffer		Kaliumphosphat-puffer (ph 7,5)	
Bestandteil	Menge	Bestandteil Lösung A (0,2M)	Menge
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	27,6 g/L
		<b>Bestandteil Lösung B (0,2M)</b>	
Saccharose	270mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	28,4 g/L
MgCl <sub>2</sub>	1mM		
Tris-HCl (ph 7,5)	10mM		

#### 2.2.3.2 Transformation von *Phaffia rhodozyma* mittels Elektroporation

Die Herstellung transgener *Phaffia*-Stämme wurde durch die Integration linearisierter Plasmide mit funktionalen Expressionskassetten im Bereich der ribosomalen DNA des Genoms durchgeführt (Tanaka und Kawamoto 1999). Die Integration erfolgte über homologe Rekombination. Für die durch einen Elektroschock (nach Visser et al. 2005) vermittelte Aufnahme linearisierter Plasmid-DNA wurden pro Ansatz 60 µl der vorbereiteten *Phaffia rhodozyma*-Zellen (siehe 2.2.3.1) jeweils in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu den elektrokompetenten Zellen wurde 10 µg DNA hinzugefügt, welche vorher durch das entsprechende Restriktionsenzym (*Sfi*I oder

## 2. Material und Methoden

*Clal*) linearisiert und mittels Phenol-Chloroform-Reinigung (siehe 2.2.2.3) gereinigt wurde. Die Konzentration der DNA-Proben wurden auf 1 µg DNA pro 1 µl eingestellt. Die vorbereiteten Zell-DNA-Proben (70 µl) wurden in sterile Elektroporationsküvetten (2 mm Spaltgröße, kurze Elektroden) überführt und ein Elektropuls mit den Parametern 1000 Ω, 25 µF und 0,8 kV ausgelöst. Direkt nach dem Puls wurde dem Ansatz 500 µl YPD-Medium zugeführt und die Ansätze 3 Stunden bei Raumtemperatur unter mäßigem Schütteln zur Regeneration inkubiert.

Die Proben wurden anschließend auf YPD-Agar-Platten (16% Agar) mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml G418, 60 µg/ml Hygromycin, 9 µg/ml Nourseothricin) ausplattiert (jeweils 80 µl pro Platte). Für die Positivkontrolle ohne Antibiotikum wurden lediglich 30 µl des jeweiligen Ansatzes ausplattiert. Nach 5-6 Tagen sollten Transformanten sicht- und abimpfbar sein.

### **2.2.3.3 Carotinoid-Extraktion aus *Phaffia rhodozyma***

Zur Analyse der Carotinoidzusammensetzung mittels HPLC wurde *Phaffia rhodozyma* in 50 ml-Flüssigkulturen für acht Tage schüttelnd inkubiert und nach der Zellernte (4500 rpm, RT, 10 min, Heraeus Labofuge 400R) über Nacht lyophilisiert. Am folgenden Tag wurde das lyophilisierte Material gewogen, pulverisiert und 20 mg, bzw. 3 mg bei den DSM-Stämmen, in Metallröhrchen überführt. Der Zellaufschluss erfolgte nach Zugabe von 5 ml DMSO nach Sedmak et al. 1990 und Inkubation der Lösung bei 55°C für 15 Minuten. Nach 10-15-minütigem Abkühlungen wurde die Probe in einen Scheidetrichter überführt und mit 5 ml Diethylether versetzt. Die Probe wurde 2 Minuten bei -20°C abgekühlt und anschließend mit 1 ml eiskaltes H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> versetzt und geschüttelt. Die untere der zwei entstandenen Phasen wurde in einen zweiten Scheidetrichter überführt und separat ausgeschüttelt. Beiden Phasen wurden 5 ml 10 % Ether in Petrolbenzin, 5 ml Aceton und 5 ml H<sub>2</sub>O zugegeben und geschüttelt. Die vergleichsweise unpolaren Carotinoide befinden sich nunmehr in der Etherphase. Bei sichtlicher Trübung der polaren Phase wurden 5-10 ml 70 % Ethanol zugegeben. Die wässrigen Phasen wurden entlassen und die Carotinoidlösung in Glasröhrchen aufgefangen. Die optische Dichte wurde photometrisch bei OD<sub>465</sub> bestimmt und das Gesamtvolumen der Carotinoidlösung notiert. Die Proben wurden anschließend unter einem N<sub>2</sub>-Strom bei 37°C eingeeengt.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.3.4 Quantifikation des Gesamtcarotinoids

Die Berechnung des Gesamtcarotinoidgehaltes der Carotinoidlösung wurde als Anpassung des Lambert-Beer'schen Gesetzes nach Formel F3 berechnet:

#### F3: Berechnung des Carotinoidgehalts einer Carotinoidlösung

$\epsilon_{1\%}$  ist hierbei der Extinktionskoeffizient (2100) einer 1 %-igen Carotinoidlösung

$$m = \frac{OD_{465 \text{ nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Volumen Carotinoidlösung} * 1 \text{ g}}{\epsilon_{1\%} * 100}$$

Die berechneten Daten wurden auf die Dimension  $\mu\text{g}$  pro Gramm Trockengewicht ( $\mu\text{g/g dw}$ ) normalisiert.

### 2.2.3.5 Chromatographische Analyse des Gesamtcarotinoids mittels HPLC

Zur Bestimmung, welche Carotinoide in den Extrakten vorhanden waren wurde standardmäßig eine „High-Pressure-Liquid-Chromatography“ (HPLC) durchgeführt. Für die chromatographische Analyse wurden jeweils 100  $\mu\text{g}$  bis 250  $\mu\text{g}$  Carotinoid in das HPLC-System eingespritzt. Die Ermittlung der Spektren erfolgte über einen Diode Array Detektor (Kontron DAD 440) bei 465 nm und 475 nm. Es wurde eine „Reversed-Phase“-C18-Säule (Nucleosil, 300  $\mu\text{m}$  Korngröße) als stationäre Phase verwendet. Als mobile Phase wurde ein Laufmittel, bestehend aus Acetonitril, Methanol und 2-Propanol (im Verhältnis 85:10:5), mit einer Flussrate von 1 ml/min durch die auf 10°C oder 32°C temperierte Säule gepumpt. Die Dokumentation und die Datenverarbeitung der HPLC-Analysen erfolgte an einem PC mit der Software Clarity Lite (Chromatogramme) und WinWaters (Spektren).

### 2.2.3.6 Isolation von genomischer DNA aus *Phaffia rhodozyma*

Für die Isolation von genomischer DNA aus *Phaffia rhodozyma* wurde der betreffende Stamm in einem 20 ml-Kulturvolumen in YPD-Medium 4-6 Tage bei 19°C angezogen. Die Zellen wurden anschließend bei 10000 rpm, 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Zellsediment zwei Mal in sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen. Auf den

## 2. Material und Methoden

zweiten Waschschrift folgend wurden die Zellen wieder in 100 µl TE-Puffer aufgenommen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und diesem ein Volumen von 300 µl Glasperlen (0,25-0,5 mm) zugegeben. Das Gemisch wurde zum Zellaufschluss eine Minute bei maximaler Einstellung stark geschüttelt (Retsch Schwingmühle MM200 30/s) und anschließend eine Minute auf Eis ruhen gelassen. Diese letzten beiden Schritte wurden zwei Mal wiederholt, bevor 400 µl einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (Verhältnis 25:24:1) hinzugefügt wurde. Der Ansatz wurde 30 Sekunden stark geschüttelt und anschließend eine Minute bei 6000 rpm zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, zur organischen Phase wurden 300 µl TE-Puffer hinzugefügt. Letzteres Gemisch wurde wiederum 30 Sekunden stark geschüttelt und ein weiteres Mal bei 6000 rpm eine Minute zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde zu der vorangegangenen wässrigen Phase hinzugefügt und der Gesamtansatz mit 400 µl einer Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (Verhältnis 24:1) vermischt. Die Probe wurde stark geschüttelt, bei 6000 rpm eine Minute zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Für die anschließende Fällungsreaktion wurde die Probe mit 2,5 Volumen 100% Ethanol (p.a.) und 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat vermischt und mindestens über Nacht bei -20°C ruhen gelassen.

Frühestens am Folgetag wurde die Probe für 15 Minuten bei 10000 rpm, 0°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand sorgfältig entfernt und das Sediment bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde in 40 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> rückgelöst und bei 4°C gelagert.

### **2.2.3.7 Mikroskopie von *Phaffia rhodozyma***

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit freundlicher Unterstützung im Arbeitskreis Piepenbring der Goethe-Universität Frankfurt/, die rasterelektronenmikroskopischen Analysen mit freundlicher Unterstützung ebenfalls an der Goethe-Universität Frankfurt bei Manfred Ruppel, durchgeführt.

## 3. Ergebnisse

Für die Herstellung eines *Phaffia*-Stammes mit gesteigerter Astaxanthinsynthese wurden eine oder mehrere Mutanten gesucht, welche sich durch einen hochregulierten Carotinoidbiosyntheseweg auszeichneten. Geeignete Mutanten sollen jedoch weiterhin Limitierungen im Carotinoidstoffwechsel aufweisen, damit durch „Metabolic Engineering“ eine weitere Steigerung der Carotinoidbsynthese erreicht werden kann.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Herstellung eines Astaxanthin hochproduzierenden Stammes, der durch eine Kombination aus chemischer Mutagenese und gezielter genetischer Manipulation aus dem Pilz *Phaffia rhodozyma* entstehen soll.

Die chemische Mutagenese wurde von „DSM Nutritional Products“ durchgeführt. Für die genetische Modifikation des Carotinoidbiosynthesewegs wurden aus diesen Mutagenisierungsexperimenten die Stämme ATX-30, TTH-2, AXG-13 und AXJ-20 bereitgestellt.

Diese Stämme sollen zunächst charakterisiert und ihr Potential für „Metabolic Engineering“ evaluiert werden, bevor die geeigneten Schlüsselgene identifiziert und genetische modifiziert werden.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Evaluation und Optimierung der Mutanten AXJ-20, AXG-13 und TTH-2

Abb. 12 zeigt schematisch die Herstellung der hier bearbeiteten Stämme. Die spontan aufgetretene, Astaxanthin-hochproduzierende Mutante TTH-2 wurde in drei Stufen mit N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) behandelt und auf eine gesteigerte Carotinoidbiosynthese hin für die jeweils nächste Stufe selektiert. Chemische Mutagene wie EMS oder NTG führen im Genom vornehmlich zu Basenpaarsubstitutionen und DNA-Deletionen (Talbot 2001). NTG ist eine stark mutagene Substanz, welche bereits in der 1960er Jahren zur Herstellung von zufälligen Mutanten verschiedenster Spezies eingesetzt wurde (Mandell und Greenberg 1960, Adelberg und Mandel 1965, Nordström 1967).

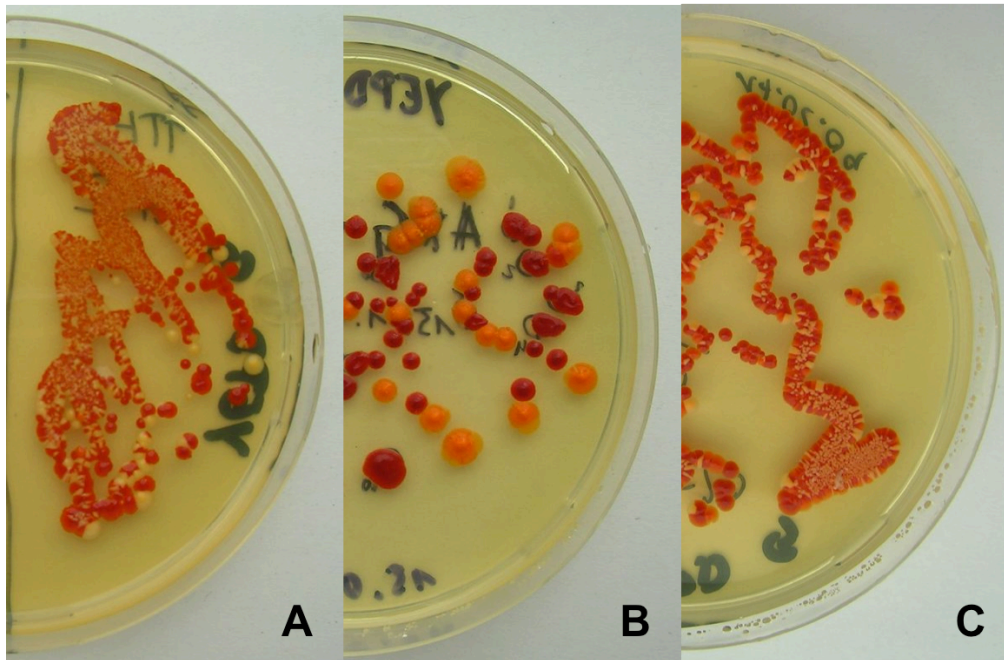


**Abb. 12: Herstellung der Mutanten.**

Das Bild zeigt den schematischen Ablauf der chemischen Mutagenisierung der Stämme TTH-2, AXG-13 und AXJ-20. TTH-2 war eine spontane Mutante des Wildtyps mit erhöhter Carotinoidbiosynthese, deren Syntheseleistung durch NTG weiter über mehrere Stufen gesteigert wurde.

Die vier bereitgestellten Stämme wurden zunächst aus einer -80°C-Dauerkultur auf YPD-Agar ausgestrichen und kultiviert. Diese Stämme wiesen hierbei eine enorm verzögerte Wachstumsgeschwindigkeit, im Vergleich zum Wildtyp CBS6938 mit 6-8 Tagen, von 14 Tagen auf bis einzelne Kolonien isoliert werden konnten. Die Pigmentierung der Stämme zeigte eine sichtbare Instabilität (Abb. 13). Während aus den Stämmen TTH-2, AXG-13 und AXJ-20 rote Einzelkolonien isoliert werden konnten, zeigte ATX-30 generell kein Wachstum (nicht gezeigt). Von den gezeigten Kulturen (Abb. 13) wurden einzelne rote Kolonien isoliert und auf frischen YPD-Agar überimpft. Die inhomogene Pigmentierung war auch in dieser zweiten Generation vorhanden (nicht gezeigt). Von dieser zweiten Generation wurden 5 ml GSM-Vorkulturen angefertigt, mit welchen dann 50 ml GSM-Hauptkulturen zur Analyse angeimpft wurden. Mit zwölf Tagen Anzuchtsdauer wich die Kultivierung von der üblichen Zeitspanne (vgl. acht Tage) um vier Tage ab, da sich die Wachstumsgeschwindigkeit im direkten Vergleich mit Kontrollanzuchten von CBS6938 noch immer als verzögert darstellte.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 13: Erstkultivierung der mutagenisierten Stämme.**

Die Abbildung zeigt die drei für 14 Tage bei 19°C kultivierten Stämme (bereitgestellt von „DSM Nutritional Products“), ausgestrichen auf YPD-Agar aus -80°C-Dauerkulturen; **(A)** TTH-2, **(B)** AXG-13 und **(C)** AXJ-20. Alle Stämme weisen eine inhomogene Pigmentierung und eine verzögerte Wachstumsgeschwindigkeit auf.

Tab. 21 zeigt eine Zusammenfassung der Carotinoidanalysen der mutagenisierten Stämme. Der Gesamtcarotinoidgehalt lag entsprechend ihres Mutagenisierungsgrades in der Reihenfolge TTH-2 ( $1137 \pm 363 \mu\text{g/gdw}$ ), AXG-13 ( $1818 \pm 373 \mu\text{g/gdw}$ ) und AXJ-20 ( $1840 \pm 215 \mu\text{g/gdw}$ ), wobei man die starke Standardabweichung der jeweils drei biologischen Replikate innerhalb der Stämme beachten muss. Die Variation war innerhalb der Replikate bereits sehr hoch, was durch eine inhomogene Pigmentierung der Petrischalenkultur hervorgerufen wurde.

**Tab. 21: Zusammenfassung der Erstanalyse der mutagenisierten Stämme (erstes Isolat)**

Anzuchtdauer zwölf Tage, 19°C, GSM-Medium. Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

	<b>TTH-2</b>	<b>AXG-13</b>	<b>AXJ-20</b>	<b>CB6938</b>
<b>Gesamtcarotinoideid</b>	$1137 \pm 363$	$1818 \pm 373$	$1840 \pm 215$	$149 \pm 32$
<b><math>\mu\text{g/gdw}</math></b>				
<b>Astaxanthin</b>	$591 \pm 313$	$708 \pm 109$	$901 \pm 464$	$116 \pm 13$
<b><math>\mu\text{g/gdw}</math></b>				
<b>Astaxanthin %</b>	49	40	48	79

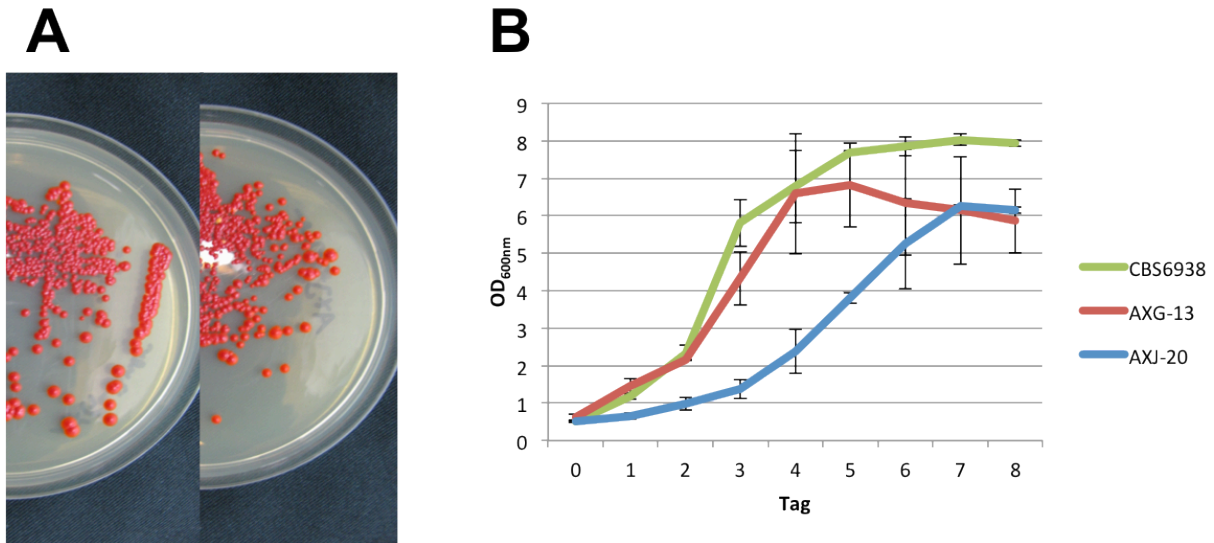
### 3. Ergebnisse

Der Astaxanthingehalt in den Kulturen lag bei  $591 \pm 313 \mu\text{g/gdw}$  (TTH-2) mit einem durchschnittlichen Anteil von 49 % des Gesamtcarotinoidgehalts. Analysen von AXG-13 zeigten einen Astaxanthinanteil von durchschnittlich 40 %, der einer Menge von  $708 \pm 109 \mu\text{g/gdw}$  entspricht. AXJ-20 zeigte durchschnittlich den größten Anteil Astaxanthins am Gesamtcarotinoid mit  $901 \pm 464 \mu\text{g/gdw}$  (48 %), wobei in diesem Stamm zwischen den drei Replikaten die größte Standardabweichung auftrat. Der Wildtyp CBS6938 hatte eine Gesamtcarotinoidsyntheseleistung von  $149 \pm 32 \mu\text{g/gdw}$  mit einem Astaxanthingehalt von  $116 \pm 13 \mu\text{g/gdw}$ . Dies entspricht knapp 80% des Gesamtcarotinoids. Bezüglich des relativen Astaxanthingehalt, liegt CBS6938 damit deutlich über den Mutanten. Der Gesamtcarotinoidgehalt liegt hingegen um den Faktor 10 unter dem Syntheseniveau der Mutanten.

Aus diesen ersten Analysen wurde aufgrund des generell als zu niedrigen Carotinoidgehaltes im Stamm TTH-2 entschieden, nur die beiden Stämme AXG-13 und AXJ-20 für eine Fortführung der Experimente zu berücksichtigen.

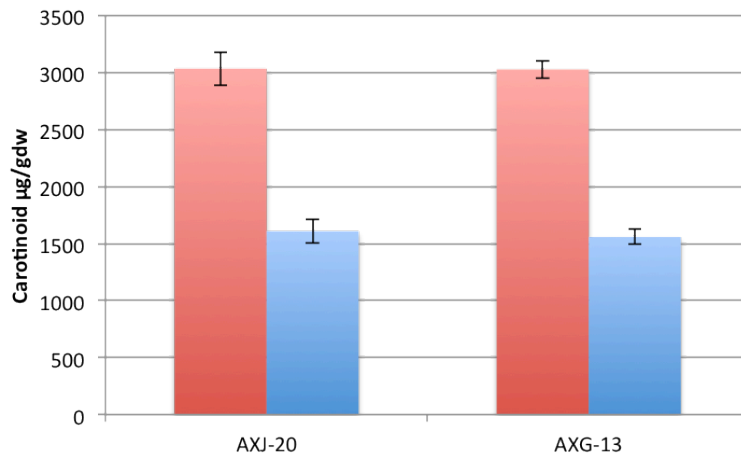
Die Stämme AXG-13 und AXJ-20 wurden über insgesamt fünf bis sechs Generationen auf YPD-Agar nach Farbigkeit selektiert und passagiert, bis die Pigmentierung innerhalb einer Kultur schließlich als homogen zu bewerten war (Abb. 14 A). Die Stämme wurden durch das Passagieren und Selektieren nicht nur auf die Stabilität der Pigmentierung, sondern auch auf ihre Wachstumsgeschwindigkeit hin optimiert. Allerdings zeichneten sie sich in diesem Stadium der Optimierung im Vergleich zum Wildtyp CBS6938 durch eine verzögerte, exponentielle Wachstumphase und eine geringere Zelldichte in der stationären Phase aus, diese wurde zwischen dem vierten und siebenten Tag erreicht (Abb. 14 B). Nach der Selektion nach Farbigkeit der Stämme AXJ-20 und AXG-13 konnten auch stabilere Carotinoidzusammensetzungen ermittelt werden. So liegt die Carotinoidbiosyntheseleistung von AXJ-20 nach dieser Optimierung bei  $3034 \pm 145 \mu\text{g/gdw}$  mit einem Astaxanthingehalt von  $1609 \pm 103 \mu\text{g/gdw}$ . Für AXG-13 konnte ein Gesamtcarotinoidgehalt von  $3028 \pm 80 \mu\text{g/gdw}$  mit einer Astaxanthinmenge von  $1558 \pm 66 \mu\text{g/gdw}$  ermittelt werden. Die Variationen innerhalb der Kulturen mit ihren Replikaten konnte ebenfalls reduziert werden, weshalb die Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Kulturen) nun deutlich geringer sind (Abb. 15).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 14: AXJ-20 und AXG-13 nach Reinigung.**

**(A) Optimierte Stämme.** In dieser Fotografie sind die auf Wachstum und Pigmentierung optimierten YPD-Agar-Kulturen AXG-13 (links) und AXJ-20 (rechts) zu sehen. Die Pigmentierung ist homogen rot. **(B) Wachstumskurven von CBS6938, AXG-13 und AXJ-20.** Der Graph zeigt die mittleren Wachstumsdichten pro Tag des Wildtyps CBS6938 (grün) und der beiden mutagenisierten Stämme AXG-13 (rot) und AXJ-20 (blau). Gegen Ende der Kultivierung von acht Tagen stellt sich eine Verminderung der optischen Dichte (OD<sub>600nm</sub>) in den Stämmen AXG-13 und AXJ-20 ein, während die stationäre Phase von CBS6938 stabil bleibt und erst am Tag Acht einen Rückgang aufweist. CBS6938 erreichte am Ende der Kulturphase eine generell höhere Zelldichte als die beiden mutagenisierten Stämme AXG-13 und AXJ-20.



**Abb. 15: Carotinoidanalyse der selektierten Stämme AXG-13 und AXJ-20.**

Die Abbildung zeigt den Gesamtcarotinoid- (rot) und den Astaxanthingehalt (blau) der selektierten Stämme AXG-13 und AXJ-20 in µg Carotinoid / gdw. Durch stetige, rein qualitative, visuelle Selektion einzelner Kolonien konnten Stämme stabilisiert werden, welche über eine höhere Carotinoidbiosyntheseleistung verfügten als die Ursprungsstämme. Der Gesamtcarotinoidgehalt im Stamm AXJ-20 liegt nun bei 3034 ± 146 µg/gdw („vorher“ 1840 ± 215 µg/gdw), AXG-13 zeigt eine Syntheseleistung von 3028 ± 80 µg/gdw („vorher“ 1818 ± 373). Der Astaxanthingehalt stieg im Falle des Stamms AXJ-20 von 901 ± 464 µg/gdw auf 1609 ± 103 µg/gdw und bei AXG-13 von 708 ± 109 auf 1558 ± 66 µg/gdw.

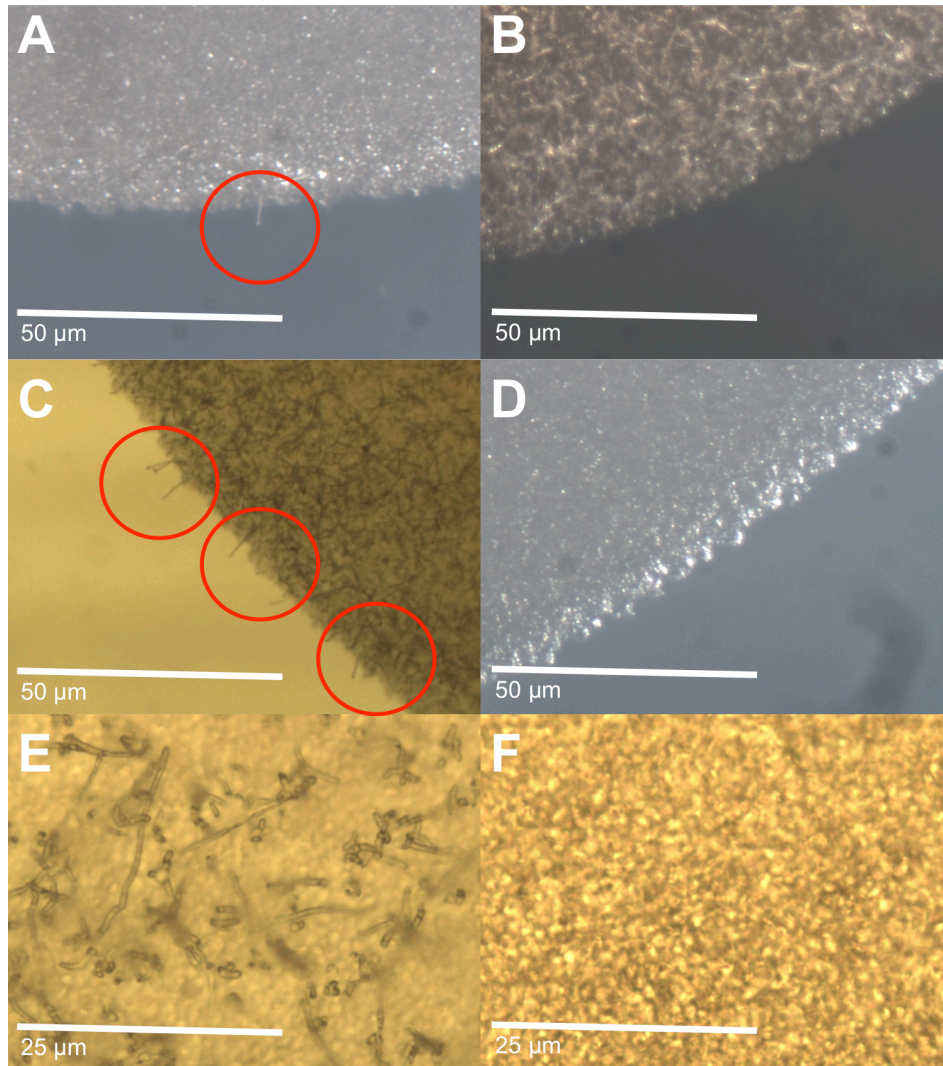
### 3. Ergebnisse

#### 3.2 Untersuchung der Wachstumsform auf Sporulationsmedium

Um weiteren Aufschluss über das Wachstum der mutagenisierten Stämme zu erhalten, wurde der *Phaffia* Wildtyp CBS6938 und die Mutanten AXJ-20 und AXG-13 auf Sporulationsmedium kultiviert. Für die Kultivierung wurde ein stickstoffarmes Sporulationsmedium (nach Retamales et al. 2002) verwendet, mit Tropfen einer Flüssigkultur der betreffenden Stämme angeimpft und 3-4 Wochen bei Temperaturen von 10°C kultiviert. Die Fotografien in Abb. 16 und Abb. 17 zeigen deutlich, dass die chemischen Mutanten in Bezug auf einen teleomorphen Generationszyklus als steril anzusehen sind und nicht mehr zu einer Ausbildung von Sporenträgern befähigt sind. CBS6938 bildete sichtbare Holobasidien mit terminal gebundenen Basidiosporen aus (Abb. 16 A, C, E, rote Kreise), während diese Strukturen bei den Mutanten AXJ-20 (Abb. 16 B und F) und AXG-13 (Abb. 16 D) nicht zu identifizieren waren. Auch im Lichtmikroskop bei stärkerer Vergrößerung konnten bei den Mutanten AXJ-20 (Abb. 17 A) und AXG-13 (Abb. 17 B) eine Ausbildung von Basidien nicht beobachtet werden.

Eine REM-Analyse des Wildtyps und der chemischen Mutante AXJ-20 zeigte, dass beim Wildtyp sporulierende und nicht sporulierende Zellen erkennbar waren (Abb. 18 A). In einem Präparat von AXJ-20 hingegen konnten keine sporulierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 18 B). Es wurden lediglich einzelne Zellen mit Knospungsnarben beobachtet (roter Kreis).

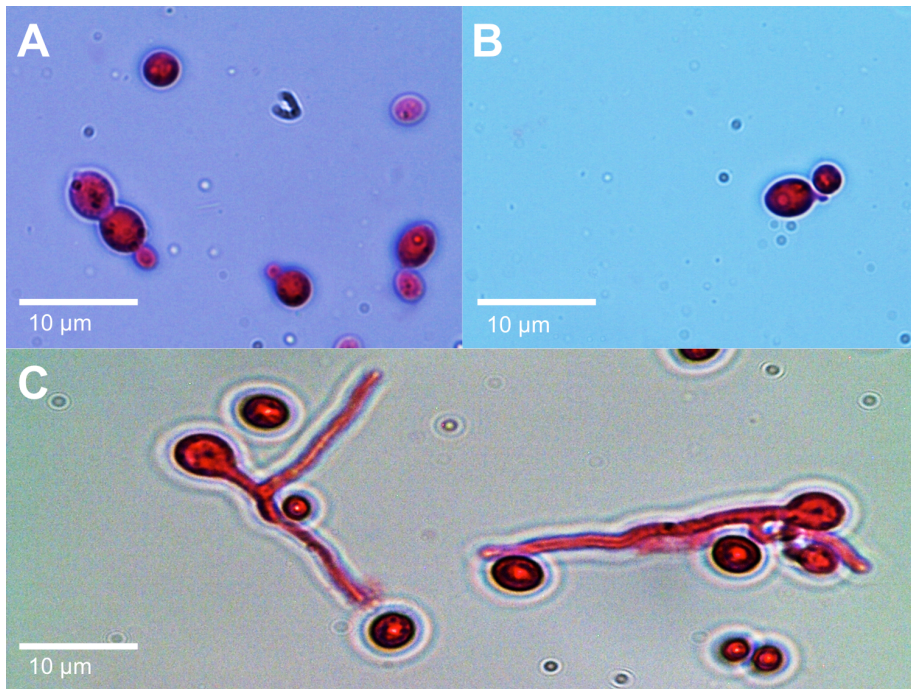
### 3. Ergebnisse



**Abb. 16: *Phaffia* Wildtyp und Mutante unter Vergrößerung.**

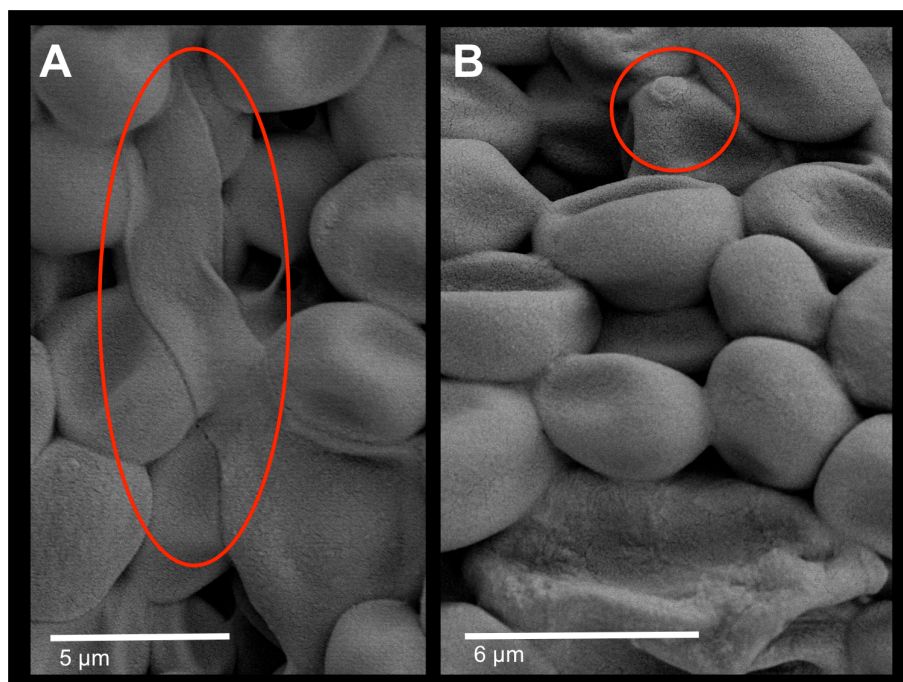
Die Abbildung zeigt Fotografien des sporulierenden *Phaffia* Wildtyps CBS6938 (A, C und E), sowie der chemischen Mutanten AXJ-20 (B und F) und AXG-13 (D). Die Stämme wurden auf stickstoffarmen Agar-Sporulationsmedium 3-4 Wochen kultiviert (Retamales et al. 2002) und unter einem Binokular analysiert. Deutlich sind in den Abbildungen A und C die Ausbildungen von Sporenträgern, den Holobasidien sichtbar. In einer Daraufricht (E) ist die Menge der Holobasidien mit terminalen Basidiosporen noch deutlicher erkennbar. Die chemischen Mutanten in B (AXJ-20) und D (AXG-13) wiesen keinerlei solcher Strukturen auf. Auch in der Daraufricht in E (AXJ-20) sind keine Sporenträger erkennbar.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 17: Lichtmikroskopische Analyse verschiedener *Phaffia*-Stämme**

Die Abbildung zeigt lichtmikroskopische Fotografien des *Phaffia* Wildtyps CBS6938 (C), sowie den Mutanten AXJ-20 (A) und AXG-13 (B). Deutlich ist auch hier die Ausbildung von Holobasidien beim *Phaffia* Wildtyp CBS6938 mit terminalen Basidiosporen sichtbar. Die chemischen Mutanten AXJ-20 und AXG-13 weisen keine solcher Strukturen auf. Die Kultivierung erfolgte 3-4 Wochen auf stickstoffarmen Sporulationsmedium (Retamales et al. 2002). Die Zellen wurden mit Phloxin B angefärbt.



**Abb. 18: REM-Aufnahme des *Phaffia* Wildtyps und einer chemischen Mutante**

Die Abbildung zeigt eine REM-Analyse eines Wildtyp-Präparats (A) und eines Präparats von AXJ-20 (B). Deutlich ist beim Wildtyp CBS6938 eine sporulierende Zelle inklusive der Holobasidie erkennbar (rote Ellipse). Beim Präparat der chemischen Mutante AXJ-20 hingegen konnten ausschließlich Knospungsarben (roter Kreis) beobachtet werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.3 Herstellung der Carotinoidstandards

Um die zu detektierenden Carotinoide in den HPLC-Chromatogrammen Carotinoiden zuordnen zu können, wurden einige Standards durch Komplementationen in *Escherichia coli* hergestellt oder käuflich erworben (Astaxanthin und Canthaxanthin). Zu Komplementationen in *E. coli* wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  mit dem Plasmid pACCAR16 $\Delta$ crtX (Misawa et al. 1995) transformiert. Dieses Plasmid trägt das aus den Genen *crtE*, *crtB*, *crtI* und *crtY* bestehende Carotinoidbiosynthesecluster aus *Erwinia uredovora* (Abb. 19).

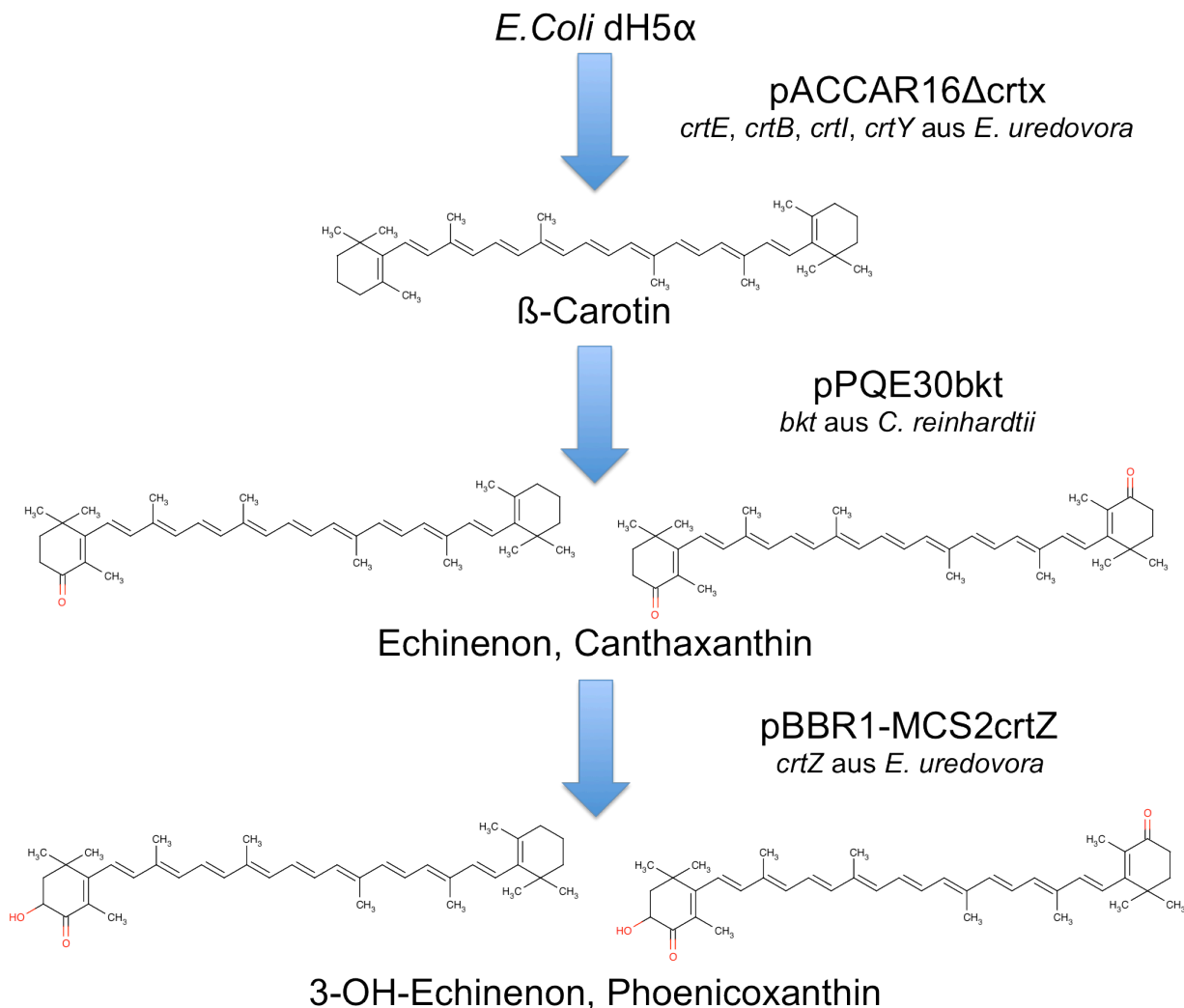


Abb. 19: Herstellung der Standards.

Über Komplementation von *E. coli* dh5 $\alpha$  mit den Plasmiden pACCAR16 $\Delta$ crtX (Carotinoidbiosynthesecluster aus *E. uredovora*), pPQE30bkt (*bkt* aus *C. reinhardtii*) und pBBR1-MCS2crtZ (*crtZ* aus *E. uredovora*) konnten die Carotinoide  $\beta$ -Carotin, Echinenon, Canthaxanthin und die hydroxylierten 3-OH-Echinenon und Phoenicoxanthin hergestellt werden. Diese Standards wurden zur Identifikation der Carotinoide in den *Phaffia*-Stämmen verwendet.

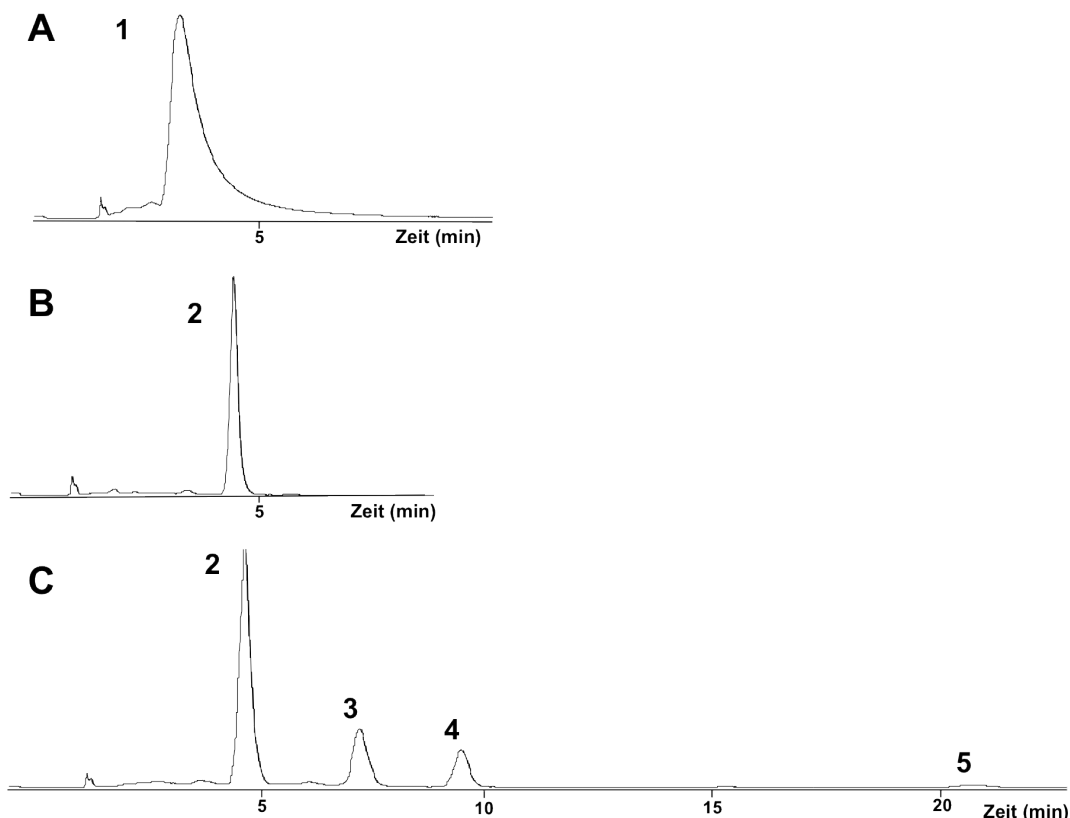


### 3. Ergebnisse

Über eine weitere Transformation des Stammes *dH5α/pACCAR16ΔcrtX* mit *pPQE30bkt* (unveröffentlicht) wird eine Ketolase (*bkt*) aus *Chlamydomonas reinhardtii* eingebracht, welche die notwendigen Ketolierungen an den Ionon-Ringen des  $\beta$ -Carotin vornimmt. Hierdurch entstehen Echinenon (4-Keto- $\beta$ -Carotin) und Canthaxanthin (4,4'-Di-Keto- $\beta$ -Carotin).

Über eine dritte Transformation mit *pBBR1-MCS2crtZ* (unveröffentlicht) wird eine in *E. coli* funktionell aktive Hydroxylase (*crtZ* aus *E. uredoovora*) eingebracht, welche zur Umsetzung der Substrate Echinenon und Canthaxanthin in ihren hydroxylierten Formen 3-OH-Echinenon und Phoenicoxanthin verwendbar ist (Abb. 19).

In Abb. 20 sind die HPLC-Chromatogramme der beschriebenen Standards dargestellt, Abb. 21 zeigt die dazugehörigen Spektren. Die Standards wurden zur Cochromatographie in den HPLC-Analysen für die Analyse der Spektren vergleichend eingesetzt.

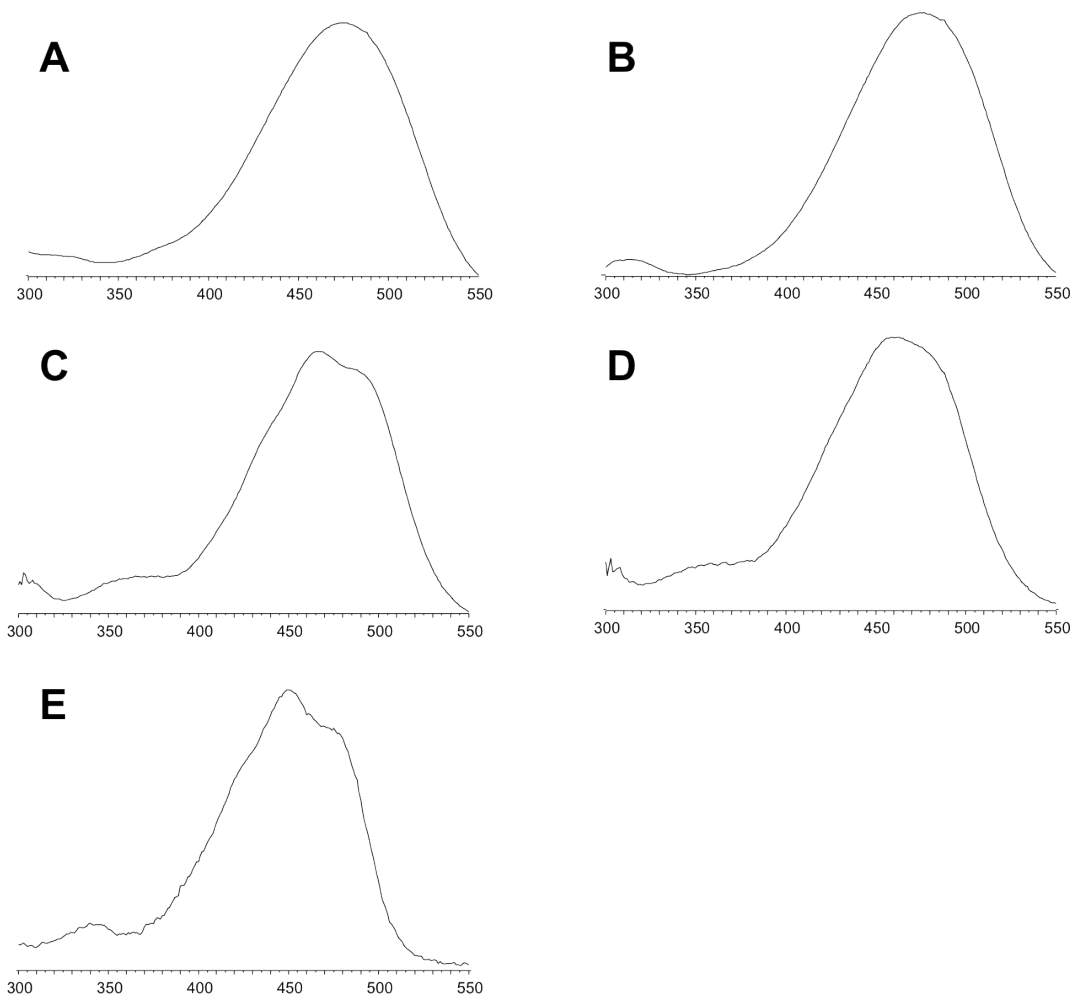


**Abb. 20: Verwendete Standards zur Identifikation und Validierung der gemessenen Carotinoide.**

(**A**) 1; Astaxanthin (Carl Roth), (**B**) 2; Canthaxanthin (Carl Roth), (**C**) 2; Canthaxanthin, 3; 3-OH-Echinenon, 4; Echinenon, 5;  $\beta$ -Carotin. Standard hergestellt über Komplementation *E.coli* *dH5α* + *pACCAR16ΔcrtX* + *pPQE30bkt* + *pBBR1-MCS2crtZ*.

### 3. Ergebnisse

Astaxanthin (Abb. 21 A) weist ein glockenförmiges Spektrum mit einem Absorptionsmaximum von 475 nm auf. Das zweite 4,4'-Di-Keto-Carotinoid, Canthaxanthin, besitzt ebenfalls ein glockenförmiges Absorptionsspektrum mit einem Hauptmaximum bei 472 nm (Abb. 21 B). 3-OH-Echinenon (Abb. 21 C) zeigt ein glockenförmiges Spektrum, dessen Verlauf rechts des Hauptmaximums von 465 nm ein schulterförmiges Nebenmaximum bei 485 nm beschreibt. Die nicht-hydroxylierte Form Echinenon (Abb. 21 D) weist ein Hauptmaximum bei 460 nm und ein davon rechts liegendes Nebenmaximum bei 480 nm auf. Abb. 21 E zeigt das Absorptionsspektrum von  $\beta$ -Carotin. Dieses Carotinoid besitzt ein Hauptmaximum bei 450 nm und zwei Nebenmaxima bei 425 nm und 480 nm.

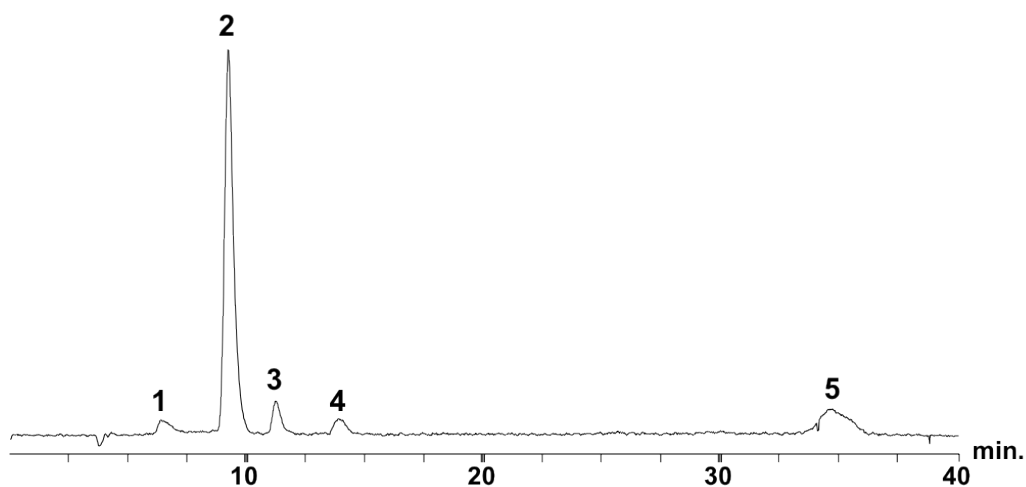


**Abb. 21: Einzelne Spektren der verwendeten Carotinoid-Standards.**

Aufgetragen ist das Spektrum der einzelnen Carotinoid-Standards gegen die Wellenlänge in nm. Die Absorptionsspektren zeigen die Absorptionsmaxima (A) Astaxanthin; bei 475 nm, (B) Canthaxanthin; bei 472 nm, (C) OH-Echinenon; bei 465 nm, (D) Echinenon; bei 460 nm, (E)  $\beta$ -Carotin; bei 425 nm 450 nm 480 nm

#### 3.4 Isolation einer Spezies mit neuartigen Carotinoiden

Abb. 13 auf Seite 57 zeigt eine enorme Unreinheit der cryogenisierten Dauerkultur des Stammes TTH-2. Aus einer durch eine gelbe Pigmentierung auffälligen Kolonie wurde Gesamtcarotinoid isoliert und der Extrakt über HPLC chromatografisch analysiert. Der Stamm enthielt einen Gesamtcarotinoidgehalt von 523,5 µg/gdw. Abb. 22 zeigt das Elutionsprofil des Gesamtcarotinoidextraktes des Isolats TTH-2/3GS. Es konnten insgesamt fünf Elutionsmaxima detektiert werden, welche mit keinem zur Verfügung stehenden Carotinoid-Standard oder nach spektralen Eigenschaften und Retentionszeit auf der Säule einem Carotinoid zugeordnet werden konnte. Es handelt sich um untypische Carotinoide, welche nicht in den Biosyntheseweg von *Phaffia* passen. Mit einem relativen Anteil von 72% am Gesamtcarotinoidgehalt bildete ein Carotinoid mit den Maxima (420 nm) 455 nm (477 nm) das Hauptcarotinoid (Nr. 2). Die Carotinoide 1 (473 nm), 3 (430 nm 453 nm 477 nm) und 4 (427 nm 453 nm 473 nm) besaßen jeweils einen Anteil von maximal knapp sechs Prozent (Tab. 22). Die restlichen 15% des Gesamtcarotinoidgehalts entfielen auf ein Carotinoid (5) mit den Absorptionsmaxima 425 nm 455 nm 485 nm, welches β-Carotin zugeordnet wurde. Das als TTH-2/3GS identifizierte Isolat zeichnete sich neben der gelben Pigmentierung, auch durch für *Phaffia rhodozyma* untypische Kultivierungsbedingungen bei 30°C, sowie einem außerordentlich strengen Geruchs aus. Diese Spezies stellte also eine unbekannte Kontaminante in der Kultur des *Phaffia*-Stammes TTH-2 dar.



**Abb. 22: Chromatogramm der HPLC-Analyse von TTH-2/3GS**

Diese Abbildung zeigt das Elutionsprofil der chromatografischen Analyse des Gesamtcarotinoids von TTH-2/3GS. Die Carotinoide konnten mit folgenden spektralen Eigenschaften dokumentiert werden: (1) 473 nm; (2) 420 nm 455 nm 477 nm; (3) 430 nm 453 nm 477 nm; (4) 427 nm 453 nm 473 nm; (5) 425 nm 455 nm 485 nm.

### 3. Ergebnisse

Tab. 22: Absorptionsspektren der Carotinoide aus TTH-2/3GS.

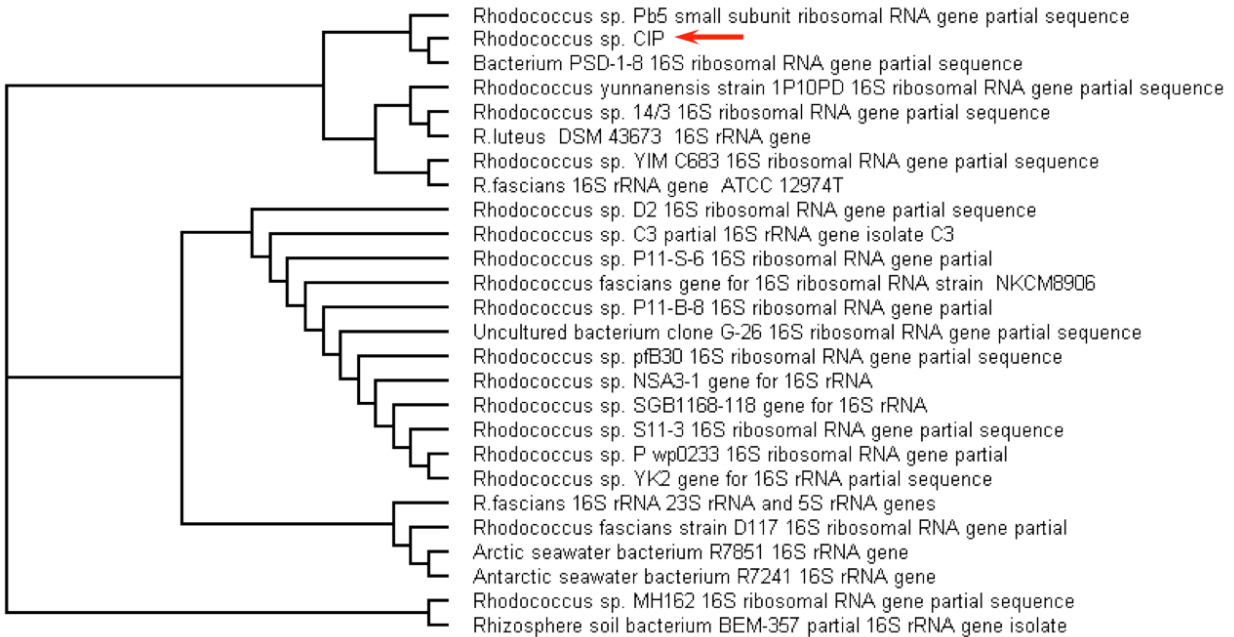
Maxima (nm)	Anteil µg/gdw	Anteil %
Gesamtcarotinoid	523,5	100
473	19	4
420 455 477	375	72
430 453 477	30	6
427 453 473	19	4
425 455 485 (β-Carotin)	78	15

Da es sich bei diesem Isolat um keine *Phaffia*-Spezies handeln konnte, wurde eine Identifizierung des Organismus über Sequenzierung der 16S-rDNA (nach Weisburg et al. 1991) durchgeführt. Hierfür wurde aus TTH-2/3GS genomische DNA isoliert und mit dieser Vorlage eine PCR über die Oligonukletide 16S-for und 16S-rev durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde aufgearbeitet und eine Sequenzierung mit dem Oligonukleotid 16S-for in Auftrag gegeben. Das Resultat der Sequenzierung ergab folgende Nukleotidreihe:

```
TGCTTACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCTTTCGGGGTAC
ACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCC
TGC ACTCTGGGATAAGCTTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGA
TATGACCGCATGCCGCATGGTGTGTGGTGGAAAGATTTATCG
GTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGT
AATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAG
CCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTGAGTGACGGTA
CCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGTCG
```

Auf Basis dieser Sequenzinformation wurde ein Homologie-Vergleich über eine Onlinedatenbank (NCBI blast nr/nt) durchgeführt und mit den Computerprogrammen Clustal X und Treeview ein Alignment, sowie eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Es handelt sich bei diesem Isolat mit der initialen Bezeichnung TTH-2/3GS um eine Spezies der Gattung *Rhodococcus*. Abb. 23 zeigt das Ergebnis der phylogenetischen Analyse, wonach der Stamm in einer Untergruppe zusammen mit *Rhodococcus luteus* und *Rhodococcus fascians* kategorisiert wurde, was eine nahe Verwandtschaft zu diesen Arten impliziert. Dem Isolat wurde die Bezeichnung *Rhodococcus sp. CIP* zugeordnet.

### 3. Ergebnisse



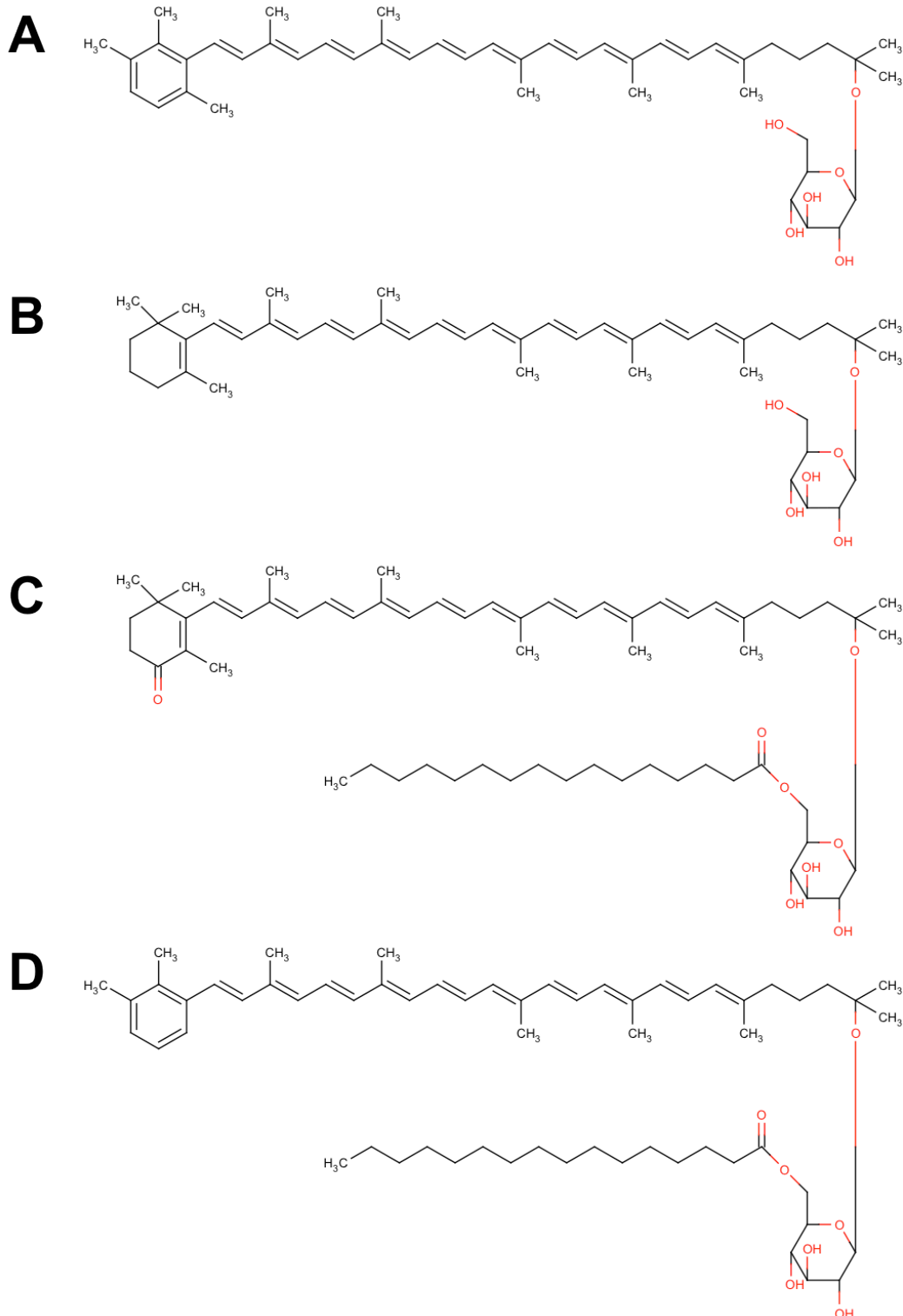
**Abb. 23: Phylogenetische Analyse von *Rhodococcus sp. CIP***

Die Abbildung zeigt die Verwandtschaft von *Rhodococcus sp. CIP* (roter Pfeil) zu anderen Vertretern der Gattung *Rhodococcus* in Form eines phylogenetischen Stammbaums. Die Identifizierung erfolgte über einen Homologie-Vergleich der 16S-rRNA-Sequenzinformation. *Rhodococcus sp. CIP* liegt in einer Untergruppe mit den Arten *Rhodococcus luteus* und *Rhodococcus fascians*, was eine nahe Verwandtschaft impliziert.

Um die Carotinoide zu identifizieren, wurde von diesem Stamm gefriergetrocknetes Material für eine NMR-spektroskopische Analyse im Arbeitskreis Shindo des „Department of Food and Nutrition“ der „Japan Women’s University, Tokyo“ hergestellt. Die Analyse ergab, dass es sich bei diesen Carotinoiden in zwei Fällen um  $\gamma$ -Carotin-Glykoside und in zwei weiteren Fällen um Chlorobacten-Glykoside handelt. Chlorobactene sind aromatische Carotinoide (Moshier und Chapman 1973), welche in *Rhodococcus* von  $\gamma$ -Carotin aus synthetisiert werden (Tao et al. 2006). Bei einem der vier Carotinoide im Stamm *Rhodococcus sp. CIP* handelt es sich mit der Bezeichnung OH-Chlorobactene-Glykosid-Hexadecanoat (IUPAC-Name: 1'-[(6-O-Hexadecanoyl- $\beta$ -D-Glucopyranosyl)oxy]-1',2'-Dihydro- $\phi,\psi$ -Carotin) um ein völlig neuartiges, bislang unbekanntes Carotinoid (Abb. 24 D). Bei den restlichen drei, ebenso seltenen, enthaltenen Carotinoiden handelt es sich um OH-Chlorobactene-Glykosid, OH- $\gamma$ -Carotin-Glykosid und OH-4-Keto- $\gamma$ -Carotin-Glykosid-Hexadecanoat (Osawa et al. 2011). In Abb. 24 sind die Strukturen dieser Carotinoide dargestellt. Diese Carotinoide besitzen ein hohes antioxidatives Potential. In einem Peroxidations-Test-System vermochten diese Carotinoide die Bildung von Superoxide mit ermittelten IC<sub>50</sub>-Werten von 14,6  $\mu$ M (OH-Chlorobacten-Glykosid-Hexadecanoat), 9,9  $\mu$ M (OH- $\gamma$ -Carotin-

### 3. Ergebnisse

Glykosid), 7,3  $\mu\text{M}$  (OH-4-Keto- $\gamma$ -Carotin-Glykosid-Hexadecanoat) und 6,5  $\mu\text{M}$  (OH-Chlorobactene-Glykosid) zu inhibieren (Osawa et al. 2011).



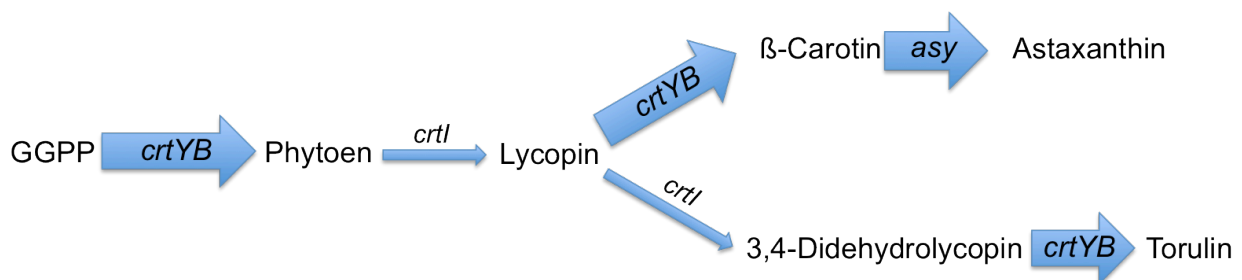
**Abb. 24: Strukturen der Carotinoide in *Rhodococcus* sp. CIP.**

(A) OH-Chlorobactene-Glykosid, (B) OH- $\gamma$ -Carotin-Glykosid, (C) OH-4-Keto- $\gamma$ -Carotin-Glykosid-Hexadecanoat und das neuartige (D) OH-Chlorobactene-Glykosid-Hexadecanoat (1'-[(6-O-Hexadecanoyl- $\beta$ -D-Glucopyranosyl)oxy]-1',2'-Dihydro- $\phi,\psi$ -Carotin). Strukturen nach Osawa et al. 2011.

### 3. Ergebnisse

#### 3.5 Exploratorische Transformationsversuche der Mutanten

Nachdem die mutagenisierten Stämme AXG-13 und AXJ-20 eine stabile Pigmentierung und eine angemessene Wachstumsgeschwindigkeit aufwiesen, folgten erste Versuche zur genetischen Modifikation des Carotinoidbiosynthesewegs. Die Transformationsstrategie (Abb. 25) umfasste zunächst eine Überexpression der Phytoensynthese/ Lycopinzyklase *crtYB*, da die Phytoensynthese im Wildtyp limitierend im Carotinoidbiosyntheseweg ist (Verdoes et al. 2003). Dieses bifunktionelle Enzym katalysiert zum Einen die Kondensation zweier Moleküle Geranylgeranyldiphosphat zu dem ersten Carotinoid Phytoen und zum Anderen die Zyklisierung des Lycopinmoleküls zu  $\beta$ -Carotin (Verdoes et al. 1999). Dies bedeutet, dass durch die Überexpression dieses Gens die Menge an CRTYB und somit der Gesamtcarotinidgehalt mit einer erhöhten Bereitstellung von Metaboliten für die Astaxanthin-Synthase zunimmt (Verdoes et al. 2003). Es soll durch Transformation festgestellt werden, ob diese Limitierung in den Mutanten weiterhin vorhanden ist und ob die Carotinoidsynthese in den Mutanten wie im Wildtyp CBS6938 noch weiter zu steigern ist. Für die Transformation wurde das Plasmid pPR13F verwendet (Verdoes et al. 2003). pPR13F vermittelt neben einer *crtYB*-Expressionskassette, konstitutiv exprimiert durch die Promotor- und Terminatorregion der *P.r.-gpdh* (Verdoes et al. 1997), eine Geneticin- (G418)-Resistenzkassette (ebenfalls unter konstitutiver Expression) zur Selektion potentieller Transformanten.



**Abb. 25: Schematische Transformationsstrategie.**

Die Abbildung zeigt ein vereinfachtes Schema zur Strategie der genetischen Modifikation von AXJ-20. Durch eine Überexpression von *crtYB* soll eine Zunahme des Gesamtcarotinoids und  $\beta$ -Carotin-Derivate bewirkt werden. Zudem soll hierdurch der Carotinoidbiosyntheseweg zugunsten des di-zyklischen Zweiges verschoben werden. In einem weiteren Schritt, d.h. einer zusätzlichen Transformation mit der Astaxanthinsynthase, soll eine Steigerung des Umsatzes der  $\beta$ -Carotin-Derivate zu Astaxanthin bewirken.

Als Akzeptorstamm für die Transformation mit dem Plasmid pPR13F wurde AXJ-20 verwendet, da dieser Stamm nach den Ergebnissen der Evaluationsphase aufgrund des Gesamtcarotinoids und Astaxanthingehalts das größte Potential für eine Erhöhung

### 3. Ergebnisse

der Netto-Astaxanthin-Biosynthese bietet. Für weitere Experimente soll der, aus der genetischen Modifikation mit pPR13F entstandene, Stamm weiter mit der Astaxanthin-Synthese transformiert werden, um einer Limitierung des Enzyms zu begegnen, bzw. die vorhandenen Intermediate weiter zu Astaxanthin zu metabolisieren. Die Transformationsstrategie ist Abb. 25 zu entnehmen. Eine Überexpression von *crtYB* führt zu einer Zunahme des Gesamtcarotinoidgehaltes, einer Verstärkung des Carotinoidbiosynthesewegs hin zum di-zyklischen Zweig, sowie die Akkumulation von Intermediaten (Verdoes et al. 2003).

Aus der Transformation konnte der Stamm AXJ-20/*crtYB* isoliert werden (Gassel et al. 2013). Die Transformante besitzt einen um 30 % erhöhten Gesamtcarotinoid- ( $4316 \pm 368 \mu\text{g/gdw}$ ) und einen um 27 % erhöhten Astaxanthingehalt ( $2199 \pm 200 \mu\text{g/gdw}$ ) gegenüber dem Akzeptorstamm, der Mutante AXJ-20. Der prozentuale Astaxanthinanteil am Gesamtcarotinoid fiel hingegen von 53 % (AXJ-20) auf 51 % (AXJ-20/*crtYB*). Der relativ niedrige Umsatz zu Astaxanthin deutet auf eine Limitierung der Astaxanthin-Synthase ASY hin.

**Tab. 23: Zusammenfassung der Carotinoide in der Mutante AXJ-20 und der Transformante AXJ-20/*crtYB*.**

	AXJ-20	%	AXJ-20/ <i>crtYB</i>	%
TC	$3035 \pm 145$	100	$4316 \pm 368$	100
Astaxanthin	$1609 \pm 103$	53	$2199 \pm 200$	51
Canthaxanthin	$497 \pm 60$	16	$238 \pm 131$	5
OH-Echinenon	$419 \pm 24$	14	$517 \pm 81$	12
450K	n.d.		$489 \pm 142$	11
Echinenon	$320 \pm 30$	11	$496 \pm 44$	12
$\beta$ -Carotin	$100 \pm 51$	3	$353 \pm 102$	8

Mit prozentualen Anteilen um 12 % besitzen AXJ-20 und AXJ-20/*crtYB* annähernd gleiche Mengen OH-Echinenon und Echinenon.  $\beta$ -Carotin als direktes Produkt der Lycopinzyklase-Aktivität von *CRTYB* stieg um 5 % auf 8 % des Gesamtcarotinoidgehalts. Bemerkenswert ist die Reduzierung des Gehalts an Canthaxanthin von 16 % (AXJ-20) auf 5 % in der Transformante AXJ-20/*crtYB*. Gleichzeitig wurde in der Transformante ein unbekanntes Keto-Carotinoid mit einem



### 3. Ergebnisse

Absorptionsmaximum von 450 nm synthetisiert, welches zu 11 % des Gesamtcarotinoidgehaltes vorhanden ist (Tab. 23).

Um akkumulierende Intermediate weiter zu metabolisieren und die Carotinoidbiosynthese zur Astaxanthinsynthese hin zu verschieben, sollen zusätzliche Kopien der Astaxanthin-Synthase eingebracht werden. AXJ-20/crtYB wurde hierfür mit dem Plasmid pPR2TNHasy transformiert. Dieses 10355 bp große Plasmid trägt die Astaxanthin-Synthase *asy* unter konstitutiver Kontrolle des GPDH-Promotors und des korrespondierenden GPDH-Terminators. Der Selektionsdruck wird durch eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin (Resistenzgen *hph-1*) gewährleistet. Aus diesem Experiment konnte die Transformante AXJ-20/crtYB/*asy* isoliert werden.

Dieser neue Stamm weist im Gegensatz zum Akzeptorstamm AXJ-20/crtYB neben einer weiteren Steigerung des Gesamtcarotinoidgehaltes um 18 % eine deutliche Reduzierung von Intermediaten in der Zusammensetzung des Gesamtcarotinoidinhaltes auf (Tab. 24).

**Tab. 24: Zusammenfassung der Carotinoide in der Transformante AXJ-20/crtYB/*asy*.**

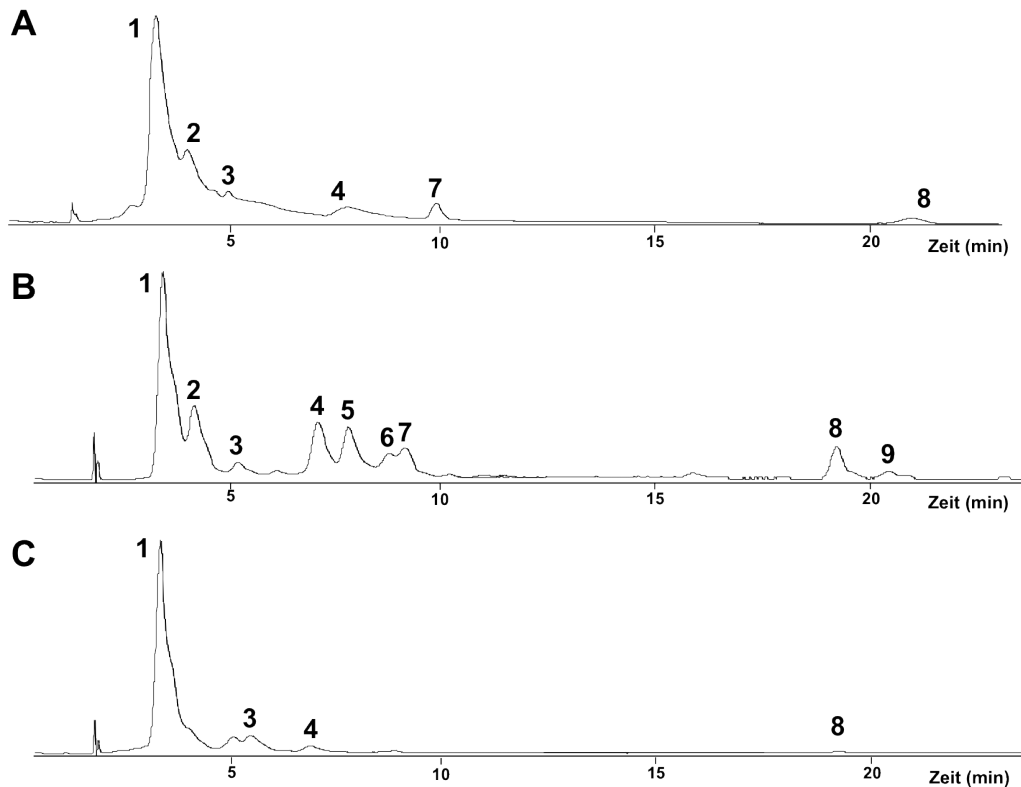
	AXJ-20/crtYB/ <i>asy</i>	%
TC	5218 ± 321	100
Astaxanthin	4691 ± 305	90
Canthaxanthin	378 ± 15	7
OH-Echinenon	36 ± 13	1
450K	n.d.	
Echinenon	n.d.	
β-Carotin	n.d.	

Die absolute Menge an Astaxanthin konnte um 41 % gegenüber der *crtYB*-Transformante gesteigert werden (2199 ± 200 µg/gdw auf 4691 ± 305 µg/gdw). Dies liegt vor allem am verstärkten Umsatz von Substraten der Astaxanthin-Synthase, wodurch der prozentuale Anteil an Astaxanthin in der Transformante von 90 % des Gesamtcarotinoids gegenüber 51 % im Akzeptorstamm AXJ-20/crtYB (siehe Tab. 23) ansteigt. Das Ergebnis dieser mehrfachen genetischen Modifikation beweist zum

### 3. Ergebnisse

Einen, dass die Mutante AXJ-20 grundsätzlich transformierbar ist und zum Anderen, dass sich die Carotinoidbiosynthese im Allgemeinen und letztlich auch die Astaxanthinbiosynthese deutlich durch genetische Modifikation steigern lässt. In Abb. 26 sind die Chromatogramme der HPLC-Analysen der Stämme AXJ-20, AXJ-20/crtYB und AXJ-20/crtYB/asy vergleichend dargestellt. Abb. 26 A zeigt im Elutionsprofil eines Extrakts von AXJ-20 sechs detektierbare Elutionsmaxima, welche durch den Vergleich mit Carotinoidstandards (siehe Abschnitt 3.3 S. 64) den Carotinoiden Astaxanthin, cis-Astaxanthin, Canthaxanthin, OH-Echinenon, Echinenon und  $\beta$ -Carotin zugeordnet werden können. Die Gesamtmenge an Astaxanthin liegt bei 53% des Gesamtcarotinoidgehaltes. Die Transformante AXJ-20/crtYB weist im Gegensatz zum Akzeptorstamm AXJ-20 eine veränderte Zusammensetzung des Gesamtcarotinoidgehaltes auf. Neben dem zu 51 % enthaltenen Astaxanthin verteilen sich die übrigen knapp 50 % auf sieben weitere Carotinoide. Diese Signale konnten zum Teil Carotinoiden zugeordnet werden, wobei zwei Keto-Carotinoide mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm unbekannt sind. Eines dieser unbekanntes Keto-Carotinoide besitzt einen Anteil von über 11 % am Gesamtcarotinoidgehalt. Die restlichen Carotinoide konnten als Canthaxanthin, OH-Echinenon, Echinenon und  $\beta$ -Carotin identifiziert werden. Eine weitere Transformation des Stamms AXJ-20/crtYB mit dem Plasmid pPR2TNHasy, welches weitere Kopien der Astaxanthinsynthese unter konstitutiver Kontrolle ins Genom integrierte, wies eine Reduzierung der Intermediate und eine deutliche Verschiebung der Carotinoidbiosynthese in Richtung des Endproduktes des di-zyklischen Synthesewegs, dem Astaxanthin, auf.  $\beta$ -Carotin und Echinenon konnten in dieser Transformante nicht mehr detektiert werden (Abb. 26), während auch die unbekanntes 450 nm-Keto-Carotinoide aus der Carotinoidzusammensetzung verschwanden.

### 3. Ergebnisse

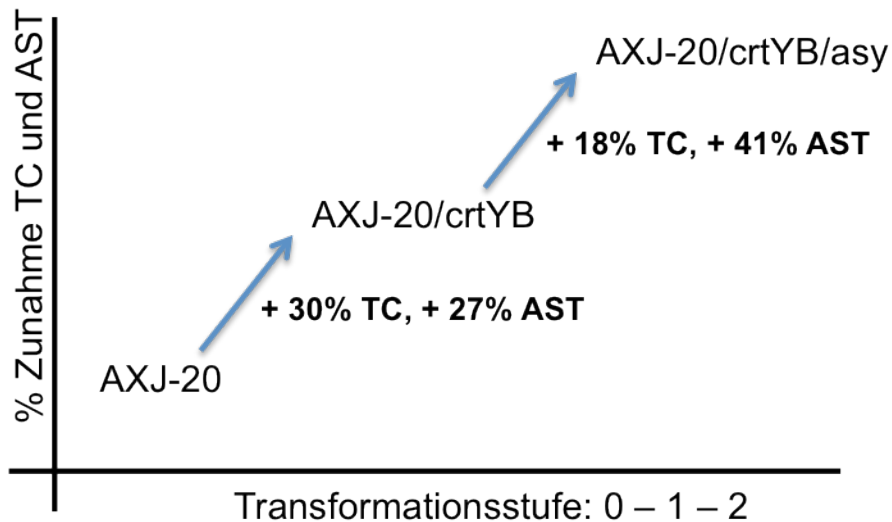


**Abb. 26: Chromatogramme der HPLC-Analysen der AXJ-20 *crtYB* und *asy* Transformanten.**

Abgebildet sind die HPLC-Elutionsprofile der Mutanten AXJ-20 (A), AXJ-20/*crtYB* (B) und AXJ-20/*crtYB/asy* (C). Nach Transformation von AXJ-20 mit pPR13F (*crtYB*) ist, neben einer Erhöhung des Gesamtcarotinoids, eine Zunahme an Intermediaten zu beobachten. Nach Transformation des Stammes AXJ-20/*crtYB* mit pPR2TNH<sub>asy</sub> konnte die Carotinoidbiosynthese wieder zugunsten von Astaxanthin korrigiert werden, wobei der Stamm AXJ-20/*crtYB/asy* kaum Intermediate aufweist. Die Carotinoide wurden wie folgt zugeordnet: (1) Astaxanthin, (2) cis-Astaxanthin, (3) Canthaxanthin, (4) OH-Echinenon, (5) 450K, (6) 450K, (7) Echinenon, (8)  $\beta$ -Carotin, (9) cis- $\beta$ -Carotin.

In Abb. 27 sind die Ergebnisse der Transformationsversuche graphisch dargestellt (A). Abb. 27 B zeigt einen Überblick über die prozentualen Steigerung des Gesamtcarotinoidgehalts (TC) und Astaxanthinanteils (AST) über die Stufen der Transformation. So konnte der Gesamtcarotinoidanteil von AXJ-20 zu AXJ-20/*crtYB* um 30 %, der Astaxanthinanteil um 27 % gesteigert werden. In der nächsten Transformationsstufe von AXJ-20/*crtYB* zu AXJ-20/*crtYB/asy* konnte eine weitere, moderate Steigerung des Gesamtcarotinoidgehaltes um 18 % erzielt werden. Der Astaxanthinanteil stieg hierbei um 41 % gegenüber des Akzeptorstamms, was auf eine gesteigerte Anzahl der Astaxanthin-Synthase durch die Transformation hindeutet.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 27: Steigerung des Gesamtcarotinoid- und Astaxanthingehalts.**

Die Abbildung zeigt die Zunahmen von Gesamtcarotinoid (**TC**) und der Astaxanthinmenge (**AST**) von AXJ-20, über die Transformante AXJ-20/crtYB bis AXJ-20/crtYB/asy. Der Gesamtcarotinoidgehalt wurde in Transformationsstufe 1 durch *crtYB*-Überexpression um 30 %, die Astaxanthinmenge um 43 % gesteigert. Transformationsstufe 2 zeigt eine weitere Steigerung des Gesamtcarotinoids um 18 % und eine Steigerung der Astaxanthinmenge um 41 %.

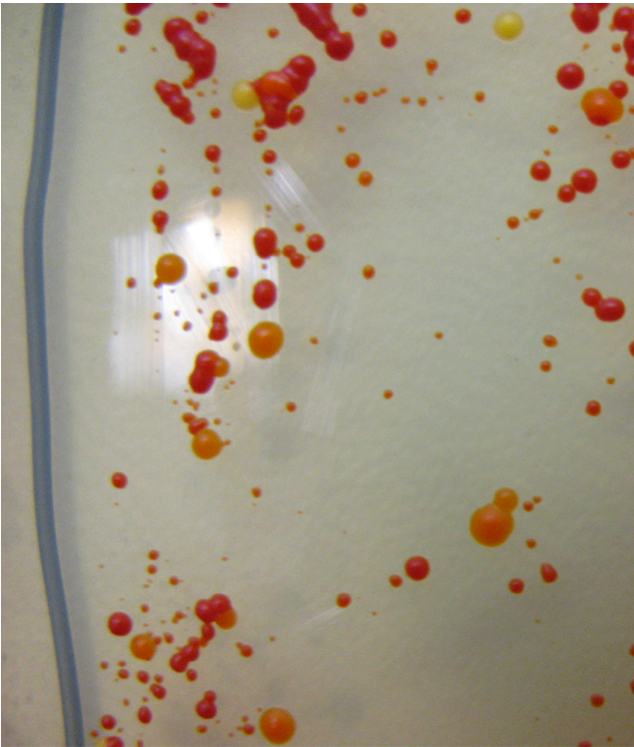
Diese hier exploratorisch durchgeführten Transformationen zeigten, dass weitere Kopien von *crtYB* und *asy* die Astaxanthin-Synthese steigern können. Dabei entstehende Limitierungen können gezielt behoben werden. Die Ergebnisse bilden die Grundlage für die Herstellung der endgültigen Transformanten.

### 3. Ergebnisse

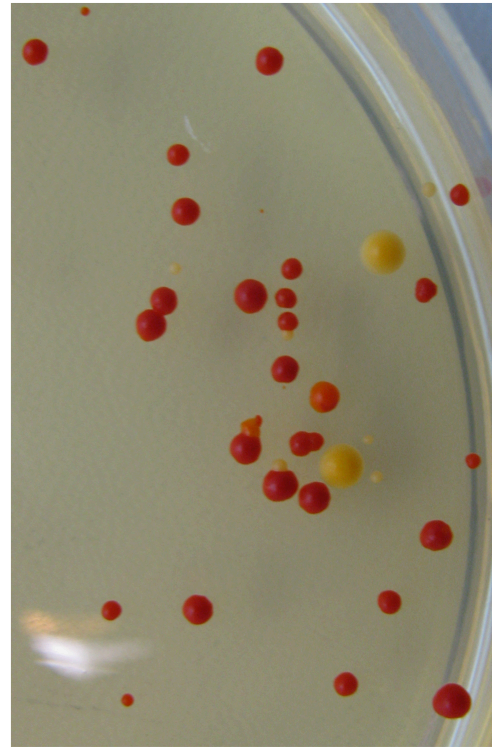
#### 3.6 Untersuchung zur Stabilität der Transformanten

Die genetische Modifikation der Stämme AXJ-20/crtYB und AXJ-20/crtYB/asy war nach den Erkenntnissen der Carotinoid-Analysen erfolgreich. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Stämme auf festem YPD-Medium wieder eine deutlich inhomogene Pigmentierung zeigten, welche von gelb, über orange bis zu rot reichten (Abb. 28), obwohl der Akzeptorstamm AXJ-20 zuvor über viele Passagen auf festem YPD-Medium zu einer homogenen Farbigkeit der Kultur selektiert wurde.

**A**



**B**

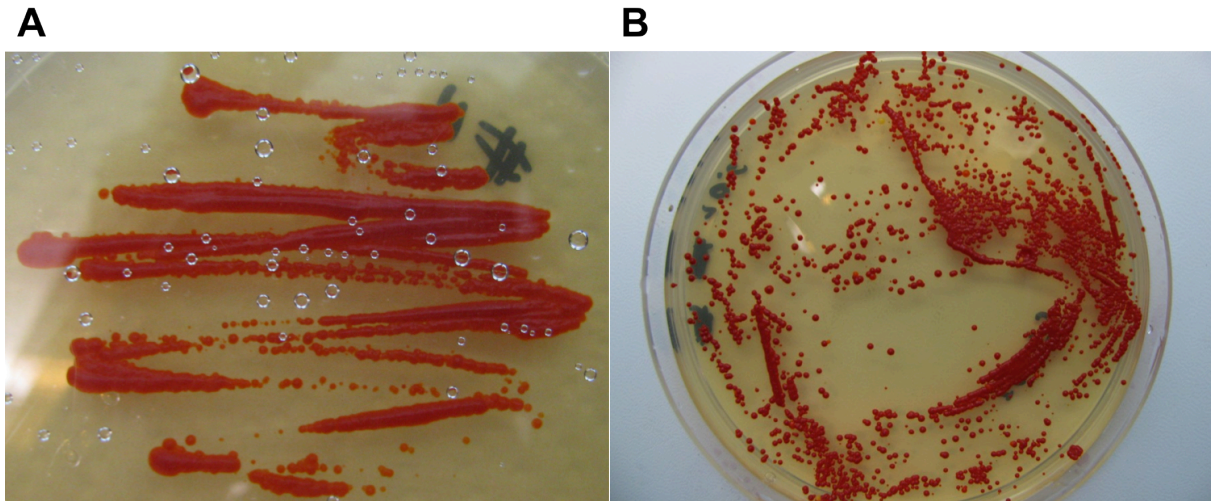


**Abb. 28: Transformanten auf festem YPD-Medium.**

Zu sehen sind Fotografien einzelner Kolonien der Stämme AXJ-20/crtYB (**A**) und AXJ-20/crtYB/asy (**B**). Deutlich sichtbar in beiden Stämmen ist eine inhomogene Pigmentierung, welche von gelb, über orange bis rot reicht, obwohl der Ursprungstamm AXJ-20 zuvor, auf homogene Farbigkeit der Kultur selektiert wurde.

Um eine stabile Carotinoidzusammensetzung der Stämme zu erhalten, war es notwendig, die Stämme AXJ-20/crtYB und AXJ-20/crtYB/asy wiederum durch Passagieren einzelner, roter Kolonien über mindestens fünf Generationen (8-14 Tage auf festem YPD) auf Homogenität der Pigmentierung hin zu selektieren (Abb. 29).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 29: Auf Pigmentierung selektierte Stämme AXJ-20/crtYB und AXJ-20/crtYB/asy.**

Auf diesen beiden Fotografien sind die Stämme AXJ-20/crtYB (**A**) und AXJ-20/crtYB/asy (**B**) abgebildet. Die Stämme zeigen nach qualitativen Kriterien eine nahezu homogene Pigmentierung nach mindestens fünf Passagen der Selektion nach qualitativen Kriterien.

Es bleibt nun die Frage, ob die inhomogene Pigmentierung eine Folge aus der starken, chemischen Mutagenisierung ist und somit die Instabilität genetisch zufällig begründet ist, oder ob die Transformation von *Phaffia* prinzipiell nicht stabil ist. Um letzteres zu untersuchen, wurden mit der *Phaffia*-Mutante PR1-104 als Teststamm Transformationen durchgeführt.

#### **3.6.1 PR1-104 als Testsystem für Transformationsstabilität**

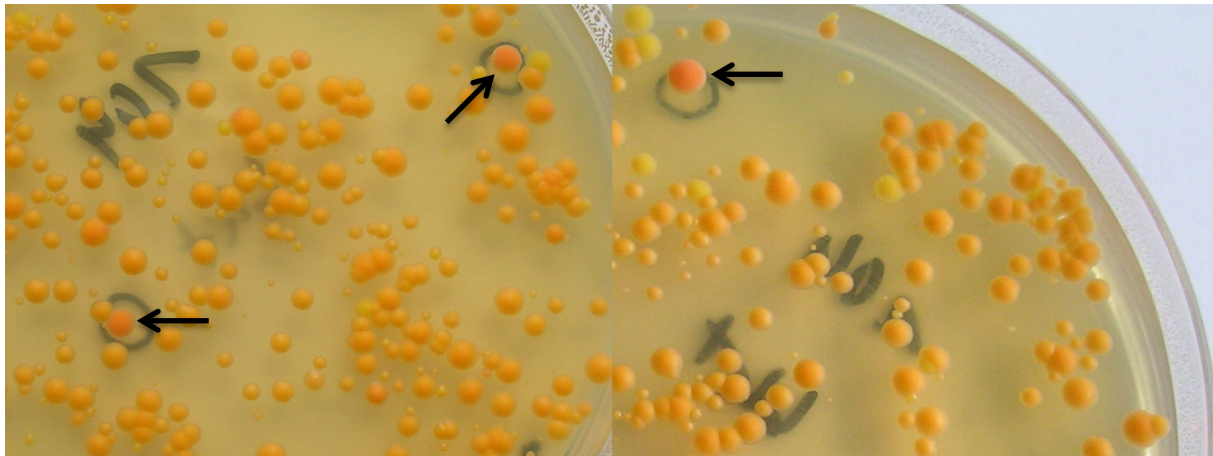
Der *Phaffia*-Stamm PR1-104 ist eine über chemische Mutagenese hergestellte Mutante auf Basis des Wildtyps CBS6938, welcher sich durch eine inaktivierte Astaxanthin-Synthase auszeichnet (Girard et al. 1994). PR1-104 akkumuliert  $\beta$ -Carotin als Hauptcarotinoid, da dieses nicht mehr von der Astaxanthin-Synthase zu Astaxanthin umgesetzt werden kann. Der Stamm zeigt eine homogene, stabile, gelbe Pigmentierung. Aufgrund der Charakteristik als  $\beta$ -Carotin-Akkumulierer, eignet sich der Stamm sehr gut für Komplementationsexperimente. Die resultierenden, funktionellen Transformanten sind durch eine andersfarbige Pigmentierung leicht erkennbar, und dadurch deren Stabilität einfach weiterzuverfolgen. PR1-104 wurde zur Untersuchung der Pigmentstabilität mit dem Plasmid pPRcDNA1bkt830 (Ojima et al. 2006) transformiert. Dieses Plasmid trägt, neben einer G418- Resistenzkassette zur Selektion, eine Ketolase (*bkt*, Misawa et al. 1995) aus *Haematococcus pluvialis*. Durch

### 3. Ergebnisse

die Überexpression der  $\beta$ -Carotin-Ketolase *bkt* in PR1-104 soll herausgefunden werden, ob fremde Gene in *Phaffia* exprimiert werden können und die Transformation stabil ist. Um die Stabilität der integrierten Expressionskassetten von *Phaffia*-eigenen Genen zu untersuchen, wurde PR1-104 mit dem Plasmid pPR2TNoasy (unveröffentlicht) transformiert, welches die Astaxanthinsynthese *asy* in Überexpression, sowie einer Nourseothricinresistenzkassette zur Selektion, trägt.

Beide Gene stehen unter konstitutiver Kontrolle durch die aus den bisher vorgestellten Plasmiden bekannte *Phaffia*-eigene GPDH-Promotor- und Terminatorregion. Durch die Ketolase BKT wird  $\beta$ -Carotin über Echinenon zu Canthaxanthin an beiden Ionon-Ringen an Position 4 und 4' ketoliert (Breitenbach et al. 1996). Die Astaxanthinsynthese ASY metabolisiert  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin.

Aus der Transformation mit pPRcDNA1bkt830 wurden drei Kolonien isoliert, die eine deutliche Rotfärbung gegenüber den übrigen Kolonien auf den Transformationsplatten (Abb. 30) aufwiesen.



**Abb. 30: Platten nach Transformation mit PR1-104/bkt.**

Auf diesen Fotografien sind die drei isolierten Transformanten PR1-104/bkt#1-#3 (Pfeile), aus der Transformation von PR1-104 mit pPRcDNA1bkt830, sichtbar. Sie unterscheiden sich visuell deutlich von den gelben falsch positiven Kolonien. Die rote Färbung entsteht durch die Synthese eines ketolierten  $\beta$ -Carotin-Derivats. Es konnten insgesamt drei rote Kolonien isoliert werden.

### 3. Ergebnisse

Diese Transformanten wurden auf frischem YPD-Agar ausgestrichen. Die Anzucht zeigte nach sieben Tagen Inkubation eine deutlich inhomogene Pigmentierung (nicht gezeigt). Um einen Eindruck der Stabilität und Reproduzierbarkeit dieser Inhomogenität zu erhalten, wurde eine der Transformanten (qualitativ nach Rotfärbung ausgewählt) so lange über YPD-Agar-Medium, mit und ohne Antibiotika, passagiert, bis eine homogene Pigmentierung sichtbar war. In Tab. 25 ist das Ergebnis der Auszählungen der Passagierung von PR1-104/bkt#2 zusammengefasst.

**Tab. 25: PR1-104/bkt#2 Optimierung über fünf Generationen.**

Die Tabelle dokumentiert das Passagieren einer roten Einzelkolonie des Stammes PR1-104/bkt#2 über fünf Generation auf festem YPD-Medium mit und ohne selektive Bedingungen. Die Anzahl der farbigen Kolonien sind (inklusive deren prozentualen Anteil an der Gesamtkolonienzahl in Klammern) der Generationenzahl zugeordnet.

Generation	0 µg/ml G418			200 µg/ml G418		
	Gelb	Orange	Pink	Gelb	Orange	Pink
1	228 (55)	101 (24)	87 (21)	40 (17)	79 (33)	118 (50)
2	80 (49)	48 (29)	37 (22)	88 (19)	119 (26)	254 (55)
3	76 (38)	51 (25)	75 (37)	39 (27)	13 (9)	93 (64)
4	182 (57)	0 (0)	139 (43)	16 (16)	0	85 (84)
5	0	6 (1)	407 (99)	0	0	339 (100)

Es ist festzustellen, dass die Pigmentierung des Stammes PR1-104/bkt#2 nach fünf Passagen der jeweils stärksten rot pigmentierten Kolonie als homogen bewertet werden kann. Hierbei zeigte die Anzucht unter selektiven Bedingungen eine schnellere Stabilität als die unter nicht-selektiven Bedingungen. Bei nicht-selektiver Kultivierung lag der Anteil roter Kolonien zu Beginn bei 21 %, 24 % wiesen eine orange und 55 % eine gelbe Pigmentierung auf. Unter Selektionsdruck konnten in der ersten Generation hingegen schon 50 % rote Kolonien, neben 33 % orangenen und 17 % gelben Kolonien, gezählt werden. Über die weiteren Passagen verschob sich der Anteil allmählich zugunsten der rot-selektierten Kolonien.

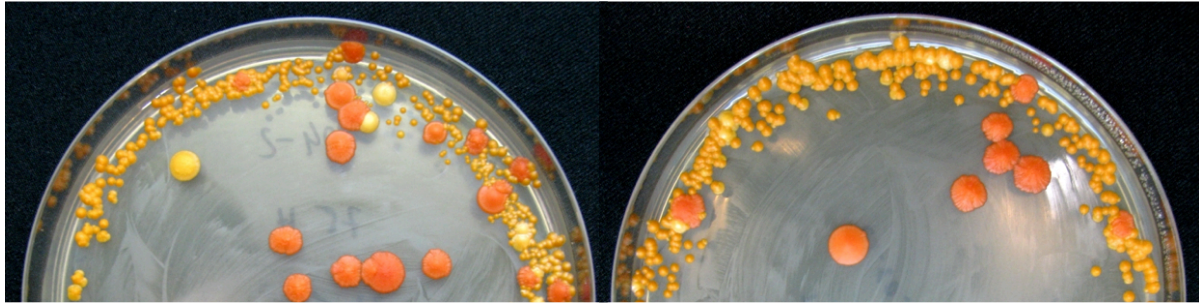
Das Ergebnis impliziert eine generelle Instabilität der Transformation von *Phaffia rhodozyma* mit Plasmiden über homologe Rekombinationsereignisse. Mit Hinblick auf die chemischen Mutanten AXG-13, AXJ-20, sowie deren Transformanten AXJ-20/crtYB und AXJ-20/crtYB/asy soll an dieser Stelle festgehalten werden, dass in diesen Fällen vermutlich zwei dezidierte Ereignisse für die genetische Instabilität



### 3. Ergebnisse

verantwortlich sind. Einerseits scheint die chemische Mutagenisierung selbst einen Einfluss auf die genetische Konfiguration zu haben, zum Anderen ist die genetische Modifikation als solche ebenfalls nicht von Beginn an stabil.

PR1-104/bkt#2 erwies sich nach den Passagierungen als stabil auf festem, sowie auch in flüssigem Medium.



**Abb. 31: PR1-104/asy auf Platten nach Transformation mit pPR2TNoasy.**

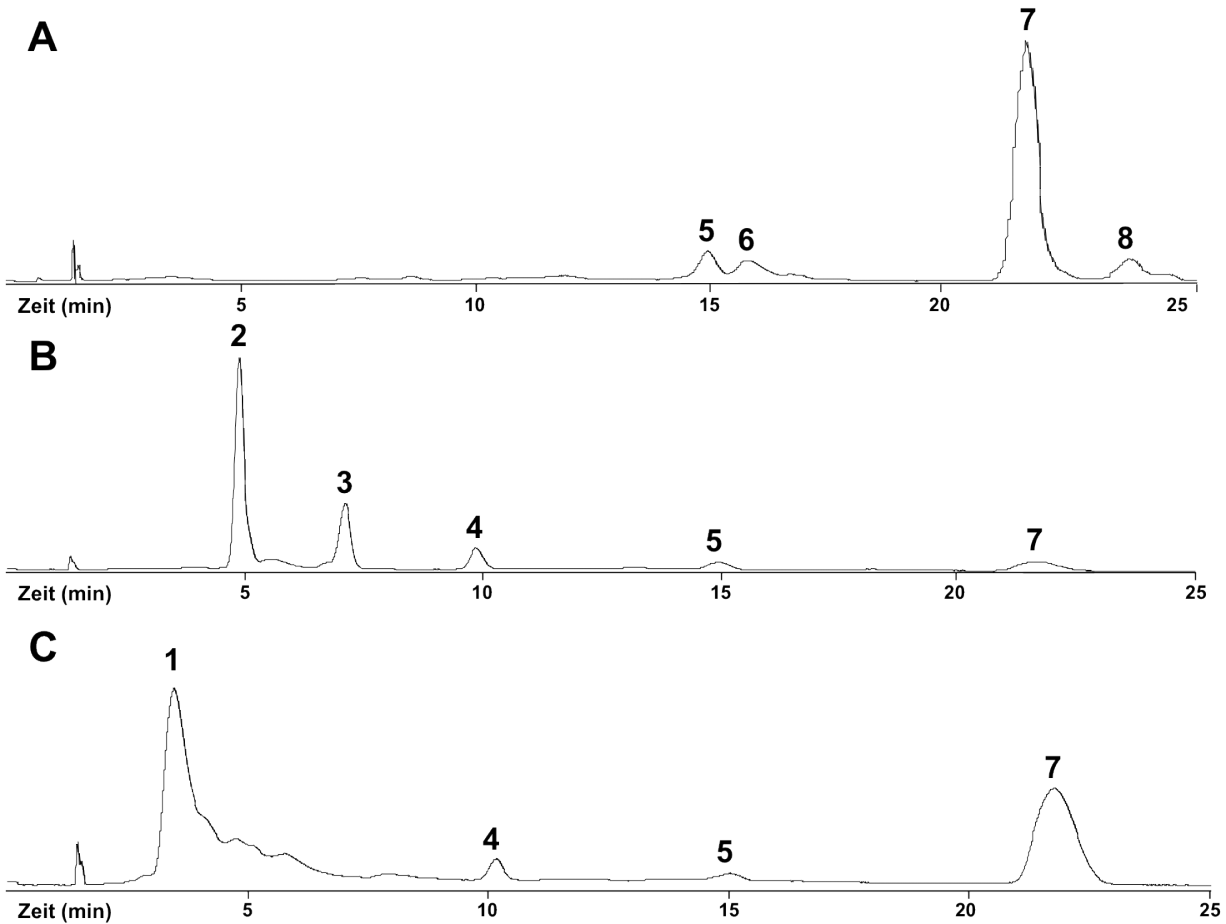
Die Fotografien zeigen einen Ausschnitt der Transformationsplatten mit den neuen Stämmen PR1-104/asy. Im Vergleich zum gelb pigmentierten Hintergrund sind die Transformanten deutlich rot pigmentiert. Es wurde die am stärksten rot pigmentierte Kolonie isoliert, kultiviert und analysiert.

Aus der Transformation von PR1-104 mit pPR2TNoasy wurde der Stamm PR1-104/asy isoliert. Bereits auf den Transformationsplatten ist deutlich zu sehen, dass die Astaxanthinsynthese in den rot pigmentierten Kolonien aktiv sein muss (Abb. 31). Der Stamm PR1-104/asy wurde wie PR1-104/bkt behandelt und durch Passagierungen von fehlpigmentierten Kolonien gereinigt.

Zur Untersuchung der Carotinoidzusammensetzung wurden die Stämme PR1-104/bkt und PR1-104/asy in Flüssigmedium (GSM) kultiviert. In Abb. 32 sind die Chromatogramme der HPLC-Analysen im Vergleich zum Akzeptorstamm PR1-104 (Abb. 32 A) dargestellt. Der rote Phänotyp der Transformanten konnte über die Carotinoidanalyse bestätigt werden. PR1-104 synthetisiert als Hauptcarotinoid  $\beta$ -Carotin (Abb. 32 A) mit einem Anteil von 80,3 % des Gesamtcarotinidgehalts. Es konnten keine ketolierten Moleküle detektiert werden. Lediglich in sehr geringem Maße konnte Torulin (8 %) als Produkt des mono-zyklischen Carotinoidbiosyntheseweigs und ein nicht identifiziertes Carotinoid (8,9 %) neben dem Hauptcarotinoid  $\beta$ -Carotin nachgewiesen werden. Abb. 32 B zeigt das Elutionsprofil der HPLC-Analyse von PR1-104/bkt#2. Die Carotinoidbiosynthese wurde deutlich in Richtung Canthaxanthin (58,8 % Anteil am Gesamtcarotinoid) erweitert,

### 3. Ergebnisse

was die erwartete Aktivität der transformierten Ketolase *bkt* zeigt.  $\beta$ -Carotin kann nur noch mit einem Anteil von 8,6 % des Gesamtcarotinoidgehaltes nachgewiesen werden. Torulin konnte in PR1-104/*bkt*#2 nicht mehr detektiert werden, die restlichen Carotinoide bestanden aus dem einfach ketolierten  $\beta$ -Carotin Echinenon (7,2 %) und Keto-Torulin (21,3 %), sowie hydroxylierten  $\beta$ -Carotin (4,1 %) mit den Absorptionsmaxima (425 nm) 455 nm (485 nm).



**Abb. 32: HPLC-Chromatogramme von PR1-104 und verschiedener Transformanten.**

Durch die Verwendung des *Phaffia*-Stammes PR1-104 (Girard et al. 1994) als Testsystem für verschiedene genetische Modifikationen, konnte die Aktivität und Stabilität von heterologen Genen in Überexpression in *Phaffia* untersucht werden. Gezeigt sind hier die HPLC-Elutionsprofile von (A) PR1-104, (B) PR1-104/*bkt*#2 und (C) PR1-104/*asy*. Während PR1-104 hauptsächlich  $\beta$ -Carotin (7) akkumuliert, wird durch das Einbringen einer Ketolase im Stamm PR1-104/*bkt*#2 Canthaxanthin (2) als Hauptcarotinoid synthetisiert. Nach Transformation mit pPR2TNoasy wurde in PR1-104/*asy* (C) Astaxanthin (1) als Hälfte des Gesamtcarotinoids hergestellt. Die Elutionsmaxima wurden folgenden Carotinoiden zugeordnet: (1) Astaxanthin, (2) Canthaxanthin, (3) Keto-Torulin, (4) Echinenon, (5) (425) 455 (485), (6) Torulin, (7)  $\beta$ -Carotin

### 3. Ergebnisse

Im Stamm PR1-104/asy (Abb. 32 C) wurden 50 % des Gesamtcarotinoids zu Astaxanthin durch die transformierte Astaxanthinsynthese umgesetzt.

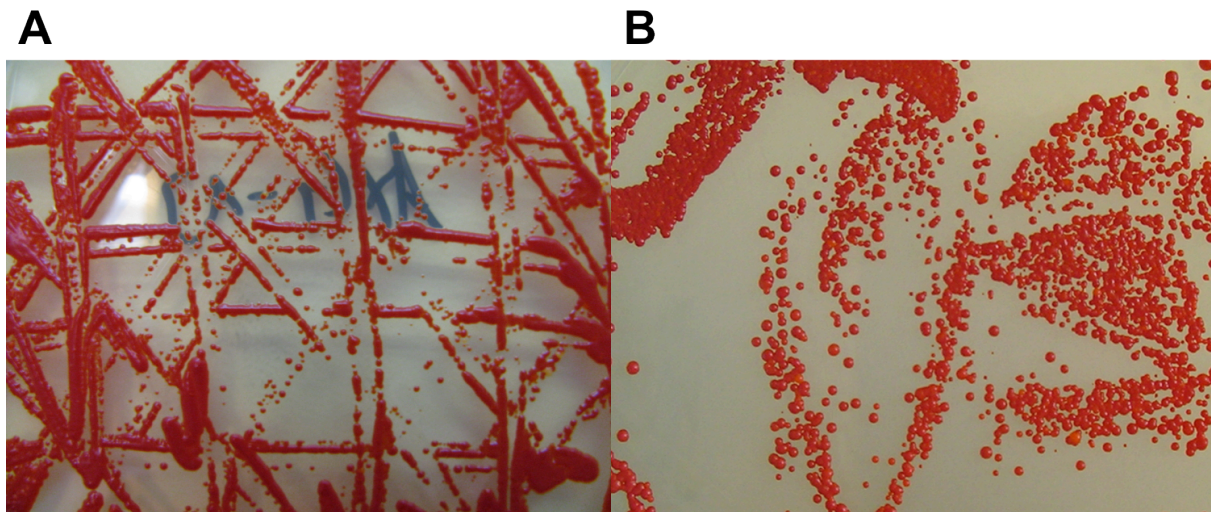
Nach dieser Evaluationsphase bleibt für die nachfolgenden Transformationen zur Herstellung eines Astaxanthin-Hochproduzenten festzuhalten, dass eine sorgfältige Optimierung der zu bearbeitenden Stämme bezüglich der Stabilität ihrer Pigmentierung durch mehrfaches Passagieren der Kultur zu jedem Zeitpunkt erforderlich ist.

### 3. Ergebnisse

#### 3.7 Herstellung eines Astaxanthin-Hochproduzierenden *Phaffia*-Stamms

##### 3.7.1 Charakterisierung neuer Isolate von AXG-13 und AXJ-20

Aufgrund der Anfangsprobleme mit der Pigmentinstabilität der Ausgangsmutanten, wurden für die weitere Bearbeitung neue Isolate der Stämme AXJ-20 und AXG-13 wie in Abschnitt 3.1 beschrieben von „DSM Nutritional Products“ hergestellt, mit denen die weiteren Arbeiten durchgeführt wurden. Diese Stämme zeichneten sich auf festem YPD-Medium als homogen rot pigmentiert aus (Abb. 33).



**Abb. 33: Neue Isolate von AXG-13 und AXJ-20.**

Die Fotografien zeigen die für die weiteren genetischen Modifikationen neu bereitgestellten Isolate der Stämme AXG-13 (A) und AXJ-20 (B). Die Farbigkeit der Kulturen ist homogen rot.

Für die Analyse der Carotinoidbiosynthese der neuen Stämme AXG-13 und AXJ-20 wurden Carotinoidextrakte hergestellt und der Carotinoidgehalt sowie die Carotinoidzusammensetzung über HPLC bestimmt. Demnach zeigte der Stamm AXJ-20 aus der zweiten Bereitstellung im Schnitt einen deutlich höheren Gesamtcarotinoidgehalt mit  $4141 \pm 210 \mu\text{g/gdw}$ . Der Astaxanthingehalt lag bei der neuen Generation ebenso höher ( $2439 \pm 197 \mu\text{g/gdw}$ ) als in der ersten Generation. Der Stamm AXG-13 zeigt keine Unterschiede in Hinblick auf den Gesamtcarotinoidgehalt. Es konnte ein Carotinoidgehalt von  $3008 \pm 66 \mu\text{g/gdw}$  in der zweiten Generation festgestellt werden. Die Astaxanthinmenge stieg hingegen auf  $1691 \pm 236 \mu\text{g/gdw}$  in der zweiten Bereitstellung.

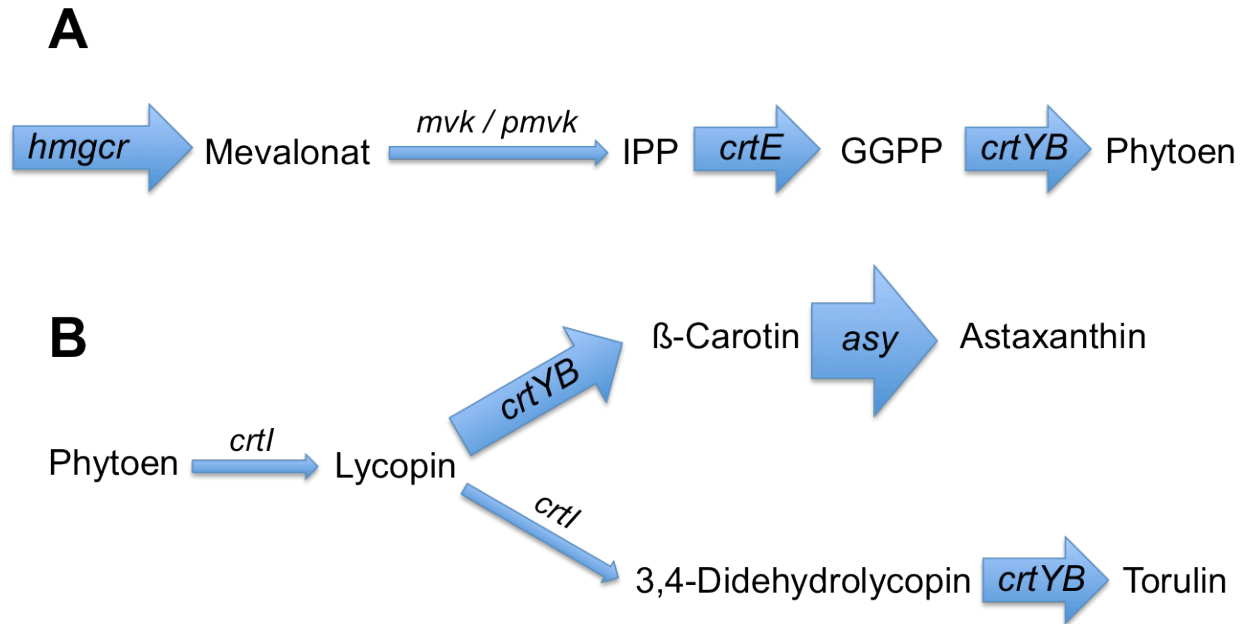
### 3. Ergebnisse

#### 3.7.2 Strategie der genetischen Modifikation

Nach den Ergebnissen der vorbereitenden Experimenten kann festgehalten werden, dass eine Überexpression der Phytoensynthase/ Lycopinzyklase *crtYB* und darauf folgend der Astaxanthin-Synthase *asy* in AXJ-20 zu einer deutlichen Erhöhung des Gesamtcarotinoids bei zusätzlicher Reduzierung verschiedener Intermediate führt. Um den Gesamtcarotinoidgehalt in *Phaffia* weiter steigern zu können, muss gewährleistet werden, dass es zu keiner Verarmung der direkten Vorläufermolekülen für CRTYB, wie z.B. Geranylgeranyldiphosphat, kommt, und somit mehr Substrate für CRTYB bereitgestellt werden. Geeignete Gene sind nicht weiter im Carotinoidbiosyntheseweg zu finden, da z.B. zum Einen die Phytoendesaturase *crtI* den mono-zyklischen Zweig der Carotinoidbiosynthese begünstigen würde und zum Anderen *crtYB* bereits das erste Gen im Carotinoidbiosyntheseweg darstellt. Eine Möglichkeit besteht darin, direkt in den Terpenoidstoffwechsel und den Mevalonatweg einzugreifen. Durch die Aktivität der limitierenden *HMG-CoA-Reduktase* wird die Carotinoidbiosynthese direkt beeinflusst (Gu et al. 1997), eine Erhöhung der Expression führt demnach zu einer Steigerung der Carotinoidproduktion. Es ist ebenso bekannt, dass eine Überexpression der Geranylgeranyldiphosphatsynthase *crtE* in *Phaffia* zu einer gesteigerten Carotinoid- und Astaxanthinproduktion führt (Breitenbach et al. 2011). Um *Phaffia* mit mehr Genen in Überexpressionskassetten genetisch zu modifizieren, wurden drei neue, integrative Plasmide bereitgestellt, welche jeweils zwei Gene in Expressionskassetten tragen.

Die Strategie zur genetischen Modifikation der neuen Mutanten AXJ-20 und AXG-13 ist in Abb. 34 dargestellt. Zunächst sollen Transformanten von beiden Stämmen hergestellt werden, welche über eine Überexpression der Gene *crtYB* und *asy* verfügen. In diesem Schritt wird direkt in den Carotinoidbiosyntheseweg eingegriffen, während der di-zyklische Zweig der Biosynthese durch CRTYB, bei gleichzeitiger Reduzierung von Intermediaten durch ASY, gefördert wird (Abb. 34 B). Im nächsten Schritt soll versucht werden den Gesamtcarotinoidgehalt der Transformanten durch einen Eingriff in den Mevalonatweg und der Terpenoidbiosynthese über die HMG-CoA-Reduktase HMGCR und der Geranylgeranyldiphosphatsynthase CRTE signifikant zu erhöhen (Abb. 34 A).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 34: Strategie zur Erhöhung des Gesamtcarotinoidgehalts und der Astaxanthinmenge.**

Das Schema zeigt die physiologische Veränderung des Terpenoid- und Carotinoidmetabolismus durch gezielte genetische Modifikation. **(A)** Durch eine Überexpression der HMG-CoA-Reduktase *hmgcr* im Mevalonatweg und einer Erhöhung der Kopienzahl der Geranylgeranyldiphosphatsynthase *crtE* soll eine deutliche Steigerung des Gesamtcarotinoids zu erreichen sein. Darauf folgt eine Überexpression von *crtYB* **(B)** zur weiteren Erhöhung der Carotinoidbiosyntheseleistung und der Förderung des di-zyklischen Synthesezweigs. Eine weitere Erhöhung der *asy* durch Überexpression soll eine Reduktion der Intermediate und somit die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Astaxanthin sicherstellen (*mvk / pmvk* = Mevalonat-Kinase/ Phosphomevalonat-Kinase)

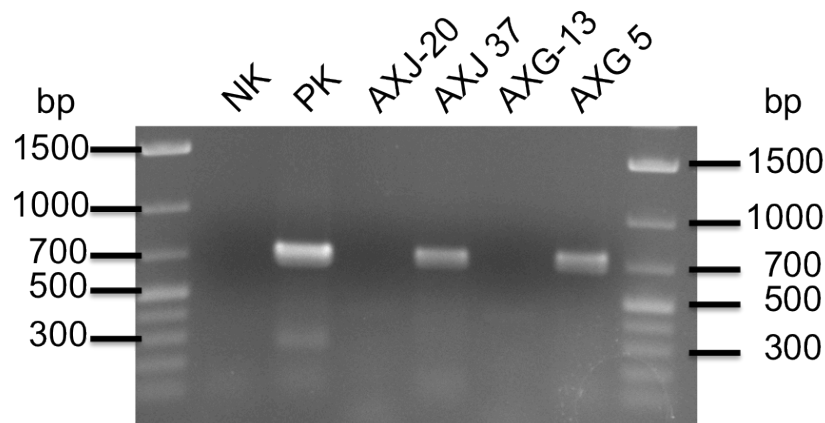
#### 3.7.3 Überexpression von *crtYB* und *asy*

Zur Umsetzung der Transformationsstrategie wurden *Phaffia*-Plasmide auf Basis von pPR2TN (Visser et al. 2003) hergestellt, welche über zwei Expressionskassetten verfügen. Die Kassetten, jeweils unter konstitutiver Kontrolle der *P.r.*-GPDH-Promotor- und Terminatorregion, beinhalten die Phytoensynthase/ Lycopinzyklase *crtYB* und die Astaxanthinsynthase *asy*. Zur Selektion trägt das Plasmid eine G418-Resistenzkassette. Das 13313 bp große Plasmid wurde mit dem Enzym *SfiI* linearisiert und für die Transformation mit AXG-13 und AXJ-20 aufgearbeitet.

Aus dieser Transformation konnten zwei Stämme isoliert werden, die in Bezug auf den Gesamtcarotinoidgehalt und die Astaxanthinmenge eine deutliche Steigerung gegenüber ihren Akzeptorstämmen aufweisen. Um die Integration des Plasmids auf genetischer Ebene zu bestätigen, wurde aus den Stämmen genomische DNA isoliert und diese über PCR auf das Vorhandensein des Plasmids hin untersucht. Für die PCR wurde ein Oligonukleotidpaar verwendet, welches zu einer Amplifizierung eines

### 3. Ergebnisse

637 bp großen DNA-Fragments, beginnend im GPDH-Promotor und endend in der Resistenzkassette für G418, führt (Res-for, G418-rev). Abb. 35 zeigt das über Agarosegelelektrophorese aufgetrennte PCR-Produkt. Spur 1 und 8 zeigen den DNA-Größenstandard GeneRuler 1kb+, links und rechts davon außerhalb der Fotografie sind die korrespondierenden Bandengrößen in bp indiziert. Spur 2 beinhaltet die Negativkontrolle (DNA ersetzt durch H<sub>2</sub>O), in welcher kein Amplifikat sichtbar ist, Spur 3 die Positivkontrolle (pPR13Fasy), in der ein DNA-Fragment der Größe von etwa 637 bp aufzuweisen ist. In den Spuren 4 und 6 enthielt der PCR-Reaktionsansatz 10 ng genomische DNA aus den Akzeptorstämmen AXJ-20 und AXG-13, bei welchen keine Amplifikation nachweisbar ist. Spuren 5 und 7 zeigen die Isolate aus AXJ-YBASY-37 und AXG-YBASY-5, bei welchen ein DNA-Fragment der Größe von etwa 637 bp sichtbar ist.



**Abb. 35: Nachweis der Integration von pPR13F-ASY**

Gezeigt ist eine Agarosegelelektrophorese des integrierten G418-Resistenzgens in den Transformanten AXJ-YBASY-37 und AXG-YBASY-5 über PCR als positiver Transformationsnachweises. Die DNA wurde mit dem Oligonukleotidpaar Res-for und G418-rev amplifiziert. Die erwartete Größe beträgt 637 bp. NK: Negativkontrolle H<sub>2</sub>O, PK: Positivkontrolle pPR13Fasy, Größenstandard in Spur 1 und 8: GeneRuler 1kb+. Spur 2-7: NK, PK, AXJ-20, AXJ-YBASY-37, AXG-13, AXG-13-YBASY-5. Es wurden entweder 5 ng (Plasmid) oder 10 ng (genomische DNA) für die PCR-Reaktion eingesetzt.

### 3. Ergebnisse

Der Gesamtcarotinoidgehalt konnte durch die Überexpression von *crtYB* und *asy* im Akzeptorstamm AXJ-20 signifikant ( $p < 0,01$ ) von  $4141 \pm 210 \mu\text{g/gdw}$  auf  $6518 \pm 540 \mu\text{g/gdw}$  in der Transformante AXJ-YBASY-37 erhöht werden. Dies entspricht einer Zunahme von 30%. Die Transformante des Akzeptorstamms AXG-13 besitzt einen um 45% hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) gesteigerten Gesamtcarotinoidgehalt von  $3008 \pm 66 \mu\text{g/gdw}$  im Akzeptorstamm auf  $5595 \pm 489 \mu\text{g/gdw}$  in der Transformante (Tab. 26).

**Tab. 26: Carotinoid-Analytik der Transformanten AXJ-YBASY-37 und AXG-YBASY-5.**

Die Tabelle zeigt die Carotinoid-Analyse der YBASY-Transformanten im Vergleich zu den Akzeptorstämmen AXJ-20 und AXG-13. Signifikanz zum Akzeptorstamm ermittelt durch Student's t-test aus jeweils drei oder mehreren Stichproben (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ).

Stamm	Gesamtcarotinoid $\mu\text{g/gdw}$	Astaxanthin $\mu\text{g/gdw}$	Astaxanthin %
AXJ-20	$4141 \pm 210$	$2439 \pm 197$	54
AXJ-YBASY-37	$6518 \pm 540$ (**)	$3662 \pm 71$ (***)	55
AXG-13	$3008 \pm 66$	$1691 \pm 236$	56
AXG-YBASY-5	$5595 \pm 489$ (***)	$3093 \pm 577$ (*)	55

Der prozentuale Anteil an Astaxanthin am Gesamtcarotinoid in beiden Stammlinien AXJ-20 und AXG-13 blieb annähernd gleich (mit 58 % für AXJ-20; 56 % für AXJ-YBASY-37, sowie 56% für AXG-13 und 55% bei AXG-YBASY-5). Die absolute Astaxanthinmenge in  $\mu\text{g/gdw}$  konnte durch die Transformation mit pPR13Fasy AXJ-YBASY-37 hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) von  $2439 \pm 197 \mu\text{g/gdw}$  auf  $3662 \pm 71 \mu\text{g/gdw}$ , von AXG-13 zur Transformante AXG-YBASY-5 von  $1691 \pm 236 \mu\text{g/gdw}$  auf  $3093 \pm 577 \mu\text{g/gdw}$  signifikant ( $p < 0,05$ ) gesteigert werden. Eine detaillierte Analyse der Carotinoidzusammensetzungen dieser Transformante ist in Abschnitt 3.7.5 auf Seite 93ff beschrieben.

Wie bereits aufgrund der Vorversuche zu erwarten war, konnte durch die Kombination der Gene *crtYB* und *asy* der Gesamtcarotinoidgehalt und die Astaxanthinmenge in AXJ-YBASY-37 und AXG-YBASY-5 deutlich gesteigert werden.



### 3. Ergebnisse

#### 3.7.4 Überexpression von *HMG1* und *crtE*

Um die Carotinoidproduktion in den Stämmen AXJ-YBASY-37 und AXG-YBASY-5 noch weiter zu erhöhen, wurde in der nächsten Stufe der genetischen Modifikation in den allgemeinen Terpenoidstoffwechsel vor der Carotinoidbiosynthese eingegriffen. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Aktivität der HMG-CoA-Reduktase HMG1 im Mevalonatweg zu einer verstärkten Carotinoidsynthese in *Phaffia rhodozyma* führt (Gu et al. 1997). Durch eine Überexpression von *crtE* kommt es zu einer verstärkten Bereitstellung von Geranylgeranyldiphosphat GGPP, und somit an Substrat für die Phytoensynthese CRTYB. Die beiden Stämme AXJ-YBASY-37 und AXG-YBASY-5 wurden mit dem 11830 bp großen Plasmid pPR2TNH-tHMGCoA/crtE (unveröffentlicht) transformiert, welches neben dem *Phaffia* eigenen Gen *crtE* auch die *hmg1* aus *Saccharomyces* trägt.

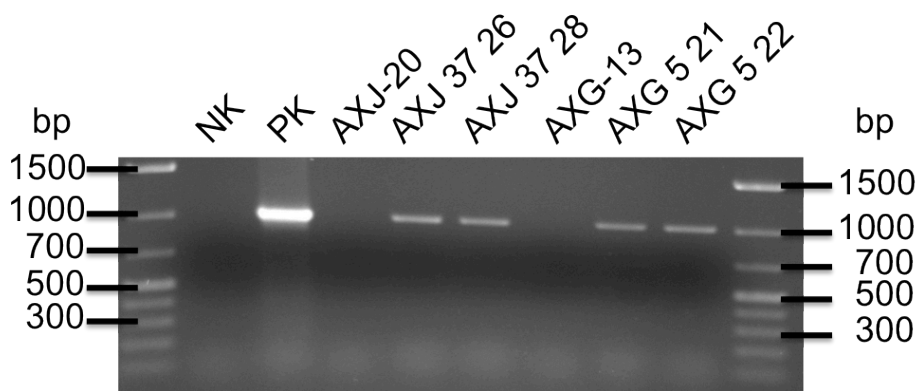
Die *Phaffia* eigene HMG-CoA-Reduktase lag zum Zeitpunkt der Klonierung des Plasmids nicht vor. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Überexpression einer verkürzten *HMG1* in Hefe zusammen mit *crtI* aus *Phaffia rhodozyma* zu einer 57-fachen Steigerung der Carotinoidbiosynthese führt (Verwaal et al. 2007). Zur Selektion potentieller Transformanten trägt das Plasmid pPR2TNH-tHMGCoA/crtE eine Hygromycin-Resistenzkassette (*hph-1*). Alle drei Expressionskassetten stehen unter der konstitutiven Kontrolle der *Phaffia* eigenen GPDH-Promotor- und Terminatorregion. Die Integration des zuvor mit *SfiI* linearisierten Plasmids geschieht über homologe Rekombination der Sequenzen der 18S und 5,8S rDNA.

Nach der Transformation konnten die Stämme AXJ-tHMG1/crtE-26 und AXJ-tHMG1/crtE-28, sowie AXG-tHMG1/crtE-21 und AXG-tHMG1/crtE-22 aufgrund ihrer Pigmentierung als die aussichtsreichsten Transformanten isoliert werden.

Zum Nachweis der Plasmidintegration in den Transformanten wurden aus den Stämmen AXJ-tHMG1/crtE-26 und -28, sowie AXG-tHMG1/crtE-21 und -22 genomische DNA isoliert und eine PCR-Reaktion durchgeführt. Das Oligonukleotidpaar Hyg-for und Hyg-rev bindet jeweils vor und hinter dem gesamten Hygromycin-Resistenzgen *hph-1* zwischen GPDH-Promotor und GPDH-Terminator. Das entstehende Amplifikat besitzt eine Größe von 977 bp. Abb. 36 zeigt die Auftrennung des PCR-Produkts. Die Spuren 1 und 10 zeigen jeweils den

### 3. Ergebnisse

Größenstandard „GeneRuler 1kb+“, dessen entsprechende Banden den bp-Größen nach Herstellerinformationen zugeordnet sind. Spur 2 zeigt die Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O statt DNA), Spur 3 die Positivkontrolle in Form des Plasmids pPR2TNH-tHMGCoA/crtE. Die Spuren 4 und 7 zeigen als Negativkontrolle die PCR-Reaktionsansätze mit der genomischen DNA der Stämme AXJ-20 und AXG-13. Spuren 5, 6, 8 und 9 sind den Transformanten AXJ-tHMG1/crtE-26 und -28, sowie AXG-tHMG1/crtE-21 und -22 zugeordnet. In diesen Proben ist ein deutliches PCR-Amplifikat von 977 bp sichtbar, was auf eine erfolgreiche Integration des Plasmids hindeutet.



**Abb. 36: Nachweis der Integration von pPR2TNH-tHMGCoA/crtE.**

Dargestellt ist die Auftrennung des PCR-Produkts, welche die erfolgreiche Integration des Plasmids pPR2TNH-tHMGCoA/crtE in die Stämme AXJ-tHMG1/crtE-26 und -28, sowie AXG-tHMG1/crtE-21 und -22 zeigt. In den Spuren 5,6,8 und 9) konnte das 977 bp große Amplifikat des Hygromycinresistenzgens *hph-1* nachgewiesen werden. Spuren 1 und 10 zeigen den Größenstandard „GeneRuler 1kb+“, Spur 2 ist die Negativkontrolle **NK** (H<sub>2</sub>O statt DNA), Spur 3 die Positivkontrolle (**PK**) in Form des Plasmids pPR2TNH-tHMGCoA/crtE für den Größenvergleich mit den Transformanten. Die Spuren 4 und 7 enthalten die Ursprungsstämme AXJ-20 und AXG-13 als Negativkontrolle. In die PCR-Reaktion wurden entweder 5 ng (Plasmid) oder 10 ng (genomische) DNA eingesetzt. Für die Amplifikation wurde das Oligonukleotidpaar Hyg-for und Hyg-rev verwendet. AXJ 37 26 / AXJ 37 28 = AXJ-tHMG1/crtE-26 / AXJ-tHMG1/crtE-28, AXG 5 21 / AXG 5 22 = AXG-tHMG1/crtE-21 / AXG-tHMG1/crtE-21.

Nach dem Integrationsnachweis wurde eine Carotinoidanalyse durchgeführt. Tab. 27 zeigt die Carotinoidkonzentrationen dieser vier neuen Stämme im Vergleich zu den entsprechenden Vorläuferstämmen.

Der Gesamtcarotinoidgehalt konnte durch die Überexpression der Gene *tHMG1* und *crtE* im Akzeptorstamm AXJ-YBASY-37 hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) von  $6518 \pm 540$   $\mu\text{g/gdw}$  auf  $8921 \pm 360$   $\mu\text{g/gdw}$  im neuen Stamm AXJ-tHMG1/crtE-28 erhöht werden. Der Astaxanthingehalt konnte um 36% von  $3662 \pm 71$   $\mu\text{g/gdw}$  auf  $5823 \pm 553$   $\mu\text{g/gdw}$  signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht werden. Der prozentuale Anteil des Astaxanthins am

### 3. Ergebnisse

Gesamtcarotinoid stieg hierbei von 55 % auf 65 % an. Der Stamm AXJ-tHMG1/crtE-26 wies im direkten Vergleich eine geringere Gesamtcarotinoidbiosynthese von  $7744 \pm 592$   $\mu\text{g/gdw}$  auf, welche dennoch eine Steigerung von 14 % gegenüber dem Akzeptorstamm AXJ-YBASY-37 darstellt. Der Astaxanthinanteil stieg auf  $4725 \pm 440$   $\mu\text{g/gdw}$ , was einer Zunahme um 22 % gegenüber des Vorläuferstammes entspricht. Der prozentuale Astaxanthinanteil am Gesamtcarotinoid betrug 61 %.

**Tab. 27: Carotinoid-Werte der Transformanten AXJ-tHMG1/crtE-26 /-28 und AXG-tHMG1/crtE-21 /-22**

Die Tabelle zeigt die Carotinoid-Analyse der tHMG1/crtE-Transformanten zusammen mit den Werten der Akzeptorstämme. Signifikanz zum Akzeptorstamm ermittelt durch Student's t-test aus jeweils drei oder mehreren Stichproben (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ).

Stamm	Gesamtcarotinoid $\mu\text{g/gdw}$	Astaxanthin $\mu\text{g/gdw}$	Astaxanthinanteil %
AXJ-YBASY-37	$6518 \pm 540$	$3662 \pm 71$	55
AXJ-tHMG1/crtE-26	$7744 \pm 592$	$4725 \pm 440$	61
AXJ-tHMG1/crtE-28	$8921 \pm 360$ (***)	$5823 \pm 553$ (**)	65
AXG-YBASY-5	$5595 \pm 489$	$3093 \pm 577$	55
AXG-tHMG1/crtE-21	$7941 \pm 1146$	$5331 \pm 680$	67
AXG-tHMG1/crtE-22	$8917 \pm 1214$ (**)	$5178 \pm 793$ (*)	58

Die Carotinoidbiosynthese des Akzeptorstammes AXG-YBASY-5 konnte durch die Transformation mit dem Plasmid pPR2TNH-tHMGCoA/crtE signifikant ( $p < 0,01$ ) von  $5595 \pm 489$   $\mu\text{g/gdw}$  auf  $8917 \pm 1214$   $\mu\text{g/gdw}$  erhöht werden, was einer Zunahme der Carotinoidmenge um 37 % entspricht. Die Menge an Astaxanthin stieg signifikant ( $p < 0,05$ ) um 41 % von  $3093 \pm 577$   $\mu\text{g/gdw}$  auf  $5178 \pm 793$   $\mu\text{g/gdw}$  in der Transformante AXG-tHMG1/crtE-22. Der zweite Stamm AXG-tHMG1/crtE-21 weist einen Carotinoidgehalt von  $7941 \pm 1146$   $\mu\text{g/gdw}$  (30 % Zunahme gegenüber Akzeptorstamm) und eine anteilige Astaxanthinmenge von  $5331 \pm 680$   $\mu\text{g/gdw}$  (42 % Steigerung) auf. Im Vergleich mit den beiden Vorläuferstämmen AXG-YBASY-5 und AXG-13 konnte jedoch beim Stamm AXG-tHMG1/crtE-22, im Gegensatz zur Transformation der AXJ-20-Stammlinie, keine nennenswerte Steigerung des prozentualen Anteils an Astaxanthin am Gesamtcarotinoidgehalt festgestellt werden. Der Stamm AXG-tHMG1/crtE-21 weist hingegen eine Steigerung des prozentualen

### 3. Ergebnisse

Astaxanthingehalt auf 67 % auf, wodurch sich eine leicht höhere, absolute Astaxanthinmenge gegenüber AXG-tHMG1/crtE-22 zeigt. Eine detaillierte Darstellung der Carotinoidzusammensetzung dieser Transformanten ist dem Abschnitt 3.7.5 auf Seite 93ff zu entnehmen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.7.5 Carotinoidzusammensetzung der Transformanten

In diesem Abschnitt soll die Zusammensetzung der Carotinoide der bisher hergestellten Transformanten verglichen werden. Tab. 28 fasst zusammen, auf welche Carotinoide sich der Gesamtcarotinoidgehalt der AXJ-20-basierenden Stämme aufteilt. Am aussagekräftigsten ist hierbei der prozentuale Anteil eines Carotinoids am Gesamtcarotinoidgehalt, da dieser den relativen Anteil beschreibt, wodurch Vergleiche unter den verschiedenen Stämmen möglich sind. Canthaxanthin war in der Transformante AXJ-YBASY-37 mit 11 % am meisten vorhanden, während dieses Carotinoid in den Stämmen AXJ-20 und AXJ-tHMG1/crtE-28 jeweils zu 8-9 % nachweisbar war. Das Niveau der Synthese zeigte keine Veränderungen durch die Transformationen. Der Anteil von 3-OH-Echinenon über den Transformationsprozess gesehen beschreibt eine ähnliche Verteilung. Die Stämme AXJ-20, AXJ-YBASY-37 und AXJ-tHMG1/crtE-28 zeigen eine Konstanz der 3-OH-Echinenonmenge zwischen 13-16 %.

**Tab. 28: Zusammensetzung der Carotinoide in den Stämmen der AXJ-20-Stammlinie.**

Gezeigt ist die anteilige Menge in  $\mu\text{g/gdw}$  des jeweiligen Carotinoids  $\pm$  der Standardabweichung (mindestens drei biologische Replikate) und der prozentuale Anteil am Gesamtcarotinoid (in Klammern).

<b>Carotinoid</b>	<b>AXJ-20</b>	<b>AXJ-YBASY-37</b>	<b>AXJ-tHMG1/crtE-28</b>
<b>Astaxanthin</b>	2439 $\pm$ 197 (54)	3662 $\pm$ 72 (55)	5824 $\pm$ 553 (65)
<b>Canthaxanthin</b>	317 $\pm$ 11 (8)	720 $\pm$ 122 (11)	793 $\pm$ 151 (9)
<b>OH-Echinenon</b>	522 $\pm$ 38 (13)	841 $\pm$ 48 (13)	1431 $\pm$ 124 (16)
<b>Echinenon</b>	513 $\pm$ 137 (12)	406 $\pm$ 109 (6)	294 $\pm$ 78 (3)
<b><math>\beta</math>-Carotin</b>	400 $\pm$ 100 (10)	477 $\pm$ 155 (7)	433 $\pm$ 95 (5)

Eine deutliche Änderung des Anteils am Gesamtcarotinoidgehalt zeigt Echinenon. Angefangen bei einem relativen Anteil von 12 % bei AXJ-20, sank der Anteil des Carotinoids mit fortschreitender Transformationsstufe über 6 % in AXJ-YBASY-37 auf 3 % in der Transformante AXJ-tHMG1/crtE-28.  $\beta$ -Carotin zeigte ebenfalls sinkende Anteile. Der Stamm AXJ-20 wies einen Anteil des  $\beta$ -Carotin von 10 % auf. Die Menge

### 3. Ergebnisse

des Carotinoids sank in den Stämmen AXJ-YBASY-37 und AXJ-tHMG1/crtE-28 auf 7 % und 5 %. Der prozentuale Anteil an Astaxanthin steigerte sich von 54 % im ersten Akzeptorstamm AXJ-20 bis zu 65 % in der Transformante AXJ-tHMG1/crtE-28.

Tab. 29 zeigt die Verteilung der Carotinoide in den Stämmen AXG-13, AXG-YBASY-5 und AXG-tHMG/crtE-22. Der Anteil des Intermediats Canthaxanthin sank nach Überexpression von *crtYB* und *asy* im Stamm AXG-YBASY-5 leicht. Nach Überexpression von *tHMG1* und *crtE* stieg die Canthaxanthinmenge in der Transformante AXG-tHMG/crtE-22 auf 15 %. Die Synthese von 3-OH-Echinenon zeigte über beide Transformationen einen Anstieg um 3 %. Auffällig ist auch hier, wie bei AXJ-tHMG1/crtE-28, der höchste Gehalt an 3-OH-Echinenon in der Mutante AXG-tHMG1/crtE-22 mit 15 % des Gesamtcarotinoidgehalts nach Überexpression von *tHMG1* und *crtE*.

**Tab. 29: Zusammensetzung der Carotinoide in den Stämmen der AXG-13-Stammlinie.**

Gezeigt ist die anteilige Menge in  $\mu\text{g/gdw}$  des jeweiligen Carotinoids  $\pm$  der Standardabweichung (mindestens drei biologische Replikate) und des prozentualen Anteils in Klammern.

Carotinoid	AXG-13	AXG-YBASY-5	AXG-tHMG1/crtE-22
<b>Astaxanthin</b>	1691 $\pm$ 236 (56)	3093 $\pm$ 577 (55)	5581 $\pm$ 1042 (56)
<b>Canthaxanthin</b>	392 $\pm$ 99 (13)	658 $\pm$ 273 (12)	970 $\pm$ 405 (15)
<b>OH-Echinenon</b>	361 $\pm$ 211 (12)	611 $\pm$ 115 (11)	1035 $\pm$ 167 (15)
<b>Echinenon</b>	196 $\pm$ 127 (7)	265 $\pm$ 52 (5)	501 $\pm$ 143 (6)
<b><math>\beta</math>-Carotin</b>	163 $\pm$ 109 (5)	366 $\pm$ 136 (6)	567 $\pm$ 247 (6)

Die prozentuale Menge an Echinenon sank von 7 % im Stamm AXG-13 auf 5 % im Stamm AXG-YBASY-5, stieg in der Transformante AXG-tHMG1/crtE-22 jedoch auf 6 %. Der Anteil von  $\beta$ -Carotin blieb über die beiden Transformationen auf dem gleichen Niveau von 5-6 % in AXG-13 über AXG-YBASY-5 und AXG-tHMG1/crtE-22. Die Astaxanthinmenge wies mit Anteilen von 56% - 58% ein gleichbleibendes Niveau auf.

### 3. Ergebnisse

#### 3.7.6 Zusätzliche Erhöhung der *asy*-Kopienzahl

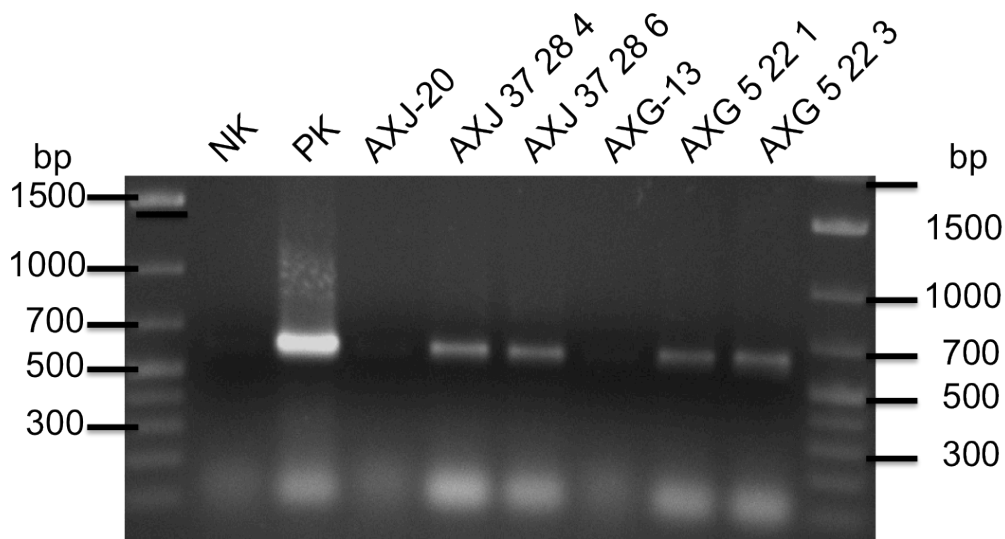
Die Ergebnisse der zweiten Transformationsstufe weisen aufgrund des nur leicht gestiegenen Astaxanthinanteils und der Erhöhung von Intermediaten auf eine Limitierung der Astaxanthinsynthese ASY hin. Eine weitere Transformation mit einer *asy*-Überexpressionskassette könnte zu einer Metabolisierung verschiedener Intermediate wie Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxy-Echinenon oder  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin führen. Für diese Transformation wurden die Stämme AXJ-tHMG1/crtE-28 und AXG-tHMG1/crtE-22 aufgrund des höchsten Gesamtcarotinoidgehaltes der jeweiligen Transformationslinien ausgewählt.

Für die Transformation wurde das 10209 bp große Plasmid pPR2TNoasy verwendet. Es enthält die Gene der Astaxanthinsynthese *asy* und der Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Nourseothricin (Goldstein et al. 1999) *nat* unter konstitutiver Kontrolle des *Phaffia*-eigenen GPDH-Promotors –und Terminators. Zusätzlich beinhaltet das Plasmid die Sequenzen der 18S- und 5,8S-rDNA für die Integration des durch *Cla*I linearisierten Plasmids über homologe Rekombination in das *Phaffia*-Genom.

Aus der Transformation der Akzeptorstämme AXJ-tHMG1/crtE-28 und AXG-tHMG1/crtE-22 mit pPR2TNoasy konnten vier weitere Stämme isoliert werden, welche eine Steigerung des Gesamtcarotinoid- und Astaxanthingehalts zeigen.

Zum Nachweis der Integration des Plasmids pPR2TNoasy in die jeweiligen Akzeptorstämme, wurden aus diesen Transformanten genomische DNA isoliert und über PCR untersucht. Für die PCR wurde das Oligonukleotidpaar NAT-for und NAT-rev verwendet, welche zur Amplifikation des kompletten *nat*-Resistenzgens, inklusive der GPDH-Promotor –und Terminatorregion, führen. Das Amplifikat hat eine theoretische Größe von 577 bp. Abb. 37 zeigt den Nachweis der Integration über die agarosegelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts. Die Spuren 1 und 10 enthalten jeweils den Größenstandard „GeneRuler 1kb+“ mit den links und rechts daneben entsprechenden Größen. Spur 2 enthielt die Negativkontrolle (NK), bei welcher im PCR-Ansatz H<sub>2</sub>O statt DNA verwendet wurde.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 37: Geldokumentation Nachweis Transformation mit pPR2TNo-ASY**

Gezeigt ist der agarosegelelektrophoretische Nachweis der Integration der Nourseothricin-Resistenz in den Transformanten AXJ-ASY-4 und -6 sowie AXG-ASY-1 und -3 zur Überprüfung der Transformanten. Die Sequenz wurde mit dem Oligonukleotidpaars NAT-for und NAT-rev amplifiziert. Die erwartete Größe beträgt 577 bp. **NK**: Negativkontrolle H<sub>2</sub>O, **PK**: Positivkontrolle pPR2TNo-ASY, **AXJ-20**: AXJ-20, **AXJ 37 28 4 / 6**: AXJ-ASY-4 / 6, **AXG-13**: AXG-13, **AXG 5 22 1 / 3**: AXG-ASY-1 / 3. Es wurden entweder 5 ng (Plasmid) oder 10 ng (genomische DNA) in der PCR eingesetzt.

Die Positivkontrolle (PK) zeigt die Amplifikation der 577 bp großen *nat*-Sequenz aus dem Plasmid pPR2TNoasy. Die PCR-Ansätze in den Spuren 4 und 7 beinhalten als DNA-Vorlage genomische DNA aus den Ursprungstämmen AXJ-20 und AXG13. In ihnen ist kein Amplifikat nachzuweisen. In den Spuren 5, 6, 8 und 9 der Transformanten AXJ-ASY-4 und -6, sowie AXG-ASY-1 und -3 ist jeweils ein Amplifikat der Größe 577 bp nachweisbar und zeigt somit die Integration des linearisierten Plasmids pPR2TNoasy in die Akzeptorstämme AXJ-tHMG1/crtE-28 und AXG-tHMG1/crtE-22.

Eine Zusammenfassung der Carotinoidbiosynthese der Stämme AXJ-ASY-4 und -6, sowie AXG-ASY-1 und -3 ist in der Tab. 30 im Vergleich mit den vorangegangenen Stämmen dargestellt. Die allgemeine Carotinoidsynthese des Stammes AXJ-ASY-4 konnte signifikant ( $p < 0,05$ ) von  $8921 \pm 360 \mu\text{g/gdw}$  auf  $11368 \pm 1337$  um weitere 25 % gegenüber AXJ-tHMG1/crtE-28 gesteigert werden. Die zweite Transformante AXJ-ASY-6 wies eine Steigerung um 10% zu  $9873 \pm 1863 \mu\text{g/gdw}$  Gesamtcarotinoidgehalt auf.



### 3. Ergebnisse

**Tab. 30: Carotinoid-Analytik der Transformanten AXJ-ASY-4 /-6 und AXG-ASY-1 /-3**

Die Tabelle zeigt die Carotinoid-Analyse der ASY-Transformanten im Vergleich zu den Akzeptorstämmen. Die Signifikanz zum Akzeptorstamm wurde durch den Student's t-test aus jeweils drei oder mehreren Stichproben ermittelt (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ).

<b>Stamm</b>	<b>Gesamtcarotinoid µg/gdw</b>	<b>Astaxanthin µg/gdw</b>	<b>Astaxanthinanteil %</b>
AXJ-tHMG1/crtE-28	8921 ± 360	5823 ± 553	65
AXJ-ASY-4	11368 ± 1337 (*)	8510 ± 1001 (**)	72
AXJ-ASY-6	9873 ± 1863	7691 ± 1803	77
AXG-tHMG1/crtE-22	8917 ± 1214	5178 ± 793	58
AXG-ASY-1	12389 ± 295 (**)	8064 ± 519 (**)	65
AXG-ASY-3	10165 ± 369	6550 ± 322	64

Die absolute Astaxanthinmenge stieg nach der Transformation im Stamm AXJ-ASY-4 sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) um 32 % von  $5823 \pm 553$  µg/gdw auf  $8510 \pm 1001$  µg/gdw und bei AXJ-ASY-6 um 24 % auf  $7691 \pm 1803$  µg/gdw. Der prozentuale Astaxanthinanteil erhöhte sich in beiden Transformanten auf über 70 %.

Die Transformanten der AXG-13-Linie wiesen eine sehr signifikante ( $p < 0,01$ ) Steigerung des Gesamtcarotinoidgehaltes um 28 % von  $8917 \pm 1215$  µg/gdw auf  $12389 \pm 295$  µg/gdw bei AXG-ASY-1 und um 12 % bei AXG-ASY-3 ( $10165 \pm 369$  µg/gdw) auf. Die Astaxanthinmenge stieg in AXG-ASY-1 sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) um 35 % von  $5178 \pm 793$  µg/gdw auf  $8064 \pm 519$  µg/gdw, AXG-ASY-3 zeigte einen Astaxanthingehalt von  $6550 \pm 322$  (21 % Zunahme).

Canthaxanthin wurde durch die Überexpression der Astaxanthinsynthase ASY im Stamm AXJ-ASY-4 weiter zu Astaxanthin metabolisiert (Tab. 31). Hier konnte Canthaxanthin nur noch zu 3 % des Gesamtcarotinoids detektiert werden. Auch 3-OH-Echinenon zeigt in der letzten Transformationsstufe AXJ-ASY-4 mit einem prozentualen Anteil von 10 % den niedrigsten Wert am Gesamtcarotinoid verglichen mit den vorangegangenen Stämmen aus dieser Linie. Die Synthese von Echinenon blieb mit 4 % des Anteils am Gesamtcarotinoid auf dem Niveau der Akzeptorstammes.

### 3. Ergebnisse

Die Menge an  $\beta$ -Carotin zeigte einen Anstieg der Synthese, welcher mit 9 % 5 % über dem Syntheseniveau des Akzeptorstammes liegt.

**Tab. 31: Carotinoide in AXJ-ASY-4 und AXG-ASY-1**

Gezeigt ist die anteilige Menge in  $\mu\text{g/gdw}$  des jeweiligen Carotinoids  $\pm$  der Standardabweichung (drei biologische Replikate) und des prozentualen Anteils in Klammern.

<b>Carotinoid</b>	<b>AXJ-ASY-4</b>	<b>AXG-ASY-1</b>
<b>Astaxanthin</b>	8622 $\pm$ 1389 (73)	8064 $\pm$ 519 (65)
<b>Canthaxanthin</b>	335 $\pm$ 250 (3)	824 $\pm$ 329 (7)
<b>3-OH-Echinenon</b>	1158 $\pm$ 50 (10)	1484 $\pm$ 140 (12)
<b>Echinenon</b>	475 $\pm$ 87 (4)	613 $\pm$ 130 (5)
<b><math>\beta</math>-Carotin</b>	1011 $\pm$ 244 (9)	1031 $\pm$ 207 (8)

AXG-ASY-1 wies mit 65 % den höchsten Anteil von Astaxanthin am Gesamtcarotinoid in der Stammlinie AXG-13 auf. Das Niveau der nochmals überexprimierten Astaxanthinsynthese liegt mit einer Steigerung von knapp 10 % (von AXG-13 bis AXG-ASY-1) unter der Steigerung der Astaxanthinsyntheseleistung der AXJ-20-Stammlinie (20 %). Dennoch konnte durch die letzte Transformation zur Erhöhung der *asy*-Kopienzahl eine absolute Astaxanthinmenge von 8064  $\pm$  519  $\mu\text{g/gdw}$  erreicht werden. Der Anteil von Canthaxanthin konnte durch die Transformation weiter verringert werden und liegt im Stamm AXG-ASY-1 bei 7 % des Gesamtcarotinoidgehaltes. Die Menge an 3-OH-Echinenon sank auf 12%, während der Anteil von Echinenon zwischen AXG-tHMG/crtE-22 und AXG-ASY-1 bei beiden Stämmen bei 5-6 % lag und damit kaum einen Unterschied aufwies. Auch die Synthese von  $\beta$ -Carotin in AXG-ASY-1 bewegte sich mit 8-9 % auf dem gleichen Niveau wie des Akzeptorstammes.

Hauptsächlich wurde das Intermediat Canthaxanthin in beiden Transformanten weiter zu Astaxanthin metabolisiert. Der prozentuale Anteil des Astaxanthins am Gesamtcarotinoid stieg in beiden Transformanten durch die zweite Erhöhung der Kopienzahl der Astaxanthinsynthese um 6-7 %.

### 3. Ergebnisse

#### 3.7.7 Bestimmung der Kopienzahl der integrierten Plasmide

Zur Untersuchung, wie oft ein Transformationsplasmid in das Genom des entsprechenden Akzeptorstamm integrierte, wurden mit genomischer DNA der Transformanten „Realtime-PCR-Analysen“ durchgeführt. Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, welche ein circa 100 bp großes Fragment im Exon eines entsprechenden Gens (welches auf dem jeweiligen Plasmid und im Genom von *Phaffia* enthalten ist) amplifizieren. Die Integrationen der Plasmide in den Transformanten AXJ-YBASY-37 und AXG-YBASY-5 wurden mit den Oligonukleotiden für *crtYB*, AXJ-tHMG1/crtE-28 und AXG-tHMG1/crtE-22 für *crtE* und die Transformanten AXJ-ASY-4 und AXG-ASY-1 mit Oligonukleotiden für *asy* untersucht. Referenz in den Realtime-PCR-Analysen war jeweils der entsprechende Akzeptorstamm AXJ-20 oder AXG-13, dessen Niveau als 1 definiert wurde. Die errechneten Effizienzen für die unterschiedlichen PC-Reaktionen betragen 2,02 (*crtYB*-RT-for/rev), 2,29 (*crtE*-RT-for/rev) und 1,94 (*Asy*-RT-for/rev). Die Quantifizierung erfolgte nach Pfaffl (2001). In Tab. 32 ist die Anzahl der Integration der Expressionsplasmide mit den Genen *crtYB*, *tHMG1*, *crtE* und *asy* in den Transformanten der Stammlinie AXJ-20 und AXG-13 dargestellt. Die Rohdaten der Analysen sind dem Anhang 12.7 zu entnehmen.

Tab. 32: Integrationshäufigkeit der Expressionsplasmide

Stamm	Plasmid	Gene	Anzahl der Integration
AXJ-YBASY-37	pPR13Fasy	<i>crtYB</i> und <i>asy</i>	3
AXJ-tHMG1/crtE-28	pPR2TNH-tHMG1/crtE	<i>tHMG1</i> und <i>crtE</i>	9
AXJ-ASY-4	pPR2TNoasy	<i>asy</i>	7
AXG-YBASY-5	pPR13Fasy	<i>crtYB</i> und <i>asy</i>	6
AXG-tHMG1/crtE-22	pPR2TNH-tHMG1/crtE	<i>tHMG1</i> und <i>crtE</i>	8
AXJ-ASY-1	pPR2TNoasy	<i>asy</i>	2

In der Transformante AXJ-YBASY-37 konnte das Plasmid pPR13Fasy über das Oligonukleotidpaar *crtYB*-RT-for/rev dreimal, in der Transformante AXG-YBASY-5 sechsmal nachgewiesen werden. Die Transformanten AXJ-tHMG1/crtE-28 und AXG-tHMG1/crtE-22 verfügen über neun, bzw. acht Integrationen des Plasmids pPR2TNH-tHMG1/crtE. Die Integrationshäufigkeit wurde mit dem Oligonukleotidpaar *crtE*-RT-

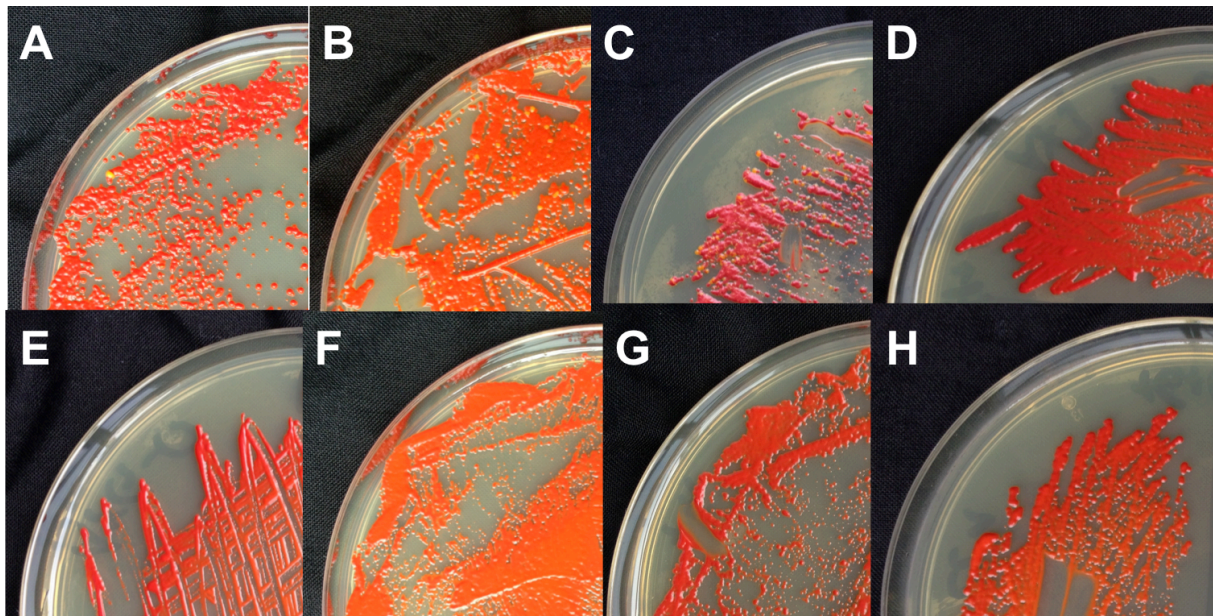
### 3. Ergebnisse

for/rev bestimmt. Das Plasmid pPR2TNo-asy mit der Astaxanthinsynthase *asy* konnte über das Oligonukleotidpaar Asy-RT-for/rev in der Transformante AXJ-ASY-4 insgesamt siebenmal, in der Transformante AXG-ASY-5 zweimal nachgewiesen werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.7.8 Stabilität der Pigmentierung in den neuen Transformanten in Kultur

Durch mehrfaches Überimpfen der hier vorgestellten Stämme erschien die Pigmentierung der Kulturen auf festem YPD-Medium überwiegend homogen rot, wobei stets andersfarbige, einzelne Kolonien auffindbar waren. In der Abb. 38 sind Ausschnitte aus Fotografien der Stämme AXJ-20 (A), AXJ-YBASY-37 (B), AXJ-tHMG1/crtE-28 (C), AXJ-ASY-4 (D), AXG-13 (E), AXG-YBASY-5 (F), AXG-tHMG1/crtE-22 (G) und AXG-ASY-1 (H) abgebildet. Die Stämme wurden stets aus einer Einzelkolonie auf frisches YPD-Medium ausplattiert. Die Pigmentierung ist überwiegend rot, wobei die Transformanten AXJ-ASY-4 (D) und AXG-ASY-1 (H) am homogensten pigmentiert erscheinen. Die Ursprungsstämme AXJ-20 (A) und AXG-13 (E), sowie AXJ-YBASY-37 (B) und AXG-YBASY-5 (F) weisen nur selten eine andersfarbige Kolonie auf. Der Stamm AXJ-tHMG1/crtE-22 (C) zeigte stets eine recht schwankende Art der Pigmentierung. Für analytische Anzuchten oder Transformation wurde stets von einer homogen gefärbten Kultur abgeimpft. Dies bedeutete vor jeder Kultivierung eine Passagierung einzelner roter Kolonien über mehrere Generationen, bis die Einfarbigkeit der Kultur wieder hergestellt wurde.



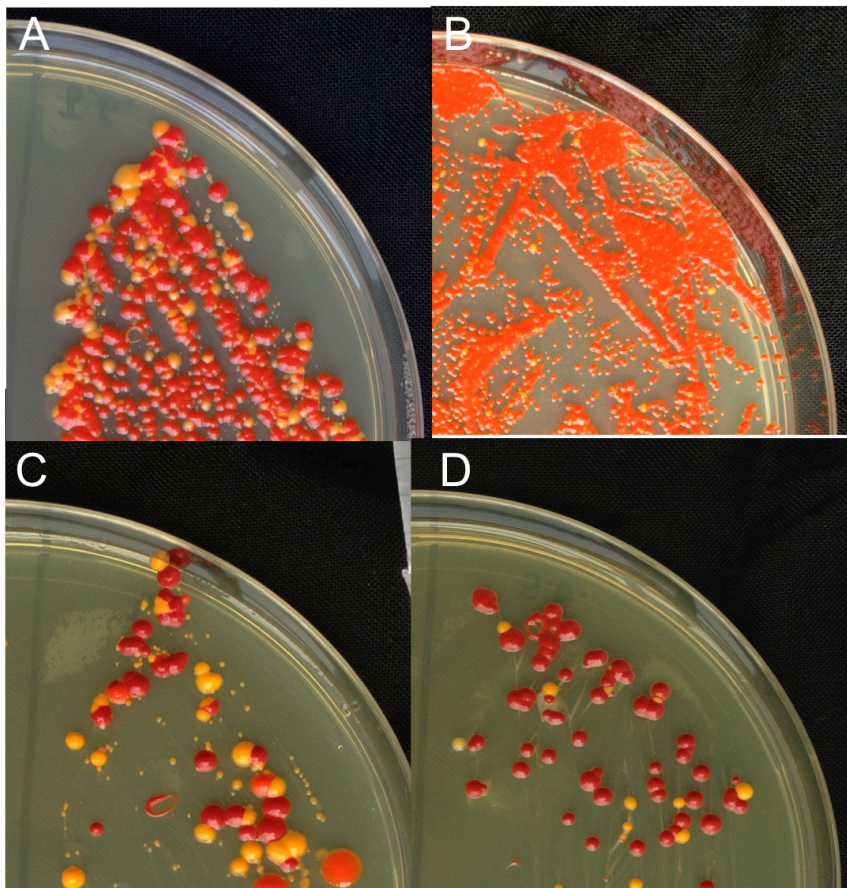
**Abb. 38: Homogenität der Stämme.**

Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus Fotografien der überimpften Stämme AXJ-20 (A), AXJ-YBASY-37 (B), AXJ-tHMG1/crtE-28 (C), AXJ-ASY-4 (D), AXG-13 (E), AXG-YBASY-5 (F), AXG-tMG1/crtE-22 (G) und AXG-ASY-1 (H). Die Stämme sind mehrheitlich homogen rot pigmentiert, wobei stets in allen Kulturen einzelne fehlpigmentierte Kolonien auffindbar sind. Der Stamm AXJ-tHMG1/crtE-28 (C) wies im Vergleich zu den restlichen Stämmen besonders viele einzelne Kolonien auf, die nicht rot pigmentiert sind.

### 3. Ergebnisse

#### 3.7.8.1 Einfluss der Lagerung in Dauerkultur bei -80°C auf die Stabilität

Die Inhomogenität der Pigmentierung konnte bei sämtlichen Stämmen beobachtet werden. In Abschnitt 3.6 wurden Hinweise dargestellt, wonach die Transformation als solche nicht stabil sein könnte, weshalb verschiedenfarbige Kolonien nach Ausplattieren einer roten Einzelkolonie auftraten. Dieser Effekt der Transformation von *Phaffia rhodozyma* ließ sich durch das konsequente Passagieren roter Einzelkolonien über mehrere Generationen korrigieren, wonach eine stabile Kultur gewonnen wurde, welche keine Fehlpigmentierungen mehr aufweisen konnte. Nach dem Ausstreichen einer cryogenisierten Dauerkultur konnte der Effekt der Vielfarbigkeit in der Transformante PR1-104/bkt z.B. nicht mehr beobachtet werden. Homogene Kulturen von Transformanten auf Basis der chemisch mutagenisierten Stämme AXJ-20 und AXG-13 dagegen zeigen einen starken Verlust der einheitlichen Pigmentierung, sobald sie aus Dauerkulturen ausgestrichen und kultiviert werden.



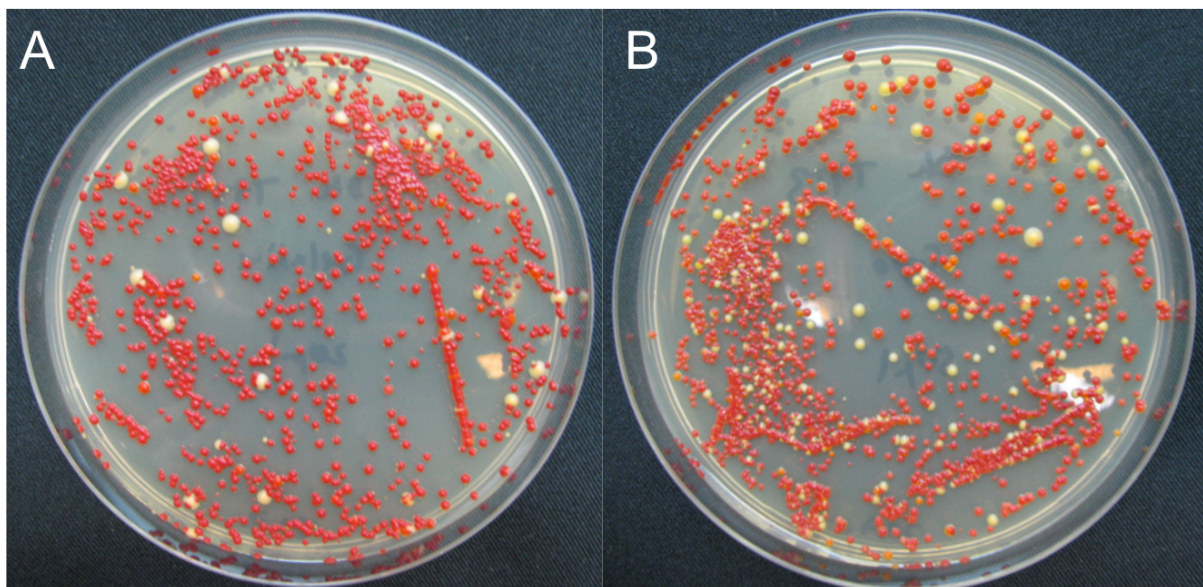
**Abb. 39: Transformanten aus cryogenisierter Kultur.**

Die Fotografien zeigen die Stämme AXJ-20 (A), AXJ-YBASY-37 (B), AXJ-tHMG1/crtE-28 (C) und AXJ-ASY-4 (D) auf festem YPD-Medium, ausgestrichen aus -80°C-Dauerkulturen. Deutlich zu sehen ist die Vielfarbigkeit der Einzelkolonien. Die Pigmentierung ist inhomogen und instabil nach Lagerung bei -80°C

### 3. Ergebnisse

Abb. 39 zeigt am Beispiel der Stammlinie AXJ-20 den Verlust der Homogenität der Pigmentierung nach Kultivierung aus cryogenisierter Dauerkultur. AXJ-20 (**A**), AXJ-tHMG1/crtE-28 (**C**) und AXJ-ASY-4 (**D**) zeigen deutliche Unterschiede der einzelnen Kolonie hinsichtlich ihrer Farbe. AXJ-YBASY-37 (**B**) ist homogener rot pigmentiert. Das Auftreten inhomogen pigmentierter Kulturen nach Lagerung bei tiefen Temperaturen deckt sich mit der Feststellung der Inhomogenität der Ausgangsstämme, welche von „DSM Nutritional Products“ als Dauerkultur bereitgestellt wurden (siehe Abschnitt 3.1).

Um zu überprüfen, ob der Effekt des Einfrierens der Grund für die Vielfarbigkeit der zuvor homogen roten Kulturen darstellt, wurden Dauerkulturen nach Marangon 2003 angefertigt. Nach dieser Methode werden Flüssigkulturen der Stämme mit steriler Gelatinelösung vermischt, anschließend im Exsikkator dehydriert und im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Abb. 40 zeigt einen Vergleich eines Ausstrichs zwischen Gelatine-basierter Dauerkultur (Abb. 40 A) und cryo-basierter Dauerkultur (Abb. 40 B). In beiden Kulturen sind deutliche Fehlpigmentierungen nachweisbar, wobei in der cryogenisierten Kultur zahlreichere, andersfarbige Einzelkolonien zu beobachten sind.



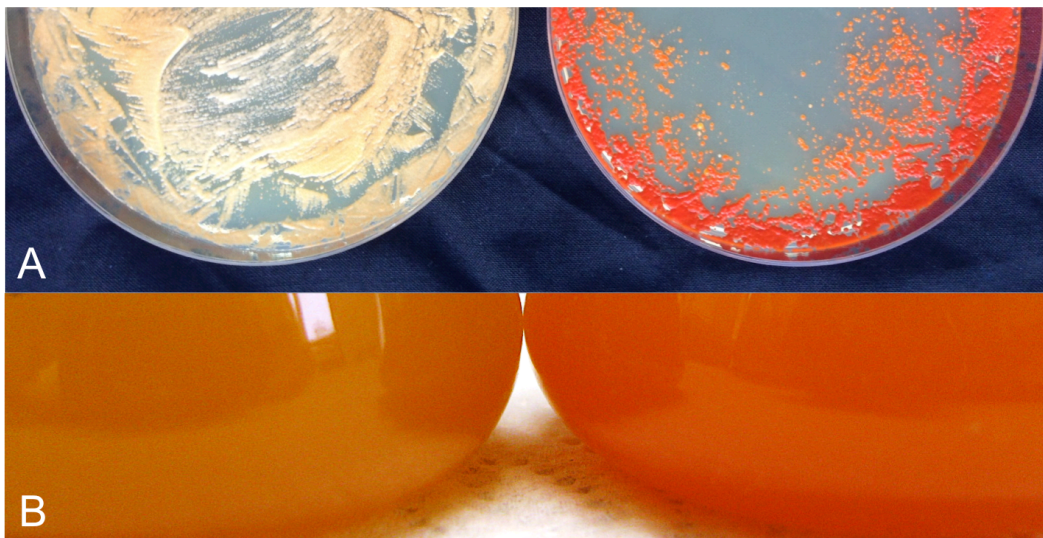
**Abb. 40: Vergleich zwischen Gelatine- und Cryo-basierter Dauerkultur.**

In diesen Fotografien ist ein Ausstrich einer Gelatine-basierten Dauerkultur (**A**) einer Cryo-basierten Dauerkultur (**B**) gegenüber gestellt. In beiden Dauerpräparaten ist eine inhomogene Pigmentierung festzustellen, wobei in der cryo-basierten Dauerkultur eine qualitativ stärkere, allgemeine Fehlpigmentierung zu beobachten ist.

### 3. Ergebnisse

#### 3.7.8.2 Einfluss von Antibiotika auf die Pigmentierung

Ein weiterer Aspekt zur möglichen Erklärung der Stabilität der Pigmentierung über experimentellen Weg soll nun über den Einsatz von Antibiotika als steter Selektionsdruck erörtert werden. Die kontinuierliche Anwendung von Antibiotika hat bei der Kultivierung und Passagierung des Stammes PR1-104/bkt zu einer schnelleren und über die Passagen hinweg deutlicheren Reduzierung fehpigmentierter Einzelkolonien geführt (siehe Abschnitt 3.6.1). Abb. 41 zeigt eine auf festem YPD-Medium ausgestrichene cryo-basierte Dauerkultur der Transformante AXJ-ASY-4 ohne (Abb. 41 A links) und mit (Abb. 41 A rechts) dem des Stammes entsprechenden Antibiotika. Die Kultur ohne Antibiotikum zeigt einen kompletten Verlust der roten Pigmentierung, während die Kultivierung auf Antibiotikahaltigem Medium eine zwar inhomogene, aber dennoch orange bis rötliche Pigmentierung aufweist. Abb. 41 B zeigt links die Flüssigkultur einer Transformante ohne Antibiotikum im Nährmedium und in Abb. 41 B rechts die gleiche Transformante mit Antibiotikum im Nährmedium. Deutlich zu sehen ist auch hier der Farbunterschied zwischen den beiden Kulturen. Ohne Antibiotikum kultivierte Stämme zeigen eine weitaus blässere Farbe als Kulturen unter permanenten Selektionsdruck.



**Abb. 41: Kultivierung von AXJ-ASY-4 ohne und mit Antibiotikum.**

Die Abbildung zeigt zwei Fotografien von jeweils der Kultivierung der Transformante AXJ-ASY-4 auf festem YPD-Medium ohne (**A, links**) und mit (**A, rechts**) Antibiotika im Nährboden der Petrischale. Der Ausstrich erfolgte aus einer cryogenisierten Dauerkultur. Deutlich zu sehen ist ein Totalverlust der roten Pigmentierung bei der Kultivierung ohne Selektionsdruck. Mit Applikation von Antibiotika ins Medium weist die Kultur eine rote, wenn auch stellenweise inhomogene, Pigmentierung auf. Eine Kultivierung des Stammes in Flüssigkultur ohne (**B, links**) und mit (**B, rechts**) bestätigt die Eindrücke der Platte. Die Flüssigkulturen wurden jeweils von einer roten Einzelkolonie angeimpft. Ohne Selektionsdruck erscheint die Kultur sichtbar blässer als die Kultur mit Antibiotikaapplikation.



### 4. Diskussion

Astaxanthin (3-3'-Dihydroxy-4-4'-Diketo- $\beta$ -Carotin) ist ein rotfarbiges Xanthophyll, welches vor allem in der Aquakultur als Futtermittelzusatz und Kosmetika als färbendes Pigment eingesetzt wird. Des Weiteren wird es inzwischen auch vermehrt in der medizinischen Forschung aufgrund der starken antioxidativen Eigenschaften verwendet. Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt größtenteils über chemische Synthese, da eine biotechnologische Produktion wirtschaftlich noch immer keine Konkurrenz zur chemischen Synthese darstellt (Rodriguez-Saiz et al. 2010, Schmidt et al. 2011). Für die kosmetische Industrie wird Astaxanthin jedoch aus Gründen des Marketings primär aus *Haematococcus* gewonnen (Guerin et al. 2003). *De-novo* synthetisiert neben der Alge *Haematococcus pluvialis* nur der Pilz *Phaffia rhodozyma* Astaxanthin in substantziellen Mengen. Es wird aufgrund des weltweit steigenden Bedarfs bereits seit vielen Jahren eine Lösung gesucht, um den Anteil an biotechnologisch hergestellten Astaxanthin zu erhöhen. Um die Möglichkeiten der Produktion in *Phaffia rhodozyma* zu bewerten, wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Konzepte zur Steigerung der Astaxanthinsynthese verfolgt. Hauptsächlich konnte eine Steigerung durch Optimierung des Anzuchtmediums (Ni et al. 2007, Flores-Cotera et al. 2001, Fontana et al. 1997), die Verwendung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen (Kim et al. 2007, Nghiem et al. 2009, Meyer und du Preez 1994, Domínguez-Bocanegra und Torres-Muñoz 2004) oder Behandlung mit Mutagenen chemischen (Miao et al. 2011, Meyer et al. 1993, Fang und Cheng 1992) oder physikalischen (Najafi et al. 2011, Sun et al. 2004) Ursprungs erzielt werden. Der Einsatz von molekularbiologischen Werkzeugen für eine genetische Modifikation der Carotinoidsynthese in *Phaffia* beschränkte sich bisher auf die Charakterisierung einzelner oder mehrerer am Biosyntheseweg beteiligten Gene (Breitenbach et al. 2011, Visser et al. 2003 und 2005, Verdoes et al. 1999 und 1997), um die Zusammenhänge der Carotinoidbiosynthese in *Phaffia* aufzuklären. Die vorliegende Arbeit hatte dagegen zum ersten Mal das Ziel, die Möglichkeiten der Kombination aus gezielter genetischer Modifikation auf Basis von chemisch mutagenisierten *Phaffia rhodozyma* Stämmen zur verstärkten Astaxanthinsynthese zu untersuchen. Es sollte geklärt werden, ob sich die Astaxanthinsynthese von chemisch mutagenisierten

## 4. Diskussion

*Phaffia*-Stämmen über „metabolic engineering“ des fast gesamten Carotinoïdbiosynthesewegs noch weiter steigern lässt.

### 4.1 Herstellung eines Astaxanthin-Hochproduzenten

Für diese Arbeit wurden *Phaffia rhodozyma* Stämme bereitgestellt, welche eine gesteigerte Carotinoïdsynthese aufweisen. Die Stämme wurden über chemische Mutagenese mittels N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (NTG) hergestellt. Der Carotinoïdgehalt dieser Stämme übertrifft den des Wildtyps CBS6938 um das 17-20-fache, jedoch werden nur etwas mehr als die Hälfte der synthetisierten Carotinoïde zum Endprodukt des Synthesewegs, Astaxanthin, metabolisiert. Die Hintergründe, welche die Hochregulierung der Carotinoïdsynthese bewirken, sind hingegen unbekannt. Schlüsselenzyme des Carotinoïdsynthesewegs in *Phaffia*, welche zur Erhöhung des Carotinoïdgehalts beitragen sind die GGPP-Synthase CRTE (Breitenbach et al. 2011) und die Phytoensynthase/ Lycopinzyklase CRTYB (Visser et al. 2003). Allerdings müssen nicht ausschließlich ein oder mehrere Enzyme der Carotinoïdbiosynthese mutiert sein, damit es zu einer Steigerung der Carotinoïdsynthese kommt. In *Phaffia* werden Carotinoïdvorläufer wie Isopentenyl-Diphosphat (IPP) über den Mevalonat-Weg bereitgestellt. Eine Heraufregulierung dieses Synthesewegs führt zu einer Steigerung der Carotinoïdsynthese (Shimada et al. 1998). Wurde in *Phaffia* die Terpenoidsynthese durch die NTG-Behandlung gesteigert, so stehen mehr Carotinoïd-Vorstufen für die Carotinoïdsynthese zur Verfügung, was in einem erhöhten Carotinoïdgehalt resultieren könnte. Eine weitere Erklärung für die heraufregulierte Carotinoïdsynthese in den Mutanten könnte ein gesteigerter Lipidstoffwechsel sein. Carotinoïde sind verhältnismäßig unpolare, wasserunlösliche Verbindungen. In Zellen sind sie entweder in Membranen verankert (McNulty et al. 2008) oder werden in Liposomen und Lipiden gespeichert (Matthäus et al. 2013, Ye et al. 2012). So konnte unter anderem in Pilzen der Ordnung Mucorales gezeigt werden, dass eine erhöhte Verfügbarkeit von Lipiden und Fettsäuren zu einer Stimulierung der Carotinoïdsynthese führt (Lampila et al. 1985). Werden in den Mutanten vermehrt Speichermöglichkeiten für Carotinoïde synthetisiert, so könnte dies auch bei den *Phaffia*-Mutanten zu einer Heraufregulierung der Carotinoïdsynthese führen. Aufgrund der antioxidativen Eigenschaften der Carotinoïde könnte ein erhöhtes Niveau an zellulären reaktiven Sauerstoffspezies in den Mutanten zu einer heraufregulierten Carotinoïdsynthese führen. Untersuchungen in *Phaffia rhodozyma*

## 4. Diskussion

zeigten, dass die Gegenwart von reaktiven Sauerstoffspezies die Carotinoidsynthese induzieren kann und zur Akkumulation von Carotinoiden führt (Schroeder und Johnson 1995). Eine Studie über *Haematococcus pluvialis* zeigte ebenso einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Carotinoidsynthese (Kobayashi et al. 1993).

### 4.1.1 Exploratorische Phase

Die bereitgestellten Mutanten AXJ-20 und AXG-13 verfügen über eine enorm gesteigerte Carotinoidsynthese. Die Mutanten unterscheiden sich auch noch in anderen Bereichen stark vom Wildtyp CBS6938. Es konnten zwar grundsätzlich die gleichen Carotinoidzusammensetzungen in Mutanten und Wildtyp nachgewiesen werden, allerdings unterschieden sich die Anteile der einzelnen Carotinoide am Gesamtcarotinoidgehalt teilweise deutlich. So wurden Astaxanthin-Vorläufer im Wildtyp bis zu 70 % des Gesamtcarotinoids zu Astaxanthin umgesetzt. Dies bedeutet, dass die Astaxanthinsynthese in den Mutanten nicht mehr gleich effizient abläuft wie im Wildtyp. Produkte des monozyklischen Carotinoidsynthesewegs, wie Keto-Hydroxy-Torulin, konnten in den Mutanten nicht mehr detektiert werden, was auf eine schnellere Zyklisierung von Lycopin durch CRTYB hindeutet, bevor es zu einer Desaturierung von Lycopin durch CRTI kommt (vgl. Abb. 8, S.25). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in den Mutanten CRTYB bereits heraufreguliert ist. Das Nebenprodukt Keto-Hydroxy-Torulin konnte im Wildtyp, wenn auch nur zu kleinem Anteil, nachgewiesen werden.

Visser et al. (2003) zeigten im Wildtyp CBS6938, dass es zu einem erhöhten Carotinoidgehalt kommt, wenn mehr CRTYB für die Carotinoidsynthese zur Verfügung steht. Um herauszufinden, ob sich dieser Effekt auch auf die Mutanten übertragen lässt, welche ohnehin schon über eine deutlich gesteigerte Carotinoidsynthese verfügen und ob die Mutanten generell für „metabolic engineering“ geeignet sind, sollte in einer ersten exploratorischen Transformation die Phytoensynthase/Lycopinzyklase *crtYB* überexprimiert werden. Zugleich musste, zum Zweck der Optimierung der Astaxanthinsynthese durch „metabolic engineering“, ermittelt werden, ob einzelne, mutierte Gene für die heraufregulierte Carotinoidsynthese in den Mutanten verantwortlich sind und es dadurch zu Limitierungen im Syntheseweg kommt.

#### 4. Diskussion

Aus diesem Experiment konnte ein Transformant isoliert werden, in welchem der Carotinoidgehalt weiter deutlich gesteigert werden konnte. Durch eine Steigerung von CRTYB wurde die Synthese von  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin-Vorläufern (3-OH-Echinenon, Echinenon und Canthaxanthin) weiter verstärkt. Das Experiment zeigte, dass sich in den Mutanten die Carotinoidsynthese noch weiter steigern lässt, es also keine allgemeine Begrenzung der Carotinoidbiosynthese vorliegt, und die Mutanten ihre Transformierbarkeit nicht durch die Mutagenisierung verloren haben.

Um einen Eindruck über das Maß der gesteigerten Carotinoidsynthese durch die Mutagenisierung in Verbindung mit der Überexpression von *crtYB* auf biotechnologischem Niveau zu erlangen, wurde die Carotinoidsynthese der Transformante AXJ-20/*crtYB* in einem Fermentationsprozess im DECHEMA Forschungsinstitut unter Leitung von PD Dr. Jens Schrader untersucht (Gassel et al. 2013). Nach einer Dauer der Fermentation von 216 Stunden zeigte die Mutante AXJ-20 einen Astaxanthingehalt von 3,9 mg/ gdw. In der Transformante AXJ-20/*crtYB* konnte im Fermenter sogar ein Astaxanthingehalt von 9,7 mg/ gdw erreicht werden (Wildtyp CBS6938 0,43 mg/ gdw). Dies ist die höchste jemals publizierte Menge an Astaxanthin, welche durch Fermentation eines Astaxanthin-synthetisierenden Organismus erreicht wurde (vgl. Rodriguez-Saiz et al. 2010, Schmidt et al. 2011).

Allerdings deutete die Carotinoidzusammensetzung der Transformante auf eine Limitierung der Astaxanthinsynthese ASY hin, da der Astaxanthinanteil am Gesamtcarotinoidgehalt unter 50 % fiel. Astaxanthin-Vorläufer wurden von der endogenen ASY nicht mehr effizient zu Astaxanthin metabolisiert. Produkte des monozyklischen Synthesewegs konnten jedoch auch in der Transformante nicht detektiert werden. Wenn der verminderte Astaxanthinanteil auf eine Limitierung der ASY zurückzuführen ist, könnte diese Limitierung durch eine zweite exploratorische Transformation mit der ASY aufgehoben werden. Um dies herauszufinden, wurde der Stamm AXJ-20/*crtYB* mit einer Überexpressionskassette für ASY transformiert. Die Astaxanthinsynthese konnte durch das Einbringen dieser weiteren Kopien der *asy* deutlich optimiert werden. In der Transformante wurden nahezu alle Astaxanthin-Vorstufen verstärkt zu Astaxanthin metabolisiert. Zusätzlich zu dieser Optimierung der Astaxanthinsynthese, konnte der Gesamtcarotinoidgehalt weiter gesteigert werden. Eine Steigerung des Gesamtcarotinoids wurde hierbei allerdings nicht erwartet. Die

## 4. Diskussion

ASY ist eine P450-Hydroxylase (Alvarez et al. 2006), welche die Oxygenierung von  $\beta$ -Carotin katalysiert und nicht für eine Erhöhung des Gesamtcarotinoidgehaltes verantwortlich ist. Eine mögliche Erklärung für die weitere Steigerung der Carotinoidsynthese könnte eine Art „Feedback“ sein, bei der die Ermangelung an Carotinoidvorstufen und Astaxanthinvorläufern dazu führt, dass die Terpenoid- und Carotinoidsynthese hochreguliert wird. Astaxanthin besaß einen Anteil von 90 % des Gesamtcarotinoids. Dies weist darauf hin, dass nahezu alle Astaxanthin-Vorstufen in das Endprodukt metabolisiert wurden und die Verfügbarkeit von metabolisierbaren Vorläufermolekülen über den gesamten Syntheseweg in diesem Stamm limitiert ist. Eine sinnvolle, weitere Optimierung der Astaxanthinsynthese liegt hier in der Bereitstellung von Metaboliten für die Carotinoidsynthese. Die beiden exploratorischen Transformationen zeigten, dass eine weitere Steigerung der Carotinoid- und Astaxanthinsynthese der Mutanten durch genetische Modifikation möglich ist. Vorhandene und entstehende Limitierungen können durch weitere genetische Modifikationen behoben werden. Dabei sind die Effekte der Mutagenese und des „metabolic engineering“ kombinierbar und kumulativ. Die Wahl der zu überexprimierenden Gene erwies sich als sehr geeignet zur Herstellung eines Astaxanthin-Hochproduzenten.

### 4.1.2 Erweiterte Optimierung der Astaxanthinsynthese

Die Ergebnisse der exploratorischen Phase zeigten, dass die Carotinoidbiosynthese weiter optimiert werden kann. Bei diesen Transformationen wurden Expressionsplasmide verwendet, welche pro Selektionsmarker nur eine Expressionskassette (*crtYB* oder *asy*), trugen. Zum Zeitpunkt dieser Testphase standen Geneticin (G418) und Hygromycin als Selektionsmarker in geeigneten Transformationsplasmiden zur Verfügung. Dadurch ist die Anzahl der möglichen Überexpressionen von Genen, aufgrund der verfügbaren Selektionsmarker, zusätzlich begrenzt. Um die Carotinoidsynthese noch weiter zu steigern und die Astaxanthinsynthese zu optimieren wurde ein Plasmidsystem entwickelt, welches erlaubt mehr als ein Gen pro Selektionsmarker als Expressionskassette unter konstitutiver Kontrolle in *Phaffia* einbringen zu können. Diese Plasmide stellen Werkzeuge dar, mit welchen ein umfangreicherer Eingriff in die Carotinoidsynthese möglich war. Neben den beiden Expressionsplasmiden mit den Resistenzgenen für

#### 4. Diskussion

Geneticin (G418) und Hygromycin wurde ein weiteres Plasmid mit einer Nourseothricinresistenz entwickelt. Insgesamt konnten mit den neuen Transformationsplasmiden theoretisch sechs verschiedene Gene überexprimiert werden. Zudem sollte herausgefunden werden, ob es Unterschiede zwischen den beiden Transformationsstrategien („1-Gen-1-Plasmid und 2-Gene-1-Plasmid“) bei der Carotinoidsynthese der Transformanten gibt.

Zunächst wurden AXJ-20 und AXG-13 mit einem Plasmid transformiert, welches die beiden Gene *crtYB* und *asy* beinhaltet. Nach den Ergebnissen der exploratorischen Phase war es sinnvoll, die schrittweise Herstellung der Endstämme mit der Überexpression dieser beiden Gene zu beginnen. Der Gesamtcarotinoidgehalt der isolierten Transformanten übertraf die Carotinoidbiosynthese der Transformante AXJ-20/*crtYB/asy* aus der exploratorischen Phase deutlich. Die Carotinoidzusammensetzung der Transformanten war qualitativ vergleichbar mit dem Stamm AXJ-20/*crtYB/asy*. Es konnten die gleichen Carotinoide detektiert werden, jedoch war die prozentuale Verteilung eher in Richtung der Astaxanthin-Vorstufen und  $\beta$ -Carotin hin verschoben. Die Metabolisierung der Astaxanthin-Vorläufer durch die ebenso auf dem Plasmid enthaltenen ASY konnte nicht auf einem vergleichbaren Niveau optimiert werden, wie durch die Überexpression der *asy* in der exploratorischen Phase. Der Grund für die geringere, prozentuale Astaxanthinausbeute könnte darin liegen, dass durch die weitere Steigerung des Gesamtcarotinoidgehaltes die Astaxanthin-Synthase ASY erneut limitierend ist und die Menge an synthetisierten Carotinoiden nicht optimal durch die erhöhte Menge an ASY metabolisiert wurde. Das Niveau der Überexpression von *crtYB* und *asy* in den Transformanten der exploratorischen Phase könnte bereits ein Optimum der Mengen der beiden Enzyme darstellen, bei dem sämtliche Metabolite effektiv umgesetzt werden.

Die Transformante AXJ-20/*crtYB/asy* aus der exploratorischen Phase zeigte einen Astaxanthingehalt von 90 %. Dies könnte auf eine Begrenzung der Terpenoidbiosynthese, ausgehend vom Mevalonatweg, hindeuten. Um die Carotinoidsynthese weiter zu steigern, wäre eine Überexpression der Phytoendesaturase CRTI im Carotinoidbiosyntheseweg nicht sinnvoll, da eine erhöhte Menge von CRTI zu einer Desaturierung von Lycopin führen könnte, bevor es zur

#### 4. Diskussion

Zyklisierung durch CRTYB kommt. Dies würde in einer Verstärkung des monozyklischen Carotinoidsynthesewegs resultieren, wobei unerwünschte Nebenprodukte wie oxygenierte Torulin-Derivate entstünden. Sämtliche Produkte des mono-zyklischen Synthesewegs sind für die Astaxanthinsynthese verloren (Visser et al. 2003).

In der nächsten Stufe zur Steigerung der Gesamtcarotinoid- und Astaxanthinsynthese sollten alternativ Schritte der Vorstufenversorgung verstärkt werden. Dazu wurden durch ein Expressionsplasmid mit den Genen *S.c.hmg1* aus dem Mevalonatweg (Shimada et al. 1998, Gu et al. 1997) und *crtE* (Breitenbach et al. 2011) Schlüsselenzyme der Terpenoidbiosynthese erhöhte Mengen an Vorläufermolekülen und Metaboliten wie IPP aus dem Mevalonatweg und GGPP für die Carotinoidbiosynthese bereitgestellt werden. Es sollte herausgefunden werden, ob eine Steigerung der Carotinoidsynthese durch eine erhöhte Verfügbarkeit von frühen Vorläufermolekülen möglich ist und ob es dadurch zu einer Limitierung der Carotinoidsynthese kommt. In allen isolierten Transformanten dieser zweiten Transformationsstufe konnte der Gesamtcarotinoidgehalt, sowie der Astaxanthinanteil, gesteigert werden. Trotz der Erhöhung dieses Anteils bleibt jedoch eine Limitierung der Astaxanthinausbeute bei steigendem Gesamtcarotinoidgehalt auf der Seite der ASY erkennbar. Die Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse aus der Literatur. Die HMG-CoA-Reduktase ist das Enzym des Mevalonatweges, welches den größten Einfluss auf die Carotinoidsynthese ausübt. Überexpression der katalytischen Domäne des Enzyms alleine resultierte in einer stärkeren Erhöhung der Carotinoidsynthese in *Candida utilis* als eine Überexpression des gesamten Enzyms (Shimada et al. 1998). Wie groß der Einfluss dieser trunkierten HMG-CoA-Reduktase allerdings in *Phaffia* wirklich auf die Carotinoidsynthese ist, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Die zuvor schon vorhandene Limitierung durch die Überexpression von CRTYB in Verbindung mit der ASY ist auch in den Transformanten der zweiten Stufe vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass die Astaxanthinsynthese ASY weiterhin der limitierende Schritt für die Oxygenierung der Astaxanthin-Vorläufermoleküle darstellt.

Um diese Limitierung zu beseitigen und um eine effizientere Metabolisierung der Intermediate zu gewährleisten, sollten weitere Kopien der *asy* über eine dritte Transformation in das Genom eingebracht werden. Die so hergestellten

#### 4. Diskussion

Transformanten wiesen eine deutlich verbesserte Metabolisierung der Carotinoid-Zwischenstufen zu Astaxanthin auf. Die Astaxanthinmenge stieg in der Transformante mit dem höchsten Anteil auf über 70 %. Neben des erhöhten Astaxanthin-Anteils, stieg auch der Gesamtcarotinoidgehalt in den Transformanten. Dieser Effekt wurde ebenso in der exploratorischen Phase bereits festgestellt und kann durch eine positive Stimulation der Carotinoidsynthese durch eine erhöhte Menge der ASY erklärt werden. Es bleibt zu erklären, warum es nach einer weiteren Erhöhung der Menge an ASY nicht zu einer ähnlich starken Effizienz der Metabolisierung von Vorläufer-Molekülen zu Astaxanthin kam wie in der der exploratorischen Phase.

Die Aktivität der Astaxanthinsynthese ist abhängig von der Aktivität eines weiteren Proteins. In der Arbeit von Alcaíno et al. 2008 wurde eine Reduktase für die Astaxanthinsynthese identifiziert, welche nachweislich für die Funktionalität der ASY notwendig ist. Dieses Enzym ist eine Reduktase (ASR) aus der Familie der P450-Cytochrome (Alcaíno et al. 2008 ) und liefert der Astaxanthinsynthese die Elektronen, welche für die Oxygenierung von Substraten der ASY benötigt werden. Es wurden dort verschiedene Transformanten hergestellt, in welchen *asr* durch eine Hygromycinresistenzkassette ausgetauscht wurde. Die Deletion im Stamm CBS6938 resultierte in einer gelb pigmentierten Transformante, welche kein Astaxanthin mehr synthetisieren konnte und  $\beta$ -Carotin akkumulierte. Diese Erkenntnisse könnten darauf hindeuten, dass es in den hier hergestellten Transformanten zu einer Limitierung der von ASR bereitgestellten Elektronen und somit zu einer Reduzierung der theoretischen Leistung der Astaxanthinsynthese kommen könnte. Eine Überexpression von *asr* könnte die Aktivität der ASY weiter steigern und zu einem erhöhten relativen Astaxanthinanteil führen.

In diesen Transformanten der dritten Stufe wurde fast der gesamte Carotinoidbiosyntheseweg, ausgehend vom Mevalonatweg, bis Astaxanthin über genetische Modifikationen optimiert. Die Transformanten weisen den höchsten, bis heute publizierten Astaxanthingehalt auf (Tab. 30). Die Experimente zeigten erstmals in eindrucksvoller Form, dass durch die Kombination aus chemischer Mutagenese und gezielter genetischer Modifikation ein sogar industriell interessanter Astaxanthin-Hochproduzent (Johnson und Schroeder 1995) hergestellt werden kann. Die Kombination dieser beiden Methoden erwies sich als hoch effizient. Grundsätzlich



#### 4. Diskussion

konnten in den Mutanten und Transformanten die gleichen Limitierungen aufgezeigt werden, welche durch ähnliche Experimente am Wildtyp CBS6938 bereits publiziert wurden. Die Mutationen in den Stämmen AXJ-20 und AXG-13 weisen dabei auf eine allgemeine Heraufregulierung der gesamten Carotinoidbiosynthese hin, deren Hintergründe weiter unbekannt bleiben. Es scheint jedoch unwahrscheinlich, dass nur einzelne Gene des Biosynthesewegs durch die Mutationen heraufreguliert wurden, da sich der gesamte Carotinoidbiosyntheseweg durch gezielte genetische Modifikationen schrittweise wie im Wildtyp heraufregulieren ließ.

### 4.2 Einfluss der Anzahl integrierter Transformationsplasmide

Bei der Transformation von *Phaffia rhodozyma* zur Herstellung der Astaxanthin-Hochproduzenten wurden integrative Expressionsplasmide verwendet, die über homologe Rekombination fest in das Genom integriert werden. Dabei ist die Häufigkeit mit der ein Plasmid in das Genom aufgenommen wird zufällig. Die Eintrittsstelle für die Integration der Plasmide befindet sich im Bereich sich wiederholender Sequenzen ribosomaler DNA. Aus der Literatur ist bekannt, dass der *Phaffia*-Stamm CBS6938 61 Kopien des rDNA-Eintrittslokus für Transformationen mit den etablierten Plasmidsystemen besitzt (Wery et al. 1997). Es können demnach theoretisch maximal 61 Kopien eines Plasmids in das Genom integriert werden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Steigerung der schrittweisen Carotinoid- bzw. Astaxanthinsynthese in den Transformanten und der Anzahl der integrierten Expressionsplasmiden zu finden, wurde die Anzahl der Integrationen über „Realtime-PCR-Analysen“ mit genomischer DNA der Transformanten untersucht. Hierbei kann allerdings nur teilweise ein kausaler Zusammenhang zwischen der Anzahl der Plasmidintegration und der Carotinoidsynthese in den Transformanten festgestellt werden. Der Gesamtcarotinoidgehalt konnte durch Überexpression von *crtYB* und *asy* in der Transformante der AXJ-Linie um 36%, in der Transformante der AXG-Linie um 46% gesteigert werden. Diese Transformante enthält auch doppelt so viele Plasmidintegrationen. In dem Fall der ersten Transformationsstufe synthetisiert die Transformante mit mehr Integrationen des Plasmids tatsächlich auch mehr Carotinoide als die Transformante mit weniger Integrationen der *crtYB/asy*-Expressionskassette. Die Anzahl der Integrationen hatte jedoch in beiden Transformanten keinen Effekt auf die Metabolisierung von Astaxanthin-Vorläufern zu Astaxanthin.

In der zweiten Stufe, in welcher die Terpenoidsynthese und die GGPP-Synthese über die Überexpression der *HMG-CoA-Reduktase* und *crtE* erhöht wurde, kann ein solcher Zusammenhang nicht direkt nachgewiesen werden. Obwohl in der Transformante der AXJ-Linie eine Integration mehr nachgewiesen werden konnte, zeigte die Transformante der AXG-Linie mit acht Integrationen eine um 10 % höhere Zunahme des Gesamtcarotinoidgehaltes. Jedoch stieg der prozentuale Anteil an Astaxanthin in der Transformante der AXJ-Linie um 10% an, während der Anteil in der Transformante der AXG-Linie dagegen auf 55-56 % unverändert blieb.

#### 4. Diskussion

Bei der Untersuchung der Integrationshäufigkeit des Expressionsplasmides der dritten Transformationsstufe kann ein Zusammenhang festgestellt werden. Mit der dritten Transformation sollte durch das Einbringen weiterer Kopien der ASY eine effizientere Metabolisierung der Astaxanthin-Vorläufer gewährleistet werden. Die Transformante der AXJ-Linie besitzt nach Einbringen des letzten Expressionsplasmides insgesamt zehn Kopien der überexprimierten ASY, die Transformante der AXG-Linie verfügt über acht Kopien insgesamt. Bei der Gesamtzahl der ASY-Integrationen sind die Kopien der ersten Transformationsstufe mit einberechnet. Der Astaxanthin-Anteil in der Transformante der AXJ-Linie liegt um 5 % höher als in der Transformante der AXG-Linie.

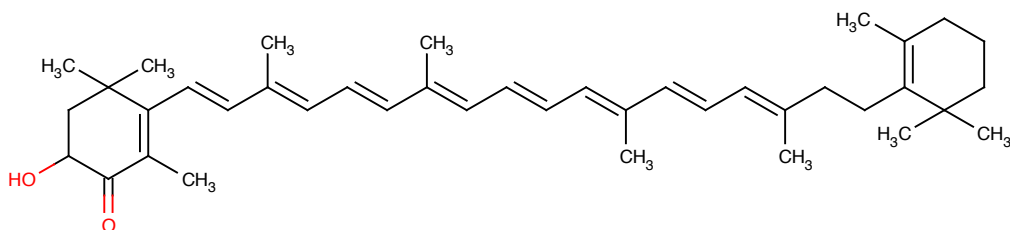
Die Anzahl der Plasmidintegrationen in den hergestellten Transformanten liegt auf vergleichbarem Niveau wie in der Arbeit von Wery et al. (1998). Obwohl ein Jahr zuvor eine Kanamycin-Resistenzkassette erfolgreich in 45 Kopien in das Genom stabil transformiert werden konnte (Wery et al. 1997), beschreiben andere Arbeiten nach densitometrischer Analyse von Southern-Autoradiogrammen Kopienzahlen integrierter Plasmide von deutlich geringeren fünf bis zehn Kopien (Wery et al. 1998). Einen entscheidenden Einfluss auf die Häufigkeit der Integration wird dem verwendeten GPDH-Terminator zugesprochen. Transformationen mit Plasmiden, welche eine Kanamycin-Resistenz mit GPDH-Promotor und –Terminator enthalten, resultierten in einer hohen Transformationseffizienz (bis zu 1000 Transformanten pro  $\mu\text{g}$  DNA) bei jedoch niedrigen Kopienzahlen (5-10). Wurde ein Plasmid transformiert, welches die Kanamycin-Resistenzkassette ohne GPDH-Terminatorsequenz beinhaltete, fiel die Transformationseffizienz um das 10-fache (bis 100 Transformanten pro  $\mu\text{g}$  DNA), jedoch erhöhte sich die Kopienzahl des integrierten Plasmids auf 60 (Wery et al. 1998). Eine Terminatorregion am 3'-Ende eines Gens führt post-transkriptionell zu einer stabileren Form der mRNA (Raué 1994). Dadurch erhöht sich die Zahl der Transformanten in *Phaffia rhodozyma* bis um das 200-fache, obwohl viel weniger Kopien des Kanamycin-Resistenzgens integriert wurden. Daraus folgt, dass die Häufigkeit wie oft ein Plasmid in das *Phaffia*-Genom integriert wird, ein selektiver Prozess sein kann. Um mit einer instabilen mRNA des Kanamycin-Resistenzgens lebensfähig zu sein, müssen mehr Kopien des Gens integriert werden, um die Anzahl der translatierbaren mRNAs zu erhöhen. Eine Transformation könnte unter einer starken Erhöhung des selektiven Druckes in einer höheren Anzahl von

#### 4. Diskussion

Plasmidintegrationen resultieren. Jedoch ist die Anzahl der maximal integrierbaren Expressionsplasmide begrenzt. Wenn tatsächlich von 61 Integrationsmöglichkeiten auszugehen ist, so wurden in den hier vorgestellten Transformanten bereits 19 (AXJ-Linie), bzw. 16 Eintrittsloki nach den drei Transformationen belegt. Das Maximum der Eintrittsloki limitiert somit die möglichen Effekte eines kombinatorischen „metabolic engineering“. Wenn durch hohen Selektionsdruck Transformanten mit hohen Integrationsanzahlen isoliert werden (Wery et al. 1998), kann es sein, dass eine dritte oder gar eine vierte Transformation mit weiteren Genen keinen oder einen nur sehr geringen Effekt zeigt.

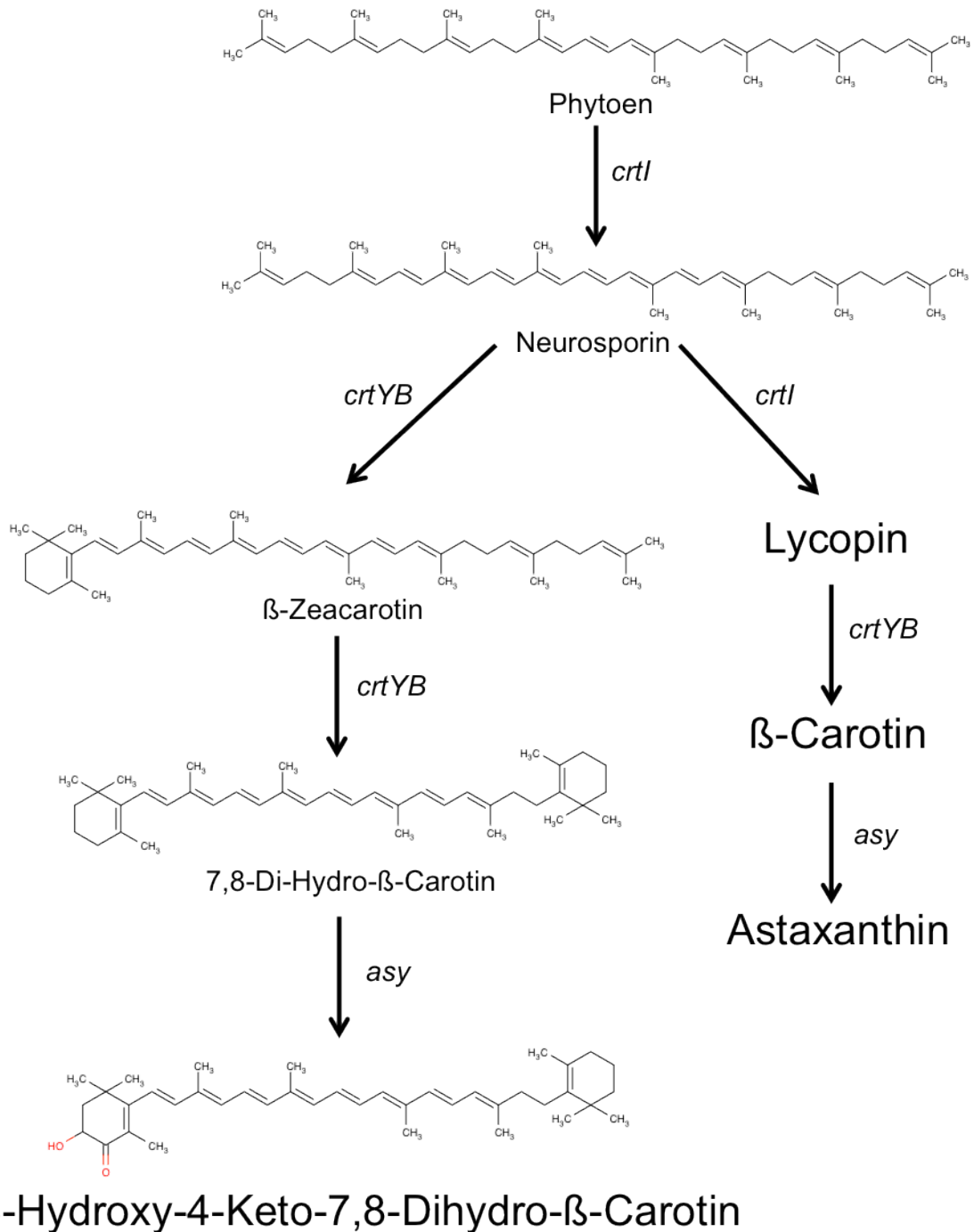
### 4.3 Identifizierung auffälliger Carotinoide in AXJ-20/crtYB

Bei der Analyse der Carotinoidzusammensetzung der ersten Transformante der exploratorischen Phase AXJ-20/crtYB wurden einige auffällige Carotinoide mit einem Keto-Spektrum und einem Absorptionsmaximum bei 450 nm detektiert. Diese Carotinoide wurden ausschließlich in der Transformante AXJ-20/crtYB detektiert und konnten weder im Wildtyp CBS6938, noch in einer der Mutanten nachgewiesen werden. Es scheint, als sei die Synthese dieser Carotinoide eine direkte Folge der Überexpression von *crtYB* und somit des Eingriffs in den Carotinoidbiosyntheseweg. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Lycopincyclasen (bakterielle CRTY von *E. uredoovora* oder die pflanzliche LCY aus *C. anuum*), fähig sind 7,8-Dihydro-Endgruppen wie beispielsweise an Neurosporin zu zyklisieren (Takaichi et al. 1996). Grund für die Synthese der Ketocarotinoide mit einem Absorptionsmaximum von 450 nm könnte demnach die Zyklisierung von Neurosporin zu  $\beta$ -Zeacarotin durch das, nach der Transformation, erhöht vorhandene CRTYB sein, bevor die Neurosporin-Desaturase CRTI die Kohlenstoffkette weiter desaturiert und Lycopin entstehen kann.  $\beta$ -Zeacarotin kann nicht weiter desaturiert werden, worauf es zu einer Zyklisierung dieses Moleküls zu 7,8-Dihydro- $\beta$ -Carotin durch CRTYB kommt (Abb. 42). Die Ketolierungs- und Hydroxylierungsreaktionen werden anschließend durch die Astaxanthinsynthase ASY durchgeführt. Abb. 43 zeigt einen möglichen Syntheseweg von 3-OH-4-Keto-7,8-Dihydro- $\beta$ -Carotin, dem 450 nm-Carotinoid mit dem größten Anteil am Gesamtcarotinoid. Eine umfassende Charakterisierung dieser Carotinoide ist einer Folgearbeit am Wildtyp CBS6938 zu entnehmen (Ledetzky et al. 2014).



**Abb. 42: Struktur von 3-OH-4-Keto-7,8-Dihydro- $\beta$ -Carotin.**

#### 4. Diskussion



**Abb. 43: Synthese von 3-OH-4-Keto-7,8-Dihydro-β-Carotin.**

Das Schema zeigt den möglichen Syntheseweg von 3-OH-4-Keto-7,8-Dihydro-β-Carotin. Durch die Überexpression von *crtYB* kommt es zu einer Monozyklisierung von Neurosporin. Das entstandene β-Zeacarotin wird anschließend weiter zu 7,8-Dihydro-β-Carotin zyklisiert, worauf die Astaxanthinsynthase ASY die folgenden Hydroxylierungs- und Ketolierungsschritte durchführt. CRTYB konkurriert um das Substrat Neurosporin, welches normalerweise durch die Phytoen-Desaturase CRTI weiter zu Lycopin desaturiert wird.

### **4.4 Stabilität der Mutanten und Transformanten**

In dieser Arbeit wurde mit Organismen gearbeitet, in deren Stoffwechsel über chemische Mutagenese und gezielter genetischer Modifikation eingegriffen wurde. Dieser Eingriff führte zu Stämmen, welche über eine stark erhöhte Carotinoidsynthese verfügen. Das bedeutet, dass die notwendigen Ressourcen für den primären und sekundären Stoffwechsel vermehrt für die Carotinoidsynthese bereitgestellt werden müssen, was zu einer Verarmung oder sogar zu einer Deregulierung anderer Stoffwechselwege führen kann. Der auffälligste Nebeneffekt der Mutanten und Transformanten, welcher zu jedem Zeitpunkt der Bearbeitung beobachtet werden konnte, war der Verlust der einheitlichen Pigmentierung der unterschiedlichen Kulturen. Darüber hinaus verzeichneten die Mutanten und Transformanten unter normalen Anzuchtsbedingungen ein langsames Wachstum und geringere Zelldichten, verglichen mit dem Wildtyp CBS6938. Die Gründe für diese Effekte sind noch immer unbekannt, da die gesamte Tragweite einer chemischen Mutagenese nur sehr schwierig vollständig aufzuschlüsseln ist. Es konnten jedoch Strategien entwickelt werden, den Umgang mit diesen Effekten zu verstehen und um diese gering genug zu halten, sodass sie bei der Bearbeitung eine nur untergeordnete Rolle spielten.

#### **4.4.1 Stabilität und Eigenschaften der chemischen Mutanten**

Bereits während der ersten Kultivierung der Mutantanten stellte sich heraus, dass die als cryogenisierter Dauerkultur bereitgestellten, Stämme deutliche Unterschiede des Phänotyps im Vergleich zum Wildtyp CBS6938 zeigten. Unter anderem wies die Pigmentierung der Kolonien eine deutliche Inhomogenität auf. Diese Inhomogenität konnte allerdings über die Selektion und Passagierung roter Einzelkolonien über mehrere Anzuchtszyklen behoben werden. Es war durch diese Methode möglich stabil pigmentierte Kulturen der Mutanten herzustellen. Es gibt unterschiedliche Ansätze, um diese grundsätzliche Instabilität zu erklären.

Bei der Charakterisierung der Stämme fiel neben der Instabilität der Pigmentierung auf, dass die Stämme nicht mehr zur teleomorphen Form der Fortpflanzung (Golubev 1995) befähigt waren, während der Wildtyp CBS6938 weiterhin zur Sporulation fähig war. Diese Form der teleomorphen Sterilität kann auf die massive, chemische

#### 4. Diskussion

Mutagenese zurückgeführt werden. Rustchenko-Bulgac und Howard (1993) beschrieben, dass sexuell sterile Stämme der Hefe *Candida albicans* eine direkte phänotypische Konsequenz von genomischen Instabilitäten sind (Rustchenko-Bulgac und Howard 1993) und die genetische Rekombination während der Mitose fördert.

Zudem konnte in *Candida albicans* eine hohe Variabilität des Karyotyps unter verschiedenen Wildstämmen und Mutanten festgestellt werden, was auf eine hohe genetische Flexibilität hindeutet (Rustchenko-Bulgac 1991). In *Phaffia rhodozyma* konnte ebenfalls ein ausgeprägter Polymorphismus des Karyotyps festgestellt werden. So konnten in verschiedenen Isolaten von *Phaffia rhodozyma* elektrophoretisch zwischen sieben und dreizehn chromosomale Banden nachgewiesen werden (Nagy et al. 1994). In einer anderen Studie wurde zusätzlich noch beim Vergleich des Wildstamms mit Mutanten ein ausgeprägter Längenpolymorphismus an neun Chromosomen des *Phaffia*-Erbgutes festgestellt, welcher sich direkt auf die Carotinoïdbiosynthese auswirkte (Cifuentes et al. 1997). Diese chromosomalen Polymorphismen beinhalten die Möglichkeit zur verstärkten genetischen Rekombination während mitotischer Teilungsprozesse und führen somit chromosomenübergreifend zu genetischen „Re-Arrangements“. Genetische Konversionen bilden hierbei stets die Möglichkeit zu genetischer Instabilität durch eine hohe Variabilität der genetischen Ordnung.

Die Heraufregulierung der Carotinoïdbiosynthese in den chemischen Mutanten könnte eine direkte Folge eines erhöhten, zellulären, oxidativen Stresses sein. In Hefe wurden die Gene *ntg1* und *ntg2* untersucht, welche als Homologe zur bakteriellen DNA Polymerase III identifiziert wurden (Alseth et al. 1999). Die bakterielle Endonuclease III repariert DNA-Schäden, welche durch Oxidation von Pyrimidinbasen hervorgerufen werden. Defiziente Hefestämme für NTG1 und NTG2 zeigten eine stark erhöhte Mutationsrate aufgrund nicht korrigierter DNA-Schäden (Alseth et al. 1999). Sollte es in den chemischen Mutanten AXJ-20 und AXG-13 zu einer Beeinträchtigung von ähnlichen DNA-Reparaturmechanismen kommen, so kann von einer Destabilisierung der DNA ausgegangen werden. In einer anderen Arbeit konnte beobachtet werden, dass Mutationen von DNA-Reparaturmechanismen stark mit einer genetischen Rekombination während mitotischer Prozesse verknüpft sind (Boram und Roman 1976). Die Mutagenese der verwendeten Hefestämme wurde dort durch UV-



## 4. Diskussion

Bestrahlung erzielt. Die Art der DNA-Schäden wurde auch hier als oxidierte Pyrimidinbasen identifiziert.

Oxidativer Stress, welcher direkte Folgen für Nukleinsäuren haben kann, führt z.B. in Algen zu einer signifikanten Erhöhung der Carotinoidbiosynthese (Kobayashi et al. 1993, Bouvier et al. 1998, Boussiba 2000) aufgrund der antioxidativen Eigenschaften von Carotinoiden. Wenn DNA-Reparaturmechanismen gestört sind, können vermehrte oxidative Schäden für eine Hochregulierung der Carotinoidbiosynthese sorgen, worauf im Phänotyp der Stämme auch die Intensität der Pigmentierung zunimmt.

### 4.4.2 Stabilität der Transformanten

Neben den Mutanten, konnte eine Destabilisierung der Pigmentierung auch bei den hergestellten Transformanten beobachtet werden. Es wurden stets nur stabile, homogen pigmentierte, *Phaffia*-Kulturen in den Transformationen eingesetzt. Darum könnte die beobachtete Instabilität der Transformanten auch ein Effekt der Transformation selbst sein.

Grundsätzlich lassen sich zwei Möglichkeiten unterscheiden, wie ein Organismus mit Fremd-DNA transformiert werden kann. DNA kann zum Einen als episomale Sequenz eingebracht werden. Hierbei repliziert sich die eingebrachte DNA im Organismus autonom über einen eigenen Replikationsursprung, autonom replizierende Sequenzen (ARS) oder über centromerische Sequenzen auf dem Plasmid zur synchronisierten Replikation mit dem Zellzyklus (Dani und Zakian 1983). Die Stabilität episomaler Plasmide ist allerdings stark von den Kultivierungsbedingungen abhängig, da der Akzeptorstamm das Plasmid unter nicht-selektiven Bedingungen im Verlauf mitotischer Zellzyklusprozesse aus der Zelle transloziert oder die DNA degeneriert (Walmsley et al. 1983, Impoolsup et al. 1989, Christianson et al. 1992, Gupta et al. 2001). Um eine Plasmidstabilität zu gewährleisten, liegen auf dem episomalen Plasmid zumeist Auxotrophien oder Antibiotikaresistenzkassetten neben den eigentlichen Expressionskassetten für heterologe Gene vor, welche den Transformanten einen Wachstumsvorteil gegenüber den nicht-transformierten Zellen vermittelt. Eine Möglichkeit, einen dauerhaft unter nicht-selektiven Bedingungen, mitotisch stabilen, episomalen Gentransfer zu vollziehen, liegt bei *S. cerevisiae* in der

#### 4. Diskussion

Verwendung eines optimierten 2 µm-Plasmid-Systems (Ludwig et al. 1993). Wird für einen hefeartigen Organismus eine Möglichkeit zur genetischen Modifikation etabliert, so sind grundsätzlich gängige Methoden der Hefegenetik auch dort anwendbar. So konnten verschiedene Hefen wie *Kluyveromyces lactis* (Das und Hollenberg 1982), *Pichia pastoris* (Cregg et al. 1985) oder *Hansenula polymorpha* (Berardi und Thomas 1990) mit Genen aus *S. cerevisiae* erfolgreich genetisch modifiziert werden. *Phaffia rhodozyma* wird ebenfalls zu den industriellen Hefen gezählt. Auf der Suche nach einer Möglichkeit zur genetischen Transformation wurde auch hier zunächst die Option episomaler Plasmide untersucht (Tanaka und Kawamoto 1999). So wurde eine Kanamycin-Resistenzkassette unter verschiedenen Expressionssystemen (Tn903-Transposon (Grindley und Joyce 1980, Young et al. 1980), *S. cerevisiae* Alkoholdehydrogenase-Promotor ADHI (Zhu und Zhang 1999) und des viralen SV40-Promotors (Takebe et al. 1988)) als zirkuläres Plasmid in *Phaffia rhodozyma* transformiert. Allerdings konnten keine Transformanten über dieses System hergestellt (Tanaka und Kawamoto 1999) werden. Daraufhin wurde eine erfolgreiche Transformationsmethode etabliert, welche auf die chromosomale Integration eines linearen Plasmides über homologe Rekombination im Locus der ribosomalen DNA beruht. Diese Methodik stellt hierbei die zweite Möglichkeit des Gentransfers in einen Akzeptor dar. Für *S. cerevisiae* oder auch *K. lactis* (Rossolini et al. 1992) ist diese Art der genetischen Modifikation schon lange bekannt (Lopes et al. 1989). Auf der Suche nach einem ähnlichen Locus in *Phaffia rhodozyma* wurde in der Arbeit von Tanaka und Kawamoto (1999) genomische DNA von *P. rhodozyma* mit einer Sonde, bestehend aus einem rDNA-Fragment aus *K. lactis*, hybridisiert, worüber eine 3 kbp große rDNA-Sequenz isoliert werden konnte. Diese Sequenz wurde als flankierende Region in einem Plasmid für die Integration von heterologen Expressionskassetten über homologe Rekombination in das *Phaffia*-Genom verwendet. Nach verschiedenen Optimierungen wurde das System als höchst effizient klassifiziert, bei dem die Transformanten als stabile Träger der genetischen Modifikation, auch ohne Selektionsdruck, erscheinen.

Die Stabilität von ins Genom integrierten Plasmiden bei nicht-selektiver Kultivierung ist hoch. So ist die integrative genetische Modifikation bei *Lactococcus lactis* über 100 Generation stabil (Leenhouts et al. 1990), eine enzymvermittelte Integration in das Genom von *Candida albicans* (Brown et al. 1996) zeigte sich gleich stabil unter

#### 4. Diskussion

selektiven und nicht-selektiven Kulturbedingungen. Eid und Sollner-Webb zeigten 1991, dass auch der eukaryotische, parasitäre Einzeller *Trypanosoma brucei* mit einem integrativen Plasmid über Elektroporation transformiert und 100 % stabile Transformanten hergestellt werden konnten. Für die Integration über homologe Rekombination wurde eine Sequenz des in eukaryotischen Systemen hochkonservierten Calmodulin verwendet (Eid und Sollner-Webb 1991). Die stabile Transformation über integrative Plasmide ist hierbei nicht auf einzellige Organismen beschränkt. Über Partikelkanonenbeschuss war es beispielsweise möglich, die multizelluläre Alge *Eudorina elegans* stabil, chromosomal zu transformieren (Lerche und Hallmann 2013). Die Plasmidstabilität nach Transformation von *Phaffia rhodozyma* ist hingegen nicht sofort gewährleistet. Wery et al. (1997) zeigten zwar, dass eine dauerhafte Stabilität bei geeigneten Transformanten selbst nach 15 Generation nicht-selektiver Kultivierung erzielt wurde. Jedoch konnte gezeigt werden, dass es nach der Transformation zu einer Variation des Phänotyps der Transformanten kommt, je nachdem wie viele Plasmidkopien in das Genom integriert wurden. Durch Passagieren mit steigenden, selektiven Druck konnte die Pigmentierung der Transformanten in Kultur stabilisiert werden.

In dieser Arbeit sollten verschiedene *Phaffia*-Stämme genetisch modifiziert und die Art dieser Modifikation anschließend untersucht werden. Es zeigte sich, dass alle in dieser Arbeit hergestellten Transformanten über inhomogene Phänotypen bezüglich ihrer Pigmentierung verfügten.

Nachdem sich in der vorliegenden Arbeit eine Destabilisierung der Carotinoidbiosynthese nach der ersten, exploratorischen Transformation zeigte, wurde die stabile,  $\beta$ -Carotin-akkumulierende Mutante PR1-104 (Girard et al. 1994) als Testplattform zur Überprüfung der Stabilität der Transformation verwendet. Bei diesem Stamm ist die Pigmentierung leicht zurück zu verfolgen, da sie  $\beta$ -Carotin akkumuliert und eine gelbe Pigmentierung aufweist. Die Mutante wurde mit einer  $\beta$ -Carotin-Ketolase BKT aus *H. pluvialis* (Ojima et al. 2006) transformiert, wodurch Canthaxanthin entstehen sollte, wodurch die Pigmentierung dann rot erscheint. Obwohl rote Einzelkolonien nach der Transformation isoliert wurden, spaltete sich diese Transformante bei Weiterkultivierung auf YPD-Agar phänotypisch in rot, orange und gelb pigmentierte Kolonien auf. Durch Passagierung roter Einzelkolonien über fünf Generationen, zeigte der Stamm eine stabile, homogene Pigmentierung, was auf eine

#### 4. Diskussion

ebenso stabile genetische Konfiguration der integrierten DNA schließen lässt. Die Beobachtungen lassen sich womöglich durch eine Mischung homozygoter und heterozygoter Ausprägung der Allele für die *bkt*-Überexpression erklären. Niklitschek et al. (2008) konnten zeigen, dass die diploide, genetische Organisation des *Phaffia*-Genoms bei Transformanten dazu führen kann, dass ein Merkmal wie eine Expressionskassette nach Transformation heterozygot und homozygot integriert werden kann. Es wurden hierbei Transformanten hergestellt, in welchen verschiedene Gene deletiert wurden. Heterozygote Deletionen von *crtI* (-/+) resultierten in einem, im Vergleich zum Wildtyp, blasser pigmentierten Phänotyp. Eine Deletionstransformante, bei welcher beide Allele *crtI* (-/-) die Deletion tragen, zeigte keine Pigmentierung, da Phytoen (farblos) in dieser Transformante nicht weiter metabolisiert werden konnte und somit das einzige Produkt der Carotinoidbiosynthese darstellte. Die heterozygote Deletion (-/+) von *crtYB* wies ebenfalls einen blässeren Phänotyp der Transformanten auf, wobei ein Anstieg der Intermediate 3-OH-4-Keto-Torulene, OH-Keto- $\gamma$ -Carotin, 3-OH-Echinenon und Echinenon als eine Konsequenz der Limitierung durch Teildeletion von *crtYB* zu beobachten war. Eine homozygote Deletion von *crtYB* resultierte ebenfalls in einem farblosen Phänotyp der Transformante, da das Substrat GGPP für CRTYB nicht weiter zu Phytoen metabolisiert werden konnte. In einem dritten Experiment konnte eine Teildeletion der Astaxanthinsynthese *asy* hergestellt werden (-/+). Der Phänotyp war wieder blasser im Vergleich zum Wildtyp und es konnte ein erhöhter Anteil von  $\beta$ -Carotin aufgrund der nun vorhandenen Limitierung durch die *asy* festgestellt werden. Eine Volldeletion (-/-) der Astaxanthinsynthese *asy* resultierte in einer gelben Pigmentierung der Transformante. Neben  $\beta$ -Carotin konnten keine weiteren Carotinoide mehr nachgewiesen werden (Niklitschek et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Studien können als Erklärung für die unterschiedliche Pigmentierung der PR1-104/*bkt*-Transformante hinzugezogen werden. Falsch positive Stämme erscheinen wie der Akzeptorstamm PR1-104 gelb ( $\beta$ -Carotin-Akkumulation), eine heterozygote Ausprägung der Transformation (*bkt* -/+) orange und eine homozygote Ausprägung rot (*bkt* +/+). Wenn der Effekt auf eine Diploidie von *Phaffia rhodozyma* zurückzuführen ist, dann ist auch der rDNA-Eintrittslokus für das integrative Plasmid in zweifacher Ausführung im Genom vorhanden. Das Passagieren roter Einzelkolonien unter Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks kann hierbei einen Wachstumsvorteil darstellen. Ein erhöhtes Resistenzvermögen gegenüber des Antibiotikums aufgrund der homozygoten, doppelt vorhandenen Anzahl an

#### 4. Diskussion

Resistenzkassetten in +/--Stämmen ist hierbei denkbar. Dies wäre eine Erklärung, weshalb sich durch Passagieren sehr schnell eine homogen pigmentierte, stabile Transformante isolieren ließ. Das Aufspalten in eine Mischkolonie nach Isolation einer roten Einzelkolonie könnte hingegen ein Effekt der bereits diskutierten, erhöhten Rekombinationshäufigkeit in chemischen Mutanten sein. Neue Informationen, erhoben während der Sequenzierung des *Phaffia*-Genoms (LOEWE, IPF), deuten darauf hin, dass der Stamm CBS6938 eine haploide Organisation besitzt. Allerdings kann eine Polyploidie durch verschiedene Einflüsse wie z.B. Chemikalien bei proliferierenden Zellen induziert werden (Ranganathan und Subramaniam 1950, Storchová et al. 2006). Die chemischen Mutanten basieren auf dem Wildtyp-Stamm CBS6938, weshalb auch hier von einem haploiden Genom auszugehen ist. Der starke Einsatz von NTG könnte jedoch auch hier eine stabile Polyploidie induziert haben, wodurch heterozygote Phänotypen wahrscheinlich sind.

Im Gegensatz zur Transformante PR1-104/bkt wiesen Transformanten der Stämme AXJ-20 und AXG-13 keine Langzeitstabilität auf. Durch Passagieren auf YPD-Agar war es zwar möglich die Kulturen zu einem homogenen, stabilen Phänotyp zu kultivieren, jedoch konnte bei hochzellichten Flüssigkulturen wieder eine Destabilisierung beobachtet werden, welche nicht alleine durch Passagierung (Schmidt et al. 2010) dauerhaft behoben werden konnte. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Kombination der Transformation und der diskutierten, allgemeinen, genetischen Instabilität mit besonderem Vermerk auf geschädigte Reparaturmechanismen darstellen. In Studien von Christman et al. (1988) konnte beobachtet werden, dass bei *S. cerevisiae* eine 50-200-fach erhöhte mitotischen Rekombinationshäufigkeit im Lokus der ribosomalen DNA auftritt, wenn es zu Schädigungen oder Deletionen der Gene für die DNA-Strukturproteine DNA-Topoisomerase I und II kommt. Diese Strukturproteine sind kritische Bestandteile des DNA-Replikationsapparates, indem sie superspiralisierte DNA-Molekülbereiche für den Prozess der Replikation oder Transkription entspannen (Gellert 1981). Die Integration von linearisierten *Phaffia*-Plasmiden erfolgt ebenfalls über den Eintritt durch homologe Sequenzbereiche im Lokus der ribosomalen DNA. Womöglich werden integrierte Sequenzen an diesen Loci in hoher Generationenzahl beim Wachstum durch diese Defekte teil- und/oder volldeletiert, weshalb es zu einer Aufspaltung in verschiedenen pigmentierte Einzelkolonien kommt. Zusammen mit dem

#### 4. Diskussion

bereits diskutierten Effekt der erhöhten mitotischen Rekombinationsfrequenz in sterilen, chemischen Mutanten (Rustchenko-Bulgac und Howard 1993) könnte es zu einer sich gegenseitig verstärkenden Häufigkeit genetischer Rekombinationen kommen.

Eine weitere Erklärung für die Instabilitäten könnten ganz einfache, homologe Rekombinationsereignisse sein, wodurch integrierte Expressionskassetten verändert oder aus dem Genom wieder herausgeschnitten werden. Durch die Verwendung sich sehr ähnlicher Plasmide erhöht sich die Anzahl zu einander homologen Sequenzen in räumlicher Nähe der rDNA-Integrationsloki. Im Speziellen sind dies hierbei die Sequenzen des GPDH-Promotors und –Terminators, sowie der rDNA-Loki selbst. Durch unterschiedliche Anzahl an Genomintegrationen des jeweiligen Plasmids entsteht eine als unbekannt einzuschätzende Rekombinationshäufigkeit. Bisherige, publizierte, genetische Veränderung über „Metabolic Engineering“ in *Phaffia* bearbeiteten stets eine nur sehr begrenzte Menge an gleichzeitig transformierten Plasmiden. Somit stehen keine Erfahrungswerte zur Verfügung, welche für einen Vergleich mit den hier beobachteten Effekten verwendet werden können.

## 4. Diskussion

### 4.4.3 Stabilität der Stämme aus Dauerkulturen

Die genetische Stabilität der Mutanten und Transformanten konnte durch sorgfältige Passagierung und Weiterkultivierung in allen Fällen gewährleistet werden. Eine Langzeit-Präservierung der *Phaffia*-Stämme durch Passagierung ist allerdings arbeits- und kostenintensiv. Darum wurde *Phaffia* als „*ultra-low-temperature*“-Kulturen in 25 % Glycerin bei -80°C gelagert. Nach Rekultivierung dieser cryogenisierten Dauerkulturen konnte eine deutliche Aufspaltung in verschiedenen pigmentierte Einzelkolonien festgestellt werden.

Eine Dauerkultivierung bei tiefen Temperaturen kann beispielsweise in *S. cerevisiae* nachweislich zu genetischen Reorganisationen führen. In der Arbeit von Odani et al. 2003 wurden Microarray-Analysen des Transkriptom durchgeföhrt, um Auskunft über das Expressionsmuster von aus Cryokultur rekultivierten Stämmen zu erhalten. Die Ergebnisse zeigen, dass es unmittelbar nach Rekultivierung zur starken Expression von Genen im Bereich der Zellrettung und Reparatur, sowie des Stoffwechsels kommt. Besonders wurden Hitzeschockproteine, Peroxidasen/ Superoxiddismutasen und Enzyme des Glucosemetabolismus induziert. Dies deutet auf eine gesteigerte Gefahr durch allgemeine Schädigungen in der Zelle hin. Stoycheva et al. beschrieben 2007 eine direkte mutagene Wirkung der Cryogenisierung auf die mitochondriale DNA in *S. cerevisiae*. Durch den Prozess des Einfrierens kam es zu Teildeletionen ( $\rho^-$ -Mutanten) der mitochondrialen DNA, welche atmungsdefiziente Mutanten zur Folge hatte. In diesem Zusammenhang wurde zudem eine Erhöhung der zellulären Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies diskutiert, welche nachweislich zu genetischen Schäden führen können (Jamieson 1998). Die Cryogenisierung induziert in Hefe auch ein Retrotransposon mit der Bezeichnung Ty1, welches autonom an zufällige, neue Loci im Genom transponieren kann (Stamenova et al. 2008). Hierbei kann es zu genetischen Schädigungen und zu genetischen Instabilitäten kommen.

Ähnliche Effekte zur mutagenen Wirkung von Cryogenisierung konnten auch in anderen Organismen wie Pflanzen (Dixit et al. 2003, Martín und González-Benito 2005, Urbanová et al. 2006) oder auch Tieren (Labbe et al. 2001, Kopeika et al. 2005) beobachtet werden. Allerdings gibt es nur sehr wenige Hinweise darauf, dass tiefe Temperaturen die Synthese von Metaboliten des Sekundärstoffwechsels beeinflussen oder es zu morphologischen Veränderung kommt (Zhelifonova et al. 2006, Vinokurova

#### 4. Diskussion

et al. 2005, Kozlovskii et al. 2003). Die Studien hierzu kommen aus Untersuchungen von verschiedenen, aus russischem Permafrostboden, isolierten Pilzspezies.

Die hier charakterisierten chemischen Mutanten und Transformanten zeigen hingegen deutliche Beeinträchtigungen des Sekundärstoffwechsels hinsichtlich der Carotinoidbiosynthese. Eine Rekultivierung cryogenisierter Kulturen des Stammes PR1-104/bkt zeigte dagegen keine Pigmentinstabilität. Die Kulturen wiesen eine homogene Pigmentierung auf, was auf eine unveränderte Carotinoidbiosynthese zurückzuführen ist. Das bedeutet, dass eine Cryogenisierung alleine nicht für die starke Instabilität in den Mutanten und deren Transformanten verantwortlich sein kann. Es müssen schon vorher Schädigungen vorliegen, welche den negativen Einfluss des Einfrierens noch zusätzlich verstärken. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der beim Prozess des Einfrierens der Mutanten, sowie deren Transformanten, entstehende Kältestress zu gravierenden genetischen Veränderungen bei einzelnen Zellen der Kultur führt. Die Mutanten und Transformanten scheinen Schädigungen vor allem im Bereich von Systemen der Gewährleistung von DNA- und Protein-Stabilität in sich zu tragen, welche z.B. im Wildtyp vor weiteren Schäden durch eine Cryogenisierung schützen. Die Präservierung der Mutanten und Transformanten über cryogenisierte Dauerkulturen scheint demnach für diese Stämme über einen längeren Zeitraum nicht empfehlenswert zu sein. Nach Rekultivierung der Stämme muss eine erneute Selektion nach Pigmentintensität hin zu einer stabilen, homogenen Kultur erfolgen.

Eine alternative Methode zur Präservierung nach Marangon (2003) über dehydrierte Gelantinetropfen zeigte nach Rekultivierung der Stämme ebenfalls eine ungleiche Pigmentierung der Kultur, was impliziert, dass auch diese Form der Zellzyklusunterbrechung zu genetischen Veränderungen führt und eine nachfolgende Selektion auch hier unerlässlich ist.



### 4.5 Ausblick

Durch eine Kombination aus chemischer Mutagenese und gezielter genetischer Modifikation wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal *Phaffia rhodozyma*-Stämme hergestellt, die über eine stark gesteigerte Carotinoid- bzw. Astaxanthinsynthese verfügen. Die Astaxanthinmenge übersteigt hierbei bislang publizierte Ausbeuten bei anderen Astaxanthin hochproduzierenden Stämmen. Vergangene Versuche, die Astaxanthinmenge in *Phaffia* zu erhöhen, untersuchten die Auswirkungen verschiedener Kultivierungsbedingungen (z. B. Licht und Sauerstoff), verschiedene Nährmedien (z. B. Minimal- oder Komplexmedien) oder Mutagene, um hochproduzierende Stämme zu isolieren.

Die hier angewandte Strategie der schrittweisen Transformation mit drei Expressionsplasmiden erlaubt die Expression von insgesamt sechs verschiedenen Genen. Zeocin, ein weiteres, kürzlich an *Phaffia* getestetes und wirksames Antibiotikum (unveröffentlicht), würde die Expression von zwei weiteren Genen ermöglichen, wodurch insgesamt acht Gene verändert werden könnten. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, neben der Modifikation der Carotinoidsynthese, auch fremde Stoffwechselwege in *Phaffia* einzuführen oder bestehende herauf zu regulieren. *Phaffia* könnte somit als Plattform dienen, um andere Verbindungen wie Sterole, Steroide, Taxole oder Fettsäuren zu synthetisieren. Hierfür eignen sich neben dem Wildtyp CBS6938 auch die chemischen Mutanten, da sie auch in diesen Stoffwechselwegen bereits Mutationen, bzw. Heraufregulierungen aufweisen könnten. *Phaffia* ist als eukaryotisches System und somit durch die Nähe zu höheren Organismen, sowie der einfachen Transformierbarkeit interessant für Grundlagenforschung und „metabolic engineering“. Zudem funktioniert das Transformationssystem über integrative Vektoren, nicht episomale, wodurch eine Selektion später theoretisch nicht mehr notwendig ist. Dadurch ist *Phaffia rhodozyma* auch als Produktionsstamm in der Biotechnologie verwendbar.

## 5. Literaturverzeichnis

- Ačimovič, J, und D Rozman. “**Steroidal triterpenes of cholesterol synthesis.**” *Molecules* 18(4) 2013: 4002–4017.
- Adelberg, E A, M Mandel, und G Chein Ching Chen. “**Optimal Conditions for Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in K12.**” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 18(5-6) 1965: 788–795.
- Adrio, J L, und M Veiga. “**Transformation of the Astaxanthin-producing Yeast *Phaffia rhodozyma*.**” *Biotechnol. Tech.* 9 (1995): 509–512.
- Alcaíno, J, S Barahona, M Carmona, C Lozano, A Marcoleta, M Niklitschek, D Sepúlveda, M Baeza, und V Cifuentes. “**Cloning of the cytochrome p450 reductase (crtR) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**” *BMC microbiology* 8 (2008): 169.
- Alseth, I, L Eide, M Pirovano, T Rognes, E Seeberg, und M Bjørås. “**The *Saccharomyces cerevisiae* homologues of endonuclease III from *Escherichia coli*, Ntg1 and Ntg2, are both required for efficient repair of spontaneous and induced oxidative DNA damage in yeast.**” *Molecular and cellular biology* 19(5) 1999: 3779–3787.
- Alvarez, V, M Rodríguez-Sáiz, J L de la Fuente, E J Gudiña, R P Godio, J F Martín, und J L Barredo. “**The crtS gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of beta-carotene into astaxanthin and other xanthophylls.**” *Fungal genetics and biology: FG & B* 43(4) 2006: 261–272.
- Ambati, R R, S Phang, S Ravi, und R G Aswathanarayana. “**Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review.**” *Marine drugs* 12(1) 2014: 128–152.
- An, G H, M H Cho, und E A Johnson. “**Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*).**” *Journal of bioscience and bioengineering* 88(2) 1999: 189–193.
- Andrewes, A G, H Phaff, M P Starr, und H Hope. “**Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a Red- Pigmented Fermenting Yeast.**” *Phytochemistry* 15 1976: 1003–1007.
- Archer, B L, und B G Audley. “**New Aspects of Rubber Biosynthesis.**” *Botanical Journal of the Linnean Society* 94(1–2) 1987: 181–196.
- Arrach, N, R Fernández-Martín, E Cerdá-Olmedo, und J Avalos. “**A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*.**” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(4) 2001: 1687–1692.

## 5. Literaturverzeichnis

- Arya, M, I S Shergill, M Williamson, L Gommersall, N Arya, und H R H Patel. "**Basic principles of real-time quantitative PCR.**" *Expert review of molecular diagnostics* 5(2) 2005: 209–219.
- BCC Research. "**The Global Market for Carotenoids**" 2011.
- Berardi, E, und D Y Thomas. "**An Effective Transformation Method for *Hansenula polymorpha*.**" *Current Genetics* 18(2) 1990: 169–170.
- Bernhard, K, R K Müller, und R Spruijtenburg. "**Process for the Preparation of Astaxanthin and Intermediates in the Astaxanthin Synthesis.**" 1984 Patent EP0101597
- Bertani, G. "**Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*.**" *Journal of bacteriology* 62(3) 1951: 293–300.
- De Boer, L, B van Hell, und A J J Krouwer. "**Strains of *Phaffia rhodozyma* Containing High Levels of Astaxanthin and Low Levels of 3-hydroxy-30,40-didehydro-beta-w-caroten-4-one (HDCO).**" 1993 US-Patent 5648261.
- Bone, R A, J T Landrum, L H Guerra, und C A Ruiz. "**Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans.**" *The Journal of nutrition* 133(4) 2003: 992–998.
- Boram, W R und H Roman. "**Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: a DNA repair mutation associated with elevated mitotic gene conversion.**" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(8) 1976: 2828–2832.
- Boussiba, S. "**Carotenogenesis in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular Physiology and Stress Response.**" *Physiologia Plantarum* 108(2) 2000: 111–117.
- Bouvier, F, R A Backhaus, und B Camara. "**Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress.**" *The Journal of biological chemistry* 273(46) 1998: 30651–30659.
- Breitenbach, J, N Misawa, S Kajiwara, und G Sandmann. "**Expression in *Escherichia coli* and properties of the carotene ketolase from *Haematococcus pluvialis*.**" *FEMS microbiology letters* 140(2–3) 1996: 241–246.
- Breitenbach, J, H Visser, J C Verdoes, A J J van Ooyen, und G Sandmann. "**Engineering of geranylgeranyl pyrophosphate synthase levels and physiological conditions for enhanced carotenoid and astaxanthin synthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**" *Biotechnology letters* 33(4) 2011: 755–761.
- Breitenbach, J, P D Fraser, und G Sandmann. "**Carotenoid synthesis and phytoene synthase activity during mating of *Blakeslea trispora*.**" *Phytochemistry* 76 2012: 40–45.

## 5. Literaturverzeichnis

- Britton, G. "**Carotenoids and Polyterpenoids.**" *Natural Product Reports* 6(4) 1989: 359.
- Britton, G, S Liaaen-Jensen, und H Pfander. "**Carotenoids Handbook.**" 2004, Basel; Boston: Birkhäuser Verlag.
- Brown, D H, Jr, I V Slobodkin, und C A Kumamoto. "**Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration.**" *Molecular & general genetics: MGG* 251(1) 1996: 75–80.
- Chang, W-C, H Song, H-W Liu, und P Liu. "**Current development in isoprenoid precursor biosynthesis and regulation.**" *Current opinion in chemical biology* 17(4) 2013: 571–579.
- Christianson, T W, R S Sikorski, M Dante, J H Shero, und Philip Hieter. "**Multifunctional Yeast High-copy-number Shuttle Vectors.**" *Gene* 110(1) 1992: 119–122.
- Christman, M F, F S Dietrich, und G R Fink. "**Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II.**" *Cell* 55(3) 1988: 413–425.
- Cifuentes, V, G Hermosilla, C Martínez, R León, G Pincheira, und A Jiménez. "**Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*.**" *Antonie van Leeuwenhoek* 72(2) 1997: 111–117.
- Cregg, J M, K J Barringer, A Y Hessler, und K R Madden. "***Pichia pastoris* as a host system for transformations.**" *Molecular and cellular biology* 5(12) 1985: 3376–3385.
- Dani, G M, und V A Zakian. "**Mitotic and meiotic stability of linear plasmids in yeast.**" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(11) 1983: 3406–3410.
- Das, S, und C P Hollenberg. "**A High-frequency Transformation System for the Yeast *Kluyveromyces lactis*.**" *Current Genetics* 6(2) 1982: 123–128.
- Dixit, S, B B Mandal, S Ahuja, und P S Srivastava. "**Genetic stability assessment of plants regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* I. Using RAPD, biochemical and morphological analysis.**" *Cryo letters* 24(2) 2003: 77–84.
- Domínguez-Bocanegra, A R, und J A Torres-Muñoz. "**Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy.**" *Applied microbiology and biotechnology* 66(3) 2004: 249–252.

## 5. Literaturverzeichnis

- Domínguez-Bocanegra, A R, T Ponce-Noyola, und J A Torres-Muñoz. "**Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study.**" *Applied microbiology and biotechnology* 75(4) 2007: 783–791.
- Dusso, A S, A J Brown, und E Slatopolsky. "**Vitamin D.**" *American journal of physiology. Renal physiology* 289(1) 2005: F8–28.
- Egelhoff, T T, S S Brown, D J Manstein, und J A Spudich. "**Hygromycin resistance as a selectable marker in *Dictyostelium discoideum*.**" *Molecular and cellular biology* 9(5) 1989: 1965–1968.
- Eid, J, und B Sollner-Webb. "**Stable integrative transformation of *Trypanosoma brucei* that occurs exclusively by homologous recombination.**" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(6) 1991: 2118–2121.
- Fang, T J, und Y S Cheng. "**Isolation of astaxanthin over-producing mutants of *Phaffia rhodozyma* and their fermentation kinetics.**" *Chinese journal of microbiology and immunology* 25(4) 1992: 209–222.
- Fernández-Sevilla, J M, F G Acién Fernández, und E M Grima. "**Biotechnological Production of Lutein and Its Applications.**" *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(1) 2010: 27–40.
- Firdous, A P, E R Sindhu, V Ramnath, und R Kuttan. "**Anticarcinogenic activity of meso-zeaxanthin in rodents and its possible mechanism of action.**" *Nutrition and cancer* 65(6) 2013: 850–856.
- Flores-Cotera, L B, R Martín, und S Sánchez. "**Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium.**" *Applied microbiology and biotechnology* 55(3) 2001: 341–347.
- De la Fuente, JL, E Peiro, B Díez, AT Marcos, C Schleissner, M Rodríguez-Sáiz, C Rodríguez Otero, W Cabri, und JL Barredo. "**Method of Production of Astaxanthin by Fermenting Selected Strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**" 2005: US-Patent US20050124032A1
- De la Fuente, J L, M Rodríguez-Sáiz, C Schleissner, B Díez, E Peiro, und J L Barredo. "**High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**" *Journal of biotechnology* 148(2–3) 2010: 144–146.
- Fontana, J D, M B Chocial, M Baron, M F Guimaraes, M Maraschin, C Ulhoa, J A Florêncio, und T M Bonfim. "**Astaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma*: optimization of low-cost culture media and yeast cell-wall lysis.**" *Applied biochemistry and biotechnology* 63–65 1997: 305–314.
- Frank, H A, A Young, G Britton, und R J Cogdell. "**The photochemistry of carotenoids.**" Dordrecht, Netherlands; Boston: Kluwer Academic, 1999.

## 5. Literaturverzeichnis

- Gassel, S, H Schewe, I Schmidt, J Schrader, und G Sandmann. "**Multiple improvement of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a combination of conventional mutagenesis and metabolic pathway engineering.**" *Biotechnology letters* 35(4) 2013: 565–569.
- Gassel, S, J Breitenbach, und G Sandmann. "**Genetic engineering of the complete carotenoid pathway towards enhanced astaxanthin formation in *Xanthophyllomyces dendrorhous* starting from a high-yield mutant.**" *Applied microbiology and biotechnology* 98(1) 2014: 345–350.
- Gellert, M. "**DNA Topoisomerases.**" *Annual Review of Biochemistry* 50(1) 1981: 879–910.
- Giordano, P, P Scicchitano, M Locorotondo, C Mandurino, G Ricci, S Carbonara, M Gesualdo, A Zito, A Dachille, P Caputo, R Riccardi, G Frasso, G Lassandro, A Di Mauro, und M M Ciccone. "**Carotenoids and cardiovascular risk.**" *Current pharmaceutical design* 18(34) 2012: 5577–5589.
- Girard, P, B Falconnier, J Bricout, und B Vladescu. "**β-Carotene Producing Mutants of *Phaffia rhodozyma*.**" *Applied Microbiology and Biotechnology* 41(2) 1994: 183–191.
- Goldstein, A L, und J H McCusker. "**Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*.**" *Yeast (Chichester, England)* 15(14) 1999: 1541–1553.
- Golubev, W I. "**Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*).**" *Yeast (Chichester, England)* 11(2) 1995: 101–110.
- Goodwin, T W. "**The Biochemistry of the Carotenoids.**" Vol 1. 2nd Edition. London: Chapman and Hall, 1980.
- Grindley, N D, und C M Joyce. "**Genetic and DNA sequence analysis of the kanamycin resistance transposon Tn903.**" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(12) 1980: 7176–7180.
- Gu, W L, G H An, und E A Johnson. "**Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*.**" *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 19(2) 1997: 114–117.
- Guerin, M, M E Huntley, und M Olaizola. "**Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition.**" *Trends in biotechnology* 21(5) 2003: 210–216.
- Gupta, J C, G Pandey, und K J Mukherjee. "**Two-stage Cultivation of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to Enhance Plasmid Stability Under Non-selective Conditions: Experimental Study and Modeling.**" *Enzyme and Microbial Technology* 28(1) 2001: 89–99.
- Hanahan, D. "**Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.**" *Journal of molecular biology* 166(4) 1983: 557–580.

## 5. Literaturverzeichnis

- Higuera-Ciapara, I, L Félix-Valenzuela, und F M Goycoolea. "**Astaxanthin: a review of its chemistry and applications.**" *Critical reviews in food science and nutrition* 46(2) 2006: 185–196.
- Hou, L-L, C Gao, L Chen, G-Q Hu, und S-Q Xie. "**Essential role of autophagy in fucoxanthin-induced cytotoxicity to human epithelial cervical cancer HeLa cells.**" *Acta pharmacologica Sinica* 2013 (Online veröffentlicht vor Druck).
- Hu, Z C, Y G Zheng, Z Wang, und Y C Shen. "**Effect of Sugar-feeding Strategies on Astaxanthin Production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**" *World J Microbiol Biotechnol* 21(5) 2005: 771–775.
- Hussein, G, U Sankawa, H Goto, K Matsumoto, und H Watanabe. "**Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition.**" *Journal of natural products* 69(3) 2006: 443–449.
- Iannone, A, C Rota, S Bergamini, A Tomasi, und L M Canfield. "**Antioxidant activity of carotenoids: an electron-spin resonance study on beta-carotene and lutein interaction with free radicals generated in a chemical system.**" *Journal of biochemical and molecular toxicology* 12(5) 1998: 299–304.
- Impoolsup, A, P Caunt, und P F Greenfield. "**Effect of Growth Rate on Stability of a Recombinant Plasmid During Continuous Culture of *Saccharomyces cerevisiae* in Non-selective Medium.**" *Journal of Biotechnology* 10(2) 1989: 171–180.
- Jacobson, G K, S O Jolly, J J Sedmak, T J Skatrud, und J M Wasileski. "**Astaxanthin Over-producing Strains of *Phaffia rhodozyma*, Methods for Their Cultivation, and Their Use in Animal Feeds.**" 1999: US-Patent US6015684
- Jager, R D, W F Mieler, und J W Miller. "**Age-related macular degeneration.**" *The New England journal of medicine* 358(24) 2008: 2606–2617.
- Jahns, P, D Latowski, und K Strzalka. "**Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids.**" *Biochimica et biophysica acta* 1787(1) 2009: 3–14.
- Jamieson, D J. "**Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.**" *Yeast (Chichester, England)* 14(16) 1998: 1511–1527.
- Johnson, E A, und W A Schroeder. "**Microbial carotenoids.**" *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 53 1996: 119–178.
- Johnson, E A, und M J Lewis. "**Astaxanthin Formation by the Yeast *Phaffia rhodozyma*.**" *Journal of General Microbiology* 115(1) 1979: 173–183.
- Johnson, E A. "***Phaffia rhodozyma*: Colorful Odyssey.**" *International Microbiology* 6(3) 2003: 169–174.

## 5. Literaturverzeichnis

- Kajiwara, S, T Kakizono, T Saito, K Kondo, T Ohtani, N Nishio, S Nagai, und N Misawa. "Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli*." *Plant molecular biology* 29(2) 1995: 343–352.
- Kim, S J, G J Kim, D H Park, und Y W Ryu. "High-level Production of Astaxanthin by Fed-batch Culture of Mutant Strain *Phaffia rhodozyma* AJ-6-1." *J Microbiol Biotechnol* 13(2) 2003: 175–181.
- Kim, S-K, J-H Lee, C-H Lee, und Y-C Yoon. "Increased carotenoid production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* G276 using plant extracts." *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 45(2) 2007: 128–132.
- Kobayashi, M, T Kakizono, und S Nagai. "Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*." *Applied and environmental microbiology* 59(3) 1993: 867–873.
- Kopeika, J, T Zhang, D M Rawson, und G Elgar. "Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebrafish (*Danio rerio*) blastomere cells." *Mutation research* 570(1) 2005: 49–61.
- Kozlovskii, A G, V P Zhelifonova, V M Adanin, T V Antipova, S M Ozerskaia, G A Kochkina, und U Grafe. "The fungus *Penicillium citrinum* Thom 1910 VKM FW-800 isolated from ancient permafrost sediments as a producer of the ergot alkaloids agroclavine-1 and epoxyagroclavine-1." *Mikrobiologija* 72(6) 2003: 816–821.
- Krinsky, N I. "Antioxidant functions of carotenoids." *Free radical biology & medicine* 7(6) 1989: 617–635.
- Kristan, K, und T L Rižner. "Steroid-transforming enzymes in fungi." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 129(1–2) 2012: 79–91.
- Krügel, H, G Fiedler, C Smith, und S Baumberg. "Sequence and transcriptional analysis of the nourseothricin acetyltransferase-encoding gene *nat1* from *Streptomyces noursei*." *Gene* 127(1) 1993: 127–131.
- Krubasik, P, und G Sandmann. "Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups." *Biochemical Society transactions* 28(6) 2000: 806–810.
- Labbe, C, A Martoriati, A Devaux, und G Maise. "Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout." *Molecular reproduction and development* 60(3) 2001: 397–404.
- Lampila, L E, S E Wallen, und L B Bullerman. "A review of factors affecting biosynthesis of carotenoids by the order Mucorales." *Mycopathologia* 90(2) 1985: 65–80.



## 5. Literaturverzeichnis

- Ledetzky, N, A Osawa, K Iki, H Pollmann, S Gassel, J Breitenbach, K Shindo, und G Sandmann. "**Multiple transformation with the crtYB gene of the limiting enzyme increased carotenoid synthesis and generated novel derivatives in *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**" *Archives of biochemistry and biophysics* January 29, 2014.
- Leenhouts, K J, J Kok, und G Venema. "**Stability of Integrated Plasmids in the Chromosome of *Lactococcus lactis*.**" *Applied and environmental microbiology* 56(9) 1990: 2726–2735.
- Lerche, K, und A Hallmann. "**Stable nuclear transformation of *Eudorina elegans*.**" *BMC biotechnology* 13 2013: 11.
- Li, Q, Z Sun, J Li, und Y Zhang. "**Enhancing beta-carotene production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering.**" *FEMS microbiology letters* 345(2) 2013: 94–101.
- Liscovitch, M, V Chalifa, M Danin, und Y Eli. "**Inhibition of neural phospholipase D activity by aminoglycoside antibiotics.**" *The Biochemical journal* 279(1) 1991: 319–321.
- Liu, Y-S, und J-Y Wu. "**Modeling of *Xanthophyllomyces dendrorhous* growth on glucose and overflow metabolism in batch and fed-batch cultures for astaxanthin production.**" *Biotechnology and bioengineering* 101(5) 2008: 996–1004.
- Lopes, T S, J Klootwijk, A E Veenstra, P C van der Aar, H van Heerikhuizen, H A Raúe, und R J Planta. "**High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression.**" *Gene* 79(2) 1989: 199–206.
- Loza-Tavera, H. "**Monoterpenes in essential oils. Biosynthesis and properties.**" *Advances in experimental medicine and biology* 464 (1999): 49–62.
- Ludwig, D L, S Ugolini, und C V Bruschi. "**High-level Heterologous Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* from a Stable 2µm Plasmid System.**" *Gene* 132(1) 1993: 33–40.
- Mandell, J D, und J Greenberg. "**A New Chemical Mutagen for Bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.**" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 3(6) 1960: 575–577.
- Marangon, A V, T A Bertoni, E S Kioshima, R A Falleiros De Pádua, S Venturini, und T I E Svidzinski. "**Dehydrated gelatin drops: a good method for fungi maintenance and preservation.**" *The new microbiologica* 26(3) 2003: 305–309.
- Martín, C, und M E González-Benito. "**Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration.**" *Cryobiology* 51(3) 2005: 281–289.

## 5. Literaturverzeichnis

- Martín, J F, E Gudiña, und J L Barredo. "**Conversion of  $\beta$ -carotene into Astaxanthin: Two Separate Enzymes or a bifunctional Hydroxylase-ketolase Protein?**" *Microbial Cell Factories* 7(1) 2008: 3.
- Masamoto, K, N Misawa, T Kaneko, R Kikuno, und H Toh. "**Beta-carotene hydroxylase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803.**" *Plant & cell physiology* 39(5) 1998: 560–564.
- Matthäus, F, M Ketelhot, M Gatter, und G Barth. "**Production of Lycopene in the non-carotenoid producing yeast *Yarrowia lipolytica*.**" *Applied and environmental microbiology* 2013.
- McGarvey, D J, und R Croteau. "**Terpenoid metabolism.**" *The Plant cell* 7(7) 1995: 1015–1026.
- McNulty, H, R F Jacob, und R P Mason. "**Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions.**" *The American journal of cardiology* 101(10A) 2008: 20D–29D.
- Meyer, P S, und J C du Preez. "**Effect of Acetic Acid on Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma*.**" *Biotechnology Letters* 15(9) 1993: 919–924.
- Meyer, P S, und J C du Preez. "**Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice.**" *World journal of microbiology & biotechnology* 10(2) 1994: 178–183.
- Meyer, P S, J C du Preez, und S G Kilian. "**Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*.**" *World journal of microbiology & biotechnology* 9(5) 1993: 514–520.
- Miao, L, S Chi, Y Tang, Z Su, T Yin, G Guan, und Y Li. "**Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain.**" *FEMS yeast research* 11(2) 2011: 192–201.
- Miller, M W, M Yoneyama und M Soneda. "***Phaffia*, a New Yeast Genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes).**" *International Journal of Systematic Bacteriology* 26(2) 1976: 286–291
- Miki, W. "**Biological Functions and Activities of Animal Carotenoids.**" *Pure Appl Chem* 63(1) 1991: 141–146.
- Misawa, N, Y Satomi, K Kondo, A Yokoyama, S Kajiwara, T Saito, T Ohtani, und W Miki. "**Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level.**" *Journal of bacteriology* 177(22) 1995: 6575–6584.
- Mizuta, M, S Hirano, N Hiwatashi, I Tateya, S-I Kanemaru, T Nakamura, und J Ito. "**The effect of astaxanthin on vocal fold wound healing.**" *The Laryngoscope* 2013.

## 5. Literaturverzeichnis

- Moran, N A, und T Jarvik. "**Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids.**" *Science (New York, N.Y.)* 328(5978) 2010: 624–627.
- Moshier, S E, und D J Chapman. "**Biosynthetic studies on aromatic carotenoids. Biosynthesis of chlorobactene.**" *The Biochemical journal* 136(2) 1973: 395–404.
- Nagy, ̂, N Garamszegi, C Vágvölgyi, und L Ferenczy. "**Electrophoretic Karyotypes of *Phaffia rhodozyma* Strains.**" *FEMS Microbiology Letters* 123(3) 1994: 315–318.
- Najafi, N, A-R Ahmadi, R Hosseini, und S Golkhoo. "**Gamma irradiation as a useful tool for the isolation of astaxanthin-overproducing mutant strains of *Phaffia rhodozyma*.**" *Canadian journal of microbiology* 57(9) 2011: 730–734.
- Nghiem, N P, J Montanti, und D Johnston. "**Production of astaxanthin from corn fiber as a value-added co-product of fuel ethanol fermentation.**" *Applied biochemistry and biotechnology* 154(1–3) 2009: 48–58.
- Nguyen-Distèche, M, J J Pollock, J M Ghuysen, J Puig, P Reynolds, H R Perkins, J Coyette, und M R Salton. "**Sensitivity to ampicillin and cephalothin of enzymes involved in wall peptide crosslinking in *Escherichia coli* K12, strain 44.**" *European journal of biochemistry / FEBS* 41(3) 1974: 457–463.
- Ni, H, Q-H Chen, H Ruan, Y-F Yang, L-J Li, G-B Wu, Y Hu, und G-Q He. "**Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*.**" *Journal of Zhejiang University. Science. B* 8(5) 2007: 365–370.
- Niklitschek, M, J Alcaíno, S Barahona, D Sepúlveda, C Lozano, M Carmona, A Marcoleta, C Martínez, P Lodato, M Baeza, und V Cifuentes. "**Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**" *Biological research* 41(1) 2008: 93–108.
- Nordström, K. "**Induction of the petite mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.**" *Journal of general microbiology* 48(2) 1967: 277–281.
- Odani, M, Y Komatsu, S Oka, und H Iwahashi. "**Screening of genes that respond to cryopreservation stress using yeast DNA microarray.**" *Cryobiology* 47(2) 2003: 155–164.
- Ojima, K, J Breitenbach, H Visser, Y Setoguchi, K Tabata, T Hoshino, J van den Berg, und G Sandmann. "**Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase.**" *Molecular genetics and genomics: MGG* 275(2) 2006: 148–158.

## 5. Literaturverzeichnis

- Osawa, A, A Kasahara, S Mastuoka, S Gassel, G Sandmann, und K Shindo. "**Isolation of a novel carotenoid, OH-chlorobactene glucoside hexadecanoate, and related rare carotenoids from *Rhodococcus sp.* CIP and their antioxidative activities.**" *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 75(11) 2011: 2142–2147.
- Pfaffl, M W. "**A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.**" *Nucleic acids research* 29(9) 2001: e45.
- Phaff, H, M Miller, M Yoneyama, und M Soneda. "**A Comparative Study of the Yeast Florae Associated with Trees on the Japanese Islands and in the West Coast of North America.**" Osaka: Society of Fermentation Technology 1972:759–774.
- Popják, G, und W S Agnew. "**Squalene synthetase.**" *Molecular and cellular biochemistry* 27(2) 1979: 97–116.
- Raman, R, und S E Mohamad. "**Astaxanthin production by freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana* and marine microalgae *Tetraselmis sp.***" *Pakistan journal of biological sciences: PJBS* 15(24) 2012: 1182–1186.
- Ranganathan, B, und M K Subramaniam. "**Studies on the Mutagenic Action of Chemical and Physical Agencies on Yeasts.**" *Journal of the Indian Institute of Science* 32A 1950: 51–72.
- Rao, A R, H N Sindhuja, S M Dharmesh, K U Sankar, R Sarada, und G A Ravishankar. "**Effective Inhibition of Skin Cancer, Tyrosinase, and Antioxidative Properties by Astaxanthin and Astaxanthin Esters from the Green Alga *Haematococcus pluvialis*.**" *Journal of agricultural and food chemistry* 2013
- Raué, H A. "**Metabolic Stability of mRNA in Yeast - a Potential Target for Modulating Productivity?**" *Trends in Biotechnology* 12(11) 1994: 444–449.
- Retamales, P, G Hermosilla, R León, C Martínez, A Jiménez, und V Cifuentes. "**Development of the sexual reproductive cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**" *Journal of microbiological methods* 48(1) 2002: 87–93.
- Rossolini, G M, M L Riccio, E Gallo, und C L Galeotti. "***Kluyveromyces lactis* rDNA as a target for multiple integration by homologous recombination.**" *Gene* 119(1) 1992: 75–81.
- Rustchenko-Bulgac, E P. "**Variations of *Candida albicans* electrophoretic karyotypes.**" *Journal of bacteriology* 173(20) 1991: 6586–6596.
- Rustchenko-Bulgac, E P, und D H Howard. "**Multiple chromosomal and phenotypic changes in spontaneous mutants of *Candida albicans*.**" *Journal of general microbiology* 139(6) 1993: 1195–1207.
- Sallaud, C, D Rontein, S Onillon, F Jabès, P Duffé, C Giacalone, S Thoraval, C Escoffier, G Herbette, N Leonhardt, M Causse, und A Tissier A. "**A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*.**" *The Plant cell* 21(1) 2009: 301–317.

## 5. Literaturverzeichnis

- Sambrook, J, E F Fritsch, und T Maniatis. **"Molecular Cloning: a Laboratory Manual."** 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Sandmann, G. **"Combinatorial biosynthesis of carotenoids in a heterologous host: a powerful approach for the biosynthesis of novel structures."** *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 3(7) 2002: 629–635.
- Schloemer, G C, und J L Davis. **"Preparation of Astaxanthin."** 2001, Patent WO0181301.
- Schmidt, I, H Schewe, S Gassel, C Jin, J Buckingham, M Hümbelin, G Sandmann, und J Schrader. **"Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*."** *Applied microbiology and biotechnology* 89(3) 2011: 555–571.
- Schöpf, L, J Mautz, und G Sandmann. **"Multiple ketolases involved in light regulation of canthaxanthin biosynthesis in *Nostoc punctiforme* PCC 73102."** *Planta* 237(5) 2013: 1279–1285.
- Schroeder, W A, und E A Johnson. **"Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*."** *The Journal of biological chemistry* 270(31) 1995: 18374–18379.
- Sedmak, J J, D K Weerasinghe, und S O Jolly. **"Extraction and Quantitation of Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*."** *Biotechnology Techniques* 4(2) 1990: 107–112.
- Shaw, W V. **"Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria."** *Methods in enzymology* 43 1975: 737–755.
- Shimada, H, K Kondo, P D Fraser, Y Miura, T Saito, und N Misawa. **"Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway."** *Applied and environmental microbiology* 64(7) 1998: 2676–2680.
- Sies, H, W Stahl, und A R Sundquist. **"Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids."** *Annals of the New York Academy of Sciences* 669 1992: 7–20.
- Stamenova, R, M Dimitrov, T Stoycheva, M Pesheva, P Venkov, und T S Tsvetkov. **"Transposition of *Saccharomyces cerevisiae* Ty1 retrotransposon is activated by improper cryopreservation."** *Cryobiology* 56(3) 2008: 241–247.
- Storchová, Z, A Breneman, J Cande, J Dunn, K Burbank, E O'Toole, und D Pellman. **"Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast."** *Nature* 443(7111) 2006: 541–547.
- Stoycheva, T, P Venkov, und Ts Tsvetkov. **"Mutagenic effect of freezing on mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*."** *Cryobiology* 54(3) 2007: 243–250.

## 5. Literaturverzeichnis

- Sun, N, S Lee, und K B Song. "**Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation.**" *International journal of food microbiology* 94(3) 2004: 263–267.
- Takaichi, S, G Sandmann, G Schnurr, Y Satomi, A Suzuki, und N Misawa. "**The carotenoid 7,8-dihydro-psi end group can be cyclized by the lycopene cyclases from the bacterium *Erwinia uredovora* and the higher plant *Capsicum annuum*.**" *European journal of biochemistry / FEBS* 241(1) 1996: 291–296.
- Takebe, Y, M Seiki, J Fujisawa, P Hoy, K Yokota, K Arai, M Yoshida, und N Arai. "**SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat.**" *Molecular and cellular biology* 8(1) 1988: 466–472.
- Talbot, N. "**Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi: a Practical Approach.**" The Practical Approach Series 2001. New York: Oxford University Press.
- Tanaka, T, und L Kawamoto. "**Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology Second Edition.**" 2nd ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology Press, 1999.
- Tao, L, L W Wagner, P E Rouvière, und Q Cheng. "**Metabolic engineering for synthesis of aryl carotenoids in *Rhodococcus*.**" *Applied microbiology and biotechnology* 70(2) 2006: 222–228.
- Thompson, J D, T J Gibson, F Plewniak, F Jeanmougin, und D G Higgins. "**The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.**" *Nucleic acids research* 25(24) 1997: 4876–4882.
- Trejo-Solís, C, J Pedraza-Chaverri, M Torres-Ramos, D Jiménez-Farfán, A Cruz Salgado, N Serrano-García, L Osorio-Rico, und J Sotelo. "**Multiple molecular and cellular mechanisms of action of lycopene in cancer inhibition.**" *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* 2013: 705121.
- Tsubokura, A, H Yoneda, und H Mizuta. "***Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic gram-negative astaxanthin-producing bacterium.**" *International journal of systematic bacteriology* 49(1) 1999: 277–282.
- Urbanová, M, J Kosuth, und E Cellárová. "**Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation.**" *Plant cell reports* 25(2) 2006: 140–147.
- Velayos, A, A P Eslava, und E A Iturriaga. "**A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the carRP gene of *Mucor circinelloides*.**" *European journal of biochemistry / FEBS* 267(17) 2000: 5509–5519.

## 5. Literaturverzeichnis

- Verdoes, J C, K P Krubasik, G Sandmann, und A J van Ooyen. "**Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**" *Molecular & general genetics: MGG* 262(3) 1999: 453–461.
- Verdoes, J C, J Wery, T Boekhout, und A J Van Ooyen. "**Molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Phaffia rhodozyma*.**" *Yeast* 13(13) 1997: 1231–1242.
- Verwaal, R, J Wang, J-P Meijnen, H Visser, G Sandmann, J A van den Berg, und A J J van Ooyen. "**High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**" *Applied and environmental microbiology* 73(13) 2007: 4342–4350.
- Vinokurova, N G, N E Ivanushkina, G A Kochkina, M U Arinbasarov, und S M Ozerskaia. "**Production of mycophenolic acid by fungi of the genus *Penicillium* link.**" *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologija* 41(1) 2005: 95–98.
- Visser, H, A J J van Ooyen, und J C Verdoes. "**Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**" *FEMS yeast research* 4(3) 2003: 221–231.
- Visser, H, G Sandmann, und J C Verdoes. "**Xanthophylls in Fungi: Metabolic Engineering of the Astaxanthin Biosynthetic Pathway in *Xantophyllomyces dendrorhous*.**" *Methods in Biotechnology: Microbial Processes and Products* 2005.
- Walmsley, R M, D C Gardner, und S G Oliver. "**Stability of a cloned gene in yeast grown in chemostat culture.**" *Molecular & general genetics: MGG* 192(3) 1983: 361–365.
- Weisburg, W G, S M Barns, D A Pelletier, und D J Lane. "**16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.**" *Journal of bacteriology* 173(2) 1991: 697–703.
- Wery, J, D Gutker, A C Renniers, J C Verdoes, und A J van Ooyen. "**High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*.**" *Gene* 184(1) 1997: 89–97.
- Wery, J, C Verdoes, und A J van Ooyen. "**Efficient Transformation of the Astaxanthin-Producing Yeast *Phaffia rhodozyma*.**" *Biotechnology Techniques* 12(5) 1998: 399–405.
- Wolak, T, und E Paran. "**Can carotenoids attenuate vascular aging?**" *Vascular pharmacology* 2013.
- Wozniak, A, C Lozano, S Barahona, M Niklitschek, A Marcoleta, J Alcaíno, D Sepulveda, M Baeza, und V Cifuentes. "**Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source.**" *FEMS yeast research* 11(3) 2011: 252–262.

## 5. Literaturverzeichnis

- Wriessnegger, T, und H Pichler. "**Yeast metabolic engineering--targeting sterol metabolism and terpenoid formation.**" *Progress in lipid research* 52(3) 2013: 277–293.
- Yanisch-Perron, C, J Vieira, und J Messing. "**Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.**" *Gene* 33(1) 1985: 103–119.
- Ye, R W, P L Sharpe, und Q Zhu. "**Bioengineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for lycopene production.**" *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 898 2012: 153–159.
- Young, R, D S Grillo, R Isberg, J Way, und M Syvanen. "**Transposition of the Kanamycin-resistance Transposon Tn903.**" *MGG Molecular & General Genetics* 178(3) 1980: 681–689.
- Zhang, D, S M Jennings, G W Robinson, und C D Poulter. "**Yeast squalene synthase: expression, purification, and characterization of soluble recombinant enzyme.**" *Archives of biochemistry and biophysics* 304(1) 1993: 133–143.
- Zhang, XW, Gong X, und Chen F. "**Dynamics and stability analysis of the growth and astaxanthin production system of *Haematococcus pluvialis*.**" *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 23(2) 1999: 133–137.
- Zhelifonova, V P, T V Antipova, S M Ozerskaia, N E Ivanushkina, und A G Kozlovskii. "**The fungus *Penicillium variable* sopp 1912 isolated from permafrost deposits as a producer of rugulovasines.**" *Mikrobiologija* 75(6) 2006: 742–746.
- Zheng, Y G, Z C Hu, Z Wang, und Y C Shen. "**Large-scale Production of Astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**" *Food Bio- Prod Process* 84(2) 2006: 164–166.
- Zhong, Y, J-C Huang, J Liu, Y Li, Y Jiang, Z-F Xu, G Sandmann und F Chen. "**Functional characterization of various algal carotenoid ketolases reveals that ketolating zeaxanthin efficiently is essential for high production of astaxanthin in transgenic *Arabidopsis*.**" *Journal of experimental botany* 62(10) 2011: 3659–3669.
- Zhu, J, und M Q Zhang. "**SCPD: a promoter database of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.**" *Bioinformatics (Oxford, England)* 15(7–8) 1999: 607–611.



## 6. Publikationen

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden folgende Publikationen:

Pollmann, Hendrik, Sören Gassel, Jürgen Breitenbach und Gerhard Sandmann. „**Genetic engineering of *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the synthesis of Zeaxanthin**“. In Vorbereitung.

Ledetzky, Nadine, Ayako Osawa, Kanoko Iki, Hendrik Pollmann, Sören Gassel, Jürgen Breitenbach, Kazutoshi Shindo und Gerhard Sandmann. „**Multiple transformation with the *crtYB* gene of the limiting enzyme increased carotenoid synthesis and generated novel derivatives in *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**“ *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014. doi:10.1016/j.abb.2014.01.014

Gassel, Sören, Jürgen Breitenbach und Gerhard Sandmann. „**Genetic engineering of the complete carotenoid pathway towards enhanced astaxanthin formation in *Xanthophyllomyces dendrorhous* starting from a high-yield mutant.**“ *Applied microbiology and biotechnology* 98(1) 2014: 345-350.

Gassel, Sören, Hendrik Schewe, Isabell Schmidt, Jens Schrader und Gerhard Sandmann. „**Multiple improvement of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a combination of conventional mutagenesis and metabolic pathway engineering.**“ *Biotechnology Letters* 35(4) 2013: 565–569.

Osawa, Ayako, Asami Kasahara, Shoko Mastuoka, Sören Gassel, Gerhard Sandmann und Kazutoshi Shindo. „**Isolation of a novel carotenoid, OH-chlorobactene glucoside hexadecanoate, and related rare carotenoids from *Rhodococcus* sp. CIP and their antioxidative activities.**“ *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75(11) 2011: 2142–2147.

Schmidt, Isabell, Hendrik Schewe, Sören Gassel, Chao Jin, John Buckingham, Markus Hümbelin, Gerhard Sandmann und Jens Schrader. „**Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*.**“ *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(3) 2011: 555–571.

### 7. Zusammenfassung der Doktorarbeit

Ziel dieser Arbeit war es erstmals durch eine Kombination aus chemischer Mutagenese und gezielter genetischer Modifikation (hier: „metabolic engineering“) einen *Phaffia*-Stamm herzustellen, welcher über die Mutagenese hinaus über eine weiter verstärkte Astaxanthin-Synthese verfügt.

Die von „DSM Nutritional Products“ bereitgestellten chemischen Mutanten wurden analysiert und über einen Selektionsprozess auf Pigmentstabilität und Wachstum hin optimiert, da die Stämme aus cryogenisierter Dauerkultur starke Pigmentinstabilitäten und ein verzögertes Wachstum aufwiesen.

Über eine exploratorische Phase wurde die Carotinoidsynthese analysiert und festgestellt, dass in den Mutanten keine Einzelreaktionen betroffen sind, welche für die Heraufregulierung der Carotinoidsynthese in den Mutanten verantwortlich sind. Hierbei wurden Limitierungen identifiziert und diese durch Transformation von Expressionsplasmiden mit geeigneten Genen aufgehoben, um damit eine noch effizientere Metabolisierung von Astaxanthin-Vorstufen hin zu Astaxanthin zu erreichen. Eine Überexpression der Phytoensynthase/ Lycopinzyklase *crtYB* resultierte in einem gesteigerten Carotinoidgehalt bei gleichbleibendem Astaxanthin-Anteil. Durch eine zweite Transformation mit einer Expressionskassette für die Astaxanthin-Synthase *asy* konnte der Carotinoidgehalt weiter gesteigert und zusätzlich eine Limitierung der Metabolisierung von Astaxanthin-Vorstufen behoben werden, sodass die Transformante nahezu alle Intermediate der Astaxanthinsynthese zu Astaxanthin metabolisieren konnte (Gassel et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass auch in den Mutanten, aus Experimenten mit dem Wildtyp bekannte, Limitierungen identifiziert und ausgeglichen werden konnten.

Nach den Erkenntnissen der exploratorischen Phase wurde in die Carotinoidsynthese der Mutanten über schrittweises „metabolic engineering“ noch umfangreicher eingegriffen. In der ersten Stufe konnte die Carotinoidsynthese durch eine Überexpression von *crtYB* und *asy* deutlich gesteigert werden. In der zweiten Stufe wurden durch Überexpression einer trunkierten *HMG-CoA-Reduktase* und *crtE* die

## 7. Zusammenfassung der Doktorarbeit

Synthese wichtiger Carotinoid-Vorstufen gesteigert, was in einer weiteren deutlichen Erhöhung des Gesamtcarotinoidgehalts resultierte. Durch eine dritte Transformation, in welcher weitere Kopien der *asy* eingebracht wurden, konnte der bestehenden Limitierung der Metabolisierung von Astaxanthin-Vorstufen entgegengewirkt werden. Die hergestellten Transformanten verfügen über den bis heute höchsten publizierten Astaxanthingehalt. Die absolute Menge produzierten Astaxanthins beträgt in den Transformanten zwischen 8000 und 8500 µg/ gdw (Gassel et al. 2014).

Die Mutanten und deren Transformanten wiesen wiederholt Instabilitäten der Pigmentierung auf. Die grundsätzliche Natur dieser Instabilitäten ist auf zufällige Mutationen anderer zellulärer Mechanismen, bedingt durch die starke Mutagenisierung, zurückzuführen. Die Instabilität der Mutanten und Transformanten konnte über Selektion und Passagierung behoben werden, sodass Kulturen mit homogener Pigmentierung gewährleistet waren.

Die Arbeit hat gezeigt, dass *Phaffia rhodozyma* eine interessante Plattform zur *de-novo*-Synthese von Astaxanthin darstellt und die Kombination aus chemischer Mutagenese mit gezielter genetischer Modifikation hoch effektiv ist, bei der sich die Effekte addieren. Zudem konnten wichtige Erkenntnisse zum molekularbiologischen Umgang mit genetisch instabilen Organismen gewonnen werden.

## 8. Abbildungsverzeichnisse

### 8.1 Allgemeine Abbildungen

Abb. 1: Grundstruktur Phytoen. ....	12
Abb. 2: Xanthophyll-Zyklus in Pflanzen. ....	14
Abb. 3: Weltweiter Gesamtmarktwert und Marktwert der drei umsatzstärksten Carotinoide. ....	15
Abb. 4: Isoprenoidbiosynthese über den Mevalonat-Weg (MEP) in Pilzen. ....	18
Abb. 5: Verwendung von Isopren. ....	20
Abb. 6: Terpenoidbiosynthese in Pilzen. ....	21
Abb. 7: Verschiedene <i>Phaffia</i> -Stämme. ....	23
Abb. 8: Die Carotinoidbiosynthese in <i>Phaffia rhodozyma</i> . ....	25
Abb. 9: Schema zum Mechanismus der Substratoxygenierung durch ASY. ....	26
Abb. 10: Mechanismus der Hydroxylierung von $\beta$ -Carotin und Entstehung der Ketogruppe. ....	28
Abb. 11: Isomere Formen von Astaxanthin (3-3'-Dihydroxy- $\beta,\beta$ -Carotin-4-4'-dion). ....	29
Abb. 12: Herstellung der Mutanten. ....	57
Abb. 13: Erstkultivierung der mutagenisierten Stämme. ....	58
Abb. 14: AXJ-20 und AXG-13 nach Reinigung. ....	60
Abb. 15: Carotinoidanalyse der selektierten Stämme AXG-13 und AXJ-20. ....	60
Abb. 16: <i>Phaffia</i> Wildtyp und Mutante unter Vergrößerung. ....	62
Abb. 17: Lichtmikroskopische Analyse verschiedener <i>Phaffia</i> -Stämme. ....	63
Abb. 18: REM-Aufnahme des <i>Phaffia</i> Wildtyps und einer chemischen Mutante. ....	63
Abb. 19: Herstellung der Standards. ....	64
Abb. 20: Verwendete Standards zur Identifikation und Validierung der gemessenen Carotinoide. ....	65
Abb. 21: Einzelne Spektren der verwendeten Carotinoid-Standards. ....	66
Abb. 22: Chromatogramm der HPLC-Analyse von TTH-2/3GS. ....	67
Abb. 23: Phylogenetische Analyse von <i>Rhodococcus sp. CIP</i> . ....	69
Abb. 24: Strukturen der Carotinoide in <i>Rhodococcus sp. CIP</i> . ....	70
Abb. 25: Schematische Transformationsstrategie. ....	71
Abb. 26: Chromatogramme der HPLC-Analysen der AXJ-20 <i>crtYB</i> und <i>asy</i> Transformanten. ....	75
Abb. 27: Steigerung des Gesamtcarotinoid- und Astaxanthingehalts. ....	76
Abb. 28: Transformanten auf festem YPD-Medium. ....	77
Abb. 29: Auf Pigmentierung selektierte Stämme AXJ-20/ <i>crtYB</i> und AXJ-20/ <i>crtYB/asy</i> . ....	78
Abb. 30: Platten nach Transformation mit PR1-104/bkt. ....	79
Abb. 31: PR1-104/ <i>asy</i> auf Platten nach Transformation mit pPR2TNoasy. ....	81
Abb. 32: HPLC-Chromatogramme von PR1-104 und verschiedener Transformanten. ....	82
Abb. 33: Neue Isolate von AXG-13 und AXJ-20. ....	84
Abb. 34: Strategie zur Erhöhung des Gesamtcarotinoidgehalts und der Astaxanthinmenge. ....	86
Abb. 35: Nachweis der Integration von pPR13F-ASY. ....	87

## 8. Abbildungsverzeichnisse

Abb. 36: Nachweis der Integration von pPR2TNH-tHMGCoA/crtE. ....	90
Abb. 37: Geldokumentation Nachweis Transformation mit pPR2TNo-ASY .....	96
Abb. 38: Homogenität der Stämme. ....	101
Abb. 39: Transformanten aus cryogenisierter Kultur. ....	102
Abb. 40: Vergleich zwischen Gelatine- und Cryo-basierter Dauerkultur.....	103
Abb. 41: Kultivierung von AXJ-ASY-4 ohne und mit Antibiotikum. ....	104
Abb. 42: Struktur von 3-OH-4-Keto-7,8-Dihydro- $\beta$ -Carotin.....	117
Abb. 43: Synthese von 3-OH-4-Keto-7,8-Dihydro- $\beta$ -Carotin. ....	118

### 8.2 Abbildungen des Anhangs:

Abbildung 1: Fotografie <i>Rhodococcus sp.</i> CIP .....	153
Abbildung 2: Chromatogramme der HPLC-Analysen der AXJ-20 Transformanten.....	154
Abbildung 3: Chromatogramme der HPLC-Analysen der AXG-13 Transformanten.....	155
Abbildung 4: Spektren der analysierten Carotinoiden in den Überexpressionsmutanten.....	156
Abbildung 5: Plasmidkarte pPR13F .....	157
Abbildung 6: Plasmidkarte pPR2TNHasy .....	158
Abbildung 7: Plasmidkarte pPR13Fasy .....	159
Abbildung 8: Plasmidkarte pPR2TNH-tHMG1/crtE.....	160
Abbildung 9: Plasmidkarte pPR2TNo-asy .....	161
Abbildung 10: Plasmidkarte pPR2TNbkt .....	162
Abbildung 11: Darstellung der Pigmentooptimierung von PR1-104/bkt#2.....	163
Abbildung 12: Carotinoidbiosyntheseleistung in AXG-13 und AXJ-20 erster und zweiter Generation. .	164

## 9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Systematische Klassifizierung von <i>P. rhodozyma</i> / <i>X. dendrorhous</i> .....	22
Tab. 2: Übersicht über Syntheseleistung verschiedener Astaxanthin-Hochproduzenten.....	32
Tab. 3: Verwendete Computersoftware.....	35
Tab. 4: Quelle der synthetischen Carotinoidstandards.....	35
Tab. 5: Geräteliste .....	36
Tab. 6: Chemikalienliste .....	37
Tab. 7: Zusammensetzung LB-Medium (nach Bertani 1951).....	38
Tab. 8: Kultivierungsmedien von <i>Phaffia rhodozyma</i> .....	39
Tab. 9: Verwendete Selektionsmarker.....	40
Tab. 10: In dieser Arbeit bearbeitete Organismen.....	42
Tab. 11: Zusammenfassung der verwendeten Enzyme und DNA-Größenstandards .....	44
Tab. 12: Standardzusammensetzung zweier Restriktionsansätze .....	44
Tab. 13: Standardzusammensetzung der PCR-Reaktionsvolumen .....	45
Tab. 14: Standardprogramm der PCR-Reaktionen .....	45
Tab. 15: Verwendete Oligonukleotide.....	46
Tab. 16: 50x TAE-Puffer .....	47
Tab. 17: Zusammenfassung der verwendeten Plasmide.....	49
Tab. 18: Zusammensetzung der Proben für die „Realtime-PCR-Analyse“ .....	50
Tab. 19: Standardprogramm der „Realtime-PCR-Analysen“ .....	50
Tab. 20: STM-Puffer, Kaliumphosphatpuffer .....	52
Tab. 21: Zusammenfassung der Erstanalyse der mutagenisierten Stämme (erstes Isolat).....	58
Tab. 22: Absorptionsspektren der Carotinoide aus TTH-2/3GS.....	68
Tab. 23: Zusammenfassung der Carotinoide in der Mutante AXJ-20 und der Transformante AXJ-20/crtYB.....	72
Tab. 24: Zusammenfassung der Carotinoide in der Transformante AXJ-20/crtYB/asy.....	73
Tab. 25: PR1-104/bkt#2 Optimierung über fünf Generationen.....	80
Tab. 26: Carotinoid-Analytik der Transformanten AXJ-YBASY-37 und AXG-YBASY-5.....	88
Tab. 27: Carotinoid-Werte der Transformanten AXJ-tHMG1/crtE-26 /-28 und AXG-tHMG1/crtE-21 /-22 .....	91
Tab. 28: Zusammensetzung der Carotinoide in den Stämmen der AXJ-20-Stammlinie.....	93
Tab. 29: Zusammensetzung der Carotinoide in den Stämmen der AXG-13-Stammlinie.....	94
Tab. 30: Carotinoid-Analytik der Transformanten AXJ-ASY-4 /-6 und AXG-ASY-1 /-3 .....	97
Tab. 31: Carotinoide in AXJ-ASY-4 und AXG-ASY-1 .....	98
Tab. 32: Integrationshäufigkeit der Expressionsplasmide .....	99

## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Gerhard Sandmann für die gute Betreuung und die Möglichkeit danken, dass ich in seinem Arbeitskreis meine Doktorarbeit anfertigen konnte.

Weiter danke ich „DSM Nutritional Products“ für die Bereitstellung der mutagenisierten Stämme und die enge Zusammenarbeit, wodurch diese Doktorarbeit auch erst ermöglicht wurde. Es war eine große und positive Erfahrung, zusammen mit einem großen Biotechnologieunternehmen ein solches Projekt zu bearbeiten. Insbesondere danke ich hierbei Andrea Kreuzer für die direkte Zusammenarbeit an diesem Projekt und den vielen wissenschaftlichen Gesprächen während des Bearbeitungszeitraumes. Ich danke auch für die Zusammenarbeit mit dem Forschungsinstitut DECHEMA, insbesondere Dr. Jens Schrader, Dr. Hendrik Schewe und Isabell Schmidt für den Gedankenaustausch auf persönlicher und wissenschaftlicher Ebene. Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und dem Land Hessen danke ich für die Mitfinanzierung des Projekts.

Weiterer Dank geht an all meine Arbeitskollegen, insbesondere an Dr. Jürgen Breitenbach für seine großartige Unterstützung, sowie Dr. Sabine Steiger für ihr stets offenes Ohr in allen Belangen und Andreas Lück für die tolle Assistenz und des Gedankenaustauschs abseits der Wissenschaft. Außerdem danke ich Ulrike Eilers und Anja Röding für die moralische, wie auch wissenschaftliche Unterstützung. Ich danke auch Jascha Weisenborn für die Unterstützung bei den Mikroskopieanalysen und Manfred Ruppel für die REM-Aufnahmen.

Mein Dank außerhalb der Laborwände gilt vor allem meiner lieben Familie um Elfriede und Manfred Gassel, sowie der Familie um Waltraud und Helmut Neudecker. Insbesondere möchte ich hierbei meiner Freundin und Ehefrau-to-be Nadja Neudecker für ihr grenzenloses Vertrauen, ihre ebenso unendliche Geduld, ihre Liebe und ihren Glauben an mich bedanken. Des weiteren danke ich meiner sehr guten Freundin Nanette Messemer für die regelmäßige, moralische Unterstützung und den dauerhaften persönlichen Kontakt, der mir sehr viel bedeutet.

## 11. Erklärung

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

Frankfurt am Main, den .....

.....

(Unterschrift)

### Eidesstattliche Versicherung

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

„Herstellung eines

*Phaffia rhodozyma* - Stamms mit verstärkter Astaxanthin-Synthese  
über gezielte genetische Modifikation  
chemisch mutagenisierter Stämme“

selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den .....

.....

(Unterschrift)



## 12. Anhang

### 12.1 *Rhodococcus sp. CIP* Phänotyp

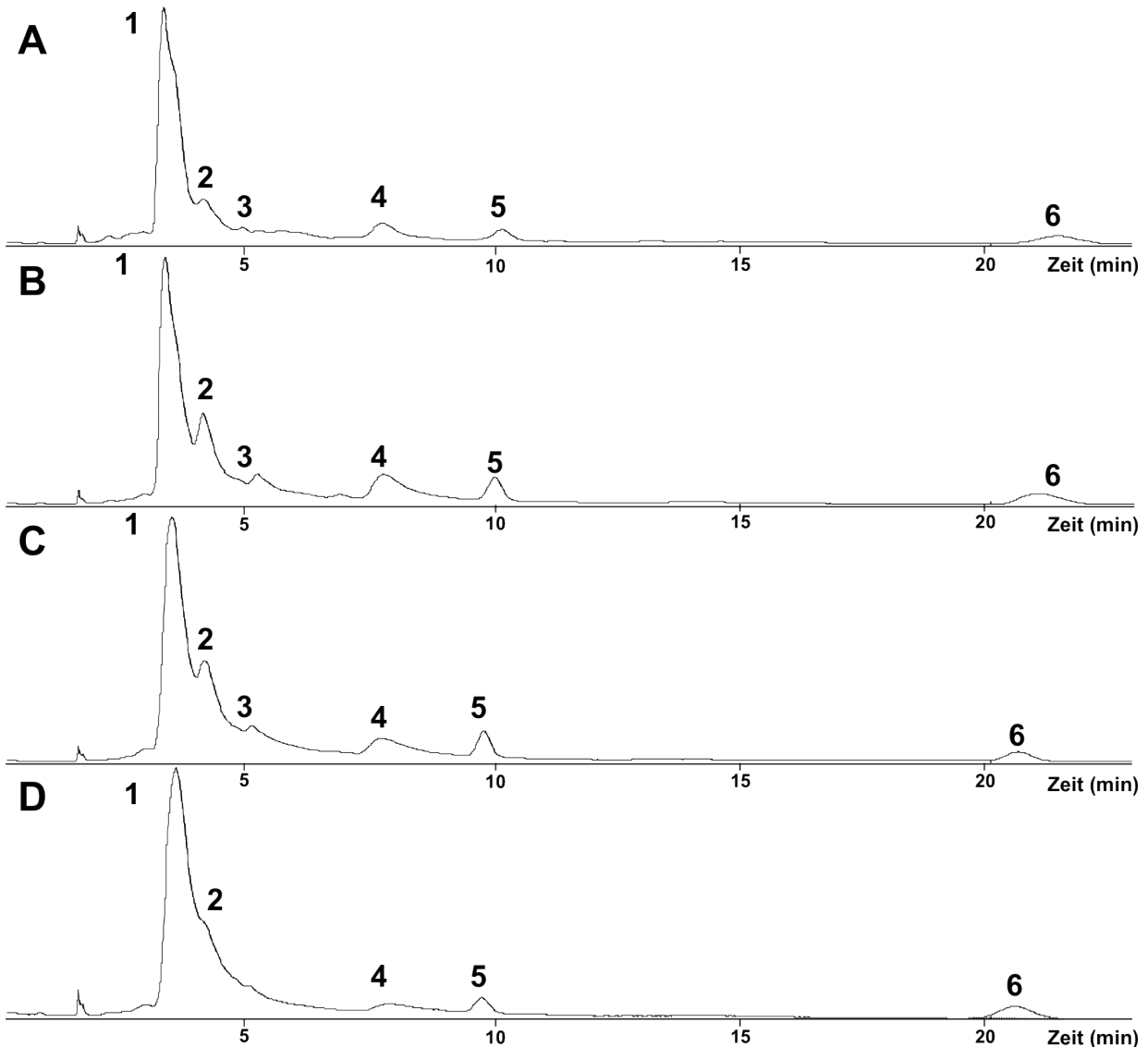


**Abbildung 1: Fotografie *Rhodococcus sp. CIP***

Die Fotografie zeigt eine Kultur von *Rhodococcus sp. CIP*. Die Kultivierung erfolgte auf festem YPD-Medium mit 2% Glucose. Die Anzuchtdauer betrug fünf Tage bei 28°C. Die Spezies zeigt eine homogene, gelbe Pigmentierung und wächst in hefeartigen Einzelkolonien.

## 12.2 HPLC-Analysen der Astaxanthin-Hochproduzenten

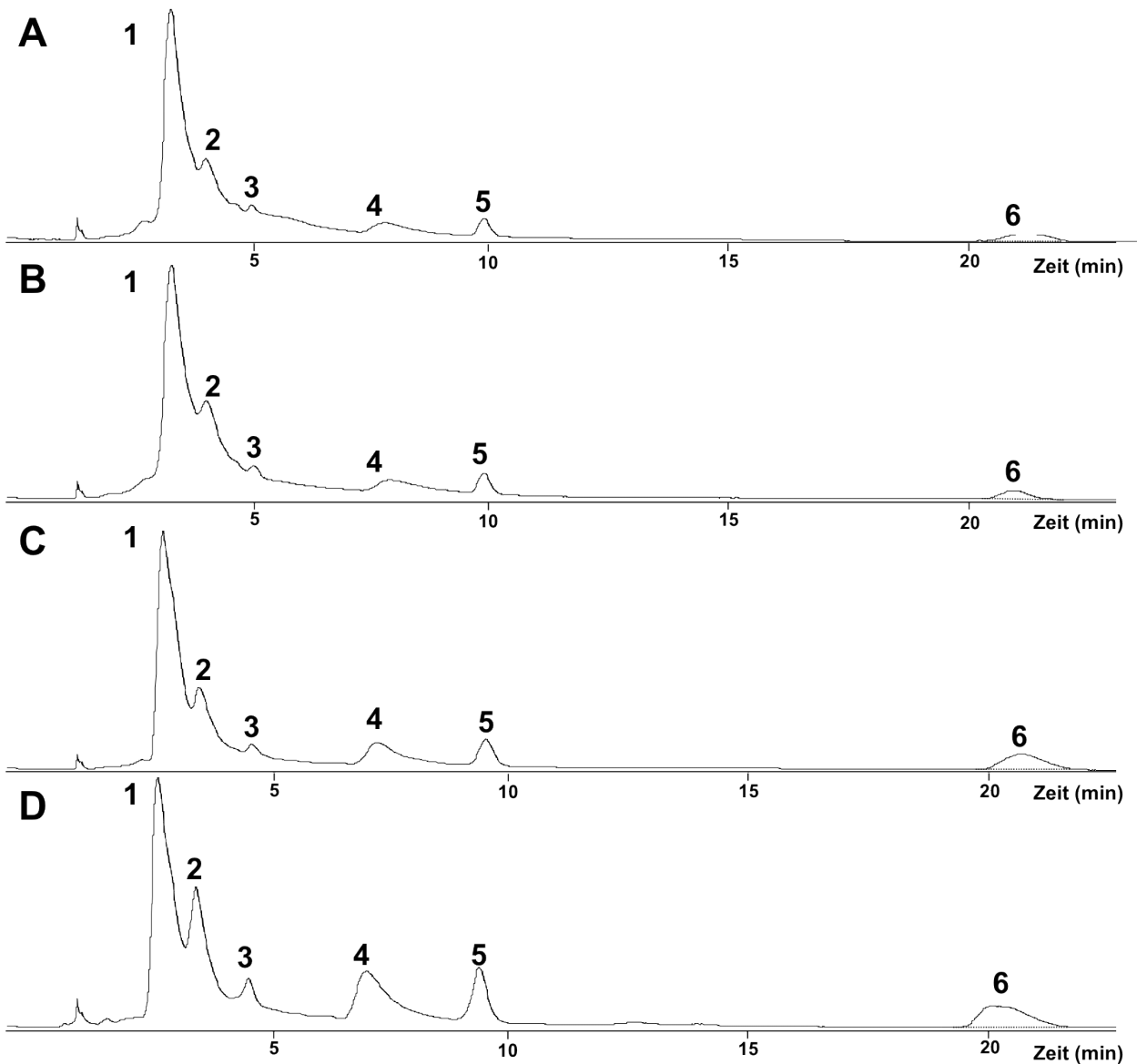
### 12.2.1 AXJ-20-Stammlinie



**Abbildung 2: Chromatogramme der HPLC-Analysen der AXJ-20 Transformanten.**

(A) AXJ-20, (B) AXJ-YBASY-37, (C) AXJ-tHMG1/crtE-28, (D) AXJ-ASY-4. Kultivierung: 8 Tage, GSM-Medium, 21°C. Bedingungen HPLC: C18-RP Säule, 20°C, Flussrate 1ml/min, Mobile Phase 15B. Das Elutionsprofil setzt sich aus folgenden Carotinoiden zusammen: (1) Astaxanthin, (2) 9-cis-Astaxanthin, (3) Canthaxanthin, (4) OH-Echinenon, (5) Echinenon, (6)  $\beta$ -Carotin

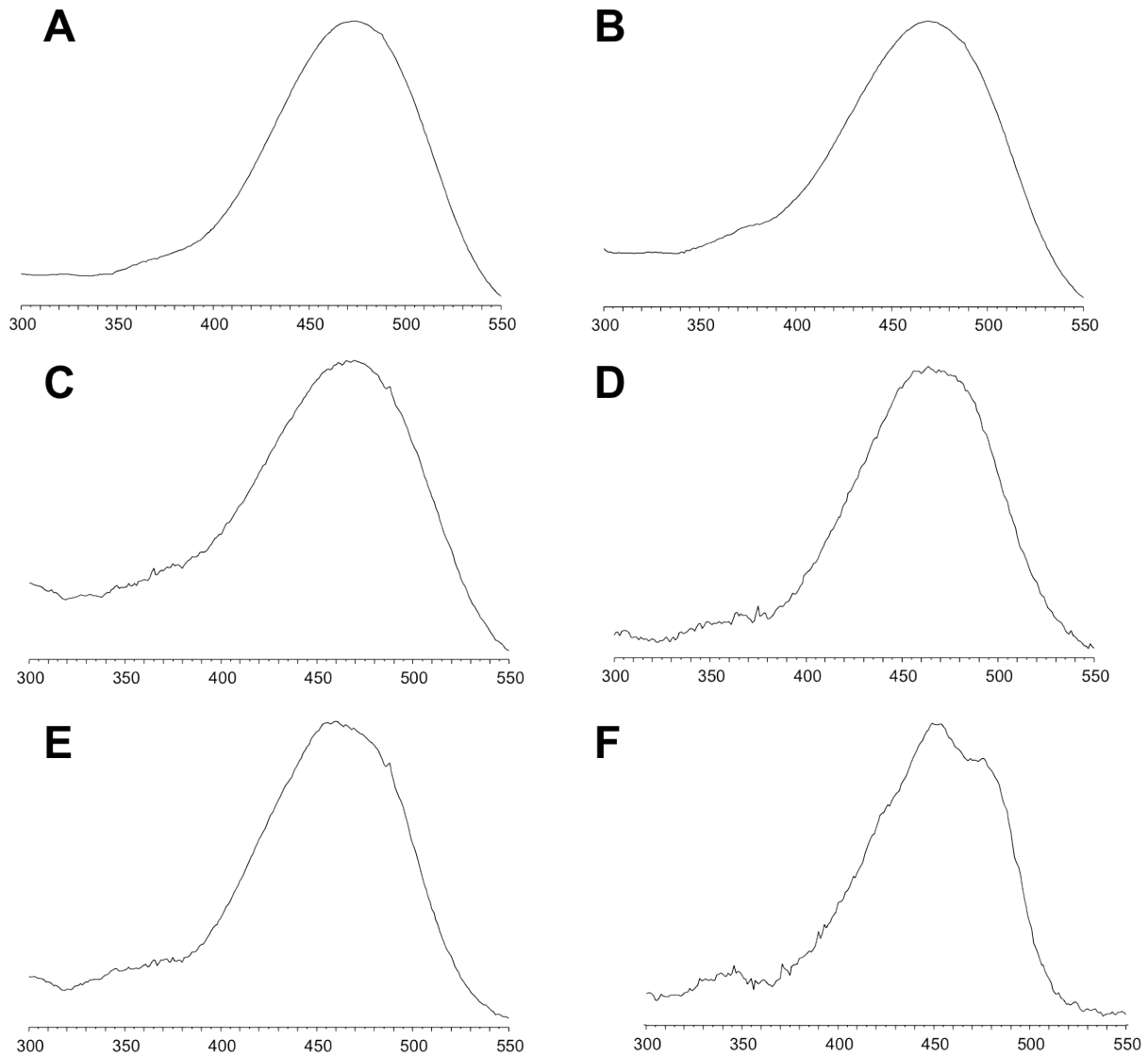
## 12.2.1 AXG-13-Stammlinie



**Abbildung 3: Chromatogramme der HPLC-Analysen der AXG-13 Transformanten**

(A) AXG-13, (B) AXG-YBASY-5, (C) AXG-tHMG1/crtE-22, (D) AXG-ASY-1. Kultivierung: 8 Tage, GSM-Medium, 21°C. Bedingungen HPLC: C18-RP Säule, 20°C, Flussrate 1ml/min, Mobile Phase 15B. Das Elutionsprofil setzt sich aus folgenden Carotinoiden zusammen: (1) Astaxanthin, (2) 9-cis-Astaxanthin, (3) Canthaxanthin, (4) OH-Echinenon, (5) Echinenon, (6)  $\beta$ -Carotin

## 12.2.3 Spektren der detektierten Carotinoide in den Transformanten

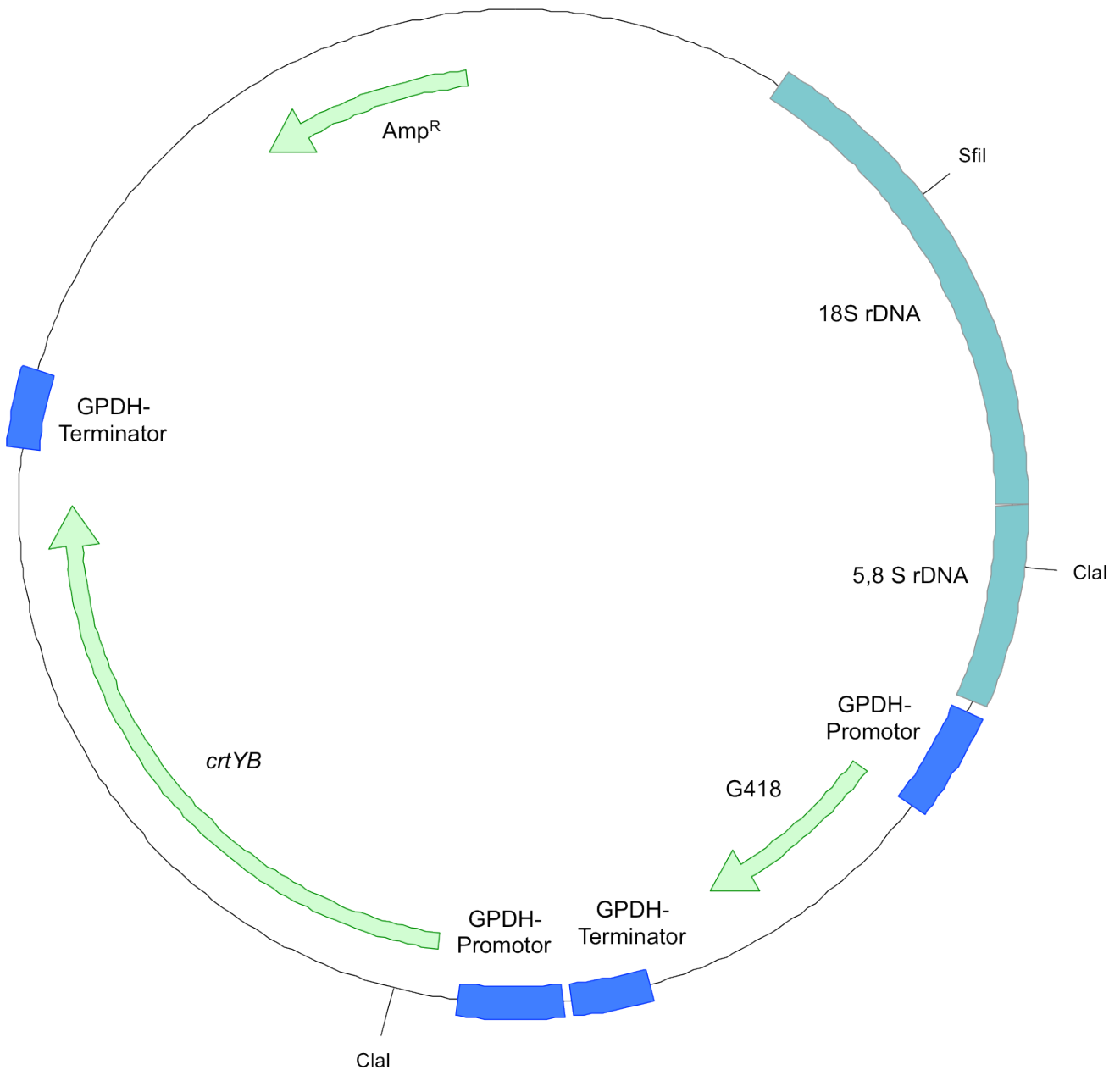


**Abbildung 4: Spektren der analysierten Carotinoiden in den Überexpressionsmutanten.**

Aufgetragen ist das jeweilige Spektrum der einzelnen Carotinoide in den Überexpressionsmutanten gegen die Wellenlänge in nm. Die Absorptionsmaxima zeigen (A) Astaxanthin; bei 475 nm, (B) 9-cis-Astaxanthin; bei 473 nm (C) Canthaxanthin; bei 470 nm, (D) OH-Echinenon; bei 465 nm, (E) Echinenon; bei 460 nm, (F)  $\beta$ -Carotin; bei 425 nm 450 nm 485 nm

## 12.3 Karten der Transformationsvektoren

### 12.3.1 Plasmidkarte pPR13F:



**Abbildung 5: Plasmidkarte pPR13F**

Charakteristika: Ampicillinresistenz (**Amp<sup>R</sup>**), *P.r.*-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Promotor und Terminator (**GPDH-Promotor/- Terminator**), Geneticinresistenz (**G418**), Phytoensynthase/Lycopinzyklase (***crtYB***), rDNA-Eintrittssequenz für homologe Rekombination (**5,8S-rDNA** und **18S-rDNA**), Restriktionsschnittstellen für Linearisierung des Vektors (**SfiI** und **Clal**).

## 12.3.2 Plasmidkarte pPR2TNHasy:

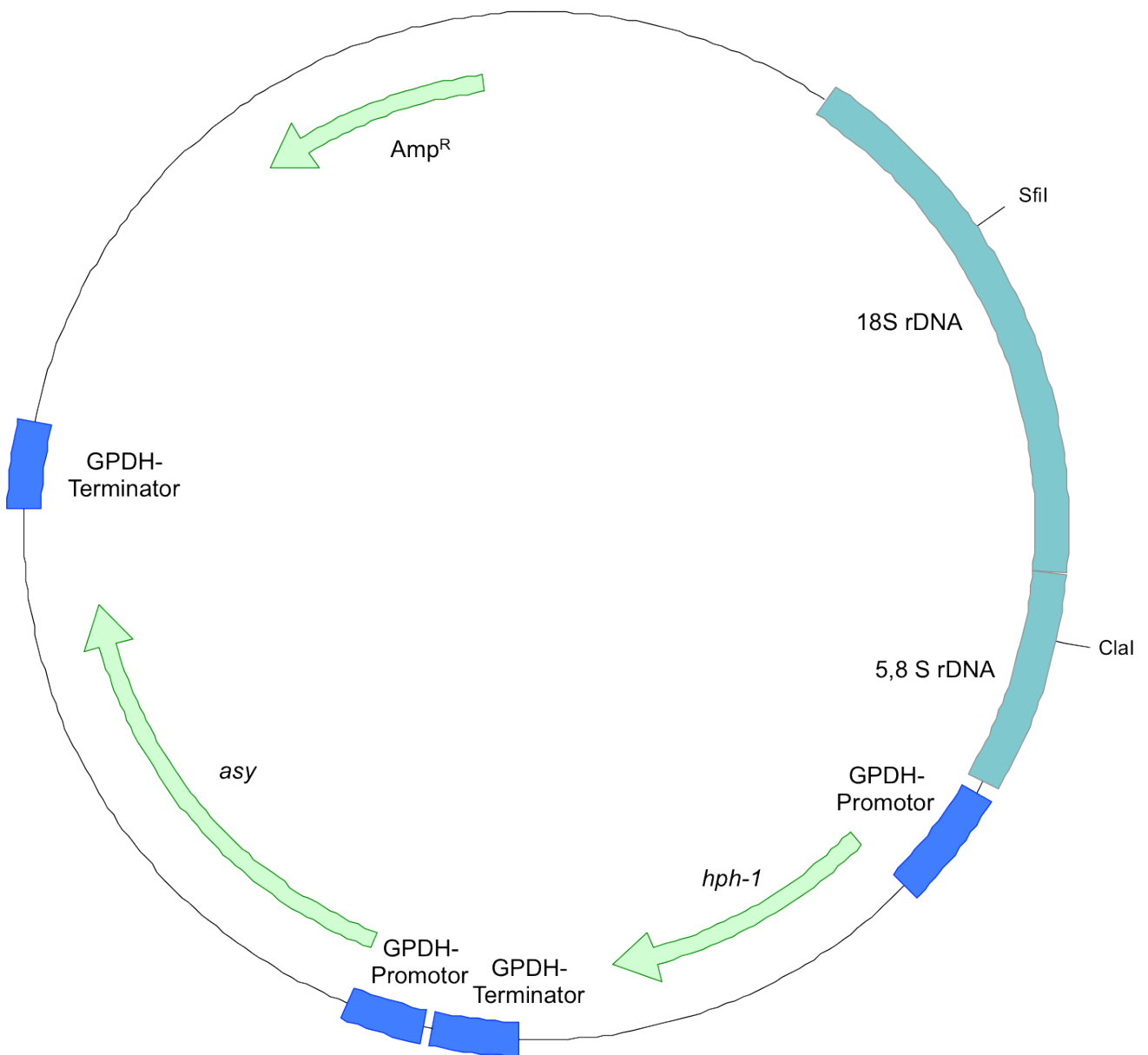


Abbildung 6: Plasmidkarte pPR2TNHasy

Charakteristika: Ampicillinresistenz (**Amp<sup>R</sup>**), *P.r.*-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Promotor und Terminator (**GPDH-Promotor/- Terminator**), Hygromycinresistenz (***hph-1***), Astaxanthinsynthase (***asy***), rDNA-Eintrittssequenz für homologe Rekombination (**5,8S-rDNA** und **18S-rDNA**), Restriktionsschnittstellen für Linearisierung des Vektors (***SfiI*** und ***ClaI***).

## 12.3.3 Plasmidkarte pPR13Fasy:

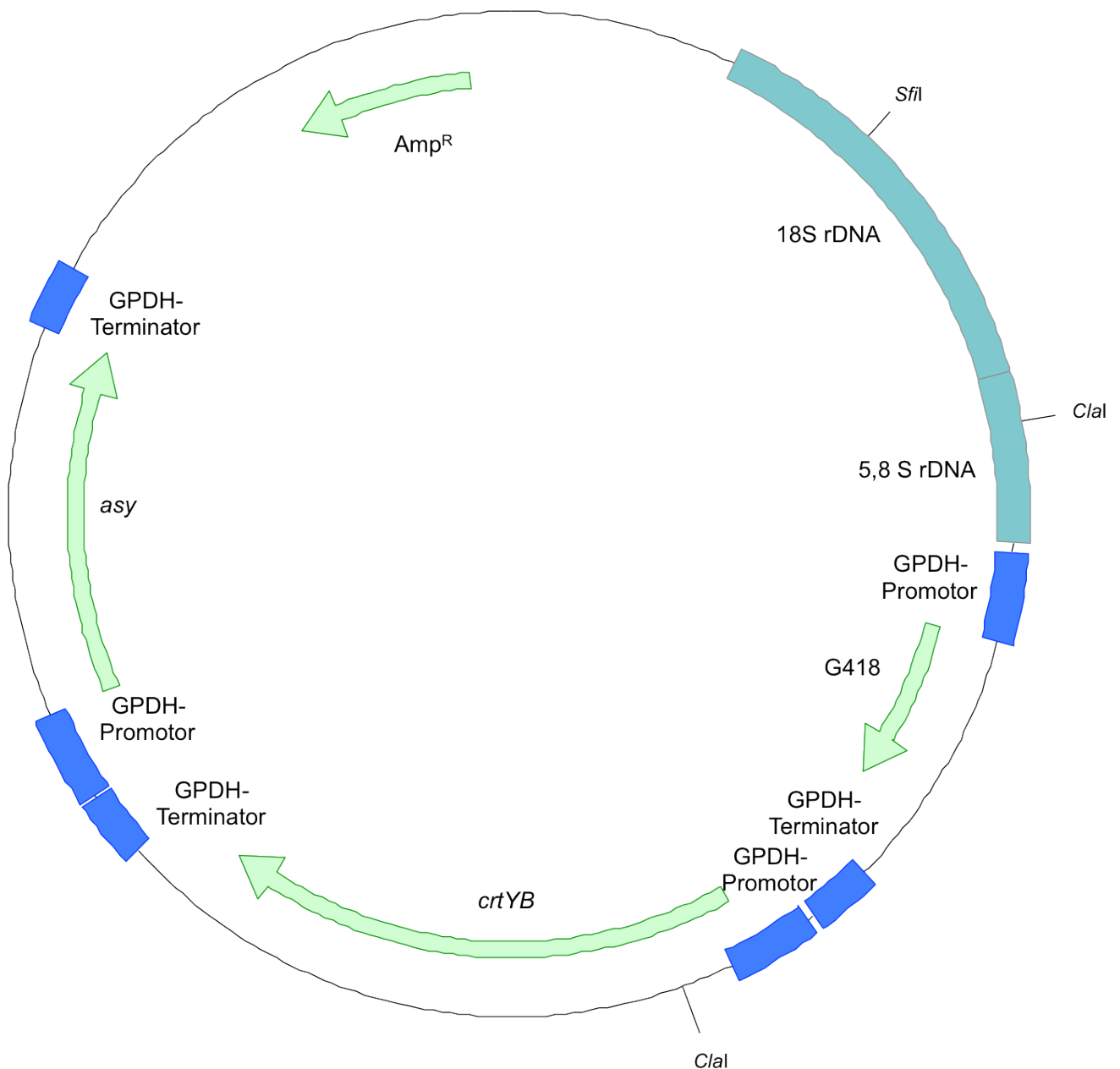


Abbildung 7: Plasmidkarte pPR13Fasy

Charakteristika: Ampicillinresistenz (**Amp<sup>R</sup>**), *P.r.*-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Promotor und Terminator (**GPDH-Promotor/- Terminator**), Geneticinresistenz (**G418**), Phytoensynthese/Lycopinzyklase (**crtYB**), Astaxanthinsynthese (**asy**), rDNA-Eintrittssequenz für homologe Rekombination (**5,8S-rDNA** und **18S-rDNA**), Restriktionsschnittstellen für Linearisierung des Vektors (**SfiI**).

## 12.3.4 Plasmidkarte pPR2TNH-tHMG1/crtE

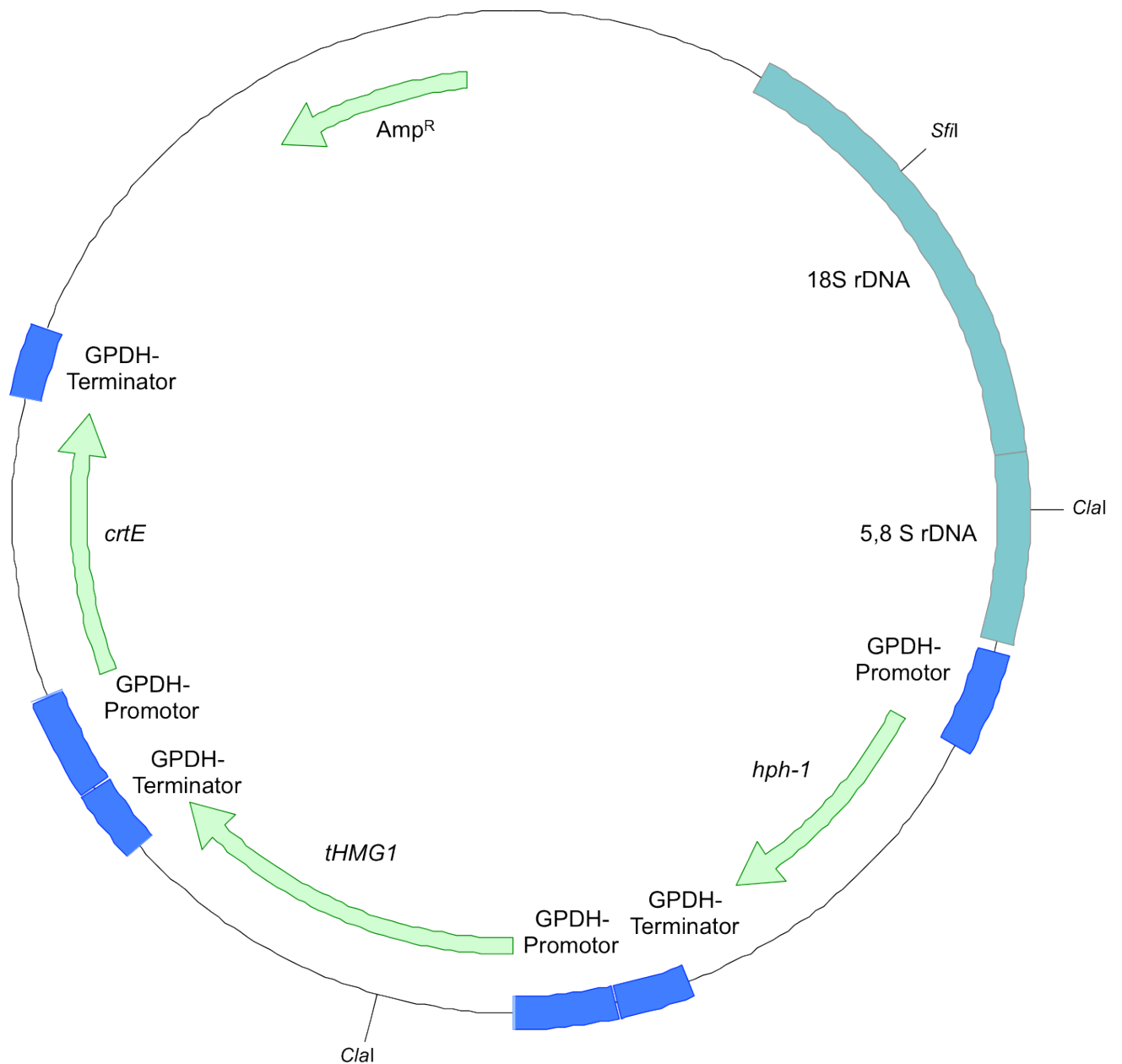


Abbildung 8: Plasmidkarte pPR2TNH-tHMG1/crtE

Charakteristika: Ampicillinresistenz (**Amp<sup>R</sup>**), *P.r.*-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Promotor und Terminator (**GPDH-Promotor/- Terminator**), Hygromycinresistenz (***hph-1***), GGPP-Synthase (***crtE***), *S.c.*-HMG-CoA-Reduktase (***tHMG1***), rDNA-Eintrittssequenz für homologe Rekombination (**5,8S-rDNA** und **18S-rDNA**), Restriktionsschnittstellen für Linearisierung des Vektors (***SfiI***).



## 12.3.5 Plasmidkarte pPR2TNo-asy:

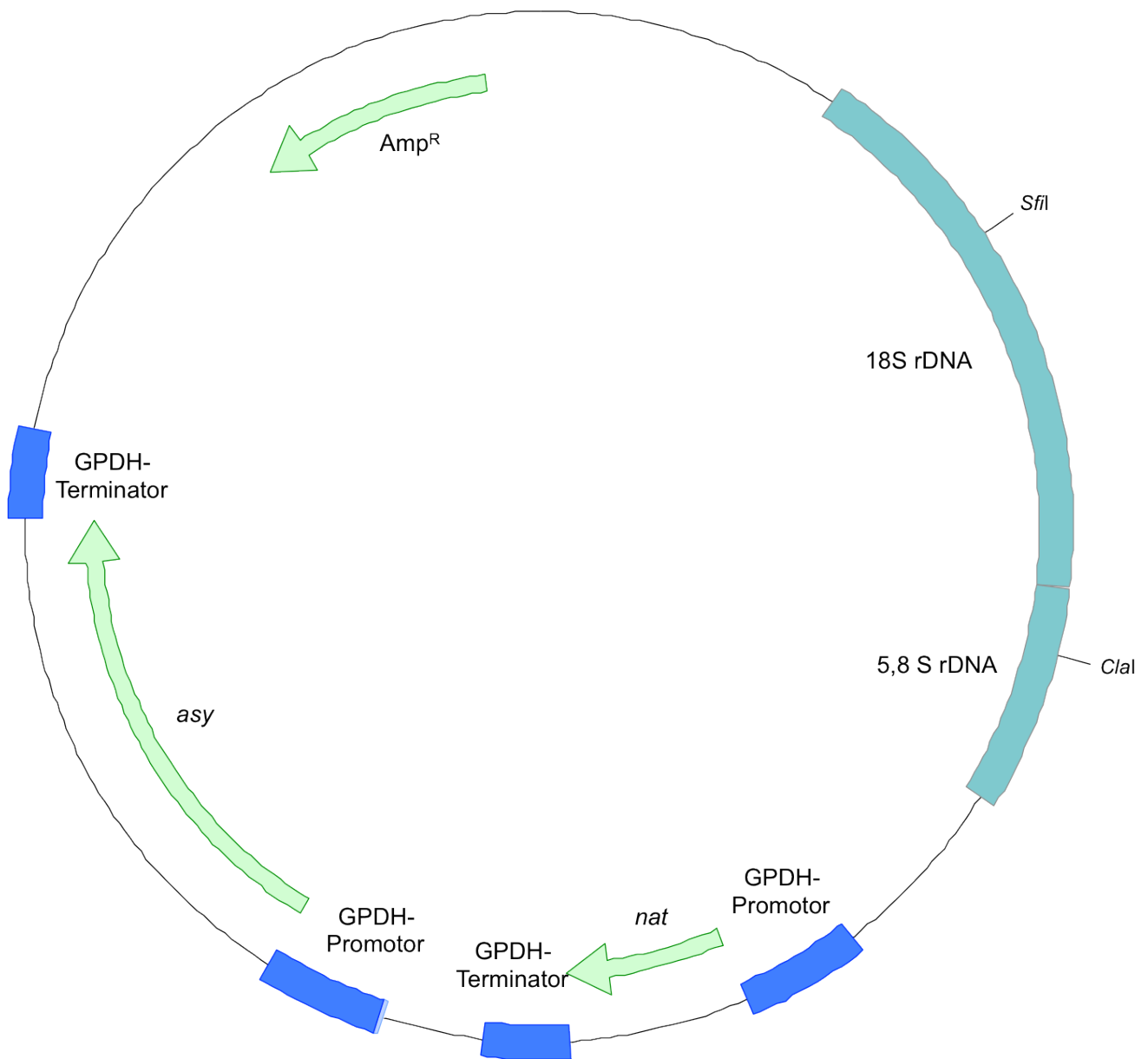


Abbildung 9: Plasmidkarte pPR2TNo-asy

Charakteristika: Ampicillinresistenz (**Amp<sup>R</sup>**), *P.r.*-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Promotor und Terminator (**GPDH-Promotor/- Terminator**), Nourseothricinresistenz (**nat**), Astaxanthinsynthase (**asy**), rDNA-Eintrittssequenz für homologe Rekombination (**5,8S-rDNA** und **18S-rDNA**), Restriktionsschnittstellen für Linearisierung des Vektors (**SfiI** und **ClaI**).

## 12.3.6 Plasmidkarte pPRcDNA1bkt830:

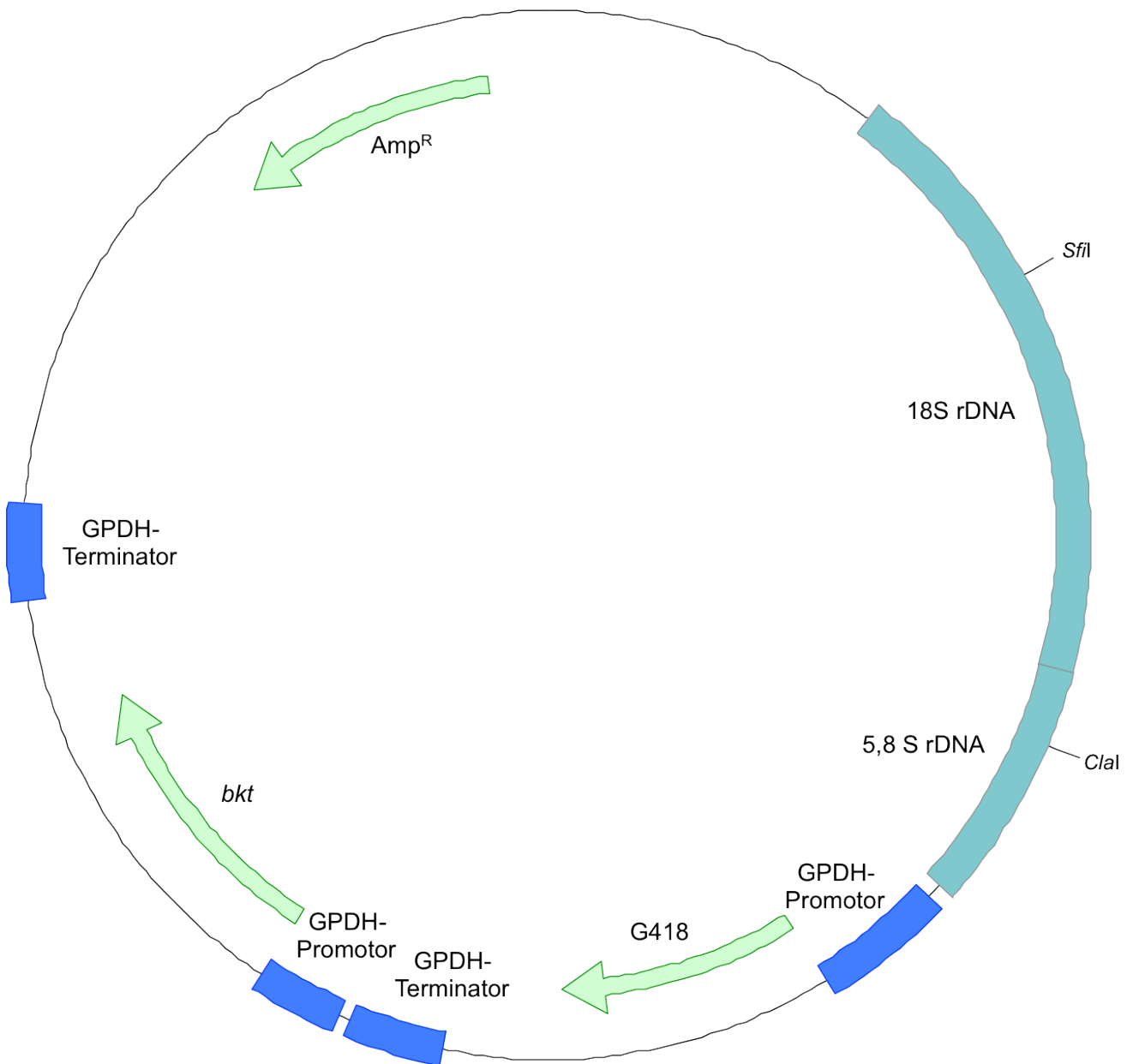
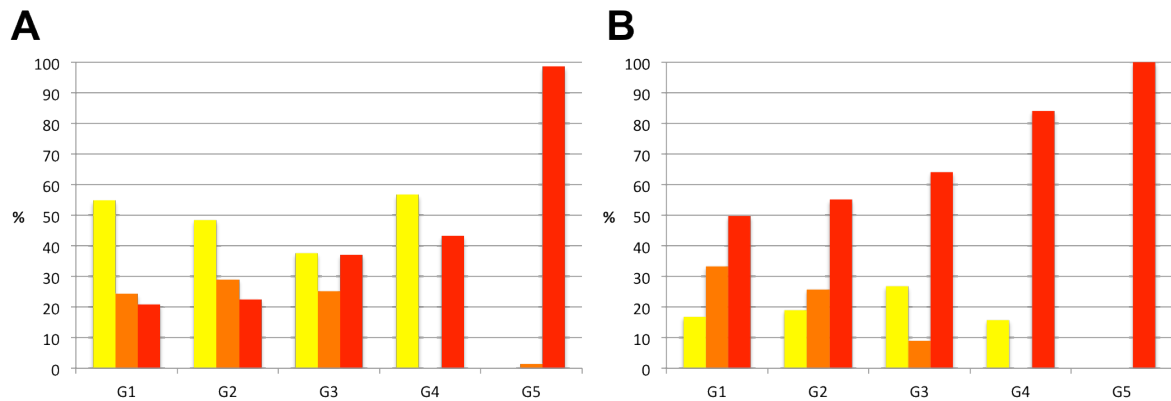


Abbildung 10: Plasmidkarte pPR2TNbkt

Charakteristika: Ampicillinresistenz (**Amp<sup>R</sup>**), *P.r.*-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Promotor und Terminator (**GPDH-Promotor/- Terminator**), Geneticinresistenz (**G418**), Astaxanthinsynthase (**asy**), rDNA-Eintrittssequenz für homologe Rekombination (**5,8S-rDNA** und **18S-rDNA**), Restriktionsschnittstellen für Linearisierung des Vektors (**SfiI** und **ClaI**).

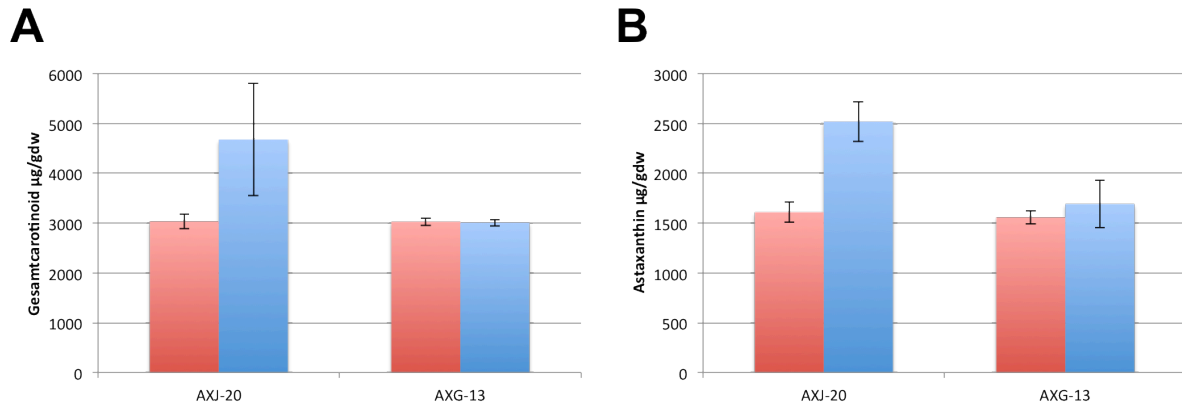
## 12.4 Pigmentooptimierung in PR1-104/bkt#2



**Abbildung 11: Darstellung der Pigmentooptimierung von PR1-104/bkt#2.**

Die Abbildung zeigt die prozentuale Verteilung der Pigmentierung der gewachsenen Kolonien von PR1-104/bkt#2 über fünf Generationen auf festem YPD-Medium mit **(A)** und ohne **(B)** selektive Bedingungen. Es wurde jeweils eine rote Kolonie auf eine frische YPD-Agar-Platte pro Generation überimpft. Die Verteilung weist unter selektiven Bedingungen eine stärkere Selektion nach rot pigmentierten Einzelkolonien auf, als unter nicht-selektiven Bedingungen. Die Farben der Diagrammteile entsprechen hier der tatsächlichen Pigmentierung der ausgezählten Kolonien.

## 12.5 Carotinoidsynthese der Mutanten verschiedener Bereitstellungen



**Abbildung 12: Carotinoidbiosynthese in AXG-13 und AXJ-20 erster und zweiter Bereitstellung.**

Die Diagramme zeigen eine Gegenüberstellung des Gesamtcarotinoidgehaltes (**A**) der Stämme AXG-13 und AXJ-20 aus erster (**rot**) und zweiter (**blau**) Bereitstellung durch „DSM Nutritional Products“. Der Gesamtcarotinoidgehalt des Stammes AXJ-20 lag in der zweiten, bereitgestellten, Generation mit  $4677 \pm 1127 \mu\text{g/gdw}$  im Schnitt deutlich höher als das erste Isolat mit  $3034 \pm 145 \mu\text{g/gdw}$ . Beim Stamm AXG-13 konnte hingegen kein Unterschied zwischen den beiden Isolaten festgestellt werden (Bereitstellung 1 (**rot**)  $3028 \pm 80 \mu\text{g/gdw}$  zu  $3008 \pm 66 \mu\text{g/gdw}$  in zweiter Bereitstellung (**blau**)). Der Astaxanthingehalt (**B**) zeigt eine Steigerung zwischen der ersten (**rot**) und zweiten (**blau**) Bereitstellung bei AXJ-20 von  $1609 \pm 103 \mu\text{g/gdw}$  auf  $2439 \pm 197 \mu\text{g/gdw}$ , bei AXG-13 von  $1558 \pm 66 \mu\text{g/gdw}$  auf  $1691 \pm 236 \mu\text{g/gdw}$ .

12. Anhang

12.6 Rohdaten der Carotinoidanalysen:

TC µg/gdw	AXJ-20	AXJ-YBASY- 37	AXJ- tHMG1/crtE- 26	AXJ- tHMG1/crtE- 28	AXJ-ASY-4	AXJ-ASY-6
Replikat 1	4091	6222	7540	8476	12901	11190
Replikat 2	4371	7142	8413	9352	10759	8556
Replikat 3	3961	6190	7283	8880	10443	
Replikat 4				8976		

AST µg/gdw	AXJ-20	AXJ-YBASY- 37	AXJ- tHMG1/crtE- 26	AXJ- tHMG1/crtE- 28	AXJ-ASY-4	AXJ-ASY-6
Replikat 1	2659	3733	5170	5170	7639	6417
Replikat 2	2377	3664	5985	5985	9603	8966
Replikat 3	2280	3590	6483	6483	8289	
Replikat 4			5655	5655		

TC µg/gdw	AXG-13	AXG-YBASY- 5	AXG- tHMG1/crtE- 21	AXG- tHMG1/crtE- 22	AXG-ASY-1	AXG-ASY-3
Replikat 1	3084	6095	8460	7714	12686	10426
Replikat 2	2969	5119	8737	9524	12095	9905
Replikat 3	2971	5571	6627	8111	12386	
Replikat 4				10317		

AST µg/gdw	AXG-13	AXG-YBASY- 5	AXG- tHMG1/crtE- 21	AXG- tHMG1/crtE- 22	AXG-ASY-1	AXG-ASY-3
Replikat 1	1511	3657	4906	4551	7499	6777
Replikat 2	1959	2503	6116	5428	8519	6322
Replikat 3	1604	3120	4970	6190	8175	
Replikat 4				4542		

## 12. Anhang

<b>Canthaxanthin µg/gdw</b>	<b>AXJ-20</b>	<b>AXJ-YBASY-37</b>	<b>AXJ-tHMG1/crtE-28</b>	<b>AXJ-ASY-4</b>
<b>Replikat 1</b>	327	622	580	595
<b>Replikat 2</b>	306	857	901	97
<b>Replikat 3</b>	317	681	795	313
<b>Replikat 4</b>			898	
<b>3-OH- Echinenon µg/gdw</b>	<b>AXJ-20</b>	<b>AXJ-YBASY-37</b>	<b>AXJ-tHMG1/crtE-28</b>	<b>AXJ-ASY-4</b>
<b>Replikat 1</b>	532	871	1256	1211
<b>Replikat 2</b>	481	786	1510	1114
<b>Replikat 3</b>	555	867	1435	1149
<b>Replikat 4</b>			1526	
<b>Echinenon µg/gdw</b>	<b>AXJ-20</b>	<b>AXJ-YBASY-37</b>	<b>AXJ-tHMG1/crtE-28</b>	<b>AXJ-ASY-4</b>
<b>Replikat 1</b>	614	498	205	391
<b>Replikat 2</b>	568	286	329	471
<b>Replikat 3</b>	356	433	383	564
<b>Replikat 4</b>			260	
<b>β-Carotin µg/gdw</b>	<b>AXJ-20</b>	<b>AXJ-YBASY-37</b>	<b>AXJ-tHMG1/crtE-28</b>	<b>AXJ-ASY-4</b>
<b>Replikat 1</b>	286	311	361	1117
<b>Replikat 2</b>	437	500	489	1184
<b>Replikat 3</b>	475	619	344	731
<b>Replikat 4</b>			539	

<b>Canthaxanthin µg/gdw</b>	<b>AXG-13</b>	<b>AXG-YBASY-5</b>	<b>AXG-tHMG1/crtE-22</b>	<b>AXG-ASY-1</b>
<b>Replikat 1</b>	400	613	455	543
<b>Replikat 2</b>	289	950	979	1185
<b>Replikat 3</b>	486	411	1003	743
<b>Replikat 4</b>			1444	
<b>3-OH- Echinenon µg/gdw</b>	<b>AXG-13</b>	<b>AXG-YBASY-5</b>	<b>AXG-tHMG1/crtE- 22</b>	<b>AXG-ASY-1</b>
<b>Replikat 1</b>	123	501	794	1638
<b>Replikat 2</b>	528	731	1056	1451
<b>Replikat 3</b>	431	599	1157	1362
<b>Replikat 4</b>			1135	
<b>Echinenon µg/gdw</b>	<b>AXG-13</b>	<b>AXG-YBASY-5</b>	<b>AXG-tHMG1/crtE- 22</b>	<b>AXG-ASY-1</b>
<b>Replikat 1</b>	72	279	428	613
<b>Replikat 2</b>	189	310	335	484
<b>Replikat 3</b>	327	207	623	743
<b>Replikat 4</b>			619	
<b>β-Carotin µg/gdw</b>	<b>AXG-13</b>	<b>AXG-YBASY-5</b>	<b>AXG-tHMG1/crtE- 22</b>	<b>AXG-ASY-1</b>
<b>Replikat 1</b>	63	501	606	1255
<b>Replikat 2</b>	146	366	605	847
<b>Replikat 3</b>	279	230	231	991
<b>Replikat 4</b>			825	1031

## 12. Anhang

<b>TC µg/gdw</b>	<b>AXJ-20</b>	<b>AXJ-20/crtYB</b>	<b>AXJ-20/crtYB/asy</b>
<b>Replikat 1</b>	2971	4028	5544
<b>Replikat 2</b>	2932	4190	5206
<b>Replikat 3</b>	3200	4730	4902

<b>AST µg/gdw</b>	<b>AXJ-20</b>	<b>AXJ-20/crtYB</b>	<b>AXJ-20/crtYB/asy</b>
<b>Replikat 1</b>	1634	2372	5017
<b>Replikat 2</b>	1495	2904	4644
<b>Replikat 3</b>	1695	3155	4412

## 12.7 Rohdaten der Realtime-PCR-Analysen

### 12.7.1 Effizienzbestimmungen

<b>crtYB-RT-for/rev</b>		<b>crtE-RT-for/rev</b>		<b>Asy-RT-for/rev</b>	
DNA	C(t)-Wert	DNA	C(t)-Wert	DNA	C(t)-Wert
0,1 ng	21,01	1 ng	19,91	1 ng	19,52
0,05 ng	22,2	0,5 ng	20,93	0,5 ng	20,71
0,001 ng	24,42	0,1 ng	23,34	0,1 ng	23,16
0,005 ng	25,22	0,05 ng	24,1	0,05 ng	24,26
0,0001 ng	27,66	0,01 ng	27,13	0,01 ng	26,46
Steigung		Steigung		Steigung	
-3,26		-3,54		-3,47	
Effizienz		Effizienz		Effizienz	
2,024		2,29		1,94	

### 12.7.2 C(t)-Werte der „Realtime-PCR-Analysen“

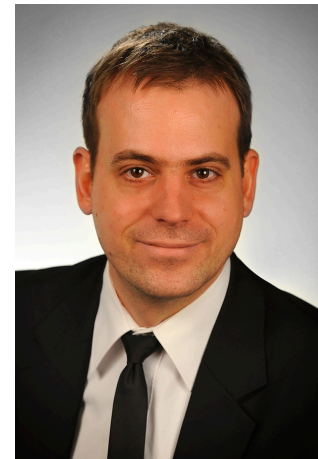
<b>crtYB-RT-for/rev</b>		<b>crtE-RT-for/rev</b>		<b>Asy-RT-for/rev</b>	
DNA	C(t)-Wert	DNA	C(t)-Wert	DNA	C(t)-Wert
AXJ-20 I	24,38	AXJ-20 I	23,28	AXJ-20 I	23,19
AXJ-20 II	24,35	AXJ-20 II	23,33	AXJ-20 II	23,29
AXJ-20 III	24,17	AXJ-20 III	23,43	AXJ-20 III	23,04
AXJ-YBASY-37 I	22,61	AXJ-crtE-28 I	20,81	AXJ-ASY-4 I	21
AXJ-YBASY-37 II	22,65	AXJ-crtE-28 II	20,61	AXJ-ASY-4 I	20,73
AXJ-YBASY-37 III	22,44	AXJ-crtE-28 III	20,54	AXJ-ASY-4 I	20,76
AXG-13 I	24,32	AXG-13 I	23,05	AXG-13 I	22,91
AXG-13 II	24,59	AXG-13 II	23,09	AXG-13 II	22,9
AXG-13 III	24,12	AXG-13 III	23,1	AXG-13 III	22,9
AXG-YBASY-5 I	21,74	AXG-crtE-22 I	20,41	AXG-ASY-1 I	20,93
AXG-YBASY-5 II	21,63	AXG-crtE-22 II	20,72	AXG-ASY-1 II	20,82
AXG-YBASY-5 III	21,68	AXG-crtE-22 III	20,46	AXG-ASY-1 III	20,81



## Lebenslauf:

### Persönliche Daten:

Name: Sören Gassel  
Geburtstag: 01.10.1979  
Geburtsort: Hanau  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Adresse: Rudolph-Weber-Str. 4  
63457 Hanau  
Telefon: 06181 – 9659735  
0170 – 5440678  
eMail-Adresse: soeren.gassel@gmail.de  
gassel@bio.uni-frankfurt.de



### Ausbildung:

Juni 2008 – Januar 2014      Promotion an der Goethe-Universität Frankfurt/ Main  
  
Fachbereich 15 – Biowissenschaften  
  
Angefertigt am Institut für Molekulare Biowissenschaften,  
AK Prof. Dr. Sandmann  
  
Titel der Arbeit: Herstellung eines *Phaffia rhodozyma* -  
Stamms mit verstärkter Astaxanthin-Synthese über  
gezielte genetische Modifikation chemisch mutagenisierter  
Stämme

Oktober 2001 – März 2008      Studium der Biologie an der Goethe-Universität Frankfurt/  
Main  
  
Hauptfächer:  
- Zellbiologie (Prof. Dr. Lutz Nover)  
- Genetik (Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz)  
- Tierphysiologie (Prof. Dr. Jörg Oehlmann und Priv. Doz.  
Dr. Elke Schleucher bei Prof. Dr. Roland Prinzinger)  
  
Diplomarbeit angefertigt am Institut für Molekulare  
Biowissenschaften, AK Prof. Dr. Osiewacz  
  
Thema der Diplomarbeit: „Molekulargenetische  
Untersuchungen zur Rolle mitochondrialer  
Hitzestressproteine bei der Alterung von *Podospora  
anserina*“

März 2000      Abitur am Lichtenberg-Oberstufengymnasium Bruchköbel

1990 – 1997      Karl-Rehbein-Schule Hanau (Gymnasium)

1986 – 1990      Kurt-Schumacher-Schule (Grundschule)