



**Der Hefepilz *Xanthophyllomyces dendrorhous*
als Produktionsplattform für die Biosynthese von
Phytoen und Zeaxanthin**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Hendrik Pollmann

aus Lahnstein

Frankfurt, 2017

vom Fachbereich 15 der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. Meike Piepenbring

Gutachter: Herr Prof. Dr. Gerhard Sandmann

Frau Prof. Dr. Claudia Büchel

Datum der Disputation:

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Sandmann für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für die Möglichkeit, an diesem spannenden Thema zu arbeiten, bedanken. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Eckard Boles für die Möglichkeit meine Arbeiten in seinen Laboren fortzuführen. Frau Prof. Dr. Claudia Büchel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei meinem Kollegen Jürgen Breitenbach möchte ich mich für die Klonierung der Knock-Out- und Knock-In-Konstrukte und für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Mein Dank gilt auch Hendrik Wolff für die Durchführung der HR-ESI-MS-Analysen. Weiterer Dank geht an alle Mitglieder der Arbeitskreise Sandmann und Boles für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meiner Frau Kim danke ich für die andauernde Unterstützung während meiner Arbeit. Bei meinen Eltern und Brüdern möchte ich mich für das fleißige Korrekturlesen und die vielen wertvollen Anmerkungen zum Ende dieser Arbeit bedanken.

Mainz, im Mai 2017

Hendrik Pollmann

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
EIGENE PUBLIKATIONEN	XVI
ZUSAMMENFASSUNG	XVII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Carotinoide	1
1.1.1 Struktur und biologische Funktion.....	1
1.1.2 Phytoen	3
1.1.3 Zeaxanthin.....	4
1.1.4 Multioxigenierte Zeaxanthinderivate	6
1.2 Der Hefepilz <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	7
1.2.1 Merkmale und Kultivierung.....	7
1.2.2 Carotinoidbiosynthese.....	8
1.2.3 Genetische Modifikation der Carotinoidbiosynthese.....	12
1.3 Zielsetzung	14
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Geräte	16
2.2 Verbrauchsmaterial	17
2.3 Chemikalien	17
2.4 DNA-modifizierende Enzyme	19
2.5 Organismen und Plasmide	20
2.6 Mikrobiologische Methoden	23
2.6.1 Wachstumsmedien.....	23
2.6.2 Weizenstrohydrolysat.....	23
2.6.3 Antibiotikakonzentrationen	24
2.6.4 Herstellung einer Dauerkultur	24
2.6.5 Kultivierung von <i>E.coli</i>	24
2.6.6 Kultivierung von <i>X. dendrorhous</i> in Schikanekolben.....	24
2.6.7 Kultivierung von <i>X. dendrorhous</i> in einem Bioreaktor.....	25

2.7 Molekularbiologische Methoden	25
2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels alkalischer Lyse	25
2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels Midipräparation	26
2.7.3 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion	26
2.7.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	27
2.7.5 Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	27
2.7.6 Bestimmung der DNA-Konzentration	28
2.7.7 Restriktion und Ligation von DNA	28
2.7.8 Sequenzierung von Plasmid-DNA	29
2.7.9 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	29
2.7.10 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA mittels Elektroporation	29
2.7.11 Aufreinigung von Plasmid-DNA mittels Phenol-Chloroform-Fällung	30
2.7.12 Linearisierung von Transformationsvektoren mit <i>SfiI</i>	30
2.7.13 Transformation von <i>X. dendrorhous</i> mit DNA mittels Elektroporation	31
2.7.14 Sporulation von <i>X. dendrorhous</i>	32
2.7.15 Isolierung genomischer DNA aus <i>X. dendrorhous</i>	32
2.7.16 Nachweis des Gen-Knock-Out mittels Polymerase- Kettenreaktion	33
2.7.17 Bestimmung der Genkopienzahl mittels quantitativer Real Time PCR	34
2.8 Carotinoideextraktion	36
2.8.1 Extraktion von Carotinoiden aus <i>E. coli</i>	36
2.8.2 Extraktion von Carotinoiden aus <i>X. dendrorhous</i>	36
2.8.3 Quantifizierung der Carotinoide menge	37
2.9 Dünnschichtchromatographie	37
2.9.1 Auftrennung von Carotinoideextrakten	37
2.9.2 Isolation von Carotinoiden	37
2.9.3 Reduktion der Ketogruppe mit Natriumborhydrid	38
2.10 HPLC-Analytik	38
2.10.1 Auftrennung von Carotinoideextrakten mittels HPLC	38
2.10.2 Identifizierung der Carotinoide mit Hilfe von Standards	39
2.10.3 Bestimmung der Phytoenkonzentration	40
2.10.4 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	40
3 ERGEBNISSE	41
3.1 Charakterisierung der Ausgangsstämme	41
3.1.1 Carotinoidezusammensetzung und Wachstum	41
3.1.2 Verwendung für die folgenden Arbeiten	43
3.2 Genetische Modifikationen zur Biosynthese von Phytoen	45
3.2.1 Generierung Phytoen-akkumulierender Mutanten	45
3.2.1.1 Knock-Out des Phytoen-Desaturase-Gens (<i>crtI</i>) im Wildtyp	45
3.2.1.2 Knock-Out des Phytoen-Desaturase-Gens (<i>crtI</i>) in AXG-13	51

3.2.2	Genomische Integration der Gene <i>crtYB</i> , <i>HMGR</i> und <i>crtE</i>	54
3.2.2.1	Integration in WT Δ crtI	54
3.2.2.2	Integration in AXG-13 Δ crtI	56
3.3	Genetische Modifikationen zur Biosynthese von Zeaxanthin	57
3.3.1	Generierung β -Carotin-akkumulierender Mutanten	57
3.3.1.1	Knock-Out des Astaxanthin-Synthase-Gens (<i>asy</i>) im Wildtyp	57
3.3.1.2	Knock-Out des Astaxanthin-Synthase-Gens (<i>asy</i>) in AXG-13	60
3.3.2	Klonierung einer optimierten Version der β -Carotin-Hydroxylase aus <i>Brevundimonas</i> SD 212	63
3.3.3	Genomische Integration des Gens <i>crtZ_{oxd}</i>	65
3.3.3.1	Integration in PR1-104-(YB) ₂ -HMG-E	65
3.3.3.2	Integration in AXG-13 Δ asy	67
3.3.4	Genomische Integration des Gens <i>crtYB</i> in AXG-13 Δ asy-(Z _{oxd}) ₂	72
3.3.5	Genomische Integration des Gens <i>crtZ_{oxd}</i> in das Astaxanthin-Synthase-Gen (<i>asy</i>) des Wildtyps (Knock-In)	73
3.4	Genetische Modifikationen zur Biosynthese von multioxygeniertem Zeaxanthin	75
3.4.1	Genomische Integration der Gene <i>crtZ_{oxd}</i> , <i>crtG</i> und <i>bkt</i> in PR1-104	76
3.4.2	Reduktion der Ketogruppen von 4-Keto-Nostoxanthin und 4,4'-Diketo- Nostoxanthin und Nachweis mittels HPLC-MS	78
3.5	Stabilisierung der generierten Zeaxanthin- und Phytoenproduzenten	83
3.5.1	Sporulation von PR1-104-(YB) ₂ -HMG-E-Z _{oxd}	83
3.5.2	Sporulation von AXG-13 Δ asy-(Z _{oxd}) ₂ , WT Δ crtI-(YB) ₂ -HMG-E und AXG-13 Δ crtI-(YB) ₂ -HMG-E	86
3.6	Kultivierung der stabilisierten Stämme in einem Bioreaktor	86
3.6.1	Kultivierung des Zeaxanthinproduzenten PR1-104-(YB) ₂ -HMG-E-Z _{oxd} -S	87
3.6.2	Kultivierung des Phytoen-Hochproduzenten AXG-13 Δ crtI-(YB) ₂ -HMG-E-S	89
3.7	Einsatz der Pentosen Arabinose und Xylose als alternative Kohlenstoffquellen	90
4	DISKUSSION	94
4.1	Der Ploidiegrad von <i>X. dendrorhous</i> CBS6938	94
4.1.1	Nachweis heterozygoter Stämme	94
4.1.2	Generierung homozygoter Stämme	96
4.2	Generierung eines Phytoen-Hochproduzenten	100
4.2.1	Inaktivierung der Phytoen-Desaturase CrtI	100
4.2.2	Überexpression der Gene <i>crtYB</i> , <i>HMGR</i> und <i>crtE</i>	101
4.2.3	Phytoenproduktion in einem Bioreaktor	102

4.3	Generierung eines Zeaxanthin-Hochproduzenten.....	103
4.3.1	Inaktivierung der Astaxanthin-Synthase <i>Asy</i>	104
4.3.2	Expression des β -3,3'-Hydroxylase-Gens <i>crtZ_{oXd}</i>	105
4.3.3	Überexpression des Gens <i>crtYB</i>	106
4.3.4	Knock-In des Gens <i>crtZ_{oXd}</i>	107
4.3.5	Zeaxanthinproduktion in einem Bioreaktor	108
4.4	Biosynthese multioxygenerter Zeaxanthinderivate	109
4.4.1	Expression der Gene <i>crtZ_{oXd}</i> , <i>crtG</i> und <i>bkt</i>	109
4.4.2	Nachweis mittels Massenspektrometrie.....	111
4.5	Nutzung der Pentosen Arabinose und Xylose als alternative Kohlenstoffquellen.....	112
5	FAZIT & AUSBLICK	116
6	LITERATURVERZEICHNIS	119
	ANHANG	129
	LEBENS LAUF	133

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Stämme von <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> und Plasmide	20
Tabelle 2.2: Verwendete Stämme von <i>Escherichia coli</i> und Plasmide	22
Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika unter Angabe der Stamm- und Endkonzentration	24
Tabelle 2.4: PCR-Ansatz und Temperaturprogramm zur Amplifikation des <i>adh4</i> -Promotors	26
Tabelle 2.5: Ansatz zur Ligation von DNA-Fragmenten	28
Tabelle 2.6: Restriktionsansatz zur Linearisierung von pPR2TN-Plasmiden	30
Tabelle 2.7: Verwendete Oligonukleotide zum Knock-Out-Nachweis	33
Tabelle 2.8: PCR-Ansatz und Temperaturprogramm zum Knock-Out-Nachweis	34
Tabelle 2.9: qRT-PCR-Ansatz und Temperaturprogramm	34
Tabelle 2.10: Verwendete Oligonukleotide zur Bestimmung der Genkopienzahl	35
Tabelle 2.11: Verwendete HPLC-Bedingungen	38
Tabelle 2.12: Übersicht über die in den Standardextrakten registrierten Retentionszeit t_R und der spektralen Absorptionsmaxima der enthaltenen Carotinoide	39
Tabelle 3.1: Übersicht über die erhaltenen Stämme von PR1-104 zur Biosynthese von multioxygenierten Zeaxanthinderivaten unter Angabe der integrierten Transformationsvektoren, der erhaltenen Antibiotikaresistenz und der Zellfarbe	76
Tabelle 3.2: Übersicht über die durchgeführten HPLC-MS-Analysen der isolierten Carotinoidproben unter der Angabe der monoisotopischen Masse (m_{i1}) in Dalton (Da) des erwarteten Carotinoids, der registrierten Retentionszeit t_R und dem bestimmten Masse-zu-Ladung-Verhältnis m/z des Moleküls $[M]^+$	80
Tabelle 3.3: Veränderung der Zeaxanthinkonzentration und der Genkopienzahl des Stamms PR1-104-(YB) ₂ -HMG-E-Z _{oxd} durch Sporulation (-S)	85
Tabelle 3.4: Zeaxanthin- und Phytoenkonzentration der nach Sporulation (-S) erhaltenen Stämme	86
Tabelle 3.5: Verlauf der Sauerstoffsättigung (pO_2) und des pH-Werts während des Wachstums (OD_{600}) von PR1-104-(YB) ₂ -HMG-E-Z _{oxd} -S in Schikanekolben mit YM-Flüssigmedium (A) und Gesamtcarotinoidkonzentration nach Wachstum in verschiedenen Glucosekonzentrationen (B)	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktur von Phytoen.	3
Abbildung 1.2: Struktur von Zeaxanthin.	4
Abbildung 1.3: Grundstruktur multioxygenierter Zeaxanthinderivate.	6
Abbildung 1.4: Mevalonatweg und Terpenoidstoffwechsel.	9
Abbildung 1.5: Carotinoidbiosynthese in <i>X. dendrorhous</i>	10
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Transformationsvektors pPR2TN (A) und eines Knock-Out-Konstrukts (B).	13
Abbildung 3.1: Pigmentierung der verwendeten Ausgangsstämme von <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (A) und Darstellung der Carotinoidkonzentration (B).	42
Abbildung 3.2: Mikroskopische Darstellung der Zellen der Ausgangsstämme (A) und Verlauf des Zellwachstums (B).	43
Abbildung 3.3: Übersicht über die durchgeführten experimentellen Arbeiten zur Gewinnung von Phytoen-, Zeaxanthin- und multioxygenierten Zeaxanthin-produzierenden Stämmen von <i>X. dendrorhous</i>	44
Abbildung 3.4: Selektion der nach Transformation des Wildtyps mit dem <i>ih1</i> -Konstrukt erhaltenen Transformanten und Subtransformanten.	46
Abbildung 3.5: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung im Wildtyp und den Transformanten WT+ <i>ih1</i> #1, WT+ <i>ih1</i> #3, WT+ <i>ih1</i> #4 und WT+ <i>ih1</i> #4w.	48
Abbildung 3.6: Selektion der Subtransformante WT+ <i>ih1</i> #4r und Bestimmung des Wachstumsverhaltens auf YPD-Festmedium mit (+) und ohne (–) Hygromycin.	49
Abbildung 3.7: PCR-Nachweis der genomischen Integration des <i>ih1</i> -Konstrukts nach Transformation mit dem Wildtyp.	50
Abbildung 3.8: Generierung des Deletionsstamms AXG-13 Δ <i>crtI</i> nach Transformation mit dem <i>ih1</i> -Konstrukt und Subkultivierung.	52
Abbildung 3.9: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung in AXG-13, der Transformante AXG-13+ <i>ih1</i> #1 und dem Deletionsstamm AXG-13 Δ <i>crtI</i>	53
Abbildung 3.10: PCR-Nachweis der genomischen Integration des <i>ih1</i> -Konstrukts nach Transformation mit dem Stamm AXG-13.	54
Abbildung 3.11: Steigerung der Phytoenkonzentration des Stamms WT Δ <i>crtI</i> durch die Integration zusätzlicher Kopien der Gene <i>crtYB</i> , <i>HMGR</i> und <i>crtE</i>	55
Abbildung 3.12: Steigerung der Phytoenkonzentration des Stamms AXG-13 Δ <i>crtI</i> durch die Integration zusätzlicher Kopien der Gene <i>crtYB</i> , <i>HMGR</i> und <i>crtE</i>	56
Abbildung 3.13: Generierung des Deletionsstamms WT Δ <i>asy</i> nach Transformation mit dem <i>aha</i> -Konstrukt und Subkultivierung.	58

Abbildung 3.14: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung im Wildtyp, der Transformante WT+aha #6 und dem Deletionsstamm WT Δ asy. 59

Abbildung 3.15: PCR-Nachweis der genomischen Integration des aha-Konstrukts nach Transformation mit dem Wildtyp. 60

Abbildung 3.16: Generierung des Deletionsstamms AXG-13 Δ asy nach Transformation mit dem aha-Konstrukt und und Subkultivierung. 61

Abbildung 3.17: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung in AXG-13, der Transformante AXG-13+aha #7 und dem Deletionsstamm AXG13 Δ asy. 61

Abbildung 3.18: PCR-Nachweis der genomischen Integration des aha-Konstrukts nach Transformation mit dem Stamm AXG-13. 62

Abbildung 3.19: Klonierung des Plasmids pHNNH2_crtZ_{oxd}. 64

Abbildung 3.20: Klonierung des Transformationsvektors pPR2TNo_crtZ_{oxd}. 65

Abbildung 3.21: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung im Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E und PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}. 66

Abbildung 3.22: Plasmidkarten der linearisierten crtZ_{oxd} Transformationsplasmide. 68

Abbildung 3.23: Selektion der Zeaxanthintransformanten nach Transformation von AXG-13 Δ asy mit verschiedenen crtZ_{oxd} Transformationsvektoren. 70

Abbildung 3.24: Steigerung des Zeaxanthingehalts in Stämmen von AXG-13 Δ asy nach Integration mehrerer crtZ_{oxd} Kopien. 71

Abbildung 3.25: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung im Stamm AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂ und AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂-(YB)₂. 72

Abbildung 3.26: Plasmidkarten der linearisierten crtZ_{oxd} Knock-In-Konstrukte. 73

Abbildung 3.27: Carotinoidzusammensetzung des Wildtyps nach Integration verschiedener crtZ_{oxd} Knock-In-Konstrukte. 74

Abbildung 3.28: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung in den Stämmen PR1-104, PR1-104-Z_{oxd}, PR1-104-Z_{oxd}-G und PR1-104-Z_{oxd}-G-bkt. 77

Abbildung 3.29: Isolation der hochpolaren Carotinoide Pol1 und Pol2 aus dem Extrakt von PR1-104-Z_{oxd}-G-bkt nach Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie (A) und Darstellung der Farbveränderung nach Behandlung mit NaBH₄ (B). 79

Abbildung 3.30: MS²-Spektren zum Nachweis von 4-Keto-Nostoxanthin und 4,4'-Diketo-Nostoxanthin und der reduzierten Derivate. 82

Abbildung 3.31: Mikroskopische Darstellung verschiedener Stadien der Sporenbildung (A) und Dokumentation gelber Kolonien (B) nach Inkubation des Stamms PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd} auf Mangelmedium. 84

Abbildung 3.32: Wachstum und Carotinoidproduktion von PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S in einem Bioreaktor. 88

Abbildung 3.33: Wachstum und Phytoenproduktion von AXG-13 Δ crtI-(YB) ₂ -HMG-E-S in einem Bioreaktor.	90
Abbildung 3.34: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf den Gesamtcarotinoidgehalt (A) und das Wachstum (B) des Wildtyps.	91
Abbildung 3.35: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Carotinoidzusammensetzung der Zeaxanthin- und Phytoen-produzierenden Stämme PR1-104-(YB) ₂ -HMG-E-Z _{oxd} -S und WT Δ crtI-(YB) ₂ -HMG-E-S.	92
Abbildung 3.36: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Carotinoidzusammensetzung der Zeaxanthin- und Phytoen-Hochproduzenten AXG-13 Δ asy-(Z _{oxd}) ₂ -S und AXG-13 Δ crtI-(YB) ₂ -HMG-E-S.	93
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Generierung homozygoter Stämme durch mitotische Rekombination am Beispiel des <i>crtI</i> -Gens der Transformante WT+ih1 #4.	97
Abbildung 4.2: Erweiterung der β -Carotinsynthese im Stamm PR1-104-Z-G-bkt zur Biosynthese von multioxygenierten Zeaxanthinderivaten.	110
Abbildung 4.3: Entstehung charakteristischer MS ² -Fragmente von 4,4'-Diketo-Nostoxanthin.	111
Abbildung 4.4: Metabolisches Netzwerk der Verwertung von Arabinose, Xylose und Glucose in <i>X. dendrorhous</i>	112
Abbildung 5.1: Carotinoide aus <i>X. dendrorhous</i> in genetisch modifizierten Stämmen und Anwendungsmöglichkeiten.	116
Abbildung A.1: Plasmidkarten der Knock-Out- und Knock-In-Plasmide.	129
Abbildung A.2: Plasmidkarten <i>crtZ</i> _{oxd} -Plasmide und Ausgangsvektoren.	130
Abbildung A.3: Plasmidkarten weiterer pPR2TN-Plasmide.	131

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

°C	Grad Celsius	U	Units (Enzymeinheit)
Da	Dalton	V	Volt
F	Farad	v/v	Volumen pro Volumen
G	Erdbeschleunigung	w/v	Gewicht pro Volumen
g	Gramm	Ω	Ohm
h	Stunde		
L	Liter		
M	Molar		
m	Meter		
min	Minute		
OD	Optische Dichte		
rpm	rounds per minute		
sek	Sekunde		

Einheitenvorsätze

k	Kilo	(10 ³)
c	Centi	(10 ⁻²)
m	Milli	(10 ⁻³)
μ	Mikro	(10 ⁻⁶)
n	Nano	(10 ⁻⁹)

Sonstige Abkürzungen

A	Adenosin
a ₈₅₀ zha	<i>crtZ_{oxd}</i> -Knock-In-Konstrukt
Abk.	Abkürzung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
<i>act</i>	Aktin-Gen
ad	auffüllen auf
<i>adh4</i>	Alkohol-Dehydrogenase-Gen
Adu	Adonirubin
aha	<i>asy</i> -Knock-Out-Konstrukt
Ast	Astaxanthin
Asy	Astaxanthin-Synthase
ATP	Adenosintriphosphat
AXG-13	<i>X. dendrorhous</i> Hochproduzent
azha	<i>crtZ_{oxd}</i> -Knock-In-Konstrukt
<i>BamHI</i>	Restriktionsenzym
BKT	β-4,4'-Ketolase aus <i>Haematococcus pluvialis</i>
bp	Basenpaare

Sonstige Abkürzungen

C	Cytosin
Can	Canthaxanthin
CBS6938	<i>X. dendrorhous</i> Wildtyp
CrtE	GGPP-Synthase
CrtG	β -2,2'-Hydroxylase aus <i>Brevundimonas</i> SD212
CrtI	Phytoen-Desaturase
CrtYB	Lycopin-Zyklase / Phytoen-Synthase
CrtZ	β -3,3'-Hydroxylase
CrtZ _{oXd}	β -3,3'-Hydroxylase aus <i>Brevundimonas</i> SD212 (codon-optimiert für <i>X. dendrorhous</i>)
C _x	Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül
DC	Dünnschichtchromatographie
D-Car	7,8-Dihydro- β -Carotin
ddH ₂ O	zweimal destilliertes Wasser
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dw	dry weight (Trockengewicht)
E4P	Erythrose-4-phosphat
Ech	Echinenon
<i>EcoRI</i>	Restriktionsenzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erg	Ergosterol
et al.	und andere
F6P	Fructose-6-phosphat
FPP	Farnesylpyrophosphat
G	Guanin
G3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
G418	Geneticin
G6P	Glucose-6-phosphat
G-Car	Gesamtcarotinoidgehalt
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
<i>gpd</i>	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Gen
GPP	Geranylpyrophosphat
<i>HindIII</i>	Restriktionsenzym
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A

Sonstige Abkürzungen

HMGR	HMG-CoA-Reduktase
<i>hph</i>	Hygromycin-B-Phosphotransferasegen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hyg ^R	Hydromycin-Resistenzgen
ih1	<i>crtI</i> -Knock-Out-Konstrukt
kb	Kilobasenpaare
K-OH-T	3-Hydroxy-4-ketotorulin
Konz.	Konzentration
Lyc	Lycopin
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
Mb	Megabasenpaare
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NAD/H	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP/H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
<i>nat1</i>	Nourseothricin-Acetyltransferase-Gen
Neu	Neurosporin
NK	Negativkontrolle
Nost	Nostoxanthin
<i>NotI</i>	Restriktionsenzym
OH-E	3-Hydroxyechinenon
OH-T	3-Hydroxytorulin
ori	Replikationsursprung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Säuregrad
Phy	Phytoen
pO ₂	Sauerstoffsättigung
Pol1	hochpolares Carotinoid #1 (4,4'-Diketo-Nostoxanthin)
Pol1-Red	reduziertes hochpolares Carotinoid #1 (4,4'-Dihydroxy-Nostoxanthin)
Pol2	hochpolares Carotinoid #2 (4-Keto-Nostoxanthin)
Pol2-Red	reduziertes hochpolares Carotinoid #2 (4-Hydroxy-Nostoxanthin)
PPP	Pentose-Phosphat-Weg
PR1-104	<i>X. dendrorhous</i> β-Carotinmutante
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
R5P	Ribose-5-phosphat
rDNA	ribosomale DNA

Sonstige Abkürzungen

R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
<i>Sa</i> I	Restriktionsenzym
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S</i> fiI	Restriktionsenzym
STM-Puffer	Saccharose-TRIS-Magnesiumchlorid-Puffer
T	Thymin
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TENS-Puffer	TRIS-EDTA-Natriumchlorid-SDS-Puffer
Tor	Torulin
t _R	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
v	Volumen
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WT	<i>X. dendrorhous</i> Wildtyp CBS6938
<i>X</i> hoI	Restriktionsenzym
YM	Yeasts and Molds, Nährmedium
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose, Nährmedium
Zea	Zeaxanthin
Zea-E1 /-E2	Zeaxanthin-Fettsäureester
β-Car	β-Carotin
β-Cry	β-Cryptoxanthin

Eigene Publikationen

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden folgende Publikationen:

Sandmann, G., Pollmann, H., Gassel, S., Breitenbach, J., 2018. *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a versatile platform for the production of carotenoids and other acetyl-CoA derived compounds. In: Carotenoids: Biosynthetic and Biofunctional Approaches, N. Misawa, ed., Springer Publisher, im Druck

Pollmann, H., Breitenbach, J., Wolff, H., Bode, H. B., Sandmann, G., 2017. Combinatorial biosynthesis of novel multi-hydroxy carotenoids in the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. J. Fungi. 3, 9.

Pollmann, H., Breitenbach, J., Sandmann, G., 2017. Development of *Xanthophyllomyces dendrorhous* as a production system for the colorless carotenoid phytoene. J. Biotechnol. 247, 34–41.

Pollmann, H., Breitenbach, J., Sandmann, G., 2017. Engineering of the carotenoid pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous* leading to the synthesis of zeaxanthin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101, 103–111.

Ledetzky, N., Osawa, A., Iki, K., Pollmann, H., Gassel, S., Breitenbach, J., Shindo, K., Sandmann, G., 2014. Multiple transformation with the *crtYB* gene of the limiting enzyme increased carotenoid synthesis and generated novel derivatives in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Arch. Biochem. Biophys. 545, 141–7.

In Vorbereitung:

Pollmann, H., Breitenbach, J., Sandmann, G., High-yield zeaxanthin formation in a *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant by gene knock-out / knock-in combined with pathway engineering.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Hefepilz *Xanthophyllomyces dendrorhous* als vielseitige biotechnologische Plattform für die Produktion von Carotinoiden verwendet. Durch genetische Modifikationen der Carotinoidbiosynthese wurde ein Astaxanthin-Hochproduzent zur Akkumulation des farblosen Phytoens, das die menschliche Haut vor der schädlichen Wirkung der UV-Strahlung schützt und des gelben Zeaxanthins, das zur Förderung und Erhalt der Sehfähigkeit beiträgt, befähigt. Zur Generierung eines Phytoen-Hochproduzenten wurde das Gen *crtI* (Phytoen-Desaturase) inaktiviert und der Phytoengehalt durch Überexpression der Gene *HMGR*, *crtE* und *crtYB* gesteigert. Die Generierung eines Zeaxanthin-Hochproduzenten beinhaltete die Inaktivierung des Gens *asy* (Astaxanthin-Synthase) und die heterologe Expression einer bakteriellen β -Carotin-Hydroxylase *CrtZ_{oxd}*.

Die Inaktivierung der Gene erfolgte mit spezifischen Knock-Out-Konstrukten, die mittels homologer Rekombination in *crtI* oder *asy* integrierten. Nachdem die Transgene auf Vektoren mit verschiedenen Antibiotikaresistenzen kloniert wurden, wurde die Überexpression durch genomische Integration in die ribosomale DNA erreicht. Anschließend wurde die Carotinoidzusammensetzung der Zellextrakte durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie an einer C₁₈-Trennsäule oder durch Dünnschichtchromatographie bestimmt. Der Knock-Out-Nachweis erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion und Amplifikation der Genloci, während die Anzahl integrierter Carotinoidgene durch quantitative Real-Time-PCR bestimmt wurde. Die Kultivierungen von *X. dendrorhous* wurden sowohl in Schikanekolben als auch in einem 2L-Bioreaktor durchgeführt.

Im Zuge der genetischen Modifikationen konnte der Ploidiegrad des Wildtyps bestimmt werden, der bis dahin unbekannt war. Durch das Auftreten von instabilen heterozygoten Stämmen und deren Überführung zu stabilen Homozygoten wurde die Existenz eines diploiden Genoms nachgewiesen. Um die für die biotechnologische Anwendung notwendige Stabilität der Carotinoidbiosyntheseleistung zu erreichen, wurden zwei Strategien entwickelt. Hierbei erfolgte die Stabilisierung der Stämme als Folge mitotischer Rekombination nach Subkultivierung und anschließender Farbselektion oder durch Induktion des sexuellen Zyklus und Sporulation.

Der *crtI*-Knock-Out führte zur Akkumulation von 3,6 mg/g dw Phytoen. Anschließend wurde die Limitierung der Phytoensynthese durch *crtYB*-Überexpression aufgehoben und die Versorgung der Carotinoidbiosynthese mit Vorläufermolekülen durch

HMGR- und *crtE*-Überexpression erhöht. Im Bioreaktor wurde durch die Anwendung eines dreistufigen Fed-Batch-Prozesses, der eine effiziente Glucoseverwertung sicherstellte, mit 10,4 mg/g dw die höchste bis dato publizierte zelluläre Phytoenkonzentration im stabilisierten Hochproduzenten erreicht.

Der *asy*-Knock-Out führte zur Akkumulation von 4,5 mg/g dw β -Carotin, das anschließend durch heterologe Expression der codon-optimierten β -3,3'-Hydroxylase *crtZ_{oxd}* im Hochproduzenten zu 3,5 mg/g dw Zeaxanthin umgesetzt wurde. Zur Optimierung des Vorgehens wurden Knock-In-Konstrukte entwickelt, mit denen beide Schritte (Knock-Out und Integration von Carotinoidgenen) in nur einem molekularbiologischen Schritt durchgeführt und 94 % des in einem Wildtypstamm vorhanden β -Carotins zu Zeaxanthin umgesetzt wurden. Die Optimierung der Wachstumsbedingungen bei der Bioreaktor-Kultivierung des stabilisierten Zeaxanthinproduzenten führte mit 10,8 mg/L zu einem 5-fach höheren Zeaxanthingehalt im Vergleich zur Schikane-Kultivierung.

Durch den Einsatz der Pentosen Arabinose und Xylose als alternative Kohlenstoffquellen wurde der Carotinoidgehalt der Phytoen- und Zeaxanthin-Hochproduzenten um 70 bzw. 92 % im Vergleich zur Glucose-Kultivierung gesteigert, wobei die Gründe für diesen Effekt in einer stärkeren Kohlenstoffverwertung und der Hemmwirkung von Glucose vermutet wurden. Aus verschiedenen pflanzlichen Abfallstoffen kann Xylose durch Hydrolyse freigesetzt werden, deren Nutzung zum Aufbau einer nachhaltigen und kostengünstigen biotechnologischen Carotinoidproduktion beitragen kann.

Darüber hinaus wurden multioxygenierte Zeaxanthinderivate, von denen eine positive Wirkung auf die menschliche Gesundheit vermutet wird, durch kombinatorische Biosynthese erhalten. Durch die schrittweise Integration der Gene *crtZ_{oxd}*, *crtG* (β -2,2'-Hydroxylase) und *bkt* (β -4,4'-Ketolase) in eine β -Carotinmutante wurde die Biosynthese von Zeaxanthin, Nostoxanthin und schließlich von 4-Keto-Nostoxanthin und 4,4'-Diketo-Nostoxanthin erreicht. Anschließend erfolgte die chemische Reduktion zu den neuartigen Carotinoiden 4-Hydroxy-Nostoxanthin und 4,4'-Dihydroxy-Nostoxanthin und der zweifelsfreie Nachweis aller vier Carotinoide anhand der mittels Massenspektrometrie bestimmten Molekülmassen und Fragmentierungsmuster.

1 Einleitung

1.1 Carotinoide

1.1.1 Struktur und biologische Funktion

Carotinoide bilden eine große Klasse lipophiler Isoprenoide, deren Farbe von schwach gelb bis tiefrot reicht. Die meisten natürlich vorkommenden Carotinoide sind hydrophobe C_{40} -Verbindungen (Tetraterpene), die eine mit Methylgruppen verzweigte Kohlenstoffwasserkette besitzen. Ihre Endstrukturen werden als azyklisch, monozyklisch oder bizyklisch beschrieben. Zu Ihnen zählen die reinen Kohlenwasserstoffe der Carotine und die sauerstoffhaltigen Derivate der Xanthophylle, die unter anderem Hydroxy- und Ketogruppen tragen können (Armstrong, 1997).

Das herausragende Strukturelement ist das ausgeprägte konjugierte Doppelbindungssystem, dessen Länge die Farbigkeit bestimmt. Während Phytoen drei konjugierte Doppelbindungen innerhalb der Polyenkette besitzt und im UV-Bereich absorbiert, sind es beim im hohen Maße ungesättigten Zeaxanthin neun Bindungen, die die Absorption zu sichtbaren Wellenlängen verschieben und eine gelbe Färbung hervorrufen. Die Lichtabsorption ist dabei für gewöhnlich durch drei Maxima gekennzeichnet, die zur Ausbildung eines charakteristischen dreigipfligen Absorptionsspektrums führen (Britton et al., 2004).

Die Biosynthese von Carotinoiden erfolgt in Pflanzen, Cyanobakterien, Pilzen sowie einigen Bakterien (Sandmann, 1994), während Tiere und Menschen nicht in der Lage sind, Carotinoide zu synthetisieren und diese daher über ihre Nahrung aufnehmen müssen. Aufgrund ihres lipophilen Charakters lagern Carotinoide typischerweise innerhalb der Zellmembranen, wobei Xanthophylle annähernd aufrecht orientiert sind und ihre hydrophilen Enden der wässrigen Umgebung präsentieren (McNulty et al., 2007). Im menschlichen Körper erfolgt die Akkumulation hauptsächlich in Leber und Fettgewebe. Allerdings wurden vergleichsweise hohe Mengen von Phytoen in der Haut (Stahl & Sies, 2012) und von Zeaxanthin im Auge (Lima et al., 2016) festgestellt.

Die biologischen Funktionen der Carotinoide sind vielfältig und durch ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften bestimmt (Britton, 1995). Größte Bedeutung kommt hierbei dem konjugierten Doppelbindungssystem zu, dessen π -Elektronen

über die gesamte Länge der Polyenkette delokalisiert und dadurch leicht anregbar sind. Als Folge besitzen Carotinoide niedrige energetische Anregungszustände, die es ihnen ermöglichen leicht Energie aufzunehmen und wieder abzugeben. Im Zuge der Photosynthese fungieren sie daher als akzessorische Pigmente und absorbieren Licht im Bereich von 400 - 550 nm, dessen Energie anschließend auf Chlorophyll übertragen wird. Darüber hinaus dienen sie als Schutzpigmente, indem sie schädliche Anregungszustände der Pigmente des Lichtsammelkomplexes durch Energietransfer verhindern (Frank & Cogdell, 1996).

Die bedeutendste biologische Funktion für den Menschen stellt ihre Schutzwirkung vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dar (Stahl & Sies, 2003). Bei Einwirkung von hochenergetischer Strahlung wie Stark- oder UV-Licht können die Moleküle der Zelle elektronisch in den Triplettzustand angeregt werden, dessen Energie anschließend auf molekularen Sauerstoff übertragen werden kann. Der hierbei entstehende Singulett-Sauerstoff kann verschiedene Reaktionen mit DNA, Proteinen und Lipiden eingehen, die zu Zellschäden und oxidativen Stress führen (Stadtman & Levine, 2000). Zusätzlich werden die Proteine der mitochondrialen Elektronentransportkette und andere sauerstoffabhängige Enzymreaktionen als große physiologische ROS-Quelle angesehen, wobei das dabei entstehende Superoxid-Anion durch nachfolgende Reaktionskaskaden eine Vielzahl unterschiedlicher ROS-Moleküle bilden kann (Fiedor & Burda, 2014). Carotinoide können die Bildung von ROS verhindern, indem sie die Anregungsenergie aufnehmen, als unschädliche Wärme an die Umgebung abgeben und zum Grundzustand zurückkehren (Edge et al., 1997). Die Energieabgabe erfolgt dabei über Schwingungen der konjugierten Polyenkette und Interaktionen mit dem umgebenden Lösemittel, nach denen das Carotinoid für einen weiteren Energietransfer zur Verfügung steht. Dieser Vorgang wird als physikalisches Quenching bezeichnet. Darüber hinaus sind Carotinoide auch zur direkten Photoprotektion fähig, indem sie Licht im UV-Bereich absorbieren.

Aufgrund der beschriebenen Schutzwirkung nehmen über die Nahrung aufgenommen Carotinoide einen entscheidenden Einfluss auf die menschliche Gesundheit, indem sie das Risiko zum Auftreten von Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie Erkrankungen der Haut und des Auges vermindern (Fiedor & Burda, 2014) und stellen dadurch interessante Wirkstoffe für die kosmetische und pharmazeutische Industrie dar. Zur Produktion können die Carotinoide aus natürlichen Quellen isoliert oder durch chemische Synthese erhalten werden. Im industriellen Maßstab wurde die chemische Synthese nur für wenige Carotinoide wie Astaxanthin und β -Carotin etabliert (Ernst, 2002), während natürliche Quellen für andere Carotinoide

aufgrund ihrer oft geringen Produktausbeuten eine schlechte Kosteneffizienz besitzen (Sandmann, 2015). Aus diesem Grund kommt der Entwicklung biotechnologischer Produktionssysteme eine wichtige Rolle zu, da durch genetische Stoffwechselmodifikationen von Pflanzen und Mikroorganismen der Gehalt eines gewünschten Carotinoid erheblich gesteigert werden kann. Im Folgenden sollen daher die für diese Arbeit wichtigen Carotinoide Phytoen und Zeaxanthin sowie dessen multioxigenierten Derivate mit Hinblick auf ihre Struktur, biologische Funktion und natürlichen Vorkommen beschrieben und die Möglichkeiten zur Biosynthese aufgezeigt werden.

1.1.2 Phytoen

Das farblose Phytoen ($C_{40}H_{64}$) gehört zu den azyklischen Carotinen (Abbildung 1.1). Es wird im ersten Schritt der Carotinoidbiosynthese gebildet und stellt daher die Vorstufe aller anderen Carotinoide dar (Meléndez-Martínez et al., 2015).

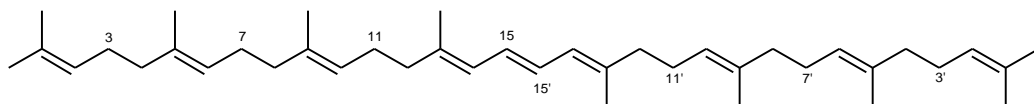


Abbildung 1.1: Struktur von Phytoen.

Phytoen ist ein symmetrisches Molekül mit neun Doppelbindungen, von denen drei ein konjugiertes Doppelbindungssystem ausbilden, das zur Lichtabsorption im UVB-Bereich (280 - 315 nm) führt. Das Absorptionsspektrum zeigt ein Hauptmaximum bei 286 nm, das von zwei Schultern bei 276 und 297 nm umgeben ist (Britton et al., 2004).

Hochenergetische UVB-Strahlen können Hautrötungen (Sonnenbrand) und die Bildung von DNA-Schäden (Pyrimidin-Dimeren) induzieren (Marrot & Meunier, 2008). Durch Photoprotektion kann Phytoen zum Schutz der menschlichen Haut gegen die schädliche Wirkung des UV-Lichts beitragen und das Auftreten von Hautschäden bis hin zu Hautkrebs verhindern (Meléndez-Martínez et al., 2015). Folglich konnte innerhalb einer klinischen Studie durch die orale Phytoengabe die Hautqualität der Probanden und die Resistenz gegenüber Sonnenlicht signifikant gesteigert werden (Oppen-Bezalel et al., 2015).

In gängigen Nahrungsmitteln wie Aprikosen, Karotten und Tomaten kann Phytoen nur in vergleichsweise geringer Konzentration gefunden werden (Biehler et al., 2012), da es natürlicherweise im Zuge der Carotinoidbiosynthese zu dem höher

desaturiertem Lycopin umgesetzt wird. Hinzukommt, dass die chemische Synthese im industriellen Maßstab nicht etabliert wurde (Ernst, 2002).

In Pflanzen wie auch in Algen und Cyanobakterien wird die Lycopinsynthese durch zwei Enzyme, die Phytoen-Desaturase (PDS) und die ζ -Carotin-Desaturase (ZDS), durchgeführt, während in Bakterien und Pilzen die vier Doppelbindungen durch nur ein Enzym, der Phytoen-Desaturase (CrtI), eingebracht werden (Sandmann, 1994). Die molekularbiologische Inaktivierung dieser Enzyme bietet eine Möglichkeit Phytoenquellen zur Deckung des menschlichen Bedarfs zu schaffen. Mit diesem Ansatz konnten Phytoen-akkumulierende Mutanten aus Pflanzen (Qin et al., 2007) und Bakterien (Zhu et al., 2011) sowie dem Pilz *Xanthophyllomyces dendrorhous* geschaffen werden (Niklitschek et al., 2008).

1.1.3 Zeaxanthin

Das gelbe Zeaxanthin ($C_{40}H_{56}O_2$) ist ein bizyklisches Xanthophyll, das zwei 3,3'-Hydroxygruppen besitzt. (Abbildung 1.2). Es wird aus β -Carotin durch die Hydroxylierung der beiden β -Iononringe gebildet und liegt natürlicherweise in der 3R, 3'R-Konfiguration vor (Sajilata et al., 2008).

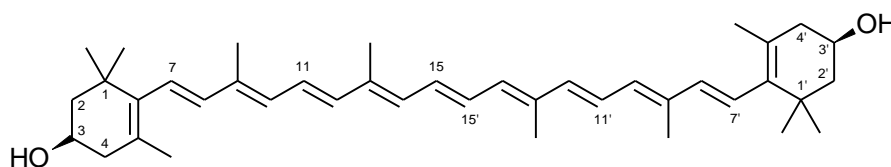


Abbildung 1.2: Struktur von Zeaxanthin.

Zeaxanthin besitzt ein System aus neun konjugierten Doppelbindungen, das ihm eine gelbe Farbe durch spektrale Absorptionsmaxima bei 424, 449 und 476 nm verleiht (Britton et al., 2004). Die Biosynthese erfolgt durch enzymatische Hydroxylierung der C3-Atome der β -Iononringe. Diese Reaktion wird durch β -3,3'-Hydroxylasen katalysiert, die aus einer Vielzahl von Pflanzen (Nisar et al., 2015) und Bakterien (Sieiro et al., 2003) isoliert werden konnten. Hierbei werden die Enzyme in zwei Klassen, die Ferredoxin-abhängigen Nicht-Häm-Di-Eisen-Hydroxylasen und Cytochrom-P450-Enzyme, eingeteilt. Erstere werden durch das Gen *crtZ* codiert und stellen die größte Gruppe bakterieller β -3,3'-Hydroxylasen dar (Choi et al., 2006). Sie besitzen an Histidinreste gebundene Eisenmoleküle, die molekularen Sauerstoff binden und diesen nach Wasserstoffabstraktion und Bildung eines Alkylradikals am C3 des β -Iononrings übertragen (Bouvier et al., 1998). Die

Aktivierung des Sauerstoffs am Eisenzentrum wird hierbei durch Übertragung von Reduktionsäquivalenten von NADPH via Ferredoxin vermittelt.

In photosynthetisch-aktiven Organismen wirkt Zeaxanthin als Schutzpigment, indem es den schädlichen Tripletzustand des Chlorophylls durch sogenanntes Nicht-Photochemisches-Quenching inaktiviert und dadurch die Bildung von ROS verhindert (Latowski et al., 2011). In einem als Xanthophyll-Zyklus bezeichneten Prozess wird Zeaxanthin unter Schwachlicht zunächst enzymatisch zu Violaxanthin, das mit den Chlorophyllen des Lichtsammelkomplexes assoziiert ist, epoxidiert. Unter starker Lichteinstrahlung kommt es zu einer Überanregung der Chlorophylle, die ihre überschüssige Energie nicht vollständig auf die Reaktionszentren übertragen können. Durch eine damit einhergehende pH-Wertverringerung wird die enzymatische Deepoxidierung zu Zeaxanthin aktiviert, das die überschüssige Anregungsenergie aufnehmen und als Wärme an die Umgebung abgeben kann.

In Menschen gehört Zeaxanthin neben Lutein zu den Hauptcarotinoiden im gelben Fleck der Netzhaut (*Macula lutea*), wo es eine schützende Funktion gegen die durch Blaulicht und Singulett-Sauerstoff verursachten Schäden einnimmt (Wooten & Hammond, 2002). Nach gängigen Hypothesen wird zusätzlich die Sehfähigkeit dadurch gesteigert, dass die Schärfe und Sichtbarkeit von Objekten durch Herausfiltern des unter natürlichen Lichtbedingungen auftretenden blauen Streulichts erhöht wird. Aufgrund seiner Bedeutung für die Augengesundheit kann ein langanhaltender Zeaxanthinmangel die Ausbildung einer altersbedingten Makuladegeneration begünstigen, die durch Sehstörungen bis hin zur Erblindung gekennzeichnet ist (Lima et al., 2016). Hierbei wird der makulare Zeaxanthingehalt stark von der Ernährung beeinflusst, da es nur von wenigen Nahrungspflanzen wie Mais, orange Paprika und Orangen in vergleichsweise geringer Konzentration gebildet wird (Sommerburg et al., 1998).

Eine Möglichkeit, einem Zeaxanthinmangel vorzubeugen, besteht in der Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln. Die zurzeit erhältlichen Zeaxanthinpräparate werden aus Extrakten der Studentenblume (*Tagetes erecta*) gewonnen, die aber Lutein als Hauptcarotinoid und nur einen kleinen Anteil (unter 10 %) Zeaxanthin enthalten (Hadden et al., 1999). Die chemische Synthese ist möglich, aber durch die Notwendigkeit zur Einbringung der natürlichen 3R, 3'R-Konfiguration erschwert (Ernst, 2002). Genetisch modifizierte Mikroorganismen hingegen können als Zeaxanthinquelle dienen. So konnte Li et al. (2015) mittels genetischer Modifikation Zellen von *Escherichia coli* zur β -Carotinbiosynthese befähigen und nach Integration des Gens

crtZ Zeaxanthin erhalten. Auch im Pilz *X. dendrorhous* konnte in einer β -Carotin-produzierenden Mutante nach *crtZ*-Integration die Bildung von Zeaxanthin nachgewiesen werden (Ojima et al., 2006).

1.1.4 Multioxygenierte Zeaxanthinderivate

Multioxygenierte Zeaxanthinderivate sind hochpolare Carotinoide, die zusätzliche Hydroxy- oder Ketogruppen tragen (Abbildung 1.3). Zu dieser Gruppe gehören unter anderem das gelbe Nostoxanthin ($C_{40}H_{56}O_4$) mit insgesamt vier Hydroxygruppen und das rote 4,4'-Diketo-Nostoxanthin ($C_{40}H_{52}O_6$) mit zwei zusätzlichen Ketogruppen.

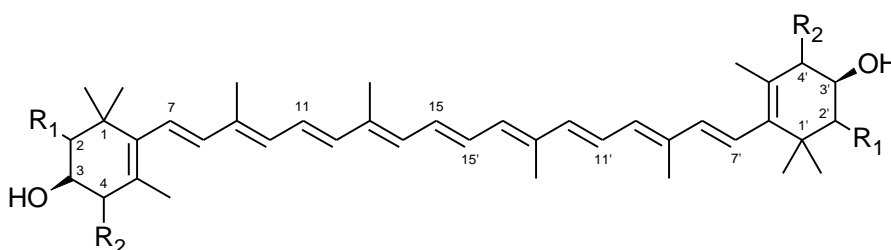


Abbildung 1.3: Grundstruktur multioxygenierter Zeaxanthinderivate. Durch enzymatische Oxigenierungen von Zeaxanthin ($R_1=R_2=H$) können Nostoxanthin ($R_1=OH$, $R_2=H$) und 4,4'-Diketo-Nostoxanthin ($R_1=OH$, $R_2=O$) gebildet werden.

Nostoxanthin weist die gleichen spektralen Eigenschaften wie Zeaxanthin auf, während die Ketogruppe von 4,4'-Diketo-Nostoxanthin in Konjugation zur Polyenkette steht, wodurch ein glockenförmiges Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 477 nm (Britton et al., 2004) ausgebildet wird. Die Carotinoide können enzymatisch aus Zeaxanthin durch Hydroxylierung der β -Iononringe am C2 und der Ketolierung am C4 synthetisiert werden. β -2,2'-Hydroxylasen werden durch das Gen *crtG* codiert und wurden aus Bakterien der Gattung *Brevundimonas* (Misawa, 2011) isoliert. Sie sind in der Lage β -Iononringe, die bereits eine 3-Hydroxy- und eine 4-Ketogruppen tragen, zu hydroxylieren (Nishida et al., 2005). β -4,4'-Ketolasen werden in die zwei Genfamilien *crtO* und *crtW* eingeteilt, wobei letztere 4-Ketogruppen in bereits substituierte β -Iononringe einbringen können (Choi et al., 2007). Zu ihnen gehört die Ketolase BKT aus der Alge *Haematococcus pluvialis* (Kajiwara et al., 1995), die die Ketolierung von Zeaxanthin zu Astaxanthin katalysiert.

Mehrfach hydroxylierte und ketolierte Carotinoiden wird eine hohe antioxidative Aktivität zugesprochen (Pashkow et al., 2008). Durch Kristallstrukturanalysen von McNulty et al. (2007) geht man davon aus, dass sich diese Moleküle präzise mit ihren polaren Enden innerhalb der Lipiddoppelschicht der Zellmembranen anordnen

können. Durch diese transmembrane Orientierung wird Lipidperoxidation verhindert und eine Möglichkeit geschaffen, ROS durch Elektronentransfer über die Plasmamembran zu inaktivieren.

Nostoxanthin und 4,4'-Diketo-Nostoxanthin sind äußerst seltene Carotinoide, wobei letzteres bisher nur in einer Mutante des Knöllchenbakteriums *Rhizobium lupini* (Beyer et al., 1979) und einem Stamm des Proteobakteriums *Brevundimonas* (Yokoyama et al., 1996) in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte. Ebenso ist eine chemische Synthese nicht etabliert (Ernst, 2002). Aufgrund der unzureichenden Biosynthese in natürlichen Quellen ist es schwierig, ausreichende Mengen dieser Carotinoide zu erhalten, um ihre biologische Aktivität und ihr pharmazeutisches Potential zu erforschen. Durch kombinatorische Biosynthese ist es dagegen möglich, seltene Carotinoide aus der Kombination verschiedener Carotinoidbiosynthesegene in heterologen Wirtstämmen wie *X. dendrorhous* zu synthetisieren (Sandmann, 2002).

1.2 Der Hefepilz *Xanthophyllomyces dendrorhous*

1.2.1 Merkmale und Kultivierung

Der Hefepilz *Xanthophyllomyces dendrorhous* wurde aus dem Pflanzensaft von Birkenbäumen in Finnland und aus Regionen Japans und Russlands isoliert (Johnson, 2003). Der Pilz gehört zur Abteilung der Basidiomycota (Ständerpilze) und besitzt die ungeschlechtliche Vermehrungsform *Phaffia rhodozyma* (Webster & Weber, 2007). Die orange-roten Zellen synthetisieren das Carotinoid Astaxanthin, dessen Biosynthese in keinem anderen Pilz bekannt ist. Dieses Xanthophyll besitzt antioxidative Eigenschaften, die nach Schroeder und Johnson (1995) wahrscheinlich dafür verantwortlich sind, den Pilz vor oxidativen Stress seines natürlichen Habitats zu schützen. Die vegetative Vermehrung erfolgt durch Knospung (Miller et al., 1976), bei der sich kleine Zellausstülpungen nach Vergrößerung und Aufteilung der Zellkompartimente als Tochterzellen von der Mutterzelle abschnüren. Unter Nährstoffmangel kommt es zur homothallischen sexuellen Vermehrung durch Sporenbildung nach der Fusion von Mutter- und Tochterzelle und Ausbildung von Halobasiden mit terminalen Basidiosporen (Golubev, 1995; Kucsera et al., 1998).

Das 19,5 Mb große Genom des in dieser Arbeit verwendeten Wildtyps CBS6938 besteht aus acht Chromosomen (Nagy et al., 1994) und wurde kürzlich vollständig sequenziert (Sharma et al., 2015). Der Ploidiegrad konnte bisher nicht eindeutig

bestimmt werden, da bisherige Untersuchungen zu gegensätzlichen Ergebnissen kamen. Aufgrund der effizienten Genomassemblierung schlossen Sharma et al. (2015) auf ein haploides Genom, während die Auswertung des Segregationsverhältnisses der von Kucsera et al. (1998) erhaltenen Sporen ein diploides Genom nahe legen.

Die Kultivierung von *X. dendrorhous* im Labormaßstab erfolgt in Schüttelkolben, wobei das Temperaturoptimum für die Carotinoidbiosynthese zwischen 18 und 22 °C liegt (Schmidt et al., 2011). Hierbei sind die Zellen in der Lage neben einigen Aminosäuren zahlreiche Zucker, wie Glucose und Maltose als auch die Pentosen Arabinose und Xylose, als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen (Palágyi et al., 2001). Das größte Interesse der Forschung besteht zurzeit in der Steigerung des Gehalts an Astaxanthin, das aufgrund seiner roten Farbe in großen Mengen als Pigment in der Fischzucht verwendet wird (Johnson et al., 1980). Zur Erhöhung der Biomasse und des Carotinoidgehalts können die Zellen von *X. dendrorhous* in einem größeren Kulturvolumen innerhalb eines Bioreaktors kultiviert werden. Hierbei wurde in den letzten Jahren der Einfluss der Kohlen- und Stickstoffquelle sowie physikalischer Faktoren (Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffversorgung und Licht) auf die Carotinoidbiosynthese intensiv untersucht (Rodríguez-Sáiz et al., 2010; Schmidt et al., 2011). In diesem Zusammenhang konnte Astaxanthin erfolgreich im mittel- und großformatigen industriellen Maßstab (0,6 bis 10 m³) produziert werden (de la Fuente et al., 2010; Zheng et al., 2006).

1.2.2 Carotinoidbiosynthese

Für die Biosynthese der Carotinoide in *X. dendrorhous* wird der C₂₀-Baustein des Terpenoidstoffwechsels Geranylgeranylpyrophosphat als direkte Vorstufe verwendet, das zuvor aus der C₅-Verbindung Isopentenylidiphosphat des Mevalonatwegs gebildet wird (Abbildung 1.4).

Der Mevalonatweg umfasst die Kondensation von drei Acetyl-CoA-Molekülen zur Bildung des C₅-Bausteins HMG-CoA, das anschließend durch eine Reduktion, zwei Phosphorylierungen und einer Decarboxylierung zu Isopentenylidiphosphat (IPP) umgesetzt wird. Diese Reaktionen werden von insgesamt sechs Enzymen katalysiert, wobei die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase HMGR den geschwindigkeitbestimmenden Schritt aufgrund einer starken, mehrere Ebenen der Genexpression umfassenden, Regulation darstellt (Goldstein & Brown, 1990).

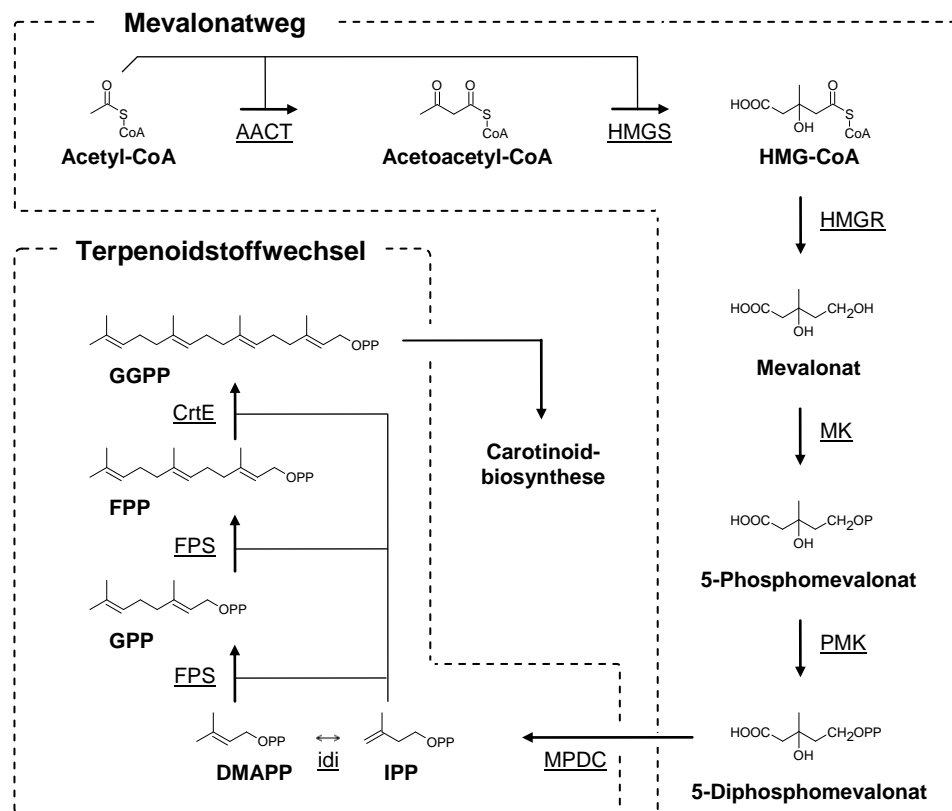


Abbildung 1.4: Mevalonatweg und Terpenoidstoffwechsel. Die beteiligten Enzyme sind: Acetyl-CoA-Acetyltransferase (AACT), HMG-CoA-Synthase (HMGS), HMG-CoA-Reduktase (HMGR), Mevalonatkinase (MK), Phosphomevalonat-Kinase (PMK), Diphosphomevalonat-Decarboxylase (MPDC), IPP-Isomerase (idi), FPP-Synthase (FPS) und GGPP-Synthase (CrE). Die Verbindungen des Terpenoidstoffwechsels sind: Isopentenylidiphosphat (IPP), Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), Geranylpyrophosphat (GPP), Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) (Bochar et al., 1999; Alcaíno et al., 2014), übernommen von Pollmann (2013).

Die Isomerisierung von IPP zu Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) ist der erste Schritt der Terpenoidbildung. Diese C₅-Bausteine werden durch Kondensationsreaktionen zu den Grundmolekülen verschiedener Terpenoidklassen, der C₁₀-Einheit Geranylpyrophosphat (GPP), der C₁₅-Einheit Farnesylpyrophosphat (FPP) und schließlich der C₂₀-Einheit Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) vereinigt. So erfolgt unter anderem die Bildung des pilzlichen Plasmamembranbestandteils Ergosterol aus FPP über das Intermediat Squalen (Weete et al., 2010). Die Kondensationsreaktionen werden in *X. dendrorhous* durch die Prenyltransferasen CrE und FPS katalysiert, deren Überexpression den metabolischen Fluss in Richtung der Carotinoidbiosynthese steigern kann (Alcaíno et al., 2014).

Das gebildete GGPP mündet daraufhin in die Carotinoidbiosynthese ein, an der vier Enzyme, die von lediglich drei Genen codiert werden und gemeinsam die Bildung von über 10 Carotinoiden katalysieren, beteiligt sind (Abbildung 1.5).

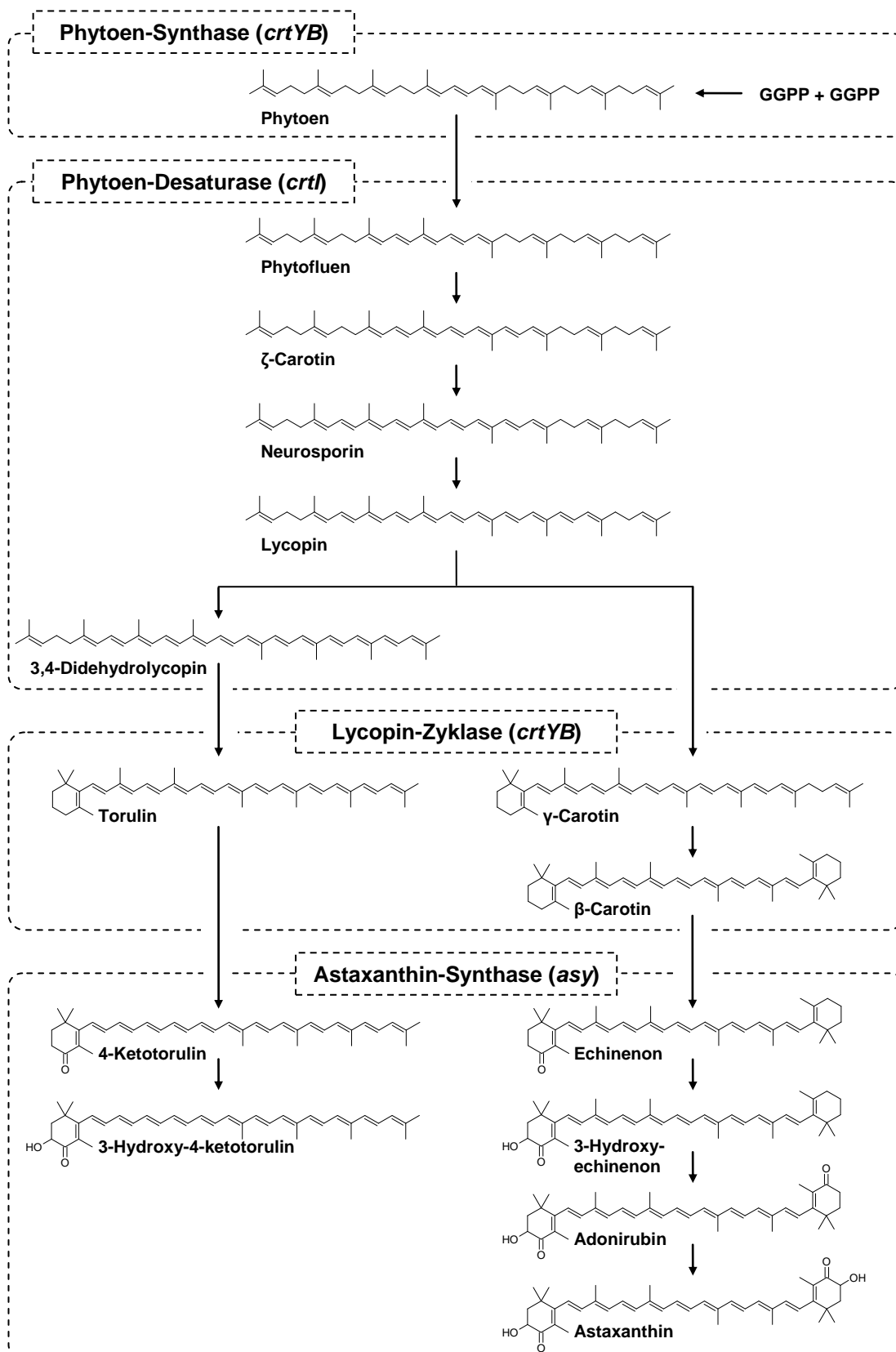


Abbildung 1.5: Carotinoidbiosynthese in *X. dendrorhous*. Die Reaktionen werden von vier Enzymen katalysiert (eingerahmt), die mit Namen und dem codierenden Gen (in Klammern) angegeben sind. Aus dem monozyklischen Weg (links) entsteht 3-Hydroxy-4-ketotorulin und aus dem dicyklischen Weg (rechts) Astaxanthin als Endprodukt (Verdoes et al., 1999a, 1999b; Ojima et al., 2006).

Die Kopf-zu-Kopf-Kondensation von zwei GGPP-Molekülen wird in *X. dendrorhous* durch das bifunktionelle Protein Phytoen-Synthase/Lycopin-Zyklase (CrtYB) katalysiert, wobei die Synthase-Aktivität im C-terminalen Bereich lokalisiert ist (Verdoes et al., 1999a). Hierbei wird zunächst das zyklische Intermediat Prephytoen gebildet, aus dem nach mehreren Umlagerungen und Verlust eines Protons Phytoen entsteht (Altman et al., 1972). Durch Überexpression konnte gezeigt werden, dass die Phytoensynthese den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Carotinoidbiosynthese darstellt (Verdoes et al., 2003) und infolge dessen einer transkriptionellen Regulation unterliegt (Marcoleta et al., 2011).

Auf die Bildung von Phytoen folgen vier Desaturierungsschritte, die von der Phytoen-Desaturase (CrtI) ausgeführt werden (Verdoes et al., 1999b). Dabei handelt es sich um ein membranständiges Protein, das Dehydrierungen der Kohlenstoffkette in Anwesenheit des Co-Faktors FAD und Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor katalysiert (Schaub et al., 2012). Nach Einführung je einer Doppelbindung werden Phytofluon, ζ -Carotin, Neurosporin und schließlich Lycopin gebildet, wodurch sich das konjugierte Doppelbindungssystem von drei auf 11 Bindungen vergrößert.

Anschließend spaltet sich die Biosynthese in den mono- und dizyklischen Weg auf (An et al., 1999). Nach Zyklisierung beider Moleküle durch die N-terminale Zyklase-Aktivität des bifunktionellen CrtYB-Proteins (Verdoes et al., 1999a) wird das dizyklische β -Carotin gebildet. Die Reaktion wird durch einen elektrophilen Protonenangriff am C2 eingeleitet und beinhaltet die zum ringschlussführende Bildung eines Carbokations, das durch das Enzym stabilisiert wird (Yu et al., 2010). Da aber die Lycopin-Desaturase auch eine geringe Substratspezifität für Lycopin besitzt (Verdoes et al., 2003), kommt es in geringen Maßen zur Einführung einer weiteren Doppelbindung und der Bildung von 3,4-Didehydrolycopin, dessen nun vollständig desaturiertes Molekül nicht zyklisiert werden kann. Folglich wird es von der Lycopin-Zyklase zum monozyklischen Torulin umgesetzt.

In einem letzten Schritt erfolgt die Integration von Hydroxy- und Ketogruppen an die β -Iononringe von β -Carotin und Torulin durch ein einziges Enzym, die Astaxanthin-Synthase (Asy). Dieses gehört zur Familie der Cytochrom P450-Proteine und benötigt neben molekularem Sauerstoff eine NADPH-abhängige Cytochrom-P450-Reduktase als Elektronendonator (Alcaíno et al., 2008). Das Enzym Asy wurde von Ojima et al. (2006) isoliert und charakterisiert, infolge dessen die Autoren als Oxidationsmechanismus eine Reihe von Hydroxylierungen vorschlugen. Demnach erfolgt die Bildung der monoketolierten Derivate Echinenon und 4-Ketotorulin, durch die

Integration von zwei Hydroxygruppen am C4 des β -Iononrings, die anschließend spontan unter Wasserabspaltung zur Ketogruppe zerfallen. Die darauffolgende Bildung von 3-Hydroxyechinenon und 3-Hydroxy-4-ketotorulin wird durch einen weiteren Hydroxylierungsschritt am C3 durchgeführt, wobei letzteres Carotinoid das Endprodukt des monozyklischen Wegs darstellt. Im dizyklischen Weg kommt es hingegen zur Ketolierung und Hydroxylierung des zweiten β -Iononrings von 3-Hydroxyechinenon und schließlich zur Bildung von Astaxanthin.

1.2.3 Genetische Modifikation der Carotinoidbiosynthese

Durch genetische Manipulation des Carotinoidstoffwechsels in *X. dendrorhous* ist es möglich, den Gehalt an Astaxanthin zu erhöhen oder die Biosynthese anderer Carotinoide zu ermöglichen (Visser et al., 2003). Dies umfasst zum einen die Induktion zufälliger Mutationen mittels chemischer Mutagenese, bei der die Zellen einem Mutagen wie N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG) oder ultraviolettem Licht ausgesetzt und anschließend nach der gewünschten Eigenschaft selektiert werden. Zum anderen kann der Stoffwechselweg durch die gezielte genomische Integration oder Deletion von Carotinoidbiosynthesegenen manipuliert werden.

Mit diesen Methoden wurden aus dem *X. dendrorhous* Wildtyp **CBS6938** drei verschiedene Stämme geschaffen, die in dieser Arbeit verwendet wurden:

- **AXG-13**: Der Astaxanthin-Hochproduzent wurde durch wiederholte NTG-Behandlung und Selektion roter Kolonien erzeugt (Gassel et al., 2014) und besitzt einen 16-fach höheren Carotinoidgehalt.
- **PR1-104**: Die gelbe β -Carotinmutante wurde von Girard et al. (1994) nach Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht, die zur Inaktivierung der Astaxanthin-Synthase führten, erhalten.
- **PR1-104-(YB)₂-HMG-E**: Durch genomische Integration der Carotinoidgene *crtYB*, *HMGR* und *crtE* konnte in einer vorausgegangenen Masterarbeit (Pollmann, 2013) der β -Carotingehalt des Stamms um das 2,5-fache im Vergleich zu PR1-104 erhöht werden.

Zur genomischen Integration von Genen in *X. dendrorhous* wurde von Wery et al. (1998) der integrative Transformationsvektor pPR2TN (Abbildung 1.6 A) entwickelt, der einen Bereich der rDNA-Sequenz aus *X. dendrorhous* und eine Geneticin-Resistenz besitzt. Er ist dadurch in der Lage, sich mittels homologer Rekombination in die genomische DNA zu integrieren und eine Selektion der transgenen Zellen zu ermöglichen. Auf dieser Grundlage wurde von Gassel et al. (2014) ein Vektorsystem

entwickelt, bei dem die Möglichkeiten zur genetischen Manipulation durch die Nutzung weiterer Antibiotikaresistenzen erheblich erweitert wurden. Mit diesem System kann ein gewünschtes Gen unter die Kontrolle der Promotor- und Terminator-Sequenzen des Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens (*gpd*) gestellt und in Ergänzung zu pPR2TN in die Hygromycin- und Nourseothricinresistenz-tragenden Transformationsvektoren pPR2TNH und pPR2TNo kloniert werden. Durch die Überexpression der Gene *HMGR*, *crtE*, *crtYB* und *asy* konnten die Autoren den Astaxanthingehalt in AXG-13 um das Sechsfache steigern.

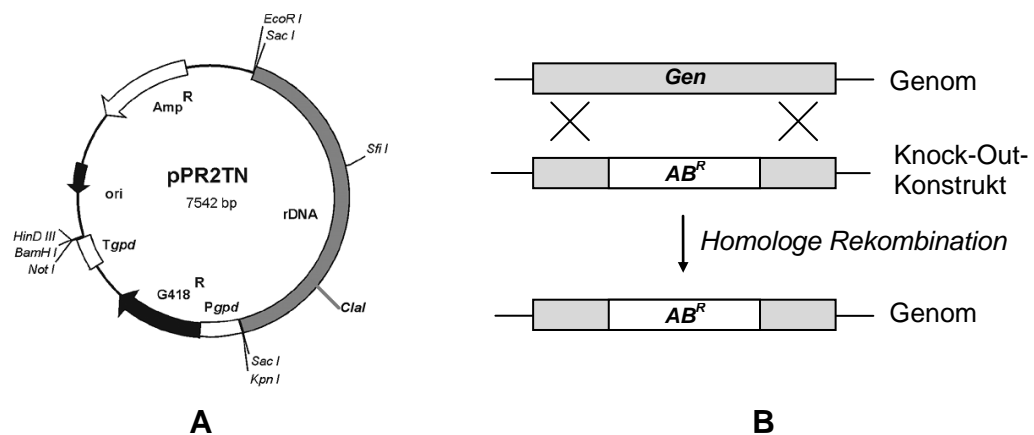


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Transformationsvektors pPR2TN (A) und eines Knock-Out-Konstrukts (B). Zur genomischen Integration mittels homologer Rekombination enthält der Vektor pPR2TN einen 3 kb großen Teil der rDNA-Sequenz von *X. dendrorhous*, wobei die für die Integration nötige Linearisierung mit Hilfe des Restriktionsenzym *SfiI* erreicht wird. Für die Selektion von Transformanten wurde das Gen *nptII*, das für eine Resistenz gegen Geneticin (G418) codiert, zwischen die Promotor-(P) und Terminator(T)-Sequenzen des Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens (*gpd*) kloniert. Mit Hilfe von *HindIII*, *BamHI* und *NotI* kann eine gewünschte DNA-Sequenz in den Vektor kloniert werden. Für die Amplifikation und Selektion in *E. coli* enthält der Vektor pPR2TN den Replikationsursprung des Plasmids pUC18 (*ori*) und das Gen für eine Ampicillin-Resistenz (*Amp^R*) (A). Zur gezielten Inaktivierung eines Gens können spezifische Knock-Out-Konstrukte verwendet werden, die eine inaktive Variante des Zielgens aufgrund eines integrierten Antibiotikaresistenzgens (*AB^R*) enthalten und nach homologer Rekombination in das Genom eingebaut werden (B) (Visser et al., 2005; Mülhardt, 2009).

Zur effizienten Expression heterologer Gene können die Codons eines Fremdgens an das Codonprofil des Wirtstamms angepasst werden (Gustafsson et al., 2004). Hintergrund ist, dass die meisten Aminosäuren durch eine Zahl von zwei bis sechs verschiedenen Codons codiert werden und es unterschiedliche Präferenzen zur Nutzung dieser Codons zwischen verschiedenen Organismen gibt, die die Translationseffizienz beeinflussen (Plotkin & Kudla, 2011). In diesem Zusammenhang eröffnet die kürzlich erfolgte Genomsequenzierung des Wildtyps CBS6938 (Sharma et al., 2015) die Möglichkeit die Gensequenz hinsichtlich einer verbesserten Codonnutzung anzupassen.

Neben der genomischen Integration ist es möglich, gezielt eines der Gene der Carotinoïdbiosynthese durch die Nutzung spezifischer Knock-Out-Konstrukte zu inaktivieren (Mülhardt, 2009). Hierbei besitzen die Konstrukte homologe Sequenzen des Zielgens und eine Antibiotikaresistenz, die nach homologer Rekombination in das Gen integriert werden (Abbildung 1.6 B). Mit diesem Ansatz konnte von Niklitschek et al. (2008) die Gene *crtI* und *asy* erfolgreich inaktiviert und die Akkumulation der Enzymsubstrate Phytoen und β -Carotin nachgewiesen werden.

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Eignung des Hefepilzes *Xanthophyllomyces dendrorhous* als biotechnologische Produktionsplattform zur Biosynthese der Carotinoïde Phytoen und Zeaxanthin zu untersuchen. Hierzu soll die Carotinoïdbiosynthese in Astaxanthin- und β -Carotin-produzierenden Ausgangsstämmen durch genetische Modifikationen in der Weise manipuliert werden, dass die gewünschten Carotinoïde in hoher Konzentration gebildet werden. Hierbei ist die Verwendung des durch chemische Mutagenese und Selektion gewonnenen Hochproduzenten AXG-13 von besonderem Interesse, da er aufgrund seines bereits gesteigerten Carotinoïdgehalts ein hohes Biosynthesepotential besitzt. Die genomischen Manipulationen sollen durch Gen-Knock-Out (Generierung von Deletionsstämmen) und genomischer Integration von Carotinoïdgenen erfolgen.

Es ist zu erwarten, dass nach Knock-Out des Phytoen-Desaturase-Gens *crtI* Phytoen als Substrat des Enzyms akkumuliert. Die anschließende Überexpression der Enzyme HMG-CoA-Reduktase (HMGR) und GGPP-Synthase (CrtE), von denen bekannt ist, dass sie limitierend für die Carotinoïdbiosynthese sind, soll dazu dienen, die Syntheserate der Vorläufermoleküle Mevalonat und Geranylgeranylpyrophosphat zu steigern, um somit den metabolischen Fluss in die Richtung der Carotinoïdbiosynthese zu erhöhen. Durch die zusätzliche Überexpression des Enzyms Phytoen-Synthase/Lycopin-Zyklase (CrtYB) soll die Phytoenkonzentration in den entstehenden Stämmen erhöht werden.

Durch Knock-Out des Astaxanthin-Synthase-Gens *asy* sollen β -Carotin-akkumulierende Mutanten hergestellt werden, in denen anschließend nach Integration einer codon-optimierten Version des Gens *crtZ* das vorhandene β -Carotin in Zeaxanthin umgesetzt wird. Daraufhin soll auch hier die Überexpression des Enzyms CrtYB erfolgen, um eine Steigerung des Zeaxanthingehalts zu bewirken.

Zur Klärung des Ploidiegrads der auf den Wildtyp CBS6938 basierenden Stämme von *X. dendrorhous* soll eine PCR-Analyse der genomischen Integration in den erhaltenen Deletionsstämmen Aufschluss darüber geben, ob diese ein haploides oder diploides Genom besitzen.

Nach Generierung der Phytoen- und Zeaxanthin-produzierenden Stämme soll die biotechnologische Anwendung erfolgen, indem das Wachstum und die Carotinoidbiosyntheseleistung in einem Bioreaktor untersucht werden. Außerdem soll der Einsatz der Pentosen Arabinose und Xylose als Kohlenstoffquelle untersucht werden, die als Bestandteil pflanzlicher Abfallstoffe eine kostengünstige Glucosealternative darstellen.

Neben der Produktion von Phytoen und Zeaxanthin soll außerdem, die Möglichkeit zur kombinatorischen Biosynthese von seltenen multioxigenierten Zeaxanthinderivaten, denen eine hohe antioxidative Eigenschaft zugesprochen wird, untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Firma
Analysenwaage BL 600	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage CP 64	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Bioreaktor-System	
Basis-Einheit BIOSTAT Aplus	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Kulturgefäß UniVessel® 2 L (einwandig)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
pH Elektrode 12/200/2 K8	Hamilton, Planegg-Martinsried, Deutschland
pO ₂ Elektrode 12/215-L	Hamilton, Planegg-Martinsried, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1- 4 LD plus	Martin Christ, Osterode am Harz, Deutschland
Geldokumentation E-Box VX2	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Pulse Controller II	
Heraeus Biofuge A	Thermo Scientific, Waltham, USA
Heraeus Labofuge 400R	Thermo Scientific, Waltham, USA
HPLC-System	
Pumpe ERC-64 A	Ercatech AG, Bern, Schweiz
Entgaser ERC-3217	Ercatech AG, Bern, Schweiz
Säulenofen 560-CIL	Techlab, Braunschweig, Deutschland
Säule Nucleosil C ₁₈ (3 µm, 250x4 mm)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Detektor Waters 994	Waters, Milford, USA
Kreisschüttler RSU-310	Bolatec, Gladenbach, Deutschland
Lichtmikroskop Leitz-512.724	Leica Camera, Wetzlar, Deutschland
Spectrophotometer ND-1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Real-Time Thermal Cycler Rotor-Gene 3000	QUIAGEN, Venlo, Niederlande
Rotator Stuart SB1	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Rotor SLA-1500	Thermo Scientific, Waltham, USA
Rotor SS-34	Thermo Scientific, Waltham, USA
Schwingmühle MM400	Retsch, Hahn, Deutschland
Sorvall RC 6 Plus Centrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA

Gerät	Firma
Spektrophotometer ND-1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Spectrophotometer Novaspec II	Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden
Sterilwerkbank CLF 460 EC	Clean Air, Woerden, Niederlande
Thermal Cycler EDGENE5D	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Universalschüttler SM 30 A	Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich

2.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma
ALUGRAM-SilG-DC-Platten	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Elektroporationsküvette 2 mm	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Glasperlen (0,25 - 0,5 mm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Medi-Test-Glucose-Teststreifen	Macherey-Nagel, Deutschland
Petrischale 92x16 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim, Deutschland
PureYield Plasmid Miniprep System	Promega, Mannheim, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzenfilter 22 µm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugenröhre 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Aceton	Chemikalienausgabe, Uni-Frankfurt
Acetonitril	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril ≥ 99,9%	VWR, Darmstadt, Deutschland
Agar-Agar, Kobe I	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose UltraPure™	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ampicillin Natriumsalz ≥ 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Antifoam 204	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau Natriumsalz	Serva, Heidelberg, Deutschland
Chloramphenicol ≥ 98,5 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie	Firma
D(+)-Saccharose $\geq 99,5$ %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Xylose $\geq 98,5$ %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diethylether $\geq 99,8$ %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DTT $\geq 99,5$ %	Applichem, Darmstadt, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ≥ 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96 - 97,2%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol 96%, vergällt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylacetat 99,5 %	J.T.Baker, Center Valley, USA
Ficoll 400	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Geneticindisulfat-Lösung 50 mg/ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin ≥ 98 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin B-Lösung 50 mg/ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Chemikalienausgabe, Uni-Frankfurt
Kaliumacetat ≥ 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid $\geq 99,5$ %	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid ≥ 85 %, in Plätzchen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycinsulfat ≥ 750 I.U./mg	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L(+)-Arabinose ≥ 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ≥ 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ≥ 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Malzextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumborhydrid, 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nourseothricin Dihydrogensulfat ≥ 85 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pepton aus Soja	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Petrolether 40-65 °C	Chemikalienausgabe, Uni-Frankfurt
Phenol pH 7,5-8,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ribitol (Adonitol) > 99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ribonuklease > 70 U/mg	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, rauchend 37%	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie	Firma
SDS Natriumsalz	Serva, Heidelberg, Deutschland
Toluol $\geq 99,5$ %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS $\geq 99,9$ %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylene Cyanol FF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zeocin 100 mg/ml	Invivogen, San Diego, USA
α -D(+)-Glucose Monohydrat $\geq 99,5$ %	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.4 DNA-modifizierende Enzyme

Enzym	Firma
Polymerasen	
<i>pfu</i> -Polymerase	Thermo Scientific, Waltham, USA
DreamTaq-DNA-Polymerase	Thermo Scientific, Waltham, USA
KAPA SYBR FAST Universal Mix	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Restriktionsenzyme	
<i>EcoRI</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>HindIII</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>NotI</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>SaI</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>SfiI</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>XhoI</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Thermo Scientific, Waltham, USA
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.5 Organismen und Plasmide

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Organismen und Plasmide.

Tabelle 2.1: Verwendete Stämme von *Xanthophyllomyces dendrorhous* und Plasmide

Stamm / Plasmid ^a	relevante Eigenschaft ^{b,c}	Referenz / Quelle
Ausgangsstämme von <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>		
CBS6938	Wildtyp (WT)	Golubev, 1995
AXG-13	Astaxanthin-Hochproduzent	Gassel et al., 2012
PR1-104	β-Carotinproduzent	Girard et al., 1994
PR1-104-(YB) ₂ -HMG-E	G418 ^R , Hyg ^R ; <i>crtYB</i> aus <i>X. dendrorhous</i> <i>HMG</i> R aus <i>S. cerevisiae</i> <i>crtE</i> aus <i>X. dendrorhous</i>	Pollmann, 2013
Deletionsstämme		
WTΔ <i>crtI</i>	Hyg ^R ;	diese Arbeit
AXG-13Δ <i>crtI</i>	Δ <i>crtI</i> (Knock-Out)	
WTΔ <i>asy</i>	Hyg ^R ;	diese Arbeit
AXG-13Δ <i>asy</i>	Δ <i>asy</i> (Knock-Out)	
WTΔ <i>asy</i> -Z _{oxd}	Hyg ^R ; Δ <i>asy</i> (Knock-In) <i>crtZ_{oxd}</i> aus <i>Brev.</i> SD212	diese Arbeit
Nach Genintegration erhaltene Stämme		
WTΔ <i>crtI</i> -(YB) ₂	Hyg ^R , G418 ^R ;	diese Arbeit
AXG-13Δ <i>crtI</i> -(YB) ₂	Δ <i>crtI</i> (Knock-Out) <i>crtYB</i> aus <i>X. dendrorhous</i>	
WTΔ <i>crtI</i> -(YB) ₂ -HMG-E	Hyg ^R , G418 ^R , NTC ^R ;	diese Arbeit
AXG-13Δ <i>crtI</i> -(YB) ₂ -HMG-E	Δ <i>crtI</i> (Knock-Out) <i>crtYB</i> aus <i>X. dendrorhous</i>	
	<i>HMG</i> R aus <i>S. cerevisiae</i> <i>crtE</i> aus <i>X. dendrorhous</i>	
PR1-104-(YB) ₂ -HMG-E-Z _{oxd}	Hyg ^R , G418 ^R , NTC ^R ; <i>crtYB</i> aus <i>X. dendrorhous</i> <i>HMG</i> R aus <i>S. cerevisiae</i> <i>crtE</i> aus <i>X. dendrorhous</i> <i>crtZ_{oxd}</i> aus <i>Brev.</i> SD212	diese Arbeit
AXG-13Δ <i>asy</i> -(Z _{oxd}) ₂	Hyg ^R , NTC ^R ; Δ <i>asy</i> (Knock-Out) <i>crtZ_{oxd}</i> aus <i>Brev.</i> SD212	diese Arbeit
AXG-13Δ <i>asy</i> -(Z _{oxd}) ₂ -(YB) ₂	Hyg ^R , NTC ^R , G418 ^R ; Δ <i>asy</i> (Knock-Out) <i>crtZ_{oxd}</i> aus <i>Brev.</i> SD212 <i>crtYB</i> aus <i>X. dendrorhous</i>	diese Arbeit

Tabelle 2.1: (Fortsetzung)

Stamm / Plasmid ^a	relevante Eigenschaft ^{b,c}	Referenz / Quelle
PR1-104-Z _{oXd}	NTC ^R ; <i>crtZ_{oXd}</i> aus <i>Brev. SD212</i>	diese Arbeit
PR1-104-Z _{oXd} -G	NTC ^R , Hyg ^R ; <i>crtZ_{oXd}</i> aus <i>Brev. SD212</i> <i>crtG</i> aus <i>Brev. SD212</i>	diese Arbeit
PR1-104-Z _{oXd} -G-bkt	NTC ^R , Hyg ^R , G418 ^R ; <i>crtZ_{oXd}</i> aus <i>Brev. SD212</i> <i>crtG</i> aus <i>Brev. SD212</i> <i>bkt</i> aus <i>H. pluvialis</i>	diese Arbeit
Knock-Out-Plasmide		
pMon_ihi	<i>crtl</i> -Knock-Out-Konstrukt	AK Sandmann
pMon_aha	<i>asy</i> -Knock-Out-Konstrukt	
Knock-In-Plasmide		
pBlue_ahza		AK Sandmann
pBlue_ahzza	<i>crtZ_{oXd}</i> -Knock-In-Konstrukte	
pBlue_a ₈₅₀ hza		
Integrative Plasmide		
pPR13FYB	Amp ^R , G418 ^R ; 2x <i>crtYB</i> aus <i>X. dendrorhous</i>	Ledetzky et al., 2014
pPRcDNA1bkt830	Amp ^R , G418 ^R ; <i>bkt</i> aus <i>H. pluvialis</i>	Ojima et al., 2006
pPR2TNH_crtG	Amp ^R , Hyg ^R ; <i>crtG</i> aus <i>Brev. SD212</i>	AK Sandmann
pPR2TNo_HMG_crtE	Amp ^R , Hyg ^R ; <i>HMGR</i> aus <i>S. cerevisiae</i> <i>crtE</i> aus <i>X. dendrorhous</i>	diese Arbeit
pPR2TNo_crtZ _{oXd}	Amp ^R , NTC ^R ; <i>crtZ_{oXd}</i> aus <i>Brev. SD212</i>	diese Arbeit
pPR2TNo_(crtZ _{oXd}) ₂		diese Arbeit
pPR2TNo_(crtZ _{oXd}) _{2g/a}	Amp ^R , NTC ^R ; 2x <i>crtZ_{oXd}</i> aus <i>Brev. SD212</i>	
pPR2TNoL_(crtZ _{oXd}) ₂		

^a Plasmidenkarten befinden sich im Anhang auf Seite 129.

^b Antibiotikaresistenzen: G418^R (Geneticin), Hyg^R (Hygromycin B), NTC^R (Nourseothricin), Amp^R (Ampicillin).

^c Gene: *asy* (Astaxanthin-Synthase), *crtl* (Phytoen-Desaturase), *HMGR* (HMG-CoA-Reduktase), *crtE* (GGPP-Synthase), *crtB* (Phytoen-Synthase), *crtl* und *al-1* (Phytoen-Desaturase), *crtY* (Lycopin-Zyklase), *crtYB* und *al-2* (Phytoen-Synthase/Lycopin-Zyklase), *crtZ_{oXd}* (codon optimierte β-3,3'-Hydroxylase aus *Brevundimonas SD212*), *bkt* (β-4,4'-Ketolase).

Tabelle 2.2: Verwendete Stämme von *Escherichia coli* und Plasmide

Stamm / Plasmid	relevante Eigenschaft ^{a,b,c}	Referenz / Quelle
<i>Escherichia coli</i>		
JM110	Wirtstamm für die Isolierung methylierungsfreier (<i>dam</i> , <i>dcm</i>) Plasmid-DNA	Yanisch-Perron et al., 1985
DH5 α	Wirtstamm für die Replikation von Plasmid-DNA und <i>crt</i> -Genexpression	Bethesda Research Laboratories, 1986
Plasmide für <i>E. coli</i> zur Konstruktion von integrativen <i>X. dendrorhous</i>-Plasmiden		
pMon38201	Amp ^R ; <i>lacZ'</i> Reporter gen aus <i>E. coli</i>	(Borovkov & Rivkin, 1997)
pUC8 Δ EcoRI-HNNH	Amp ^R ; P _{gpd} aus <i>X. dendrorhous</i> T _{gpd} aus <i>X. dendrorhous</i>	Gassel et al., 2014
pPR2TNo	Amp ^R , NTC ^R ; Transformationsvektor	Gassel et al., 2014
Plasmide für <i>E. coli</i> zur Biosynthese von Carotinoiden		
pACCAR16 Δ crtX	Cmp ^R ; <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , und <i>crtY</i> aus <i>E. uredovora</i>	Misawa et al., 1995
pACCAR25 Δ crtX	Cmp ^R ; <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> und <i>crtZ</i> aus <i>E. uredovora</i>	Misawa et al., 1995
pACCAR25 Δ crtX Δ Z_O	Cmp ^R ; <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , und <i>crtY</i> aus <i>E. uredovora</i> <i>crtO</i> aus <i>Syne. PCC6803</i>	AK Sandmann
pACCRTEBal ₁ al ₂	Cmp ^R ; <i>crtE</i> , <i>crtB</i> aus <i>E. uredovora</i> <i>al-1</i> , <i>al-2</i> aus <i>N. crassa</i>	AK Sandmann Schmidhauser et al., 1990, 1994
pACYC-EB	Cmp ^R ; <i>crtE</i> , <i>crtB</i> aus <i>E. uredovora</i>	AK Sandmann
pACYC-EBI _{E.u.}	Cmp ^R ; <i>crtE</i> , <i>crtB</i> und <i>crtI</i> aus <i>E. uredovora</i>	AK Sandmann
pACYC-EBI _{RC}	Cmp ^R ; <i>crtE</i> , <i>crtB</i> aus <i>E. uredovora</i> <i>crtI</i> aus <i>R. capsulatus</i>	Takaichi et al., 1996
pRKcrtY	Tet ^R ; <i>crtY</i> aus <i>E. uredovora</i>	AK Sandmann
pRK-bkt	Tet ^R ; <i>bkt</i> aus <i>H. pluvialis</i>	AK Sandmann
pUC-Bre-O11	Amp ^R ; <i>crtG</i> aus <i>Brev. SD212</i>	Nishida et al., 2005
pUC-bch ₃	Amp ^R ; <i>bch₃</i> aus <i>N. tabacum</i>	AK Sandmann

^a Antibiotikaresistenzen: Amp^R (Ampicillin), Cmp^R (Chloramphenicol), Tet^R (Tetracyclin).

^b Genprodukte: *lacZ'* (β -Galactosidase), *crtE* (GGPP-Synthase), *crtB* (Phytoen-Synthase), *crtI* und *al-1* (Phytoen-Desaturase), *crtY* (Lycopin-Zyklase), *crtYB* und *al-2* (Phytoen-Synthase/Lycopin-Zyklase), *crtZ* und *bch₃* (3,3'- β -Hydroxylase), *crtG* (2,2'- β -Hydroxylase), *bkt* (β -4,4'-Ketolase), *crtO* (β -4,4'-Ketolase aus *Synechocystis PCC6803*).

^c DNA-Elemente: P_{gpd} und T_{gpd} (Promotor- und Terminatorsequenzen des Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens).

2.6 Mikrobiologische Methoden

Im Folgenden werden die für die Anzucht von *E. coli* und *X. dendrorhous* benötigten Wachstumsmedien und Antibiotikakonzentrationen sowie die Kultivierungsbedingungen beschrieben.

2.6.1 Wachstumsmedien

Name	Herstellung
LB-Medium	5 g Hefeextrakt 10 g Pepton aus Soja 5 g NaCl mit VE-Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt und autoklaviert
YM-Medium	3 g Hefeextrakt 3 g Malzextrakt 5 g Pepton aus Casein 10 g Glucose in 1000 ml ddH ₂ O gelöst und autoklaviert
YP-Medium	4 g Hefeextrakt 8 g Pepton aus Casein in 360 ml ddH ₂ O gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen 40 ml einer sterilen Zucker-Lösung hinzugegeben
YPA-Medium	YP-Medium + 40 ml sterile 30%-Arabinose-Lösung
YPD-Medium	YP-Medium + 40 ml sterile 20%- oder 30%-Glucose-Lösung
YPH-Medium	YP-Medium + 40 ml steriles Weizenstrohydrolysat
YPX-Medium	YP-Medium + 40 ml sterile 30%-Xylose-Lösung
YPD-Agar	YPD-Medium mit 1,6 % (w/v) Agar versetzt und autoklaviert

2.6.2 Weizenstrohydrolysat

Das Weizenstrohydrolysat wurde von der Firma Green Sugar (Meißen, Deutschland) zur Verfügung gestellt und enthielt folgende Zucker in den angegebenen Konzentrationen: Xylose (194,1 g/L), Glucose (66,9 g/L), Arabinose (45,8 g/L), Galactose (37,7 g/L) und Mannose (19,1 g/L). Vor der Verwendung wurde das Hydrolysat durch die Zugabe einer 1 M NaOH-Lösung neutralisiert und steril filtriert.

2.6.3 Antibiotikakonzentrationen

Zur Selektion von transformierten *E. coli* oder *X. dendrorhous*-Zellen wurden folgende Antibiotika mit den angegebenen Endkonzentrationen verwendet (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika unter Angabe der Stamm- und Endkonzentration

Antibiotika	Stammkonzentration [mg/ml]	Endkonzentration ^a [µg/ml]
<i>E. coli</i>		
Ampicillin	25	100
Chloramphenicol	34	34
Tetracyclin	10	25
<i>X. dendrorhous</i>		
Geneticin	50	100 (25)
Hygromycin B	50	60 (15)
Nourseothricin	10	30 (10)

^a Die Zellen von AXG-13 benötigten geringere Endkonzentrationen (in Klammern).

2.6.4 Herstellung einer Dauerkultur

750 µl einer Kultur aus Zellen von *E. coli* oder *X. dendrorhous* wurden in ein 1,5ml-Reagiergefäß übergeführt, abzentrifugiert (30 sek, 6.000 rpm) und das Zellsediment in dem gleichen Volumen Wachstumsmedium resuspendiert. Zur Lösung wurden 250 µl 80%-Glycerin-Lösung gegeben, gemischt und das Reagiergefäß bei - 80 °C gelagert.

2.6.5 Kultivierung von *E.coli*

Für die Kultivierung wurden Reagenzgläser oder 100ml-Erlenmeyerkolben mit 5 oder 50 ml LB-Medium verwendet und die Zellen bei 37 °C auf einen Rotator oder einem Kreisschüttler bei 120 rpm für 1-3 Tage inkubiert.

2.6.6 Kultivierung von *X. dendrorhous* in Schikanekolben

Für die Kultivierung in einem 500ml-Schikanekolben wurden 50 ml YM-Medium mit 5 ml einer Vorkultur versetzt und die Zellen bei 20 °C und 160 rpm für sieben Tage unter Belichtung mit Weißlicht inkubiert.

2.6.7 Kultivierung von *X. dendrorhous* in einem Bioreaktor

Die Kultivierung wurde mit dem in Abschnitt 2.1 auf Seite 16 aufgelisteten Bioreaktor-System unter Belichtung mit Weißlicht durchgeführt. Zu einem initialen Kulturvolumen von 1 L YM-Medium wurden 100 ml einer Vorkultur gegeben und die Kultivierung gestartet. Die Temperatur wurde durch eine Wasserkühlung auf 21 °C geregelt und die Kultur mit einem Volumenstrom von 1 L/min belüftet. Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von 2 M NaOH und 2 M HCl auf 5,5 gehalten. Die Sauerstoffsättigung wurde durch die Variation der Rührerdrehzahl (300 - 1300 rpm) über 40 % gehalten. Schaumentwicklung wurde durch die Zugabe von 200 µl Antifoam 204 unterdrückt. Nach Verbrauch der initialen Glucosemenge wurden 200 - 220 ml einer Glucose-Lösung (10 % oder 25%) mit einer Rate von 6,5 ml/h hinzugegeben. Die Glucosekonzentration wurde mit Glucose-Teststreifen bestimmt und unter 2 g/L gehalten.

2.7 Molekularbiologische Methoden

Im Folgenden wird die Durchführung der in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Methoden beschrieben. Hierbei wurde *E. coli* als Wirtstamm für die Replikation von Plasmiden und zur Expression von Carotinoidbiosynthesegenen verwendet, während genetische Modifikationen von *X. dendrorhous*-Stämmen erfolgten.

2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse

Verwendete Lösungen

Name	Herstellung
Puffer 1	50 mM TRIS, pH 8 10 mM EDTA, pH 8 100 µg/ml RNase in ddH ₂ O gelöst
Puffer 2	200 mM NaOH 1 % SDS in ddH ₂ O gelöst und autoklaviert
Puffer 3	3M Kaliumacetat, pH 5,2 in ddH ₂ O gelöst und autoklaviert

Durchführung

Von einer *E. coli*-Kultur wurden 1,5 ml in einem 1,5ml-Reagiergefäß abzentrifugiert (1 min, 10.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µl Puffer 1 resuspendiert. Anschließend wurden je 250 µl Puffer 2 und Puffer 3 hinzugegeben und das Reagiergefäß nach jeder Zugabe 20 Mal invertiert. Nach Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand in ein neues 1,5ml-Reagiergefäß übergeführt, 600 µl Isopropanol hinzugegeben und fünf Mal invertiert. Nach erneuter Zentrifugation (6 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 400 µl Ethanol (70 %) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand vollständig verworfen, die DNA getrocknet und in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels Midipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in Größenordnungen von 500 ng/µl erfolgte mit dem PureYield Plasmid Midiprep System nach Herstellerangaben.

2.7.3 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Die Amplifizierung des *adh4*-Promotors erfolgte mit genomischer DNA aus CBS6938 und der *pfu*-Polymerase nach dem in Tabelle 2.4 angegebenen PCR-Ansatz.

Tabelle 2.4: PCR-Ansatz und Temperaturprogramm zur Amplifikation des *adh4*-Promotors

Komponente ^a	Volumen [µl]	Konzentration	Temperaturprogramm		
Genomische DNA	1				
dNTPs (25 mM)	0,6	0,31 mM	96 °C	3 min	
Padh4_fw_NotI (10 µM)	5	0,4 µM	96 °C	30 sek	x 35
Padh4_rv_EcoRI (10 µM)	5	0,4 µM	57 °C	30 sek	
<i>Pfu</i> -Puffer + MgCl ₂ (10x)	5	1x	72 °C	2 min	
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)	0,4	0,05 U	72 °C	10 min	
ddH ₂ O	33				

^a Oligonukleotide: Padh4_fw_NotI (GCGGCCGCGTATAAGAACGGAGGATCC)
Padh4_rv_EcoRI (GAATTCTGTGGGGTTCAGATGATGTG)

2.7.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Verwendete Lösungen

Name	Herstellung
DNA-Ladepuffer (10x)	6 g Ficoll 400 100 mg Bromphenolblau 100 mg Xylene Cyanol FF in 40 ml ddH ₂ O bei 50 °C im Wasserbad gelöst
TAE-Puffer (50x)	242 g TRIS 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8 mit VE-Wasser auf 1000 ml aufgefüllt

Durchführung

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen wurden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Proben mit 1/10 des Probenvolumens 10xDNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 1%-Agarosegel (1 % Agarose in 1xTAE-Puffer) aufgetragen. Als Größenstandard wurden 6 µl des 1 kb Plus Ladder-Markers (Thermo Scientific, Waltham, USA) verwendet. Nachdem die Elektrophorese mit 90 V gestartet wurde, konnte das Fortschreiten der Fragmente mittels der Bromphenol- und Xylenebanden als Bestandteil des Ladepuffers verfolgt werden. Anschließend wurde das Gel für ca. 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (3,3 µg/ml) gefärbt, unter UV-Licht betrachtet und dokumentiert.

2.7.5 Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Verwendete Lösungen

Name	Herstellung
Silica-Suspension	500 µl Siliziumdioxid in 500 µl ddH ₂ O suspendiert
Kaliumiodid-Lösung (6 M)	25 g Kaliumiodid in 25 ml ddH ₂ O gelöst und autoklaviert
Waschpuffer	10 mM TRIS, pH 7,5 2,5 mM EDTA 0,1 M NaCl in 25 ml ddH ₂ O gelöst, autoklaviert, plus 25 ml Ethanol

Durchführung

Die Agarosegelstücke wurden in einem 1,5ml-Reagiergefäß mit 900 µl Kaliumiodid-Lösung versetzt, 10 min bei 55 °C erwärmt und minütlich invertiert. Nach Auflösung der Agarose wurden 30 µl Silica-Suspension hinzugegeben und die Inkubation für weitere 5 min fortgesetzt. Nach Zentrifugation für 30 sek bei 13.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 500 µl Waschpuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Waschpufferzugabe wurde dieser Schritt ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde der Überstand restlos entfernt und das Sediment in 20 µl ddH₂O suspendiert. Nach Inkubation (5 min, 55 °C) und Zentrifugation (30 sek, 13.000 rpm) wurde die DNA-Lösung aus dem Reagiergefäß entnommen.

2.7.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mittels Extinktionsmessung mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Extinktionswert 1 entsprach dabei einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl. Es war darauf zu achten, dass das Verhältnis der Extinktionsquotienten von 260/280 zu 260/230, das die Reinheit der DNA-Präparation beschreibt, im Bereich von 1,8 bis 2,2 lag.

2.7.7 Restriktion und Ligation von DNA

Zur Restriktion von DNA wurden Restriktionsenzyme sowie Puffer der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl. Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.7.4) und die gewünschten Fragmente aus dem Gel isoliert (Abschnitt 2.7.5). Anschließend wurden die DNA-Enden des linearisierten Vektors mit Hilfe des Enzyms Shrimp Alkaline Phosphatase nach Herstellerangaben dephosphoriliert, bevor er mit dem DNA-Fragment (Insert) kovalent verknüpft werden konnte. Die Ligation erfolgte mit der T4-DNA-Ligase nach folgendem Ansatz (Tabelle 2.5) und Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur.

Tabelle 2.5: Ansatz zur Ligation von DNA-Fragmenten

Komponente	Volumen [µl]
Insert-DNA	7
Vektor-DNA	1
T4-DNA-Ligase	1
T4-DNA-Ligase-Puffer	1

2.7.8 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden die Plasmide aus *E. coli* mit dem PureYield Plasmid Miniprep System nach Herstellerangaben isoliert und 15 µl der DNA-Lösung (Konzentration 50 - 100 ng/µl) zur Sequenzierung an die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) geschickt. Hierbei wurden die Oligonukleotid-Primer pPRrev (CAGCTATGACCATGATTACGC) für pPR2TNo-Plasmide und M13-uni-43 (AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT) für Plasmide basierend auf pMon38201 oder pUC8ΔEcoRI-HNNH verwendet.

2.7.9 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer Vorkultur versetzt und die Hauptkultur bei 37 °C und 160 rpm inkubiert bis die OD₆₀₀ einen Wert von 0,6 erreicht hatte. Im Anschluss erfolgten alle weiteren Schritte auf Eis bzw. in vorgekühlten Zentrifugen. Die Kultur wurde bei leichtem Schütteln 15 - 30 min auf Eis abgekühlt und die Zellen danach 15 min bei 4 °C und 5.000 G abzentrifugiert. In vier aufeinanderfolgenden Waschschritten wurde das Zellsediment mit 500, 250 und 100 ml eiskaltem sterilen VE-Wasser und zuletzt mit 50 ml 10%-Glycerin-Lösung resuspendiert und anschließend abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 5.000 G). Danach wurden die Zellen in 1 ml eiskalter steriler 10%-Glycerin-Lösung resuspendiert und in Aliquots zu 70 µl bei - 80 °C gelagert.

2.7.10 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA mittels Elektroporation

Ein Aliquot (70 µl) elektrokompetenter *E.coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µl einer DNA-Lösung versetzt. Anschließend wurde die Zell-DNA-Lösung in eine Elektroporationsküvette übergeführt und die Elektroporation durchgeführt (250 Ω, 25 µF, 2,5 kV). Nach sofortiger Zugabe von 750 µl LB-Medium wurde für 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und im Anschluss ein geeignetes Volumen auf Selektionsplatten (LB-Agar mit Antibiotikum) aufgebracht.

2.7.11 Aufreinigung von Plasmid-DNA mittels Phenol-Chloroform-Fällung

Verwendete Lösungen

Name	Herstellung
Kaliumacetat-Lösung (3 M)	29,5 g Kaliumacetat in 75 ml ddH ₂ O gelöst, pH 5,3 mit Essigsäure eingestellt, mit ddH ₂ O auf 100 ml aufgefüllt und autoklaviert

Durchführung

Zu 1 Volumen einer DNA-Lösung wurde 1 Volumen Phenol gegeben, die Lösung stark geschüttelt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 / 24 / 1) versetzt. Nach kurzem Mischen und Zentrifugation (30 sek, 6.000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und mit 1 Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24 / 1) versetzt. Nach kurzem Mischen und Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und zügig mit 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Kalium-Acetat-Lösung (pH 5,2) versetzt. Im Anschluss wurde die DNA über Nacht bei - 20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde die Lösung für 30 min bei 13.000 rpm und - 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 500 µl 80%-Ethanol hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die DNA getrocknet und in einem geeigneten Volumen sterilen Wassers aufgenommen.

2.7.12 Linearisierung von Transformationsvektoren mit *Sfi*I

Zur Integration von Plasmiden (basierend auf dem Transformationsvektor pPR2TN) in die genomische DNA von *X. dendrorhous*-Stämmen mussten diese zuvor linearisiert werden. Vor der Transformation wurden die Plasmide als methylierungsfreie (*dam*⁻, *dcm*⁻) DNA aus dem *E. coli*-Stamm JM110 isoliert (Abschnitt 2.7.2) und mit Hilfe des Restriktionsenzym *Sfi*I geschnitten (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Restriktionsansatz zur Linearisierung von pPR2TN-Plasmiden

Komponente	Ansatz
Plasmid-DNA	10 µg
Puffer Green (10x)	2 µl
<i>Sfi</i> I	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Je 10 µg einer mittels Phenol-Chloroform-Fällung (Abschnitt 2.7.11) aufgereinigten Plasmid-Präparation wurden nach dem angegebenen Restriktionsansatz für 10 h bei 50 °C verdaut. Nachdem der Erfolg mittels Agarosegelelektrophorese überprüft wurde, wurden alle Ansätze vereinigt und mittels Phenol-Chloroform-Fällung aufgereinigt.

2.7.13 Transformation von *X. dendrorhous* mit DNA mittels Elektroporation

Verwendete Lösungen

Name	Herstellung
DTT-Lösung	0,1 g Dithiothreitol in 25 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer gelöst und sterilfiltriert
Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5)	4 ml 0,4 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung 21 ml 0,4 M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung in 375 ml ddH ₂ O gelöst und autoklaviert
STM-Puffer	270 mM Saccharose 10 mM TRIS-HCl 1 M Magnesiumchlorid in ddH ₂ O gelöst und autoklaviert

Durchführung

100 ml YPD-Medium wurden mit 10 bis 20 ml einer Vorkultur versetzt und die Hauptkultur bei 19 °C und 160 rpm in einem 250ml-Erlenmeyerkolben über Nacht inkubiert. Wenn die OD₆₀₀ 1,2 betrug, wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4.500 rpm) geerntet und das Sediment mit 25 ml einer frischen DTT-Lösung resuspendiert. Daraufhin wurde 15 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden zentrifugiert (10 min, 4.500 rpm, 4 °C) und das Sediment zwei Mal mit 25 ml STM-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig mit einer Pipette abgenommen und das Zellsediment in 250 µl STM-Puffer resuspendiert. Zur Transformation wurden 60 µl Zellen verwendet und mit bis zu 10 µl einer hochkonzentrierten (10 µg/ml) DNA-Lösung versetzt. Nachdem die Zell-DNA-Lösung in eine Elektroporationsküvette übergeführt wurde, erfolgte die Elektroporation (1.000 Ω, 25 µF, 0,8 kV) und die sofortige Zugabe von 500 µl YPD-Medium. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf einem Rotator für 2,5 h bei 19 °C inku-

biert und anschließend je 100 µl auf Selektionsplatten (YPD-Festmedium + Antibiotikum) aufgebracht.

2.7.14 Sporulation von *X. dendrorhous*

Zur Sporulation von *X. dendrorhous*-Zellen wurde die Methode von Kucsera et al. (1998) angewendet. Hierzu wurde eine Zellkolonie in 5 ml YPD-Medium übertragen und die Kultur für 2 Tage bei 20 °C kultiviert. Anschließend wurden 500 µl der Zellsuspension abzentrifugiert (3 min, 6.000 rpm), der Überstand verworfen und die Zellen in 500 µl ddH₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension wurde dieser Schritt ein weiteres Mal wiederholt. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf eine Sporulationsplatte (0,5 % Adonitol, 2 % Agar) aufgetragen und die Platte bei 10 °C im Dunkeln gelagert. Die Sporenentwicklung wurde nach Probenentnahme mit einem Lichtmikroskop unter 630-facher Vergrößerung beobachtet.

2.7.15 Isolierung genomischer DNA aus *X. dendrorhous*

Verwendete Lösungen

Name	Herstellung
RNAse-Lösung (10 mg/ml)	5 mg Ribonuklease in 500 µl ddH ₂ O gelöst, 15 min bei 100 °C im Heizblock erwärmt und anschließend langsam abgekühlt
TENS-Puffer	50 µl 1 M TRIS-HCl, pH 8 50 µl 0,1 mM Na-EDTA, pH 8 100 µl 5 M Natriumchlorid 500 µl 20 % SDS in 4,3 ml ddH ₂ O gelöst

Durchführung

40 ml YPD-Medium wurden mit einer Vorkultur versetzt und die Hauptkultur bei 20 °C und 160 rpm in einem Erlenmeyerkolben für vier Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4.500 rpm, 10 min) geerntet und das Zellsediment in 2 ml frischem TENS-Puffer und 20 µl RNAse-Lösung (10 mg/ml) resuspendiert. Daraufhin erfolgte der Zellaufschluss. Hierzu wurde die Zellsuspension auf zwei 2ml-Reagiergefäße mit 500 µl Glasperlen aufgeteilt und die Zellen für 5 min mit einer Frequenz von 30 min⁻¹ in der Schwingmühle aufgeschlossen. Daraufhin wurden die Lösungen der beiden Ansätze 10 min bei 15.000 rpm zentrifugiert, der Überstand mit 1 Volumen Phenol versetzt und gemischt. Nach anschließender Zen-

trifugation (1 min, 6.000 rpm) wurde die obere Phase abgenommen, mit 1 Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 / 24 / 1) versetzt und gemischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen, mit 1 Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24 / 1) versetzt und gemischt. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen, mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und gemischt. Daraufhin erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 20 min bei 4 °C und 15.000 rpm. Das Sediment wurde nach Zugabe von 90 µl ddH₂O und 10 µl 3 M Kalium-Acetat-Lösung 15 min bei 37 °C und leichtem Schütteln gelöst und beide Ansätze vereint. Im Anschluss wurden der Lösung 400 µl 100% Ethanol zugegeben, die DNA 15 min bei - 80 °C gefällt und 20 min bei 13.000 rpm und - 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 400 µl 80%-Ethanol hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vollständig verworfen, die DNA getrocknet und in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

2.7.16 Nachweis des Gen-Knock-Out mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die erfolgreiche Integration der Knock-Out-Konstrukte *ihi* und *aha* in die Gene *crtl* und *asy* wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft. Hierzu wurden Oligonukleotid-Primer verwendet, die vor und hinter den Genen bzw. innerhalb des Hygromycin B-Resistenzgens *hph* binden und mit ihnen DNA-Fragmente spezifischer Länge amplifiziert (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Verwendete Oligonukleotide zum Knock-Out-Nachweis

Oligonukleotid ^a	Sequenz [5'→3']	Bindestelle
Up_crtl_fw	GGCGATCAAACCTTCTCGTTC	<i>crtl</i>
Down_crtl_rv	GAACAGACGAGCAGAGTATG	
Up_asy_fw	ACTACCCGTCGATTCTAACC	<i>asy</i>
Down_asy_rv	GACGACGTAGAAGTCATAGC	
Hyg_rev	GTGAGCAGGCTCCCGTTTCCTTAT	<i>hph</i>

^a Die mit „Up“ oder „Down“ bezeichneten Oligonukleotide binden innerhalb der Promotor- oder Terminatorbereiche der angegeben Gene. Hyg_rev bindet innerhalb des *hph*-Gens.

Die Amplifizierung erfolgte mit der DreamTaq-DNA-Polymerase nach dem in Tabelle 2.8 angegebenen PCR-Ansatz und Temperaturprogramm, wobei die Elongationszeit von der Länge des zu amplifizierenden Fragments abhing.

Tabelle 2.8: PCR-Ansatz und Temperaturprogramm zum Knock-Out-Nachweis

Komponente	Volumen [μ l]	Konzentration	Temperaturprogramm	
Template DNA		1 ng/ μ l		
dNTPs (25 mM)	0,25	0,31 mM	96 °C	3 min
Primer_forward (10 μ M)	0,8	0,4 μ M	96 °C	30 sek
Primer_reverse (10 μ M)	0,8	0,4 μ M	59 °C	30 sek
DreamTaq-Puffer (10x)	2	1x	72 °C	2,5 - 4,0 min
DreamTaq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,2	0,05 U	72 °C	10 min
ddH ₂ O	ad 20			

2.7.17 Bestimmung der Genkopienzahl mittels quantitativer Real Time PCR

Die Berechnung der Kopienzahl mittels quantitativer Real Time PCR (qRT-PCR) erfolgte nach Pfaffl (2001). Hierzu wurde zunächst genomische DNA aus *X. dendrorhous* isoliert (Abschnitt 2.7.15) und die DNA-Konzentration densitometrisch nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel mit der Software ImageJ (Version 1.5; Wayne Rasband, Open-Source) ermittelt. Anschließend wurde die DNA-Lösung auf eine Konzentration auf 0,001 ng/ μ l verdünnt und als DNA-Matrize verwendet. Für die PCR-Reaktion wurde der KAPA SYBR FAST Universal Mix verwendet, der die DNA-Polymerase, den Fluoreszenzmarker SYBR-Green und Deoxinukleotide enthielt. Tabelle 2.9 stellt den qRT-PCR-Ansatz und das verwendete Temperaturprogramm dar.

Tabelle 2.9: qRT-PCR-Ansatz und Temperaturprogramm

Komponente	Volumen [μ l]	Konzentration	Temperaturprogramm	
genomische DNA	1		95 °C	3 min
KAPA SYBR FAST (2x)	10	1x	95 °C	3 sek
Primer_forward (10 μ M)	0,4	0,4 μ M	60 °C	3 sek
Primer_reverse (10 μ M)	0,4	0,4 μ M		
ddH ₂ O	8,2		50 - 99 °C	+ 0,5 °C / 5 sek

Hierbei wurden mit Hilfe der in Tabelle 2.10 angegebenen Oligonukleotid-Primer DNA-Sequenzen der integrierten Gene amplifiziert. Als Referenz wurde das Gen *act* verwendet. Im Anschluss wurde eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt, um die Spezifität der Reaktion zu kontrollieren.

Tabelle 2.10: Verwendete Oligonukleotide zur Bestimmung der Genkopienzahl

Oligonukleotid	Sequenz [5'→3']	Effizienz [E]
act_fw act_rv	TGGCTCCTTGGCTCATATCC AGCATCATCTCCGGCGAATC	2,12
crtE_fw crtE_rv	GCAGATTCCGTTCTCGAAAG AGGACACGTCCAGACTATCTC	2,03
crtYB_fw crtYB_rv	AGGGCTGATCCCTCGATACC GTCTCGATAGCGTCTTCCG	2,02
crtZ.oXd_fw crtZ.oXd_rv	GTCCATCGACGATTCCCTAC CCCAGAGGAATCCGAAAGAG	2,06

Hierzu wurde zunächst die Effizienz der PCR-Reaktion für jedes Oligonukleotidpaar bestimmt, indem 10^{-1} bis 10^{-4} ng genomische DNA zur PCR-Reaktion eingesetzt wurden. Die mit einem Schwellenwert von 0,2 erhaltenen C_T -Werte wurden logarithmisch gegen die DNA-Verdünnung aufgetragen und mit der Steigung der Regressionsgeraden die Effizienz nach Formel 2.1 berechnet.

$$E = 10^{\frac{1}{m}} \quad 2.1$$

mit E = PCR-Effizienz des Primerpaars
 m = Steigung der Regressionsgeraden

Anschließend konnte die Kopienzahl bestimmt werden. Da sich während der Amplifikation die DNA-Menge nach jedem Zyklus verdoppelte, variierte die Zykluszahl an dem die DNA-Menge den Schwellenwert überschritt in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge der als Startmatrize verwendeten DNA-Genbereiche. Da außerdem die Kopienzahl des Referenzgens in den Proben unverändert blieb, lies sich aus der Differenz der Zykluszahlen des Referenz- und des Zielgens (ΔC_t -Wert), die Kopienzahl nach Formel 2.2 berechnen.

$$\text{Kopienzahl} = 2 \cdot E^{\Delta C_T(\text{act}-\text{Zielgen})} \quad 2.2$$

mit E = gemittelte Oligonukleotid-Effizienz (2,06)
act = C_T -Wert des act-Referenzgens
Zielgen = C_T -Wert des Zielgens

Innerhalb der Formel werden die Werte mit 2 entsprechend einem diploiden Genom multipliziert. Da die Gene *HMGR* und *crtE* gemeinsam auf dem Transformationsvek-

tor pPR2TNo_HMG_crtE in das Genom integriert wurden, wurde die *crtE*-Kopienzahl auch für HMGR verwendet.

2.8 Carotinoideextraktion

2.8.1 Extraktion von Carotinoiden aus *E. coli*

Die Zellen einer *E. coli*-Kultur wurden durch Zentrifugation (4.500 rpm, 10 min) geerntet, das Zellsediment eingefroren und über Nacht in der Lyophylle getrocknet. Am nächsten Tag wurden die getrockneten Zellen zu einem Pulver zerkleinert und in ein Metallröhrchen übergeführt. Nach Zugabe von 20 ml Methanol und 2 ml einer 60%-Kaliumhydroxid-Lösung wurde 20 min bei 55 °C im Wasserbad erwärmt. Nachdem die Lösung in einen Scheidetrichter übergeführt wurde, erfolgte die Zugabe von 15 ml 50%-Ether-Petrolether, 2 ml VE-Wasser und 1 ml Ethanol. Anschließend wurde die untere wässrige Phase abgelassen und die organische Phase in einem Glasröhrchen gesammelt. Nachdem die OD₄₆₅ und das Volumen zur Quantifizierung bestimmt wurden, wurde bei 30 °C im Wasserbad unter einem konstanten Stickstoffstrom eingengt.

2.8.2 Extraktion von Carotinoiden aus *X. dendrorhous*

Die Zellen einer *X. dendrorhous*-Kultur wurden durch Zentrifugation (4.500 rpm, 10 min) geerntet, das Zellsediment eingefroren und über Nacht in der Lyophylle getrocknet. Am nächsten Tag wurden die getrockneten Zellen zu einem Pulver zerkleinert und 20 mg in ein 1,5ml-Reagiergefäß eingewogen. Dazu wurden ca. 250 µl Glasperlen, 675 µl Methanol und 75 µl einer 60%-Kaliumhydroxid-Lösung hinzugegeben und die Zellen für 8 min mit einer Frequenz von 30 min⁻¹ in der Schwingmühle aufgeschlossen. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 55 °C erwärmt. Der Überstand wurde in einen Scheidetrichter übergeführt und die verbliebenen Glasperlen dreimal mit Methanol gewaschen. Nach der Zugabe von 10 ml 50%-Ether-Petrolether wurde heftig geschüttelt und 2 ml VE-Wasser und 1 ml Ethanol hinzugegeben. Anschließend wurde die untere wässrige Phase abgelassen und die organische Phase in einem Glasröhrchen gesammelt. Nachdem die OD₄₆₅ und das Volumen zur Quantifizierung bestimmt wurden, wurde bei 30 °C im Wasserbad unter einem konstanten Stickstoffstrom eingengt.

2.8.3 Quantifizierung der Carotinoidmenge

Die Gesamtcarotinoidkonzentration in $\mu\text{g/g}$ dw (dry weight, Trockengewicht) des zur Extraktion eingesetzten farbigen Zellmaterials von *E. coli* bzw. *X. dendrorhous* wurde mit Hilfe von Formel 2.3 berechnet. Hierzu wurden die in den Abschnitten 2.8.1 und 2.8.2 dokumentierten Extinktionswerte (OD_{465}) und die Volumina der Carotinoidlösungen verwendet.

$$c = \frac{\text{OD}_{465} \cdot V \cdot 10^7}{\epsilon_{1\%} \cdot m} \quad 2.3$$

mit	c	= Carotinoidkonzentration in $\mu\text{g/g}$ Trockengewicht
	OD_{465}	= Optische Dichte bei 465 nm
	V	= Volumen der Carotinoidlösung in ml
	$\epsilon_{1\%}$	= Extinktionskoeffizient einer 1%-Carotinoidlösung (2100)
	m	= Masse des verwendeten Zellmaterials in mg

Die Konzentrationsbestimmung des farblosen Phytoens erfolgte über HPLC unter Verwendung eines Eichwerts (Abschnitt 2.10.3).

2.9 Dünnschichtchromatographie

2.9.1 Auftrennung von Carotinoidextrakten

Zur Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) wurden die DC-Platten vor der Verwendung 1 Stunde bei 120 °C aktiviert. Anschließend wurden die Carotinoidextrakte in 50 μl Aceton gelöst und als kleine Punkte im Abstand von 1,5 cm im unteren Bereich der Platte aufgetragen. Danach wurde die Platte in eine DC-Kammer gestellt, die 50 ml des Laufmittels Toluol/Ethylacetat/Methanol in zwei Mischungsverhältnissen A oder B enthält. Zur Auftrennung der Extrakte der AXG-13 Δ asy-Transformanten wurde Mischung A (75/20/5 v/v/v) und zur Auftrennung des Extrakts aus PR1-104-Z_{oxd}-G-bkt Mischung B (65/30/5 v/v/v) verwendet. Nachdem das Laufmittel den oberen Bereich der DC-Platte erreicht hatte, wurde die Platte aus der Kammer entnommen, die Lauffront markiert und das Auftreten der Carotinoidbanden dokumentiert.

2.9.2 Isolation von Carotinoiden

Zur Isolation der hochpolaren Carotinoide Pol1 und Pol2 wurden die Carotinoide aus 100 mg Zellmaterial extrahiert und als 0,5 cm breiter Streifen im unteren Bereich

einer DC-Platte aufgetragen und die Chromatographie mit Laufmittel B durchgeführt. Das Kieselgel der Carotinoidbanden wurde mit einem Spatel ausgekratzt, in ein Glasröhrchen übergeführt und 6 ml Aceton hinzugegeben. Nach Zentrifugation (2 min, 10.000 rpm) wurde der Überstand entnommen, gesammelt und dieser Schritt drei Mal mit 3 ml Aceton wiederholt. Die vereinigte Carotinoidlösung wurde anschließend bei 30 °C im Wasserbad unter einem konstanten Stickstoffstrom eingengt.

2.9.3 Reduktion der Ketogruppe mit Natriumborhydrid

Zur Reduktion der C4-Ketogruppe nach Eugster (1995) wurden die Carotinoide in 1 ml Ethanol gelöst, eine Spatelspitze Natriumborhydrid hinzugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in einen Scheidetrichter mit 65%-Ether-Petrolether übergeführt und analog zu Abschnitt 2.8.2 weiterverarbeitet.

2.10 HPLC-Analytik

2.10.1 Auftrennung von Carotinoidextrakten mittels HPLC

Die chromatographische Auftrennung von Carotinoidextrakten erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit dem in Abschnitt 2.1 auf Seite 16 aufgelisteten HPLC-System unter den zwei verschiedenen Bedingungen A und B. Bedingung A wurde routinemäßig verwendet, während die Auftrennung von hochpolaren Carotinoiden unter Bedingung B erfolgte (Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11: Verwendete HPLC-Bedingungen

	A	B
Mobile Phase	Acetonitril/Methanol/Isopropanol (40/80/10 v/v/v)	Acetonitril/Methanol/Isopropanol (40/80/10 v/v/v + 3 % H ₂ O)
Temperatur [°C]	32	20
Flussrate [ml/min]	0,8	0,8

Hierzu wurden die Extrakte in einem geeigneten Volumen (50 - 500 µl) Aceton oder Methanol gelöst und 20 µl über eine Probenschleife auf die C₁₈-Säule aufgetragen. Die von dem Dioden Array Detektor übermittelten Elutionsprofile wurden mit Hilfe der Software Clarity Lite (Version 4.0; Data Apex, Prag, Tschechien) aufgenommen

und bearbeitet. Die Übertragung und Speicherung der Absorptionsspektren erfolgte mit der Software WinWaters (Version 1.0; Hubert Fink, Uni-Konstanz).

2.10.2 Identifizierung der Carotinoide mit Hilfe von Standards

Die Identifizierung der in den erhaltenen Chromatogrammen auftretenden Elutionsgipfel erfolgte anhand von Standards durch Vergleich der Retentionszeiten und der spektralen Absorptionsmaxima. Dabei handelte es sich um Reinsubstanzen (Astaxanthin und Canthaxanthin) und um Extrakte rekombinanter *E. coli*-Bakterien, die Plasmide mit den Biosynthesegenen des Standardcarotinoids enthielten.

Tabelle 2.12: Übersicht über die in den Standardextrakten registrierten Retentionszeit t_R und der spektralen Absorptionsmaxima der enthaltenen Carotinoide

Abk.	Carotinoide	Plasmide ^a	t_R [min] ^b		Maxima ^c [nm]
			A	B	
Ast	Astaxanthin	Sigma-Aldrich, USA	5,4	11,3	475
Nost	Nostoxanthin	pACCAR25 Δ crtX pUC-Bre-O11		13,0	425, 451, 478
Zea	Zeaxanthin	pACCAR25 Δ crtX	6,6	20,7	426, 451, 478
Adu	Adonirubin	pACCAR16 Δ crtX pPR-bkt, pUC-bch ₃	6,3		475
Can	Canthaxanthin	Sigma-Aldrich, USA	8,1	18,2	475
OH-E	3-Hydroxyechinenon	pACCAR25 Δ crtX Δ Z_crtO pUC-bch ₃	10,0		460, (482)
β -Cry	β -Cryptoxanthin	pACCAR16 Δ crtX pUC-bch ₃	11,6		425, 451, 477
Ech	Echinenon	pACCAR25 Δ crtX Δ Z_crtO	13,1	35,3	461, (482)
Lyc	Lycopin	pACYC-EBI _{E.u.}	16,2		446, 471, 502
Neu	Neurosporin	pACYC-EBI _{Y.c.}	18,1		416, 440, 469
Tor	Torulin	pACCRTEBa ₁ a ₂	19,5		462, 487, 519
β -Car	β -Carotin	pACCAR16 Δ crtX	23,0	57,0	426, 452, 478
D-Car	7,8-Dihydro- β -Carotin	pACCRT-EBI _{RC} pRK-crtY	26,2		408, 430, 455
Phy	Phytoen	pACYC-EB	27,3		275, 286, 297

^a Die Carotinoide Astaxanthin und Canthaxanthin lagen als chemisch synthetisierte Reinsubstanzen vor. Für sie ist die Bezugsquelle angegeben.

^b Die Angabe der Retentionszeiten erfolgt zu den in Tabelle 2.11 genannten zwei HPLC-Bedingungen A und B.

^c Die Angaben in Klammern bezeichnen eine Schulter.

2.10.3 Bestimmung der Phytoenkonzentration

Die Berechnung der Phytoenkonzentration in *X. dendrorhous*-Extrakten erfolgte nach chromatographischer Auftrennung unter Verwendung der gemessenen Flächeneinheiten des Phytoen-Elutionsgipfels und eines Eichwerts nach Formel 2.4.

$$c = \frac{F_E \cdot V \cdot 10^3}{P \cdot V_I \cdot m} \quad 2.4$$

mit	c	= Phytoenkonzentration in µg/g Trockengewicht
	F _E	= Flächeneinheiten des Phytoen-Elutionsgipfels
	V	= Volumen der Carotinoidlösung in µl
	P	= Eichwert von Phytoen (32156 F _E /µg)
	V _I	= injiziertes Volumen in µl
	m	= Masse des verwendeten Zellmaterials in mg

Zur Eichung des HPLC-Systems wurden 1 µg des Phytoenstandards aus *E.coli*(pACYC-EB) in drei unabhängigen Messungen über HPLC aufgetrennt und die Flächeneinheiten des Elutionsgipfels von Phytoen bestimmt. Die Mittelwertbildung ergab den Eichwert von 32156 Flächeneinheiten pro µg Phytoen.

2.10.4 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Die Analysen an einem hochauflösenden Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (HR-ESI-MS) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Helge Bode (Goethe Universität Frankfurt) durchgeführt. Hierzu wurden 5 µl des Carotinoids in Acetonitril gelöst und chromatographisch auf einer ACQUITY UPLCTM BEH C18-Säule (Länge 50 mm, Durchmesser 2,1 mm, Partikelgröße 1,7 µm; Waters, Milford, USA) mit einem UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Waltham, USA) HPLC-System aufgetrennt, das an ein Impact II QTOF Massenspektrometer (Bruker, Billerica, USA) gekoppelt war. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Acetonitril (+ 0,1 % Ameisensäure) und H₂O (+ 0,1 % Ameisensäure) bei einer Flussrate von 0,4 ml/min und einer Temperatur von 40 °C verwendet, wobei der Acetonitrilanteil zunächst von 5 % (0 - 2 min) auf 40 % (2 - 4 min) und anschließend kontinuierlich mittels eines Gradienten auf 95 % (4 - 14 min) gesteigert wurde. Die Detektion der Carotinoide erfolgte optisch bei 200 - 600 nm und durch Aufnahme der Analytmassen im positiven Modus von *m/z* 100 - 1200. Als interner Kalibrant wurde Natriumformiat verwendet.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse präsentiert, die sich in fünf aufeinanderfolgende Abschnitte einteilen lassen. Nach der Charakterisierung der Ausgangsstämme von *X. dendrorhous* erfolgten die genetischen Modifikationen zur Biosynthese der Carotinoide Phytoene und Zeaxanthin sowie multioxygenierten Zeaxanthinderivaten. Darauf folgten die Stabilisierung der erhaltenen Stämme, die anschließende Kultivierung in einem Bioreaktor und die Untersuchungen zur Nutzung von Pentosen als alternative Kohlenstoffquelle.

3.1 Charakterisierung der Ausgangsstämme

Bevor mit den Arbeiten zur genetischen Modifikation begonnen werden konnte, wurden die zu verwendenden Stämme charakterisiert und ihre Verwendung für die folgenden Arbeiten festgelegt. Dabei handelte es sich um den Astaxanthin-akkumulierenden Wildtyp CBS6938, den Astaxanthin-Hochproduzenten AXG-13, die β -Carotinmutante PR1-104 und die Transformante PR1-104-(YB)₂-HMG-E.

3.1.1 Carotinoidzusammensetzung und Wachstum

Nach Wachstum auf YPD-Festmedium und Kultivierung in YM-Flüssigmedium zeigten die Ausgangsstämme deutliche Unterschiede in der Farbe und im Gesamtcarotinoidgehalt (Abbildung 3.1). Bei den Astaxanthin-produzierenden Stämmen wies der **Wildtyp CBS6938** (Stamm 1) eine blasse rote Färbung auf, während diese bei **AXG-13** (Stamm 2) deutlich intensiver in Erscheinung trat. Der Gesamtcarotinoidgehalt war um mehr als das 16-fache von 242 auf 4013 $\mu\text{g/g dw}$ erhöht, wobei in beiden Stämmen das rote Astaxanthin mit über 80 % das Hauptcarotinoid bildete. Daneben konnte ein geringer Anteil der Astaxanthinvorstufe β -Carotin (2,4 und 1,7 %) bestimmt werden. Als weitere Carotinoide wurden 3-Hydroxy-4-ketotorulin (9,8 %) und zusätzlich für den Stamm AXG-13 die Astaxanthinvorstufen 3-Hydroxyechinenon (5,9 %) und Lycopin (1,5 %) nachgewiesen. Im Gegensatz zum Wildtyp und AXG-13, wiesen die β -Carotin-produzierenden Stämme **PR1-104** (Stamm 3) und die von ihm abgeleitete Transformante **PR1-104-(YB)₂-HMG-E** (Stamm 4) eine gelbe Färbung auf. Bei letzterem konnte eine stärkere Intensität beobachtet werden. Der Gesamtcarotinoidgehalt betrug 235 bzw. 800 $\mu\text{g/g dw}$ und war somit um das 3,4-fache im Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E erhöht. In beiden Stämmen bildete β -Carotin mit 96 und 72 % das Hauptcarotinoid. Als weitere Carotinoide konnten

Torulin (3,7 %) im Stamm PR1-104 und 7,8-Dihydro- β -Carotin (28 %) im Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E bestimmt werden.

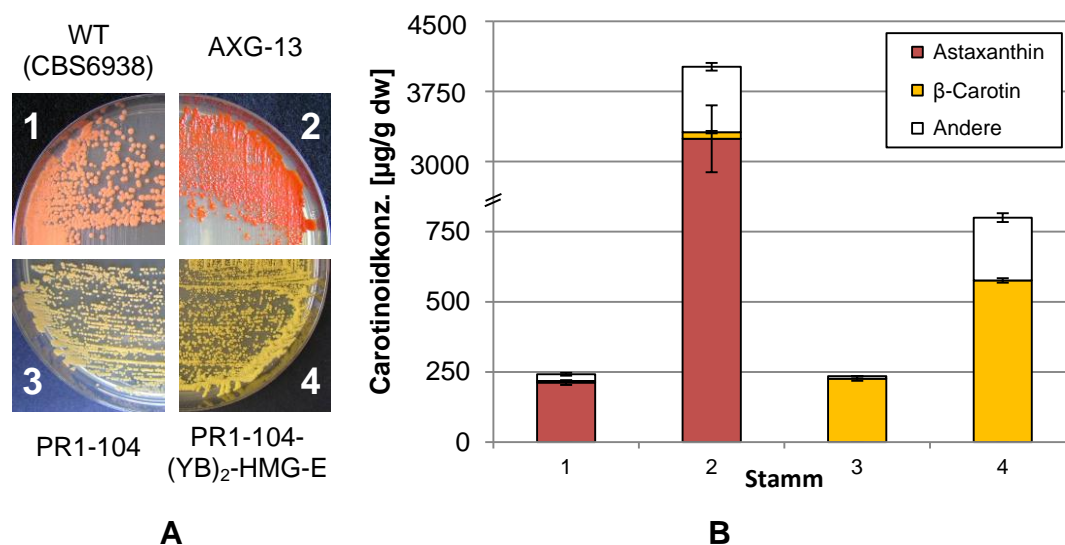


Abbildung 3.1: Pigmentierung der verwendeten Ausgangsstämme von *Xanthophylomyces dendrorhous* (A) und Darstellung der Carotinoidkonzentration (B). Die Stämme wurden auf YPD-Festmedium ausgestrichen und für 4-7 Tage kultiviert (A). Nach Kultivierung von je drei biologischen Replikaten in YM-Flüssigmedium (Abschnitt 2.6.6) wurden die Carotinoide wie in Abschnitt 2.8.2 beschrieben extrahiert und ihre Zusammensetzung mittels HPLC (Abschnitt 2.10.1) bestimmt. Die berechneten Mittelwerte sind unter Angabe der Standardabweichung (n=3) dargestellt (B).

Neben der Carotinoidzusammensetzung wurde auch das Wachstum der Stämme während der Kultivierung in Schikanekolben untersucht (Abbildung 3.2 B). Hierbei zeigte der mutagenisierte Stamm AXG-13 ein deutlich unterschiedliches Wachstumsverhalten sowie unterschiedliche Zellmorphologie, die auf erhebliche zelluläre Veränderungen innerhalb des Stamms hinwiesen. Während der Wildtyp und die beiden Stämme PR1-104 und PR1-104-(YB)₂-HMG-E die stationäre Phase nach 48 h erreichten, wuchsen die Zellen von AXG-13 deutlich langsamer und erreichten die stationäre Phase erst nach 96 h. Daraufhin kam es zu einem deutlichen Rückgang der Zelldichte bis zum Ende der Kultivierung nach 168 h, die bei den anderen Stämmen nicht beobachtet werden konnte. Die nach Abschluss der Kultivierung bestimmte Zellmasse betrug 3,2 g/L für AXG-13 und lag damit um ein Drittel niedriger als bei den anderen Stämmen, die Zelldichten zwischen 4,7 und 5,7 g/L erreichten.

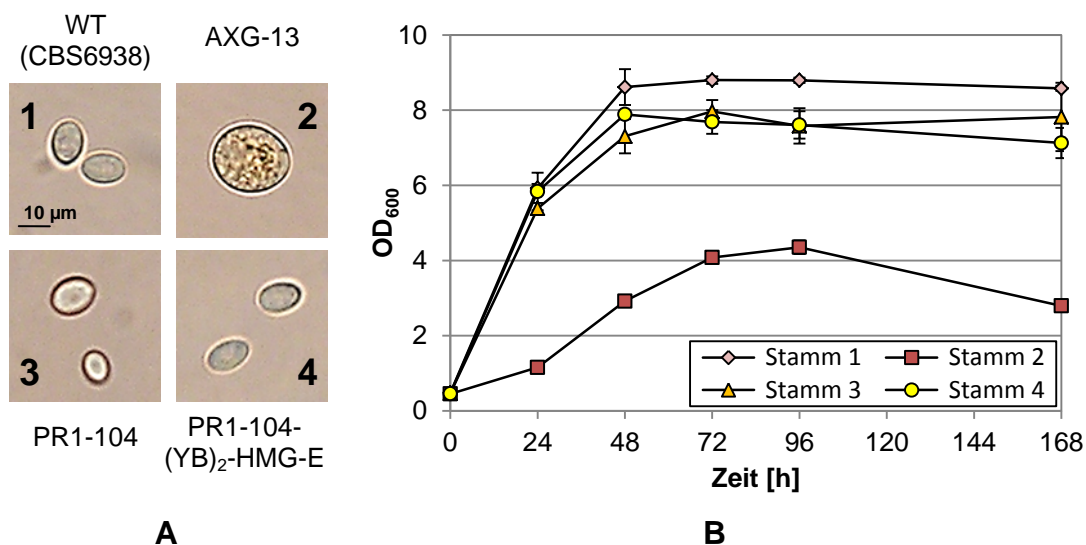


Abbildung 3.2: Mikroskopische Darstellung der Zellen der Ausgangsstämme (A) und Verlauf des Zellwachstums (B). Je drei biologische Replikate der Stämme wurden für 7 Tage in YM-Flüssigmedium kultiviert (Abschnitt 2.6.6) und täglich die optische Dichte (OD₆₀₀) der Zellsuspension bestimmt. Nach 96 h wurden Proben der Zellsuspension unter dem Mikroskop (Abschnitt 2.7.14) betrachtet und dokumentiert (A). Die bestimmten Mittelwerte der OD₆₀₀-Werte sind unter Angabe der Standardabweichung (n=3) dargestellt (B).

Auch mikroskopische Aufnahmen der Zellen zeigten auffällige morphologische Unterschiede (Abbildung 3.2 A). So besaßen die Zellen von AXG-13 nach 96 h Wachstum eine stärker abgerundete Form, während die Zellen des Wildtyps elliptisch waren. Darüber hinaus waren die Zellen deutlich größer und besaßen eine granuläre Struktur, die farbige Einschlüsse erkennen ließ. Die anderen Stämme zeigten keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp.

3.1.2 Verwendung für die folgenden Arbeiten

Auf der Grundlage der durchgeführten Charakterisierung konnte die Verwendung der Ausgangsstämme für die folgenden Arbeiten festgelegt werden. Der Stamm AXG-13 wurde für die Arbeiten zur genetischen Modifikation ausgewählt, mit dem Ziel einen Phytoen- bzw. Zeaxanthin-Hochproduzenten zu erhalten. Hierbei wurde zunächst der Wildtyp aufgrund seiner guten Wachstumseigenschaften als Testsystem verwendet und nach erfolgreicher Durchführung die Arbeiten auf den Stamm AXG-13 übertragen. Wegen seines bereits erhöhten β -Carotingehalts bot sich der Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E zur Evaluierung einer codon-optimierten β -3,3'-Hydroxylase CrtZ_{oxd} an. Der Stamm PR1-104 wurde zur Biosynthese von multioxygenierten Zeaxanthin verwendet, da er ebenfalls β -Carotin produziert, aber keine Antibiotikaresistenzen besitzt und daher drei Gene auf drei unterschiedlichen Transformationsvektoren aufnehmen konnte. Abbildung 3.3 stellt eine Übersicht über die durchgeführten Arbeiten dar.

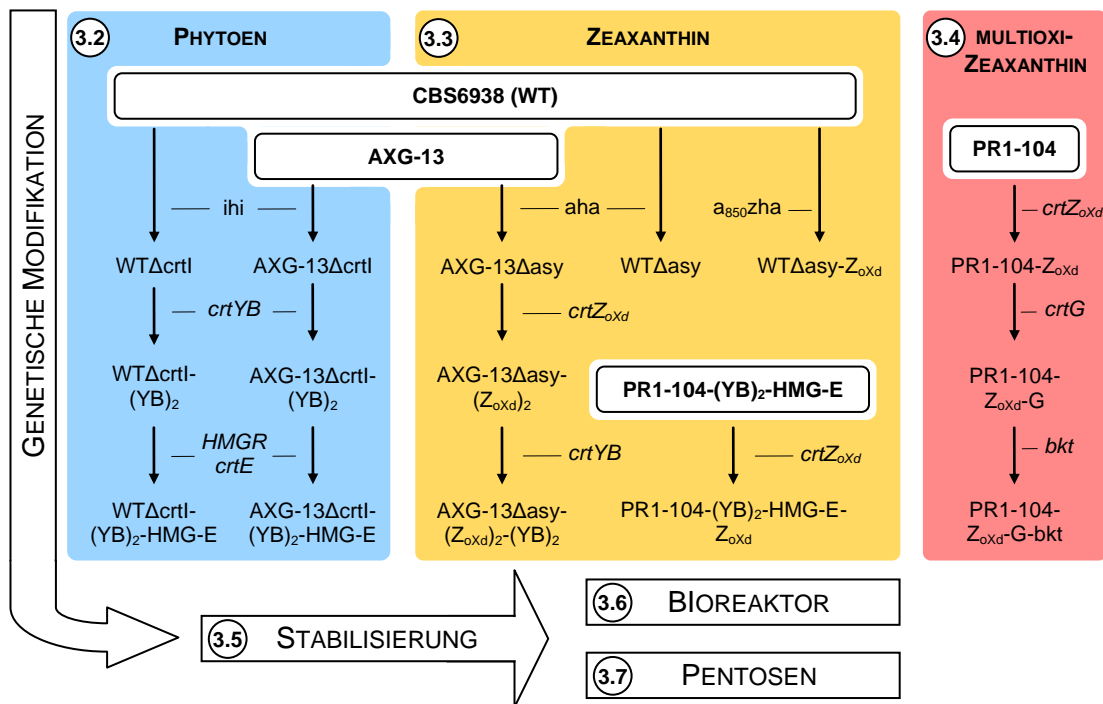


Abbildung 3.3: Übersicht über die durchgeführten experimentellen Arbeiten zur Gewinnung von Phytoen-, Zeaxanthin- und multioxygenierten Zeaxanthin-produzierenden Stämmen von *X. dendrorhous*. Zu jedem Teil sind die Abschnittsnummern (3.2 – 3.7) angegeben. Folgende Carotinoidegene wurden in die Ausgangsstämme integriert: *crtYB* (Phytoen-Synthase/Lycopin-Zyklase), *HMGR* (HMG-CoA-Reduktase), *crtE* (GGPP-Synthase), *crtZ_{oxd}* (codon-optimierte β-3,3'-Hydroxylase), *crtG* (β-2,2'-Hydroxylase) und *bkt* (β-4,4'-Ketolase). Mit Hilfe der Knock-Out-Konstrukte *ihl* und *aha* erfolgte die Inaktivierung des Phytoen-Desaturase und des Astaxanthin-Synthase-Gens. Das Knock-In-Konstrukt *a₈₅₀zha* diente zur Inaktivierung des Astaxanthin-Synthase- und gleichzeitiger Integration des *crtZ_{oxd}* Gens.

Zuerst erfolgten die Arbeiten zur Gewinnung Phytoen-produzierender Mutanten (Abschnitt 3.2). Hierzu wurde das Phytoen-Desaturase-Gen *crtl* mittels des Knock-Out-Konstrukts *ihl* in den beiden Stämmen CBS6938 (Wildtyp, WT) und AXG-13 inaktiviert, das zur Akkumulation von Phytoen in den Deletionsstämmen $WT\Delta crtI$ und $AXG-13\Delta crtI$ führte. Anschließend wurden die Gene *crtYB* sowie *HMGR* und *crtE* in das Genom dieser Stämme integriert um die Biosynthese von Phytoen zu steigern. Zur Gewinnung Zeaxanthin-produzierender Stämme (Abschnitt 3.3) wurde das Astaxanthin-Synthase-Gen *asy* mittels des Knock-Out-Konstrukts *aha* inaktiviert, das zur Akkumulation von β-Carotin in den Stämmen $WT\Delta asy$ und $AXG-13\Delta asy$ führte. Um den β-Carotinpool zu Zeaxanthin umzusetzen, wurde eine codon-optimierte Version des Gens *crtZ* aus *Brevundimonas* SD212 zuerst in das Genom des Stamms *PR1-104*-(YB)₂-HMG-E und anschließend in den Stamm *AXG-13* Δasy integriert. Daraufhin wurde mittels *crtYB*-Integration versucht eine Steigerung des Zeaxanthingehalts zu erreichen. Außerdem wurde die Möglichkeit einer kombinierten Inaktivierung des Gens *asy* mit gleichzeitiger Integration des

Gen *crtZ_{oxd}* mittels des Knock-In-Konstrukts *a₈₅₀zha* untersucht. Mit Abschluss der genetischen Modifikationen wurde eine Stabilisierung (Abschnitt 3.5) der erhaltenen Phytoen- (*WTΔcrtI*-(YB)₂-HMG-E und *AXG-13ΔcrtI*-(YB)₂-HMG-E) und Zeaxanthin-produzierenden Stämme (*AXG-13Δasy*-(Z_{oxd})₂ und *PR1-104*-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}) notwendig, da sich eine deutliche Verringerung der Konzentration des gewünschten Carotinoids nach Kultivierung ohne Antibiotikum zeigte. Nach diesem Schritt konnten zwei der Stämme erfolgreich in einem Bioreaktor kultiviert werden (Abschnitt 3.6). Abschließend wurde der Einsatz der Pentosen Xylose und Arabinose als alternative Kohlenstoffquelle untersucht (Abschnitt 3.7). Die Arbeiten zur Gewinnung von multioxygiertem Zeaxanthin (Abschnitt 3.4) wurden mit dem β -Carotin-akkumulierenden Stamm *PR1-104* durchgeführt. Durch aufeinanderfolgende Integration der Gene *crtZ_{oxd}*, *crtG* und *bkt* konnte die Biosynthese von Zeaxanthin, Nostoxanthin und 4,4'-Diketo-Nostoxanthin erreicht werden.

3.2 Genetische Modifikationen zur Biosynthese von Phytoen

Die Arbeiten zur Biosynthese von Phytoen sind in zwei aufeinanderfolgende Abschnitte unterteilt. Zuerst wurden Phytoen-akkumulierende Mutanten des Wildtyps und danach von *AXG-13* generiert, deren Phytoengehalt im Anschluss durch die Integration von drei Genen der Carotinoidbiosynthese gesteigert wurde.

3.2.1 Generierung Phytoen-akkumulierender Mutanten

Zur Inaktivierung des Phytoen-Desaturase-Gens *crtI* in *X. dendrorhous* wurde zunächst der Wildtyp als Testsystem verwendet. Dabei wurden Hinweise auf den Ploidiegrad der Zellen erhalten und homozygote Deletionsstämme mit Hilfe einer Subkultivierungsmethode generiert.

3.2.1.1 Knock-Out des Phytoen-Desaturase-Gens (*crtI*) im Wildtyp

Das Gen *crtI* codiert für die Phytoen-Desaturase, die die Synthese der Astaxanthin-vorstufe Lycopin katalysiert (Verdoes et al., 1999b). Nach Inaktivierung war daher die Akkumulation des Substrats Phytoen zu erwarten. Zur Durchführung des *crtI*-Knock-Outs wurde das *ih1*-Konstrukt verwendet, welches homologe Sequenzen des *crtI*-Gens, die die Genkassette für eine Hygromycin B-Resistenz (Hyg^R) flankieren, besitzt (vergl. Abbildung 1.6 B, S.13). Es ist dadurch in der Lage, sich mittels homologer Rekombination in das Gen *crtI* zu integrieren und es dadurch zu inaktivieren, wobei die Hygromycin-Resistenz anschließend als Marker für die erfolgreiche Inte-

gration verwendet werden kann. Das Konstrukt wurde mittels Fusions-PCR innerhalb der Arbeitsgruppe amplifiziert, in das Plasmid pMon38201 kloniert und für die weitere Verwendung in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Anschließend konnte das *ih1*-Konstrukt mit Hilfe des Restriktionsenzym *SalI* aus dem Plasmid pMon_ih1 herausgeschnitten werden. Nach Transformation mit Zellen des Wildtyps und Selektion auf Hygromycin-haltigem YPD-Festmedium sollte der Erfolg des *crt1*-Knock-Outs durch die Farbe der Zellen erkennbar sein. Während im Wildtyp das rote Astaxanthin das Hauptcarotinoid bildet, sollte nach Inaktivierung der Phytoen-Desaturase das farblose Substrat Phytoen akkumulieren und die Zellen eine weiße Färbung aufweisen.

Transformation mit dem *ih1*-Konstrukt und Subkultivierungen

Nach der Durchführung der Transformation konnten auf den Selektionsplatten insgesamt sechs weiße, zehn rote sowie 1230 orange Kolonien gezählt werden (Abbildung 3.4).

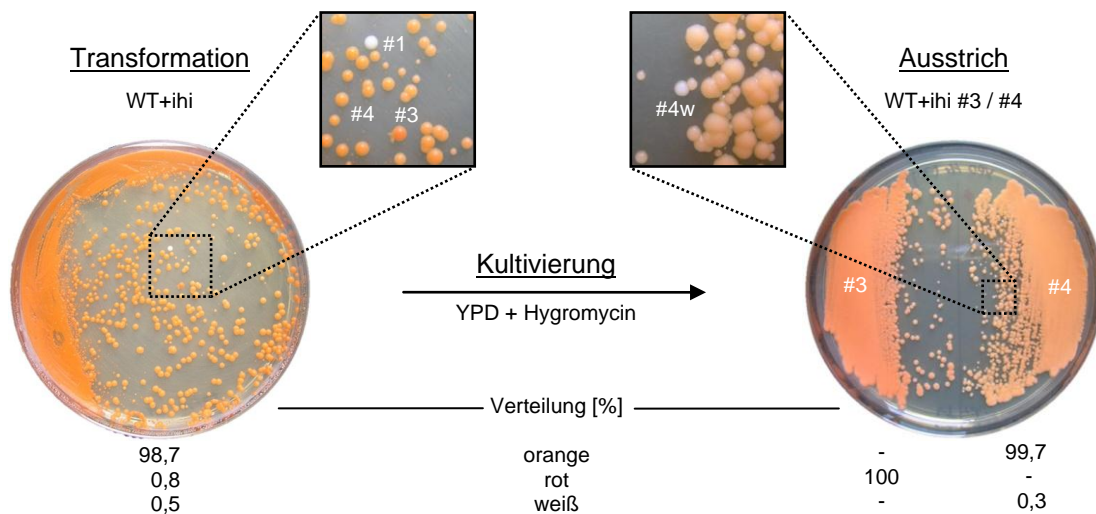


Abbildung 3.4: Selektion der nach Transformation des Wildtyps mit dem *ih1*-Konstrukt erhaltenen Transformanten und Subtransformanten. Die Transformation der Zellen wurde wie in Abschnitt 2.7.13 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden einzelne Kolonien anhand ihrer Farbe (#1 weiß, #3 rot, #4 orange) ausgewählt (links). Die Kolonien #3 und #4 wurden in Hygromycin-haltigen YPD-Flüssigmedium kultiviert und die Zellsuspension auf Festmedium ausgestrichen (rechts). Daraufhin konnte die weiße Subtransformante WT+ih1 #4w erhalten werden. Die prozentuale Verteilung der Phänotypen ist unterhalb der Platten angegeben.

Somit führte die Transformation nur bei wenigen Zellen zu der erwarteten weißen Färbung. Es konnte dagegen hauptsächlich ein oranger Phänotyp beobachtet werden, dessen Färbung eine Mischung zwischen der weißen und roten Kolonienfarbe darstellte. Solche intermediären Phänotypen sind ein Anzeichen von Heterozygotie,

bei der Gene eines diploiden Genoms in zwei Allelen vorliegen. Zur Klärung der genomischen Organisation wurde daher die Stabilität der beobachteten Zellfärbung überprüft, indem drei unterschiedlich gefärbte Kolonien (#1, #3 und #4) in Hygromycin-haltigem YPD-Flüssigmedium kultiviert und die Zellen auf YPD-Festmedium ausgestrichen wurden. Nach Niklitschek et al. (2012) können durch dieses Vorgehen aus heterozygoten Transformanten homozygote Zellen als Folge eines zweiten zufälligen Rekombinationsereignisses (Doppel-Rekombinations-Methode) erhalten werden. Nach der Kultivierung waren die Zellen der weißen Transformante WT+ih1 #1 durchgehend weiß gefärbt (nicht dargestellt). Auch die Zellen der rötlichen Transformante WT+ih1 #3, deren Farbe der des Wildtyps entsprach, zeigten keine Veränderung. Hingegen führte der Ausstrich der orangen Transformante WT+ih1 #4 zur Bildung einzelner (0,3 %) weißer Kolonien, von denen eine unter der Bezeichnung WT+ih1 #4w in YPD-Flüssigmedium kultiviert wurde. Wurden diese Zellen auf Festmedium ausgestrichen, zeigte auch diese eine homogene weiße Färbung (nicht dargestellt). Die Zellen des intermediären Phänotyps konnten somit durch Kultivierung und Ausstrich in den stabilen weißen Phänotyp überführt werden.

Um ein genaueres Bild über Carotinoidzusammensetzung der gewonnenen Transformanten zu erhalten, wurden im Anschluss die Carotinoide aus dem Zellmaterial extrahiert und die Zusammensetzung mittels HPLC bestimmt. Hierbei wurde die Absorption im sichtbaren Bereich (465 nm) sowie im UV-Bereich (285 nm) gemessen, um eine Detektion der farbigen Carotinoide und des farblosen Phytoens zu ermöglichen. Dabei zeigte sich, dass die weißen Zellen ausschließlich Phytoen als einziges Carotinoid bildeten (Abbildung 3.5).

Im Chromatogramm des Wildtyps wurde Astaxanthin bei 465 nm als Hauptelutionsgipfel sichtbar, der 88 % der Chromatogrammfläche einnahm. Das Spektrum zeigte die charakteristische Form einer Glockenkurve mit einem Absorptionsmaximum bei 476 nm. Im UV-Bereich fiel der große Elutionsgipfel nach 13,6 min ins Auge, der aufgrund seines viergipfligen Absorptionsspektrums als Ergosterol identifiziert wurde. Im Chromatogramm der Transformante WT+ih1 #1 konnten keine Carotinoide im sichtbaren Licht nachgewiesen werden. Der Extrakt war farblos. Bei 285 nm wurde nach 27,3 min als einziges Carotinoid der Elutionsgipfel von Phytoen (275, 286, 297 nm) sichtbar, dessen Konzentration 194 µg/g dw betrug. Das Chromatogramm und der Gesamtcarotinoidgehalt der roten Transformanten WT+ih1 #3 zeigte keine wesentlichen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Im Chromatogramm der Transformante WT+ih1 #4 war das Fehlen von 3-Hydroxy-4-ketotorulin und Phytoen auffällig. Im Gegensatz dazu enthielt der farblose Extrakt der nach Kultivierung und

Ausstrich erhaltenen weißen Subtransformante WT+ih1 #4w Phytoen mit einer Konzentration von 287 µg/g dw.

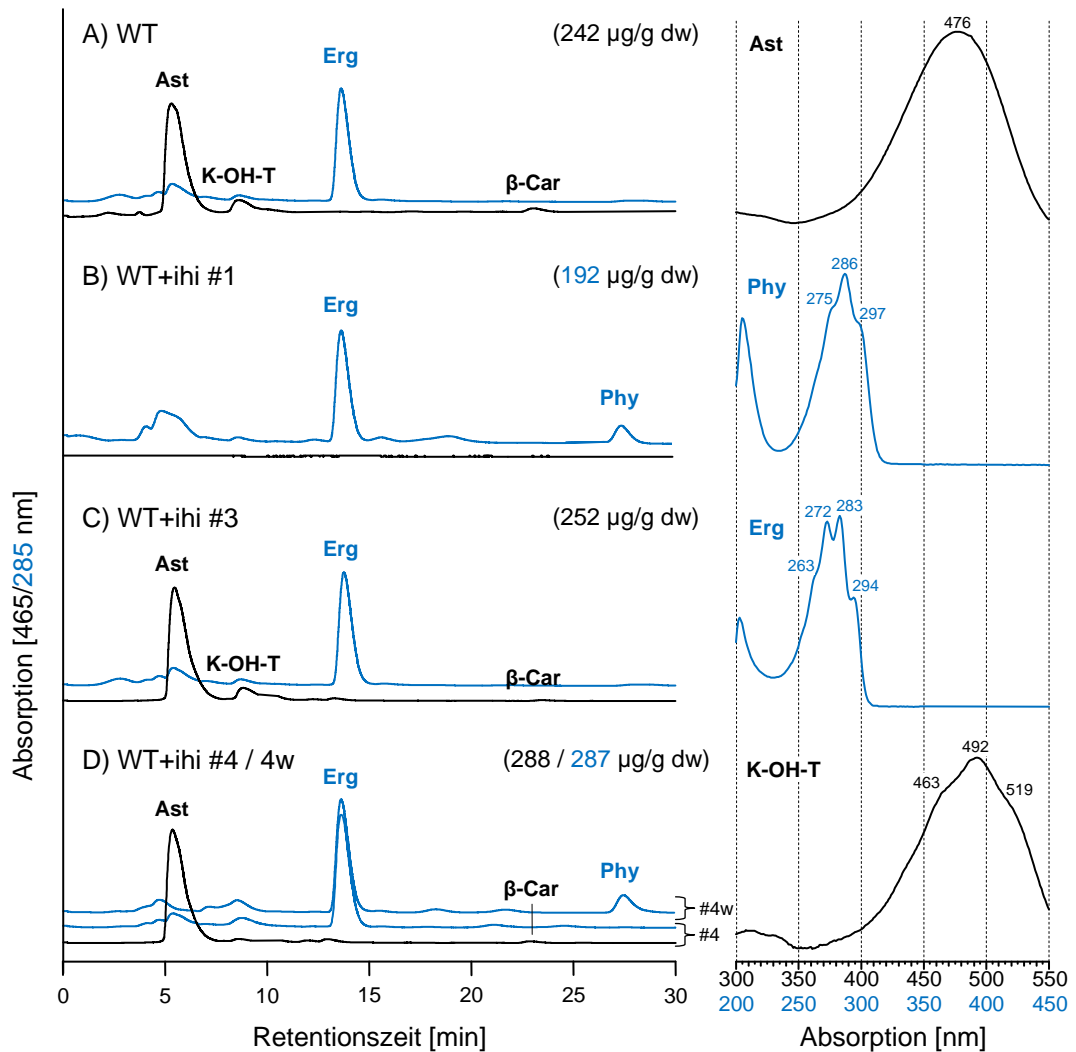


Abbildung 3.5: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung im Wildtyp und den Transformanten WT+ih1 #1, WT+ih1 #3, WT+ih1 #4 und WT+ih1 #4w. Die Extraktion der Carotinoide, die Quantifizierung und die chromatographische Auftrennung mittels HPLC wurden wie in den Abschnitten 2.8 und 2.9 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurde die Absorption bei 465 nm (schwarz) und 285 nm (blau) gemessen. Der Gesamtcarotinoidgehalt aller farbigen Carotinoide (schwarz) und die Phytoenkonzentration (blau) ist in Klammern angegeben. Carotinoide: Astaxanthin (Ast), 3-Hydroxy-4-ketotorulin (K-OH-T), β-Carotin (β-Car), Phytoen (Phy). Zusätzlich wurde das Lipid Ergosterol (Erg) nachgewiesen.

Nach der Auswertung dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob eine Überführung der intermediären Transformante WT+ih1 #4 zum roten Phänotyp des Wildtyps ebenfalls möglich ist. Hierzu wurde die Stabilität der Transformante erneut untersucht, die Zellen aber nun im Gegensatz zu den vorherigen Kultivierungen in Abwesenheit von Hygromycin kultiviert (Abbildung 3.6).

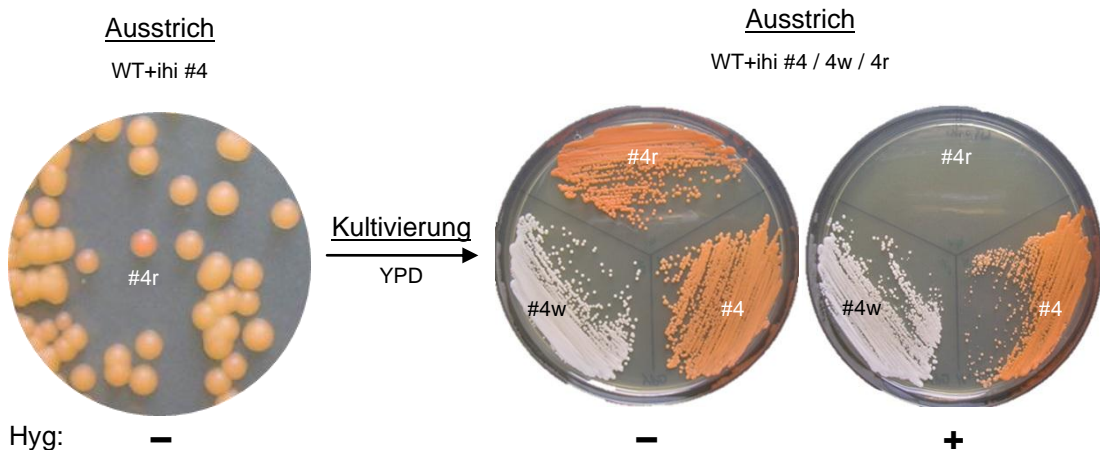


Abbildung 3.6: Selektion der Subtransformante WT+ihi #4r und Bestimmung des Wachstumsverhaltens auf YPD-Festmedium mit (+) und ohne (-) Hygromycin. Die Zellen der Transformante WT+ihi #4 wurden in YPD-Flüssigmedium kultiviert und die Zellsuspension auf YPD-Festmedium vereinzelt (links). Anschließend wurde die Kolonie der Subtransformante WT+ihi #4r anhand ihrer roten Farbe ausgewählt, in Flüssigmedium kultiviert und die Zellsuspension auf Hygromycin-freien (-) und Hygromycin-haltigen (+) Festmedium ausgestrichen (rechts). Zum Vergleich wurden ebenfalls Zellen der Transformante WT+ihi #4 und der Subtransformante WT+ihi #4w ausgestrichen.

Nach Ausstrich auf YPD-Festmedium wurde zwischen den orangenen Zellen einzelne (0,3 %) rote Kolonien sichtbar, von denen eine als Subtransformante WT+ihi #4r bezeichnet wurde und nur zum Wachstum auf Hygromycin-freiem Festmedium fähig war, was auf den Verlust der Hygromycin-Resistenz hindeutete. Im Vergleich dazu konnten für die Transformante WT+ihi #4 und dessen Subtransformante #4w Wachstum unter beiden Bedingungen festgestellt werden. Eine Carotinoidanalyse der Subtransformante WT+ihi #4r offenbarte eine Carotinoidzusammensetzung, die der des Wildtyps entsprach (nicht dargestellt).

Durch die durchgeführten Subkultivierungen und den Erhalt der beiden Subtransformanten WT+ihi #4r und WT+ihi #4w konnte daher gezeigt werden, dass die Zellen der Transformante WT+ihi #4 einen instabilen intermediären Phänotyp besaßen und mit einer Rate von 0,3 % entweder zum Phänotyp des Wildtyps revertierten oder den weißen Phytoen-produzierenden Phänotyp annahmen. Dieses Verhalten lässt eine heterozygote Ausprägung der *ihi*-Integration vermuten, die in einen homozygoten Zustand durch Verlust oder Verdopplung des *ihi*-Alles wechseln kann.

PCR-Nachweis der *ihi*-Integration

Um den Nachweis über die Existenz beider Allele (intaktes *crtI*- und integriertes *ihi*-Allel) zu führen, wurde in einem nächsten Schritt die genomische DNA aus den

Zellen extrahiert und das Gen *crtl* mit den Oligonukleotid-Primern *crtl_Up_fw* und *crtl_Down_rv* amplifiziert (Abbildung 3.7 A).

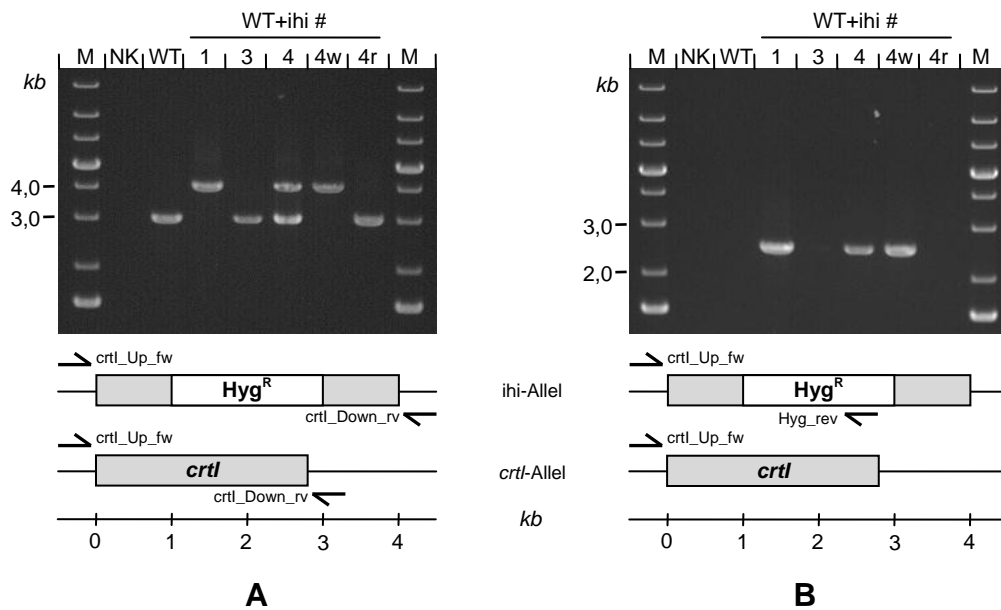


Abbildung 3.7: PCR-Nachweis der genomischen Integration des ihi-Konstrukts nach Transformation mit dem Wildtyp. Die PCR-Experimente und die elektrophoretische Auftrennung wurden wie in den Abschnitten 2.7.16 und 2.7.4 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden Oligonukleotid-Primer verwendet, die 82 bp vor und 61 bp hinter dem Gen *crtI* (A) bzw. im Gen der integrierten Hygromycin-Resistenzkassette *Hyg^R* (B) binden. Die Abbildungen zeigen die Bindestellen, aus deren Abstand die Größe des erwarteten DNA-Fragments in Kilobasen (kb) abgelesen werden kann. Zur Kontrolle wurde für je eine Reaktion ddH₂O (NK) als DNA-Matrize verwendet. Als DNA-Größenmarker (M) wurde die 1 kb Plus DNA Ladder aufgetragen.

Mit ihnen wurde ein Fragment von 3 kb Länge amplifiziert, wobei sich nach Integration des *ih*i-Konstrukts die Fragmentlänge auf 4,2 kb erhöhte. Nach Amplifikation mit genomischer DNA des Wildtyps war die 3kb-Bande erkennbar, die das intakte *crtI*-Gen anzeigt. Gleiches galt für die Transformante WT+*ih*i #3, die phänotypisch dem Wildtyp entspricht. Für die weiße Transformante WT+*ih*i #1 war hingegen die 4,2kb-Bande sichtbar, die auf die Integration des *ih*i-Konstrukts in das *crtI*-Gen zurückzuführen war. Interessanterweise wurden für die intermediäre Transformante WT+*ih*i #4 beide DNA-Banden sichtbar. Diese Beobachtung bestätigten das Vorhandensein von zwei Allelen des *crtI*-Genlocus, die sich als 3 kb große Bande des intakten *crtI*-Allels und als 4,2 kb große Bande des *ih*i-Allels amplifizieren ließen. Für die weißen und roten Subtransformanten WT+*ih*i #4w und WT+*ih*i #4r wurde das Fehlen einer dieser Allele festgestellt.

Um die Vergrößerung des Genlocus eindeutig auf die Integration des *ih*i-Konstrukts zurückzuführen, wurde für einen weiteren PCR-Versuch der zweite Oligonukleotid-Primer durch *Hyg_rev* ersetzt (Abbildung 3.7 B). Dieser bindet im *hph*-Gen der

Hygromycin-Resistenzkassette Hyg^R und führt zur Amplifikation eines 2,5 kb großen DNA-Fragments. Die genomische Integration des *ihi*-Konstrukts konnte bei den Transformanten WT+*ihi* #1, WT+*ihi* #4 und WT+*ihi* #4w durch das Auftreten der 2,5kb-Bande nachgewiesen werden, während beim Wildtyp und den Transformanten WT+*ihi* #3 und WT+*ihi* #4r keine Bande beobachtet werden konnte. Neben der Verifikation der *ihi*-Integration bestätigte sich dadurch der Befund, dass es zu keiner Aufnahme des *ihi*-Konstrukts in die Transformante WT+*ihi* #3 und es zu einem Verlust des Konstrukts im Genom der Subtransformante WT+*ihi* #4r gekommen war.

Als Ergebnis der Arbeiten zur Inaktivierung der Phytoen-Desaturase im Wildtyp konnte die Generierung der Transformante WT+*ihi* #1 festgehalten werden, die im Folgenden als Deletionsstamm **WTΔ*crtI*** bezeichnet wird und für die anstehenden Arbeiten zur genomischen Integration von Carotinoidgenen verwendet wurde. Außerdem wurde eine zweite Phytoen-akkumulierende Mutante (WT+*ihi* #4w) erfolgreich mit der Subkultivierungsmethode (Kultivierung und Ausstrich) aus einer intermediären Transformante generiert. Darüber hinaus konnte durch den Nachweis von zwei *crtI*-Allelen auf die Existenz eines diploiden Genoms geschlossen werden.

3.2.1.2 Knock-Out des Phytoen-Desaturase-Gens (*crtI*) in AXG-13

Nachdem die Transformation des Wildtyps mit dem *ihi*-Konstrukt zur Generierung Phytoen-akkumulierender Mutanten führte und aufschlussreiche Informationen über die genomische Organisation erhalten wurden, wurde im Folgenden die Transformation mit dem Stamm AXG-13 durchgeführt. Dieser besitzt einen 16-fach höheren Gesamtcarotinoidgehalt (Abbildung 3.1 B, S. 42), weshalb nach Inaktivierung des *crtI*-Gens eine hohe Phytoenkonzentration erwartet wurde.

Transformation mit dem *ihi*-Konstrukt und Generierung des Deletionsstamms

Nach Durchführung der Transformation von AXG-13 konnte eine erheblich geringere Transformationseffizienz im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Lediglich eine blasse orange Kolonie konnte von den Transformationsplatten erhalten werden. Die Transformante (AXG-13+*ihi* #1) wurde zunächst in Hygromycin-haltigem YPD-Flüssigmedium kultiviert und die Zellsuspension als Tropfen auf YPD-Festmedium gegeben, um nach weiterer Kultivierung eine genauere Beurteilung der Farbe zu ermöglichen (Abbildung 3.8).

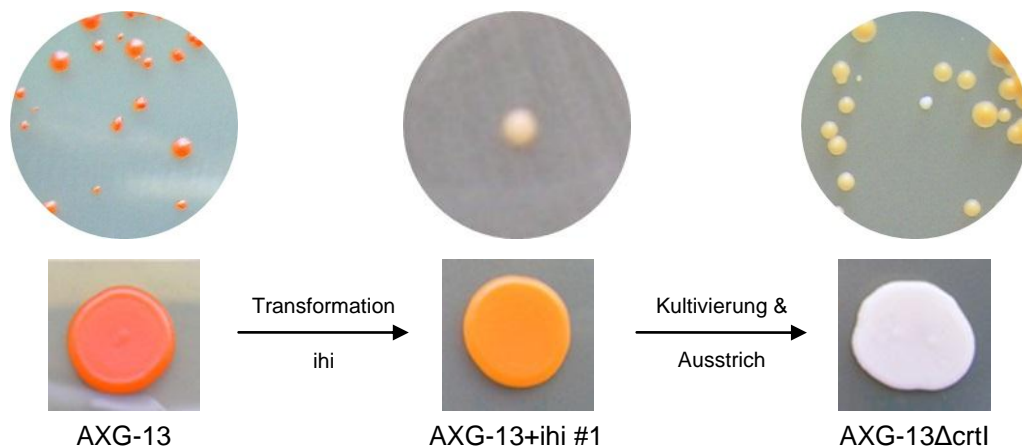


Abbildung 3.8: Generierung des Deletionsstamms AXG-13 Δ crtl nach Transformation mit dem ihi-Konstrukt und Subkultivierung. Die Zellsuspensionen wurden auf YPD-Festmedium ausgestrichen (oben) oder 10 μ l als Tropfen aufgegeben (unten). Die Transformation der Zellen wurde wie in Abschnitt 2.7.13 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die einzige Kolonie (AXG-13+ihi #1) in Hygromycin-haltigem Flüssigmedium kultiviert und ausgestrichen. Daraufhin konnte der Stamm AXG-13 Δ crtl erhalten werden.

Die Transformante AXG-13+ihi #1 zeigte im Vergleich zum Ausgangsstamm AXG-13 eine intensive orange Färbung. Aufgrund des intermediären Phänotyps und der erworbenen Hygromycin-Resistenz wurde eine heterozygote ihi-Integration in Analogie zur Wildtyp-Transformante WT+ihi #4 vermutet. Folglich konnte daraufhin der fehlende Deletionsstamm **AXG-13 Δ crtl** durch die beschriebene Methode der Subkultivierung generiert werden. Anschließend wurde die Akkumulation von Phytoen in beiden Stämmen nachgewiesen, wobei der Gehalt in der intermediären Transformante aufgrund des Auftretens farbiger Carotinoide noch gering war (Abbildung 3.9).

Im Chromatogramm des Ausgangsstamms AXG-13 wurden bei 465 nm neben dem Elutionsgipfel des Hauptcarotinoids Astaxanthin (75 %) weitere Elutionsgipfel von 3-Hydroxy-4-ketotorulin (12 %), 3-Hydroxyechinenon (5,2 %) Lycopin (5,1 %) und β -Carotin (2,3 %) deutlich. Im Chromatogramm der Transformante AXG-13+ihi #1 waren die Elutionsgipfel von 3-Hydroxy-4-ketotorulin (12 %), 3-Hydroxyechinenon (13 %) und β -Carotin (11 %) merklich vergrößert, während der Astaxanthingehalt auf 63 % sank und Lycopin nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich verringerte sich der Gehalt der farbigen Carotinoide von 4069 auf 3731 μ g/g dw, während im UV-Bereich die Elution von Phytoen (510 μ g/g dw) sichtbar wurde. Im Extrakt des Deletionsstamms AXG-13 Δ crtl waren keine farbigen Carotinoide vorhanden, in dem eine drastische Erhöhung der Phytoenkonzentration auf 3704 μ g/g dw registriert wurde, die annähernd die Höhe des Gesamtcarotinoidgehalts des Ausgangsstamms erreichte.

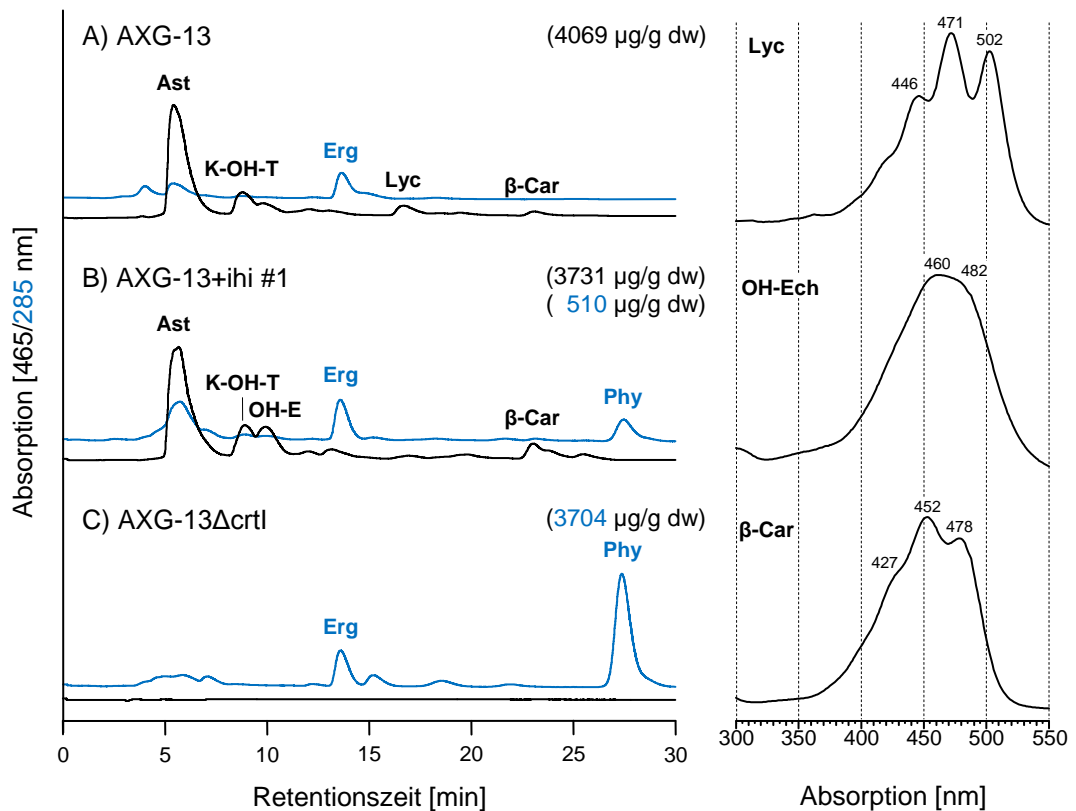


Abbildung 3.9: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung in AXG-13, der Transformante AXG-13+ihi #1 und dem Deletionsstamm AXG-13Δcrtl. Die Extraktion der Carotinoide, die Quantifizierung und die chromatographische Auftrennung mittels HPLC wurden wie in den Abschnitten 2.8 und 2.9 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurde die Absorption bei 465 nm (schwarz) und 285 nm (blau) gemessen. Der Gesamtcarotinoidgehalt aller farbigen Carotinoide (schwarz) und die Phytoenkonzentration (blau) ist in Klammern angegeben. Carotinoide: Astaxanthin (Ast), 3-Hydroxy-4-ketotorulin (K-OH-T), Lycopin (Lyc), β-Carotin (β-Car), 3-Hydroxyechinenon (OH-E), Phytoen (Phy). Zusätzlich wurde das Lipid Ergosterol (Erg) nachgewiesen.

PCR-Nachweis der Genomintegration

Für den Nachweis der genomischen Integration wurden erneut die Primer *crtl_Up_fw* und *crtl_Down_rv* verwendet (Abbildung 3.10 A). Hierbei wurde die erfolgreiche Generierung des Deletionsstamms AXG-13Δcrtl bestätigt, da er wie der Stamm WTΔcrtl nur die 4,2 kb-DNA-Bande des *ihi*-Allels aufwies, während mit genomischer DNA der intermediären Transformante AXG-13+ihi #1 die Amplifikation beider Allele (*ihi*- und *crtl*-) erreicht wurde. In Übereinstimmung mit diesem Befund, konnte für alle diese Stämme die Integration des *ihi*-Konstrukts nach Verwendung des Primers *Hyg_rev* (Abbildung 3.10 B) durch das Auftreten der 2,5 kb-Bande nachgewiesen werden.

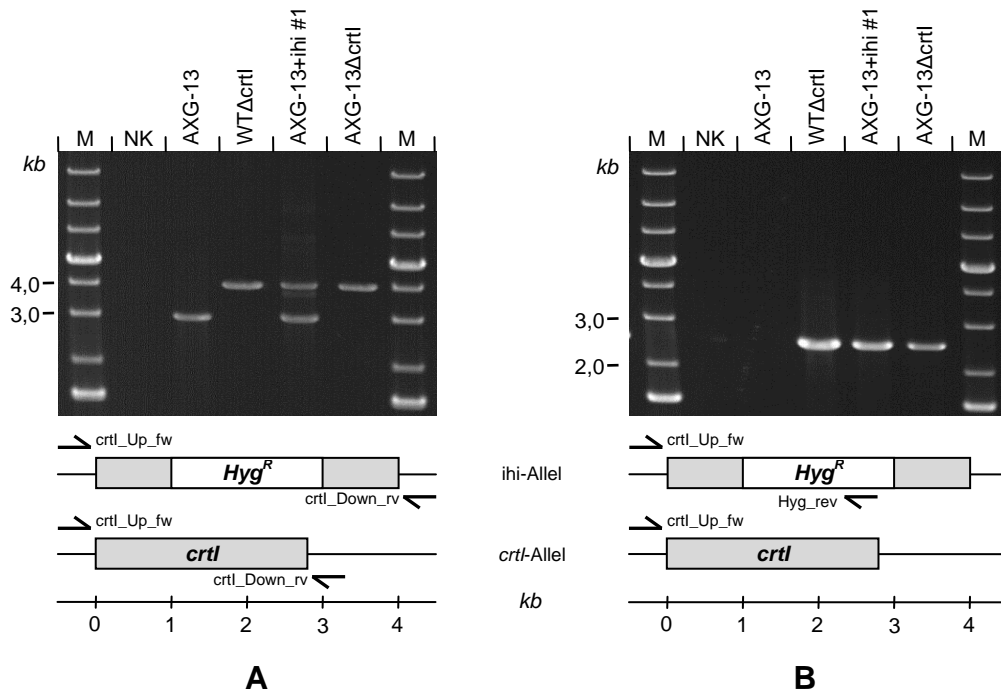


Abbildung 3.10: PCR-Nachweis der genomischen Integration des *ihl*-Konstrukts nach Transformation mit dem Stamm AXG-13. Die PCR-Experimente und die elektrophoretische Auftrennung wurden wie in den Abschnitten 2.7.16 und 2.7.4 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden Oligonukleotid-Primer verwendet, die 82 bp vor und 61 bp hinter dem Gen *crtI* (A) bzw. im Gen der integrierten Hygromycin-Resistenzkassette *Hyg^R* (B) binden. Die Abbildungen zeigen die Bindestellen, aus deren Abstand die Größe des erwarteten DNA-Fragments in Kilobasen (kb) abgelesen werden kann. Zur Kontrolle wurde für je eine Reaktion ddH₂O (NK) als DNA-Matrize verwendet. Als DNA-Größenmarker (M) wurde die 1 kb Plus DNA Ladder aufgetragen.

3.2.2 Genomische Integration der Gene *crtYB*, *HMGR* und *crtE*

Nachdem die Phytoen-akkumulierenden Stämme WTΔ*crtI* und AXG-13Δ*crtI* erfolgreich generiert wurden, sollte der Phytoengehalt durch die genomische Integration zusätzlicher Genkopien der Carotinoidbiosynthese gesteigert werden. Hierzu wurde zunächst der Stamm WTΔ*crtI* als Testsystem verwendet, bevor die Arbeiten mit dem Phytoen-Hochproduzent AXG-13Δ*crtI* begonnen wurden.

3.2.2.1 Integration in WTΔ*crtI*

Zur Integration des Gens *crtYB* sowie der Gene *HMGR* und *crtE* wurden Transformationsvektoren basierend auf dem Vektor pPR2TN (vergl. Abbildung 1.6 A, S.13) verwendet. Die Gene *HMGR* und *crtE* codieren für die Enzyme HMG-CoA-Reduktase und GGPP-Synthase, die die Synthese von Vorläufermolekülen der Carotinoidbiosynthese katalysieren (Breitenbach et al., 2011; Verwaal et al., 2007). Das Gen *crtYB* codiert für ein bifunktionelles Enzym, das die Bildung von Phytoen durch die Kondensation von zwei GGPP-Molekülen katalysiert (Verdoes et al.,

1999a). Daher war von der genomischen Integration zusätzlicher Genkopien in den Stamm $WT\Delta crtI$ eine Steigerung der Phytoenkonzentration zu erwarten.

Nach Transformation der Zellen mit dem Vektor pPR13FYB wurden 12 Kolonien in Geneticin-haltigem YM-Flüssigmedium kultiviert und der Phytoengehalt bestimmt. Die Transformante mit dem höchsten Phytoengehalt wurde für die weitere Verwendung ausgewählt und als Stamm $WT\Delta crtI-(YB)_2$ bezeichnet. Mittels quantitativer Real-Time-PCR (Abschnitt 2.7.17) wurde die Anzahl zusätzlicher Genkopien bestimmt. Hierzu wurden 111 bis 190 bp große DNA-Sequenzen der integrierten Gene aus genomischer DNA amplifiziert und als Referenz das Gen *act* verwendet. In einem nächsten Schritt wurden die Zellen des erhaltenen Stamms für die Transformation mit dem Vektor pPR2TNo_HMG_crtE eingesetzt, wobei der erhaltene Stamm $WT\Delta crtI-(YB)_2-HMG-E$ den höchsten Phytoengehalt aufwies.

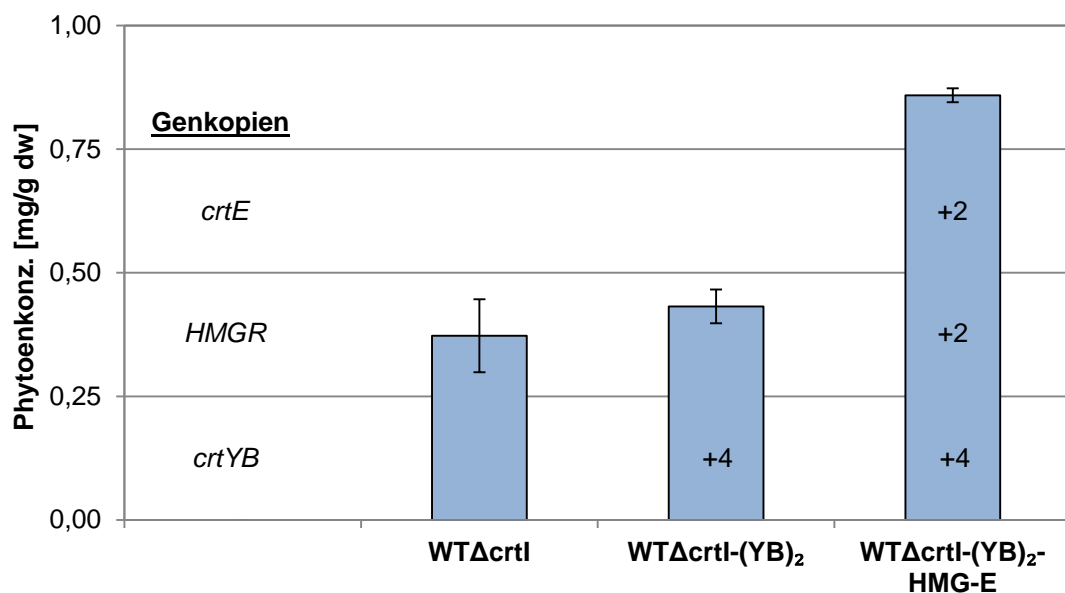


Abbildung 3.11: Steigerung der Phytoenkonzentration des Stamms $WT\Delta crtI$ durch die Integration zusätzlicher Kopien der Gene *crtYB*, *HMGR* und *crtE*. Die Extraktion der Carotinoide und die Bestimmung der Phytoenkonzentration mittels HPLC wurde wie in den Abschnitten 2.8.2 und 2.10.3 beschrieben durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte sind unter Angabe der Standardabweichung (n=3) dargestellt. Die Bestimmung der Genkopienzahl erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR (Abschnitt 2.7.17), wobei die Anzahl der zusätzlichen Genkopien innerhalb der Balken dargestellt wird.

Abbildung 3.11 zeigt die Steigerung der Phytoenkonzentration in den erhaltenen Stämmen, wobei die Anzahl der zusätzlichen Genkopien innerhalb der Balken dargestellt wird. Die Phytoengehalt des Stamms $WT\Delta crtI$ betrug 373 $\mu\text{g/g dw}$. Hierbei war die hohe Standardabweichung von $\pm 74 \mu\text{g/g dw}$ auffällig, die einer Abweichung von 20 % um den Mittelwert entsprach. Nach Integration von vier Kopien des *crtYB*-Gens stieg die Phytoenkonzentration leicht auf 432 $\mu\text{g/g dw}$, während sie sich von

diesem Niveau nach Integration von je zwei Kopien der Gene *HMGR* und *crtE* auf 859 µg/g dw nahezu verdoppelte. Im Vergleich zum Stamm WTΔcrtI konnte somit der Phytoengehalt durch Integration zusätzlicher Genkopien um den Faktor 2,3 gesteigert werden.

3.2.2.2 Integration in AXG-13ΔcrtI

Nachdem die genomische Integration der Carotinoidbiosynthesegene in den Stamm WTΔcrtI zu einer deutlichen Steigerung des Phytoengehalts führten, wurde die gleiche Strategie für den Phytoen-Hochproduzenten AXG-13ΔcrtI angewendet. Abbildung 3.12 stellt die Phytoenkonzentration und die Genkopienzahl des Deletionsstamms AXG13ΔcrtI, des nach Integration des Gens *crtYB* erhaltenen Stamms **AXG-13ΔcrtI-(YB)₂** und des nach weiterer Integration der Gene *HMGR* und *crtE* erhaltenen Stamms **AXG-13ΔcrtI-(YB)₂-HMG-E** dar.

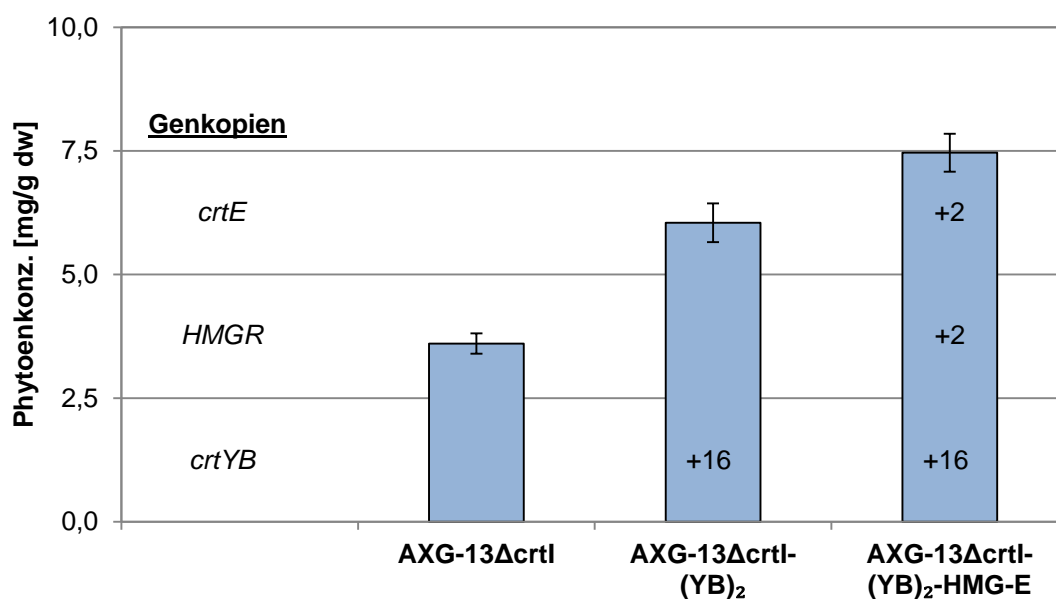


Abbildung 3.12: Steigerung der Phytoenkonzentration des Stamms AXG-13ΔcrtI durch die Integration zusätzlicher Kopien der Gene *crtYB*, *HMGR* und *crtE*. Die Extraktion der Carotinoide und die Bestimmung der Phytoenkonzentration wurde wie in den Abschnitten 2.8.2 und 2.10.3 beschrieben durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte sind unter Angabe der Standardabweichung (n=3) dargestellt. Die Bestimmung der Genkopienzahl erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR (Abschnitt 2.7.17), wobei die Anzahl der zusätzlichen Genkopien innerhalb der Balken dargestellt wird.

Der Stamm AXG-13ΔcrtI akkumulierte 3,6 mg/g dw Phytoen, dessen Gehalt im Stamm AXG-13ΔcrtI-(YB)₂ auf 6,0 mg/g dw durch die Integration von 16 Kopien des Gens *crtYB* gesteigert wurde. Im Vergleich zu dem in der vorherigen Abbildung dargestellten Stamm WTΔcrtI-(YB)₂ wurden hierbei deutlich mehr Kopien integriert. Durch die Integration von je zwei Kopien der Gene *HMGR* und *crtE* konnte im Stamm AXG-13ΔcrtI-(YB)₂-HMG-E eine Phytoenkonzentration von 7,5 mg/g dw und

somit eine Verdopplung des Phytoengehalts im Vergleich zum Stamm AXG-13 Δ ctrl erreicht werden.

3.3 Genetische Modifikationen zur Biosynthese von Zeaxanthin

Die Arbeiten zur Biosynthese von Zeaxanthin sind in vier aufeinanderfolgende Abschnitte unterteilt. Zuerst wurden β -Carotin-akkumulierende Mutanten des Wildtyps und von AXG-13 generiert. Nach Klonierung des codon-optimierten β -3,3'-Hydroxylase-Gens *crtZ_{oxd}* konnte dieses in das Genom des Ausgangsstamms PR1-104-(YB)₂-HMG-E und des erhaltenen Deletionsstamms AXG-13 Δ asy integriert werden. Als letztes wurde das Gen *crtZ_{oxd}* in das Astaxanthin-Synthase-Gen (*asy*) des Wildtyps integriert.

3.3.1 Generierung β -Carotin-akkumulierender Mutanten

Zur Inaktivierung des Astaxanthin-Synthase-Gens *asy* in *X. dendrorhous* wurde – wie schon bei der genetischen Modifikation zur Biosynthese von Phytoen – der Wildtyp als Testsystem verwendet und die Arbeiten in der gleichen Weise unter Verwendung eines neuen Knock-Out-Konstrukts durchgeführt.

3.3.1.1 Knock-Out des Astaxanthin-Synthase-Gens (*asy*) im Wildtyp

Das Gen *asy* codiert für die Astaxanthin-Synthase, die die Einführung von zwei Hydroxy- und zwei Ketogruppen an die β -Iononringe von β -Carotin katalysiert (Ojima et al., 2006). Nach Inaktivierung war daher die Akkumulation des Substrats β -Carotin zu erwarten. Zur Durchführung des *asy*-Knock-Outs wurde das *aha*-Konstrukt verwendet, das homologe Sequenzen des *asy*-Gens und eine Hygromycin-Resistenzkassette besitzt (vergl. Abbildung 1.6 B, S.13). Auch dieses Konstrukt wurde mittels Fusions-PCR innerhalb der Arbeitsgruppe amplifiziert, in das Plasmid pMon38201 kloniert und für die weitere Verwendung in dieser Arbeit übergeben. Anschließend konnte das *aha*-Konstrukt mit Hilfe des Restriktionsenzym *HindIII* aus dem Plasmid pMon-*aha* herausgeschnitten werden. Nach Transformation mit Zellen des Wildtyps konnte eine erfolgreiche Inaktivierung der Astaxanthin-Synthase durch eine gelbe Zellfärbung aufgrund einer Akkumulation des Substrats β -Carotin überprüft werden.

Transformation mit dem aha-Konstrukt und Generierung des Deletionsstamms

Nach Durchführung der Transformation erschienen auf Hygromycin-haltigen Selektionsplatten lediglich mehrere orange, aber keine gelben Kolonien. Folglich war es notwendig, durch Subkultivierung der intermediären Transformanten den gelben Deletionsstamm **WTΔasy** zu erhalten (Abbildung 3.13).

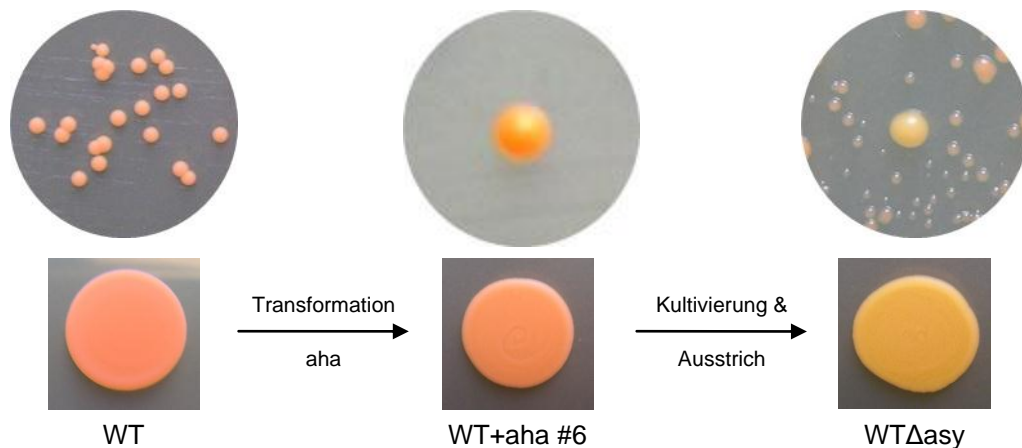


Abbildung 3.13: Generierung des Deletionsstamms WTΔasy nach Transformation mit dem aha-Konstrukt und Subkultivierung. Die Zellsuspensionen wurden auf YPD-Festmedium ausgestrichen (oben) oder 10 µl als Tropfen aufgegeben (unten). Die Transformation der Zellen wurde wie in Abschnitt 2.7.13 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde eine Kolonie anhand ihrer orangenen Farbe ausgewählt (WT+aha #6), in Hygromycin-haltigem Flüssigmedium kultiviert und ausgestrichen. Daraufhin konnte der gelbe Deletionsstamm WTΔasy erhalten werden.

Die vollständige Inaktivierung der Astaxanthin-Synthase im Stamm WTΔasy wurde im Anschluss mittels HPLC bestätigt, da anders als im Wildtyp und in der Transformante WT+aha #6 Astaxanthin oder dessen Vorstufen nicht nachgewiesen wurden und dagegen β-Carotin akkumulierte (Abbildung 3.14).

Nach der genomischen Integration des aha-Konstrukts in den Wildtyp kam es zu erheblichen Veränderungen der Carotinoidzusammensetzung in der erhaltenen Transformante WT+aha #6. Während der Astaxanthingehalt von 212 auf 27,4 µg/g dw fiel, akkumulierten die Intermediate der Astaxanthinsynthese Adonirubin (7,3 %), 3-Hydroxyechinenon (12 %) und Echinenon (15,2 %). Zudem wurde zusätzlich zum Elutionsgipfel von 3-Hydroxy-4-ketotorulin (6,0 %) nach 19,5 min Torulin von der Säule eluiert. Daneben fiel die drastische Erhöhung der β-Carotinkonzentration von 5,9 auf 104 µg/g dw ins Auge, die zusammen mit den anderen Beobachtungen auf eine reduzierte Hydroxylase-Aktivität der Astaxanthin-Synthase hinwies. Im Deletionsstamm WTΔasy, in dem β-Carotin (*all-trans* und *cis*-Isomer) mit 95 % der Chromatogrammfläche (222 µg/g dw) das Hauptcarotinoid bildete, wurden keine der

genannten Intermediate nachgewiesen. Das *cis*-Isomer wurde nach 25,7 min durch das Auftreten einer zusätzlichen spektralen Absorptionsbande bei 339 nm und die um 7 nm verschobenen Absorptionsmaxima identifiziert.

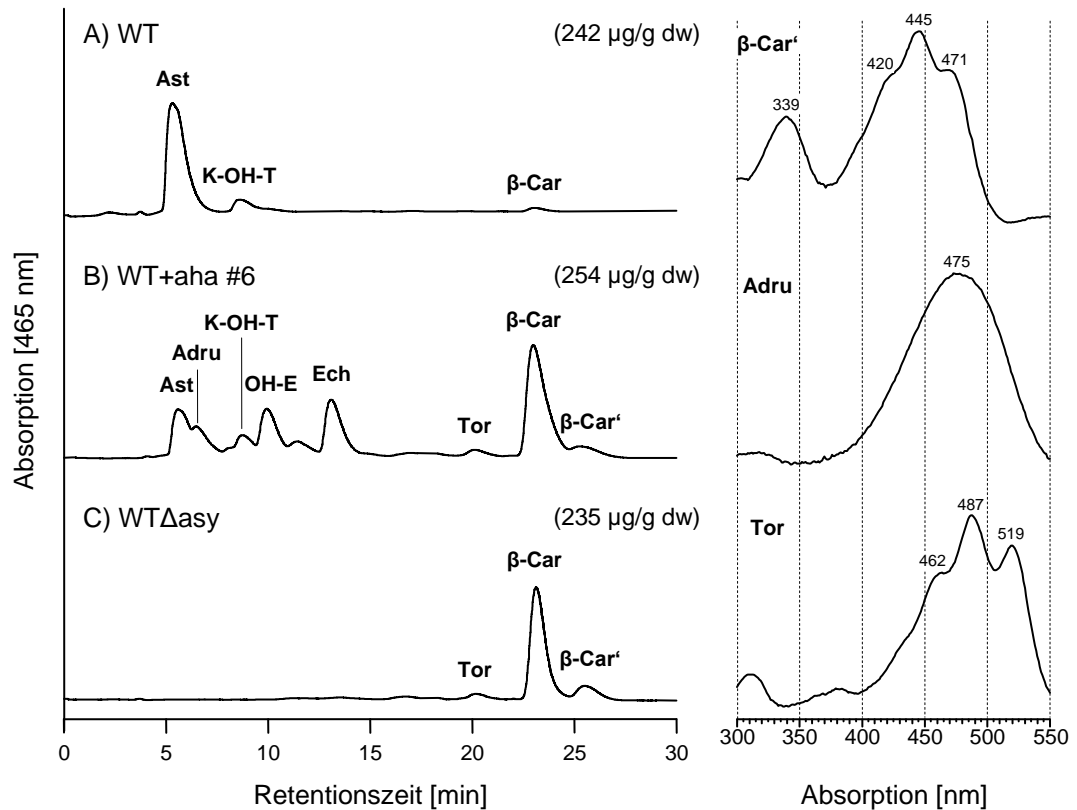


Abbildung 3.14: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung im Wildtyp, der Transformante WT+aha #6 und dem Deletionsstamm WTΔasy. Die Extraktion der Carotinoide, die Quantifizierung und die chromatographische Auftrennung mittels HPLC wurden wie in den Abschnitten 2.8 und 2.9 beschrieben durchgeführt. Der Gesamtcarotinoidgehalt ist in Klammern angegeben. Carotinoide: Astaxanthin (Ast), Adonirubin (Adu), 3-Hydroxy-4-ketotorulin (K-OH-T), 3-Hydroxyechinenon (OH-E), Echinenon (Ech), Torulin (Tor), β-Carotin (β-Car), *cis*-β-Carotin (β-Car').

PCR-Nachweis der Genomintegration

Die Auswirkung der *aha*-Integration lies auch für das *asy*-Gen die Existenz von zwei Allelen vermuten, die in einem nächsten Schritt mittels PCR nachgewiesen wurden (Abbildung 3.15 A). Zu diesem Zweck wurde mit den Oligonukleotiden *asy_Up_fw* und *asy_Down_rv* ein Fragment von 3,4 kb Länge amplifiziert, das sich nach Integration des *aha*-Konstrukts auf 4,4 kb vergrößerte. Dabei wurden für die intermediäre Transformante WT+aha #6 beide Allele (*aha*- und *asy*-) nachgewiesen, während aus genomischer DNA des Deletionsstamms WTΔ*asy* ausschließlich das *aha*-Allel amplifiziert wurde. Die Existenz des Allels wurde zusätzlich durch Verwendung des Primers *Hyg_rev* und Amplifikation eines 2,6kb-Fragments bestätigt

(Abbildung 3.15 B). Somit konnten in Übereinstimmung mit den beobachteten Phänotypen die Existenz des natürlichen *asy*- und das rekombinante *aha*-Allels in den Genomen der Stämme nachgewiesen und dadurch erneut Hinweise auf ein diploides Genom erhalten werden.

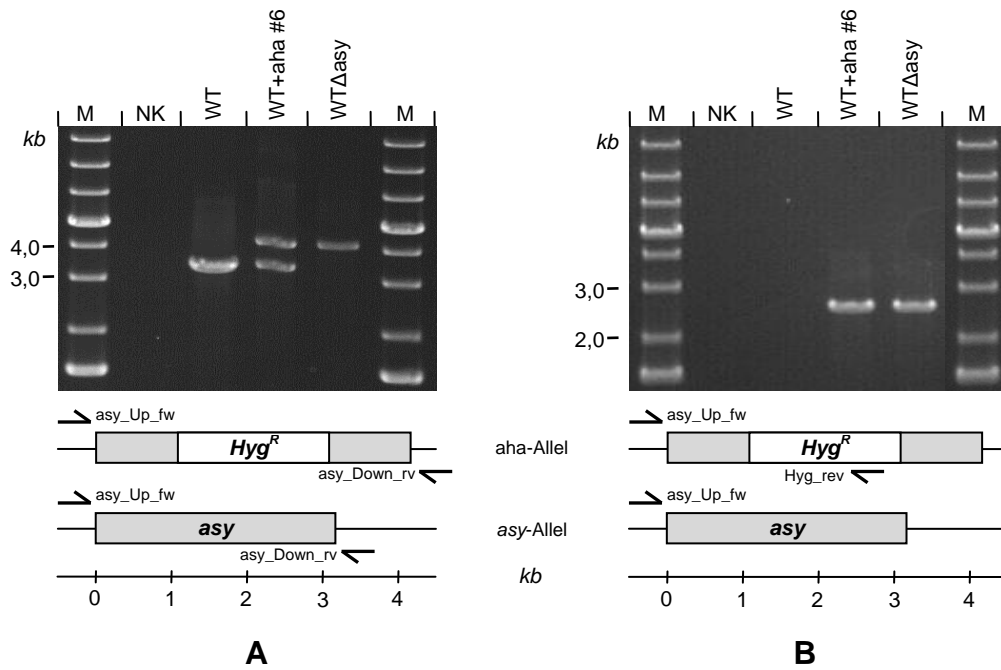


Abbildung 3.15: PCR-Nachweis der genomischen Integration des *aha*-Konstrukts nach Transformation mit dem Wildtyp. Die PCR-Experimente und die elektrophoretische Auftrennung wurden wie in den Abschnitten 2.7.16 und 2.7.4 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden Oligonukleotid-Primer verwendet, die 80 bp vor und 99 bp hinter dem Gen *crtI* (A) bzw. im Gen der integrierten Hygromycin-Resistenzkassette *Hyg^R* (B) binden. Die Abbildungen zeigen die Bindestellen, aus deren Abstand die Größe des erwarteten DNA-Fragments in Kilobasen (kb) abgelesen werden kann. Zur Kontrolle wurde für je eine Reaktion ddH₂O (NK) als DNA-Matrize verwendet. Als DNA-Größenmarker (M) wurde die 1 kb Plus DNA Ladder aufgetragen.

3.3.1.2 Knock-Out des Astaxanthin-Synthase-Gens (*asy*) in AXG-13

Aus den vorangegangenen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass auch das *asy*-Gen in zwei Allelen im Genom von *X. dendrorhous* vorhanden ist. Daher wurde auch für die Generierung des Deletionsstamms AXG-13Δ*asy* die Strategie aus Transformation des Knock-Out-Konstrukts und Subkultivierung der auftretenden intermediären Transformanten angewendet.

Transformation mit dem *aha*-Konstrukt und Generierung des Deletionsstamms

Nach Ausstrich der Transformante AXG-13+*aha* #7 wurde der Deletionsstamm **AXG-13Δ*asy*** generiert, dessen Zellen eine intensive gelbe Färbung aufwiesen (Abbildung 3.16).

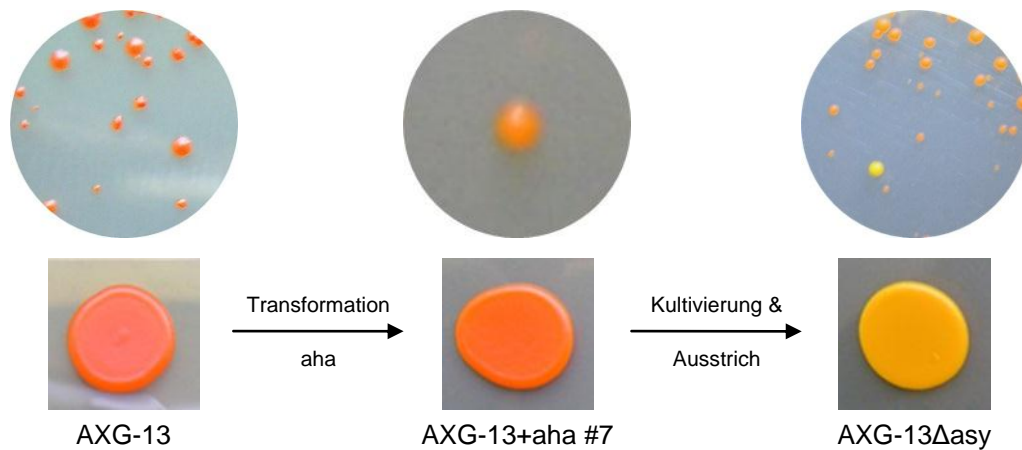


Abbildung 3.16: Generierung des Deletionsstamms AXG-13Δasy nach Transformation mit dem aha-Konstrukt und Subkultivierung. Die Zellsuspensionen wurden auf YPD-Festmedium ausgestrichen (oben) oder 10 µl als Tropfen aufgegeben (unten). Die Transformation der Zellen wurde wie in Abschnitt 2.7.13 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde eine Kolonie anhand ihrer Farbe ausgewählt (AXG-13+aha #7), in Hygromycin-haltigem YPD-Flüssigmedium kultiviert und vereinzelt. Daraufhin konnte der Stamm AXG-13Δasy erhalten werden.

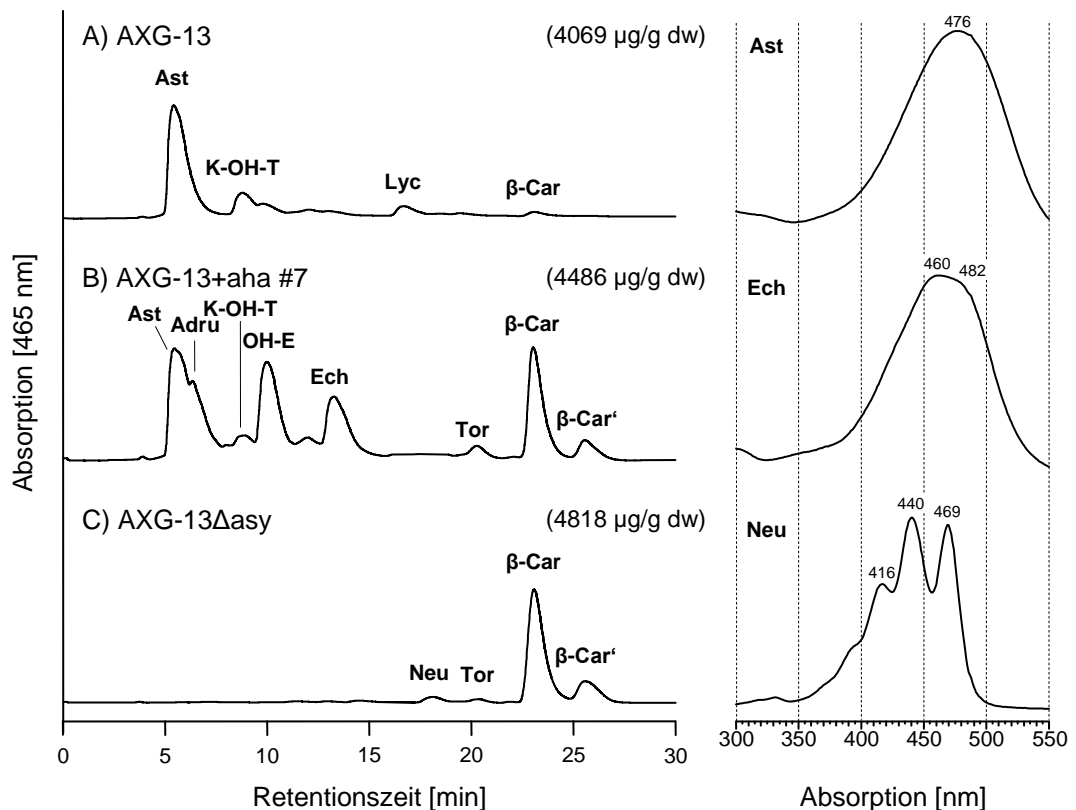


Abbildung 3.17: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung in AXG-13, der Transformante AXG-13+aha #7 und dem Deletionsstamm AXG-13Δasy. Die Extraktion der Carotinoide, die Quantifizierung und die chromatographische Auftrennung mittels HPLC wurden wie in den Abschnitten 2.8 und 2.9 beschrieben durchgeführt. Der Gesamtcarotinoidgehalt ist in Klammern angegeben. Carotinoide: Astaxanthin (Ast), Adonirubin (Adru), 3-Hydroxy-4-ketotorulin (K-OH-T), 3-Hydroxyechinenon (OH-E), Echinenon (Ech), Lycopin (Lyc), Neurosporin (Neu), Torulin (Tor), β-Carotin (β-Car), *cis*-β-Carotin (β-Car').

Die Auswertung der anschließenden HPLC-Analysen (Abbildung 3.17) offenbarte ein ähnliches Bild, das schon nach Inaktivierung der Astaxanthin-Synthase des Wildtyps beobachtet wurde. Im Vergleich zu AXG-13 wurde der β -Carotingehalt durch die reduzierte Astaxanthin-Synthase-Aktivität deutlich von 68,2 auf 960 $\mu\text{g/g dw}$ in der Transformante AXG-13+aha #7 erhöht, während zusätzlich die Intermediate der Astaxanthinbiosynthese Adonirubin (12 %), 3-Hydroxyechinenon (18 %) und Echinenon (14 %) akkumulierten. Im Extrakt des Deletionsstamms AXG-13 Δ asy bildete β -Carotin (all-*trans* und *cis*-Isomer) das Hauptcarotinoid mit einer Konzentration von 4514 $\mu\text{g/g dw}$, wobei in geringen Mengen Torulin und Spuren der β -Carotinvorstufe Neurosporin nachgewiesen wurden.

PCR-Nachweis der Genomintegration

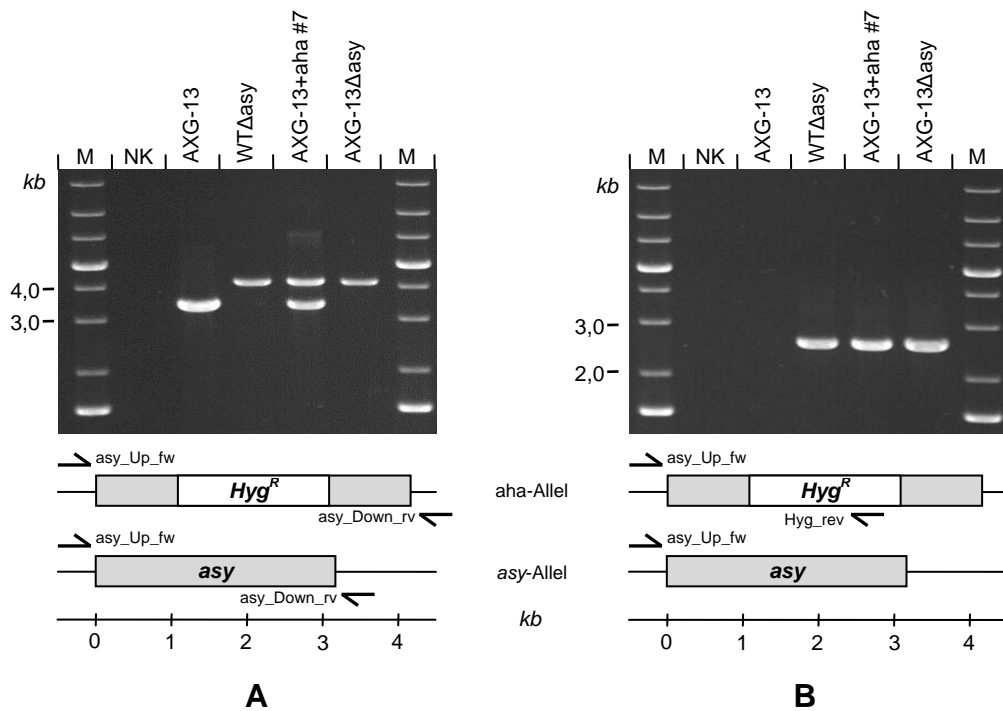


Abbildung 3.18: PCR-Nachweis der genomischen Integration des aha-Konstrukts nach Transformation mit dem Stamm AXG-13. Die PCR-Experimente und die elektrophoretische Auftrennung wurden wie in den Abschnitten 2.7.16 und 2.7.4 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden Oligonukleotid-Primer verwendet, die 80 bp vor und 99 bp hinter dem Gen *ctl* (A) bzw. im Gen der integrierten Hygromycin-Resistenzkassette *Hyg^R* (B) binden. Die Abbildungen zeigen die Bindestellen, aus deren Abstand die Größe des erwarteten DNA-Fragments in Kilobasen (kb) abgelesen werden kann. Zur Kontrolle wurde für je eine Reaktion ddH₂O (NK) als DNA-Matrize verwendet. Als DNA-Größenmarker (M) wurde die 1 kb Plus DNA Ladder aufgetragen.

Durch den Vergleich mit dem Stamm WT Δ asy wurde die Generierung des Deletionsstamms durch Amplifikation des aha-Allels (4,4kb-Bande) verifiziert (Abbildung 3.18). Erwartungsgemäß besaß die intermediäre Transformante AXG-13+aha #7 zusätzlich das natürliche asy-Allel (3,4kb-Bande).

3.3.2 Klonierung einer optimierten Version der β -Carotin-Hydroxylase aus *Brevundimonas* SD 212

Zur Biosynthese von Zeaxanthin wurden die β -Carotin-produzierenden Stämme PR1-104-(YB)₂-HMG-E und AXG-13 Δ asy verwendet, indem eine optimierte Version der β -Carotin-Hydroxylase aus *Brevundimonas* SD212 in das Genom der Stämme integriert wurde. Dieses Proteobakterium synthetisiert Astaxanthin aus β -Carotin durch die Integration je einer Ketogruppe am C4 der β -Iononringe und durch Integration je einer Hydroxygruppe am C3. Im Gegensatz zur Astaxanthin-Synthase Asy in *X. dendrorhous* werden diese Oxygenierungen durch zwei unabhängige Enzyme, der β -4,4'-Ketolase CrtW und der β -3,3'-Hydroxylase CrtZ durchgeführt (Nishida et al., 2005). Ist nur CrtZ aktiv, kommt es zur Bildung von Zeaxanthin. Zur genomischen Integration war es notwendig, das Gen in den Vektor pPR2TNo zu klonieren. Zuvor wurde die Gensequenz an die in *X. dendrorhous* vorherrschende Codon-Usage angepasst, um eine effiziente Translation sicherzustellen.

Codon-Optimierung des crtZ-Gens

Durch die Sequenzierung des CBS6938-Genoms (Sharma et al., 2015) lag die Codon-Usage von 5000 Genen vor, auf deren Grundlage die Gensequenz des crtZ-Gens verändert wurde. Die Sequenz des 486 bp langen Gens besteht aus 162 Codons, die für 20 verschiedene Aminosäuren und ein Stop-Codon codieren. Im Zuge der Codonoptimierung wurden 109 dieser Codons, durch die in *X. dendrorhous* am häufigsten für eine Aminosäure genutzten Codons ersetzt. Beispielweise verwendet der Pilz hauptsächlich das Codon CGA für Arginin, weshalb andere für Arginincodierende Codons (CGT, CGG, CGC) insgesamt 13 Mal ersetzt wurden. Die Sequenzen des Gens crtZ aus *Brevundimonas* SD212 und die der codon-optimierten Variante crtZ_{oXd} (optimiert für *Xanthophyllomyces dendrorhous*) befinden sich im Anhang (S. 132).

Klonierung des Transformationsvektors pPR2TNo_ crtZ_{oXd}

Die Klonierung des Vektors pPR2TNo_ crtZ_{oXd} erfolgte, indem zuerst die crtZ_{oXd} Genkassette erzeugt und diese anschließend in den Vektor pPR2TNo integriert wurde.

In einem ersten Schritt wurde die Synthese des Gens crtZ_{oXd} mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) in Auftrag gegeben und das 2948 bp große Plasmid pEX-A2-crtZ_{oXd} erhalten. Nach Restriktion mit *EcoRI* und *SalI* konnte ein DNA Fragment auf der Höhe von 0,5 kb als das Gen crtZ_{oXd} aus dem Agarosegel isoliert werden (Abbildung 3.19 A).

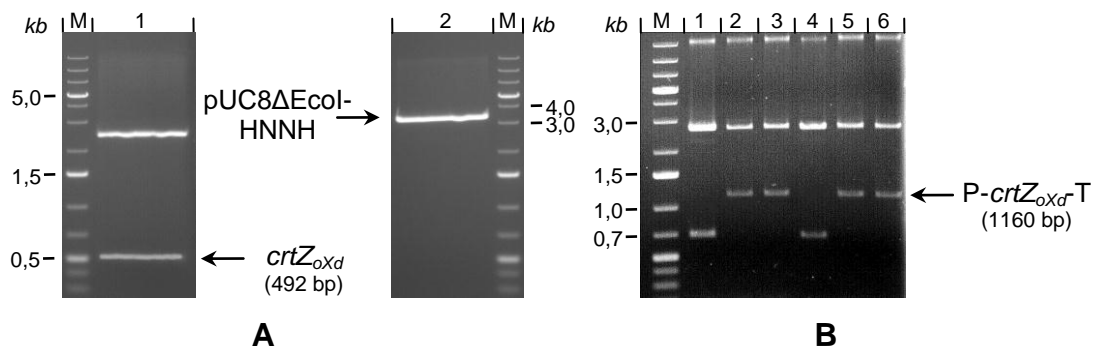


Abbildung 3.19: Klonierung des Plasmids pHNNH2_ crtZ_{oXd}. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben. Das Plasmid pEX-A2-crtZ_{oXd} wurde mit *EcoRI* und *SalI* geschnitten (A1) und das Gen crtZ_{oXd} isoliert. Das Plasmid pUC8ΔEcoRI-HNNH wurde mit *EcoRI* und *XhoI* linearisiert (A2). Nach Ligation beider DNA-Fragmente wurde die erfolgreiche Generierung der Genkassette P-crtZ_{oXd}T durch *NotI*-Restriktion überprüft (B2-B6). Zur Kontrolle wurde pUC8ΔEcoRI-HNNH mit *NotI* geschnitten (B1). Als Größenmarker (M) wurde die 1kb Plus DNA Ladder aufgetragen.

Parallel dazu wurde das Plasmid pUC8ΔEcoRI-HNNH, das die Promotor- und Terminatorsequenzen des Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens (*gpd*) enthält, mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* geschnitten und als 3,4 kb großes DNA-Fragment isoliert. Im Anschluss wurden die beiden Fragmente miteinander ligiert und der Ansatz mit Zellen von *E. coli* DH5α transformiert. Von Ampicillin-haltigem LB-Festmedium wurden fünf Kolonien in LB-Flüssigmedium kultiviert, die Plasmide isoliert und zur Kontrolle mit *NotI* geschnitten. Die Generierung der Genkassette infolge des crtZ_{oXd}-Geneinbaus zwischen die Promotor- und Terminatorsequenzen wurde durch das Auftreten eines 1,2 kb großes DNA-Fragment kontrolliert (Abbildung 3.19 B).

In einem zweiten Schritt wurde das generierte Plasmid pHNNH2_ crtZ_{oXd} und der Vektor pPR2TNo mit *NotI* geschnitten, der linearisierte Vektor und die crtZ_{oXd} Kassette isoliert (Abbildung 3.20 A) und ligiert.

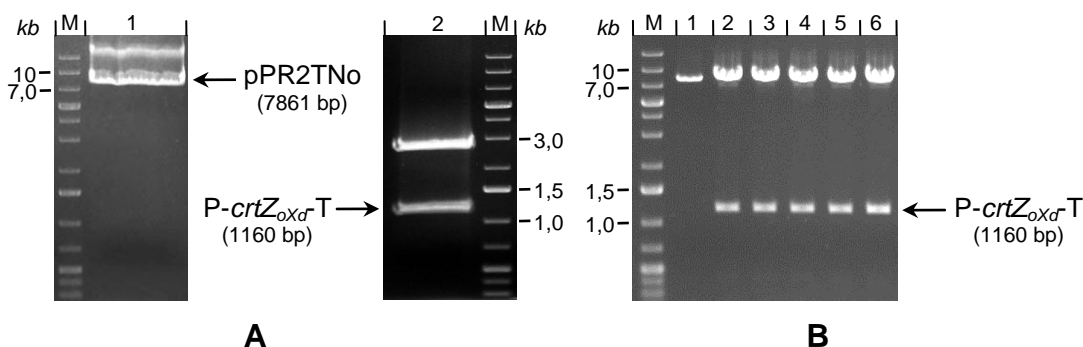


Abbildung 3.20: Klonierung des Transformationsvektors pPR2TNo_ crtZ_{oxd}. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben. Das Plasmide pPR2TNo und pHNNH2_ crtZ_{oxd} wurden mit *NotI* geschnitten und der linearierte Vektor (A1) und die crtZ_{oxd}-Kassette (A2) aus dem Gel isoliert. Nach Ligation beider DNA-Fragmente wurde die erfolgreiche Integration der Genkassette durch *NotI*-Restriktion kontrolliert (B2-B6). Zur Kontrolle wurde pPR2TNo mit *NotI* geschnitten (B1). Als Größenmarker (M) wurde die 1kb Plus DNA Ladder aufgetragen.

Nach Transformation des Ligationsansatzes mit Zellen von *E. coli* DH5 α wurden erneut fünf Kolonien in Ampicillin-haltigem LB-Flüssigmedium kultiviert, die Plasmide isoliert und zur Kontrolle mit *NotI* geschnitten. Das Auftauchen des Vektorrückgrats und der crtZ_{oxd}-Kassette auf einem Agarosegel zeigte die erfolgreiche Konstruktion des Vektors pPR2TNo_ crtZ_{oxd} an (Abbildung 3.20 B).

Abschließend wurde eine Sequenzierung des Vektors mit dem Oligonukleotid-Primer pPRrev, der in unmittelbare Nähe zur *NotI*-Restriktionsschnittstelle bindet, in Auftrag gegeben (Abschnitt 2.7.8). Nach Auswertung der erhaltenen Sequenz konnte keine Mutationen des Gens festgestellt werden, das in tandem-Orientierung zum Nourseothricin-Resistenzgen (*nat1* \rightarrow crtZ_{oxd}) vorlag.

3.3.3 Genomische Integration des Gens crtZ_{oxd}

3.3.3.1 Integration in PR1-104-(YB)₂-HMG-E

Mit Erhalt des Transformationsvektors pPR2TNo_ crtZ_{oxd} wurde im nächsten Schritt die katalytische Aktivität und die Effizienz der β -Carotin-Hydroxylierung im Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E evaluiert. Dieser wurde als Teststamm vor der nachfolgenden Transformation von AXG-13 Δ asy verwendet, da er gute Wachstumseigenschaften und einen erhöhten β -Carotiningehalt (Abbildung 3.1 B, S. 42) besaß.

Nach Transformation der Zellen wurden 20 Kolonien in YPD-Flüssigmedium, das die Antibiotika Geneticin, Hygromycin und Nourseothricin enthielt, kultiviert und die Carotinoide extrahiert. Hierbei wurden erhebliche Unterschiede in der Zeaxanthinkonzentration (2,2 - 71 %) deutlich, wobei die Transformante mit dem höchsten Ge-

halt an Zeaxanthin als Stamm **PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}** für die weiteren Arbeiten verwendet und die Carotinoidzusammensetzung bestimmt wurde (Abbildung 3.21).

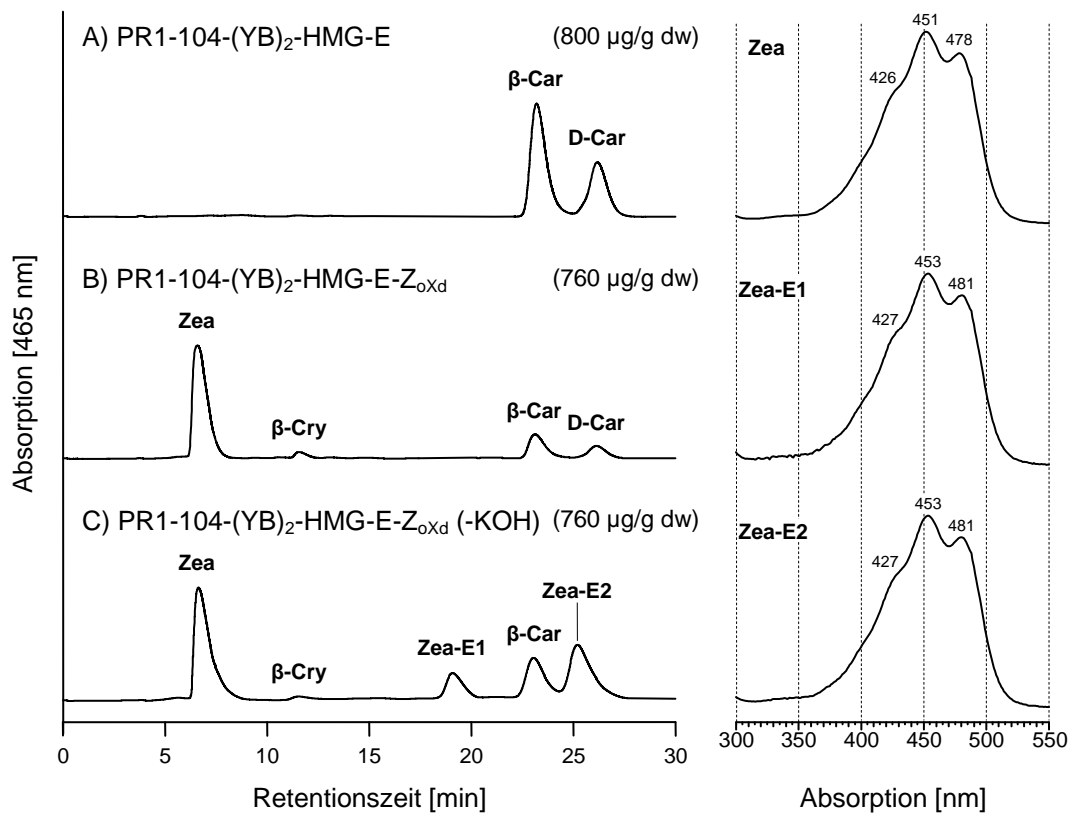


Abbildung 3.21: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung im Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E und PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}. Die Extraktion der Carotinoide, die Quantifizierung und die chromatographische Auftrennung mittels HPLC wurde wie in den Abschnitten 2.8 und 2.9 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Probe ohne die Zugabe von Kaliumhydroxid (-KOH) extrahiert. Der Gesamtcarotinoidgehalt ist in Klammern angegeben. Carotinoide: β -Carotin (β -Car), 7,8-Dihydro- β -Carotin (D-Car), Zeaxanthin (Zea), β -Cryptoxanthin (β -Cry), Zeaxanthin-Fettsäure-Ester (Zea-E1, Zea-E2).

Das Chromatogramm des Ausgangsstamms PR1-104-(YB)₂-HMG-E zeigte lediglich zwei Elutionsgipfel, die β -Carotin (71 %) und 7,8-Dihydro- β -Carotin (29 %) zugeordnet werden konnten. Im Vergleich mit dem Ausgangsstamm fielen im Chromatogramm des Extrakts aus PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd} die zusätzlichen Elutionsgipfel von β -Cryptoxanthin (28 μ g/g dw) und Zeaxanthin (517 μ g/g dw) ins Auge, die auf eine veränderte Carotinoidzusammensetzung nach Integration des Gens *crtZ_{oxd}* hindeuteten, während der Gesamtgehalt an Carotinoiden mit 760 μ g/g dw nahezu unverändert blieb. Entsprechend sanken der Gehalt an β -Carotin und 7,8-Dihydro- β -Carotin auf 131 bzw. 84 μ g/g dw. Wurde die Extraktion ohne die Zugabe von Kaliumhydroxid (KOH) durchgeführt, erschienen zusätzlich zum Elutionsgipfel des freien Zeaxanthins zwei weitere Elutionsgipfel nach 19,1 und 25,2 min, die anhand ihrer erhöhten Retentionszeiten, aber unveränderten Absorptionsspektren, als

Zeaxanthin-Fettsäureester identifiziert wurden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird daher der Gesamtgehalt aus freien und verestertem Zeaxanthin nach Verseifung mit KOH angegeben. Die heterologe Expression der optimierten β -3,3'-Hydroxylase CrtZ_{oxd} führte somit zu einer Bildung von Zeaxanthin, wobei 90 % des im Ausgangsstamm vorhandenen β -Carotins umgesetzt wurde.

3.3.3.2 Integration in AXG-13 Δ asy

Nachdem im Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd} eine hohe Effizienz der Zeaxanthinsynthese festgestellt wurde, sollte nun das Gen crtZ_{oxd} in das Genom des β -Carotin-Hochproduzenten AXG-13 Δ asy integriert werden, um Zeaxanthin aus dem vorhandenen β -Carotinpool zu bilden. Da der β -Carotingehalt des Stamms im Vergleich zum Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E um das 8-fache erhöht war, erschien es notwendig, eine zusätzliche crtZ_{oxd} -Kassette in den Vektor pPR2TNo_ crtZ_{oxd} einzubringen. Dadurch sollte nach genomischer Integration des Duo-Vektors eine höhere Kopienzahl erreicht werden. Hierbei war zu beachten, dass durch die Vergrößerung des DNA-Bereichs und die unmittelbare Nähe zweier Gene die Genexpression vermindert werden kann. Neben negativen Positionseffekten, die durch die Lage zu regulatorischen DNA-Elementen wie Enhancern oder Silencern ausgelöst werden (Chen & Zhang, 2016), kann es zusätzlich zu einer direkten Beeinflussung der beiden Promotoren aufgrund der Konkurrenz um Transkriptionsfaktoren oder topologische Veränderungen während der Transkription (Curtin et al., 2008) kommen. Um den möglichen negativen Einfluss zu untersuchen, wurden drei Vektoren kloniert, die sich hinsichtlich der Lage der zweiten crtZ_{oxd} -Kassette und des verwendeten Promotors unterschieden.

Klonierung verschiedener crtZ_{oxd} -Transformationsvektoren

Die Klonierung des Vektors pPR2TNo_ crtZ_{oxd} wurde bereits in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Er wurde durch Restriktion des Vektors pPR2TNo mit *NofI* und Ligation mit der crtZ_{oxd} -Kassette erhalten. Dieser Vektor wurde nun mit dem Restriktionsenzym *HindIII* linearisiert, um eine weitere Genkassette einzufügen. Abbildung 3.22 zeigt die auf den generierten Vektoren vorhandenen Gene und DNA-Bereiche.

Zur Konstruktion des ersten Duo-Vektors wurde die crtZ_{oxd} -Kassette aus dem Plasmid pHNNH2_ crtZ_{oxd} nach Restriktion mit *HindIII* isoliert und anschließend mit dem Vektor pPR2TNo ligiert, um den Vektor pPR2TNo_(crtZ_{oxd})₂ zu erhalten. Hierbei folgt der Promotor der zweiten Genkassette unmittelbar auf den Terminator der ers-

ten. Die Unversehrtheit des Gens und die tandem-Orientierung ($nat1 \rightarrow crtZ_{oxd} \rightarrow crtZ_{oxd}$) der Genkassette wurde durch Sequenzierung bestätigt.

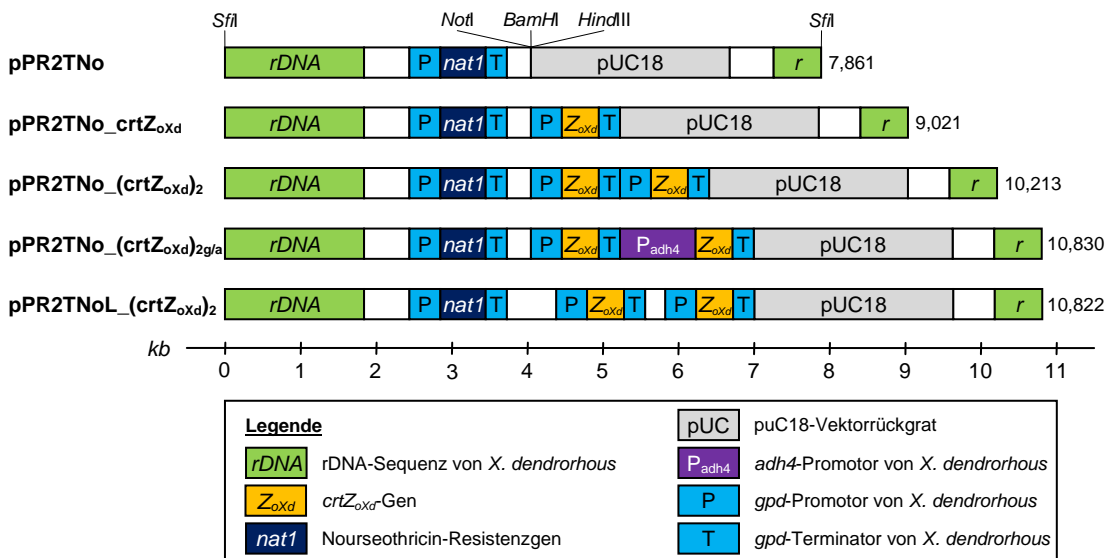


Abbildung 3.22: Plasmidkarten der linearisierten *crtZ_{oxd}* Transformationsplasmide. Im Ausgangsvektor pPR2TNo sind die zur Linearisierung (*Sfi*I) und Klonierung (*Not*I, *Bam*HI, *Hind*III) verwendeten Restriktionsschnittstellen angegeben. Die Größenangaben sind in Kilobasen (kb).

Zur Konstruktion des Vektors pPR2TNo_(*crtZ_{oxd}*)_{2g/a} musste in einem ersten Schritt der Promotor des Gens der Alkohol Dehydrogenase 4 (*adh4*) aus *X. dendrorhous* vor das *crtZ_{oxd}*-Gen im Plasmid pHNNH2_*crtZ_{oxd}* kloniert werden. Hierzu wurden ein 993 bp großes Fragment mit Hilfe der Oligonukleotid-Primer Padh4_fw_NotI und Padh4_rv_EcoRI aus genomischer DNA des Wildtyps amplifiziert, isoliert und mit dem linearisierten Plasmid pMon38201 ligiert. Nach Transformation des Ansatzes mit *E. coli* DH5α konnte das Plasmid pMon_Padh4 aus den Zellen isoliert und nach Restriktion mit *Not*I und *Eco*RI das DNA-Fragment des *adh4*-Promotors erhalten werden. Parallel dazu wurde das Plasmid pHNNH2_*crtZ_{oxd}* zunächst durch Restriktion mit *Eco*RI zwischen dem *gpd*-Promotor und dem *crtZ_{oxd}*-Gen linearisiert und anschließend durch partiellen Restriktionsverdau mit *Not*I der Promotorbereich vom Vektorrückgrat getrennt. Das 3472 bp große DNA-Fragment des Vektorrückgrats wurde isoliert und mit dem DNA-Fragment des *adh4*-Promotors ligiert, um das Plasmid pHNNH2_*crtZ_{oxd}*_Padh4 zu erhalten. Daraufhin erfolgte die Konstruktion des Vektors pPR2TNo_(*crtZ_{oxd}*)_{g/a}, indem die *crtZ_{oxd}*-Kassette nach Restriktion mit *Hind*III aus dem Plasmid isoliert und mit dem linearisierten Vektor pPR2TNo_*crtZ_{oxd}* ligiert wurde.

Zur Konstruktion des Vektors pPR2TNoL_(*crtZ_{oxd}*)₂ wurde der Vektor pPR2TNoL verwendet, in dem der Abstand zwischen den Restriktionsschnittstellen vergrößert

wurde. Er wurde innerhalb der Arbeitsgruppe aus dem Vektor pPR2TNo, dessen *NotI*-Schnittstelle zuvor mittels blund-end-Religation entfernt wurde, durch Integration eines 606 bp großen DNA-Bereich des Plasmids pRK404 zwischen den Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Hind*III erzeugt. Da dieser Bereich eine neue *NotI*-Schnittstelle enthält, liegt diese nun 275 bp von der *Hind*III-Schnittstelle entfernt. Daraufhin wurden bereits, wie für die Vektoren pPR2TNo_*crtZ*_{oxd} und pPR2TNo_(*crtZ*_{oxd})₂ beschrieben, zwei Kassetten des Gens *crtZ*_{oxd} nach Restriktion mit *NotI* und *Hind*III integriert. Auf dem erhaltenen Vektor ist die zweite Genkassette durch einen 275 bp großen nichtcodierenden DNA-Bereich von der ersten getrennt.

Transformation in AXG-13 Δ asy und Selektion der Zeaxanthintransformanten

Nach Konstruktion der Duo-Vektoren konnten diese zusammen mit dem Mono-Vektor für die Transformation von AXG-13 Δ asy verwendet werden. Nach der Durchführung wurden von jedem Ansatz bis zu 30 Kolonien in YM-Flüssigmedium kultiviert und die Carotinoide extrahiert. Um den zeitlichen Aufwand im Vergleich zur Analyse aller Transformanten mit Hilfe von HPLC zu verringern, wurden die Carotinoidezusammensetzung der Extrakte zunächst mittels Dünnschichtchromatographie (DC) beurteilt. Dieses Verfahren hatte den Vorteil, dass auf einer DC-Platte gleichzeitig über 20 Extrakte analysiert werden konnten. Hierbei wurden die visuellen Intensitäten der auftretenden gelben Zeaxanthin- und β -Carotinbanden miteinander verglichen, um die Transformanten mit dem höchsten Zeaxanthin/ β -Carotin-Verhältnis für eine eingehendere HPLC-Analyse auszusuchen. Abbildung 3.23 stellt Ausschnitte der dokumentierten DC-Platten dar.

Zur Bestimmung der Retentionsfaktoren (R_f) von Zeaxanthin und β -Carotin wurden zunächst Extrakte von *E.coli*, die auch im Zuge der HPLC-Analysen als Standards verwendet wurden, aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Extrakt aus Zellen des Ausgangsstamms AXG-13 Δ asy zum Vergleich verwendet. Durch das Aufsteigen des Laufmittels wurden die Carotinoide in Richtung der Lauffront bewegt und in Abhängigkeit ihrer Polarität aufgetrennt. So erschien Zeaxanthin als gelber Fleck mit einem R_f -Wert von 0,37, während sich β -Carotin nahe der Lauffront ($R_f = 0,91$) zeigte. Darüber hinaus war ein schwacher Farbfleck mit einem R_f -Wert von 0,65 erkennbar, der wahrscheinlich auf das Intermediat β -Cryptoxanthin zurückzuführen war.

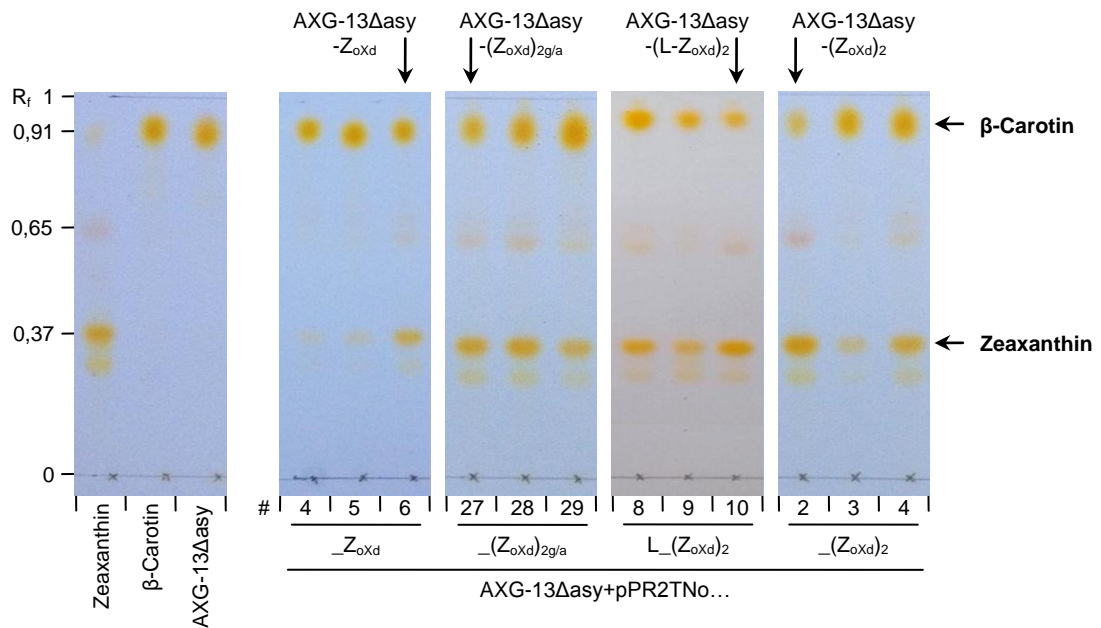


Abbildung 3.23: Selektion der Zeaxanthintransformaten nach Transformation von AXG-13Δasy mit verschiedenen crtZ_{oxd}-Transformationsvektoren. Die Auftrennung der Carotinoide wurde wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben durchgeführt. Als Zeaxanthin- und β-Carotinstandards wurden die Extrakte aus *E.coli*(pACCAR25ΔcrtX) und *E.coli*(pACCAR16ΔcrtX) aufgetragen. Die Retentionsfaktoren (R_f) einzelner Carotinoide sind angegeben. Die Transformanten mit dem größten beobachteten Zeaxanthin/β-Carotin-Verhältnis sind mit einem Pfeil unter Angabe des Stammmens gekennzeichnet.

In den Extrakten der Transformanten von AXG-13Δasy mit den verschiedenen crtZ_{oxd}-Transformationsvektoren bildeten Zeaxanthin und dessen Vorstufe β-Carotin die Hauptcarotinoide, wobei deutliche Unterschiede im Verhältnis der beiden Carotinoide sichtbar waren. So waren nach Transformation mit dem Mono-Vektor pPR2TNo_crtZ_{oxd} teilweise schwach ausgeprägte Zeaxanthinbanden (#4 und #5) erkennbar, während β-Carotin eine starke Bande zeigte. Im Stamm AXG-13Δasy-Z_{oxd} trat Zeaxanthin deutlicher hervor, weshalb dieser für die nachfolgende HPLC-Analyse ausgewählt wurde. Nach Transformation mit dem Duo-Vektor pPR2TNo_(crtZ_{oxd})₂ besaß der Stamm **AXG-13Δasy-(Z_{oxd})₂** ein hohes Zeaxanthin/β-Carotin-Verhältnis, das auf einen hohen Zeaxanthingehalt hinwies. Eine ähnliche Ausprägung zeigte sich für die Stämme AXG-13Δasy-(Z_{oxd})_{2g/a} und AXG-13Δasy-(L-Z_{oxd})₂ nach Transformation mit den Vektoren pPR2TNo_(crtZ_{oxd})_{2g/a} und pPR2TNoL_(crtZ_{oxd}), bei denen ebenfalls eine schwächere β-Carotin- und eine stärkere Zeaxanthinbande beobachtet werden konnte.

Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung und $crtZ_{oxd}$ -Kopienzahl

Das beobachtete hohe Zeaxanthin/ β -Carotin-Verhältnis wies auf einen hohen Zeaxanthingehalt in den ausgewählten Stämmen hin. Daher wurden die Carotinoidzusammensetzung und die Anzahl integrierter $crtZ_{oxd}$ -Kopien bestimmt (Abbildung 3.24).

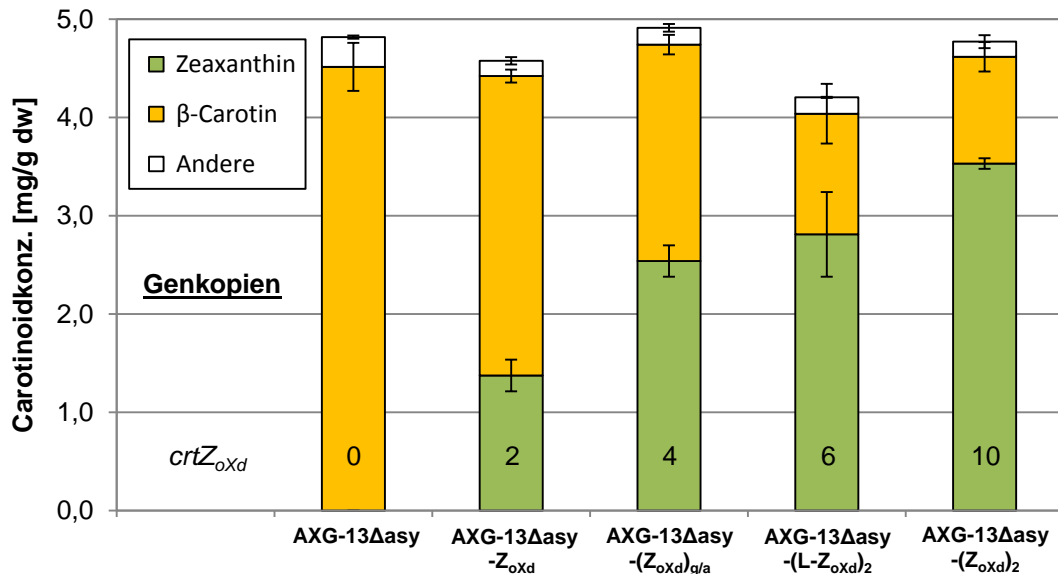


Abbildung 3.24: Steigerung des Zeaxanthingehalts in Stämmen von AXG-13 Δ asy nach Integration mehrerer $crtZ_{oxd}$ -Kopien. Die Extraktion der Carotinoide und die Bestimmung der Carotinoidverteilung wurde wie in den Abschnitten 2.8 und 2.9 beschrieben durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte sind unter Angabe der Standardabweichung (n=3) dargestellt. Die Bestimmung der Genkopienzahl erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR (Abschnitt 2.7.17), wobei die Anzahl der $crtZ_{oxd}$ -Genkopien innerhalb der Balken dargestellt wird.

Der Verlauf der Carotinoidzusammensetzung bestätigte die auf den DC-Platten erfolgte visuelle Beurteilung des Zeaxanthin/ β -Carotin-Verhältnisses und legte eine Abhängigkeit der Zeaxanthinbiosynthese von der Anzahl integrierter $crtZ_{oxd}$ -Kopien nahe. Ein Einfluss der Vektorstruktur (Lage der Genkassetten, Promotor) war nicht erkennbar. So wurde durch die Integration von zwei Genkopien ein Zeaxanthingehalt von 1,4 mg/g dw im Stamm AXG-13 Δ asy- $(Z_{oxd})_2$ erreicht, der sich durch die Integration von insgesamt vier Kopien auf 2,5 mg/g dw im Stamm AXG-13 Δ asy- $(Z_{oxd})_{2g/a}$ verdoppelte. Dies entsprach der Hälfte des Gesamtcarotinoidgehalts. Nach der Integration von zehn Kopien im Zeaxanthin-Hochproduzenten AXG-13 Δ asy- $(Z_{oxd})_2$ betrug der Zeaxanthingehalt 3,5 mg (42 % freies Zeaxanthin, 34 % Zeaxanthin-Fettsäureester). Der höchste Gehalt an Zeaxanthin und die höchste Kopienzahl konnten somit durch Transformation mit dem Duo-Vektor pPR2TNo- $(crtZ_{oxd})_2$ erreicht werden.

3.3.4 Genomische Integration des Gens *crtYB* in **AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂**

Nachdem der Zeaxanthin-Hochproduzent AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂ generiert wurde, sollte der Zeaxanthingehalt durch die Integration zusätzlicher *crtYB*-Genkopien gesteigert werden. Hierzu wurde die Zellen mit dem Vektor pPR13FYB, der bereits zur Steigerung des Phytoengehalts verwendet wurde (Abschnitt 3.2.2), transformiert und die Transformanten hinsichtlich ihrer Carotinoidzusammensetzung untersucht (Abbildung 3.25).

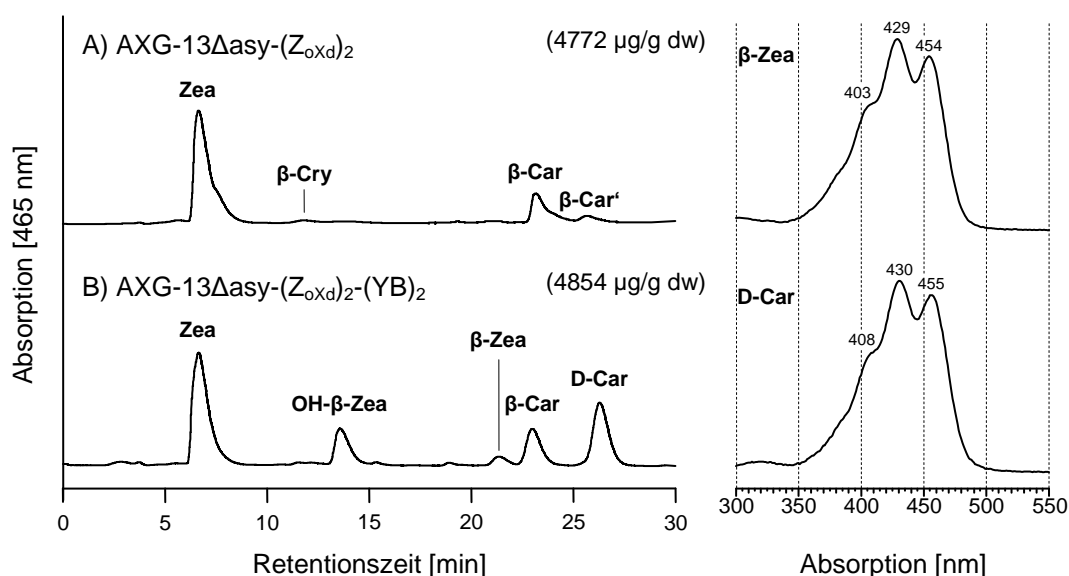


Abbildung 3.25: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung im Stamm AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂ und AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂-(YB)₂. Die Extraktion der Carotinoide, die Quantifizierung und die chromatographische Auftrennung mittels HPLC wurde wie in den Abschnitten 2.8 und 2.9 beschrieben durchgeführt. Der Gesamtcarotinoidgehalt ist in Klammern angegeben. Carotinoide: Zeaxanthin (Zea), β -Cryptoxanthin (β -Cry), β -Carotin (β -Car), cis- β -Carotin (β -Car'), 3-Hydroxy- β -Zeaxcarotin (OH- β -Zea), β -Zeaxcarotin (β -Zea), 7,8-Dihydro- β -Carotin (D-Car).

Verglichen mit dem Ausgangsstamm führte die Genintegration im Stamm **AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂-(YB)₂** zum Auftreten zusätzlicher Elutionsgipfel, die anhand ihrer Absorptionsspektren und der Retentionszeiten als β -Zeaxcarotin, 3-Hydroxy- β -Zeaxcarotin und 7,8-Dihydro- β -Carotin identifiziert wurden. Bei diesen Carotinoiden handelt es sich um mono- und dizyklisierte Derivate der β -Carotinvorstufe Neurosporin, die nicht als Substrat für die Zeaxanthinsynthese verwendet werden können. Entsprechend fiel der Zeaxanthingehalt auf 2,4 mg/g dw (44 %), während sich der Gesamtcarotinoidgehalt nur leicht auf 4,9 mg/g dw erhöhte. Eine gezielte Steigerung der Zeaxanthinproduktion konnte mit diesem Ansatz nicht erreicht werden.

3.3.5 Genomische Integration des Gens *crtZ_{oxd}* in das Astaxanthin-Synthase-Gen (*asy*) des Wildtyps (Knock-In)

Die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Ergebnisse führten zur Generierung Zeaxanthin-produzierender Stämme, wobei eine Zwei-Schritt-Strategie verfolgt wurde. Zuerst wurde das Astaxanthin-Synthase-Gen *asy* durch Integration eines Knock-Out-Konstrukts inaktiviert und anschließend die β -3,3'-Hydroxylase *crtZ_{oxd}* in mehreren Kopien in die Sequenzen der ribosomalen DNA integriert. Als Selektionsmarker wurden die Hygromycin- und Nourseothricin-Resistenz verwendet. Da die verwendbaren Antibiotikaresistenzen begrenzt sind, sollte versucht werden, beide genomischen Modifikationen – *asy*-Knock-Out und *crtZ_{oxd}*-Integration – in einem Schritt durchzuführen. Zu diesem Zweck wurden Knock-In-Konstrukte innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelt, die zusätzlich zur Hygromycin-Resistenz das *crtZ_{oxd}*-Gen enthielten. Hierbei sollte die Möglichkeit untersucht werden, das Transgen unter die Kontrolle des natürlichen *asy*-Promotors zu stellen, um den Effekt auf die Genexpression mit Konstrukten, die die klassische *crtZ_{oxd}*-Kassette aus *gpd*-Promotor und -Terminator enthielten, zu vergleichen.

Beschreibung der verwendeten *crtZ_{oxd}*-Knock-In-Konstrukte

Abbildung 3.26 zeigt die Plasmidkarten der linearisierten Knock-In-Konstrukte im Vergleich zum Knock-Out-Konstrukt *aha* und dem *asy*-Genlocus im Genom des Wildtyps CBS6938.

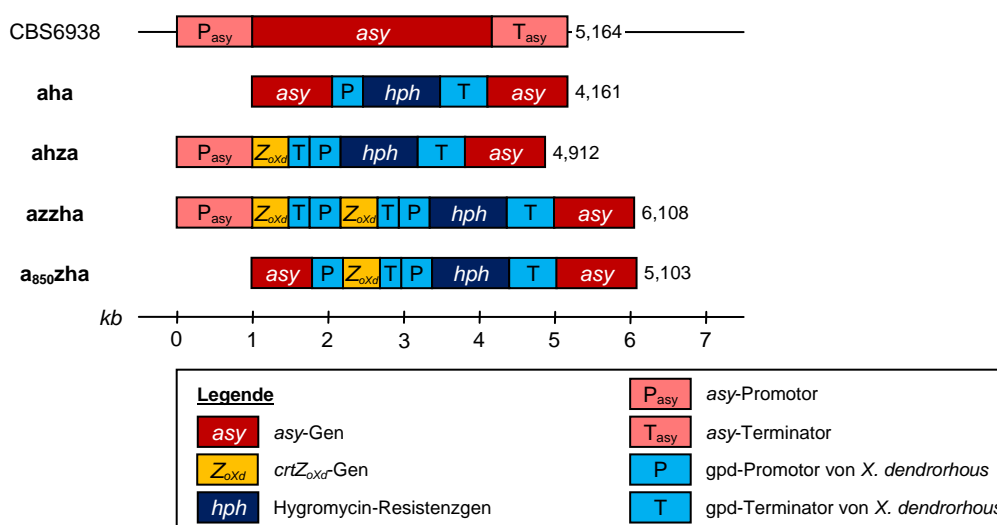


Abbildung 3.26: Plasmidkarten der linearisierten *crtZ_{oxd}*-Knock-In-Konstrukte. Die Größenangaben sind in Kilobasen (kb).

Im *ahza*-Konstrukt ist das Gen *crtZ_{oxd}* mit dem Promotor P_{asy} und dem *gpd*-Terminator verbunden, wodurch die Transkription des heterologen Gens unter der Kontrolle des natürlichen *asy*-Promotors steht. Durch Hinzufügen einer zweiten *crtZ_{oxd}*-Kassette, die den *gpd*-Promotor und -Terminator enthielt, wurde das *azzha*-Konstrukt erhalten. Beide Konstrukte integrieren über die homologen Sequenzen des *asy*-Promotors und dem Endbereich des *asy*-Gens. Die Konstruktion des Konstrukts *a₈₅₀zha* hingegen entspricht der des ursprünglichen *aha*-Konstrukts, in das zusätzlich zur Hygromycin-Resistenzkassette eine *crtZ_{oxd}*-Kassette integriert wurde.

Transformation mit dem Wildtyp und Bestimmung der Carotinoidkonzentration

Nach Transformation der Vektoren mit Zellen des Wildtyps wurden die auftretenden intermediären Kolonien kultiviert, die Zellsuspension auf YPD-Festmedium vereinzelte und gelbe Subtransformanten erhalten. Daraufhin konnte für die weiteren Kultivierungen auf die Zugabe von Hygromycin verzichtet werden, da eine stabile Integration vorlag und ein Verlust des gelben Phänotyps über mehrere Generationen nicht beobachtet werden konnte. Abbildung 3.27 stellt die Carotinoidzusammensetzung der erhaltenen Transformanten im Vergleich zum Deletionsstamm $WT\Delta_{asy}$ dar.

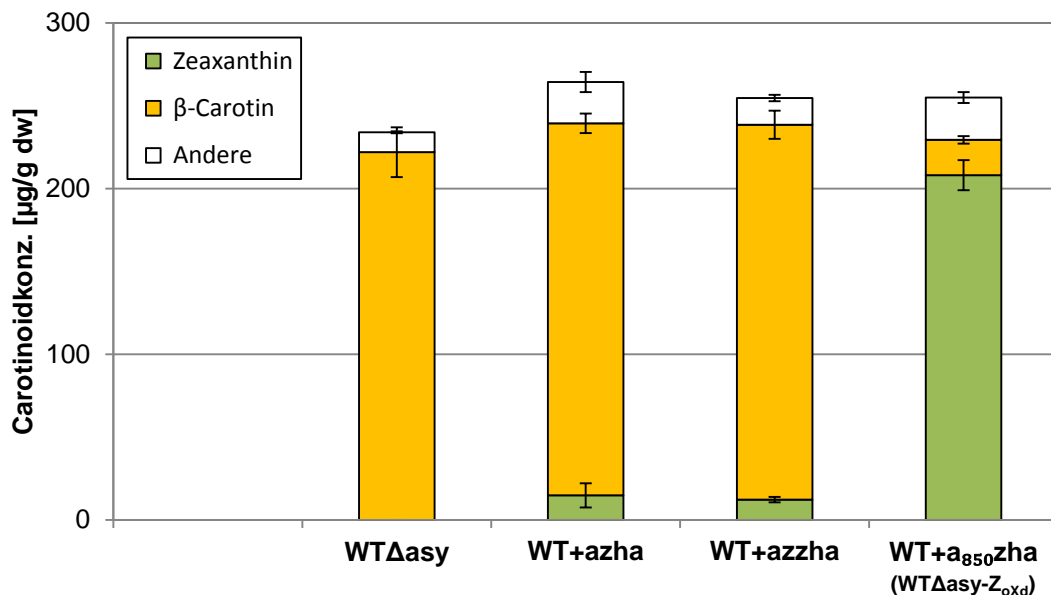


Abbildung 3.27: Carotinoidzusammensetzung des Wildtyps nach Integration verschiedener *crtZ_{oxd}*-Knock-In-Konstrukte. Die Extraktion der Carotinoide und die Bestimmung der Carotinoidverteilung wurde wie in den Abschnitten 2.8 und 2.9 durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte sind unter Angabe der Standardabweichung (n=3) dargestellt. Zum Vergleich wurde der Deletionsstamm $WT\Delta_{asy}$ dargestellt, der nach Transformation mit dem *aha*-Knock-Out-Konstrukt erhalten wurde (Abschnitt 3.3.1.1). Die Subtransformante $WT+a_{850}zha$ wird im weiteren Verlauf als Knock-In-Stamm $WT\Delta_{asy}-Z_{oxd}$ bezeichnet.

In der Transformante WT+azha bildete β -Carotin, wie im Deletionsstamm WT Δ asy das Hauptcarotinoid, während nur eine geringe Hydroxylase-Aktivität durch das Auftreten von Zeaxanthin sowie β -Cryptoxanthin und Hydroxytorulin erkennbar war. Auffällig war der geringe Zeaxanthingehalt und dass keine Steigerung nach Transformation mit dem azzha-Konstrukt, das zwei *crtZ_{oxd}*-Kopien enthielt, beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu bildete in der Transformanten WT+a₈₅₀zha (Knock-In-Stamm WT Δ asy-Z_{oxd}) Zeaxanthin mit 208 μ g/g dw das Hauptcarotinoid, wobei nur 21 μ g/g dw des Substrats β -Carotin verblieben. Im Vergleich zum Stamm WT Δ asy wurden 94 % des vorhandenen β -Carotins zu Zeaxanthin umgesetzt. Die Standardabweichung des Zeaxanthingehalts war mit einer maximalen Abweichung von 4 % um den Mittelwert sehr gering.

Somit schien eine Abhängigkeit der Zeaxanthinbiosynthese von der Struktur der Knock-In-Konstrukte zu bestehen, wobei die Verwendung des natürlichen *asy*-Promotors einen negativen Einfluss zu haben schien. Durch die Verwendung des *gpd*-Promotors des Wildtyps konnte hingegen der Stamm **WT Δ asy-Z_{oxd}** mit hohem Zeaxanthingehalt unter Ausnutzung nur eines Resistenzmarkers erhalten werden. Zudem war die Stabilität der Genomintegration festzuhalten, da eine konstante Zeaxanthinbiosynthese in drei unabhängig aufeinanderfolgenden Kulturen ohne die Verwendung von Hygromycin nachgewiesen werden konnte.

3.4 Genetische Modifikationen zur Biosynthese von multioxygeniertem Zeaxanthin

Neben den durchgeführten genetischen Modifikationen zur Biosynthese von Phytoen und Zeaxanthin wurde in dieser Arbeit außerdem die Möglichkeit zur Biosynthese von multioxygenierten Zeaxanthinderivaten, von denen ein hohes antioxidatives Potential vermutet wird, untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Gene *crtZ_{oxd}*, *crtG* und *bkt*, deren Genprodukte Hydroxy- und Ketogruppen an die β -Iononringe von β -Carotin einbringen, in das Genom des β -Carotin-produzierenden Stamms PR1-104 integriert. Im Anschluss wurden zunächst neuartige hochpolare Carotinoide aus dem Extrakt isoliert, die Ketogruppe chemisch reduziert und die Struktur mittels HPLC-MS nachgewiesen.

3.4.1 Genomische Integration der Gene *crtZ_{oxd}*, *crtG* und *bkt* in PR1-104

Das Gen *crtZ_{oxd}* codiert für eine β -3,3'-Hydroxylase und konnte bereits erfolgreich in Abschnitt 3.3 zur Biosynthese von Zeaxanthin verwendet werden. Die Gene *crtG* aus *Brevundimonas* SD212 (Nishida et al., 2005) und *bkt* aus *Haematococcus pluvisialis* (Kajiwara et al., 1995) codieren für eine β -2,2'-Hydroxylase und eine β -4,4'-Ketolase, die die Integration weiterer Hydroxy- bzw. von Ketogruppen an C2 bzw. C4 der β -Iononringe von β -Carotin katalysieren. Aufgrund dieser Eigenschaften erschien daher die Biosynthese des multioxygenierten Zeaxanthinderivats 4,4'-Diketo-Nostoxanthin über die Intermediate Zeaxanthin und Nostoxanthin nach genomischer Integration dieser Gene in den Stamm PR1-104 möglich. 4,4'-Diketo-Nostoxanthin ist ein hochpolares Carotinoid mit vier Hydroxy- und zwei Ketogruppen (vergl. Abbildung 1.3, S. 6). Der Stamm PR1-104 wurde als Testsystem verwendet, da er bereits β -Carotin produziert und keine Antibiotikaresistenzen besitzt und dadurch zu Aufnahme von drei verschiedenen Transformationsvektoren fähig war.

Transformation mit PR1-104

Die Gene lagen auf Transformationsvektoren vor und wurden sukzessive in das Genom integriert, wobei zunächst zwei gelbe und schließlich ein roter Stamm erhalten wurde, dessen Zellfarbe die enzymatische Aktivität der β -4,4'-Ketolase BKT anzeigte (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Übersicht über die erhaltenen Stämme von PR1-104 zur Biosynthese von multioxygenierten Zeaxanthinderivaten unter Angabe der integrierten Transformationsvektoren, der erhaltenen Antibiotikaresistenz und der Zellfarbe

Stamm	Transformationsvektoren	AB-Resistenz	Zellfarbe
PR1-104	keiner	keine	gelb
PR1-104-Z _{oxd}	pPR2TNo_crtZ _{oxd}	Nourseothricin	gelb
PR1-104-Z _{oxd} -G	+ pPR2TNH_crtG	+ Hygromycin	gelb
PR1-104-Z _{oxd} -G-bkt	+ pPRcDNA1bkt830	+ Geneticin	rot

Die Transformationen wurden wie in Abschnitt 2.7.13 beschrieben durchgeführt. AB: Antibiotika

Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung

Zur Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung (Abbildung 3.28) wurde im Vergleich zu den bisherigen HPLC-Analysen eine andere mobile Phase verwendet und die Messtemperatur gesenkt (Abschnitt 2.10.1). Diese Maßnahmen waren notwen-

dig, um die in den Extrakten auftretenden polaren Carotinoide, die mehr als zwei sauerstoffhaltige Gruppen besitzen, aufzutrennen.

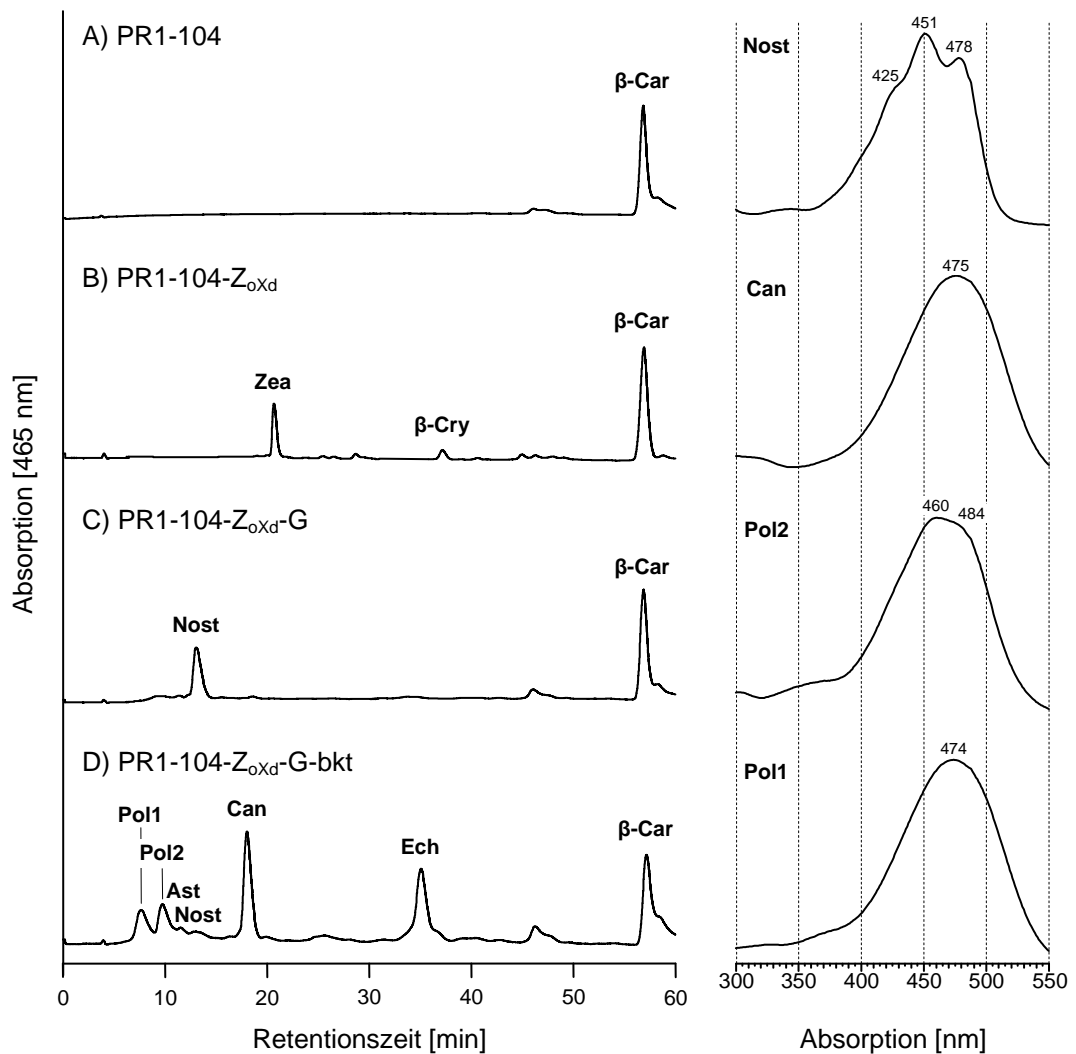


Abbildung 3.28: Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung in den Stämmen PR1-104, PR1-104-Z_{oxd}, PR1-104-Z_{oxd}-G und PR1-104-Z_{oxd}-G-bkt. Die Extraktion der Carotinoide und die chromatographische Auftrennung mittels HPLC wurden wie in den Abschnitten 2.8 und 2.10 beschrieben durchgeführt. Carotinoide: Astaxanthin (Ast), Nostoxanthin (Nost), Canthaxanthin (Can), Zeaxanthin (Zea), Echinenon (Ech), β-Cryptoxanthin (β-Cry), β-Carotin (β-Car). Hochpolare Carotinoide wurden als Pol1 und Pol2 bezeichnet.

Im Extrakt des Ausgangsstamms PR1-104 bildete β-Carotin das Hauptcarotinoid, das in diesem System nach 57,0 min von der Säule eluierte. Nach Integration des Gens *crtZ_{oxd}* im Stamm **PR1-104-Z_{oxd}** erschienen im Chromatogramm die Elutionsgipfel von Zeaxanthin und β-Cryptoxanthin. Durch die Aktivität der β-2,2'-Hydroxylase CrtG wurden zwei weitere Hydroxygruppen in das Zeaxanthinmolekül integriert, weshalb Nostoxanthin als neuer Elutionsgipfel im Chromatogramm des Stamms **PR1-104-Z_{oxd}-G** sichtbar wurde. Es besaß die gleichen spektralen Eigenschaften wie die Vorläufer β-Carotin und Zeaxanthin mit Absorptionsmaxima bei

425, 451 und 478 nm, wurde aber wegen seiner erhöhten Polarität mit 13,0 min deutlich früher von der Säule eluiert. Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin konnten nicht mehr nachgewiesen werden. Nach Integration der β -4,4'-Ketolase BKT kam es zu einer deutlichen Veränderung der Carotinoidzusammensetzung im Extrakt von **PR1-104-Z_{oxd}-G-bkt**, in dem fünf neue Elutionsgipfel erkennbar waren. Neben dem deutlich verkleinertem Elutionsgipfel von Nostoxanthin war das Auftreten der Carotinoide Echinenon und Canthaxanthin (475 nm) auffällig, die aus der C4-Ketolierung von β -Carotin entstanden. Außerdem wurde Astaxanthin in kleinen Mengen sichtbar. Im vorderen Bereich des Chromatogramms waren zwei neue Elutionsgipfel zu erkennen, deren im Vergleich zu Nostoxanthin verkürzten Elutionszeiten von 7,6 und 9,8 min auf eine hohe Polarität der Carotinoide hinwiesen. Da keine Standards vorlagen, wurden sie als die unidentifizierten polaren Carotinoide Pol1 und Pol2 bezeichnet. Die Spektren zeigten eine Glockenkurve mit einem Hauptabsorptionsmaximum bei 474 nm bzw. einem Hauptmaximum und einer Schulter bei 460 und 484 nm, die typisch für di- und monoketolierte β -Carotinderivate sind.

Somit konnten nach genomischer Integration der Gene hochpolare Carotinoide in den Extrakten erhalten werden, bei denen es sich wahrscheinlich aufgrund ihrer Retentionszeit und spektralen Eigenschaften um die gewünschten ketolierten Nostoxanthinderivate 4-Diketo-Nostoxanthin und 4,4'-Keto-Nostoxanthin handelte.

3.4.2 Reduktion der Ketogruppen von 4-Keto-Nostoxanthin und 4,4'-Diketo-Nostoxanthin und Nachweis mittels HPLC-MS

Um die Struktur der im Extrakt von PR1-104-Z_{oxd}-G-bkt enthaltenen hochpolaren Carotinoide Pol1 und Pol2 zu klären, wurde zunächst die Existenz der Ketogruppe durch Reduktion nachgewiesen und im Anschluss alle Carotinoide mittels Massenspektrometrie (MS) analysiert. In einem ersten Schritt mussten sie daher zunächst aus dem Extrakt isoliert werden.

Isolation der hochpolaren Carotinoide Pol1 und Pol2 und Reduktion der Ketogruppe

Zu diesem Zweck wurde eine Probe des Extrakts zusammen mit Standard- und Vergleichsproben auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und nach Chromatographie mit dem Laufmittel Toluol:Ethylacetat:Methanol (65:30:5 v/v/v) die auftretenden Carotinoide mit dem kleinsten Retentionsfaktor ausgekratzt (Abbildung 3.29 A).

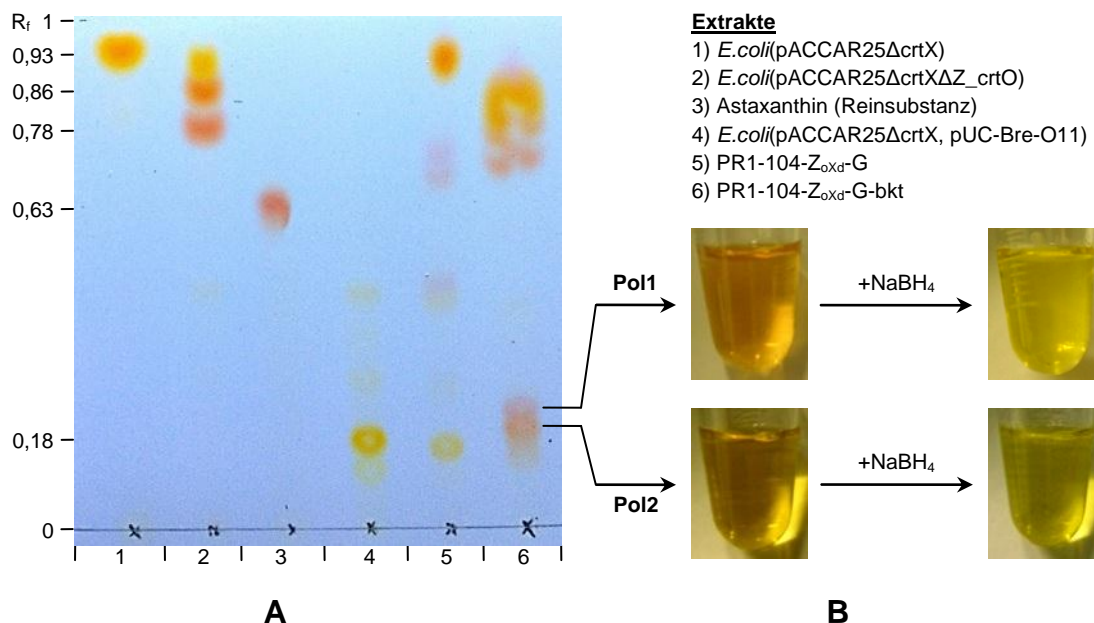


Abbildung 3.29: Isolation der hochpolaren Carotinoide Pol1 und Pol2 aus dem Extrakt von PR1-104-Z_{oxd}-G-bkt nach Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie (A) und Darstellung der Farbveränderung nach Behandlung mit NaBH₄ (B). Die Auftrennung der Carotinoide wurde wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben durchgeführt. Die Retentionsfaktoren (R_f) einzelner Carotinoide sind angegeben. Nach Isolation und Reduktion (Abschnitt 2.9.2 und 2.9.3) mit Natriumborhydrid (NaBH₄) konnte ein Farbumschlag von Rot zu Gelb beobachtet werden.

Anhand ihrer Farbe und ihres Laufverhalten konnten in den aufgetragenen Standardextrakten von *E. coli*(pACCAR25ΔcrtX) und *E. coli*(pACCAR25ΔcrtXΔZ_crtO), die bereits für die HPLC-Analysen verwendet wurden, das gelbe β-Carotin (R_f = 0,93) und die roten mono- und diketolierten Derivate Echinenon (R_f = 0,86) und Canthaxanthin (R_f = 0,78) identifiziert werden. Das rote Astaxanthin besitzt eine höhere Polarität und erschien nach Zweidrittel der Laufstrecke (R_f = 0,63). Nostoxanthin wurde aus der Komplementation von *E. coli*(pACCAR25ΔcrtX, pUC-Bre-O11) erhalten und war anhand seiner gelben Farbe im unteren Viertel der DC-Platte auszumachen (R_f = 0,18). Im Extrakt des Stammes PR1-104-Z_{oxd}-G war es ebenfalls zu erkennen, während es im Extrakt von PR1-104-Z_{oxd}-G-bkt nur in Spuren sichtbar war. Dafür erschienen zwei prominente Farbflecke oberhalb der Höhe von Nostoxanthin, bei denen es sich um die hochpolaren Carotinoide Pol1 und Pol2 handelte. Interessanterweise besaßen diese beiden Carotinoide höhere R_f-Werte als Nostoxanthin, zeigten aber eine rötliche Färbung, die ketolierten β-Carotinderivaten entsprach.

Nachdem die Carotinoide Pol1 und Pol2 aus dem Kieselgel isoliert wurden, konnten sie auf das Vorhandensein der C4-Ketogruppen überprüft werden. Dies geschah durch Begutachtung der Farbe der Carotinoidlösung vor und nach der Behandlung

mit dem Reduktionsmittel Natriumborhydrid (NaBH_4), das Carotinoidketone zu sekundären Alkoholen mit einem Farbumschlag von Rot zu Gelb reduziert (Eugster, 1995). Bei der Betrachtung der Carotinoidlösungen konnte eine rötliche Färbung von Pol1 und Pol2 wahrgenommen werden, während nach Hinzufügen von NaBH_4 eine deutliche Farbveränderung eintrat (Abbildung 3.29 B). Beide Extrakte wiesen die gleiche gelbe Färbung auf, die die Reduktion der Ketogruppe anzeigte. Die spektralen Hauptabsorptionsmaxima verschoben sich in beiden Fällen auf 448 nm.

Strukturnachweis durch Massenspektrometrie

Nach erfolgreicher Isolation und Nachweis der Ketogruppe wurden im Anschluss alle Carotinoide (Pol1, Pol2 und die reduzierten Derivate) mittels HPLC-MS untersucht. Die Struktur und das Vorhandensein funktioneller Gruppen konnte hierbei durch Bestimmung der Molekülmasse und durch das Auftreten charakteristischer Molekülfragmente nachgewiesen werden.

Die HPLC-MS-Analysen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Helge B. Bode (Goethe Universität Frankfurt) durchgeführt. Die Proben wurden chromatographisch mit einer C_{18} -Säule aufgetrennt und anschließend durch ein hochauflösendes Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer analysiert (Abschnitt 2.10.4). Hierbei konnten Substanzen mit der erwarteten Masse nachgewiesen werden (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Übersicht über die durchgeführten HPLC-MS-Analysen der isolierten Carotinoidproben unter der Angabe der monoisotopischen Masse (m_{i1}) in Dalton (Da) des erwarteten Carotinoids, der registrierten Retentionszeit t_R und dem bestimmten Masse-zu-Ladung-Verhältnis m/z des Molekülions $[M]^{+}$

Probe	Erwartetes Carotinoid	m_{i1} [Da]	t_R [min]	$[M]^{+}$ [m/z]
Pol2	4-Keto-Nostoxanthin	614,40	10,06	614,40
Pol1	4,4'-Diketo-Nostoxanthin	628,38	9,31	628,37
Pol2-Red	4-Hydroxy-Nostoxanthin	616,41	9,27	616,41
Pol1-Red	4,4'-Dihydroxy-Nostoxanthin	632,41	7,46	632,41

Die HPLC-MS-Analysen wurden mit dem in Abschnitt 2.10.4 beschriebenen HR-ESI-MS-System durchgeführt.

Dabei stimmte das gemessene Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) des Molekülions in hoher Genauigkeit mit der erwarteten monoisotopischen Masse überein. Der Unterschied zwischen mono- und diketolierten Nostoxanthin betrug m/z 14, der auf die Integration eines Sauerstoffatoms und Abspaltung zweier Wasserstoffatome zurückzuführen war. Nach Reduktion der Ketogruppe erhöhte sich die Masse um m/z 2, da es zur Bindung von zwei zusätzlichen Wasserstoffatomen (am Sauerstoff

und am β -Iononring) kam. Bei der Betrachtung der Retentionszeiten war eine Abnahme von 10,06 bis 7,46 min erkennbar, die auf die zunehmende Polarität der Carotinoide hinwies. Durch Auswertung der auftretenden Fragmentmuster (MS^2 -Spektren) wurden die Carotinoide 4-Keto-Nostoxanthin und 4,4'-Diketo-Nostoxanthin zweifelsfrei aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften nachgewiesen (Abbildung 3.30).

Hierbei konnte das Molekülion $[M]^{+}$ zusammen mit den Fragmenten detektiert werden. Aus dem Auftreten charakteristischer Fragmentgrößen (Rivera et al., 2014) wurden die strukturellen Merkmale der Carotinoide nachgewiesen. Hierbei wies das Fragment bei m/z $[M-92]^{+}$ auf die intensive Konjugation der Polyenkette innerhalb der Carotinoide hin, die zur Bildung und Verlust eines Toluolmoleküls (92 Da) führten. Die Fragmente mit einer um m/z 17 oder m/z 18 verringerten Masse zeigten die Existenz von Hydroxygruppe an, die als Hydroxyl-Radikal (17 Da) oder unter Wasserabspaltung (18 Da) verloren gingen. Zudem war das Auftreten des Fragmentions bei m/z 147 typisch für die Ketocarotinoide 4-Keto-Nostoxanthin und 4,4'-Diketo-Nostoxanthin (Abbildung 3.30 A-B), die eine C4-Ketogruppe und eine C3-Hydroxygruppe tragen. Bei den reduzierten Derivaten 4-Hydroxy-Nostoxanthin und 4,4'-Dihydroxy-Nostoxanthin (Abbildung 3.30 C-D) hingegen war die Intensität des m/z 147-Fragments aufgrund der Reduktion der 4-Ketogruppe zu einer 4-Hydroxygruppe deutlich verringert.

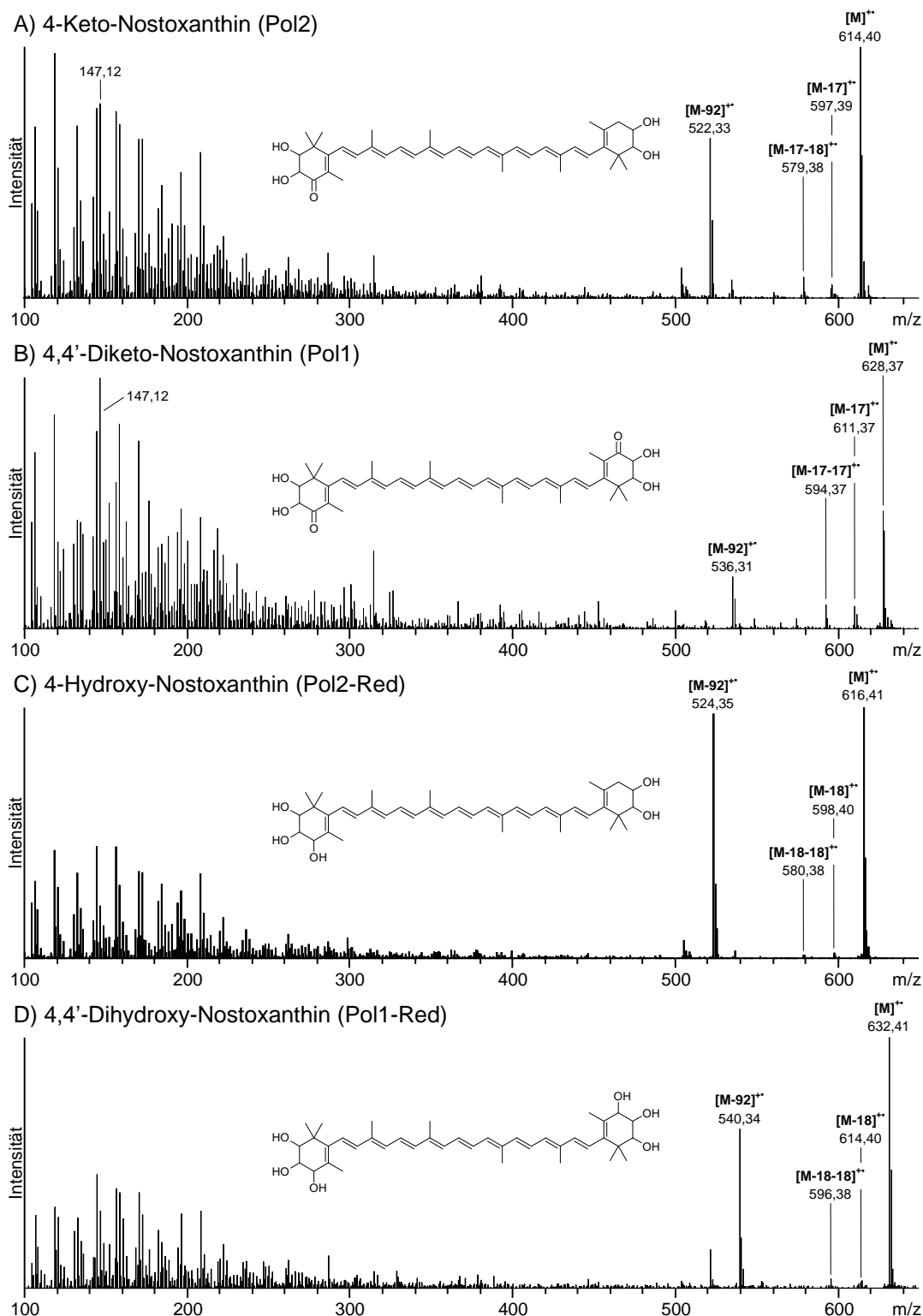


Abbildung 3.30: MS²-Spektren zum Nachweis von 4-Keto-Nostoxanthin und 4,4'-Diketo-Nostoxanthin und der reduzierten Derivate. Die HPLC-MS-Analysen wurden mit dem in Abschnitt 2.10.4 beschriebenen HR-ESI-MS-System durchgeführt.

3.5 Stabilisierung der generierten Zeaxanthin- und Phytoenproduzenten

Nach Abschluss der Arbeiten zur genetischen Modifikation sollten die biotechnologische Anwendung der erhaltenen Zeaxanthin- und Phytoen-produzierenden Stämme in einem Bioreaktor untersucht werden, wobei auf die Zugabe von Antibiotika zum Kulturmedium verzichtet werden sollte. In Vorversuchen zeigte sich aber eine deutliche Verringerung des Gesamtcarotinoidgehalts nach Kultivierung in antibiotikafreiem Medium, die auf einen Verlust der integrierten Gene als Folge mitotischer Rekombinationsereignisse zurückgeführt wurde. Deshalb wurde eine Sporulationsstrategie entwickelt mit der im Anschluss stabile Stämme erhalten wurden.

3.5.1 Sporulation von PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}

Die bisherigen Kultivierungen des Stamms PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd} wurden mit Geneticin-, Hygromycin- und Nourseothricin-haltigem YM-Flüssigmedium durchgeführt, um die genomische Integration der Transformationsvektoren sicherzustellen. Da nun eine Kultivierung des Stamms in einem Bioreaktor zur Produktion von Zeaxanthin beabsichtigt wurde, wurden zunächst Vorversuche in Abwesenheit der Antibiotika durchgeführt, die zu einer deutlichen Verringerung des Gesamtcarotinoidgehalts führten. Er fiel von 760 auf 413 µg/g dw, wobei nur noch 89 µg/g dw Zeaxanthin (minus 83 %) gebildet wurden. Die beabsichtigte Kultivierung in einem Bioreaktor schien nach Erhalt dieser Ergebnisse nicht möglich.

Als Grund für den starken Rückgang der Carotinoidproduktion wurde eine Verringerung der integrierten Vektorkopien aufgrund eines nicht-reziproken DNA-Transfers zwischen zwei homologen Chromosomen vermutet. Eine solche Genkonversion kann durch mitotische Rekombination ausgelöst werden, die bei Pilzen stark ausgeprägt sein kann (Lee et al., 2009). Bei diesem Mechanismus werden zufällige DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe des als DNA-Matrize dienenden intakten homologen Chromosoms repariert (Prado et al., 2003). Dies setzt die Existenz eines diploiden Genoms voraus, das durch den Nachweis von zwei Allelen des *crtl*- und des *asy*-Gens (Abschnitt 3.2.1 und 3.3.1) sehr wahrscheinlich ist. In Bezug auf die Integration der Transformationsvektoren würde das Vorliegen eines diploiden Chromosomensatzes zu einer heterozygoten Ausprägung der rDNA-Integrationsbereiche führen und es den Zellen erlauben, durch mitotische Rekombination zwischen den homologen Chromosomenbereichen die integrierte Fremd-DNA aus dem Genom zu entfernen.

Sporulation der Zellen auf Mangelmedium und Selektion gelber Kolonien

Auf der Grundlage obiger Überlegungen wurden die Zellen des Stamms PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd} zur Sporulation angeregt, um diploide homozygote Sporen zu erhalten, die nach Auskeimung eine stabile Merkmalausprägung aufweisen. Dabei wurde die Methode von Kucsera et al. (1998), bei der die Zellen auf festem Mangelmedium (2 % Agar, 0,5 % Adonitol) gegeben werden, angewandt und die Sporulationsplatte für sechs Wochen bei 10 °C im Dunkeln gelagert (Abschnitt 2.7.14). In regelmäßigen Abständen wurden Proben des aufgetragenen Zellmaterials zur mikroskopischen Betrachtung entnommen und die Entwicklung von Holobasidien und Basidiosporen dokumentiert (Abbildung 3.31 A).

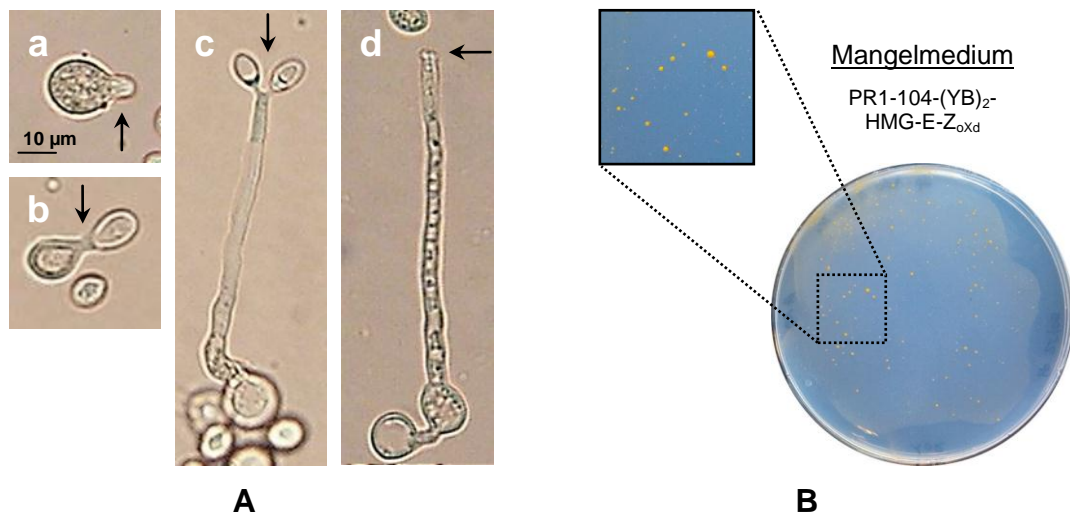


Abbildung 3.31: Mikroskopische Darstellung verschiedener Stadien der Sporenbildung (A) und Dokumentation gelber Kolonien (B) nach Inkubation des Stamms PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd} auf Mangelmedium. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.7.14 beschrieben behandelt. Beobachtete Stadien der Sporenentwicklung (A): Ausbildung von Konjugationsröhren nach 11 Tagen (a), Fusion zweier Zellen nach 17 Tagen (b), entwickelte Halobasidie mit Basidiosporen nach 27 Tagen (c) und Halobasidie mit freiliegenden Sporenträgern nach Sporenablösung nach 27 Tagen (d). Markante Strukturen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Nach 34 Tagen wurden gelbe Kolonien auf dem Mangelmedium sichtbar (B).

Nach der Ausbildung von Konjugationsröhren konnte die Fusion zweier Zellen nach 17 Tagen beobachtet werden. Nach weiteren 10 Tagen waren lange dünne Halobasidien mit zwei apikalen Basidiosporen entstanden. Die Sporen saßen auf dünnen winzigen Stegen, die nach Ablösung der Sporen erkennbar wurden. Der Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd} war somit zur Sporulation fähig.

An diesem Punkt wurden die mikroskopischen Beobachtungen eingestellt, da eine Selektion der Sporen mit den gegebenen Mitteln nicht möglich war und die Platte weiterhin bei 10 °C im Dunkeln gelagert. Nach 6 Wochen konnte die Bildung far-

biger Zellkolonien aus ausgekeimten Basidiosporen beobachtet werden (Abbildung 3.31 B). Nach Übertragung von zehn dieser Kolonien in YM-Flüssigmedium konnten die Zellen anschließend zur Produktion von Carotinoiden kultiviert werden, wobei der Gesamtcarotinoidgehalt des Zellmaterials variierte (324 - 653 µg/g dw). In dem Zellextrakt der Kolonien mit einem hohen Gehalt über 600 µg/g dw (#3 und #4) wurde ein Zeaxanthingehalt von 69 % (435 µg/g dw) bzw. 66 % (431 µg/g dw) ermittelt.

Bestimmung der Stabilität der Zeaxanthinbiosynthese

Um nun die Stabilität der Zeaxanthinbiosynthese zu überprüfen, wurden die Zellen der Kolonie #3 auf YPD-Festmedium passagiert. Hierzu wurde eine Kolonie in YM-Flüssigmedium kultiviert, auf Festmedium vereinzelt und dieses Vorgehen zweimal mit einer der nach Inkubation auftretenden Kolonien wiederholt. Nach jedem Schritt konnte stets ein Zeaxanthinanteil von über 60 % (441, 375 und 499 µg/g dw) nachgewiesen werden, weshalb die nach dem letzten Passagierschritt erhaltenen Zellen als stabil bezüglich ihrer Zeaxanthinbiosyntheseleistung bewertet und als Stamm **PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S** bezeichnet wurden. Tabelle 3.3 stellt die Carotinoidgehaltzusammensetzung und die Kopienzahl der integrierten Gene *crtYB* und *crtZ_{oxd}* dar.

Tabelle 3.3: Veränderung der Zeaxanthinkonzentration und der Genkopienzahl des Stamms PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd} durch Sporulation (-S)

Stamm	Carotinoidgehalt [µg/g dw]				Kopienzahl	
	Gesamt	Zea	β-Car	Andere	<i>crtYB</i>	<i>crtZ_{oxd}</i>
PR1-104-(YB) ₂ -HMG-E-Z _{oxd}	760 ± 31	517 ± 17	131 ± 28	112 ± 11	+ 8	+ 4
PR1-104-(YB) ₂ -HMG-E-Z _{oxd} -S	664 ± 21	432 ± 73	152 ± 42	93 ± 46	+ 6	+ 2
	(-13 %)	(-16 %)	(-14 %)	(-17 %)		

Die Extraktion der Carotinoide und die Bestimmung der Carotinoidgehaltverteilung wurde wie in den Abschnitten 2.8 und 2.10 beschrieben durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte sind unter Angabe der Standardabweichung (n=3) angegeben. In Klammern erfolgt die Angabe der relativen Änderung der Konzentrationswerte. Die Bestimmung der Genkopienzahl erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR (Abschnitt 2.7.17). Carotinoide: Zeaxanthin (Zea), β-Carotin (β-Car).

Es wurde deutlich, dass es nach Sporulation zu einer Verringerung des Gesamtcarotinoidgehalts gekommen war, der mit einem Verlust von je zwei Kopien des *crtYB*- und des *crtZ_{oxd}*-Gens einherging. Der Gehalt an Zeaxanthin verblieb dennoch auf einem hohen Niveau und war daher für die anstehende biotechnologische Anwendung in einem Bioreaktor als zufriedenstellend zu bewerten.

3.5.2 Sporulation von AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂, WT Δ crtI-(YB)₂-HMG-E und AXG-13 Δ crtI-(YB)₂-HMG-E

Da die angewandte Sporulationsstrategie zur Ausbildung einer stabilen Carotinoidbiosynthese führte, wurden auch die anderen Zeaxanthin- und Phytoenproduzierenden Stämme in der gleichen Weise behandelt. Dabei konnte für alle Stämme Sporenbildung beobachtet werden, wobei die Stämme der AXG-13-Linie erst nach 12 Wochen Kolonien auf dem Mangelmedium ausbildeten. Tabelle 3.4 stellt die Carotinoidkonzentrationen der erhaltenen Stämme dar.

Tabelle 3.4: Zeaxanthin- und Phytoenkonzentration der nach Sporulation (-S) erhaltenen Stämme

Stamm	Carotinoidkonz. [μ g/g dw]	
	Zeaxanthin	Phytoen
AXG-13 Δ asy-(Z _{oxd}) ₂ -S	2711 \pm 200 (- 23 %)	0
WT Δ crtI-(YB) ₂ -HMG-E-S	0	755 \pm 23 (- 12 %)
AXG-13 Δ crtI-(YB) ₂ -HMG-E-S	0	6574 \pm 610 (- 12 %)

Die Extraktion der Carotinoide und die Bestimmung der Carotinoidverteilung wurde wie in den Abschnitten 2.8 und 2.10 beschrieben durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte sind unter Angabe der Standardabweichung (n=3) angegeben. In Klammern erfolgt die Angabe der relativen Änderung der Konzentrationswerte im Vergleich zum Ausgangsstamm.

Aus den Daten wurde ersichtlich, dass es im Hochproduzenten **AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂-S** zu einer Verringerung des Zeaxanthingehalts um 23 % gekommen war. Auch in den beiden Phytoenproduzierenden Stämmen **WT Δ crtI-(YB)₂-HMG-E-S** und **AXG-13 Δ crtI-(YB)₂-HMG-E-S** konnte eine Verringerung des Phytoengehalts um 12 % festgestellt werden, wobei in allen Stämmen die Biosyntheseleistung auf hohem Niveau verblieb.

3.6 Kultivierung der stabilisierten Stämme in einem Bioreaktor

Nachdem mittels Sporulation der Zeaxanthin- und Phytoenproduzenten stabile Stämme hinsichtlich ihrer Carotinoidbiosynthese erhalten wurden, konnten diese nun in einem Bioreaktor kultiviert werden. Hierbei wurden zunächst Vorversuche mit dem Zeaxanthinproduzenten PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S durchgeführt, um die Prozessparameter festzulegen, bevor die erfolgreiche Kultivierung erfolgen konnte. Im Anschluss konnten diese Parameter für die Kultivierung des Phytoen-Hochproduzenten AXG-13 Δ crtI-(YB)₂-HMG-E-S verwendet werden.

3.6.1 Kultivierung des Zeaxanthinproduzenten PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S

Die Kultivierungen erfolgten in einem 2L-Bioreaktor mit 1 L Kulturvolumen (Abschnitt 2.6.7), in dem höhere Zelldichten und Produktausbeuten im Vergleich zu den Schikanekolben-Kultivierungen erreicht werden können. Um optimale Wachstumsbedingungen herzustellen, mussten die für den Betrieb wichtigen Prozessparameter Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Glucosekonzentration des Mediums zuvor ermittelt und festgelegt werden.

Festlegung der Prozessparameter

Zu diesem Zweck wurden Vorversuche in Schikanekolben durchgeführt und der Verlauf der Sauerstoffsättigung und des pH-Werts bestimmt. Die erhaltenen Werte dienten schließlich als Entscheidungsgrundlage zur Festlegung der Prozessparameter (Tabelle 3.5 A).

Tabelle 3.5: Verlauf der Sauerstoffsättigung (pO₂) und des pH-Werts während des Wachstums (OD₆₀₀) von PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S in Schikanekolben mit YM-Flüssigmedium (A) und Gesamtcarotinoidkonzentration nach Wachstum in verschiedenen Glucosekonzentrationen (B)

Zeit [h]	OD ₆₀₀	pO ₂ [%]	pH		
				Glucose [g/L]	Carotinoide [µg/g dw]
1	0,51	96	6,2	10	650
24	0,85	94	6,6	25	626
48	1,68	70	5,7	50	610
72	6,33	43	4,7	75	506
96	11,20	52	4,2	100	423
192	9,40	83	4,5		

A
B

Aus den erhaltenen Daten konnte das Minimum des Sauerstoffgehalts während der Kultivierung mit 43 % ermittelt werden. Mit Beginn des Zellwachstums kam es zuerst zu einer kontinuierlichen Abnahme, auf die nach Erreichen des Minimums eine Zunahme folgte. Daher wurde die minimale Sauerstoffsättigung im Bioreaktor auf 40 % festgelegt und die Rührerdrehzahl in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration geregelt. Der pH-Wert lag im Bereich von 6,6 bis 4,5, wobei eine Abnahme erkennbar war. Der pH-Wert im Bioreaktor wurde durch die Zugabe von Korrekturlösungen auf 5,5 gehalten, da dieser Wert dem mittleren Bereich des gemessenen pH-Verlaufs entsprach.

Um eine im Vergleich zur Kultivierung im Schikanekolben hohe Zelldichte und Produktausbeute zu erreichen, war es darüber hinaus notwendig, die verfügbare Glucosemenge im Medium zu erhöhen. Hierbei konnte die gesamte Glucosemenge gleich zu Beginn der Kultivierung (Batch-Verfahren) oder nach Verbrauch der Anfangsmenge kontinuierlich hinzugegeben werden (Fed-Batch-Verfahren). Zur Klärung, ob sich das Batch-Verfahren anbot, wurden die Zellen in Schikanekolben in fünf Ansätzen mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen kultiviert und die Gesamtcarotinoidkonzentration bestimmt (Tabelle 3.5 B). Aus den erhaltenen Daten war eine Verringerung des Carotinoidgehalts mit steigender Glucosekonzentration erkennbar. Daher wurde das Fed-Batch-Verfahren gewählt und nach Zugabe der Glucose-Lösung die Glucosekonzentration unter 2 g/L gehalten.

Kultivierung im Bioreaktor

Nach Festlegung der Prozessparameter wurden erste Wachstumsversuche im Bioreaktor durchgeführt, wobei das Inokulationsvolumen, die Belichtungsverhältnisse sowie die Konzentration und der Volumenstrom der Glucose-Lösung variiert wurden. Daraufhin konnte mit den optimierten Prozessbedingungen die Zelldichte und die Zeaxanthinkonzentration des Kulturmediums durch Kultivierung des Stamms PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S in einem Bioreaktor deutlich im Vergleich zu der vorangegangenen Schikanekolben-Kultivierung erhöht werden (Abbildung 3.32).

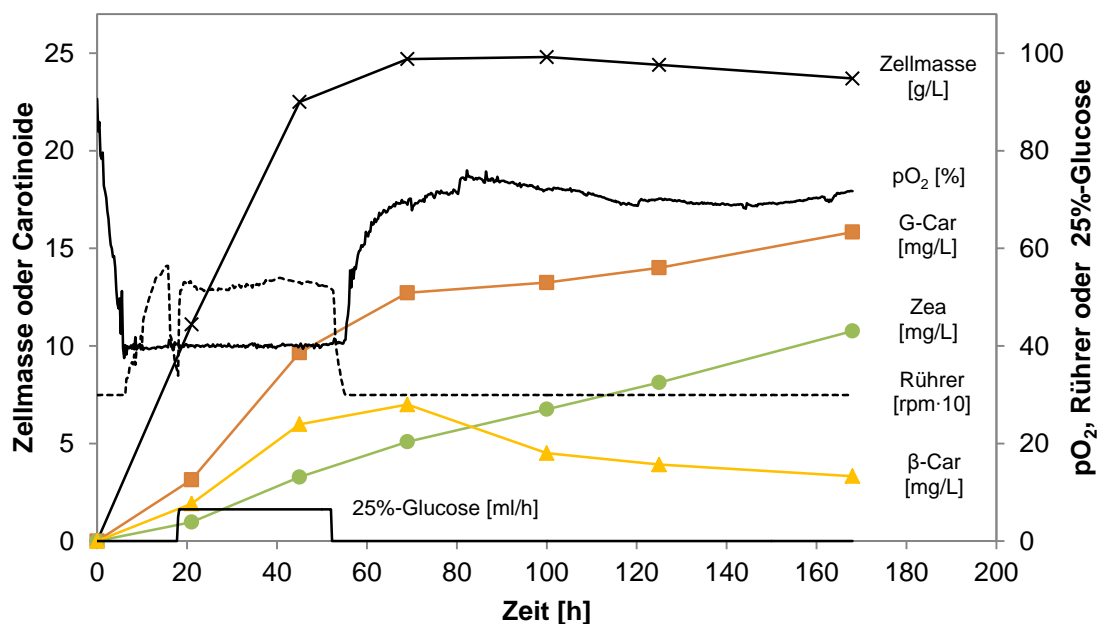


Abbildung 3.32: Wachstum und Carotinoidproduktion von PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S in einem Bioreaktor. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 2.6.7 beschrieben durchgeführt. Abkürzungen: Sauerstoffsättigung (pO₂), Gesamtcarotinoidgehalt (G-Car), Zeaxanthin (Zea), β-Carotin (β-Car).

Mit Beginn des Zellwachstums konnte eine rapide Abnahme der Sauerstoffkonzentration beobachtet werden, die nach 6 h durch die geregelte Erhöhung der Rührerdrehzahl konstant auf 40 % gehalten wurde. Nach 16 h führte die Regelung zu einem abrupten Abfall der Drehzahl, der eine verringerte Sauerstoffaufnahme der Zellen und folglich das Aufbrauchen der initialen Glucosemenge anzeigte. Daraufhin wurde zwischen 18 und 52 h eine 25%-Glucose-Lösung mit einer Rate von 6,5 ml/h hinzugegeben und die Konzentration bei 2 g/L gehalten. Nach dem Ende der Glucosezugabe erreichten die Zellen eine Dichte von 24 g/L (Schikanekolben: 5,1 g/L) und gingen von der linearen in die stationäre Wachstumsphase über. Gleichzeitig stieg die Sauerstoffkonzentration von 40 auf 72 %. Nach Beginn der stationären Phase konnte eine Verdopplung der Zeaxanthinkonzentration auf 10,8 mg/L beobachtet werden, während der β -Carotingehalt entsprechend von 7,0 auf 3,3 mg/L sank. Im Vergleich zur Kultivierung im Schikanekolben (2,2 mg/L) konnte somit eine fünf Mal höhere Zeaxanthinkonzentration erreicht werden. Der Stamm wies somit auch nach Erhöhung des Kulturvolumens und der Zelldichte eine stabile Zeaxanthinproduktion innerhalb eines biotechnologischen Prozesses auf.

3.6.2 Kultivierung des Phytoen-Hochproduzenten AXG-13 Δ crtl-(YB)₂-HMG-E-S

Nachdem die Produktion von Zeaxanthin im Bioreaktor erfolgreich war, sollte nun die Kultivierung des stabilisierten Phytoen-Hochproduzenten AXG-13 Δ crtl-(YB)₂-HMG-E-S unter Verwendung der gleichen Prozessparameter erfolgen. Hierbei wurde die Konzentration der Glucose-Lösung auf 10 % gesenkt, da die auf AXG-13 basierenden Stämme ein langsames Wachstum aufwiesen. Abbildung 3.33 stellt das Wachstum und die Phytoenproduktion dar.

Nach Beginn der Kultivierung zeigten die Zellen ein lineares Wachstum, das zwischen 45 und 75 h durch die Zugabe der 10%-Glucose-Lösung unterstützt wurde. Nach 72 h wechselten die Zellen in die stationäre Phase, wobei bis zum Ende der Kultivierung die Zelldichte von 8,4 auf 7,0 g/L (Schikanekolben 3,7 g/L) abnahm. Die Sauerstoffkonzentration fiel zunächst im Verlauf der Kultivierung bis sie zwischen 35 und 95 h durch Regelung der Rührerdrehzahl auf 40 % stabilisiert wurde und nach Beginn der stationären Phase einen Anstieg auf 75 % erfuhr. Der Verlauf der Phytoenkonzentration zeigte eine konstante Zunahme auf 72 mg/L und war somit im Vergleich zur Schikanekolben-Kultivierung (24 g/L) um das Dreifache erhöht. Auch bezogen auf die Zellmasse (10,4 zu 6,6 mg/g dw) wurde eine deutliche Steigerung erreicht.

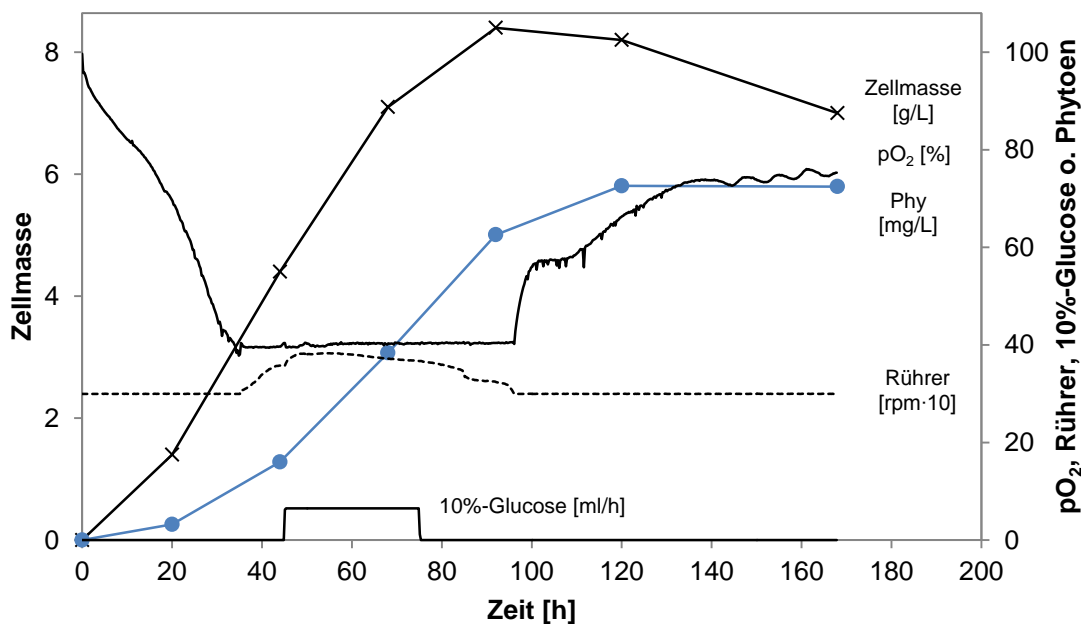


Abbildung 3.33: Wachstum und Phytoenproduktion von AXG-13Δctrl1-(YB)₂-HMG-E-S in einem Bioreaktor. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 2.6.7 beschrieben durchgeführt. Abkürzungen: Sauerstoffsättigung (pO₂), Phytoen (Phy).

3.7 Einsatz der Pentosen Arabinose und Xylose als alternative Kohlenstoffquellen

Die zum Wachstum verwendete Kohlenstoffquelle (C-Quelle) ist ein wichtiger Kostenpunkt innerhalb der biotechnologischen Produktion, bei der üblicherweise Glucose zum Einsatz kommt. Da *X. dendrorhous* die Pentosen Arabinose und Xylose, die aus pflanzlichem Abfallmaterial gewonnen werden können, als C-Quelle nutzen kann, sollte deren Einfluss auf das Zellwachstum und die Carotinoidproduktion untersucht werden. Hierzu wurde Arabinose- oder Xylose-haltiges YP-Medium verwendet und Kultivierungen im Schikanekolben durchgeführt. Nach Vorversuchen mit dem Wildtyp wurden die stabilisierten Zeaxanthin- und Phytoen-produzierenden Stämme untersucht.

Vorversuche mit dem Wildtyp

Im Vergleich mit der Kultivierung in YPD-Flüssigmedium (3% Glucose) wurde der Gesamtcarotinoidgehalt durch die Verwendung von YPA- (3% Arabinose) und YPX-Medium (3% Xylose) von 328 µg/g dw auf über 400 µg/g dw gesteigert (Abbildung 3.34 A). Das Wachstum in den Pentose-haltigen Medien führte zu höheren Zelldichten, wobei die Zellen in YPX-Medium ein verlangsamtes Wachstum innerhalb der ersten 48 Stunden zeigten (Abbildung 3.34 B). Bezogen auf das Kulturvolumen

wurden die Carotinoidgehalte von 9,0 µg/L (YPD) auf 15,0 µg/L (YPX) und 18,2 µg/L (YPA) verdoppelt.

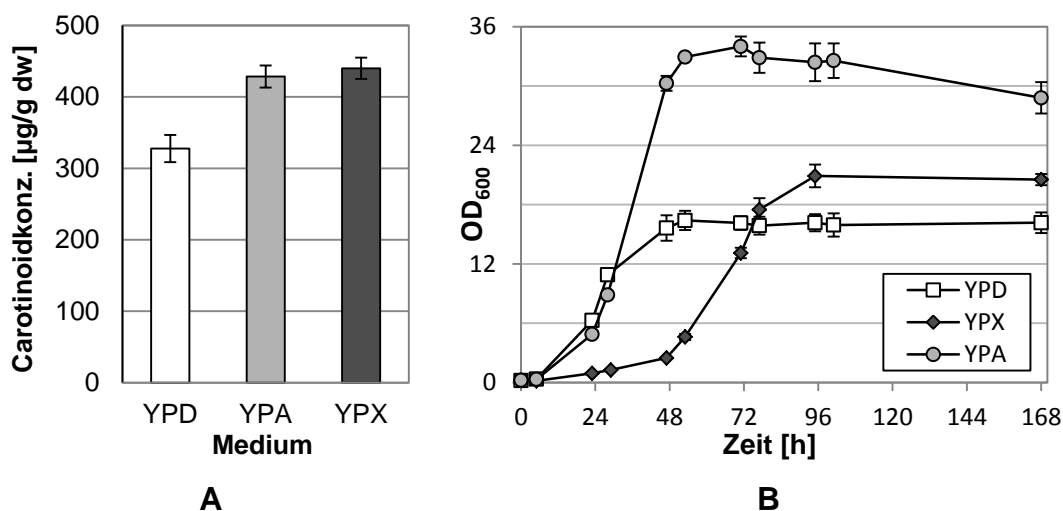


Abbildung 3.34: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf den Gesamtcarotinoidgehalt (A) und das Wachstum (B) des Wildtyps. Die Extraktion der Carotinoide und die Bestimmung der Carotinoidgehalte mittels HPLC wurde wie in den Abschnitten 2.8 und 2.10 beschrieben durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.6.6 beschrieben. Die berechneten Mittelwerte sind unter Angabe der Standardabweichung (n=3) dargestellt. Als C-Quellen wurden Glucose (YPD, 3 %), Arabinose (YPA, 3 %) und Xylose (YPX, 3 %) verwendet (Abschnitt 2.6.1).

Aus diesen Ergebnissen konnte ein positiver Effekt der Pentosen auf das Wachstum und den Carotinoidgehalt der Zellen festgestellt werden, weshalb im Anschluss die stabilisierten Zeaxanthin- und Phytoenproduzenten untersucht wurden, wobei der stärkste Einfluss auf die Carotinoidgebilde bei den generierten Hochproduzenten der AXG-13-Linie auftrat. Zusätzlich wurden der Zeaxanthin-Hochproduzent AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂-S mit einem Weizenstrohhydrolysat als Kohlenstoffquelle kultiviert, das zur Hälfte aus Xylose und einer Mischung aus Glucose, Arabinose, Galactose und Mannose bestand (Abschnitt 2.6.2).

Kultivierung von PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S und WT Δ crtI-(YB)₂-HMG-E-S

Aus der Abbildung 3.35 wird deutlich, dass eine Steigerung des Gesamtcarotinoidgehalts im Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S nach Kultivierung in den Pentose-haltigen Medien erreicht wurde. Er stieg von 598 auf 802 µg/g dw, wobei sich der Zeaxanthingehalt auf 530 µg/g dw und der Anteil andere Carotinoide auf 186 µg/g dw erhöhte. Auf letzteren entfiel das Intermediat β -Cryptoxanthin, dessen verstärktes Auftreten auf eine unvollständige β -Carotinhydroxylierung hinwies. Die Phytoenproduktion des Stamms WT Δ crtI-(YB)₂-HMG-E-S verblieb auf dem Niveau der YPD-Kultivierung.

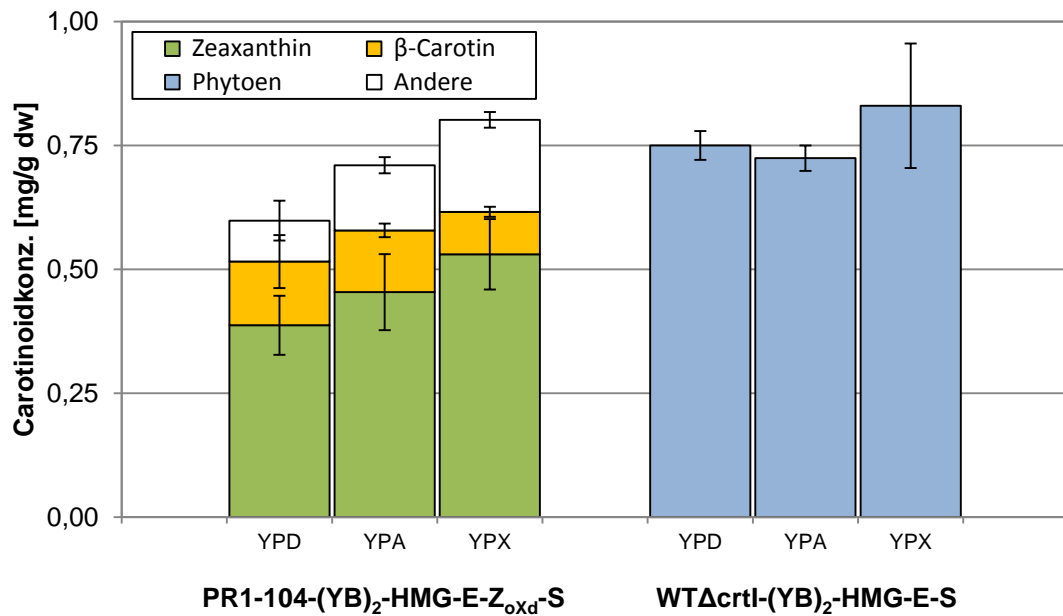


Abbildung 3.35: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Carotinoidzusammensetzung der Zeaxanthin- und Phytoen-produzierenden Stämme PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S und WTΔcrtl-(YB)₂-HMG-E-S. Die Extraktion der Carotinoide und die Bestimmung der Carotinoidverteilung mittels HPLC wurde wie in den Abschnitten 2.8 und 2.10 beschrieben durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte sind unter Angabe der Standardabweichung (n=3) dargestellt. Als C-Quellen wurden Glucose (YPD, 3 %), Arabinose (YPA, 3 %) und Xylose (YPX, 3 %) verwendet (Abschnitt 2.6.1).

Kultivierung von AXG-13-(Z_{oxd})₂-S und AXG-13Δcrtl-(YB)₂-HMG-E-S

Bei den Hochproduzenten zeigte sich ein deutlich stärkerer Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Carotinoidbiosynthese (Abbildung 3.36), die sich um 70 % im Phytoenproduzenten AXG-13Δcrtl-(YB)₂-HMG-E-S (11,1 mg/g) und um 92 % im Zeaxanthinproduzenten AXG-13Δasy-(Z_{oxd})₂-S (7,7 mg/g dw) nach Kultivierung in YPX-Medium erhöhte. Durch den Einsatz des Xylose-haltigen Weizenstrohhydrolysats (YPH-Medium) konnte der Gesamtcarotinoidgehalt um 53 % von 4,0 auf 6,1 mg/g dw gesteigert werden. Auffällig war bei allen drei untersuchten Pentose-haltigen Medien, dass sich der Zeaxanthingehalt nur um maximal 28 % steigerte, da der Großteil der Zunahme auf das Substrat β-Carotin entfiel, was auf eine Limitierung der enzymatischen Hydroxylierung hindeutete.

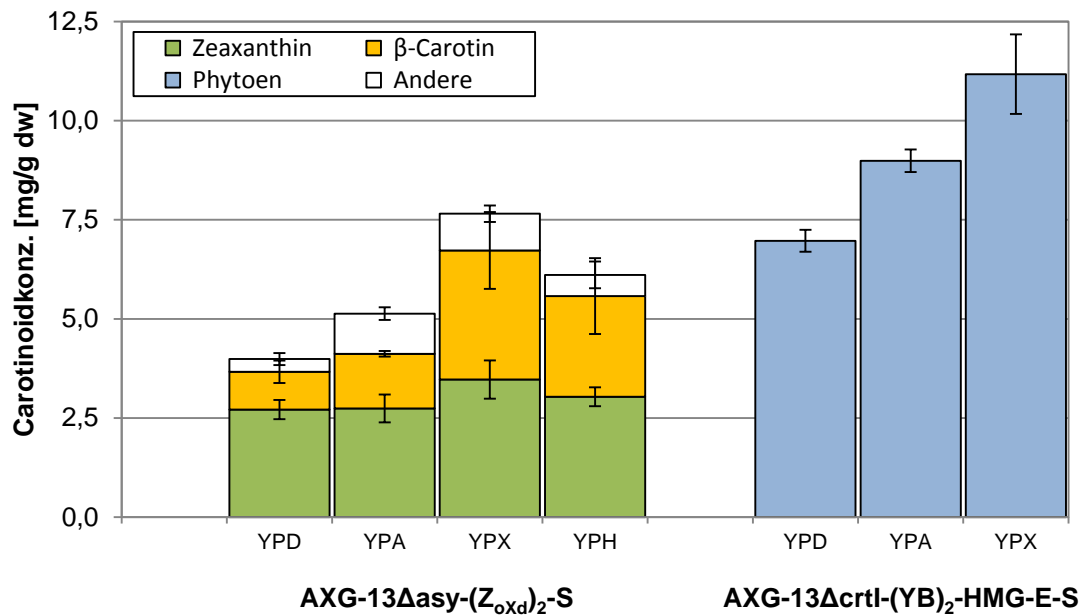


Abbildung 3.36: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Carotinoidzusammensetzung der Zeaxanthin- und Phytoen-Hochproduzenten AXG-13Δasy-(Z_{oxd})₂-S und AXG-13ΔcrtI-(YB)₂-HMG-E-S. Die Extraktion der Carotinoide und die Bestimmung der Carotinoidverteilung mittels HPLC wurde wie in den Abschnitten 2.8 und 2.10 beschrieben durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte sind unter Angabe der Standardabweichung (n=3) dargestellt. Als C-Quellen wurden Glucose (YPD, 3 %), Arabinose (YPA, 3 %) und Xylose (YPX, 3 %) und ein Weizenstrohhydrolysat (YPH, 3 %) verwendet (Abschnitt 2.6.1).

Als Ergebnis konnte die erfolgreiche Verwendung von Arabinose- und Xylose als Kohlenstoffquelle zur Carotinoidproduktion festgehalten werden, die in allen untersuchten Stämmen mindestens auf dem Niveau der Glucose-Kultivierungen verblieb oder teilweise erheblich gesteigert wurde. So war der Phytoengehalt des Stamms AXG-13ΔcrtI-(YB)₂-HMG-E-S der höchste, der im Zuge dieser Arbeit ermittelt werden konnte. Darüber hinaus konnte das Potential von Xylose-haltigen Hydrolysaten für die biotechnologische Anwendung aufgezeigt werden.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Spektrum der Carotinoidbiosynthese im Hefepilz *X. dendrorhous* um weitere biologisch aktive Carotinoide erweitert. Hierzu wurden Phytoen- (Abschnitt 4.2) und Zeaxanthin-Hochproduzenten (Abschnitt 4.3) durch genetische Modifikationen des Carotinoidstoffwechsels erzeugt und deren biotechnologische Anwendung untersucht. Da die Genomorganisation der auf den Wildtyp CBS6938 basierenden Ausgangsstämme maßgeblichen Einfluss auf die genetische Stabilität der erhaltenen Transformanten nahm und somit von essentieller Bedeutung für diese Arbeit war, sollen zunächst die erhaltenen Erkenntnisse über den Ploidiegrad besprochen werden.

4.1 Der Ploidiegrad von *X. dendrorhous* CBS6938

Der Ploidiegrad des *X. dendrorhous* Wildtyp CBS6938-Genoms war unklar, wobei widersprüchliche Beobachtungen gemacht wurden. Die Untersuchungen von Kucsera et al. (1998) legten ein diploides Genom nahe, während die Beobachtung von Wery et al. (1997) und Alcaíno et al. (2008) Hinweise auf ein haploides Genom lieferten. Demgegenüber kann der in dieser Arbeit erfolgte Nachweis heterozygoter Stämme (Abschnitt 4.1.1) und die anschließende Generierung homozygoter Stämme (Abschnitt 4.1.2) nur auf der Grundlage eines diploiden Genoms erklärt werden.

4.1.1 Nachweis heterozygoter Stämme

Nach genomischer Integration der Knock-Out-Konstrukte *ihi* und *aha* in das Genom des Wildtyps CBS6938 wurde eine heterozygote Ausprägung der *crtl*- und *asy*-Loci in den erhaltenen Transformanten nachgewiesen. Mit Hilfe des PCR-Nachweises konnten in der Transformante WT+*ihi* #4 das intakte *crtl*-Allel zusammen mit dem rekombinanten *ihi*-Allel amplifiziert werden (Abbildung 3.7, S. 50). In Analogie zu diesen Ergebnissen wurde auch für die Transformante WT+*aha* #6 eine heterozygote Ausprägung des *asy*-Locus nachgewiesen (Abbildung 3.15, S.60).

Das Auftreten heterozygoter Stämme ist auf die Existenz einer zweiten *crtl*- bzw. *asy*-Kopie zurückzuführen, die nicht durch die Integration der verwendeten Knock-Out-Konstrukte inaktiviert wurde. Zwar können durch Genduplikation (Magadum et al., 2013) auch innerhalb eines haploiden Genoms zwei Ausführungen vorhanden sein, allerdings weist die Genomsequenz von *X. dendrorhous* (Sharma et al., 2015)

lediglich eine einzige Genkopie auf. Folglich muss die zweite Genkopie auf einem homologen Chromosom eines diploiden Genoms lokalisiert sein.

Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit den von Kucsera et al. (1998) durchgeführten Untersuchungen des Lebenszyklus von CBS6938. Nach Kreuzung auxothropher Mutanten, zeigte der Großteil der erhaltenen Tetraden eine 4:0-Aufspaltung und Wiederherstellung der Prototrophie. Dies spricht deutlich für die Existenz diploider vegetativer Zellen, in denen das rezessive Auxothrophiemerkmal, durch das intakte homologe Chromosom ausgeglichen werden kann. Darüber hinaus lieferten Rekombinations- und Komplementationsversuche (Hermosilla et al., 2003), elektrophoretische Karyotypisierungen (Cifuentes et al., 1997) und durchflusszytometrische Bestimmungen des DNA-Gehalts (Medwid, 1998) anderer Wildtypstämme (ATCC 24230 und ATCC 24202) ebenfalls Hinweise für ein diploides Genom.

Im Gegensatz dazu ließen die Ergebnisse anderer Untersuchungen an CBS6838 (Wery et al., 1997; Alcaíno et al., 2008) ein haploides Genom vermuten, wobei die gemachten Beobachtungen unterschiedliche Interpretationen zulassen. Ein konkreter Nachweis der Genomorganisation fehlt, da die Untersuchungen nur auf der Ebene einzelner Chromosomen oder Gene durchgeführt wurden. So bestimmten Wery et al. (1997) die Chromosomenlänge nach der Integration von Fremd-DNA und konnten eine erhebliche Vergrößerung einzelner Chromosomen beobachten, die sich in einer Verschiebung der DNA-Bande nach Auftrennung mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese äußerten. Da an der ursprünglichen Position kein Chromosom verblieb, war die Existenz eines zweiten homologen Chromosoms unwahrscheinlich, woraus die Autoren auf ein haploides Genom schlossen. Auch von Alcaíno et al. (2008) wurde ein haploides Genom vermutet, da nach Deletion des Cytochrom-P450-Reduktase-Gens *crtR* keine heterozygoten Transformanten beobachtet werden konnten. Eine Erklärungsmöglichkeit für den Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit könnte der Verlust einzelner Chromosomen des diploiden Genoms (Aneuploidie) sein (Wertheimer et al., 2016). Aneuploide Zellen können in Abhängigkeit von dem untersuchten Gen eine heterozygote Ausprägung zeigen, während andere so genannte hemizygoten Gene aufgrund des fehlenden homologen Chromosomenpartners als haploid erscheinen. Diese Möglichkeit konnte auch von Kucsera et al. (1998) nach elektrophoretischer Karyotypisierung nicht ausgeschlossen werden und wurde ebenfalls von Loto et al. (2012) nach Auswertung zufälliger Mutagenisierungsexperimente und Genomintegrationsversuche angenommen. Eine andere Erklärung wurde von Hermosilla et al. (2003) für den diploiden Wildtyp ATCC 24230

gegeben, die eine natürliche Heterozygotie vermuteten, bei der ein Chromosom das Wildtyp-Allel und das andere ein nicht-funktionales Allel enthält.

Zur Klärung der Genomorganisation kann die Betrachtung von der Gen- auf die Genomebene verlagert werden. Interessanterweise konnten Sharma et al. (2015) im Zuge der Genomsequenzierung keine Hinweise für ein diploides Genom finden, da eine effiziente Genomassemblierung erfolgte. Die Assemblierung diploider Genome stellt für gewöhnlich eine erhebliche Herausforderung dar, da kurze DNA-Sequenzen anhand identischer Sequenzbereiche zusammengesetzt werden müssen, homologe Chromosomen aber zufällige Sequenzvariationen (Polymorphismen) besitzen, die den Zusammenbau erheblich erschweren (Bodily et al., 2015). Eine mögliche Antwort auf die Frage, warum dieser Effekt bei CBS6938 nicht beobachtet werden konnte, könnte ebenfalls mit dem Verlust einzelner homologer Chromosomen beantwortet werden und zusätzlich dadurch, dass das verbliebene diploide Genom eine geringe Polymorphismusrate besitzt.

4.1.2 Generierung homozygoter Stämme

Die These eines diploiden Genoms wird durch die erfolgte Generierung homozygoter Stämme aus den erhaltenen Knock-Out-Transformanten und aus den nach Sporulation erhaltenen pPR2TN-Transformanten weiter unterstützt.

Knock-Out-Transformanten

Aus der heterozygoten Transformante WT+ih1 #4 konnten nach Kultivierung und Ausstrich die roten und weißen homozygoten Subtransformanten WT+ih1 #4r (Abbildung 3.6, S. 49) und WT+ih1 #4w (Abbildung 3.4, S. 46) generiert werden, die nur das intakte *crtI*-Allel bzw. das rekombinante ih1-Allel besaßen (Abbildung 3.7, S. 50). Dieses Verhalten lässt sich durch Rekombinationsereignisse zwischen den homologen Chromosomen erklären, die ein diploides Genom voraussetzen. Der Prozess wird als mitotische Rekombination bezeichnet (Symington et al., 2014) und in Abbildung 4.1 am Beispiel des *crtI*-Gens verdeutlicht.

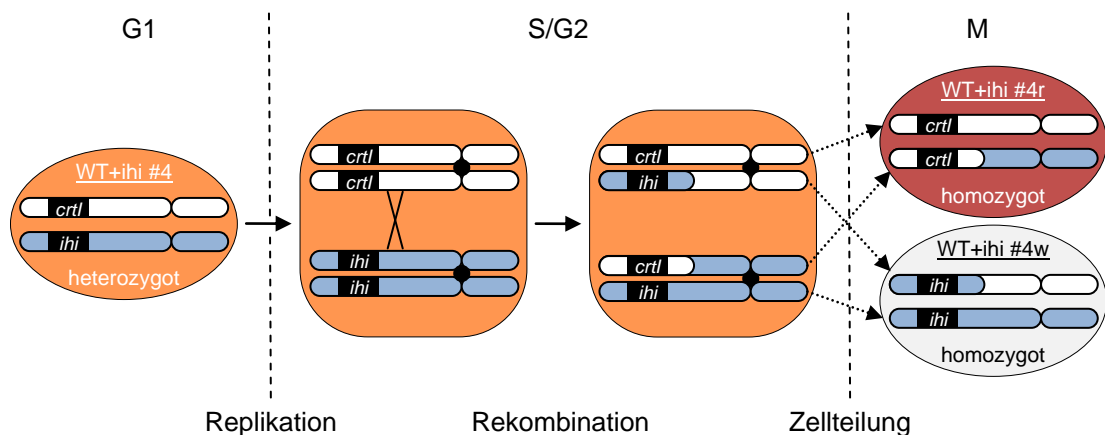


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Generierung homozygoter Stämme durch mitotische Rekombination am Beispiel des *crtI*-Gens der Transformante WT+ihi #4. Die orange Transformante WT+ihi #4 besitzt eine heterozygote Ausprägung des *crtI*-Locus aufgrund der Integration des *ihi*-Konstrukts in eines der homologen Chromosomen (blau dargestellt). Im Verlauf des Zellzyklus erfolgt die Replikation der Chromatide in der S-Phase. Durch zufälliges Crossing-Over werden die *crtI*-Loci zwischen den homologen Chromosomen rekombiniert. Im Zuge der Mitose (M) werden die Chromatide auf Mutter- und Tochterzelle verteilt und es entstehen rote und weiße homozygote Stämme, die nur das *crtI*- (WT+ihi #4r) oder das *ihi*-Allel (WT+ihi #4w) tragen.

Mitotische Rekombinationsereignisse werden durch zufällige DNA-Doppelstrangbrüche ausgelöst, wobei der Zeitpunkt des DNA-Schadens innerhalb des Zellzyklus entscheidend ist (Lee et al., 2009). Entsteht der Schaden nach der Genomreplikation, kann die Reparatur mit Hilfe des unbeschädigten Schwesterchromatids ohne Sequenzveränderungen erfolgen. Entsteht der Schaden hingegen vor der Genomreplikation, entstehen zwei beschädigte Schwesterchromatide, für deren Reparatur das homologe Chromosom als Vorlage verwendet werden muss.

Bezogen auf das in dieser Arbeit untersuchte *crtI*-Gen werden in der heterozygoten Transformante WT+ihi #4 die *crtI*- und *ihi*-Allele zwischen den homologen Chromosomen durch Crossing-Over ausgetauscht (Abbildung 4.1). Es entstehen ungleiche Schwesterchromatide, die anschließend im Zuge der Mitose zufällig auf die Tochterzellen verteilt werden, wobei homozygote Zellen entstehen können. Hierbei bilden jene Zellen, die ausschließlich das intakte *crtI*-Allel besitzen, den roten Phänotyp der Subtransformante WT+ihi #4r, während die weißen Zellen der Subtransformante WT+ihi #4w homologe Chromosomen besitzen, die nur das *ihi*-Allel tragen.

Die Selektion der homozygoten Wildtyp- und AXG-13-Transformanten erfolgte durch Subkultivierung und Ausstrich analog zu der von Niklitschek et al. (2012) beschriebenen Doppel-Rekombinations-Methode. Diese Methode beruht auf der hohen Rekombinationsrate von *X. dendrorhous* und führt zum Auftreten spontaner homozygoter Zellkolonien, die anhand ihrer Farbe erkennbar sind. In der Tat liegt

die in dieser Arbeit bestimmte Rekombinationsrate bei 0,3 % (Abbildung 3.4, S. 46) und ist somit um mehr als den Faktor 100 höher im Vergleich zu anderen Pilzen wie *S. cerevisiae* (Sheltzer et al., 2011). Die Möglichkeit zur Farbselektion stellt hierbei den entscheidenden Vorteil dieser Methode dar, da dadurch eine einfache und effiziente Selektion der großen Anzahl der nach Ausstrich auftretenden Kolonien ermöglicht wird. Die *crtI*- und *asy*-Gene fungieren in diesem Fall als Reportergene, deren vollständige oder verminderte Expression den homo- oder heterozygoten Zustand der entsprechenden Loci anzeigt.

pPR2TN-Transformanten

Nach Kultivierung der Zellen von PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oXd} in antibiotikafreiem Medium kam es zu einer erheblichen Verringerung der Carotinoid- bzw. der Zeaxanthinkonzentration (Abschnitt 3.5.1, S. 83). Auch dieses Verhalten unterstützt die These eines diploiden Genoms, bei dem die Integration der auf pPR2TN basierenden Transformationsvektoren zu einer heterozygoten Ausprägung der rDNA-Bereiche führt. Durch spontane mitotische Rekombinationsprozesse können die integrierten Transgene *crtYB*, *HMGR*, *crtE* und *crtZ_{oXd}* vollständig oder teilweise aus dem Genom entfernt werden. Die daraus resultierenden Zellen besitzen einen Wachstumsvorteil gegenüber den rekombinanten Ursprungszellen, da bei ihnen die Expression der Resistenzgene und der zusätzlichen Carotinoidgene reduziert ist. Ohne Selektionsdruck kommt es mit steigender Generationszahl zum allmählichen Verlust dieser Transgene. Es entsteht eine Mischkultur aus heterozygoten und homozygoten Zellen, die an einer reduzierten Genaktivität erkennbar ist.

Im Gegensatz zu den Knock-Out-Transformanten resultierte die mitotische Rekombination bei den pPR2TN-Transformanten aber nicht in einer Veränderung des Phänotyps, da die Zellen keine Farbveränderung in Abhängigkeit von der Anzahl integrierter Transgene zeigten. Legt man aber die für die Knock-Out-Transformanten bestimmte Rekombinationsrate von 0,3 % zu Grunde, kann der Anteil homozygoter Zellen y in Abhängigkeit der Generationszahl x näherungsweise durch die e -Funktion $y = e^{-0,003 x}$ beschrieben werden. Bereits nach 232 Generationen liegen nur noch 50 % der Zellen der Kultur in heterozygoter Ausprägung vor, deren Anteil nach weiteren 190 Generationen auf 10 % sinkt. Hierbei handelt es sich zwar um eine grobe Näherung, da die tatsächliche Rekombinationsrate und das Zellwachstum von vielen Faktoren abhängig sind. Trotzdem verdeutlicht diese Berechnung anschaulich in welchem kurzen Zeitraum es in einem erheblichen Anteil der kultivierten Zellen zum Verlust der Transgene kommen kann und gibt eine Erklä-

rung für die deutlich reduzierte Carotinoidkonzentration der Zellen von PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd} nach Kultivierung in antibiotikafreiem Medium.

Das Vorliegen eines diploiden Chromosomensatzes verursacht somit die Instabilität der heterozygoten Genintegration, ermöglicht aber gleichzeitig die Stabilisierung der erhaltenen Transformanten durch Induktion der Sporenbildung von PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd} (Abbildung 3.31, S. 84). Nach Webster & Weber (2007) beginnt die geschlechtliche Vermehrung diploider *X. dendrorhous*-Zellen mit der Fusion zweier Zellen (Plasmogamie) und der anschließenden Verschmelzung der Zellkerne (Karyogamie). Die entstehende tetraploide Zygote bildet lange Basidien aus, in denen die Meiose stattfindet. Durch die dabei stattfindende Reduktionsteilung werden die homologen Chromosomen rekombiniert und es entstehen diploide Basidiosporen. Mit Bezug auf die integrierten Transgene gibt es hierbei eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten, da die als Integrationsorte dienenden rDNA-Bereiche auf drei verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (Nagy et al., 1994). Dabei kann es zur Ausbildung homozygoter Sporen, in denen alle homologen Chromosomenpaare Träger der Transgene sind, kommen.

Als Folge der meiotischen Rekombination zeigten die nach Sporulation erhaltenen Zellen von PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd} eine große Variation des Gesamtcarotinoidgehalts. Hierbei wies der Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S zwar eine leichte Verringerung der Anzahl integrierter *crtYB*- und *crtZ*-Gene auf (Tabelle 3.3, S. 85), besaß aber eine stabile Carotinoidbiosyntheseleistung während der Bioreaktor-Kultivierung in antibiotikafreiem Medium (Abbildung 3.32, S. 88). Auf der Grundlage der Überlegungen zur Instabilität der heterozygoten Transformanten ist die erfolgte Stabilisierung auf eine homozygote Genintegration zurückzuführen, die durch mitotische Rekombination nicht verändert werden konnte. Der Erfolg dieser Stabilisierungs-Methode wurde ebenfalls für die auf AXG-13 basierenden Zeaxanthin- und Phytoen-produzierenden Stämme gezeigt (Tabelle 3.4, S. 86).

Abschließend kann aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse die Existenz eines haploiden Genoms in *X. dendrorhous* CBS6938 und AXG-13 ausgeschlossen werden. Dagegen setzen das Auftreten heterozygoter Stämme mit intermediärem Phänotyp und die Instabilität der Genintegration zusammen mit der erfolgten Überführung dieser Transformanten zu stabilen Homozygoten die Existenz eines diploiden Genoms zwingend voraus.

4.2 Generierung eines Phytoen-Hochproduzenten

Aufgrund seiner Schutzwirkung gegen die schädliche Wirkung der UV-Strahlung (Photoprotektion) besteht ein wachsender Bedarf an Phytoen für die menschliche Gesundheit. Da die chemische Synthese nicht etabliert ist, kommt der Entwicklung eines biotechnologischen Produktionssystems ein erhöhtes Interesse zu. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit ein Phytoen-Hochproduzent durch die genetische Modifikation der Carotinoidbiosynthese des Astaxanthin-Hochproduzenten *X. dendrorhous* AXG-13 hergestellt. Zusätzlich wurde der Wildtyp CBS6938 als Testsystem verwendet. Hierzu wurden die Phytoen-Desaturase in beiden Stämmen vollständig inaktiviert und anschließend der Phytoengehalt durch Überexpression von drei Carotinoidbiosynthesegenen gesteigert.

4.2.1 Inaktivierung der Phytoen-Desaturase *CrtI*

Die Phytoen-Desaturase *CrtI* katalysiert die Umsetzung des farblosen Phytoens zum roten Lycopin und 3,4-Didehydrolycopin, die die Ausgangsmoleküle des mono- und dizyklischen Weges der Carotinoidbiosynthese von *X. dendrorhous* bilden (Abbildung 1.5, S. 10). Aufgrund des diploiden Genoms (Abschnitt 4.1) führte der *crtI*-Knock-Out des Wildtyps und von AXG-13 zur Ausbildung hetero- und homozygoter Transformanten mit veränderter Carotinoidzusammensetzung.

In der heterozygoten Transformante WT+ih1 #4 wurde eine deutlich geringere Konzentration des monozyklischen 3-Hydroxy-4-ketotorulins festgestellt, während Phytoen nicht akkumulierte (Abbildung 3.5, S. 48). Dieses Verhalten lässt sich auf die unterschiedliche Spezifität der Phytoen-Desaturase für Phytoen und Lycopin zurückführen. Da das Enzym nur eine geringe Effizienz zur Synthese von 3,4-Didehydrolycopin besitzt (Verdoes et al., 2003), wurde bei reduzierter Enzymaktivität Phytoen zwar vollständig zu Lycopin desaturiert, letzteres aber anschließend vermehrt dem monozyklischen Biosyntheseweg durch die Zyklisierungsreaktionen der Lycopin-Zyklase *CrtYB* entzogen. In dem homozygoten Deletionsstamm WT Δ *crtI* (Transformante WT+ih1 #1) hingegen lag eine vollständige Inaktivierung vor, da das Substrat Phytoen als einziges Carotinoid akkumulierte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Niklitschek et al. (2008), die nach *crtI*-Inaktivierung des diploiden *X. dendrorhous* Stamms ATCC 24230 ebenfalls hetero- und homozygote Transformanten und Phytoen-Akkumulation nachwies. Folgerichtig wies die rote Transformante WT+ih1 #3 keine Veränderungen aufgrund der nicht erfolgten ih1-Integration (Abbildung 3.7, S. 50) auf. Die vorhandene Resistenz gegen den Se-

lektionsmarker Hygromycin ist vermutlich auf eine spontane Mutation der kleinen ribosomalen 70S-Untereinheit, dem Wirkort von Hygromycin (Borovinskaya et al., 2008), zurückzuführen, die die Hygromycinbindung negativ beeinflusst. Das Auftreten spontaner Hygromycin-resistenter Zellen mit geringer Frequenz wurde auch für andere Pilze wie *Yarrowia lipolytica* berichtet (Cordero Otero & Gaillardin, 1996).

Interessanterweise führte bereits die unvollständige *CrtI*-Inaktivierung des Hochproduzenten AXG-13 in der heterozygoten Transformante AXG-13+*ihi* #1 zur Akkumulation von Phytoen (Abbildung 3.9, S. 53). Dieser Umstand weist auf die hohe Aktivität der Phytoensynthese in AXG-13 hin, da die Zellen der Transformante im Gegensatz zu WT+*ihi* #4 nicht in der Lage waren, durch die Expression des verbliebenen *crtI*-Allels die Desaturierung aller Phytoenmoleküle zu ermöglichen. Der anschließend generierte homozygote Deletionsstamm AXG-13 Δ *crtI* wies einen Phytoengehalt von 3,6 mg/g auf, der daraufhin durch die Überexpression von Carotinoidgenen deutlich gesteigert wurde.

4.2.2 Überexpression der Gene *crtYB*, *HMGR* und *crtE*

Der Ausgangsstamm AXG-13 besitzt eine enorm gesteigerte Carotinoidbiosynthese als Folge der wiederholten NTG-Behandlung. Die Charakterisierung (Abschnitt 3.1, S. 41) zeigte deutlich, dass darüber hinaus auch andere Stoffwechselwege betroffen sein müssen, da sich der Stamm im Vergleich zum Wildtyp durch eine veränderte Zellmorphologie und ein verändertes Wachstumsverhalten kennzeichnete. Welche Genmutationen für diese Effekte verantwortlich sind ist unbekannt, jedoch konnte von Gassel et al. (2014) gezeigt werden, dass durch die Überexpression der Gene *crtYB*, *HMGR* und *crtE* eine weitere Steigerung der Carotinoidbiosynthese möglich ist. Daher wurde diese Strategie auch für den in dieser Arbeit erhaltenen Phytoenproduzenten AXG-13 Δ *crtI* angewandt, indem zunächst die Limitierung der Phytoensynthese durch *crtYB*-Überexpression aufgehoben und anschließend die Versorgung der Carotinoidbiosynthese mit Vorläufermolekülen durch *HMGR*- und *crtE*-Überexpression erhöht wurde.

Die Synthese von Phytoen wird mittels Fusion von zwei Molekülen Geranylgeranylpyrophosphat durch die Phytoen-Synthase des bifunktionellen Proteins *CrtYB* katalysiert (Abbildung 1.5, S. 10) und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Carotinoidbiosynthese in *X. dendrorhous* dar. Nach Überexpression wurde von Verdoes et al. (2003) eine 1,8-fache Steigerung des Gesamtcarotinoidgehalts von CBS6938 festgestellt. Darüber hinaus konnten Ledetzky et al. (2014) einen kontinuierlichen Anstieg des Carotinoidgehalts nach sukzessiver

crtYB-Integration erreichen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen stieg der Phytoengehalt der Deletionsstämme $WT\Delta crtI$ und $AXG-13\Delta crtI$ in Abhängigkeit von der Anzahl zusätzlicher Genkopien. Während die Integration von vier Genkopien im Stamm $WT\Delta crtI-(YB)_2$ nur eine moderate Steigerung von 16 % hervorrief (Abbildung 3.11, S. 55), führten die 16 integrierten Genkopien im Stamm $AXG-13\Delta crtI-(YB)_2$ zu einer erheblichen Steigerung von 67 % (Abbildung 3.12, S. 56).

Die Gene *HMGR* und *crtE*, die an der Biosynthese von Vorläufermolekülen beteiligt sind, stellen weitere Angriffspunkte zur Steigerung des Carotinoidgehalts dar. Die HMG-CoA-Reduktase HMGR katalysiert die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat, während die GGPP-Synthase CrtE an der Synthese von Geranylgeranylpyrophosphat beteiligt ist (Abbildung 1.4, S. 9). Von Verwaal et al. (2007) wurde berichtet, dass die Überexpression der katalytischen Domäne von *HMG1* in Carotinoid-produzierenden *S. cerevisiae*-Zellen zu einer siebenfachen Erhöhung des Carotinoidgehalts führt. Nach Überexpression von *crtE* in *X. dendrorhous* konnten Breitenbach et al. (2011) und Alcaíno et al. (2014) eine bis zu 1,5-fache Erhöhung des Carotinoidgehalts nachweisen. Durch die in dieser Arbeit angewandte kombinierte Überexpression beider Gene im Phytoen-Hochproduzenten $AXG-13\Delta crtI-(YB)_2$ -HMG-E wurde eine 25-prozentige Erhöhung des Phytoengehalts auf 7,5 mg/g dw erreicht (Abbildung 3.12, S. 56).

4.2.3 Phytoenproduktion in einem Bioreaktor

Aufgrund des diploiden Genoms wies der Stamm $AXG-13\Delta crtI-(YB)_2$ -HMG-E eine heterozygote Ausprägung der integrierten Gene *crtYB*, *HMGR* und *crtE* und als Folge mitotischer Rekombination eine instabile Carotinoidbiosynthese auf (Abschnitt 4.1.2). Durch Induktion der Sporulation und Selektion der ausgekeimten Basidiosporen wurde der homozygote Stamm $AXG-13\Delta crtI-(YB)_2$ -HMG-E-S anhand seiner stabilen Phytoenbiosyntheseleistung in antibiotikafreien Medium identifiziert (Tabelle 3.4, S. 86). Nach Kultivierung in einem Bioreaktor erreichten die Zellen eine Dichte von 7,0 g/L bei einem Phytoengehalt von 10,4 mg/g dw (Abbildung 3.33, S. 90).

Diese Werte belegen die erfolgreiche Stabilisierung und zeigen, dass durch das angewendete Fed-Batch-Verfahren eine Steigerung der Phytoenproduktion auf zwei Wegen, durch Erhöhung der Zellmasse und der intrazellulären Carotinoidkonzentration, möglich ist. Von Liu & Wu (2008) wurde auf der Grundlage eines kinetischen Modells ein optimaler Fed-Batch-Prozess entwickelt, der aus drei Abschnitten, einem anfänglichen Batch-Prozess, gefolgt von einer Fed-Batch Periode mit Glucosezugabe und einem finalen Batch-Prozess besteht. Durch dieses Vorgehen werden die

negativen Auswirkungen des in *X. dendrorhous* auftretenden Crabtree-Effekts (Reynders et al., 1997) verhindert. Demnach führen hohe Glucosekonzentrationen auch unter aeroben Bedingungen zur unvollständigen Glucoseverwertung durch Gärung mit Ethanol als Endprodukt und als Folge zu einer Verringerung der Biomasse und der Carotinoidproduktion. Dieses Phänomen wird auf einen Überflussmetabolismus (engl. overflow metabolism) aufgrund einer limitierten respiratorischen Kapazität zurückgeführt (Rodríguez-Sáiz et al., 2010; Schmidt et al., 2011). Folglich wurde der Bioreaktorprozess von AXG-13 Δ crtl-(YB)₂-HMG-E-S mit einer Glucosekonzentration von lediglich 10 g/L gestartet und nach Verbrauch das Zellwachstum durch die kontinuierliche Zugabe von Glucose aufrechterhalten, wobei die Glucosekonzentration unter 2 g/L gehalten wurde. Nach dem Ende des Zellwachstums setzte sich die Carotinoidbiosynthese in der stationären Phase fort. Durch dieses Verfahren wurde eine hohe Produktivität in Bezug auf das im Kulturmedium vorhandene Phytoen erreicht, dessen Gehalt (72 mg/L) im Vergleich zur Schikane-Kultivierung (24 g/L) um das Dreifache gesteigert wurde.

Im Vergleich zu anderen bekannten Phytoenproduzenten konnte mit dem in dieser Arbeit hergestellten Prototyp eine deutlich gesteigerte Phytoenbiosynthese erreicht werden. So konnten von Barbachano-Torres et al. (2014) nach NTG-Behandlung ebenfalls weiße *X. dendrorhous* Stämme erhalten werden, deren Phytoengehalt mit durchschnittlich 2,5 mg/g dw aber deutlich geringer ausfiel. Auch von dem filamentösen Pilz *Phycomyces blakesleeanus* wurde nach Hemmung der Phytoen-Desaturase durch Diphenylamin oder von weißen Mutanten ein Phytoengehalt auf diesem Niveau berichtet (Clarke et al., 1983). Durch Überexpression der Phytoen-Synthese in Tomaten (*Solanum lycopersicum*) war es zwar möglich den Gehalt mehr als zu verdoppeln, dies resultierte aber in einer Akkumulation von lediglich 0,24 mg/g dw Phytoen, das 11 % der Gesamtcarotinoidmenge bildete und durch andere höher desaturierte Carotinoide wie Phytofluoren oder β -Carotin verunreinigt war (Fraser et al., 2007). Im Gegensatz dazu stellt der in dieser Arbeit generierte Phytoen-Hochproduzent AXG-13 Δ crtl-(YB)₂-HMG-E-S eine vielversprechende Möglichkeit dar, um reines biotechnologisch produziertes Phytoen zu gewinnen.

4.3 Generierung eines Zeaxanthin-Hochproduzenten

Zeaxanthin ist ein essentieller Bestandteil des menschlichen Sehapparats, wird aber nur von wenigen Nahrungspflanzen in vergleichsweise geringer Konzentration akkumuliert. Zwar sind Pilze nicht zur Biosynthese von Zeaxanthin fähig, jedoch kann

das Carotinoid durch die enzymatische Hydroxylierung aus β -Carotin synthetisiert werden. Um auf dieser Grundlage einen Zeaxanthin-Hochproduzenten aus AXG-13 zu schaffen, erfolgte zunächst eine 2-Schritt-Strategie, indem die Astaxanthin-Synthase inaktiviert und anschließend der vorhandene β -Carotinpool zu Zeaxanthin durch die heterologe Expression des Gens *crtZ_{oXd}*, das für eine β -3,3'-Hydroxylase codiert, umgesetzt wurde. Zusätzlich wurden der Wildtyp CBS6938 und der β -Carotinproduzent PR1-104-(YB)₂-HMG-E als Testsysteme verwendet. Anschließend wurden beide Modifikationen in einem Schritt (Knock-In) durchgeführt.

4.3.1 Inaktivierung der Astaxanthin-Synthase Asy

Die bifunktionale Astaxanthin-Synthase Asy katalysiert die Einführung von zwei Hydroxy- und zwei Ketogruppen an die β -Iononringe von β -Carotin und Torulin (Ojima et al., 2006). Aus dieser Reaktion entstehen Astaxanthin und 3-Hydroxy-4-ketotorulin. In Analogie zum *crtI*-Gen führte auch der *asy*-Knock-Out des Wildtyps und von AXG-13 zur Ausbildung hetero- und homozygoter Transformanten mit veränderter Carotinoidzusammensetzung.

Hierbei hatte die unvollständige Inaktivierung der Astaxanthin-Synthase in den heterozygoten Transformanten WT+aha #6 (Abbildung 3.14, S. 59) und AXG-13+aha #7 (Abbildung 3.17, S. 61) die Akkumulation von Torulin, β -Carotin und dessen sauerstoffhaltigen Derivaten Echinenon, 3-Hydroxyechinenon und Adonirubin zur Folge. Bei letzteren drei Carotinoiden handelt es sich um Intermediate der Astaxanthinsynthese, die aus der C4-Ketolierung und der C3-Hydroxylierung beider β -Iononringe entstehen (Abbildung 1.5, S. 10). Das Auftreten der Substrate Torulin und β -Carotin sowie der Intermediate ist auf die reduzierte Asy-Enzymaktivität als Folge des inaktivierten *asy*-Allels zurückzuführen, weshalb die notwendigen Oxigenierungen zur Bildung von 3-Hydroxy-4-ketotorulin und Astaxanthin nicht – oder nur zu einem gewissen Teil – ausgeführt wurden. Nach vollständiger Inaktivierung war keine Astaxanthinsynthese in den homozygoten Deletionsstämmen WT Δ *asy* und AXG-13 Δ *asy* nachweisbar, da lediglich die sauerstofffreien Carotine β -Carotin und Torulin auftraten. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Niklitschek et al. (2008), die ebenfalls eine Steigerung des β -Carotingehalts und das Auftreten ketolierter und hydroxylierter Intermediate berichteten. Der erhaltene β -Carotin-Hochproduzent AXG-13 Δ *asy* produzierte 4,8 mg/g dw β -Carotin und stellte somit einen idealen Ausgangspunkt für die Biosynthese von Zeaxanthin dar.

4.3.2 Expression des β -3,3'-Hydroxylase-Gens $crtZ_{oXd}$

Die enzymatische Umwandlung vom β -Carotin zu Zeaxanthin erfolgte mit einer codon-optimierten Version der β -3,3'-Hydroxylase CrtZ des Proteobakteriums *Brevundimonas* SD212 (Nishida et al., 2005), dessen heterologe Expression in *E. coli* eine hohe katalytische Effizienz im Vergleich zu anderen Hydroxylasen aus *Paracoccus* oder *Pantoea ananatis* zeigte (Choi et al., 2006). Um auch im Pilz *X. dendrorhous* eine effiziente Expression sicherzustellen, erfolgte die Vermeidung seltener Codons durch die Anpassung der Gensequenz an das Codonprofil (Gustafsson et al., 2004). Die Analyse des Stamms PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oXd} zeigte eine hohe Enzymaktivität, da 90 % des im Ausgangsstamm vorhandenen β -Carotins zu Zeaxanthin umgesetzt wurden (Abbildung 3.21, S. 66). Hierbei deutete der Nachweis von zwei Zeaxanthin-Fettsäureestern darauf hin, dass eine unspezifische Esterase in *X. dendrorhous* in der Lage ist, das neu gebildete Zeaxanthin zu metabolisieren. Auch in natürlichen Zeaxanthinquellen, wie orange Paprika, treten üblicherweise Mono- und Diester mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge (C12 bis C18) auf (Weller & Breithaupt, 2003), wobei die an der Veresterung beteiligten Enzyme jedoch unbekannt sind. In *X. dendrorhous* bilden Ölsäure (C18:1, 50 %), Linolsäure (C18:2, 26 %) und Palmitinsäure (C16:0, 16 %) die Hauptfettsäuren (Miao et al., 2011), die als wahrscheinlichste Substrate für die Veresterung in Betracht kommen. Anhand des Elutionsverhaltens der detektierten Zeaxanthin-Fettsäureester lässt sich vermuten, dass Zea-E1 als Monoester und Zea-E2 aufgrund der höheren Retentionszeit als Diester vorliegt.

Die Generierung des Stamms PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oXd} erfolgte mit Hilfe des Mono-Vektors pPR2TNo_crtZ_{oXd}, der nur eine Kopie des $crtZ_{oXd}$ -Gens enthielt. Zur Expression im β -Carotin-Hochproduzenten AXG-13 Δ asy wurden zusätzlich drei verschiedene Duo-Vektoren mit zwei Genkopien verwendet, die zur Integration höherer Genkopienzahlen führten. Hierbei zeigte sich folgender Effekt: Je mehr $crtZ_{oXd}$ -Kopien im Genom vorlagen, desto höher war der Zeaxanthinumsatz (Abbildung 3.24, S. 71). Dies deutet darauf hin, dass mehr Gene zu einer höheren Expression und folglich zu mehr Enzymen und einer gesteigerten intrazellulären Hydroxylase-Aktivität führen. Einschränkend ist aber zu erwähnen, dass dieser Zuwachs nicht linear war. Während vier $crtZ_{oXd}$ -Kopien zu einem Zeaxanthinanteil von 52 % führten, wurden durch sechs Kopien 69 % und durch zehn Kopien 74 % erreicht. Die Gründe hierfür liegen wahrscheinlich in einer negativen Rückkopplung der Genexpression. Die regulativen Mechanismen, die die Expression eines heterologen Gens beeinflussen, sind vielfältig und decken alle Bereiche der Gen-, RNA- und Protein-

ebene ab (Romanos et al., 1992). So ist es möglich, dass wenn mehr mRNA eines Gens in der Zelle vorhanden ist, dessen Transkription gezielt herunterreguliert wird oder dass mit einer erhöhten Translation auch ein gesteigerter Proteinabbau einhergeht. Dies hat zur Folge, dass sich das Expressionsniveau nicht linear durch Erhöhung der Genkopienzahl steigern lässt.

Um mögliche transkriptionelle Regulationseinflüsse zu untersuchen, unterschieden sich die Strukturen der Duo-Vektoren hinsichtlich der verwendeten Promotoren und der Lage der zweiten *crtZ_{oxd}*-Kassette (Abbildung 3.22, S. 68). Kam es aufgrund der erhöhten Transkription des *gpd*-Promotors zu dessen gezielter Regulation, könnte die Verwendung eines anderen Promotors Abhilfe schaffen. Aus dieser Überlegung wurde der Vektor pPR2TNo_(*crtZ_{oxd}*)_{2g/a} verwendet, in dem die zweite *crtZ_{oxd}*-Kopie unter der Kontrolle des *adh4*-Promotors stand. Durch Fluoreszenzuntersuchungen konnten Hara et al. (2014) zeigen, dass durch die Nutzung dieses Promotors die heterologe Expression des Reportergens *gfp* in *X. dendrorhous* um das 14-fache im Vergleich zu *gpd* erhöht ist. Darüber hinaus kann die unmittelbare Nähe zweier Promotoren zu einer direkten Beeinflussung aufgrund der Konkurrenz um Transkriptionsfaktoren oder topologische Veränderungen während der Transkription führen (Curtin et al., 2008). Aus diesem Grund wurde der Vektor pPR2TNoL_(*crtZ_{oxd}*)₂ verwendet, in dem alle drei Genkassetten (*nat1*-Resistenzgen und zwei *crtZ_{oxd}*-Gene) durch größere nicht-codierende DNA-Bereiche voneinander getrennt sind. Die Tatsache aber, dass die Integration des Vektors pPR2TNo_(*crtZ_{oxd}*)₂, dessen Struktur die beschriebenen Einflüsse nicht berücksichtigt, zum höchsten Zeaxanthinumsatz (3,5 mg/g dw) führte, legt die Vermutung nahe, dass die Transkription nicht maßgeblich durch die Vektorstruktur beeinflusst wird. In erste Linie besteht eine Abhängigkeit von der Anzahl integrierter Genkopien, wobei der beobachtete Sättigungseffekt vermutlich auf der Regulation anderer Expressionsebenen beruht.

4.3.3 Überexpression des Gens *crtYB*

Die Überexpression des bifunktionellen Enzyms Phytoen-Synthase/Lycopin-Zyklase (*CrtYB*) im Stamm AXG-13 Δ asy-(*Z_{oxd}*)₂.(*YB*)₂ führte zur Akkumulation von β -Zeaxanthin und 7,8-Dihydro- β -Carotin, während eine Steigerung des Zeaxanthingehalts nicht erreicht werden konnte (Abbildung 3.25, S. 72).

Dieser Befund lässt sich mit der Fähigkeit der Lycopin-Zyklase neben Lycopin auch den Vorläufer Neurosporin mit geringer Spezifität als Substrat verwenden zu können (Ledetzky et al., 2014) erklären. Während im Wildtyp (Abbildung 1.5, S. 10) und im Ausgangsstamm AXG-13 Δ asy-(*Z_{oxd}*)₂ Phytoen vollständig zu Lycopin desaturiert

und anschließend zu β -Carotin zyklisiert wurde, wurde durch die Erhöhung der zellulären CrtYB-Konzentration die ungünstige Reaktion verstärkt, wodurch es zum Auftreten zyklisierter Neurosporinderivate kam, die für die Zeaxanthinbiosynthese verloren gingen. Diese breite Substratspezifität der Lycopin-Zyklase konnten auch in anderen Organismen wie dem Bakterium *Pantoea ananatis* und der höheren Pflanze *Capsicum annuum* (Paprika) nachgewiesen werden (Takaichi et al., 1996). Um die ausschließliche Biosynthese der Zeaxanthinvorstufe β -Carotin zu fördern, könnte es daher in zukünftigen Arbeiten hilfreich sein, eine um die Lycopin-Zyklase verkürzte Variante des Enzyms CrtYB zu verwenden. Im Zuge der funktionellen Charakterisierung des Fusionsgens *crtYB* wurden von Verdoes et al. (1999a) Deletionskonstrukte erzeugt und hinsichtlich der Enzymaktivität nach Komplementation in *E. coli* untersucht. Die Verkürzung des 5'-Endes der cDNA um 300 bp resultierte in einem vollständigen Verlust der Zyklase-Aktivität, wobei 30 % der Phytoen-Synthase-Aktivität verblieb. Arrach et al. (2001) untersuchten das Hydrophobizitätsprofil des homologen Proteins CarRA aus *Phycomyces blakesleeanus* und bestimmten eine hydrophobe (Lycopin-Zyklase) und eine hydrophile (Phytoen-Synthase) Domäne, die durch eine putative Proteaseschnittstelle miteinander verbunden sind. Nach Vergleich der Proteinsequenz mit anderen Pilzen wurde das Motiv Leucin-Serin-Alanin-Cystein-Asparaginsäure nach 248 Aminosäuren (744 bp) als Spaltstelle in CrtYB aus *X. dendrorhous* identifiziert. Nach genomischer Integration eines an dieser Stelle verkürzten Gens wäre es somit möglich, die Carotinoidbiosynthese durch die erhöhte Aktivität der Phytoen-Synthase ausschließlich in Richtung β -Carotin zu verstärken, welches anschließend als Substrat für die Synthese von Zeaxanthin zur Verfügung stünde.

4.3.4 Knock-In des Gens *crtZ_{oxd}*

Im Gegensatz zu der 2-Schritt-Strategie aus Asy-Inaktivierung und anschließender *crtZ_{oxd}*-Expression war es durch die Verwendung des Knock-In-Konstrukts *a₈₅₀zha* möglich, die Anzahl der notwendigen Schritte zur Entwicklung eines stabilen Zeaxanthinproduzenten deutlich zu verringern. Mit dem *a₈₅₀zha*-Konstrukt konnte nach Transformation des Wildtyps und Selektion der homozygoten Subtransformante WT Δ *asy-Z_{oxd}* die Astaxanthin-Synthase inaktiviert und 94 % des vorhandenen β -Carotins zu Zeaxanthin umgesetzt und dadurch ein Zeaxanthingehalt von 208 μ g/g dw erreicht werden (Abbildung 3.27, S. 74).

Mit dieser Methode konnte auf die Verwendung der pPR2TN-Vektoren und die anschließende Stabilisierung der Integration durch Sporulation verzichtet werden. Ins-

besondere letzterer Schritt ist zeitintensiv, da er einige Wochen Wartezeit und die Selektion der stabilen homozygoten Stämme benötigt und außerdem mit einer Reduktion des Carotinoidgehalts einhergeht (Tabelle 3.4, S. 86). Mit den Knock-In-Verfahren kann somit die Arbeitseffizienz der genetischen Modifikation erheblich gesteigert und zudem die begrenzten Antibiotikaresistenzen (bisher stehen vier zur Verfügung) effektiv genutzt werden. Folglich bieten sich die Knock-In-Konstrukte in zukünftigen Arbeiten zur Generierung von AXG-13-Hochproduzenten an.

4.3.5 Zeaxanthinproduktion in einem Bioreaktor

Die Produktion von Zeaxanthin in einem Bioreaktor erfolgte mit dem Stamm PR1-104-(YB)₂-HMG-E-Z_{oxd}-S. Wie bereits für die Phytoenproduktion beschrieben (Abschnitt 4.2.3), wurde durch die Anwendung des dreistufigen Fed-Batch-Prozesses eine hohe Produktivität erreicht. So wurde der Zeaxanthingehalt im Vergleich zur Schikane-Kultivierung um das Fünffache von 2,2 auf 10,8 mg/L gesteigert (Abbildung 3.32, S. 88). Die Hälfte der Produktivität wurde nach Ende des Zellwachstums mit einer großen Sauerstoffversorgung (>70 %) erreicht. Dies entspricht dem Verhalten, dass auch von der Astaxanthinbiosynthese des Wildtyps bekannt ist. Demnach führt eine Überversorgung mit Sauerstoff zu einer Hemmung des Zellwachstums (An et al., 2001), während die Astaxanthinbildung durch steigende Sauerstoffkonzentrationen induziert wird (Yamane et al., 1997). Bezogen auf die Zeaxanthinproduktion wurde somit ein rasches Zellwachstum bei einer Sauerstoffkonzentration von 40 % ermöglicht und anschließend die Hydroxylierung von β -Carotin durch die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration gefördert.

Die generierten Zeaxanthinproduzenten akkumulieren mit 0,5 und 3,5 mg/g dw deutlich mehr Zeaxanthin als gängige Nahrungsmittel wie orange Paprika mit 0,17 mg/g dw oder gelber Mais mit 0,005 mg/g dw (Perry et al., 2009). Der beste mikrobielle Zeaxanthinproduzent ist ein genetisch-modifizierter *E. coli* Stamm, der 12 mg/g dw Zeaxanthin enthält (Li et al., 2015). Um dieses Niveau in einem auf AXG-13 basierenden Zeaxanthin-Hochproduzenten zu erreichen, können weitere genetische Modifikationen durchgeführt werden. Neben der bereits erwähnten Integration einer verkürzten Version von *crtYB* (Abschnitt 4.3.3) kann die Carotinoidbiosynthese durch die Überexpression von *HMGGR* und *crtE* intensiviert werden, die im Fall des Phytoen-Hochproduzenten AXG-13 Δ crtI-(YB)₂-HMG-E zu einer Verdopplung des Carotinoidgehalts führten (Abbildung 3.12, S. 56). Anschließend kann durch die Integration weiterer *crtZ_{oxd}*-Kopien, die vollständige Umsetzung von β -Carotin zu Zeaxanthin erreicht werden. Da für den Zeaxanthin-Hochproduzenten AXG-13 Δ asy-

(Z_{oxd})₂ nur noch eine Antibiotikaresistenz zur Verfügung steht, bietet sich die Generierung eines neuen Stamms unter Verwendung des *crtZ_{oxd}*-Knock-In-Konstrukts *a₈₅₀zha* an, mit dem die Zeaxanthinbiosynthese unter Verbrauch lediglich einer Resistenz etabliert werden kann. Ein solcher auf AXG-13 basierender Hochproduzent besitzt ein großes biotechnologisches Potential, da er in einem Bioreaktor zu hohen Zelldichten kultiviert werden kann (Gassel et al., 2012), seine Kapazität zur Einlagerung der Carotinoide aufgrund des hohen intrazellulären Lipidgehalts (Johnson et al., 1980) groß ist und er ein breites Spektrum nutzbarer Kohlenstoffquellen aufweist (Palágyi et al., 2001).

4.4 Biosynthese multioxigenerter Zeaxanthinderivate

Neben der Hochproduktion von Phytoen und Zeaxanthin wurde Zeaxanthin in *X. dendrorhous* zu weiteren mehrfach oxigenierten Carotinoiden modifiziert. Multioxigenierte Carotinoide weisen ein hohes antioxidatives Potential auf und sind daher für eine pharmazeutische Anwendung äußerst interessant. Deren Synthese konnte durch die kombinatorische Expression von drei Oxigenasen etabliert werden. Der anschließende Nachweis der erhaltenen Carotinoide erfolgte mittels Massenspektrometrie.

4.4.1 Expression der Gene *crtZ_{oxd}*, *crtG* und *bkt*

Durch die sukzessive Expression der β -3,3'-Hydroxylase *CrtZ_{oxd}*, der β -2,2'-Hydroxylase *CrtG* und der β -4,4'-Ketolase *BKT* wurde die β -Carotinsynthese im Stamm PR1-104 um die Biosynthese multioxigenerter Zeaxanthinderivate erweitert (Abbildung 3.28, S. 77). Durch die anschließende chemische Reduktion der erhaltenen mono- und diketolierten Derivate (Abbildung 3.29, S. 79) wurden Carotinoide mit fünf und sechs Hydroxygruppen erzeugt. Die Erweiterung des Stoffwechselwegs im generiertem Stamm PR1-104-Z-G-bkt ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Die durchgeführten Arbeiten zeigen die Machbarkeit (Proof-of-Concept) der Biosynthese komplexer multioxigenerter Zeaxanthinderivate in *X. dendrorhous*. Die Konzentration ist für eine biotechnologische Anwendung allerdings derzeit noch nicht ausreichend. Um die Carotinoidausbeute in zukünftigen Arbeiten zu erhöhen, bietet sich die Anwendung der für die Phytoen- und Zeaxanthinproduktion erarbeiteten Techniken an: Verwendung des Zeaxanthin-Hochproduzenten AXG-13 Δ *asy*-(Z_{oxd})₂ als Ausgangsstamm, Codon-Optimierung der *crtG*- und *bkt*-Gensequenzen sowie Klonierung als Duo-Vektoren für eine effizientere Expression. Durch die biotechno-

logische Carotinoidproduktion eines auf diese Weise generierten Stamms ließen sich die Carotinoide in großer Ausbeute gewinnen und wären damit einer Untersuchung ihrer biologischen Aktivität zugänglich.

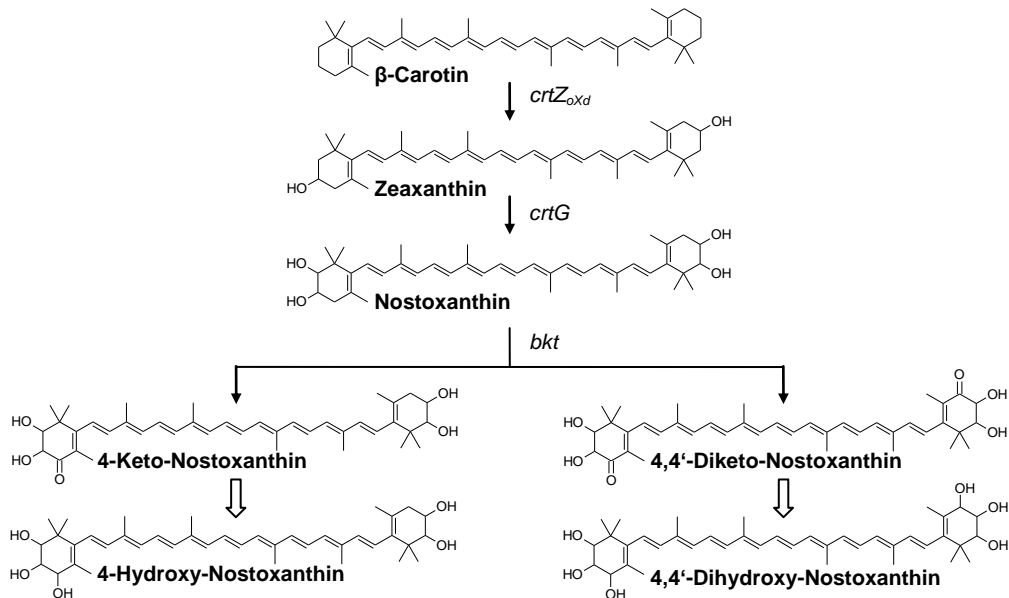


Abbildung 4.2: Erweiterung der β -Carotinsynthese im Stamm PR1-104-Z-G-bkt zur Biosynthese von multioxygenierten Zeaxanthinderivaten. Schwarze Pfeile zeigen die Enzymreaktionen der codierenden Gene *crtZ_{oxd}* (3,3'- β -Hydroxylase), *crtG* (2,2'- β -Hydroxylase) und *bkt* (4,4'- β -Ketolase). Offene weiße Pfeile kennzeichnen die chemische Reduktion.

Im Gegensatz zu β -Carotin besitzen die Xanthophylle Zeaxanthin und Astaxanthin eine deutlich erhöhte antioxidative Aktivität. Die Existenz sauerstoffhaltiger Gruppen an den terminalen Endringen erlaubt es diesen Carotinoiden, die Plasmamembran zu durchspannen und dadurch die Membranlipide effektiv gegen ROS zu schützen (Pashkow et al., 2008). Die Höhe der antioxidativen Wirkung ist hierbei abhängig von der Anzahl und der Art der oxidativen Gruppen, die die Orientierung innerhalb der Membranstruktur beeinflussen, wobei Astaxanthin mit je zwei Hydroxy- und Ketogruppen die größte Hemmwirkung gegen Lipidperoxidation besitzt (McNulty et al., 2007). Die in dieser Arbeit erhaltenen Zeaxanthinderivate besitzen hingegen fünf bis sechs oxidative Gruppen (Keto- und/oder Hydroxygruppen). Hierbei unterscheidet sich 4,4'-Diketo-Nostoxanthin von Astaxanthin durch zwei weitere Hydroxygruppen am C2 und C2' der β -Iononringe. Von Nishida et al. (2005) wurde gezeigt, dass die 2-Hydroxylierung des Astaxanthinvorläufers Canthaxanthin eine 10-fach höhere Hemmwirkung gegen Lipidperoxidation zur Folge hat. Darüber hinaus wurden durch die in-vitro Derivatisierungen völlig neuartige Carotinoide mit einer 4-OH-Gruppe erhalten, deren natürliches Vorkommen nicht bekannt ist. Aufgrund der multioxygenierten Struktur dieser erhaltenen Carotinoide kann auf eine ebenfalls erhebliche

antioxidative Aktivität geschlossen werden, von der eine gesundheitsfördernde Wirkung auf den Menschen ausgehen kann.

4.4.2 Nachweis mittels Massenspektrometrie

Der Nachweis der multioxygenierten Zeaxanthinderivate erfolgte mittels Massenspektrometrie. Hierbei wurden neben der exakten Molekülmasse (Tabelle 3.2, S. 80) charakteristische Fragmente im MS²-Spektrum erhalten (Abbildung 3.30, S. 82), deren Auftreten die Existenz der Polyenkette, der Hydroxylgruppen und der 4-Ketogruppe belegten. Die Entstehung dieser Fragmente ist in Abbildung 4.3 am Beispiel von 4,4'-Diketo-Nostoxanthin dargestellt.

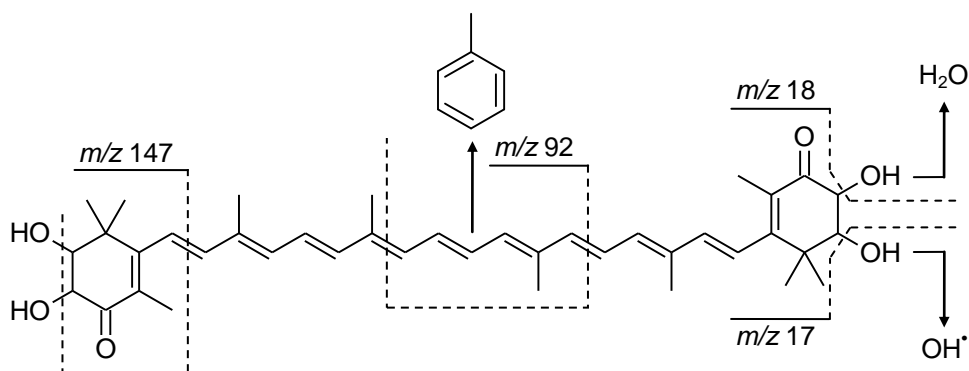


Abbildung 4.3: Entstehung charakteristischer MS²-Fragmente von 4,4'-Diketo-Nostoxanthin. Die Bruchkanten innerhalb des Moleküls sind durch gestrichelte Linien unter Angabe des Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) des entstehenden Fragments dargestellt (Goodwin, 1980; Rivera et al., 2014).

Der Verlust eines Toluolmoleküls ist typisch für Carotinoide mit ihrem ausgeprägten konjugierten Doppelbindungssystem (Goodwin, 1980). Er resultiert aus der Faltung der Polyenkette und intramolekularer Zyklisierung, nach der über mehrere Zwischenschritte ein Toluolmolekül (m/z 92) aus dem nun verkürzten Carotinoidmolekül (M-92) herausgetrennt wird. Durch Dehydratisierung des terminalen β -Iononrings und Spaltung der 7,8-Doppelbindung entsteht ein m/z 147 großes Fragment, das charakteristisch für 3-hydroxylierte Ketocarotinoide ist (Rivera et al., 2014). Dieses Fragment konnte für 4-Keto-Nostoxanthin und 4,4'-Diketo-Nostoxanthin mit hoher Intensität nachgewiesen werden, wobei die Intensität nach chemischer Reduktion der Ketogruppe deutlich verringert war. Hydroxygruppen gehen typischerweise unter Wasserabspaltung (m/z 18) oder als Hydroxyl-Radikal (m/z 17) verloren (Rivera et al., 2014). Da die untersuchten Carotinoide bis zu sechs Hydroxygruppen tragen, konnten verschiedene einfach (M-17, M-18) und zweifach (M-17-17, M-17-18, M-18-18) dehydroxylierte Carotinoidfragmente detektiert werden.

4.5 Nutzung der Pentosen Arabinose und Xylose als alternative Kohlenstoffquellen

Der Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glucose auf die Pentosen Arabinose oder Xylose hatte einen erheblichen Einfluss auf das Zellwachstum und die Carotinoidproduktion von *X. dendrorhous*. Nach Wachstum des Wildtyps mit Arabinose war die Zelldichte um die Hälfte im Vergleich zur Glucose-Kultivierung erhöht (Abbildung 3.34 B, S.91), während insbesondere Xylose eine erheblich gesteigerte Carotinoidbiosynthese in den auf AXG-13 basierenden Phytoen- und Zeaxanthin-Hochproduzenten hervorrief (Abbildung 3.36, S. 93). Diese Effekte, auf deren Gründe im Folgenden näher eingegangen werden soll, sind vermutlich zum einen auf eine gesteigerte Kohlenstoffverwertung und zum anderen auf die Hemmwirkung von Glucose auf die Carotinoidbiosynthese zurückzuführen.

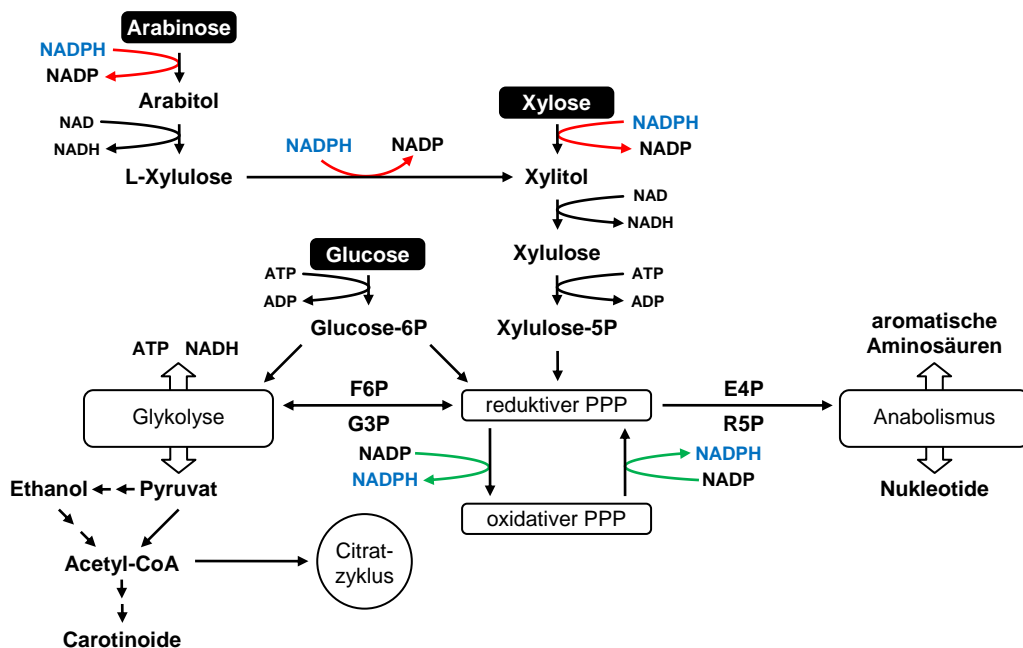


Abbildung 4.4: Metabolisches Netzwerk der Verwertung von Arabinose, Xylose und Glucose in *X. dendrorhous*. Arabinose und Xylose werden zunächst unter NADPH-Verbrauch (roter Pfeil) zu Xylitol reduziert und zu Xylulose reoxidiert. Nach Phosphorylierung zu Xylulose-5-phosphat tritt der Zucker in den reduktiven Teil des Pentose-Phosphat-Wegs (PPP) ein, in dem phosphorylierte C₃- bis C₇-Zucker durch enzymatische Umlagerungs- und Isomerisierungsreaktionen reversibel ineinander umgewandelt werden. Der metabolische Pool steht an zentraler Stelle mit Verbindungen zur Glykolyse über Fructose-6-phosphat (F6P) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) sowie zur Synthese von aromatischen Aminosäuren und Nukleotiden über Erythrose-4-phosphat (E4P) und Ribose-5-phosphat (R5P). Glucose wird zunächst zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert und kann anschließend über die Glykolyse oder dem PPP verwertet werden. Im oxidativen PPP erfolgt die Bildung von zwei Molekülen NADPH (grüner Pfeil) durch aufeinanderfolgende Reduktions-, Hydrolyse- und Decarboxylierungsreaktionen an Glucose-6-phosphat zu Ribulose-5-phosphat. Aus der Glykolyse geht Pyruvat als Endprodukt hervor, das zu Acetyl-CoA decarboxyliert wird und zur weiteren Energiegewinnung in den Citratzyklus einmündet oder als Ausgangsstoff für die Biosynthese von Carotinoiden dient (Jeffries, 1983; Fernandes and Murray, 2010; Stincone et al., 2015; Martinez-Moya et al., 2015).

Die Verwertung der Zucker erfolgt über ein Zusammenspiel von Pentose-Phosphat-Weg (PPP) und Glykolyse, wobei sich die Eintrittsstellen in das metabolische Netzwerk unterscheiden und die Pentosen im Gegensatz zu Glucose zunächst unter NADPH-Verbrauch reduziert werden müssen (Abbildung 4.4). Die Glykolyse dient der Erzeugung von Energie in Form von ATP und NADH. Das Abbauprodukt Pyruvat kann anschließend durch oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA umgewandelt werden und zur weiteren Energieerzeugung in den Citratzyklus einmünden oder als Ausgangsstoff für die Biosynthese von Carotinoiden, Fettsäuren und anderen Zellbestandteilen dienen (Martinez-Moya et al., 2015). Die Hauptaufgabe des PPP besteht in der Regenerierung des Reduktionsmittels NADPH und der Erzeugung von Bausteinen für die Nukleotid- und Aminosäuresynthese (Stincone et al., 2015). Er hat daher eine entscheidende Bedeutung für das Zellwachstum, indem er Protonen und Elektronen für die NADPH-abhängige Biosynthese liefert und zugleich essentielle Vorläufer für die Synthese von DNA, RNA und Proteinen bereitstellt.

Die Verwertung von Glucose, Arabinose oder Xylose nimmt unterschiedlichen Einfluss auf die NADPH-Verfügbarkeit (Abbildung 4.4). Aus Glucose wird zunächst Glucose-6-Phosphat (G6P) gebildet, das anschließend in der Glykolyse oder dem oxidativen PPP unter Bildung von zwei Molekülen NADPH verwertet wird. Durch metabolische Flussanalysen von *X. dendrorhous* wurde von Dong et al. (2006) und Cannizzaro et al. (2004) der Anteil des PPP bestimmt, demnach 46 bis 65 % des G6P in den oxidativen PPP fließen. Da andere NADPH-Quellen wie das NADP-abhängige Malatenzym nur eine geringe Aktivität aufweisen (Cannizzaro et al., 2004), ist ein hoher Fluss notwendig, um den Bedarf an NADPH zu decken. Die Verwertung von Arabinose hingegen weist eine geringe NADPH-Ausbeute auf. Da für die Reduktion zu Arabitol und später zu Xylitol NADPH verbraucht wird, muss Arabinose vermutlich in höherem Maße im Vergleich zu Glucose verwertet werden. Dies wiederum führt zu einem Überschuss an phosphorylierten Zuckermolekülen des reduktiven PPP, die zur Energiegewinnung und für die Biosynthese von Zellbestandteilen zur Verfügung stehen. Folglich ist die Aktivität des Metabolismus stark erhöht, wodurch das Wachstum der Zellen und deren Teilung gefördert werden. Dieser Zusammenhang kann eine Erklärung für die erhöhte Zelldichte des Wildtyps nach Wachstum in Arabinose-haltigen Medium geben (Abbildung 3.34 B, S.91). Interessanterweise lief die Verwertung von Xylose, die nur ein NADPH-Molekül benötigt, zunächst ein langsames Wachstum hervor, das aber auch in einer höheren Zelldichte endete. In beiden Fällen war die Carotinoidsynthese deutlich intensiviert, da wahrscheinlich aufgrund der erhöhten Kohlenstoffverwertung mehr Acetyl-CoA

als Vorläufermolekül zur Verfügung stand. Zukünftige Metabolomuntersuchungen an *X. dendrorhous*, wie sie bereits von Martinez-Moya et al. (2015) mit Glucose als Kohlenstoffquelle durchgeführt wurden, könnten zur Überprüfung dieser Hypothese dienen, da auf diese Weise der Verlauf der intrazellulären Konzentration der Stoffwechselintermediate bestimmt werden kann.

Die gesteigerte Carotinoidproduktion lässt sich zusätzlich durch das Ausbleiben der Hemmwirkung von Glucose erklären. So zeigt *X. dendrorhous* den Crabtree-Effekt, der zu Ethanolbildung durch Gärung und zu einer geringen Carotinoidkonzentration führt (Reynders et al., 1997). Erst nach Abbau der Glucose und einer Metabolisierung des zuvor gebildeten Ethanols kommt es zu einer starken Induktion der Carotinoidbiosynthese (Yamane et al., 1997; Lodato et al., 2007). Marcoleta et al. (2011) konnten zeigen, dass die Gene *crtYB*, *crtI* und *asy* einer negativen transkriptionellen Regulation durch Glucose unterliegen. Die Promotorregionen dieser Gene besitzen putative Bindestellen für den Transkriptionsfaktor MIG1, der die Glucoserepression in verschiedenen Pilzen vermittelt (Klein et al., 1998; Zaragoza et al., 2000). Durch die Nutzung von Pentosen als Kohlenstoffquelle konnten diese Effekte vermieden und die Carotinoidbiosynthese intensiviert werden (Abbildung 3.36, S. 93).

Auch andere Untersuchungen zeigten den positiven Einfluss von Xylose. So konnten Wozniak et al. (2011) durch die Verwendung von Xylose als alleinige Kohlenstoffquelle den Carotinoidgehalt um ein Viertel steigern. Montanti et al. (2011) untersuchten den Effekt von Glucose, Arabinose und Xylose auf die Carotinoidbiosyntheseleistung von drei *X. dendrorhous*-Mutanten, wobei die höchsten Werte nach Wachstum mit Xylose ermittelt wurden. Parajo et al. (1998) konnten eine hohe Produktivität nach Wachstum der Zellen mit Xylose-haltigen Eukalyptus-Hydrolysaten als Kohlenstoffquelle in 1L-Bioreaktorversuchen erreichen.

Eine günstige, erneuerbare und weit verfügbare Quelle für die eingesetzten Pentosen sind pflanzliche Abfallstoffe. Ein Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände ist das Polysaccharid Hemicellulose, das aus verschiedenen Zuckermonomeren, abhängig von der Pflanzenart, aufgebaut ist (Scheller & Ulvskov, 2010). In Weizen- und Maisstroh entfallen ungefähr ein Viertel der Trockenmasse auf Hemicellulose, die zu gut 80% aus Xylose- und zu 20 % aus Arabinosemonomeren besteht (Jeffries, 1983). Durch saure Hydrolyse können die Pentosen aus den Pflanzenresten gewonnen werden und stehen in Form von Hydrolysaten direkt als Substrat für die biotechnologische Produktion zur Verfügung (Gírio et al., 2010). Daher wurde die Eignung eines Weizenstrohhydrolysats für die Carotinoidproduktion im Hochproduzenten

AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂-S untersucht, mit dem sich der Gesamtcarotinoidgehalt um die Hälfte steigerte und Zeaxanthin auf dem Konzentrationsniveau der Glucose-Kultivierung erhalten wurde (Abbildung 3.36, S. 93). Im Gegensatz zur Verwendung von aus Weizen- oder Maiskörnern gewonnener Glucose konkurriert Stroh als Abfallprodukt jedoch nicht mit der Nahrungsmittelproduktion und steht in großen Mengen zur Verfügung. Deshalb sind, mit Hinblick auf die Nachhaltigkeit und die Produktionskosten, die aus Hemicellulose-haltigem Abfallmaterial gewonnenen Pentosen Arabinose und Xylose vielversprechende Kohlenstoffquellen für die biotechnologische Produktion von Carotinoiden in *X. dendrorhous*.

5 Fazit & Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten genetischen Stoffwechselmodifikationen haben es ermöglicht, das Spektrum der Carotinoidbiosynthese des Hefepilz *X. dendrorhous* um eine Vielzahl biologisch aktiver Carotinoide zu erweitern. Hierbei eröffnet die Entwicklung der auf AXG-13 basierenden Phytoen- und Zeaxanthin-Hochproduzenten die Möglichkeit zur biotechnologischen Produktion dieser Carotinoide, während die erfolgreiche Biosynthese von multioxygenierten Zeaxanthin-derivaten die Erforschung ihrer biologischen Funktion zulässt (Abbildung 5.1).

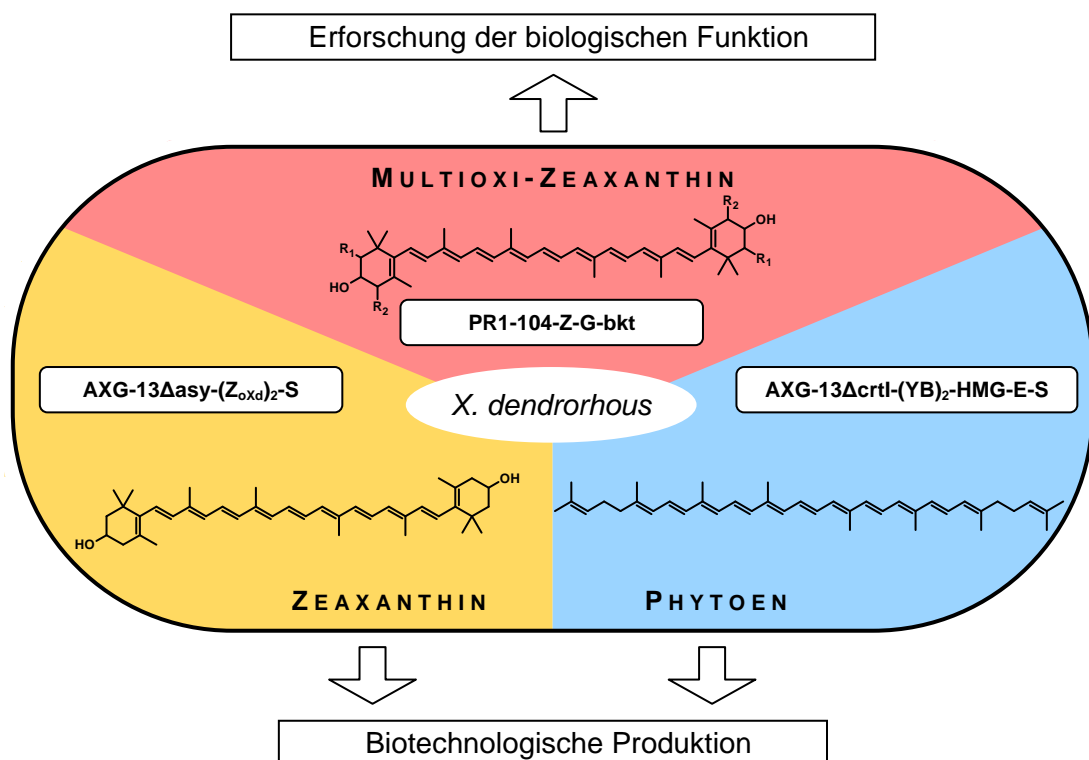


Abbildung 5.1: Carotinoide aus *X. dendrorhous* in genetisch modifizierten Stämmen und Anwendungsmöglichkeiten.

Phytoen, das die menschliche Haut gegen die schädliche Wirkung der UV-Strahlung schützt und Zeaxanthin, ein essentieller Bestandteil des menschlichen Sehapparats, sind interessante Wirkstoffe für die kosmetische und pharmazeutische Industrie. Für die biotechnologische Produktion dieser Carotinoide stellen die generierten Hochproduzenten AXG-13 Δ ctrl-(YB)₂-HMG-E-S und AXG-13 Δ asy-(Z_{oxd})₂ vielversprechende Kandidaten dar, wobei der entwickelte Bioreaktorprozess zur Produktivitätssteigerung vom Labor- auf den Industriemaßstab übertragen werden kann. Die Produktionskosten können durch die Verwendung pflanzlicher Abfallstoffe gesenkt werden, wobei die Verwendung Xylose-haltiger Hydrolysate als Kohlenstoffquelle vielversprechend ist. Ein solcher Prozess besitzt das Potential zur kosten-

günstigen Mengenproduktion, an deren Ende die Carotinoide für die Verwendung in Form kosmetischer Cremes oder Nahrungsergänzungsmitteln zur Verfügung stehen. Darüber hinaus stellen multioxygenierte Zeaxanthinderivate neue potentielle Wirkstoffe dar. Zusätzlich zu dem Stamm PR1-104-Z-G-bkt können diese Carotinoide durch Optimierung der Biosynthese und Übertragung der genetischen Modifikationen auf AXG-13 in ausreichender Menge erhalten werden, um ihre biologische Aktivität zu erforschen.

Die Ergebnisse der Stammentwicklung zeigen, dass durch den kombinierten Ansatz aus Gen-Knock-Out und genomischer Integration von Carotinoidgenen die Biosynthese der gewünschten Carotinoide nicht nur ermöglicht, sondern auch erheblich gesteigert wurde. So führte die Inaktivierung der Phytoen-Desaturase zur Akkumulation des Substrats Phytoen, dessen Zellkonzentration durch die Aufhebung enzymatischer Limitierungen im Mevalonatweg (HMGR), im Terpenoidstoffwechsel (CrtE) und der Carotinoidbiosynthese (CrtYB) massiv gesteigert wurde. Demgegenüber hatte die Inaktivierung der Astaxanthin-Synthase die Akkumulation des Substrats β -Carotin zur Folge, das über die heterologe Expression der codon-optimierten Hydroxylase $CrtZ_{oxd}$ effizient zu Zeaxanthin umgesetzt wurde, wobei die Konzentration mit der Anzahl der Genkopien zunahm. Zudem war der Pilz zur heterologen Expression weiterer Carotinoidbiosynthesegene (*crtG* und *bkt*) aus Bakterien und Algen fähig. Diese Fähigkeit verdeutlicht das enorme Potential von *X. dendrorhous* als Wirtstamm für die kombinatorische Biosynthese komplexer Carotinoidmoleküle.

Die Notwendigkeit zur Stabilisierung der Carotinoidbiosynthese in den generierten Stämmen stellte eine große Herausforderung für die Stammentwicklung dar. Dieser Umstand war zu Beginn der Arbeit aufgrund des unbekanntenen Ploidiegrads noch nicht absehbar. Da die Zellen aber ein diploides Genom besaßen und instabile heterozygote Transformanten ausbildeten, mussten Strategien entwickelt werden, um homozygote Stämme zu erhalten. Die Etablierung einer stabilen Carotinoidbiosyntheseleistung in den diploiden Zellen erfolgte daher auf zwei Wegen. Zum einen durch heterozygote Integration in die Carotinoidgene *crtI* und *asy* mit Hilfe von Knock-Out-Konstrukten und Farbselektion der homozygoten Phänotypen nach mitotischer Rekombination (Doppel-Rekombinations-Methode). Zum anderen durch heterozygote Genomintegration mit dem pPR2TN-Vektorsystem, Induktion des sexuellen Zyklus und Selektion der homozygoten Sporen. Durch die Verwendung von Knock-In-Konstrukten wurde das Vorgehen optimiert, indem beide Schritte (Knock-Out und Integration von Carotinoidgenen) in nur einem molekularbiologischen Schritt durchgeführt wurden. Dieses Vorgehen bietet sich auch in zukünftigen

Arbeiten zur kombinatorischen Biosynthese in *X. dendrorhous* an, da dadurch komplexe Stoffwechseleränderungen unter Verwendung nur einer Antibiotikaresistenz durchgeführt werden können.

Aufgrund der Möglichkeiten zur effizienten Stoffwechselmodifikation, des breiten Biosynthespektrums und des Potential zur industriellen Produktion stellt der Pilz *X. dendrorhous* somit eine vielseitige biotechnologische Plattform für die Produktion von Carotinoiden dar.

6 Literaturverzeichnis

- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., Baeza, M., Cifuentes, V., 2008. Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.* 8, 169.
- Alcaíno, J., Romero, I., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., Rojas, M.C., Baeza, M., Cifuentes, V., 2014. Functional characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. *PLoS ONE* 9.
- Altman, L.J., Ash, L., Kowerski, R.C., Epstein, W.W., Larsen, B.R., Rilling, H.C., Muscio, F., Gregonis, D.E., 1972. Prephytoene pyrophosphate. A new intermediate in the biosynthesis of carotenoids. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 3257–3259.
- An, G.H., Cho, M.H., Johnson, E.A., 1999. Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *J. Biosci. Bioeng.* 88, 189–193.
- An, G.H., Jang, B.G., Cho, M.H., 2001. Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 121–125.
- Armstrong, G.A., 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 629–659.
- Arrach, N., Fernández-Martín, R., Cerdá-Olmedo, E., Avalos, J., 2001. A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1687–1692.
- Barbachano-Torres, A., Castelblanco-Matiz, L.M., Ramos-Valdivia, A.C., Cerda-García-Rojas, C.M., Salgado, L.M., Flores-Ortiz, C.M., Ponce-Noyola, T., 2014. Analysis of proteomic changes in colored mutants of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Arch. Microbiol.* 196, 411–421.
- Bethesda Research Laboratories, 1986. BRL pUC host: *E. coli* DH5 α competent cells. *Bethesda Res Lab Focus* 9.
- Beyer, P., Kleinig, H., Englert, G., Meister, W., Noack, K., 1979. Carotenoids of *Rhizobium*. IV. Isolation and structure elucidation of the carotenoids of a mutant of *Rhizobium lupini*. *Helv. Chim. Acta* 62, 2551–2557.
- Biehler, E., Alkerwi, A., Hoffmann, L., Krause, E., Guillaume, M., Lair, M.-L., Bohn, T., 2012. Contribution of violaxanthin, neoxanthin, phytoene and phytofluene to total carotenoid intake: Assessment in Luxembourg. *J. Food Compos. Anal.* 25, 56–65.
- Bochar, D., Friesen, J., Stauffacher, C., Rodwell, V., 1999. Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl CoA, in: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 2. Elsevier Science, Oxford, UK, pp. 15–44.

- Bodily, P.M., Fujimoto, M., Ortega, C., Okuda, N., Price, J.C., Clement, M.J., Snell, Q., 2015. Heterozygous genome assembly via binary classification of homologous sequence. *BMC Bioinformatics* 16 Suppl 7, S5.
- Borovinskaya, M.A., Shoji, S., Fredrick, K., Cate, J.H.D., 2008. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA* 14, 1590–1599.
- Borovkov, A.Y., Rivkin, M.I., 1997. XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products. *BioTechniques* 22, 812–814.
- Bouvier, F., Keller, Y., d'Harlingue, A., Camara, B., 1998. Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 1391, 320–328.
- Breitenbach, J., Visser, H., Verdoes, J.C., van Ooyen, A.J.J., Sandmann, G., 2011. Engineering of geranylgeranyl pyrophosphate synthase levels and physiological conditions for enhanced carotenoid and astaxanthin synthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Lett.* 33, 755–761.
- Britton, G., 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9, 1551–1558.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., 2004. Carotenoids: Handbook. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Cannizzaro, C., Christensen, B., Nielsen, J., von Stockar, U., 2004. Metabolic network analysis on *Phaffia rhodozyma* yeast using ¹³C-labeled glucose and gas chromatography-mass spectrometry. *Metab. Eng.* 6, 340–351.
- Chen, X., Zhang, J., 2016. The genomic landscape of position effects on protein expression level and noise in yeast. *Cell Syst.* 2, 347–354.
- Choi, S.-K., Harada, H., Matsuda, S., Misawa, N., 2007. Characterization of two beta-carotene ketolases, CrtO and CrtW, by complementation analysis in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1335–1341.
- Choi, S.-K., Matsuda, S., Hoshino, T., Peng, X., Misawa, N., 2006. Characterization of bacterial beta-carotene 3,3'-hydroxylases, CrtZ, and P450 in astaxanthin biosynthetic pathway and adonirubin production by gene combination in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 1238–1246.
- Cifuentes, V., Hermosilla, G., Martínez, C., León, R., Pincheira, G., Jiménez, A., 1997. Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72, 111–117.
- Clarke, I., de la Concha, A., Murillo, F., Sandmann, G., Skone, E., Bramley, P., 1983. The effect of diphenylamine on carotenogenesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *Phytochemistry* 22, 435–439.
- Cordero Otero, R., Gaillardin, C., 1996. Efficient selection of hygromycin-B-resistant *Yarrowia lipolytica* transformants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 143–148.

- Curtin, J.A., Dane, A.P., Swanson, A., Alexander, I.E., Ginn, S.L., 2008. Bidirectional promoter interference between two widely used internal heterologous promoters in a late-generation lentiviral construct. *Gene Ther.* 15, 384–390.
- de la Fuente, J.L., Rodríguez-Sáiz, M., Schleissner, C., Díez, B., Peiro, E., Barredo, J.L., 2010. High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Biotechnol.* 148, 144–146.
- Dong, Q.-L., Zhao, X.-M., Ma, H.-W., Xing, X.-Y., Sun, N.-X., 2006. Metabolic flux analysis of the two astaxanthin-producing microorganisms *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma* in the pure and mixed cultures. *Biotechnol. J.* 1, 1283–1292.
- Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G., 1997. The carotenoids as anti-oxidants - a review. *J. Photochem. Photobiol. B* 41, 189–200.
- Ernst, H., 2002. Recent advances in industrial carotenoid synthesis. *Pure Appl. Chem.* 74, 2213–2226.
- Eugster, C.H., 1995. Chemical derivatization: Microsomale tests for the presence of common functional groups in carotenoids, in: *Carotenoid Volume 1A Isolation and Analysis*. Basel.
- Fernandes, S., Murray, P., 2010. Metabolic engineering for improved microbial pentose fermentation. *Bioeng. Bugs* 1, 424–428.
- Fiedor, J., Burda, K., 2014. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 6, 466–488.
- Frank, H.A., Cogdell, R.J., 1996. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63, 257–264.
- Fraser, P.D., Enfissi, E.M.A., Halket, J.M., Truesdale, M.R., Yu, D., Gerrish, C., Bramley, P.M., 2007. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell* 19, 3194–3211.
- Gassel, S., Breitenbach, J., Sandmann, G., 2014. Genetic engineering of the complete carotenoid pathway towards enhanced astaxanthin formation in *Xanthophyllomyces dendrorhous* starting from a high-yield mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 345–350.
- Gassel, S., Schewe, H., Schmidt, I., Schrader, J., Sandmann, G., 2012. Multiple improvement of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a combination of conventional mutagenesis and metabolic pathway engineering. *Biotechnol. Lett.* 35, 565–569.
- Girard, P., Falconnier, B., Bricout, J., Vladescu, B., 1994. β -Carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 183–191.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carneiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800.

- Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425–430.
- Golubev, W.I., 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast* Chichester Engl. 11, 101–110.
- Goodwin, T., 1980. *The Biochemistry of the Carotenoids: Volume I Plants*. Springer Science & Business Media.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., Minshull, J., 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* 22, 346–353.
- Hadden, W.L., Watkins, R.H., Levy, L.W., Regalado, E., Rivadeneira, D.M., van Breemen, R.B., Schwartz, S.J., 1999. Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4189–4194.
- Hara, K.Y., Morita, T., Endo, Y., Mochizuki, M., Araki, M., Kondo, A., 2014. Evaluation and screening of efficient promoters to improve astaxanthin production in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6787–6793.
- Hermosilla, G., Martínez, C., Retamales, P., León, R., Cifuentes, V., 2003. Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84, 279–287.
- Jeffries, T.W., 1983. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 27, 1–32.
- Johnson, E.A., 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 6, 169–174.
- Johnson, E.A., Villa, T.G., Lewis, M.J., 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture* 20, 123–134.
- Kajiwara, S., Kakizono, T., Saito, T., Kondo, K., Ohtani, T., Nishio, N., Nagai, S., Misawa, N., 1995. Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.* 29, 343–352.
- Klein, C.J., Olsson, L., Nielsen, J., 1998. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiol. Read. Engl.* 144 (Pt 1), 13–24.
- Kucsera, J., Pfeiffer, I., Ferenczy, L., 1998. Homothallic life cycle in the diploid red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 163–168.
- Latowski, D., Kuczyńska, P., Strzałka, K., 2011. Xanthophyll cycle - a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 16, 78–90.
- Ledetzky, N., Osawa, A., Iki, K., Pollmann, H., Gassel, S., Breitenbach, J., Shindo, K., Sandmann, G., 2014. Multiple transformation with the *crtYB* gene of the limiting enzyme increased carotenoid synthesis and generated novel deriva-

- tives in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Arch. Biochem. Biophys. 545, 141–7.
- Lee, P.S., Greenwell, P.W., Dominska, M., Gawel, M., Hamilton, M., Petes, T.D., 2009. A fine-structure map of spontaneous mitotic crossovers in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genet. 5,
- Li, X.-R., Tian, G.-Q., Shen, H.-J., Liu, J.-Z., 2015. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce zeaxanthin. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 42, 627–636.
- Lima, V.C., Rosen, R.B., Farah, M., 2016. Macular pigment in retinal health and disease. Int. J. Retina Vitre. 2, 19.
- Liu, Y.-S., Wu, J.-Y., 2008. Modeling of *Xanthophyllomyces dendrorhous* growth on glucose and overflow metabolism in batch and fed-batch cultures for astaxanthin production. Biotechnol. Bioeng. 101, 996–1004.
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Niklitschek, M., Carmona, M., Wozniak, A., Baeza, M., Jiménez, A., Cifuentes, V., 2007. Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Biol. Res. 40, 73–84.
- Loto, I., Gutiérrez, M.S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., Cifuentes, V., Alcaíno, J., 2012. Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. BMC Microbiol. 12, 235.
- Magadum, S., Banerjee, U., Murugan, P., Gangapur, D., Ravikesavan, R., 2013. Gene duplication as a major force in evolution. J. Genet. 92, 155–161.
- Marcoleta, A., Niklitschek, M., Wozniak, A., Lozano, C., Alcaíno, J., Baeza, M., Cifuentes, V., 2011. Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. BMC Microbiol. 11, 190.
- Marrot, L., Meunier, J.-R., 2008. Skin DNA photodamage and its biological consequences. J. Am. Acad. Dermatol. 58, S139-148.
- Martinez-Moya, P., Niehaus, K., Alcaíno, J., Baeza, M., Cifuentes, V., 2015. Proteomic and metabolomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* using different carbon sources. BMC Genomics 16, 289.
- McNulty, H.P., Byun, J., Lockwood, S.F., Jacob, R.F., Mason, R.P., 2007. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1768, 167–174.
- Medwid, R.D., 1998. *Phaffia rhodozyma* is polyploid. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 21, 228–232.
- Meléndez-Martínez, A.J., Mapelli-Brahm, P., Benítez-González, A., Stinco, C.M., 2015. A comprehensive review on the colorless carotenoids phytoene and phytofluene. Arch. Biochem. Biophys. 572, 188–200.

- Miao, L., Chi, S., Tang, Y., Su, Z., Yin, T., Guan, G., Li, Y., 2011. Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain. *FEMS Yeast Res.* 11, 192–201.
- Miller, M.W., Yoneyama, M., Soneda, M., 1976. *Phaffia*, a new yeast genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26, 286–291.
- Misawa, N., 2011. Carotenoid β -ring hydroxylase and ketolase from marine bacteria - promiscuous enzymes for synthesizing functional xanthophylls. *Mar. Drugs* 9, 757–771.
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T., Miki, W., 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* 177, 6575–6584.
- Montanti, J., Nghiem, N.P., Johnston, D.B., 2011. Production of astaxanthin from cellulosic biomass sugars by mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 655–665.
- Mülhardt, C., 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Nagy, Á., Garamszegi, N., Vágvölgyi, C., Ferenczy, L., 1994. Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 123, 315–318.
- Niklitschek, M., Alcaíno, J., Barahona, S., Sepúlveda, D., Lozano, C., Carmona, M., Marcoleta, A., Martínez, C., Lodato, P., Baeza, M., Cifuentes, V., 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res.* 41, 93–108.
- Niklitschek, M., Baeza, M., Fernández-Lobato, M., Cifuentes, V., 2012. Generation of astaxanthin mutants in *Xanthophyllomyces dendrorhous* using a double recombination method based on hygromycin resistance. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 898, 219–234.
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N.C., Pogson, B.J., 2015. Carotenoid metabolism in plants. *Mol. Plant* 8, 68–82.
- Nishida, Y., Adachi, K., Kasai, H., Shizuri, Y., Shindo, K., Sawabe, A., Komemushi, S., Miki, W., Misawa, N., 2005. Elucidation of a carotenoid biosynthesis gene cluster encoding a novel enzyme, 2,2'- β -Hydroxylase, from *Brevundimonas* sp. strain SD212 and combinatorial biosynthesis of new or rare xanthophylls. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4286–4296.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J., Sandmann, G., 2006. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol. Genet. Genomics* 275, 148–158.

- Oppen-Bezalel, L. von O.-, Fishbein, D., Havas, F., Ben-Chitrit, O., Khaiat, A., 2015. The photoprotective effects of a food supplement tomato powder rich in phytoene and phytofluene, the colorless carotenoids, a preliminary study. *Glob. Dermatol.* 2, 178–182.
- Palágyi, Z., Ferenczy, L., Vágvölgyi, C., 2001. Carbon-source assimilation pattern of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 95–97.
- Parajo, J., Santos, V., Vazquez, M., 1998. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of eucalyptus globulus wood. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 501–506.
- Pashkow, F.J., Watumull, D.G., Campbell, C.L., 2008. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 101, 58D–68D.
- Perry, A., Rasmussen, H., Johnson, E.J., 2009. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *J. Food Compos. Anal.* 22, 9–15.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Plotkin, J.B., Kudla, G., 2011. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat. Rev. Genet.* 12, 32–42.
- Pollmann, H., 2013. Genetische Modifikation der Carotinoidbiosynthese im Hefepilz *Phaffia rhodozyma* zur Generierung eines Zeaxanthin-produzierenden Stammes. Goethe Universität Frankfurt am Main, Frankfurt am Main.
- Prado, F., Cortés-Ledesma, F., Huertas, P., Aguilera, A., 2003. Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 42, 185–198.
- Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X.W., Chen, Z., Qu, L.-J., 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Res.* 17, 471–482.
- Reynders, M.B., Rawlings, D.E., Harrison, S.T.L., 1997. Demonstration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. *Biotechnol. Lett.* 19, 549–552.
- Rivera, S.M., Christou, P., Canela-Garayoa, R., 2014. Identification of carotenoids using mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 33, 353–372.
- Rodríguez-Sáiz, M., de la Fuente, J.L., Barredo, J.L., 2010. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 645–658.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A., Clare, J.J., 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast Chichester Engl.* 8, 423–488.

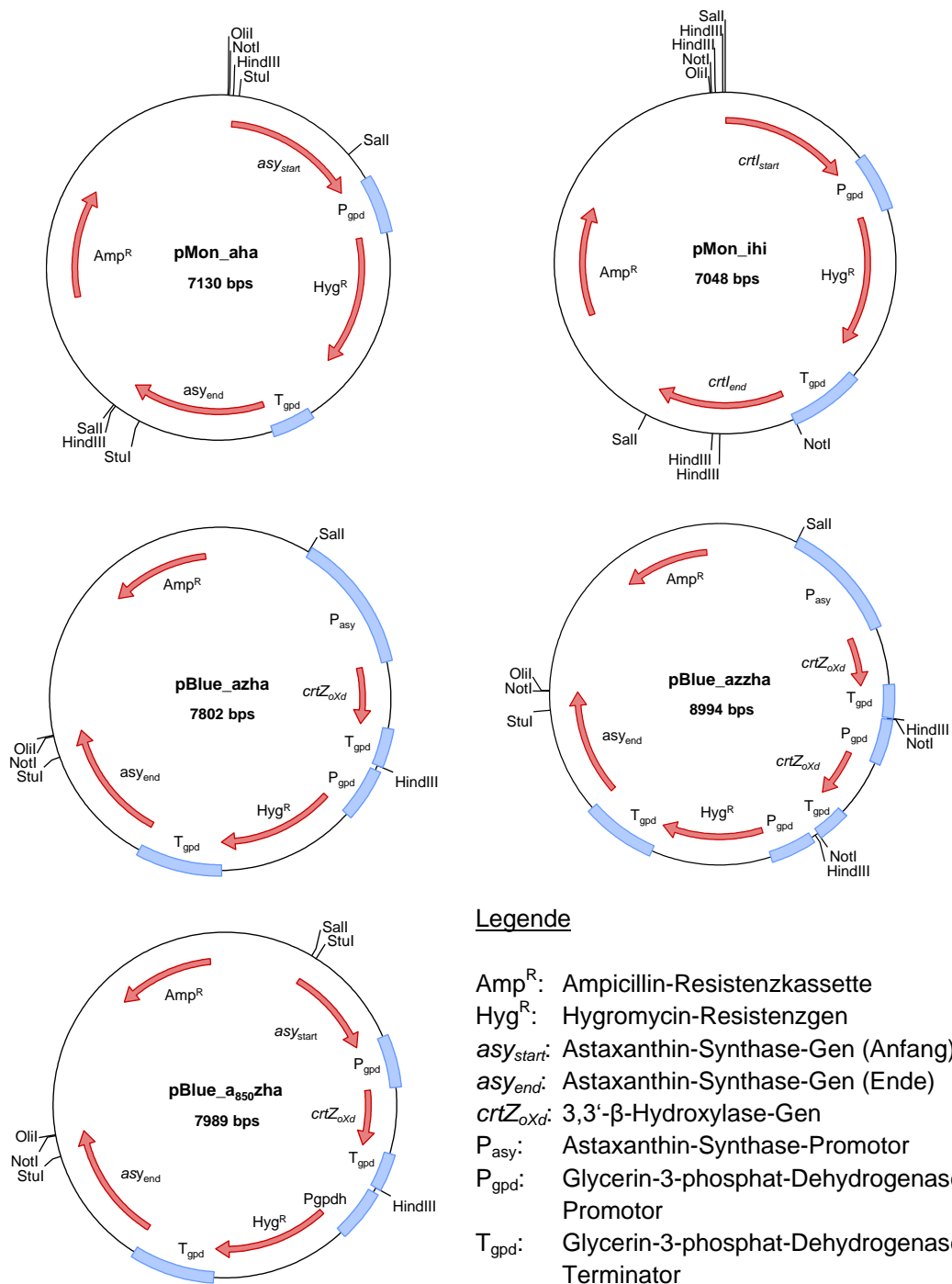
- Sajilata, M. g., Singhal, R. s., Kamat, M. y., 2008. The carotenoid pigment zeaxanthin - A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 7, 29–49.
- Sandmann, G., 2015. Carotenoids of biotechnological importance. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 148, 449–467.
- Sandmann, G., 2002. Combinatorial biosynthesis of carotenoids in a heterologous host: a powerful approach for the biosynthesis of novel structures. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 3, 629–635.
- Sandmann, G., 1994. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem. FEBS* 223, 7–24.
- Schaub, P., Yu, Q., Gemmecker, S., Poussin-Courmontagne, P., Mailliot, J., McEwen, A.G., Ghisla, S., Al-Babili, S., Cavarelli, J., Beyer, P., 2012. On the structure and function of the phytoene desaturase CRTI from *Pantoea ananatis*, a membrane-peripheral and FAD-dependent oxidase/isomerase. *PLoS ONE* 7.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263–289.
- Schmidhauser, T.J., Lauter, F.R., Russo, V.E., Yanofsky, C., 1990. Cloning, sequence, and photoregulation of al-1, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5064–5070.
- Schmidhauser, T.J., Lauter, F.R., Schumacher, M., Zhou, W., Russo, V.E., Yanofsky, C., 1994. Characterization of al-2, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. Cloning, sequence analysis, and photoregulation. *J. Biol. Chem.* 269, 12060–12066.
- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sandmann, G., Schrader, J., 2011. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 555–571.
- Schroeder, W.A., Johnson, E.A., 1995. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J. Ind. Microbiol.* 14, 502–507.
- Sharma, R., Gassel, S., Steiger, S., Xia, X., Bauer, R., Sandmann, G., Thines, M., 2015. The genome of the basal agaricomycete *Xanthophyllomyces dendrorhous* provides insights into the organization of its acetyl-CoA derived pathways and the evolution of Agaricomycotina. *BMC Genomics* 16, 233.
- Sheltzer, J.M., Blank, H.M., Pfau, S.J., Tange, Y., George, B.M., Humpton, T.J., Brito, I.L., Hiraoka, Y., Niwa, O., Amon, A., 2011. Aneuploidy drives genomic instability in yeast. *Science* 333, 1026–1030.
- Sieiro, C., Poza, M., de Miguel, T., Villa, T.G., 2003. Genetic basis of microbial carotenogenesis. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 6, 11–16.
- Sommerburg, O., Keunen, J.E., Bird, A.C., van Kuijk, F.J., 1998. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *Br. J. Ophthalmol.* 82, 907–910.

- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2000. Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 191–208.
- Stahl, W., Sies, H., 2012. β -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *Am. J. Clin. Nutr.* 96, 1179S–84S.
- Stahl, W., Sies, H., 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med., Fat Soluble Vitamins: Old Molecules with Novel Properties* 24, 345–351.
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M.M.C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.-M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M.A., Breitenbach, M., Brindle, K.M., Rabinowitz, J.D., Ralser, M., 2015. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 927–963.
- Takaichi, S., Sandmann, G., Schnurr, G., Satomi, Y., Suzuki, A., Misawa, N., 1996. The carotenoid 7,8-dihydro- ψ end group can be cyclized by the lycopene cyclases from the bacterium *Erwinia uredovora* and the higher plant *Capsicum annuum*. *Eur. J. Biochem. FEBS* 241, 291–296.
- Verdoes, J.C., Krubasik, K.P., Sandmann, G., van Ooyen, A.J., 1999a. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet.* 262, 453–461.
- Verdoes, J.C., Misawa, N., van Ooyen, A.J., 1999b. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 750–755.
- Verdoes, J.C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., van Mossel, M., van Ooyen, A.J.J., 2003. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3728–3738.
- Verwaal, R., Wang, J., Meijnen, J.-P., Visser, H., Sandmann, G., van den Berg, J.A., van Ooyen, A.J.J., 2007. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4342–4350.
- Visser, H., Sandmann, G., Verdoes, J.C., 2005. Xanthophylls in fungi, in: Barredo, J.-L. (Ed.), *Microbial Processes and Products*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 257–272.
- Visser, H., van Ooyen, A.J.J., Verdoes, J.C., 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res.* 4, 221–231.
- Webster, J., Weber, R., 2007. *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press.
- Weete, J.D., Abril, M., Blackwell, M., 2010. Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS One* 5.

- Weller, P., Breithaupt, D.E., 2003. Identification and quantification of zeaxanthin esters in plants using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7044–7049.
- Wertheimer, N.B., Stone, N., Berman, J., 2016. Ploidy dynamics and evolvability in fungi. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371.
- Wery, J., Gutker, D., Renniers, A.C., Verdoes, J.C., van Ooyen, A.J., 1997. High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Gene* 184, 89–97.
- Wery, J., Verdoes, J.C., Ooyen, A.J.J. van, 1998. Efficient transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Tech.* 12, 399–405.
- Wooten, B.R., Hammond, B.R., 2002. Macular pigment: influences on visual acuity and visibility. *Prog. Retin. Eye Res.* 21, 225–240.
- Wozniak, A., Lozano, C., Barahona, S., Niklitschek, M., Marcoleta, A., Alcaíno, J., Sepulveda, D., Baeza, M., Cifuentes, V., 2011. Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS Yeast Res.* 11, 252–262.
- Yamane, Y., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nishio, N., 1997. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-Batch cultures: Kinetic and stoichiometric analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4471–4478.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J., 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119.
- Yokoyama, A., Miki, W., Izumida, H., Shizuri, Y., 1996. New trihydroxy-ketocarotenoids isolated from an astaxanthin-producing marine bacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 200–203.
- Yu, Q., Schaub, P., Ghisla, S., Al-Babili, S., Krieger-Liszkay, A., Beyer, P., 2010. The lycopene cyclase CrtY from *Pantoea ananatis* (formerly *Erwinia uredovora*) catalyzes an FAD_{red}-dependent non-redox reaction. *J. Biol. Chem.* 285, 12109–12120.
- Zaragoza, O., Rodríguez, C., Gancedo, C., 2000. Isolation of the MIG1 gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. *J. Bacteriol.* 182, 320–326.
- Zheng, Y.-G., Hu, Z.-C., Wang, Z., Shen, Y.-C., 2006. Large-scale production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Food Bioprod. Process.* 84, 164–166.
- Zhu, L., Wu, X., Li, O., Chen, Y., Qian, C., Teng, Y., Tao, X., Gao, H., 2011. Cloning and knockout of phytoene desaturase gene in *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 for economic recovery of gellan gum. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1507–1513.

Anhang

A.1 Plasmidkarten



Legende

- Amp^R: Ampicillin-Resistenzkassette
- Hyg^R: Hygromycin-Resistenzgen
- asy_{start}*: Astaxanthin-Synthase-Gen (Anfang)
- asy_{end}*: Astaxanthin-Synthase-Gen (Ende)
- crtZ_{oxd}*: 3,3'-β-Hydroxylase-Gen
- P_{asy}: Astaxanthin-Synthase-Promotor
- P_{gpd}: Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Promotor
- T_{gpd}: Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Terminator

Abbildung A.1: Plasmidkarten der Knock-Out- und Knock-In-Plasmide.

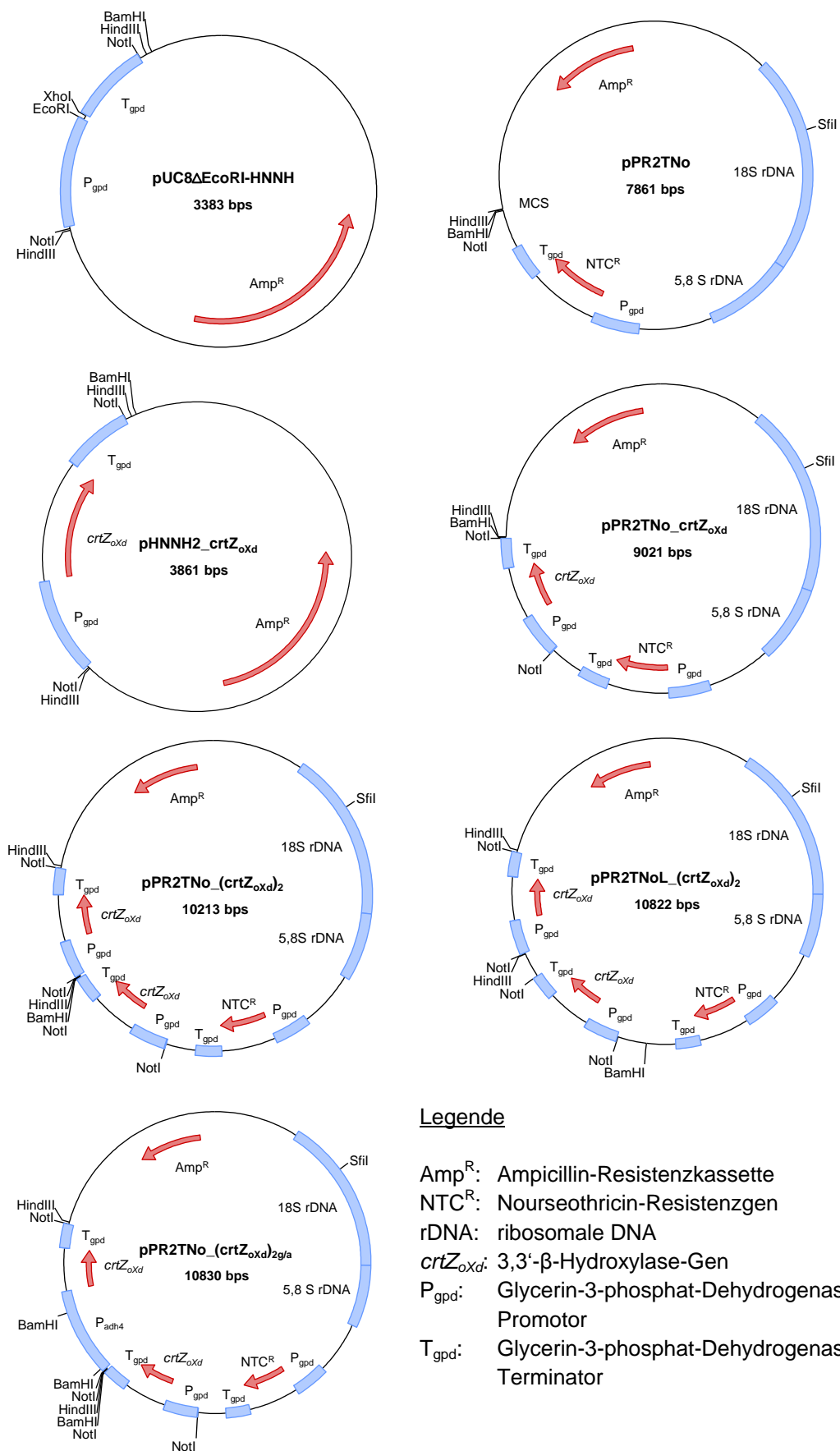
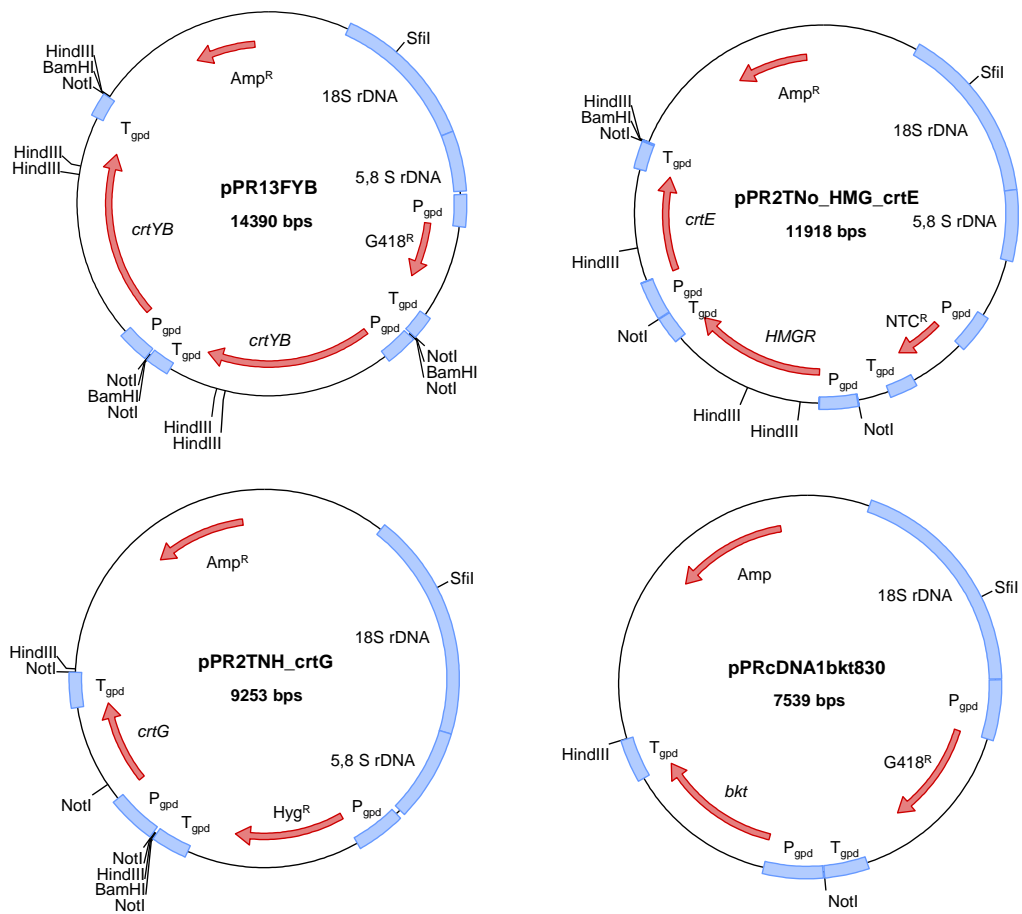


Abbildung A.2: Plasmidkarten der *crtZ_{oxd}*-Plasmide und Ausgangsvektoren.



Legende

- Amp^R: Ampicillin-Resistenzkassette
- G418^R: Geneticin-Resistenzgen
- Hyg^R: Hygromycin-Resistenzgen
- NTC^R: Nourseothricin-Resistenzgen
- rDNA: ribosomale DNA
- crtYB*: Lycopin-Zyklase / Phytoen-Synthase -Gen
- HMGR*: HMG-CoA-Reduktase-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae*
- crtG*: β-2,2'-Hydroxylase aus *Brevundimonas SD212*
- bkt*: β-4,4'-Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*
- P_{gpd}: Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Promotor
- T_{gpd}: Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Terminator

Abbildung A.3: Plasmidkarten weiterer pPR2TN-Plasmide.

A.2 Gensequenzen

crtZ aus *Brevundimonas* SD212 [BAD99414.1]

ATGGCCTGGCTGACGTGGATCGCGCTGTTCTGACCGCCTTTTTGGGCATGGA
GGCGTTCGCTGGATCATGCACCGCTATGTGATGCACGGTTTCCTGTGGTCTG
GGCACCGCAGCCATCATGAGCCGCACGATCACCCCTGGAGAAGAACGACCT
GTTCCCGTGGTCTTCGCCGCCCGGCCATCGTCATGGTGGCCGTGGGTCTG
CACCTGTGGCCCTGGGCCCTGCCGGTCGGCCTGGGGATCACGGCCTATGGG
ATGGTCTATTTCTTCTCCACGACGGCCTGGTGCACCGGCGGTTCCCGACGGG
CTTTCCGGGCGGTCCGGCTTCTGGACGCGGCGCATCCAGGCGCACCGTCTG
CATCACGCCGTGCGCACGCGGAAGGCTGCGTCTCCTTCGGCTTTCTGTGGG
TGCGGTGCGCGCGGGCGCTGAAGGCCGAAGTGGCTCAGAAGCGGGGCTCTT
CCAGCAGCGGCGCCTGA

crtZ_{oxd} (codon optimiert für *X. dendrorhous*) [KX063854]

ATGGCTTGGCTCACCTGGATCGCTCTCTTCCTCACCGCTTTCCTCGGAATGGA
GGCTTTCGCTTGGATCATGCATCGATACGTCATGCATGGATTCTCTGGTCTTG
GCATCGATCTCATCATGAGCCTCATGATCATCCTCTCGAGAAGAACGATCTCTT
CGCTGTGCTCTTCGCTGCTCCTGCTATCGTCATGGTCGCTGTCCGACTCCATC
TCTGGCCTTGGGCTCTCCCTGTCGGACTCGGAATCACCGCTTACGGAATGGTC
TACTTCTTCTTCCATGATGGACTCGTCCATCGACGATTCCCTACCGGATTCTCT
GGACGATCTGGATTCTGGACCCGACGAATCCAGGCTCATCGACTCCATCATGC
TGTCGGAACCCGAGAGGGATGTGTCTCTTTCGGATTCTCTGGGTCCGATCTG
CTCGAGCTCTCAAGGCTGAGCTCGCTCAGAAGCGAGGATCTTCTTCTTCTGGA
GCTTGA