



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

**Optimierung der Astaxanthin-Synthese in  
*Synechococcus* sp. PCC7002 unter Zuhilfenahme  
synthetischer Biologie**

vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

**Dissertation**  
**Von Simon Greulich**

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Harald Kolmar

Darmstadt 2024

---

---

Simon Greulich:

Optimierung der Astaxanthin-Synthese in *Synechococcus* sp. PCC7002 unter Zuhilfenahme synthetischer Biologie.

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUprints: 2024

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2024

Veröffentlicht unter CC BY 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

---

---

---

## 1 Ehrenwörtliche Erklärung:

---

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich, dass ich bei der Verfassung der Dissertation die "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Technischen Universität Darmstadt" und die "Leitlinien zum Umgang mit digitalen Forschungsdaten an der TU Darmstadt" in den jeweils aktuellen Versionen beachtet habe. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

.....  
Darmstadt, 05.08.2024

Ort, Datum

.....

---

---

## 2 Danksagung

---

„Zusammenkommen ist ein Beginn, Zusammenbleiben ist ein Fortschritt, Zusammenarbeiten führt zum Erfolg.“ *Henry Ford, Großindustrieller*

Unter diesem Zitat möchte ich mich allen voran bei Herrn Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff bedanken. Dafür, dass er sein Vertrauen in mich gesetzt und mir das Thema dieser Arbeit überlassen hat. Aber auch für die vielen Ratschläge, Diskussionen und Hilfestellungen vor und während der Arbeit. Abschließend auch dafür, dass er Inspiration und Antrieb für mich ist und war, um als Wissenschaftler über mich selbst herauswachsen zu können.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar für die Bereitschaft sich als Zweitgutachter für meine Arbeit zur Verfügung zu stellen.

Mein Dank gilt weiter Beate Otto für die intensiven und erhellenden Gespräche, die Ratschläge und die Weitergabe von Teilen ihres immensen Laborwissens. Das Teilen eines Büros war stets eine Freude und eine Bereicherung für mich und meine Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei der Abteilung für Massenspektrometrie des Fachbereichs Chemie der TU Darmstadt bedanken, dass sie meine Proben für mich mittels HPLC-MS analysiert haben. Hier besonders bei Frau Christiane Rudolph für die Aufarbeitung der Rohdaten.

Für entspannende Mittagspausen möchte ich Franziska Joseph, Isabell Pappert und Luca Jokic danken, die mich darüber hinaus auch in den Labmeetings durch die geführten Diskussionen weitergebracht haben. Ferner Danke ich Dr. Nam Trung Tran, Kim Tristan Wolf und Mia Seitz für die Unterhaltungen und Gesellschaft bei der Arbeit. Hier möchte ich mich auch bei Dr. Norbert Uehlein-Rössner bedanken, der mir beibrachte das Labor wie meine Westentasche zu kennen.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Jungs unserer Lerngruppe bedanken, die mich durch mein Studium begleitet haben und auch danach stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz besonders gilt hier mein Dank Marcel Wendel für die Motivation durch unsere gemeinsamen Fahrten von und zur Uni und die langen Diskussionen über unsere Arbeiten bis spät in die Nacht.

Hier nun auch ein sehr großer Dank an meine Freundin Natascha Eder, die die vielen Diskussionen über meine Arbeit ertragen hat und für mich in stressigen Zeiten stets zur Seite stand. Auch dafür, dass sie meine Arbeit korrekturgelesen hat.

Zum Schluss gilt mein Dank meiner Familie, für ihre unermüdliche Unterstützung in all den schwierigen Zeiten. Ohne sie hätte ich nie begonnen zu studieren und hätte so meine Leidenschaft für die Forschung nicht ausleben können.

---

### 3 Zusammenfassung

---

Weil fossile Rohstoffe endlich sind und deren Nutzung negativ auf den immer schneller voranschreitenden Klimawandel wirkt, ist es wichtig Alternativen zu finden. Eine derzeit schon genutzte Lösung stellen Produktionslinien gestützt auf Mikroorganismen dar. Diese benötigen jedoch Zucker für ihr Wachstum und die damit verbundene Produktion der gewünschten Güter. Zudem erzeugt der Metabolismus dieser Zellen CO<sub>2</sub> im Unterschied zu photosynthetisch aktiven Mikroorganismen. Diese benötigen keinen Zucker für ihr Wachstum und produzieren darüber hinaus Sauerstoff. Eine klimaneutrale oder sogar klimapositive Produktion ist so möglicherweise erreichbar.

Entsprechend werden Cyanobakterien derzeit intensiv erforscht. Sie sollen als Produktionsplattform für die Synthese verschiedenster Substanzen verwendet werden. Darunter sind Feinchemikalien, Medikamente oder Biotreibstoff. Jedoch scheitern viele dieser Ansätze derzeit an der zu geringen Ausbeute. Hier spielen die kostenintensive Ernte und Aufreinigung eine wichtige Rolle. Auch die Synthese von Astaxanthin ist aus diesem Grund oft nicht rentabel, obwohl die Substanz hochpreisig gehandelt wird und in der Pharma-, Lebensmittel- oder Kosmetikindustrie wegen starker antioxidativer Eigenschaften gefragt ist.

*Synechococcus* sp. PCC7002 kann den Astaxanthin-Vorläufer  $\beta$ -Carotin produzieren, aber nicht Astaxanthin. Jedoch ist dieses Cyanobakterium leicht genetisch zu modifizieren und weist ein extremes Wachstum, mit einer minimalen Verdopplungszeit von 2,6 Stunden, auf. Unter Verwendung eines synthetischen Ketolase- und eines synthetischen Hydroxylase-Gens gelang die Modifizierung des Carotin-Stoffwechsels. Der Organismus war nun in der Lage Astaxanthin zu synthetisieren. Der zelluläre Gesamtgehalt an Astaxanthin wurde durch die Überexpression der intrinsischen Phytoen-Synthase weiter erhöht. Bei den Versuchen der Modifizierung des Carotinoid-Stoffwechsels zeigte sich, dass es mehr Regulationsmechanismen gibt als derzeit in der wissenschaftlichen Literatur bekannt sind. Darüber hinaus stellten sich gewisse durch die wissenschaftliche Literatur begründete Annahmen als falsch heraus.

Bezüglich der Lösung des Problems der kostenintensiven Ernte und Extraktion, ermöglichte die Expression eines *E. coli*-ABC-Transporter den Export von Astaxanthin. Zugleich verringert dies die intrazelluläre Produktakkumulation. Auf diese Weise wurde die Synthese weiter gesteigert. Aus dem Kulturmedium können dann erhebliche Mengen Astaxanthin zurückgewonnen werden, ohne dass es einer Zerstörung der Zellen bedarf.

Insgesamt ermöglichen die erzielten Erfolge, allen voran durch die erstmalige erfolgreiche Nutzung eines ABC-Transporters für den Export von Carotinoiden in photosynthetisch aktiven Mikroorganismen, eine gänzlich neue Produktionsstrategie. Der erzeugte *Synechococcus* sp. PCC7002-Stamm kann eine kontinuierliche Astaxanthin-Produktion gewährleisten, die ohne Ernte und Zerstörung der Zellen auskommt. Potenziell ergibt sich daraus eine klimaneutrale oder sogar klimapositive Produktionsplattform.

---

## 4 Abstract

---

As fossil Resources are finite and their use contributes to accelerating climate change, it is important to find alternatives. One solution already in use is production lines based on microorganisms. However, these require sugar to grow and produce the desired goods. In addition, the metabolism of these cells produces CO<sub>2</sub>, unlike photosynthetically active microorganisms. These do not require sugar to grow and also produce oxygen. Climate-neutral or even climate-positive production may therefore be achievable.

Consequently, cyanobacteria are currently the subject of intensive research. As a production platform, they can be used to synthesise a wide range of substances. These include among other things chemicals, medicines, and biofuels. However, many of these applications are failing. The most important reasons are the low yield combined with costly harvesting as well as purification processes. For these reasons the synthesis of Astaxanthin is also often unprofitable, although the substance is traded at a high price and is in demand in the pharmaceutical, food and cosmetics industries due to its strong antioxidant properties.

*Synechococcus* sp. PCC7002 is able to produce the astaxanthin precursor  $\beta$ -carotene but cannot produce astaxanthin. However, this cyanobacterium is easily genetically modified and exhibits extreme growth, with a minimum doubling time of 2.6 hours. Using a synthetic ketolase as well as a synthetic hydroxylase gene, the modification of the carotene metabolism was successful. Finally, the organism was able to synthesise astaxanthin. Total cellular astaxanthin content was further increased by the overexpression of the intrinsic phytoene synthase. Attempts to modify the carotenoid metabolism revealed that there are more regulatory mechanisms than currently known in the scientific literature. In addition, certain assumptions based on the scientific literature turned out to be incorrect.

To overcome the problem of costly harvesting and extraction, the expression of an *E. coli* ABC transporter enabled the export of astaxanthin. At the same time the intracellular accumulation of the product was reduced. In this way synthesis was further enhanced. Consequently, substantial amounts of astaxanthin can then be recovered from the culture medium without the need to destroy the cells.

Overall, a completely new production strategy is made possible by the successes achieved, the first successful use of an ABC transporter for the export of carotenoids in photosynthetic microorganisms. The *Synechococcus* sp. PCC7002 strain developed can ensure continuous astaxanthin production without harvesting and destroying the cells. This could potentially result in a climate-neutral or even climate-positive production platform.

---

## 5 Inhaltsverzeichnis

---

1	Ehrenwörtliche Erklärung:	3
2	Danksagung	4
3	Zusammenfassung	1
4	Abstract	2
5	Inhaltsverzeichnis	iii
6	Einleitung	6
7	Material und Methoden	14
7.1	Molekularbiologische Verfahren	14
7.1.1	Erzeugung synthetischer Gene	14
7.1.2	Plasmid-Mini-Präparation	14
7.1.3	Ethanol/Natriumacetat-Präzipitation	15
7.1.4	Oligodesoxynucleotidprimer-Synthese	15
7.1.5	Polymerase Chain Reaction (PCR)	15
7.1.6	Auftrennung von DNA durch Elektrophorese	16
7.1.7	Auftrennung von RNA durch Elektrophorese	17
7.1.8	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	17
7.1.9	Synthese von cDNA	18
7.1.10	qPCR-Analyse	18
7.1.11	Restriktion	19
7.1.12	Ligation	20
7.1.13	In-Fusion® HD cloning	20
7.1.14	Vektoren	21
7.1.15	Sequenzierung	24
7.2	Verwendete Organismen	24
7.3	Verfahren mit <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	24
7.3.1	Kultivierung	24
7.3.2	Generierung von chemische kompetenten <i>E. coli</i>	25
7.3.3	Kryokonservierung	26
7.3.4	Transformation	26
7.4	Verfahren mit <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	27
7.4.1	Kulturbedingungen	27
7.4.2	Transformation	28
7.4.3	Selektion	28

---

7.4.4	Erweiterte Selektion	28
7.4.5	Ermittlung der relativen Integrationszahl	29
7.4.6	Extraktion von genomischer DNA aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	30
7.4.7	Extraktion der RNA	30
7.4.8	Kryokonservierung	31
7.4.9	Überschichtung mit organischem Lösemittel	31
7.5	Verfahren mit Carotinoiden	32
7.5.1	Extraktion von Carotinoiden aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	32
7.5.2	Extraktion von Carotinoiden aus organischen Lösemitteln	32
7.5.3	Verseifung von Carotinoiden	32
7.5.4	HPLC-Analyse	32
7.5.5	HPLC-MS-Analyse	34
7.6	Statistik	34
8	Ergebnisse	35
8.1	Funktionsanalyse von Einzelgenen	35
8.2	Enzymfunktionsanalyse	36
8.3	Funktionstest von mehrfach veränderten Transformanden	37
8.4	Expressionsnachweis auf RNA-Ebene	38
8.5	Funktionsanalyse einer alternativen $\beta$ -Carotin-Hydroxylase	39
8.6	Analyse von mehrfach veränderten Transformanden mit alternativer $\beta$ -Carotin-Hydroxylase	41
8.7	Vergleich der neutralen Integrationsstellen auf Ihr Expressions-Niveau	42
8.8	Expression der synthetischen Gene durch die Integration in das endogene Plasmid	44
8.9	Untersuchung des Einflusses der Kultivierungszeit auf die Carotinoid-Ausbeute	44
8.10	Untersuchung des Einflusses von Licht auf die Carotinoid-Synthese	45
8.10.1	Experimentelle Untersuchung der Lichtintensität	45
8.10.2	Experimentelle Untersuchung von Lichtrhythmen	45
8.11	Einfluss von pH-Stress auf die Carotinoid-Synthese	46
8.12	Überexpression der Phytoen-Synthase zur Optimierung des Synthesewegs	46
8.13	Relative Integrationszahl	49
8.14	Auswirkungen des ABC-Transporters auf die Zelllinien	50
9	Diskussion	54
9.1	Einflüsse der Expression von $\beta$ -Carotin-modifizierenden Enzymen	54
9.2	Analyse der Funktion von Enzymen im <i>E. coli</i> -System	54
9.3	Nachweis der Expression auf RNA-Ebene	55



---

9.4	Verwendung einer alternativen $\beta$ -Carotin-Hydroxylase	56
9.5	Einflüsse der Expression von zwei Genen in einer Zelllinie	56
9.6	Analyse der Integration von Genen in verschiedene neutrale Integrationsstellen	58
9.7	Einfluss von Kultivierungsparametern auf die Carotinoid-Ausbeute	59
9.7.1	Analyse von Einflüssen des Lichts	59
9.7.2	Analyse des Parameters pH-Stress	59
9.8	Auswirkungen durch die Überexpression der Phytoen-Synthase	60
9.9	Einflüsse der relativen Integrationszahl auf die Carotinoid-Ausbeute	62
9.10	Auswirkungen eines ABC-Transporters auf den Organismus	62
10	Ausblick	65
11	Literaturverzeichnis	67
12	Anhang	73
12.1	Abbildungsverzeichnis	73
12.2	Tabellenverzeichnis	77
12.3	Abkürzungsverzeichnis	78
12.4	Sequenzen	79
12.4.1	PsbA1-Promotor	79
12.4.2	CPC560-Promotor	79
12.4.3	Theophyllin induzierbarer Promotor	80
12.4.4	Ketolase-Gensequenz aus <i>Brevundimonas</i> sp. optimiert für PCC7002	80
12.4.5	Hydroxylase-Gensequenz aus <i>Brevundimonas</i> sp. optimiert für PCC7002	80
12.4.6	Hydroxylase-Gensequenz aus <i>Alcaligenes</i> sp. strain PC-1 optimiert für PCC7002	80
12.4.7	Linker-Sequenz	81
12.4.8	EcoMSBA-Transporter-Gensequenz aus <i>E.coli</i> str. K-12 optimiert für PCC7002	81
12.5	Listen	82
12.6	HPLC-Chromatogramme der Standardsubstanzen	90
12.7	HPLC-MS Ergebnisse	92
12.8	Beim Ideenwettbewerb der TU Darmstadt eingereichtes Nebenprojekt	96
12.9	Lebenslauf	97

---

## 6 Einleitung

---

Der Klimawandel schreitet mit enormer Geschwindigkeit voran. Um dem entgegenzuwirken, müssen Maßnahmen ergriffen werden, die die CO<sub>2</sub> Emissionen reduzieren oder einen CO<sub>2</sub> Kreislauf unterstützen. Neue industrielle klimaverträgliche Produktionsverfahren können einen Beitrag dazu leisten (Dasan et al. 2019; Kumar et al. 2020; Medeiros et al. 2015).

Eine Alternative zu derzeit genutzten Verfahren stellen sogenannte „grüne Produktionslinien“ dar. Diese basieren nicht auf fossilen Rohstoffen, sondern verwenden Mikroorganismen zur Herstellung von Produkten (Kumar et al. 2020; Medeiros et al. 2015). Die eingesetzten Mikroorganismen, zumeist Hefen oder *Escherichia coli*, werden hierbei in Fermentern kultiviert und die Produkte aus der Fermentation gewonnen. Jedoch benötigen diese Organismen Zucker für Ihr Wachstum, der ebenfalls eine begrenzte, wenn auch nachwachsende Ressource darstellt. Sowohl in der Forschung als auch der Industrie rücken Mikroalgen aus diesem Grund immer mehr in den Fokus (Gurreri et al. 2023). Mikroalgen stellen eine Gruppe photosynthetischer, ein- oder mehrzelliger Organismen dar, die weltweit in einer Vielzahl von Lebensräumen vorkommen. Dazu gehören Meeresumgebungen und Süßwasser sowie unerwartete Nischen wie Wälder, Steinwände oder Eisflächen. Die Anzahl der Arten wird auf 45.000 bis 100.000 geschätzt (Singh und Saxena 2015; Heimann und Huerlimann 2015; Rumin et al. 2020; Maity und Mallick 2022). Sie benötigen nur Licht, Salz und CO<sub>2</sub> für Ihr Wachstum. Dabei weisen sie eine bis zu 10-fach höhere photosynthetische Effektivität im Vergleich zu höheren Pflanzen auf (Xu et al. 2019). Marine Mikroalgen sind maßgeblich an der Sauerstoffproduktion der Erde beteiligt, etwa die Hälfte der globalen Sauerstoffproduktion entfällt auf sie (Maity und Mallick 2022). Vor allem die Sequestrierung von CO<sub>2</sub> ist ein Vorteil, den bisherige Produktionsketten nicht aufweisen. Durch die Verwendung von CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle benötigen Mikroalgen keinen Zucker für Ihr Wachstum (Acién et al. 2012; Zhou et al. 2017). Auch Stickstoff können sie aus der Luft assimilieren und für ihr Wachstum verwenden. So wäre eine klimaneutrale Produktion oder gar eine klimapositive Produktion möglich (Zhou et al. 2017; Maity und Mallick 2022). In den letzten Jahren sind immer mehr Forschungsarbeiten rund um die Nutzung von Mikroalgen als Produktionssystemen veröffentlicht worden.

Der Fokus lag hier vor allem auf den prokaryotischen Vertretern der Mikroalgen, den Cyanobakterien. Diese sind genetisch einfacher aufgebaut und schon bestehende Kenntnisse können auf sie übertragen werden. Hierbei dient Wissen aus nicht photosynthetisch aktiven Organismen, welche schon in der Industrie verwendet werden (*E. coli*), als Quelle (Carroll et al. 2018). Zu beachten ist jedoch, dass der Begriff Mikroalge kein offizielles Phylum beschreibt. Unter Mikroalgen werden Organismen zusammengefasst, die photosynthetisch aktive einzellige Organismen sind. Aus diesem historischen Hintergrund erfolgt auch die Zuschreibung der früher ob Ihres kobaltblauen Pigments Phycocyanin als Blaualgen bezeichneten Cyanobakterien zur Gruppe der Mikroalgen. Aktuell erfolgt die offizielle Zuteilung hingegen zum Phylum der Bakterien. Im direkten Vergleich mit eukaryontischen Mikroalgen weisen Cyanobakterien ein schnelleres Wachstum auf. Gewisse Vertreter dieser Gattung haben eine minimale Verdopplungszeit von 1,5 Stunden, wohingegen viele

---

eukaryontische Mikroalgen eine Verdopplungszeit von mindestens 12 Stunden aufweisen (Ungerer et al. 2018; Krzemińska et al. 2014).

Des Weiteren ist der Aufbau von Cyanobakterien simpler, da sie keine abgetrennten Kompartimente wie Zellkern, Mitochondrien oder Chloroplasten aufweisen (Carroll et al. 2018). Es wird sogar davon ausgegangen, dass die Chloroplasten von eukaryontischen Mikroalgen, aus der Endosymbiose mit Cyanobakterien hervorgingen (Sato 2021). Dies würde zudem die komplexere genetische Regulation von eukaryontischen Mikroalgen erklären, die nicht nur aus der Abtrennung durch den Zellkern und der komplexeren Regulation der Zellen hervorgeht. Die Chloroplasten dieser Zellen besitzen eine eigene genetische Regulation, infolgedessen ist eine genetische Manipulation schwieriger. Cyanobakterien besitzen hingegen nur ein Genom, das in mehrfacher Kopie in der Zelle vorliegt (Zerulla et al. 2016). Einzelne Stämme verfügen darüber hinaus noch über endogene Plasmide, die ebenfalls eine Relevanz für den Metabolismus aufweisen (Yano et al. 1995).

Die Forschung arbeitet derzeit daran, die Regulation und Steuerung des Metabolismus solcher Organismen aufzuklären, damit eine Manipulation dieser für die Nutzung in Produktionsketten möglich ist. Hierbei ist die Idee, Cyanobakterien als Chassis für die Produktion von Feinchemikalien, Nahrungsergänzungsmitteln oder klinisch relevante Stoffe zu verwenden (Ruffing et al. 2016).

Unter diesen, ist *Synechococcus* sp. PCC7002 einer der geeignetsten. Dieser Stamm ist natürlich kompetent und sein 3 Mbp langes Genom ist komplett sequenziert, infolgedessen ist er einfach genetisch modifizierbar. Darüber hinaus besitzt *Synechococcus* sp. PCC7002 mehrere neutrale Integrationsstellen (NS, für engl. „neutral site“), Genombereiche die bei Veränderung keine Auswirkung auf den Metabolismus oder das Wachstum des Stammes haben. Mittels homologer Rekombination können heterologe Gene zielgerichtet in das Genom - idealerweise in die neutralen Integrationsstellen – eingebracht werden (Ruffing et al. 2016; Vogel et al. 2017). Dies erfolgt über sogenannte Transformationsvektoren, die eine hohe Transformationseffizienz ermöglichen. Die Verwendung synthetischer Gene – Gene, die eine Anpassung an den Organismus durch Codon-Optimierung erfahren haben, jedoch auch auf ihre RNA- und DNA-Sekundärstrukturen optimiert sind – könnte eine verbesserte Genexpression ermöglichen (Tran und Kaldenhoff 2020a). Dies dürfte zu einer erhöhten Enzymkonzentration führen, die in hierdurch limitierten Syntheseschritten den Engpass aufheben.

*Synechococcus* sp. PCC7002 kann sowohl in Frischwasser als auch in Brackwasser wachsen und hat eine minimale Verdopplungszeit von 2,6 Stunden. Die Möglichkeit, in Brackwasser zu wachsen, ermöglicht die Vermeidung der Nutzung von Frischwasser. Dies sorgt für weniger Konkurrenz zur Landwirtschaft und schont Ressourcen (Ruffing et al. 2016; Aikawa et al. 2014). Ebenfalls würden Produktionsanlagen, die *Synechococcus* sp. PCC7002 nutzen, die Möglichkeit besitzen, derzeitiges Brachland zu verwenden, um nicht in Konkurrenz zur Landwirtschaft oder Wohnraum zu stehen. Durch den geringen Nährstoffbedarf und die CO<sub>2</sub>-Nutzung könnten Anlagen mit Industrieprozessen gekoppelt werden, in denen CO<sub>2</sub> und im Idealfall auch Wärme als Abfallprodukte entstehen. Mittels dieser Verknüpfung entsteht die Möglichkeit der Etablierung einer Kreislaufwirtschaft.

---

Für dieses Ziel bedarf es zuerst weiterer Forschung in der Nutzung und dem Verständnis der Biologie des verwendeten Stamms. Viele Regulationsmechanismen des Metabolismus sind noch nicht oder nur unzureichend aufgeklärt. Der Einfluss durch Veränderungen der neutralen Integrationsstellen auf das Wachstum und den Metabolismus sind zwar erforscht, jedoch gab es keine einheitlichen Studien zur Untersuchung der Expression heterologer Gene in diesen neutralen Integrationsstellen. Diese Lücke konnte durch die Studie von Pappert et al. infolge unerwarteter Ergebnisse meiner Arbeit geschlossen werden (Pappert et al. 2023).

Carotinoide, eine vielfältige Gruppe von wasserunlöslichen Pigmenten, sind in der Natur weit verbreitet. Sie werden von praktisch allen photosynthetisch aktiven Organismen, sowie von vielen Bakterien und Pilzen, synthetisiert. In der Welt der Mikroalgen erfolgt die Synthese von mehr als 30 verschiedenen Carotinoiden, die bei der Photosynthese eine zentrale Rolle spielen. Sie dienen als Pigmente zur Lichtabsorption und bieten Schutz vor photooxidativen Schäden (Badger et al. 2006; Liu et al. 2022). Neben ihren grundlegenden biologischen Funktionen haben Carotinoide auch in der Industrie eine breite Anwendung gefunden. Ihre Bedeutung in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie erhalten sie durch ihre leuchtenden Farben, ihre antioxidativen Eigenschaften, ihre Anti-Aging-Eigenschaften und ihre stresslindernde Wirkung in Verbindung mit ihrer Rolle als Vorstufen essenzieller Vitamine (Nabi et al. 2020; Shin et al. 2022; Baran et al. 2020).

Unter diesen Carotinoiden zeichnet sich Astaxanthin, ein tiefrotes Pigment, durch eine bemerkenswerte antioxidative Wirkung aus; die geschätzte biologische Aktivität ist etwa zehnmal höher als die anderer Carotinoide und tausendmal höher als die von Vitamin E (Patel et al. 2022). Der Trivialnamen Astaxanthin steht für 3,3'-Dihydroxy- $\beta,\beta$ -carotin-4,4'-dion, woraus sich ableiten lässt, dass es ein Derivat von  $\beta$ -Carotin ist. Der Stoff zählt zur Klasse der Xanthophylle und ist folglich ein Tetraterpen, das sauerstoffhaltige Gruppen in Form von Hydroxy-, Carbonyl- oder Carboxygruppen trägt (Stachowiak und Szulc 2021; Aneesh et al. 2022; Zhu et al. 2010). In der Natur kommt Astaxanthin in vielen Mikroalgen vor und sorgt für die Pigmentierung von Fischen und Krebstieren, die es nicht selbst synthetisieren können. Gegenwärtig wird Astaxanthin vor allem in Tierfutter für die Aquakultur verwendet, um die Pigmentierung von Lachs-, Forellen- und Krabbenfleisch zu verbessern und gleichzeitig gesundheitliche Vorteile für diese Wassertiere zu bieten. Seine außergewöhnlichen Eigenschaften haben es in den Fokus gerückt und zu einer steigenden Nachfrage nach seiner Verwendung in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten geführt (Patel et al. 2022; Varela et al. 2015; Nabi et al. 2020).

Im Jahr 2019 erreichte der Weltmarkt für Astaxanthin einen Wert von 1,0 Mrd. USD und es wird erwartet, dass er bis 2027 eine stetige Wachstumsrate von 16,2 % aufweisen wird (Stachowiak und Szulc 2021). Innerhalb dieses Marktes dominiert synthetisches Astaxanthin, dessen Gewinnung hauptsächlich durch chemische Synthese erfolgt, den Fisch- und Tierfuttersektor aufgrund seiner vergleichsweise niedrigen Kosten von 1.000 USD pro Kilogramm. Die Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikindustrie hingegen bevorzugt natürliches Astaxanthin, das aus biologischen Quellen gewonnen wird. Trotz seines höheren Preises von 5.000 USD pro Kilogramm im Vergleich zu synthetischen Alternativen ergibt sich die Bevorzugung von natürlichem Astaxanthin aufgrund seiner deutlich verbesserten und nachgewiesenen gesundheitlichen Wirkung (Patel et al. 2022;

---

Stachowiak und Szulc 2021). Diese wird durch Ester-Verbindungen mit Fettsäuren hervorgerufen. Infolge dieser Verbindungen besitzt natürliches Astaxanthin eine höher Bioverfügbarkeit, da die Aufnahme bei der Verdauung verbessert ist (Yang et al. 2021b; Yang et al. 2021a). Zudem erhöhen diese Verbindungen die antioxidativen Eigenschaften, in dem die Elektronendichte des konjugierten  $\pi$ -Systems beeinflusst wird.

Die Gewinnung von natürlichem Astaxanthin erfolgt derzeit durch die Kultivierung von verschiedenen eukaryontischen Mikroalgen wie *Haematococcus pluvialis*. Diese Mikroalgen besitzen einen Metabolismus, der fähig ist, Astaxanthin zu produzieren. Jedoch ist entweder die Ausbeute sehr gering oder es bedarf eines zweistufigen Produktionsprozesses (Li et al. 2020). In diesem erfolgt zuerst der Aufbau von Biomasse unter streng kontrollierten Kultivierungsbedingungen. In einem zweiten Schritt werden die vegetativen Zellen Stress, z.B. Licht- oder Trocken-Stress, ausgesetzt. Dies sorgt dafür, dass die Mikroalgen ihr Wachstum einstellen und zum Schutz Carotinoide, insbesondere Astaxanthin, produzieren. Diese Umstellung kann bei gewissen Spezies zur Bildung von Zysten – ein Zelltyp der nur noch grundlegende Stoffwechselprozesse aufrechterhält und sich nicht mehr fortpflanzt – führen. In der Dauerform ist es möglich, Astaxanthin Anteile von 5 % an der Zelltrockenmasse zu erreichen (Bauer und Minceva 2021; Shah et al. 2016). Für eine solch hohe Ausbeute bedarf es jedoch einer mehrwöchigen Kultivierung. Einen wesentlich einfacheren Prozess ergäbe eine Verwendung von Mikroalgen, die Astaxanthin dauerhaft in ihren vegetativen Zellen produzieren. In der wissenschaftlichen Literatur gibt es für diesen Zweck mehrere potenzielle Stämme (Liu et al. 2019; Shimada et al. 2020; Amendola et al. 2023). Zumeist wurden diese durch „Metabolic Engineering“, zur Astaxanthin-Synthese befähigt oder ihr natürlicher Astaxanthin-Syntheseweg erfuhr eine Verbesserung. Alle Versuche zeigen in der Regel nur ein „proof of principle“, in denen Enzyme Verwendung fanden, die aus bekannten Astaxanthin produzierenden Organismen stammten. Regulationen jeglicher Art wurden dabei nicht beachtet und sind noch immer wenig bis überhaupt nicht erforscht (Patel et al. 2022; Wan et al. 2021).

Der Stamm *Synechococcus* sp. PCC7002 besitzt einen eigenen Carotinoid-Syntheseweg, über den er  $\beta$ -Carotin und geringe Mengen Zeaxanthin synthetisieren kann (Hasunuma et al. 2019). Durch dies und die oben erwähnten Eigenschaften der leichten genetischen Modifizierbarkeit und dem schnellen Wachstum bei geringem Nährstoffbedarf, ist die Verwendung dieses Stammes zur Produktion von Astaxanthin naheliegend. Der natürliche Carotinoid-Syntheseweg müsste in der Theorie lediglich mit zwei zusätzlichen Genen versehen werden, einer  $\beta$ -Carotin-Ketolase und einer  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase. Diese beiden Enzyme können sowohl  $\beta$ -Carotin als auch dessen Derivate als Edukte nutzen. Eine Ketolase fügt eine Keto-Gruppe an das Kohlenstoffgerüst hinzu. Im Falle der  $\beta$ -Carotin-Ketolase wird die Keto-Gruppe (=O) an das C4-Atom von einem der beiden endständigen  $\beta$ -Ionon-Ringe angefügt. Durch diese Reaktion wird aus  $\beta$ -Carotin Echinenon. Im Fall einer Veränderung beider endständigen C4-Atome entsteht Canthaxanthin. Die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase fügt eine Hydroxyl-Gruppe (-OH) an einen der beiden asymmetrischen Kohlenstoffe (C3- oder C3'-Atom) an. Eine Reaktion erzeugt  $\beta$ -Cryptoxanthin und eine Zweifachreaktion Zeaxanthin. Beide Enzyme können alle Derivate von  $\beta$ -Carotin verändern. Mögliche Reaktionen der zwei Enzyme für die Astaxanthin-Synthese sind in der Abbildung 1 schematisch dargestellt. Nicht für jedes der

---

Intermediate besitzen die Enzyme die gleiche Bindungsaffinität. In der Natur gibt es verschiedene Organismen, die entweder eines der beiden oder beide Enzyme besitzen. Hierbei unterscheiden sich jedoch die Aminosäure-Sequenzen, während die intrinsische Funktion gleichbleibt. Es ändern sich dabei aber die Bindungsaffinitäten zu den unterschiedlichen Intermediaten. In der Studie von Wang et al. (Wang et al. 2017) konnte gezeigt werden, dass dies einen erheblichen Einfluss auf die Astaxanthin-Synthese hat. Im Detail erforschten Wang et al. die Auswirkung der Kombination von  $\beta$ -Carotin-Ketolasen und  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen aus verschiedenen Organismen auf die Astaxanthin-Produktion in *Saccharomyces cerevisiae*. Alle Kombinationen führten in diesen Versuchen zur Bildung von Carotinoid-Gemischen, deren Zusammensetzung stark variierte, jedoch zumeist mit Astaxanthin als Hauptprodukt. Die Kombination von Enzymen mit der höchsten Astaxanthin-Ausbeute erbrachten die  $\beta$ -Carotin-Ketolase aus *Brevundimonas* sp. und eine  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase aus *Alcaligenes* sp. strain PC-1.

Für *Synechococcus* sp. PCC7002 hingegen gibt es bereits eine Studie, die demonstriert, dass der Organismus durch die Verwendung einer  $\beta$ -Carotin-Ketolase und  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase aus *Brevundimonas* sp. in die Lage versetzt wird, Astaxanthin als Hauptprodukt zu synthetisieren (Hasunuma et al. 2019). Dies steht im Widerspruch zur Studie von Wang et al., die für diese Kombination der Enzyme eine eher moderate Astaxanthin-Bildung ergab (Wang et al. 2017). Dieser Widerspruch ist möglicherweise auf artspezifische Regulationen des Metabolismus zurückzuführen. Ein Vergleich beider Enzym-Kombinationen in *Synechococcus* sp. PCC7002 sollte Hinweise darauf liefern, ob die von Wang et al. ermittelte optimale Kombination auch in Cyanobakterien eine verbesserte Astaxanthin-Ausbeute liefert. Zu möglichen Regulationen ist bisher nichts weiter bekannt, es könnten die verwendeten Promotoren, die verwendete Integrationsstelle im Genom oder die „Codon usage“ einen Einfluss besitzen. Zur Überprüfung der Hypothesen, dass die genannten Elemente eine Auswirkung auf die Astaxanthin-Synthese haben, erfolgten Analysen hierzu in dieser Arbeit.

Die Regulation beschränkt sich hierbei nicht nur auf die heterologen Gene, sondern auch auf Synthese-Schritte des natürlichen Carotinoid-Metabolismus von *Synechococcus* sp. PCC7002. Für eukaryontische Mikroalgen ist ein limitierender Schritt die Synthese von Phytoen aus zwei Geranylgeranylpyrophosphaten (GGDP) durch die Phytoen-Synthase (PSY). Die GGDPs entstehen wiederum aus dem Methylerythritolphosphatweg - kurz MEP -, über dessen Endprodukte Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) (Deng et al. 2020). Während der MEP-Syntheseweg und die Bildung von GGDP in Mikroalgen hoch funktionelle Enzyme aufweisen die zudem miteinander agieren, um den Produktfluss zur Carotinoid-Synthese zu verbessern, sind die Reaktionen zur Bildung von Phytoen und zu  $\beta$ -Carotin unerforscht und zeigen Limitierungen (Zhou et al. 2022; Deng et al. 2020). Eine Überexpression der natürlichen Gene könnte in *Synechococcus* sp. PCC7002 dazu führen, dass es zu einer gesteigerten  $\beta$ -Carotin-Synthese kommt. Dies dürfte auf die nachfolgenden Syntheseschritte hin zum Astaxanthin ebenfalls positive Auswirkungen haben, denn dann stünde mehr Edukt in den Reaktionen zur Verfügung. Infolgedessen sollte eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes hin zu den Produkten erfolgen. In gewisser Weise erhöht dies den Reaktionsdruck der enzymatischen Reaktion.

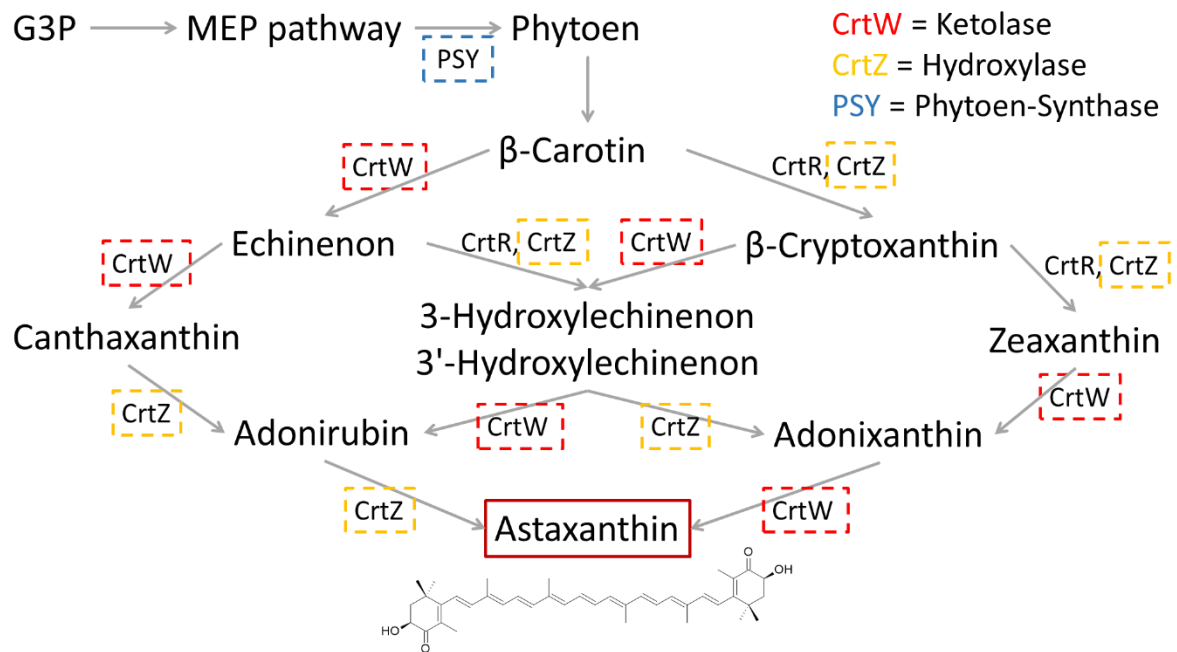


Abbildung 1: Die Syntheseweg-Erweiterung von  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin in *Synechococcus* sp. PCC7002. Erfasst sind alle möglichen Intermediate und auf den Pfeilen gestrichelt eingerahmt heterologe oder überexprimierte Enzyme. Das Endprodukt Astaxanthin ist rot eingerahmt. Darunter ist die Strukturformel dieses in der Keilstrichform wiedergegeben.

Hohe Biomassen neben der eigentlichen Astaxanthin-Konzentration pro Zelle sind in der Regel entscheidend, um eine kosteneffiziente Produktion zu ermöglichen. Dies liegt daran, dass Ernte und Aufreinigung eine der größten Kostenpunkte in der Produktion von Astaxanthin in Mikroalgen sind (Singh und Patidar 2018). Jedoch könnte die Umgehung dieser Schritte erfolgen, wenn die Zellen das produzierte Astaxanthin direkt in das Kulturmedium abgeben. Interessanterweise gibt es auf diesem Gebiet noch keine veröffentlichte Studie. Für *E. coli* hingegen wurden bereits Transporter-Proteine erforscht, die bestimmte Carotinoide über die Membran in das Medium abgeben können (Doshi et al. 2013). In dieser Studie kamen sogenannte ABC-Transporter zum Einsatz, die in der Theorie verschiedene Carotinoide aktiv über die Membran transportieren. Im Detail erfolgte der Einsatz von MsbA-Transportern. Über diese ist bekannt, dass sie verantwortlich für den Transport der Lipid-A-Kernkomponente von Lipopolysaccharid vom Inneren der Zellmembran zur Außenseite der Membran sind. Über einen alternativen Mechanismus können diese Transporter eine breite Variation von Chemotherapeutika, Medikamenten und Antibiotika ebenfalls durch die Membran bewegen, siehe Abbildung 2 (Doshi et al. 2013; Bonifer und Glaubitz 2021). Die Anwendung auf Carotinoide war in *E. coli* ein Erfolg. Auch, wenn nur für einen Teil der gebildeten Carotinoide ein Transport erfolgte, ergab sich eine erhöhte Gesamt-Carotinoid-Produktion für die Stämme mit ABC-Transportern.

Ein solcher Transporter könnte möglicherweise auch in *Synechococcus* sp. PCC7002 die Lösung sein, um den kostenintensiven Schritt der Ernte zu umgehen (Abbildung 2). Die Membran unterscheidet sich jedoch von *E. coli*-Membranen. Die Zellen von *Synechococcus* sp. PCC7002 weisen eine äußere und eine innere Plasmamembran auf. Zwischen den beiden Membranen, dem Periplasma, erfolgt

eine Ansammlung von Peptidoglykanen und Cellulose. Die Anreicherung dieser Stoffe bildet eine Zellwand, die für die Klassifizierung dieses Stammes als ein gramnegatives Cyanobakterium sorgt (Zhao et al. 2015). Hinzu kommt eine Thylakoidmembran (Pisareva et al. 2011), die teilweise mit der inneren Plasmamembran verbunden ist und in der die respirativen und photosynthesebezogenen Proteinkomplexe sitzen (Mullineaux 2014). Durch die Verbindung mit der inneren Plasmamembran kommt es zur Bildung des Lumen, ein vom Cytoplasma abgegrenzter Raum.

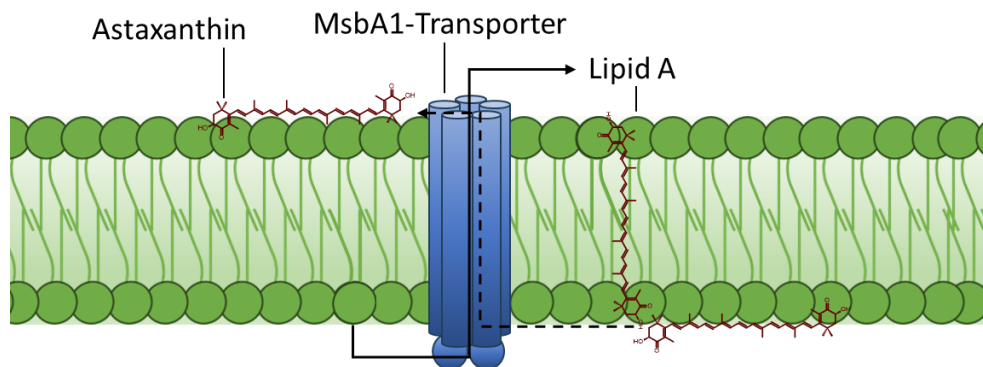


Abbildung 2: Biomembran von *Synechococcus* sp. PCC7002 mit ABC-Transporter-Protein. Die an der Membran produzierten Carotinoide, bevorzugt Astaxanthin, können mittels des MsbA1-Transporters durch die Membran auf deren Außenseite transportiert werden. Hierzu wird der alternative Funktionsmechanismus dieses Transporters verwendet (gestrichelte Linie), denn eigentlich dient er dem Transport von Lipid A.

Aus Versuchen, in denen die Synthese von Limonen und Bisabolon in *Synechococcus* sp. PCC7002 erfolgte geht hervor, dass die Kulturen mittels organischem Lösemittel überschichtet werden können (Davies et al. 2014; Chenebault et al. 2023). Dies diente in der Studie von Davies et al. dazu, dass die flüchtigen Terpenoide nicht aus dem Kulturmedium verdampfen und dadurch der Nachweis ihrer Bildung verloren geht, denn diese können über die Zellmembran diffundieren. Im organischen Lösemittel reicherte sich über die Zeit der Kultivierung das synthetisierte Limonen oder Bisabolon infolgedessen an.

Die Verwendung von Lösemittel als Überschichtung von Flüssigkulturen könnte der letzte Baustein sein, um ein vollendetes Verfahren zur kosteneffizienten Produktion von Astaxanthin in *Synechococcus* sp. PCC7002 zu ermöglichen. Durch die richtige Regulation des Astaxanthin-Synthesewegs mittels synthetischer Gene für bisher nicht mögliche Reaktionsschritte und die Verbesserung natürlicher Synthesewege sollte eine Astaxanthin-Anreicherung in den Zellen möglich sein. Potenziell angereichertes Astaxanthin könnte, über einen geeigneten ABC-Transporter, von den Zellen ins Kulturmedium abgegeben werden. In dem es dann über Diffusion in ein organisches Lösemittel wandert und sich dort akkumuliert. Diese vier notwendigen Schritte sind in der Abbildung 3 schematisch dargestellt. Im Schritt eins soll die Expression von synthetischen Genen für eine  $\beta$ -Carotin-Ketolase und eine  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase die Astaxanthin-Synthese in *Synechococcus* sp. PCC7002 ermöglichen. Hierbei gilt es, die Expression so zu optimieren, sodass potenzielle Regulierungen sich nicht negativ auswirken. Zudem bedarf es einer sorgsam Auswahl der genutzten Enzyme, deren zugrunde liegenden DNA-Sequenzen die Basis für die synthetischen



Gene liefern. Die Enzyme in Kombination sollten eine optimale Astaxanthin-Synthese ergeben, ohne Intermediate des Synthesewegs zu akkumulieren. Der darauffolgende zweite Schritt könnte eine Optimierung des natürlichen Carotinoid-Stoffwechsels darstellen, z.B. durch die Entfernung von limitierenden Synthese-Schritten mittels Überexpression von stammeigenen Enzymen. Die Abgabe des synthetisierten Astaxanthins in das Medium durch die Zellen wäre der dritte Schritt, der durch genetische Modifikation erreicht werden könnte. Die Nutzung von Transporter-Proteinen der Familie MsbA könnte hierfür der Schlüssel sein. Der vierte Schritt bezieht sich weniger auf die Biologie und eher auf ein chemisches Verfahren. Durch die Übersichtung von Kulturen mit organischen Lösemitteln sollte es möglich sein, Carotinoide aus Schritt 3 durch Diffusion in der Lösemittel-Phase zu akkumulieren und sie so ohne viel Aufwand von den Kulturen zu dekantieren. In einem solchen Verfahren erfolgt die Produktion von einer hochwertigen Chemikalie durch die Verwendung von Sonnenlicht und CO<sub>2</sub>. Eine Entkopplung von fossilen Ressourcen entstünde und dennoch eine Produktion des höherwertigeren natürlichen Astaxanthin.

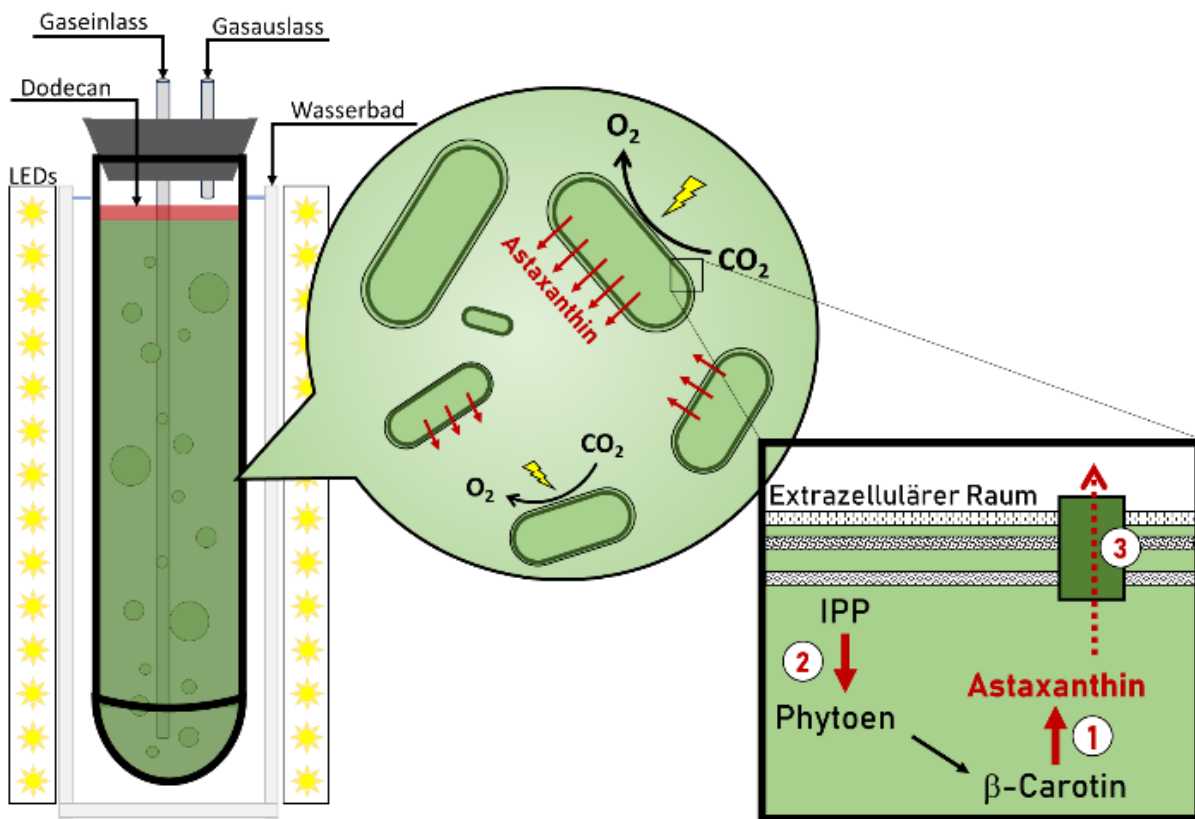


Abbildung 3: Schema eines auf *Synechococcus* sp. PCC7002-gestütztes Astaxanthin-Produktionsverfahrens. Ein Blasensäulen-Reaktor mit Flüssigkultur von genetisch veränderten Stämmen übersichtet mit einem organischen Lösemittel. Die Zellen sind durch synthetische Gene in der Lage Astaxanthin zu produzieren (1), durch die Optimierung von limitierenden Schritten erfolgte eine Ausbeuten-Steigerung (2) und ein Transporter ermöglicht es den Zellen das Produkt in das Medium abzugeben (2). Im Medium findet eine Phasentrennung statt, sodass sich das Astaxanthin in der organischen Phase akkumuliert.

---

## 7 Material und Methoden

---

### 7.1 Molekularbiologische Verfahren

#### 7.1.1 Erzeugung synthetischer Gene

In diesem Verfahren wurden die DNA-Gensequenzen aus verschiedenen Organismen für *Synechococcus* sp. PCC7002 optimiert. Mittels einer „Codon-Usage“-Tabelle erfolgte die Anpassung an die Verwendung der Codonen durch *Synechococcus* sp. PCC7002. Zum Einsatz kamen der Codon-Optimizer von IDT (Integrated DNA Technologies) oder die Codon Tabelle von kazusa.or.jp. Der hier genutzte Algorithmus verwendet jedoch nicht immer nur das am häufigsten verwendete Codon, sondern sorgt zudem für eine optimale Ausnutzung des t-RNA-Pools. Zudem wird auf mögliche Sekundärstrukturen der mRNA geachtet und versucht, diese zu vermeiden. Dadurch kann eine optimale Translation in das gewünschte Enzym gewährleistet werden. Die Synthese der so erzeugten synthetischen DNA-Gensequenzen erfolgte durch die BioCat GmbH. Die Sequenzen sind im Anhang angegeben.

#### 7.1.2 Plasmid-Mini-Präparation

Der Transfer von 3 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß und die Sedimentation durch Zentrifugation für 30 sec bei 14.000 RPM ermöglichte die Ernte der Zellen. Der Überstand wurde vollständig verworfen und das Pellet in 300  $\mu$ L P1-Puffer resuspendiert. RNase A wurde erst nach dem Autoklavieren, direkt vor der Verwendung, hinzugegeben (siehe Tabelle 1). Zur Lyse der Bakterien erfolgt die Zugabe von 300  $\mu$ L P2-Puffer (siehe Tabelle 2) und eine Inkubation bei Raumtemperatur für maximal fünf Minuten. Die Zugabe von 300  $\mu$ L P3-Puffer (3 M NaOAc (pH 5,2)) und zehnmütiger Inkubation auf Eis ermöglichte die Ausfällung der Zelltrümmer und der genomischen DNA. Durch eine zehnmütige Zentrifugation wurde das Präzipitat nachfolgend bei 14.000 RPM sedimentiert. Der Transfer des Überstandes erfolgte in ein neues Gefäß und die Fällung der DNA mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol begann. Anschließend erfolgte eine zehnmütige Zentrifugation bei 14.000 RPM. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das verbleibende DNA-Pellet mit 1 mL 70 % Ethanol gewaschen. Die Lösung des Pellets in 20 bis 30  $\mu$ L MilliQ-H<sub>2</sub>O bildet das Ende der Aufarbeitung.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Resuspensionspuffers (P1)

Bestandteil	Endkonzentration
Tris/HCl pH 8	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 $\mu$ g/mL

Tabelle 2: Zusammensetzung des Lysepuffers (P2)

Bestandteil	Endkonzentration
NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

### 7.1.3 Ethanol/Natriumacetat-Präzipitation

Zu einem Volumen DNA-Lösung wurde 1/10 Volumen 3M NaAc (pH 5,2) und 2,5 Volumen 98 % Ethanol hinzugegeben und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zentrifugation des Reaktionsansatzes für 10 Minuten bei 4 °C und 13k RPM. Es bedarf anschließend der Entfernung des Überstandes und das zweifache Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol, bevor es zur Lösung des Pellets in MilliQ-H<sub>2</sub>O kommt. Das Volumen des Wassers wurde je nach Pelletgröße und zu erwartender DNA-Menge gewählt.

### 7.1.4 Oligodesoxynucleotidprimer-Synthese

Die verwendeten Oligodesoxynucleotidprimer wurde durch die Firma Merck KGaA synthetisiert (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Hierzu diente die sogenannte Festphasen-Oligonukleotidsynthese. Der Produktmaßstab betrug stets 0,025 µmol und als Aufreinigung wurde die Kategorie „Entsalzen“ gewählt. Erhalten wurden die Primer getrocknet und wurden nach Produktdatenblatt in der jeweiligen Menge MilliQ-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 7.1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### PCR mit PrimeStar Polymerase

Zur Erzeugung der DNA-Fragmente für die Vektor-Klonierung wurde die Polymerase „PrimeStar“ von „TaKaRa“ verwendet, da diese eine „high-fidelity“ Polymerase mit Korrekturlesefunktion ist.

12,5 µL Ansatz

- PrimeSTAR Mastermix (2X) 6,25 µl (final conc. 1X)
- Primer 1 10 - 15 pmol (final conc. 0.2 - 0.3 µM)
- Primer 2 10 - 15 pmol (final conc. 0.2 - 0.3 µM)
- Template < 2,5 µL
- Add MilliQ-H<sub>2</sub>O auf 12,5 µl

Folgende Einstellungen des „Thermocycler“ (T Gradient von Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) wurden verwendet:

1. 98 °C 10 sec
2. 55 °C 5 or 15 sec
3. 68 °C 5 - 10 sec/kb (Erhöhung auf 20 -30 sec/kb bei Amplifikation über 4k bp länge)
4. 4 °C ∞

#### PCR mit Taq-Polymerase

Für Kolonie PCR wurde die Taq-Polymerase von Biozym (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) verwendet. Durchgeführt, um einen Nachweis der erfolgreichen Transformation von *E. coli* oder *Synechococcus* sp. PCC7002 Zellen zu erbringen, wurde hierbei mittels eines autoklavierten Zahnstochers ein Teil einer Kolonie in 4 µL MilliQ-H<sub>2</sub>O überführt und davon 1 µL in der PCR eingesetzt.

15 µL Ansatz:

- 1,5 µL 10x Taq Reaction Buffer
- 0,75 µL DMSO

- 0,6  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  forward Primer
- 0,6  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  reverse Primer
- 1  $\mu\text{L}$  Template (gepickte Kolonie resuspendiert in 4  $\mu\text{L}$  und 1  $\mu\text{L}$  eingesetzt)
- 0,15  $\mu\text{L}$  10 mM dNTPs
- 0,075  $\mu\text{L}$  Biozym Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )
- 10,33  $\mu\text{L}$  MilliQ-H<sub>2</sub>O

20  $\mu\text{L}$  Ansatz:

- 2  $\mu\text{L}$  10x Taq „Reaction Buffer“
- 1  $\mu\text{L}$  DMSO
- 0,8  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  forward Primer
- 0,8  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  reverse Primer
- 1  $\mu\text{L}$  Template (genomische DNA-Extrakt)
- 0,2  $\mu\text{L}$  10 mM dNTPs
- 0,01  $\mu\text{L}$  Biozym Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )
- 14,19  $\mu\text{L}$  MilliQ-H<sub>2</sub>O

Folgende Einstellungen des „Thermocycler“ (T Gradient von Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) wurden verwendet:

1. 95 °C 1 min
2. 95 °C 15 sec
3. 55 °C 15 sec
4. 72 °C 15 sec/kbp (für Amplifikationen, die länger als 1,5k bp sind Erhöhung auf 30 sec/kbp)
5. 4 °C  $\infty$

Die Schritte 2 bis 4 erfuhren eine 25- bis 29-malige Wiederholung.

### 7.1.6 Auftrennung von DNA durch Elektrophorese

Für eine Analyse von DNA-Proben aus PCR oder genomischem DNA-Extrakt diente eine Agarose-Gelelektrophorese. Das Agarosegel bestand aus 0,8 % Agarose (w/v) und 1x TAE-Puffer (Tabelle 3). Nach dem Aufkochen in einer Mikrowelle und der vollständigen Lösung der Agarose erfolgte die Zugabe von einer 1 %-igen Ethidiumbromid-Lösung (EtBr; 10  $\mu\text{L}$  auf 200 mL Agarosegel). Die fertige Gelmischung lagerte bis zur Verwendung im Wärmeschrank bei 55 °C. Zur Anfertigung eines Gels musste ein Gelschlitten in einen Gießstand eingespannt und Gelkämme, zur Erzeugung von Probenaufnahmetaschen, an den vorhandenen Arretierungspunkten eingesetzt werden. Darauf folgte die Befüllung des präparierten Gelschlittens mittels flüssigem Agarosegel, dessen Aushärtung ca. 15 min dauert. Der Gelschlitten wurde anschließend in eine Elektrophoresekammer gegeben, die mit 1x TAE-Puffer befüllt war. Nach dem Entfernen der Gelkämme erfolgte die Probenauftragung. Zu analysierende Proben mussten im Vorfeld mit 5X „orange Loading Dye“, bestehend aus „Orange G“ 2,2 mM und Ficoll 7,5 % (w/v), versetzt werden, ehe 5 – 10  $\mu\text{L}$  der Probe, durch Auftragung in die Probentasche, zum Einsatz kamen. Die Auftrennung erfolgte bei 90-100 V für ca. 25 Minuten und endete nach Erreichen des unteren Gelendes durch die orangene Lauffront. Ein Gel-Dokumentationsgerät (TCP-26.M von LTF Labortechnik GmbH & Co.KG, Wasserburg, Germany) half bei der Analyse der Gele, das durch die Anregung des sich in die DNA interkalierenden EtBr mittels UV-Licht die Detektion von DNA ermöglicht.

Tabelle 3: Zusammensetzung von 50xTAE

Bestandteil	Endkonzentration
Tris/HCl pH 8,3	2 M
EDTA	0,05 M
Essigsäure	0,057 % (v/v)

### 7.1.7 Auftrennung von RNA durch Elektrophorese

Die Analyse von RNA verlangt eine Auftrennung mittels eines Agarosegels. Das verwendete Gel beinhaltete 1g Agarose und 42,5 mL autoklaviertes MiliQ-H<sub>2</sub>O. Zur Lösung der Agarose kam eine Mikrowelle zum Einsatz, die die Mischung erhitze. Nach Abkühlen des Agarosegels auf 60 °C erfolgte unter einem Abzug die Zugabe von 5 mL 10x MEN-Puffer (siehe Tabelle 4) und 2,7 mL 37 % Formamid. Die Vorbereitung des Gelschlittens entsprach der von DNA-Agarosegelen (siehe Abschnitt 7.1.6). Vor dem Auftragen mussten ca. 500 ng RNA in einem Verhältnis 1:1 mit 2x RNA-Ladepuffer (mit EtBr) versetzt werden (siehe Tabelle 5). Vor der Auftragung der Proben fand eine Denaturierung dieser durch die Erhitzung auf 65 °C für 10 Minuten mit anschließender zweiminütiger Abkühlung auf Eis statt. Eine Regelauftragung beinhaltete 10 µL. Die Kammer enthielt 1x MEN als Laufpuffer und wurde bei 60 – 70 V betrieben. Die elektrophoretische Auftrennung, unter einem Abzug stattfindend, dauerte 30 – 45 min. Die Analyse der Gele erfolgte durch ein Gel-Dokumentationsgerät (TCP-26.M von LTF Labortechnik GmbH & Co.KG, Wasserburg, Germany), das durch die Anregung des sich in die RNA interkalierenden EtBr mittels UV-Licht die Detektion von RNA ermöglicht.

Tabelle 4: Zusammensetzung des 10x MEN-Puffers

Bestandteil	Endkonzentration
MOPS	0,2 M
EDTA	0,01 M
NaAc	0,05 M

Tabelle 5: Zusammensetzung des 2x RNA-Ladepuffers

Bestandteil	Endkonzentration
Formamid	48 % (v/v)
10x MEN	1,06x
Formaldehyd (37 %)	6,4 % (v/v)
Glycerin (86 %)	5,33 % (v/v)
Bromphenolblau (2 %)	0,106 % (v/v)
EtBr-Lösung (1 %)	0,002 % (v/v)

### 7.1.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die mittels elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel eine Separation erfuhren, mussten aus diesem zur Weiterverwendung isoliert werden. Für diesen Zweck kam das „Nucleospin™ Gel and PCR clean-up Kit“ (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) zur Verwendung. Zuvor mussten die gewünschten Banden, die das zu isolierende DNA-Fragment darstellten, mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten werden. Für den Schutz der DNA vor Schäden durch UV-Licht darf die Exposition nur möglichst gering ausfallen. Das ausgeschnittene Gel-Fragment wurde in ein zuvor gewogenes 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und das Gewicht bestimmt. Pro 100 mg Agarose kamen 200 µL NTI-Puffer hinzu. Der Anleitung des

Herstellers konnte Folge geleistet werden. Die DNA wurde in 30  $\mu\text{L}$  NE-Puffer eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 7.1.9 Synthese von cDNA

Für den Nachweis einer Genexpression auf RNA-Ebene bedarf es einer Umschreibung der RNA in DNA.

Eine quantitative Analyse der vorhandenen RNA kann dann mittels qPCR (quantitative “Real-time” PCR) erfolgen. Die Synthese der cDNA erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers der verwendeten RNA-abhängigen DNA-Polymerase (M-MuLV Reverse Transkriptase, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika). Ein Reaktionsansatz bestand aus den in Tabelle 6 angeben Bestandteilen. Zur Verhinderung des Abbaus von RNA durch RNase während der Inkubation erfolgte die Zugabe von RNase Inhibitor. Der Reaktionsansatz wurde in einem „Thermocycler“ (T Gradient von Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) zunächst für 5 min bei 25 °C und anschließend für 1 h bei 42 °C inkubiert, bevor die Inaktivierung der reversen Transkriptase für 20 min bei 65 °C geschah. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Bestandteil	Einzusetzen
RNA	ca. 1 $\mu\text{g}$
Random hexamer Primer (60 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{L}$
dNTPs (10 mM)	1 $\mu\text{L}$
10x MuLV Reaktionspuffer	2 $\mu\text{L}$
MuLV RT (200 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{L}$
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{L}$
Autoklaviertes, deionisiertes H <sub>2</sub> O	Ad 20 $\mu\text{L}$

### 7.1.10 qPCR-Analyse

Die quantitative „Real-time“ Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) dient der Analyse des Transkript-Niveaus einzelner Gene. Dies wird durch die Messung eines fluoreszierenden Farbstoffes (SYBR-Green), der während der Kettenverlängerung in doppelsträngige DNA interkaliert, ermöglicht. Nach jeder Elongationsphase eines PCR-Zyklus wird die Signalstärke des Farbstoffes gemessen. Hierbei steigt die Fluoreszenz proportional zum exponentiellen Anstieg des Amplifikats. Der Vergleich verschiedener Proben wird durch das Mitführen eines endogenen Markers erreicht. Dieser ist ein Gen, dessen Expression unabhängig vom Metabolismus und der Expression anderer Gene ist und infolgedessen immer eine gleiche Amplifikation zeigt. Zur Auswertung gibt es verschiedene Methoden. Hier kam die CT-Methode zum Einsatz. Der CT-Wert ist ein Schwellenwert, der festgelegt wird und als Vergleichspunkt für verschiedene Proben dient. Hierbei gibt der CT-Wert die Zyklenzahl der PCR an, ab der das gemessene Fluoreszenzsignal den Schwellenwert (i.d.R. die Hintergrundfluoreszenz) übertritt.

Zunächst erfolgte die Erstellung eines Mastermix für jedes verwendete Primerpaar, jedoch ohne „Template“. Die Zusammensetzung des Mastermix ist in Tabelle 7 angegeben. Es wurde der Reaktionsmix „2x qPCRBio SyGreen Mix Hi-ROX“ von PCR Biosystems Ltd (London, Vereinigtes Königreich) verwendet und als „Template“ diente cDNA (siehe Abschnitt 7.1.9). Nach der Aufteilung des Mastermix in einer „MicroAmp Fast 96-Well Reaktionsplatte“ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) erfolgte die Zugabe des „Templates“ und die Versiegelung der Platte mittels einer optisch klaren Klebefolie (qPCR-Folie, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland). Mittels Plattenzentrifuge wurden die Platten zentrifugiert, um mögliche Tröpfchen mit dem restlichen Reaktionsansatz zu vermengen. Die PCR fand in einem Thermo-Cycler (Stepone Plus RTPCR System, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) statt, der auf folgende Parameter eingestellt war.

1. Initiale Denaturierung bei 95 °C für 120 sec
  2. Denaturierung bei 95 °C für 5 sec
  3. Annealing & Elongation bei 60 °C für 30 sec
  4. Denaturierung bei 95 °C für 15 sec
  5. Schmelzkurve von 60 °C auf 95 °C (0,3 °C Schritte) für 60 sec und halten für 15 sec
- } Wdh. 40x

Die Ergebnisse dieses Verfahrens wurden zu weiteren Berechnungen verwendet. Für die ermittelten  $C_T$ -Werte der untersuchten Gene erfolgte eine Normalisierung ( $\Delta C_T\text{-Wert}_{\text{Probe}} = C_T\text{-Wert}_{\text{Gen}} - C_T\text{-Wert}_{\text{Standard}}$ ) auf den endogenen Standard. Für den endogenen Standard wurde das Gen Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (*ppc*), auf Grundlage der Arbeit von (Szekeres et al. 2014), ausgewählt. Nach der Normalisierung auf den endogenen Standard folgte eine Relativierung ( $\Delta\Delta C_T\text{-Wert} = \Delta C_T\text{-Wert}_{\text{Probe}} - \Delta C_T\text{-Wert}_{\text{Referenz}}$ ) des nicht veränderten Stamms (Referenz) auf das Transkript-Niveau des jeweils zu untersuchende Gen. Für die Berechnung des relativen Quotienten (RQ) wurde anschließend die Formel  $RQ = 2^{-(\Delta)\Delta C_T}$  verwendet.

Tabelle 7: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes

Bestandteil	Einzusetzen
2x qPCRBio SyGreen Mix Hi-Rox	10 µL
Primer forward (10 µM)	0,8 µL
Primer reverse (10 µM)	0,8 µL
cDNA „Template“	10 ng
Autoklaviertes, MilliQ-H <sub>2</sub> O	Ad 20 µL

### 7.1.11 Restriktion

Für Ligationen oder zur Analyse von isolierten Plasmiden fand eine Restriktion durch Nukleasen Anwendung. Zum Abbau von DNA-Strängen an bestimmten DNA-Sequenzen wurde je 1 µg der DNA mit 1 U der Nuklease (Restriktionsenzym) in 1x Reaktionspuffer (enzymspezifisch) gegeben (siehe Tabelle 8). Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für 20 min bei der enzymspezifischen optimalen Temperatur. Als Kontrolle diente die Mitführung eines Ansatzes ohne DNA sowie eines

Ansatzes ohne Enzym. Mittels Gelelektrophorese wurde die Reaktion anschließend auf Richtigkeit geprüft.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes

Bestandteil	Einzusetzen
10x enzyspezifischer Reaktionspuffer	10 $\mu$ L
DNA-Template	1 $\mu$ g
Restriktionsenzym (1 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Autoklaviertes, MilliQ-H <sub>2</sub> O	Ad 100 $\mu$ L

### 7.1.12 Ligation

Zur Erzeugung zweier Vektoren wurde zu Beginn der Arbeit die Klonierung von neuen Vektoren mittels Ligation durchgeführt. Alle anderen Vektoren wurden mittels In-Fusion® HD cloning (siehe Abschnitt 7.1.13) hergestellt. Bei der Ligation können zuvor abgebaute DNA-Fragmente mit Überhängen, die komplementär sind, verbunden werden. Die Ligase verknüpft dabei die DNA-Fragmente, die sich aneinandergelagert haben. Es kam die T4-DNA-Ligase von Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific Inc.) zur Anwendung. Zu 20 ng eines Vektorfragments, das mittels Restriktionsenzymen abgebaut wurde, erfolgte die Zugabe eines „Inserts“ -DNA-Fragments mit der Sequenz für das einzubringende Gen im molaren Verhältnis von 5:1 (Vektor:Insert).

Ein Ansatz hatte ein Volumen von 20  $\mu$ L, bestehend aus 2  $\mu$ L T4-DNA-Ligase-Reaktion-Puffer, 1 u T4-DNA-Ligase und MilliQ-H<sub>2</sub>O zum Auffüllen nach der Zugabe der DNA-Fragmente. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei RT. Die Reaktion wurde nach der Inkubation für 5 min bei 65 °C abgestoppt und 5  $\mu$ L des Ansatzes in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (siehe Abschnitt 7.3.4).

### 7.1.13 In-Fusion® HD cloning

Die Klonierung von Vektoren geschah durch In-Fusion Cloning von TaKaRa Inc. (Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan). Zur Durchführung bedarf es zwei bis 10 DNA-Fragmente mit jeweils einem 15 bp langen homologen Bereich zum Nachbarfragment. Das Enzym des In-Fusion Cloning Mixes erzeugt an den Enden der eingesetzten DNA-Sequenzen einzelsträngige Bereiche, die sich durch die homologen Endbereiche an die Nachbarbereiche anlagern (siehe Abbildung 4). Nach der Transformation in kompetente Stellar™-Zellen reparieren diese die vermeintlichen DNA-Strangbrüche und es entstehen neue Vektoren. Es könnten so auch Inserts (DNA-Fragmente) in bestehende Vektoren eingebracht werden.

Für die PCR der Fragmente erfolgte die Nutzung der PrimeStar Polymerase (siehe hierzu den Abschnitt 7.1.5). Nach einer Auftrennung der erzeugten DNA-Fragmente wurden diese mittels eines Agarosegels aufgetrennt und aus diesem eluiert. Bei der Insertion von einem Insert in einen Vektor betrug das eingesetzte molare Verhältnis 1:2 (Vektor:Insert). Für die Nutzung von gleich großen Fragmenten änderte sich das Verhältnis auf 1:1. Ein Reaktionsansatz bestand aus 5  $\mu$ L mit folgender Zusammensetzung:



- 1  $\mu\text{L}$  5x In-Fusion Snap Assembly Master Mix
- X  $\mu\text{L}$  DNA-Fragment Mix (100 ng) (z. B. Vektor + Insert oder Fragment + Fragment + Fragment)
- X  $\mu\text{L}$  MiliQ-H<sub>2</sub>O

Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 50 °C inkubiert und anschließend bis zur Verwendung für die *E. coli*-Transformation auf Eis gelagert.

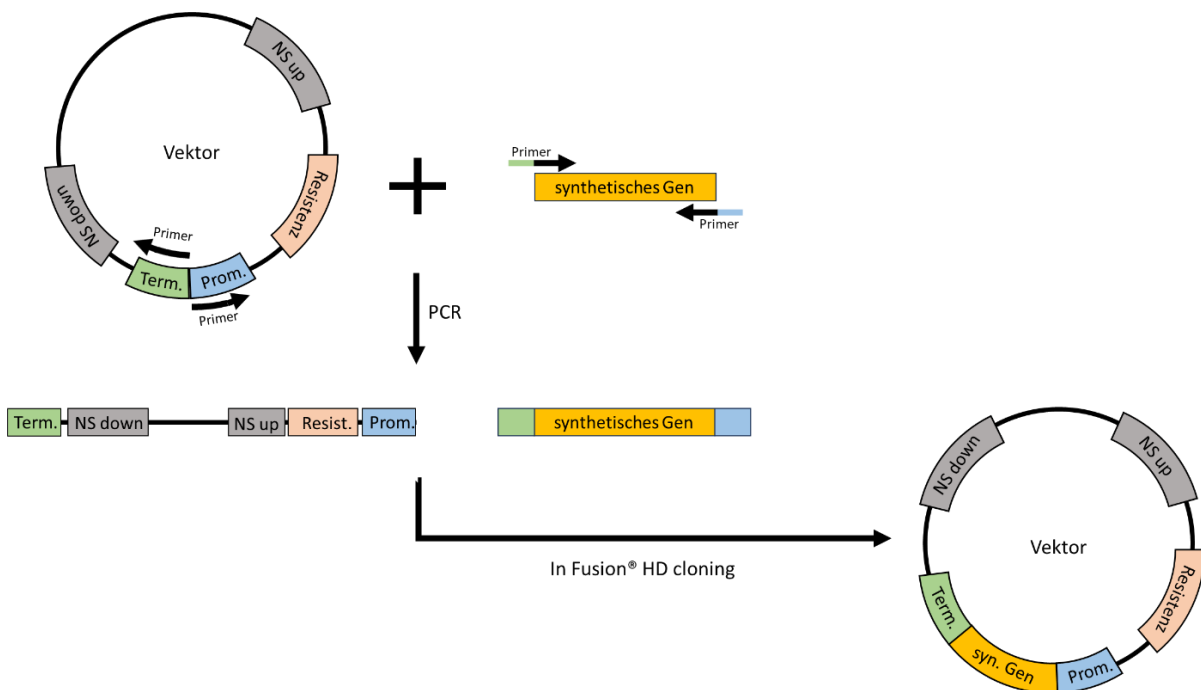


Abbildung 4: Theoretischer Ablauf des „In-Fusion® HD cloning“. Amplifikation des Vektor-Fragments und des Synthetischen Gens, mit 15 bp langen homologen Sequenzen zum Vektor, mittels PCR. Behandlung der aufgereinigten DNA-Fragmente mit dem In-Fusion-Enzym, zum Erhalt des gewünschten Vektors.

### 7.1.14 Vektoren

Für die Integration von Genen in *Synechococcus* sp. PCC7002 bedurfte es Transformationsvektoren. Diese wiesen den im Folgenden beschriebenen Aufbau auf. Auf einen *cpc560* oder *psbA1* Promotor-Sequenzen im Anhang aufgeführt (Markley et al. 2015; Nair et al. 2001; Li et al. 2018)- folgten die synthetischen Gensequenzen, die anschließend eine Terminator-Sequenz aufweisen. Die Expressionskassette und der vorangestellte Antibiotikums-Selektionsmarker wurden von den „upstream“ und „downstream“ homologen Bereichen für die jeweiligen neutralen Integrationsstellen flankiert. Zudem verfügten die Vektoren über einen Ori für die Replikation in *E. coli*. Als Selektionsmarker wurde entweder eine Kanamycin- oder eine Spectinomycin-Resistenz verwendet. In den Abbildung 5 bis 8 sind die konstruierten Vektoren dargestellt. Alle dafür verwendeten Primer und eine Liste aller erzeugten Vektoren sind im Anhang aufgeführt (siehe Tabelle 23 und Tabelle 24).

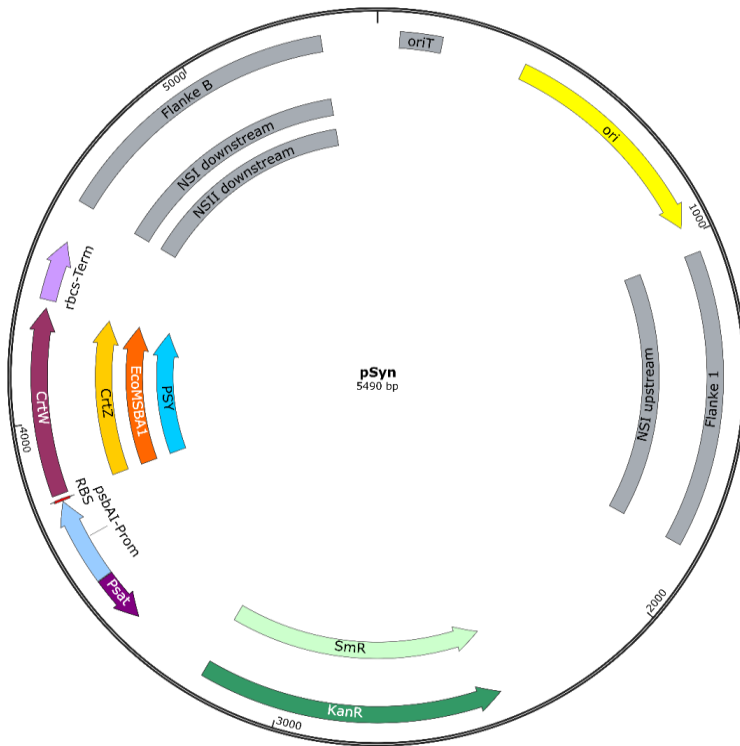


Abbildung 5: Vektor-Karte des verwendeten pSyn-Vektors, mit allen möglichen Varianten. Die Varianten werden durch eingeschobene Elemente dargestellt. Bei den neutralen Integrationsstellen sind die „upstream“ und „downstream“ Stellen bei Variation aus der gleichen neutralen Integrationsstelle.

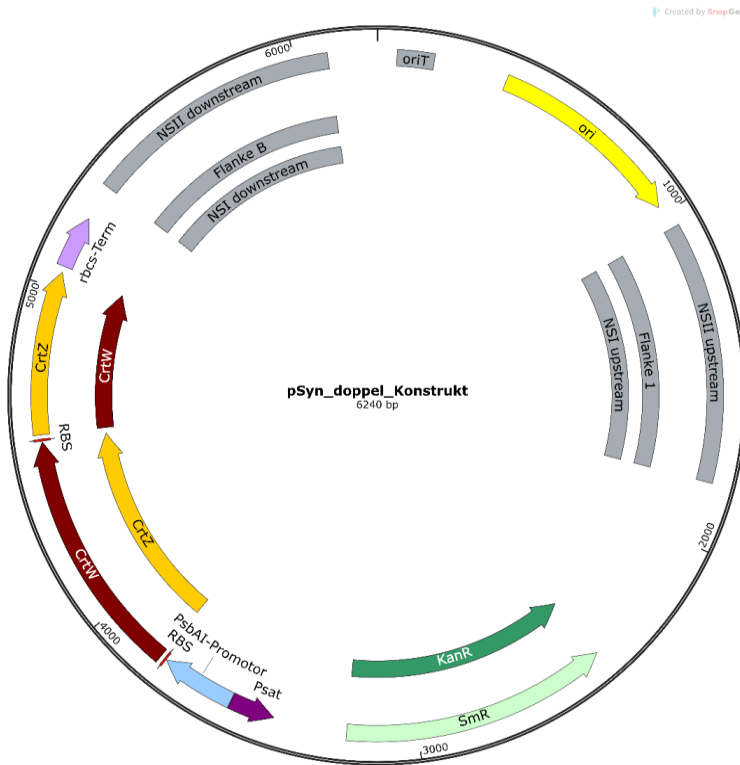


Abbildung 6: Vektor-Karte des verwendeten pSyn-Vektors für Konstrukte mit zwei Genen unter der Kontrolle eines Promotors, mit allen möglichen Varianten. Die Varianten werden durch eingeschobene Elemente dargestellt. Bei den neutralen Integrationsstellen sind die „upstream“ und „downstream“ Stellen bei Variation aus der gleichen neutralen Integrationsstelle.

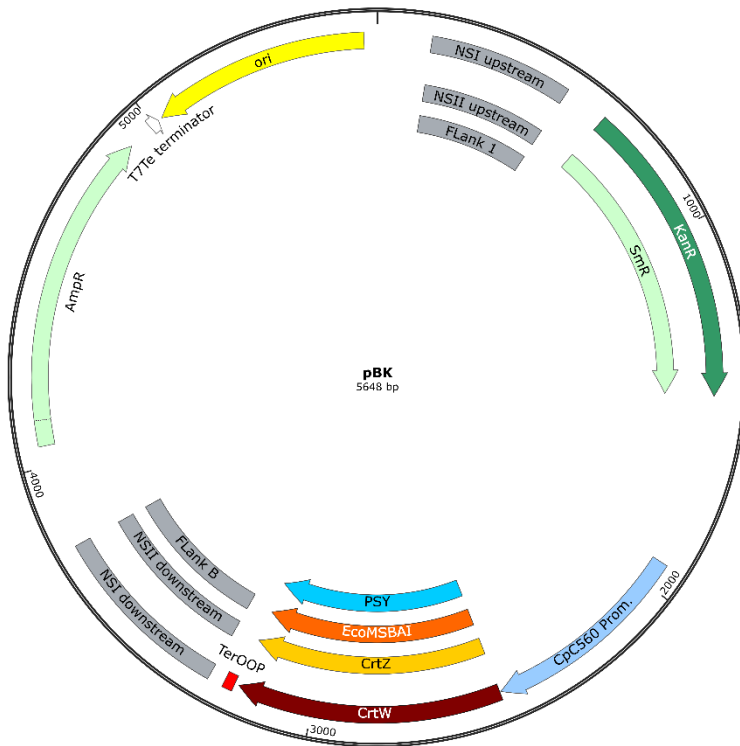


Abbildung 7: Vektor-Karte des verwendeten pBK-Vektors, mit allen möglichen Varianten. Die Varianten werden durch eingeschobene Elemente dargestellt. Bei den neutralen Integrationsstellen sind die „upstream“ und „downstream“ Stellen bei Variation aus der gleichen neutralen Integrationsstelle.

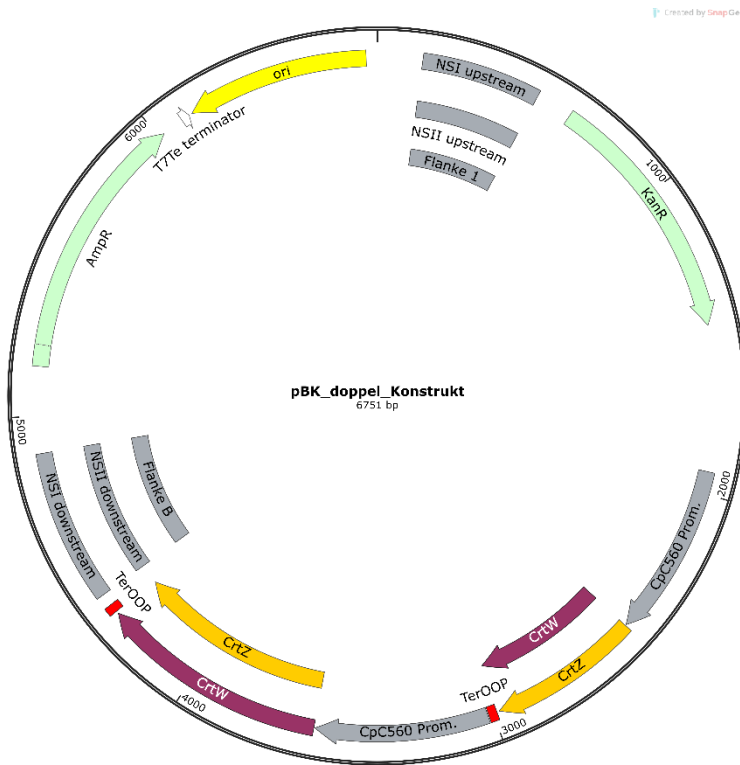


Abbildung 8: Vektor-Karte des verwendeten pBK-Vektors für Konstrukte mit zwei Genen unter der Kontrolle je eines Promotors, mit allen möglichen Varianten. Die Varianten werden durch eingeschobene Elemente dargestellt. Bei den neutralen Integrationsstellen sind die „upstream“ und „downstream“ Stellen bei Variation aus der gleichen neutralen Integrationsstelle.

### 7.1.15 Sequenzierung

Zur Analyse von klonierten Vektoren erfolgte eine Sequenzierung, nach der Sanger Strangbruchmethode (GREEN 2012), der Expressionskassette durch die Firma Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen, Deutschland). Diese erhielt Probenröchen mit 12  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA (Endkonzentration 40-100 ng/ $\mu\text{l}$  in 15  $\mu\text{l}$ ) und 3  $\mu\text{l}$  eines Primers (20  $\mu\text{M}$ ). Der Primer musste spezielle Merkmale aufweisen: ca. 18 bp Länge, eine Schmelztemperatur von ca. 48 °C und mindestens 50 bp vor der zu analysierenden Sequenz an die DNA binden.

### 7.2 Verwendete Organismen

Die Sequenzen der Gene, welche als Grundlage für die synthetischen Gene dienten, stammen aus der online Datenbank von NCBI. Die  $\beta$ -Carotin-Ketolase und -Hydroxylase von *Brevundimonas* sp. (GenBank: AB181388.1) sowie die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase von *Alcaligenes* sp. PC-1 (GenBank: D58422.1) fanden Verwendung. Für den ABC-Transporter kam die Sequenz des EcoMSBA1-Transporters aus *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 (GenBank: CP097884.1) als Vorlage zum Einsatz. Die Sequenzen wurden von BioCat GmbH synthetisiert und im pBlueScript II KS(+) Vektor zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Sequenzen befanden sich auf Plasmiden in *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen (Genotyp: +recA1, +endA1 und +lacZ $\Delta$ M15) oder in *Synechococcus* sp. PCC7002. Mittels der Technik „In-Fusion Cloning“ von TaKaRa Bio Inc. erfolgte die Klonierung von neuen Vektoren. Diese wurden in mitgelieferte, kompetente Stellar™-Zellen (*E. coli* HST08 mit Genotyp: -mrr, -hsdRMS, -mcrBC & -mcrA) transformiert.

### 7.3 Verfahren mit *Escherichia coli* (*E. coli*)

#### 7.3.1 Kultivierung

Für verschiedenen Anwendungen war es erforderlich, *E. coli* zu kultivieren. Hierzu kam LB-Medium zum Einsatz (siehe Tabelle 9). Übernacht-Kulturen wurden aus 3 mL LB-Medium in Reagenzgläsern erstellt. Mittels autoklavierter Zahnstocher geschah die Übertragung der jeweiligen *E. coli* Zellen. Kultiviert wurde der Ansatz über Nacht in einem Schüttler (Laboshake RO 500 von Gerhardt) und bei 37 °C.

Zur Generierung von hochkompetenten Zellen fand ein Selektionsausstrich von Zellen auf einer LB-Agar-Platte (siehe Tabelle 10) statt. Mittels Impföse wurden die gewünschten Zellen aus einem Kryostock entnommen und auf der Platte verteilt. Hierbei erfolgte die Verfolgung des Schemas in Abbildung 9. Die Platten wurden über Nacht in einem 37 °C Wärmeschrank inkubiert und am nächsten Morgen wurde eine Einzelkolonie in einem 100 mL Erlenmeyerkolben mit 50 mL LB-Medium resuspendiert. Die erzeugte Kultur bedurfte einer Inkubation bei 37 °C auf einem Schüttler für 6 Stunden. Von dieser Vorkultur wurden drei Kulturen in 500 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL SOB-Medium (siehe Tabelle 11) angezogen. Es erfolgte die Verwendung von 0,2 mL, 0,4 mL und 1 mL Vorkultur zur Beimpfung der Kulturen. Die Inkubation wurde auf einem Schüttler und Kühlung auf 19 °C über Nacht durchgeführt. Erreichte eine der Kulturen eine OD<sub>600nm</sub> von 0,55, konnten diese weiterverwendet werden. Andere Kulturen wurden verworfen. Die so erzeugte Kultur kam im Abschnitt 7.3.2 zur Verwendung.

Tabelle 9: Zusammensetzung von LB-Medium

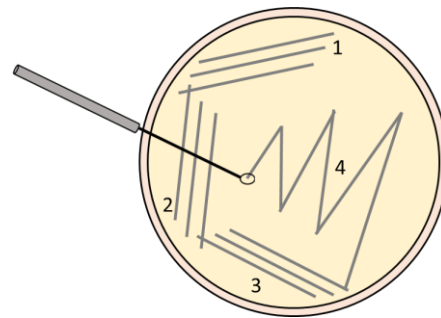
Bestandteil	Einzusetzen
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
NaCl	5 g
Einstellen von	pH =7,5
ddH <sub>2</sub> O	Ad 1 L

Tabelle 10: Zusammensetzung von LB-Agar

Bestandteil	Einzusetzen
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
NaCl	5 g
Agar	8 g
Einstellen von	pH =7,5
ddH <sub>2</sub> O	Ad 1 L

Tabelle 11: Zusammensetzung von SOB-Medium

Bestandteil	Einzusetzen
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
MgCl <sub>2</sub> (2 M)	5 mL
KCl (250 mM)	10 mL
Einstellen von	pH 7
ddH <sub>2</sub> O	Ad 1 L

Abbildung 9: Schema eines Selektionsausstriches für *E. coli* oder *Synechococcus* sp. PCC7002 mittels Impföse.

### 7.3.2 Generierung von chemische kompetenten *E. coli*

Für die Generierung von hochkompetenten Zellen bedurfte es einer bei 19 °C angezogenen Vorkultur (100 mL), die eine OD<sub>600nm</sub> von 0,55 aufwies (siehe Abschnitt 7.3.1). Eine solche Kultur wurde bei 4 °C mittels Zentrifuge (3.500 RPM, 10 min.) geerntet, gefolgt von der Entfernung des Überstandes und der Trocknung des Pellets durch Inkubation an Raumluft. Anschließend folgte die Resuspendierung des Zellpellets in 32 mL 0 °C kaltem Inoue-Puffer (siehe Tabelle 12), ehe eine erneute Ernte mittels Zentrifuge (3.500 RPM, 10 min.) durchgeführt wurde. Daraufhin kam eine erneute Verwerfung des Überstandes und die Trocknung des Zellpellets an der Raumluft. Abschließend erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 8 mL Inoue-Puffer, der mit 0,8 mL DMSO versetzt war. Die so erhaltene Zell-Suspension wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäße zu je 250 µL aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine Lagerung der Zellen geschah bei -80 °C.

Tabelle 12: Zusammensetzung von Inoue-Puffer

Bestandteil	Endkonzentration
PIPES (pH 6,7)	10 mM
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	55 mM
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	15 mM
KCl	250 mM
ddH <sub>2</sub> O	Ad 1 L

### 7.3.3 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung von *E. coli*-Linien wurde durch die Vermischung von 600  $\mu\text{l}$  Kultur mit 300  $\mu\text{l}$  80 %igem Glycerol in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß und die nachfolgende Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  erreicht.

### 7.3.4 Transformation

Für die Klonierung von Plasmiden mittels In Fusion<sup>®</sup> HD clonings war es nötig, die DNA-Reaktionsansätze in *E. coli* zu transformieren. Die Transformation von Plasmiden lief nach dem gleichen Protokoll ab. In der Regel wurden chemisch kompetente *E. coli* Stellar<sup>™</sup> Zellen (Takara Bio Euorpe SAS, St. Germain en Laye, Frankreich) verwendet. Den Start bildete das Auftauen von einem Zellgefäß auf Eis. Zu 50 bis 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurden 2,5  $\mu\text{l}$  des In-Fusion HD cloning Reaktionsmixes oder 1  $\mu\text{l}$  (1-2 ng/ $\mu\text{l}$ ) DNA-Suspension gegeben. Für den Reaktionsansatz vollzog sich eine Inkubation auf Eis für 30 min, ehe dieser für 45 sec bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  einem Hitzeschock ausgesetzt und mittels Eis anschließend für 2 min gekühlt wurde. Die Regeneration erfolgte durch die Zugabe von 450  $\mu\text{l}$  vorgewärmten SOC-Medium (siehe Tabelle 13) und einer einstündigen Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , um den Zellen die Möglichkeit zur Ausbildung der Antibiotikums-Resistenz zu ermöglichen. Nachfolgend wurden verschieden große Volumen (50, 100, 150 und 200  $\mu\text{l}$ ) der Zellsuspension auf LB-Platten (siehe Tabelle 10) mit der benötigten Antibiotikumskonzentration gegeben (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin, Sepctinomycin oder Kanamycin). Als Kontrolle erfolgte die Mitführung von Zellen ohne Zugabe von DNA, die auf Selektivplatten und LB-Platten ohne Antibiotikum ausgebracht wurden. Die Transformation konnte nach einer Inkubation über Nacht in einem  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  Wärmeschrank abgeschlossen werden. Für entstandene Kolonien erfolgte eine Kolonie-PCR (siehe Abschnitt 7.1.4), wenn das Verhältnis der entstandenen Kolonien zu denen der Kontrollen (Plasmid-Fragment ohne Insert und Zellen ohne DNA) circa zehn Mal höher waren.

Tabelle 13: Zusammensetzung von SOC-Medium

Bestandteil	Einzusetzen
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
MgCl <sub>2</sub> (2 M)	5 mL
KCl (250 mM)	10 mL
Glucose (1 M) <sup>1</sup>	20 mL
Einstellen von	pH 7
ddH <sub>2</sub> O	Ad 1 L

<sup>1</sup> Die Glucose wurde sterilfiltriert und erst nach dem Abkühlen zum Medium dazugegeben

## 7.4 Verfahren mit *Synechococcus* sp. PCC7002

### 7.4.1 Kulturbedingungen

Für die Kultivierung von *Synechococcus* sp. PCC7002 wurde A<sup>+</sup>-Medium (siehe Tabelle 14) verwendet. Die Beimpfung von Vorkulturen erfolgte aus Kryostocks oder von A<sup>+</sup>-Agar-Platten (siehe Tabelle 15). In 50 mL A<sup>+</sup>-Medium wurde ein aufgetauter Kryostock oder mittels Impföse eine Kolonie von einer A<sup>+</sup>-Agar-Platte resuspendiert. Darauf folgte die Kultivierung bei 30 °C und 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$  Weißlicht (6500 K). Für Experimente wurden 200 mL Kulturen aus den Vorkulturen angeimpft. Hierbei ist eine OD<sub>730</sub> von 0,1 oder 0,5 einzustellen. Die Kultivierung der Kulturen erfolgte bei 30 °C und 300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$  Weißlicht 6500 K, mit einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden. Alle Kulturen wurden in Blasensäulen-Reaktoren (siehe Abbildung 10) kultiviert und permanent mit 1 % CO<sub>2</sub> begast.

Tabelle 14: Zusammensetzung von A<sup>+</sup>-Medium

Bestandteil	Einzusetzen
NaCl	18 g
KCl	0,6 g
NaNO <sub>3</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 g/L)	1 mL
CaCl <sub>2</sub> (37 g/L)	7,2 mL
NaEDTA (3 g/L)	10 mL
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O (3,89 g in 1 L 0,1 N HCl)	1 mL
Tris pH 8,2 (100 g/L)	10 mL
1000x P1 Metal Mix	1 mL
dH <sub>2</sub> O	Add 1 L

Tabelle 15:Zusammensetzung A<sup>+</sup>-Agar

Bestandteil	Einzusetzen
NaCl	18 g
KCl	0,6 g
NaNO <sub>3</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 g/L)	1 mL
CaCl <sub>2</sub> (37 g/L)	7,2 mL
NaEDTA (3 g/L)	10 mL
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O (3,89 g in 1 L 0,1 N HCl)	1 mL
Tris pH 8,2 (100 g/L)	10 mL
1000x P1 Metal Mix	1 mL
Agar	10 g
dH <sub>2</sub> O	Add 1 L

Tabelle 16: Zusammensetzung von 1000x P1 Metal Mix

Bestandteil	Einzusetzen
B(OH) <sub>3</sub>	34,26 g
MnCl <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O	4,32 g
ZnCl	0,315 g
MoO <sub>3</sub>	0,03 g
CuSO <sub>4</sub> *5 H <sub>2</sub> O	0,003 g

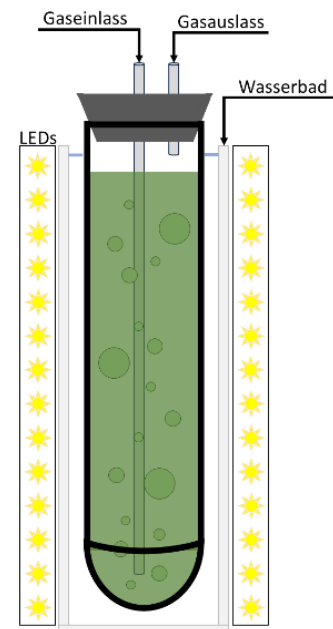


Abbildung 10: Blasensäulen Reaktor für die Anzucht. zylindrisches Reaktionsgefäß in einem Wasserbad zur Thermosteuerung und belichtet mit Weißlicht LEDs von zwei Seiten. Die Begasung erfolgt über ein Glasrohr, das im Reaktionsgefäß bis zum Boden reicht. Das Gefäß ist mittels Gummistopfen abgeschlossen und hat ein weiteres Glasrohr zur Entlüftung.

#### 7.4.2 Transformation

Die erzeugten Vektoren wurden für die Transformation von *Synechococcus* sp. PCC7002 verwendet, alle erzeugten Stämme sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Kulturen wurden in der exponentiellen Phase (ca.  $OD_{730nm} = 1$ ) geerntet und auf eine  $OD_{730nm}$  von 3,5 eingestellt. Zu 400  $\mu\text{L}$  Zellsuspension wurde 1  $\mu\text{g}$  Plasmid gegeben und die Suspension für 5 Stunden bei 37 °C und in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf A<sup>+</sup>-Agar-Platten ausgebracht, wo sie für 38 Stunden bei 30 °C und 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$  Weißlicht inkubierten. Nach der Erholungszeit wurde das jeweilige Antibiotikum auf die Platten gegeben (i.d.R. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Endkonzentration). Zur gleichmäßigen Verteilung des Antibiotikums wurde dieses in 1 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst und mittels einer Pipette über die Platte verteilt und anschließend mittels eines Drigalskispatels gleichmäßig verteilt. Für die Selektion wurden die Platten bei 30 °C und 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$  Weißlicht 10 Tage lang inkubiert. Entstandene Kolonien konnten mittels eines autoklavierten Zahnstochers in 25  $\mu\text{L}$  Wasser überführt und darin resuspendiert werden. Auf Selektionsplatten mit erhöhter Antibiotikumskonzentration erfolgte die weitere Selektion der so resuspendierten Kulturen (siehe Abschnitt 7.4.3).

#### 7.4.3 Selektion

Durch die Transformation erhaltene Kolonien wurden einer Selektion unterzogen, um nicht oder nur zum Teil veränderte Zellen zu entfernen. Zu diesem Zweck erhöhte sich die Antibiotikumskonzentration in jedem Schritt von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und dann auf 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dies sollte dafür sorgen, dass heterozygote Zellen durch eine Wachstumsinhibition von homozygoten Zellen verdrängt werden. Kolonien, für die mittels Kolonie PCR eine Überprüfung stattfand, wurden in MilliQ-H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf Selektionsplatten mit der nächsten Antibiotikumskonzentration ausgebracht. Die Kultivierung benötigte 3 Tage bei 30 °C unter 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$  Weißlicht, ehe eine weitere Übertragung der Kolonien auf neue Selektionsplatten möglich war. Nach der Kultivierung – erneut für 3 Tage bei 30 °C unter 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$  Weißlicht – erfolgte die Überführung der Kolonien in Flüssigkulturen. Aus diesen entstanden nachfolgend Kryostocks (siehe Abschnitt 7.4.8).

#### 7.4.4 Erweiterte Selektion

Sollte die Standardselektion keine homozygoten Linien erzeugt haben, musste die erweiterte Selektion angewendet werden. Hierfür bedurfte es der Anzucht von Stämmen, für die bereits eine Kolonie-PCR-Analyse erfolgt ist. Die Kultivierung fand in 250 mL Erlenmeyerkolben statt, in die 50 mL A<sup>+</sup>-Medium und das jeweilige Antibiotikum (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin oder Spectinomycin) gegeben wurde. Die Animpfung von Kulturen mit Zellen erfolgte auf eine  $OD_{730nm}$  von 0,1. Kultiviert wurde anschließend für fünf Tage bei 120 RPM, 30 °C und 90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$  Weißlicht. Für so erhaltene Kulturen folgte ein Reinigungsausstrich (siehe Abbildung 9) auf A<sup>+</sup>-Agar-Platten (siehe Tabelle 15) mit dem jeweiligen Antibiotikum. Nach 3 bis 5 Tagen konnten Einzelkolonien detektiert werden, die, wie zuvor, in Flüssigkultur gebracht wurden. Jedoch erfolgte die Verdopplung der Antibiotikumskonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Die beschriebenen Schritte wurden 3-mal wiederholt, sodass zum Ende eine Flüssigkultur mit einer Antibiotikumskonzentration von



800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  vorlag. Es erfolgte anschließend eine PCR für Stämme, die mittels dieser Methode erhalten wurden.

#### 7.4.5 Ermittlung der relativen Integrationszahl

Die Analyse der relativen Integrationszahl (rI-Zahl) ermöglicht es, Stämme, die mittels Transformation erhalten wurden, auf eine vollständige Veränderung zu überprüfen. Es erfolgte die Analyse von Linien mittels der Standardselektion oder der erweiterten Selektion. Die eigentliche Bestimmung geschah durch die Extraktion der genomischen DNA (siehe Abschnitt 7.4.6) aus *Synechococcus* sp. PCC7002 Kulturen. Darauf wurde eine PCR-Analyse, für die Ermittlung auf das Vorhandensein von unveränderten DNA-Bereichen der neutralen Integrationsstellen und durch die Integration der synthetischen Gene veränderten Bereiche, durchgeführt. Es kamen Primer (siehe Tabelle ff im Anhang) zum Einsatz, die gleich lange Fragmente erzeugten und eine gleiche Effizienz aufwiesen. Für die Reaktion kam die Taq-Polymerase von Biozym (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) zum Einsatz (siehe Abschnitt 7.1.5). Für erhaltene Ergebnisse erfolgte eine Analyse mittels Agarosegel (siehe Abschnitt 7.1.6). So erhaltene Gelbilder wurden mittels des „open source“ Computer-Programms Fiji auf die Bandenintensität analysiert. Durch eine Verdünnungsreihe der PCR-Ansätze diente der Ausbeuten Berechnung. Unter der Verwendung dieser konnte mittels der erhaltenen Bandenintensität und der Relativierung auf die Bandenintensität des mitgeführten DNA-Markers [HyperLadder™ 1kb von meridian Bioscience® (siehe Abbildung 11)] eine DNA ausbeute berechnet werden. Mittels des Verhältnisses von veränderten DNA-Bereichen zu nicht veränderten DNA-Bereichen erfolgte dann die Berechnung der relativen Integrationszahl. Eine rI-Zahl von eins gibt an, dass ein Verhältnis von 1:1 für beide DNA-Bereiche vorliegt. Ist das Verhältnis  $>1$  gibt es mehr DNA, die verändert wurde und bei  $<1$  gibt es mehr nicht veränderte DNA.

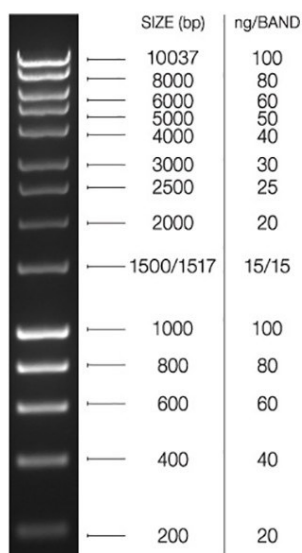


Abbildung 11: Zur Analyse bereitgestelltes Bild des aufgetrennten DNA-Markers. Mit Angaben der DNA-Länge in bp die die jeweiligen Banden erzeugen und das DNA-Gewicht in ng. Bild von der Internetseite des Herstellers (Meridian Bioscience Inc.).

#### 7.4.6 Extraktion von genomischer DNA aus *Synechococcus* sp. PCC7002

Zur Extraktion von genomischer DNA aus *Synechococcus* sp. PCC7002 erfolgte die Anwendung des Protokolls von (Kasajima et. al. 2004) mit leichten Adaptionen. Für die Extraktion wurden 500  $\mu\text{l}$  einer Zellkultur mit einer  $\text{OD}_{730\text{ nm}}=1$  bei 10.000 RPM für 5 min zentrifugiert und das entstandene Zellpellet anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und 200  $\mu\text{L}$  Extraktionspuffers, der aus einer Mischung von einem Teil Edwards-Lösung (siehe Tabelle 17) und neun Teilen TE-Puffer bestand (siehe Tabelle 18), hinzugefügt. Für den mechanischen Aufbruch durch den BeadBlaster 24 (Benchmark Scientific, Syreville, New Jersey, Vereinigte Staaten) bei 4000 m/s für 10 sec bedurfte es zwei Spatelspitzen „glass beads“ ( $\varnothing$  0,25-0,5 mm). Die Sedimentation der Zelltrümmer ermöglichte die Zentrifugation bei 10.000 RPM für 5 min. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die DNA-Lösung bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Edwards-Lösung

Bestandteil	Endkonzentration
Tris/HCl (pH 7,5)	200 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5 %
NaCl	250 mM

Tabelle 18: Zusammensetzung von TE-Puffer

Bestandteil	Endkonzentration
Tris/HCl (pH 8)	10 mM
EDTA	1 mM

#### 7.4.7 Extraktion der RNA

Die Extraktion erfolgte durch den Einsatz von Zelltrockenmasse, die durch die Behandlung eines Zellpellets aus einer zentrifugierten Flüssigkultur (4000 RPM für 15 min ohne Bremse) mittels Lyophilisator entstand. Das Mörsern unter Zugabe von flüssigem Stickstoff ermöglichte das Aufbrechen der Zellen unter Verwendung von ca. 100 mg Trockenmasse. Das erhaltene Pulver wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL Lysepuffer versetzt (siehe Tabelle 19). Es folgte die Zugabe eines Gemisches von Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und die Schüttung mit einer Rüttelplatte für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Suspension bei 13.000 RPM für 15 min zentrifugiert, um die Sedimentation der Zelltrümmer zu erreichen. Tröpfchenweise erfolgte die Zugabe von 8 M LiCl (0,75-fache Volumen) zur Fällung der RNA. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurde das RNA-Präzipitat von den flüssigen Bestandteilen durch eine Zentrifugation mit 13.000 RPM für 15 min bei 4 °C separiert und der Überstand verworfen. Die RNA wurde mit 70 %igem eiskaltem EtOH gewaschen und anschließend in 17,5  $\mu\text{l}$  autoklaviertem MilliQ- $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Nach Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  10x DNase-Reaktionspuffer (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) und 0,5  $\mu\text{l}$  DNase (2 U/ $\mu\text{l}$ , New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) mussten DNA-Verunreinigungen durch 30-minütige Inkubation bei 38 °C entfernt werden. Zur Inaktivierung der DNase bedurfte es der Zugabe von 2,5  $\mu\text{l}$  25 mM EDTA und einer Inkubation bei 75 °C für 10 min. Die RNA-Lösung wurde mit weiteren 277,5  $\mu\text{l}$  autoklaviertem MilliQ- $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und durch Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  3M Kaliumacetat (pH 5) und 750  $\mu\text{l}$  eiskaltem 100 % EtOH über Nacht bei -20 °C gefällt. Das RNA-Präzipitat wurde am nächsten Tag bei 4 °C und 13.000 RPM für 15 min zentrifugiert, um es zu sedimentieren. Der Überstand konnte verworfen und das

Präzipitat mit eiskaltem 70 %igem EtOH gewaschen werden. Es folgte eine Trocknungsphase, in der das geöffnete Gefäß auf Eis inkubierte. Abschließend konnte die RNA in 50  $\mu$ l autoklaviertem MiliQ-H<sub>2</sub>O aufgenommen werden. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80 °C. Zur Überprüfung der erfolgreichen Isolation bedurfte es einer photometrischen Messung, in der die Absorptionsverhältnisse  $A_{260/280\text{nm}}$  und  $A_{260/230\text{nm}}$  gebildet wurden oder durch eine elektrophoretische Auftrennung in einem 1 % MEN-Agarosegel (siehe Abschnitt 7.1.7).

Tabelle 19: Lysepuffer zur Extraktion von RNA nach Sokolovsky et al. (1990)

Bestandteil	Endkonzentration
NaCl	600 mM
Tris/HCl pH 8	100 mM
EDTA	10 mM
SDS	4 % (w/v)

#### 7.4.8 Kryokonservierung

Für die Erhaltung von *Synechococcus* sp. PCC7002 und den erzeugten Transformanten über einen längeren Zeitraum erfolgte eine Kryokonservierung. Hierzu wurden 950  $\mu$ l einer Zellsuspension mit einer optischen Dichte bei 730 nm zwischen 2 und 9 mit 50  $\mu$ l DMSO vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung geschah anschließend bei -80 °C. Zur Reaktivierung mussten die Proben für 10 min bei 37 °C inkubiert werden. Die Anzucht erfolgte dann in A<sup>+</sup>-Medium (siehe Abschnitt 7.4.1).

#### 7.4.9 Überschichtung mit organischem Lösemittel

Für die Analyse der Funktionsfähigkeit des ABC-Transporters wurden 50 mL *Synechococcus* sp. PCC7002 Kulturen aus Vorkulturen in 200 mL Erlenmeyerkolben mit einer OD<sub>730</sub> von 0,5 angeimpft. Die Kulturen wurden für drei Tage bei 30 °C und 100  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>\*sec Weißlicht unter Rotation (120 RPM) inkubiert. Nachfolgend erhielten die Kulturen eine 5 mL Dodecan-Überschichtung und wurden unter den gleichen Bedingungen für weitere fünf Tage inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Dodecan-Überstände abgenommen und durch neues Dodecan ausgetauscht, welches nach erneuten fünf Tagen Kultivierung ebenfalls abgenommen wurde. Die erhaltenen Dodecan-Proben wurden mittels einer SpedVac eingedampft und die zurückgebliebenen Carotinoide in 50  $\mu$ L Chloroform gelöst.

---

## 7.5 Verfahren mit Carotinoiden

### 7.5.1 Extraktion von Carotinoiden aus *Synechococcus* sp. PCC7002

Die Extraktion erfolgte durch die Entnahme von 50 mL Kultur nach 7 Tägiger Kultivierung und 15-minütige Zentrifugation bei 3500 RPM ohne Bremse. Das Pellet wurde zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend lyophilisiert. Für die Extraktion wurden 10 mg Trockenmasse eingesetzt, die durch eine Lösung aus Methanol: Chloroform: Wasser (10:3:1) gelöst wurde. Um die Zellen aufzubrechen, erfolgte die Zugabe von zwei Spatelspitzen „glass beads“ (Durchmesser 0,5 mm). Die Suspensionen erhielt anschließend eine zweifache Behandlung für 30 Sekunden in einem BeadBlaster Microtube Homogenizer (Biozym) bei 7 m/s. Die Zelltrümmer mussten daraufhin abzentrifugiert und die Lösemittelphase in ein neues Gefäß überführt werden. Die Zugabe von 260  $\mu$ L Wasser löste die Phasentrennung aus. Zur gänzlichen Trennung erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 10.000 RPM. Die Chloroform-Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und für die Untersuchung verwendet.

### 7.5.2 Extraktion von Carotinoiden aus organischen Lösemitteln

Die Überführung der Lösemittel von den Kulturen in neue Gefäße gelang mittels Pipette. Die Proben wurden zentrifugiert (2 min, 10.000 RPM), um eventuelle Verunreinigungen zu pelletieren, anschließend 0,7 mL in neue Gefäße überführt und für 72 Stunden in einer SpeedVac bei 40 °C behandelt. Das Lösemittel konnte so rückstandslos verdampft werden, ohne die Carotinoide zu beschädigen. Zur Kontrolle erfolgte die Mitführung eines Astaxanthin-Standards. Die getrockneten Carotinoide wurden in 50  $\mu$ L Chloroform gelöst.

### 7.5.3 Verseifung von Carotinoiden

Alle Carotinoid-Extrakte bedurften einer Verseifungsreaktion. Hierfür wurden die Extrakte in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ L Chloroform gelöst und mit 300  $\mu$ L 2 % (w/v) KOH-Methanol versetzt, ehe eine Inkubation der Lösung für 3 Stunden auf Eis und anschließend eine Waschung durch die Zugabe von 600  $\mu$ L 10 %iger-NaCl-Lösung (w/v) stattfand. Mittels Zentrifuge (2 min, 10.000 RPM) wurde die Phasentrennung erreicht und anschließend die Chloroform-Phase in ein neues Gefäß überführt. Der Waschschrift erfolgte zweimal.

### 7.5.4 HPLC-Analyse

Vorbereitete Carotinoidproben kamen zur Erwärmung auf Raumtemperatur in neue Gefäße. Es erfolgte nur die Überführung der zu analysierenden Menge in HPLC-Gefäße, die in den Probenhalter des HPLC-Gerätes - ein Agilent Series 1100 - platziert wurden (Agilent Technologies, Inc., US). Hierbei wurde eine C30 YMC-carotenoid Säule (YMC, Japan, 250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m particles) für die Auftrennung verwendet. Bei der Säule handelt es sich um eine sogenannte „reversed-phase column“ auf Basis von C30- gebundenem Siliziumdioxid. Hierdurch weist die Säule eine starke Hydrophobizität auf, welche die ebenfalls hydrophoben Carotinoide zurückhält. Da der Puffer A Polar ist werden die unpolaren Carotinoide erst eluiert, wenn der Puffer B in ausreichender Konzentration vorhanden ist, da dieser ebenfalls unpolar ist. Für die Analyse erfolgte die

Vermessung von einer Leer-Probe, von Standardsubstanzen für die zu erwartenden Carotinoide und die der Probe. Es wurden 10  $\mu$ L Probe aufgetragen und mittels Zwei-Puffer-System analysiert. Das Gerät erzeugte durch die zwei Puffer einen zeitlichen Gradienten. In den Tabellen 20 und 21 sind die Pufferzusammensetzungen zu finden. Ein Durchlauf setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

- Probenauftragung bei 100 % Puffer A
- Kontinuierliche Änderung des Puffers von A zu B über 30 min
- Durchfluss von 100 % Puffer B für 5 min
- Wechsel auf 100 % Puffer A und dessen Durchfluss für 5 min
- Start einer neuen Messung durch den ersten Schritt

Die Analyse der aufgetrennten Proben erfolgte durch einen UV/Vis-Detektor, der auf 470 nm eingestellt war. Zur Quantifizierung der detektierten Substanzen wurden im Vorfeld die jeweiligen Standard-Substanzen in einer Verdünnungsreihe vermessen. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurden dann Formeln zur Bestimmung der Menge der untersuchten Stoffe in  $\mu$ g ausgehend von der Peakfläche berechnet. Die Retentionszeiten der wichtigsten Stoffe dieser Arbeit können der Tabelle 22 entnommen werden. Im Anhang sind Beispiel Chromatogramme der vier wichtigsten Substanzen Astaxanthin, Zeaxanthin, Canthaxanthin und  $\beta$ -Carotin zu finden, siehe Abbildungen 34 bis 37. In den HPLC-Chromatogrammen sind die Stoffnamen direkt über den zugeordneten Peaks angegeben.

Tabelle 20: Zusammensetzung Puffer A

Bestandteil	Anteil
Methanol	81 % (v/v)
MTBE	15 % (v/v)
H <sub>2</sub> O	4 % (v/v)

Tabelle 21:Zusammensetzung Puffer B

Bestandteil	Anteil
Methanol	8 % (v/v)
MTBE	88 % (v/v)
H <sub>2</sub> O	4 % (v/v)

Tabelle 22: Retentionszeiten für die Stoffe der Astaxanthin-Synthese

Substanz	Retentionszeit
Astaxanthin	6,96 min
Adonirubin	7,62 min
Adonixanthin	7,88 min
Zeaxanthin	9,12 min
Canthaxanthin	10,15 min
Hydroxylechinenon	12,45 min
Echinenone	15,26 min
$\beta$ -Cryptoxanthin	16,32 min
$\beta$ -Carotin	19,43 min
Phytoen	21,20 min

---

### 7.5.5 HPLC-MS-Analyse

Für diese Analyse erfolgte ein Lösemittelwechsel von Chloroform zu Methanol der Proben durch Erhitzung auf 40 °C unter einer Stickstoffatmosphäre. Die Proben wurden dann durch die Abteilung für Massenspektrometrie des Fachbereichs Chemie der TU Darmstadt analysiert und die Ergebnisse zur Auswertung bereitgestellt. Zur Analytik erfolgte eine HPLC (mit einer „reversed-phase column“ und Trennung nach Polarität) gefolgt von einer Massenspektrometrie durch APCI.

### 7.6 Statistik

Wie beschrieben wurden für alle Versuche 6 biologische Replikate angefertigt. Für jedes dieser wurde dann wiederum 3 technische Replikate analysiert. Alle Daten wurden anschließend auf ihre Signifikanz geprüft. Zu diesem Zweck erfolgte zuerst eine Prüfung auf Gleichverteilung, mittels des Shapiro-Wilk-Test und anschließend noch auf Varianzhomogenität. Wenn beides gegeben war, erfolgte eine zweiseitiger T-Test, mit einem gesetzten Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ . Alle gezeigten Vergleiche von Daten weisen dabei eine Signifikanz für die zwei in Bezug gesetzten Stichproben auf. Die verschiedenen Tests wurden durch ein Python-Skript auf die Daten angewendet.

## 8 Ergebnisse

### 8.1 Funktionsanalyse von Einzelgenen

*Synechococcus* sp. PCC7002 besitzt die Grundausstattung zur Synthese von  $\beta$ -Carotin. Für die Herstellung von Astaxanthin müssten zwei weitere Gene, eine Hydroxylase (CrtZ) und eine  $\beta$ -Carotin-Ketolase (CrtW), zur Verfügung stehen. Es bieten sich als Vorlage Gene aus anderen Cyanobakterien, eukaryotische Mikroalgen oder Bakterien an.

Für den Versuch, einen eigenen Astaxanthin-produzierenden Stamm zu generieren, erfolgte die Nutzung der Gensequenzen für die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase und die  $\beta$ -Carotin-Ketolase aus *Brevundimonas* sp. Die Gensequenzen wurden entsprechend optimiert und die künstlichen Gene transformiert. Die Integration erfolgte unter der Regulation eines psbA1-Promotors in die neutrale Integrationsstelle 2 des Genoms. Transformanten mit entweder der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase oder der  $\beta$ -Carotin-Ketolase wurden kultiviert und anschließend die Carotinoid-Zusammensetzung mittels HPLC analysiert. Als Kontrolle wurde der Ausgangsstamm in 10 Kulturen über alle Experimente hinweg angezüchtet und der Mittelwert der entsprechenden Inhaltsstoffe als Referenz benutzt. Die Daten der Transformanten beruhen in allen Experimenten auf sechs biologischen Replikaten ( $n=6$ ). Die Erwartung war, dass der nicht veränderte Stamm  $\beta$ -Carotin und geringe Mengen Zeaxanthin produziert. Dies konnte in den Untersuchungen bestätigt werden. In Abbildung 12 ist ein Beispielergebnis einer HPLC-Analyse für den nicht veränderten Stamm gezeigt. Ein HPLC-Diagramm stellt die Absorption eines detektierten Stoffes in der Einheit mAU (eng. Miliabsorbance Units) gegenüber der Retentionszeit in Minuten dar. Als Hauptprodukt wird  $\beta$ -Carotin produziert, als Nebenprodukte treten noch Zeaxanthin und  $\alpha$ -Carotin auf.

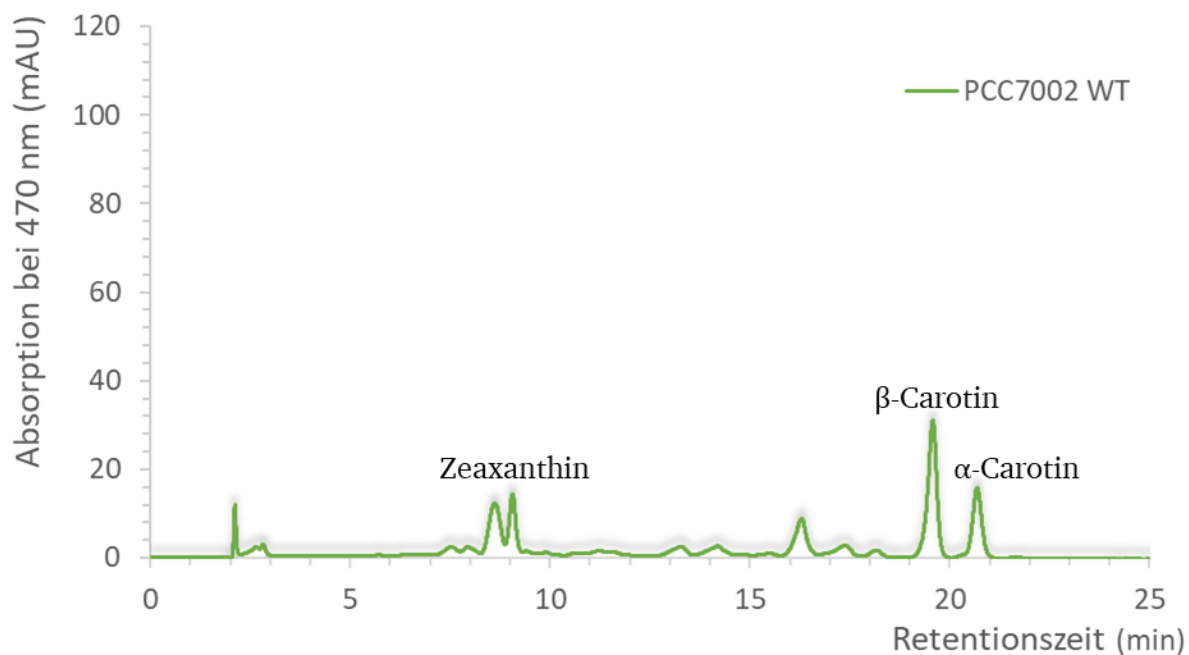


Abbildung 12: HPLC-Diagramm eines Carotinoid-Extraktes des unveränderten *Synechococcus* sp. PCC7002 Stamms. Identifiziert wurden drei Carotinoide, Zeaxanthin bei min 9,  $\beta$ -Carotin bei min 19,5 und bei min 20,8  $\alpha$ -Carotin.

Für die Stämme mit einer synthetischen  $\beta$ -Carotin-Ketolase sollte Canthaxanthin als Hauptprodukt entstehen. Linien mit einer synthetischen  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase dagegen sollten Zeaxanthin als Hauptprodukt synthetisieren. Die Experimente lieferten jedoch teilweise unerwartete Ergebnisse. Linien mit  $\beta$ -Carotin-Ketolase ergaben, wie erwartet, Canthaxanthin als Hauptprodukt. Dies ist in Abbildung 13 gezeigt. Zudem konnte festgestellt werden, dass, im Vergleich zu nicht veränderten Kontrollen, die Gesamt-Carotinoid-Konzentration stieg. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine höhere Konzentration an Canthaxanthin enthalten war. Solche mit einer  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase dagegen zeigten nur eine sehr geringe Zeaxanthin Konzentration; vergleichbar mit der in Kontrollen. Es konnte in diesem Versuch keine Funktion der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase nachgewiesen werden.

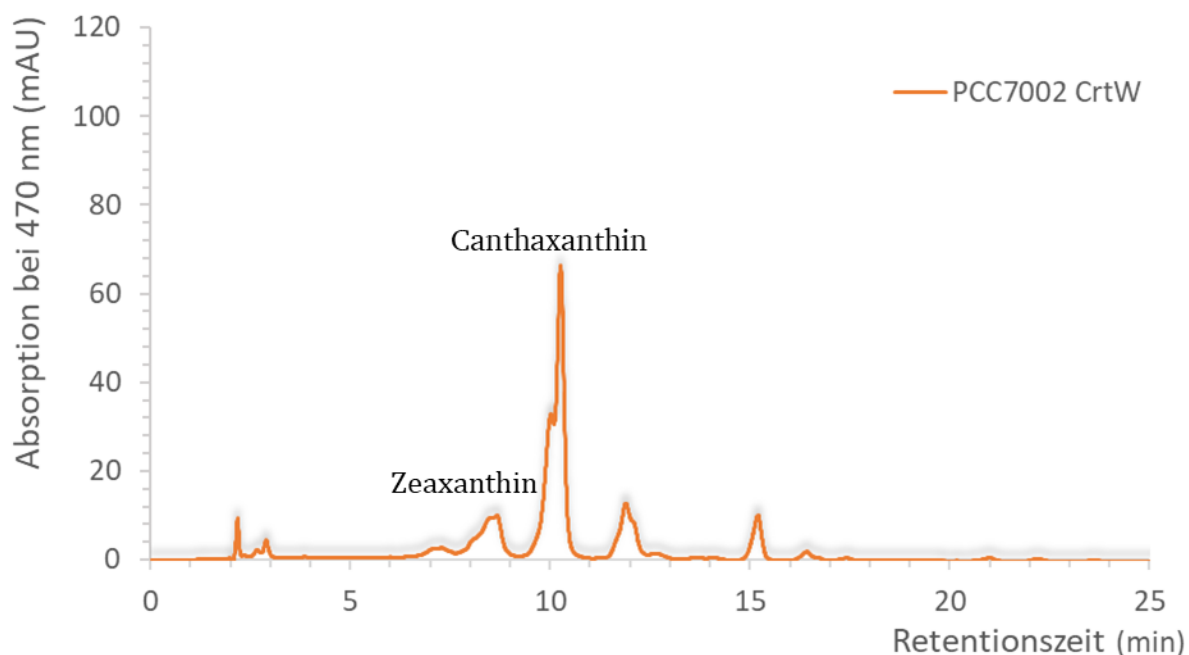


Abbildung 13: Analyseergebnis eines Carotinoid-Extraktes des  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Stamms. Die zwei wichtigsten Carotinoide wurden markiert, Zeaxanthin bei min 9 und Canthaxanthin bei min 10.

## 8.2 Enzymfunktionsanalyse

Da in *Synechococcus* sp. PCC7002 keine Funktion der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase nachgewiesen werden konnte, bedurfte es eines alternativen Testsystems, um die Aktivität und Funktion des durch das synthetische Gen kodierten Enzyms zu zeigen. Hierfür wurde ein *E. coli*-Testsystem etabliert. Es handelt sich bei diesem um einen *E. coli* DH5 $\alpha$ -Stamm, der durch das Plasmid pACCAR16 in der Lage ist,  $\beta$ -Carotin zu synthetisieren, dieser Stamm wird nachfolgen als pACCAR16 Stamm bezeichnet (Misawa et al. 1995). Die Genregulierung ist in *E. coli* einfacher und besser erforscht als in Cyanobakterien. Zudem ist die Detektion von Enzymaktivität in *E. coli* einfacher, da weniger störende Metabolite, wie andere Carotinoide, vorliegen. Eine Regulation der Carotinoid-Synthese ist deswegen unwahrscheinlich. Hierdurch sind ungewollte Nebenreaktionen mit anderen Carotinoid-verändernden Enzymen ausgeschlossen. Die zu testenden Gene wurden in den *E. coli* pACCAR16 Stamm transformiert.



---

Hierbei nutzte ich die Transformationsvektoren für *Synechococcus* sp. PCC7002, um das Gen mit seiner gesamten Expressionskassette aus Promotor-, Gen- und Terminator-Sequenz zu testen. Nach einer fünftägigen Kultivierung von Flüssigkulturen erfolgte die Carotinoid-Extraktion mit anschließender HPLC-Analyse. Für den pACCAR16 Stamm konnte das erwartete Ergebnis erbracht werden. Die Analyse ergab nur den Gehalt von  $\beta$ -Carotin. Auch für Linien mit einer  $\beta$ -Carotin-Ketolase konnten die vorhergesagten Ergebnisse, dass es zu einer Canthaxanthin-Synthese kommt und dieses das Hauptprodukt bildet, belegt werden. Die Ergebnisse der Stämme mit  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase wichen jedoch von der Erwartung ab, dass Zeaxanthin als Hauptprodukt zu finden sei. Die Analysen zeigten eine geringe Synthese von Zeaxanthin und das Hauptprodukt blieb  $\beta$ -Carotin. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase nur eine geringe Aktivität aufweist.

### 8.3 Funktionstest von mehrfach veränderten Transformanden

Auch mit einer nur geringen Aktivität der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase sollte dennoch eine Astaxanthin-Produktion möglich sein. Aus diesem Grund wurde in das *E. coli*-Testsystem ein Plasmid mit einem Fusionsprodukt aus  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase und  $\beta$ -Carotin-Ketolase eingebracht. Dieses Fusionsprodukt besteht aus einem *psbA1*-Promotor, dem ersten Gen, einer Linker Sequenz, dem zweiten Gen und einer Terminator-Sequenz. Einmal enthielt das Konstrukt zuerst die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase und dann die  $\beta$ -Carotin-Ketolase (*crtzw*) und ein zweites Mal war die Reihenfolge vertauscht (*crtwz*). In der nachfolgenden HPLC-Analyse von Carotinoid-Extrakten aus solchen Kulturen zeigte sich, dass Canthaxanthin, Zeaxanthin und Astaxanthin als Produkte gefunden werden konnten. Die Astaxanthin-Konzentration war am geringsten und die Canthaxanthin-Konzentration am höchsten.

Auch in *Synechococcus* sp. PCC7002 erfolgte ein Test von Kulturen mit beiden Enzymen. Wie im *E. coli*-Testsystem kamen die Fusions-Konstrukte zum Einsatz. Hinzu kamen sogenannte Doppeltransformanden, in denen je ein Gen in eine neutrale Integrationsstelle eingebracht wurde. Zu diesem Zweck erfolgte die Integration der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase entweder in die neutrale Integrationsstelle 1 oder 2. Die  $\beta$ -Carotin-Ketolase wurde entsprechend in die freie neutrale Integrationsstelle 1 oder 2 integriert (*crtz1w* oder *crtw1z*).

Alle vier Transformanden lieferten die gleichen Ergebnisse. In Abbildung 14 ist ein Beispielergebnis dargestellt. Hier ist die HPLC-Analyse der Carotinoid-Zusammensetzung der nicht veränderten Kontrolle gegen die eines Stammes mit beiden Genen aufgetragen. Es zeigt sich, dass die Gesamt-Carotinoid-Ausbeute gesteigert werden konnte. Entgegen der theoretischen Annahme, dass Astaxanthin als Hauptprodukt entsteht, konnte Canthaxanthin als Hauptprodukt gefunden werden. Als Nebenprodukte erzeugte der Stamm Zeaxanthin und Adonirubin. Das Ergebnis untermauert die Vermutung, dass die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase nur eine geringe Aktivität besitzt. Durch die Detektion von Adonirubin zeigt sich aber, dass die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase zumindest einen Teil der Reaktionen katalysiert, die sie katalysieren sollte. Unklar bleibt aber, warum die Reaktion von Adonirubin zu Astaxanthin nicht erfolgt. Dies deutet auf eine Produktselektivität der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase hin.

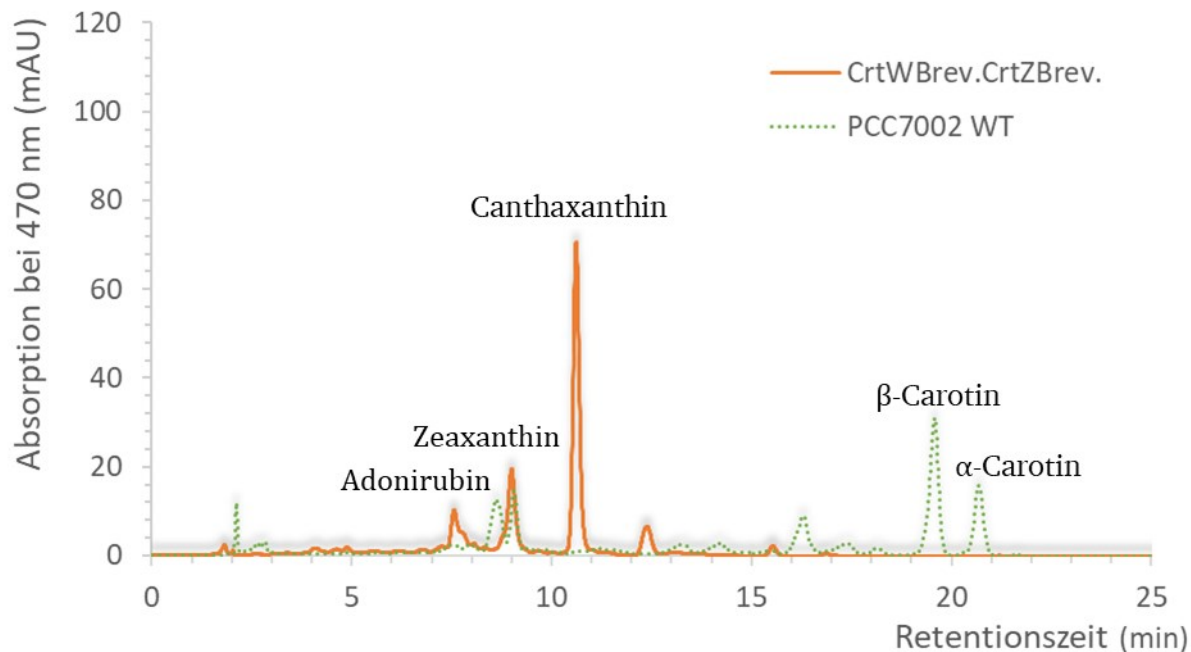


Abbildung 14: HPLC-Ergebnisvergleich für den unveränderten Stamm und einen zweifach veränderten Stamm. In orange ist die Analyse des Carotinoid-Extraktes des zweifach modifizierten Stammes mit den synthetischen Genen für die  $\beta$ -Carotin-Ketolase und  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit Ursprung in *Brevundimonas* sp. gezeigt. Verglichen wird dieser mit einem unveränderten *Synechococcus* Stamms als Kontrolle in grün.

#### 8.4 Expressionsnachweis auf RNA-Ebene

Die geringe Aktivität der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase (CrtZ) könnte aber auch auf einem fehlerhaften Gen beruhen. Um dies auszuschließen, erfolgte eine qPCR-Analyse. In dieser kann eine Genexpression auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Bei einer erfolgreichen Expression der zwei heterologen Gene sollte das Expression-Level gleich sein. Ein defektes Gen könnte jedoch zu einer Nichtexpression des Gens führen. Zudem ermöglichen zelleigene Regulationsmechanismen eine potenzielle Inhibition der Expression. Als interner Standard kam das *ppC*-Gen (Phosphoenolpyruvat-Carboxylase) zum Einsatz. Dieser interne Standard dient dazu das RNA-Level verschiedener Transformanden miteinander zu vergleichen, da das RNA-Level des internen Standards in allen Zellen ungefähr gleich sein sollte. Der Test des hauseigenen *crtR*-Gens, welches für eine  $\beta$ -Carotin-Oxygenase kodiert, die nur  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin umwandeln kann, erfolgte ebenfalls. Der Test wurde durchgeführt, um mögliche Regulationen zwischen CrtR und  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase-Expressions-Level festzustellen, da die beiden Enzyme teilweise die gleichen Reaktionen katalysieren. In Abbildung 15 ist eine Übersicht der Ergebnisse dargestellt. Allen Kulturen wurden auf die Expression der Gene *ppc*, *crtR*, *crtZ* und *crtW* analysiert. Normiert auf den internen Standard *ppC* erfolgte der Vergleich der Expression zwischen den einzelnen Kulturen. Der nicht veränderte Stamm (WT), die Stämme mit  $\beta$ -Carotin-Ketolase (CrtW) und  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase (CrtZ) zeigten wie erwartet keine Expression für Gene, die sie nicht enthielten. Die Expression des *crtR*-Gens wies immer die gleiche Expression auf. Linien mit einer  $\beta$ -Carotin-Ketolase exprimierten das Gen signifikant mit einem  $\Delta\Delta C_T$  von 25.000 im Durchschnitt. Inkonstante Ergebnisse lieferte die Analyse des  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase-Gens.

In Stämmen mit nur diesem Gen als Veränderung zeigte sich ein  $\Delta\Delta C_T$  von 350. Daraus lässt sich eine Überexpression ableiten, diese ist aber signifikant geringer als die Expression des  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gens. In Stämmen mit beiden Genen liegt die Überexpression bei einem  $\Delta\Delta C_T$  von 8.000, ist aber immer noch signifikant geringer als die des  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gens. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass beide eingebrachten Gene exprimiert werden. Die  $\beta$ -Carotin-Ketolase dürfte in einer höheren Konzentration vorliegen als die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase, gemessen an der Expression auf RNA-Ebene. Die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase scheint einer Regulation zu unterliegen.

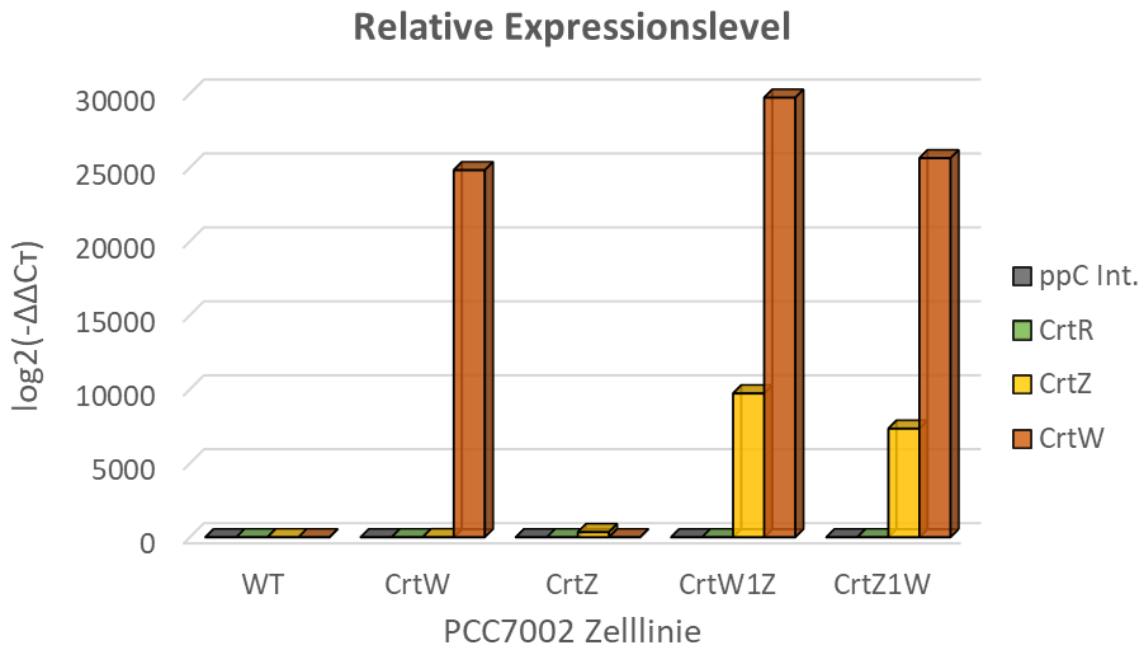


Abbildung 15: Ergebnis der qPCR-Analyse. Die relativen Expressionslevel der Gene *crtR* (grün), *crtZ* (gelb) und *crtW* (orange) sind in Form der Balken gegeben. Analysiert wurden der unveränderte Stamm (WT), eine Zelllinie mit synthetischer  $\beta$ -Carotin-Ketolase (CrtW), eine Zelllinie mit synthetischer  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase und zwei Stämme mit beiden synthetischen Genen (*crtw1z* und *crtz1w*). Für jede Zelllinie sind die Ergebnisse auf ppC (grau) normiert und auf den WT relativiert.

### 8.5 Funktionsanalyse einer alternativen $\beta$ -Carotin-Hydroxylase

In der wissenschaftlichen Literatur sind geringe Aktivitäten von  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen oder  $\beta$ -Carotin-Ketolasen ebenfalls beschrieben. Hierbei ist der Grund, dass es verschiedene  $\beta$ -Carotin-Ketolasen und  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen gibt, die alle die gleichen Reaktionen katalysieren. Die verschiedenen Enzyme unterscheiden sich stark in ihrer Intermediär-Selektivität. Dies führt zur Akkumulation verschiedener Intermediate, je nach verwendeter Kombination der Gene. Für *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine umfassende Studie zur Verwendung und Kombination von verschiedenen  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen und -Ketolasen erstellt. Wang et al. ermittelten dabei, dass der Ursprung des Gens eine bedeutende Rolle in der Carotenoid-Synthese spielt. Die meisten Kombinationen von Genen führen zu einer Akkumulation von Astaxanthin-Vorstufen, aber nicht zum gewünschten Astaxanthin. Das eben beschriebene Phänomen tritt häufig bei Genkombinationen auf, in denen die heterologen Gene für beide Enzyme aus demselben Organismus stammen. Die Arbeit von Wang et al. stellte fest, dass die Kombination aus  $\beta$ -Carotin-Ketolase mit Ursprung in

*Brevundimonas* sp. und der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1 die effektivste Astaxanthin-Synthese ergab.

Diese Kombination der Gene wurde in eigenen Untersuchungen getestet. Auch das  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase-Gen mit Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1 (*crtz* A.PC-1) erfuhr wie beschrieben eine Optimierung. Stämme mit dem synthetischen Gen *crtz* A.PC-1 ergaben in nachfolgenden HPLC-Analysen die erwarteten Ergebnisse. Die Abbildung 16 stellt ein Beispielergebnis der durchgeführten HPLC-Analysen dar. Zeaxanthin bildete das Hauptprodukt, es konnten zusätzlich  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Carotin detektiert werden.

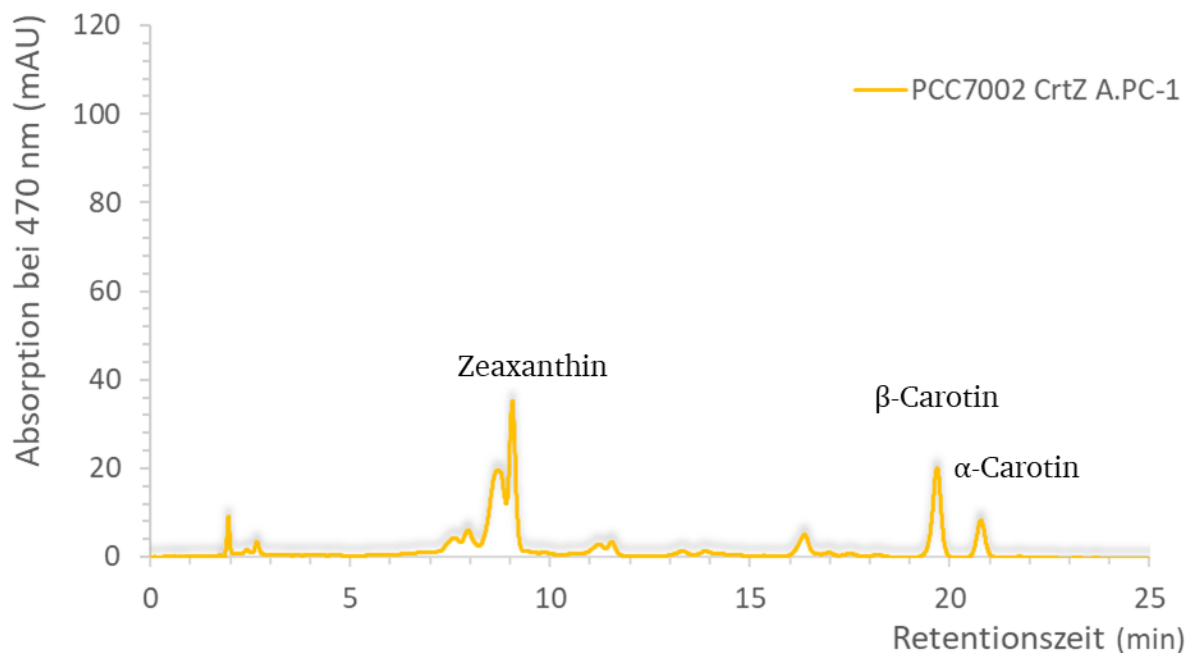


Abbildung 16: HPLC-Ergebnis einer Zelllinie mit dem synthetischen Gen *crtz* A. PC-1. In diesen Stämmen kann Zeaxanthin (min 9) als Hauptprodukt gefunden werden. Zusätzlich besteht das Carotinoid-Gemisch noch aus  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Carotin.

Wie schon für die anderen Enzyme wurde auch für die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1 ein Enzymfunktionstest im *E. coli*-Testsystem durchgeführt. In diesem Test erzielte das Enzym eine höhere Aktivität und setzte  $\beta$ -Carotin zur Gänze in Zeaxanthin um. Die Ergebnisse aus beiden Organismen zusammen betrachtet ergeben die Schlussfolgerung, dass die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1 die erwartete Aktivität aufweist, jedoch in *Synechococcus* sp. PCC7002 entweder die Expression nicht ausreichend hoch ist oder das Enzym einer unbekanntem Regulierung unterliegt. Im Vergleich mit den Ergebnissen der nicht veränderten Kontrolle und den Linien mit  $\beta$ -Carotin-Ketolase steigert die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1 die Carotinoid-Konzentration von *Synechococcus* sp. PCC7002 nicht. Die  $\beta$ -Carotin-Ketolase sorgt hingegen für eine erhöhte Carotinoid-Konzentration in den Zellen im direkten Vergleich mit dem nicht veränderten Stamm (siehe Abbildung 17).

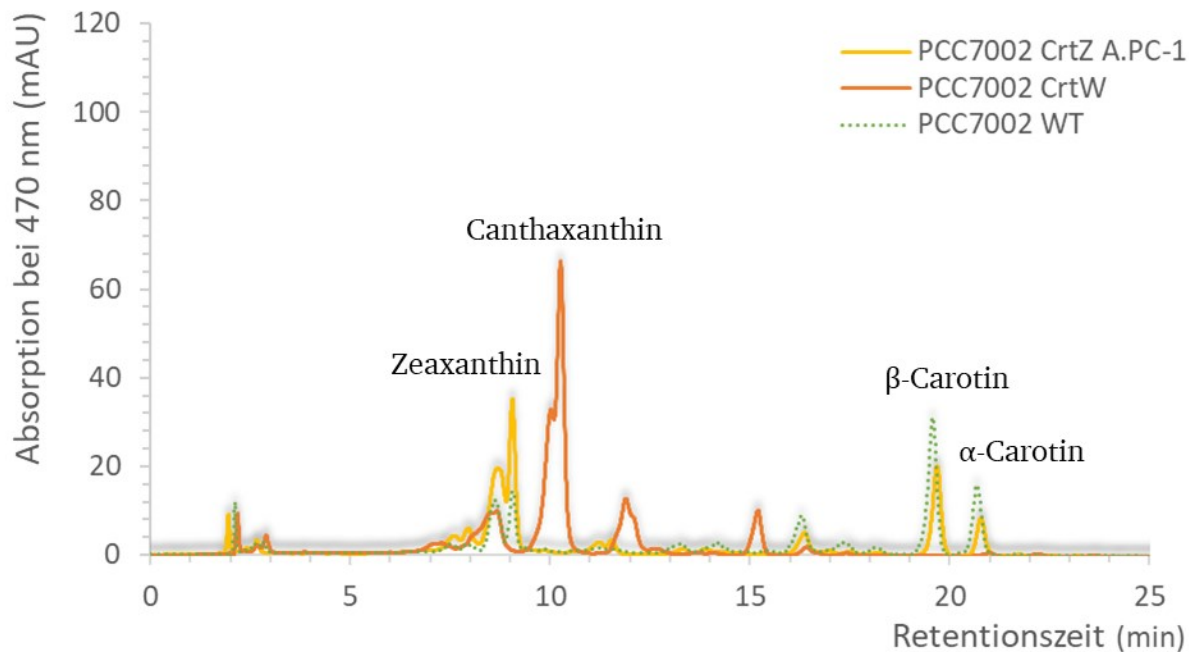


Abbildung 17: Vergleich der Carotinoid-Zusammensetzungen. Die HPLC-Ergebnisse der Stämme mit dem *crtZ* A.PC-1-Gen (gelb) und dem *crtW*-Gen (orange) sind gegen die Ergebnisse aus dem unveränderten Stamm (WT, grün) aufgetragen. Die *CrtZ* A.PC-1-Zelllinie und der WT beinhalten Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Carotin. Dabei liegt im WT eine höhere Konzentration an  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Carotin vor als Zeaxanthin. In der *CrtZ* A.PC-1-Zelllinie ist dies umgekehrt. Die Carotinoid-Zusammensetzung der *CrtW*-Zelllinie besteht dagegen nur aus Canthaxanthin und dessen Vorstufen in geringen Mengen. Dafür ist die Gesamt-Carotinoid-Ausbeute in diesem Stamm gegenüber dem unveränderten Stamm gesteigert.

### 8.6 Analyse von mehrfach veränderten Transformanden mit alternativer $\beta$ -Carotin-Hydroxylase

Mittels der Kombination aus Ketolase mit Ursprung in *Brevundimonas* sp. und der Hydroxylase mit Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1 produzierte *Synechococcus* sp. PCC7002 Adonirubin und Adonixanthin als Hauptprodukte. Diese zwei Carotinoide sind die direkten Vorläufer von Astaxanthin, wobei nicht nur diese, sondern auch geringe Mengen an Astaxanthin in HPLC-Analysen gefunden wurden. Die Analyse der zwei direkten Vorstufen gelang nur über eine HPLC gekoppelt mit einer Massenspektrometrie (MS), da für diese Stoffe keine Standardsubstanz zur Verfügung stand und die Separation der Peaks via HPLC nicht gelang. Zur Identifikation erfolgte der Vergleich mit simulierten MS-Zerfallsmustern, im Anhang unter Abschnitt 12.7 sind zwei Teilergebnisse für eine solche Analyse gezeigt. Interessanterweise konnte in Stämmen mit einer Kombination aus beiden Genen wieder  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Carotin detektiert werden. Linien mit nur dem Gen für die  $\beta$ -Carotin-Ketolase produzierten nur Canthaxanthin. Jedoch stieg die Gesamt-Carotinoid-Konzentration um das Dreifache im Vergleich zur nicht veränderten Kontrolle (siehe Abbildung 18). Im *E. coli*-Testsystem konnte hingegen Astaxanthin als Hauptprodukt identifiziert werden.

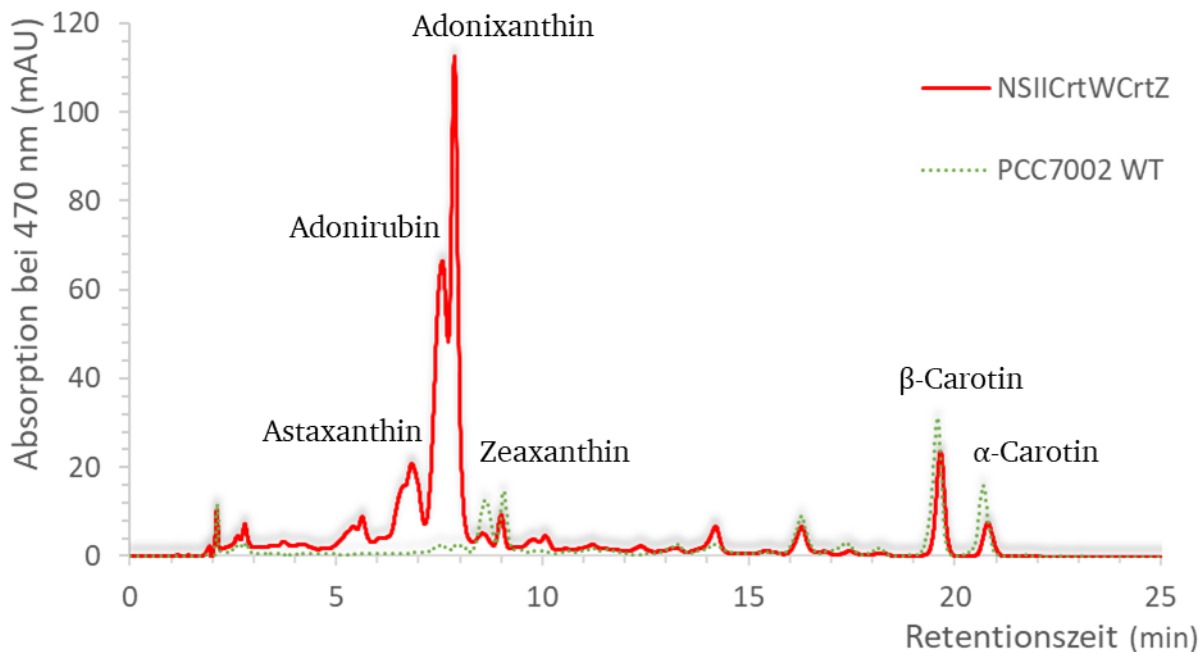


Abbildung 18: Carotinoid-Zusammensetzung einer mehrfach modifizierten Zelllinie. Das HPLC-Chromatogramm gibt die Ergebnisse der Vermessung eines Carotinoidextraktes aus einem Stamm mit synthetischer Ketolase mit Ursprung in *Brevundimonas* sp. und einer Hydroxylase mit Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1 (roter Graph) wieder. Die Hauptprodukte sind Adonixanthin (min. 8) und Adonirubin (min. 7,5) Für den Vergleich dient ein Ergebnis aus dem unveränderten Stamm (grüner Graph).

### 8.7 Vergleich der neutralen Integrationsstellen auf Ihr Expressions-Niveau

Das Genom von *Synechococcus* sp. PCC7002 liegt ca. in dreifacher Kopienzahl vor. Hingegen ist die Kopienzahl des endogenen Plasmids pAQ1 ca. 50 (Akiyama et al. 1998). Es scheint zudem ein Zusammenhang zwischen Genom-Kopienzahl und Expressionslevel zu bestehen (Pappert et al. 2023). Aus diesem Grund sind Teile dieser Arbeit hier gezeigt, auch wenn sie kein Bestandteil dieser Arbeit sind. Für die Untersuchung der möglichen Einflüsse der neutralen Integrationsstellen erfolgte die Entwicklung eines auf GFP-basierenden Expressionssystems. Ein unter der Kontrolle eines synthetischen cpc560-Promotors (Markley et al. 2015) liegendes sfGFP wurde in die drei Genom-NS (NSI, NSII und NSIII) sowie in die vorhergesagte Neutralstelle des endogenen Plasmids pAQ1 mit der Bezeichnung Flanke1B eingebracht (Hasunuma et al. 2019). Eine Untersuchung dieser Stämme (in der Regel n=10 biologische Replikate) auf Ihre GFP-Fluoreszenz ermöglicht Rückschlüsse auf die GFP-Menge und so auf die Stärke der GFP-Expression. Ein Fluoreszenzmikroskop erbrachte die Messungen für einzelne Zellen. Für jede Linie umfasste die Auswertung 5000 Zellen. Mittels dieser Untersuchung gelang es, folgende Aussagen zu treffen: Die Expression zwischen den einzelnen genombasierten neutralen Integrationsstellen NSI, NSII und NSIII zeigten keine Änderungen in Ihrer Expressionsstärke (siehe Abbildung 19). Die Expression des GFP im endogenen Plasmid pAQ1 war hingegen um ein Vielfaches (Faktor 10) gesteigert (Pappert et al. 2023). Es konnten noch zwei weitere Phänomene erfasst werden. Wird das GFP mit einem anderen Protein fusioniert, in diesem Fall mit der  $\beta$ -Untereinheit des Phycocyanin, ist die Expression um einen Faktor von 1,2 gesteigert. Dies ist ebenso für die Fusion mit einem His-Tag zu detektieren. Die gesteigerte Expression von GFPHis (siehe Abbildung 19) konnte mittels CrtZHis- und CrtWHis-

Stämmen weiter belegt werden. CrtZHis- und CrtWHis-Transformanden zeigten eine gesteigerte Carotinoid-Konzentration und eine stärkere Bildung Ihrer Hauptprodukte Zeaxanthin und Canthaxanthin. In Abbildung 20 ist ein Vergleich zwischen den Linien CrtW und CrtWHis gezeigt. Die Konzentration an Canthaxanthin ist in CrtWHis-Stämmen höher.

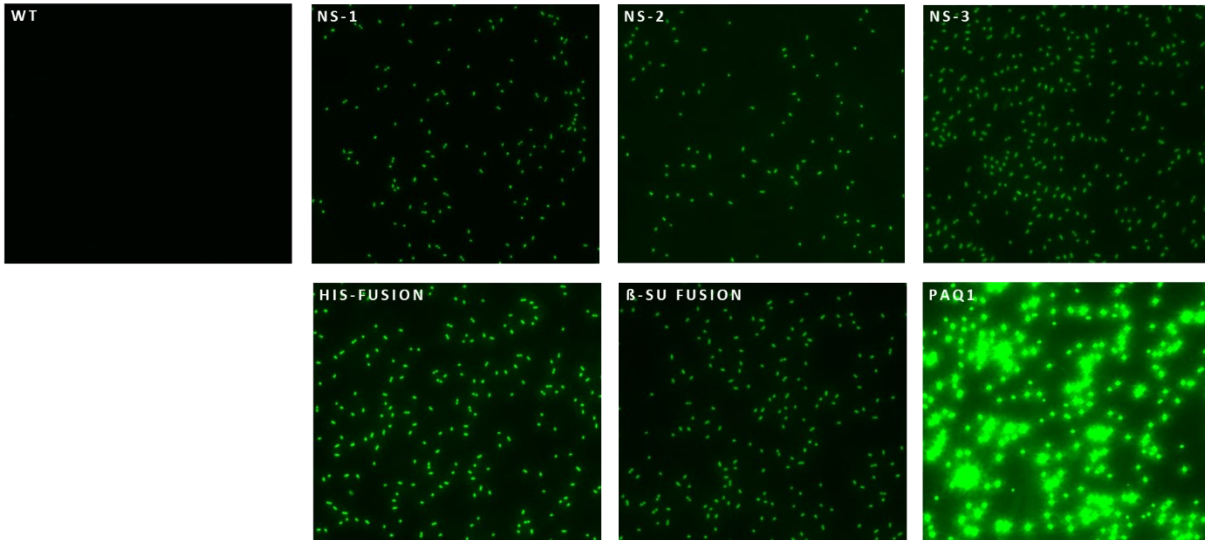


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen der GFP-exprimierenden *Synechococcus*-Stämme. Für den Vergleich der GFP-Intensität pro Zelle sind Aufnahmen aller vermessenen Stämme gegeben. In der oberen Reihe sind Stämme, die das *gfp*-Gen in einer der neutralen Integrationsstellen inseriert haben (NSI, NSII und NSIII) gegen den unveränderten Stamm (WT) aufgetragen. Die untere Reihe zeigt Zelllinien, in denen das *gfp*-Gen in der NSII integriert ist und als Fusion mit einem endständigen His-Tag (His-Fusion) oder vorangestellter Beta-Untereinheit des Phycocyanin ( $\beta$ -SU Fusion) vorliegen. Die Fluoreszenzintensität ist um das 1,2-Fache erhöht. Das Bild unten rechts dagegen stellt das Ergebnis für die Integration des GFP-Gens in das endogene Plasmid pAQ1 (PAQ1) dar. Hier ist die Fluoreszenzintensität um das 10-Fache erhöht (Pappert et al. 2023).

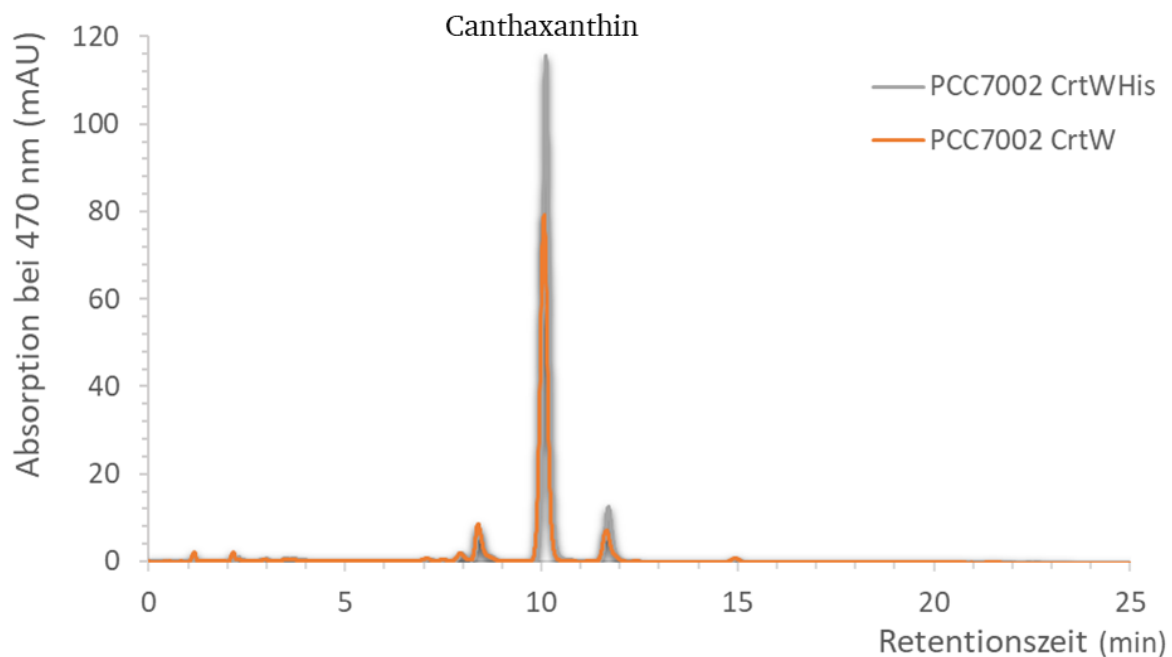


Abbildung 20: Auswirkung des endständigen His-Tags auf die Carotinoid-Zusammensetzung. Die HPLC-Ergebnisse zeigen eine erhöhte Canthaxanthin-Konzentration in der Zelllinie mit einem angefügten His-Tag an die Ketolase (grauer Graph). Im Vergleich dazu sind die

Ergebnisse für die Zelllinie mit Ketolase-Gen in orange dargestellt. Die Zusammensetzung ändert sich nicht, nur die Ausbeute des Hauptbestandteils Canthaxanthin und des Vorläufers werden gesteigert.

### 8.8 Expression der synthetischen Gene durch die Integration in das endogene Plasmid

Die Integration in das endogene Plasmid pAQ1 sollte eine erhöhte Expression der synthetischen Gene zur Folge haben. Infolgedessen sollte auch mehr Enzym für die Umsetzung von  $\beta$ -Carotin vorhanden sein. Möglicherweise kann die erhöhte Enzymkonzentration nicht nur das noch vorhandene  $\beta$ -Carotin umsetzen, sondern erhöht zudem den Astaxanthin-Anteil.

Für eigene Untersuchungen erfolgte die Integration der Kombination aus Ketolase mit Ursprung in *Brevundimonas* sp. und der Hydroxylase mit Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1 in das endogene Plasmid pAQ1. Zur Integration von zwei separaten Gen-Konstrukten in die gleiche neutrale Integrationsstelle wurden die beiden Gene jeweils unter der Kontrolle eines eigenen Promotors integriert. In der anschließenden HPLC-Analyse konnte für den so erzeugten Stamm (Stamm A) Astaxanthin als Hauptprodukt identifiziert werden (siehe Abbildung 21). Die Ausbeute lag bei  $1,2 \pm 0,13$  mg/g Zellrockengewicht. Als Nebenprodukte traten Zeaxanthin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin auf.

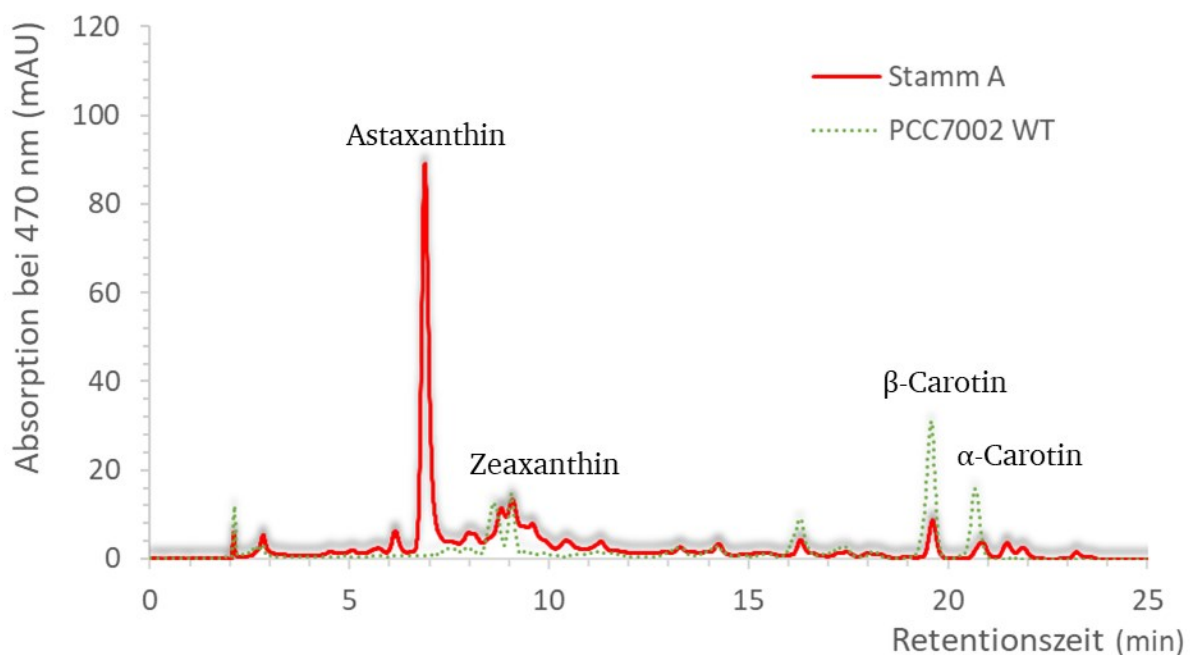


Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm eines Stammes mit Astaxanthin als Hauptprodukt. In rot ist die Carotinoid-Zusammensetzung eines Stammes mit *crtw* und *crtz* integriert in das endogene Plasmid pAQ1 (Stamm A) dargestellt. Das Hauptprodukt ist Astaxanthin bei min. 6,9. Zum Vergleich dient der grüne Graph, der die Zusammensetzung des unveränderten Stammes (WT) wiedergibt. Für die jeweiligen Linien sind die Hauptprodukte markiert. Die Gesamt-Carotinoid-Ausbeute ist im Astaxanthin-produzierenden Stamm erhöht.

### 8.9 Untersuchung des Einflusses der Kultivierungszeit auf die Carotinoid-Ausbeute

In Vorexperimenten zeigte sich, dass die Kultivierungszeit einen Einfluss auf die Carotinoid-Ausbeute besitzt. Mit steigender Kultivierungsdauer steigt die Ausbeute an Carotinoid pro g Zellrockenmasse. Dies deutet auf eine Akkumulation von Carotinoiden in den Zellen hin. Hieraus erfolgte die Entwicklung der Hypothese, dass *Synechococcus* sp. PCC7002 mit zunehmendem Alter



---

der Kulturen Carotinoide akkumuliert, bis ein zellinterner Maximalspiegel erreicht wird. Die Kultivierungszeit erfuhr eine sukzessive Steigerung von 5 Tagen auf 7, 10, 15, 20, 25 und 30 Tage. Während die zellinterne Carotinoid-Konzentration bis Tag 15 kontinuierlich anstieg, kam es danach zu keiner weiteren Steigerung. Die effektivste Ausbeute wurde an Tag 7 erhalten. Hier war das Zeit-Astaxanthin-Ausbeuten-Verhältnis am höchsten für die Astaxanthin-Ausbeute. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Regulation des Carotinoid-Synthesewegs weiteren Faktoren unterliegt.

## **8.10 Untersuchung des Einflusses von Licht auf die Carotinoid-Synthese**

### **8.10.1 Experimentelle Untersuchung der Lichtintensität**

Das eingesetzte Licht spielt hierbei eine wichtige Rolle. Durch Licht, vor allem Lichtstress, konnte in der wissenschaftlichen Literatur gezeigt werden, dass die Carotinoid-Synthese eine Aktivierung erfährt (Golden et al. 1997; Steinbrenner und Linden 2003). Zudem sind beide verwendeten Promotoren lichtinduziert, auch wenn die Literatur von konstitutiv aktiven Promotoren spricht (Liu et al. 2019; Nair et al. 2001). Jedoch gibt es noch andere Parameter des Lichts, die eine Rolle spielen könnten (Pagels et al. 2021). In höheren Pflanzen, aber auch in Mikroalgen, ist bekannt, dass ein Lichtrhythmus einen positiven Einfluss auf den Metabolismus besitzt (Velez-Ramirez et al. 2011; Liu et al. 2015). Daher wurden zwei unabhängige Experimente zum Thema Licht durchgeführt. In beiden ging es darum, zu klären, inwieweit das Licht einen Einfluss auf die Carotinoid-Synthese besitzt. Im ersten Experiment wurde die Hypothese verfolgt, dass eine höhere Lichtintensität eine gesteigerte Carotinoid-Synthese bewirkt. Hierbei muss die Carotinoid-Ausbeute jedoch das durch Licht erhöhte Wachstum übertreffen, um eine erhöhte Netto-Carotinoid-Synthese zu erhalten. Es wurden Lichtintensitäten zwischen 100 und 600  $\mu\text{E}$  ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ ) verwendet. Insgesamt erfolgte der Test von folgenden Lichtintensitäten: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 und 600  $\mu\text{E}$  Weißlicht 6500 K. Es zeigte sich, dass sich in den Kulturen bis 300  $\mu\text{E}$  das Wachstum und die Netto-Astaxanthin-Ausbeute mit jeder Lichtintensitäts-Steigerung sich ebenfalls erhöht. Bei 400  $\mu\text{E}$  konnte keine erhöhte Astaxanthin-Ausbeute im Vergleich zu 300  $\mu\text{E}$  festgestellt werden. Hingegen ergaben sich bei 600  $\mu\text{E}$  Unterschiede. In den ersten Tagen der Kultivierung war die Astaxanthin-Ausbeute ebenfalls nicht erhöht. Das Wachstum kam zum Erliegen und die Astaxanthin-Ausbeute sank ab Tag 10 im Vergleich mit den Kulturen bei 200, 250 und 300  $\mu\text{E}$  Weißlicht. Dies deutet darauf hin, dass 600  $\mu\text{E}$  Weißlicht der Kultur auf Dauer schadet.

### **8.10.2 Experimentelle Untersuchung von Lichtrhythmen**

Das zweite Experiment verfolgte die Hypothese, dass der Lichtrhythmus eine Auswirkung auf die Carotinoid-Synthese besitzt (Singh et al. 2023; Golden et al. 1997). Hierzu wurden Kulturen erst für 12 Stunden synchronisiert (Kultivierung über 12 Stunden in Dunkelheit) und dann unterschiedlichen Rhythmen an Licht ausgesetzt. Ein Rhythmus setzte sich aus 24 Stunden mit zuerst einem Lichtanteil und dann einer Dunkelphase zusammen. Getestet wurden die Rhythmen 12:12, 16:8, 20:4 und Dauerlicht als Kontrolle. Die Hypothese hinter dem Versuch war, dass eine Dunkelphase, gefolgt von Licht, den Promotor erneut aktiviert und so eine stärkere Genaktivierung

---

erfolgt. Unter Dauerlicht könnte der Promotor die Aktivität bei gleichbleibendem Reiz verlieren. Es zeigte sich, dass die Rhythmen 12:12 und 20:4 keine Verbesserung im Vergleich zu Kulturen mit Dauerlicht hervorbrachten. Im Gegenteil, nicht nur das Wachstum verschlechterte sich bei einer 12:12 Behandlung, sondern auch die Netto-Carotinoid-Ausbeute wurde verringert. Dies war in gewisser Weise auch zu erwarten, da die Lichtleistung über einen Tag betrachtet halbiert wurde. Es scheint, dass die Zellen nicht in der Lage sind, genügend Speicherstoffe zu bilden, um ihren Metabolismus über 12 Stunden Dunkelheit voll aktiv zu halten. Jedoch bei Rhythmen von 16:8 und 20:4 sind die Zellen in der Lage, die Dunkelfase zu überbrücken, ohne ein verringertes Wachstum zu zeigen. Die Nettoausbeute an Astaxanthin in Kulturen mit 20:4-Rhythmus verringerte sich, was darauf hindeutet, dass die Dunkelfase nicht ausreichend war, um den Promotor erneut zu stimulieren. Denn in Kulturen, die einen 16:8-Rhythmus erfuhren, entstand eine erhöhte Netto-Astaxanthin-Ausbeute, um 5 % im Vergleich zur Dauerlichtkontrolle.

### **8.11 Einfluss von pH-Stress auf die Carotinoid-Synthese**

Die Carotinoid-Synthese in Mikroalgen und Cyanobakterien ist nicht nur durch Licht, sondern auch anderen Stressfaktoren wie Trockenstress oder pH-Stress induzierbar (Pagels et al. 2021). Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu Licht noch der Einfluss einer pH-Wert-Änderung getestet. Das A<sup>+</sup>-Medium wird auf einen pH-Wert von 8,2 eingestellt. Durch die CO<sub>2</sub>-Begasung sinkt dieser auf einen pH-Wert von 7 ab. Während der Kultivierung kommt es durch die Zellen zu einer Anpassung des pH-Werts auf 9. Dies scheint ein aktiver Prozess der Zellen zu sein. Im Folgenden wurde, um eine pH-Stress zu induzieren, das Medium in regelmäßigen Abständen (24h) mittels Salzsäure auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Zu beobachten war, dass die Kulturen den pH-Wert innerhalb der 24 Stunden anhoben, durchschnittlich auf pH 8±0,24. Dies war für die ersten 6 Tage der Kultivierung zu beobachten. Ab dem Tag 7 stellten die Kulturen mit angesäuertem pH-Wert das Wachstum ein und starben ab. Ein Einfluss auf die Astaxanthin-Synthese konnte nicht festgestellt werden. Die Hypothese, dass saurer pH-Stress die Carotinoid-Produktion steigert, erwies sich daher als nicht zu bestätigen.

### **8.12 Überexpression der Phytoen-Synthase zur Optimierung des Synthesewegs**

Der synthetische Astaxanthin-Syntheseweg von β-Carotinoid zu Astaxanthin ist durch die synthetischen Gene für die Ketolase mit Ursprung aus *Brevundimonas* sp. und der Hydroxylase mit Ursprung aus *Alcaligenes* sp. PC-1 stark optimiert und sollte daher keinen „Bottleneck“ mehr ergeben. Jedoch könnte ein derzeit nicht angetasteter Schritt die Umsetzung von Geranylgeranylpyrophosphat zu Phytoen durch die Phytoen-Synthase einen Engpass darstellen. Zur Entfernung dieses Engpasses und zur Erhöhung des Reaktionsdruckes durch eine höhere Edukt-Konzentration in den nachfolgenden Reaktionsschritten wurde die Phytoen-Synthase von *Synechococcus* sp. PCC7002 überexprimiert.

Das stammeigene Gen der Phytoen-Synthase kam für diesen Zweck zum Einsatz. Die Überexpression des Gens erfolgte durch die Integration in die neutrale Integrationsstelle 2 oder 1 unter der Kontrolle des psbAI-Promotors. Mittels HPLC-Analyse konnte eine Steigerung der α- und

$\beta$ -Carotin-Konzentration in den veränderten Stämmen festgestellt werden. Für die Integration in die neutrale Integrationsstelle 1 ergab sich eine dreifache Steigerung der Carotin-Konzentration und für die neutrale Integrationsstelle 2 konnte eine fünffache Steigerung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 22).

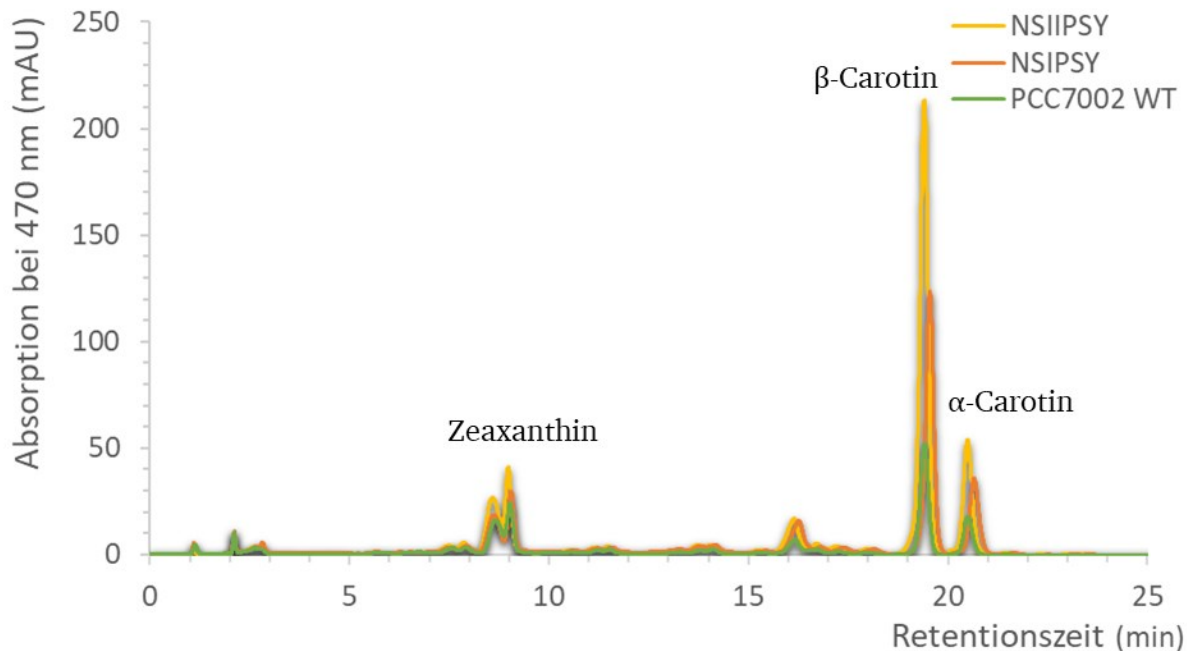


Abbildung 22: Erhöhung der  $\beta$ -Carotin-Ausbeute durch die Überexpression der PSY. Der grüne Graph gibt das Ergebnis eines Carotinoid-Extraktes aus dem unveränderten Stamm wieder, der orangene Graph das mit überexprimierter PSY durch Integration in die NSI und der gelbe Graph durch Integration in die NSII. Alle gefundenen Carotinoide wurden durch die Überexpression des Enzyms in einer höheren Konzentration gebildet. Für die NSII ist dieser Effekt am stärksten.

Nach dem erfolgreichen Beweis, dass die Carotin-Konzentration in den Zellen durch die Überexpression der Phytoen-Synthase gesteigert werden konnte. Galt es nachzuweisen, dass dies auch einen Einfluss auf die Astaxanthin-Konzentration hat. Der Nachweis gelang durch den Vergleich von Astaxanthin-bildenden *Synechococcus* sp. PCC7002-Stämmen (Stamm A) und Stämmen mit zusätzlicher Phytoen-Synthase (Stamm A PSY). Aus der HPLC-Analyse ergab sich, dass im Vergleich die Astaxanthin-Konzentration in Astaxanthin-bildenden Linien  $1,71 \pm 0,32$  mg Astaxanthin pro g Zelltrockengewicht (DCW eng. für dry cell mass) betrug und in Linien mit zusätzlicher Phytoen-Synthase  $2,38 \pm 0,17$  mg Astaxanthin pro g Zelltrockengewicht. Dies entspricht einer Steigerung um 29 % (siehe Abbildung 23). Zudem konnte in den Stämmen mit zusätzlicher Phytoen-Synthase ein Anstieg der Konzentration von Zeaxanthin und Phytoen festgestellt werden (siehe Abbildung 24).

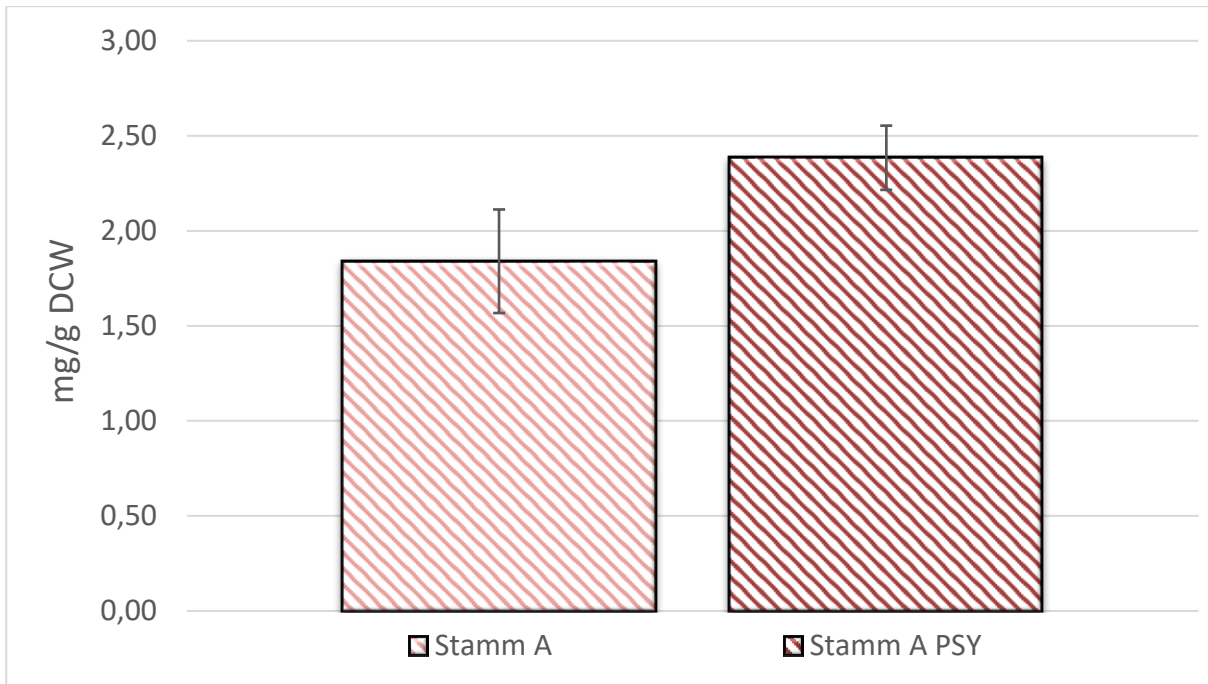


Abbildung 23: Berechnete Ausbeute aus Astaxanthin-bildenden Stämmen mit und ohne PSY. Die hellrote Säule zeigt die durchschnittliche Astaxanthin-Ausbeute von sechs biologischen Replikaten gemessen in Duplikaten des Stamm A. Die Ausbeute liegt für diesen Stamm bei  $1,71 \pm 0,32$  mg pro g Zelltrockenmasse. Für den Stamm A PSY betrug die Astaxanthin-Ausbeute  $2,38 \pm 0,17$  mg pro g Zelltrockenmasse, wiedergegeben durch die dunkelrote Säule mit dem gleichen  $n=6$ .

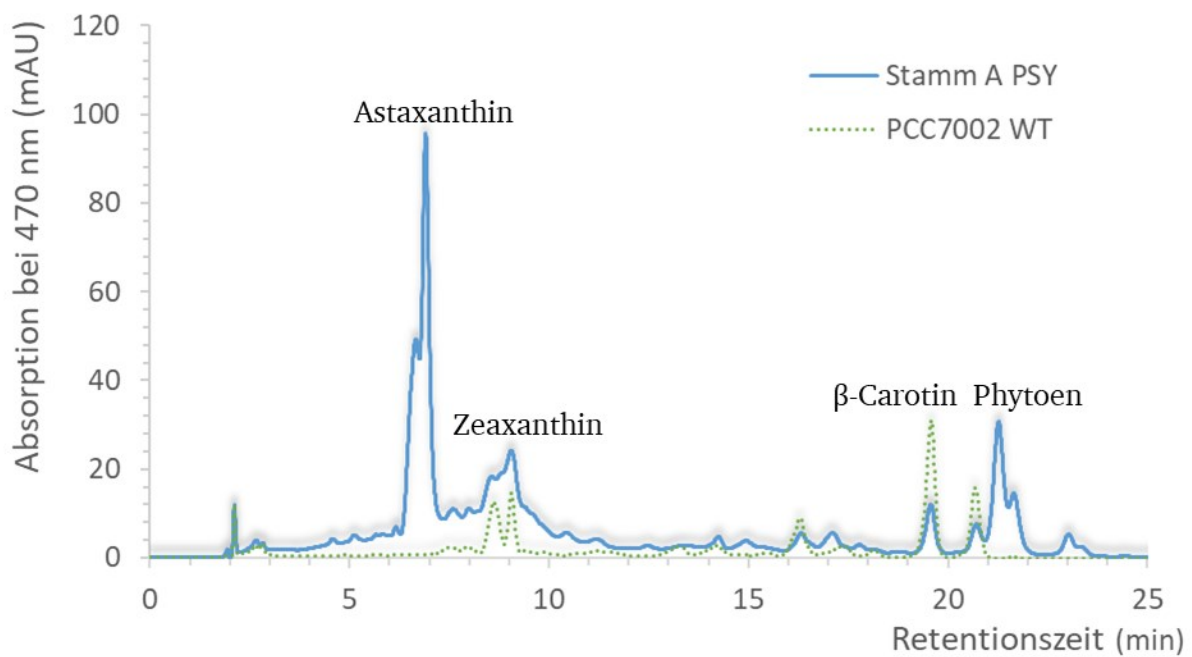


Abbildung 24: HPLC-Ergebnis des Stamm A PSY (blau) im Vergleich zum unveränderten Stamm (grün). Für beide Stämme sind die wichtigsten Produkte markiert. Der Stamm A PSY bildet erstmals, neben dem Astaxanthin-Hauptprodukt, messbare Mengen Phytoen (min. 21,3).

### 8.13 Relative Integrationszahl

Im Laufe der Transformationen zeigte sich, dass Stämme, die mit dem gleichen Vektor verändert wurden, sowohl in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit als auch der Carotinoid-Ausbeute unterschiedlich performten. Bei einer PCR-Analyse des Genoms zeigte sich, dass nicht alle Genomkopien eine Veränderung erfuhren. Infolgedessen wurde mittels PCR die relative Integrationszahl (rI-Zahl) bestimmt. Dies soll angeben, in welchem Verhältnis nicht veränderte DNA-Sequenzen zu veränderten Stellen vorkommen. Nach der Selektion mit dreifacher Antibiotikums-Steigerung konnten Werte zwischen 0,7 und 2,5 für die relative Integrationszahlen ermittelt werden. Eine relative Integrationszahl von 1 würde anzeigen, dass die Hälfte der Genomkopien verändert ist und die andere Hälfte nicht.

Die ermittelten relativen Integrationszahlen deckten sich mit den durch HPLC-Analysen erhaltenen Astaxanthin-Ausbeuten. Bei höherer rI-Zahl war auch die Astaxanthin-Ausbeute erhöht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden schon getestete Stämme einer Behandlung über vier Runden durch Selektionssaustriche und Anzucht von so erhaltenen Einzelkolonien in neuen Flüssigkulturen unterzogen. Die Konzentration an Antibiotikum verdoppelte sich in jedem Schritt von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf schlussendlich 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Die PCR-Analyse der mittels dieser Technik erhaltenen Stämme ergab, dass sich die rI-Zahl in allen Stämmen erhöht hatte. In Abbildung 25 ist ein Beispiel-Agarosegel, das für die rI-Zahl-Bestimmung dient, gezeigt. NSII gibt dabei den Nachweis für unveränderte Genomkopien der neutralen Integrationsstelle 2 an. Banden, die dort entstehen, sind auf nicht veränderte DNA-Bereiche zurückzuführen.

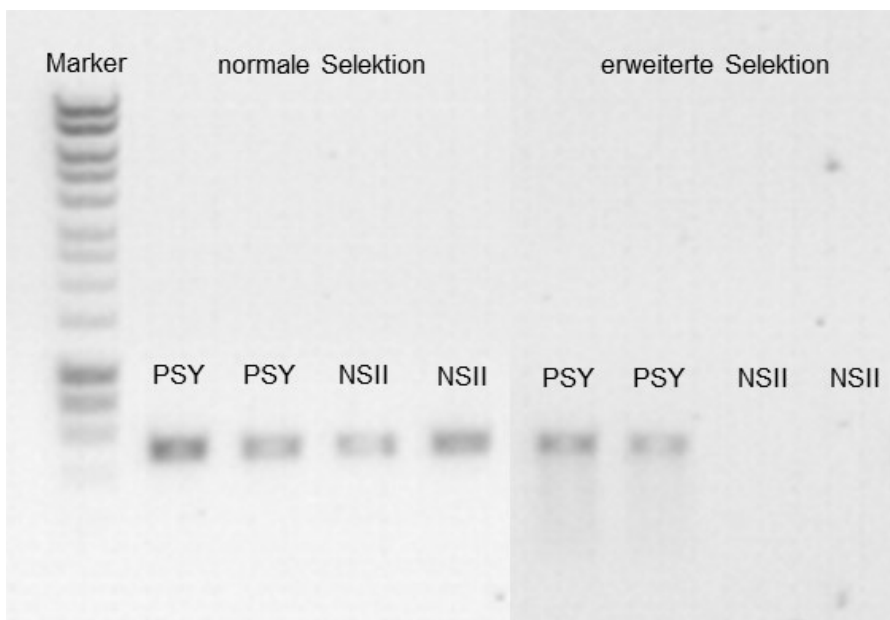


Abbildung 25: Beispielagarosegel für die Bestimmung der rI-Zahl. Mittels PCR-analyasierter genomischer DNA für Stämme nach der normalen Selektion und der erweiterten. Untersucht wurde auf das synthetische Gen der *psy* und der ursprünglichen DNA-Sequenz für die NSII. Die Proben wurden in zwei Verdünnungen aufgetragen.

Im Beispiel erfolgte die Untersuchung auf die Integration der Phytoen-Synthase (*psy*) in die NSII. Für die Standard-Selektion können Banden in beiden Untersuchungen detektiert werden. Durch die erweiterte Selektion erfolgte nur noch der Nachweis von veränderten DNA-Bereichen. Für Integrationen in die neutralen Integrationsstellen des Genoms ergaben sich Werte zwischen 1,8 und 5,1 und für die Integration in das endogene Plasmid von 3,6 bis 63,1. Für mehrere Stämme konnte eine vollständige Integration des Zielgens erreicht werden. Stämme mit gesteigerter rI-Zahl wiesen ebenfalls eine gesteigerte Astaxanthin-Konzentration auf. In der Grafik 26 ist das Ergebnis für zwei solcher Stämme (Stamm A und Stamm A PSY) gezeigt. Die gestrichelten Säulen zeigen die Stämme vor der erweiterten Selektion und die gestreiften Säulen die Stämme nach der vierten Runde der erweiterten Selektion. Es ist zu sehen, dass für den Stamm A die Astaxanthin-Ausbeute bei  $1,2 \pm 0,13$  mg/g Zelltrockengewicht betrug und nach der vierten Selektionsrunde bei  $1,84 \pm 0,27$  mg/g Zelltrockengewicht lag. Für den Stamm A PSY konnten vor der erweiterten Selektion eine Astaxanthin-Ausbeute von  $1,33 \pm 0,14$  mg/g detektiert werden und nach der vierten Runde der erweiterten Selektion betrug die Ausbeute  $2,38 \pm 0,17$  mg/g Zelltrockengewicht.

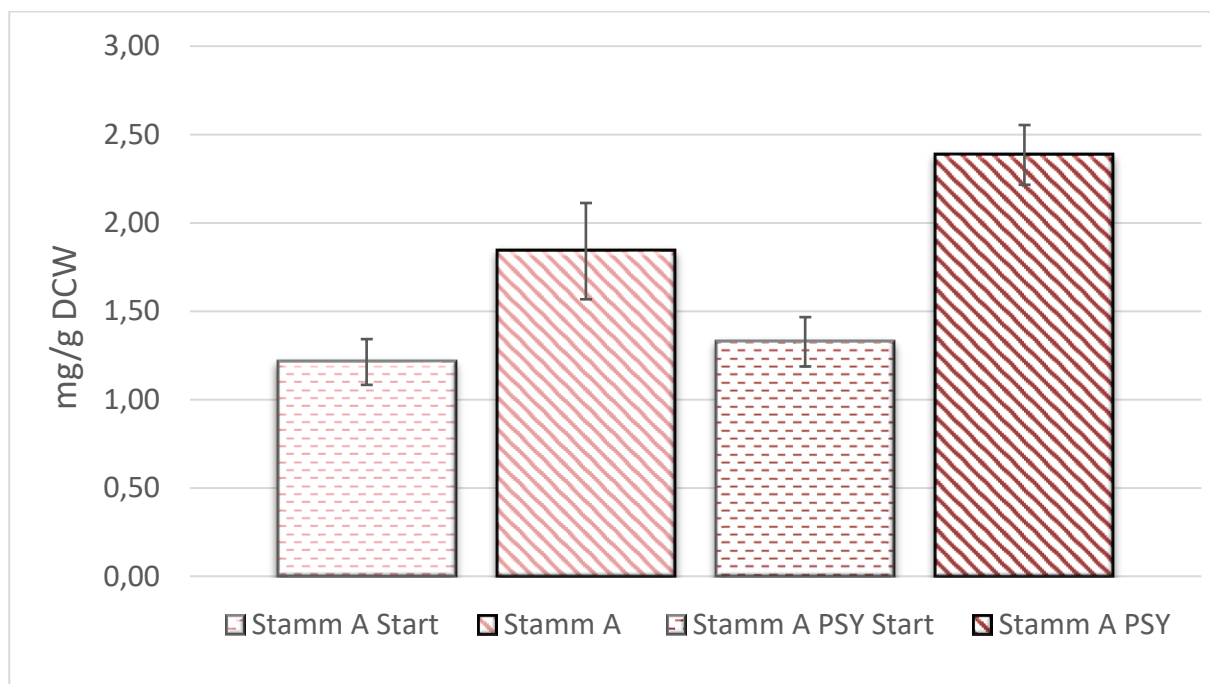


Abbildung 26: Astaxanthin-Ausbeuten vor und nach der erweiterten Selektion. Die gestrichelten Säulen geben die berechneten Ausbeuten vor der erweiterten Selektion an, die linierten danach. In hellrot sind die Ergebnisse für den Stamm A, mit einer Erhöhung der Ausbeute von  $1,2 \pm 0,13$  mg/g auf  $1,84 \pm 0,27$  mg/g dargestellt und in dunkelrot die des Stamm A PSY, mit einer Erhöhung von  $1,33 \pm 0,14$  mg/g auf  $2,38 \pm 0,17$  mg/g.

#### 8.14 Auswirkungen des ABC-Transporters auf die Zelllinien

Zur Eliminierung des Ernte- und Extraktions-Schrittes erfolgte die Untersuchung eines ABC-Transporters. Dieser wurde in der neutralen Integrationsstelle 2 mit verschiedenen Promotoren getestet. Unter der Kontrolle des *cpc560* Promotors gelang es nicht, lebensfähige Stämme zu erhalten. Durch die Verwendung eines Theophyllin-induzierbaren Promotors (Li et al. 2018) sind wachsende Stämme transformiert worden, jedoch konnte nach dem Induzieren keine Funktion des

ABC-Transporters nachgewiesen werden. Das Wachstum war im direkten Vergleich mit dem unveränderten Stamm jedoch um 4 % verringert. Durch das Induzieren des Promotors verschlechterte sich das Wachstum erneut, insgesamt ergab sich so ein um 7 % verlangsames Wachstum.

Für die Berechnung des verringerten Wachstums wurde die erreichte maximale optische Dichte bei 730 nm über einen festgesetzten Zeitraum (10 Tage) verglichen. Der unveränderte Stamm erreichte hier eine  $OD_{730nm}$  von  $15 \pm 0,35$ .

Die Verwendung des *psbA1*-Promotors ermöglichte es, Stämme zu erzeugen, die ein verlangsames Wachstum aufwiesen, dafür jedoch auch eine Funktion des ABC-Transporters. Das Wachstum, gemessen über 10 Tage, erlitt eine Reduktion von  $14 \pm 1,8$  %, die Stämme erreichten eine  $OD_{730nm}$  von  $12,9 \pm 0,19$ . Zur Analyse der Funktion des ABC-Transporters kam eine Übersichtung mit Dodecan zum Einsatz. Flüssigkulturen von Astaxanthin-produzierenden Stämmen (Stamm A) und Stämmen mit zusätzlichem ABC-Transporter (Stamm AT) erhielten eine solche Übersichtung. Die Kulturen wurden aus Vorkulturen auf eine optische Dicht $_{730nm}$  von 0,5 angeimpft und für drei Tage ohne Übersichtung kultiviert. Nach der Behandlung mit Dodecan erfolgte die Probenentnahme nach 5 bzw. 11 Tagen, sodass die Kulturen zu diesem Zeitpunkt 8 bzw. 14 Tage alt waren (siehe Abbildung 27). Für die Probenentnahme wurde der Dodecan-Überstand entfernt und durch neues Dodecan ersetzt.

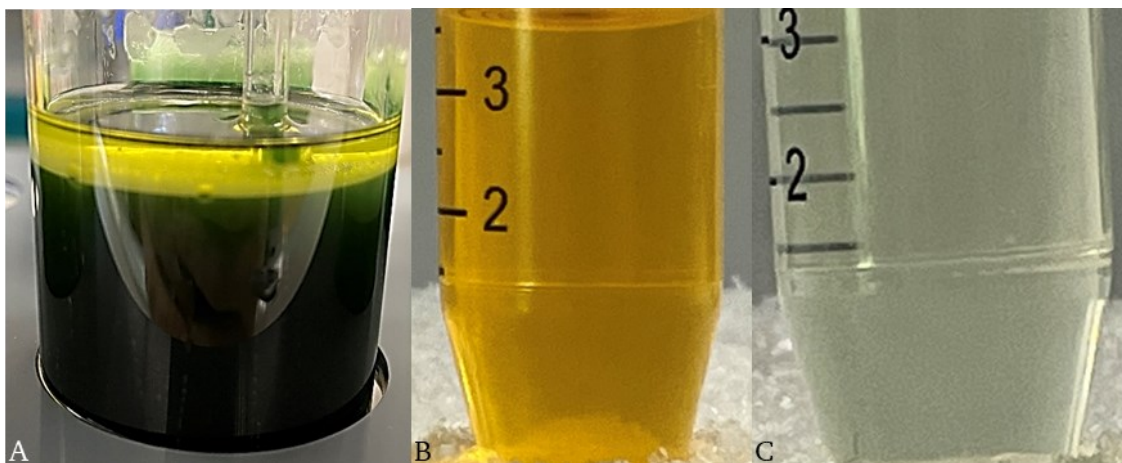


Abbildung 27: *Synechococcus* sp. PCC7002 Kultur und Dodecan-Überstände A) Flüssigkultur des Stamm AT mit Dodecan-Überstand nach 8 Tagen der Kultivierung in einem Blasensäulenreaktor. B) Dodecan-Überstand einer Stamm AT-Kultur 5 Tagen nach der Übersichtung mit der typischen orangenen Carotinoid-Farbe C) Dodecan-Überstand einer Stamm A-Kultur 5 Tagen nach der Übersichtung ungefärbt, wie reiner Dodecan.

Aus den so gewonnen Überständen erfolgte die Carotinoid-Gewinnung. Zur Berechnung der Ausbeuten und der Bestimmung der Carotinoide erfolgte eine HPLC-Analyse der gewonnenen Dodecan-Proben und Proben aus Zelltrockenmasse. Beide Stämme enthielten die gleichen Carotinoide und internen Konzentrationen. Im Überstand gelang lediglich für den Stamm AT der Nachweis von Carotinoiden (siehe Abbildungen 28 und 29). Als Hauptpeak wurde Astaxanthin in der HPLC gefunden und zusätzlich kleinere Mengen Zeaxanthin.

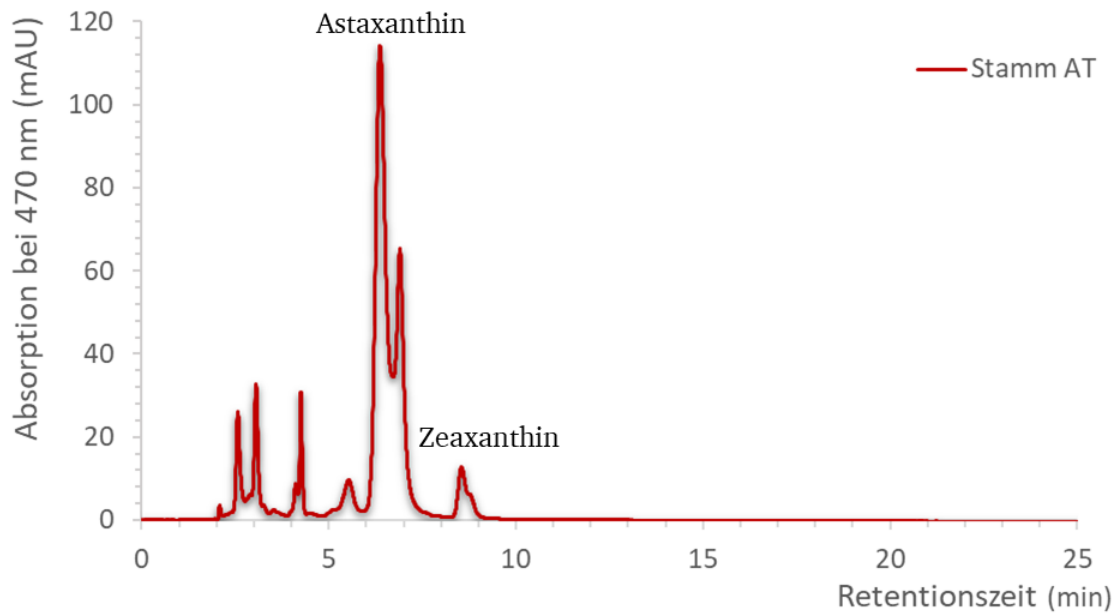


Abbildung 28: Im Dodecan-Überstand gefundene Carotinoide des Stamm AT. Die Vermessung mittels HPLC ergab Astaxanthin und geringe Mengen an Zeaxanthin für die eingedampften Dodecan-Überstände des untersuchten Stamms. Vor min. 5 sind ungeklärte Peaks, die immer bei einer Dodecan-Überschichtung auftraten, jedoch nicht durch Dodecan hervorgerufen werden. Es muss sich um Produkte aus *Synechococcus* handeln.

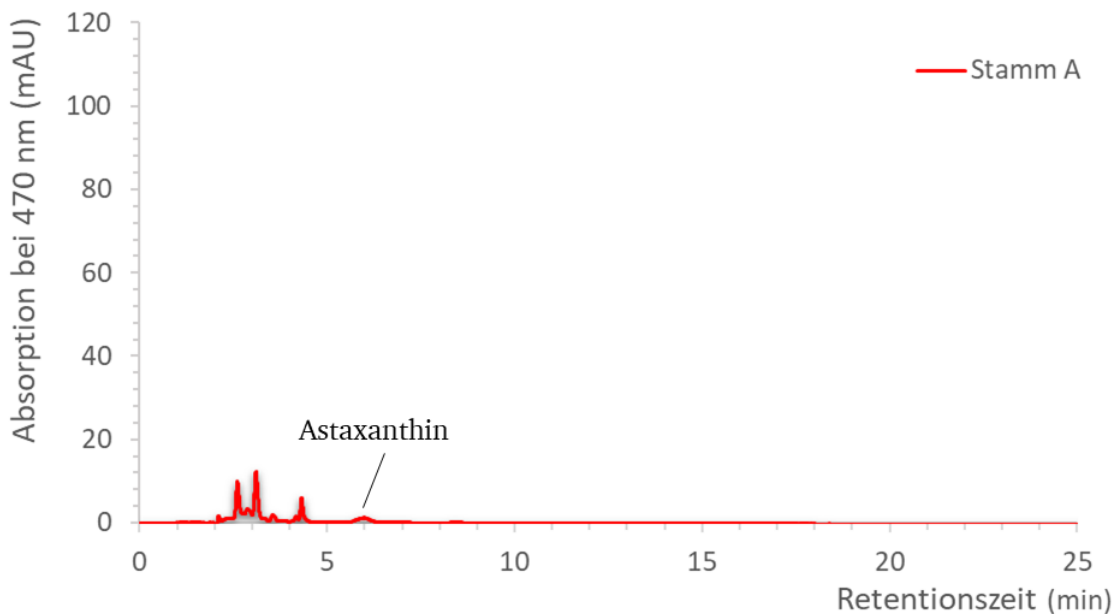


Abbildung 29: HPLC-Diagramm der Carotinoid-Ausbeute des Stamm A aus dem Dodecan-Überstand. Minimale Mengen Astaxanthin können detektiert werden.



Fünf Tagen nach der Überschichtung konnte eine durchschnittliche Astaxanthin-Ausbeute von  $0,22 \pm 0,065 \mu\text{g/mL}$  Kultur detektiert werden, siehe Abbildung 30 hellrot gestreifte Säule. Weitere fünf Tage nach der Überschichtung (14 Tage Kultivierung) stieg die Ausbeute auf  $0,45 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$  Kultur, Abbildung 30 rot gestreifte Säule. Im Vergleich hierzu gelang für den Stamm der nur Astaxanthin produziert ausschließlich die Detektion von geringen Mengen Astaxanthin. Die Ausbeute betrug unabhängig von der Kultivierungszeit  $0,022 \pm 0,046 \mu\text{g/mL}$  Kultur, siehe gestichelte Säulen in Abbildung 30. Aus den Ergebnissen ist zu schließen, dass die gefundenen Carotinoide im Dodecan auf der Verwendung des ABC-Transporters beruhen. Zudem ist die intrazelluläre Astaxanthin-Konzentration der Stämme A und AT identisch. Für den Stamm A betrug diese nach 8 Tagen der Kultivierung  $1,38 \pm 0,013 \text{ mg Astaxanthin/g DCW}$  und nach 14 Tagen  $2,15 \pm 0,057 \text{ mg Astaxanthin/g DCW}$ . Im Vergleich zeigte der Stamm AT eine Ausbeute nach 8 Tagen von  $1,37 \pm 0,041 \text{ mg Astaxanthin/g DCW}$  und nach 14 Tagen von  $2,15 \pm 0,15 \text{ mg Astaxanthin/g DCW}$ . Eine kontinuierliche selektive Sekretion von Astaxanthin durch die Zellen ist möglich, solange die Nährstoffversorgung sichergestellt ist.

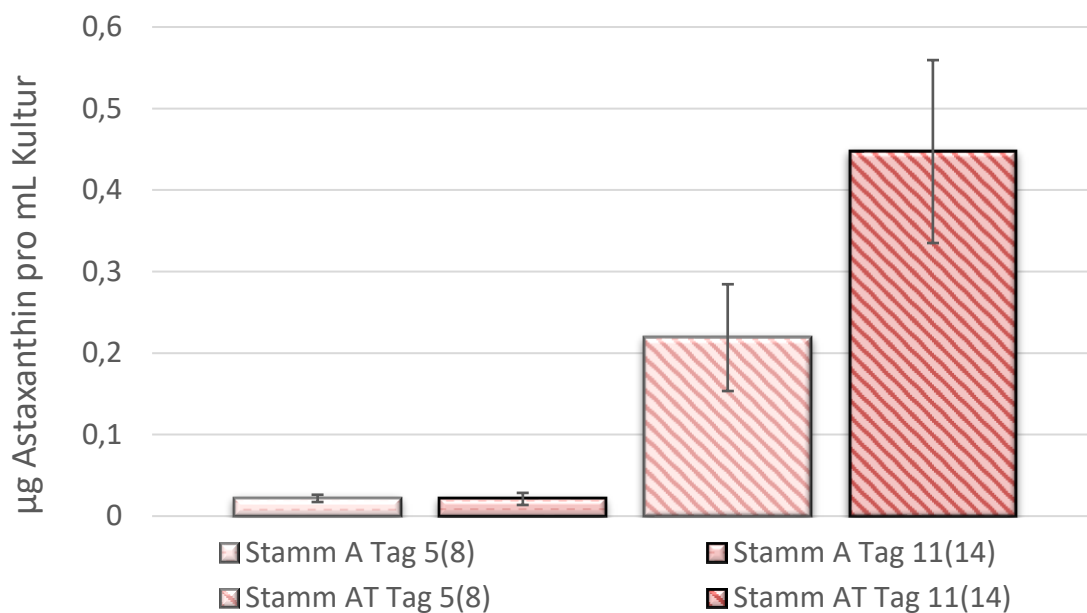


Abbildung 30: Berechnete Astaxanthin-Ausbeute aus den Dodecan-Überständen. Die linken gepunkteten Säulen geben die durchschnittlichen Ausbeuten von Astaxanthin im Dodecan-Überstand für den Stamm A wieder. In hellrot ist die Ausbeute aus dem Überstand 5 Tagen nach der Überschichtung und in dunkelrot nach 11 Tagen gezeigt. Für den Stamm AT sind die Ergebnisse in den gestreiften Säulen wiedergegeben. Die hellrote steht wieder für die Ausbeute nach 5 Tagen und die dunkelrote nach 11 Tagen. Alle Ergebnisse beruhen auf n=6 Messungen.

### 9.1 Einflüsse der Expression von $\beta$ -Carotin-modifizierenden Enzymen

Die Expression von synthetischen Genen, welche für Enzyme codieren, die  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin umzusetzen, ergab in *Synechococcus* sp. PCC7002 eine Änderung der Carotinoid-Zusammensetzung. Die Nutzung der Gensequenz für eine  $\beta$ -Carotin-Ketolase mit Ursprung in *Brevundimonas* sp. zur Erzeugung eines synthetischen Gens führte zur erwarteten Bildung von Canthaxanthin. Das  $\beta$ -Carotin, das der nicht veränderte Stamm produzieren konnte, wird durch dieses Enzym effektiv in das zweifach veränderte Canthaxanthin umgesetzt. Zudem stieg, im Vergleich zum nicht veränderten Stamm, die Gesamt-Carotinoid-Ausbeute. Dies deutet auf eine Produktinhibition durch  $\beta$ -Carotin hin, die es mit Canthaxanthin entweder nicht mehr gibt oder zumindest nur in geringer Form.

Für das synthetische Gen der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase, für das die Sequenz aus *Brevundimonas* sp. als Grundlage diente, ergab sich nach den erhaltenen Ergebnissen keine Funktion. Mittels HPLC konnten, trotz der durch die PCR nachgewiesenen Genomveränderung, keine Veränderungen in der Carotinoid-Synthese von *Synechococcus* sp. PCC7002 detektiert werden. Das Ausbleiben des erwarteten Ergebnisses, dass das Zeaxanthin- $\beta$ -Carotin-Verhältnis sich zu Gunsten von Zeaxanthin verschiebt, ist auf ungeklärte Ursachen zurückzuführen. Hieran könnte eine fehlerhafte Expression des synthetischen Gens, eine für den Organismus spezifische Enzymregulation oder ein nicht funktionelles Enzym beteiligt sein. Mögliche Regulationen könnten dadurch ausgelöst werden, dass *Synechococcus* schon einen eigenen Zeaxanthin-Syntheseweg über das *crtr*-Gen besitzt.

### 9.2 Analyse der Funktion von Enzymen im *E. coli*-System

Zur reinen Funktionsanalyse von Enzymen nutzt die wissenschaftliche Literatur zellfreie Systeme, in denen die Enzyme entkoppelt vom Zellmetabolismus auf ihre intrinsische Funktion analysiert werden können. Die Etablierung eines solchen Systems in der Arbeitsgruppe war nicht gegeben, jedoch gab es ein auf *E. coli* basierendes Testsystem, das schon in früheren Arbeiten zum Einsatz kam (Tran und Kaldenhoff 2020b). Es ist speziell für die Analyse von Carotinoid-Synthese-Enzymen designt worden. In diesem wird eine *E. coli*-Linie verwendet, die in der Lage ist,  $\beta$ -Carotin zu produzieren. Durch eine gut aufgeklärte Genregulation in Verbindung mit einem bekannten Metabolismus ist die Detektion in *E. coli* simpler. Insbesondere für Enzyme, die an der Carotinoid-Synthese beteiligt sind, ist die Funktionsanalyse einfacher, da *E. coli* keine natürlichen Synthesewege für Carotinoide oder andere Bestandteile der Photosynthese besitzt. Infolgedessen können auch keine Regulationen über diese Wege die Synthese der Carotinoide beeinflussen.

Der eigentliche Grund für die Verwendung des *E. coli*-Testsystems ergab sich daraus, dass das synthetische Gen der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase keine nachweisbare Funktion zeigte. Durch die Verwendung des Testsystems gelang der Nachweis, dass das synthetische Gen der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase, mit Ursprung in *Brevundimonas* sp., eine geringe Aktivität besitzt. Jedoch wurden in Stämmen mit diesem Gen weiterhin  $\beta$ -Carotin neben dem nun auch gebildeten Zeaxanthin gefunden. Der Test des Gens der  $\beta$ -Carotin-Ketolase mit demselben Ursprung ergab eine bessere

---

Aktivität. Dieses Gen sorgte für die gesamte Umsetzung des  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin. Eine Erhöhung der Gesamt-Carotinoid-Konzentration konnte für beide Gene nicht nachgewiesen werden. In *Synechococcus* sp. PCC7002 dagegen gelang dies für Stämme mit der  $\beta$ -Carotin-Ketolase. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Carotinoid-Synthese in dieser Spezies einer Produktinhibition unterliegt.

Darüber hinaus muss es noch andere Regulationen geben. Für Stämme des Testsystems mit beiden  $\beta$ -Carotin-verändernden Genen gelang der Nachweis von geringen Mengen an Astaxanthin. Das erhaltene Carotinoid-Gemisch enthielt als Hauptbestandteil Canthaxanthin. Dies bestätigt die Annahme, dass die  $\beta$ -Carotin-Ketolase eine höhere Aktivität oder Effizienz aufweist als die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase. Durch den Fund von höheren Konzentrationen an Zeaxanthin als an Adonirubin und Astaxanthin zeigt sich, dass die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit Ursprung in *Brevundimonas* sp. eine höhere Bindeaffinität für  $\beta$ -Carotin aufweist als für Canthaxanthin oder Adonirubin. Diese Stoffe können zwar umgewandelt werden, jedoch nimmt die Konzentration mit dem Grad der Veränderung weiter ab. Für die  $\beta$ -Carotin-Ketolase muss davon ausgegangen werden, dass sie eine höhere Bindeaffinität zu  $\beta$ -Carotin besitzt als die verwendete Hydroxylase, denn Canthaxanthin liegt in einer höheren Konzentration als Zeaxanthin vor. Dies könnte auch an einer höheren Effizienz dieses Enzyms liegen, was jedoch den gleichen Effekt hätte. Die Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass die verwendete Ketolase nur eine sehr geringe Bindeaffinität zu Zeaxanthin aufweist; denn es können keine Vorstufen von Astaxanthin ausgehend von Zeaxanthin – z.B. Adonixanthin – gefunden werden. Durch den Fund von Adonirubin zeigt sich, dass der Reaktionsweg über Canthaxanthin läuft.

### 9.3 Nachweis der Expression auf RNA-Ebene

Die eben diskutierten Ergebnisse ergeben sich in *Synechococcus* sp. PCC7002 nicht. Dies deutet auf eine Genregulation hin. Aus diesem Grund kam es zur Analyse der Expression auf RNA-Ebene durch eine qPCR. Die Ergebnisse bestätigten die Vermutung einer Regulation, ausgelöst durch Zeaxanthin. In Linien mit synthetischer  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase konnte keine Aktivität des Enzyms festgestellt werden, da es nur zu einer geringeren Überexpression kommt; zumindest im direkten Vergleich zu Linien mit einer synthetischen  $\beta$ -Carotin-Ketolase. In Linien mit beiden Enzymen ergab sich eine gesteigerte Überexpression der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase. In diesen Stämmen erfolgte die Identifizierung von Canthaxanthin als Hauptprodukt und der Nachweis einer gesteigerten Gesamt-Carotinoid-Konzentration. Infolgedessen muss die Regulation durch das Produkt Zeaxanthin ausgelöst sein. Die geringere Expression der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase im Vergleich zur verwendeten Ketolase in Stämmen mit beiden Genen kann darüber hinaus nicht erklärt werden. Dies muss auf das synthetische Gen oder weitere Regulierungen dieser zurückzuführen sein. Möglicherweise gibt es eine zu große Übereinstimmung mit dem stammeigenen *crtr*-Gen, welches ebenfalls  $\beta$ -Carotin zu Zeaxanthin umsetzen kann.

---

#### 9.4 Verwendung einer alternativen $\beta$ -Carotin-Hydroxylase

Eine Erklärung für das Ausbleiben der Synthese von Astaxanthin in *Synechococcus* sp. PCC7002 könnten die Daten von Wang et al. geben (Wang et al. 2017). Die bisher erbrachten und diskutierten Ergebnisse zeigen, dass die synthetischen Gene mit Ursprung in *Brevundimonas* sp. funktionsfähig sind und in *Synechococcus* exprimiert werden. Jedoch kommt es zu Regulationen, die die Bildung von Astaxanthin verhindern. Dies steht im Widerspruch zur Arbeit von Hasunuma et al., der mit dieser Genkombination Astaxanthin als Hauptprodukt erhalten hatte (Hasunuma et al. 2019). Das könnte durch die Verwendung von synthetischen Genen zustande kommen. Die Analyse der Enzyme im *E. coli*-Testsystem ergaben jedoch ein ähnliches Ergebnis wie die Arbeit von Wang et al. (Wang et al. 2017). Daher musste der Schluss gezogen werden, dass auch in *Synechococcus* sp. PCC7002 der Ursprung der Gene eine wichtige Rolle spielt. Denn es gibt einen erheblichen Einfluss auf die Funktion und Aktivität des Enzyms, der auf dem Ursprung der genutzten Gensequenz beruht. Sequenzen für Enzyme mit der gleichen Bezeichnung und intrinsischen Funktion aus verschiedenen Organismen sind dennoch unterschiedlich. Diese Variation verändert z.B. Produktaffinitäten oder Reaktionsgeschwindigkeiten. Die Nutzung einer Gensequenz, welche in *E. coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* die gewünschte Funktion zeigte, könnte auch für *Synechococcus* in Frage kommen. Ausgewählt wurde als Alternative eine synthetische  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase, deren Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1 lag. Dieses Gen erbrachte die erwartete Zeaxanthin-Synthese. Die Gesamt-Carotinoid-Konzentration konnte jedoch nicht gesteigert werden. Dies bleibt weiterhin nur mit der verwendeten Ketolase möglich. Zwar erfolgte eine erhöhte Zeaxanthin-Synthese im Vergleich zum unveränderten Stamm, dennoch enthielten diese Linien weiterhin  $\beta$ -Carotin, auch wenn in verringerter Konzentration. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1 eine erhöhte Funktion aufweist und zudem weniger Regulationen unterliegt. Die mögliche Produktinhibition kann aber auch dieses Gen nur teilweise umgehen. Möglicherweise spielen daher auch die Konzentrationen von  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin gemeinsam eine Rolle bei der Regulation. Daher ist es nur möglich das Verhältnis zwischen diesen zwei Produkten zu verändern. Die Gesamtausbeute kann dagegen nicht gesteigert werden.

#### 9.5 Einflüsse der Expression von zwei Genen in einer Zelllinie

Der eigentliche Fortschritt, den die alternative  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1 brachte, ergab sich erst in Stämmen mit beiden  $\beta$ -Carotin-verändernden Enzymen. Hier konnte auch in *Synechococcus* sp. PCC7002 Astaxanthin als Produkt detektiert werden. Die Hauptprodukte bildeten jedoch Adonirubin und Adonixanthin. Hierbei kam es zu einer Steigerung der Gesamt-Carotinoid-Konzentration um das Dreifache. Ebenfalls konnten die drei auch in nicht veränderten Stämmen vorkommenden Carotinoide  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin in den Analysen nachgewiesen werden. Die Bildung von Zeaxanthin, jedoch nicht von Canthaxanthin, untermauert die Hypothese, dass die verwendete  $\beta$ -Carotin-Ketolase eine sehr geringe Affinität zu Zeaxanthin aufweist. Ist Zeaxanthin erst durch das *CrtR*-Enzym oder durch die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase gebildet, kommt es zu keinen weiteren Veränderungen. Eigentlich müsste die  $\beta$ -Carotin-Ketolase Zeaxanthin als Edukt verwenden und es unter zweifacher Reaktion über

Adonixanthin zu Astaxanthin umsetzen. Diese Reaktion scheint jedoch auszubleiben. Daher ist nach den derzeitigen Ergebnissen davon auszugehen, dass die verwendete Ketolase ihre höchste Affinität zu  $\beta$ -Carotin und Echinenon aufweist und dieses effektiv in Canthaxanthin umsetzt. Die  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase, mit Ursprung in *Alcaligenes* sp. PC-1, hingegen besitzt eine erhöhte Affinität zu den von der Ketolase schon veränderten  $\beta$ -Carotin-Derivaten. Insgesamt bestätigt das Ergebnis dieses Experiments erneut die Vermutung einer auf  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin beruhenden Produktinhibition des Carotinoid-Synthesewegs in *Synechococcus*. Ausgehend von diesen Hypothesen wurde der angenommene Carotinoid-Syntheseweg (siehe Abbildung 1) überarbeitet. In Abbildung 31 ist nun die Produktinhibition durch  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin gezeigt. Sie beeinflussen die Funktion und möglicherweise die Expression der PSY, CrtR und CrtZ. Außerdem sind die Reaktionspfeile in verschiedenen Intensitäten dargestellt; dies soll die Produkaffinität der Enzyme wiedergeben. Je stärker ein Pfeil, umso höher ist dessen Affinität zum davorliegenden Edukt.

Es muss noch weitere Regulationen geben, denn es bleibt immer noch aus, dass Astaxanthin als Hauptprodukt gebildet wird. Im direkten Vergleich bildet das *E. coli*-Testsystem mit den nun verwendeten synthetischen Genen Astaxanthin als Hauptprodukt und zudem als einziges nachweisbares Carotinoid. Die Regulierung in *Synechococcus* sp. PCC7002 könnte weiterhin für das Ausbleiben dieses Zustands verantwortlich sein. Es könnte nun aber auch an der zur Verfügung stehenden Enzym-Konzentration oder dem Verhältnis der zwei synthetischen Enzyme zueinander liegen.

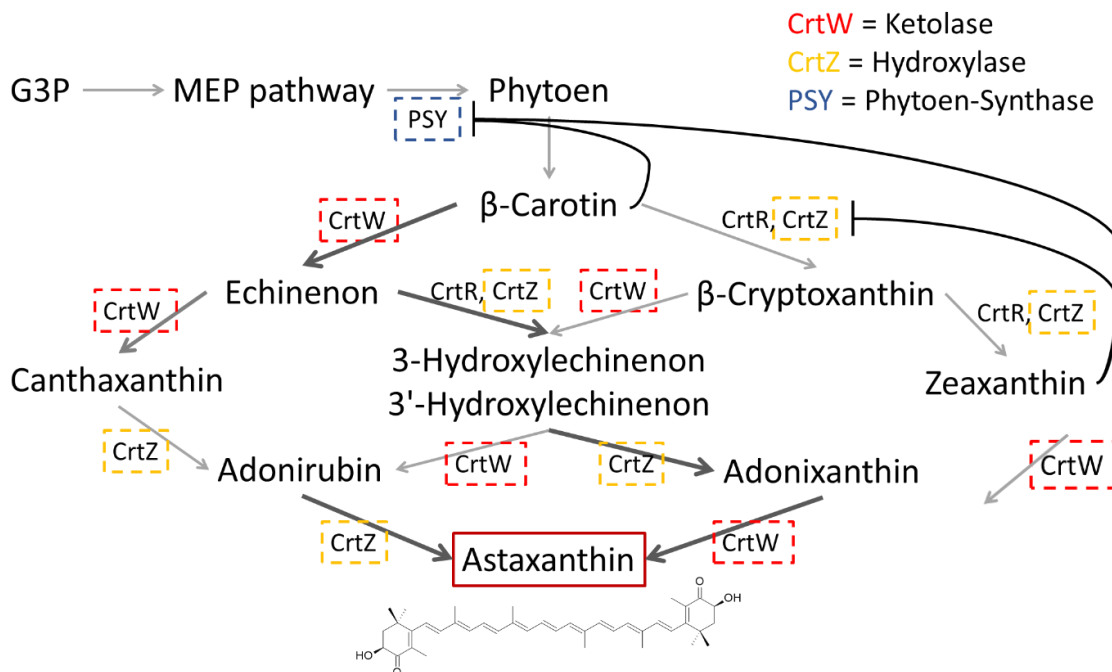


Abbildung 31: Syntheseweg in *Synechococcus* sp. PCC7002 für Astaxanthin. Die Erweiterung von  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin in *Synechococcus* sp. PCC7002. Erfasst sind alle möglichen Intermediate und auf den Pfeilen gestrichelt eingerahmt heterologe oder überexprimierte Enzyme. Über die schwarzen Pfeile mit flachem Kopf sollen mögliche Produktinhibitionen gezeigt werden. Die Intensität der Reaktionspfeile gibt höhere Produkaffinitäten an.

## 9.6 Analyse der Integration von Genen in verschiedene neutrale Integrationsstellen

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mittels qPCR könnten alternativ interpretiert werden und einen Hinweis darauf geben, dass die verwendete neutrale Integrationsstelle für das Einbringen des heterologen Gens einen Einfluss auf dessen Expression besitzt. In der wissenschaftlichen Literatur gibt es dazu verschiedene Meinungen, auch wenn es bisher noch keine Studie gab, die direkt alle neutralen Integrationsstellen auf dieses Leistungsmerkmal untersuchte. Aus diesem Grund kam es zur Studie von Pappert et al. (Pappert et al. 2023). Für die Stellen, welche sich im Genom befinden, kam es zu gleichen Expressionsstärken für GFP. Interessanterweise kam es in Linien mit den verwendeten Enzymen für die Ketolase oder Hydroxylase zu leichten Änderungen in der Carotinoid-Konzentration. In der Regel lag hier eine erhöhte Konzentration des Hauptprodukts Canthaxanthin (Ketolase-Linien) oder Zeaxanthin (Hydroxylase-Linien) für Stämme, die die neutrale Integrationsstelle 2 für das Einbringen der heterologen Gene verwendeten, vor. Dieses Phänomen könnte jedoch auch andere Ursachen haben. Die erhöhte Expression des GFP in Fusion mit anderen Proteinen oder einem His-Tag konnte teilweise bestätigt werden. Durch das Anfügen eines His-Tags an die synthetische  $\beta$ -Carotin-Ketolase oder  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase erfolgte eine Steigerung des gebildeten Carotinoid-Hauptprodukts für den jeweiligen Stamm im Vergleich zu Stämmen ohne angefügte His-Tags. Dies könnte möglicherweise darauf hindeuten, dass für fusionierte Proteine eine geänderte Abbaukinetik vorliegt und diese dadurch länger aktiv in den Zellen vorliegen. Dies würde die Enzym-Konzentration bei gleicher Expression in der Zelle erhöhen. Die wissenschaftliche Literatur ging davon aus, dass die Expression im endogenen Plasmid pAQ1 möglicherweise erhöht ist. Argumentiert wurde hier damit, dass dieses Plasmid in einer 50-fachen Kopienzahl vorliegt, das Genom des Organismus hingegen nur in einer 3- bis 5-fachen Anzahl (Akiyama et al. 1998; Hasunuma et al. 2019). Die durchgeführte Studie konnte die postulierte erhöhte Expression, zumindest für GFP, bestätigen. Eine Anwendung dieser Ergebnisse auf die Carotinoid-Synthese ergab Astaxanthin als Hauptprodukt. Erreicht wurde dies mittels Integration der synthetischen Gene, unter jeweils einem separaten Promotor für jedes Gen in die neutrale Integrationsstelle des endogenen Plasmids pAQ1. Die Konzentrationen der Nebenprodukte  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin waren dagegen verschwindend gering. Die Ergebnisse dienen als eine Bestätigung der Hypothese, dass die Enzymkonzentration der heterologen Enzyme in *Synechococcus* zu gering war, um Astaxanthin als Hauptprodukt zu bilden. Bei zu geringer Expression der Enzyme – so wie es in den im Genom lokalisierten Neutralstellen der Fall ist – kommt es nur zur Synthese von geringen Mengen an Astaxanthin. Dafür kommt es zur Akkumulation der direkten Vorstufen Adonirubin und Adonixanthin. Potenziell könnten die Konzentrationen der Enzyme weiter gesteigert werden, in dem eine Fusion mit His-Tags erfolgt. Dies könnte infolgedessen die Ausbeute an Astaxanthin erhöhen und möglicherweise die Konzentration der Nebenprodukte weiter senken. Schon jetzt konnte zudem ein weiterer Beweis für die postulierte Produktinhibition durch  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin erbracht werden. In diesen Stämmen kam es zu einer Steigerung der Gesamt-Carotinoid-Konzentration um das 4-Fache im Vergleich zur nicht veränderten Kontrolle. Da nun aber die vorliegende Konzentration an  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin geringer ausfiel, ist die Limitierung der Synthese durch andere Parameter bedingt. Der Rückgang der  $\beta$ -Carotin-Konzentration dürfte dafürsprechen, dass es eine Limitation der Bildung dieses durch vorangegangene Syntheseschritte gibt. Eine Begrenzung

---

der Synthese könnte ebenso auf der maximalen Auslastung des Metabolismus des Organismus beruhen. Es konnte aber bisher keine gesteigerte Wachstumsinhibition erfasst werden, die dies belegen könnte. Alle veränderten Stämme zeigen derzeit mit dem Grad der Veränderung die gleiche Inhibition an. Linien mit nur einem heterologen Gen wachsen schneller als die mit zwei heterologen Genen.

## **9.7 Einfluss von Kultivierungsparametern auf die Carotinoid-Ausbeute**

### **9.7.1 Analyse von Einflüssen des Lichts**

Für photoautotrophe Organismen ist Licht ein großer Einfluss. In der wissenschaftlichen Literatur gibt es hierzu für *Synechococcus* sp. PCC7002 viele Untersuchungen rund um dessen Wachstum. Eine optimale Lichtintensität konnte dabei nicht ermittelt werden. Unterschiedliche Studien kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Vor allem die Definition von Hochlicht-Bedingungen ist umstritten (Zhu et al. 2010; Sakamoto und Bryant 2002; Nomura et al. 2006). In einer vorrausgegangenen Arbeit in der Arbeitsgruppe konnte ermittelt werden, dass eine Steigerung der Lichtintensität das Wachstum beschleunigt. Ab einer Lichtintensität von 250  $\mu\text{E}$  bis zu einer Intensität von 400  $\mu\text{E}$  konnten nur noch sehr geringe Verbesserungen erfasst werden. Es gibt Studien, die auch höhere Lichtintensitäten erforschten, hier dann jedoch nur noch auf Leistungsparameter der Photosynthese. Eine für das Wachstum optimale Beleuchtung muss nicht ebenso die perfekte Bedingung für die Bildung von Carotinoiden sein. Diese Pigmente dienen dem Schutz vor Licht, vor allem vor Stress durch zu viel Licht. Daraus könnte sich ergeben, dass die höchste Carotinoid-Konzentration durch Lichtintensitäten erzielt wird, die nicht denen für das optimale Wachstum entsprechen; sondern durch Intensitäten, die Stress für den Organismus bedeuten. Die darauf basierende Annahme musste infolge der erhaltenen Ergebnisse verworfen werden. Kurzzeitig ergaben Lichtintensitäten, die potenziell Stress für den Organismus bedeuten, keine Veränderungen der Netto-Carotinoid-Ausbeute. Die so behandelten Kulturen starben aber bereits nach 10 Tagen ab.

### **9.7.2 Analyse des Parameters pH-Stress**

Im Verlauf von Experimenten zur Untersuchung des Wachstums kam es zur Detektion von pH-Wertänderungen im Medium. Das verwendete A<sup>+</sup>-Medium war gepuffert auf einen pH-Wert von 8,2. Durch die Begasung mit CO<sub>2</sub> fiel der Wert auf pH 7 ab, der Organismus benötigt jedoch nach der wissenschaftlichen Literatur einen pH-Wertbereich zwischen 8 und 9,5. Infolge der Kultivierung stieg der pH-Wert auf 9 an und es konnte ein maximaler pH-Wert von 11 für eine 14 Tage alte Kultur gemessen werden. Dieser Anstieg muss durch einen Prozess der Zelle von *Synechococcus* sp. PCC7002 ausgelöst worden sein. Durch die gleiche Annahme wie bei den Lichtversuchen – Carotinoide sind Schutzpigmente und Ihre Synthese erfolgt zum Schutz vor Stress – kam es zur Durchführung von Versuchen zum sauren pH-Stress. Auf die Produktion von Carotinoiden hatte dies jedoch keinen Einfluss. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass der Organismus das Medium an sein pH-Optimum angleicht. Sobald dieser nicht mehr in der Lage ist dies zu erreichen, beginnt er

abzusterben. Mittels dieser Ergebnisse ist zwar die Annahme aus der wissenschaftlichen Literatur erneut zu bestätigen, für die untersuchte Regulation der Carotinoid-Synthese aber unerheblich.

### 9.8 Auswirkungen durch die Überexpression der Phytoen-Synthase

Nur die richtige Kombination der Gene aus den unterschiedlichen Arten erzielte eine fast vollständige Umsetzung aller Vorstufen zu Astaxanthin. Bei anderen Kombinationen kommt es zur Anreicherung von Vorstufen des Astaxanthins. Zudem ist die neutrale Integrationsstelle entscheidend, um eine hohe Expression zu gewährleisten. Dies ist zur Vermeidung der Akkumulation von Vorstufen essenziell. Dabei zeigte sich, dass es scheinbar einen bevorzugten Syntheseweg gibt. Denn bei der Anreicherung der Astaxanthin-Vorstufen wurden immer die Zwischenprodukte angereichert, die durch die Reaktion von  $\beta$ -Carotin mit der Ketolase gebildet werden. Es wurde eine höhere Konzentration an Canthaxanthin als Zeaxanthin gefunden, sowie eine höhere Konzentration an Echinenon im Vergleich zu  $\beta$ -Cryptoxanthin. Dies galt auch in Stämmen mit nur einem der heterologen Gene. Die höhere Konzentration an Adonirubin im Vergleich zu Adonixanthin kann mit einer höheren Affinität der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase für Echinenon und 3-Hydroxylechinenon erklärt werden. Die  $\beta$ -Carotin-Ketolase muss hier eine geringe Affinität für diese Intermediate aufweisen. Aus diesen Hypothesen folgt, dass der optimale Syntheseweg ausgehend vom  $\beta$ -Carotin durch die Ketolase zu Echinenon und dann mittels der Hydroxylase zu 3-Hydroxylechinenon und anschließend zu Adonixanthin verläuft. Astaxanthin wird dann aus Adonixanthin mittels der Ketolase gebildet. Der auf Grundlage dieser Behauptung entstehende Syntheseweg für Astaxanthin in *Synechococcus* sp. PCC7002 ist in Abbildung 32 demonstriert.

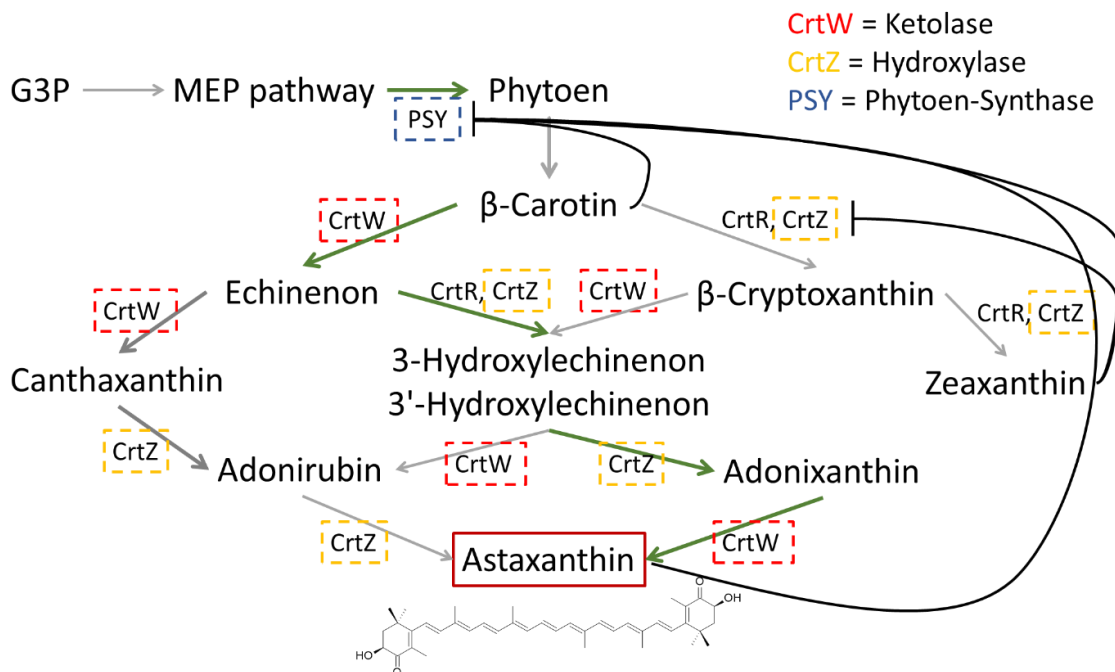


Abbildung 32: Aus den Ergebnissen abgeleiteter Syntheseweg für Astaxanthin. Die Katalyse von Zeaxanthin zu Adonixanthin durch CrtW scheint nicht stattzufinden, daher ist diese Reaktion hier nicht aufgeführt. Die schwarzen Pfeile mit flachem Kopf geben mögliche



---

Produktinhibitionen an und die Intensität der Reaktionspfeile gibt die Produkaffinität der Enzyme wieder. Mittels grüner Pfeile ist der in *Synechococcus* sp. PCC7002 bevorzugte Syntheseweg gezeigt.

Die Synthese verläuft entlang der grünen Pfeile und daraus geht auch der nun limitierende Schritt hervor. Die Reaktion von Phytoen zu  $\beta$ -Carotin, ausgehend vom MEP-Syntheseweg, ist der einzige Schritt, der noch nicht verändert wurde. Die Reaktion von Phytoen zu  $\beta$ -Carotin, ausgehend vom MEP-Syntheseweg, ist der einzige Schritt, der noch nicht verändert wurde. Bei der stammeigenen  $\beta$ -Carotin-Synthese könnte es folglich noch Optimierungsbedarf geben. Denn in Stämmen mit optimierter Astaxanthin-Synthese konnten nur noch geringe Konzentrationen an  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin detektiert werden. Entweder dieses Limit entsteht durch einen Engpass der  $\beta$ -Carotin-Synthese oder infolge einer Überbelastung des Metabolismus. Durch die Überexpression der Phytoen-Synthase konnte einer der limitierenden Schritte entfernt werden. Hierdurch kam es zu einer Steigerung der Konzentration an  $\beta$ -Carotin sowie der Astaxanthin-Konzentration in Astaxanthin-bildenden Stämmen. Im Detail ermöglichte eine Überexpression der Phytoen-Synthase in Stämmen, die sonst keine Veränderung erfahren hatten, eine Erhöhung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration. Es ergaben sich hierbei Unterschiede für die verwendeten neutralen Integrationsstellen. Für die NSII konnte eine Steigerung um das 5-Fache und für die NSI um das 3-Fache gemessen werden. Möglicherweise ist dies doch auf eine unterschiedlich starke Expression, ausgelöst durch die NS, zurückzuführen, die mittels der GFP-Expression nicht ermittelt werden konnte. In Stämmen, die Astaxanthin bilden, ermöglichte die Überexpression der Phytoen-Synthase eine Steigerung des Astaxanthin-Gehaltes um 29 %. Zusätzlich steigerte dies den Gehalt an Zeaxanthin und interessanterweise auch den von Phytoen. Aus diesen Ergebnissen gehen mehrere Rückschlüsse hervor. Als erstes gelang die Bestätigung der Behauptung, dass die Synthese von Phytoen ein limitierender Schritt in der Synthese von  $\beta$ -Carotin ist. Die Limitierung der Astaxanthin-Synthese wurde ebenfalls durch diesen Schritt hervorgerufen, was bedeutet, dass sich der Organismus noch nicht an der Belastungsgrenze befindet. Zudem ist dies ein weiterer Beweis dafür, dass Astaxanthin die Produktinhibition der Carotinoid-Synthese nicht oder potenziell später auslöst. Die erhöhten Konzentrationen an Zeaxanthin und Phytoen dürften durch zu geringe Level an Enzymen für deren Umsetzung entstehen. Vor allem das erstmalige Auftauchen einer messbaren Konzentration an Phytoen spricht für die Verschiebung des limitierenden Schrittes. War zuvor der Carotinoid-Syntheseweg bis zur Bildung von  $\beta$ -Carotin in *Synechococcus* sp. PCC7002 optimal geregelt, änderte dies die Überexpression der Phytoen-Synthase. Es bildete sich ein neuer limitierender Schritt: die Umwandlung von Phytoen in  $\beta$ -Carotin durch unter anderem die Phytoen-Desaturase und Lycopin- $\beta$ -Cyclase. Infolge reichert sich das Edukt an, da die Überexpression für eine höhere Umsetzung des Geranylgeranylpyrophosphat zu Phytoen sorgt. Dieses kann dann aber nur noch teilweise durch die Phytoen-Desaturase und Lycopin- $\beta$ -Cyclase in  $\beta$ -Carotin umgewandelt werden. Dieser Effekt tritt nur in Astaxanthin-bildenden Stämmen auf, da andernfalls die Produkte Zeaxanthin und  $\beta$ -Carotin eine Regulation auslösen. Diese führt zu einer Begrenzung der gebildeten Carotinoide. Auch die Phytoen-Synthase muss dieser Regulation unterliegen, da es ferner in unveränderten Stämmen oder in Linien mit überexprimierter Phytoen-Synthase zur Akkumulation von Phytoen kommen müsste. Möglicherweise könnte dieser neue limitierende Schritt durch die

---

Überexpression der stammeigenen Enzyme für die Umsetzung von Phytoen in  $\beta$ -Carotin (Phytoen-Desaturase,  $\zeta$ -Carotin-Isomerase,  $\zeta$ -Carotin-Desaturase, Cis-Trans-Isomerase und Lycopin- $\beta$ -Cyclase) ebenso einfach aufgelöst werden, wie es schon die Überexpression der Phytoen-Synthase für die Synthese des Phytoen darstellte (Zhou et al. 2022; Zhao et al. 2020).

### 9.9 Einflüsse der relativen Integrationszahl auf die Carotinoid-Ausbeute

Die relative Integrationszahl (rI-Zahl) gibt an, wie viele der Genomkopien oder Kopien des endogenen Plasmids im Zuge der Transformation verändert wurden. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Astaxanthin-Ausbeute in Zusammenhang mit der rI-Zahl steht. Eine Erhöhung dieser führt zu einer gesteigerten Anzahl an Genkopien der heterologen Enzyme und infolgedessen erhöht sich die Astaxanthin-Ausbeute. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Anzahl der Genkopien einen direkten Einfluss auf die Expressionslevel der jeweiligen Gene hat. Trifft diese Behauptung zu, muss von einer dauerhaften Transkription des gesamten Genoms und der endogenen Plasmide ausgegangen werden. Durch eine erweiterte Selektion gelang es, homozygote Stämme in Bezug auf die synthetischen Expressionskassetten zu erhalten. Dadurch steigerte sich der Astaxanthin-Gehalt um bis zu 78 %. Ist die Ausbeute von mehreren neu eingebrachten Genen abhängig, steigt auch der Einfluss der rI-Zahl an. In Linien, die in Folge der synthetischen  $\beta$ -Carotin-Ketolase und -Hydroxylase Astaxanthin produzieren, stieg die Ausbeute nur um 52 %. Der Anstieg betrug 78 % bei Stämmen mit zusätzlich überexprimierter Phytoen-Synthase. Der größere Anstieg könnte auch bedeuten, dass der Syntheseschritt, der durch die Phytoen-Synthase katalysiert wird, einen größeren Einfluss auf die Limitierung der Carotinoid-Synthese hat. Durch die erhöhte Expression infolge der gesteigerten rI-Zahl erlischt diese Begrenzung. Aus den Ergebnissen ergibt sich, dass die Limitierung der Carotinoid-Synthese in den Zellen durch die Konzentration der benötigten Enzyme beeinflusst wird. Denn jede Steigerung der Expression der zugrundeliegenden Gene, potenziell gleich zu setzen mit einer Erhöhung der Konzentration der Enzyme, führte zu einer Steigerung der Carotinoid-Ausbeute.

### 9.10 Auswirkungen eines ABC-Transporters auf den Organismus

Der größte Durchbruch gelang durch den erstmaligen Beweis, dass ein ABC-Transporter in *Synechococcus* sp. PCC7002 dafür genutzt werden kann, das produzierte Astaxanthin aus den Zellen abzugeben. Generell ist dies die erste erfolgreiche Nutzung eines solchen Transporters in Cyanobakterien und generell in photosynthetisch aktiven Mikroorganismen. Jedoch hat dieser Erfolg auch klare Grenzen. Erste Versuche, den verwendeten MsbA1-Transporter (EcoMSBA1) im Organismus zu exprimieren, führten zu letalen Linien. Die Zellen starben spätestens in der zweiten Selektionsphase ab und auch schon auf der initialen Transformationsplatte konnten weniger Kolonien pro Ansatz verzeichnet werden. Die Expression des *msba1*-Gens scheint letal für *Synechococcus* sp. PCC7002 zu sein, zumindest unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven *cpc560*-Promotors. Auch als Fusionskonstrukt mit den Genen *crtw* und/oder *crtz* trat dieses Phänomen auf. Ausgehend hiervon sollten induzierbare Promotoren die Expression des Gens regulieren und potenziell unterhalb der letalen Konzentration des gebildeten Porenproteins halten. Stämme, die

---

das *msba1*-Gen unter der Kontrolle eines Theophyllin-induzierbaren Promotors enthielten, waren auch nach der Selektion stabil und es gelang eine Anzucht. Das Wachstum war im direkten Vergleich mit dem unveränderten Stamm jedoch verringert (-4 %). Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass dieses Gen für den Organismus letal ist oder zumindest das Wachstum inhibiert. Durch das Induzieren des Promotors verringerte sich das Wachstum erneut im Vergleich zum nicht veränderten Stamm, der ebenfalls mit Theophyllin versetzt wurde und dient ebenfalls als Beweis der Letalität des Gens. Für sowohl Kulturen mit als auch ohne aktivierten Promotor blieb die Detektion einer Funktion zur Nutzung des Transporter-Gens für den Carotinoid-Export aus.

Einzelne Kolonien gab es auch nach der Transformation mit dem *cpc560*-Promotor, eine Anzucht dieser nach der Selektion gelang aber nicht. Schon in der Selektionsphase starben die Kulturen ab. Das Entstehen initialer Kolonien und die Ergebnisse des Versuches zur Steigerung der relativen Integrationszahl umreißen eine denkbare Erklärung. Die Ergebnisse rund um den Einsatz des induzierbaren Promotors in Verknüpfung mit dem *MsbA1*-Transporter gestatten die Hypothese, dass eine geringe Expression des *msba1*-Gens zu stabilen, wenn auch wachstums-inhibierten Linien führt. Unter Zuhilfenahme des schwächeren, konstitutiv aktiven *psbA1*-Promotors in Verbindung mit dem *msba1*-Gen gelang es, stabile Stämme zu erzeugen (Li et al. 2018). Da viele der Linien während der Selektion abstarben und das Wachstum mit voranschreitender Selektionsintensität abnahm, kann daraus eine Schlussfolgerung gezogen werden. Bei stärkerer Expression des Gens, infolge der erhöhten Genkopien-Zahl durch die Veränderung weiterer Genomkopien, sinkt das Wachstum. Für alle Stämme mit dem *msba1*-Gen unter der Kontrolle des *psbA1*-Promotors gelang ein Nachweis des Carotinoid-Exports. Dies bedeutet, dass ein Gleichgewicht zwischen Expressionsmaximum für einen hohen Export und minimaler Wachstumsinhibition erreicht werden muss. In Stämmen mit normaler Selektion kam es zu einer Reduktion des Wachstums um  $14 \pm 1,8$  %. Dem entgegen steht ein Export von Astaxanthin, der mit zunehmender Kultivierungszeit anstieg.

Die Verwendung eines Dodecan-Überstandes zur Detektion der exportierten Carotinoide ermöglichte es, den Export über feste Zeiträume der Kultivierung zu beobachten. Die Überschichtung direkt während des Animpfens einer Kultur hinzuzufügen verringerte das Wachstum dieser Kultur. Zudem konnten in den ersten drei Tagen keine Carotinoide nachgewiesen werden. Eine Überschichtung der Kulturen nach drei Tagen führte im nachfolgenden Verlauf zu keiner Wachstumsverringering. Wie zu erwarten, stieg die Carotinoid-Ausbeute mit steigender Kulturdichte. Nach acht Tagen konnten Astaxanthin-Konzentrationen von  $0,22 \mu\text{g}/\text{mL}$  Kultur und nach 14 Tagen von  $0,45 \mu\text{g}/\text{mL}$  Kultur alle fünf Tage erhalten werden. Astaxanthin-bildende Stämme ohne zusätzliches Gen für den Transporter zeigten dagegen immer die gleiche Konzentration von  $0,022 \mu\text{g}/\text{mL}$  Kultur im Überstand. Dieses Ergebnis beweist, dass die im Überstand nachweisbaren Carotinoide durch die Arbeit des ABC-Transporters dort gefunden werden können. Untermauert wird die Behauptung dadurch, dass die Zellen der Linien mit und ohne Transportergen die gleiche interne Carotinoid-Konzentration aufweisen.

Ein weiterer Schluss kann aus diesem Ergebnis gezogen werden: Der gleiche intrazelluläre Carotinoid-Spiegel zeigt eine produktinhibierte Synthese an. Denn in Stämmen mit ABC-Transporter kam es zu einer gesteigerten Carotinoid-Synthese. Neben den exportierten Carotinoiden erfolgte zudem die Synthese der gleichen intrazellulären Konzentration, was insgesamt eine

---

Steigerung der Carotinoid-Produktion innerhalb des Stammes bedeutet. Dieser Nachweis der Produktinhibition der Carotinoid-Synthese, auch durch Astaxanthin, stellt neue Ansätze zur Steigerung der Synthese in Aussicht. Die Erforschung der Limitierung könnte eine Möglichkeit sein, die Ausbeute durch die Beseitigung der Produktinhibition zu erhöhen. Zum jetzigen Zeitpunkt gestattet die Verwendung des ABC-Transporters in *Synechococcus* sp. PCC7002 eine kontinuierliche Astaxanthin-Produktion. Das verringerte Wachstum spielt hierdurch nur noch eine untergeordnete Rolle, da nicht direkt die Biomasse für die Produktion benötigt wird.

Zusätzlich sollte ein weiterer Punkt beachtet werden: Bei den im Überstand nachgewiesenen Carotinoiden handelt es sich überwiegend um Astaxanthin. Geringe Mengen an Zeaxanthin konnten ebenfalls gefunden werden. Im direkten Vergleich mit den intrazellulär gebildeten Carotinoiden ergibt sich eine Veränderung des Verhältnisses zwischen Astaxanthin und Zeaxanthin. Es scheint zu einem höheren Export von Astaxanthin im Gegensatz zu Zeaxanthin, vermittelt durch den ABC-Transporter, zu kommen. Da es ferner zu keiner Detektion von  $\beta$ -Carotin im Überstand kam, könnte dies an der zu geringen Produktionsmenge dessen liegen oder der ABC-Transporter bevorzugt Astaxanthin. Für letzteres spricht, dass aus der wissenschaftlichen Literatur bekannt ist, dass der Transport hydrophober Stoffe durch den MsbA1-Transporter verringert ist (Doshi et al. 2013).

Im Überblick gelang es in dieser Arbeit, grundlegende Regulationen des Carotinoid-Synthesewegs, vor allem der synthetischen Erweiterung zum Astaxanthin, in *Synechococcus* sp. PCC7002 aufzuklären. Auch konnten nötige Feinabstimmungen innerhalb der Expression von den synthetischen Genen ermittelt werden. In Folge der erstmaligen erfolgreichen Nutzung eines ABC-Transporters für den Export von Astaxanthin in *Synechococcus* und generell photosynthetisch aktiven Mikroorganismen ergibt sich ein gänzlich neuer Produktionsansatz. Mittels dieses Exports und der anschließenden Akkumulation der Carotinoide in einem Lösemittelüberstand ist eine Produktion ohne den kostenintensiven Schritt der Algenernte möglich. Zudem vereinfacht dies die Aufreinigung des Produktes erheblich. Es ist infolgedessen sogar eine energieneutrale oder zumindest energieeffizientere Produktion möglich, die darüber hinaus noch möglicherweise kontinuierlich stattfinden kann. Denn durch den Entfall der Ernte und der Steigerung der Ausbeute mit zunehmender Zelldichte/Alter der Kultur muss diese nur mit Nährstoffen versorgt werden, um eine dauerhafte Produktion über mehrere Monate in der Theorie zu gewährleisten.

Es konnten verschiedene Erfolge in dieser Arbeit erzielt werden. Mittels genetischer Manipulation gelang es, die Carotinoid-Synthese in *Synechococcus* sp. PCC7002 so zu verändern, dass es zur Astaxanthin-Produktion kommt. Im Zuge dieser Experimente konnten verschiedene Regulationen des Synthesewegs aufgeklärt werden. Der veränderte Metabolismus ist noch nicht perfekt optimiert und es bedürfte weiterer Forschung, alle Regulierungen aufzuklären. Erst dann könnte der Syntheseweg zur Gänze optimiert werden. Erste Ansatzpunkte sind, die der Produktinhibition zugrundeliegenden Prozesse zu identifizieren oder derzeit nicht optimierte Syntheseschritte zu verbessern. Für diesen Zweck käme die Umwandlung von Phytoen zu  $\beta$ -Carotin durch die zwei Hauptenzyme Phytoen-Desaturase und Lycopin- $\beta$ -Cyclase in Frage (Zhao et al. 2020; Gong und Bassi 2016). Denn durch die Optimierung der Synthese von Phytoen mittels überexprimierter Phytoen-Synthase akkumulierten sich daraufhin gewisse Mengen an Phytoen, die nicht zu  $\beta$ -Carotin umgesetzt werden konnten. Zur Gewährleistung eines besseren Produktabflusses könnte, über die gleiche Strategie, eine Verbesserung der Bildung von  $\beta$ -Carotin erfolgen.

Der Teil der Synthese, der durch die synthetischen Enzyme ermöglicht wurde, birgt aber ebenso noch Potenzial. Derzeit ergab jede Steigerung der Enzymkonzentration eine direkte Erhöhung der erhaltenen Astaxanthin-Ausbeute. Ausgehend davon und mit den Kenntnissen über den Einfluss der rI-Zahl, sind Experimente, in denen die Genkopien-Zahl erhöht wird, vielversprechend. Eine vervielfachte Anzahl der Genkopien dürfte die daraus resultierende Enzymkonzentration in den Zellen weiter steigern. Infolgedessen könnte es zu einer schnelleren Umsetzung der gebildeten Vorstufen von Astaxanthin kommen. In Kombination mit der verbesserten Bildung von  $\beta$ -Carotin sollte so die Konzentration an Astaxanthin gesteigert werden dürfen.

Eine Synthese, die einer solchen Optimierung unterzogen wurde, hat dann aber das Problem der Produktinhibition. Die Verwendung des ABC-Transporters ermöglicht die Beseitigung dieses Problems, zumindest bis zu gewissen Funktionsgrenzen. Denn das Gen des verwendeten Transporters kann letal für die Zellen sein, wenn die Expression zu hoch ist.

Abseits der Optimierung durch genetische Modifikationen ergeben sich viele Forschungsfelder. In *Synechococcus* ist der Einfluss von Licht und dessen Spektrum nur sehr gering erforscht. Eine optimierte Bestrahlung der Kulturen, abgestimmt auf die jeweiligen Produktionsabschnitte, könnte die Ausbeuten weiter verbessern. Lichtfarben, aber auch -taktung und -intensitäten spielen hierbei eine Rolle. Da Carotinoide in der Regel zum Schutz vor Licht oder anderen Stresseinflüssen dienen, ist eine optimale Produktion wahrscheinlich nicht mit den Bedingungen für ein optimales Wachstum identisch. Daher gilt es, eine Beleuchtungsstrategie zu entwickeln, die sich an den Bedürfnissen des jeweiligen Schrittes orientiert.

Die Ausbeute an Astaxanthin konnte mit steigender optischer Dichte der Kulturen gesteigert werden. In Flüssigkulturen ist es möglich, OD<sub>730nm</sub>-Werte von über 50 zu erreichen. In den Experimenten dieser Arbeit wurden Kulturen mit einer OD<sub>703nm</sub> von 7 bzw. 14 verwendet und dies hatte eine Verdopplung der Ausbeute zur Folge. Wenn dieser lineare Zusammenhang weiter besteht, könnte, durch die Anzucht auf höhere OD-Werte, die Ausbeute drastisch gesteigert werden.

Eine mögliche Einbettung der Zellen in Alginatkugeln ermöglicht es darüber hinaus, das Kulturmedium zu wechseln und den Zellen neue Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. Dies ermöglicht eine vereinfachte kontinuierliche Produktion. In unveröffentlichten Daten konnte gezeigt werden, dass die Einbettung das Wachstum beschleunigt und der Transfer von den Zellen in frisches Nährmedium vereinfacht wird. In diesen Kugeln ist es möglich, OD<sub>730nm</sub>-Werten von über 90 zu erreichen. Da die Zellen aber durch die Einbettung vor Stress, vor allem mechanischem Stress, geschützt sind, ist der Einfluss auf die Carotinoid-Synthese ungeklärt.

Bei all diesen Überlegungen ist die Wahl des Kultivierungssystems noch nicht beachtet. Dies würde ein gänzlich eigenes Forschungsfeld sein, in dem interdisziplinär gearbeitet werden müsste. Es birgt aber das größte Potenzial in Hinblick auf „upscaling“ und die Nutzung des erarbeiteten Stamms in Form eines neuartigen Produktionssystems.

Im Laufe der Arbeit zeigte sich, dass die erzeugten Stämme unterschiedliche Farbtöne aufwiesen. Die Färbung der Kulturen variierte mit dem Carotinoid-Gehalt. Stämme, die viel Astaxanthin produzierten, waren dunkelbräunlich verfärbt (siehe Abbildung 33 C). Für Kulturen mit niedriger bis mittlerer Astaxanthin-Konzentration konnten dunkelgrüne Verfärbungen festgestellt werden (siehe Abbildung 33B). Dagegen wiesen Canthaxanthin-haltige Stämme eine hellbräunliche Färbung auf und erhöhte  $\beta$ -Carotin- sowie Zeaxanthin-Konzentrationen verfärbten die Kulturen scheinbar nicht, im Vergleich zum unveränderten Stamm (siehe Abbildung 33 A). Diese Änderungen in der Färbung könnten dazu genutzt werden, ein nicht invasives Detektionssystem zu entwickeln. Als Messansatz könnte die Änderung der Reflektion genutzt werden, um die Carotinoid-Zusammensetzung und den Gehalt einzelner Carotinoide von Kulturen zu bestimmen. Als Grundlage dieser Idee dient hierbei die Arbeit von Vinh et al (Vinh et al. 2021) In dieser gelang mittels einer solchen Messung schon die Bestimmung der Gesamt-Carotinoid-Konzentration in *Microchloropsis salina*. Die Erweiterung dieses Modells dürfte durch die große Variation an erzeugten Stämmen in dieser Arbeit nun möglich sein. Die Bestimmung einzelner Carotinoide könnte in Produktionsanlagen zur Bestimmung des Erntezeitpunktes oder zur Steuerung der Kultivierungsbedingungen genutzt werden.

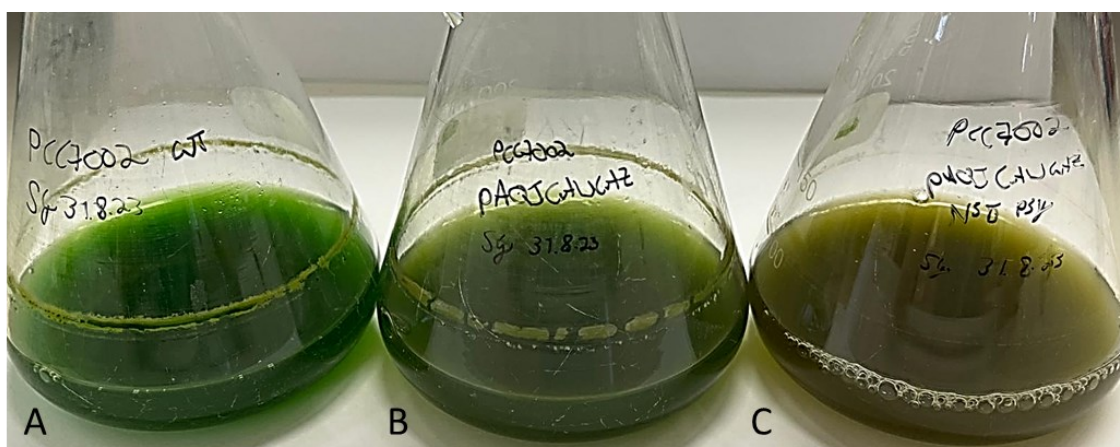


Abbildung 33: Flüssigkulturen von verschiedenen *Synechococcus* sp. PCC7002 Stämmen. A) unveränderter Stamm mit grüner Färbung. B) Stamm mit mittleren Astaxanthin-Konzentrationen mit grüngelblicher Färbung. C) Stamm A PSY mit hoher Astaxanthin-Konzentration mit bräunlicher Färbung

---

## 11 Literaturverzeichnis

---

- Ación, F. G.; Fernández, J. M.; Magán, J. J.; Molina, E. (2012): Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. In: *Biotechnology advances* 30 (6), S. 1344–1353. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.02.005.
- Aikawa, Shimpei; Nishida, Atsumi; Ho, Shih-Hsin; Chang, Jo-Shu; Hasunuma, Tomohisa; Kondo, Akihiko (2014): Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 from an oceanic environment. In: *Biotechnology for biofuels* 7, S. 88. DOI: 10.1186/1754-6834-7-88.
- Akiyama, H.; Kanai, S.; Hirano, M.; Miyasaka, H. (1998): Nucleotide sequence of plasmid pAQ1 of marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002. In: *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 5 (2), S. 127–129. DOI: 10.1093/dnares/5.2.127.
- Amendola, Sofia; Kneip, Jacob S.; Meyer, Florian; Perozeni, Federico; Cazzaniga, Stefano; Lauersen, Kyle J. et al. (2023): Metabolic Engineering for Efficient Ketocarotenoid Accumulation in the Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *ACS synthetic biology* 12 (3), S. 820–831. DOI: 10.1021/acssynbio.2c00616.
- Aneesh, P. A.; Ajeeshkumar, K. K.; Lekshmi, R.G.Kumar; Anandan, R.; Ravishankar, C. N.; Mathew, Suseela (2022): Bioactivities of astaxanthin from natural sources, augmenting its biomedical potential: A review. In: *Trends in Food Science & Technology* 125, S. 81–90. DOI: 10.1016/j.tifs.2022.05.004.
- Badger, Murray R.; Price, G. Dean; Long, Ben M.; Woodger, Fiona J. (2006): The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO<sub>2</sub> concentrating mechanism. In: *Journal of experimental botany* 57 (2), S. 249–265. DOI: 10.1093/jxb/eri286.
- Baran, Marzena Teresa; Miziak, Paulina; Bonio, Katarzyna (2020): Characteristics of carotenoids and their use in the cosmetics industry. In: *J Educ Health Sport* 10 (7), S. 192–196. DOI: 10.12775/JEHS.2020.10.07.020.
- Bauer, Andreas; Minceva, Mirjana (2021): Examination of Photo-, Mixo-, and Heterotrophic Cultivation Conditions on *Haematococcus pluvialis* Cyst Cell Germination. In: *Applied Sciences* 11 (16), S. 7201. DOI: 10.3390/app11167201.
- Bonifer, Christian; Glaubitz, Clemens (2021): MsbA: an ABC transporter paradigm. In: *Biochemical Society transactions* 49 (6), S. 2917–2927. DOI: 10.1042/BST20211030.
- Carroll, Austin L.; Case, Anna E.; Zhang, Angela; Atsumi, Shota (2018): Metabolic engineering tools in model cyanobacteria. In: *Metabolic engineering* 50, S. 47–56. DOI: 10.1016/j.ymben.2018.03.014.
- Chenebault, Célia; Blanc-Garin, Victoire; Vincent, Marine; Diaz-Santos, Encarnación; Goudet, Amélie; Cassier-Chauvat, Corinne; Chauvat, Franck (2023): Exploring the Potential of the Model Cyanobacteria *Synechococcus* PCC 7002 and PCC 7942 for the Photoproduction of High-Value Terpenes: A Comparison with *Synechocystis* PCC 6803. In: *Biomolecules* 13 (3). DOI: 10.3390/biom13030504.
- Dasan, Yaleeni Kanna; Lam, Man Kee; Yusup, Suzana; Lim, Jun Wei; Lee, Keat Teong (2019): Life cycle evaluation of microalgae biofuels production: Effect of cultivation system on energy, carbon emission and cost balance analysis. In: *The Science of the total environment* 688, S. 112–128. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.181.
- Davies, Fiona K.; Work, Victoria H.; Beliaev, Alexander S.; Posewitz, Matthew C. (2014): Engineering Limonene and Bisabolene Production in Wild Type and a Glycogen-Deficient Mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2, S. 21. DOI: 10.3389/fbioe.2014.00021.

- Deng, Yin-Yin; Wang, Qi; Cao, Tian-Jun; Zheng, Hui; Ge, Zi-Han; Yang, Li-En; Lu, Shan (2020): Cloning and functional characterization of the bona fide geranylgeranyl diphosphate synthase from the red algal seaweed *Bangia fuscopurpurea*. In: *Algal Research* 48, S. 101935. DOI: 10.1016/j.algal.2020.101935.
- Doshi, Rupak; Nguyen, Tuan; Chang, Geoffrey (2013): Transporter-mediated biofuel secretion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (19), S. 7642–7647. DOI: 10.1073/pnas.1301358110.
- Golden, Susan S.; Ishiura, Masahiro; Johnson, Carl Hirschie; Kondo, Takao (1997): CYANOBACTERIAL CIRCADIAN RHYTHMS. In: *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 48, S. 327–354. DOI: 10.1146/annurev.arplant.48.1.327.
- Gong, Mengyue; Bassi, Amarjeet (2016): Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. In: *Biotechnology advances* 34 (8), S. 1396–1412. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.10.005.
- GREEN, MICHAEL R. (2012): MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL. 4TH ED. WOODBURY: COLD SPRING HARBOR LAB.
- Gurreri, Luigi; Calanni Rindina, Mirko; Luciano, Antonella; Lima, Serena; Scargiali, Francesca; Fino, Debora; Mancini, Giuseppe (2023): Environmental sustainability of microalgae-based production systems: Roadmap and challenges towards the industrial implementation. In: *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 35, S. 101191. DOI: 10.1016/j.scp.2023.101191.
- Hasunuma, Tomohisa; Takaki, Ayako; Matsuda, Mami; Kato, Yuichi; Vavricka, Christopher J.; Kondo, Akihiko (2019): Single-Stage Astaxanthin Production Enhances the Nonmevalonate Pathway and Photosynthetic Central Metabolism in *Synechococcus* sp. PCC 7002. In: *ACS synthetic biology* 8 (12), S. 2701–2709. DOI: 10.1021/acssynbio.9b00280.
- Heimann, Kirsten; Huerlimann, Roger (2015): Microalgal Classification. In: *Handbook of Marine Microalgae*: Elsevier, S. 25–41.
- Krzemińska, Izabela; Pawlik-Skowrońska, Barbara; Trzcińska, Magdalena; Tys, Jerzy (2014): Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. In: *Bioprocess and biosystems engineering* 37 (4), S. 735–741. DOI: 10.1007/s00449-013-1044-x.
- Kumar, Manish; Sun, Yuqing; Rathour, Rashmi; Pandey, Ashok; Thakur, Indu Shekhar; Tsang, Daniel C. W. (2020): Algae as potential feedstock for the production of biofuels and value-added products: Opportunities and challenges. In: *The Science of the total environment* 716, S. 137116. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137116.
- Li, Shubin; Sun, Tao; Xu, Chunxiao; Chen, Lei; Zhang, Weiwen (2018): Development and optimization of genetic toolboxes for a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. In: *Metabolic engineering* 48, S. 163–174. DOI: 10.1016/j.ymben.2018.06.002.
- Li, Xin; Wang, Xiaoqian; Duan, Chuanlan; Yi, Shasha; Gao, Zhengquan; Xiao, Chaowen et al. (2020): Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. In: *Biotechnology advances* 43, S. 107602. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107602.
- Liu, John D.; Goodspeed, Danielle; Sheng, Zhengji; Li, Baohua; Yang, Yiran; Kliebenstein, Daniel J.; Braam, Janet (2015): Keeping the rhythm: light/dark cycles during postharvest storage preserve the tissue integrity and nutritional content of leafy plants. In: *BMC plant biology* 15, S. 92. DOI: 10.1186/s12870-015-0474-9.



- 
- Liu, Xufeng; Xie, Hao; Roussou, Stamatina; Lindblad, Peter (2022): Current advances in engineering cyanobacteria and their applications for photosynthetic butanol production. In: *Current opinion in biotechnology* 73, S. 143–150. DOI: 10.1016/j.copbio.2021.07.014.
- Liu, Yaming; Cui, Yulin; Chen, Jun; Qin, Song; Chen, Gao (2019): Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. PCC6803 to produce astaxanthin. In: *Algal Research* 44, S. 101679. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101679.
- Maity, Sudatta; Mallick, Nirupama (2022): Trends and advances in sustainable bioethanol production by marine microalgae: A critical review. In: *Journal of Cleaner Production* 345, S. 131153. DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.131153.
- Markley, Andrew L.; Begemann, Matthew B.; Clarke, Ryan E.; Gordon, Gina C.; Pflieger, Brian F. (2015): Synthetic biology toolbox for controlling gene expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. In: *ACS synthetic biology* 4 (5), S. 595–603. DOI: 10.1021/sb500260k.
- Medeiros, Diego Lima; Sales, Emerson A.; Kiperstok, Asher (2015): Energy production from microalgae biomass: carbon footprint and energy balance. In: *Journal of Cleaner Production* 96, S. 493–500. DOI: 10.1016/j.jclepro.2014.07.038.
- Meridian Bioscience Inc.: HyperLadder™ 1kb. Online verfügbar unter <https://www.bioline.com/hyperladder-1kb.html>, zuletzt geprüft am 30.04.2024.
- Misawa, N.; Satomi, Y.; Kondo, K.; Yokoyama, A.; Kajiwara, S.; Saito, T. et al. (1995): Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. In: *Journal of bacteriology* 177 (22), S. 6575–6584. DOI: 10.1128/jb.177.22.6575-6584.1995.
- Mullineaux, Conrad W. (2014): Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1837 (4), S. 503–511. DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.11.017.
- Nabi, Fazul; Arain, Muhammad A.; Rajput, Nasir; Alagawany, Mahmoud; Soomro, Jamila; Umer, Muhammad et al. (2020): Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: A review. In: *Journal of animal physiology and animal nutrition* 104 (6), S. 1809–1818. DOI: 10.1111/jpn.13375.
- Nair, U.; Thomas, C.; Golden, S. S. (2001): Functional elements of the strong psbAI promoter of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. In: *Journal of bacteriology* 183 (5), S. 1740–1747. DOI: 10.1128/jb.183.5.1740-1747.2001.
- Nomura, Christopher T.; Sakamoto, Toshio; Bryant, Donald A. (2006): Roles for heme-copper oxidases in extreme high-light and oxidative stress response in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. In: *Archives of microbiology* 185 (6), S. 471–479. DOI: 10.1007/s00203-006-0107-7.
- Pagels, Fernando; Vasconcelos, Vitor; Guedes, Ana Catarina (2021): Carotenoids from Cyanobacteria: Biotechnological Potential and Optimization Strategies. In: *Biomolecules* 11 (5). DOI: 10.3390/biom11050735.
- Pappert, Isabell; Greulich, Simon; Joseph, Franziska M.; Otto, Beate; Kaldenhoff, Ralf (2023): Protein Expression in *Synechococcus* PCC 7002: A Quantitative Comparison of Promoters and Integration Sites. In: *JABB* 26 (4), S. 28–39. DOI: 10.9734/JABB/2023/v26i4629.
- Patel, Anil Kumar; Tambat, Vaibhav Sunil; Chen, Chiu-Wen; Chauhan, Ajeet Singh; Kumar, Prashant; Vadrade, Akash Pralhad et al. (2022): Recent advancements in astaxanthin production from microalgae: A review. In: *Bioresource technology* 364, S. 128030. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.128030.

- 
- Pisareva, Tatiana; Kwon, Joseph; Oh, Jihyun; Kim, Soohyun; Ge, Changrong; Wieslander, Ake et al. (2011): Model for membrane organization and protein sorting in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 inferred from proteomics and multivariate sequence analyses. In: *Journal of proteome research* 10 (8), S. 3617–3631. DOI: 10.1021/pr200268r.
- Ruffing, Anne M.; Jensen, Travis J.; Strickland, Lucas M. (2016): Genetic tools for advancement of *Synechococcus* sp. PCC 7002 as a cyanobacterial chassis. In: *Microbial cell factories* 15 (1), S. 190. DOI: 10.1186/s12934-016-0584-6.
- Rumin, Judith; Nicolau, Elodie; Junior, Raimundo Gonçalves de Oliveira; Fuentes-Grünwald, Claudio; Picot, Laurent (2020): Analysis of Scientific Research Driving Microalgae Market Opportunities in Europe. In: *Marine drugs* 18 (5). DOI: 10.3390/md18050264.
- Sakamoto, Toshio; Bryant, Donald A. (2002): Synergistic effect of high-light and low temperature on cell growth of the Delta12 fatty acid desaturase mutant in *Synechococcus* sp. PCC 7002. In: *Photosynthesis research* 72 (3), S. 231–242. DOI: 10.1023/A:1019820813257.
- Sato, Naoki (2021): Are Cyanobacteria an Ancestor of Chloroplasts or Just One of the Gene Donors for Plants and Algae? In: *Genes* 12 (6). DOI: 10.3390/genes12060823.
- Shah, Md Mahfuzur R.; Liang, Yuanmei; Cheng, Jay J.; Daroch, Maurycy (2016): Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. In: *Frontiers in plant science* 7, S. 531. DOI: 10.3389/fpls.2016.00531.
- Shimada, Naoya; Okuda, Yukiko; Maeda, Kaisei; Umeno, Daisuke; Takaichi, Shinichi; Ikeuchi, Masahiko (2020): Astaxanthin production in a model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: *The Journal of general and applied microbiology* 66 (2), S. 116–120. DOI: 10.2323/jgam.2020.01.003.
- Shin, Kyung-Chul; Seo, Min-Ju; Kim, Yeong-Su; Yeom, Soo-Jin (2022): Molecular Properties of  $\beta$ -Carotene Oxygenases and Their Potential in Industrial Production of Vitamin A and Its Derivatives. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11 (6). DOI: 10.3390/antiox11061180.
- Singh, Gulab; Patidar, S. K. (2018): Microalgae harvesting techniques: A review. In: *Journal of environmental management* 217, S. 499–508. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.04.010.
- Singh, Jasvinder; Saxena, Rakesh Chandra (2015): An Introduction to Microalgae. In: *Handbook of Marine Microalgae*: Elsevier, S. 11–24.
- Singh, Prashant R.; Pathak, Jainendra; Rajneesh; Ahmed, Haseen; Häder, Donat-P; Sinha, Rajeshwar P. (2023): Physiological responses of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under rhythmic light variations. In: *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 22 (9), S. 2055–2069. DOI: 10.1007/s43630-023-00429-x.
- Stachowiak, Barbara; Szulc, Piotr (2021): Astaxanthin for the Food Industry. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (9). DOI: 10.3390/molecules26092666.
- Steinbrenner, Jens; Linden, Hartmut (2003): Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. In: *Plant molecular biology* 52 (2), S. 343–356. DOI: 10.1023/A:1023948929665.
- Tran, Nam Trung; Kaldenhoff, Ralf (2020a): Achievements and challenges of genetic engineering of the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Algal Research* 50, S. 101986. DOI: 10.1016/j.algal.2020.101986.

---

Tran, Nam Trung; Kaldenhoff, Ralf (2020b): Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthetic pathway in *Chlamydomonas reinhardtii* strain CC-4102. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 10688. DOI: 10.1038/s41598-020-67756-2.

Ungerer, Justin; Lin, Po-Cheng; Chen, Hui-Yuan; Pakrasi, Himadri B. (2018): Adjustments to Photosystem Stoichiometry and Electron Transfer Proteins Are Key to the Remarkably Fast Growth of the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. In: *mBio* 9 (1). DOI: 10.1128/mbio.02327-17.

Varela, João C.; Pereira, Hugo; Vila, Marta; León, Rosa (2015): Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. In: *Photosynthesis research* 125 (3), S. 423–436. DOI: 10.1007/s11120-015-0149-2.

Velez-Ramirez, Aaron I.; van Ieperen, Wim; Vreugdenhil, Dick; Millenaar, Frank F. (2011): Plants under continuous light. In: *Trends in plant science* 16 (6), S. 310–318. DOI: 10.1016/j.tplants.2011.02.003.

Vinh, Trinh Quang; Trung, Tran Nam; Balasus, Jens; Sharma, Sulabha; Hegemann, Tim; Greulich, Simon et al. (2021): Light reflection spectra as a tool for direct and real-time determination of biomass and pigments in the microalgae *Microchloropsis salina*. In: *Lighting Research & Technology* 53 (2), S. 171–184. DOI: 10.1177/1477153520958455.

Vogel, Anne Ilse Maria; Lale, Rahmi; Hohmann-Marriott, Martin Frank (2017): Streamlining recombination-mediated genetic engineering by validating three neutral integration sites in *Synechococcus* sp. PCC 7002. In: *Journal of biological engineering* 11, S. 19. DOI: 10.1186/s13036-017-0061-8.

Wan, Xia; Zhou, Xue-Rong; Moncalian, Gabriel; Su, Lin; Chen, Wen-Chao; Zhu, Hang-Zhi et al. (2021): Reprogramming microorganisms for the biosynthesis of astaxanthin via metabolic engineering. In: *Progress in lipid research* 81, S. 101083. DOI: 10.1016/j.plipres.2020.101083.

Wang, Ruizhao; Gu, Xiaoli; Yao, Mingdong; Pan, Caihui; Liu, Hong; Xiao, Wenhai et al. (2017): Engineering of  $\beta$ -carotene hydroxylase and ketolase for astaxanthin overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Front. Chem. Sci. Eng.* 11 (1), S. 89–99. DOI: 10.1007/s11705-017-1628-0.

Xu, Xianzhen; Gu, Xiaoguang; Wang, Zhongyang; Shatner, William; Wang, Zhenjun (2019): Progress, challenges and solutions of research on photosynthetic carbon sequestration efficiency of microalgae. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 110, S. 65–82. DOI: 10.1016/j.rser.2019.04.050.

Yang, Lu; Gu, Jiayu; Luan, Tianle; Qiao, Xing; Cao, Yunrui; Xue, Changhu; Xu, Jie (2021a): Influence of oil matrixes on stability, antioxidant activity, bioaccessibility and bioavailability of astaxanthin ester. In: *Journal of the science of food and agriculture* 101 (4), S. 1609–1617. DOI: 10.1002/jsfa.10780.

Yang, Lu; Qiao, Xing; Gu, Jiayu; Li, Xuemin; Cao, Yunrui; Xu, Jie; Xue, Changhu (2021b): Influence of molecular structure of astaxanthin esters on their stability and bioavailability. In: *Food chemistry* 343, S. 128497. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128497.

Yano, Shin-ichi; Kawata, Yoshikazu; Kojima, Hiroyuki (1995): Salinity-dependent copy number change of endogenous plasmids in *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. In: *Current Microbiology* 31 (6), S. 357–360. DOI: 10.1007/BF00294699.

Zerulla, Karolin; Ludt, Katharina; Soppa, Jörg (2016): The ploidy level of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is highly variable and is influenced by growth phase and by chemical and physical external parameters. In: *Microbiology (Reading, England)* 162 (5), S. 730–739. DOI: 10.1099/mic.0.000264.

---

Zhao, Chi; Li, Zhongkui; Li, Tao; Zhang, Yingjiao; Bryant, Donald A.; Zhao, Jindong (2015): High-yield production of extracellular type-I cellulose by the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. In: *Cell discovery* 1, S. 15004. DOI: 10.1038/celldisc.2015.4.

Zhao, Zilong; Liu, Zhen; Mao, Xiangzhao (2020): Biotechnological Advances in Lycopene  $\beta$ -Cyclases. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 68 (43), S. 11895–11907. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c04814.

Zhou, Wenguang; Wang, Jinghan; Chen, Paul; Ji, Chengcheng; Kang, Qiuyun; Lu, Bei et al. (2017): Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: Advances and perspectives. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 76, S. 1163–1175. DOI: 10.1016/j.rser.2017.03.065.

Zhou, Xuesong; Rao, Sombir; Wrightstone, Emalee; Sun, Tianhu; Lui, Andy Cheuk Woon; Welsch, Ralf; Li, Li (2022): Phytoene Synthase: The Key Rate-Limiting Enzyme of Carotenoid Biosynthesis in Plants. In: *Frontiers in plant science* 13, S. 884720. DOI: 10.3389/fpls.2022.884720.

Zhu, Yuehui; Graham, Joel E.; Ludwig, Marcus; Xiong, Wei; Alvey, Richard M.; Shen, Gaozhong; Bryant, Donald A. (2010): Roles of xanthophyll carotenoids in protection against photoinhibition and oxidative stress in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 504 (1), S. 86–99. DOI: 10.1016/j.abb.2010.07.007.

### 12.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die Syntheseweg-Erweiterung von  $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin in *Synechococcus* sp. PCC7002. Erfasst sind alle möglichen Intermediate und auf den Pfeilen gestrichelt eingerahmt heterologe oder überexprimierte Enzyme. Das Endprodukt Astaxanthin ist rot eingerahmt. Darunter ist die Strukturformel dieses in der Keilstrichform wiedergegeben. .... 11
- Abbildung 2: Biomembran von *Synechococcus* sp. PCC7002 mit ABC-Transporter-Protein. Die an der Membran produzierten Carotinoide, bevorzugt Astaxanthin, können mittels des MsbA1-Transporters durch die Membran auf deren Außenseite transportiert werden. Hierzu wird der alternative Funktionsmechanismus dieses Transporters verwendet (gestrichelte Line), denn eigentlich dient er dem Transport von Lipid A..... 12
- Abbildung 3: Schema eines auf *Synechococcus* sp. PCC7002-gestütztes Astaxanthin-Produktionsverfahrens. Ein Blasensäulen-Reaktor mit Flüssigkultur von genetisch veränderten Stämmen überschichtet mit einem organischen Lösemittel. Die Zellen sind durch synthetische Gene in der Lage Astaxanthin zu produzieren (1), durch die Optimierung von limitierenden Schritten erfolgte eine Ausbeuten-Steigerung (2) und ein Transporter ermöglicht es den Zellen das Produkt in das Medium abzugeben (2). Im Medium findet eine Phasentrennung statt, sodass sich das Astaxanthin in der organischen Phase akkumuliert. .... 13
- Abbildung 4: Theoretischer Ablauf des „In-Fusion® HD cloning“. Amplifikation des Vektor-Fragments und des Synthetischen Gens, mit 15 bp langen homologen Sequenzen zum Vektor, mittels PCR. Behandlung der aufgereinigten DNA-Fragmente mit dem In-Fusion-Enzym, zum Erhalt des gewünschten Vektors..... 21
- Abbildung 5: Vektor-Karte des verwendeten pSyn-Vektors, mit allen möglichen Varianten. Die Varianten werden durch eingeschobene Elemente dargestellt. Bei den neutralen Integrationsstellen sind die „upstream“ und „downstream“ Stellen bei Variation aus der gleichen neutralen Integrationsstelle..... 22
- Abbildung 6: Vektor-Karte des verwendeten pSyn-Vektors für Konstrukte mit zwei Genen unter der Kontrolle eines Promotors, mit allen möglichen Varianten. Die Varianten werden durch eingeschobene Elemente dargestellt. Bei den neutralen Integrationsstellen sind die „upstream“ und „downstream“ Stellen bei Variation aus der gleichen neutralen Integrationsstelle. .... 22
- Abbildung 7: Vektor-Karte des verwendeten pBK-Vektors, mit allen möglichen Varianten. Die Varianten werden durch eingeschobene Elemente dargestellt. Bei den neutralen Integrationsstellen sind die „upstream“ und „downstream“ Stellen bei Variation aus der gleichen neutralen Integrationsstelle..... 23
- Abbildung 8: Vektor-Karte des verwendeten pBk-Vektors für Konstrukte mit zwei Genen unter der Kontrolle je eines Promotors, mit allen möglichen Varianten. Die Varianten werden durch eingeschobene Elemente dargestellt. Bei den neutralen Integrationsstellen sind die „upstream“ und „downstream“ Stellen bei Variation aus der gleichen neutralen Integrationsstelle. .... 23
- Abbildung 9: Schema eines Selektionsausstriches für *E. coli* oder *Synechococcus* sp. PCC7002 mittels Impföse..... 25

Abbildung 10: Blasensäulen Reaktor für die Anzucht. zylindrisches Reaktionsgefäß in einem Wasserbad zur Thermosteuerung und belichtet mit Weißlicht LEDs von zwei Seiten. Die Begasung erfolgt über ein Glasrohr, das im Reaktionsgefäß bis zum Boden reicht. Das Gefäß ist mittels Gummistopfen abgeschlossen und hat ein weiteres Glasrohr zur Entlüftung.....	27
Abbildung 11: Zur Analyse bereitgestelltes Bild des aufgetrennten DNA-Markers. Mit Angaben der DNA-Länge in bp die die jeweiligen Banden erzeugen und das DNA-Gewicht in ng. Bild von der Internetseite des Herstellers (Meridian Bioscience Inc.). .....	29
Abbildung 12: HPLC-Diagramm eines Carotinoid-Extraktes des unveränderten <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 Stamms. Identifiziert wurden drei Carotinoide, Zeaxanthin bei min 9, $\beta$ -Carotin bei min 19,5 und bei min 20,8 $\alpha$ -Carotin. ....	35
Abbildung 13: Analyseergebnis eines Carotinoid-Extraktes des $\beta$ -Carotin-Ketolase-Stamms. Die zwei wichtigsten Carotinoide wurden markiert, Zeaxanthin bei min 9 und Canthaxanthin bei min 10. ....	36
Abbildung 14: HPLC-Ergebnisvergleich für den unveränderten Stamm und einen zweifach veränderten Stamm. In orange ist die Analyse des Carotinoid-Extraktes des zweifach modifizierten Stammes mit den synthetischen Genen für die $\beta$ -Carotin-Ketolase und $\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit Ursprung in <i>Brevundimonas</i> sp. gezeigt. Verglichen wird dieser mit einem unveränderten <i>Synechococcus</i> Stamms als Kontrolle in grün. ....	38
Abbildung 15: Ergebnis der qPCR-Analyse. Die relativen Expressionslevel der Gene <i>crtr</i> (grün), <i>crtz</i> (gelb) und <i>crtw</i> (orange) sind in Form der Balken gegeben. Analysiert wurden der unveränderte Stamm (WT), eine Zelllinie mit synthetischer $\beta$ -Carotin-Ketolase (CrtW), eine Zelllinie mit synthetischer $\beta$ -Carotin-Hydroxylase und zwei Stämme mit beiden synthetischen Genen ( <i>crtw1z</i> und <i>crtz1w</i> ). Für jede Zelllinie sind die Ergebnisse auf ppC (grau) normiert und auf den WT relativiert. ....	39
Abbildung 16: HPLC-Ergebnis einer Zelllinie mit dem synthetischen Gen <i>crtz</i> A. PC-1. In diesen Stämmen kann Zeaxanthin (min 9) als Hauptprodukt gefunden werden. Zusätzlich besteht das Carotinoid-Gemisch noch aus $\beta$ -Carotin und $\alpha$ -Carotin. ....	40
Abbildung 17: Vergleich der Carotinoid-Zusammensetzungen. Die HPLC-Ergebnisse der Stämme mit dem <i>crtz</i> A.PC-1-Gen (gelb) und dem <i>crtw</i> -Gen(orange) sind gegen die Ergebnisse aus dem unveränderten Stamm (WT, grün) aufgetragen. Die CrtZ A.PC-1-Zelllinie und der WT beinhalten Zeaxanthin, $\beta$ -Carotin und $\alpha$ -Carotin. Dabei liegt im WT eine höhere Konzentration an $\beta$ -Carotin und $\alpha$ -Carotin vor als Zeaxanthin. In der CrtZ A.PC-1-Zelllinie ist dies umgekehrt. Die Carotinoid-Zusammensetzung der CrtW-Zelllinie besteht dagegen nur aus Canthaxanthin und dessen Vorstufen in geringen Mengen. Dafür ist die Gesamt-Carotinoid-Ausbeute in diesem Stamm gegenüber dem unveränderten Stamm gesteigert.....	41
Abbildung 18: Carotinoid-Zusammensetzung einer mehrfach modifizierten Zelllinie. Das HPLC-Chromatogramm gibt die Ergebnisse der Vermessung eines Carotinoidextraktes aus einem Stamm mit synthetischer Ketolase mit Ursprung in <i>Brevundimonas</i> sp. und einer Hydroxylase mit Ursprung in <i>Alcaligenes</i> sp. PC-1 (roter Graph) wieder. Die Hauptprodukte sind	

Adonixanthin (min. 8) und Adonirubin (min. 7,5) Für den Vergleich dient ein Ergebnis aus dem unveränderten Stamm (grüner Graph).....	42
Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen der GFP-exprimierenden <i>Synechococcus</i> -Stämme. Für den Vergleich der GFP-Intensität pro Zelle sind Aufnahmen aller vermessenen Stämme gegeben. In der oberen Reihe sind Stämme, die das <i>gfp</i> -Gen in einer der neutralen Integrationsstellen inseriert haben (NSI, NSII und NSIII) gegen den unveränderten Stamm (WT) aufgetragen. Die untere Reihe zeigt Zelllinien, in denen das <i>gfp</i> -Gen in der NSII integriert ist und als Fusion mit einem endständigen His-Tag (His-Fusion) oder vorangestellter Beta-Untereinheit des Phycocyanin ( $\beta$ -SU Fusion) vorliegen. Die Fluoreszenzintensität ist um das 1,2-Fache erhöht. Das Bild unten rechts dagegen stellt das Ergebnis für die Integration des GFP-Gens in das endogene Plasmid pAQ1 (PAQ1) dar. Hier ist die Fluoreszenzintensität um das 10-Fache erhöht (Pappert et al. 2023).....	43
Abbildung 20: Auswirkung des endständigen His-Tags auf die Carotinoid-Zusammensetzung. Die HPLC-Ergebnisse zeigen eine erhöhte Canthaxanthin-Konzentration in der Zelllinie mit einem angefügten His-Tag an die Ketolase (grauer Graph). Im Vergleich dazu sind die Ergebnisse für die Zelllinie mit Ketolase-Gen in orange dargestellt. Die Zusammensetzung ändert sich nicht, nur die Ausbeute des Hauptbestandteils Canthaxanthin und des Vorläufers werden gesteigert. ....	43
Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm eines Stammes mit Astaxanthin als Hauptprodukt. In rot ist die Carotinoid-Zusammensetzung eines Stammes mit <i>crtw</i> und <i>crtz</i> integriert in das endogene Plasmid pAQ1 (Stamm A) dargestellt. Das Hauptprodukt ist Astaxanthin bei min. 6,9. Zum Vergleich dient der grüne Graph, der die Zusammensetzung des unveränderten Stammes (WT) wiedergibt. Für die jeweiligen Linien sind die Hauptprodukte markiert. Die Gesamt-Carotinoid-Ausbeute ist im Astaxanthin-produzierenden Stamm erhöht. ....	44
Abbildung 22: Erhöhung der $\beta$ -Carotin-Ausbeute durch die Überexpression der PSY. Der grüne Graph gibt das Ergebnis eines Carotinoid-Extraktes aus dem unveränderten Stamm wieder, der orangene Graph das mit überexprimierter PSY durch Integration in die NSI und der gelbe Graph durch Integration in die NSII. Alle gefundenen Carotinoide wurden durch die Überexpression des Enzyms in einer höheren Konzentration gebildet. Für die NSII ist dieser Effekt am stärksten. ....	47
Abbildung 23: Berechnete Ausbeute aus Astaxanthin-bildenden Stämmen mit und ohne PSY. Die hellrote Säule zeigt die durchschnittliche Astaxanthin-Ausbeute von sechs biologischen Replikaten gemessen in Duplikaten des Stamm A. Die Ausbeute liegt für diesen Stamm bei $1,71 \pm 0,32$ mg pro g Zelltrockenmasse. Für den Stamm A PSY betrug die Astaxanthin-Ausbeute $2,38 \pm 0,17$ mg pro g Zelltrockenmasse, wiedergegeben durch die dunkelrote Säule mit dem gleichen $n=6$ . ....	48
Abbildung 24: HPLC-Ergebnis des Stamm A PSY (blau) im Vergleich zum unveränderten Stamm (grün). Für beide Stämme sind die wichtigsten Produkte markiert. Der Stamm A PSY bildet erstmals, neben dem Astaxanthin-Hauptprodukt, messbare Mengen Phytoen (min. 21,3).....	48
Abbildung 25: Beispielagarosegel für die Bestimmung der <i>rl</i> -Zahl. Mittels PCR-analyzierter genomischer DNA für Stämme nach der normalen Selektion und der erweiterten. Untersucht	

wurde auf das synthetische Gen der <i>psy</i> und der ursprünglichen DNA-Sequenz für die NSII. Die Proben wurden in zwei Verdünnungen aufgetragen.....	49
Abbildung 26: Astaxanthin-Ausbeuten vor und nach der erweiterten Selektion. Die gestrichelten Säulen geben die berechneten Ausbeuten vor der erweiterten Selektion an, die linierten danach. In hellrot sind die Ergebnisse für den Stamm A, mit einer Erhöhung der Ausbeute von $1,2 \pm 0,13$ mg/g auf $1,84 \pm 0,27$ mg/g dargestellt und in dunkelrot die des Stamm A PSY, mit einer Erhöhung von $1,33 \pm 0,14$ mg/g auf $2,38 \pm 0,17$ mg/g. ....	50
Abbildung 27: <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 Kultur und Dodecan-Überstände A) Flüssigkultur des Stamm AT mit Dodecan-Überstand nach 8 Tagen der Kultivierung in einem Blasensäulenreaktor. B) Dodecan-Überstand einer Stamm AT-Kultur 5 Tagen nach der Überschichtung mit der typischen orangenen Carotinoid-Farbe C) Dodecan-Überstand einer Stamm A-Kultur 5 Tagen nach der Überschichtung ungefärbt, wie reiner Dodecan. ....	51
Abbildung 28: Im Dodecan-Überstand gefundene Carotinoide des Stamm AT. Die Vermessung mittels HPLC ergab Astaxanthin und geringe Mengen an Zeaxanthin für die eingedampften Dodecan-Überstände des untersuchten Stamms. Vor min. 5 sind ungeklärte Peaks, die immer bei einer Dodecan-Überschichtung auftraten, jedoch nicht durch Dodecan hervorgerufen werden. Es muss sich um Produkte aus <i>Synechococcus</i> handeln. ....	52
Abbildung 29: HPLC-Diagramm der Carotinoid-Ausbeute des Stamm A aus dem Dodecan-Überstand. Minimale Mengen Astaxanthin können detektiert werden. ....	52
Abbildung 30: Berechnete Astaxanthin-Ausbeute aus den Dodecan-Überständen. Die linken gepunkteten Säulen geben die durchschnittlichen Ausbeuten von Astaxanthin im Dodecan-Überstand für den Stamm A wieder. In hellrot ist die Ausbeute aus dem Überstand 5 Tagen nach der Überschichtung und in dunkelrot nach 11 Tagen gezeigt. Für den Stamm AT sind die Ergebnisse in den gestreiften Säulen wiedergegeben. Die hellrote steht wieder für die Ausbeute nach 5 Tagen und die dunkelrote nach 11 Tagen. Alle Ergebnisse beruhen auf n=6 Messungen. ....	53
Abbildung 31: Syntheseweg in <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 für Astaxanthin. Die Erweiterung von $\beta$ -Carotin zu Astaxanthin in <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002. Erfasst sind alle möglichen Intermediate und auf den Pfeilen gestrichelt eingerahmt heterologe oder überexprimierte Enzyme. Über die schwarzen Pfeile mit flachem Kopf sollen mögliche Produktinhibitionen gezeigt werden. Die Intensität der Reaktionspfeile gibt höhere Produktaffinitäten an. ....	57
Abbildung 32: Aus den Ergebnissen abgeleiteter Syntheseweg für Astaxanthin. Die Katalyse von Zeaxanthin zu Adonixanthin durch <i>CrtW</i> scheint nicht stattzufinden, daher ist diese Reaktion hier nicht aufgeführt. Die schwarzen Pfeile mit flachem Kopf geben mögliche Produktinhibitionen an und die Intensität der Reaktionspfeile gibt die Produktaffinität der Enzyme wieder. Mittels grüner Pfeile ist der in <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 bevorzugte Syntheseweg gezeigt. ....	60
Abbildung 33: Flüssigkulturen von verschiedenen <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 Stämmen. A) unveränderter Stamm mit grüner Färbung. B) Stamm mit mittleren Astaxanthin-Konzentrationen mit grüngelblicher Färbung. C) Stamm A PSY mit hoher Astaxanthin-Konzentration mit bräunlicher Färbung.....	66



Abbildung 34: HPLC-Chromatogramm des All-trans-3S,3'S -Astaxanthin-Standards. Die Retentionszeit lag bei 6,96 min. und es wurden 0,005 µg Astaxanthin aufgetragen. ....	90
Abbildung 35: HPLC-Chromatogramm des Zeaxanthin-Standards. Die Retentionszeit lag bei 9,12 min. und es wurden 0,005 µg Zeaxanthin aufgetragen.....	90
Abbildung 36: HPLC-Chromatogramm des Canthaxanthin-Standards. Die Retentionszeit lag bei 10,15 min. und es wurden 0,005 µg Canthaxanthin aufgetragen. ....	91
Abbildung 37: HPLC-Chromatogramm des β-Carotin-Standards. Die Retentionszeit lag bei 19,43 min. und es wurden 0,01 µg β-Carotin aufgetragen.....	91
Abbildung 38: Teilergebnis der Analyse für Probe 1. In diesem Teil kann Adonixanthin identifiziert werden. Der Vergleich mit simulierten Ergebnissen, ermöglicht die Identifikation der gefundenen Stoffe. ....	92
Abbildung 39: Teilergebnis der Analyse für Probe 1. In diesem Teil kann Adonirubin identifiziert werden. Der Vergleich mit simulierten Ergebnissen, ermöglicht die Identifikation der gefundenen Stoffe. ....	93
Abbildung 40: Teilergebnis der Analyse für Probe 2. In diesem Teil kann Adonixanthin identifiziert werden. Der Vergleich mit simulierten Ergebnissen, ermöglicht die Identifikation der gefundenen Stoffe. ....	94
Abbildung 41: Teilergebnis der Analyse für Probe 1. In diesem Teil kann Adonirubin identifiziert werden. Der Vergleich mit simulierten Ergebnissen, ermöglicht die Identifikation der gefundenen Stoffe. ....	95
Abbildung 42: Prototyp des entwickelten Sensors. A) Übersicht über den Messkopf und die Datenverarbeitungs-Platine. B) Verwendung des Prototyps in einer Synechococcus-Kultur.....	96

## 12.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Resuspensionspuffers (P1)	14
Tabelle 2: Zusammensetzung des Lysepuffers (P2)	14
Tabelle 3: Zusammensetzung von 50xTAE	17
Tabelle 4: Zusammensetzung des 10x MEN-Puffers	17
Tabelle 5: Zusammensetzung des 2x RNA-Ladepuffers	17
Tabelle 6: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	18
Tabelle 7: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes	19
Tabelle 8: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes	20
Tabelle 9: Zusammensetzung von LB-Medium	25
Tabelle 10: Zusammensetzung von LB-Agar	25
Tabelle 11: Zusammensetzung von SOB-Medium	25
Tabelle 12: Zusammensetzung von Inoue-Puffer	25
Tabelle 13: Zusammensetzung von SOC-Medium	26
Tabelle 14: Zusammensetzung von A <sup>+</sup> -Medium	27
Tabelle 15: Zusammensetzung A <sup>+</sup> -Agar	27
Tabelle 16: Zusammensetzung von 1000x P1 Metal Mix	27

Tabelle 17: Zusammensetzung der Edwards-Lösung	30
Tabelle 18: Zusammensetzung von TE-Puffer	30
Tabelle 19: Lysepuffer zur Extraktion von RNA nach Sokolovsky et al. (1990)	31
Tabelle 20: Zusammensetzung Puffer A	33
Tabelle 21: Zusammensetzung Puffer B	33
Tabelle 22: Retentionszeiten für die Stoffe der Astaxanthin-Synthese	33
Tabelle 23: Liste aller verwendeten Primer	82
Tabelle 24: Liste aller erzeugten Vektoren	87
Tabelle 25: Liste von erzeugten <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 Stämmen	88

### 12.3 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	Membranprotein für den primär aktiven Transport von verschiedenen Substanzen
A	Absorption
mA	Miliabsorbance Units
ad	Auffüllen auf
bp	Basenpaare
mbp	Megabasenpaare
CrtR	$\beta$ -Carotin-Oxygenase
CrtW	$\beta$ -Carotin-Ketolase
CrtZ	$\beta$ -Carotin-Hydroxylase
CrtZ A. PC-1	$\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit Ursprung in <i>Alcaligenes</i> sp.
CT	Cycle Threshold
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
Ø	Durchmesser
engl.	Englisch
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
Flanke1	„upstream“ Bereich der neutralen Integrationsstelle des Plasmids pAQ1
FlankeB	„downstream“ Bereich der neutralen Integrationsstelle des Plasmids pAQ1
Flanke1B	Bezeichnung der neutralen Integrationsstelle des endogenen Plasmids pAQ1
GGDP	Geranylgeranylpyrophosphat
GFP	green fluorescent protein
G3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
°C	Grad Celsius
g	Gramm
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
K	Kelvin
mg	Miligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
MsbA1	MsbA1-Protein für den aktiven Transport von Lipid A
ng	Nanogramm
IPP	Isopentenylpyrophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
L	Liter
mL	Mililiter
$\mu$ l	Mikroliter
LB	Luria-Bertani-Medium
MS	Massenspektrometrie
MEP	Methylerythritolphosphatweg
$\mu$ m	Mikrometer

min	Minute(n)
M	Molar
mM	Milimolar
$\mu$ M	Mikromolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NaAc	Natriumacetat
NS	neutrale Integrationsstelle
NSI	NS, lokalisiert zwischen den Genbankeinträgen A0932 und A0933
NSII	NS lokalisiert zwischen den Genbankeinträgen A1202 und A1203
NSIII	NS lokalisiert zwischen den Genbankeinträgen A1778 und A1779
OD	Optische Dichte
PCC	The Pasteur Culture collection of Cyanobacteria
PPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PSY	Phytoen-Synthase
pAQ1	das kleinste endogene Plasmid von <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002
pH	Potential des Wasserstoffs (lateinisch pondus hydrogenii)
$\mu$ mol/(m <sup>2</sup> *sec)	Photonenstromdichte in Mikromol/(Quadratmeter*Sekunde)
$\mu$ E	$\mu$ mol/m <sup>2</sup> *sec
His-Tag	Polyhistidin-Tag
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
%	Prozent
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (engl. real-time quantitative PCR)
rI-Zahl	relative Integrationszahl
RQ	Relativer Quotient
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
sec	Sekunde(n)
sp.	lateinisch für species
Vis	sichtbares Licht (engl. visible)
h	Stunde(n)
sfGFP	superfolder green fluorescent protein
SOB	Super Optimal Broth-Medium
SOC	Super Optimal Broth -Medium mit 20mM Glukose
d	Tage
UV	Ultraviolettstrahlung (engl. Ultraviolet light)
RPM	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
U	Units
V	Volt
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser (engl. double-distilled water)
MilliQ-H <sub>2</sub> O	Wasser aus einem Reinwasser-Aufbereitungssysteme der Firma Merck Millipore
w/v	„weight per volume“ = Masse pro Volumen
x g	Zentrifugalbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

## 12.4 Sequenzen

### 12.4.1 PsbA1-Promotor

ATTTAGCGTCTTCTAATCCAGTGTAGACAGTAGTTTTGGCTCCGTTGAGCACTGTAGCCTTGGGCGA  
TCGCTCTAAACATTACATAAATTCACAAAGTTTTTCGTTACATAAAAATAGTGTCTACTTAGCTAAAAA  
TTAAGGGTTTTTTACACCTTTTTGACAGTTAATCTCCTAGCCTAAAAAGCAAGAGTTTTTAACTAAGA  
CTCTTGCCCTTTACAACCTC

### 12.4.2 CPC560-Promotor

ACCTGTAGAGAAGAGTCCCTGAATATCAAATGGTGGGATAAAAAGCTCAAAAAGGAAAGTAGGCT  
GTGGTTCCCTAGGCAACAGTCTTCCCTACCCACTGGAACTAAAAAACGAGAAAAGTTCGCACCG  
AACATCAATTGCATAATTTTAGCCCTAAAACATAAGCTGAACGAACTGGTTGTCTTCCCTTCCCAAT

---

CCAGGACAATCTGAGAATCCCCTGCAACATTACTTAACAAAAAGCAGGAATAAAATTAACAAGATG  
TAACAGACATAAGTCCCATCACCGTTGTATAAAGTTAACTGTGGGATTGCAAAAGCATTCAAGCCTA  
GGCGCTGAGCTGTTTGAGCATCCCGGTGGCCCTTGTCTGCTGCCTCCGTGTTTCTCCCTGGATTTATT  
TAGGTAATATCTCTCATAAATCCCCGGGTAGTTAACGAAAGTTAATGGAGATCAGTAACAATAACTC  
TAGGGTCATTACTTTGGACTCCCTCAGTTTATCCGGGGGAATTGTGTTTAAGAAAATCCCAACTCAT  
AAAGTCAAGTAGGAGATTAAT

#### **12.4.3 Theophyllin induzierbarer Promotor**

TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGAAGGAAGGCCGTCAAGGCCGCATTTTTAAGCTAGCAGGAA  
AACCCGATGGTGCCTTTAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATG  
TGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACATACGCTCACAATTTGTACCGGTGATACCAGCATCGTCT  
TGATGCCCTTGGCAGCACCTGCTAAGGAGGCAACAAG

#### **12.4.4 Ketolase-Gensequenz aus *Brevundimonas* sp. optimiert für PCC7002**

ATGACTGCGGCAGTCGCCGAGCCGCGTATCGTTCCCCGTCAGACCTGGATTGGGCTCACGTTAGCC  
GGGATGATTGTCGCAGGATGGGGTAGTCTCCATGTGTATGGAGTTTACTTTACCGCTGGGGGACG  
AGCTCGCTCGTTATTGTACCCGCTATCGTTGCCGTGCAAACCTGGTTATCCGTTGGATTGTTTCATCG  
TTGCACATGATGCCATGCACGGAAGTTTAGCTCCCGGGCGCCCGCGCCTGAATGCGGCGGTGGGCC  
GCTTAACTTTGGGCTTGTACGCTGGCTTTTCGGTTCGATCGCCTCAAACAGCTCACCATGCTCACCA  
CGCAGCTCCGGGTACAGCCGATGACCCGGACTTTTACGCTCCTGCACCGCGTGCATTCTTACCTTGG  
TTCTTAAATTTTTCCGGACATATTTTGGGTGGCGGGAGATGGCTGTGCTCACGGCTCTCGTGTGA  
TCGCGCTGTTTGGACTCGGGGCACGTCCGGCAAATCTGTTGACCTTCTGGGCAGCACCGGCGTTATT  
AAGTGCCCTCCAGTTATTCACCTTTGGTACTTGGCTCCACATCGCCATACAGACCAACCTTTTCGCTG  
ATGCCACCATGCGCGTTCTTCCGGGTACGGACCTGTCTTGTCTGTTGTTAACCTGCTTTCACTTTGG  
CCGGCACCAACGAACACCACTTAACCCCGTGGCGGCCTTGGTGGCGTCTGTGGCGGGGCGAATCTTG  
A

#### **12.4.5 Hydroxylase-Gensequenz aus *Brevundimonas* sp. optimiert für PCC7002**

ATGGCCTGGCTGACGTGGATCGCATTGTTCCCTCACAGCCTTTCTCGGTATGGAAGCCTTCGCGTGGA  
TTATGCATCGCTATGTGATGCATGGGTTCTGTGGTCTTGGCACCGCAGCCACCACGAACCGCACGA  
TCATCCATTAGAGAAAATGACCTCTTCGCGGTAGTGTGTTGCCGCGCCAGCGATCGTAATGGTCGCG  
GTTGGGTTACACTTATGGCCATGGGCGCTCCCTGTTGGGTTGGGTATTACAGCCTACGGGATGGTG  
TACTTTTTCTTTCACGATGGCCTCGTCCACCGTCGGTTTCCCACCGGGTTCTCGGGCCGCTCGGGGT  
TTTGACGCGTCGGATTCAGGCTCACCGTTTGCATCATGCAGTCCGTACTIONGTAAGGCTGCGTCTC  
TTTCGGTTTTTTGTGGGTTTCGTAGCGCTCGCGCACTGAAAGCTGAATTGGCCAAAAGCGTGGCAGT  
TCCAGTTCCGGTGCATGA

#### **12.4.6 Hydroxylase-Gensequenz aus *Alcaligenes* sp. strain PC-1 optimiert für PCC7002**

ATGACACAGTTTCTCATCGTCGTGGCTACTGTTCTGGTGATGGAGTTAACAGCGTACTCTGTTTCATC  
GCTGGATCATGCATGGCCACTCGGCTGGGGGTGGCACAAAAGTCATCACGAAGAGCACGACCATG  
CCCTGGAGAAGAACGACTTATATGGCGTGGTATTCGCAGTGTGGCTACAATTTTGTTCACTGTCCG

---

AGCTTATTGGTGGCCGGTCTGTGGTGGATCGCCCTCGGCATGACGGTCTACGGTTTAATTTATTTTC  
ATCTTGCATGATGGTCTCGTTCATCAACGCTGGCCTTTTCGGTATATTCCGCGTCGGGGCTATTTTC  
GTCGTTTGTACCAGGCACACCGGCTGCACCATGCAGTCGAGGGACGCGACCACTGTGTTTCCTTCG  
GGTTTATCTACGCACCACCAGTGGATAAATTGAAGCAGGACTTAAAGCGGTCTGGGGTACTGCGCCC  
CCAAGATGAACGCCCGTCGTAA

#### 12.4.7 Linker-Sequenz

AGTAGGAGCGTCAGATCTCAT

#### 12.4.8 EcoMSBA-Transporter-Gensequenz aus *E.coli* str. K-12 optimiert für PCC7002

ATGCACAATGACAAAGATTTAAGTACATGGCAGACTTTTCGGCGCTTATGGCCTACAATTGCCCCCT  
TTAAGGCCGGCCTGATCGTGGCCGGCGTCTGATCCTCAATGCGGCTTCTGATACTTTCATGTT  
ATCGTTGTTGAAGCCCCTGTTGGATGACGGCTTTGGCAAACCTGATCGGTCCGTATTAGTGTGGATG  
CCTTTGGTAGTCATTGGATTGATGATCTTGCCTGGAATTACATCCTACGTGAGCTCGTATTGCATTT  
CTTGGGTCTCTGGGAAAGTAGTAATGACCATGCGTCTGCTCTGTTTCGGGCACATGATGGGTATGCC  
GGTCAGCTTTTTTGGATAAGCAATCCACCGGCACCTTATTAAGTCGGATTACCTATGACTCTGAGCAA  
GTCGCCTCCTCCAGCTCGGGGGCCTTGATCACAGTAGTACGCGAAGGAGCGAGTATTATCGGGCTG  
TTTATCATGATGTTTTACTACAGTTGGCAAACCTGAGTATTATTTAATTGTGCTGGCACCCATCGTCAG  
TATTGCCATTCGCGTGGTATCTAAACGTTTCCGTAACATTAGCAAAAACATGCAAAAATACGATGGGC  
CAGGTGACCACCAGCGCCGAGCAGATGTTAAAAGGACATAAAGAGGTACTGATTTTTGGAGGACAG  
GAAGTCGAAACGAAGCGTTTTGACAAAGTAAGCAACCGGATGCGTCTCCAAGGTATGAAGATGGTA  
AGCGCTTCGTCTATCTGACCCGATTATCCAATTGATCGCTTCTCTCGCCTTAGCTTTCGTCTCTA  
TGCTGCATCGTTCCCTAGCGTTATGGACAGCCTGACAGCAGGGACCATCACTGTGCTGTTCTCGTCT  
ATGATTGCGCTGATGCGCCCTCTCAAAGCTTGACGAATGTAAACGCACAATTCCAGCGTGGTATGG  
CCGCTTGCCAGACCCTCTTACGATTCTGGATTCCGGAGCAGGAGAAAGATGAAGGTAAGCGTGTGA  
TCGAGCGCGGACCGGGGATGTCGAATTTGCAATGTCACCTTTCACATATCCTGGCCGCGATGTACC  
AGCGCTCCGGAATATCAACTTGAATCCAGCAGGCAAACCGTAGCATTGGTGGGACGGTCCGG  
GAGCGGCAAATCCACCATTGCTTCTTTAATCACACGTTTCTATGACATTGATGAGGGGGAGATCTTG  
ATGGACGGGCATGATTTACGGGAATATACGCTGGCATCTCTCCGCAACCAAGTCGCTTTAGTGAGTC  
AAAATGTCCATCTCTTTAACGATACAGTTGCAAATAACATTGCTTACGCTCGTACCGAGCAGTACTCC  
CGCGAACAGATTGAGGAAGCGGCCCGTATGGCGTATGCGATGGACTTCATCAATAAAATGGATAAC  
GGGTTGGACACCGTAATCGGAGAGAATGGTGTCTCTTGTCCGGGGGACAACGCCAACGGATTGCA  
ATTGCCCGCGCTTTATTGCGGGATAGCCCCATTTTGATCTTGGATGAAGCGACATCCGCACTGGACA  
CAGAATCTGAACGTGCTATTCAGGCAGCTCTGGACGAGTTACAGAAAAACCGGACGTCCTTAGTCAT  
CGCCATCGGCTGTCTACAATCGAGAAAGCCGACGAAATTGTAGTTGTGAGGACGGTGTGATCGT  
TGAACGGGGGACGCACAATGACCTGTTGGAGCATCGCGGGGTATACGCCAGCTCCACAAGATGCA  
ATTTGGACAGTAG

## 12.5 Listen

Tabelle 23: Liste aller verwendeten Primer

Primer für die Ligation	Sequenz	Verwendungszweck
PCC7002 NSII down FP	aaaaGCTAGCCGCcagaaatgaagaa cgtag	Zur Amplifikation des „downstream“ Bereiches der Neutralen integrationsstelle 2 von PCC7002 für die Ligation in pSyn
PCC7002 NSII down RP	aaaaCCATGGcctgccatcacgttggtat c	
PCC7002 NSII up FP	aaaaGGGCCcgggtgcctttgatatt c	
PCC7002 NSII up RP	aaaaCTGCAGAGAGATTTTGAGAC ACAACGTG	
In-Fusion cloning Primer	Sequenz	Verwendungszweck
Backbone_pSyn_up FP	GTCTAGATAATCCCTAGCGATCG C	Zur Amplifikation des pSyn-Vektors, um die „upstream“ NS auszutauschen
Backbone_pSyn_up RP	GAAGGCCAGTCTTTCGAC	
PCC7002_NSIII down FP	AGTCGAAAGACTGGGCCTTCCGA CGATTGAGAGATAAATGGCTAC	Zur Amplifikation des „downstream“ Bereichs der NS3 aus PCC7002 für die Klonierung in den pSyn-Vektor
PCC7002_NSIII down RP	ACCAGCGGCACCAAAGCAATGAT CACAATGCCG	
Backbone_pSyn_down FP	ATTGCTTTGGTGCCGCTGGTTGG CTTGG	Zur Amplifikation des pSyn-Vektors, um die „downstream“ NS auszutauschen
Backbone_pSyn_down RP	ATCACCTCACGGGCCAGCACAC ATGTGAGC	
PCC7002_NSIII up FP	TGCTGGGCCCGTGAGGTGATCAT GGCAGAACTC	Zur Amplifikation des „upstream“ Bereichs der NS3 aus PCC7002 für die Klonierung in den pSyn-Vektor
PCC7002_NSIII up RP	ACCAGCGGCACCAAAGCAATGAT CACAATGCCG	
Backbone_pSyn_Kan_up FP	GTCTAGATAATCCCTAGCGATCG C	Zur Amplifikation des pSyn_Kan-Vektors, um die „upstream“ NS auszutauschen
Backbone_pSyn_Kan_up RP	AAGGCCAGTCTTTCGAC	
PCC7002_NSI down FP	CAGTCGAAAGACTGGGCCTTTAT TGAGGATTCCTTACAATGGC	Zur Amplifikation des „downstream“ Bereichs der NS1 aus PCC7002 für die Klonierung in den pSyn-Vektor
PCC7002_NSI down RP	ACCAGCGCAAAGATAAAGGA GCGCCTGTG	
Backbone_pSyn_Kan_down FP	CTTTATCTTTGCCGCTGGTTGGC TTGG	Zur Amplifikation des pSyn_Kan-Vektors, um die „downstream“ NS auszutauschen
Backbone_pSyn_Kan_down RP	TCAATTTACGGGCCAGCACAC ATGTGAGC	
PCC7002_NSI up FP	TGCTGGGCCCGTAAATTGACCA ACCACTGGGG	Zur Amplifikation des „upstream“ Bereichs der NS1 aus PCC7002 für die Klonierung in den pSyn-Vektor
PCC7002_NSI up Rp	TCGCTAGGGATTATCTAGACAGA TCGAAAGAAAGAGGATCC	
InsertCrtW FP	TCCGGTGCATGAAGTAGGAGCGT CAGATCTCATATGACT	Zur Amplifikation des Ketolase-Gens mit Ursprung in Brev. Für die Klonierung in den pSyn-Vektor
InsertCrtW RP	CTCGATGCATACAGTACTTCAAG ATTCGCCCGCCA	

InsertCrtZ FP	GGCGAATCTTGAAGTAGGAGCGT CAGATCTCATATGGC	Zur Amplifikation des Hydroxylase-Gens mit Ursprung in Brev. für die Klonierung in den pSyn-Vektor
InsertCrtZ RP	CTCGATGCATACAGTACTTCATGC ACCGGAACCTGGAAC	
pBK47 Bb up FP	GGCTAGTCATCGCCACGTTG	Zur Amplifikation des pBK-Vektors, um die „upstream“ NS auszutauschen
pBK47 Bb up RP	CGGTACCGAATTCTTGAGGCC	
NSI up pBK47 FP	AAGAATTCGGTACCGCCCGTAAA TTGACCAACCACTGG	Zur Amplifikation des „upstream“ Bereichs der NS1 aus PCC7002 für die Klonierung in den pBK-Vektor
NSI up pBK47 RP	TGGCGATGACTAGCCCAGATCGA AAGAAAGAGGATCCA	
NSIII up pBK47 FP	AAGAATTCGGTACCGGTGAGGTG ATCATGGCAGAACTC	Zur Amplifikation des „upstream“ Bereichs der NS3 aus PCC7002 für die Klonierung in den pBK-Vektor
NSIII up pBK47 RP	TGGCGATGACTAGCCCAACATTC AACGCCTCAGTGCTC	
Flank 1 pBK47 FP	AAGAATTCGGTACCGATCGCTCT CACCAAAGATTC	Zur Amplifikation des „upstream“ Bereichs der NS des pAQ1-Plasmids aus PCC7002 für die Klonierung in den pBK-Vektor
Flank 1 pBK47 RP	TGGCGATGACTAGCCGCCTCCTG AATAAATCTATTATAC	
pBK47 Bb down FP	GCTCGAGGTGCGCGTGAT	Zur Amplifikation des pBK-Vektors, um die „downstream“ NS auszutauschen
pBK47 Bb down RP	GGCGGCCGCCTTCCAGAT	
NSI down pBK47 FP	TGGAAGGCGGCCGCCTATTGAGG ATTCCTTACAATGGC	Zur Amplifikation des „downstream“ Bereichs der NS1 aus PCC7002 für die Klonierung in den pBK-Vektor
NSI down pBK47 RP	ACGCGCACCTCGAGCAAAGATAA AGGAGCGCCTGTG	
NSIII down pBK47 FP	TGGAAGGCGGCCGCCGACGATT GAGAGATAAATGGCTAC	Zur Amplifikation des „downstream“ Bereichs der NS3 aus PCC7002 für die Klonierung in den pBK-Vektor
NSIII down pBK47 RP	ACGCGCACCTCGAGCCCAAAGCA ATGATCACAATGCCG	
Flank B pBK47 FP	TGGAAGGCGGCCGCCCTAGACTG TGCCAGATCATAAGCCT	Zur Amplifikation des „downstream“ Bereichs der NS des pAQ1-Plasmids aus PCC7002 für die Klonierung in den pBK-Vektor
Flank B pBK47 RP	CATCCGAGCCATGGCTCGAGTAA GCTCGGAATCCCT	
CrtZ A.PC-1 FP	AGCGTCAGATCTCATATGACACA GTTTCTCATCGTCGTGG	Zur Amplifikation des Hydroxylase-Gens mit Ursprung in A.PC-1 für die Klonierung in den pSyn-Vektor
CrtZ A.PC-1 RP	GCATACAGTACTCTATTACGACG GGCGTTCATCTTGG	
NSIICrtZA.PC-1BBFP	AGTACTGTATGCATCGAGTGCCT	Zur Amplifikation des pBKcrtZA.PC-1-Vektors, um ihn als lineares Fragment in der Klonierung einzusetzen
NSIICrtZA.PC-1BBRP	CTATTACGACGGGCGTTCATCTTG G	
WInsCrtZA.PC-1FP	CGCCCGTCGTAATAGAGGAGCGT CAGATCTCATATGACT	Zur Amplifikation des Ketolase-Gens mit Ursprung in Brev. Für die Klonierung in den pBKcrtZA.PC-1-Vektor
WInsCrtZA.PC-1RP	GATGCATACAGTACTTCAAGATTC GCCCGCCA	
pBK47pAQ1 fw	TCTAGATCCAACGCTCGG	

pBK47pAQ1 rev	ATGATTAATCTCCTACTTGACTTT	Zur Amplifikation des pBK-Vektors, um ihn als lineares Fragment in der Klonierung einzusetzen
EcoMSBAI FP	TAGGAGATTAATCATATGCACAA TGACAAAGATTTAAGT	Zur Amplifikation des EcoMSBA1-Transporter-Gens.
EcoMSBAI RP	AGCGTTGGATCTAGACTACTGTC CAAATTGCATCTTGTGG	Für die Klonierung in den pBK-Vektor
pSynFlanke1 FP	CCATGGCTCGGATGCAATCG	Zur Amplifikation des pSynFlanke1-Vektors, um die NS „downstream“ auszutauschen
pSynFlanke1 RP	GCGGCTAGCGATTTGGGTAG	
Flanke B FP	CAAATCGCTAGCCGCCCTAGAC TGTGCCAGATCATAAGC	Zur Amplifikation des „downstream“ Bereichs der NS des pAQ1-Plasmids aus PCC7002 für die Klonierung in den pSynFlanke1-Vektor
Flanke B RP	GCATCCGAGCCATGGTCGAGTAA GCTCGGAATCCCTTACC	
pSynFlanke FP	GCTAGTCATCGCCACGTTGTG	Zur Amplifikation des pSyn-Vektors, um die NS „upstream“ auszutauschen
pSynFlanke RP	GGGCCAGCACACATGTG	
Flanke 1 FP	ATGTGTGCTGGGCCCCGATCGCT CTCACCAAAG	Zur Amplifikation des „upstream“ Bereichs der NS des pAQ1-Plasmids aus PCC7002 für die Klonierung in den pSyn-Vektor
Flanke 1 RP	GTGGCGATGACTAGCGCCTCCTG AATAAATCTATTTATAC	
pSynNSIIBB für Eco FP	AGTACTGTATGCATCGAGTGCCT G	Zur Amplifikation des pSyn-Vektors, um ihn als lineares Fragment in der Klonierung einzusetzen
pSynNSIIBB für Eco RP	ATGAGATCTGACGCTCCTTCGAG	
EcoMSBAI Insert NSII FP	AGCGTCAGATCTCATATGCACAA TGACAAAGATTTAAGT	Zur Amplifikation des EcoMSBA1-Transporter-Gens.
EcoMSBAI Insert NSII RP	GATGCATACAGTACTCTACTGTCC AAATTGCATCTTGTGG	Für die Klonierung in den pSyn-Vektor
CrtZCrtWBB für Eco FP	ACTGTATGCATCGAGTGCCTGG	Zur Amplifikation des pSynCrtWCrtZ-Vektors, um ihn als lineares Fragment in der Klonierung einzusetzen
CrtZCrtWBB für Eco RP	ACTTCAAGATTCGCCCCGCC	
EcoMSBAI Insert CrtZCrtW FP	GGCGAATCTTGAAGTAGGAGCGT CAGATCTCATATGCAC	Zur Amplifikation des EcoMSBA1-Transporter-Gens.
EcoMSBAI Insert CrtZCrtW RP	CTCGATGCATACAGTACTCTACTG TCCAAATTGCATCTTG	Für die Klonierung in den pSynCrtWCrtZ-Vektor
PSY für NSI FP	AGCGTCAGATCTCATATGCTGCA ATTGTCTAGACTTCAAC	Zur Amplifikation des Phytoen-Synthase-Gens. Für die Klonierung in den pSyn_Kan-Vektor
PSY für NSI RP	GATGCATACAGTACTTTACAACAC TTGCGATCGC	
BB fuer 70 47 fp	TAATCTAGATCCAACGCTCGG	Zur Amplifikation des pBK-Vektors, um ihn als lineares Fragment in der Klonierung einzusetzen
BB fuer 70Eco rp	TCTTGTTGCCTCCTTAGCAGG	



InsertEcoMSBA170fp	AAGGAGGCAACAAGAATGCACA ATGACAAAGATTTAAGT	Zur Amplifikation des EcoMSBA1-Transporter-Gens.
InsertEcoMSBA170rp	GTTGGATCTAGACTACTGTCCAAA TTGCATCTTGTGGA	Für die Klonierung in den pBK- Vektor
Insert CrtW 47 fp	TAGGAGATTAATCATATGACTGC GGCAGTCGCC	Zur Amplifikation des Ketolase- Gens mit Ursprung in Brev. Für die Klonierung in den pBK- Vektor
Insert CrtW 47 rp	GTTGGATCTAGATTAAGATTCGC CCCGCCACAGACG	
Insert CrtZ 47 fp	TAGGAGATTAATCATATGACACA GTTTCTCATCGTCG	Zur Amplifikation des Hydroxylase-Gens mit Ursprung in A.PC-1. für die Klonierung in den PBK-Vektor
Insert CrtZ 47 rp	GTTGGATCTAGATTACGACGGGC GTTTCATCTTGG	
BBfuer47CrtZCrtWfp	TCTGCAGGAGCAGAAGAGC	Zur Amplifikation des pBKCrtZ- Vektors, um ihn als lineares Fragment in der Klonierung einzusetzen
BBfuer47CrtZCrtWrp	ATAAAAAACGCCCGGCGGC	
InsertCrtW47CrtZfp	CCGGGCGTTTTTATACTGTAGA GAAGAGTCCCTGA	Zur Amplifikation des Ketolase- Gens mit Ursprung in Brev. Für die Klonierung in den pBKCrtZ- Vektor
InsertCrtW47CrtZrp	TTCTGCTCCTGCAGAAAAACGC CCGGCGGCAA	
<b>Primer für die RI-Zahl- Bestimmung</b>	<b>Sequenzen</b>	<b>Verwendungszweck</b>
WTpAQ1 Nachweis FP	GAGGGCTTTGTATTTAAGCCGG	Primer für den Nachweis der unveränderten NS des pAQ1- Plasmid aus PCC7002. Primer- Paar ergibt ein 500 bp Fragment
WTpAQ1 Nachweis RP	TCCCGATACCGCAGAGCAAA	
WTNSII Nachweis FP	GAAGAACTATATGGTGCGGCC	Primer für den Nachweis der unveränderten NS2 aus PCC7002. Primer-Paar ergibt ein 500 bp Fragment
WTNSII Nachweis RP	GAGTTAACCCACCGAACTTGAT	
CrtwCrtZNachweisFP	CCCGTCAGACCTGGATTGG	Primer für den Nachweis einer mit den Genen <i>crtWcrtZ</i> veränderten NS in PCC7002. Primer-Paar ergibt ein 500 bp Fragment
CrtWCrtZNachweisRP	TAATAACGCCGGTGCTGCC	
PSY Nachweis FP	CTGTAGCCTTGGGCGATCG	Primer für den Nachweis einer mit dem Gen <i>psy</i> veränderten NS in PCC7002. Primer-Paar ergibt ein 500 bp Fragment
PSY Nachweis RP	AAGGCCACATCTGGATCGG	
<b>qPCR-Primer</b>	<b>Sequenzen</b>	<b>Verwendungszweck</b>
cDNA CrtW FP	GCTCGTTATTGTACCCGCTATC	Primer, um die cDNA des Ketolase-Gens mit Ursprung in Brev. zu amplifizieren
cDNA CrtW RP	GCGTACAAGCCCAAAGTTAAG	
cDNA CrtZ FP	TGTTCTCACAGCCTTTCTC	Primer, um die cDNA des Hydroxylase-Gens mit Ursprung in Brev. zu amplifizieren
cDNA CrtZ RP	CAAACACTACCGGAAGAG	
cDNA CrtR FP	GGGTAAACCCTGGCATTITTC	Primer, um die cDNA des Stamm eigenen Oxygenase-Gens zu amplifizieren
cDNA CrtR RP	AGGCATCCAGTATGGCTTC	

cDNA ppC FP	GCCGCTTCTACTTTATTTTCCC	Primer, um die cDNA des Stamm eigenen Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Gens zu amplifizieren
cDNA ppC RP	TCCCCGACATCTACGAAAC	
<b>Sequenzierungs-Primer</b>	<b>Sequenzen</b>	<b>Verwendungszweck</b>
Seq pSyn FP	TTCATCCGTTTCCACGGT	Zur Sequenzierung eines in den pSyn-Vektor klonierten Gens ausgehend vom Promotor
Seq pSynNSII RP	TTCGCCAATCACAGTGATC	Zur Sequenzierung eines in den pSynNSII-Vektor klonierten Gens ausgehend vom Terminator
Seq pSynNSI RP	GTTGCGGACGTAGCTTTC	Zur Sequenzierung eines in den pSynNSI-Vektor klonierten Gens ausgehend vom Terminator
Seq mittig EcoMSBAI FP	ATTGTCTGGCACCCATCG	Zur Sequenzierung des EcoMSBAI-Gens Start der Sequenzierung ist in der Mitte des Gens
Seq pBK FP	GCCAATGCCTGACGATGC	Zur Sequenzierung eines in den pBK-Vektor klonierten Gens ausgehend vom Promotor
Seq pBK RP	CCTTCCAGATGTATGCTC	Zur Sequenzierung eines in den pBK-Vektor klonierten Gens ausgehend vom Terminator
<b>Nachweis-Primer</b>	<b>Sequenzen</b>	<b>Verwendungszweck</b>
CrtW FP	AAAACATATGACTGCGGCAGTCG	Primer für den Nachweis des Ketolase-Gens in PCC7002 via PCR
CrtW RP	AAAaAGTACTTCAAGATTGCCCCGC	
CrtZ FP	AAAACATATGGCCTGGCTGACG	Primer für den Nachweis des Hydroxylase-Gens in PCC7002 via PCR
CrtZ RP	AAAAAGTACTTCATGCACCGGAACTGGAAC	
CrtZ A.PC-1 FP	AGCGTCAGATCTCATATGACACA GTTTCTCATCGTCGTGG	Primer für den Nachweis des Hydroxylase-Gens aus A.PC-1 in PCC7002 via PCR
CrtZ A.PC-1 RP	GCATACAGTACTCTATTACGACG GGCGTTCATCTTGG	
EcoMSBAI FP	GCCCCATTTTGATCTTGG	Primer für den Nachweis des EcoMSBAI-Gens in PCC7002 der „revers“ Primer muss dabei je nach NS ausgewählt werden
NSIIcoMSBAI RP	TTCGCCAATCACAGTGATC	
NSIcoMSBAI RP	GTTGCGGACGTAGCTTTC	
PSY FP	GCGGGAGTTATCGATGAGC	Primer für den Nachweis des Phytoen-Synthase-Gens in den NS von PCC7002 der „revers“ Primer muss dabei je nach NS ausgewählt werden. Das Stamm eigene PSY-Gen wird hierbei nicht amplifiziert.
NSIIPSY RP	TTCGCCAATCACAGTGATC	
NSIPSY RP	GTTGCGGACGTAGCTTTC	

Tabelle 24: Liste aller erzeugten Vektoren

Nr.	Vektor
1	pSynNSIII
2	pSynNSII
3	pSynNSI
4	pSynNSI_Kan
5	pSynNSI_Kan_CrtZ
6	pSynNSII_CrtW
7	pSynNSII_CrtZ
8	pSynNSI_Kan_CrtW
9	pSynNSII_CrtZCrtW
10	pSynNSII_CrtWCrtZ
11	pSynNSII_CrtZ A.PC-1
12	pSynNSI_Kan_CrtZ A.PC-1
13	pSynNSII_CrtZ A.PC-1_CrtW
14	pSynNSI_Kan_CrtZHis
15	pSynNSII_CrtWHis
16	pSynNI_Kan_CrtZ A.PC-1His
17	pSynNSII_CrtZHisCrtWHis
18	pSynNSII_CrtZ A.PC-1HisCrtWHis
19	pSynNSII_CrtWHisCrtZ A.PC-1His
20	pSynNSII_CrtZGPF
21	pSynNSII_CrtWGFP
22	pSynNSII_CrtZ A.PC-1GFP
23	pBKNSI
24	pBKNSIII
25	pBKpAQ1
26	pSynpAQ1_CrtWCrtZ A.PC-1
27	pSynpAQ1_EcoMSBAI
28	pSynNSII_EcoMSBAI
29	pSynNSII_CrtZ A.PC-1CrtWEcoMSBAI
30	pSynNSII_PSY
31	pSynNSI_Kan_PSY
32	pBKpAQ1_CrtW
33	pBKpAQ1_CrtZ A.PC-1
34	pBK70EcoMSBAI
35	pBKpAQ1_CrtWCrtZ A.PC-1

Tabelle 25: Liste von erzeugten *Synechococcus* sp. PCC7002 Stämmen

Vektor	Transformiert in	Stamm
-	-	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002
pSynNSII	WT	PCC7002 NSII
pSynNSI	WT	PCC7002 NSI
pSynNSI_Kan	WT	PCC7002 NSI_Kan
pSynNSI_Kan_CrtZ	WT	PCC7002 NSI_Kan_CrtZ
pSynNSII_CrtW	WT	PCC7002 NSII_CrtW
pSynNSII_CrtZ	WT	PCC7002 NSII_CrtZ
pSynNSI_Kan_CrtW	WT	PCC7002 NSI_Kan_CrtW
pSynNSII_CrtZCrtW	WT	PCC7002 NSIICrtZCrtW
pSynNSII_CrtWCrtZ	WT	PCC7002 NSIICrtWCrtZ
pSynNSII_CrtZ A.PC-1	WT	PCC7002 NSIICrtZ A.PC-1
pSynNSI_Kan_CrtZ A.PC-1	WT	PCC7002 NSI_KanCrtZ A.PC-1
pSynNSII_CrtZ A.PC-1_CrtW	WT	PCC7002 NSIICrtZ A.PC-1CrtW
pSynNSI_Kan_CrtZHis	WT	PCC7002 NSI_KanCrtZHis
pSynNSII_CrtWHis	WT	PCC7002 NSIICrtWHis
pSynNI_Kan_CrtZ A.PC-1His	WT	PCC7002 NI_KanCrtZ A.PC-1His
pSynNSII_CrtZHisCrtWHis	WT	PCC7002 NSIICrtZHisCrtWHis
pSynNSII_CrtZ A.PC-1HisCrtWHis	WT	PCC7002 NSIICrtZ A.PC-1HisCrtWHis
pSynNSII_CrtWHisCrtZ A.PC-1His	WT	PCC7002 NSIICrtWHisCrtZ A.PC-1His
pSynNSII_CrtZGPF	WT	PCC7002 NSIICrtZGPF
pSynNSII_CrtWGFP	WT	PCC7002 NSIICrtWGFP
pSynNSII_CrtZ A.PC-1GFP	WT	PCC7002 NSIICrtZ A.PC-1GFP
pBKNSI	WT	PCC7002 pBKNSI
pBkNSIII	WT	PCC7002 pBkNSIII
pBKpAQ1	WT	PCC7002 pBKpAQ1
pSynpAQ1_CrtWCrtZ A.PC-1	WT	PCC7002 pAQ1_CrtWCrtZ A.PC-1
pSynpAQ1_EcoMSBAI	WT	PCC7002 pAQ1_EcoMSBAI
pSynNSII_EcoMSBAI	WT	PCC7002 NSII_EcoMSBAI
pSynNSII_CrtZ A.PC-1CrtWEcoMSBAI	WT	PCC7002 NSIICrtZ A.PC-1CrtWEcoMSBAI
pSynNSII_PSY	WT	PCC7002 NSII_PSY
pSynNSI_Kan_PSY	WT	PCC7002 NSI_Kan_PSY
pBKpAQ1_CrtW	WT	PCC7002 pBKpAQ1_CrtW
pBKpAQ1_CrtZ A.PC-1	WT	PCC7002 pBKpAQ1_CrtZ A.PC-1
pBK70EcoMSBAI	WT	PCC7002 pBK70EcoMSBAI

Kombination von Vektoren	Transformiert in	Stamm
pBKpAQ1_CrtW_CrtZ A.PC-1	WT	PCC7002 pBKpAQ1_CrtW_CrtZ A.PC-1 (Stamm A)
pSynNSI_Kan_CrtZ pSynNSII_CrtW	pSynNSI_Kan_CrtZ	PCC7002 NSICrtZ1_NSIIcrtW2
pSynNSII_CrtW pSynNSI_Kan_CrtZ	pSynNSII_CrtW	PCC7002 NSICrtZ2_NSIIcrtW1
pSynNSII_CrtW pSynNSI_KanCrtZ A.PC-1	pSynNSII_CrtW	PCC7002 NSICrtZ A.PC-12_NSIIcrtW1
pSynNSI_KanCrtZ A.PC-1 pSynNSII_CrtW	pSynNSI_KanCrtZ A.PC-1	PCC7002 NSICrtZ A.PC-11_NSIIcrtW2
pSynNSI_Kan_CrtZ A.PC-1CrtW pBK70EcoMSBAI	pSynNSI_KanCrtZ A.PC-1CrtW	PCC7002 NSICrtZ A.PC-1 NSII70EcoMSBAI
pSynNSII_CrtZ A.PC-1CrtW pSynNSI_Kan_PSY	pSynNSII_CrtZ A.PC-1CrtW	PCC7002 NSIIcrtZ A.PC-1CrtW_NSI_KanPSY
pSynpAQ1_CrtZ A.PC-1CrtW pBK70EcoMSBAI	pSynpAQ1_CrtZ A.PC-1CrtW	PCC7002 pAQ1CrtZ A.PC-1CrtW_NSII70EcoMSBAI
pSynpAQ1_CrtZ A.PC-1CrtW pSynNSI_Kan_PSY	pSynpAQ1_CrtZ A.PC-1CrtW	PCC7002 pAQ1CrtZ A.PC-1CrtW_NSI_KanPSY
pSynNSII_EcoMSBAI pBKpAQ1_CrtW_CrtZ A.PC-1	pSynNSII_EcoMSBAI	PCC7002 NSIIEcoMSBAI_pBKpAQ1CrtWCrtZ A.PC-1 (Stamm AT)
pSynNSII_PSY pBKpAQ1_CrtW_CrtZ A.PC-1	pSynNSII_PSY	PCC7002 NSIIPSY1_pBKpAQ1CrtWCrtZ A.PC-12

## 12.6 HPLC-Chromatogramme der Standardsubstanzen

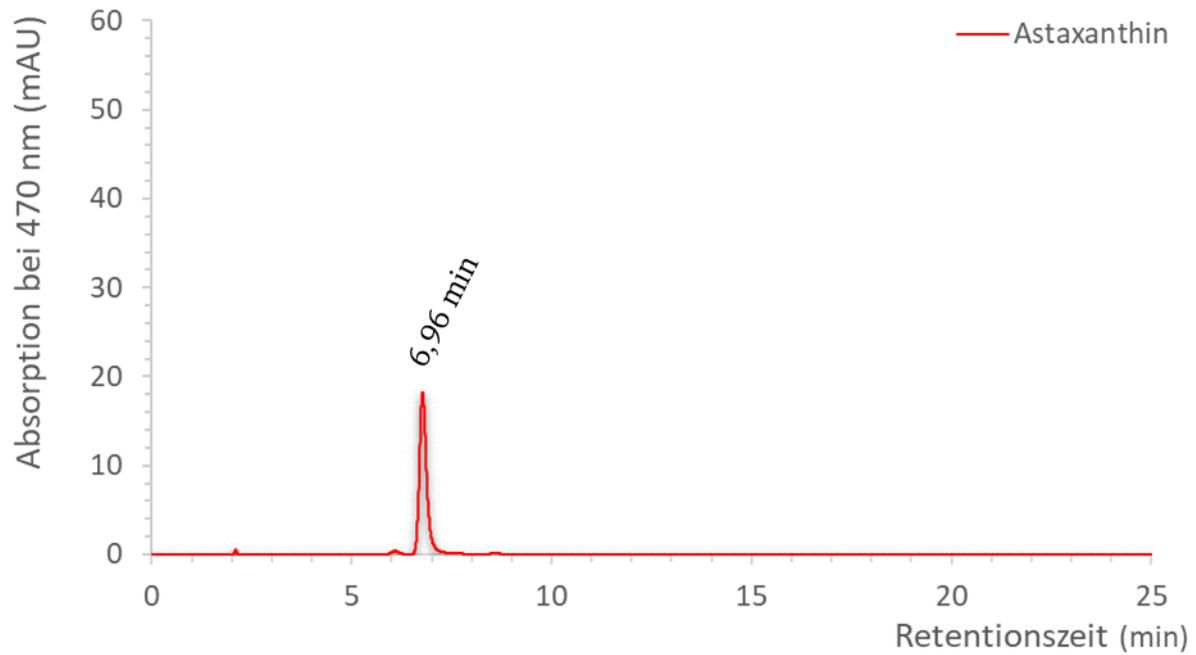


Abbildung 34: HPLC-Chromatogramm des All-trans-3S,3'S-Astaxanthin-Standards. Die Retentionszeit lag bei 6,96 min. und es wurden 0,005 µg Astaxanthin aufgetragen.

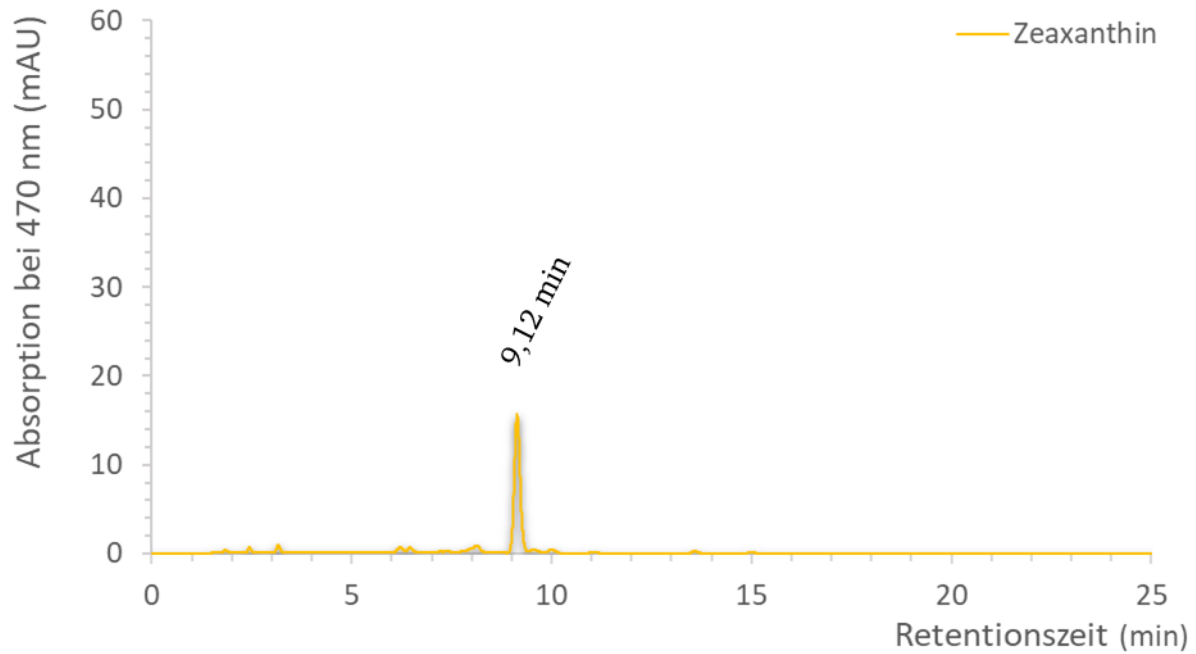


Abbildung 35: HPLC-Chromatogramm des Zeaxanthin-Standards. Die Retentionszeit lag bei 9,12 min. und es wurden 0,005 µg Zeaxanthin aufgetragen.

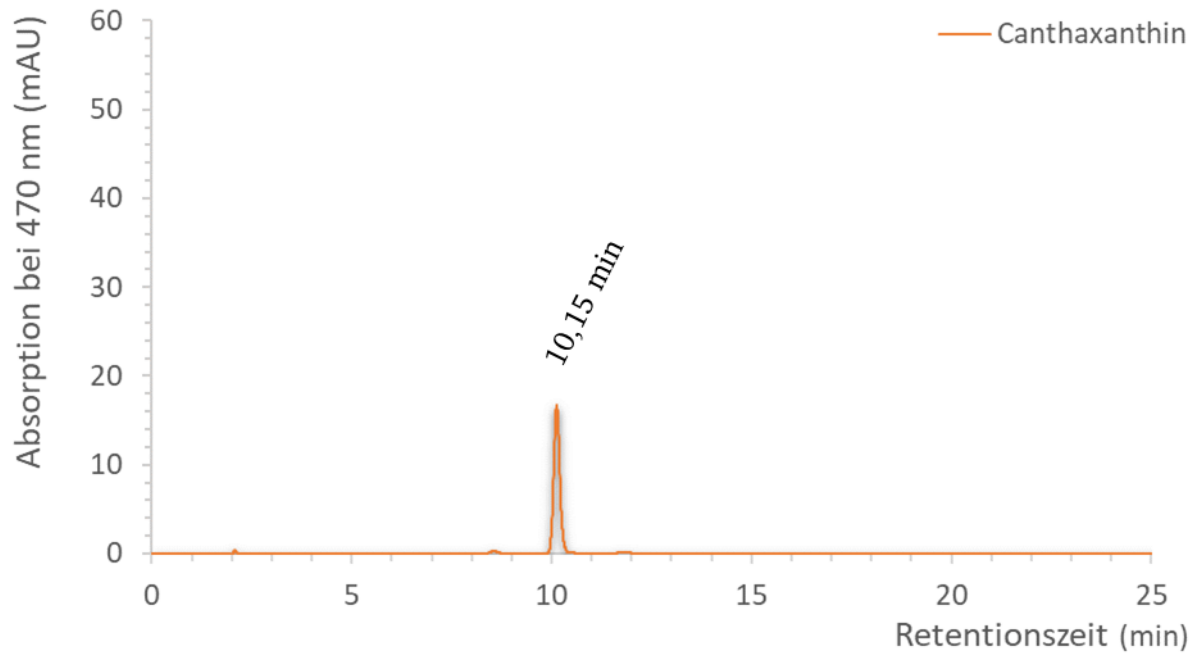


Abbildung 36: HPLC-Chromatogramm des Canthaxanthin-Standards. Die Retentionszeit lag bei 10,15 min. und es wurden 0,005  $\mu\text{g}$  Canthaxanthin aufgetragen.

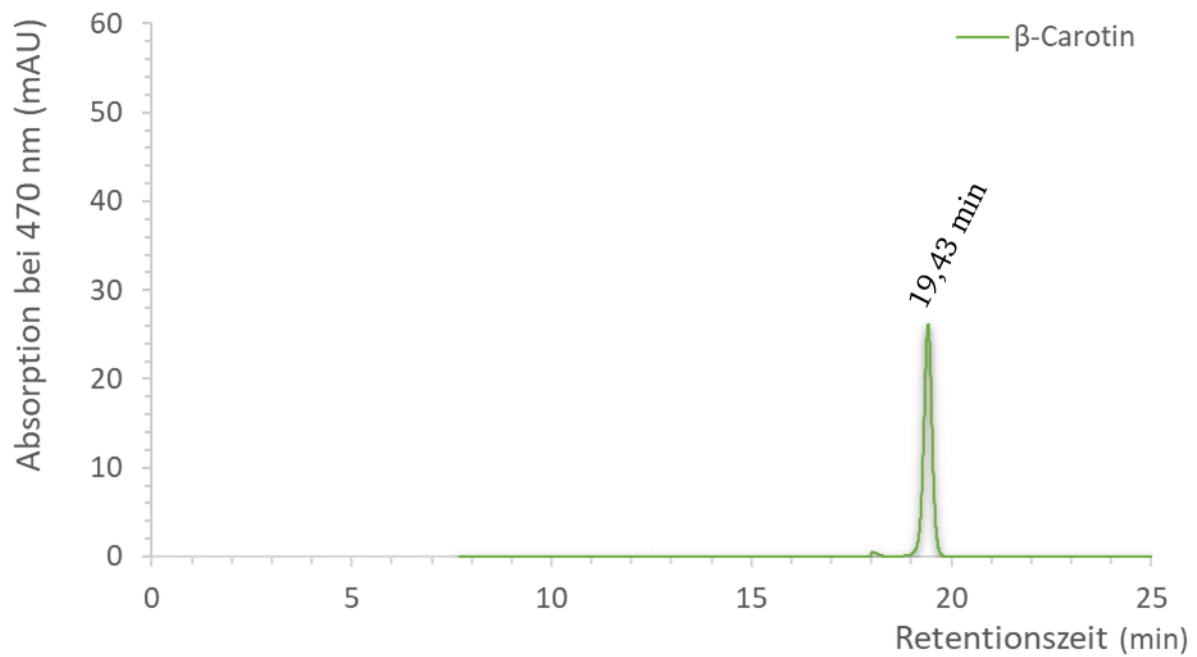


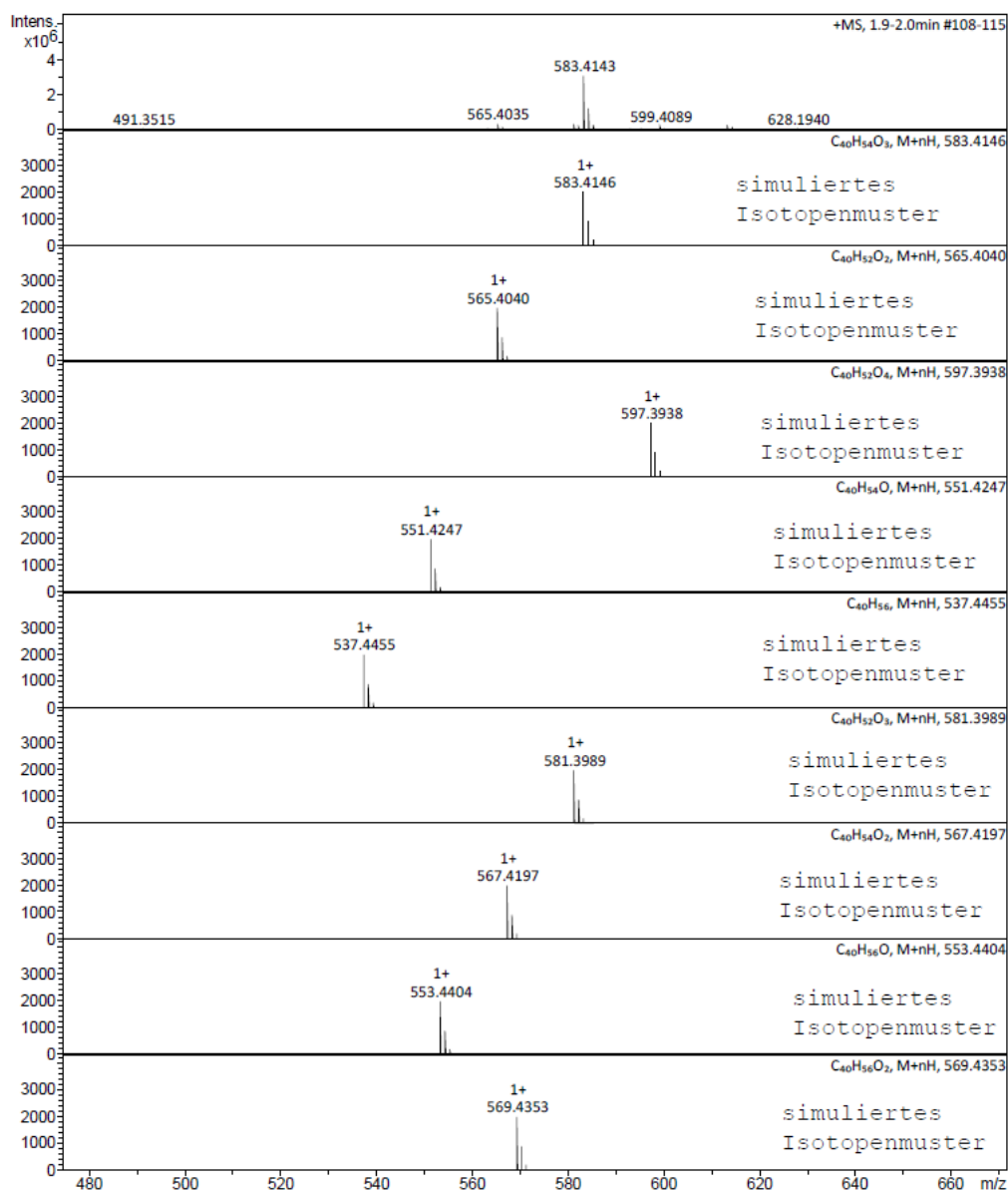
Abbildung 37: HPLC-Chromatogramm des  $\beta$ -Carotin-Standards. Die Retentionszeit lag bei 19,43 min. und es wurden 0,01  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Carotin aufgetragen.

## 12.7 HPLC-MS Ergebnisse

Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten stammen aus der Analyse von Carotinoid-Extrakten durch die Abteilung für Massenspektrometrie des Fachbereichs Chemie der TU Darmstadt und wurden nicht selbst erzeugt. Es sind zwei Analysen des Stammes *Synechococcus* sp. PCC7002 NSII CrTW Brev. CrTZ A.PC-1 dargestellt. Denn in diesen Extrakten musste Adonirubin und Adonixanthin identifiziert werden.

### Mass spectrum

Analysis	D:\Data\Kaldenhoff\90756_APCI_HPLC_P1-E-2_01_23964.	Acquisition Date	21.02.2023 11:29:08
Sample Name	90756_APCI_HPLC	Ionisation	APCI Positive
Method	apci_hplc_pos_1600.m	Mass Range	50 m/z - 1600 m/z
Client	Greulich_Probe1 Extrakt	Operator	Rudolph_Finn

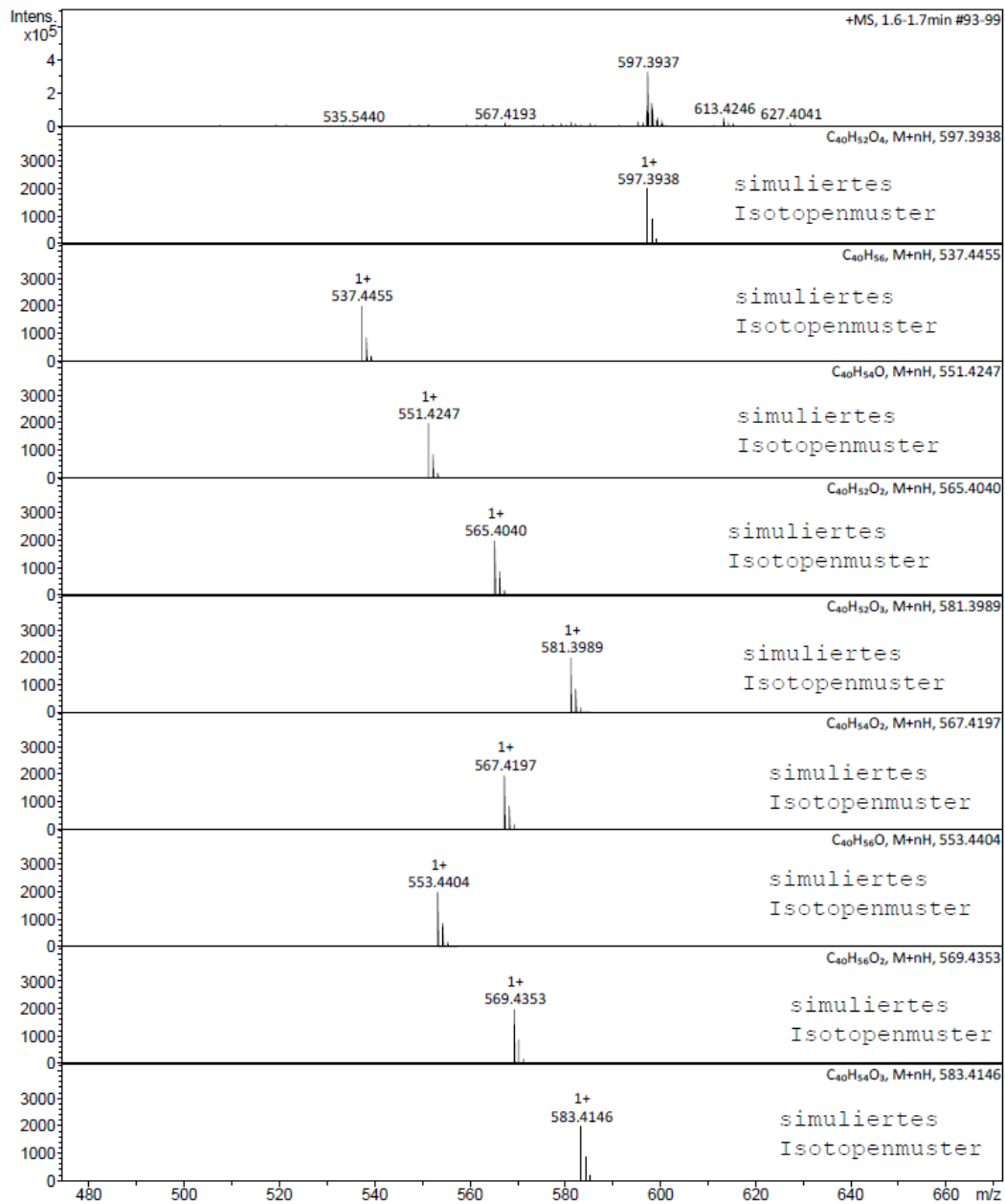


Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, Technische Universität Darmstadt Instrument: Bruker Impact II

Abbildung 38: Teilergebnis der Analyse für Probe 1. In diesem Teil kann Adonixanthin identifiziert werden. Der Vergleich mit simulierten Ergebnissen, ermöglicht die Identifikation der gefundenen Stoffe.



Analysis	D:\Data\Kaldenhoff\90756_APCI_HPLC_P1-E-2_01_23964.	Acquisition Date	21.02.2023 11:29:08
Sample Name	90756_APCI_HPLC	Ionisation	APCI Positive
Method	apci_hplc_pos_1600.m	Mass Range	50 m/z - 1600 m/z
Client	Greulich_Probe1 Extrakt	Operator	Rudolph_Finn

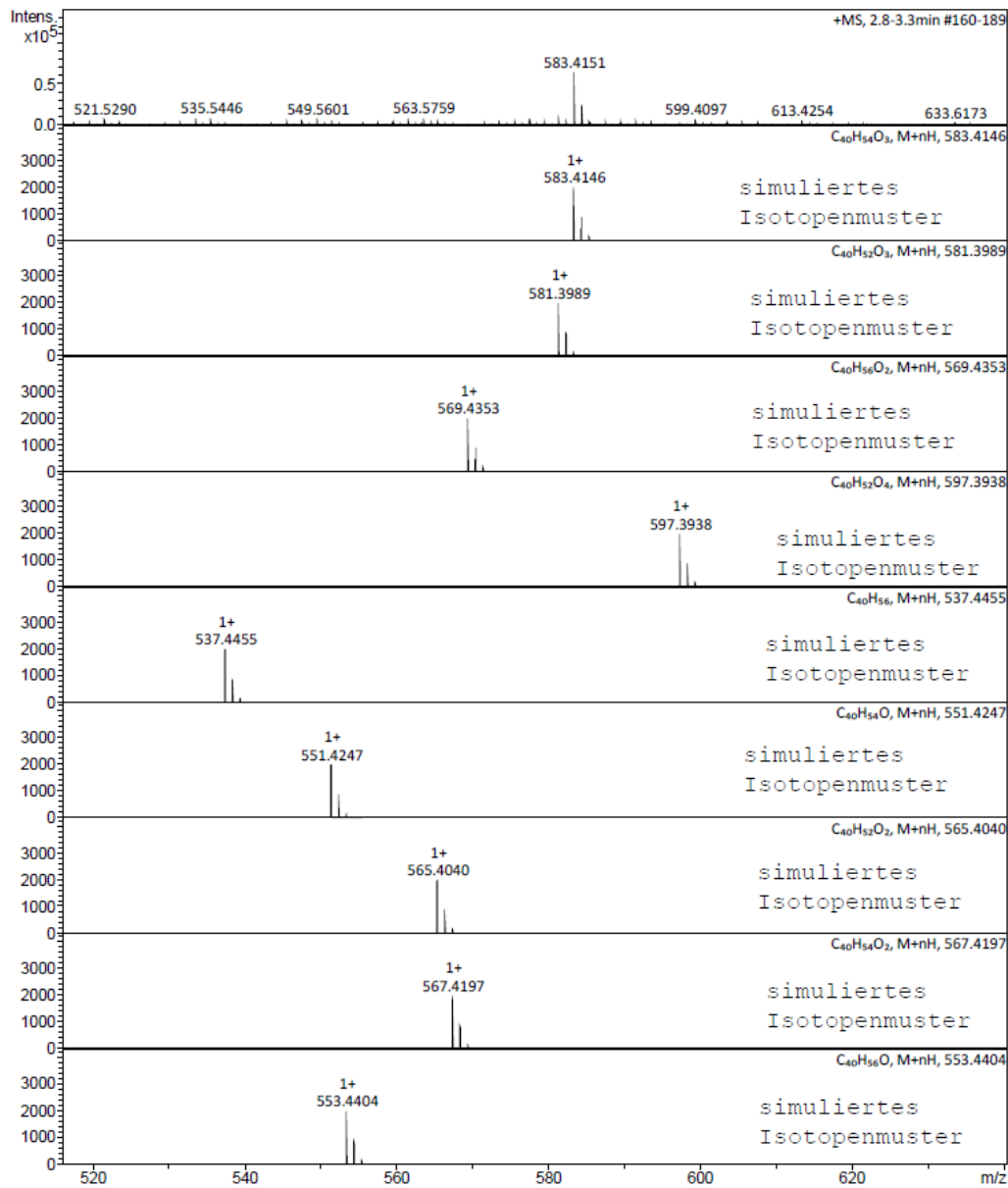


Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, Technische Universität Darmstadt Instrument: Bruker Impact II  
Page 1 of 2

Abbildung 39: Teilergebnis der Analyse für Probe 1. In diesem Teil kann Adonirubin identifiziert werden. Der Vergleich mit simulierten Ergebnissen, ermöglicht die Identifikation der gefundenen Stoffe.

## Mass spectrum

Analysis	D:\Data\Kaldenhoff\90755_APCI_HPLC_P1-E-1_01_23963.	Acquisition Date	21.02.2023 11:12:45
Sample Name	90755_APCI_HPLC	Ionisation	APCI Positive
Method	apci_hplc_pos_1600.m	Mass Range	50 m/z - 1600 m/z
Client	Greulich_Probe2 Extrakt	Operator	Rudolph_Finn



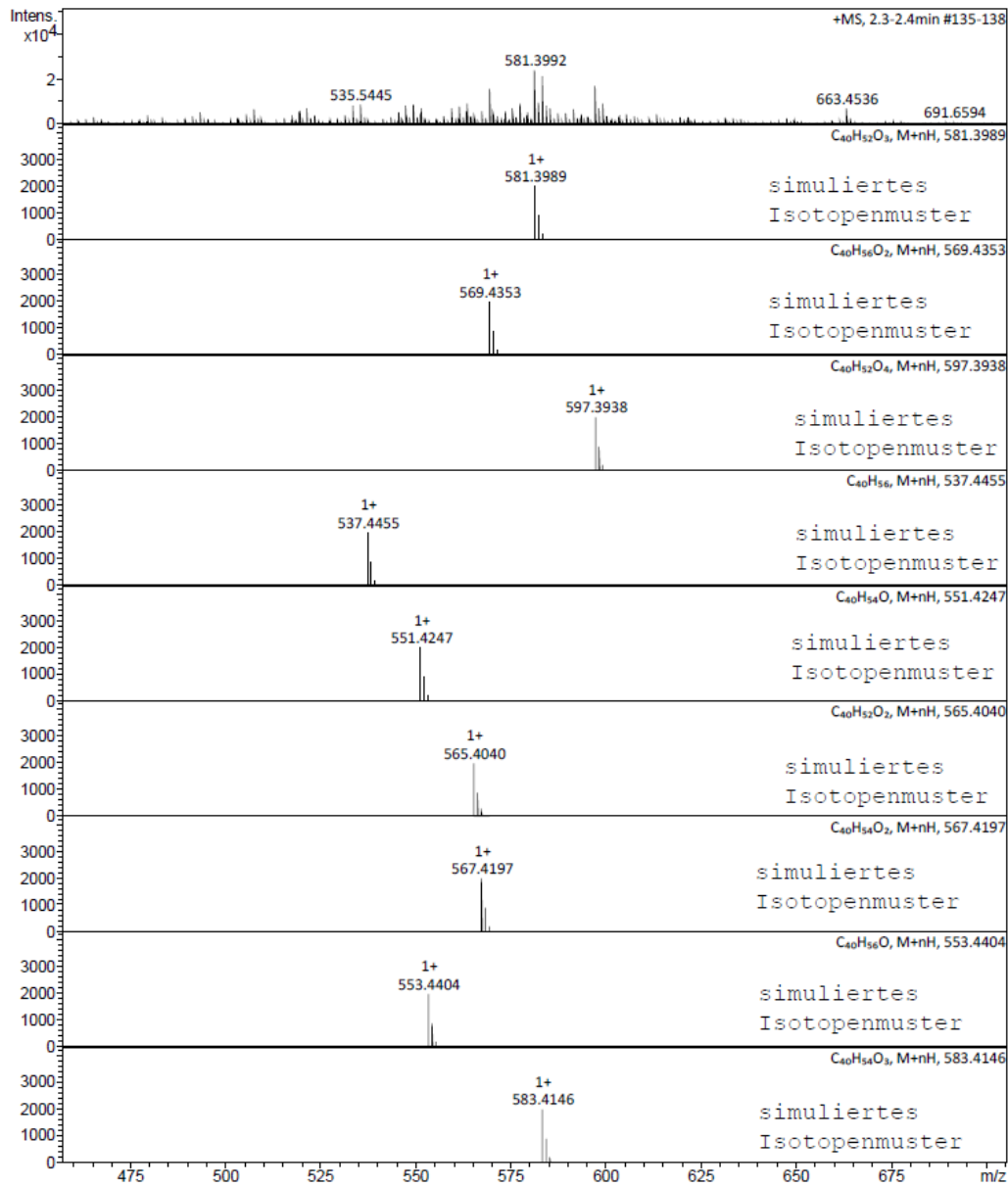
Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, Technische Universität Darmstadt Instrument: Bruker Impact II

Page 1 of 1

Abbildung 40: Teilergebnis der Analyse für Probe 2. In diesem Teil kann Adonixanthin identifiziert werden. Der Vergleich mit simulierten Ergebnissen, ermöglicht die Identifikation der gefundenen Stoffe.

## Mass spectrum

Analysis	D:\Data\Kaldenhoff\90755_APCI_HPLC_P1-E-1_01_23963	Acquisition Date	21.02.2023 11:12:45
Sample Name	90755_APCI_HPLC	Ionisation	APCI Positive
Method	apci_hplc_pos_1600.m	Mass Range	50 m/z - 1600 m/z
Client	Greulich_Probe2 Extrakt	Operator	Rudolph_Finn



Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, Technische Universität Darmstadt Instrument: Bruker Impact II  
Page 1 of 1

Abbildung 41: Teilergebnis der Analyse für Probe 1. In diesem Teil kann Adonirubin identifiziert werden. Der Vergleich mit simulierten Ergebnissen, ermöglicht die Identifikation der gefundenen Stoffe.

## 12.8 Beim Ideenwettbewerb der TU Darmstadt eingereichtes Nebenprojekt

Für die Arbeit mit Mikroalgen ist die Überwachung des Wachstums wichtig. In der Regel wird für die Kontrolle dieses in Flüssigkulturen die Zellzahl, die Trockenmasse oder optische Dichte bestimmt. Für viele Mikroalgen ist das automatisierte Zellenzählen noch nicht möglich, da sie für die Zählmaschinen zu klein sind. Auch die Trockenmassen-Bestimmung ist für die Anwendung in der wissenschaftlichen Forschung ungeeignet, da zu große Volumina für eine sichere Messung benötigt werden. Die Wachstumsbestimmung mittels optischer Dichte ist daher am weitesten verbreitet. Diese hat aber das Problem, dass eine Vermessung von Kulturen nur bis zu einem Wert von eins, ohne Verdünnung der Probe möglich ist. Die Industrie hat für diesen Zweck Sensoren entwickelt, die die Trübung messen und dadurch auf die optische Dichte, Zellzahl oder Trockenmasse zurückschließen. Da diese Sensoren jedoch eher für die Industrie konzipiert wurden, sind sie meist nicht umgebungslichtunabhängig und sehr groß; denn in der Industrie kommen solche Sensoren in der Regel in geschlossenen Fermentern mit einer Größe von mehreren hundert bis tausend Litern zum Einsatz. Ein weiterer Negativpunkt ist, dass diese Sensoren kostspielig sind. Ein Sensor kostet zwischen 500 und 3000 Euro. In der Forschung werden aber häufig viele Proben auf einmal kultiviert und so bedürfte es einer ganzen Reihe an Sensoreinheiten.

Das Ziel ist aus diesem Grund, die Entwicklung eines umgebungslichtunabhängigen und kostengünstigen Sensors für die Überwachung von vielen Laborreaktoren gleichzeitig.

Der entwickelte Sensor beinhaltet einen Infrarotemitter und eine Photodiode. Emitter und Photodiode sind aufeinander ausgerichtet. Durch den Lichtstrahl des Emitters erregt, erzeugt die Photodiode einen zur Intensität des Lichtstrahls proportionalen Strom. Dieser Strom wird mit einem Operationsverstärker als Transimpedanzverstärker in eine messbare Spannung umgewandelt. Mit steigender Trübung/Zell-dichte verringert sich die Lichtintensität des auf die Photodiode gerichteten Lichtstrahls. Dadurch wird der erzeugte Strom gemindert, wodurch auch die messbare Spannung gemindert wird. Der Wert der Spannung wird mit einem hochauflösenden Analog/Digital-Wandler diskretisiert und als Spannungsdifferenzsignal von einem Mikroprozessor verarbeitet. Dieser Mikroprozessor versendet anschließend die Daten per WLAN an einen Server im selben Netzwerk. Ein Prototyp ist in Abbildung 42 gezeigt. Zusätzlich gibt es eine auf „open sources“ basierende Software zur Steuerung und Datensicherung.

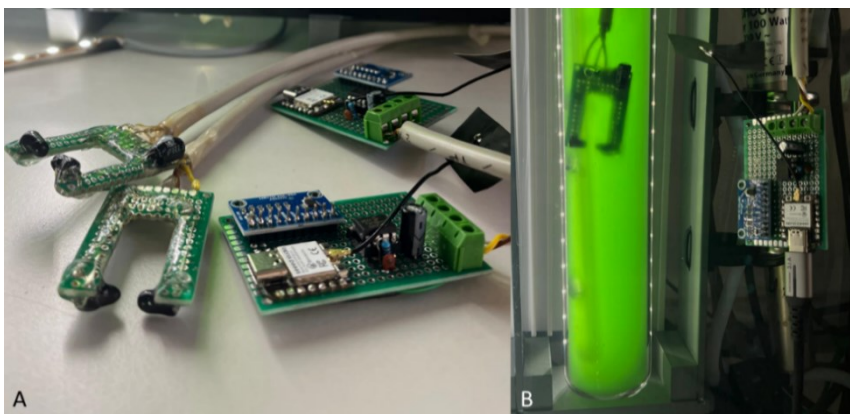


Abbildung 42: Prototyp des entwickelten Sensors. A) Übersicht über den Messkopf und die Datenverarbeitungs-Platine. B) Verwendung des Prototyps in einer Synechococcus-Kultur.

---

## 12.9 Lebenslauf

von Simon Greulich

### Akademische Ausbildung

10.2015 – 09.2019	Bachelor of Science Biomolecular Engineering an der TU Darmstadt
10.2019 – 03.2021	Master of Science Biomolecular Engineering
15.04.2021 – heute	PhD Kandidat am Fachbereich Biologie der TU Darmstadt
12.2022 – heute	Mitglied der „International Graduate School Life Science Engineering“

### Veröffentlichungen

25. Oktober 2020	Vinh TQ, Trung TN, Balasus J., Sharma S., Hegemann T., Greulich S., Khanh TQ, and Kaldenhoff R (2021). Light reflection spectra as a tool for direct and real-time determination of biomass and pigments in the microalgae <i>Microchloropsis salina</i> . <i>Lighting Research &amp; Technology</i> . 53(2):171-184. <a href="https://doi.org/10.1177/1477153520958455">https://doi.org/10.1177/1477153520958455</a>
13. Juni 2023	Pappert, I., Greulich, S., Joseph, F. M., Otto, B., & Kaldenhoff, R. (2023). Protein Expression in <i>Synechococcus</i> PCC 7002: A Quantitative Comparison of Promoters and Integration Sites. <i>Journal of Advances in Biology &amp; Biotechnology</i> , 26(4), 28–39. <a href="https://doi.org/10.9734/jabb/2023/v26i4629">https://doi.org/10.9734/jabb/2023/v26i4629</a>
19. März 2024	Patentanmeldung mit dem Titel „Astaxanthin-sezernierendes Cyanobakterium“; Aktenzeichen 10 2024 107 817.0
März 2024	Simon Greulich and Ralf Kaldenhoff (2024); ASTAXANTHIN SYNTHESIS IN <i>SYNECHOCOCCUS</i> PCC7002: OPTIMIZATION AND PRODUCT SECRETION TO CULTURE MEDIUM <i>Int. J. of Adv. Res.</i> (Mar). 255-263 (ISSN 2320-5407). <a href="http://www.journalijar.com">www.journalijar.com</a>
11 April 2024 (akzeptiert)	Simon Greulich, Nam Trung Tran und Ralf Kaldenhoff; Harnessing Microalgae: From Biology to Innovation in Sustainable Solutions; Sonderheft „Biological Engineering“ in <i>at – Automatisierungstechnik</i> , De Gruyter Verlag

### Drittmittel

Februar 2024	Beteiligung an der Akquirierung von Fördergeldern von der Familienstiftung Illig.
--------------	---

### Konferenzen

21 – 23.09.2022	GASB6 Conference
27 – 28.07-2023	SynBio World Cafe 2023