

Studiengang B. Sc. Biotechnologie

## Bachelorarbeit

# Expressionsanalyse neuer Promotoren von *Pichia pastoris* für die Produktion rekombinanter Multiproteinkomplexe

---

Sascha Wani

Matrikelnummer: 2071651

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung

Arbeitsgruppe Rekombinante Proteinexpression

Inhoffenstraße 7

38127 Braunschweig

Betreuer: Dr. Joop van den Heuvel, Christian Schinkowski (M. Sc.)

HAW Hamburg

Fakultät Life Sciences

Ulmenliet 20

21033 Hamburg

Betreuer: Prof. Dr. Oliver Ullrich

Eingereicht am 03. September 2015

## Zusammenfassung

*Pichia pastoris* wird seit mehreren Dekaden sowohl in der Industrie als auch in der Forschung für die Produktion rekombinanter Proteine verwendet. Die Zahl der produzierten Proteine nimmt dabei kontinuierlich zu, wobei gleichzeitig immer neue Ansätze verfolgt werden, das Expressionssystem hinsichtlich seiner Expressionsleistung zu verbessern.

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war die Untersuchung der Expressionsstärke von drei kürzlich entdeckten nativen Promotoren von *P. pastoris*. Dabei handelt es sich um die Promotoren eines Glycosylphosphatidyl-inositol-Ankerproteines ( $P_{GCW14-Wildtyp}$  und  $P_{GCW14M+20}$ ) und der Sorbitoldehydrogenase ( $P_{SDH}$ ), bei denen es sich nach aktueller Literatur um starke konstitutive Promotoren handelt. Der klassische konstitutive Promoter der Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase ( $P_{GAP}$ ) und der induzierbare Promoter der Alkoholoxidase 1 ( $P_{AOX1}$ ) wurden dabei für den Vergleich ebenfalls untersucht. Als Markerprotein wurde das rotfluoreszierende RudolphRFP verwendet, sodass die Fluoreszenz als indirektes Maß für die Expression herangezogen werden konnte.

Im Zuge der Arbeit wurden stabile *P. pastoris* X-33 Zelllinien generiert, selektiert und Einzelklone isoliert. Diese wurde daraufhin durch verschiedene Polymerase-Kettenreaktions-Ansätze hinsichtlich der erfolgreichen Integration der Expressionskassette in das Genom untersucht. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Promotoren zu gewährleisten, wurden die isolierten Klone ebenfalls auf mögliche *Tandem-Repeat*-Insertionen überprüft. Nachgewiesene Einzelinsertions-Klone wurden daraufhin in einer Testexpression in 96-*Deepwell*-Platten kultiviert und die Zellextrakte auf das Zielprotein untersucht. In den folgenden Versuchen wurden ausgewählte exprimierende Klone in Schüttelkolben kultiviert und die Fluoreszenz der Zellen mit einem Durchflusszytometer vermessen. Zeitgleich wurden in einer Hochdurchsatzkultivierung im Biolector-Mikroreaktor-System mehrere Klone je Promoter kultiviert und die Zelldichte und Fluoreszenz in einer Online-Messung gemessen. Aus den gemessenen Werten konnte als Vergleichskriterium die relative Fluoreszenz normiert auf die Biomasse berechnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass beide verwendeten Varianten des GCW14-Promoters deutliche höhere Expressionsausbeuten erzielen als der klassische GAP-Promoter.

In einem zusätzlichen Versuch wurde als Beispiel eines schwierig zu exprimierenden Proteins die extrazelluläre Domäne einer Mutante der Transmembran-Serinprotease Tmprss2 (D343N) mit  $P_{GCW14-M+20}$  exprimiert. Die Untersuchungen haben ergeben, dass der Promoter ein zum AOX1-Promoter vergleichbares Expressionslevel erzielt. Somit kann das Arsenal der für die Expression in *P. pastoris* verfügbarer Promotoren durch einen neuen starken konstitutiven Promoter ergänzt werden.

## Abstract

*Pichia pastoris* has been used for decades as an expression system to produce recombinant proteins in research and industry. So the number of produced recombinant proteins has increased continuously and new approaches have been followed to increase the performance of these systems. The aim of this project was the examination and comparison of three native promoters of *P. pastoris*, which have been recently discovered: This includes the Promoter of a glycosylphosphatidylinositol-anchor-protein ( $P_{GCW14-Wildtyp}$ ,  $P_{GCW14M+20}$ ) and of the sorbitol dehydrogenase ( $P_{SDH}$ ), which are described to be equal or stronger than the classic constitutive Promoter of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ( $P_{GAP}$ ). Additionally the strong alcoholoxidase 1 Promoter ( $P_{AOX1}$ ) were also examined. The redfluorescent protein RudolphRFP was used as markerprotein and the red fluorescence, which is applicable as a comparison criterion for the promoter performance, was measured.

To do so, stabile cell lines of *P. pastoris* X-33 cells were generated, selected and isolated. The isolated clones have been tested for a successfully integrated gene-cassette and possible multi-copy insertions using different polymerase chain reaction approaches. To guarantee the comparability, only single-insertion clones have been examined comparatively. Qualified clones have been cultivated in different systems. To test the expression of the targetprotein 96-deepwellplates have been used for the cultivation of multiple clones and the protein has been detected using western blots. Furthermore, single chosen clones have been grown in shaking flasks. For the measurement of the fluorescence a flow cytometer was used. At the same time the high-througput biolector system has been used to cultivate and measure the cell density and red fluorescence of multiple clones in an online-measurement. With the measured data the relative fluorescence has been calculated, which gives evidence for the expression performance of the different clones.

In a last experiment the  $P_{GCW14M+20}$ -Promoter, which gave the best results in the previous experiments, was used to express the difficult to express protein Tmprss2, which has already been expressed using the AOX1-Promoter. The examination showed that the  $P_{GCW14M+20}$  almost reached the performance of the inducible  $P_{AOX1}$ , which is supposed to be one of the strongest promoters in *P. pastoris*. This makes it a promising candidate for the constitutive expression of recombinant proteins in the *P. pastoris* expression system.

## **Danksagung**

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich für die Übernahme des Referats und die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Er war bei Problemen und Fragen stets zur Stelle, obwohl er selber sehr beschäftigt ist. Man hat sich nie allein gelassen gefühlt.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Dr. Joop van den Heuvel bedanken, der es mir im Rahmen meiner Bachelorarbeit ermöglichte, selbstständig und wissenschaftlich an einem sehr interessanten Thema in der Arbeitsgruppe Rekombinante Proteinexpression am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig zu arbeiten. Während der Zeit in seinem Labor habe ich sehr viele nützliche Handgriffe erlernt, Wissen hinzugewonnen und konnte mein Interesse in die Molekularbiologie erheblich verstärken. Auch für die Übernahme des Korreferats vielen Dank.

Vielen Dank auch an Christian Schinkowski, der selbst in stressigen Phasen immer offen für meine zahlreichen Fragen war und mich stets mit Rat und Tat unterstützt hat. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen. Er zeigte stets großes Interesse und Begeisterung für das Thema und trug durch seine Art immer zu einer entspannten und amüsanten Atmosphäre im Labor bei.

Sehr bedanken möchte ich mich auch beim gesamten Laborteam für die Unterstützung, die gute Stimmung und den freundlichen Umgang miteinander, sowie den zahlreichen anderen Bachelorstudenten, die den Laboralltag unglaublich bereicherten. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht, diese Arbeit in einer so lockeren und freundlichen Umgebung mit so vielen hilfsbereiten Menschen anfertigen zu können.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch meiner Familie, meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben in Braunschweig meine Abschlussarbeit zu absolvieren und mich immer in allem, was ich machen wollte, unterstützt haben, und ganz besonders meiner Mutter, die auch in den stressigsten Phasen immer ein offenes Ohr für meine zahlreichen Probleme hatte. Ich möchte mich auch bei meinen Freunden bedanken, die mich in dieser arbeitsintensiven Phase aufgemuntert und unterstützt haben und viel Geduld mit mir bewiesen.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Pichia pastoris</i> als Expressionssystem .....	2
1.2 Promotoren .....	5
1.2.1 Der Alkoholoxidase 1-Promoter.....	6
1.2.2 Der GAP-Promoter .....	8
1.2.3 Der GCW14-Promoter.....	8
1.2.4 Der SDH-Promoter .....	9
1.3 Fluoreszierende Proteine als Markerproteine in Hefe .....	10
1.4 Das Zielprotein Tmprss2 als potentiell <i>Drug Target</i> in der Influenza A-Behandlung 11	
1.5 Ziele dieser Arbeit .....	13
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1 Verwendete Bakterien- und Hefestämme .....	14
2.2 Verwendete Expressionsplasmide.....	14
2.3 Polymerase Kettenreaktion .....	16
2.4 Restriktionsverdau.....	17
2.5 Ligation .....	17
2.6 Hitzeschock-Transformation .....	18
2.7 Plasmid-Isolierung.....	18
2.8 Testverdau .....	18
2.9 Agarose-Gelelektrophorese.....	19
2.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	20
2.11 Stabile Transformation von <i>P. pastoris</i> .....	20
2.11.1 Herstellung elektrokompenter Hefezellen .....	20
2.11.2 Linearisierung der Vektoren .....	20
2.11.3 Elektroporation von <i>P. pastoris</i> .....	21
2.12 Transiente Transformation .....	22
2.13 Extraktion der genomischen DNA.....	22
2.14 96- <i>Deepwell</i> -Platten-Kultivierung .....	23
2.15 Schüttelkolbenkultivierung.....	23

2.16	Hochdurchsatzkultivierung im Biolector .....	26
2.17	Zellaufschluss .....	27
2.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot .....	28
2.19	Slot Blot.....	32
2.20	Glycerin-Kulturen .....	32
2.21	Verwendete Online-Tools.....	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1.	Überprüfen von RudolphRFP als Markerprotein .....	33
3.2.	Generierung stabiler <i>P. pastoris</i> Zelllinien .....	35
3.3.	Überprüfung der hergestellten <i>P. pastoris</i> Zelllinien durch genomische PCR .....	38
3.4.	Kultivierung in 96- <i>Deepwell</i> -Platten, SDS-PAGE und Western Blot.....	50
3.5.	Schüttelkolbenversuche .....	54
3.6.	Untersuchung der Expression im Biolector.....	58
3.7.	Konstruktion eines episomalen Expressionsvektors für die Überprüfung des SDH-Promoter.....	71
3.8.	Evaluierung des GCW14-M+20-Promoters zur Expression von <i>Tmprss2</i> .....	73
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>76</b>
<b>5.</b>	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung: .....</b>	<b>84</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>1</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis für den Anhang:.....</b>	<b>1</b>
	<b>Tabellenverzeichnis im Anhang.....</b>	<b>2</b>
7.1.	Vektoren.....	2
7.2.	Marker für die Agarose-Gelelektrophorese und SDS-PAGE/Western Blot.....	5
7.3.	Verwendete Lösung und Medien .....	5
7.4.	Geräteliste.....	10
7.5.	Chemikalienliste und Kits .....	11
7.6.	Verwendete Primer.....	12
7.7.	Sequenzen.....	13
7.8.	Zusätzliche Daten und Diagramme des ersten und zweiten Biolector-Versuches...	17
7.9.	Zusätzliche Western Blots .....	32

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich zwischen zwei Kulturen mit unterschiedlicher optischer Dichte ( $OD_{600}$ ).....	3
Abbildung 2: Allgemeines Schema der homologen Rekombination.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Methanol-Stoffwechsels in <i>P. pastoris</i> .....	7
Abbildung 4: Alignment der Sequenzen des GCW14-Promoters als Wildtyp und als M+20-Mutante....	9
Abbildung 5: Anregungs- und Emissionsspektrum von RudolphRFP.....	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung von Tmprss2 und der exprimierten Mutante D343N.....	12
Abbildung 7: Allgemeine Darstellung der in den Vektor eingebrachten Expressionskassette.....	33
Abbildung 8: Aufnahme von untransformierten und transformierten X-33 Zellen unter den Fluoreszenzmikroskop und mit einer normalen Kamera.....	34
Abbildung 9: Vergleich zwischen untransformierten und transformierten Zellen im Durchflusszytometer .....	35
Abbildung 10: Überprüfung der Linearisierung der Expressionsplasmide.....	36
Abbildung 11: Darstellung der Reinstriche der Promoter-Transformanten auf YPD-Zeocin-Agarplatten .....	37
Abbildung 12: Übersicht über die Expressionskassette als Einzelinsertion (A) und Tandem-Repeat- Integration für die konstitutiven Promotoren (B) und $P_{AOX1}$ (C).....	40
Abbildung 13: Überprüfung der $P_{GAP}$ -Klone auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette.....	41
Abbildung 14 Überprüfung der $P_{GAP}$ -Klone auf Tandem-Repeats.....	42
Abbildung 15: Überprüfung der $P_{AOX1}$ -Klone auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette.....	42
Abbildung 16: Überprüfung der $P_{AOX1}$ -Klone auf Tandem-Repeats.....	43
Abbildung 17: Überprüfung der $P_{GCW14}$ -Klone auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette.....	44
Abbildung 18 Überprüfung der $P_{GCW14}$ -Klone auf Tandem-Repeats.....	45
Abbildung 19: Überprüfung der $P_{GCW14M+20}$ -Klone auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette..	46
Abbildung 20: Überprüfung der $P_{GCW14+20}$ -Klone auf Tandem-Repeats.....	46
Abbildung 21: Überprüfung der $P_{SDH}$ -Klone auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette.....	47
Abbildung 22: Überprüfung der $P_{SDH}$ -Klone auf Tandem-Repeats.....	48
Abbildung 23: Überprüfung der SDH-Promoter-Klone auf die Zeocin-Resistenzkassette.....	49
Abbildung 24: SDS-PAGE und Western Blot der $P_{GAP}$ -Testexpression.....	50
Abbildung 25: SDS-PAGE und Western Blot der $P_{AOX1}$ -Testexpression.....	51
Abbildung 26: SDS-PAGE und Western Blot der $P_{GCW14}$ -Testexpression.....	52
Abbildung 27: SDS-PAGE und Western Blot der $P_{GCW14M+20}$ -Testexpression.....	52
Abbildung 28: SDS-PAGE und Western Blot der $P_{SDH}$ -Testexpression.....	53
Abbildung 29: Verlauf der optischen Dichte der Schüttelkolbenkulturen.....	55
Abbildung 30: Fotografische Aufnahmen der Zellpellets zu verschiedenen Zeitpunkten der Schüttelkolbenkultivierung.....	56
Abbildung 31: Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung der Tagesproben über den vollständigen Zeitraum der Kultivierung.....	57
Abbildung 32: Histogramm über die normierte Fluoreszenz der Promotoren über den Zeitraum der Kultivierung.....	58

Abbildung 33: Wachstum der Negativkontrolle in den verschiedenen Kultivierungsmedien im ersten Biolector Versuch .....	59
Abbildung 34: Verhältnis zwischen Fluoreszenz (Gain 100) und Zelldichte (Gain 10) der Negativkontrolle im ersten Biolector-Versuch .....	60
Abbildung 35: Zeitlicher Verlauf der absoluten Fluoreszenz für $P_{AOX1}$ im ersten Biolector-Versuch ....	61
Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für $P_{AOX1}$ im ersten Biolector-Versuch .....	61
Abbildung 37: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für $P_{GAP}$ im ersten Biolector-Versuch .....	63
Abbildung 38: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für $P_{GCW14-Wildtyp}$ im ersten Biolector-Versuch .....	64
Abbildung 39: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für $P_{GCW14M+20-Mutante}$ im ersten Biolector-Versuch.....	65
Abbildung 40: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für $P_{SDH}$ im ersten Biolector-Versuch.....	66
Abbildung 41: Übersicht über die Maxima der Promoter-Dreifachbestimmungen und der Negativkontrolle im ersten Biolector-Versuch .....	67
Abbildung 42: Vergleich der Maxima zwischen Einzelinsertions- und Tandem-Repeat-Klonen für alle Promotoren im ersten Biolector-Versuch .....	68
Abbildung 43: Beispielhafter Vergleich des Unterschieds im Auftreten des Maximums zwischen dem ersten und zweiten Biolector-Versuches anhand der $P_{GCW15-Wildtyp}$ -Probe ( $W*2$ ) .....	69
Abbildung 44: Agarose-Gelelektrophorese des Testverdau der episomalen Expressionsvektoren .....	71
Abbildung 45: Reinstrichplatten der transformierten X-33-Zellen mit den episomalen Expressionsvektoren .....	72
Abbildung 46: Western Blot der Testexpression von RudolphRFP mit den neuen episomalen Expressionsvektoren .....	73
Abbildung 47: Auftrennung des Testverdau von $pGCWmZ-\alpha Tmprss2-D343N$ -Vektors mit Pst1-HF und SacI-HF.....	74
Abbildung 48: Slot Blot der Überstandsproben der $Tmprss2-D343N$ opt-Testexpression.....	75



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über verwendeten Promotoren von <i>P. pastoris</i> .....	6
Tabelle 2: Übersicht über den verwendeten bakteriellen Stamm und dessen Genotyp und Verwendung.....	14
Tabelle 3: Übersicht über den verwendeten Hefestamm und dessen Verwendung. ....	14
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Expressionsplasmide, den verwendeten Selektionsmarker, das GOI und die Transformationsart .....	15
Tabelle 5: Übersicht über das allgemeine PCR-Programm .....	16
Tabelle 6: Übersicht über die PCR-Ansätze für die genomische DNA und für PCR- Amplifizierung im Rahmen von Klonierungsarbeiten .....	17
Tabelle 7: Übersicht über die eingesetzten Mengen der Reagenzien für einen präparativen Restriktionsverdau .....	17
Tabelle 8: Übersicht der Zusammensetzung von Ligations- und Religationsansatz .....	18
Tabelle 9: Übersicht über die eingesetzten Mengen der Reagenzien für einen Testverdau .....	19
Tabelle 10: Verwendete Menge 0,8 %iger Agarose-Lösung und Rotisafe für das Gießen eines 0,75 cm dicken Gels mit aufgeführten Maßen .....	19
Tabelle 11: Übersicht der für die Linearisierung der Expressionsvektoren verwendeten Restriktionsenzyme .....	21
Tabelle 12: Reaktionsansatz für die Linearisierung der Expressionsvektoren. ....	21
Tabelle 13: Trennkapazität einer SDS-Page bei variierenden Acrylamid-Konzentrationen nach (Jansohn and Rothhämel 2012) .....	29
Tabelle 14: Komponenten für das Gießen von acht Trenn- und Sammelgelen mit angegebener Konzentrationen .....	29
Tabelle 15 Übersicht über die für die Detektion von RudolphRFP verwendeten Antikörper und die angesetzten Verdünnungen. ....	31
Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Online-Tools .....	32
Tabelle 17: Übersicht über die linearisierten Plasmide sowie der erwarteten Bandengröße bei erfolgreicher Linearisierung .....	35
Tabelle 18: Übersicht über die durchgeführten PCR-Reaktionen, die verwendeten Primer und die erwarteten Bandengrößen bei einem positiven Nachweis. ....	39
Tabelle 19: Übersicht über die eingesetzten Klone und verwendeten Medien in den Schüttelkolbenversuchen .....	54
Tabelle 20: Übersicht über die im Biolector kultivierten Klone .....	59
Tabelle 21: Vergleich der Maxima im ersten und zweiten Biolector-Versuch und der Zeitpunkt ihres Auftretens .....	70

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -MF <sub>ss</sub>	<i><math>\alpha</math>-Mating-Factor</i> -Sekretionssignal
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AOX1	Alkoholoxidase 1
AOX2	Alkoholoxidase 2
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulphat
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
BEDS	Bicine-NaOH, Ethylenglykol, DMSO, Sorbitol
BMD	<i>Buffered Minimal Dextrose</i>
BMDY	<i>Buffered Dextrose Complex</i>
BMG	<i>Buffered Minimal Dextrose</i>
BMGY	<i>Buffered Glycerin Complex</i>
BMM	<i>Buffered Minimal Methanol</i>
BMMY	<i>Buffered Methanol Complex</i>
Bp	Basenpaare
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Eng. Desoxyribonukleinsäure
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
FDH	Formaldehyd-Dehydrogenase
FSC	<i>Forward-Scatter</i>
FW	<i>Forward</i>
HA	Hemagglutinin
GAP	Glyceraldehyde 3-phosphat dehydrogenase
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GOI	<i>Gene of Interest</i>
GPI	Glycosylphosphatidyl-inositol -Ankerproteines
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	Klon
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria-Bertani medium</i>
LDR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
MCS	<i>multicloningsite</i>
MeOH	Methanol
Mut <sup>s</sup>	<i>methanol utilization slow</i>
Mut <sup>+</sup>	<i>methanol utilization plus</i>
NK	Negativkontrolle
OD	optische Dichte
PARS1	<i>pichia autonomous replication sequence 1</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Eng. Polymerasekettenreaktion
PK	Positivkontrolle
RFP	Rotfluoreszierendes Protein
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
Rrm	Rounds per minute (Drehzahl)
RV	<i>Reverse</i>
ScFv	single-chain variable fragment
SDH	Sorbitoldehydrogenase
SDS	<i>Sodiumdodecylsulphat</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SRCR	<i>Scavenger Receptor Cysteine-Rich</i>
SSC	<i>Sideward-Scatter</i>
SWB	Sterilwerkbank
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS-Puffer	<i>Tris-buffered Saline</i>
TBS-T-Puffer	<i>Tris-buffered Saline-Tween 20-Puffer</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tmprss2	<i>transmembrane protease/serine subfamily member 2</i>
TT <sub>AOX1</sub>	<i>transcriptional terminator</i> der AOX1
U	Units
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
Zeo	Zeocin

## 1. Einleitung

In allen biologischen Prozessen sind Proteine von entscheidender Bedeutung. Sie stellen die vielseitigste und funktionsfähigste Gruppe der Biomoleküle dar. So katalysieren sie in Form von Enzymen die Mehrheit der katabolischen und anabolischen Stoffwechselreaktionen. Als Rezeptoren spielen sie als wichtiger Bestandteil des Immunsystems, des Nervensystems sowie der allgemeinen Kommunikation sowohl innerhalb als auch zwischen Zellen eine essentielle Rolle. Als fester Bestandteil des Zytoskelett und anderer Strukturproteine verleihen sie den Zellen Stabilität.

Die Biotechnologie erlaubt es, Proteine außerhalb ihres Ursprungsorganismus zu produzieren, zu modifizieren und zu untersuchen. Im Mittelpunkt stehen dabei die Entschlüsselung der Struktur, Funktion und Interaktion von und zwischen Proteinen sowie die Nutzbarkeit in Medizin, Forschung und Industrie.

In den letzten Dekaden hat sich eine Vielzahl an Expressionssystemen für die Produktion rekombinanter Proteine etabliert. Die Spanne an verfügbaren Systemen reicht dabei von Prokaryoten, eukaryotischen Mikroorganismen bis hin zu tierischen Zellkulturen. Jedes Expressionssystem verfügt dabei über charakteristische Vor- und Nachteile. Es wird kontinuierlich daran geforscht die vorhandenen Expressionssysteme weiter zu verbessern.

Die verschiedenen zur Verfügung stehenden Systeme für die Produktion von Proteinen unterscheiden sich dabei unter anderem entscheidend hinsichtlich der Robustheit der Kultivierung und der Komplexität der prozessierten Proteinmodifikation. Dabei spielen gerade die spezifischen Glykosylierungen eine essentielle Rolle zur Gewährleistung der pharmakologischen Aktivität von Proteinen. Während Bakterien sich durch eine einfache und stabile Kultivierung auszeichnen, zeigen sie Defizite bezüglich der komplexeren Modifikation von Proteinen.

Dahingegen zeigen die tierischen Zellsysteme die Fähigkeit zu komplexen Glykosylierungen. Im Gegenzug sind diese Kulturen weniger robust und anfälliger für Kontaminationen als die bakteriellen Systeme. Außerdem ist der Kultivierungsprozess nicht in dem Maße einfach zu realisieren wie bei den Bakterien. Als Beispiel für ein tierisches Zellsystem seien hier die *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zellen genannt, die sich sowohl in der Wissenschaft als auch in der Industrie etabliert haben. (Schmidt 2004)

Die Hefe-Systeme zeichnen sich sowohl durch eine simple Kultivierung mit der Fähigkeit hohe Zelldichten zu erreichen sowie die Prozessierung komplexerer Proteinmodifikationen aus. Die verschiedenen eingesetzten Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* und *Hansenula polymorpha*) verfügen dabei gegenüber den Bakterien, in der Regel *Escherichia coli*, über effizientere Sekretionswege sowie die grundlegende Fähigkeit zu

einfachen Proteinmodifikationen und sind durch das Fehlen von Endotoxinen nicht pyrogen. (Schmidt 2004)

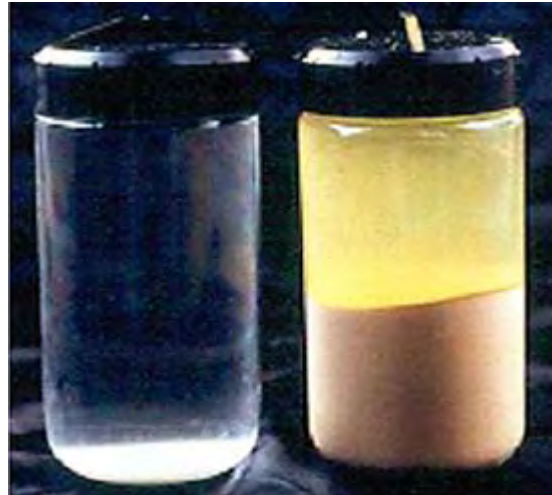
### 1.1 *Pichia pastoris* als Expressionssystem

Die Hefe *Pichia pastoris* ist ein eukaryotischer Organismus und eines der wichtigsten Expressionssysteme der Biotechnologie. Aus industrieller Sicht ist *P. pastoris* interessant, weil die Kultivierung einfach und kostengünstig ist. So wird eine Vielzahl an rekombinanten Proteinen auf industriellem Maßstab in *P. pastoris* produziert, wozu auch mehr als 500 pharmazeutische Proteine zählen (Spohner *et al.* 2015). Als Beispiel seien verschiedene Antikörper-Fragmente (scFv) und das L1-Kapselprotein des humanen Papillomvirus genannt (Weinacker *et al.* 2013). Dabei zeichnet sich *P. pastoris* im Vergleich zu *E. coli* durch das Fehlen von Endotoxinen aus (Goncalves *et al.* 2013). Gleichzeitig ist die Kultivierung im Gegensatz zu tierischen Zellkulturen wesentlich robuster gegenüber Kontaminationen (Goncalves *et al.* 2013). In der Lebensmittelindustrie kommt *P. pastoris* zur Produktion verschiedener Produkte (z.B. Amylasen, Laccasen, Lipasen) zum Einsatz (Spohner *et al.* 2015). Dabei gibt es einige Charakteristika, die *P. pastoris* gegenüber anderen Expressionssystemen auszeichnet.

Eine herausragende Fähigkeit von *P. pastoris* ist auf Methanol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle (methylotroph) zu wachsen. Verbunden ist diese Eigenschaft mit den Enzymen Alkoholoxidase 1 und 2 (AOX1, AOX2). Dabei wird die AOX1 durch einen sehr starken und strikt regulierten Promoter, den AOX1-Promoter, gesteuert. Die Regulation dieses Promoters wirkt dabei so effizient, dass in Abwesenheit von Methanol keine Alkoholoxidase 1 nachgewiesen werden kann (Gellissen 2005). Durch die Nutzung dieses Promoters für die Produktion rekombinanter Proteine ist es möglich den Kultivierungsprozess in Wachstums- und Produktionsphase aufzuteilen. Dies gestaltet sich gerade bei der Produktion wachstumshemmender oder toxischer Produkte als sinnvoll, da die Produktion auf diesem Weg erst nach erfolgreichem Wachstum aktiviert werden kann.

Als Mikroorganismus kann *P. pastoris* einfach und gezielt genetisch modifiziert werden (Gellissen 2005). Die Handhabung und Kultivierung von *P. pastoris* ist dabei vergleichbar zu der Modell-Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Darby *et al.* 2012). Wie *S. cerevisiae* ist auch *P. pastoris* in der Lage einfache posttranslationale Modifikationen wie Disulfid-Brücken und Glykosylierung durchzuführen. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* neigt *P. pastoris* nicht zur Hyperglykosylierung und zeichnet sich durch das Fehlen diverser pilzspezifischer Glykosylierungen aus. Des Weiteren bevorzugt *P. pastoris* aerobes Wachstum. Bei der Kultivierung hoher Zelldichten ist dies vom Vorteil, da im Gegensatz zu *S. cerevisiae* keine signifikante Menge des toxischen Fermentationsproduktes Ethanol erzeugt wird. Stattdessen wird die vorhandene Kohlenstoffquelle favorisiert in Biomasse umgesetzt (Jacobs *et al.*

2009). So wurde in *Fed Batch*-Kultivierungen eine Zelldichte von 200 g/L (Biotrockenmasse) (Looser *et al.* 2015) oder optische Dichten von  $OD_{600} = 400$  erreicht (Vgl. Abbildung 1). In einigen Fällen kann sich eine Limitierung der Sauerstoffversorgung allerdings auch positiv auf die Expression von Proteinen auswirken (Baumann *et al.* 2010).



**Abbildung 1: Vergleich zwischen zwei Kulturen mit unterschiedlicher optischer Dichte ( $OD_{600}$ ).**  
Links: Zellsuspension mit  $OD_{600}$  von 1. Rechts: Zellsuspension mit  $OD_{600}$  von 400. (Cregg 2007)

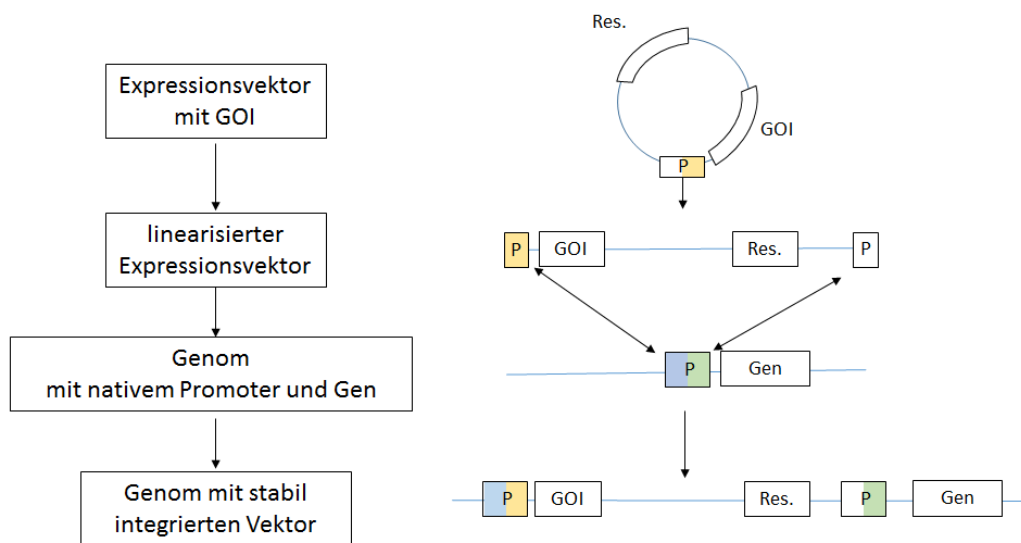
Für die Produktion rekombinanter Proteine gibt es eine Vielzahl kommerziell verfügbarer Stämme. Die Wildtypstämme (z.B. X-33) sind durch die Verfügbarkeit der AOX1 und AOX2 in der Lage auf Methanol als Kohlenstoffquelle zu wachsen. Diese Stämme werden als  $Mut^+$  („methanol utilization plus“) bezeichnet (Cereghino and Cregg 2000). Durch die Deletion des AOX1-Gens wurden zudem Stämme generiert, die weiterhin über die Fähigkeit verfügen, auf Methanol zu überleben. Allerdings ist aufgrund der schwachen Aktivität des AOX2-Promoters im Vergleich zum AOX1-Promoter kein effizientes Wachstum auf Methanol mit Hilfe der verbliebenen AOX2 mehr möglich (Cregg *et al.* 1989). Diese  $Mut^s$ - („methanol utilization slow“) Stämme weisen folglich einen geringeren Methanolverbrauch auf. Trotz der Deletion kann der AOX1-Promoter weiterhin für die Produktion rekombinanter Proteine genutzt werden. Es hat sich gezeigt, dass die Proteinproduktion bei Nutzung dieser Stämme in einigen Fällen erhöht war (Cereghino and Cregg 2000).

Es wurden außerdem genetisch modifizierte Stämme entwickelt, die über neue Eigenschaften wie eine humanisierte N-Glykosylierung verfügen (Jacobs *et al.* 2009). Dies macht *P. pastoris* im Bereich der Infektionsforschung, in dem „humane“ bzw. „humanisierte“ Proteine eine wichtige Rolle spielen, zu einem geeigneten Kandidaten für die Expression pharmazeutischer Proteine, deren Aktivität an spezifische Proteinmodifikationen gekoppelt ist (Weinacker *et al.* 2013).

In der Strukturbiologie spielt *P. pastoris* ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Produktion komplexer Proteine, die Proteinmodifikationen benötigen, zu denen *E. coli* nicht in der Lage ist. (Yokoyama 2003) Als Beispiel sei hier die humane Transmembran-Serinprotease Hepsin genannt, deren extrazelluläre Domäne für die Strukturaufklärung in *P. pastoris* exprimiert wurde (Somoza *et al.* 2003).

Die Prozessoptimierung spielt neben der genetischen Modifikation eine entscheidende Rolle für die Erhöhung der Ausbeute. Sie ist abhängig von der gewählten Kohlenstoffquelle und den Prozessparametern (Looser *et al.* 2015). Durch die Sekretion von Proteinen kann die Aufreinigung des Zielproteins erheblich vereinfacht werden, da *P. pastoris* nur über wenige native sekretierte Proteine verfügt (Weinacker *et al.* 2013).

Für *P. pastoris* werden bevorzugt Expressionsvektoren für die gezielte stabile Integration einer Expressionskassette, die das Zielgen („*gene of interest*“, GOI) enthält, in das Genom verwendet. Die Integration erfolgt hierbei durch homologe Rekombination (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Allgemeines Schema der homologen Rekombination.**

Bei der homologen Rekombination überlagern sich homologe Regionen und werden ausgetauscht. So wird der zuvor im Promotor (P) linearisierte Expressionsvektor gezielt in das Genom integriert. Es kann zu Einzelinsertionen aber auch zu *Tandem-Repeat*-Insertionen durch eine Wiederholung des Vorganges kommen. Auf dem Vektor ist neben dem GOI noch ein Selektionsmarker (z.B. Resistenz gegen ein Antibiotikum) für die Selektion positiver Transformanten vorhanden.

Diese beruht auf der Überlagerung homologer Sequenzen, wodurch der Integrationsloкус bestimmt werden kann. Der Expressionsvektor muss für diesen Vorgang zunächst innerhalb der homologen Sequenz linearisiert werden, da so die Effizienz der Integration gegenüber einem zirkulären Plasmid signifikant erhöht ist. Bei der Insertion über eine einzelne homologe Sequenz kann der Vektor mehrfach eingefügt werden, sodass Tandem

Wiederholungen (*tandem repeats*) entstehen (Orr-Weaver *et al.* 1981). Dies kann bei bis zu 10 % der Fälle auftreten (Cregg *et al.* 2000). *Tandem-Repeats* können zu einer erhöhten Expression, aber auch zu einem *Silencing* des Gens führen (Orr-Weaver *et al.* 1981).

Bei der homologen Rekombination über zwei homologe Sequenzen am 3'- und 5'-Ende der Integrationskassette kann es auch zu einem *Replacement* kommen. Durch diesen Vorgang geht das native Gen verloren, sodass im Fall der AOX1 aus einem Mut<sup>+</sup> Stamm ein Mut<sup>s</sup> Stamm erzeugt werden kann (Cregg *et al.* 2000).

Der Vorteil der stabilen Zelllinien besteht darin, dass auch in Abwesenheit des Selektionsdrucks (z.B. Antibiotika) die integrierte Genkassette erhalten bleibt.

Alternativ ist auch eine transiente Expression in *P. pastoris* möglich. Dazu wird zirkuläre Plasmid-DNA für die Transformation verwendet. Eine spezifische Sequenz, die *pichia autonomous replication sequence 1* (PARS1), führt zu einer autonomen Replikation der Plasmide in *P. pastoris* (Cregg *et al.* 1985). Die Sequenz ist vergleichbar zu einem *origin of replication* in *E. coli*. Solange der Selektionsdruck (z.B. ein Antibiotikum) aufrechterhalten wird, überleben nur die Zellen, die das Plasmid enthalten (Cregg *et al.* 1985).

Es wurden verschiedene episomale Vektoren entwickelt, die eine PARS enthalten. So wurde aus dem normalerweise für die homologe Rekombination genutzten Vektor pGAPZ $\alpha$ -A (Invitrogen) von Lee *et al.* der Vektor pBGP1 entwickelt. Dieser verfügt neben dem *P. pastoris* Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-(GAP-)Promoter, dem  *$\alpha$ -mating factor*-Sekretionssignal aus *S. cerevisiae*, der Zeocin-Resistenz (*sh ble*) und der *multi cloning site* (MCS) außerdem über die PARS1, sodass eine Expression ohne stabile Integration in das Genom möglich ist (Lee *et al.* 2005). Es existieren außerdem Plasmide, die für die Expression von Proteinen (z.B. humane fetale Hirnproteine aus einer cDNA-Bibliothek) sowohl in *E. coli* als auch in *P. pastoris* verwendet wurden (Lueking *et al.* 2000).

## 1.2 Promotoren

Promotoren sind essentiell wichtige genetische Regulationselemente. Jedes Gen verfügt über einen Promoter, welcher in der *upstream*-Region vor dem 5'-Ende des Gens liegt. Die Promotersequenzen dienen als Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Die Summe der aktivierenden bzw. inhibierenden Signale entscheidet letzten Endes über die Transkription eines Gens. Die Signale wiederum sind abhängig von den vorherrschenden Umweltfaktoren.

Es wird im Allgemeinen unterschieden zwischen zwei verschiedenen Typen von Promotoren: Einerseits gibt es induzierbare Promotoren, welche durch die Anwesenheit einer bestimmten Substanz induziert werden. Als klassisches Beispiel für die Induktion und Repression sei hier das Lac-Operon in *E. coli* genannt, welches in Anwesenheit von Lactose und Abwesenheit

von Glucose aktiviert wird. Dieser Promoter kann auch mit Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden. Dieser Mechanismus wird häufig für die Produktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli* verwendet. Auf der anderen Seite gibt es konstitutive Promotoren, welche in der Regel dauerhaft aktiv sind. Da die Regulation von Genen in der Natur von entscheidender Bedeutung ist, stehen unterschiedlich starke Promotoren für die Expression von Proteinen zur Verfügung.

*P. pastoris* verfügt über eine Vielzahl an nativen Promotoren (Spohner *et al.* 2015), welche für die Produktion rekombinanter Proteine genutzt werden können. Die beiden am häufigsten verwendeten Promotoren sind der induzierbare Promoter der Alkoholoxidase 1 ( $P_{AOX1}$ ) und der konstitutive Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase-Promoter ( $P_{GAP}$ ). In den letzten 25 Jahren wurde das Arsenal der verfügbaren Promotoren ständig erweitert, unter anderem um die in dieser Arbeit untersuchten starken konstitutiven Promotoren des Glycosylphosphatidyl-inositol-Ankerproteins ( $P_{GCW14}$ ) und der Sorbitoldehydrogenase ( $P_{SDH}$ ). Eine Übersicht über die verwendeten Promotoren ist in Tabelle 1 zu sehen. Die Promotoren definieren in der Regel durch die Linearisierung den Lokus der Integration bei der stabilen Transformation der Hefezellen.

**Tabelle 1: Übersicht über verwendeten Promotoren von *P. pastoris***

Die Promotoren unterscheiden sich bezüglich der Regulationsmechanismen und der Expressionsstärke.

Name	Gen	Regulation	Stärke	Quelle
$P_{AOX1}$	Alkoholoxidase 1	Induzierbar	Stark	(Tschopp <i>et al.</i> 1987)
$P_{GAP}$	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase	Konstitutiv	Stark	(Waterham <i>et al.</i> 1997)
$P_{GCW14}$ $P_{GCW14M+20}$	Glycosylphosphatidyl-inositol-Ankerproteines (GPI)	Konstitutiv	Stark	(Liang <i>et al.</i> 2013)
$P_{SDH}$	Sorbitoldehydrogenase	Konstitutiv	Stark	(Periyasamy <i>et al.</i> 2013)

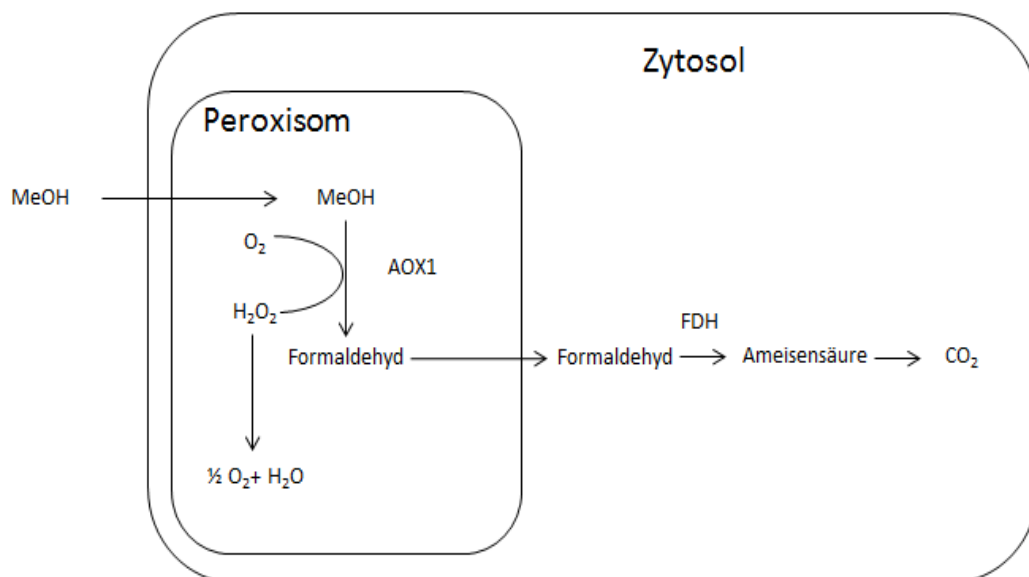
### 1.2.1 Der Alkoholoxidase 1-Promoter

Die Fähigkeit von *P. pastoris* auf Methanol (MeOH) als Kohlenstoffquelle zu wachsen ist einer der Gründe für die Attraktivität dieses Expressionssystems. Methanol wird unter anderem durch das Enzym Alkoholoxidase 1 (AOX1) umgesetzt. Der Promoter der AOX1 wird durch Methanol induziert und ist der bis dato stärkste bekannte native Promoter in *P. pastoris* (siehe Tabelle 1). Zuerst wurde der Promoter 1987 von Tschopp *et al.* beschrieben und für die Expression einer Invertase verwendet (Tschopp *et al.* 1987). Er gehört zu den klassischen und häufig verwendeten Promotoren für die rekombinante Proteinexpression in *P. pastoris*. Während der Promoter so strikt reguliert ist, dass in



Abwesenheit von Methanol kein Transkript der AOX1 nachweisbar ist (Cereghino and Cregg 2000), wird seine Aktivität zusätzlich durch die Anwesenheit alternativer Kohlenstoffquellen inhibiert, was sowohl auf Glycerin (Zhang *et al.* 2007) als auch auf Glucose zutrifft (Rodriguez 2007). Ein zu schneller Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glucose/Glycerin auf Methanol ist toxisch für die Zelle, da der AOX1-Promoter durch die restlichen Mengen an Glucose/Glycerin inhibiert wird und das Methanol nicht abgebaut werden kann (Rodriguez 2007). Aus diesem Grund wird vor der Induktion bei Kultivierungen im Schüttelkolben das Medium vollständig gewechselt. Bei der Fermentation im Bioreaktor wird abgewartet bis die alternative Kohlenstoffquelle vollständig aufgebraucht ist, bevor Methanol zugegeben wird. So werden Wachstumsphase und Produktionsphase voneinander separiert.

Der Methanol-Stoffwechselweg von *P. pastoris* ist schematisch in Abbildung 3 zu sehen. Das Methanol wird durch die AOX1 in einer Oxidationsreaktion zu Formaldehyd umgewandelt, wobei Wasserstoffperoxid entsteht (siehe Abbildung 3). Beide Substanzen sind toxisch für die Zelle. Um den oxidativen Stress zu minimieren, wird die MeOH-Konzentration während der Kultivierung limitiert.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Methanol-Stoffwechsels in *P. pastoris*.**

Dargestellt ist die Zelle mit Zytosol und Peroxisom. Die Größen entsprechen nicht den realen Umständen. Das Methanol (MeOH) wird durch die Alkoholoxidase 1 (AOX1) in Formaldehyd umgewandelt, wobei Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) gebildet wird. Das Formaldehyd wird durch die Formaldehyd-Dehydrogenase (FDH) in Ameisensäure und weiter zu  $\text{CO}_2$  umgewandelt. (Abbildung nach (Cereghino and Cregg 2000))

Neben den positiven Eigenschaften dieses Promoters hat dieser jedoch auch einen Nachteil. Das Wachstum auf Methanol ist im Vergleich zu anderen Kohlenstoffquellen schwächer und zeitgleich ist der MeOH-Verbrauch bei Nutzung von  $\text{Mut}^+$ -Stämmen sehr hoch. Der erhöhte Methanolverbrauch bei größeren Prozessen im industriellen Maßstab führt aufgrund der Toxizität und Entzündlichkeit von Methanol zusätzlich zu einem erhöhten Sicherheitsrisiko.

Daher sind für die Produktion rekombinanter Proteine weitere starke Promotoren von Interesse, die nicht durch Methanol induziert werden müssen.

### 1.2.2 Der GAP-Promoter

Der Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase-Promoter (GAP-Promoter,  $P_{GAP}$ ) ist ein starker konstitutiver Promoter und neben dem AOX1-Promoter der häufigste verwendete Promoter in *P. pastoris*. Er wurde 1996 von Waterham *et al.* untersucht und charakterisiert. Seitdem hat sich der GAP-Promoter als der klassische konstitutive Promoter in *P. pastoris* etabliert. (Waterham *et al.* 1997)

Die Expressionsstärke variiert stark mit der verwendeten Kohlenstoffquelle. So ist die stärkste Expression auf Glucose zu beobachten. Im Vergleich dazu ist die Expression mit Glycerin und Methanol auf zwei Drittel bzw. ein Drittel reduziert (Cereghino and Cregg 2000). Der GAP-Promoter muss als konstitutiver Promoter nicht induziert werden, was zur Folge hat, dass die Proteinexpression kontinuierlich aktiv ist. Dadurch ist eine Trennung in Wachstums- und Produktionsphasen, wie sie häufig in Verbindung mit dem AOX1-Promoter verwendet wird, nicht möglich, wodurch der Promoter für die Produktion von toxischen oder wachstumshemmenden Proteinen ungeeignet ist. Allerdings gestaltet sich der Produktionsprozess ohne diese Trennung einfacher. Der große Vorteil gegenüber dem AOX1-Promoter ist, dass die Induktion mit Methanol entfällt. Dies bedeutet gerade für größere Produktionsanlagen eine Senkung des Sicherheitsrisikos durch den Wegfall von Methanol.

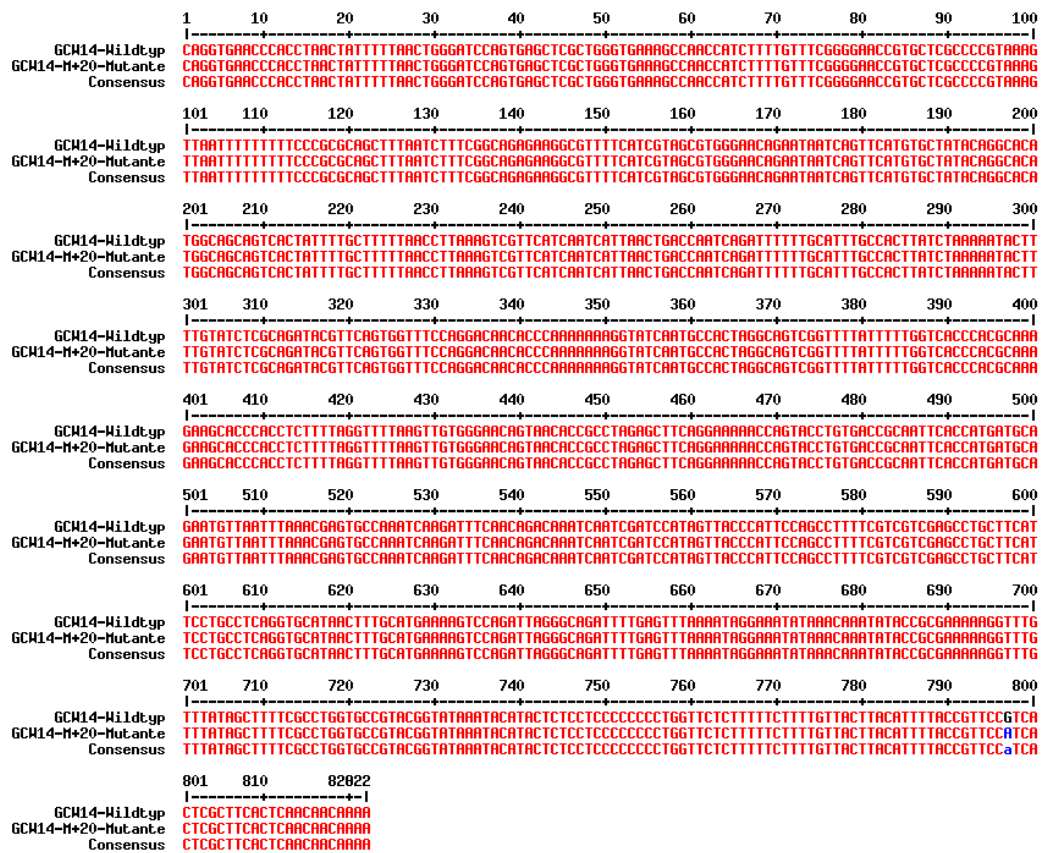
Es gibt Versuche, den GAP-Promoter zu verbessern. So wurden verschiedene Mutanten des GAP-Promoters auf ihre Expressionsstärke hin untersucht (Qin *et al.* 2011). Außerdem zeigen neue Untersuchungen, dass neben der Wahl der Kohlenstoffquelle ebenso die Sauerstoffversorgung einen Einfluss auf den GAP-Promoter hat und dass dieser unter bestimmten Bedingungen sogar einen induzierbaren Charakter aufzuweisen scheint (Vogl and Glieder 2013).

### 1.2.3 Der GCW14-Promoter

Der starke konstitutive GCW14-Promoter ( $P_{GCW14}$ ) reguliert die Expression eines Glycosylphosphatidyl-inositol-Ankerproteines (GPI) und wurde 2013 von Liang *et al.* untersucht (Liang *et al.* 2013). Der GCW14-Promoter soll stärker als der GAP-Promoter sein und näherungsweise die Expressionsleistung des AOX1-Promoters erreichen, was ihn zu einer guten Alternative für die Überexpression nicht zytotoxischer Proteine machen würde. Die Expressionsstärke mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen ist geringeren Schwankungen unterlegen als beim GAP-Promoter. So können relativ zu  $P_{GAP}$  unter

Methanol (450 %), Ethanol (400 %), Glycerin (420 %) und Glucose (400 %) vergleichbar hohe Proteinmengen erzielt werden (Liang *et al.* 2013).

In dieser Arbeit werden zwei Varianten des Promoters untersucht. Die Wildtyp-Variante und eine von Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2013) entwickelte und untersuchte Mutante (M+20). Die Mutante unterscheidet sich dabei durch eine Punktmutation, bei der ein Guanin gegen Adenin ausgetauscht wurde Abbildung 4. Die Mutationen wurde dabei durch eine *error-pron PCR* erzeugt (Zhang *et al.* 2013). Diese Mutante zeigte in den Untersuchungen nochmal eine Erhöhung der Expression um bis zu 20 %, was sie zu einer interessanten Alternative für zukünftige Projekte macht.



**Abbildung 4: Alignment der Sequenzen des GCW14-Promoters als Wildtyp und als M+20-Mutante.** Der Unterschied liegt in einer Punktmutation am Ende der Sequenz (blau dargestellt), bei der ein Guanin durch Adenin ersetzt worden ist. Das Alignment wurde mit MultiAlign durchgeführt.

### 1.2.4 Der SDH-Promoter

Bei dem Sorbitoldehydrogenase-Promoter (SDH-Promoter) handelt es um einen starken konstitutiven Promoter, der in seiner Expressionsstärke vergleichbar zum GAP-Promoter sein soll (Periyasamy *et al.* 2013). Dabei ist die Expression in der Kultivierung mit verschiedenen Kohlenstoffquellen überwiegend konstant. So gibt es kaum Unterschiede in der Kultivierung mit Sorbitol, Methanol und Glucose (Periyasamy *et al.* 2013). Die Expressionsstärke mit Glycerin als Kohlenstoffquelle soll marginal stärker sein als auf den anderen Kohlenstoffquellen. (Periyasamy *et al.* 2013)

Im Gegensatz zu den restlichen Promotoren handelt es sich bei dem SDH-Promoter um einen sehr kleinen Promoter. Er besteht aus etwa 211 bp und ist damit nur halb so groß wie der GAP-Promoter (483 bp) und wesentlich kleiner als der AOX1-Promoter (942 bp) und der GCW14-Promoter (~822 bp). Die kleine Fragmentgröße führt zu einer verringerten Vektorgröße, was sich positiv auf die Klonierungsarbeiten auswirkt.

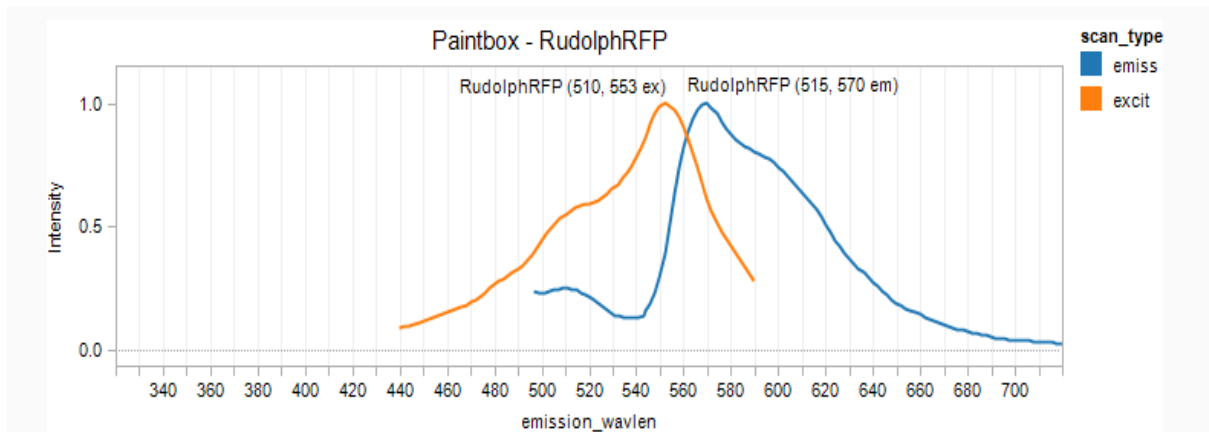
### 1.3 Fluoreszierende Proteine als Markerproteine in Hefe

Seit der Entdeckung des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) in 1965 aus *Aequorea victoria* ist die Anzahl der Anwendung dieser Proteine stetig gestiegen. So wurde GFP erfolgreich in Hefen exprimiert und für verschiedene Untersuchungen verwendet. In den letzten Jahrzehnten sind weitere Fluoreszenzproteine entdeckt und entwickelt worden. Diese variieren in der Wellenlänge der Anregung und Emission und erweitern das Spektrum auf die Farben Gelb (YFP), Cyan (CFP) und Rot (RFP) (Rodrigues *et al.* 2001).

Durch die Nutzung der verschiedenen Fluoreszenzproteine hat sich eine breite Anwendungsspanne entwickelt, die die Untersuchung der Genexpression, der subzellulären Lokalisierung von Proteinen sowie der Proteininteraktion umfasst.

Die relativ einfache Messung der Fluoreszenz von Fluorochromen als Maß für ihre Expression machen diese zu geeigneten Markerproteine für die Genexpression. Es bedarf keines Zellaufschlusses, keiner Zugabe weiterer Substrate oder spezieller Assays zum Nachweis des exprimierten Proteins (Rodrigues *et al.* 2001). Die Fluoreszenz kann dabei in einem Durchflusszytometer, unter dem Fluoreszenzmikroskop oder in einem *Plate Reader* direkt gemessen werden.

Die Nutzung von roten Fluoreszenzproteinen birgt den Vorteil, dass für die Messung höhere Wellenlängen verwendet werden können, bei denen die Lichtstreuung und Eigenfluoreszenz der Zellen verringert ist (Hitchcock *et al.* 2005). Außerdem ist die rötliche Färbung der Zellen schon bei Umgebungslicht sichtbar. In dieser Arbeit wird als Markerprotein das rotfluoreszierende Protein RudolphRFP (Hersteller: DNA 2.0) verwendet, welches die für die Überexpression optimierte Form des *GFP-like red fluorescent protein* aus *Corynactis californica* ist.



**Abbildung 5: Anregungs- und Emissionsspektrum von RudolphRFP**

Dargestellt ist die Intensität der Anregung (orange) und Emission (blau). Auf der Abszisse ist die Wellenlänge aufgetragen. Auf der Ordinate die Intensität.

Die optimale Wellenlänge für die Anregung (engl. *Excitation*) liegt bei 553 nm und für die Emission bei 570 nm (siehe Abbildung 5). Dies erlaubt die indirekte Quantifizierung des exprimierten Proteins mit verschiedenen optischen Methoden.

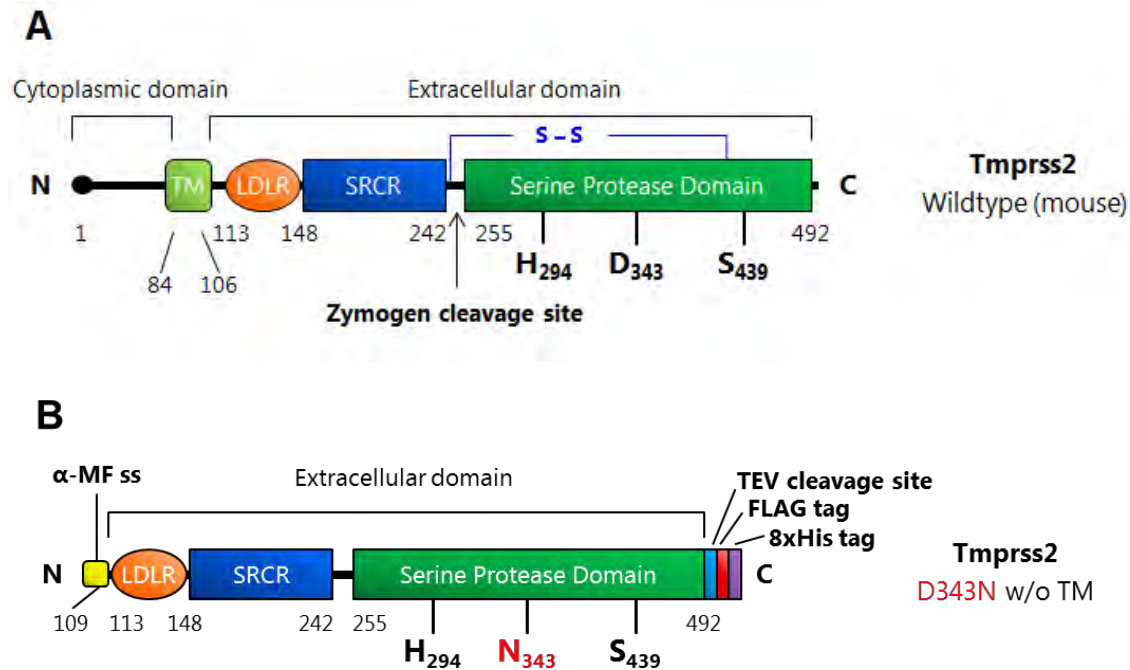
#### 1.4 Das Zielprotein Tmprss2 als potentielles *Drug Target* in der Influenza A-Behandlung

Die Typ II Transmembranserinprotease Tmprss2 (*transmembrane protease serine subfamily member 2*) ist eine membrangebundene Serinprotease, die vor allem auf den Lungenepithelzellen präsent ist und eine essentielle Rolle im Infektionsweg des Influenza A Virus spielt. (Bottcher-Friebertshauer *et al.* 2013).

Der Influenza A Virus ist ein humanpathogener Virus. Die Wirtszellen des Virus sind die Zellen im respiratorischen Trakt, weshalb der Virus zu den Hauptauslösern von Atemwegserkrankungen zählt (Taubenberger and Morens 2008). Entscheidend für den Infektionsvorgang ist die Aktivierung des Kapselproteins Hemagglutinin (HA). Die Aktivierung erfolgt dabei durch die Spaltung des Proteins durch wirtseigene Proteasen, die zwischen den verschiedenen Wirtsorganismen variieren können (Bottcher-Friebertshauer *et al.* 2013). Es hat sich gezeigt, dass Tmprss2 für die viralen Subtypen H1N1 und H3N2 eine essentielle Schlüsselrolle spielt. So konnten Tmprss2-Knockout-Mäuse im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen nicht mehr durch diese viralen Subtypen infiziert werden (Hatesuer *et al.* 2013).

Dies macht Tmprss2 zu einem interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapeutika gegen Influenza A-Infektionen. Daher sollen weitere Untersuchungen, die sowohl einen Funktionstest als auch die Strukturanalyse von Tmprss2 sowie die Interaktion von HA und Tmprss2 einschließen, durchgeführt werden. Zur Durchführung dieser Experimente ist die Herstellung von rekombinanter Tmprss2 notwendig. *P. pastoris* hat sich als interessantes Expressionssystem erwiesen, da Tmprss2 eine große Homologie zu

Hepsin aufweist, welches bereits erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert worden ist (Somoza *et al.* 2003).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung von Tmprss2 und der exprimierten Mutante D343N**

A: Schematische Darstellung von Tmprss2-Wildtyp. Zu sehen sind: die Transmembrandomäne (TM), die low density lipoprotein receptor domain (LDLR), die Scavenger Receptor Cysteine-Rich domain (SRCR) und die Serinproteasedomäne, mit der katalytischen Triade aus Histidin (H), Asparaginsäure (D) und Serin (S). Die vorhergesagte Zymogen-Schnittstelle ist ebenfalls dargestellt.

B: Konkrete für die Überexpression der extrazellulären Domäne in *P. pastoris* genutzten Mutante (D343N), die über eine verringerte Aktivität der katalytischen Triade verfügt. Die Expression erfolgt konkret ab der 109. Aminosäure. Die Sekretion wird gesteuert über das  $\alpha$ -mating-factor sekretionssignal. Zusätzlich verfügt das Fragment über zwei Tags zur Aufreinigung und einer TEV cleavage site zur Entfernung der Tags. Quelle: Christian Schinkowski, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig

Die allgemeine Domänenstruktur von Tmprss2 ist in Abbildung 6 zu sehen. Tmprss2 besteht aus einer Peptidkette, welche sich aus einem kurzen N-terminalen Rest, der Transmembrandomäne und der extrazellulären C-terminalen-Domäne zusammensetzt. Letztere umfasst eine LDLR-Domäne (*low density lipoprotein receptor*), eine SRCR-Domäne (*Scavenger Receptor Cysteine-Rich*) und die katalytische Serinprotease-Domäne. Es wird zunächst eine Vorstufe gebildet, die eine autokatalytische Reaktion durchläuft, durch die die 15 kDa große Proteasedomäne abgespalten wird (Abbildung 6 A Pfeil). Diese bleibt allerdings über eine Disulfid-Brücke weiterhin mit dem membranständigen N-Terminus verbunden (Bottcher-Friebertshauer *et al.* 2013).

Analog zu Hepsin (Somoza *et al.* 2003). wird für die Untersuchungen nur die extrazelluläre Domäne ab Aminosäure 109 exprimiert (siehe Abbildung 6 B), welche eine Größe von 45 kDa hat. Während die Mutante bisher schon über den induzierbaren AOX1-Promoter produziert worden ist (Christian Schinkowski, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung,

Braunschweig), wäre es interessant zu überprüfen, ob die Verwendung eines starken konstitutiven Promoters sich als vorteilhafte Alternative herausstellt.

### 1.5 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von drei alternativen konstitutiven Promotoren für die Produktion von komplexen Proteinen in *P. pastoris*. Als Referenz sollten die beiden klassischen *P. pastoris*-Promotoren  $P_{GAP}$  und  $P_{AOX1}$  mit untersucht werden. In der Literatur werden die Promotoren  $P_{SDH}$ ,  $P_{GCW14-Wildtyp}$  und  $P_{GCW14M+20}$  als gleichwertig bzw. stärker als der etablierte GAP-Promoter beschrieben.

Für die Untersuchungen sollen Vektoren verwendet werden, die über die Expressionskassette aus Promoter und dem Markerprotein RudolphRFP verwendet werden. Als Maß für die Expressionsleistung wird die rote Fluoreszenz herangezogen. Zunächst sollen stabile X-33-Zelllinien durch Elektroporation generiert werden und der Erfolg der Integration durch mehrere Polymerase-Kettenreaktions- (PCR) Ansätze überprüft werden. Für die Kultivierung der Zellen und Expression des Markerproteins sollen Versuche in verschiedenen Maßstäben durchgeführt werden. Eine grundlegende Testexpression erfolgt in 96-*Deepwell*-Platten, wobei das Zielprotein im Anschluss über einen Western Blot detektiert wird. Des Weiteren sollen einzelne isolierte Klone in Schüttelkolben kultiviert und die Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Zeitgleich werden mehrere isolierte Klone im Biolector-Mikroreaktor-System kultiviert, welches über eine *Online*-Messung für die Zelldichte und Fluoreszenz verfügt. Die Fluoreszenz wird zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit auf die Biomasse normiert, sodass ein Vergleich zwischen den Promotoren unabhängig von der Zelldichte durchgeführt werden kann.

Zum Abschluss des Projektes soll der Promoter, der sich in den Versuchen als am stärksten erwiesen hat, für die Expression von Tmprs2 verwendet werden. Tmprs2 dient dabei als Musterbeispiel für ein schwer zu exprimierendes Protein. Anhand der Ergebnisse sollen die neuen Promotoren auf ihre Einsatzfähigkeit in zukünftigen Projekten beurteilt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Bakterien- und Hefestämme

Im Folgenden sind alle Bakterien- und Hefestämme aufgeführt, die im Rahmen der Arbeit für Klonierungs- und Vermehrungsprozesse sowie die Expression des Zielproteins verwendet worden sind (siehe Tabelle 2 und Tabelle 3)

**Tabelle 2: Übersicht über den verwendeten bakteriellen Stamm und dessen Genotyp und Verwendung.**

Organismus	Stamm	Genotyp	Verwendung
<i>E. coli</i>	TOP10	F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 $\lambda^-$	Klonierung Vermehrung von Plasmiden

**Tabelle 3: Übersicht über den verwendeten Hefestamm und dessen Verwendung.**

Organismus	Stamm	Genotyp	Verwendung
<i>P. Pastoris</i>	X-33	Wildtyp	stabile und transiente Transformierung Expression der Zielproteine

### 2.2 Verwendete Expressionsplasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide basieren auf zwei Vektoren von Invitrogen. Für den AOX1-Promoter wurde das Plasmid pPICZA (siehe Anhang 7.1) verwendet. Für den GAP-Promoter wurde der Vektor pGAPZ $\Delta$ m8 eingesetzt, der auf dem kommerziellen Plasmid pGAPZ $\alpha$ -A (Invitrogen) basiert. Im Gegensatz zu pGAPZ $\alpha$ -A wurde pGAPZ $\Delta$ m8 mit einer Ampicillin-Resistenzkassette ausgestattet, sodass eine kostengünstigere Selektion mit Ampicillin während der Klonierungsarbeiten in *E. coli* möglich ist. Zudem wurde das  $\alpha$ -mating factor Sekretionssignal ( $\alpha$ -MF<sub>ss</sub>) deletiert, wodurch der Vektor an dieser Stelle im Vergleich zum kommerziellen pGAPZ-A (Invitrogen) um 8 bp verkürzt ist ( $\Delta$ m8). Für die Herstellung der weiteren Expressionsvektoren wurde der GAPPromoter in pGAPZ $\Delta$ m8 durch die neuen Promotoren (P<sub>SDH</sub>, P<sub>GCW14</sub> und P<sub>GCW14m+20</sub>) ersetzt. Die entstehenden Vektoren werden entsprechend als pSDHZ, pGCWZ und pGCWmZ bezeichnet. Alle Plasmide verfügen für die Selektion in Hefe über eine Zeocin-Resistenz („sh ble“).

Das Marker-Gen *RudolphRFP-Flag* wurde im Vorfeld dieser Arbeit inklusive Kozak-Sequenz (5'-gaaacg-3') zwischen die *EcoRI*- und *SacI*-Schnittstellen der MCS kloniert.

Ein für die Expression in *P. pastoris* durch die Firma GenScript optimiertes Gen für Maus Tmprss2, Mutante D343N, wurde inklusive  $\alpha$ -MF<sub>ss</sub> aus einem vorhandenen Plasmid



basierend auf pPICZ $\alpha$ -A (Invitrogen) – pPICZ $\alpha$ -A-Tmprss2-D343N<sub>opt</sub> – PCR-amplifiziert und mittels *Bsa*I und *Not*I zwischen die *Eco*RI- und *Not*I-Schnittstellen des Vektors pGCWmZ kloniert.

Für die transiente Expression wird das Fragment bestehend aus dem Promotor (P<sub>SDH</sub> oder P<sub>GCW14</sub>) und *RudolphRFP-Flag* aus pGCWZ-RudolphRFP-Flag und pSDHZ-RudolphRFP-Flag geschnitten. (siehe Kapitel 2.4). Dieses Fragment wurde zwischen die *Spe*I- und *Not*I-Schnittstellen der MCS in den pBGP1- $\Delta\alpha$ -B kloniert, nachdem dieser dephosphoryliert worden war (siehe 2.5). Dieses verfügt für die Selektion anstatt über eine Zeocin-Resistenz über eine Blastocidin-S-Resistenz.

Die in dieser Arbeit verwendeten und generierten Plasmide sind in der Tabelle 4 aufgelistet. Die zugehörigen Vektorkarten und verwendeten PCR-Primer sind im Anhang (siehe Kapitel 7.1) zu finden.

**Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Expressionsplasmide, den verwendeten Selektionsmarker, das GOI und die Transformationsart**

Name	Promoter	GOI	Selektionsmarker	Methode
pPICZ-RudolphRFP-Flag	AOX1	RudolphRFP	Zeo	Stabil
pGAPZ $\Delta$ m8-RudolphRFP-Flag	GAP	RudolphRFP	Zeo + Amp	Stabil
pGCWZ-RudolphRFP-Flag	GCW14	RudolphRFP	Zeo + Amp	Stabil
pGCWmZ-RudolphRFP-Flag	GCW14M+20	RudolphRFP	Zeo + Amp	Stabil
pSDHZ-RudolphRFP	SDH	RudolphRFP	Zeo + Amp	Stabil
pGCWmZ- $\alpha$ -mTmprss2-D343N-opt	GCW14M+20	Tmprss2-D343N <sub>opt</sub>	Zeo + Amp	Stabil
pBGP1 $\Delta\alpha$ -B-GCW14-RudolphRFP-Flag	GCW14	RudolphRFP	Blasticidin-S + Amp	transient
pBGP1 $\Delta\alpha$ -B-SDH-RudolphRFP-Flag	SDH	RudolphRFP	Blasticidin-S + Amp	transient

## 2.3 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Die PCR besteht aus drei zeitlich voneinander getrennten Reaktionen. Die doppelsträngige DNA wird zunächst denaturiert, sodass sich die beiden Stränge voneinander trennen und für die Anlagerung von Nukleotiden zur Verfügung stehen. Im nächsten Schritt, dem *Annealing*, lagern sich die Primer an spezifische Basensequenzen der Einzelstränge an. Primer sind Oligonukleotide, die als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen. Sie sind notwendig, da die DNA-Polymerase stets einen Startpunkt benötigt, an deren 3' OH-Gruppe sie neue Nukleotide anlagern kann. Es wird für jeden Strang ein eigener Primer benötigt. Die Primer werden im Vorfeld designt. Dabei handelt es sich um einen kritischen Punkt, da viele Faktoren die Anlagerung der Primer und die Effizienz der ganzen Reaktion beeinflussen.

Während der Abschlussarbeit wird das Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase Kit von NEB verwendet. Dabei werden sowohl genomische PCR-Ansätze als auch PCR-Amplifikationen in Rahmen einer Klonierung, die als *Template* Plasmid-DNA haben, durchgeführt. Beide Ansätze unterscheiden sich in den verwendeten Puffern und der Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO). Die verwendeten Ansätze sind in Tabelle 6 zu finden. Das Programm (siehe Tabelle 5) für die PCR kann separat am Thermocycler eingestellt und an die verwendeten Primer angepasst werden. Das allgemeine Programm ist unten zu sehen. Dieses Programm kann bezüglich Temperatur, Zeit und Zyklen modifiziert werden

**Tabelle 5: Übersicht über das allgemeine PCR-Programm**

Das Programm kann bezüglich Dauert und Wiederholung der Schritte sowie der Temperatur modifiziert werden.

Schritt	Wiederholung	Temperatur [°C]	Dauer [s]
<b>Primäre Denaturierung</b>	1	98	300
<b>Denaturierung</b>	30	98	60
<b>Annealing</b>		50-60	60
<b>Elongation</b>		72	60
<b>Finale Elongation</b>	1	72	300

**Tabelle 6: Übersicht über die PCR-Ansätze für die genomische DNA und für PCR- Amplifizierung im Rahmen von Klonierungsarbeiten**

	Genomische PCR	PCR-Amplifizierung
<b>5x GC-Puffer bzw. HF-Puffer</b>	10 µL GC-Puffer	10 µL HF-Puffer
<b>Primer (10 µM)</b>	1,25 µL	1,25 µL
<b>DSMO (100 %)</b>	2,5 µL	/
<b>Desoxyribonukleotide (10 mM)</b>	1 µL	1 µL
<b>Template</b>	1 µL genomische DNA	1 µL
<b>Phusion-Polymerase</b>	1 µL	1 µL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	32 µL	34,5 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	50 µL	50 µL

## 2.4 Restriktionsverdau

Für die Ligation müssen der Zielvektor und das gewünschte DNA-Fragment (*Insert*) passende Enden aufweisen, die miteinander verbunden werden können. Dafür werden sowohl der Vektor als auch das *Insert* mit denselben Restriktionsenzymen behandelt. Der Ansatz lautet wie folgt.

**Tabelle 7: Übersicht über die eingesetzten Mengen der Reagenzien für einen präparativen Restriktionsverdau**

Reagenzien	Eingesetzte Menge
DNA	x (~5 µg)
Enzyme	je 60 U
10x Cutsmart-Puffer (NEB)	10 µL
H <sub>2</sub> O	auf 100 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	100 µL

Der Ansatz wird für 3 h bei 37 °C inkubiert und danach in einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.9) aufgetrennt. Die Zielbanden werden aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten, aus dem Gelstück aufgereinigt (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ von Macherey-Nagel) und die DNA-Konzentration mit dem Nanodrop 2000 gemessen. Zusätzlich werden die aufgeschnittenen Vektoren dephosphoryliert.

## 2.5 Ligation

Bei der Ligation werden die beiden zuvor vorbereiteten DNA-Fragmente durch die T4-Ligase (Roche) miteinander verbunden. Durch die Ligation wird das *Insert* in den Vektor integriert. Um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Ligation zu erhöhen, wird eine erhöhte Insert-Konzentration eingesetzt. Es wird ein 1:4 Verhältnis zwischen Vektor und *Insert* verwendet. Die Endkonzentrationen betragen 30 fmol Vektor und 120 fmol *Insert*. Parallel zur Ligation wird ein Religationsansatz als Kontrolle angesetzt.

**Tabelle 8: Übersicht der Zusammensetzung von Ligations- und Religationsansatz**

	<b>Ligation</b>	<b>Religation</b>
<b>Vektor (30 fmol)</b>	x $\mu$ L	x $\mu$ L
<b>Insert (120 fmol)</b>	y $\mu$ L	/
<b>10x Ligase-Puffer</b>	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
<b>T4-Ligase (1 U/<math>\mu</math>L)</b>	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	17,5 $\mu$ L-x-y	17,5 $\mu$ L-x
<b>Gesamtvolumen</b>	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L

## 2.6 Hitzeschock-Transformation

Die Hitzeschock-Transformation induziert die Aufnahme fremder DNA in die Zellen über eine plötzliche Temperaturerhöhung. Es werden 2  $\mu$ L der Plasmid-DNA zu 50  $\mu$ L kompetenten *E. coli* TOP10 gegeben und die Zellen daraufhin für 15 bis 30 min auf Eis inkubiert, sodass sich die DNA an die Zellen anlagern kann. Die Transformation wird durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 30 bis 45 s induziert. Im Anschluss werden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt, mit 500  $\mu$ L LB-Medium versetzt und für 30-60 min bei 37 °C und 300 rpm auf den Heizblock inkubiert. Daraufhin werden die Zellen auf LB-Amp-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

## 2.7 Plasmid-Isolierung

Für die Isolierung von Plasmiden im kleinen Maßstab aus *E. coli* TOP10 (4 mL Übernachtskulturen) wird das GenElute™ Plasmid Miniprep Kit von Sigma Aldrich verwendet. Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica-Säule. Dabei wird die Isolierung gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Einige Schritte wurden modifiziert, um die Ausbeute zu erhöhen und die Reinheit zu verbessern. So wird das Lysat bei 15.000 x g statt 12.000 x g zentrifugiert. Außerdem wird die Säule vor der finalen Elution für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Isolierung wird die DNA im Nanodrop 2000 vermessen und in einem Testverdau überprüft.

## 2.8 Testverdau

Der Testverdau ist eine Methode zur Überprüfung von Plasmid-DNA. Dazu wird durch den gezielten Einsatz von Restriktionsenzymen ein charakteristisches Fragment aus dem Plasmid herausgeschnitten. Der Ansatz wird auf einem Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.9) aufgetrennt und das Plasmid anhand des Bandenmusters überprüft. Der Ansatz ist wie folgt. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei 37 °C.

**Tabelle 9: Übersicht über die eingesetzten Mengen der Reagenzien für einen Testverdau**

Komponente	Eingesetzte Menge
DNA	3 µL
Enzyme	je 6 U
10x Cutsmart-Puffer (NEB)	1 µL
H <sub>2</sub> O	auf 10 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	10 µL

## 2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe aufzutrennen. Sie beruht darauf, dass durch Erhitzen gelöste Agarose beim Verfestigen eine netzartige Struktur in Form eines Gels ausbildet. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes, wandern die negativgeladenen DNA-Fragmente dem Pluspol entgegen. Kleine Fragmente werden durch die Gitterstruktur weniger in ihrer Bewegung gestört, sodass sie die Strecke schneller zurücklegen als größere DNA-Fragmente.

### Gießen des Agarose-Gels:

Die Agarose-Konzentration beeinflusst den Trennbereich des Gels. So wird ein 0,8 %iges Agarosegel verwendet, welches über eine Auflösung für Basengrößen von 200 bp bis 10.000 bp verfügt. Es wird eine Vorratslösung angesetzt. Für diese werden 2,4 g Agarose in 300 mL 1xTAE-Puffer gelöst. Die Agarosesuspension wird 3 min erhitzt. Es wird gewartet bis die Lösung sich bei Raumtemperatur und unter Rühren abgekühlt hat. Daraufhin wird die Lösung in eine entsprechende Gelform gegeben. Die verwendete Menge hängt von der Größe des Gels ab. Es wird eine Dicke von rund 0,75 cm angestrebt. (siehe Tabelle 10)

Für die Visualisierung der DNA-Fragmente wird „Rotisafe“ (Carl Roth) verwendet. Die Menge des eingesetzten Rotisafes ist abhängig von der Größe des Gels:

**Tabelle 10: Verwendete Menge 0,8 %iger Agarose-Lösung und Rotisafe für das Gießen eines 0,75 cm dicken Gels mit aufgeführten Maßen**

Größe (Breite x Länge)	Volumen Agarose-Lösung (mL)	Volumen Rotisafe (µL)
7 cm x 7 cm	30	1,5
7 cm x 10 cm	45	2,25
15 cm x 7 cm	60	3,00
15 cm x 10 cm	90	4,50

Nach dem Gießen des Gels wird für die Bildung der Probetaschen ein Kamm in das noch flüssige Gel gegeben. Der Kamm wird dem Probenvolumen angepasst.

### Durchführung

Die Proben werden mit 6xLadepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Zusätzlich wird als Marker der „SmartLadder“-DNA Marker von Eurogentec (siehe Anhang 0) aufgetragen. Dieser besitzt Banden im Bereich von 200 bp bis 10.000 bp.

Die Elektrophorese erfolgt für 30 min bei 100 Volt. Nach erfolgreicher Gelelektrophorese steht ein Kamerasystem von Kodak zur Verfügung, mit dem Bilder von Agarose-Gelen zur Dokumentation erstellt werden können. Sofern eine Bande aus dem Gel ausgeschnitten werden muss, wird ein UV Transilluminator von Intas verwendet.

## **2.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wird in der Abteilung „Genomanalytik“ des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung durchgeführt. Die Ergebnisse werden mit den Softwares „Vektor NTI“, Chromas und diversen Online-Tools ausgewertet.

## **2.11 Stabile Transformation von *P. pastoris***

### **2.11.1 Herstellung elektrokompenter Hefezellen**

Die Herstellung der elektrokompenten X33-Zellen für diese Arbeit erfolgt nach dem Protokoll von Lin-Cereghino *et. al.* (Lin-Cereghino *et al.* 2005). Das Protokoll beschreibt eine schnelle Methode für die Herstellung elektrokompenter Zellen von *P. pastoris*. Die so hergestellten Zellen sind bei -80°C lagerbar.

Die X-33-Zellen werden in Schüttelkolben bis zu einer optischen Dichte von 0,8 bis 1,0 kultiviert und dann geerntet. Daraufhin werden die Zellen zunächst in BEDS-Puffer und 1 M DDT inkubiert, abzentrifugiert und erneut mit BEDS-Puffer gewaschen. Die Zellen können nun direkt transformiert werden oder bei -80 °C gelagert werden. Im Gegensatz zu *E. coli* sind Hefezellen gegenüber Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff sensibel, sodass sie in einem Isopropanolcontainer langsam auf die gewünschte Temperatur abkühlen (1 °C/min).

### **2.11.2 Linearisierung der Vektoren**

In dieser Arbeit wird die Linearisierung der Expressionsvektoren mit Restriktionsenzymen (NEB) durchgeführt. Die Enzyme werden so gewählt, dass die Linearisierung innerhalb der Promotersequenzen stattfindet, sodass die homologe Rekombination in die genomischen Loci der jeweiligen Promotoren erfolgt. Es werden ~4 µg Plasmid-DNA für 3-4 h bei 37 °C linearisiert (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 11: Übersicht der für die Linearisierung der Expressionsvektoren verwendeten Restriktionsenzyme**

Promoter	Restriktionsenzym
P <sub>GAP</sub>	AvrII
P <sub>AOX1</sub>	SacI
P <sub>GCW14-Wildtyp/M+20-Mutante</sub>	SacI
P <sub>SDH</sub>	AflI

**Tabelle 12: Reaktionsansatz für die Linearisierung der Expressionsvektoren.**

Reagenz	Volumen (µL)
DNA	10-20
Cutsmart-Puffer	10
Enzyme	60 Units
Wasser	x
<b>Gesamt</b>	<b>100</b>

Die Ansätze werden nach der Inkubation direkt aufgereinigt (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ von Macherey-Nagel). Dabei wird dem Herstellerprotokoll gefolgt. Die linearisierten Plasmide können direkt für die Transformation verwendet werden. Da zirkuläre Plasmid-DNA die Transformationseffizienz einschränken könnte, kann außerdem die Linearisierung in einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden. Dafür werden 3 µL DNA mit 7 µL H<sub>2</sub>O und 2 µL 6xLadepuffer versetzt und auf einem Agarosegel aufgetrennt.

### 2.11.3 Elektroporation von *P. pastoris*

Die Transformation erfolgt durch Elektroporation. Dabei wird die Zellwand durch das Ansetzen eines elektrischen Feldes für DNA durchlässig gemacht, sodass die Fremd-DNA eindringen und sich über homologe Rekombination in das Genom integrieren kann (Cregg 2007). Für die Elektroporation wird der Gene-Pulser von Biorad mit folgenden Einstellungen verwendet:

Küvettenpalt: 2 mm

Spannung: 1,5 kV

Kapazität: 25 µf

Widerstand: 200 Ω

Die Zellen werden nach der Elektroporation sofort mit 1 mL 1 M Sorbitol oder einem Gemisch aus 0,5 mL 1 M Sorbitol und 0,5 mL YPD versetzt und für 1-3 h bei 30 °C und 300 rpm auf dem Heizblock inkubiert. Danach können die Zellen auf Selektionsagarplatten ausgestrichen werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden YPD-Agar Platten mit Zeocin

(Invitrogen) oder Blastidicin S (Invitrogen) entsprechend der auf den Expressionsplasmiden vorhandenen Resistenz eingesetzt

Bei Zeocin handelt es sich um ein Kupferchelat-haltiges Antibiotikum, welches sowohl gegen Prokaryoten (z.B. *E. coli*) als auch gegen Eukaryoten (z.B. *P. pastoris*) wirksam ist. Die antibiotische Wirkung basiert auf Interkalation mit der DNA. Die Resistenz gegen Zeocin wird durch das Gen *-sh ble-* vermittelt, welches auf den eingesetzten Vektoren vorhanden ist. Zeocin wird den Platten oder Flüssigmedien in einer Konzentration von 100 µg/mL zugegeben.

Blasticidin S wirkt ebenfalls gegen eukaryotische wie prokaryotische Organismen. Durch das Antibiotikum wird die tRNA an das Ribosom fixiert, sodass die Proteinbiosynthese inhibiert wird. Für die Selektion von *E. coli* wird eine Konzentration von 100 µg/mL und für die Selektion von *P. pastoris* eine von 500 µg/mL eingesetzt.

Die Platten werden für 3 bis 5 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

Von den bewachsenen Transformationsplatten werden nach Inkubation mehrere Kolonien gepickt und in einem Reinstich auf frischen YPD-Zeocin- bzw. YPD-Blasticidin-Platten vereinzelt und erneut inkubiert. Von diesem Reinstich wird ein weiterer Reinstich hergestellt, um homogene Einzelkolonien für die folgenden Arbeiten zu erhalten.

Für das Screening nach *Tandem-Repeat*-Klonen werden die Transformationsansätze auf YPD-Agar-Platten mit einer erhöhten Zeocin-Resistenz (200 µg/mL und 1 mg/mL) ausgestrichen. Die Inkubationsdauer ist aufgrund der erhöhten Antibiotikumkonzentration und dem verlangsamten Wachstum auf bis zu 6 Tagen bei 30 °C erhöht.

## 2.12 Transiente Transformation

Für die transiente Transformation von *P. pastoris* werden ca. 200 ng zirkuläre Plasmid-DNA, der auf den pBGP1 basierenden Plasmiden für die Transformation eingesetzt. Die Transformation und die Selektion erfolgen analog zur stabilen Transformation (siehe Kapitel 2.11.3).

## 2.13 Extraktion der genomischen DNA

Die Extraktion der genomischen DNA ist notwendig, um den Erfolg der Transformation und die Integration der gewünschten DNA-Abschnitte zu überprüfen. Für die Extraktion wird nach dem Protokoll von Lööke *et. al.* (Looke *et al.* 2011) gearbeitet, welches zusätzlich modifiziert worden ist, um die Ausbeute zu erhöhen.

Zunächst werden die transformierten Zellen von der Platte über Nacht bei 30 °C und 130 rpm in 1 mL Medium (YPD oder BMMY/BMDY-Medium mit Zeocin) kultiviert.



Von den Zellsuspensionen werden 100  $\mu\text{L}$  entnommen, geerntet (6.000 x g für 5 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in einem Lyse-Puffer (200 mM Lithiumacetat und 1 % SDS) resuspendiert und für 15 min bei 95 °C aufgeköcht. Danach werden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur abgekühlt und mit 0,5  $\mu\text{L}$  RNase A (100 mg/mL, Qiagen) versetzt, um die in den Zellen vorhandene RNA abzubauen. In diesem Zustand werden die Ansätze für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fällung der DNA erfolgt mit Isopropanol anstatt Ethanol. Außerdem werden die Ansätze bei -20 °C inkubiert, um die Fällung zu beschleunigen. Danach wird die DNA durch Zentrifugation geerntet und mit 70 % Ethanol gewaschen. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, das Pellet bei 37 °C getrocknet und in Tris-HCl-Puffer resuspendiert. Die Probe kann nun im Nanodrop 2000 vermessen und für eine PCR-Reaktion verwendet werden.

### **2.14 96-Deepwell-Platten-Kultivierung**

Die *Deepwell*-Platten 96/2000 (Eppendorf) verfügen über 96 Vertiefungen (*wells*), die in zwölf Spalten und acht Reihen aufgeteilt sind. Die *wells* fassen ein Volumen von bis zu 2 mL. So kann eine Vielzahl von Klonen parallel kultiviert werden. Die Kultivierung wird auf einem Heidolph Titramax 1000 bei 1.050 rpm und 28 °C durchgeführt. Da der Schüttler über keine Kühlung verfügt, können während der Kultivierung Temperaturen von bis zu 30 °C auftreten. Dies liegt im Bereich der für *P. pastoris* adäquaten Wachstumstemperatur. Die hohe Schüttelfrequenz ist für eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen notwendig. Dies führt zu einer teilweisen Sedimentation der Zellen. Um eine gleichmäßige Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, werden die *wells* einmal täglich mit einer Pipette aufgeschwemmt.

Nach 72 bis 96 h werden die Zellen geerntet. Sofern mit den Pellets weitergearbeitet werden soll, wird der Inhalt der *wells* in je ein Eppendorf-Tube überführt, für 10 min bei 6.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets werden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -20 °C gelagert.

Wenn die Überstände von Interesse sind, wird die komplette Platte für 10 min bei 3.000 rpm in der Schwenkzentrifuge zentrifugiert und die Überstände abgenommen.

### **2.15 Schüttelkolbenkultivierung**

*Pichia pastoris* ist sehr robust gegenüber verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 30 °C. Gleichzeitig ist *P. pastoris* in der Lage bei Temperaturen bis 25 °C (Zhang *et al.* 2007) bei verringerter Teilungsrate zu wachsen. Bei der Expression einiger Proteine kann die Temperatur zugunsten der Expression variiert werden.

Auch hinsichtlich der Versorgung mit Sauerstoff ist das Expressionssystem robust. So ist ein Wachstum sowohl unter aeroben wie auch anaeroben Bedingungen möglich, wobei aerobes Wachstums bevorzugt wird und anaerobe Bedingungen sich auf das physiologische Proteom von *P. pastoris* auswirkt.

Im Laufe der Kultivierung verändert sich durch den Stoffwechsel der pH-Wert des verwendeten Mediums ins Saure. *P. pastoris* ist sehr resistent gegenüber sauren Bedingungen und hält pH-Werte bis zu pH 3,5 aus.

#### Verwendete Schüttelkolben

Es werden Schott Duran Schüttelkolben in unterschiedlichen verwendet. Die Schüttelkolben sind mit Schikanen ausgestattet, um den Sauerstoffeintrag zu erhöhen. Die Größe der Schüttelkolben wird dem Volumen der Zellsuspension angepasst. So wird ein Flaschenvolumen gewählt, dass in etwa dem 10-fachem des Suspensionsvolumens entspricht. Über Nacht werden die Schüttelkolben mit Parafilm abgedeckt, um ein übermäßiges Verdampfen der Flüssigkeit zu verhindern.

#### Verwendete Kultivierungsmedien

Es stehen grundsätzlich drei verschiedene Kultivierungsmedien zur Verfügung. Die Herstellungsprotokolle sind im Anhang zu finden. Das YPD-Medium (*Yeast extract*, Pepton, Dextrose) ist das Grundmedium für Vorkulturen und Agarplatten. Es dient als einfaches Kultivierungsmedium und ist nicht gepuffert. Als Kohlenstoffquelle ist Dextrose enthalten. Des Weiteren werden für Expression auf pH 6,5 eingestellte Medien eingesetzt, sodass der pH-Wert auch bei längeren Kultivierungen annähernd stabil bleibt. Diese unterscheiden sich in der verwendeten Kohlenstoffquelle und in der Zugabe der Komplexmedium-Komponente Hefe-Extrakt (*Yeast Extract*).

#### Komplexmedien:

BMMY: *Buffered Methanol Complex Medium*

BMGY; *Buffered Glycerol Complex Medium*

BMDY: *Buffered Dextrose Complex Medium*

#### Minimalmedien:

BMM: *Buffered Minimal Methanol Medium*

BMG: *Buffered Minimal Glycerin Medium*

BMD: *Buffered Minimal Dextrose Medium*

Die Minimalmedien sind im Gegensatz zu den Komplexmedien farblos und verfügen daher über eine geringe Eigenabsorption bzw. Eigenfluoreszenz.

### Vorkulturen

Für die Vorkultur der Transformanten wird YPD-Zeocin-Medium verwendet. Dafür werden 4 mL Medium in Kulturröhrchen transferiert. Zum Animpfen wird unter der Sterilwerkbank (SWB) mit einem Zahnstocher eine Einzelkolonie von einer Agarplatte gepickt und die Vorkultur für 48 h bis 72 h bei 30 °C und 130 rpm inkubiert.

### Animpfen der Hauptkulturen

Zunächst wird die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) der Vorkulturen gemessen. Daraufhin wird jede Hauptkultur so angeimpft, dass die  $OD_{600}$  der Kulturen zum Startpunkt gleich ist.

Die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) ist ein Maß für die Zelldichte der Kultur und wird gemessen, um das Wachstumsverhalten der Kulturen zu untersuchen. Dabei ist der Wert linear proportional zur Zelldichte. Diese Proportionalität gilt allerdings nur für einen Bereich bis 0,6, sodass dichte Zellsuspensionen entsprechend verdünnt werden müssen. Die Verdünnung erfolgt mit  $H_2O$  oder PBS-Puffer. Mit der Verdünnung kann der ursprüngliche Wert berechnet werden. Bei höheren Dichten wurden serielle Verdünnungen mit einem Mindestvolumen von 10  $\mu$ L durchgeführt, um den Einfluss von Pipettierfehlern möglichst gering zu halten.

Für eine Messung wird zunächst eine Probe der Kultur genommen und auf  $OD_{600} < 0,6$  verdünnt. Da das Medium bzw. das Verdünnungsmittel ebenfalls eine Absorbanz aufweist, muss das Messgerät darauf zunächst kalibriert werden (*blanking*). Dafür wird 1 mL Flüssigkeit in eine Küvette (Ratiolab Halbmikro, PS) überführt und die „Blank“-Funktion des eingesetzten Spektralphotometers verwendet. 1 mL der verdünnten Probe wird nun in eine frische Küvette überführt und vermessen.

### Probenahme und -weiterverarbeitung

Die Probenahme erfolgt 1- bis 2-mal täglich. Unter der SWB wird 1 mL Probe pro Kolben in ein Eppendorf-Tube überführt. Die genommene Probe wird für die Analytik ( $OD_{600}$  und Durchflusszytometrie) verwendet. Außerdem wird ein Aliquot der Zellsuspension abgenommen, der einer optischen Dichte von  $OD_{600}=1$  entspricht. Diese normierte Probe wird für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wird mit 1 mL  $H_2O$  gewaschen und erneut für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Diese Probe kann für eine spätere SDS-PAGE und den Western Blot nach Zellaufschluss verwendet werden.

Die restliche Zellsuspension wird als Rückstellprobe ebenfalls für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird bei – 20 °C gelagert.

#### Analytik: Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wird das Guava easyCyte™ mini zusammen mit der Software „Guava Cytosoft 4.2“ der Firma Merk verwendet. Das Gerät ist in der Lage einzelne Zellen zu vermessen. Dafür wird die Zellsuspension durch eine Mikrokapillare zu einem Messkopf geleitet. Dort werden die Zellen mit einem blauen Argon-Laser (488 nm) vermessen. Durch die Zelle wird das Licht abgelenkt. Dabei wird zwischen dem sogenannten „*Forward-Scatter*“ (FSC), wobei es sich um ein kurz winkeliges Lichtsignal handelt, welches Auskunft über die Größe der Zelle gibt, und den „*Sideward-Scatter*“ (SSC) unterschieden. Dabei handelt es sich um ein breitwinkeliges Lichtsignal, welches eine Aussage über die Granularität der Zellen wiedergibt. Über die Signale des FSC und SSC können lebende Zellen von Zellaggregaten und Zelltrümmer unterschieden werden, da diese sich in der Größe und Granularität unterscheiden. Mit Hilfe von *Gates* lassen sich Teilmengen der gemessenen Events abgrenzen und weiter analysieren.

Da der Argon-Laser auf 488 nm festgestellt ist, wird RudolphRFP nur mit einer Intensität von ca. 20 % angeregt (Vgl. Abbildung 5).

Für die Probenvorbereitung müssen die Zellsuspensionen ausreichend verdünnt werden, um die Kapillare nicht zu blockieren. Als Maß wird angenommen, dass ein Wert von  $OD_{600}=1$  einer Zellzahl von  $3 \times 10^7$  Zellen/mL entspricht (Bionumbers Database). Für die Messung werden die Proben auf eine Zelldichte von rund  $5 \times 10^5$  Zellen/mL verdünnt.

### **2.16 Hochdurchsatzkultivierung im Biolector**

Beim Biolector-System der Firma m2p-labs handelt es sich um ein Mikroreaktor-System. Im System können Zellen in proprietäre 48-Well-Platten bei einer eingestellten Temperatur kultiviert und der pH-Wert, die Biomasse und die Fluoreszenz gemessen werden. Außerdem kann der Sauerstoffeintrag über die Schüttelfrequenz reguliert werden.

Das System kann sowohl für die Kultivierung von eukaryotischen als auch prokaryotischen Zellen verwendet werden. Parallel zu den anderen Messungen können die Fluoreszenzproteine über ein LED-System angeregt und die Fluoreszenz gemessen werden. Das System ist dabei vollständig automatisiert und erlaubt ein Hochdurchsatz-Screening nach der Expression von fluoreszierenden Proteinen.

Für die Kultivierung stehen zwei verschiedene Platten-Typen zur Verfügung:

- a) *Round-Well-Plate* für scherempfindliche Zellen
- b) *FlowerPlate* für einen erhöhten Sauerstoffeintrag

Für *P. pastoris* wird die *FlowerPlate* gewählt, da *P. pastoris* nicht scherempfindlich ist und der Sauerstoffeintrag somit erhöht werden kann. Die folgenden Parameter wurden für die Kultivierung eingestellt:

Temperatur: 28 °C

Schüttelfrequenz: 900 rpm

Sauerstoffregulierung: Aus

Feuchtigkeitsregulierung: Aus

Auf die Feuchtigkeitsregulierung wurde aufgrund der Kultivierungstemperatur von 28 °C verzichtet, da kein signifikanter Flüssigkeitsverlust zu erwarten war. Das System verfügt über sechs Messkanäle zum Messen verschiedener selbstgewählter Parameter in unterschiedlichen Intensitäten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Biomasse und die rote Fluoreszenz in jeweils drei verschiedenen Intensitäten (*Gains*) gemessen, um einen möglichst großen Messbereich abzudecken. Es wurden folgende Kanäle gewählt:

1. Biomasse (*Gain* 5, 10, 15)
2. Rote Fluoreszenz (*Gain* 15,40,100)

## 2.17 Zellaufschluss

### Herstellung von Zellextrakten mit *acid-washed* Glaskugeln

Das Reporterprotein RudolphRFP-Flag wird intrazellulär exprimiert. Folglich müssen die Zellen vor der weiteren Untersuchung durch eine SDS-PAGE und Western Blot aufgeschlossen werden.

Für diese Arbeit wurde eine mechanische Aufschlussmethode verwendet, für die *acid-washed* Glaskugeln (Hersteller: Sigma, 0,5 mm) eingesetzt worden sind. Der Aufschluss erfolgte nach dem Protokoll von Invitrogen (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit). Das Protokoll wurde in einigen Punkten modifiziert, um den Aufschluss effizienter zu gestalten. Zusätzlich zum mechanischen Aufschluss wurden die Zellen zuvor mit Lyticase (aus *Arthrobacter luteus*, Sigma) behandelt. Lyticase ist ein Enzym, welches die Zellwände der Hefezellen abbaut. Dadurch werden die Zellwände vorgeschwächt, sodass die Effizienz des mechanischen Aufschlusses mit den Glaskugeln erhöht ist. Die Lyticase ist außerdem kompatibel mit dem für den Aufschluss verwendeten *Breaking-Buffer*, sodass die Zellen vor Zugabe der Glaskugeln für 30 min bei Raumtemperatur mit 6 U Lyticase inkubiert wurden. Eine Unit ist folgendermaßen definiert:

“One unit will produce a  $\Delta A_{800}$  of 0.001 per min at pH 7.5 at 25 °C, using a suspension of yeast as substrate in a 3 mL reaction mixture.” (Quelle: Sigma).

Des Weiteren wurden die Zellen nach einem hausinternen Protokoll mit 0,5  $\mu\text{L}$  DNase (SFPR, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung) behandelt. Genomische DNA fällt in Verbindung mit dem SDS-Ladepuffer aus, sodass das Beladen der Probenaschen bei der SDS-Page (siehe Kapitel 2.18) erschwert wird.

Nach erfolgreichem Aufschluss wurden die Glaskugeln zunächst über Nacht in 5,8 M HCl und anschließend 10-Mal in Wasser gewaschen. Über Nacht wurden die Kugeln bei 37 °C im Brutschrank getrocknet und standen daraufhin für den nächsten Aufschluss zur Verfügung.

### Direkter Aufschluss von Zellen in SDS-Probenpuffer

Bei einer erhöhten Probenanzahl gestaltet sich der Aufschluss mit Glaskugeln zunehmend als zeitaufwendig. Außerdem kann die Homogenität des Aufschlusses nicht sichergestellt werden.

Eine zeiteffizientere Methode ist das Aufkochen der Zellen in SDS-Ladepuffer (Zhang *et al.* 2011). Zunächst wurde ein Aliquot der Zellsuspension auf eine optische Dichte von  $\text{OD}_{600}=1$  verdünnt und geerntet (16.000 x g für 1 min). Das Pellet wurde mit 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 100  $\mu\text{L}$  2xLadepuffer versetzt und resuspendiert und danach bei 95 °C für 15 min im Heizblock aufgekocht und zwischenzeitlich gevortext. Die Zelltrümmer wurden im Anschluss durch eine Zentrifugation (16.000 x g für 5 min) entfernt. Von dem Extrakt könnten nun direkt Proben für eine SDS-Page abgenommen werden.

## **2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot**

Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulphat-Polyacrylamidelectrophorese) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe. Proteine sind polyionische Biopolymere, die je nach Aminosäuresequenz eine unterschiedliche Gesamtladung haben. So würden Proteinen in einem elektrischen Feld gemäß ihrer Ladung entweder zur Kathode bzw. Anode wandern. Die Auftrennung wäre also nicht rein abhängig von der Größe des Proteins. Aus diesem Grund wurden die Proteine im Vorfeld der Auftrennung denaturiert. Dabei wird SDS benutzt, das sich an die Proteine anlagert. SDS ist negativ geladen und verleiht dadurch allen Proteinen ebenso eine negative Ladung. Kleine Proteine können sich jedoch schneller durch das netzartige Gel bewegen und wandern somit weiter. (Laemmli 1970)

### Gießen der SDS-Polyacrylamid-Gele

Das Gel besteht aus zwei Schichten. Unten ist das größere Trenngel, welches maßgeblich für die Auftrennung der Proteine verantwortlich ist. Über dem Trenngel ist das Sammelgel. Dieses ist schwächer konzentriert als das Trenngel und dient der Aufkonzentrierung der Probe zu Beginn der Auftrennung. Das Sammelgel erhöht die Qualität der Auftrennung. Die Trennkapazität des Gels ist abhängig von der Acrylamid-Konzentration. (Laemmli 1970)

**Tabelle 13: Trennkapazität einer SDS-Page bei variierenden Acrylamid-Konzentrationen nach (Jansohn and Rothhämel 2012)**

Acrylamid-Konzentration (%)	Größe des Proteins (kDa)
5	60-200
10	16-70
15	12-45

Da das Zielprotein (RudolphRFP) eine Größe von ca. 25 kDa hat wurde ein 15 %iges Acrylamid-Trenngel verwendet. Als Sammelgel wurde ein 5 %iges Acrylamid-Gel verwendet.

Zum Gießen des Gels werden zwei Glasplatten (Biorad) zusammengelegt und durch eine Halterung gegeneinander gedrückt. Die beiden Glasscheiben sind unterschiedlich lang, sodass die größere Scheibe überlappt. Zwischen den Glasscheiben entsteht ein Spalt, in den das Gel gegossen wird.

Die Lösungen der beiden Gele bestehen aus folgenden Komponenten:

**Tabelle 14: Komponenten für das Gießen von acht Trenn- und Sammelgelen mit angegebener Konzentrationen**

Die Mengen sind so ausgelegt, dass ein Reservevolumen mit einberechnet ist.

Komponente	Trenngel (15%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid (30 %)	13,5 mL	1,5 mL
4x Lower-Puffer	7,6 mL	/
4x Upper-Puffer	/	2,5 mL
10 % SDS	300 µL	/
Demin. H <sub>2</sub> O	7,1 mL	5,9 mL
Temed	40 µL	20 µL
APS 40 % (Ammoniumperoxodisulfat)	60 µL	20 µL

Die Polymerisation des Gels wird durch die Zugabe von Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 40 %igem Ammoniumpersulphat (APS) induziert. Nach Zugabe wird die Lösung mit einer Pipette zügig in den Spalt zwischen den Glasscheiben pipettiert. Dabei wird Raum gelassen für das Sammelgel. Die noch flüssige Lösung wird mit 0,1 %igem SDS überschichtet, um die Polymerisation luftfrei durchzuführen. Es wird 30 min gewartet bis das Trenngel polymerisiert ist.

Das 0,1 %ige SDS wird abgegossen und das Sammelgel analog auf das Trenngel gegossen. Das Sammelgel reicht bis zum Rand der Glasscheibe. Zum Schluss wird der Kamm zur Erzeugung der Probestaschen in das noch flüssige Sammelgel gegeben, wo es für weitere

30 min bis zur vollständigen Polymerisation ruht. Die Gele können nun in feuchtem Milieu bei 4 °C für mehrere Wochen gelagert werden und zum späteren Zeitpunkt verwendet werden.

Alternativ konnten für große Probenmengen gekaufte Gele (Criterion TGX precast gels von Bio-Rad) verwendet werden. Dabei handelt es sich um 12%ige Polyacrylamid-SDS-Gele, die über kein Sammelgel verfügen. Die Gele besitzen 26 Proben Taschen, die ein Volumen von 15 µL fassen.

### Probenvorbereitung

Bei den durchgeführten SDS-Pages handelt es sich um denaturierende Auftrennung. Dies bedeutet, dass die Proteinproben im Vorfeld denaturiert werden. Dafür wurden die Proben mit 8x Ladepuffer im Verhältnis 1:7 versetzt und für 5 min bei 95 °C auf dem Heizblock aufgeköcht. Durch die Hitze und das  $\beta$ -Mercaptoethanol im Ladepuffer werden die Proteine denaturiert. Das SDS sorgt für eine der Größe des Proteins proportionalen negativen Ladung. Je Tasche wurden nun ca. 10 µL Probe pipettiert.

### Durchführung der SDS-Page

Zusätzlich zu den Proben wird noch ein Proteinstandard als Marker (8 µL) (siehe Anhang 0) aufgetragen. Dabei handelt es sich um den „PageRuler Plus prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific). Dieser Marker verfügt über vorgefärbte Banden, die auch bei einem späteren Western Blot sichtbar sind. Der Marker deckt einen Bereich von 10 kDa bis 250 kDa ab.

Nach der Beladung des Gels wird die Auftrennung gestartet. Zunächst erfolgt eine 5 minütige Sammelphase bei 120 V, bei der sich die Proben am Ende des Sammelgels ansammeln. Danach startet die eigentliche Auftrennung bei 160 V für 60 min. Der Probenpuffer enthält Bromphenolblau, welches schneller verläuft als die Proteine und als blaue Linie erkennbar ist. Die Auftrennung wird solange fortgesetzt bis die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel herausgelaufen ist.

### Färbung des SDS-Gels

Nach erfolgreicher Auftrennung kann das Gel gefärbt werden. Dafür wird das Gel für 30 bis 60 min mit Instantblue (Expedeon) behandelt und daraufhin über Nacht mit Wasser gewaschen. Dadurch werden die Proteine im Gel angefärbt und eine erste Untersuchung kann erfolgen. Die Nachweisgrenze bei der Färbung mit Instantblue liegt bei ca. 5 ng/Bande.

Zur dauerhaften Konservierung wurden die Gele getrocknet.



### Western Blot

Neben der Färbung des Gels kann ein Western Blot durchgeführt werden. Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen mit Antikörpern. Dafür werden die Proteine im Anschluss an eine SDS-PAGE auf eine Membran transferiert und dort fixiert. Die auf der Membran fixierten Proteine können im Anschluss mittels Antikörper und Färbung nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze ist nochmal deutlich besser als bei der SDS-Page und liegt bei ca. 2 pg/Bande. Außerdem ist die Spezifität in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern stark verbessert.

Für das Blotten wird während der Bachelorarbeit das Trans-Blot Turbo–Transfer System (Bio-Rad) verwendet. Der Blot erfolgt bei 0,4 A und 25 V für 7 min. Als Membran für den Western Blot wird die hydrophobe PVDF-Membran Immobilon-P (Merck Millipore) verwendet, welche vor dem Blotten mit Methanol aktiviert werden muss.

Nachdem die Proteine auf der Membran fixiert wurden, werden die restlichen Bindungsplätze mit einer 2,5 % Milchpulverlösung in 1x TBS-T-Puffer für eine Stunde blockiert. Daraufhin wird eine zweistufige Antikörperbindung (siehe Tabelle 15) verwendet, um das gesuchte Protein nachzuweisen.

Zunächst wird die Membran mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 15) in TBS-T-Puffer für 5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 15) in TBS-T-Puffer für 3 h bei Raumtemperatur. Zwischen den Inkubationsschritten wird die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Vor dem letzten Schritt wird die Membran zusätzlich für 5 min mit AP-Puffer gewaschen. Die Färbung erfolgt durch die Zugabe von 10-20 mL AP-Puffer mit 33 µL BCIP und 66 µL NBT. Danach wird die Membran getrocknet und dokumentiert. Der prestained Marker ist auch nach dem Blotten erkennbar, sodass eine Untersuchung des Bandenmusters möglich ist. Die entsprechenden Rezepte sind im Anhang aufgeführt.

**Tabelle 15 Übersicht über die für die Detektion von RudolphRFP verwendeten Antikörper und die angesetzten Verdünnungen.**

	<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Inkubationsdauer</b>
<b>Primärantikörper</b>	Monoclonal ANTI-FLAG M2 antibody produced in mouse (Sigma)	1:4000	5 h
<b>Sekundärantikörper</b>	Anti-Mouse IgG (H+L), AP Conjugate (Promega)	1:7500	3 h

## 2.19 Slot Blot

Der Slot Blot ist eine qualitative und semi-quantitative Nachweismethode für Proteine. Dabei werden die Proben (Überstände oder Extrakte) direkt auf eine Nitrocellulose-Membran gegeben. Die Auftragung erfolgt dabei in Slots, die der Methode ihren Namen verleihen. Die Proben werden mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch die Membran gesaugt, wobei die enthaltenen Proteine an die Membran gebunden werden.

Die Membran wird daraufhin analog zum Western Blot behandelt. (siehe Kapitel 2.18), sodass Proteine über ein Tag-Antikörpersystem nachgewiesen werden können. Durch das Auftragen einer Referenzprobe mit bekannter Proteinkonzentration kann durch einen Vergleich der Farbtintensität eine Aussage über die Konzentration der Proben getroffen werden.

## 2.20 Glycerin-Kulturen

Für die längerfristige Lagerung erstellter Hefezelllinien werden Glycerin-Kulturen angesetzt und bei -80 °C gelagert. Dafür werden 2 mL YPD-Medium mit Antibiotikum mit den jeweiligen Zellen angesetzt und für 24 h bei 30 °C inkubiert. In Kryoröhrchen werden 200 µL Glycerin (80 %) vorgelegt, 800 µL Zellsuspension zugegeben und die Ansätze gut durchmischt. Daraufhin können die Röhrchen in einem mehrfach mit Papier umwickelten Ständer in einer geschlossenen Styropor-Box oder in einem Isopropanolbehälter langsam auf -80 °C abgekühlt und gelagert werden.

## 2.21 Verwendete Online-Tools

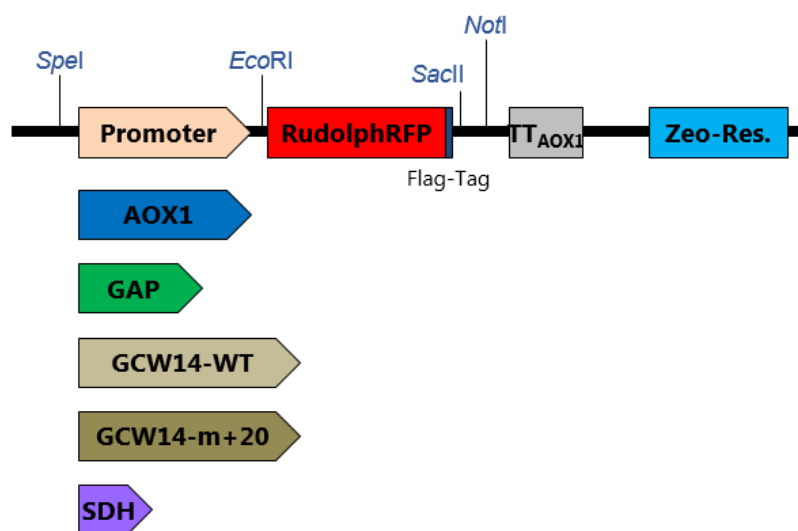
Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Online-Tools

Name	Internetseite	Verwendung
Multialign	<a href="http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/">http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/</a>	Alignment von Sequenzen
Reverse Complement	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a>	Übersetzung einer DNA Sequenz in die <i>reverse complement</i> Sequenz
ExpASy	<a href="http://web.expasy.org/translate/">http://web.expasy.org/translate/</a>	Translation von DNA-Sequenzen
BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	Abgleich von DNA und Aminosäuresequenzen mit einer Datenbank

### 3. Ergebnisse

Das Ziel der Versuche ist es alternative native Promotoren aus *P. pastoris* bezüglich ihrer Expressionsstärke zu untersuchen und mit den klassischen Promotoren ( $P_{GAP}$  und  $P_{AOX1}$ ) zu vergleichen und somit das Arsenal verfügbarer Promotoren für die hiesigen Anwendungen für die Expression von komplexen Proteinen in *P. pastoris* zu erweitern.

Der allgemeine Aufbau des relevanten Abschnittes der verwendeten Genkassette, ist in Abbildung 7 zu sehen. Sie besteht aus dem Promoter, dem Markerprotein RudolphRFP mit Flag-Tag, dem AOX1-Transkriptionsterminator ( $TT_{AOX1}$ ) und dem Zeocin-Resistenzgen für die Selektion.



**Abbildung 7: Allgemeine Darstellung der in den Vektor eingebrachten Expressionskassette**

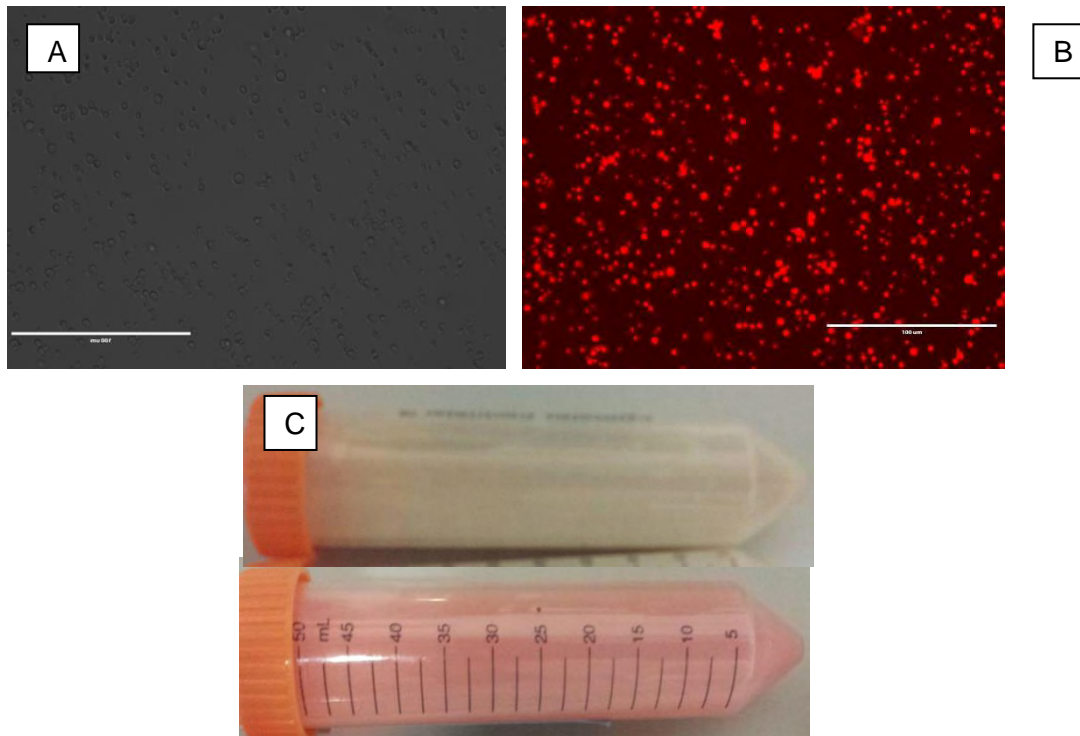
Dieses besteht aus einem variierenden Promoter, RudolphRFP-Flag, dem  $TT_{AOX1}$  (transcriptional terminator) für die Sequenzierung sowie einer Zeocin-Resistenz als Selektionsmarker.

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 auf Seite 15 zu sehen. Die Plasmide sind im Vorfeld der Arbeit generiert und ihre Sequenz überprüft worden.

#### 3.1. Überprüfen von RudolphRFP als Markerprotein

RudolphRFP sollte als Markerprotein für die Expression verwendet. Die Expression des Proteins ist dabei schon ohne die Verwendung von UV-Licht durch eine rötliche Färbung der Zellsuspensionen und –pellets identifizierbar.

Ein signifikanter Unterschied zwischen untransformierten und transformierten Zellen ist auch unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (531 nm Anregung, 593 nm Emission) zu erkennen (siehe Abbildung 8)

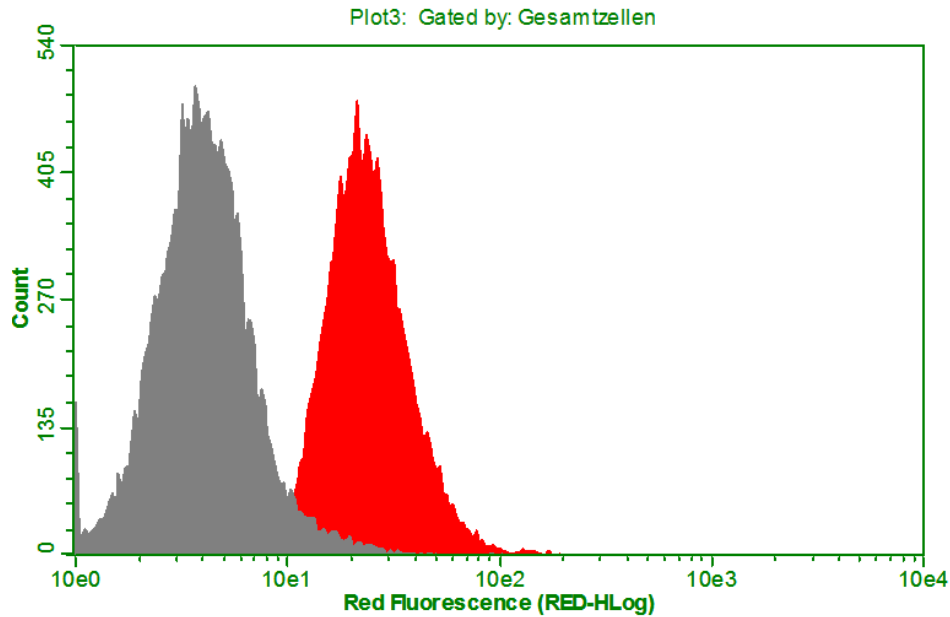


**Abbildung 8: Aufnahme von untransformierten und transformierten X-33 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop und mit einer normalen Kamera**

A und B: Untransformierte (A) und transformierte (B) X-33-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (40x Vergrößerung, 50 % Fluoreszenzintensität, 531 nm Anregung, 593 nm Emission). Die Expression der transformierten Zellen wurde über den GAP-Promoter gesteuert.

C: Zu sehen ist die Zellsuspension einer untransformierten X-33Kultur und zum Vergleich darunter die Zellsuspension eines transformierten Klon ( $P_{GAP}$  nach mehreren Tagen der Kultivierung in einem Schüttelkolben).

In den späteren Schüttelkolbenkultivierungen sollen die Zellproben mit dem Durchflusszytometer Guava easyCyte mini vermessen werden. Das Durchflusszytometer ist in der Lage die Fluoreszenz einzelner Zellen zu messen, die zuvor durch die Wahl der *Gates* von den Zellaggregaten und Zelltrümmern getrennt worden sind. Wie in Abbildung 9 zu sehen, weisen die transformierten Zellen einen deutlichen Unterschied auf, sodass gezeigt werden konnte, dass das Durchflusszytometer sich für die Messung der Fluoreszenz eignet. Als Vergleichskriterium wird der arithmetische Mittelwert der Fluoreszenz der Zellen genommen.



**Abbildung 9: Vergleich zwischen untransformierten und transformierten Zellen im Durchflusszytometer**  
 Dargestellt ist ein Histogramm, welches mit dem Durchflusszytometer aufgenommen worden ist. Die Verteilung der untransformierten Zellen (grau) zeigt einen deutlichen Unterschied zu den transformierten Zellen (rot), deren Expression über den GAP-Promoter gesteuert wurde. Auf der Abszisse ist die rote Fluoreszenz (logarithmisch) und auf der Ordinate die Anzahl der Zellen dargestellt.

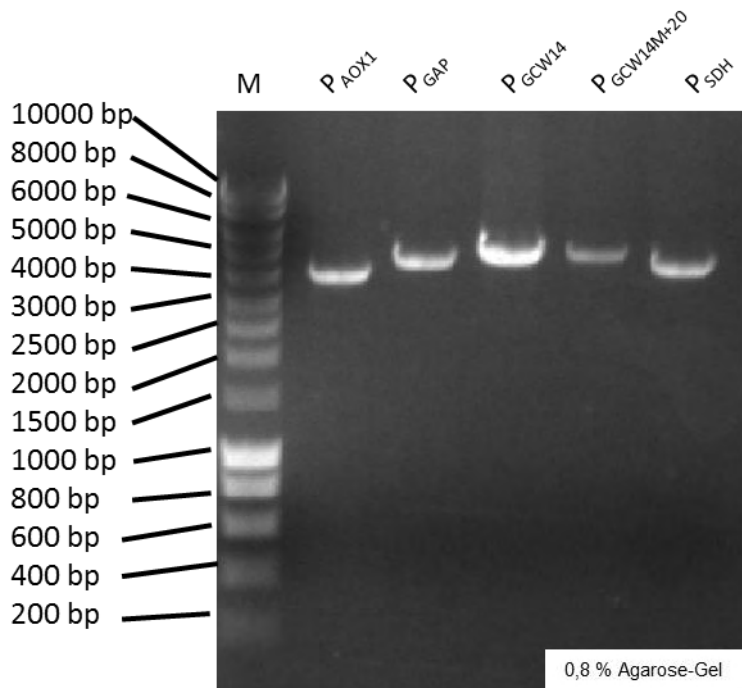
### 3.2. Generierung stabiler *P. pastoris* Zelllinien

Die Expressionsvektoren wurden linearisiert und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.11.2). Es wurde außerdem eine Agarose- Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.9) durchgeführt, um den Erfolg der Linearisierung zu überprüfen.

Es wurden folgende Banden bei einer erfolgreichen Linearisierung erwartet:

**Tabelle 17: Übersicht über die linearisierten Plasmide sowie der erwarteten Bandengröße bei erfolgreicher Linearisierung**

Plasmid	Bandengröße (bp)
pPICZ-RudolphRFP-Flag	4.002
pGAPZΔm8-RudolphRFP-Flag	4.626
pGCWZ-RudolphRFP-Flag	4.979
pGCWmZ-RudolphRFP-Flag	4.979
pSDHZ-RudolphRFP-Flag	4.371



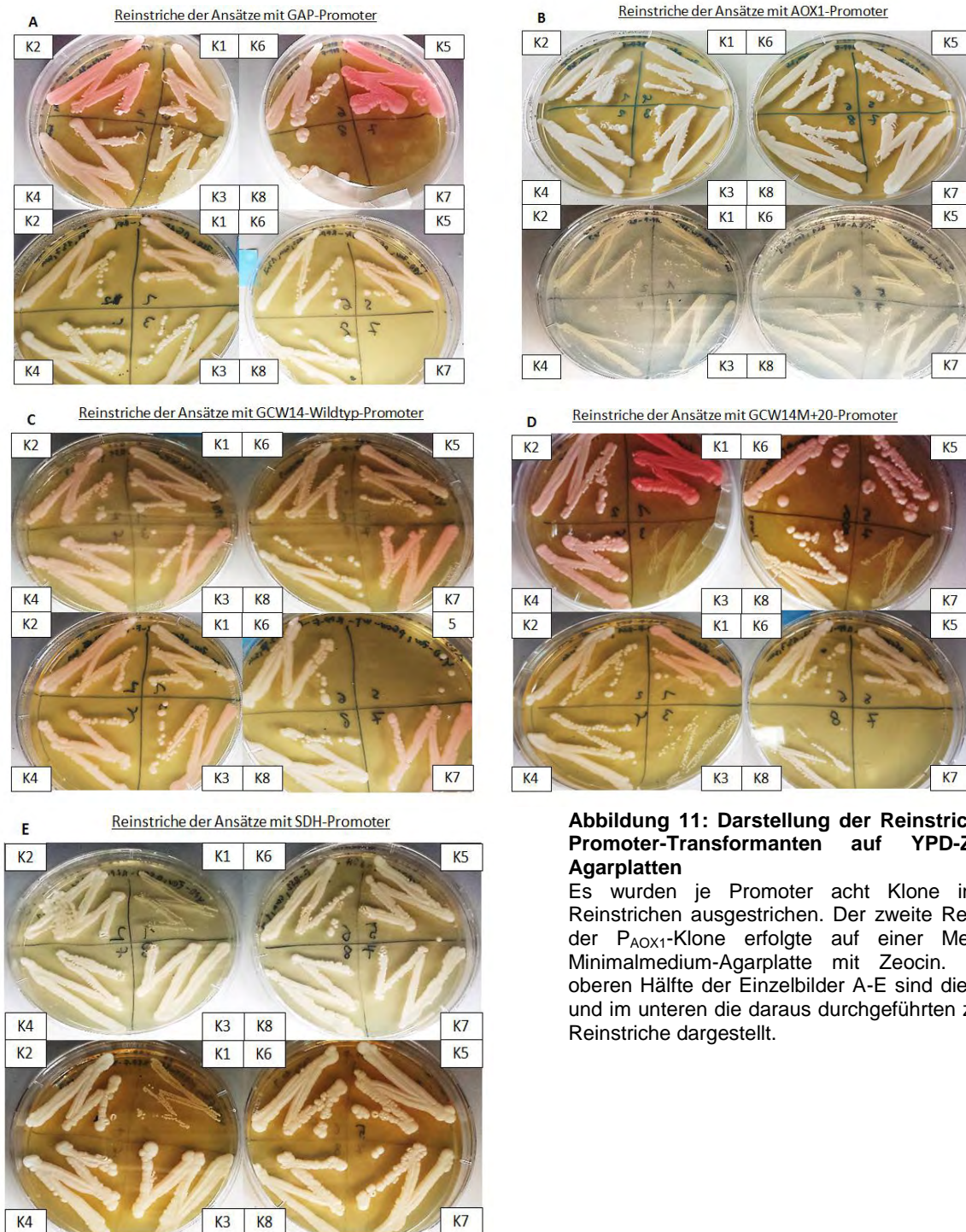
**Abbildung 10: Überprüfung der Linearisierung der Expressionsplasmide**

Die Auftragung erfolgte auf einem 0,8 %igen Agarosegel. Für die Färbung wurde Rotisafe verwendet. Die Größen der erwarteten Banden sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Alle Vektoren wurden als vollständig linearisiert angesehen, da in allen Ansätzen nur je eine Bande in der erwarteten Größe zu sehen ist (Vgl. Abbildung 10). Es ist keine unverdaute Plasmid-DNA in detektierbaren Mengen mehr vorhanden. Die Ansätze wurden zur Transformation (siehe Kapitel 2.11.3) von *P. pastoris* eingesetzt.

Die transformierten Zellen wurden auf ihre Zeocin-Resistenz selektiert. Nach erfolgreicher Selektion wurden Einzelkolonien in zwei Reinstreichen isoliert (siehe Kapitel 2.11.3), in Glycerin-Kulturen (siehe Kapitel 2.20) zur längerfristigen Lagerung überführt und für die weiteren Arbeiten eingesetzt.





**Abbildung 11: Darstellung der Reinstriche der Promoter-Transformanten auf YPD-Zeocin-Agarplatten**

Es wurden je Promoter acht Klone in zwei Reinstrichen ausgestrichen. Der zweite Reinstrich der  $P_{AOX1}$ -Klone erfolgte auf einer Methanol-Minimalmedium-Agarplatte mit Zeocin. In der oberen Hälfte der Einzelbilder A-E sind die ersten und im unteren die daraus durchgeführten zweiten Reinstriche dargestellt.

In Abbildung 11 sind die Reinstriche der Promoter-Ansätze zu sehen. Einige der Klone wuchsen gar nicht oder nur sehr schwach auf den Platten (z.B.  $P_{GAP}$  K7), was für falsch positive Klone auf den initialen Selektionsplatten nach der Transformation sprechen könnte. Während der Inkubation der YPD-Agarplatten bei 30 °C und der Lagerung im Kühlraum zeigten die gewachsenen Kolonien der konstitutiven Promotoren bereits unterschiedlich stark ausgeprägte Rotfärbungen durch die Expression von RudolphRFP. So zeigte zum Beispiel  $P_{GAP}$  K5 eine stärkere Färbung als  $P_{GCW14M+20}$  K2. Die Färbung trat außerdem mit unterschiedlicher Geschwindigkeit auf. Die  $P_{GCW14}$ -Klone (Wildtyp und Mutante) zeigten eine

schnellere Färbung als die  $P_{GAP}$ -Klone, was ein Indiz für eine schnellere bzw. stärkere Expression ist. Die Klone des SDH-Promoters blieben auch nach längerer Inkubation weiterhin alle farblos. Das zu den anderen Transformanten vergleichbare Wachstum auf den verwendeten Selektionsplatten spricht allerdings für den Erfolg der Transformation, da die Zeocin-Resistenz vorhanden zu sein scheint.

Der AOX1-Promoter erfordert die Induktion durch Methanol. Daher wurden Minimalmedium-Agarplatten mit Methanol gegossen und ein Reinstrich mit diesen gemacht. Jedoch war auch nach längerer Inkubation und Lagerung keine Rotfärbung zu sehen, was auf das verminderte Wachstum der Zellen auf diesen Platten zurückgeführt werden könnte.

Die unterschiedliche Intensität der Färbung könnte auf *Tandem-Repeats* zurückzuführen sein. In der nächsten Untersuchung wurde daher in mehreren PCR-Reaktionen das Genom der transformierten Zellen auf das Vorhandensein der Genkassette und von möglichen *Tandem-Repeats*-Integrationen überprüft.

### **3.3. Überprüfung der hergestellten *P. pastoris* Zelllinien durch genomische PCR**

Nach der erfolgreichen Transformation und Isolierung der Klone musste überprüft werden, ob eine homologe Integration der Vektoren in das Genom von X-33 erfolgt ist. Das Auftreten der unterschiedlichen Färbungsintensitäten der einzelnen Klone könnte außerdem auf *Tandem-Repeats* zurückzuführen sein. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit zwischen den Promotoren sollten in den späteren Versuchen deshalb nur Einzelinsertionen miteinander verglichen werden.

Zur Überprüfung auf das Vorhandensein der Expressionskassette und mögliche *Tandem-Repeats* wurden mehrere PCR-Reaktionen mit entsprechenden Primerpaaren (siehe Tabelle 18) und zuvor extrahierter genomischer DNA (siehe Kapitel 2.13) der transformierten Zellen durchgeführt.

Die mit pGCWmZ-RudolphRFP transformierten, zuvor auf Selektionsplatten nur schwach gewachsenen Klone 3 und 7 (siehe Abbildung 11) wuchsen in den angesetzten YPD-Zeocin Übernachtkulturen nicht an und wurden daher nicht für die weiteren Versuche verwendet.

Die extrahierte genomische DNA der übrigen Klone wurde für die folgenden PCR-Reaktionen (siehe Kapitel 2.3) verwendet. Die Wahl der eingesetzten PCR-Primer gestaltete sich dabei wie folgt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Integration der intakten Kassette aus Promoter und *rudolphRFP*-Gen wurden Primer verwendet, die in der 3'-Region des jeweiligen Promoters und in der 3'-Region von *rudolphRFP* bzw. im AOX1-Terminator ( $TT_{AOX1}$ ) binden (Vgl. Abbildung 12).



Für die Gewährleistung der Vergleichbarkeit werden die Klone auf *Tandem-Repeats* bzw. auf Einzelinsertionen überprüft. Für die Überprüfung wurde ein *forward* (FW)-Primer verwendet, der *upstream* des jeweiligen Promoters bindet. Im Falle des AOX1-Promoters bindet der FW-Primer im pUC-Origin, der im pPICZ in der 5'-Region des Promoters liegt. Für die restlichen Promotoren liegt in dieser Region die Ampicillin-Resistenzkassette, sodass ein dort bindender FW-Primer verwendet werden konnte. Der *reverse*-Primer bindet wie zuvor entweder in der 3'-Region des *RudolphRFP*-Gens oder im TT<sub>AOX1</sub> (Vgl. Abbildung 12).

Die Klone des SDH-Promoters wurden aufgrund der fehlenden Färbung und ihres zu den positiven Klonen vergleichbaren Wachstums zusätzlich auf das Vorhandensein der Zeocin-Resistenzkassette überprüft. Dafür wurden Primer verwendet, die im Promoter (P<sub>TEF1</sub>) und im Terminator (TT<sub>CYC1</sub>) der Zeocin-Resistenz des Vektors binden.

Eine Übersicht über die Reaktionen, die verwendeten Primern und die erwarteten Bandengrößen ist in Tabelle 18 zu sehen. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang 7.6 aufgelistet.

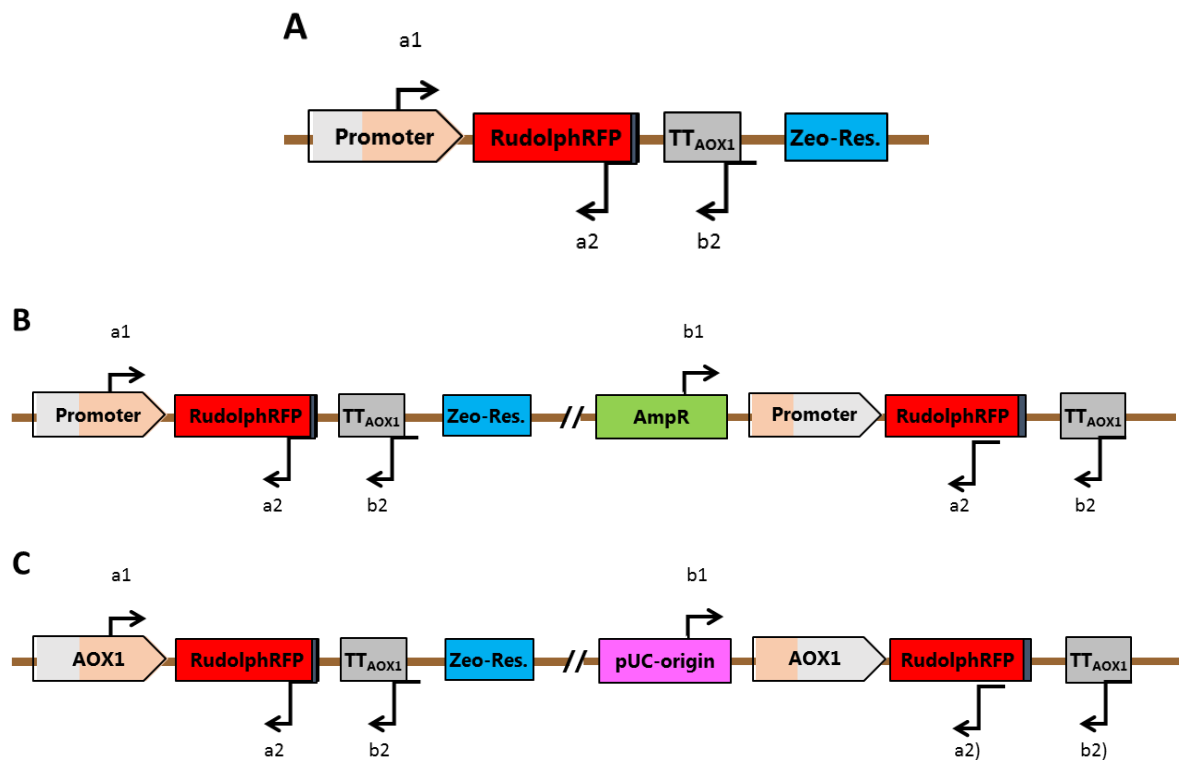
**Tabelle 18: Übersicht über die durchgeführten PCR-Reaktionen, die verwendeten Primer und die erwarteten Bandengrößen bei einem positiven Nachweis.**

Mehr Informationen über die verwendeten Primer sind im Anhang zu finden.

Reaktion	Plasmid	Forward-Primer	Reverse-Primer	Erwartete Bande [bp]
<b>Überprüfung der erfolgreichen Integration</b>	pGAPZΔm8-RudolphRFP-Flag	GAP-FW	AOX1-TT-RV	941
	pPICZ-RudolphRFP-Flag	AOX1-FW	AOX1-TT-RV	998
	pGCWZ-RudolphRFP	GCW14-FW	RudolphRFP-RV	833
	pGCWmZ-RudolphRFP-Flag	GCW14-FW	RudolphRFP-RV	833
	pSDHZ-RudolphRFP-Flag	SDH-FW	RudolphRFP-RV	835
<b>Überprüfung auf Tandem-Repeats</b>	pGAPZΔm8-RudolphRFP-Flag	AMP-FW	AOX1-TT-RV	1432
	pPICZ-RudolphRFP-Flag	pUC-FW	AOX1-TT-RV	1885
	pGCWZ-RudolphRFP	AMP-FW	RudolphRFP-RV	1588
	pGCWmZ-RudolphRFP-Flag	AMP-FW	RudolphRFP-RV	1588
	pSDHZ-RudolphRFP-Flag	AMP-FW	RudolphRFP-RV	980
<b>Überprüfung des Zeocin-Resistenzgen</b>	pSDHZ-RudolphRFP-Flag	TEF1-FW	CYC1-RV	1172

Zusätzlich zu den genomischen Templates der Klone wurden außerdem eine Positivkontrolle (PK) (zirkuläres Expressionsplasmid als Template) und eine Negativkontrolle (NK) (genomische DNA aus untransformierten X-33-Zelle) in allen Ansätzen verwendet. Da im zirkulären Expressionsplasmid der pUC-origin bzw. die Amp-Resistenzkassette vor den

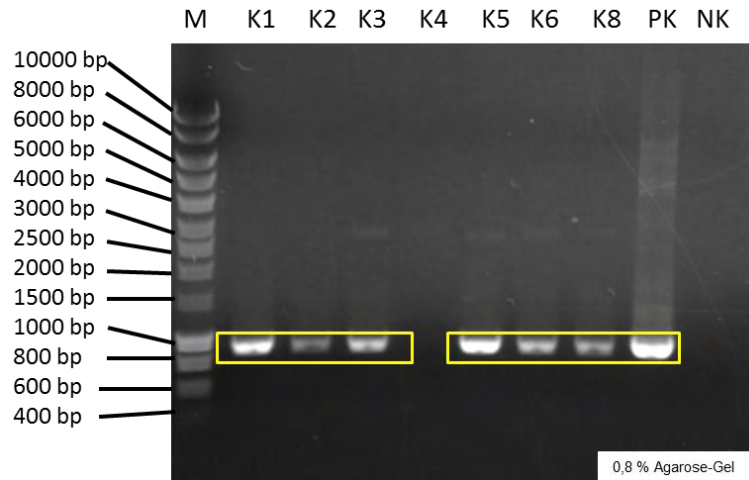
Promotoren liegt, kann das zirkuläre Plasmid auch als Positivkontrolle für den Nachweis von Einzelinsertionen bzw. *Tandem-Repeats* verwendet werden.



**Abbildung 12: Übersicht über die Expressionskassette als Einzelinsertion (A) und *Tandem-Repeat-Integration* für die konstitutiven Promotoren (B) und P<sub>AOX1</sub> (C).**

Zu sehen sind die relevanten Elemente der Genkassette, so wie die Bindungsstellen der Primer (a1, b1 für die FW-Primer und a2, b2 für die RV-Primer) für die jeweiligen PCR-Reaktionen. „//“ steht dabei für einen nicht dargestellten Bereich des integrierten Expressionsvektors.

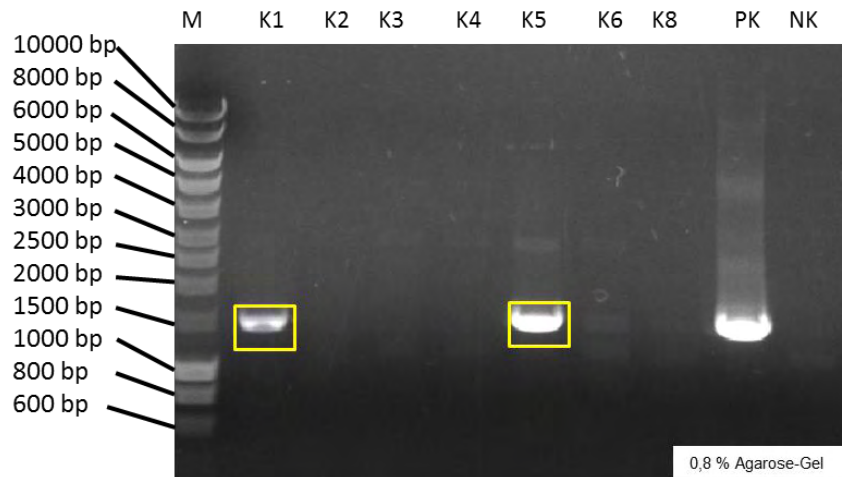
### Integration von RudolphRFP in den GAP-Lokus



**Abbildung 13: Überprüfung der  $P_{GAP}$ -Klone auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette**

Es wurde die Primerkombination a1+b2 verwendet. Die erwartete Bande liegt bei 941 bp. Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Für die PCR wurden Primer verwendet, die in der 3' Region des GAP-Promoters und am  $TT_{AOX1}$  binden (siehe Tabelle 18). Es ist ein positives Signal für K1, K2, K3, K5, K6 und K8 zu sehen. Bei K4 ist keine Bande zu sehen. Die zusehenden Banden liegen auf der erwarteten Höhe (941 bp) und entsprechen ebenfalls der Positivkontrolle. Die Negativkontrolle zeigt erwartungsgemäß kein Signal. Es konnten unterschiedliche Bandenintensitäten beobachtet werden, wobei die Klone K1 und K5 höhere Bandenintensitäten als die Klone K3, K6 und K8 zeigten, wobei letztere vergleichbare Bandenstärken aufweisen. Es ist davon auszugehen, dass die Bandenstärke mit der Menge an PCR-Produkt und diese wiederum mit der Anzahl integrierter Kassettenkopien in Zusammenhang steht. Ein Spezialfall der Mehrfachintegration ist die *Tandem-Repeat*-Insertion, welche wie anschließend durch eine geeignete Auswahl an PCR-Primern untersucht werden konnte. Unabhängig davon konnte die Integration der Expressionskassette für die oben genannten Klone nachgewiesen werden.

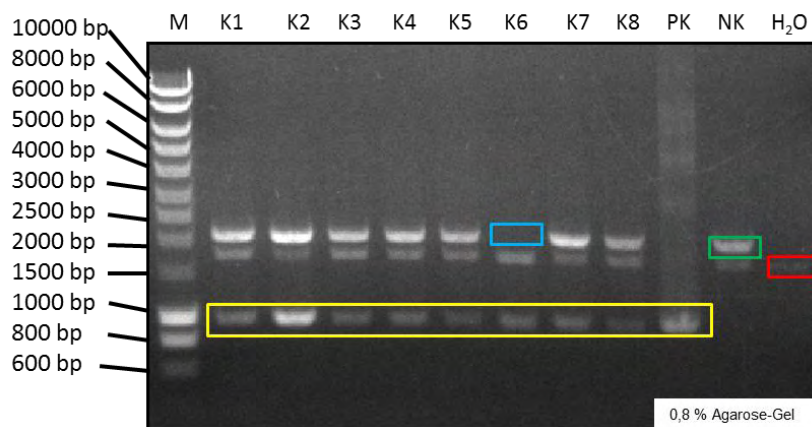


**Abbildung 14 Überprüfung der  $P_{GAP}$ -Klone auf *Tandem-Repeats***

Es wurde die Primer-Kombination b1+b2 verwendet. Das erwartete PCR-Produkt hat eine Größe von 1432 bp. Die Klone K1 und K5 zeigen ein positives Signal in der erwarteten Höhe und auf derselben Höhe wie die Positivkontrolle. Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Für die PCR wurden Primer verwendet, die in der *upstream*-Region des GAP-Promoters und am  $TT_{AOX1}$  binden (siehe Tabelle 18). Die Klone K1 und K5 zeigen ein positives Signal in der Höhe von 1432 bp (siehe Abbildung 14). Die Signale korrelieren mit der Bandenintensität in Abbildung 13, in der die Klone K1 und K5 die stärkste Bandenintensität zeigen. Für die genannten Klone konnte somit eine *Tandem-Repeat*-Insertion nachgewiesen werden.

### Integration von RudolphRFP in den AOX1-Lokus



**Abbildung 15: Überprüfung der  $P_{AOX1}$ -Klone auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette**

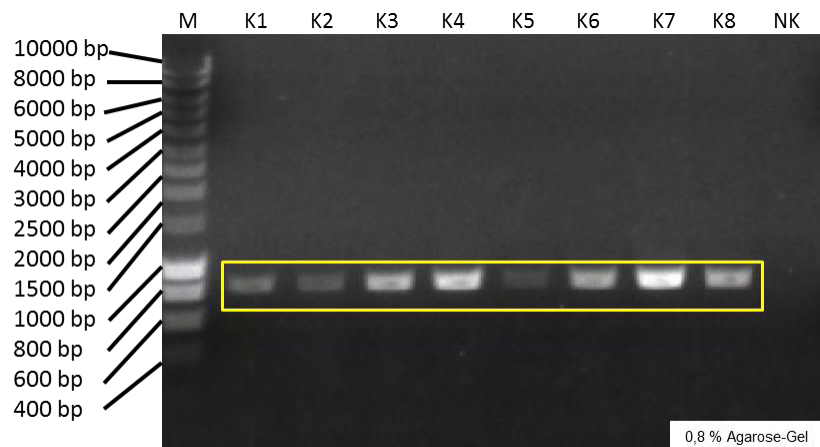
Es wurde die Primerkombination a1+b2 verwendet. Die erwartete Bande liegt bei 998 bp. Diese ist neben der Positivkontrolle bei allen Klonen (außer der Negativkontrolle) zu sehen. Zusätzlich sind zwei weitere Banden zu erkennen. Die Erste (grün) bei ca. 2.000 bp und die Zweite (rot) bei ca. 1700 bp. Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Für die PCR wurden Primer verwendet, die in der 3' Region des AOX1-Promoters und am  $TT_{AOX1}$  binden (siehe Tabelle 18). Wie in Abbildung 15 zu sehen, zeigen alle Klone das erwartete Signal für die Expressionskassette bei 998 bp (gelb markiert). Der Klon K2 zeigt ein deutlich stärkeres Signal als die restlichen Klone. Es sind zusätzlich noch zwei weitere Banden (rot und grün) zu sehen. Diese treten auch bei der Negativkontrolle (genomische



*reverse-Primer* 100 bp *downstream* des Stopcodons. Mithilfe der bekannten Größe des AOX1-Gens von 1992 bp ergibt sich ein erwartetes Fragment von 3079 bp, das der hier gemachten Beobachtung entspricht. Die zusätzlichen Banden sind nicht bei Klon K3 und K6 zu sehen. Der Nachweis von *Tandem-Repeats* korreliert im Fall von K2 mit der in Abbildung 15 beobachteten Bandenintensität. Für K6 ist diese Korrelation nicht zu sehen.

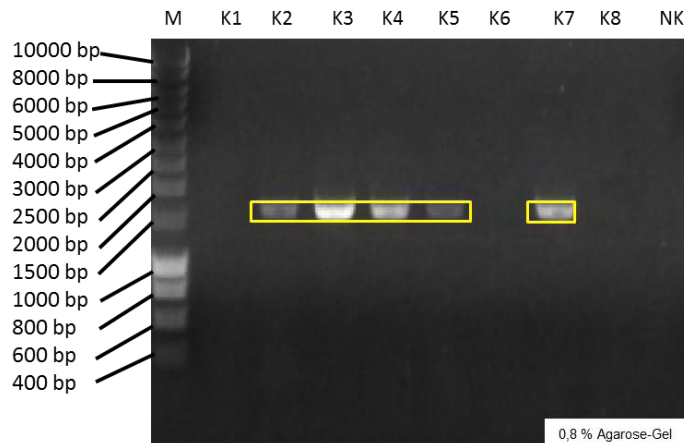
### Integration von RudolphRFP in den GCW14-Lokus mit dem Wildtyp-Promoter



#### **Abbildung 17: Überprüfung der $P_{GCW14}$ -Klone auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette**

Es wurde die Primerkombination a1+a2 verwendet. Die erwartete Bande liegt bei 883 bp. Diese Bande ist bei allen Klonen zu finden. Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Für die PCR wurden Primer verwendet, die in der 3' Region des GCW14-Promoters und in der 3' Region von *rudolphRFP* binden (siehe Tabelle 18). Die erwartete Bande (gelb) ist für alle Klone zu sehen. Die Banden weisen eine unterschiedliche starke Intensität auf. Die Klone K3, K4, K6, K7 und K8 zeigen eine stärkere Bande als die restlichen Klone. Der Klon K7 weist nochmals eine stärkere Intensität im Vergleich zu den anderen Klonen auf. Da für die beiden GCW14-Promoter-Varianten ein Ansatz mit denselben Primern parallel eingesetzt worden ist, ist die Positivkontrolle in Abbildung 19 zu finden. Für alle Klone konnte somit eine erfolgreiche Integration der Expressionskassette nachgewiesen.



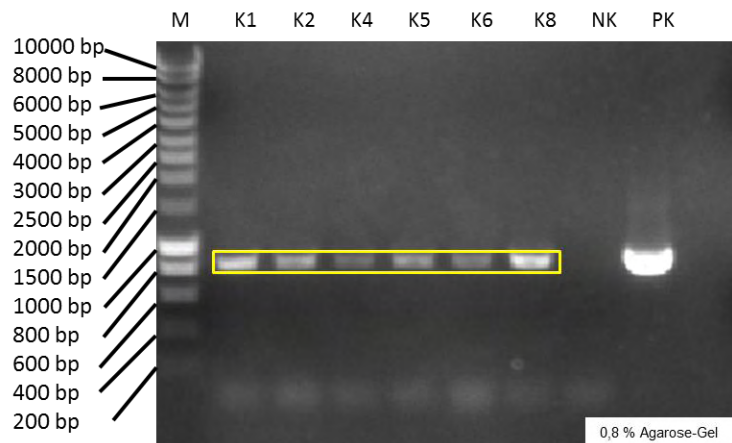
**Abbildung 18 Überprüfung der  $P_{GCW14}$ -Klone auf *Tandem-Repeats***

Es wurde die Primer-Kombination b1+a2 verwendet. Das erwartete PCR-Produkt hat eine Größe von 1588 bp. Die Klone K2, K3, K4, K5 und K7 zeigen eine positive Bande. Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Für die PCR wurden Primer verwendet, die in der *upstream*-Region des GCW14-Promoters und in der 3' Region von *rudolphRFP* binden (siehe Tabelle 18). Die Klone K2, K3, K4, K5 und K7 zeigen eine positive Bande. Die Positivkontrolle ist in Abbildung 20 zu sehen, da die Reaktion parallel und mit denselben Primern durchgeführt worden ist. Die zusehenden Banden zeigen erneut eine unterschiedlich stark ausgeprägte Intensität. Wobei K3 die stärkste Bande zeigt. Die Banden von K4 und K7 sind weniger stark und die von K2 und K5 am schwächsten ausgeprägt. Die Bandenintensität dieser Reaktion ist für die Klone K5 und K6 nicht korrelierbar mit der ersten Reaktion (siehe Abbildung 17). Dies könnte auf eine unterschiedlich gute PCR-Amplifikation zurückzuführen sein. So zeigt K5 in der zweiten Reaktion eine positive Bande, wohingegen für K6 keine zu sehen ist. In der ersten Reaktion (siehe Abbildung 17) hatte K6 hingegen eine stärkere Bande gezeigt als K5. Somit könnte eine Einzelinsertion für die Klone K1 und K6 nachgewiesen werden.



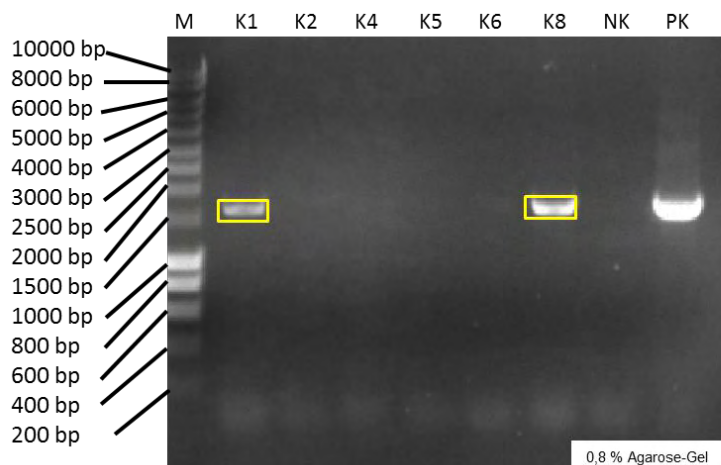
### Integration von RudolphRFP in den GCW14-Lokus der M+20-Promoter-Mutante



**Abbildung 19: Überprüfung der  $P_{GCW14M+20}$ -Klone auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette**

Es wurde die Primerkombination a1+a2 verwendet. Die erwartete Bande liegt bei 883 bp. Diese Bande ist bei allen Klone in unterschiedlicher Intensität zu finden. Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Für die PCR wurden Primer verwendet, die in der 3' Region des GCW14M+20-Promoters und in der 3' Region von *rudolphRFP* binden (siehe Tabelle 18). Alle aufgetragenen Proben zeigen eine positive Bande bei 833 bp (siehe Abbildung 19). Die Banden zeigen unterschiedlich starke Signale. So haben die Klone K1 und K8 die stärksten Banden, gefolgt von K2, K5, K6 und schlussendlich K4. Somit konnte die erfolgreiche Integration der Expressionskassette für alle aufgetragenen Proben nachgewiesen werden.



**Abbildung 20: Überprüfung der  $P_{GCW14+20}$ -Klone auf *Tandem-Repeats***

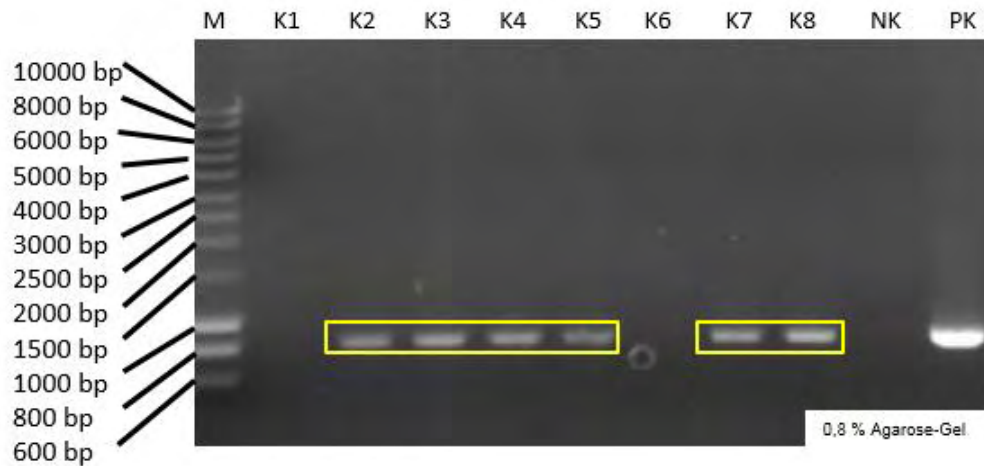
Es wurde die Primer-Kombination b1+a2 verwendet. Das erwartete PCR-Produkt hat eine Größe von rund 1588 bp. Diese Bande ist für K1 und K8 zu sehen. Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Für die PCR wurden Primer verwendet, die in der *upstream*-Region des GCW14M+20-Promoters und in der 3' Region von *rudolphRFP* binden (siehe Tabelle 18). Wie in Abbildung 20 erkennbar, zeigen die Klone K1 und K8 ein positives Signal (gelb). Die zu sehenden



Banden korrelieren mit der Bandenintensität in Abbildung 19. Eine Einzelinsertion konnte somit für Klone K2, K4, K5 und K6 erfolgreich nachgewiesen werden.

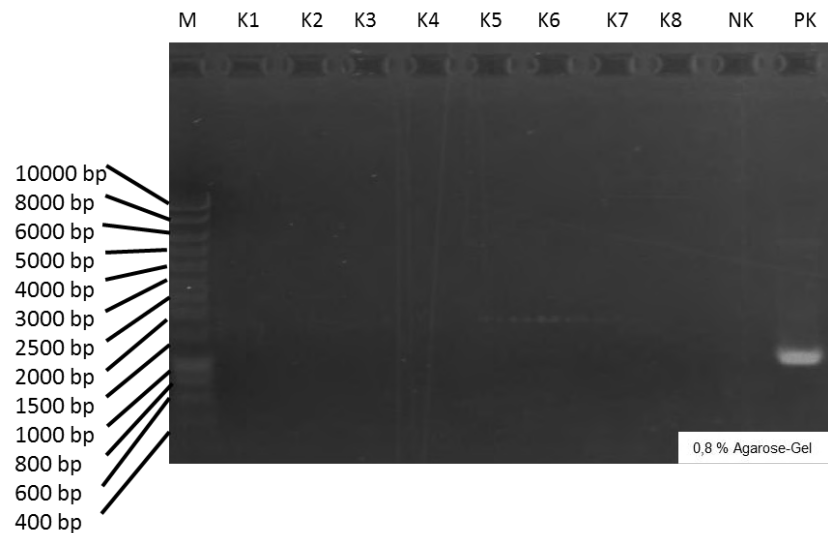
### Integration von RudolphRFP in den SDH-Lokus



#### **Abbildung 21: Überprüfung der $P_{SDH}$ -Klone auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette**

Es wurde die Primerkombination a1+a2 verwendet. Die erwartete Bande liegt bei 835 bp. Diese Bande ist bei allen Klonen außer K1 und K6 zu sehen. Die Bandenintensität zeigt eine einheitliche Ausprägung für die zusehenden Banden. Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Für die PCR wurden Primer verwendet, die in der 3' Region des SDH-Promoters und in der 3' Region von *rudolphRFP* binden (siehe Tabelle 18). Die Klone K2, K3, K4, K5, K7 und K8 sind positiv. Die Klone K1 und K6 zeigen hingegen kein positives Signal. Die zu sehenden Banden sind in ihrer Intensität homogen. Somit konnte eine Integration der Expressionskassette in das Genom erfolgreich nachgewiesen werden, obwohl keine Färbung der Kolonien auf den Agarplatten beobachtet wurde.

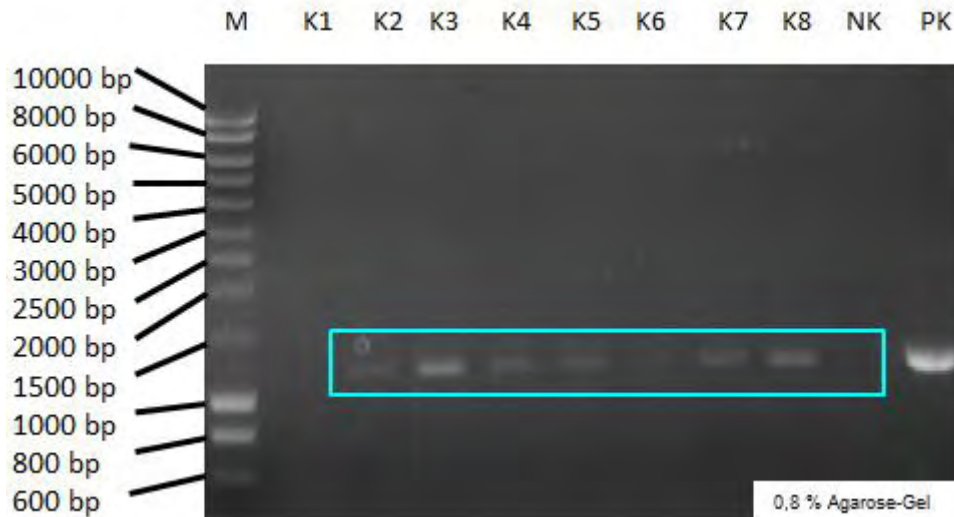


**Abbildung 22: Überprüfung der  $P_{SDH}$ -Klone auf *Tandem-Repeats***

Es wurde die Primer-Kombination b1+a2 verwendet. Das erwartete PCR-Produkt hat eine Größe von rund 980 bp. Für alle Klone ist keine positive Bande zu sehen. Die Positivkontrolle hingegen ist positiv. Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Für die PCR wurden Primer verwendet, die in der *upstream*-Region des SDH-Promoters und in der 3' Region von *rudolphRFP* binden (siehe Tabelle 18). Keiner der Klone zeigt eine positive Bande, sodass *Tandem-Repeat*-Integrationen für alle Klone ausgeschlossen werden können. Durch die Positivkontrolle konnte gezeigt werden, dass die Reaktion selbst funktioniert hat. Das Ergebnis korreliert mit den farblosen Zellen auf den Agarplatten.

Die isolierten Kolonien mit dem putativ stark konstitutiven SDH-Promoter hatten keinerlei Färbung gezeigt (Vgl. Abbildung 11), konnten jedoch sowohl auf Platten als auch in Kulturröhrchen selektiv anwachsen. Aufgrund dieser Tatsache und da für die Klone K1 und K6 keine positiven PCR-Produkte für die Insertion nachgewiesen werden konnten, wurde zusätzlich das Vorhandensein der Zeocin-Resistenzkassette überprüft. Dafür wurden im TEF1-Promoter bzw. im CYC1-Terminator bindende *forward* und *reverse* Primer verwendet, welche das *sh ble* Gen flankieren und ein PCR-Produkt von 1172 bp erzeugen sollten.



**Abbildung 23: Überprüfung der SDH-Promoter-Klone auf die Zeocin-Resistenzkassette**

Als Primer wurden ein TEF1-FW-Primer und ein CYC1-RV-Primer verwendet. Die PCR war für die Klone K2 bis K8 erfolgreich. Die Bande ist bei 1172 bp zu sehen. Die erkennbaren Banden unterscheiden sich teilweise in ihrer Intensität. Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Die Klone 2 bis 8 zeigen ein positives Signal, wohingegen die Reaktion für K1 negativ war. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch auf den Reinstrichplatten wieder (siehe Abbildung 11). Die Intensität der Banden schwankt. So zeigen die Klone K3, K7 und K8 eine stärkere Bandenintensität. Die schwächste Bande ist bei K6 zu sehen. Dieser Klon hatte ebenfalls auch keinen positiven Nachweis für die Integration der Genkassette gezeigt, wobei er jedoch wie alle anderen Klone auf den selektiven Agarplatten gewachsen ist.

Es konnten für alle Promotoren Klone mit einer Einzelinsertion nachgewiesen werden, die in den folgenden Expressionsversuchen weitergehend untersucht wurden.

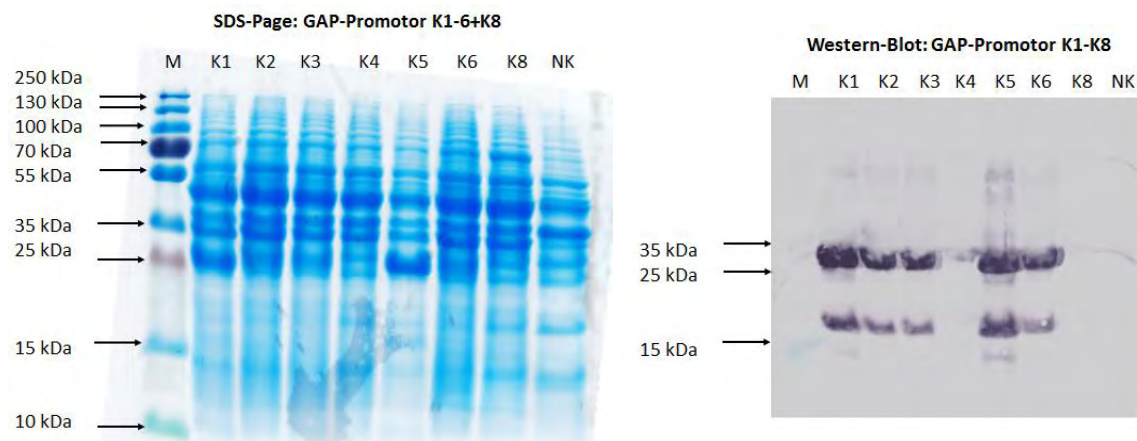
### 3.4. Kultivierung in 96-Deepwell-Platten, SDS-PAGE und Western Blot

In diesem Experiment sollten die reingestrichenen Klone auf ihre Expression in Hochdurchsatz vergleichend untersucht werden. Um die hohe Anzahl an Klonen effektiv zu untersuchen, wurden 96-Deepwell-Platten für die Kultivierung (siehe 2.14) verwendet. Als Kultivierungsmedium wurde dabei 1,5 mL an YPD für die konstitutiven Promotoren bzw. BMMY-Medium für die  $P_{AOX1}$ -Klone verwendet. Die Induktion der  $P_{AOX1}$ -Klone wurde durch die tägliche Zugabe von 0,5 % MeOH aufrechterhalten. Die Expression wurde über 96 h durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden untransformierte X-33 mit kultiviert.

Nach der Kultivierung wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen (siehe 2.17). Die Zellextrakte wurden in zwei parallelen SDS-PAGEs (siehe 2.18) aufgetrennt. Das erste Gel wurde mit Instantblue gefärbt und das Zweite für einen Western Blot verwendet (siehe 2.18)

Das gefärbte SDS-Gel ermöglicht eine Bewertung der Effizienz des Zellaufschlusses. Die Western Blots hingegen erlauben die spezifische Detektion des Zielproteins und die Identifikation exprimierender Klone. Zudem ist ein grober qualitativer Vergleich der Expression innerhalb eines Blotes anhand der Informationen aus Gel und Western Blot möglich.

#### Textexpression von RudolphRFP mit dem GAP-Promoter



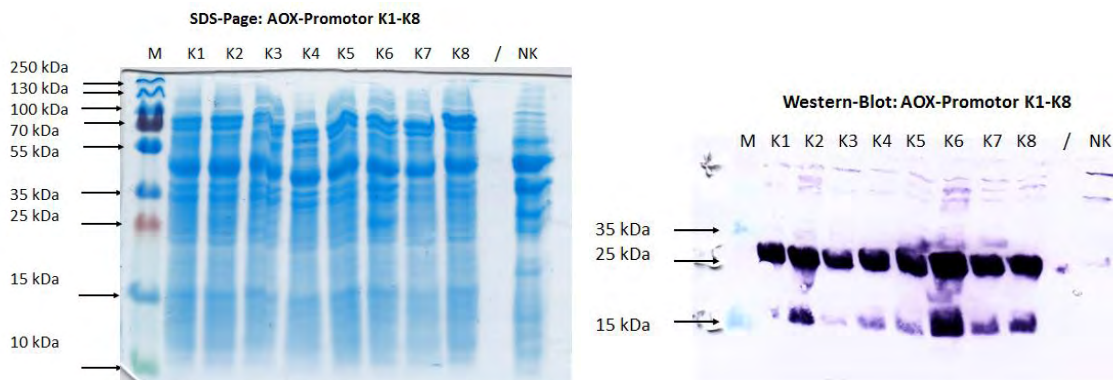
**Abbildung 24: SDS-PAGE und Western Blot der  $P_{GAP}$ -Testexpression**

Links: Das mit Instantblue gefärbte SDS-Gel (15 %iges Trenngel, 5 %iges Sammelgel). Rechts: Gefärbter Western Blot. Als Proben wurden Zellextrakte von Aliquots mit einer normierten  $OD_{600}$  von 5 verwendet. Die Zellextrakte wurden durch einen mechanischen Aufschluss mit Glaskugeln hergestellt. Es wurden 12  $\mu$ L Probe aufgetragen. Das Zielprotein verläuft bei ca. 27 kDa. Die Färbung des Western Blots erfolgte über den Flag-Tag des Zielproteins RudolphRFP.

Das gefärbte Gel (siehe Abbildung 24) zeigt, dass der Aufschluss für alle Klone erfolgreich war. Die Klone K5 und die Negativkontrolle (NK) zeigen eine etwas schwächere und die Klone K2 und K6 eine etwas stärkere Ausprägung der Banden. Die Bande des Zielproteins läuft bei 27 kDa und tritt auf dem SDS-Gel vor Allem bei K5 besonders stark hervor.

Der Western Blot zeigt eine positive Bande für die Klone K1, K2, K3, K5 und K6. Die Klone K4 und K8 zeigen hingegen keine Bande. Besonders stark sind die Banden der Klone K1 und K5 ausgeprägt, bei denen es sich um nachgewiesene *Tandem-Repeat*-Klone handelt (siehe Abbildung 14). Es ist außerdem eine weitere Bande bei 17 kDa zu sehen, deren Intensität proportional zur Zielproteinbande ist. Für den Klon K8 konnte keine Expression nachgewiesen werden, obwohl eine Färbung auf der Agarplatte beobachtet und die Integration der Genkassette durch eine PCR bestätigt wurde.

### Textexpression von RudolphRFP mit dem AOX1-Promoter

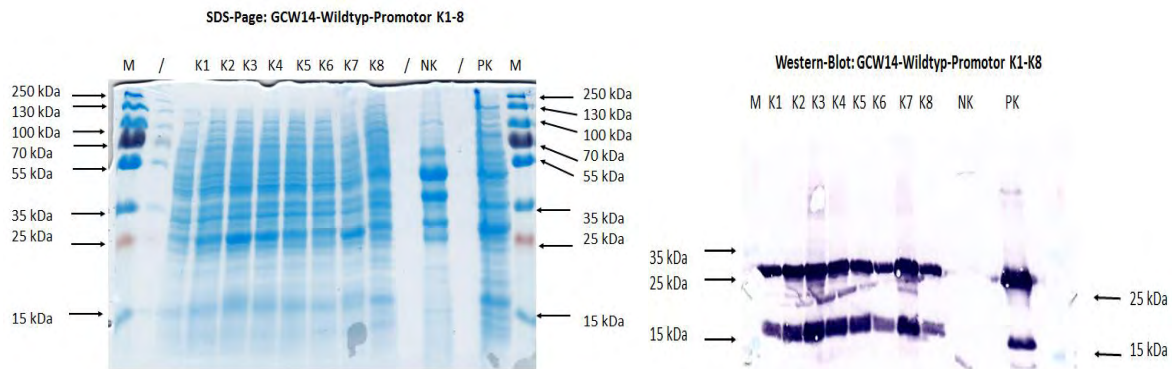


#### **Abbildung 25: SDS-PAGE und Western Blot der $P_{AOX1}$ -Testexpression**

Links: Das mit Instantblue gefärbte SDS-Gel (15 %iges Trenngel, 5 %iges Sammelgel). Rechts: Gefärbter Western Blot. Als Proben wurden Zellextrakte von Aliquots mit einer normierten  $OD_{600}$  von 5 verwendet. Die Zellextrakte wurden durch einen mechanischen Aufschluss mit Glaskugeln hergestellt. Es wurden 10  $\mu$ L Probe je Tasche aufgetragen. Das Zielprotein verläuft bei ca. 27 kDa. Die Färbung des Western Blots erfolgte über den Flag-Tag des Zielproteins RudolphRFP.

Das gefärbte Gel (siehe Abbildung 25) zeigt, dass der Zellaufschluss für alle Proben gleichermaßen effizient war. Auf dem zugehörigen Western Blot ist zu sehen, dass alle Klone das Zielprotein exprimieren. Die stärkste Expression ist bei den Klonen K2 und K6 zu sehen, bei denen es sich um nachgewiesene *Tandem-Repeat*-Klone handelt. Die zuvor beobachtete Bande bei 17 kDa tritt erneut in unterschiedlicher Intensität auf, die bei K2 und K6 ebenfalls am stärksten auftritt. Die Expression konnte somit für alle Klone nachgewiesen werden und entspricht den Ergebnissen aus der PCR-Überprüfung.

## Textexpression von RudolphRFP mit dem GCW14-Wildtyp-Promoter



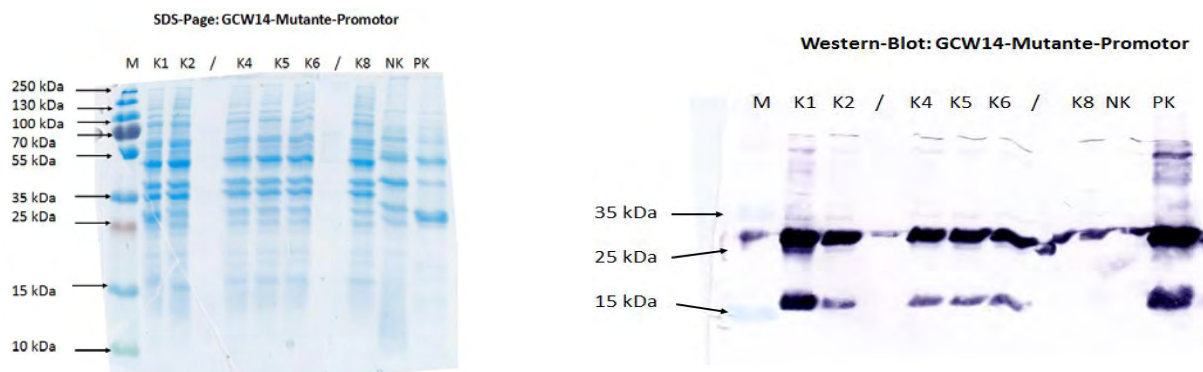
### **Abbildung 26: SDS-PAGE und Western Blot der $P_{GCW14}$ -Testexpression**

Links: Das mit Instantblue gefärbte SDS-Gel (15 %iges Trenngel, 5 %iges Sammelgel). Rechts: Gefärbter Western Blot. Als Proben wurden Zellextrakte von Aliquots mit einer normierten  $OD_{600}$  von 1 verwendet, die durch das Aufkochen in 2x SDS-Ladepuffer hergestellt wurden. Es wurden 10  $\mu$ L Probe je Tasche aufgetragen. Das Zielprotein verläuft bei rund 27 kDa. Die Färbung des Western Blots erfolgte über den Flag-Tag des Zielproteins RudolphRFP.

In Abbildung 26 ist das gefärbte Gel zu sehen und der Aufschluss war für alle Klone gleichmäßig. Als Positivkontrolle (PK) wurde in diesem Ansatz die schon aufgeschlossene Probe  $P_{GAP}$  K5 genutzt. Die Bande des Zielproteins ist auf dem Gel sowohl bei der PK, die eine etwas höhere Bandendichte zeigt als auch bei den Klonen K3, K4 und K7 zu erkennen.

Die Detektion auf dem Western Blot zeigt, dass alle Klone das Zielprotein exprimieren. Die Klone K1 und K6 weisen die schwächste auf, die bestätigt das Ergebnis der PCR, dass es sich bei den beiden Klonen um Einzelinsertions-Klone handelt. Sowohl die PK als auch die Proben weisen die Zielproteinbande und die zuvor gesehene Bande bei 17 kDa auf. Das Ergebnis stimmt überein mit der Färbung auf den Agarplatten und den Ergebnis der PCR-überprüfung.

## Textexpression von RudolphRFP mit dem GCW14m+20-Promoter



### **Abbildung 27: SDS-PAGE und Western Blot der $P_{GCW14m+20}$ -Testexpression**

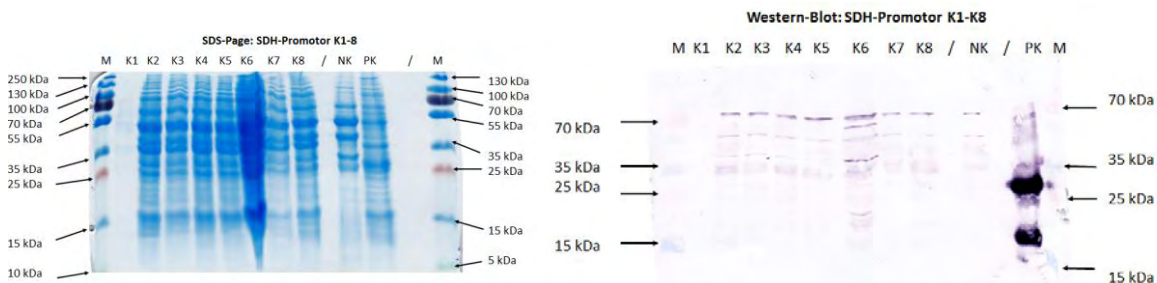
Links: Das mit Instantblue gefärbte SDS-Gel (15 %iges Trenngel, 5 %iges Sammelgel). Rechts: Gefärbter Western Blot. Als Proben wurden Zellextrakte von Aliquots mit einer normierten  $OD_{600}$  von 5 verwendet, die zuvor 1:5 verdünnt worden sind. Die Zellextrakte wurden durch einen mechanischen Aufschluss mit Glaskugeln hergestellt. Es wurden 12  $\mu$ L Probe je Tasche aufgetragen. Das Zielprotein verläuft bei rund 27 kDa. Die Färbung des Western Blots erfolgte über den Flag-Tag des Zielproteins RudolphRFP.



In Abbildung 27 ist das gefärbte Gel zu sehen. Der Aufschluss ist bei allen Proben vergleichbar. Als PK wurde erneut die Probe P<sub>GAP</sub> K5, die dieses Mal zusätzlich verdünnt (1:5) wurde, verwendet.

Die Zielbande von 27 kDa tritt auf dem Western Blot bei allen aufgetragenen Proben auf, wobei K1, ein nachgewiesener Klon mit *Tandem-Repeat*-Integration, die stärkste Bandenintensität zeigt. Die Bande bei 17 kDa ist bei allen Klonen detektierbar. Die Negativkontrolle ist aufgrund einer Unregelmäßigkeit im SDS-Gel nicht eindeutig. Da die Negativkontrolle in den parallel durchgeführten, anderen Western Blots (siehe Abbildung 24) negativ war, wurde dieser Blot nicht wiederholt.

### Textexpression von RudolphRFP mit dem SDH-Promoter



#### **Abbildung 28: SDS-PAGE und Western Blot der P<sub>SDH</sub>-Testexpression**

Links: Das mit Instantblue gefärbte SDS-Gel (15 %iges Trenngel, 5 %iges Sammelgel). Rechts: Gefärbter Western Blot. Als Proben wurden Zellextrakte von Aliquots mit einer normierten OD<sub>600</sub> von 5 verwendet, die mit Glaskugeln hergestellt wurden. Es wurden 12 µL Probe je Tasche aufgetragen. Das Zielprotein verläuft bei rund 27 kDa. Die Färbung des Western Blots erfolgte über den Flag-Tag des Zielproteins RudolphRFP.

Auf dem gefärbten Gel (siehe Abbildung 28) ist zu sehen, dass der Aufschluss für K1 nicht erfolgreich war. Die Spur von K6 ist außerdem überladen

Auf den Western Blot ist keine positive Bande der Proben zu erkennen. Die Testexpression zeigt keine detektierbare Expression, obwohl die integrierte Expressionskassette erfolgreich nachgewiesen werden konnte.

Bei allen positiven Proben hat sich neben der Bande des Zielproteins bei 26 kDa zusätzlich noch eine zweite Bande bei ca. 17 kDa gezeigt, die in ihrer Intensität proportional zur Zielbande war. Diese Bande könnte durch einer Spaltung einer Asparaginsäure-Prolin Bindung durch das Aufkochen in SDS-Ladepuffer bei 95 °C zustande kommen. Die Asparaginsäure-Prolin-Bindung ist die thermisch-instabilste Proteinverbindung (Kurien and Scofield 2012). Im Markerprotein RudolphRFP ist eine solche Bindung vorhanden, die bei einer Spaltung zu einem ca. 17 kDa großen Fragment mit Flag-Tag führen würde. Diese Theorie wurde durch einen separaten Western Blot ausgeschlossen (siehe Anhang 7.9), bei dem Proben bei 37 °C, 65 °C und 95 °C aufgekocht und aufgetragen worden sind.

### 3.5. Schüttelkolbenversuche

Die Expression im Schüttelkolbenmaßstab sollte gegenüber den 96-*Deepwell*-Platten einen besseren Sauerstoffeintrag garantieren und eine Sedimentation der Zellen verhindern, was zu verbesserten Bedingungen für die Proteinproduktion führen sollte

Daher wurden Testexpressionen in 50 mL Maßstab in 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen für 168 h durchgeführt. Das Medium wurde anhand der stärksten Aktivität der Promotoren in der Literatur eingesetzt (siehe Tabelle 19). Auf eine Kultivierung der Klone des SDH-Promoters wurde in Anbetracht der vorangegangenen Versuche in 96-*Deepwell*-Platten und negativen Detektion auf dem Western Blot (siehe Abbildung 28) verzichtet.

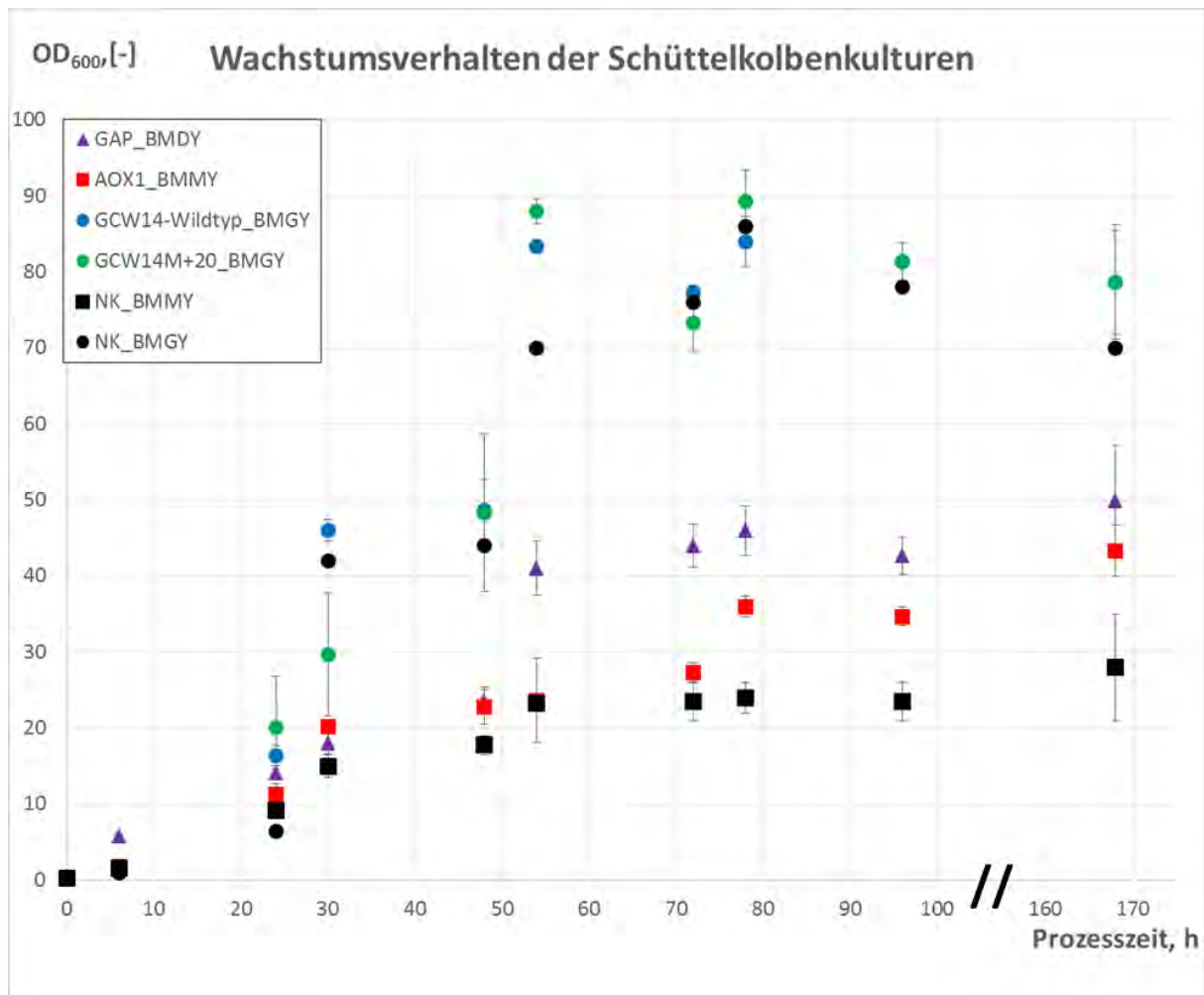
**Tabelle 19: Übersicht über die eingesetzten Klone und verwendeten Medien in den Schüttelkolbenversuchen**

Die Promotoren werden in den Medien eingesetzt, in der sie laut Literaturangabe die höchste Expressionsleistung zeigen. Die zugehörigen Quellen sind ebenfalls angegeben.

Promoter	Klon	Medium	Quelle
AOX1	K5	BMMY	(Cereghino and Cregg 2000)
GAP	K2	BMDY	(Cereghino and Cregg 2000)
GCW14-Wildtyp	K8	BMGY	(Liang <i>et al.</i> 2013)
GCW14M+20-Mutante	W4	BMGY	(Liang <i>et al.</i> 2013)

Für den Versuch wurde je Promoter ein Klon ausgewählt und in einer Dreifachbestimmung kultiviert. Außerdem wird zusätzlich zu den Promotoren eine Negativkontrolle (in BMMY und BMGY) mitkultiviert. Dabei handelt es sich um einen bereits vorliegenden mit leerem pPICZ-Vektor (Invitrogen) transformierten X-33-Klon.



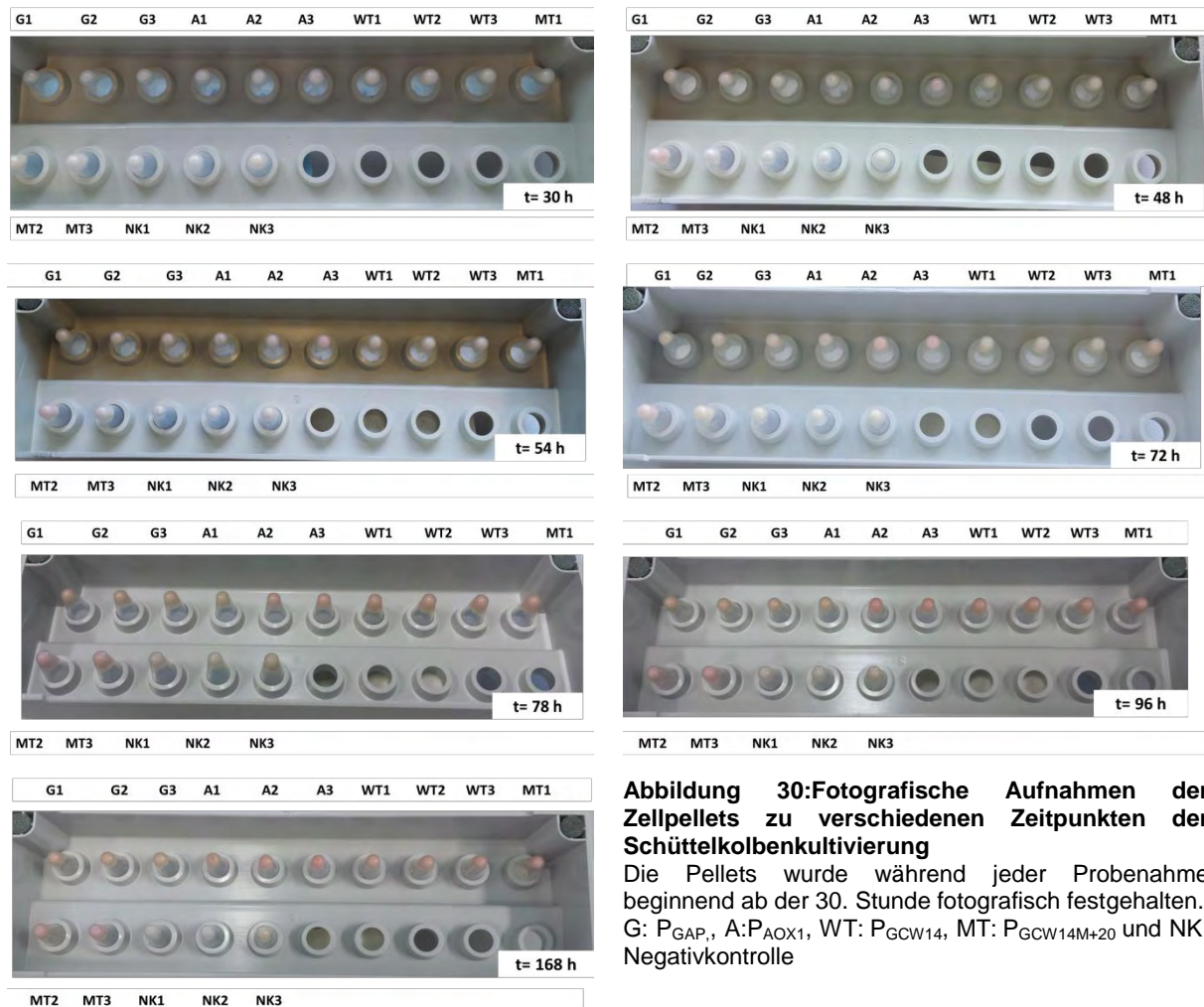


**Abbildung 29: Verlauf der optischen Dichte der Schüttelkolbenkulturen**

Die optische Dichte wurde ein- bzw. zweimal täglich gemessen. Jeder Promoter wurde in einer Dreifachbestimmung kultiviert und vermessen. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die Mittelwerte inklusive Fehlerbalken für die Dreifachbestimmung. „//“ symbolisiert einen Zeitsprung. Im nicht dargestellten Zeitraum erfolgten keine Messungen.

Das Wachstum der Zellen wurde über die  $OD_{600}$  bestimmt. Dazu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe Kapitel 2.15) Proben genommen und vermessen. Die Schüttelkulturen wurden aus zuvor gewachsenen Vorkulturen gleichermaßen angeimpft (siehe Kapitel 2.15).

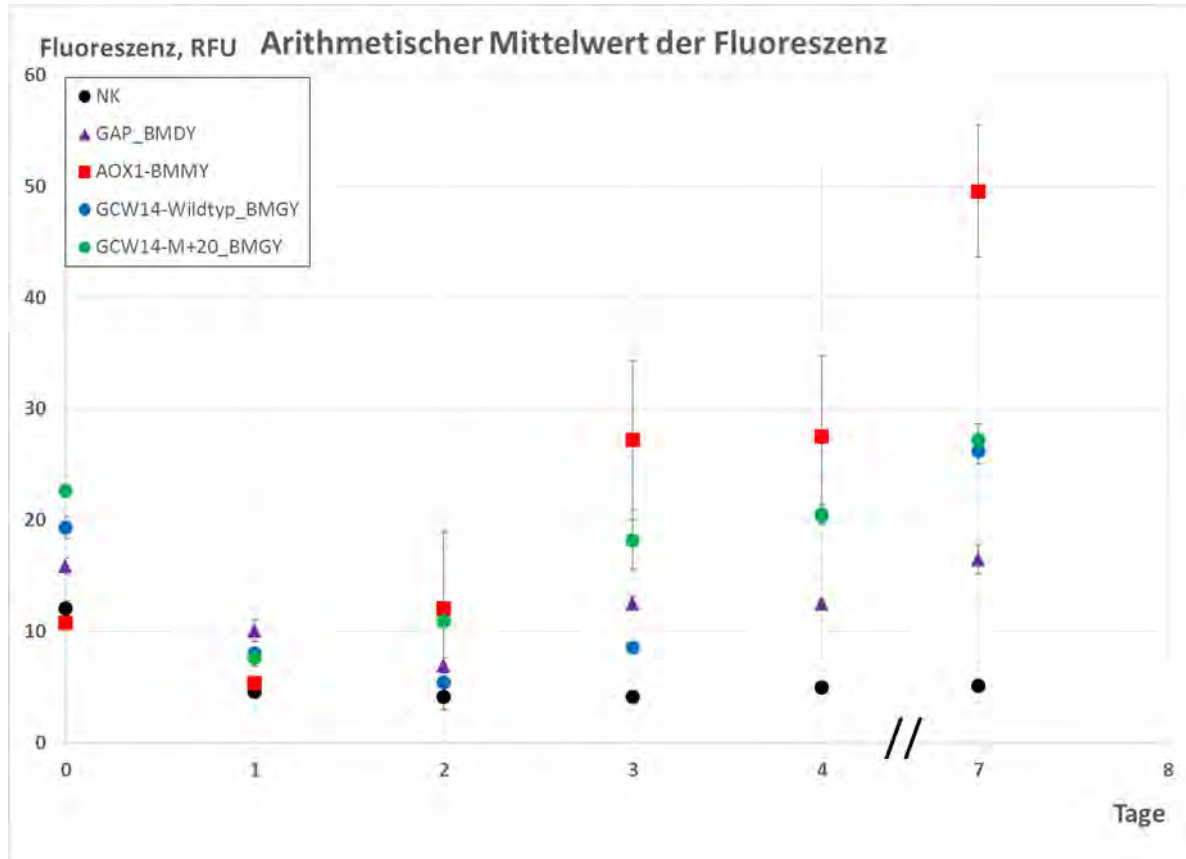
Das Wachstum der Zellen schwankte stark und variierte mit der verwendeten Kohlenstoffquelle. So erreichten die Ansätze mit Glycerin (BMGY) eine  $OD_{600}$  von 90, die mit Dextrose (BMDY) von 50 und die mit Methanol (BMMY) von etwa 40. Ab 24 h wurden zunehmend Unterschiede in den Zelldichten zwischen den Kulturen gemessen. Bei den Kolben des GCW14-M+20-Promoters zeigten sich im Zeitraum von 24 bis 48 h große Unterschiede. Innerhalb der Dreierbestimmung zeigten die Kulturen ein vergleichbares Wachstum. Wie schon bei den Agarplatten (siehe Abbildung 11) ist bei einer höheren Proteinkonzentration eine rötliche Färbung der Pellets sichtbar, sodass ein genereller optischer Vergleich zwischen den Pellets möglich ist. Die Färbung wurde zu den Zeitpunkten der Probenahme fotografisch dokumentiert (Vgl. Abbildung 30)



Die erste Färbung eines Pellets ist bei  $P_{AOX1}$  (A2) nach 30 h erkennbar. Nach 48 h ist auch eine rötliche Färbung bei der Probe  $P_{GCW14M+20}$  MT2 zu sehen. Der größte Anstieg der Färbung ist zwischen 72 h und 78 h zu beobachten. So wiesen zu diesem Zeitpunkt alle Pellets außer der Negativkontrolle eine Färbung auf. Auch nach 168 h sind die Pellets der Negativkontrollen weiterhin farblos. Die Pellets der konstitutiven Promotoren ( $P_{GAP}$ ,  $P_{GCW14}$  und  $P_{GCW14M+20}$ ) weisen eine vergleichbare Färbung auf. Die stärkste Färbung ist bei den Klonen mit dem AOX1-Promoter zu erkennen, wobei jedoch die Färbung der drei Proben nicht homogen ist und die Probe A2 dabei die stärkste Färbung aufweist.

### Messung der Fluoreszenz der Einzelzellen mit dem Guava easyCyte™

Mit Hilfe des Guava easyCyte™ mini wurden die Proben einmal täglich vermessen. (siehe Kapitel 2.15).



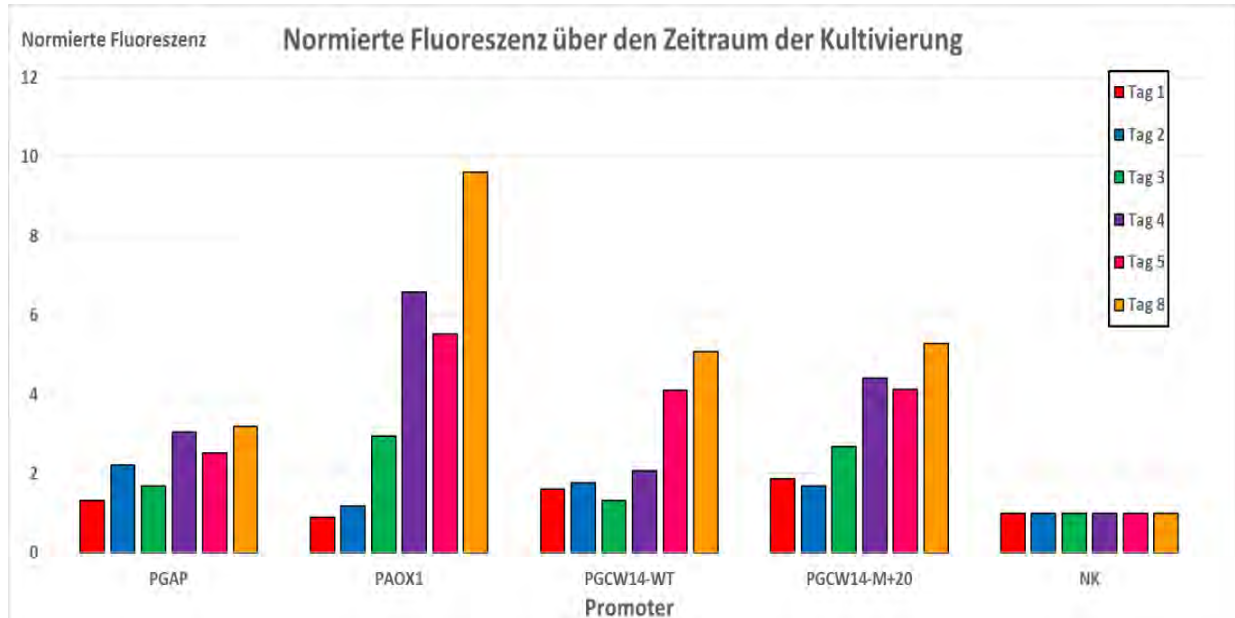
**Abbildung 31: Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung der Tagesproben über den vollständigen Zeitraum der Kultivierung.**

Auf der Abszisse ist die Fluoreszenz in der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) dargestellt. Auf der Ordinate ist die Zeit in Tagen aufgetragen. „//“ symbolisiert einen Zeitsprung. Im nicht dargestellten Zeitraum erfolgten keine Messungen. In der Legende ist zusätzlich das verwendete Medium angegeben.

In Abbildung 31 ist der arithmetische Mittelwert der Fluoreszenz zu sehen. Zu Beginn des Experimentes lag die Fluoreszenz der Zellen für alle Kulturen höher als nach 24 h. Bereits nach 48 h hat sich eine höhere Fluoreszenz des AOX1-Promoters gegenüber den konstitutiven Promotoren gezeigt. Jedoch zeigten die  $P_{AOX1}$ -Kulturen die größten Schwankungen (siehe Abbildung 31 Fehlerbalken) innerhalb der Dreifachbestimmung.

Die Kulturen der konstitutiven Promotoren zeigten schon zum Zeitpunkt des Animpfens eine erhöhte Fluoreszenz gegenüber der Negativkontrolle und den AOX1-Kulturen, was durch das Animpfen der Kulturen mit bereits gefärbten Zellen zu erklären ist. Innerhalb der folgenden drei Tage entwickelten sich die konstitutiven Kulturen unterschiedlich stark hinsichtlich der Fluoreszenz. Ab 96 h lagen die beiden GCW14-Promoter-Varianten auf einem vergleichbaren Expressionsniveau über den  $P_{GAP}$ -Kulturen und unter den  $P_{AOX1}$ -Kulturen.

Die erreichten Fluoreszenzwerte der  $P_{GCW14}$ -Varianten entsprachen ~50 % und die des GAP-Promoters ca. 35 % der Fluoreszenz des AOX1-Promoters (siehe Abbildung 32). Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante M+20 des GCW14-Promoters ist zum Ende des Experimentes nicht zu erkennen.



**Abbildung 32: Histogramm über die normierte Fluoreszenz der Promotoren über den Zeitraum der Kultivierung**

Die gemessenen Fluoreszenzmittelwerte wurden gegen den Mittelwert der Negativkontrolle derselben Probe normiert. Auf der Abszisse ist die Normierte Fluoreszenz dargestellt. Auf der Ordinate sind die Promotoren zu aufgelistet.

In Abbildung 32 ist die gegen die Negativkontrolle normierte Fluoreszenz der Proben über den Zeitraum des Experimentes dargestellt. Während sich die Fluoreszenz des AOX1-Promoters schnell entwickelte, verblieben die Kulturen der konstitutiven Promoter über die ersten 72 h auf einem vergleichbaren Niveau. Dies deckt sich mit dem Zeitraum der exponentiellen Wachstumsphase (siehe Abbildung 29). Der AOX1-Promoter war nach der Normierung um den Faktor 1,89 (gegenüber den Wildtyp), 1,82 (gegenüber der Mutante) und 3 (gegenüber den GAP-Promoter) stärker.

### 3.6. Untersuchung der Expression im Biolector

Da in den Schüttelkolbenkulturen jeweils nur ein Klon je Promoter untersucht wurde und die Messung zum Teil starke Schwankungen aufweisen, wurde in einem weiteren Versuch der Biolector verwendet. Der Biolector ist ein Mikroreaktor-System und zeichnet sich durch die Möglichkeit bis zu 48 Kultivierungen parallel durchzuführen aus. Dabei können in Online-Messungen die Biomasse und Fluoreszenz gemessen werden.

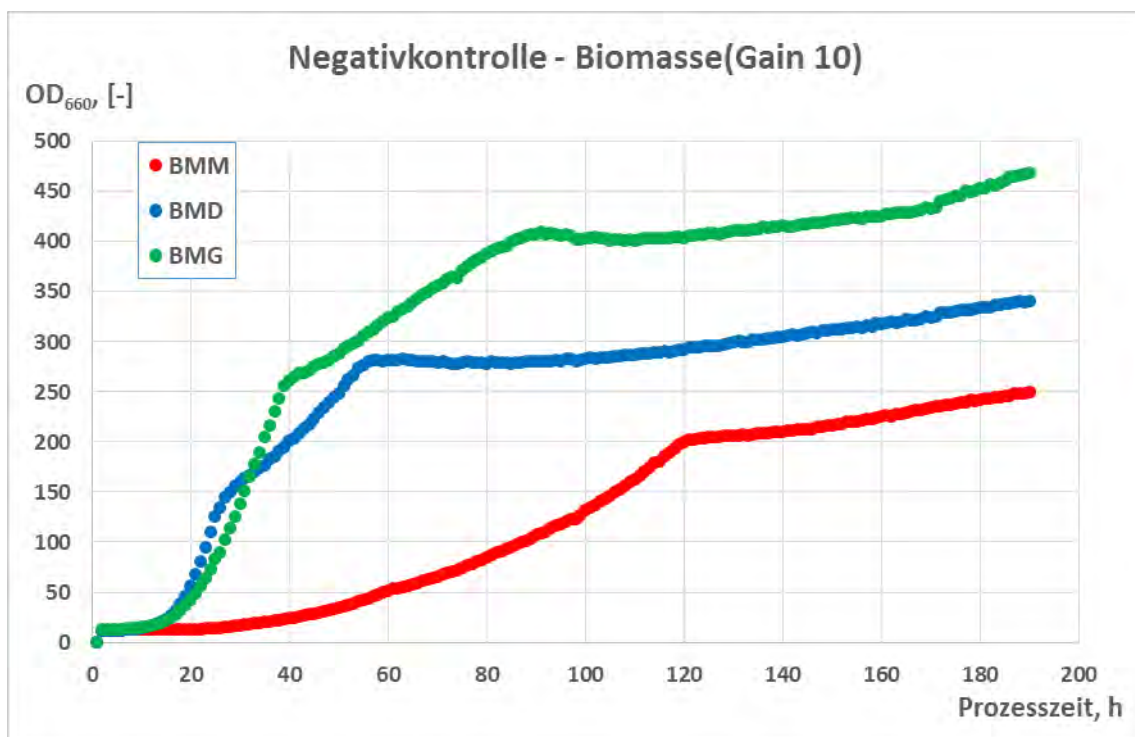
Im Versuch wurden von jedem Promoter drei Klone (biologische Replikate) mit nachgewiesener Einzelinsertion in einer Doppelbestimmung (technische Replikate) kultiviert und vermessen. Zusätzlich wurde je Promoter ein Klon mit nachgewiesenen *Tandem-*

*Repeats* (siehe Kapitel 3.3) ebenfalls vermessen, um die Expressionsstärke mit den Einzelinsertionen zu vergleichen. Als Negativkontrolle wurde ein mit einem leeren pPICZ-Vektor (nur AOX1-Promoter ohne RudolphRFP) transformierter X-33-Klon verwendet. Es wurde eine Negativkontrolle für jedes der drei verwendeten Kultivierungsmedien mitgeführt. Die Messung erfolgt jeweils einmal pro Stunde. Für die spätere Auswertung wurden die *Gains* 10 (Biomasse) und *Gain* 40 (Fluoreszenz) verwendet, da keine der Proben innerhalb dieser *Gains* den maximalen Wert erreicht. Eine Übersicht über die kultivierten Klone ist in

**Tabelle 20: Übersicht über die im Biolector kultivierten Klone**

Promoter	Einzelinsertions-Klone	Tandem-Repeat-Klone
AOX1	K3,K5,K7	K2
GAP	K2,K3,K6	K5
GCW14-Wildtyp	K1,K6,K8	K2,K3
GCW14M+20-Mutante	K4,K5,K6	K1
SDH	K2,K4,K7	/

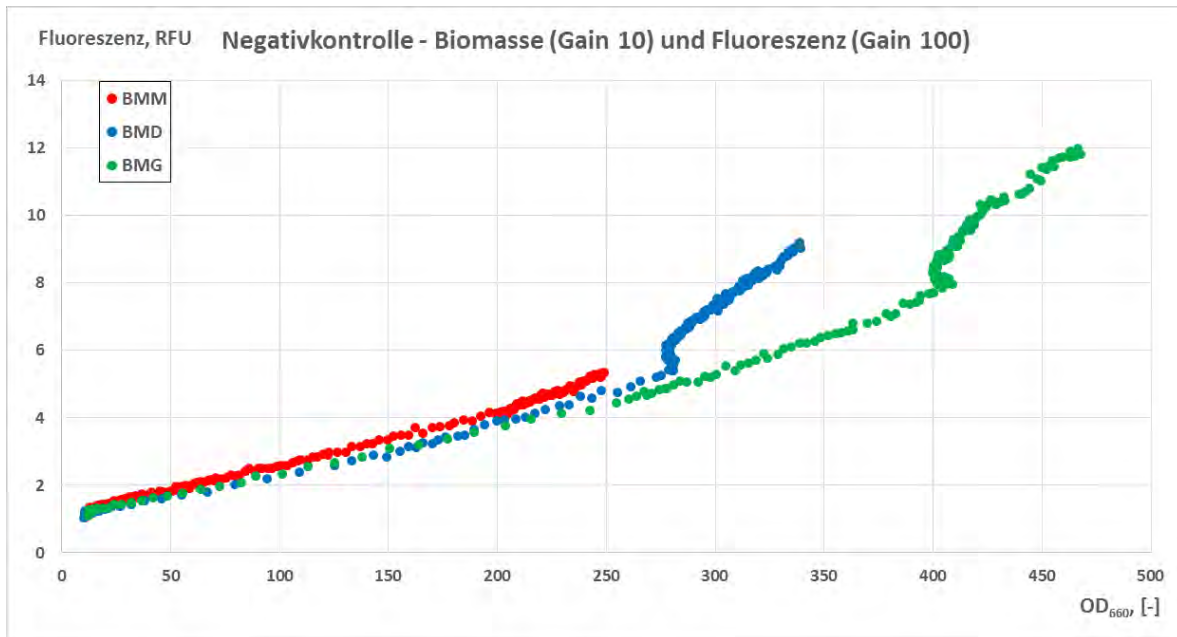
### Messung der Negativkontrollen



**Abbildung 33: Wachstum der Negativkontrolle in den verschiedenen Kultivierungsmedien im ersten Biolector Versuch**

Die Negativkontrolle wurde in allen verwendeten Medien kultiviert. Das Wachstum deckt sich mit dem Wachstum der Promoter-Klone. Je nach verwendetem Medium variiert das Wachstum. Auf der Ordinate ist die OD<sub>660</sub> und auf der Abszisse die Prozesszeit abgebildet. Die Messung erfolgte stündlich. Dargestellt ist die Biomasse im *Gain* 10





**Abbildung 34: Verhältnis zwischen Fluoreszenz (Gain 100) und Zelldichte (Gain 10) der Negativkontrolle im ersten Biolector-Versuch**

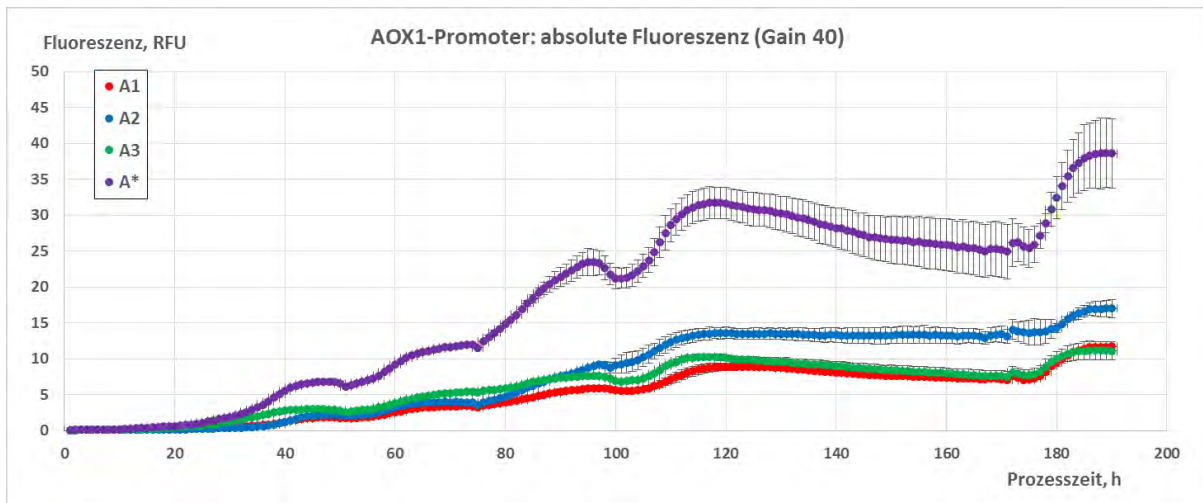
Auf der Abszisse ist die OD<sub>660</sub> und auf der Ordinate die Fluoreszenz dargestellt. Das Diagramm zeigt das Verhältnis dieser beiden Werte und ist ein Maß für die Eigenfluoreszenz der Zellen, da die Negativkontrollen kein fluoreszierendes Protein exprimieren.

In Abbildung 33 ist zeigt sich, dass das Wachstum abhängig vom verwendeten Medium ist. Das stärkste Wachstum war in BMG-Medium zu verzeichnen, gefolgt vom BMD-Medium. Die exponentielle Phase im BMG dauerte länger an und die Kulturen erreichten eine höhere Biomasse als in den übrigen Medien. Die exponentielle Phase im BMD-Medium verlief ähnlich, ging jedoch früher in eine stationäre Phase über, sodass insgesamt eine geringere Biomasse erreicht wurde. In BMM-Medium fand das schwächste Wachstum statt. Aufgrund des geringeren Wachstums dauerte die exponentielle Phase länger an, sodass die stationäre Phase später und bei einer geringeren Zelldichte als im BMD- und BMG-Medium eintrat. Die zum Ende des Versuches erreichte Zelldichte im BMM-Medium lag bei fast 50 % und im BMD-Medium bei 70 % der im BMG-Medium erzielten Zelldichte. Das Wachstum der Negativkontrollen ist vergleichbar zum Wachstum der Promoter-Kulturen, deren Wachstumsdiagramme im Anhang 7.8 zu finden sind.

In Abbildung 34 ist die Fluoreszenz gegen die Biomasse aufgetragen, welche linear proportional zur Biomasse zunimmt. Beide Größen zeigen ein linear proportionales Verhältnis, wobei sich beim Erreichen von höheren Zelldichten der Proportionalitätsfaktor erhöht.

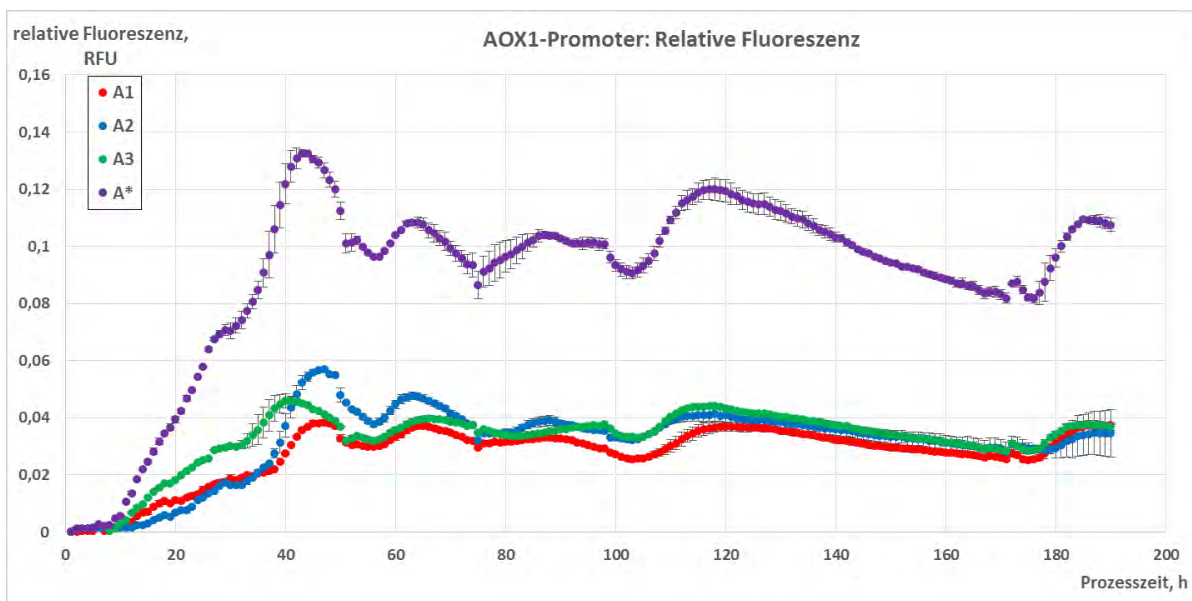
### Messung der AOX1-Promoter-Klone

Die Klone des AOX1-Promoters wurden täglich durch die Zugabe von 0,5 % Methanol induziert. Die Induktion erfolgte nach 24 h, 48 h, 78 h, 96 h (mit 1 %) und nach 168 h.



**Abbildung 35: Zeitlicher Verlauf der absoluten Fluoreszenz für  $P_{AOX1}$  im ersten Biolector-Versuch**

Dargestellt sind die Mittelwerte und Fehlerbalken der Einzelsinsertionsklone (A1-A3) und des *Tandem-Repeat*-Klons (A\*). Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz abgebildet. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet.



**Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für  $P_{AOX1}$  im ersten Biolector-Versuch**

Es sind Mittelwerte und Fehlerbalken sowohl der Einzelsinsertionsklone (A1-A3) und des *Tandem-Repeat*-Klons (A\*) zu sehen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz abgebildet. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet.

In Abbildung 35 ist die gemessene absolute Fluoreszenz dargestellt. Der Klon P\* mit nachgewiesener *Tandem-Repeat*-Integration zeigte eine signifikante höhere Fluoreszenz als die restlichen Proben. Der Klon A2 erreichte bezüglich der absoluten Fluoreszenz einen höheren Wert als die Klone A1 und A3, welche gleichmäßig verliefen. Dieser Unterschied ist durch die höhere Biomasse in den *wells* von A2 zu erklären (siehe Anhang 7.8). Der Verlauf der absoluten Fluoreszenz erfolgte stufenweise. Das im Medium vorhandene Methanol

wurde von den Zellen aufgebraucht und RudolphRFP wurde exprimiert, sodass die Fluoreszenz anstieg. Sobald das Methanol aufgebraucht war, stagnierte die Fluoreszenz bis zur nächsten Induktion. Über den Zeitraum von 120 h bis 170 h ist eine Abnahme der Fluoreszenz zu beobachten, welche nach erneuter Methanolinduktion, die wieder anstieg.

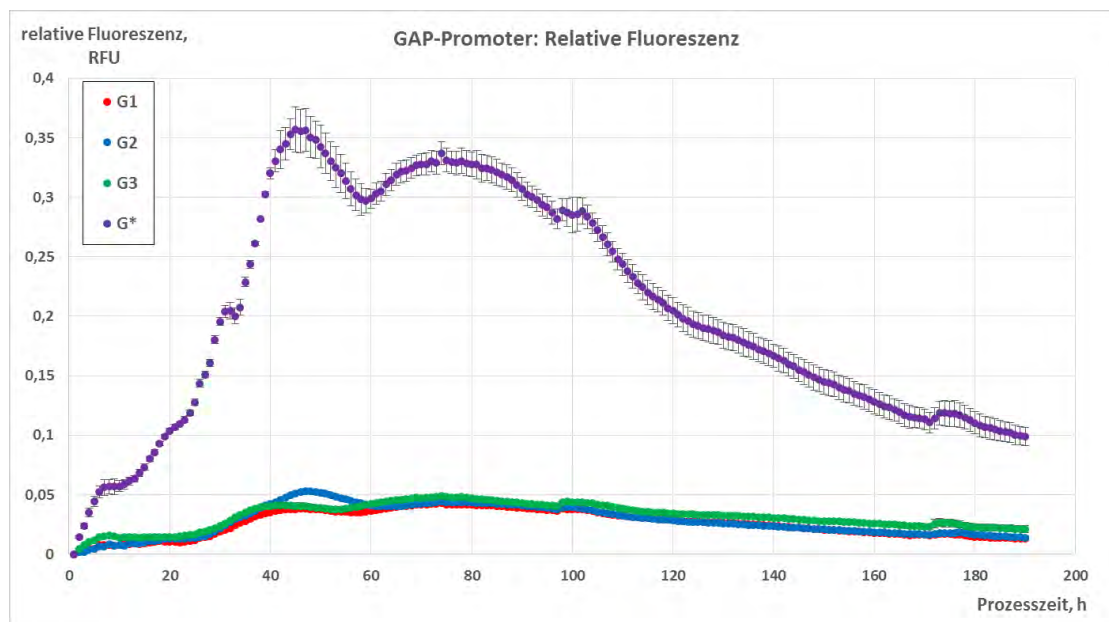
Für einen von der Biomasse unabhängigen Vergleich der Fluoreszenz der einzelnen Klone wurde eine relative Fluoreszenz definiert. Diese ist definiert als der Quotient der in einem *well* gemessenen, absoluten Fluoreszenz und Biomasse abzüglich desselben Quotienten der im selben Medium gewachsenen Negativkontrolle.

$$rel. Fluoreszenz = \frac{abs. Fluoreszenz (Probe)}{Biomasse (Probe)} - \frac{abs. Fluoreszenz (Blank)}{Biomasse (Blank)}$$

In Abbildung 36 sind die berechneten relativen Fluoreszenzwerte dargestellt. Der Verlauf ist nach einem steilen Anstieg zu Beginn der Kultivierung geprägt von Schwankungen, die aus dem stufenweisen Anstieg der Fluoreszenz durch die Induktion mit Methanol hervorgehen. Über einen längeren Zeitraum betrachtet verblieb die relative Fluoreszenz trotz dieser Schwankungen auf demselben Niveau. Die *Tandem-Repeat*-Probe A\* erreichte einen Wert der ca. dreifach höher ist als der Wert der Einzelinsertions-Proben (A1-A3). Klon A2 bewegt sich nun aufgrund der Normierung auf die Biomasse in derselben Größenordnung wie A1 und A3. Folglich stellt die relative Fluoreszenz ein vergleichbares Maß für die Expressionsstärke der einzelnen Proben dar und wurde für die weiteren Ansätze aller Promotoren ebenfalls verwendet.



### Messung der GAP-Promoter-Klone

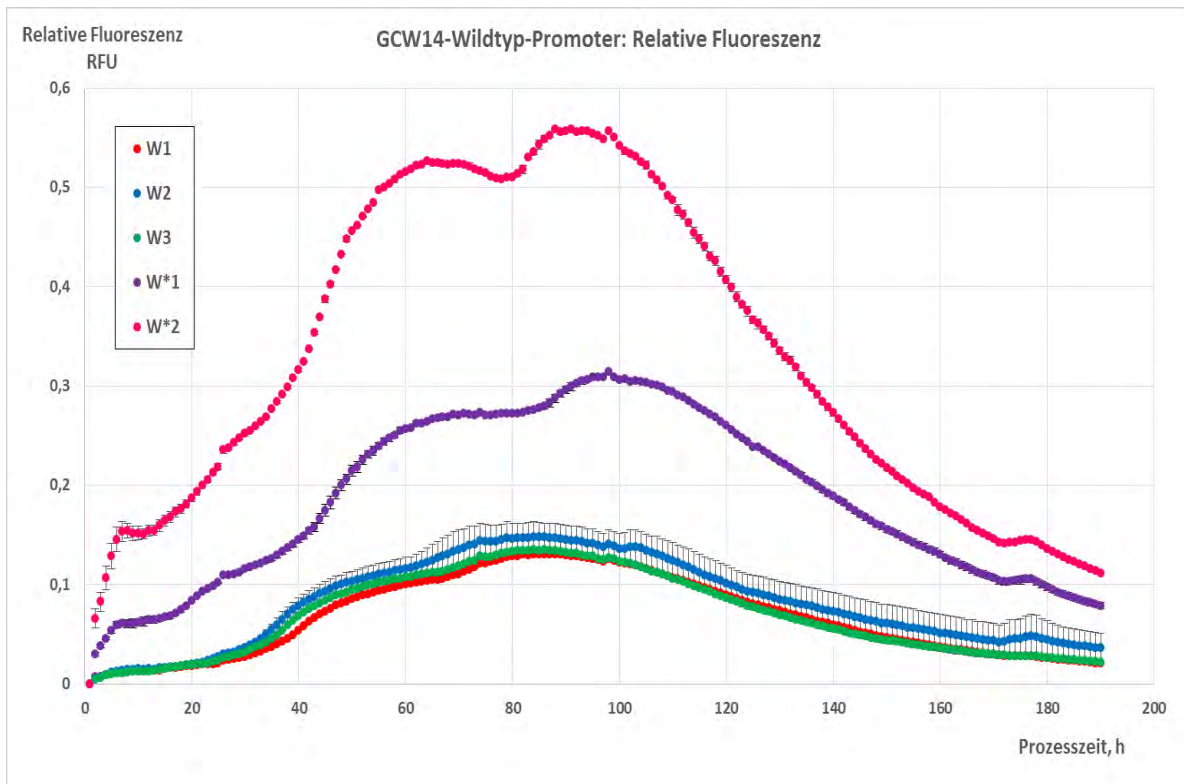


**Abbildung 37: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für  $P_{GAP}$  im ersten Biolector-Versuch**

Es sind Mittelwerte und Fehlerbalken sowohl der Einzelinsertionsklone (G1-G3) und des *Tandem-Repeat*-Klons (G\*) zu sehen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die relative Fluoreszenz abgebildet. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet.

Der Verlauf des Wachstums ist vergleichbar zur Negativkontrolle im BMD-Medium. Die absolute Fluoreszenz (siehe Anhang 7.8) hat einen parabelförmigen Verlauf und nimmt nach durchschreiten des Maximums (75 h) fast linear ab.

Der Verlauf der relativen Fluoreszenz für  $P_{GAP}$  (siehe Abbildung 37) zeigt, dass der *Tandem-Repeat*-Klon G\* das Expressionslevel der Einzelinsertions-Klone um den Faktor 14 übersteigt. Die biologischen Replikate der Einzelinsertions-Klone sind in ihrem Verlauf einander ähnlich. Die relative Fluoreszenz (siehe Abbildung 37) zeigte für alle Klone analog zur absoluten Fluoreszenz einen parabelförmigen Verlauf mit einem ersten Maximum bei 45 h und ein zweites analog zur absoluten Fluoreszenz bei 75 h.

Messung der GCW14-Wildtyp-Promoter:

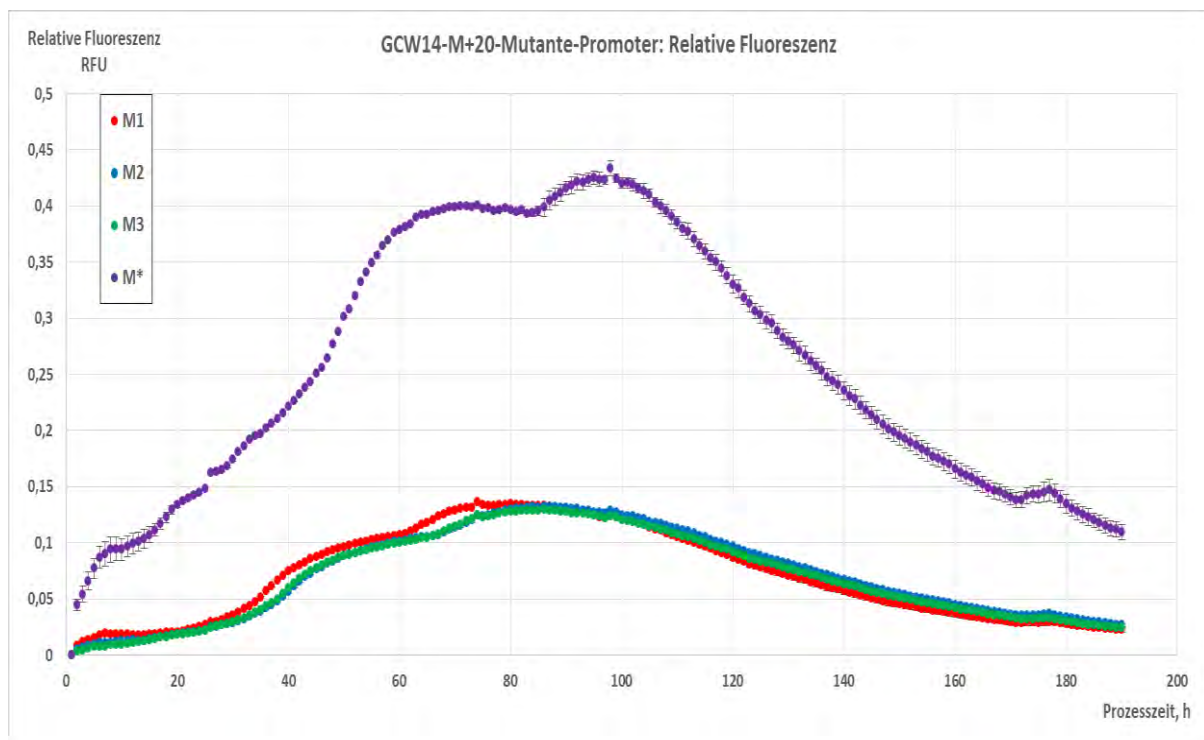
**Abbildung 38: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für  $P_{GCW14}$ -Wildtyp im ersten Biolector-Versuch**

Es sind Mittelwerte sowohl der Einzelinsertionsklone (W1-W3) und der *Tandem-Repeat*-Klone (W\*1) und (W\*2) zu sehen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die relative Fluoreszenz abgebildet. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet.

Das Wachstum der Zellen aller  $P_{GCW14}$ -Ansätze (siehe Anhang Abbildung 38) verlief homogen und war auch mit der Negativkontrolle im BMG-Medium (siehe Abbildung 33) vergleichbar. Neben den Einzelinsertions-Klonen wurden zwei weitere *Tandem-Repeat*-Klone (W\*1, W\*2), die sich in ihrer Farbintensität auf der Agar-Platte zusätzlich untereinander unterschieden, überprüft.

Die absolute Fluoreszenz (siehe Anhang 7.8) verlief vergleichbar zu den  $P_{GAP}$ -Proben und zeigte ebenfalls einen parabelförmigen Verlauf mit anschließendem linearem Abfall der Fluoreszenz.

Ebenso weist die relative Fluoreszenz wie bei den  $P_{GAP}$ -Proben einen parabelförmigen Verlauf auf. Das Maximum wurde nach 90 h erreicht und die Fluoreszenz sank darauffolgend ab. Die *Tandem-Repeat*-Proben zeigten wie erwartet eine signifikant höhere Fluoreszenz, wobei W\*2 ca. um den Faktor 2 stärker exprimierte als W\*1.

Messung der GCW14-M+20-Promoter:

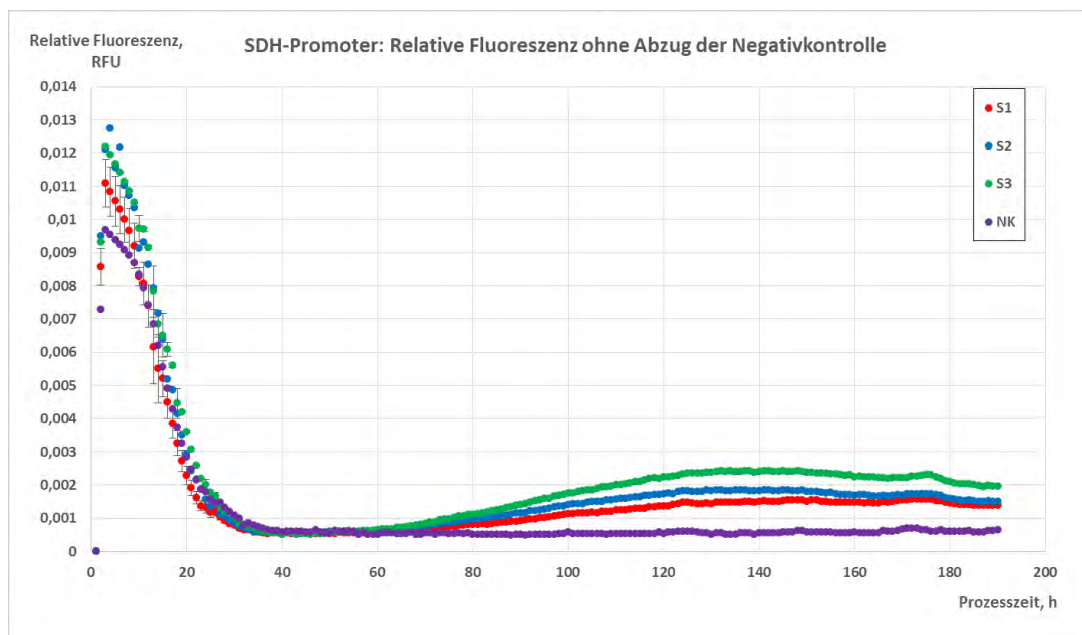
**Abbildung 39: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für  $P_{GCW14M+20}$ -Mutante im ersten Biolector-Versuch**

Es sind Mittelwerte und Fehlerbalken sowohl der Einzelinsertionsklone (M1-M3) und der *Tandem-Repeat*-Klons (M\*1) zu sehen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die relative Fluoreszenz abgebildet. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet.

Das Wachstum und die absolute Fluoreszenz aller  $P_{GCW14M+20}$ -Ansätze waren im Verlauf vergleichbar zu den Proben des  $P_{GCW14-Wildtyp}$  und der Negativkontrolle im BMG-Medium. Es wurde ein *Tandem-Repeat*-Klon (M\*) mit getestet, der wie bei den anderen konstitutiven Promotoren zuvor eine gesteigerte Fluoreszenz gegenüber den Einzelinsertions-Klonen gezeigt hat.

Der Verlauf der relativen Fluoreszenz (siehe Abbildung 39) ist mit den vorherigen konstitutiven Promotoren vergleichbar. Das Maximum lag bei etwa 95 h. Für alle Proben wurde ein ebenso ein linearer Abfall der Fluoreszenz beobachtet.

Die weiteren Graphen des Biomasse- und absoluten Fluoreszenz-Verlaufs sind in Anhang 7.8 beigefügt.

Messung des SDH-Promoters:**Abbildung 40: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für  $P_{SDH}$  im ersten Biolector-Versuch**

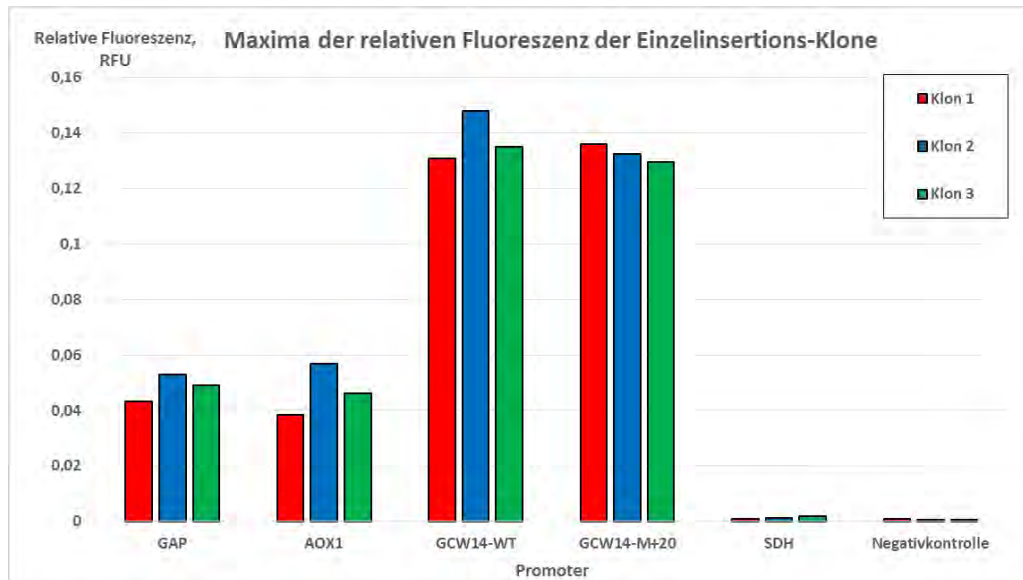
Es sind Mittelwerte und Fehlerbalken der Einzelinsertions-Klone (S1-S3) dargestellt. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die relative Fluoreszenz abgebildet. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet. Im Gegensatz zu den vorherigen Diagrammen wurde die Eigenfluoreszenz der Zellen nicht von den normierten Werten abgezogen. Stattdessen ist die Negativkontrolle (NK in BMG) ebenfalls im Diagramm abgebildet.

Das Wachstum der  $P_{SDH}$ -Proben zeigte keine signifikanten Unterschiede zu denen der GCW14-Promoter-Varianten und der Negativkontrolle (siehe. Anhang 7.8).

Die Werte der relativen Fluoreszenz (siehe Abbildung 40) unterschieden sich nicht signifikant von denen der nicht-fluoreszierenden Zellen der Negativkontrolle. Dies ist konsistent mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen in 96-*DeepWell*-Platten und Schüttelkolben.

### Maxima der relativen Fluoreszenz

Als Vergleichskriterium für die Expressionsstärke der Promotoren sind im folgenden Diagramm die Maxima der relativen Fluoreszenz der Einzelinsertions-Klone aufgetragen.

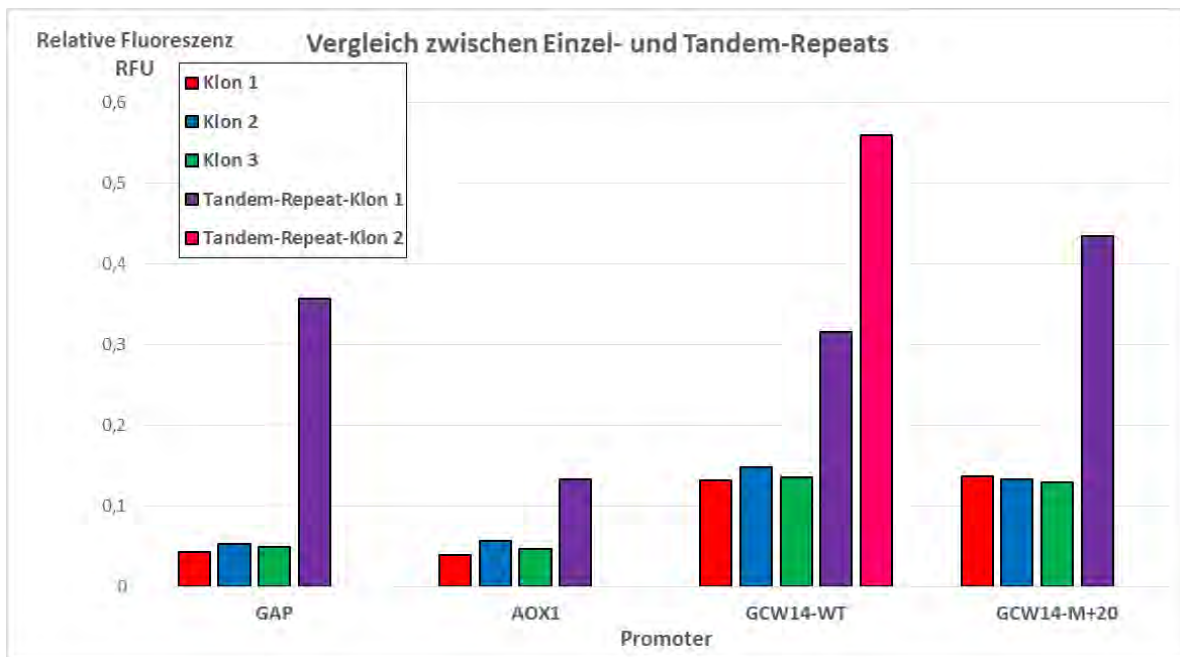


**Abbildung 41: Übersicht über die Maxima der Promoter-Dreifachbestimmungen und der Negativkontrolle im ersten Bioelector-Versuch**

Als Maximum wurde der höchste Wert der Mittelwerte der relativen Fluoreszenz definiert. Die Übersicht erlaubt einen direkten Vergleich in der maximalen Expressionsleistung der verschiedenen Promotoren. Auf der Abszisse sind die Promotoren aufgelistet und auf der Ordinate ist die Relative Fluoreszenz abgebildet.

Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, liegt das Maximum der relativen Fluoreszenz für alle Promotoren (außer dem SDH-Promoter) signifikant über der Eigenfluoreszenz der Negativkontrolle. Innerhalb der Dreifachbestimmung waren die Werte gleichmäßig. Es ist zu erkennen, dass die beiden Varianten des GCW14-Promoters die größten relativen Fluoreszenz-Werte in diesem Versuch erreichten. Diese lagen dreimal so hoch wie die Maxima von  $P_{GAP}$  und  $P_{AOX1}$ , deren Maxima sich auf demselben Level bewegten. Die größten Schwankungen sind beim induzierbaren AOX1-Promoter zu beobachten. Diese Schwankungen sind allerdings auf die Induktion zurückzuführen. Die  $P_{SDH}$ -Klone übertreffen die Negativkontrolle nicht signifikant.

Neben den Klonen mit Einzelinsertionen wurden auch Klone kultiviert, die über nachgewiesene *Multi-Copy*-Insertionen verfügen und eine erhöhte Expression aufweisen. (Vgl. Abbildung 42)



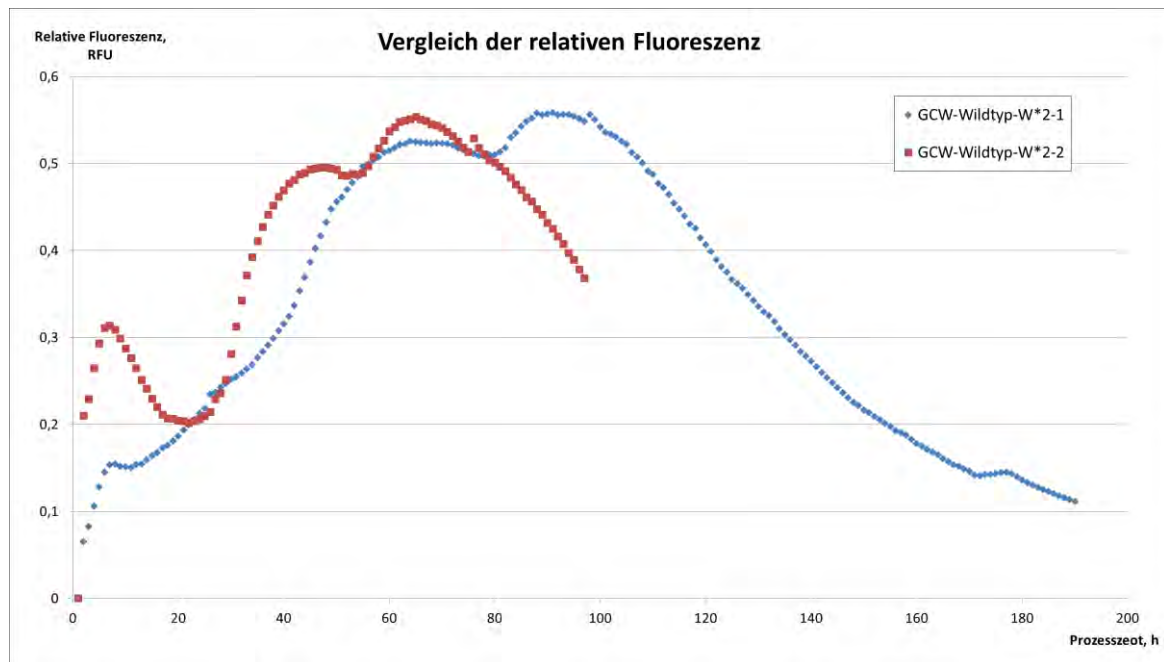
**Abbildung 42: Vergleich der Maxima zwischen Einzelinsertions- und *Tandem-Repeat*-Klonen für alle Promotoren im ersten Biolector-Versuch**

Als Maximum wurde der über die Kultivierungsdauer höchste erreichte Mittelwert der relativen Fluoreszenz verwendet. Auf der Ordinate ist die relative Fluoreszenz abgebildet und auf der Abszisse sind die Promotoren aufgelistet.

Es ist zu erkennen, dass die *Tandem-Repeat*-Klone die Einzelinsertions-Klone signifikant übertreffen. Dabei werden Maxima erreicht, die doppelt- bis sechsfach so hoch liegen. Der größte Unterschied ist bei den Klonen des GAP-Promoters zu beobachten, wo der *Tandem-Repeat*-Klon die anderen Klone um den Faktor 6 übertrifft. Das Maximum beim  $P_{AOX1}$ -*Tandem-Repeat*-Klon erreichte den dreifachen Wert der übrigen  $P_{AOX1}$ -Klone. Dieser liegt jedoch erneut wesentlich unter denen der anderen konstitutiven Promotoren. Für  $P_{GCW14-WT}$  sind zwei *Tandem-Repeat*-Klone getestet worden, die sich nochmals signifikant voneinander unterscheiden (Vgl. Abbildung 42). Das Maximum von W\*1 (lila) liegt doppelt so hoch wie das der Einzelinsertionsklone. Dieser Wert wurde seinerseits fast um den Faktor 2 vom W\*2 (magenta) übertroffen. Bei  $P_{GCW14M+20}$  liegt der Unterschied zwischen Einzelinsertion und *Tandem-Repeat* um den Faktor 3.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde dieselbe Kultivierung im Biolector erneut für einen kürzeren Zeitraum (96 h) durchgeführt. Die einzelnen Diagramme der Verläufe der Biomasse, absoluten und relativen Fluoreszenz sind im Anhang 7.8 zu finden. In diesem Versuch verlief die Biomasse-Zunahme sowohl für die biologischen Replikate als auch die technischen Replikate erneut einheitlich. Die Fluoreszenz erreichte für die verschiedenen Promotoren ein mit dem ersten Versuch vergleichbares Level. Der einzige auffällige Unterschied ist, dass die relative Fluoreszenz fast aller Proben zum Startzeitpunkt erhöht ist. Dies ist beispielhaft für die *Tandem-Repeat*-Proben von W\*2 in Abbildung 43 dargestellt. Die Maxima weisen jedoch einen vergleichbaren Wert auf





**Abbildung 43: Beispielhafter Vergleich des Unterschieds im Auftreten des Maximums zwischen dem ersten und zweiten Biolector-Versuches anhand der  $P_{GCW15-Wildtyp-Probe (W*2)}$**

In Blau ist der Verlauf der Mittelwerte der relativen Fluoreszenz aus dem ersten und in Rot der aus dem zweiten Biolector-Versuch zu sehen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die relative Fluoreszenz abgebildet

Die zuvor als Vergleichskriterium herangezogenen Maxima der relativen Fluoreszenz wurden auch für den zweiten Biolector-Versuch verwendet (siehe Kapitel 7.8). In Tabelle 21 sind die jeweiligen normierten Maxima der beiden Versuche gegenüber gestellt. Die Maxima liegen auf demselben Niveau treten allerdings etwas früher auf. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die *wells* erneut von denselben Agarplatten angeimpft worden sind, die zwischen den beiden Versuchen bei 4 °C gelagert worden sind. Wie zuvor schon bei den Reinstrichen beobachtet, wird die Expression auch während der Lagerung fortgesetzt, sodass die Fluoreszenz zu Beginn des Versuches auf eine erhöhte Menge RudolphRFP zurückzuführen ist.

**Tabelle 21: Vergleich der Maxima im ersten und zweiten Biolector-Versuch und der Zeitpunkt ihres Auftretens**

Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit wurden die Maxima auf das jeweilige Maximum von G1 normiert.

Promoter	Probe	Zeitpunkt (Versuch 1)	Normiertes Maximum (Versuch 1)	Zeitpunkt (Versuch 2)	Normiertes Maximum (Versuch 2)
GAP	G1	72	1,0	72	1,0
	G2	45	1,2	72	0,9
	G3	72	1,1	45	1,4
	G*	43	8,3	72	8,8
AOX-1	A1	45	0,9	39	1,1
	A2	44	1,3	39	1,4
	A3	39	11	39	1,2
	A*	41	3,1	38	3,4
GCW14-Wildtyp	W1	85	3,0	74	3,3
	W2	82	3,4	74	3,2
	W3	84	3,1	74	3,7
	W*1	96	7,3	74	8,2
	W*2	89	13,0	63	14,4
GCW14M+20	M1	72	3,2	74	3,3
	M2	85	3,1	75	3,5
	M3	84	3,0	74	3,5
	M*1	96	10,1	74	11,1
SDH	S1	145	0,02	95	0,01
	S2	133	0,03	95	0,02
	S3	132	0,04	95	0,03

Die Ergebnisse des ersten Biolector-Laufes konnten reproduziert werden. Der zweite Biolector-Versuch verlief einheitlicher als der erste. Die beobachteten Unterschiede in der Biomasse und absoluten Fluoreszenz sind im Rahmen des biologischen Systems zu erklären und sind in der normierten relativen Fluoreszenz nicht wieder zu finden. So haben die beiden Biolector-Versuche gezeigt, dass die beiden GCW14-Promoter-Varianten den klassischen GAP-Promoter deutlich übertreffen.

Alles in allem zeigten die Klone mit *Tandem-Repeats* in beiden Versuchen 3-5x stärkere Fluoreszenzsignale. Dies verdeutlicht die Bedeutung des Screenings nach solchen Klonen insbesondere für die Expression schwierig zu exprimierender Zielproteine.

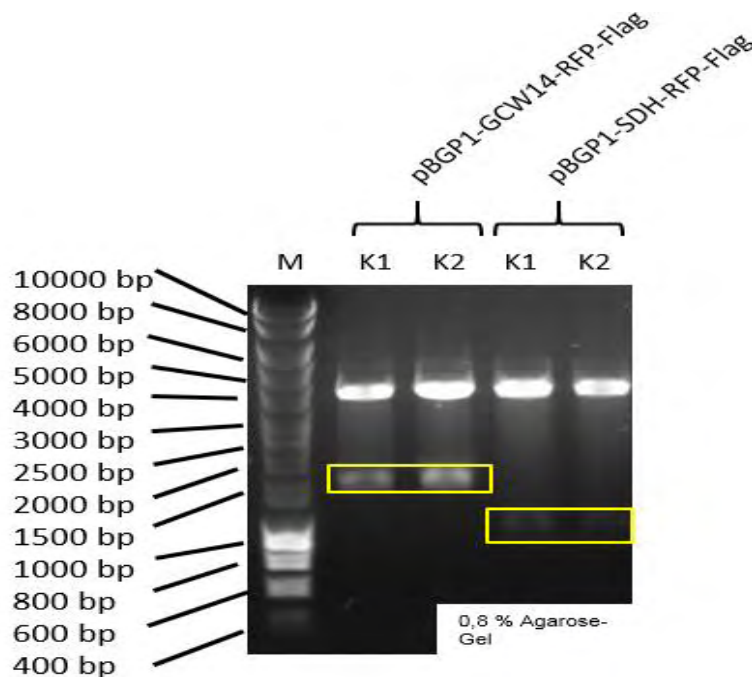


### 3.7. Konstruktion eines episomalen Expressionsvektors für die Überprüfung des SDH-Promoter

In allen bisherigen Experimenten konnte keine bzw. nur eine schwach detektierbare Expression von RudolphRFP durch den SDH-Promoter festgestellt werden, obwohl dieser in der Literatur (Periyasamy *et al.* 2013) als starker Promoter beschrieben wird. Eine mögliche Ursache könnte darin gelegen haben, dass die schwache Expression als Folge der Integration ins Genom verursacht wurde. Für die transiente Expression wurde pBGP1 $\Delta\alpha$ B eingesetzt, der über seine PARS1-Sequenz zirkulär in *P. pastoris* repliziert und bei der Zellteilung vererbt werden kann.

In den Vektor wurde ein Fragment aus SDH-Promoter und RudolphRFP-Flag kloniert. Als Positivkontrolle wurde analog ein Vektor mit dem bereits erfolgreich eingesetzten GCW14-Wildtyp-Promoter kloniert (siehe Kapitel 2.2).

Die Ansätze wurden in *E. coli* TOP10 transformiert (siehe Kapitel 2.6). Nach erfolgreicher Selektion wurden Klone gepickt und die Plasmid-DNA in einer Miniprep (siehe Kapitel 2.7) isoliert. Das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.9) nach erfolgreichem Testverdau (siehe Kapitel 2.8) ist in Abbildung 44 zu sehen.



**Abbildung 44: Agarose-Gelelektrophorese des Testverdau der episomalen Expressionsvektoren**

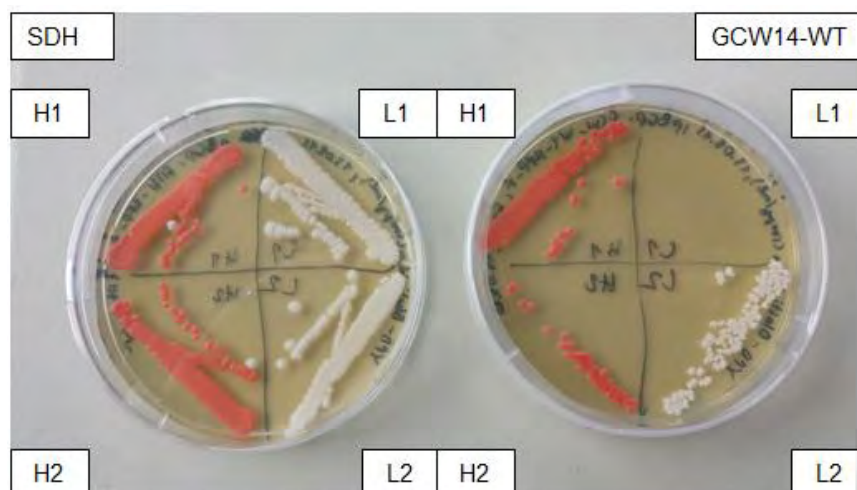
Die zusehenden Banden entsprechen den Erwartungen. Das Backbone ist für alle Klone gleich und hat eine Größe von rund 4.200 bp. Die Inserts haben eine Größe von 1.700 bp (pBGP1- $\Delta\alpha$ -GCW14-RFP-Flag) und 1.000 bp (pBGP1- $\Delta\alpha$ -B-SDH-RFP-Flag). Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Alle Klone zeigen ein positives Signal mit ~4.200 bp für das Vektorrückgrat sowie ~1.700 bp bzw. ~1.000 bp für das jeweilige Insert bestehend aus  $P_{GCW14}$  bzw.  $P_{SDH}$  und RudolphRFP-Flag. Die Korrektheit der Sequenz wurde zudem durch eine Sequenzierung validiert (siehe Kapitel 2.10). Die entsprechenden Sequenzalignments sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Anhang 7.7).

Die Vektoren wurden nun zirkulär in elektrokompetente *P. pastoris* X-33 transformiert. Da pBGP1 $\Delta\alpha$ -B über eine Blasticidin S-Resistenz anstelle der Zeocin-Resistenz verfügt, wurde die Selektion und die Reinstriche auf YPD-Blasticidin-Agarplatten durchgeführt. (siehe Kapitel 2.12)

Auf den bewachsenen Transformationsplatten waren für die beiden transformierten Vektoren sowohl farblose als auch rote Kolonien zu finden. Es wurden je zwei Klone von den farblosen und den roten Zellen für Reinstriche eingesetzt.

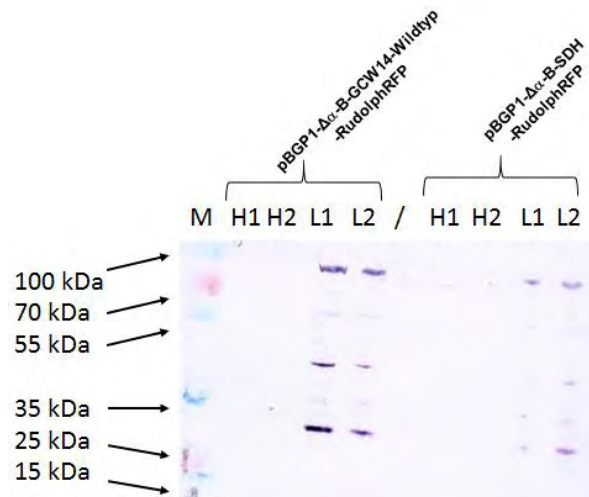
Die auf der Transformationsplatte roten Kolonien wurden auch im Reinstrich wieder rot (siehe Abbildung 45). Die farblosen Kolonien sind ebenso farblos geblieben.



**Abbildung 45: Reinstrichplatten der transformierten X-33-Zellen mit den episomalen Expressionsvektoren**

Je Vektor wurden zwei farblose (L) und zwei rote Kolonien (H) ausgestrichen. Die roten Zellen weisen eine starke Färbung auf. Die zuvor farblosen Zellen des pBGP1-GCW14-RudolphRFP-Vektors zeigen eine schwache Färbung. Die zuvor farblosen Zellen des pBGP1-SDH-RudolphRFP-Vektors zeigen weiterhin keine Färbung.

Alle Reinstrich Klone wurden für 72 h in einer 96-*Deepwell*-Platte kultiviert (siehe Kapitel 2.14). Die Zellen wurden geerntet und in SDS-Ladepuffer aufgeschlossen (siehe Kapitel 2.17). Die so erhaltenen Zellextrakte wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und von dem Gel wurde ein Western Blot angefertigt (s. Kapitel 2.18).



**Abbildung 46: Western Blot der Testexpression von RudolphRFP mit den neuen episomalen Expressionsvektoren**

Vor dem Western Blot wurde eine SDS-Page (15 %iges Trenngel, 5 %iges Sammelgel) durchgeführt und geblottet. Das Problemvolumen betrug 10  $\mu$ L. Je Vektor wurden jeweils die Zellextrakte von zwei roten (H1, H2) und zwei farblosen (L1, L2) Zellen aufgetragen. Die Färbung wurde über den Flag-Tag des Zielproteins durchgeführt.

Wie auf dem Western Blot (siehe Abbildung 46) zu erkennen ist, zeigten die roten Proben (H) kein positives Signal für RudolphRFP, die beiden farblosen Proben (L) hingegen ein schwaches positives Signal bei ca. 27 kDa. Die in Kapitel 3.4 beobachtete zweite Bande bei ca. 17 kDa trat nicht erneut auf. Daraufhin wurden die beiden Platten (siehe Abbildung 45) unter UV-Licht auf ihre Fluoreszenz untersucht. Die roten Kolonien auf beiden Platten zeigten trotz roter Färbung keine Fluoreszenz.

Die Ergebnisse sind zu dem der stabilen Expression konsistent, bei der die Expression über  $P_{SDH}$  schwächer als die über  $P_{GCW14}$  war. Der fehlende Nachweis für die Expression von RudolphRFP in den stark roten Klonen könnte durch Handhabung oder eine Kontamination erklärbar sein. Dafür muss der Western Blot wiederholt werden. Zudem könnten weitere Klone auf ihre Expressionsleistung gescreent werden. Dies war in dieser Arbeit jedoch aus Zeitgründen nicht mehr möglich.

### 3.8. Evaluierung des GCW14-M+20-Promoters zur Expression von Tmprss2

In den bisherigen Experimenten stellte der GCW14-Promoter die vielversprechendste Alternative zu den klassischen Promotoren für die Überexpression dar. Deshalb sollte in einem weiteren Versuch die Expressionsleistung anhand von Tmprss2 als Beispiel eines komplexen Proteins evaluiert werden.

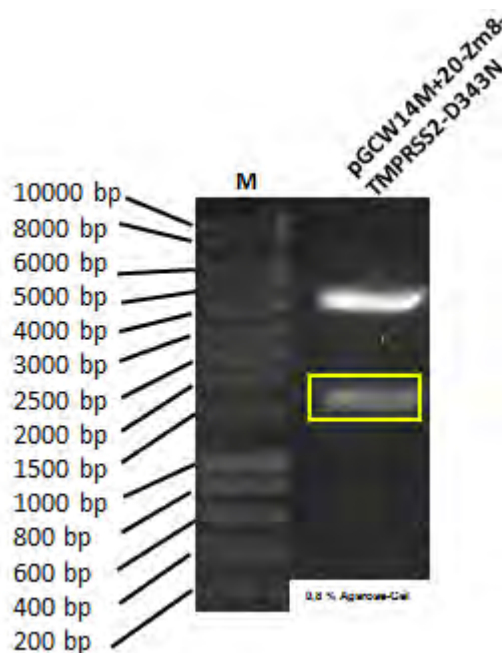
Für eine inaktive Mutante von Tmprss2 (D343N) wurden bereits *P. pastoris* Zelllinien generiert und für die Expression eingesetzt (Quelle: Christian Schinkowski, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig). Diese basieren auf dem Vektor pPICZ $\alpha$ -A (Invitrogen) und enthalten eine codon-optimierte Variante von Tmprss2-D343N (Tmprss2-

D343Nopt). Die Expression von Tmprss2-D343N wurde über den AOX1-Promoter gesteuert. Die Sekretion erfolgte durch das im Vektor codierte  $\alpha$ -*mating factor* Sekretionssignal.

Aus dem bestehenden Vektor pPICZ $\alpha$ -A-Tmprss2-D343Nopt wurde das Zielgen inklusive des Sekretionssignals durch eine PCR amplifiziert, verdaut und nach Kapitel 2.2 in den Vektor pGCWmZ integriert. Nach Transformation (siehe Kapitel 2.6) in *E. coli* TOP10 und erfolgter Selektion wurden Kolonien gepickt und die Plasmid-DNA isoliert (siehe Kapitel 2.7). Die isolierte Plasmid DNA wurde einem Testverdau (siehe Kapitel 2.8) mit den Restriktionsenzymen *SacI*-HF und *PstI*-HF unterzogen. Das Ergebnis der nachfolgenden Agarose-Gelelektrophorese zeigte das erwartete Bandenmuster von 1.632 bp und 4.140 bp für *Insert* und Vektorrückgrat (Vgl. Abbildung 47). Die DNA wurde zudem über eine Sequenzierung validiert. Die entsprechenden Sequenzalignments sind dem Anhang zu entnehmen (Anhang 7.7).

Das Plasmid wurde mit *SacI*-HF linearisiert und in elektrokompetente *P. pastoris* X-33-Zellen (siehe Kapitel 2.11) zur Generierung stabiler Zelllinien transformiert.

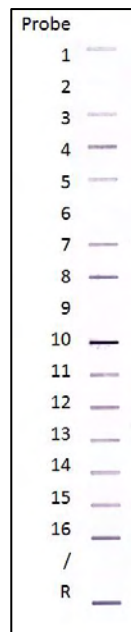
Für die Selektion von *Multi-Copy-Klonen mit Tandem-Repeats* wurden YPD-Agarplatten mit erhöhten Zeocin-Resistenzen (500  $\mu$ g/mL und 1 mg/mL) verwendet. Nach erfolgter Inkubation wurden insgesamt 16 Klone gepickt und in BMGY-Medium in einer 96-*Deepwell*-Platte für 72 h kultiviert. Nach der Ernte wurde ein Slot Blot mit 15  $\mu$ L Überstand der Proben 1-16 durchgeführt.



**Abbildung 47: Auftrennung des Testverdaus von pGCWmZ- $\alpha$ TMPRSS2-D343N-Vektors mit *PstI*-HF und *SacI*-HF**

Die Probe zeigt ein positives Signal. Das Insert hat eine Größe von rund 1632 bp und das Rückgrat von 4140 bp. Die Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Rotisafe.

Als Referenz wurden äquivalente Mengen von Überstandsproben bereits vorhandener P<sub>AOX1</sub>-Zelllinien mit Tmprss2-D343Nopt eingesetzt (R). Die unterschiedlichen Klone wiesen hierbei auf dem Slot Blot (siehe Abbildung 48) starke Schwankungen in der Expressionsleistung auf. So zeigte der Klon 10 die stärkste Expression, gefolgt von den Klonen 4 und 16. Die Bande von Klon 10 übertrifft dabei sogar die Intensität der Referenz-Bande. Bei den Klonen 2,6 und 9 konnte keine Expression nachgewiesen werden. Die aufgetretenen Schwankungen könnten auf eine unterschiedliche eine Genkopiezahl zurückzuführen sein.



**Abbildung 48: Slot Blot der Überstandsproben der Tmprss2-D343Nopt-Testexpression**

Für den Slot Blot wurden 15 µL Proben verwendet. Die Färbung erfolgte analog zu den Western Blots zur Detektion RudolphRFP, da Tmprss2 ebenfalls über einen Flag-Tag verfügt. Als Referenz sind Überstände vorhandener P<sub>AOX1</sub>-Zelllinien verwendet worden.

#### 4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der drei konstitutiven Promotoren  $P_{SDH}$ ,  $P_{GCW14}$  und  $P_{GCW14M+20}$  und der Vergleich der Expressionsleistung gegenüber den etablierten Promotoren  $P_{AOX1}$  und  $P_{GAP}$ .

Der SDH-Promoter wird in der Literatur (Periyasamy *et al.* 2013) als starker konstitutiver Promoter beschrieben, dessen Expressionsleistung vergleichbar zum bisher genutzten GAP-Promoter sein soll. Dies konnte durch die durchgeführten Experimente nicht bestätigt werden. So zeigten die Zelllinien des GAP-Promoters bereits auf den Reinstrich-Agarplatten eine Expression, wohingegen für die Klone des SDH-Promoters keine Expression nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis hat sich in den folgenden Versuchen mit stabilen Zelllinien oder in transienter Expression fortgepflanzt, in denen die Klone des SDH-Promoters keine signifikante oder nur sehr geringe Expression aufwiesen.

Der Grund für die schlechte Expressionsleistung der stabilen Zelllinien könnte zudem in einer fehlerhaften homologen Rekombination liegen. Eine zufällige Integration der Genkassette in einen für die Expression unvorteilhaften Locus kann in Anbetracht des nur sehr kurzen SDH-Promoters nicht ausgeschlossen werden, da die Länge der überlappenden homologen Sequenzen gering ist (Orr-Weaver *et al.* 1981). Mit den vorhandenen PCR-Primern war es nicht möglich, den Integrationslocus zu überprüfen. Dazu müssten beispielsweise Primer designt werden, die spezifisch außerhalb der integrierten Genkassette binden oder ein Southern Blot durchgeführt werden.

In der Literatur wird der GCW14-Promoter von Liang *et al.* als vier- bis fünfmal so stark wie der GAP-Promoter und annähernd so stark wie der AOX1-Promoter beschrieben (Liang *et al.* 2013). Dieser Wert wurde zwar in den Schüttelkolbenversuchen nicht erreicht. In den Versuchen mit dem Biolector übertraf die Expression beider Varianten des GCW14-Promoters jedoch den GAP-Promoter um ca. 75 % (siehe Abbildung 32). Zwischen den beiden GCW14-Promoter-Varianten war hingegen kein deutlicher Unterschied zu erkennen. Während dieses Verhältnis nicht deckungsgleich mit den Studien von Zhang *et al.* ist, ist jedoch zu beachten, dass in dieser Veröffentlichung die mRNA als direktes Maß für die Expressionsstärke verwendet wurde (Zhang *et al.* 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde hingegen die Fluoreszenz als indirektes Maß gemessen, sodass ein direkter Vergleich der Werte nicht möglich ist.

Weiterhin soll der AOX1-Promoter laut Liang *et al.* auf Methanol um den Faktor  $\sim 1,8$  stärker (bezogen auf das mRNA-Level) sein als der GCW14-Wildtyp-Promoter in Glycerol (Liang *et al.* 2013). Dies konnte in den Schüttelkolben bestätigt werden. Die durchgeführte Messung ergab nach 168 Stunden einen Unterschied um den Faktor  $\sim 1,8$  (siehe Abbildung 32). Im

Biolector konnte für den laut Literatur stärkeren AOX1-Promoter (Cereghino and Cregg 2000) nur eine Expression auf dem Level des GAP-Promoters beobachtet werden. Jedoch hat die Online-Messung der Fluoreszenz auch einen stufenartigen Anstieg der Expression statt eines kontinuierlichen Verlaufs gezeigt. Dadurch blieb der AOX1-Promoter hinter seinem eigentlichen Potential zurück. Für eine kontinuierliche Induktion müsste die Methanolzugabe für diese Zelllinie erhöht werden, wobei darauf geachtet werden muss, dass die Konzentration keinen für die Zellen zytotoxisch Level erreicht. So könnte eine Induktion wie von Kamarthapu *et al.* beschrieben durch die tägliche Zugabe von bis zu 1 % Methanol erfolgen (Kamarthapu *et al.* 2013).

Die Maxima der GCW14-Promotoren (Wildtyp und M+20-Mutante) zeigten in allen Versuchen vergleichbare Expressionslevel. Die in der Literatur beschriebene 20 % stärkere Expression des GCW-14-M+20-Promoters (Zhang *et al.* 2013) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Allerdings zeigten die von Zhang *et al.* durchgeführten Messungen (Zhang *et al.* 2013) für die M+20-Mutante eine starke Standardabweichung, die einer Expressionsleistung von 100 bis 120 % gegenüber dem Wildtyp entsprechen, was eine mögliche Erklärung für die hier gemachten Beobachtungen sein kann.

Für alle Promotoren wurde der Einfluss von *Tandem-Repeats* durch den Biolector-Versuch verdeutlicht. Daher wäre es interessant, das Screening nach solchen Klonen zu vereinfachen z.B. durch die Fusion des Zielproteins an ein fluoreszierendes Markerprotein. Außerdem wäre es interessant, die Langzeitstabilität solcher Klone beispielsweise durch eine langfristige Kultivierung in Schüttelkolben zu überprüfen.

In den Western Blots, die von den Ernteproben nach 96 h Expression durchgeführt wurden, hat sich neben der erwarteten Produktbande für RudolphRFP eine weitere Bande von 17 kDa gezeigt. Dabei könnte es sich um ein Abbau-Produkt von RudolphRFP handeln. Diese Bande ist in der Erntefraktion der transienten Expression nach 72 h nicht detektiert worden. Ein möglicher Grund dafür ist die verkürzte Kultivierungsdauer von 72 h statt 96 h. Im Biolector wurde ein Abfall der Fluoreszenz ab ca. 80 h beobachtet, sodass die aufgetretene Bande durch einen möglichen Abbau entstehen könnte. Dies könnte durch eine Western Blot Analytik mit Zeitproben während der Expression überprüft werden. Des Weiteren könnte durch eine native SDS-PAGE untersucht werden, ob die Bande durch eine Spaltung der Peptidkette von RudolphRFP entsteht, bei der das Chromophor selbst jedoch intakt bleibt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Analysen jedoch aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

Aufgrund der starken Expression wurde der GCW14M+20-Promoter zur Evaluierung für die sekretorische Expression von Tmprss2-D343N eingesetzt. Eine Zelllinie (Klon 10) zeigte in einem vorläufigen Test (Slot Blot) eine stärkere Ausbeute als die Referenz (AOX1-Promoter).

Die Tatsache, dass der GCW14M+20-Promoter nicht induziert werden muss, bedeutet gerade für größere Expressionsmaßstäbe (z.B. Bioreaktoren) einen Vorteil, da kein MeOH-*Feed* mehr erfolgen muss und so das Sicherheitsrisiko gesenkt wird. Der Prozess wird zudem für die Produktion nicht toxischer Proteine vereinfacht. Die Netto-Ausbeute kann unter Umständen gegenüber dem AOX1-Promoter sogar erhöht sein, sofern eine sekretorische Expression über einen längeren Kultivierungsverlauf möglich ist. Im *Batch*-Verfahren wäre dies möglich, solange das Zielprotein im Überstand stabil ist. Alternativ wäre der Einsatz einen kontinuierlichen Reaktors möglich, bei dem das Medium stetig ausgetauscht wird. Ob dies im Fall von Tmprss2 möglich ist, müsste in Langzeituntersuchungen getestet werden. Dabei könnte sich die aktive Wildtyp-Form von der hier untersuchten inaktiven Mutante D343N unterscheiden. Dies konnte im Rahmen der Bachelorarbeit nicht mehr überprüft werden. In der Literatur hat eine Doppelexpression über  $P_{GAP}$  und  $P_{AOX1}$  zu einer erhöhten Proteinausbeute geführt (He *et al.* 2015). Derselbe Ansatz könnte in einer dualen Expression mit  $P_{GCW14M+20}$  in Kombination mit  $P_{AOX1}$  verfolgt werden. So könnte die zuvor für die Expression ungenutzte Wachstumsphase auf Glycerin ebenfalls nutzbar gemacht werden. Nach erfolgreichem Wachstum kann die Expression durch die Induktion zusätzlich gesteigert werden. Speziell die Kombination aus  $P_{GCW14M+20}$  und  $P_{AOX1}$  könnte dabei interessant sein, weil der GCW14M+20-Promoter im Gegensatz zum GAP-Promoter auch auf Methanol eine starke Expression zeigte (Liang *et al.* 2013).

Alles in allem hat sich herausgestellt, dass sich der GCW14-Promoter in beiden Varianten stärker ist als der GAP-Promoter. Daher ist er aufgrund dieser Arbeit der aussichtsreichste Kandidat für die Expression schwer zu exprimierender Proteine und bietet sich für die Erstellung von Zelllinien an, deren Expression über mehrere Promotoren gesteuert wird.



## 5. Fazit und Ausblick

Der GCW14-Promoter (Wildtyp und M+20) zeigte in allen Experimenten eine signifikant höhere Proteinexpression als der GAP- und der SDH-Promoter und erscheint somit als geeignete Alternative zu den klassischen Promotoren. Die Leistung des GCW14M+20-Promoters wurde außerdem durch die sekretorische Expression von Tmprss2 getestet, wobei das Niveau des AOX1-Promoters von einigen der hergestellten Klone erreicht wurde.

Bezüglich des AOX1-Promoters hat sich anhand des Biolector-Systems gezeigt, dass für dessen Verwendung mit X-33 Zellen die Induktion optimiert werden könnte. Dies könnte mithilfe der Onlinemessung auch für andere Zelllinien und Stämme analog durchgeführt und zur Optimierung der manuellen Methanolinduktions-Strategie eingesetzt werden.

Mit dem starken konstitutiven GCW14-Promotor können überdies neue Expressionsstrategien verfolgt werden. So könnte die bestehende X33-Zelllinie für die Expression von Tmprss2 über den GCW14-M+20-Promoter weiter modifiziert werden, um die Expressionskassette zusätzlich in den AOX1-Lokus zu integrieren. Alternativ könnte auch die bestehende, durch den AOX1-Promoter gesteuerte *P. pastoris* KM71H-Zelllinie um eine weitere Expressionskassette mit dem GCW14-Promoter ergänzt werden. Dadurch könnten höhere Ausbeuten erzielt und die sonst für die Produktion ungenutzte Wachstumsphase auf Glycerin für die Expression erschlossen werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Baumann, K., M. Carnicer, M. Dragosits, A. B. Graf, J. Stadlmann, P. Jouhten, H. Maaheimo, B. Gasser, J. Albiol, D. Mattanovich and P. Ferrer (2010). "A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions." *BMC Syst Biol* 4: 141.

Bottcher-Friebertshauer, E., H. D. Klenk and W. Garten (2013). "Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium." *Pathog Dis* 69(2): 87-100.

Cereghino, J. L. and J. M. Cregg (2000). "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." *FEMS Microbiol Rev* 24(1): 45-66.

Cregg, J. (2007). DNA-Mediated Transformation. *Pichia Protocols*. J. Cregg, Humana Press. 389: 27-42.

Cregg, J., J. Cereghino, J. Shi and D. Higgins (2000). "Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*." *Molecular Biotechnology* 16(1): 23-52.

Cregg, J. M. (2007). "Introduction: distinctions between *Pichia pastoris* and other expression systems." *Methods Mol Biol* 389: 1-10.

Cregg, J. M., K. J. Barringer, A. Y. Hessler and K. R. Madden (1985). "*Pichia pastoris* as a host system for transformations." *Mol Cell Biol* 5(12): 3376-3385.

Cregg, J. M., K. R. Madden, K. J. Barringer, G. P. Thill and C. A. Stillman (1989). "Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*." *Mol Cell Biol* 9(3): 1316-1323.

Darby, R. J., S. Cartwright, M. Dilworth and R. Bill (2012). Which Yeast Species Shall I Choose? *Saccharomyces cerevisiae* Versus *Pichia pastoris* (Review). *Recombinant Protein Production in Yeast*. R. M. Bill, Humana Press. 866: 11-23.

Gellissen, G., Ed. (2005). Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems. Weinheim, Wiley-VCH.

Goncalves, A. M., A. Q. Pedro, C. Maia, F. Sousa, J. A. Queiroz and L. A. Passarinha (2013). "*Pichia pastoris*: a recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins." *J Microbiol Biotechnol* 23(5): 587-601.

Hatesuer, B., S. Bertram, N. Mehnert, M. M. Bahgat, P. S. Nelson, S. Pohlmann and K. Schughart (2013). "Tmprss2 is essential for influenza H1N1 virus pathogenesis in mice." *PLoS Pathog* 9(12): e1003774.

- He, D., W. Luo, Z. Wang, P. Lv and Z. Yuan (2015). "Combined use of GAP and AOX1 promoters and optimization of culture conditions to enhance expression of *Rhizomucor miehei* lipase." *J Ind Microbiol Biotechnol* 42(8): 1175-1182.
- Hitchcock, A. L., J. A. Kahana and P. A. Silver (2005). *The Uses of Green Fluorescent Protein in Yeasts. Green Fluorescent Protein*, John Wiley & Sons, Inc.: 179-201.
- Jacobs, P. P., S. Geysens, W. Vervecken, R. Contreras and N. Callewaert (2009). "Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology." *Nat Protoc* 4(1): 58-70.
- Jansohn, M. and S. Rothhämel (2012). *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag: Online-Ressource (XXIII, 660 S.).
- Kamarthapu, V., S. Ragampeta, K. V. Rao and V. D. Reddy (2013). "Engineered *Pichia pastoris* for enhanced production of S-adenosylmethionine." *AMB Express* 3: 40.
- Kurien, B. and R. H. Scofield (2012). *Common Artifacts and Mistakes Made in Electrophoresis. Protein Electrophoresis*. B. T. Kurien and R. H. Scofield, Humana Press. 869: 633-640.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lee, C. C., T. G. Williams, D. W. Wong and G. H. Robertson (2005). "An episomal expression vector for screening mutant gene libraries in *Pichia pastoris*." *Plasmid* 54(1): 80-85.
- Liang, S., C. Zou, Y. Lin, X. Zhang and Y. Ye (2013). "Identification and characterization of P GCW14 : a novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*." *Biotechnol Lett* 35(11): 1865-1871.
- Lin-Cereghino, J., W. W. Wong, S. Xiong, W. Giang, L. T. Luong, J. Vu, S. D. Johnson and G. P. Lin-Cereghino (2005). "Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." *Biotechniques* 38(1): 44, 46, 48.
- Looke, M., K. Kristjuhan and A. Kristjuhan (2011). "Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications." *Biotechniques* 50(5): 325-328.
- Looser, V., B. Bruhlmann, F. Bumbak, C. Stenger, M. Costa, A. Camattari, D. Fotiadis and K. Kovar (2015). "Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review." *Biotechnol Adv.*
- Lueking, A., C. Holz, C. Gotthold, H. Lehrach and D. Cahill (2000). "A system for dual protein expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif* 20(3): 372-378.
- Orr-Weaver, T. L., J. W. Szostak and R. J. Rothstein (1981). "Yeast transformation: a model system for the study of recombination." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(10): 6354-6358.

Periyasamy, S., N. Govindappa, S. Sreenivas and K. Sastry (2013). "Isolation, characterization and evaluation of the *Pichia pastoris* sorbitol dehydrogenase promoter for expression of heterologous proteins." *Protein Expr Purif* 92(1): 128-133.

Qin, X., J. Qian, G. Yao, Y. Zhuang, S. Zhang and J. Chu (2011). "GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*." *Appl Environ Microbiol* 77(11): 3600-3608.

Rodrigues, F., M. van Hemert, H. Y. Steensma, M. Corte-Real and C. Leao (2001). "Red fluorescent protein (DsRed) as a reporter in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* 183(12): 3791-3794.

Rodriguez, E. (2007). Heavy Labeling of Recombinant Proteins. *Pichia Protocols*. J. Cregg, Humana Press. 389: 151-164.

Schmidt, F. R. (2004). "Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry." *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(4): 363-372.

Somoza, J. R., J. D. Ho, C. Luong, M. Ghate, P. A. Sprengeler, K. Mortara, W. D. Shrader, D. Sperandio, H. Chan, M. E. McGrath and B. A. Katz (2003). "The structure of the extracellular region of human hepsin reveals a serine protease domain and a novel scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain." *Structure* 11(9): 1123-1131.

Spohner, S. C., H. Muller, H. Quitmann and P. Czermak (2015). "Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*." *J Biotechnol* 202: 118-134.

Taubenberger, J. K. and D. M. Morens (2008). "The pathology of influenza virus infections." *Annu Rev Pathol* 3: 499-522.

Tschopp, J. F., G. Sverlow, R. Kosson, W. Craig and L. Grinna (1987). "High-Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylophilic Yeast, *Pichia Pastoris*." *Nat Biotech* 5(12): 1305-1308.

Vogl, T. and A. Glieder (2013). "Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production." *N Biotechnol* 30(4): 385-404.

Waterham, H. R., M. E. Digan, P. J. Koutz, S. V. Lair and J. M. Cregg (1997). "Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter." *Gene* 186(1): 37-44.

Weinacker, D., C. Rabert, A. B. Zepeda, C. A. Figueroa, A. Pessoa and J. G. Farias (2013). "Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry." *Braz J Microbiol* 44(4): 1043-1048.

Yokoyama, S. (2003). "Protein expression systems for structural genomics and proteomics." *Current Opinion in Chemical Biology* 7(1): 39-43.

Zhang, T., J. Lei, H. Yang, K. Xu, R. Wang and Z. Zhang (2011). "An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 28(11): 795-798.

Zhang, W., M. Inan and M. Meagher (2007). Rational Design and Optimization of Fed-Batch and Continuous Fermentations. *Pichia Protocols*. J. Cregg, Humana Press. 389: 43-63.

Zhang, X., X. Zhang, S. Liang, Y. Ye and Y. Lin (2013). "Key regulatory elements of a strong constitutive promoter, P GCW14, from *Pichia pastoris*." *Biotechnol Lett* 35(12): 2113-2119.

**Eidesstattliche Erklärung:**

Hiermit versichere ich, dass ich die Abschlussarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung war.

Unterschrift der Verfasserin / des Verfassers

## 7. Anhang

### Abbildungsverzeichnis für den Anhang:

Abbildung 49 Vektorkarten von pGAPZΔm8A und pPICZA.....	2
Abbildung 50: Vektorkarten von pGAPZm8A-RFP-Flag und pPICZ-A-RFP-Flag.....	2
Abbildung 51: Vektorkarten der Expressionsvektoren mit den GCW14-Promotervarianten und dem SDH-Promoter .....	3
Abbildung 52: Vektorkarten von pBPG1-Δα-B und pBPG1-Δα-B-SDH-RFP-Flag.....	4
Abbildung 53: Vektorkarten von pBPG1-Δα-B-GCW14-RFP-Flag und pGCWmZ-mTmprss2-D343N-opt.....	4
Abbildung 54: Smartladder-DNA-Marker von Eurogentec .....	5
Abbildung 55: Proteinmarker "PageRuler Plus Prestained Protein Ladder" von Thermo Scientific .....	5
Abbildung 56: Alignment der Sequenz von RudolphRFP-Flag im pBPG1-Δα-B-SDH-RFP-Flag-Vektor nach der Sequenzierung .....	13
Abbildung 57: Alignment der Sequenz von RudolphRFP-Flag im pBPG1-Δα-B-SDH-RFP-Flag-Vektor nach der Sequenzierung .....	14
Abbildung 58: Alignment der Sequenz von mTmprss2-D343N-opt im pGCWmZ-mTmprss2-D343N-opt-Vektor nach der Sequenzierung.....	15
Abbildung 59: Absolute Fluoreszenz der Negativkontrollen im ersten Biolector-Versuch .....	17
Abbildung 60: Verlauf der optischen Dichte der P <sub>Aox1</sub> -Proben im ersten Biolector-Versuch.....	17
Abbildung 61: Verlauf der optischen Dichte der P <sub>GAP</sub> -Proben im ersten Biolector-Versuch .....	18
Abbildung 62: Zeitlicher Verlauf der absoluten Fluoreszenz für P <sub>GAP</sub> im ersten Biolector-Versuch .....	18
Abbildung 63: Verlauf der optischen Dichte der P <sub>GCW14</sub> -Proben im ersten Biolector-Versuch.....	19
Abbildung 64: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der P <sub>GCW14</sub> -Proben im ersten Biolector-Versuch ....	19
Abbildung 65: Verlauf der optischen Dichte der P <sub>GCW14M+20</sub> -Proben im ersten Biolector-Versuch.....	20
Abbildung 66: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der P <sub>GCW14M+20</sub> -Proben im ersten Biolector-Versuch .....	20
Abbildung 67: Verlauf der optischen Dichte der P <sub>SDH</sub> -Proben im ersten Biolector-Versuch .....	21
Abbildung 68: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der P <sub>SDH</sub> -Proben im ersten Biolector-Versuch .....	21
Abbildung 69: Wachstum der Negativkontrolle in den verschiedenen Kultivierungsmedien im zweiten Biolector Versuch .....	22
Abbildung 70: Absolute Fluoreszenz der Negativkontrollen im zweiten Biolector-Versuch.....	22
Abbildung 71: Verhältnis zwischen Fluoreszenz (Gain 100) und Zelldichte (Gain 10) der Negativkontrolle im zweiten Biolector-Versuch .....	23
Abbildung 72 : Verlauf der optischen Dichte der P <sub>Aox1</sub> -Proben im zweiten Biolector-Versuch.....	23
Abbildung 73: Zeitlicher Verlauf der absoluten Fluoreszenz für P <sub>Aox1</sub> im zweiten Biolector-Versuch ..	24
Abbildung 74: Zeitlicher Verlauf der absoluten Fluoreszenz für P <sub>Aox1</sub> im zweiten Biolector-Versuch ..	24
Abbildung 75: Verlauf der optischen Dichte der P <sub>GAP</sub> -Proben im zweiten Biolector-Versuch .....	25
Abbildung 76: Verlauf der optischen Dichte der P <sub>GCW14</sub> -Proben im zweiten Biolector-Versuch.....	25
Abbildung 77: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für P <sub>GAP</sub> im zweiten Biolector-Versuch.....	26
Abbildung 78: Verlauf der optischen Dichte der P <sub>GCW14</sub> -Proben im zweiten Biolector-Versuch.....	26
Abbildung 79: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der P <sub>GCW14</sub> -Proben im zweiten Biolector-Versuch..	27
Abbildung 80 : Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für P <sub>GCW14-Wildtyp</sub> im zweiten Biolector-Versuch.....	27
Abbildung 81: Verlauf der optischen Dichte der P <sub>GCW14M+20</sub> -Proben im zweiten Biolector-Versuch.....	28
Abbildung 82: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der P <sub>GCW14M+20</sub> -Proben im zweiten Biolector-Versuch .....	28
Abbildung 83: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für P <sub>GCW14M+20-Mutante</sub> den 2. Biolector-Versuch.....	29
Abbildung 84: Verlauf der optischen Dichte der P <sub>SDH</sub> -Proben im zweiten Biolector-Versuch .....	29
Abbildung 85: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der P <sub>SDH</sub> -Proben im zweiten Biolector-Versuch .....	30
Abbildung 86: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für P <sub>SDH</sub> im zweiten Biolector-Versuch .....	30
Abbildung 87 Übersicht über die Maxima der Promoter-Dreifachbestimmungen und der Negativkontrolle im zweiten Biolector-Versuch .....	31
Abbildung 88 Vergleich der Maxima zwischen Einzelinsertions und <i>Tandem-Repeat</i> -Klonen für alle im zweiten Biolector Versuch .....	31
Abbildung 89: Western Blot zur Überprüfung der Temperaturstabilität von RudolphRFP.....	32

**Tabellenverzeichnis im Anhang**

Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Geräte und Hersteller ..... 10  
 Tabelle 23: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Hersteller ..... 11  
 Tabelle 24: Übersicht über die verwendeten Kits, Hersteller und Katalognummer..... 12  
 Tabelle 25: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer ..... 12

**7.1. Vektoren**

Im Folgenden sind die verwendeten Expressionsvektoren dargestellt.

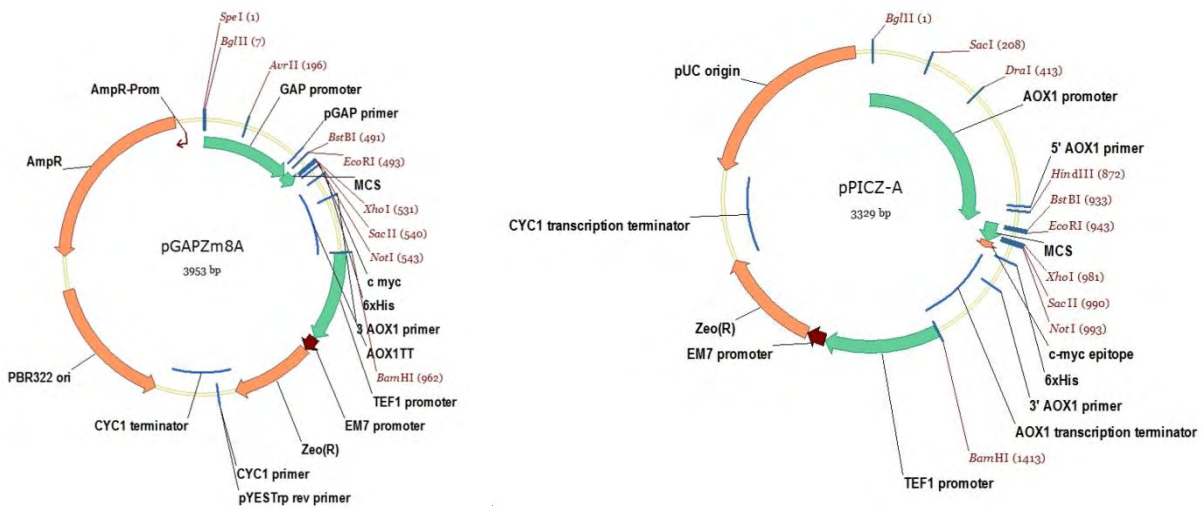


Abbildung 49 Vektorkarten von pGAPZΔm8A und pPICZA.

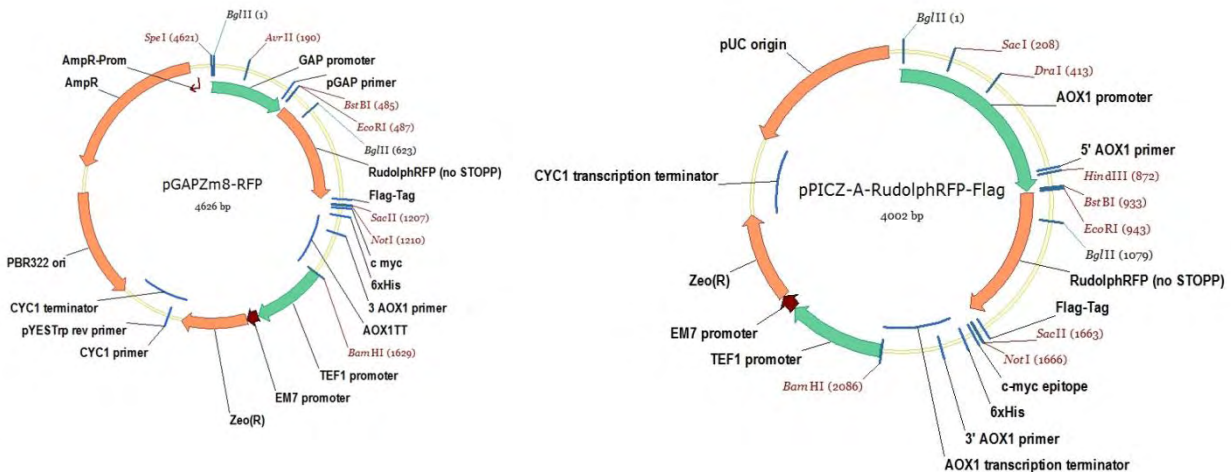
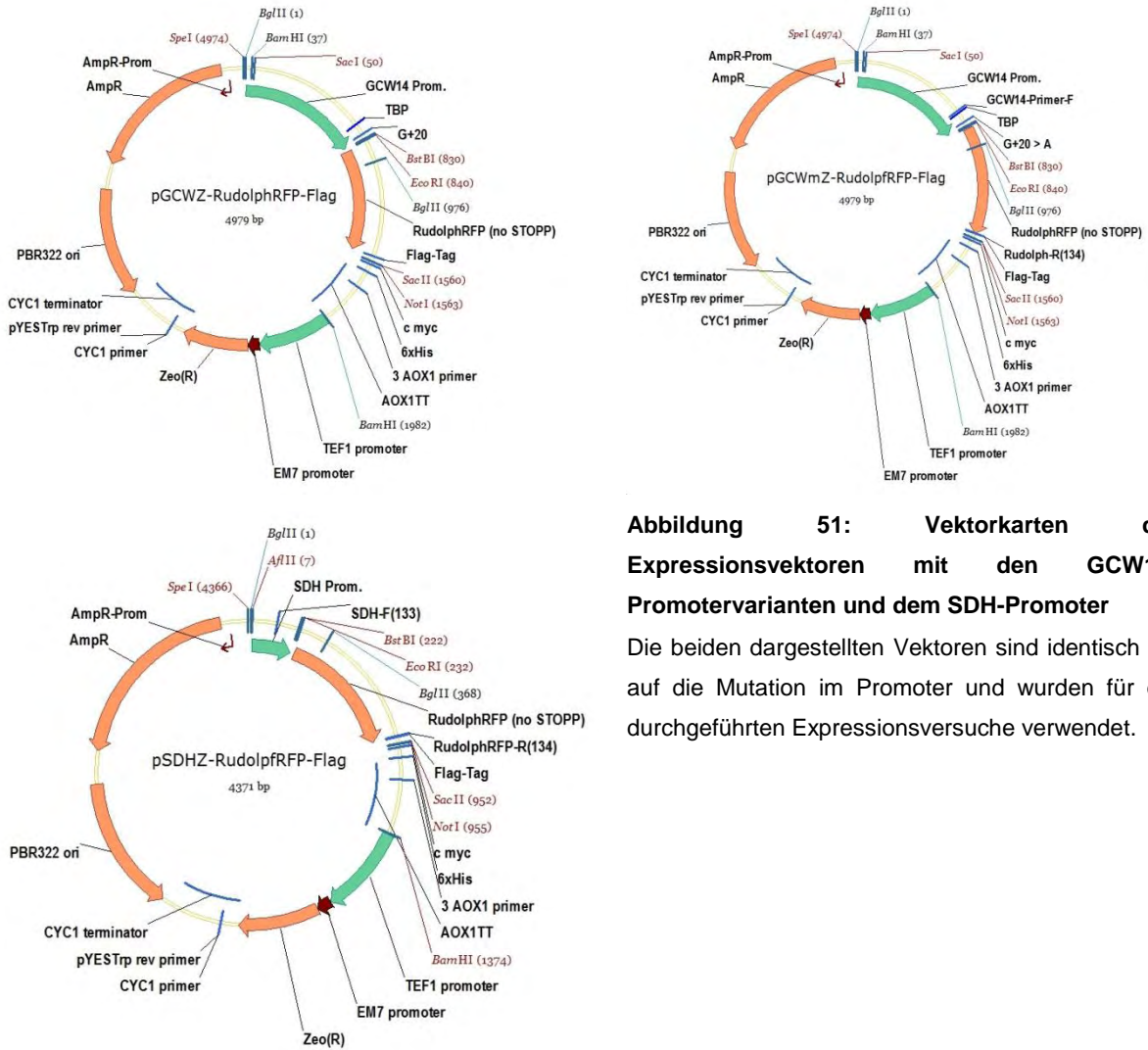


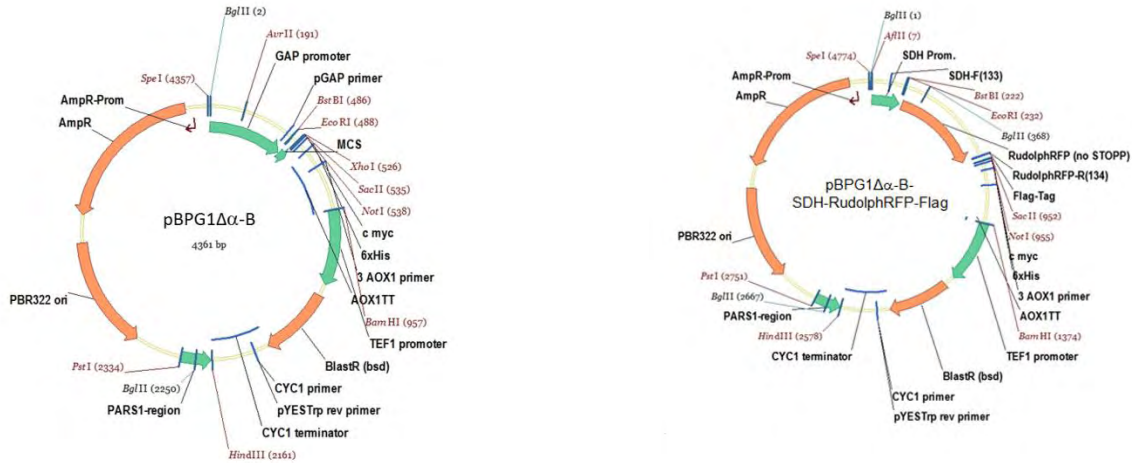
Abbildung 50: Vektorkarten von pGAPZm8A-RFP-Flag und pPICZ-A-RFP-Flag

Die Vektoren verfügen über die jeweiligen Promotoren und wurden in den Versuchen für die Expression RudolphRFP verwendet.



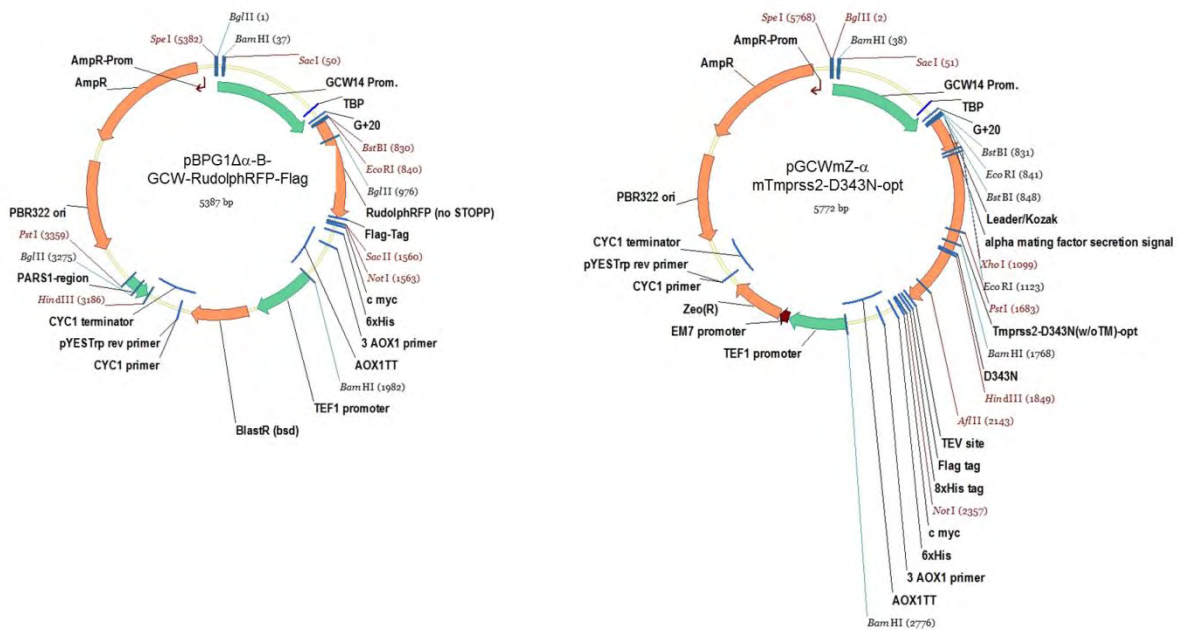


**Abbildung 51: Vektorkarten der Expressionsvektoren mit den GCW14-Promotervarianten und dem SDH-Promoter**  
 Die beiden dargestellten Vektoren sind identisch bis auf die Mutation im Promoter und wurden für die durchgeführten Expressionsversuche verwendet.



**Abbildung 52: Vektorkarten von pBPG1-Δα-B und pBPG1-Δα-B-SDH-RFP-Flag**

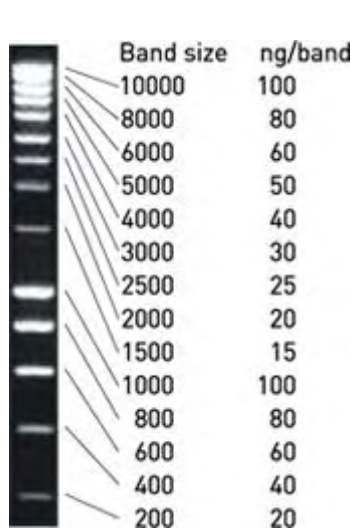
Der pBPG1-Δα-B-Vektor diente als Ausgangsvektor für die Klonierung der episomalen Expressionsvektoren mit SDH- und GCW14-Wildtyppromoter. Der Vektor pBPG1-Δα-B-SDH-RFP-Flag wurde für die transiente Expression von RudolphRFP über den SDH-Promoter eingesetzt.



**Abbildung 53: Vektorkarten von pBPG1-Δα-B-GCW14-RFP-Flag und pGCWmZ-mTmprss2-D343N-opt**

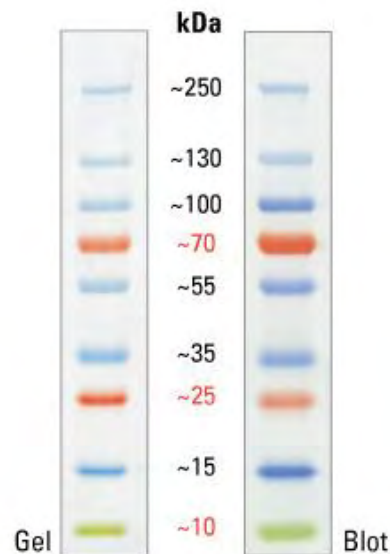
Der Vektor pBPG1-Δα-B-GCW14-RFP-Flag wurde für die transiente Expression von RudolphRFP über den SDH-Promoter eingesetzt. Der Vektor pGCWmZ-mTmprss2-D343N-opt wurde für die Evaluierung des GCW14M+20-Promoters durch die Expression von Tmprss2-D343N-opt verwendet.

## 7.2. Marker für die Agarose-Gelelektrophorese und SDS-PAGE/Western Blot



**Abbildung 54: Smartladder-DNA-Marker von Eurogentec**

Der Marker wurde als Referenz bei der Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Der Marker verfügt über Banden von 200 bp bis 10.000 bp. Quelle: Eurogentec



**Abbildung 55: Proteinmarker "PageRuler Plus Prestained Protein Ladder" von Thermo Scientific**

Der Proteinmarker wurde für die SDS-PAGEs und Western Blots eingesetzt und verfügt über einen Bereich von 10 bis 250 kDa.

## 7.3. Verwendete Lösung und Medien

### Stocklösung

- 1) BMY-Base
  - 40 g *Yeast Extract*
  - 80 g Pepton
  - In 700 H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren
- 2) 10 x D (20% Dextrose)
  - 200 g D-Glucose gelöst in 1000 mL H<sub>2</sub>O (sterilfiltriert)
- 3) 10 x M (5% Methanol)
  - 50 mL Methanol (100%) gemischt mit 950 mL H<sub>2</sub>O (sterilfiltriert)
- 4) 10 x G (10% Glycerin)
  - 100 mL Glycerin gemischt mit 900 mL H<sub>2</sub>O (sterilfiltriert oder autoklaviert)
- 5) 10 x YNB (Yeast Nitrogen Base)
  - 134g Yeast Nitrogen Base (YNB) mit Ammoniumsulfat und ohne Aminosäuren (Hersteller Invitrogen) gelöst in 1000 mL H<sub>2</sub>O (sterilfiltriert)
- 6) 500 x B (0,02 % Biotin)
  - 20 mg Biotin gelöst in 100 mL H<sub>2</sub>O (sterilfiltriert)

- 7) 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0)
- 132 mL 1 M  $K_2HPO_4$  und 868 mL  $KH_2PO_4$  gemischt
  - Einstellen des pH-Wertes auf 6,0 (KOH)
- a) 1 M  $K_2HPO_4$
- 136 g  $K_2HPO_4$  gelöst in 1000 mL  $H_2O$
- b) 1 M  $KH_2PO_4$
- 174 g  $KH_2PO_4$  gelöst in in 1000 mL  $H_2O$
- 8) Tris-Base-Stock
- 121,14 g Tris-Base
  - auf 800 mL mit  $H_2O$  auffüllen
  - pH auf 8,0 oder 9,5 einstellen
  - auf 1000 mL mit  $H_2O$  auffüllen
- 9) NaCl-Stock
- 233,76 g NaCl
  - auf 1000 mL mit  $H_2O$  auffüllen
- 10)  $MgCl_2$ -Stock
- 50,82 g  $MgCl_2 \times 6H_2O$
- 11) SDS-Stock
- 10 g SDS-Pellets
  - in 100 mL  $H_2O$  lösen
- 12) Bromphenolblau/Xylene Cyanol-Stock
- 300 mg Bromphenolblau
  - 300 mg Xylene Cyanol
  - auf 10 mL mit  $H_2O$  auffüllen
- 13) EDTA-Stock
- 186,12 g EDTA-Natriumsalz-DIhydrat
  - auf 800 mL mit  $H_2O$  auffüllen
  - pH auf 8,0 einstellen
  - auf 1000 mL mit  $H_2O$  auffüllen (sterilfiltrieren)
- 14) 10x TBS-Stock
- 200 mL Tris-Base-Stock (pH 8)
  - 375 mL NaCl-Stock
  - auf 1000 mL mit  $H_2O$  auffüllen

## Medien

- 1) LB-Medium/-Agar
  - 10 g Trypton
  - 5 g *Yeast Extract*
  - 5 g NaCl
  - für Agar: 20 g Agar
  - gelöst in 1000 mL H<sub>2</sub>O und autoklavieren
  
- 2) YPD-Medium/Agar
  - 20 g Pepton
  - 10 g *Yeast Extract*
  - für Agar: 20 g Agar
  - gelöst in 900 mL H<sub>2</sub>O und autoklavieren
  - nach dem Autoklavieren 100 mL 10x D zugeben
  
- 3) BMDY/BMMY/BMGY-Medium
  - 700 mL BMY-Base
  - 100 mL 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0)
  - 100 mL 10x YNB
  - 100 mL 10xD/10xM/10xG (je nach Medium)
  - 2 mL 500xB
  
- 4) BMD/BMM/BMG-Medium
  - 700 mL steriles H<sub>2</sub>O
  - 100 mL 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0)
  - 100 mL 10x YNB
  - 100 mL 10xD/10xM/10xG (je nach Medium)
  - 2 mL 500xB

## Puffer und weitere Lösungen

- 1) Transferpuffer
  - 3 g Tris-Base
  - 14,40 g Glycin
  - 150 mL Methanol(100 %)
  - auf 1000 mL mit sterilem H<sub>2</sub>O
  
- 2) 10x SDS-Laufpuffer
  - 60 g Tris-Base
  - 288 g Glycin
  - 20 g SDS-Pellets
  - auf 1500 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen
  - pH auf 8,3 einstellen
  - auf 2000 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen
  
- 3) Upper-Buffer (SDS-Page)
  - 30,5 g Tris-Base
  - 20 mL SDS-Stock
  - auf 400 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen
  - pH auf 6,8 einstellen
  - auf 500 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen

- 4) Lower-Buffer (SDS-Page)
  - 91 g Tris-Base
  - auf 400 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen
  - pH auf 8,8 einstellen
  - auf 500 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen
  
- 5) AP-Puffer
  - 100 mL Tris-Base-Stock (pH 9,5)
  - 25 mL NaCl-Stock
  - 10 mL MgCl<sub>2</sub>-Stock
  - auf 800 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen
  - pH auf 9,5 einstellen
  - auf 1000 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen
  
- 6) 8x Probenpuffer (SDS-Page)
  - 16 mL SDS-Stock
  - 5 mL Glycerin
  - 2,2 mL Tris/HCl (pH 6,8)
  - 800 µL Mercaptoethanol
  - 1 mL Bromphenolblau-Stock
  - pH auf 8,3 einstellen
  - auf 2000 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen
  
- 7) 6x Ladepuffer (Agarose-Gelelektrophorese)
  - 7,44 g 100 % Glycerin p.A.
  - 1,2 mL EDTA-Stock
  - 200 µL Bromphenolblau/ Xylene Cyanol -Stock
  
- 8) 50x TAE-Puffer
  - 242 g Tris-Base
  - 57,10 mL 100 % Eisessig p.A
  - 100 mL EDTA-Stock
  - in 1000 mL H<sub>2</sub>O lösen
  
- 9) 10x PBS
  - 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 18,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O
  - 2 g KCl
  - 80 g NaCl
  - auf 800 mL H<sub>2</sub>O auffüllen
  - pH auf 7,4 einstellen
  - auf 1000 mL H<sub>2</sub>O auffüllen
  
- 10) TBS-T-Puffer
  - 100 mL TBS-Stock
  - auf 1000 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen
  - 500 µL Tween-20 zugeben
  
- 11) 1 M Sorbitol-Lösung
  - 18,2 g D-Sorbitol
  - lösen in 100 mL H<sub>2</sub>O (sterilfiltrieren oder autoklavieren)

12) *P. Pastoris* Lyse-Puffer

- 2,04 g Lithiumacetat x 2H<sub>2</sub>O
- in 50 mL H<sub>2</sub>O lösen
- 10 mL SDS-Stock
- auf 100 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen

## 13) Breaking Buffer

- 6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 372 mg EDTA
- 50 mL 100 % Glycerin p.A.
- auf 900 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen
- pH auf 7,4 einstellen
- auf 1000 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen

## 14) BEDS-Puffer

- 0,16317 g Bicine-NaOH
- 3 mL Ethylenglykol
- 5 DMSO
- 18,2 g Sorbitol
- auf 90 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen
- pH auf 8,3 einstellen
- auf 100 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen

## 15) 1 M DDT

- 3,5449 g DDT
- lösen in 10 mL H<sub>2</sub>O
- aliquotieren zu je 1 mL

## 7.4. Geräteliste

**Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Geräte und Hersteller**

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
Zentrifuge mit Schwengrotor	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA	Heraeus Multifuge 3S-R
Brutschrank	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA	Heraeus B20 Function Line
Tischzentrifuge	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA	Heraeus Fresco 17 Centrifuge
Heizblock	Eppendorf Hamburg, Germany	Thermomixer compact
Vortexer	Heidolph Instruments Schwabach, Germany	REAX top
Western Blot-System	Bio-Rad Laboratories Kalifornien, USA	Trans-Blot-Turbo Transfer-System
Spannungsumwandler (SDS-Page)	Bio-Rad Laboratories Kalifornien, USA	PowerPac HC
Spannungsumwandler (Agarose-Gelelektrophorese)	Bio-Rad Laboratories Kalifornien, USA	PowerPac Basic
Schüttelinkubator (für Deepwell-Platten)	Heidolph Instruments Schwabach, Deutschland	Titramax 1000
Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland	TProfessional Basic
Spektralphotometer (Messung der DNA)	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA	Nanodrop 2000
Spektralphotometer (Messung der Zelldichte)	WPA biowave Cambridge, UK	C0800 Cell Density Meter
SDS-Page-System	Bio-Rad Laboratories Kalifornien, USA	Mini-PROTEAN Tetra cell
Agarose-Gelelektrophorese System	Bio-Rad Laboratories Kalifornien, USA	Sub-Cell GT cell
Schwenker	Biometra Göttingen, Deutschland	WT12
Sterilwerkbank	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA	HERAsafe
Elektroporations-Gerät	Bio-Rad Laboratories Kalifornien, USA	Gene-Pulser
Gel-Dokumentationssystem	Kodak, New York, USA	Gel logic 212 Imaging System
UV-Transilluminator	Intas, Göttingen, Deutschland	Science Imaging
Waage 1	Kern & Sohn Balingen, Deutschland	4200-2NM
Waage 2	Sartorius, Göttingen, Deutschland	BP 3100 S
Magnetrührer	IKA Staufen, Deutschland	RCT basic
Zentrifuge	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA	Sorvall RC 6+ Centrifuge
Schüttelinkubator	Infors HT Einsbach, Deutschland	Multitron
Mikro-Bioreaktor-System	m2p-labs Baesweiler, Deutschland	BioLector-Basic
Durchflusszytometer	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland	Guava easyCyte mini



## 7.5. Chemikalienliste und Kits

**Tabelle 23** Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Hersteller

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog-Nummer</b>
Methanol	J.T. Baker, Pennsylvania, USA	67-56-1
Ethanol	J. T. Baker, Pennsylvania, USA	64-17-5
Isopropanol	J.T. Baker, Pennsylvania, USA	67-63-6
Glycerin	Merck, Millipore, Darmstadt, Deutschland	56-61-5
Yeast-Nitrogen-Base w/o aminoacids -w/ ammoniumsulphate	Thermo Fischer Scientific, Invitrogen Massachusetts, USA	Q300-09
LE Agarose For electrophoresis	Biozym Scientific Oldendorf, Deutschland	840004
D(+)-Glucose monohydrat	AppliChem Darmstadt, Deutschland	A3617, 1000
Nonfat dried milk powder	AppliChem Darmstadt, Deutschland	A0830, 1000
D-Sorbitol	Sigmar-Aldrich St. Louis, USA	51876-1Kg
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	3904.1
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	P479.2
Bacto Peptone	Becton, Dickinson and Company Maryland, USA	211677, 500g
Bacto Tryptone	Becton, Dickinson and Company Maryland, USA	211705, 500g
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company Maryland, USA	214020, 454g
Bacto Yeast-Extract	Becton, Dickinson and Company Maryland, USA	212750, 500g
SDS-Pellets	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland	CN30.3
InstantBlue	Expedeon, Cambridge, UK	
Rotisafe-Gelstain	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland	38651
D-Biotin	Sigmar-Aldrich St. Louis, USA	B-4501
Tween 20	Sigmar-Aldrich St. Louis, USA	P1379-500mL
NBT	Promega, Wisconsin, USA	S380C
BCIP	Promega, Wisconsin, USA	S381C
Tris-Base (Trizma-Base)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	33742-1KG

**Tabelle 24: Übersicht über die verwendeten Kits, Hersteller und Katalognummer**

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nummer
Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	PLN350-1KT
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	740609.250
Phusion® High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs, Massachusetts	E0553L

## 7.6. Verwendete Primer

**Tabelle 25: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer**

Name	Sequenz	Länge	Verwendung
s_pPICZ-F	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21	PCR-Überprüfung
s_pPICZ-R	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21	PCR-Überprüfung
s_pGAPZ-F	GTCCCTATTTCAATCAATTGAA	22	PCR-Überprüfung
s_pTEF_f	GCAATCTAATCTAAGGGCGGTG	22	PCR-Überprüfung
s_tCYC1_r	GGCGTGAATGTAAGCGTGAC	20	PCR-Überprüfung
s_AmpR-F	CTCATGAGCGGATACATATTTGAATG	26	PCR-Überprüfung
s_pUC-F	GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC	24	PCR-Überprüfung
s_GCW14-P-F	GCCTGGTGCCGTACGGTATAAATAC	25	PCR-Überprüfung Squenzierung
s_SDH-P-F	CGTAATCCGTTGTAGTTCCACCAAAG	26	PCR-Überprüfung Squenzierung
Rudolph-R	GTATACCGCGCCTTATCATCATCCTTGTAAT CAG	38	PCR-Überprüfung Squenzierung
Bsal-aMF-TM-P-F	GATATGGTCTCGAATTCTTCGAAACGATGAGATTT CCTCC	40	Klonierung

### 7.7. Sequenzen

1) Sequenz von RudolphRFP –Flag in pBPG1-Δα-B-SDH-RFP-Flag-Vektors

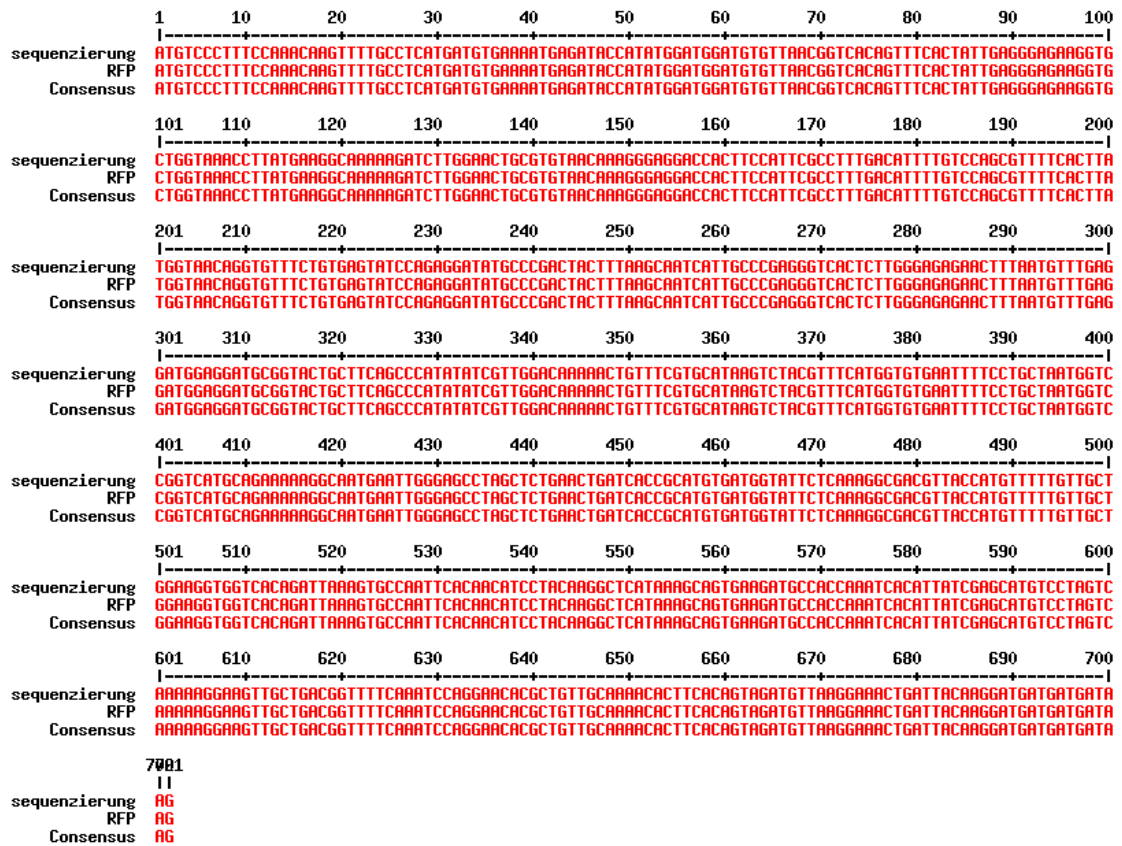


Abbildung 56: Alignment der Sequenz von RudolphRFP-Flag im pBPG1-Δα-B-SDH-RFP-Flag-Vektor nach der Sequenzierung  
 Die Sequenz weist keine Mutationen auf. Der Vektor wird für die episodale Expression verwendet.



3) Sequenz von mTmprss2-D343N-opt in pGCWmZ-mTmprss2-D343N-opt

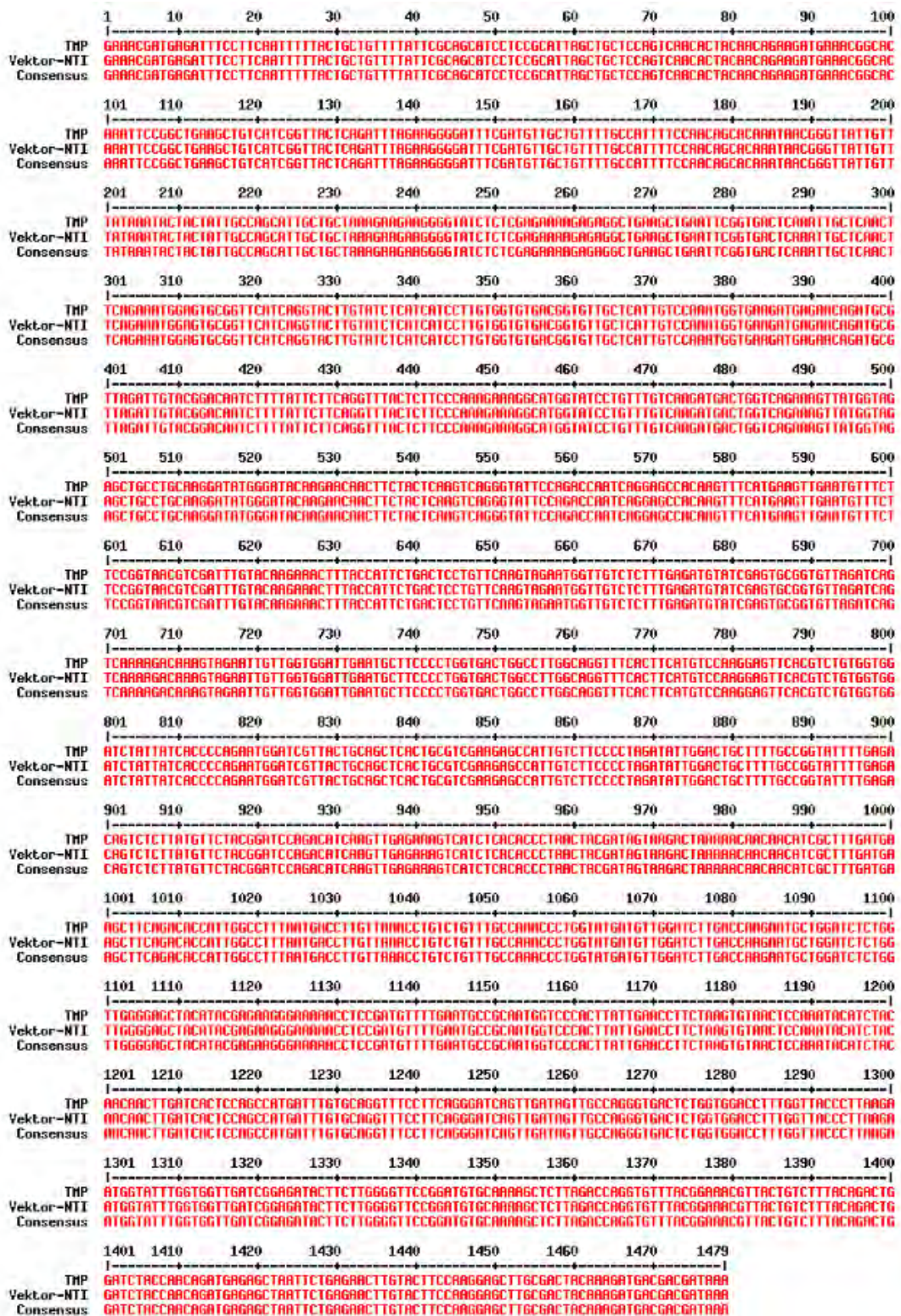


Abbildung 58: Alignment der Sequenz von mTmprss2-D343N-opt im pGCWmZ-mTmprss2-D343N-opt-Vektor nach der Sequenzierung  
Die Sequenz weist keine Mutationen auf..



## 4) DNA-Sequenz von RudolphRFP-Flag

```
ATGTCTCTATCAAAGCAAGTTCTCCCACATGACGTGCGGATGC
GCTATCATATGGATGGGTGTGTCAACGGACACAGCTTTACCAT
TGAAGGAGAAGGCGCTGGAAAACCTTACGAAGGAAAAAAGACT
TTGAAATTGAGGGTCACCAAGGAGGACCACTTCCGTTCCGCCT
TTGATATATTGTCCGCAACGTTTACGTATGGAAACAGATGCTT
TTGCGAGTATCCAGAAGACATGCCCGATTATTTCAAACAGTCA
TTGCCTGAAGGATACTCATGGGAAAGGACTATGATGTACGAGG
ACGGAGGGTGTGGCACATCCAGTGCGCACATAAGACTCGAGAA
AAACTGCTTTGTGCACCAATCCACATTTCTCGGCGTCAACTTT
CCTGCTAACGGACCTGTGATGCAAAAAAAGGCCCTGAACTGGG
AGCCTTCCAGCGAGCTAATAACTCCCTGTGATGGAATACTGAA
GGGCGATGTGACCATGTTTCTCATGCTGGAAGGAGGTCACCGA
CAGAAATGTCAATTCACA ACTTCTTACAAGGCAAGCAAGGCTG
TCAAAATGCCACCGAACCATATCATAGAACACGTTGTTTGGAA
AGGCGAAGATAGCGACGGTTTTCAAATCAAAGAACACGCTGTT
GCAAAACACTTTCACAGTAGATGTCAAGGAAACGTAA
```

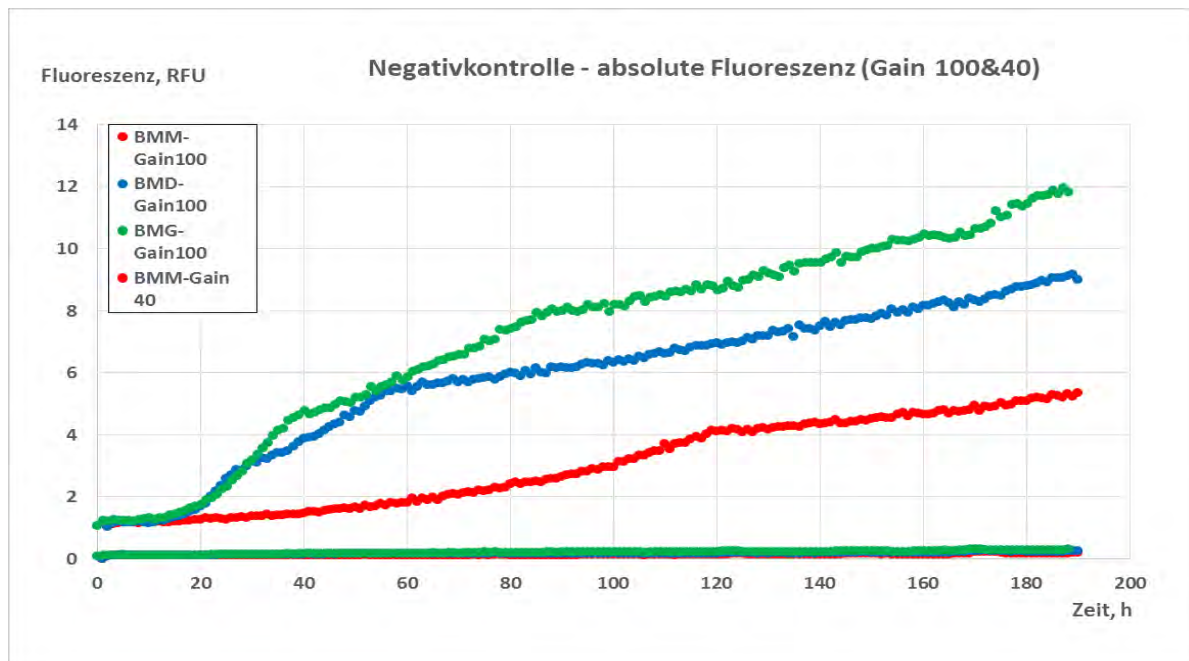
## 5) DNA-Sequenz der Alkoholoxidase1 (NCBI)

```
ATGGCTATCCCCGAAGAGTTTGATATCCTAGTTC TAGGTGGTGGATCCAGTGGATCCTGTATTGCCGG
AAGATTGGCAAACCTTGGACCACTCCTTGAAAGTTGGTCTTATCGAAGCAGGTGAGAACAACCTCAACA
ACCCATGGGTCTACCTTCCAGGTATTTACCCAAGAAACATGAAGTTGGACTCCAAGACTGCTTCCTTC
TACACTTCTAACCCATCTCCTCACTTGAATGGTAGAAGAGCCATTGTTCCATGTGCTAACGTCTTGGG
TGGTGGTTCTTCTATCAACTTCATGATGTACACCAGAGGTTCTGCTTCTGATTACGATGACTTCCAAG
CCGAGGGCTGGAAAACCAAGGACTTGCTTCCATTGATGAAAAAGACTGAGACCTACCAAAGAGCTTGC
AACAACCCTGACATTCACGGTTTTCGAAGGTCCAATCAAGGTTTCTTTTCGGTAACTACACCTACCCAGT
TTGCCAGGACTTCTTGAGGGCTTCTGAGTCCCAAGGTATTCCATACGTTGACGACTTGGAAAGACTTGG
TTACTGCTCACGGTGCTGAACACTGGTTGAAGTGGATCAACAGAGACACTGGTCGTCGTTCCGACTCT
GCTCATGCATTTGTCCACTCTACTATGAGAAACCACGACA ACTTGTACTTGATCTGTAACACGAAGGT
CGACAAAATTATTGTGCAAGACGGAAGAGCTGCTGCTGTTAGA ACCGTTCCAAGCAAGCCTTTGAACC
CAAAGAAGCCAAGTCACAAGATCTACCGTGCTAGAAAAGCAAATCGTTTTGTCTTGTGGTACCATCTCC
TCTCCATTGGTTTTTGCAAAGATCCGGTTTTTGGTGACCCAATCAAGTTGAGAGCCGCTGGTGTAAAGCC
TTTTGGTCAACTTGCCAGGTGTCCGGAAGAACTTCCAAGACCACTACTGTTTCTTCAGTCTTACAGAA
TCAAGCCTCAGTACGAGTCTTTTCGATGACTTCGTCGGTGGTATGCTGAGATTCAAAGAGAGTCTTT
GACCAATGGTACGCCAATGGTACTGGTCTCTTGCCACTAACGGTATCGAAGCTGGTGTCAAGATCAG
ACCAACACCAGAAGAACTCTCTCAAATGGACGAATCCTTCCAGGAGGGTTACAGAGAATACTTCAAG
ACAAGCCAGACAAGCCAGTTATGCACTACTCCATCATTGCTGGTTTTCTTCCGGTGACCACACCAAGATT
CCTCCTGGAAAGTACATGACTATGTTCCACTTCTTGGAAATACCCATTCTCCAGAGGTTCCATTACAT
TACCTCCCCAGACCCATACGCAGCTCCAGACTTCGACCCAGGTTTCATGAACGATGAAAGAGACATGG
CTCCTATGGTTTTGGGCTTACAAGAAGTCTAGAGAAACCGCTAGAAGAATGGACCACTTTGCCGGTGAG
GTCACTTCTCACCACTCTGTTCCTACTCATCCGAGGCCAGAGCCTTGAAATGGATTTGGAGAC
CTCTAATGCCTACGGTGGACCTTTGAACTTGTCTGCTGGTCTTGCTCACGGTCTTGGACTCAACCTT
TGAAGAAGCCA ACTGCAAAGAACGAAGGCCACGTTACTTTCGAACCAGGTCGAGCTTCATCCAGACATC
GAGTACGATGAGGAGGATGACAAGGCCATTGAGA ACTACATTCGTGAGCACACTGAGACCACATGGCA
CTGTCTGGGAACCTGTTCCATCGGTCCAAGAGAAGGTTCCAAGATCGTCAAATGGGGTGGTGTTTTGG
ACCACAGATCCAACGTTTACGGAGTCAAGGGCTTGAAGGTTGGTACTTGTCCGTGTGCCAGACAAT
GTTGGTTGTAACACCTACACCACCGCTCTTTTGATCGGTGAAAAGACTGCCACTTTGGTTGGAGAAGA
TTTAGGATACTCTGGT GAGGCCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGA
CCGGTCTTGCTAGATTCTAA
```

## 7.8. Zusätzliche Daten und Diagramme des ersten und zweiten Biolector-Versuches

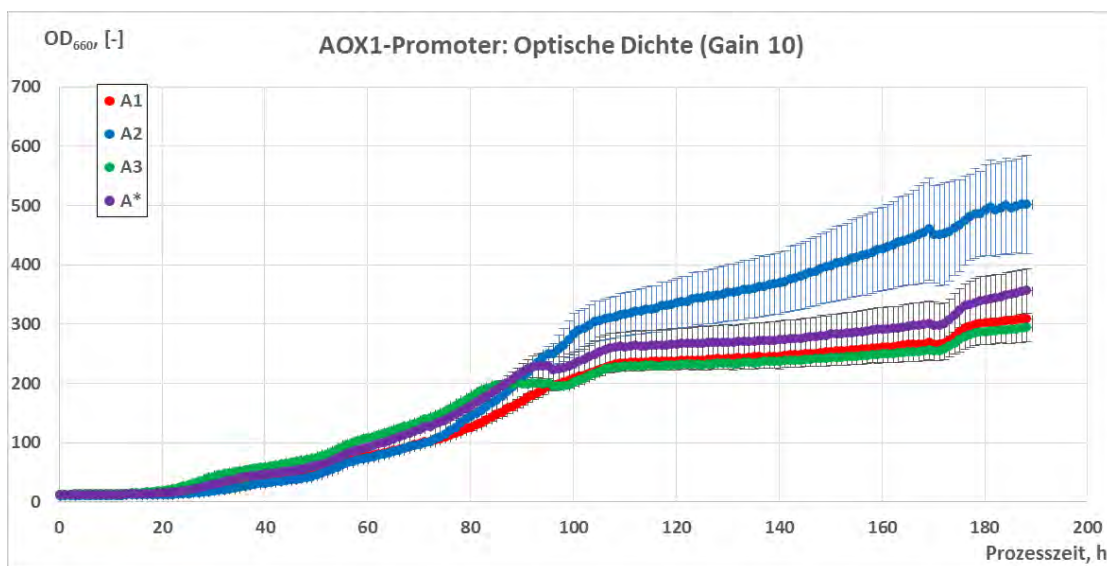
Es wurden zwei Biolector-Versuche durchgeführt. Hier sind die zusätzlichen Diagramme der Fluoreszenz und Biomasse in den für Auswertung benutzten *Gains* zu finden. Die Rohdaten sind auf dem ebenfalls eingereichten Datenträger digital hinterlegt.

### 1) Erster Versuch



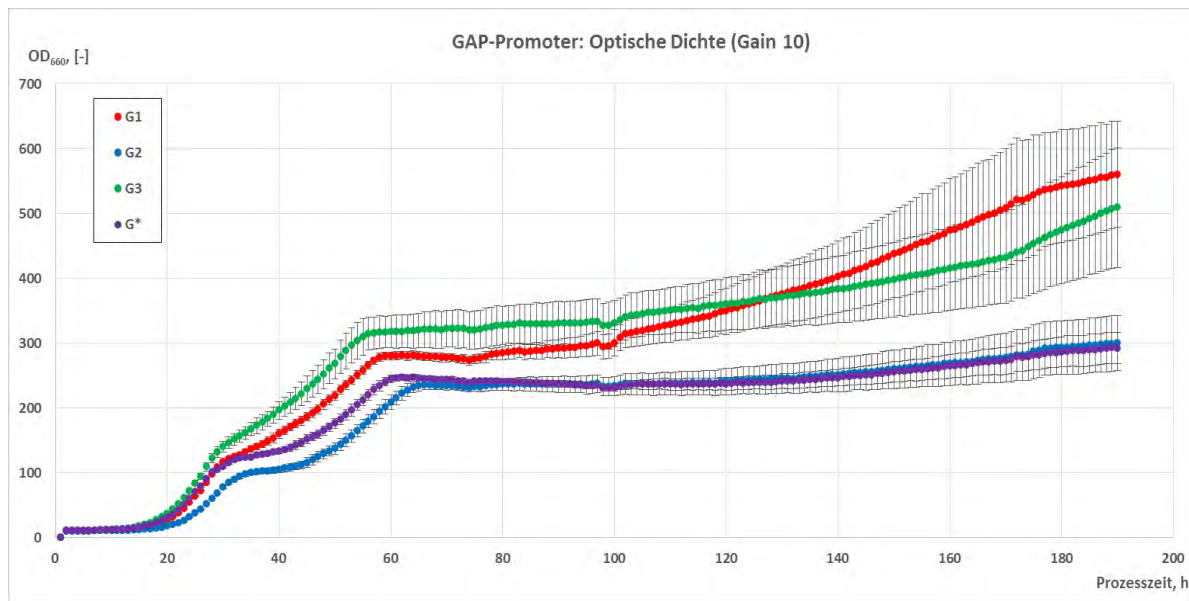
**Abbildung 59: Absolute Fluoreszenz der Negativkontrollen im ersten Biolector-Versuch**

Dargestellt ist die absolute Fluoreszenz (Gain 100 und 40) für die Negativkontrollen in den unterschiedlichen Kultivierungsmedien. Das Gain 40 wurde für die Auswertung verwendet. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz abgebildet.



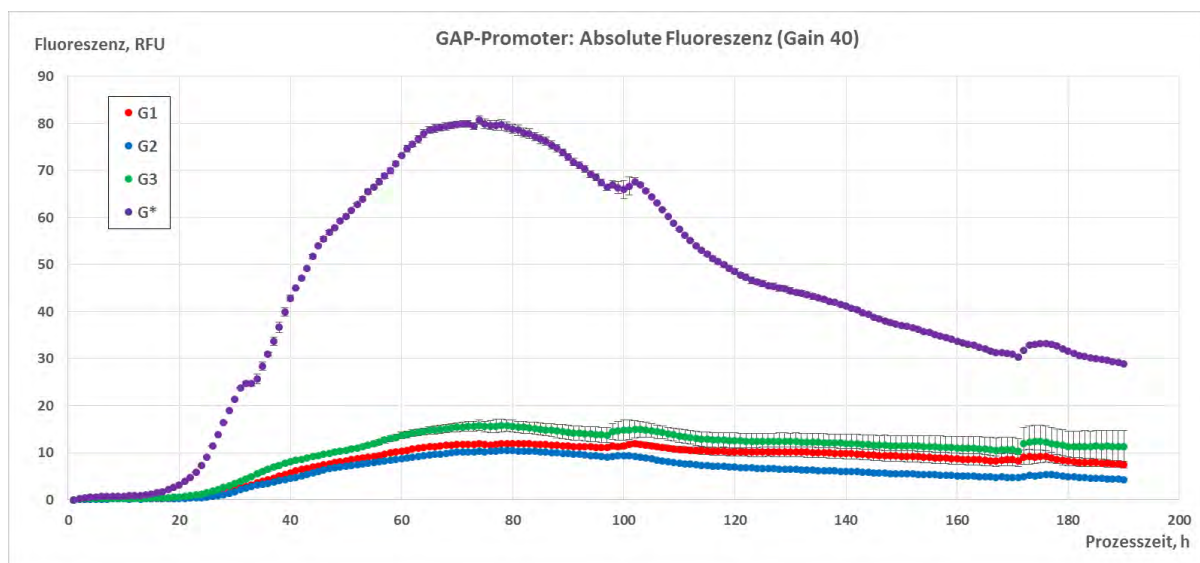
**Abbildung 60: Verlauf der optischen Dichte der  $P_{AOx1}$ -Proben im ersten Biolector-Versuch**

Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte (Gain 10) als Maß für das Wachstum der Biomasse in BMM-Medium. Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die  $OD_{660}$  zu sehen.



**Abbildung 61: Verlauf der optischen Dichte der  $P_{GAP}$ -Proben im ersten Bioelector-Versuch**

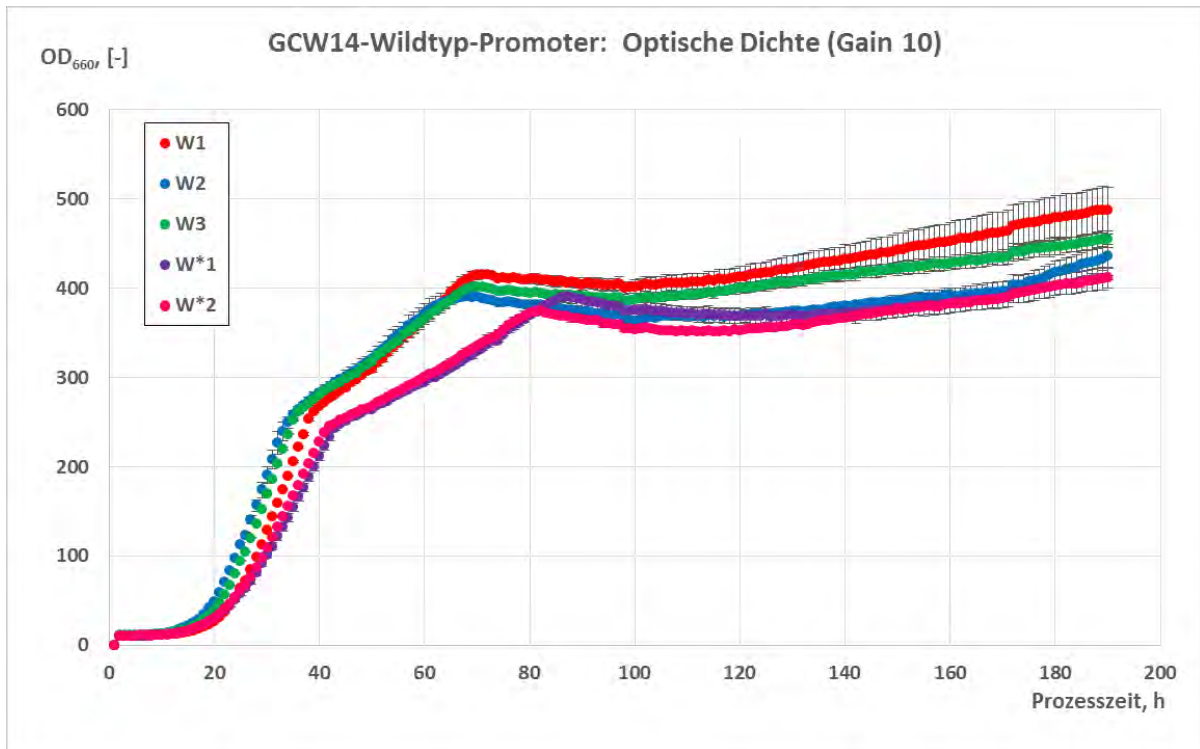
Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte (Gain 10) als Maß für das Wachstum der Biomasse in BMD-Medium. Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die  $OD_{660}$  zu sehen.



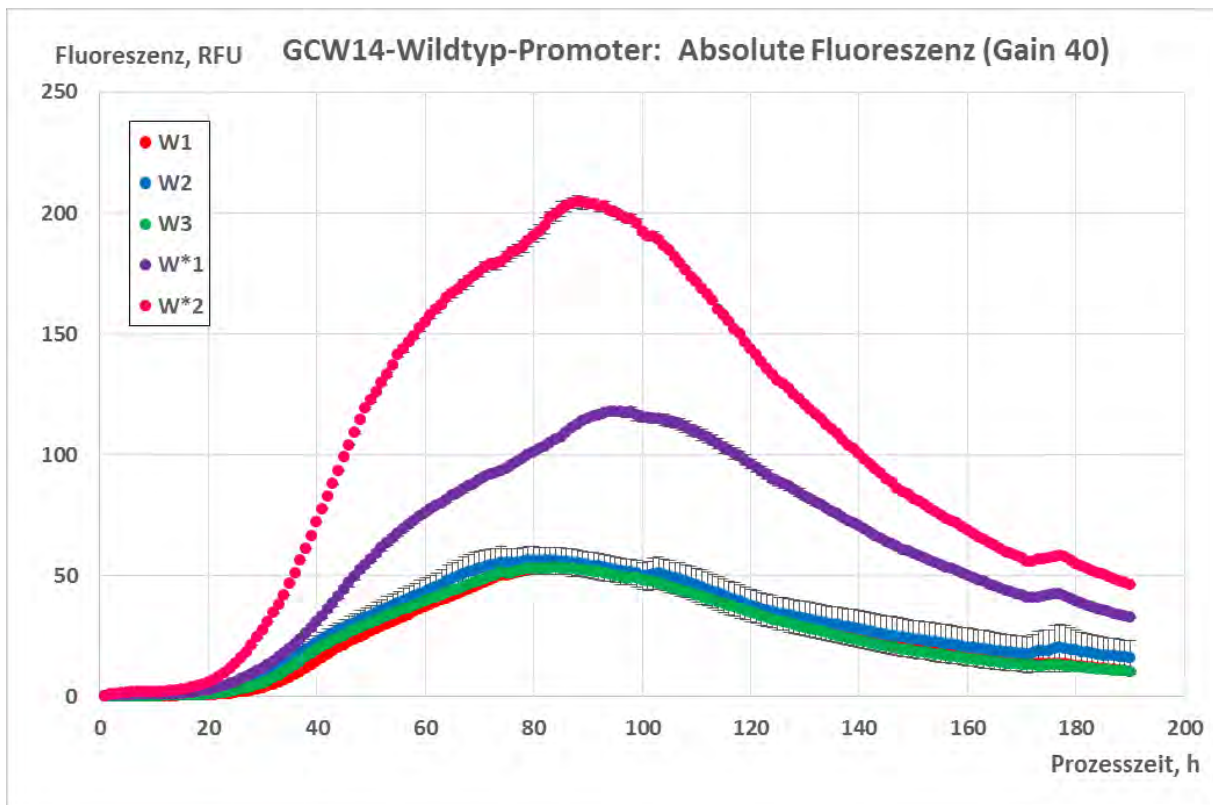
**Abbildung 62: Zeitlicher Verlauf der absoluten Fluoreszenz für  $P_{GAP}$  im ersten Bioelector-Versuch**

Dargestellt sind die Mittelwerte und Fehlerbalken der Einzelinsertionsklone (G1-G3) und des *Tandem-Repeat*-Klons ( $G^*$ ). Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz abgebildet. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet.

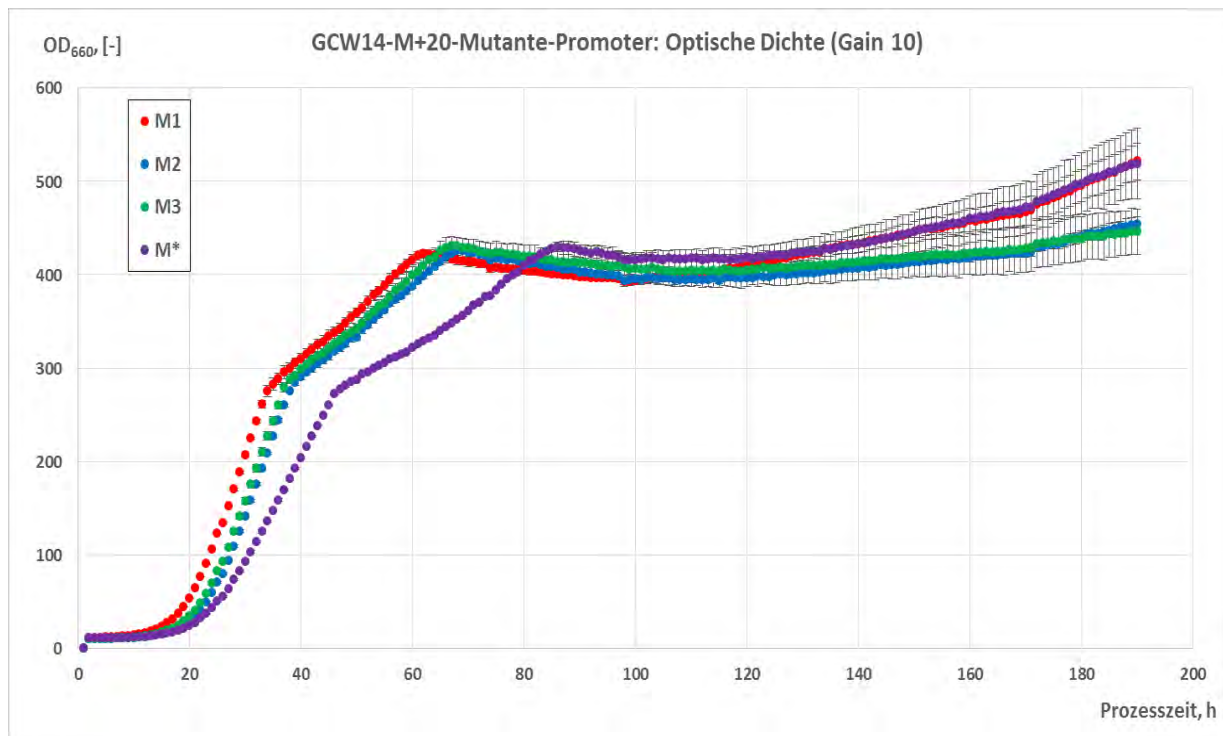




**Abbildung 63: Verlauf der optischen Dichte der  $P_{GCW14}$ -Proben im ersten Biolector-Versuch**  
 Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte (Gain 10) als Maß für das Wachstum der Biomasse in BMG-Medium. Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die  $OD_{660}$  zu sehen.

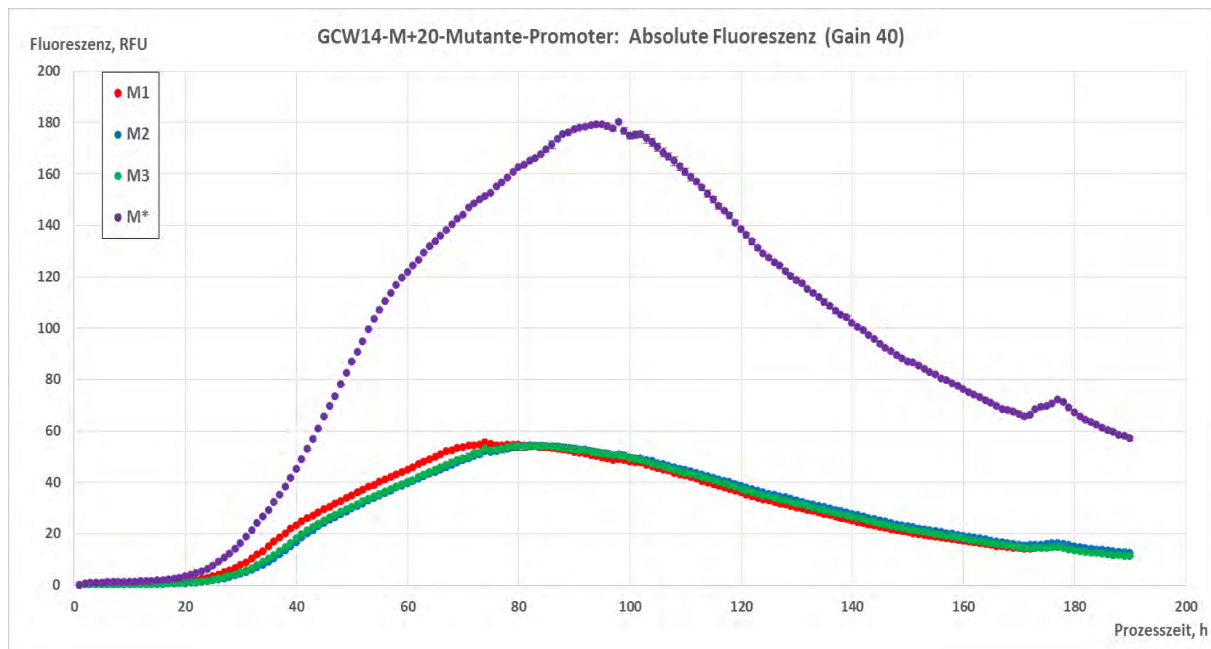


**Abbildung 64: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der  $P_{GCW14}$ -Proben im ersten Biolector-Versuch**  
 Dargestellt ist der Verlauf der absoluten Fluoreszenz (Gain 10) Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz zu sehen.



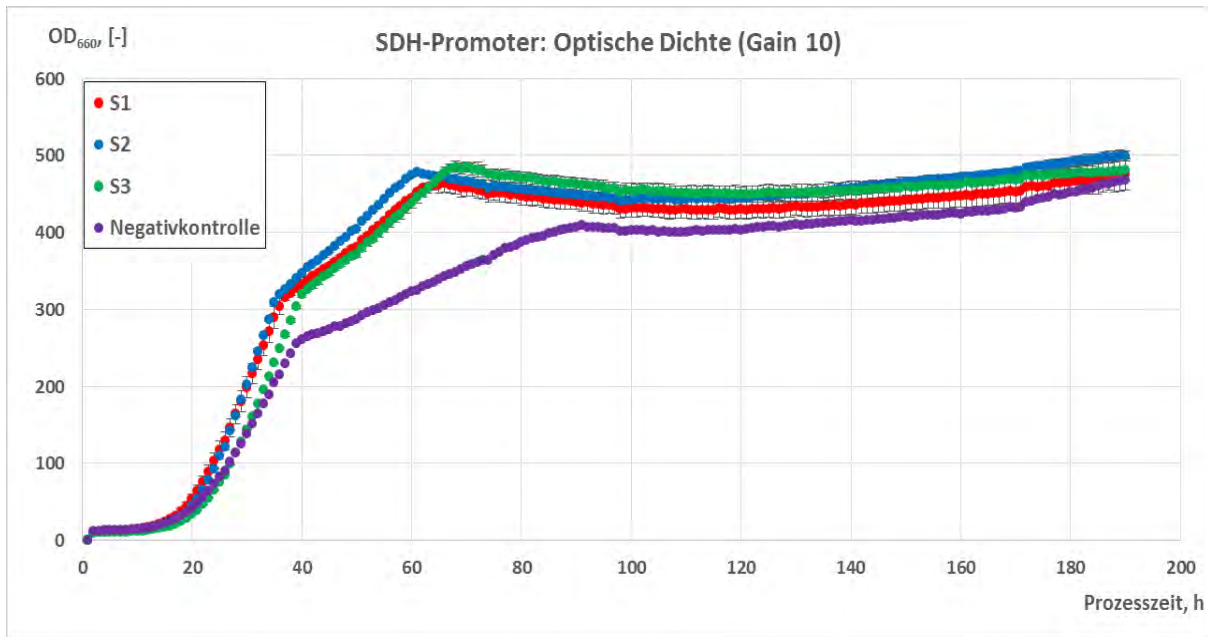
**Abbildung 65: Verlauf der optischen Dichte der  $P_{GCW14M+20}$ -Proben im ersten Biolector-Versuch**

Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte (Gain 10) als Maß für das Wachstum der Biomasse in BMG-Medium. Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die OD<sub>660</sub> zu sehen.



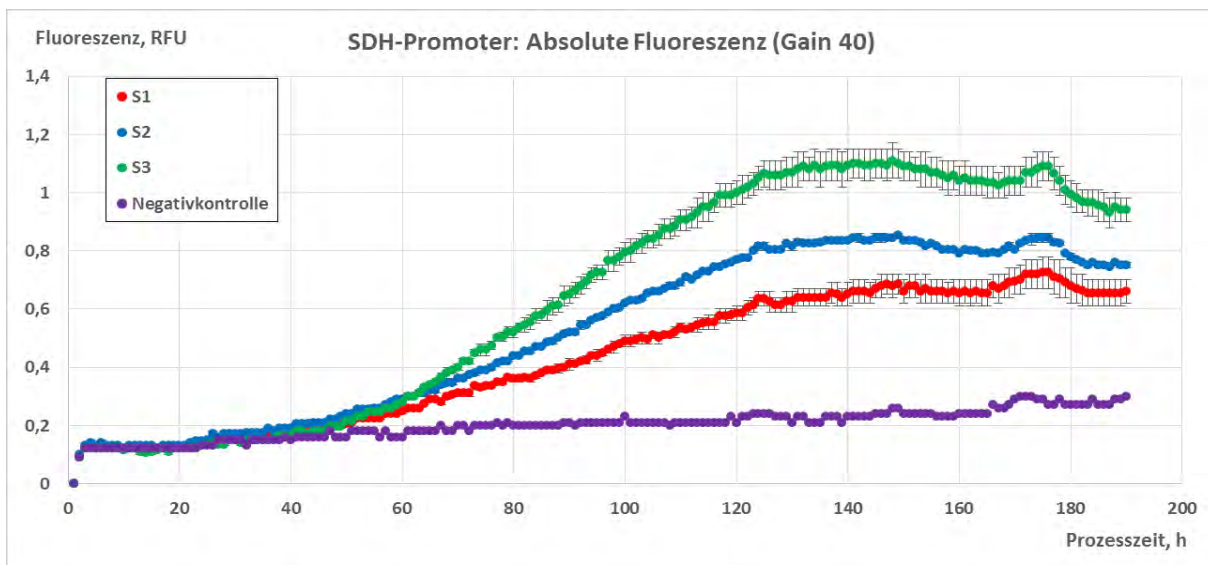
**Abbildung 66: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der  $P_{GCW14M+20}$ -Proben im ersten Biolector-Versuch**

Dargestellt ist der Verlauf der absoluten Fluoreszenz (Gain 10) Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz zu sehen.



**Abbildung 67: Verlauf der optischen Dichte der P<sub>SDH</sub>-Proben im ersten Biolector-Versuch**

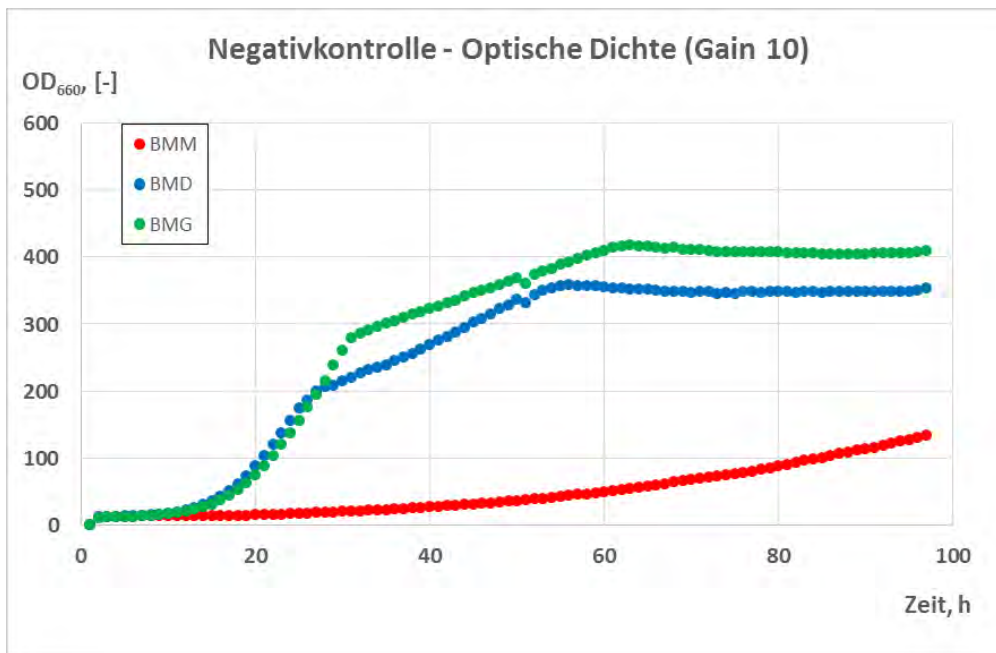
Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte (Gain 10) als Maß für das Wachstum der Biomasse in BMG-Medium. Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die OD<sub>660</sub> zu sehen.



**Abbildung 68: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der P<sub>SDH</sub>-Proben im ersten Biolector-Versuch**

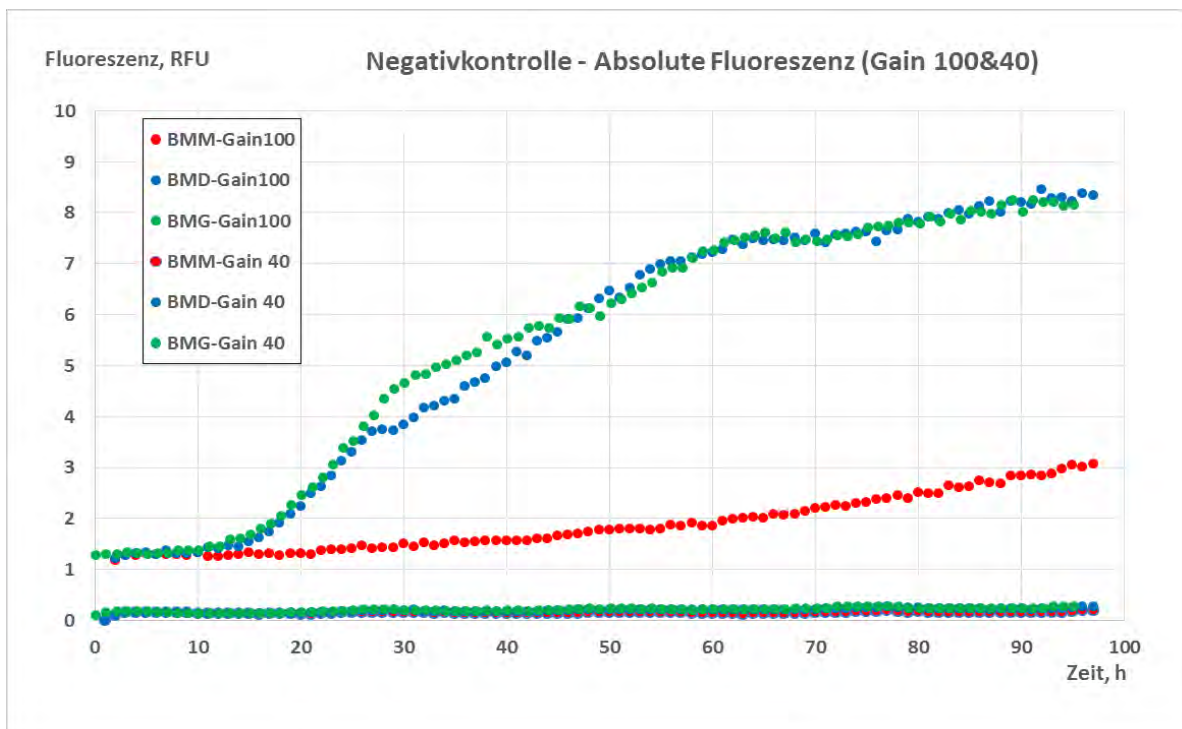
Dargestellt ist der Verlauf der absoluten Fluoreszenz (Gain 10) Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz zu sehen.

2) Zweiter Versuch



**Abbildung 69: Wachstum der Negativkontrolle in den verschiedenen Kultivierungsmedien im zweiten Biolector Versuch**

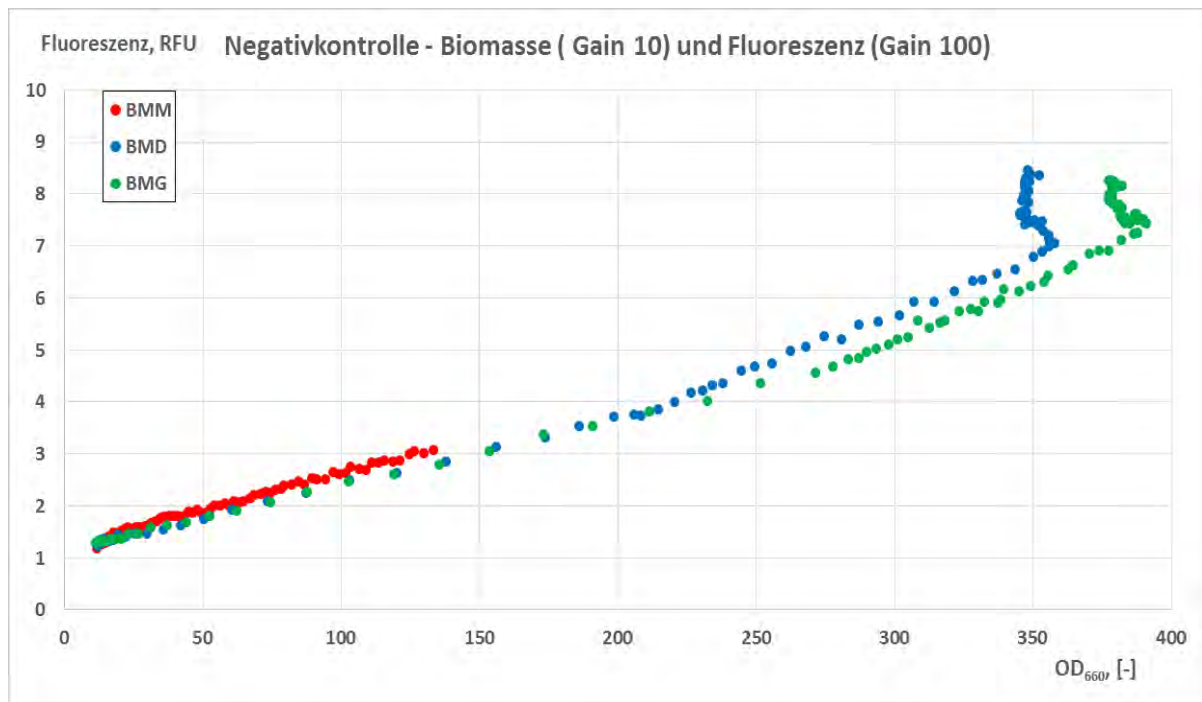
Die Negativkontrolle wurde jedes Medium kultiviert. Das Wachstum deckt sich mit dem Wachstum der Promotor-Klone. Je nach verwendetem Medium variiert das Wachstum. Auf der Ordinate ist die OD<sub>660</sub> und auf der Abszisse die Prozesszeit abgebildet. Die Messung erfolgte stündlich. Dargestellt ist die Biomasse im Gain 10.



**Abbildung 70: Absolute Fluoreszenz der Negativkontrollen im zweiten Biolector-Versuch**

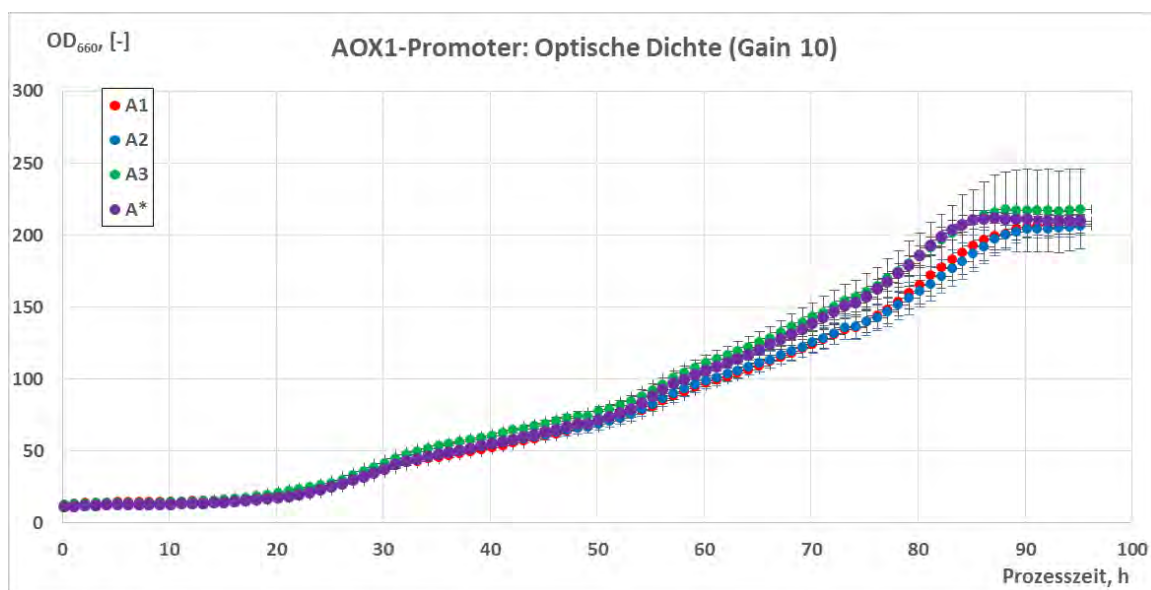
Dargestellt ist die absolute Fluoreszenz (Gain 100 und 40) für die Negativkontrollen in den unterschiedlichen Kultivierungsmedien. Das Gain 40 wurde für die Auswertung verwendet. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz abgebildet.





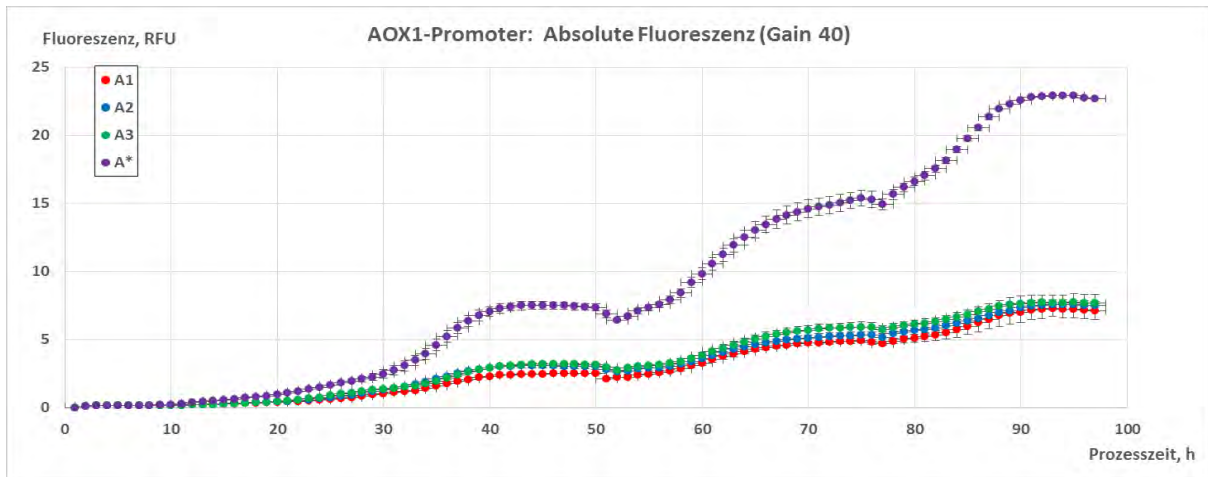
**Abbildung 71: Verhältnis zwischen Fluoreszenz (Gain 100) und Zelldichte (Gain 10) der Negativkontrolle im zweiten Biolector-Versuch**

Auf der Abszisse ist die  $OD_{660}$  und auf der Ordinate die Fluoreszenz. Das Diagramm zeigt das Verhältnis dieser beiden Werte und ist ein Maß für die Eigenfluoreszenz der Zellen, da die Negativkontrollen kein fluoreszierendes Protein exprimieren.

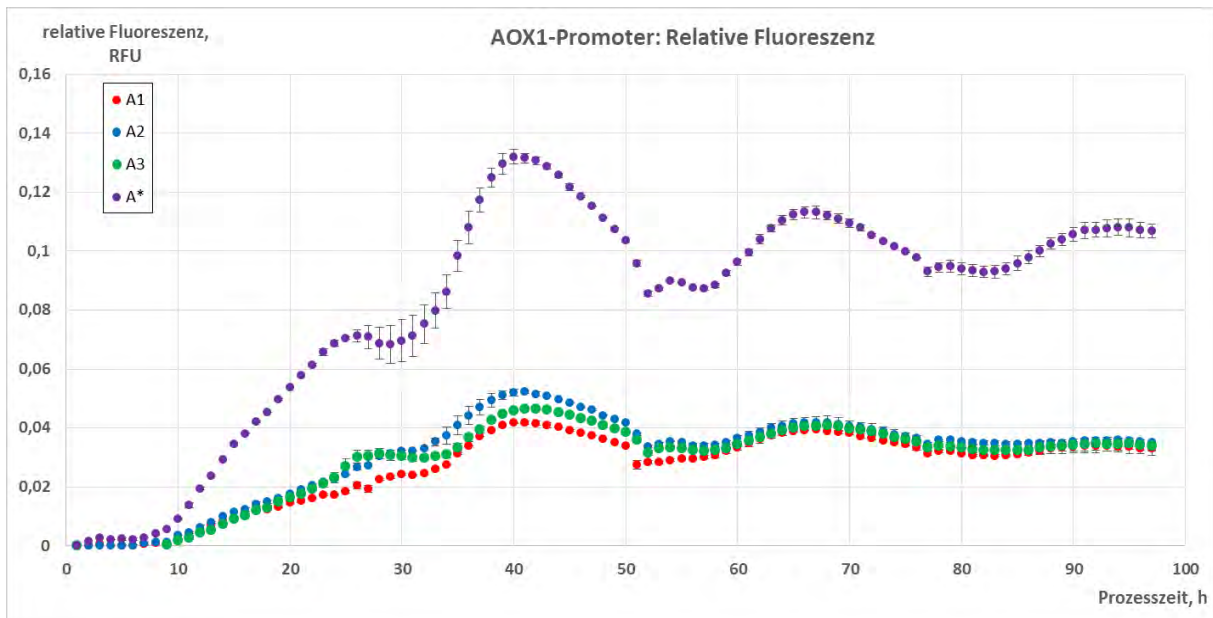


**Abbildung 72 : Verlauf der optischen Dichte der  $P_{AOx1}$ -Proben im zweiten Biolector-Versuch**

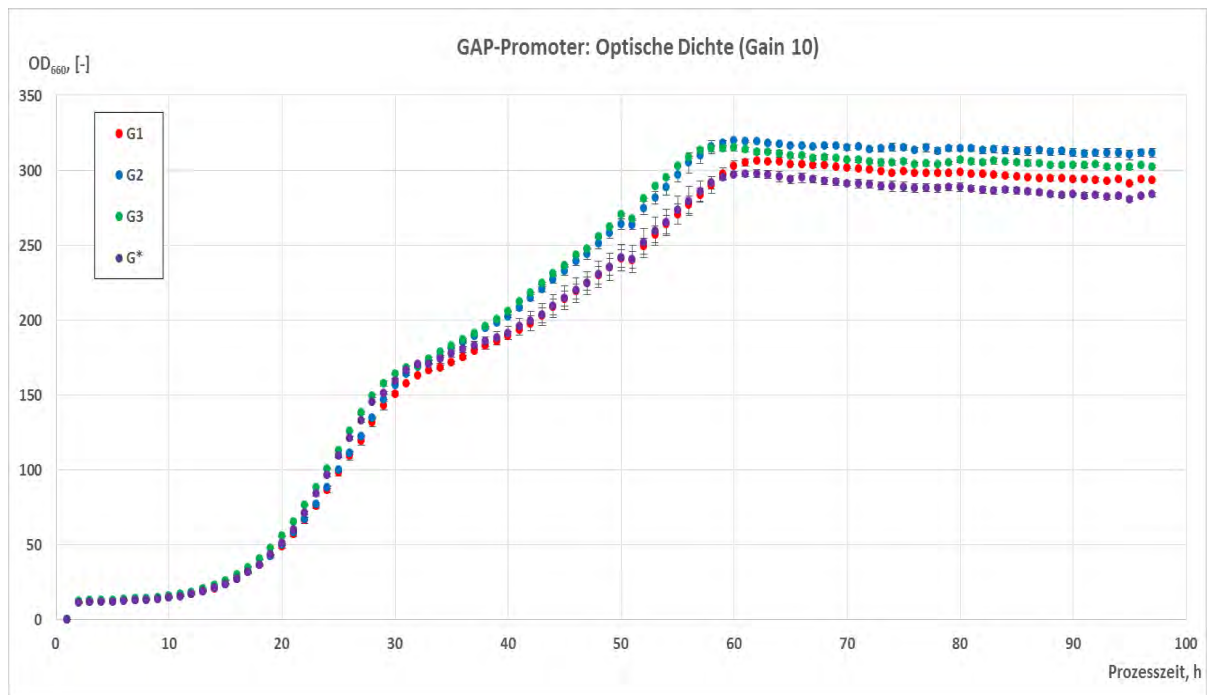
Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte (Gain 10) als Maß für das Wachstum der Biomasse in BMM-Medium. Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die  $OD_{660}$  zu sehen.



**Abbildung 73: Zeitlicher Verlauf der absoluten Fluoreszenz für  $P_{AOX1}$  im zweiten Biolector-Versuch**  
 Dargestellt sind die Mittelwerte und Fehlerbalken der Einzelinsertionsklone (A1-A3) und des Tandem-Repeat-Klons (A\*). Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz abgebildet. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet.

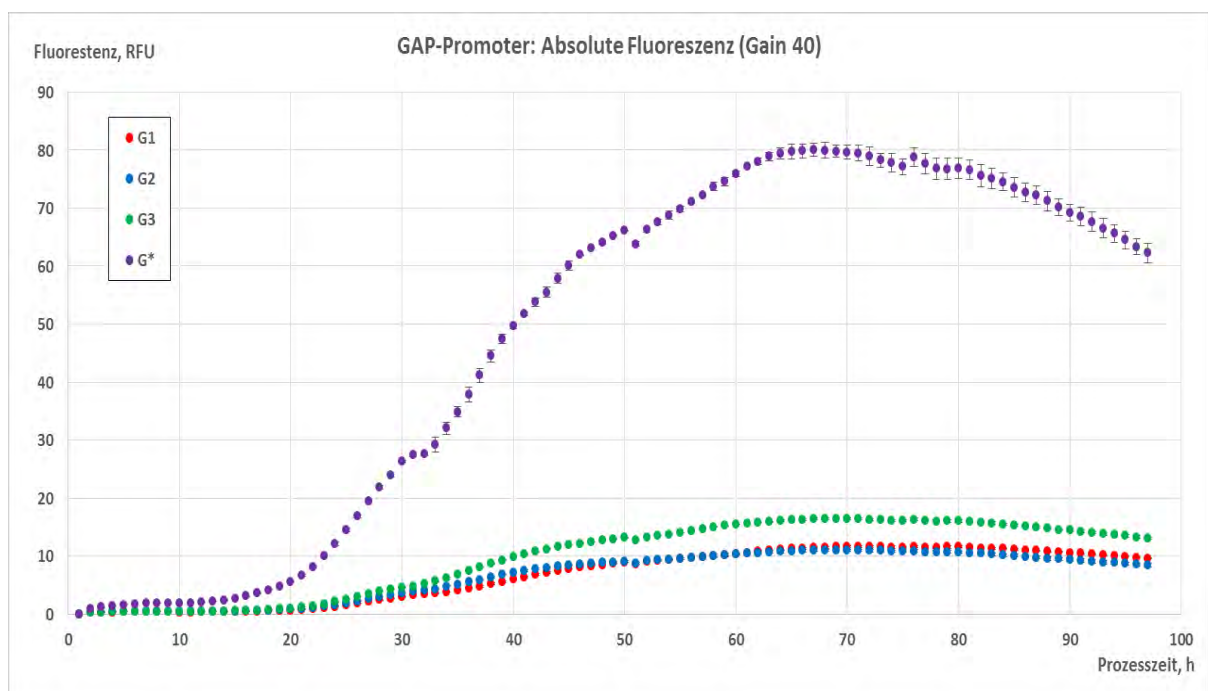


**Abbildung 74: Zeitlicher Verlauf der absoluten Fluoreszenz für  $P_{AOX1}$  im zweiten Biolector-Versuch**  
 Dargestellt sind die Mittelwerte und Fehlerbalken der Einzelinsertionsklone (A1-A3) und des *Tandem-Repeat*-Klons (A\*). Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz abgebildet. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet.



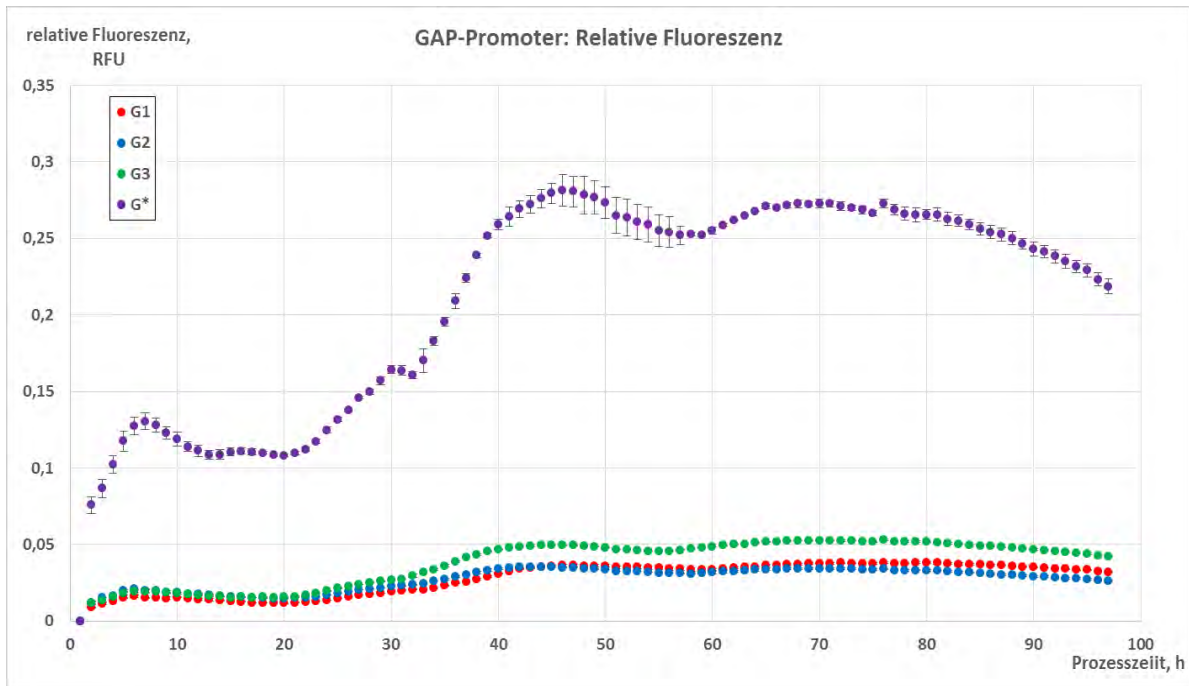
**Abbildung 75: Verlauf der optischen Dichte der  $P_{GAP}$ -Proben im zweiten Biolector-Versuch**

Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte (Gain 10) als Maß für das Wachstum der Biomasse in BMD-Medium. Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die  $OD_{660}$  zu sehen.

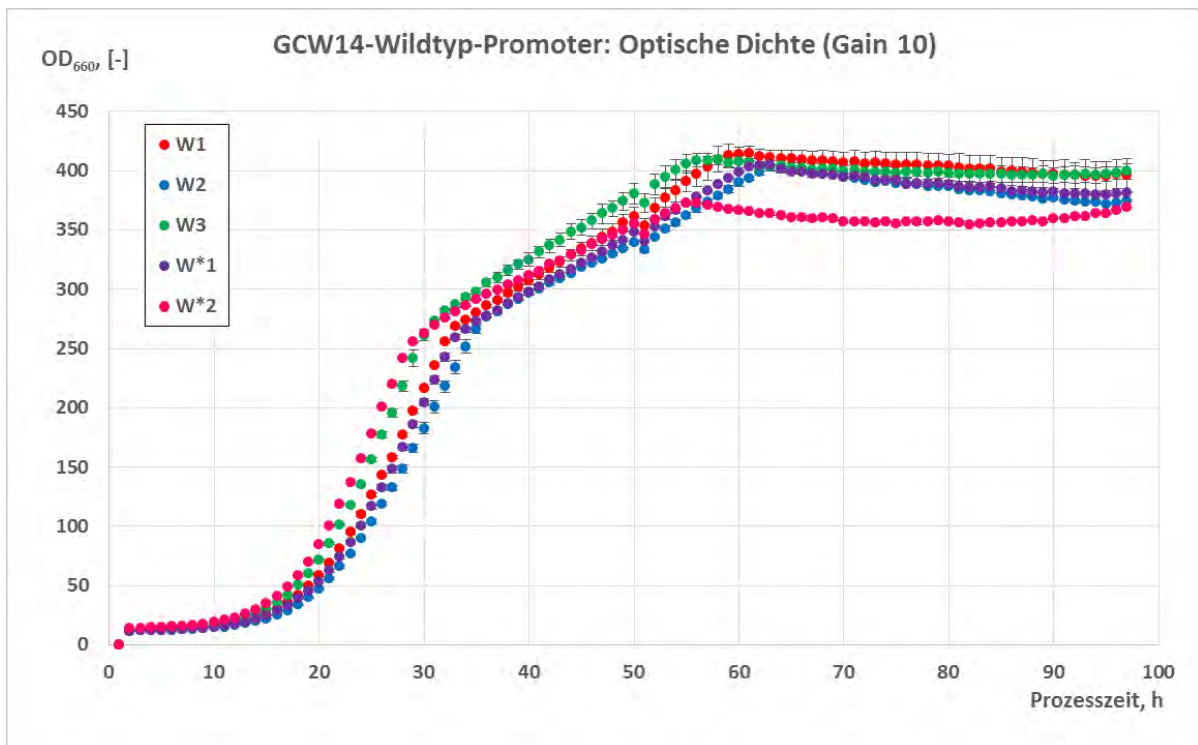


**Abbildung 76: Verlauf der optischen Dichte der  $P_{GCW14}$ -Proben im zweiten Biolector-Versuch**

Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte (Gain 10) als Maß für das Wachstum der Biomasse in BMG-Medium. Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die  $OD_{660}$  zu sehen.

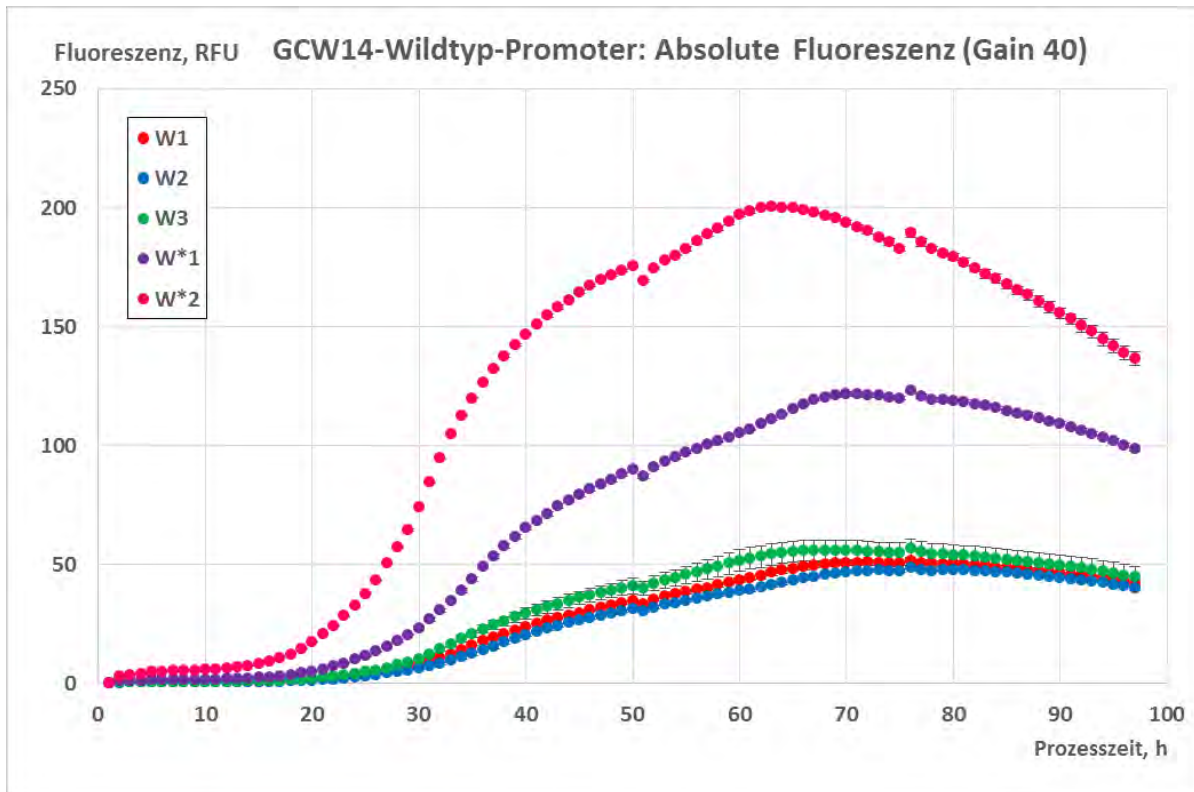


**Abbildung 77: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für  $P_{GAP}$  im zweiten Biolector-Versuch**  
 Es sind Mittelwerte und Fehlerbalken sowohl der Einzelinsertionsklone (G1-G3) und des *Tandem-Repeat*-Klons (G\*) zu sehen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die relative Fluoreszenz abgebildet. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet.

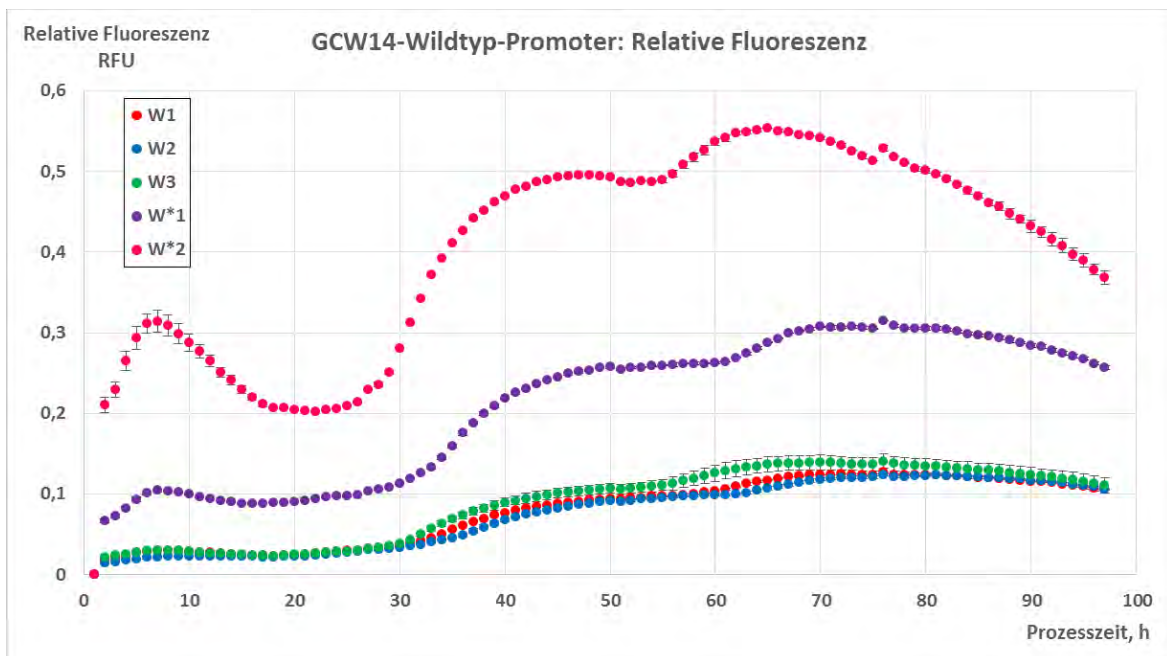


**Abbildung 78: Verlauf der optischen Dichte der  $P_{GCW14}$ -Proben im zweiten Biolector-Versuch**  
 Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte (Gain 10) als Maß für das Wachstum der Biomasse in BMG-Medium. Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die OD<sub>660</sub> zu sehen.

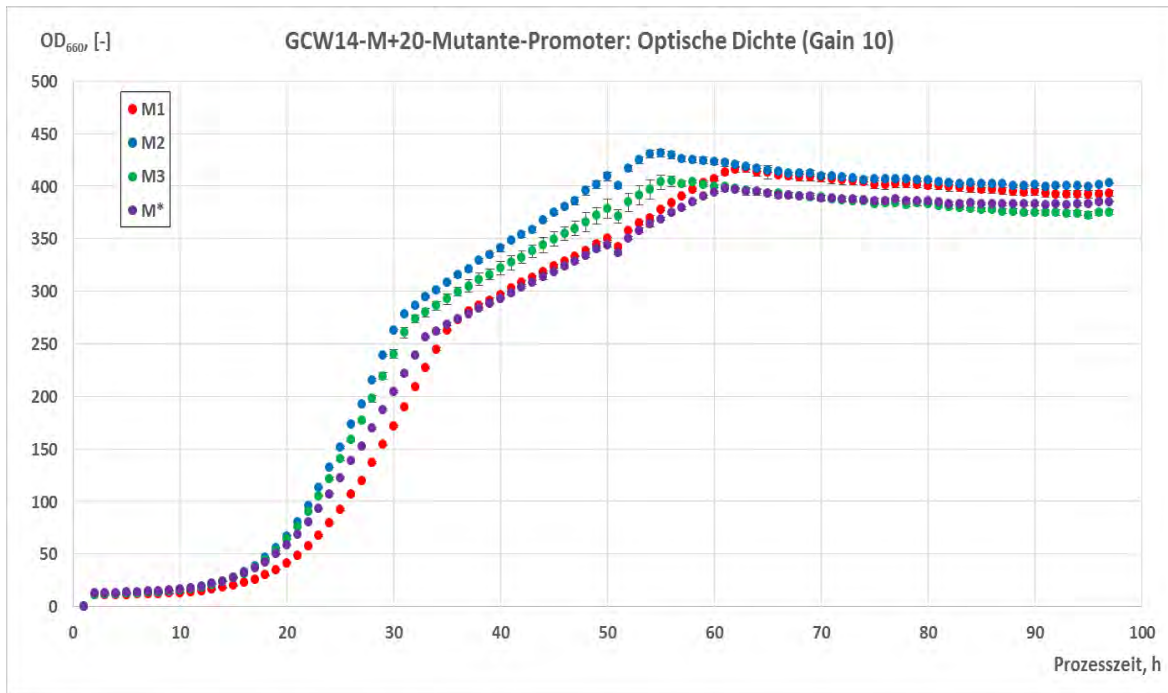




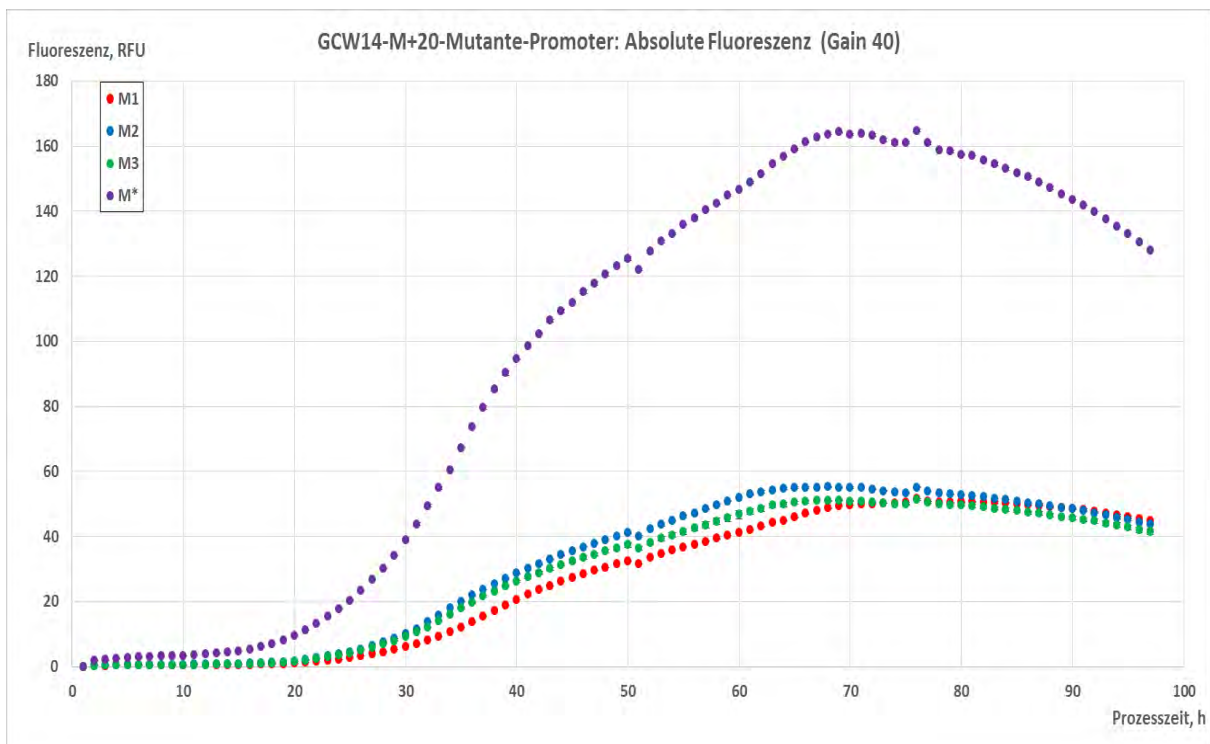
**Abbildung 79: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der  $P_{GCW14}$ -Proben im zweiten Bioelector-Versuch**  
 Dargestellt ist der Verlauf der absoluten Fluoreszenz (Gain 10) Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz zu sehen.



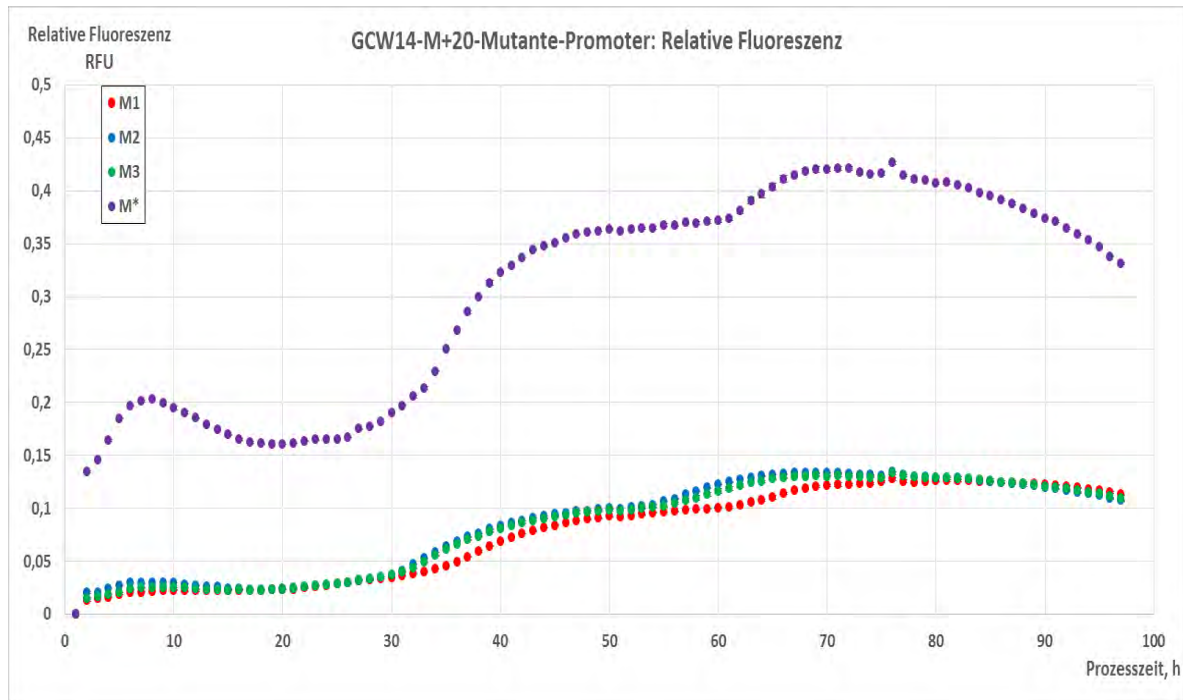
**Abbildung 80 : Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für  $P_{GCW14-Wildtyp}$  im zweiten Bioelector-Versuch**  
 Es sind Mittelwerte sowohl der Einzelinsertionsklone (W1-W3) und der *Tandem-Repeat*-Klone (W\*1) und (W\*2) zu sehen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die relative Fluoreszenz abgebildet. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet



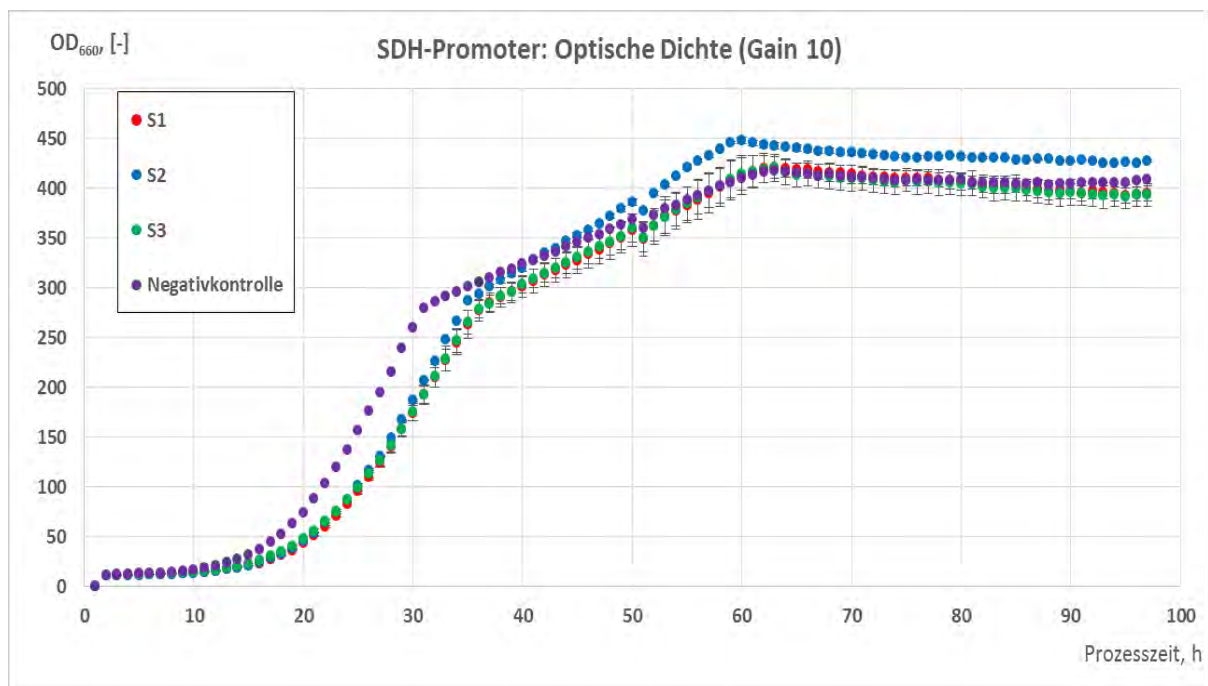
**Abbildung 81: Verlauf der optischen Dichte der  $P_{GCW14M+20}$ -Proben im zweiten Biolector-Versuch**  
 Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte (Gain 10) als Maß für das Wachstum der Biomasse in BMG-Medium. Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die  $OD_{660}$  zu sehen.



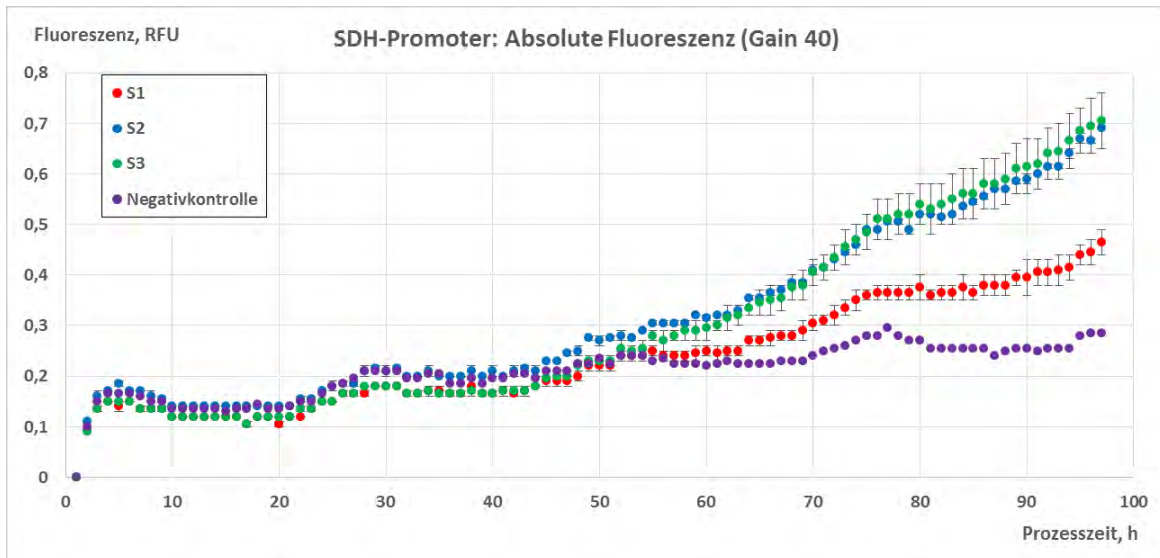
**Abbildung 82: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der  $P_{GCW14M+20}$ -Proben im zweiten Biolector-Versuch**  
 Dargestellt ist der Verlauf der absoluten Fluoreszenz (Gain 10) Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz zu sehen.



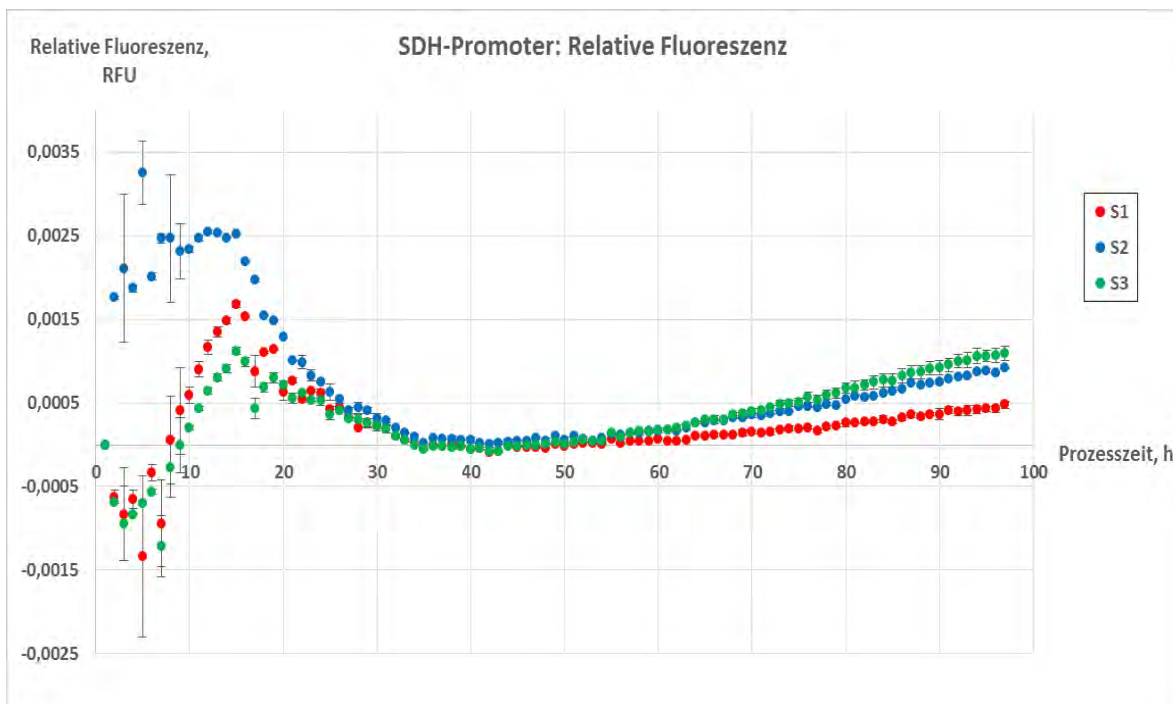
**Abbildung 83: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für  $P_{GCW14M+20}$ -Mutante** den 2. Biolector-Versuch  
Es sind Mittelwerte und Fehlerbalken sowohl der Einzelinsertionsklone (M1-M3) und der Tandem-Repeat-Klons (M\*1) zu sehen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die relative Fluoreszenz. Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet.



**Abbildung 84: Verlauf der optischen Dichte der  $P_{SDH}$ -Proben im zweiten Biolector-Versuch**  
Dargestellt ist der Verlauf der optischen Dichte (Gain 10) als Maß für das Wachstum der Biomasse in BMG-Medium. Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die OD<sub>660</sub> zu sehen.

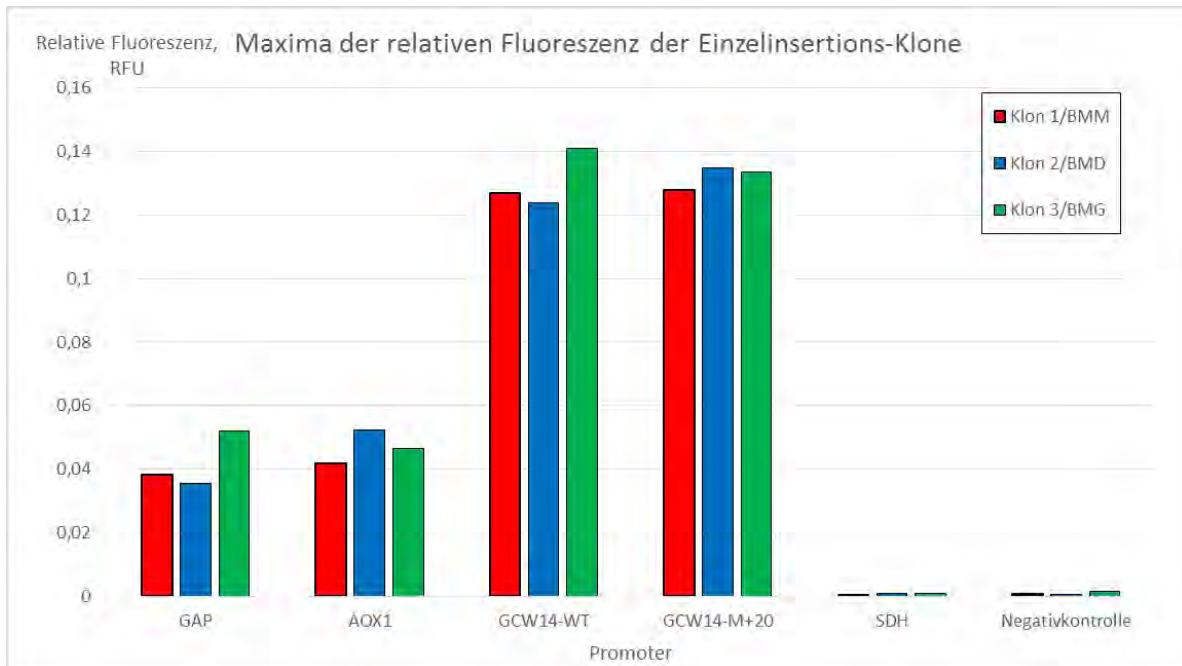


**Abbildung 85: Verlauf der absoluten Fluoreszenz der  $P_{SDH}$ -Proben im zweiten Biolector-Versuch**  
 Dargestellt ist der Verlauf der absoluten Fluoreszenz (Gain 10) Es handelt sich um Mittelwerte und Fehlerbalken aus den Doppelbestimmungen. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die absolute Fluoreszenz zu sehen.



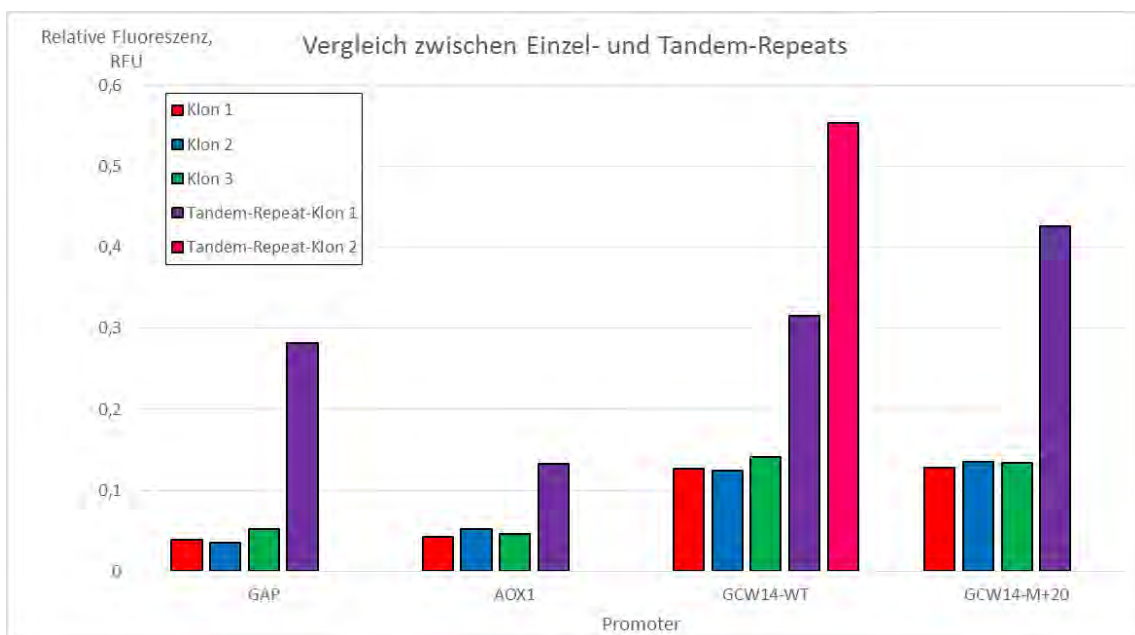
**Abbildung 86: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz für  $P_{SDH}$  im zweiten Biolector-Versuch**  
 Es sind Mittelwerte und Fehlerbalken der Einzelinserionsklone (S1-S3) dargestellt. Auf der Abszisse ist die Prozesszeit und auf der Ordinate die relative Fluoreszenz abgebildet Die Mittelwerte und Fehlerbalken wurden aus den Doppelbestimmungen berechnet.





**Abbildung 87 Übersicht über die Maxima der Promoter-Dreifachbestimmungen und der Negativkontrolle im zweiten Biolector-Versuch**

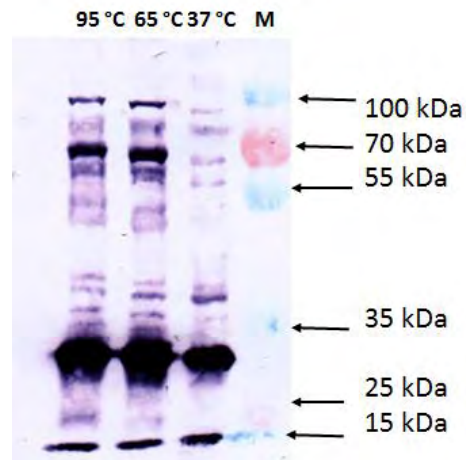
Als Maximum wurde der höchste Wert der Mittelwerte der relativen Fluoreszenz definiert. Die Übersicht erlaubt einen direkten Vergleich in der maximalen Expressionsleistung der verschiedenen Promotoren. Auf der Abszisse sind die Promotoren aufgelistet und auf der Ordinate ist die Relative Fluoreszenz abgebildet.



**Abbildung 88: Vergleich der Maxima zwischen Einzelinsertions- und Tandem-Repeat-Klonen für alle Promotoren im zweiten Biolector-Versuch**

Als Maximum wurde der über die Kultivierungsdauer höchste erreichte Mittelwert der relativen Fluoreszenz verwendet. Auf der Ordinate ist die relative Fluoreszenz abgebildet und auf der Abszisse sind die Promotoren aufgelistet.

## 7.9. Zusätzliche Western Blots



**Abbildung 89: Western Blot zur Überprüfung der Temperaturstabilität von RudolphRFP**

Es sollte überprüft werden, ob die beobachtete Bande bei ca. 17 kDa durch die Spaltung einer thermisch instabilen Asparaginsäure-Prolin-Bindung entsteht. Dafür wurde die Proben parallel bei 65 °C und 37 °C statt 95 °C aufgekocht und auf ein SDS-Gel (15 Trenngel und 5 % Sammelgel) aufgetragen und geblottet. Die Detektion erfolgte über das Flag-Tag von RudolphRFP.