

Expressionssysteme für die heterologe Proteinproduktion in *Candida utilis*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Maya Kunigo
aus Gelsenkirchen

Düsseldorf, Oktober 2013

aus dem Institut für Molekulare Mykologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J. F. Ernst
Korreferent: Prof. Dr. R. Freudl

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Candida utilis</i> und <i>Pichia jadinii</i>	1
1.2	Expressionssysteme für die heterologe Proteinsynthese.....	3
1.2.1	Prokaryoten als Wirtsorganismus.....	3
1.2.2	Eukaryotische Mikroorganismen als Wirtsorganismus.....	5
1.2.2.1	<i>C. utilis</i> - Genetische Untersuchungen und Genexpressionen	6
1.3	Reporterproteine GFP und CalB.....	10
1.3.1	Green Fluorescent Protein (GFP)	10
1.3.2	<i>C. antarctica</i> Lipase B (CalB)	11
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Chemikalien und Enzyme.....	14
2.2	Stämme und Medien	14
2.2.1	<i>E. coli</i> -Stämme	14
2.2.2	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i>	15
2.2.3	Hefestämme.....	15
2.2.4	Medien und Anzucht von Hefestämmen.....	18
2.3	Plasmide und Primer	18
2.3.1	Plasmide.....	18
2.3.2	Primer	19
2.4	FACS-Analyse.....	21
2.5	Sensitivitätstest.....	22
2.6	Wachstumsanalysen	22
2.7	Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren.....	22
2.7.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
2.7.2	Isolierung chromosomaler DNA aus Hefen.....	23
2.7.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefen.....	23
2.7.4	Restriktion.....	24
2.7.5	Ligation.....	24
2.7.6	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	24
2.7.7	TA-Cloning in den Vektor pGEM-T	24
2.7.8	Auftrennung über Gelelektrophorese	24
2.7.9	DNA- Größenstandard	25
2.7.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
2.7.11	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	25
2.7.12	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	25
2.7.13	DNA-Sequenzierung.....	25
2.7.14	Southern-Blot-Analyse.....	25

2.7.14.1	Sondenmarkierung	25
2.7.14.2	Nukleinsäuretransfer auf eine Nylonmembran	26
2.7.14.3	Hybridisierung und Detektion.....	26
2.7.15	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.7.15.1	Standard-PCR	26
2.7.15.2	Kolonie-PCR.....	27
2.7.15.3	Quantitative Real Time-PCR.....	27
2.7.16	Transformation	30
2.7.16.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (RbCl-Methode)	30
2.7.16.2	Transformation von <i>E. coli</i>	30
2.7.16.3	Transformation von <i>C. utilis</i> , <i>P. jadinii</i> und <i>C. albicans</i> mit der Lithiumacetat-Methode.....	30
2.7.16.4	Transformation von <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i> durch Elektroporation	31
2.7.16.5	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	31
2.8	Plasmidstabilitätsanalyse	32
2.9	Stabilisierung der Integration durch selektive Kultivierung	32
2.10	Proteinbiochemische Methoden	32
2.10.1	Herstellung von Rohextrakten	32
2.10.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	33
2.10.3	Proteinfällung	33
2.10.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.10.5	Protein-Größenstandard.....	33
2.10.6	Antikörper	34
2.10.7	Immunoblot-Analyse	34
2.10.8	Aktivitätsbestimmung der Xylanase	35
2.10.9	Aktivitätsbestimmung der Lipase	35
2.11	Fehlingsche Reaktion	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Charakterisierung von <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i>	36
3.1.1	Einfluss von Temperatur und Kohlenstoffquelle	36
3.1.2	Einfluss des pH-Wertes	39
3.1.3	Einfluss von Antimykotika.....	40
3.1.4	Bestimmung der Ploidie von <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i>	41
3.2	Heterologe Expression in der Futterhefe <i>C. utilis</i>	43
3.2.1	Konstruktion der Expressionsplasmide.....	43
3.2.1.1	Konstitutive Promotoren	44
3.2.1.2	Xylose-induzierbarer Promotor	45
3.2.2	Transformation von <i>C. utilis</i> mit Expressionsplasmiden	47
3.2.3	Heterologe Expression des Reportergens <i>GFP</i>	49
3.2.3.1	Promotoreffizienz	50
3.2.3.2	Integrationsanalyse und Plasmidstabilität.....	51
3.2.3.3	Änderung des Integrationsortes	54
3.2.3.4	Heterologe Expression von <i>GFP</i> mit dem <i>GXS1</i> -Promotor	58

3.2.3.5	Regulation des <i>GXS1</i> -Promotors durch Glukose und Xylose	59
3.2.4	Heterologe Expression des Reportergens <i>CALB</i>	61
3.2.5	Heterologe Expression einer Xylanase aus <i>P. simplicissimum</i>	64
3.2.5.1	Konstruktion des Expressionsvektors	65
3.2.5.2	Integrationsanalyse und Plasmidstabilität.....	65
3.2.5.3	Heterologe Expression und Sekretion der Xylanase in <i>C. utilis</i>	67
3.2.5.4	Bestimmung der Xylanaseaktivität	68
3.2.5.5	Verwertung von Xylan als Kohlenstoffquelle.....	70
3.2.6	Bestimmung der Kopiezahl in <i>C. utilis</i>	71
3.3	Heterologe Expression in der Hefe <i>P. jadinii</i>	75
3.3.1	Heterologe Expression von GFP.....	75
3.3.1.1	Promotoreffizienz	76
3.3.1.2	Integrationsanalyse und Plasmidstabilität.....	77
3.3.2	Heterologe Expression von CalB	80
4	Diskussion	83
4.1	Enge Verwandtschaft zwischen <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i>	83
4.1.1	Genomanalyse von <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i>	84
4.1.2	Verwandtschaft einzelner Gene in <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i>	85
4.2	Heterologe Genexpression in <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i>	86
4.2.1	Die Integration der Expressionsvektoren wird durch nicht-homologe Rekombination dominiert	87
4.3	Regulation des <i>GXS1</i> -Promotors in <i>C. utilis</i>	88
4.4	Sekretion von CalB in <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i>	89
4.5	Verwertung von Xylan durch <i>C. utilis</i>	90
5	Zusammenfassung	94
6	Summary	95
7	Literaturverzeichnis	96
8	Abkürzungsverzeichnis.....	106
9	Anhang	109

1 Einleitung

1.1 *Candida utilis* und *Pichia jadinii*

Der Pilz *Candida utilis* ist auch unter dem Namen *Torula*-Hefe bekannt und gehört zu der Abteilung der Schlauchpilze (Ascomycota). Im Laufe der Zeit wurden ebenso die Namen *Torulopsis utilis* bzw. *Torula utilis*, *Saccharomyces jadinii*, *Hansenula jadinii*, *Pichia jadinii* und *Lindnera jadinii* als Synonyme für *C. utilis* verwendet (Gronenborn *et al.*, 1984; Jeffery *et al.*, 1989; Riedel und Kunze, 1997). Dieser Verlauf spiegelt die Schwierigkeiten der Namensgebung und der Klassifizierung dieser Hefe wieder. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass *C. utilis* als Anamorph, d. h. als asexuelle Form des Pilzes *P. jadinii* eingeordnet wird, von dem eine sexuelle Vermehrung beschrieben wurde (Kurtzman *et al.*, 1979; Yamada *et al.*, 1995). In Abb. 1.1 ist erkennbar, dass sowohl *C. utilis* als auch *P. jadinii* sich durch Knospung vermehren.

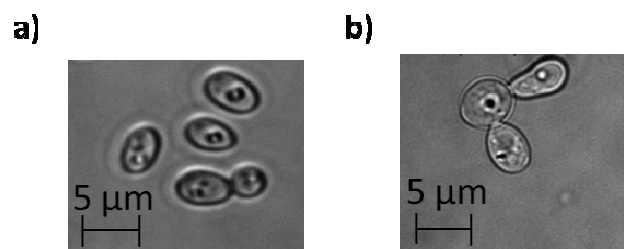


Abb. 1.1: Mikroskopische Aufnahmen von *C. utilis* DSM2361 und *P. jadinii* CBS1600. Phasenkontrastbilder von *C. utilis*- und *P. jadinii*-Zellen mit 5 µm Skalierung.

C. utilis wurde bereits im ersten Weltkrieg als Futtermittel eingesetzt, da diese Hefe proteinreich und gleichzeitig kostengünstig in der Produktion ist (Kurtzman *et al.*, 1979). Auch heute noch wird *C. utilis* als Futterhefe und Lebensmittelzusatz in der Industrie verwendet. Dabei spielen verschiedene Kriterien eine entscheidende Rolle. Zum einen ist *C. utilis* in der Lage, sehr hohe Zelldichten zu erreichen und dabei sehr kostengünstige Nährstoffquellen aus Industrieabfällen zu nutzen, wie z. B. die Verwertung der Pentose Xylose (Bekatorou *et al.*, 2006). Zum anderen besitzt *C. utilis* den sogenannten GRAS-Status (generally recognized as safe), vergeben von der Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (Food and Drug Administration FDA) (Boze *et al.*, 1992). Charakteristisch für *C. utilis* ist der sogenannte Umami-Geschmack, welcher als fleischig und herzhaft beschrieben wird (Chaudhari *et al.*, 2009). Das Wort Umami setzt sich aus den japanischen Wörtern "umai" (lecker, schmackhaft) und "mi" (Geschmack) zusammen und ergänzt die vier Geschmackssinne süß, sauer, bitter und salzig. Der besondere Geschmack des L-Glutamats wird durch die 5'-Ribonukleotide Inosinmonophosphat (IMP) und Guanosinmonophosphat (GMP) erheblich verstärkt (Zhang *et al.*, 2008). Verantwortlich für die Vermittlung des Umami-Geschmacks sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) T1R1 und T1R3, die ein Heterodimer bilden (Zhang *et al.*, 2008). Ein weiteres besonderes Merkmal von *C. utilis* ist die Eigenschaft, unter aeroben Bedingungen in Gegenwart von hohen Glukosekonzentrationen

kein Ethanol zu produzieren, der das Wachstum der Hefe hemmt. Somit ist *C. utilis* im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* "Crabtree-negativ" (Kondo *et al.*, 1995; van Dijken *et al.*, 1993).

In der Literatur sind verschiedene Publikationen zu finden, die die Ploidie von *C. utilis* wiedergeben. Unter anderem wurde aufgrund unterschiedlicher Experimente vermutet, dass *C. utilis* diploid ist (Kondo *et al.*, 1995; Stoltenburg *et al.*, 1992). Bei einem weiteren Experiment zur Herstellung eines auxotrophen *URA3*-Stammes benötigte man vier Zyklen, um eine Nullmutante zu erhalten, so dass man von einem tetraploiden Organismus ausging (Ikushima *et al.*, 2009b). Auch die Messung des DNA-Gehaltes mittels FACS-Analyse ergab, dass *C. utilis* entweder tri-, tetra- oder pentaploid ist (Ikushima *et al.*, 2009b). Alle Publikationen stimmen darin überein, dass *C. utilis* polyploid und trotz der damit verbundenen Schwierigkeit in den letzten Jahren zunehmend zu einer vielversprechenden Alternative für heterologe Genexpressionen in Hefen geworden ist.

Da keine Genomdaten von *C. utilis* bekannt waren, wurde das gesamte Genom von *C. utilis* DSM2361 sequenziert (D. Tielker und J. F. Ernst, unveröffentlicht). Die Sequenzierung ergab eine Genomgröße von ungefähr 12,5 Mbp bei einer 17-fachen Abdeckung durch die 454-Sequenziermethode. Die Annotation im Vergleich zu den Genomdaten von *Candida albicans* ergab 6417 Gene und 4201 homologe Proteine in der SwissProt-Datenbank (Buerth *et al.*, 2011). Zwei Jahre später veröffentlichten Tomita *et al.* (2012) die Genomsequenz von *C. utilis* NRBC0988 (DSM2361), welche eine Genomgröße von 14,6 Mbp umfasst. Bei der Auswertung der Daten wurden 13 Genomabschnitte (sogenannte Supercontigs) mit einer Länge über 40 kb definiert, welche als Chromosomen angenommen wurden. Bei der weiteren Analyse konnten 8646 Gene identifiziert werden, von denen bei 4041 homologe Proteine in der *Saccharomyces*-, *Candida*- oder SwissProt-Datenbank (www.yeastgenome.org; www.candidagenome.org; www.uniprot.org) gefunden wurden. Zusätzlich wurden für 3476 Gene Proteinfunktionen in der KOG-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/; Tatusov *et al.*, 2000) und bei 770 Genen Signalpeptide für die Sekretion mit Hilfe des Programms PrediSi (www.predisi.de/home.html; Hiller *et al.*, 2004) identifiziert.

Einige *Candida*-Arten haben einen besonderen Kodongebrauch, der bei der heterologen Genexpression eine wichtige Rolle spielt. Der humanpathogene Pilz *C. albicans* translatiert das CUG-Kodon nicht wie im Standardgebrauch in Leucin, sondern in Serin (Leuker und Ernst, 1994). Diese Besonderheit muss bei der heterologen Genexpression berücksichtigt werden und hat zur Folge, dass gegebenenfalls die Basentriplets so angepasst werden müssen, so dass es keine Auswirkungen auf die Proteinstruktur und -funktion hat. Da *C. utilis* auch in die Gattung der *Candida*-Pilze eingeteilt wird, musste sein Kodongebrauch geklärt werden. Buerth *et al.* (2011) etablierten das Sekretom von *C. utilis* und erhielten dabei Teilsequenzen der sekretierten Invertase. Der Vergleich mit der Invertase-kodierenden Genomsequenz (NCBI GenBank-Nr.: Y12659; Chavez *et al.*, 1998) ergab, dass das CUG-Triplett für Leucin kodiert (Abb. 1.2). Dieses Ergebnis zeigt, dass *C. utilis* den Standardcode verwendet und die heterologe Genexpression keine Kodonanpassung benötigt.

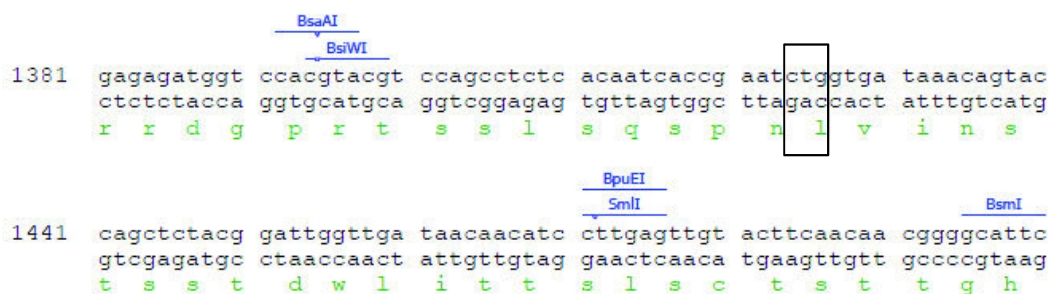


Abb. 1.2: Kodongebrauch in *C. utilis*. Vergleich der Invertase-Proteinsequenz (in grün) mit der DNA-Sequenz des *C. utilis*-Invertase-Gens *INV1* (Buerth *et al.*, 2011). Das CTG-Triplett entspricht der Translation der Aminosäure Leucin (schwarzer Kasten).

1.2 Expressionssysteme für die heterologe Proteinsynthese

Für die heterologe Genexpression werden sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Wirtsorganismen verwendet. Die Auswahl hängt dabei von dem eigentlichen Zielprodukt, dessen Verwendung, aber auch von den verschiedenen Vor- und Nachteilen der einzelnen Systeme selbst ab. Die Expressionssysteme, die sich im Laufe der Zeit durchsetzen konnten, haben meistens gemein, dass sie auf günstigen Substraten wachsen und dabei hohe Zelldichten erreichen können. Neben der Ausbeute ist aber auch die Aktivität des Zielproteins von Bedeutung. Bei einem pharmazeutischen Produkt kommen z. B. auch immunologische Kriterien in Betracht, die bei einem industriellen Produkt nicht beachtet werden müssen.

1.2.1 Prokaryoten als Wirtsorganismus

Bei der Wahl des Wirtsorganismus für die heterologe Proteinsynthese werden Bakterien aufgrund der einfachen Handhabung und des schnellen Wachstums oft bevorzugt (Sahdev *et al.*, 2008). Weitere Vorteile sind die geringen Kosten für Substrate und das Erreichen hoher Zelldichten (Sahdev *et al.*, 2008; Terpe, 2006). Zusätzlich werden die Klonierung und die Wahl des geeigneten Promotors durch die vielen detaillierten und verfügbaren genetischen Informationen erleichtert (Terpe, 2006). Sind allerdings posttranslationale Modifikationen für die biologische Aktivität des Proteins essentiell, eignen sich prokaryotische Expressionssysteme eher weniger (Terpe, 2006). Zu der bekanntesten posttranslationalen Modifikation gehört neben der Acetylierung und Phosphorylierung die Glykosylierung von Proteinen. Dabei hat die Glykosylierung verschiedene Funktionen wie z. B. das Gewährleisten der korrekten Proteinfaltung oder als Schutz vor Proteasen (Helenius und Aebi, 2001).

Das am meisten genutzte Bakterium für die heterologe Proteinsynthese ist *Escherichia coli*, wobei die Stämme K12 und BL21, sowie deren Derivate verwendet werden (Terpe, 2006). Trotz der beliebten Anwendung des Systems enthält *E. coli* Endotoxine (Lipopolysaccharide), die im Produkt auftauchen können; dieses kann zu erheblichen Problemen bei der Produktion von pharmazeutischen Produkten führen. Zur Trennung der Lipopolysaccharide sind weitere Prozessschritte notwendig, da schon kleinste Mengen gefährliche Auswirkungen auf den menschlichen Körper haben (Petsch und

Anspach, 2000). Eine weitere Problematik ist die Bildung von Einschlusskörpern (inclusion bodies), welche sich in der Zelle anreichern. Diese Anhäufungen können aus nicht-korrekt gefalteten und damit inaktiven Proteinen bestehen. Das Potenzial von *E. coli* zur Proteinsekretion ist zurzeit noch eingeschränkt, so dass die meisten Produkte im Cytoplasma synthetisiert werden (Sahdev *et al.*, 2008). Trotz der hohen Ausbeuten durch die Produktbildung im Cytoplasma, werden daher verschiedene Möglichkeiten verfolgt, die Sekretionsfähigkeit von *E. coli* zu verbessern und so die Produktgewinnung zu vereinfachen (Georgiou und Segatori, 2005; Sahdev *et al.*, 2008; Terpe, 2006). Die Proteinfaltung kann durch die Modifizierung der für die Bildung aktiver und löslicher Proteine verantwortlichen Bedingungen, wie z. B. durch Verwendung genetisch veränderter *E. coli*-Stämme oder durch die Co-Expression von Chaperonen, die das synthetisierte Protein bei der korrekten Faltung und der Konformationsbildung unterstützen, positiv beeinflusst werden (Hockney, 1994; Sahdev *et al.*, 2008). Eine andere Möglichkeit ist die nachträgliche Faltung der inaktiven, unlöslichen Proteine, um diese in aktive und lösliche Formen zu überführen, oder die Fusion mit einem weiteren Protein, welches sich schneller faltet oder die Konformationsbildung begünstigt (Hockney, 1994; Lilie *et al.*, 1998; Sahdev *et al.*, 2008; Singh und Panda, 2005). Eine wichtige Problematik, besonders bei der heterologen Synthese von Proteinen aus Eukaryoten in *E. coli*, ist der Kodongebrauch des heterologen Gens (Sahdev *et al.*, 2008; Terpe, 2006). Die natürlich vorkommenden 20 Aminosäuren können durch 61 verschiedene Basentriplets kodiert werden. Dabei gibt es in jedem Organismus eine Verteilung über die Häufigkeit und Präferenz eines Kodons für die entsprechende Aminosäure, die bei der effektiven Proteinsynthese berücksichtigt werden muss (Sharp und Li, 1987). So translätieren bestimmte Vertreter der Gattung *Candida*, wie z. B. *C. albicans* und *C. cylindracea*, ein CUG-Triplett zu Serin und nicht zu Leucin wie *E. coli* (Kawaguchi *et al.*, 1989; Leuker und Ernst, 1994). Werden die entsprechenden Kodons nicht optimiert, kann die heterologe Expression zu einem inaktiven Produkt führen. Eine andere Möglichkeit neben der Kodonoptimierung ist die Nutzung des Stammes *E. coli* Rosetta, eines BL21-Derivats, welcher das Plasmid pRARE enthält (Tegel *et al.*, 2010). Das Plasmid führt zur Überexpression der tRNAs für Kodons, die selten in *E. coli*, aber dafür häufig in Eukaryoten verwendet werden (Tegel *et al.*, 2010). So können Translationsprobleme bei der heterologen Proteinsynthese teilweise umgangen werden (Kane, 1995). Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei einer Überexpression von tRNA allein, andere essentielle Komponenten für die tRNA-Synthese limitierend vorliegen können (Gustafsson *et al.*, 2004).

Alternativen zu *E. coli* als bakteriellen Wirtsorganismus sind Expressionssysteme basierend auf Gram-positiven *Bacillus*-Stämmen. Diese haben die Vorteile, dass sie nicht wie *E. coli* eine äußere Membran aus Lipopolysacchariden besitzen und Proteine sehr gut in das Medium sekretieren können (Terpe, 2006). Daher werden zunehmend Stämme wie *B. subtilis* und *B. megaterium* aufgrund ihrer effizienten Sekretionsfähigkeit für die heterologe Produktion von industriellen und pharmazeutischen Proteinen verwendet (Meinhardt *et al.*, 1989; Westers *et al.*, 2004).

1.2.2 Eukaryotische Mikroorganismen als Wirtsorganismus

Die eukaryotischen Expressionssysteme haben gegenüber den prokaryotischen den großen Vorteil, dass sie die Fähigkeit zu posttranslationalen Modifikationen besitzen. Hefen und andere Pilze verwerten preiswerte Substrate und erreichen hohe Zelldichten. Im Gegensatz zu prokaryotischen Systemen besitzen sie sehr effektive Sekretionswege, durch die viele Produkte extrazellulär gebildet und einfacher aufgereinigt werden können. Zur Transformation der eukaryotischen Wirtsorganismen werden einerseits integrative Vektoren verwendet, die in das Wirtsgenom durch homologe Rekombination integriert werden. Diesen Plasmiden fehlt die episomale Replikation, so dass sie als frei vorliegendes Plasmid in der Zelle nicht bestehen können (Nasser *et al.*, 2003). Zum anderen werden replizierende Vektoren verwendet, die aufgrund einer chromosomalen Replikation oder einem Plasmidreplikator (autonomously replicating sequence) zur Replikation auch ohne Integration ins Genom in der Zelle weitergegeben werden (Nasser *et al.*, 2003).

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* wird vielfach für die Produktion rekombinanter Proteine verwendet (Celik und Calik, 2012). Von Vorteil sind dabei die gut untersuchten und verstandenen Stoffwechsel- und Signalwege, die einfachen genetischen Manipulationen aufgrund der zahlreichen genomischen Daten und die einfachen Prozessbedingungen. Feste Bestandteile der Vektoren sind Resistenzmarker, autonome Replikationssequenzen oder ein natives Gen, welches für die Integration durch homologe Rekombination verwendet wird, sowie ein geeigneter Promotor für die heterologe Genexpression. Für die Nutzung auxotropher Marker werden bevorzugt native Gene gewählt, die für die Biosynthese bestimmter Aminosäuren z. B. Leucin (*LEU2*), Histidin (*HIS3*), Tryptophan (*TRP1*), Methionin (*MET15*) oder Uracil (*URA3*) verantwortlich sind (Pronk, 2002; Romanos *et al.*, 1992). Für die Transformation werden Wirtsorganismen verwendet, die für diese Aminosäuren auxotroph sind. Erst bei der Transformation wird mit dem Plasmid das fehlende Gen in die Nullmutante eingebracht. Durch die im Medium fehlende entsprechende Aminosäure können nun Transformanten identifiziert werden, die das Plasmid in sich tragen und somit in der Lage sind, diese Aminosäure zu synthetisieren. Diese Methode der Verwendung auxotropher Markergene hat den Vorteil, dass die Zellen keinen toxischen und teilweise kostenintensiven Substanzen ausgesetzt werden. Die Selektion erfolgt einfach auf Medien, die den entsprechenden Nährstoff nicht enthalten. Die andere Möglichkeit ist die Verwendung bakterieller Gene, die der Zelle Antibiotikaresistenz verleihen. Häufig werden die Gene *hph* für Hygromycin-Phosphotransferase aus *Streptomyces hygrosopicus* und *aph* für Aminoglykosid-Phosphotransferase z. B. aus *Staphylococcus aureus* verwendet (Davies und Jimenez, 1980; Gritz und Davies, 1983). Die Hygromycin-Phosphotransferase Hph phosphoryliert das Hygromycin, so dass dieses nicht mehr die Proteinsynthese hemmen kann (Leboul und Davies, 1982). Die Phosphorylierung der Aminoglykoside Kanamycin oder G418 (Geneticin) durch die Aminoglykosid-Phosphotransferase Aph führt dazu, dass diese nicht mehr am Ribosomen binden und damit die Proteinsynthese blockieren können (Foster, 1983; Lang-Hinrichs *et al.*, 1989). Ein weiterer Resistenzmarker ist das aus *Streptomyces noursei* stammende Gen *nat1* (*sat1*) kodierend für die Nourseothricin-Acetyltransferase (Krugel *et al.*, 1993). Dabei führt die Übertragung einer Acetylgruppe auf die Aminogruppe des β -Lysins zur Inaktivierung des Antibiotikums Nourseothricin (auch Streptothricin genannt), so dass es zu keiner Einschränkung der Proteinsynthese kommt (Krugel *et al.*, 1988; Seltmann, 1989). Bei der Selektion von Transformanten durch Zugabe von Antibiotika ist es erforderlich, durch Vorexperimente die Sensitivität des Wildtyp-Stammes auf das

entsprechende Antibiotikum zu untersuchen. Für die Selektion wird eine Antibiotika-Konzentration gewählt, die eine zuverlässige Identifikation der Transformanten, die das Resistenzgen in sich tragen, gewährleistet.

Die Wahl des geeigneten Promotors ist essentiell für die heterologe Genexpression. Neben den konstitutiven, starken Promotoren basierend auf den glykolytischen Genen wie z. B. *TDH3* für Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase und *PGK1* für Phosphoglyceratkinase werden auch induzierbare Promotoren wie der *ADH1*-Promotor (Glukose), der *PHO5*-Promotor (Phosphatmangel), sowie die *GAL1*- und *GAL10*-Promotoren (Galaktose) verwendet (Celik und Calik, 2012; Nasser *et al.*, 2003; Romanos *et al.*, 1992). *S. cerevisiae* gehört aber zu den "Crabtree-positiven" Hefen, die unter aeroben Bedingungen bei hoher Glukosekonzentration Ethanol bilden, welches das Wachstum hemmt (Barford und Hall, 1979). Alternativen zu *S. cerevisiae* als heterologe Expressionssysteme bei Pilzen sind unter anderem die methylo-trophen Hefen *Pichia pastoris* und *Hansenula polymorpha*, aber auch *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* und *Schizosaccharomyces pombe* (Boer *et al.*, 2007; Celik und Calik, 2012; Nasser *et al.*, 2003). Die häufig verwendete Hefe *P. pastoris* verwertet Methanol als Kohlenstoffquelle und verfügt über den starken Methanol-regulierten Promotor des *AOX1*-Gens kodierend für Alkoholoxidase 1; zum anderen ist *P. pastoris* in der Lage, Zelldichten bis zu 100 g/l Trockengewicht zu erreichen (Cregg *et al.*, 1993). Eine weitere Gruppe von Wirtsorganismen stellen die filamentösen Pilze der Gattung *Aspergillus* dar. In den letzten Jahren wurden Stämme wie *A. oryzae*, *A. nidulans* und *A. niger* unter anderem für die Produktion von Interleukin IL-6 und monoklonalen Antikörpern wie IgG (Immunoglobulin G) verwendet (Demain und Vaishnav, 2009; Lubertozzi und Keasling, 2009; Nevalainen *et al.*, 2005). Trotz der guten Sekretionseigenschaften vieler Pilze, sind es jedoch die zahlreichen Proteasen, die die Handhabung bei der Produktion heterologer Proteine erschweren (Ward, 2012).

1.2.2.1 *C. utilis* - Genetische Untersuchungen und Genexpressionen

Bis vor kurzem war die Genomsequenz von *C. utilis* nicht öffentlich zugänglich (D. Tielker und J. F. Ernst, unveröffentlicht; Tomita *et al.*, 2012). In den Jahren zuvor wurden nur vereinzelte Gene von *C. utilis* durch Gensequenzierung und Komplementierung der entsprechenden auxotrophen Mutanten von *S. cerevisiae* bzw. *E. coli* beschrieben wie z. B. die Gene *INV1* für Invertase, *LEU2* für 3-Isopropylmalatdehydrogenase und *HIS3* für Imidazolglycerolphosphatdehydratase (Basabe *et al.*, 2004; Chavez *et al.*, 1998; Hamasawa *et al.*, 1987). Zusätzlich wurde das Gen für β -D-Xylosidase in *C. utilis* identifiziert und charakterisiert, wobei eine Glukose-Repression der β -D-Xylosidase beobachtet wurde (Yanai und Sato, 2001). Des Weiteren wurden Gene aus der Glutathionsynthese durch Überexpression in *C. utilis* und durch den Vergleich mit dem Syntheseweg in *S. cerevisiae* identifiziert (Suzuki *et al.*, 2011). Hsu *et al.* (1983) zeigten die Funktionalität der chromosomalen Replikationssequenz (*ARS*) von *C. utilis* in *S. cerevisiae* durch die Replikation eines Expressionsvektors in einer *S. cerevisiae-ura3*-Mutante. Andere Arbeitsgruppen exprimierten die Uricase aus *C. utilis* in *E. coli* JM109 bzw. BL21 und erzielten Enzymaktivitäten von 25 U/mg und 38,4 IU/mg (Koyama *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2011). González *et al.* (2013) verwendeten den *GAPDH*-Promotor (*TDH3p*) aus *C. utilis* für die Expression der β -Glucuronidase (*GUS*) in dem Pflanzenpathogen *Agrobacterium tumefaciens*.

In den vergangenen Jahren wurde *C. utilis* bereits als Wirt für die Expression verschiedener Proteine verwendet. Kondo *et al.* (1997) beschrieben die Expression des Süßstoffs Monellin aus *Dioscorephyllum cumminisii* unter der Kontrolle des *C. utilis* *TDH3*-Promotors. Das Expressionsplasmid basierte auf dem high-copy Plasmid pUC19 und enthielt die mutierte Sequenz für das ribosomale Protein L41 von *C. utilis* für die Ausbildung der Cycloheximid-Resistenz. Die Verwendung dieses Gens war dadurch möglich, da für die Ausbildung der Resistenz eine höhere Kopiezahl des Gens (3-10) in der Zelle erforderlich ist (Kondo *et al.*, 1997). Integriert wurde entweder in den rDNA- oder *URA3*-Lokus von *C. utilis*, wobei die Integration in den *URA3*-Lokus eine höhere Stabilität aufwies. So wurde eine 80-100 %-ige Stabilität nach Wachstum von 50 Generationen im nicht-selektiven Medium erzielt, im Gegensatz zu maximal 30 % des im rDNA-Lokus integrierten Plasmids. Ausgehend von diesem Expressionssystem synthetisierte die gleiche Arbeitsgruppe die α -Amylase aus *Sulfolobus solfataricus* mit einer Ausbeute von 12,3 g/l (Miura *et al.*, 1999). Der *C. utilis* *TDH3*-Promotor wurde auch von Wei *et al.* (2010) verwendet, um die Xylanase aus *Streptomyces olivaceoviridis* in *C. utilis* intrazellulär zu exprimieren. Dabei konnte durch die Integration des auf dem Plasmid pBR322-basierenden Expressionsvektors in den 18S rDNA-Lokus die höchste Xylanaseaktivität von 60 IU/ml beobachtet werden. Als Resistenzmarker diente hierbei ebenfalls das *C. utilis*-eigene Gen für das mutierte, ribosomale Protein L41, das Cycloheximid-Resistenz bewirkt. Weitere Expressionssysteme in *C. utilis* dienen der Produktion von Carotinoiden (Miura *et al.*, 1998b), Biotin (Hong *et al.*, 2006), Ethanol (Tamakawa *et al.*, 2011), Isopropanol (Tamakawa *et al.*, 2013a) und L-Laktat (Ikushima *et al.*, 2009c; Tamakawa *et al.*, 2012). So wurde für die Synthese von Carotinoiden wie Lycopene, β -Carotin und Astaxanthin die für die Synthese-wichtigen Gene *crtE*, *crtB*, *crtI* und *crtY* von *Erwinia uredovora* und *crtZ* und *crtW* von *Agrobacterium aurantiacum* in *C. utilis* exprimiert (Miura *et al.*, 1998b). Die Gene wurden für *C. utilis* kodonoptimiert und unter der Kontrolle der *C. utilis*-Promotoren *TDH3p*, *PGK1p*, *PMA1p*, *P14p* oder *P57p* exprimiert. Durch die bereits von Kondo *et al.* (1995) untersuchte Integration in den rDNA-Lokus konnten bis zu 1,1 mg/g Zellrockengewicht Lycopene, 0,1 mg/g Zellrockengewicht β -Carotin und 0,4 mg/g Zellrockengewicht Astaxanthin produziert werden. Shimada *et al.* (1998) konnten durch die Überexpression des *HMG*-Gens in *C. utilis*, kodierend für die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, welche im Isoprenoid-Stoffwechselweg beteiligt ist (Abb. 1.3), die Lycopene-Produktion auf 7,8 mg/g Zellrockengewicht erhöhen. Gleichzeitig wurde die höhere Ausbeute durch Disruption des *ERG9*-Gens, welches bei der Ergosterol-Synthese eine Rolle spielt, unterstützt (Abb. 1.3).

Für die Produktion von Biotin in *C. utilis* wurde zunächst das Gen für die Biotinsynthese *BIO2* von *C. utilis* durch Sequenzierung und Komplementierung in *E. coli* identifiziert (Hong *et al.*, 2006). Für die Expression wurde das Gen stromabwärts starker *C. utilis*-Promotoren wie *TDH3p* und *L41p* in das Expressionsplasmid kloniert. Dabei wurden sowohl ein high-copy Plasmid, welches in die 18S rDNA integriert wurde, als auch low-copy Plasmide für die Integration in den *URA3*- oder *HIS3*-Lokus konstruiert. Für die stabile Plasmidintegrität in den entsprechenden Loci war jedoch der Selektionsdruck ausgehend von Cycloheximid essentiell. Hong *et al.* (2006) konnten mit diesem Expressionssystem eine Biotin-Ausbeute von 1,8 mg/l Kulturmedium nach einer Kultivierung von 72 h bei 30 °C erzielen.

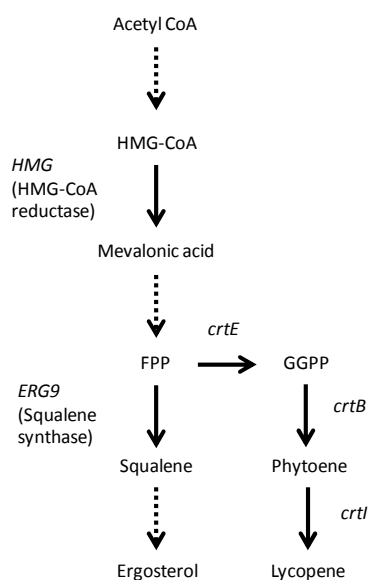


Abb. 1.3: Stoffwechselweg der endogenen Ergosterol-Biosynthese und exogenen Lycopene-Biosynthese. Durchgehende Pfeile stehen für einzelne Schritte, während gepunktete Linien mehrere Syntheseschritte beschreiben. FPP: Farnesyldiphosphat, GGPP: Geranylgeranyldiphosphat, HMG: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, ERG9: Squalensynthetase, crtE: GGPP-Synthase, crtB: Phytoensynthase, crtI: Phytoendesaturase (Shimada *et al.*, 1998).

Wie bereits erwähnt, ist *C. utilis* Crabtree-negativ und deshalb nicht in der Lage, unter aeroben Bedingungen in Gegenwart hoher Glukosekonzentration Ethanol zu produzieren (siehe 1.1). Tamakawa *et al.* (2011) untersuchten für die Ethanol-Produktion in *C. utilis* aus Xylose die in dem Xylose-Abbau beteiligten Gene *XYL1* für Xyloxyreduktase (XR) und *XYL2* für Xylyldehydrogenase (XDH) (Abb. 1.4). Die Ursache für die fehlende Bildung von Ethanol aus Xylose wurde in dem unterschiedlichen Coenzym-Gebrauch beider Gene vermutet, da Xyl1 NADPH- und Xyl2 NAD⁺-abhängig ist. Deshalb wurden die Gene *XYL1* (NADH-abhängig) und *XYL2* (NAD⁺-abhängig) von *Candida shehatae* und *XYL3* für die Xylylosekinase von *Pichia stipitis* in *C. utilis* heterolog exprimiert, wobei auch hier der *TDH3*-Promotor von *C. utilis* für die Expression verwendet wurde. Die Transformanten wurden nach der Integration in den *URA3*-Lokus auf Hygromycin-haltigem Medium selektiert (*hph*-Gen als Resistenzmarker). Ferner wurden verschiedene Mutationen in den einzelnen Genen untersucht, um die spezifische Coenzym-Bindung in den Proteinen CsheXyl1 und CsheXyl2 zu verbessern. Durch Mutation in der Coenzym-Bindungsstelle von CsheXyl1 konnte letztendlich 17,4 g/l Ethanol aus 50 g/l Xylose hergestellt werden (Tamakawa *et al.*, 2011).

Dieselbe Arbeitsgruppe konnte durch eine Kombination aus heterologer Genexpression und Überexpression von *C. utilis*-Genen Isopropanol aus Glukose in *C. utilis* produzieren (Tamakawa *et al.*, 2013a). Dafür wurden die für *C. utilis* kodonoptimierten Gene *ctfA* und *ctfB* für die Untereinheiten A und B der Acetoacetyl-CoA-Transferase aus *Clostridium acetobutylicum* und *adc* für Acetoacetat-Decarboxylase und *sadh* für primäre/sekundäre Alkoholdehydrogenase aus *Clostridium beijerinckii* unter der Kontrolle des *TDH3*-Promotors in einem auf pUC119-basierenden Expressionsvektor in *C. utilis* exprimiert (Abb. 1.5). Gleichzeitig wurden die *C. utilis*-Gene *ACS2* für Acetyl-CoA-Synthetase und *ERG10* für Acetyl-CoA-Acetyltransferase in dem gleichen Stamm überexprimiert (Abb. 1.4). Diese Kombination führte zu einer Isopropanol-Ausbeute von 27,2 g/l (Tamakawa *et al.*, 2013a).

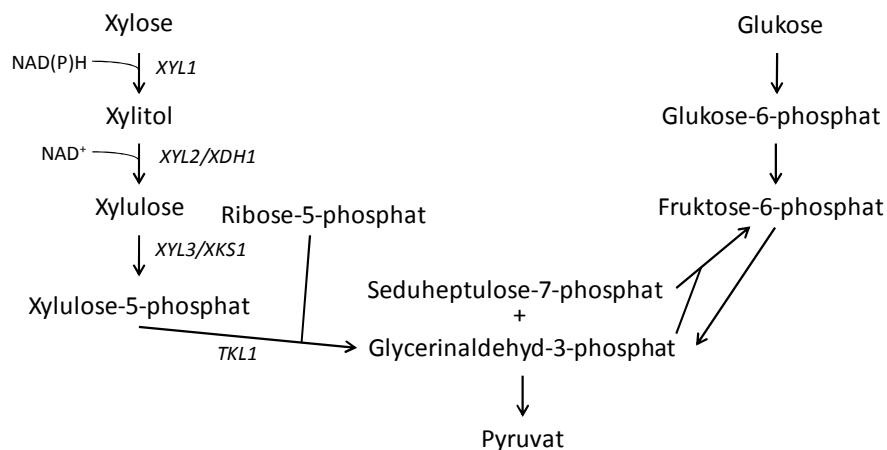


Abb. 1.4: Ausschnitt aus dem Abbauweg der Xylose. Die Xylose wird in mehreren Schritten unter Beteiligung der Xylosereduktase (*XYL1*), Xylitoldehydrogenase (*XYL2/XDH1*) und Xylulosekinase (*XYL3/XKS1*) zu Xylulose-5-phosphat reagiert, welches zusammen mit der Ribose-5-phosphat durch die Transketolase (*TKL1*) zu Seduheptulose-7-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat umgewandelt wird. Das Seduheptulose-7-phosphat gelangt in den Calvin-Zyklus, während aus dem Glycerinaldehyd-3-phosphat in der Glykolyse Pyruvat entsteht (Wohlbach *et al.*, 2011; modifiziert).

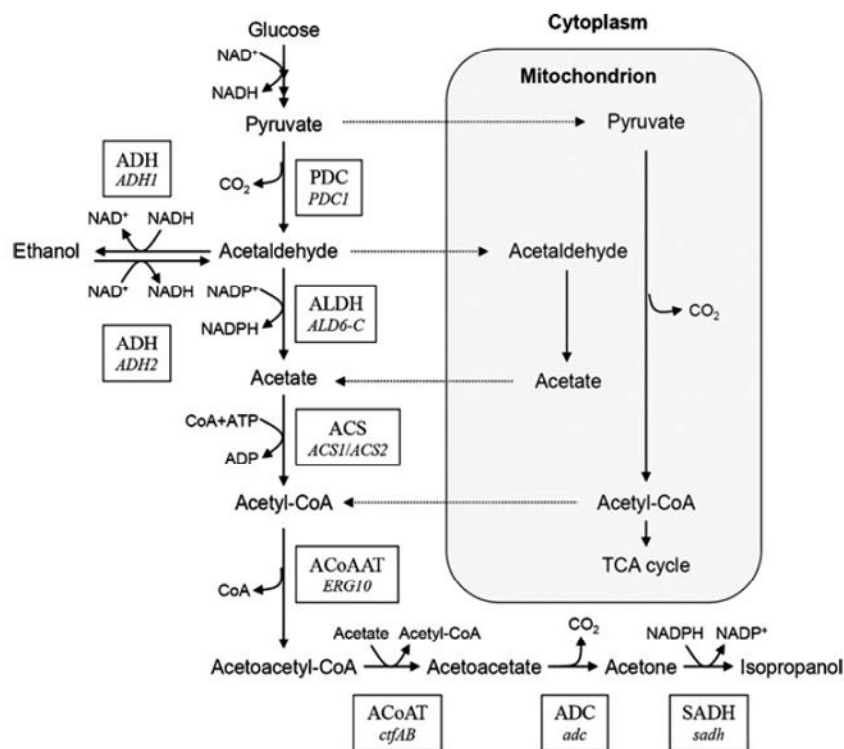


Abb. 1.5: Stoffwechselweg für die Isopropanol-Produktion in Hefe. Gezeigt sind sowohl die Gene in *C. utilis* (groß und kursiv) als auch die Gene in den Bakterien *C. acetobutylicum* und *C. beijerinckii* (klein und kursiv). ADH: Alkoholdehydrogenase, PDC: Pyruvatdecarboxylase, ACS: Acetyl-CoA-Synthetase, ALDH: Acetaldehyd-Dehydrogenase, ACoAAT: Acetyl-CoA-Acetyltransferase, ACoAT: Acetoacetyl-CoA-Transferase, ADC: Acetoacetat-Decarboxylase, SADH: primäre/sekundäre Alkoholdehydrogenase (Tamakawa *et al.*, 2013a).

Die Produktion von L-Laktat, Monomer des Biopolymers Polylactid, welches als erneuerbarer Rohstoff und Alternative für die auf Erdöl-basierenden Kunststoffe gilt, gewinnt immer mehr an Aufmerksamkeit (Ikushima *et al.*, 2009c). Für die Produktion von L-Laktat in *C. utilis* wurde zunächst eine *PDC1*-Nullmutante mit Hilfe des *Cre-loxP*-Systems erstellt. Die Herstellung des auxotrophen Stammes erfolgte wie bereits schon für die *URA3*-Nullmutante beschrieben, wo ebenfalls vier Disruptionsrunden benötigt wurden, um das Gen in allen Allelen in *C. utilis* zu deletieren (Ikushima *et al.*, 2009a). Da *Pdc1* und *L-Ldh* (L-Laktatdehydrogenase) um das Substrat Brenztraubensäure konkurrieren, sollte die Disruption der *PDC1*-Allele zur Erhöhung der L-Laktat-Ausbeute führen. Durch die heterologe Expression des *LDH*-Gens aus *Bos taurus* in der *PDC1*-Nullmutante konnten 103,3 g/l L-Laktat aus 108,7 g/l Glukose produziert werden (Ikushima *et al.*, 2009c). Für die Produktion von L-Laktat aus der Pentose Xylose in *C. utilis* wurde das bereits für die Ethanol-Produktion verwendete System, in welchem neben dem mutierten *CsheXYL1* (für Xylosereduktase) die Gene *CsheXYL2* (für Xylitoldehydrogenase) und *PsXYL3* (für Xylulosekinase) heterolog exprimiert werden, in die *PDC1*-Nullmutante transformiert (Tamakawa *et al.*, 2011; Tamakawa *et al.*, 2012). Mit diesem Expressionssystem wurden 93,9 g/l L-Laktat aus 105 g/l Xylose in *C. utilis* hergestellt (Tamakawa *et al.*, 2012).

1.3 Reporterproteine GFP und CalB

Reporterproteine wie z. B. fluoreszierende Proteine (FP), Lipase B aus *C. antarctica* (CalB) und β -Galaktosidase (LacZ) sind wichtige molekulare Werkzeuge der heutigen Mikrobiologie. Sie werden für verschiedenste Untersuchungen zu Proteinsynthese, -lokalisierung, Protein-Protein-Interaktionen und vielen weiteren Anwendungen eingesetzt. Für die Wahl des geeigneten Reporters müssen unter anderem die Umgebungsbedingungen, die Stabilität des Proteins, die Sensitivität und die einfache und zuverlässige Detektierbarkeit berücksichtigt werden.

1.3.1 Green Fluorescent Protein (GFP)

Das "Grün fluoreszierende Protein" (green fluorescent protein, GFP) wurde in der Qualle *Aequorea victoria* identifiziert. Es besteht aus 238 Aminosäuren (26,9 kDa) und besitzt eine zylindrische Form, welche von 11 β -Faltblättern gebildet werden und in dessen Inneren sich eine α -Helix befindet (Abb. 1.6) (Ormo *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Die sich in der Mitte der α -Helix befindliche Chromophor-Gruppe 4-(p-Hydroxybenzyliden)-Imidazolin-5-on wird in mehreren Schritten bestehend aus Faltung, Zyklisierung und Oxidation von den drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin an den Positionen 65 bis 67 gebildet (Heim *et al.*, 1994). Die Ausbildung der Fluoreszenz ist dabei mit einem zeitintensiven Schritt, der Oxidation an der Hydroxybenzyl-Seitenkette des Tyrosins, verbunden (Cubitt *et al.*, 1995). Dieser letzte Schritt zur Bildung des Chromophors kann je nach Bedingungen zwei bis vier Stunden in Anspruch nehmen (Reid und Flynn, 1997). Diese Tatsache und auch die Abhängigkeit von der Gegenwart von Sauerstoff sollte bei der Verwendung von GFP als Reporterprotein beachtet werden. GFP besitzt ein Haupt-Absorptionsmaximum bei 395 nm und ein kleineres bei 475 nm, so wie ein Emissionsmaximum bei 508 nm (Tsien, 1998).

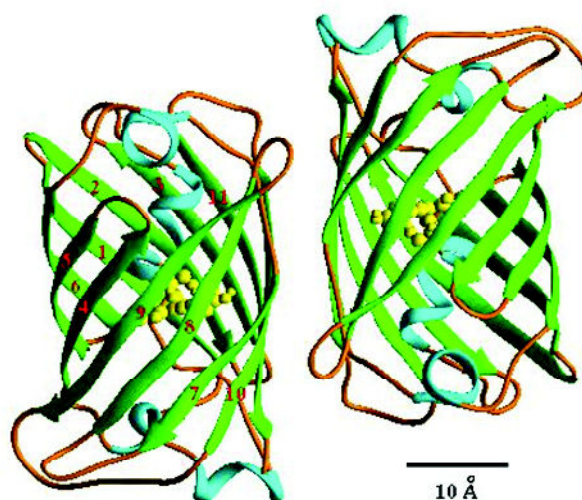


Abb. 1.6: Struktur von GFP. Anordnung der 11 β -Faltblätter (grün) und kurze Abschnitte der α -Helices (blau) zu einem Zylinder, in dessen Mitte sich das Chromophor (gelb) befindet (Yang *et al.*, 1996).

Weitere Eigenschaften wie z. B. die Fluoreszenzabnahme aufgrund der verschlechterten Proteinfaltung bei 37 °C und die Neigung zur Aggregatbildung erschwerten jedoch die Handhabung des Proteins (Arpino *et al.*, 2012). Deshalb entstanden durch genetische Mutationen im Laufe der Zeit verschiedene Varianten von GFP, die sich im Absorptions- und Emmisionsspektrum sowie der Fluoreszenzintensität unterscheiden (Cinelli *et al.*, 2000). Eines des so entstandenen GFPs (enhanced GFP, eGFP) besitzt z. B. eine höhere Faltungseffizienz und damit eine schnellere und höhere Fluoreszenzintensität bei 37 °C, nur noch ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 490 nm und durch die Kodonoptimierung eine höhere Fluoreszenzausbeute bei der Expression in Säugerzellen (Arpino *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 1996).

Außerdem wurden verschiedenste Farbvarianten von fluoreszierenden Proteinen konstruiert, wie z. B. das YFP (yellow fluorescent protein), das RFP (red fluorescent protein) und das CFP (cyan fluorescent protein). Da bei der Bildung des Chromophors von GFP und GFP-Varianten molekularer Sauerstoff benötigt wird, wurde ein Sauerstoff-unabhängiges, fluoreszierendes Reporterprotein, FbFP (flavin mononucleotide-based fluorescent protein), entwickelt (Drepper *et al.*, 2007; Tielker *et al.*, 2009).

1.3.2 *C. antarctica* Lipase B (CalB)

Die Enzymgruppe der Lipasen (EC 3.1.1.3) hydrolysiert Triglyceride in Wasser-Öl-Gemischen. Triglyceride oder auch Triacylglycerole bestehen aus drei Acyl-Säureresten, welche mit Glycerin verestert sind. Lipasen unterscheiden sich von den Esterasen darin, dass Esterasen nur wasserlösliche Substrate hydrolysieren, während Lipasen die wasserunlöslichen bevorzugen (Schmid, 1999). In wässrigen Lösungen hydrolysieren sie Ester und in organischen Lösungen katalysieren sie unter anderem die Veresterung oder die Umesterung (Blank *et al.*, 2006). Die Lipase B aus *C. antarctica* (CalB) gehört zu den α/β -Hydrolasen und sie besitzt ein aktives Zentrum bestehend aus den

Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure (Uppenberg *et al.*, 1994). Das aktive Zentrum ist dabei von außen durch einen engen Trichter zugänglich (Uppenberg *et al.*, 1994). Die Lipase CalB, aufgebaut aus 10 α -Helices und 9 β -Faltblättern, hat eine Molekularmasse von ungefähr 33 kDa und besteht aus 318 Aminosäuren (Abb. 1.7; Uppenberg *et al.*, 1995).

CalB besitzt ein Signalpeptid bestehend aus 18 Aminosäuren, welches mit 7 Aminosäuren einer Pro-Sequenz fusioniert ist (Vadhana *et al.*, 2013). Desweiteren befindet sich am C-terminalen Ende der Pro-Sequenz eine Erkennungssequenz (K-R) für die Kex2-Protease. Diese Signalsequenz von 25 Aminosäuren dient der Sekretion der Lipase B aus der Zelle, welche dann als N-glykosylierte Form extrazellulär vorzufinden ist. Die Glykosylierung erfolgt an das Asparagin in Position 74 der Aminosäuresequenz (Uppenberg *et al.*, 1994).

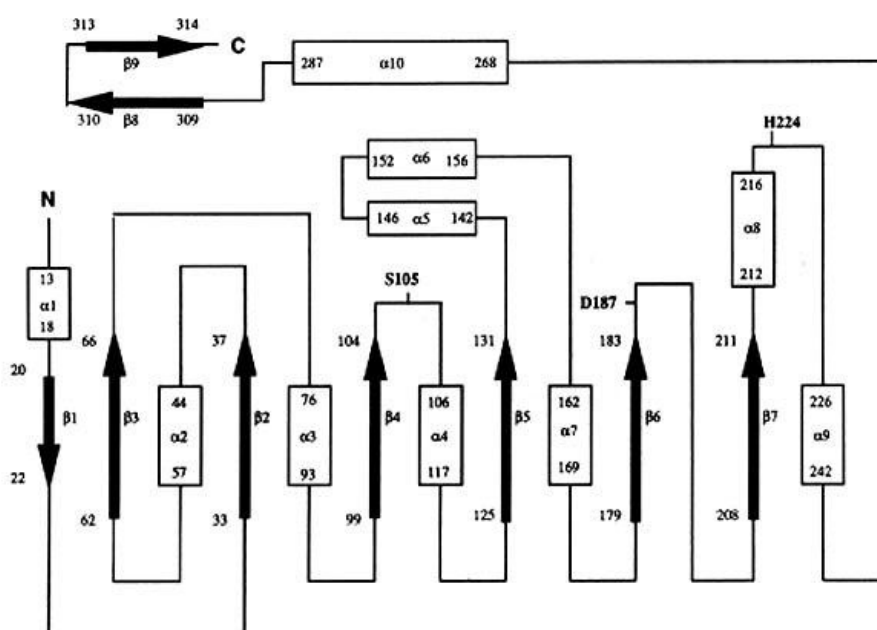


Abb. 1.7: Schema der Sekundärstruktur von CalB. Abgebildet sind 10 α -Helices und 9 β -Faltblätter von CalB, wobei hier die Signalsequenz nicht aufgeführt ist (Uppenberg *et al.*, 1995).

Die heterologe Expression von CalB gelang bereits in verschiedenen Mikroorganismen. Dabei wurde CalB entweder mit der *C. antarctica*-eigenen Signalsequenz oder aber mit der für den Wirtsorganismus, z. B. *S. cerevisiae*-, *P. pastoris*- oder *A. oryzae*-spezifischen Sequenz sekretiert (Rotticci-Mulder *et al.*, 2001; Suen *et al.*, 2004; Tamalampudi *et al.*, 2007). Ein häufig verwendeter Wirtsorganismus ist *P. pastoris*, da bereits viele verschiedene Expressionssysteme existieren. Vadhana *et al.* (2013) verglichen die Sekretion der *C. antarctica* Lipase B mit der nativen Signalsequenz und der Präpro-Sequenz des α -Faktors aus *S. cerevisiae* unter der Kontrolle des AOX1-Promotors. Dabei wurde eine dreifach höhere Lipaseaktivität im Medium gemessen, wenn CalB mit Hilfe der nativen Signalsequenz sekretiert wurde. Desweiteren konnte mit der nativen Sequenz eine effektivere Sekretion beobachtet werden, da im Fall der α -Präpro-Sequenz teilweise nicht-prozessiertes CalB im Medium nachgewiesen wurde. Vadhana *et al.* (2013) vermuteten, dass das Valin vor der Kex2-Erkennungssequenz in der Pro-Sequenz von *C. antarctica* (V-K-R) dazu führt, dass die Protease bevorzugt dort schneidet, während sich in der α -Präpro-Sequenz an dieser Position ein

Glutamat (E-K-R) befindet. Neben der effektiven Sekretion von CalB in *P. pastoris* konnten Vadhana *et al.* (2013) zeigen, dass außerdem die native Sekretionssequenz von *C. antarctica* zu einer höheren Lipaseausbeute führt als bei der Sekretion mit der α -Präpro-Sequenz von *S. cerevisiae*. Im Verlaufe dieser Arbeit und einer parallelen Arbeit (Bürth, 2013) wurde auch *C. utilis* als Wirt für die heterologe Expression von *CALB* etabliert.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Futterhefe *C. utilis*, welche den GRAS-Status besitzt, wird bereits seit vielen Jahren für verschiedene heterologe Genexpressionen eingesetzt. Die wachsende industrielle Bedeutung von *C. utilis* gegenüber anderen bekannten Hefen wie *S. cerevisiae* beruht insbesondere auf der Eigenschaft, unterschiedliche und kostengünstige Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen, wie z. B. Xylose und Nitrate zu verwerten. Ziel dieser Arbeit war es, neue Expressionssysteme für die heterologe Proteinproduktion in *C. utilis* zu entwickeln. Besonderes Interesse galt dabei neben der Etablierung eines neuen Resistenz-Selektionsmarkers (*sat1*), die Entwicklung eines Expressionsvektors mit einem durch Xylose-induzierbaren Promotor. Da eine enge phylogenetische Verbindung zwischen *C. utilis* und *P. jadinii* festgestellt wurde, sollte das Expressionssystem ebenfalls in *P. jadinii* untersucht und mit *C. utilis* verglichen werden. Ein weiteres Ziel war es, eine extrazelluläre Xylanase in *C. utilis* heterolog zu exprimieren, so dass dieser rekombinante Stamm Xylan als Kohlenstoffquelle nutzen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Merck KGaA (inkl. Merck Millipore; Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), VWR International GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica GmbH & Co. (Heidelberg), Grüssing GmbH (Filsum), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main), BD (Heidelberg), Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim), Promega Corporation (Madison), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Thermo Fisher Scientific GmbH (inkl. Pierce; Rockford), Agilent Technologies Deutschland GmbH (inkl. Stratagene; Böblingen), Bio-Budget Technologies GmbH (Krefeld), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Life Technologies GmbH (inkl. Invitrogen und Ambion; Darmstadt), Qiagen (Hilden), WERNER BioAgents (Jena), Zymo Research Europe GmbH (Freiburg) und Fluka (Buchs) bezogen. Wenn nicht anders vermerkt, wurden diese in der Güteklasse reinst oder p.a. verwendet.

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 *E. coli*-Stämme

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α F'	F'[\Phi80 Δ (<i>lacZ</i>)M15] Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1</i> <i>endA1 hsdR17 r_K⁻ m_K⁺ supE44 thi-1 gyrA1 relA1</i>	Hanahan, 1983; Woodcock et al., 1989
Top10F'	F'[<i>lacI^q</i> Tn10(<i>tet^R</i>)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR nupG recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ ⁻	Invitrogen, Darmstadt

2.2.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

LB (Vollmedium): 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 1 % Trypton

Zur Herstellung von Festmedium wurden zusätzlich 2 % Agar eingesetzt. Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte bei 37 °C. Zur Selektion basierend auf der plasmidkodierenden Ampicillinresistenz erfolgte die Antibiotikazugabe nach dem Autoklavieren (100 µg/ml Endkonzentration). Für die Selektion aufgrund der *lacZ*-Aktivität wurden zusätzlich 50 µg/ml IPTG und 50 µg/ml X-Gal dazugegeben.

2.2.3 Hefestämme

Tab. 2.2: In dieser Arbeit verwendete *C. utilis*-Stämme

<i>C. utilis</i> -Stamm	Genotyp	Quelle
DSM2361	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig
MKCu1	Wie DSM2361, aber mit pMC1 (<i>TDH3p</i>)	diese Arbeit
MKCu2 (1, 2, 3)	Wie DSM2361, aber mit pMC2 (<i>TDH3p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKCu3	Wie DSM2361, aber mit pMC3 (<i>GXS1p</i>)	diese Arbeit
MKCu4 (1, 2, 3)	Wie DSM2361, aber mit pMC4 (<i>GXS1p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKCu5 (2, 5, 7)	Wie DSM2361, aber mit pMC5 (<i>GXS1p-CALB-3xHA</i>)	diese Arbeit
MKCu6 (1, 2, 3)	Wie DSM2361, aber mit <i>HIS3::pMC6 (TDH3p-GFP)</i>	diese Arbeit
MKCu6-9	Wie DSM2361, aber mit <i>HIS3::pMC6 (TDH3p-GFP)</i> , Integration in alle <i>HIS3</i> -Allele	diese Arbeit
MKCu7	Wie DSM2361, aber mit pMC7 (<i>XDH1p</i>)	diese Arbeit
MKCu8 (1, 2, 3)	Wie DSM2361, aber mit pMC8 (<i>XDH1p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKCu9	Wie DSM2361, aber mit pMC9 (<i>PGK1p</i>)	diese Arbeit
MKCu10 (1, 2, 3)	Wie DSM2361, aber mit pMC10 (<i>PGK1p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKCu11	Wie DSM2361, aber mit pMC11 (<i>ACT1p</i>)	diese Arbeit
MKCu12 (1, 2, 3)	Wie DSM2361, aber mit pMC12 (<i>ACT1p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKCu13	Wie DSM2361, aber mit pMC13 (<i>PMA1p</i>)	diese Arbeit
MKCu14 (1, 2, 3)	Wie DSM2361, aber mit pMC14 (<i>PMA1p-GFP</i>)	diese Arbeit

<i>C. utilis</i>-Stamm	Genotyp	Quelle
MKCu15	Wie DSM2361, aber mit pMC15 (<i>PMT1p</i>)	diese Arbeit
MKCu16 (1, 2, 3)	Wie DSM2361, aber mit pMC16 (<i>PMT1p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKCu17 (1, 2)	Wie DSM2361, aber mit pMC17 (<i>TDH3p-xynA*⁻-3xHA</i>)	diese Arbeit

Tab. 2.3: In dieser Arbeit verwendete *P. jadinii*-Stämme

<i>P. jadinii</i>-Stamm	Genotyp	Quelle
CBS1600	Wildtyp	CBS, Utrecht, Niederlande
MKPj1	Wie CBS1600, aber mit pMC1 (<i>TDH3p</i>)	diese Arbeit
MKPj2 (1, 2, 3)	Wie CBS1600, aber mit pMC2 (<i>TDH3p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKPj3	Wie CBS1600, aber mit pMC9 (<i>PGK1p</i>)	diese Arbeit
MKPj4 (1, 2, 3)	Wie CBS1600, aber mit pMC10 (<i>PGK1p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKPj5	Wie CBS1600, aber mit pMC11 (<i>ACT1p</i>)	diese Arbeit
MKPj6 (1, 2, 3)	Wie CBS1600, aber mit pMC12 (<i>ACT1p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKPj7	Wie CBS1600, aber mit pMC13 (<i>PMA1p</i>)	diese Arbeit
MKPj8 (1, 2, 3)	Wie CBS1600, aber mit pMC14 (<i>PMA1p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKPj9	Wie CBS1600, aber mit pMC15 (<i>PMT1p</i>)	diese Arbeit
MKPj10 (1, 2, 3)	Wie CBS1600, aber mit pMC16 (<i>PMT1p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKPj11	Wie CBS1600, aber mit pMC3 (<i>GXS1p</i>)	diese Arbeit
MKPj12 (1, 2, 3)	Wie CBS1600, aber mit pMC4 (<i>GXS1p-GFP</i>)	diese Arbeit
MKPj13 (3, 4, 5)	Wie CBS1600, aber mit pMC5 (<i>GXS1p-CALB-3xHA</i>)	diese Arbeit

Tab. 2.4: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

<i>S. cerevisiae</i> -Stamm	Genotyp	Quelle
MC45-5A	<i>MATα ura3-52 leu2-3, 112 trp1-289 GAL4</i>	Stammsammlung Molekulare Mykologie, Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf
TSY812	<i>MATα lys2 can1 leu2 hom3 ura3</i>	Stammsammlung Molekulare Mykologie, Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf
DE3005	<i>MATα/MATα lys2/lys2 ade2 his1 trp1 can1 leu2 hom3 ura3</i>	Stammsammlung Molekulare Mykologie, Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf
JT23727	baker's yeast (triploid)	Fleischmann's, Chesterfield, USA
MKSc1	Wie MC45-5A, aber mit pMC1 (<i>TDH3p</i>)	diese Arbeit
MKSc2	Wie MC45-5A, aber mit pMC2 (<i>TDH3p-GFP</i>)	diese Arbeit

Tab. 2.5: In dieser Arbeit verwendete *C. albicans*-Stämme

<i>C. albicans</i> -Stamm	Genotyp	Quelle
CAF2-1	<i>URA3/ura3Δ::imm434</i>	Fonzi und Irwin, 1993
MKCa1	Wie CAF2-1, aber mit pMC1 (<i>TDH3p</i>)	diese Arbeit
MKCa2	Wie CAF2-1, aber mit pMC2 (<i>TDH3p-GFP</i>)	diese Arbeit

Tab. 2.6: In dieser Arbeit verwendeter *P. pastoris*-Stamm

<i>P. pastoris</i> -Stamm	Genotyp	Quelle
X-33	Wildtyp	Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.2.4 Medien und Anzucht von Hefestämmen

YPD/YPX (Vollmedium): 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose oder Xylose

SMD/SMX (Minimalmedium): 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat), Aminosäurelösung (50 ml/l, s. u.), 2 % Glukose oder Xylose

Zur Herstellung von festen Nährböden wurde dem Medium 2 % Agar zugesetzt. Die Kultivierung der Hefestämme erfolgte bei 30 °C. Zur Selektion basierend auf der Nourseothricin-Resistenz aufgrund des auf dem Plasmid vorhandenen *sat1*-Gens kodierend für die N-Acetyltransferase wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 10 µg/ml (Endkonzentration) Nourseothricin zugegeben. Zur Selektion von *C. albicans*-Transformanten wurden 200 µg/ml (Endkonzentration) Nourseothricin eingesetzt.

Bei Verwendung des angereicherten Minimalmediums (synthetic minimal medium, SM), wurde diesem zusätzlich eine Aminosäurelösung nach Zimmermann (1975) hinzugegeben. Dafür wurden 1 l Medium 50 ml einer Stammlösung zugesetzt. Die Stammlösung setzte sich wie folgt zusammen (pro Liter):

0,28 g Adenin	1,2 g Phenylalanin	0,48 g Arginin
0,72 g Threonin	0,48 g Histidin	0,48 g Tryptophan
1,44 g Isoleucin	0,72 g Tyrosin	0,72 g Lysin
0,48 g Uracil	0,44 g Leucin	0,72 g Valin
0,48 g Methionin		

2.3 Plasmide und Primer

2.3.1 Plasmide

Tab. 2.7: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmide	Beschreibung	Referenz
pGEM-T	<i>f1 ori, Amp^R, lacZ</i>	Promega Corporation, Madison
pSat1-3HA	Wie p3HA-URA3 (Setiadi et al., 2006), aber enthält <i>CaACT1p-sat1-CaACT1t</i> von pFC1 anstatt <i>PstI-BglII URA3</i> Fragment	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Plasmide	Beschreibung	Referenz
pSat1-3HA-ARS	Wie pSat1-3HA, aber mit CaARS2 (<i>KpnI</i>) aus pARS/AatII	diese Arbeit
pARS/AatII	CaARS2	Sonneborn et al., 1999
pGFP-URA3	GFP-URA3	Gerami-Nejad et al., 2001
pMA-T	<i>Amp^R</i> , <i>xynA*</i>	GeneArt, Life Technologies GmbH
pMC1	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuTDH3p	diese Arbeit
pMC2	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuTDH3p-GFP	diese Arbeit
pMC3	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuGXS1p	diese Arbeit
pMC4	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuGXS1p-GFP	diese Arbeit
pMC5	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuGXS1p-CALB ^{3xHA}	diese Arbeit
pMC6	Wie pMC2, aber mit CuHIS3 (<i>KpnI</i>) statt CaARS2	diese Arbeit
pMC7	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuXDH1p	diese Arbeit
pMC8	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuXDH1p-GFP	diese Arbeit
pMC9	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuPGK1p	diese Arbeit
pMC10	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuPGK1p-GFP	diese Arbeit
pMC11	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuACT1p	diese Arbeit
pMC12	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuACT1p-GFP	diese Arbeit
pMC13	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuPMA1p	diese Arbeit
pMC14	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuPMA1p-GFP	diese Arbeit
pMC15	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuPMT1p	diese Arbeit
pMC16	Wie pSat1-3HA-ARS mit CuPMT1p-GFP	diese Arbeit
pMC17	Wie pSat1-3HA-ARS mit TDH3p-xynA* ^{-3xHA}	diese Arbeit

2.3.2 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Tab. 2.8: In dieser Arbeit verwendete Primer

Primer	Sequenz
ACT1p-FW-NarI	5'-TTGGCGCCGCTTCGCCTTTCCCAAATTC-3'
ACT1p-RV-HindIII	5'-GGAAGCTTACCGGAACCGTTATCAATC-3'
GAPDHp-FW-NarI	5'-TTGGCGCCCTTACAGCGAGCACTCAAATC-3'
GAPDHp Rev	5'-CCAAGCTTTATGTTGTTTGTAAAGTGTG-3'
PGK1p-FW-NarI	5'-GGGGGCGCCTTGTCTTTTAGGAG-3'

Primer	Sequenz
PGK1p-RV-HindIII	5'-CCCAAGCTTCTTATCCGCCAGTATG-3'
PMA1p-FW-NarI	5'-TTGGCGCCTAATCAGCGACCGTCCTCCATC-3'
PMA1p Rev	5'-CCCAAGCTTCTATATCAATGGTTAG-3'
PMT1p-FW-NarI	5'-TTGGCGCCTGGCCCCAAATTCGATCCCTG-3'
PMT1p-RV-HindIII	5'-GGAAGCTTCGTATTCTACTCAAGATACAAG-3'
XDH1p-Fw-NarI	5'-TTGGCGCCCTTCGTTTGAATTGGCTG-3'
XDH1p-Rv-HindIII	5'-GGAAGCTTAGTCAAAGCGATACACAAGC-3'
GXS1p-Fw-NarI	5'-TTGGCGCCACAAGGGAATTTGAACAATC-3'
GXS1p-Rv-HindIII	5'-GGAAGCTTTTTGTAATTGATATATCAG-3'
CaARS-KpnI/for	5'-ATTGGTACCTCCGGGTAGCGATGAG-3'
CaARS-KpnI/rev	5'-ATTGGTACCGTCCAGGACCGGCCAGAC-3'
CaGFP FW HindIII	5'-TTAAGCTTATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC-3'
CaGFP+Stop RV SphI	5'-GGGCATGCTTATTTGTACAATTCATCCATAC-3'
CaGFP+Stop RV Sall	5'-GGGTCGACTTATTTGTACAATTCATCCATAC-3'
CALB Fw	5'-GGAATTCATAATGAAGTTGTTGTCCTTGAC-3'
CALB Rv	5'-CGATAACGAACAATGGACCAC-3'
XYNA Fw HindIII	5'-TTAAGCTTATGAGATTCCCATCCATC-3'
XYNA Rv SphI	5'-GGGCATGCTCAAAGCGTTAGCG-3'
CuLEU2 Fwd KpnI	5'-TTGGTACCATGCCAGAGAAAACAATTG-3'
CuLEU2 Rev KpnI	5'-GGGGTACCAGCCAAGATCTTCTTGACG-3'
CuHIS3 Fwd KpnI	5'-TTGGTACCATGGCTGAAACGAACGGGG-3'
CuHIS3 Rev KpnI	5'-GGGGTACCGAACAAAACACCCTTTGTTG-3'
CuHIS3 +stop Rev KpnI	5'-GGGGTACCCTAGAACAAAACACCCTTTG-3'
CuHIS4 Fwd KpnI	5'-TTGGTACCATGCCATTTCCAGTGCTTC-3'
CuHIS4 Rev KpnI	5'-GGGGTACCAACAAAATCTTTGGACAAG-3'
CuXKS1 Fw	5'-ATGAGCTACTACTTCGGCTTG-3'
CuXKS1 Rv	5'-TCATCTTTCAAGAACAGTCTC-3'
Sonde CuHIS3 Rev	5'-CAGTGAGCGCAACGCAATTAATG-3'
Sonde CuTDH3p Fwd	5'-ACATGCAGCTCCCGGAGACG-3'
CaGFP ORF Rev	5'-GTAAGTAGCATCACCTTCACCT-3'
pSAT001	5'-AAGATGTTAATTAACCCGGG-3'
pSAT002	5'-TGTGAAATACCGCACAGATG-3'
pSAT003	5'-GATGCCGCATAGTTAAGCCA-3'
pSAT004	5'-CATAGTCCGGGACGTCATAG-3'
qPCR:	
RT-CuACT1 Fw	5'-CATTGCTCCACCAGAGAGAA-3'

Primer	Sequenz
RT-CuACT1 Rv	5'-GTTGGAAAGTGGACAAGGAAG-3'
RT-CuXYL1 Fw	5'-GCCTGGGAGTCATTCCTAAA-3'
RT-CuXYL1 Rv	5'-TCTGTCCAATGAGGAAATCG-3'
RT-CuXDH1 Fw	5'-CAAGGTCAACATCGAGCCTA-3'
RT-CuXDH1 Rv	5'-CCATTGTGCAGGTTGAAGTC-3'
RT-CuXKS1 Fw	5'-TCAAGGCATCATGGAGTGTT-3'
RT-CuXKS1 Rv	5'-CTTGGATTCTTCCATGGTGT-3'
RT-CuGXS1 Fw	5'-TATGCCACATACTCCAAGGC-3'
RT-CuGXS1 Rv	5'-AACCTGAGGCTTGTCAAAGG-3'
RT-CuGXF1 Fw	5'-CGGTGTTAAGGCATGGAAGT-3'
RT-CuGXF1 Rv	5'-TTCCACCTCCTCGGACTTAG-3'
RT-CaGFP Fw	5'-CCAGACAACCATTACTTATCCACT-3'
RT-CaGFP Rv	5'-GCAGTAACAAATTCTAACAAGACCA-3'
RT-ADH1t Fw	5'-GGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAG-3'
RT-ADH1t Rv	5'-GATCTATATTACCCTGTTATCCCTAGC-3'
RT-Sat1 Fw	5'-GCGGCATTGACCTATTCACGTA-3'
RT-Sat1 Rv	5'-CTCCGAGAACCAGTACCAGTA-3'

2.4 FACS-Analyse

Für die FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorting) wurden logarithmisch-wachsende Zellen verwendet. Dafür wurden jeweils 5 ml YPD-Medium mit den Stämmen *C. utilis* DSM2361, *P. jadinii* CBS1600 und den drei *S. cerevisiae*-Referenzstämmen TSY812 (haploid), DE3005 (diploid) und JT23727 (triploid) beimpft und über Nacht bei 30 °C herangezogen. Von den Übernachtskulturen wurde eine Zellmenge entsprechend einer OD₆₀₀ von 1,0 abzentrifugiert (5 min, 2 000 Upm) und in 1 ml 70 % Ethanol aufgenommen. Anschließend wurden 300 µl der so fixierten Zellen mit 3 ml 50 mM Natriumcitrat vermischt und erneut zentrifugiert (5 min, 2 000 Upm). Das Pellet wurde in 500 µl 50 mM Natriumcitrat (0,1 mg/ml RNase A) resuspendiert und 2 h bei 37 °C inkubiert. Für die Färbung wurden 500 µl 50 mM Natriumcitrat (2 µM SytoxGreen; Life Technologies GmbH) zugegeben. Die Messung wurde mit dem FACS Aria (Biosciences, San Jose, USA) von Klaus Meyer (Institut für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt.

2.5 Sensitivitätstest

Zur Untersuchung der Sensitivität von *C. utilis* und *P. jadinii* gegenüber bestimmten Antimykotika wurden YPD-Platten mit den verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Substanzen hergestellt. Für die Analyse wurden Übernachtskulturen von *C. utilis*, *P. jadinii* und den Vergleichsstämmen *S. cerevisiae*, *P. pastoris* und *C. albicans* in 5 ml YPD-Medium bei 30 °C angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ 1,0 verdünnt, welche dann anschließend vier weitere Male 1:10 verdünnt wurden. Von den Verdünnungen wurden je 5 µl auf die YPD-Platten getropft und 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.6 Wachstumsanalysen

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *C. utilis* und *P. jadinii* wurden verschiedene Temperaturen, Kohlenstoffquellen und pH-Bereiche gewählt. Hierzu wurde eine Vorkultur (5-10 ml YPD, SMD oder SMX) mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 30 °C über Nacht bei 110 Upm angereichert. Mit der Vorkultur wurden 100 ml des entsprechenden Mediums auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 30 °C (110 Upm), wahlweise auch bei 37 °C oder 40 °C inkubiert. Zur Untersuchung verschiedener pH-Bereiche wurden pH-Werte von 2,0, 3,0 und 9,0 untersucht. Dabei wurde das Vollmedium (YPD) mit 25 mM Maleat für pH 2,0, 15 mM Citrat für pH 3,0 bzw. 15, 25 und 50 mM CAPSO für pH 9,0 gepuffert. Für die Wachstumsanalyse wurden in regelmäßigen Abständen OD₆₀₀-Messungen durchgeführt und durch die Auftragung der OD₆₀₀-Werte gegen die Zeit die Verdopplungszeit t_D errechnet.

2.7 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren

2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte basierend auf der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979). Dafür wurden zunächst 1,5 bis 3 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Die Zelllyse wurde durch die Zugabe von 300 µl Puffer 2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) erwirkt und mit 300 µl Puffer 3 (3 M KAc pH 5,5) gestoppt. Nach jeder Zugabe wurde die Zellsuspension vorsichtig geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation (13 000 Upm) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 0,7-fachen Volumen an Isopropanol vermischt. Die DNA-Fällung erfolgte durch eine erneute Zentrifugation (25 min, 13 000 Upm, 4 °C). Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem 70 %-igen Ethanol gewaschen (10 min, 13 000 Upm, 4 °C) und bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde die isolierte Plasmid-DNA in 50 µl H₂O_{dest} aufgenommen.

2.7.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefen

Zur Isolierung der chromosomalen DNA aus Hefen wurden zunächst 5 bis 7 ml einer Kultur stationär-gewachsener Zellen abzentrifugiert (5 min, 3 500 Upm) und in 5 ml H₂O_{dest} gewaschen (5 min, 3 500 Upm). Die Zellen wurden in 400 µl SCE (1 M Sorbitol, 0,1 M Natriumcitrat, 10 mM EDTA pH 8) resuspendiert und nach Zugabe von 30 µl Zymolyase (2,5 U/ml; MP Biomedicals, LLC., Solon, USA) 30 min bei 30 °C inkubiert. Die pelletierten Zellen (5 min, 3 500 Upm) wurden in 500 µl 50 mM EDTA und 50 µl 10 % SDS aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension 30 min bei 72 °C inkubiert und nach Zugabe von 100 µl 5 M Kaliumacetat pH 6,0 eine Stunde auf Eis gestellt. Die so aufgeschlossenen Zellen wurden bei 15 min bei 13 000 Upm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde diesem das 2,5-fache Volumen an eiskaltem 100 %-igen Ethanol zugegeben und entweder bei -20 °C über Nacht oder bei -70 °C für 1 h inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 13 000 Upm, 4 °C) wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und zur 30-minütigen RNase-Behandlung (80 µg RNase A) bei 37 °C in 400 µl 150 mM Natriumcitrat pH 5,7 resuspendiert. Für die nachfolgende Phenol-Chloroform-Fällung wurde zunächst zwei Mal das gleiche Volumen an Phenol-Chloroform-Isoamyl (Carl Roth GmbH & Co. KG) zugegeben, mindestens 30 sek stark vermischt und durch kurzes Abzentrifugieren (5 min, 13 000 Upm, 4 °C) in eine organische und eine wässrige Phase, die die chromosomale DNA enthält, getrennt. Beim dritten Mal wurde nur Chloroform verwendet. Aus der danach gewonnenen wässrigen Phase wurde die DNA schließlich durch eine Ethanol-Fällung isoliert. Dafür wurde erneut das 2,5-fache Volumen an eiskaltem 100 %-igen Ethanol hinzugegeben und bei -20 °C über Nacht oder für 1 h bei -70 °C inkubiert. Die nach der anschließenden Zentrifugation (15 min, 13 000 Upm, 4 °C) pelletierte DNA wurde zwei Mal mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen (10 min, 13 000 Upm, 4 °C), bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl H₂O_{dest} aufgenommen. Die Konzentration und die Qualität der chromosomalen DNA wurden mit Hilfe des NanoDrops (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) gemessen und durch die Auftrennung im Agarosegel überprüft.

2.7.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefen

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Hefen wurden Zellen aus 50 ml Kultur geerntet (10 min, 3 500 Upm, 4 °C) und in flüssigem Stickstoff getropft. Diese Zellkugeln wurden dann zusammen mit einer Wolframcarbid-Kugel in spezielle Teflonbehälter gegeben und 2 min bei 2 600 Upm im Mikro-Dismembrator (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) aufgeschlossen. Das so erhaltene Pulver wurde in 1 ml Trizol (Invitrogen) aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 13 000 Upm, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,4-fachem Volumen Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde 15 sek gemischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die farblose, wässrige Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 0,5-fachem Volumen Isopropanol vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 13 000 Upm, 4 °C) wurde das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen (10 min, 13 000 Upm, 4 °C) und getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl DEPC-H₂O resuspendiert und die darin enthaltene RNA durch die Zugabe von 500 µl Lithiumchlorid-Puffer (4 M LiCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM EDTA) bei -20 °C über

Nacht gefällt. Die Suspension wurde 20 min bei 13 000 Upm (4 °C) zentrifugiert und das Pellet zwei Mal in 70 % Ethanol gewaschen (10 min, 13 000 Upm, 4 °C). Die RNA wurde schließlich getrocknet und in 50 bis 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die Konzentration und die Qualität der isolierten RNA wurden mit Hilfe des NanoDrops und durch die Auftrennung im Agarosegel bestimmt.

2.7.4 Restriktion

Für die Restriktion von DNA wurden Enzyme der Firmen Roche und New England Biolabs verwendet. Die Enzyme wurden nach Herstellerangaben mit dem entsprechenden Puffer eingesetzt.

2.7.5 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in einen linearisierten Vektor wurde mit Hilfe des Quick Ligation Kits von New England Biolabs nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 50 ng Plasmid-DNA und die dreifache molare Menge des einzubringenden Fragments verwendet. Zur Verbesserung der Ligation wurde der Ligationsansatz vor Zugabe der Quick T4 DNA Ligase 10 min bei 50 °C inkubiert.

2.7.6 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Die Dephosphorylierung von Plasmid-DNA diente dazu, um eine Religation des linearisierten Plasmids zu verhindern und die Ligationseffizienz mit einem DNA-Fragment zu erhöhen. Dafür wurde die Antarktische Phosphatase (New England Biolabs) nach Protokoll des Herstellers verwendet.

2.7.7 TA-Cloning in den Vektor pGEM-T

Zur Subklonierung von PCR-Fragmenten wurde das pGEM[®]-T Vector System der Firma Promega verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.7.8 Auftrennung über Gelelektrophorese

Für die Untersuchung von DNA und RNA wurden diese in einem Agarosegel aufgetrennt. Dafür wurde Agarose in der entsprechenden Konzentration (0,8-2 % (w/v)) in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8) durch kurzes Erhitzen gelöst und wahlweise mit oder ohne 2,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml; AppliChem) in die Gelkammer gegossen. Nach Erkalten der Agarose wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel mit 1x TAE-Puffer bedeckt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 34,8 % (v/v) Glycerin) versetzt und in die Taschen gegeben. Nach der Auftrennung bei 90 V für ungefähr 45 min erfolgte die Detektion unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm.

2.7.9 DNA- Größenstandard

Die DNA-Größe in einem Agarosegel wurde mit Hilfe eines DNA-Größenstandards bestimmt. Dafür wurde der GeneRuler 1 kb DNA ladder der Firma Fermentas mit den folgenden definierten Bandengrößen verwendet (bp): 250, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 3 500, 4 000, 5 000, 6 000, 8 000 und 10 000. Wahlweise wurde λ -DNA (Fermentas) mit *HindIII* geschnitten und als Größenstandard mit den folgenden Bandengrößen benutzt (bp): 125, 564, 2 027, 2 322, 4 361, 6 557, 9 416 und 23 130.

2.7.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers.

2.7.11 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte photometrisch mit dem NanoDrop 2000 bei 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Die Berechnung der Konzentration beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz, wobei eine Extinktion bei 260 nm von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA und 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA entspricht (Müller *et al.*, 1993).

2.7.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Neben der Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration mittels NanoDrop kann diese auch direkt im Agarosegel abgeschätzt werden. Dafür wird nach der gelelektrophoretischen Auftrennung die zu untersuchende Bande mit den Banden des Größenstandards, dessen Konzentrationen bekannt sind, verglichen, um eine ungefähre Aussage zu treffen.

2.7.13 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNA-Sequenzen wurde eine DNA-Probe zu der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) verschickt. Dafür wurden 600 ng bis 2 μg in einem Endvolumen von 20 μl eingesetzt.

2.7.14 Southern-Blot-Analyse

2.7.14.1 Sondenmarkierung

Die Sondenmarkierung erfolgte mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kits der Firma Roche nach Anweisungen des Herstellers.

2.7.14.2 Nukleinsäuretransfer auf eine Nylonmembran

Das Agarosegel mit der zu untersuchenden genomischen DNA wurde zunächst in 0,25 M HCl und danach in 0,4 M NaOH geschwenkt. Das HCl sorgt dafür, dass die DNA aufgrund von Depurinierung in kleine Fragmente gespalten und somit die Übertragung auf die Nylonmembran erleichtert wird. Der Transfer erfolgte mit Hilfe von 0,4 M NaOH, welches aufgrund der wirkenden Kapillarkräfte die DNA aus dem Gel auf die Nylonmembran übertrug. Beim Aufbau ist zu beachten, dass die Whatman-Papiere vor Verwendung in die Transferlösung getaucht und entstehende Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten vorsichtig mit einer Glaspipette entfernt werden. Der Transfer wurde über Nacht oder für mindestens 2,5 h durchgeführt. Abschließend wurde die Membran durch kurzes Schwenken in 4x SSC neutralisiert und die übertragene DNA durch eine 3-minütige UV-Behandlung fixiert.

2.7.14.3 Hybridisierung und Detektion

Für die Hybridisierung der Sonde an die gewünschte komplementäre Sequenz musste die Membran vorher mindestens 15 min bei 65 °C mit der Hybridisierungslösung (12,5 ml 20x SSC, 5 ml 10 % Roche blocking reagent-Lösung, 500 µl 10 % Lauroylsarcosin-Natriumsalzlösung, 100 µl 10 % SDS, mit H₂O_{dest} auf 50 ml) inkubiert werden. Die Sondenhybridisierung erfolgte für mindestens 6 h oder über Nacht bei 65 °C mit der in Hybridisierungslösung gegebenen Sonde (5-10 µl in 10 ml). Vor Zugabe der Sonde wurden diese kurz aufgekocht (5 min, 95 °C), um das Vorliegen der komplementären Sequenz als Einzelstrang zu gewährleisten. Nach der Hybridisierung wurde die Sondenlösung entfernt und die Membran jeweils für 15 min bei 65 °C in NRW 1 (2x SSC, 0,1 % SDS), NRW 1.1 (1x SSC, 0,1 % SDS) und NRW 2 (0,1x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen. Nach den Waschschrritten erfolgte die weitere Durchführung bei Raumtemperatur. Nach einer kurzen Inkubation im DIG Waschpuffer (5 min), erfolgte die Blockierung der Membran für 30 min mit NRB 2 (1 % Roche blocking reagent in 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M Natriumchlorid, pH 7,5). Anschließend wurde die Membran 30 min in der Antikörperlösung (anti-DIG-AB 1:10 000 in NRB 2) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten (je 15 min) in DIG Waschpuffer wurde die Membran 5 min in NRB 3 (0,01 M Tris/HCl pH 9,5, 0,01 M Natriumchlorid, 0,05 M Magnesiumchlorid) äquilibriert. Schließlich wurde 5 min nach Zugabe der CDP-star Lösung (CDP-star 1:100 in NRB 3) das Chemilumineszenzsignal mit Hilfe des LAS1000 detektiert.

2.7.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.7.15.1 Standard-PCR

Zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis und Faloona (1987) durchgeführt. Diese erfolgten wahlweise in einem Thermozykler (Biometra GmbH, Göttingen) oder in einem Gradientenzykler (Eppendorf, Hamburg). Für die PCR-Reaktionen wurden 10-100 ng DNA-Template, 1 µl 10 mM dNTP-Mix (Fermentas), 2 mM MgCl₂, je 10 µl (5 µM) 5'- und 3'-Primer, 5 µl 10x Puffer und 1-5 U Polymerase angesetzt. Die PCR-Ansätze wurden auf ein Endvolumen von 50 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Zur Verifizierung von DNA-Sequenzen wurde die *Taq*-Polymerase der Firma New England Biolabs nach Herstellerangaben verwendet. Für die Amplifizierung von DNA-Sequenzen zur Klonierung wurde hingegen die Expand™ High

Fidelity-Polymerase der Firma Roche nach Protokoll des Herstellers eingesetzt. Die Zyklenanzahl variierte je nach PCR zwischen 30 und 35. Die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit wurden an die verwendeten Primer bzw. des zu erwartenden PCR-Fragments angepasst. Die PCR-Fragmente wurden, wenn diese für weitere Klonierungsarbeiten verwendet wurden, mit Hilfe des PCR-Purification Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.7.15.2 Kolonie-PCR

Für die Verifizierung von integrierter DNA wurde Zellmaterial von einer Einzelkolonie verwendet. Die Zellen wurden hierfür in 50 µl 0,02 M NaOH resuspendiert und 10 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden diese auf Eis gestellt. Nach einer kurzen Zentrifugation (1 min, 13 000 Upm, 4 °C) wurden 5 µl des Überstandes in einem PCR-Ansatz eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde unter Verwendung der *Taq*-Polymerase (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.7.15.3 Quantitative Real Time-PCR

Die Quantitative Real Time-PCR (qPCR) ermöglicht die Analyse eines DNA-Produktes in Echtzeit. Dabei wird im Prinzip wie bei einer herkömmlichen PCR verfahren, jedoch kann bei der qPCR die Amplifikation des Produktes über die Zeit verfolgt werden. Die Messung beruht auf der Detektion von Fluoreszenzsignalen, die bei der Bindung eines Fluoreszenzmoleküls an das gebildete DNA-Produkt entsteht. Als Substrat wurde entweder SYBR Green oder Eva Green verwendet. Die Messungen wurden im Mx3000P der Firma Agilent Technologies Deutschland GmbH durchgeführt.

1) Bestimmung des Transkriptspiegels eines zu analysierenden Gens

Probenvorbereitung

Für die Durchführung einer qPCR ist es notwendig, dass die mRNA in die komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe der Reversen Transkriptase umgeschrieben wird. Bevor die RNA in der Transkriptionsreaktion verwendet wird, wird zunächst eine DNase I Behandlung durchgeführt.

a) DNase I Behandlung

Für die DNase I Behandlung wurden jeweils 8 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 µl DNase I (Turbo DNase Kit, Ambion) versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin folgte die Reinigung der RNA mit dem RNA clean-up Kit (Zymo Research Europe GmbH) nach Angaben des Herstellers.

b) Reverse Transkription

Von der zuvor aufgereinigten RNA wurden je 1 µg für die Reverse Transkription eingesetzt. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt außerdem 2 µl Oligo(dT), 12,5 µl 2x cDNA Synthese Master Mix (RETROscript® First Strand Synthesis Kit for RT-PCR, Ambion) und außer bei den sogenannten NoRT-Proben je 1 µl Affinity Reverse Transkriptase und RNase Inhibitor (RETROscript® Kit, Ambion; SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen). Zur Primerbindung wurden die Ansätze 5 min bei 25 °C inkubiert, bevor die cDNA Synthese bei 42 °C für 30 min erfolgte. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase 5 min bei 95 °C inaktiviert und mit DEPC-H₂O 1:10

verdünnt. Die NoRT-Proben wurden zur Kontrolle in der qPCR eingesetzt, um die Gegenwart nicht verdauter DNA auszuschließen, die die gemessenen Werte verfälschen könnten.

c) qPCR

Für die qPCR wurde der Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies Deutschland GmbH) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die zuvor erstellten cDNA-Proben wurden im folgenden Ansatz eingesetzt:

- 10 µl cDNA
- 12,5 µl SYBR Green II + ROX
- Je 1 µl Primer
- 0,5 µl DEPC-H₂O

Zur Bestimmung der geeigneten Primer wurde das Programm „GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design“ (www.genscript.com/ssl-bin/app/primer) verwendet. Um eine möglichst genaue Messung zu erreichen, wurden alle Komponenten des Reaktionsansatzes außer der cDNA in einem Master Mix zusammengeführt und in die einzelnen Wells gegeben. Anschließend wurden jeweils 10 µl der cDNA Proben hinzu pipetiert. Alle Proben wurden in einer Dreifachbestimmung (Triplikate) oder zumindest in einer Zweifachbestimmung gemessen. Zur Normalisierung des Transkriptspiegels des zu untersuchenden Gens wurde Aktin als Referenzgen verwendet. Somit wurden alle cDNA Proben ebenfalls mit den Primern RT-CuACT1 Fw und RT-CuACT1 Rv angesetzt. Zunächst wurde die geeignete Primerkonzentration ermittelt, indem die cDNA Proben gepoolt wurden. Von diesem cDNA Pool wurde eine 1:1 000 Verdünnung hergestellt und für die erste Analyse verwendet. Die untersuchten Primerkonzentrationen betragen 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 µM. Das Programm der RT-PCR war wie folgt:

- | | | |
|---------|--------|------------------------|
| - 95 °C | 10 min | } 40 Zyklen |
| - 95 °C | 30 sek | |
| - 60 °C | 1 min | |
| - 95 °C | 1 min | |
| - 55 °C | 30 sek | } Schmelzkurvenanalyse |
| - 95 °C | 30 sek | |

Im ersten Schritt wurde die *Taq*-Polymerase aktiviert, anschließend folgten 40 Amplifikationszyklen. Schließlich wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die spezifische Bindung der Primer und somit das gebildete Produkt zu überprüfen. Zusätzlich wurde die Primereffizienz untersucht. Dafür wurde der cDNA Pool in vier Verdünnungen (1:10 bis 1:10 000) in einer Dreifachbestimmung mit den Primern gemessen. Die Effizienz pro Primerpaar wurde aus der Standardkurve berechnet: $\text{Effizienz} = 10^{-(1/\text{Steigung})}$. Bei jeder Messung wurden ebenfalls die entsprechenden NoRT-Proben und Proben ohne Template (No Template Control, NTC) mit gemessen, um Primerdimer-Bildung und DNA-Kontaminationen ausschließen zu können.

Für die Auswertung der qPCR wurde der sogenannten Ct-Wert (Treshold Cycle) der einzelnen Reaktionen betrachtet. Dieser Ct-Wert gibt den Zyklus an, in dem das Fluoreszenzsignal des Reporter-moleküls zum ersten Mal die Hintergrundfluoreszenz wesentlich übersteigt (Bustin *et al.*, 2009). Der relative Transkriptspiegel wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Relativer Transkriptspiegel (RTL)} = \frac{(\text{Effizienz}_{\text{Aktin}})^{\text{Ct}_{\text{Aktin}}}}{(\text{Effizienz}_{\text{Gen}})^{\text{Ct}_{\text{Gen}}}}$$

2) Bestimmung der Kopiezahl

a) Probenvorbereitung

Für die Bestimmung der Kopiezahl wurden 20 ng Gesamt-DNA als Template in der qPCR verwendet. Um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen, wurden die Proben über Säulen aus dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) aufgereinigt.

b) qPCR

Für die Bestimmung der Kopiezahl mittels qPCR wurde der *my*-Budget 5x QPCR Mix II (Bio-Budget Technologies GmbH) mit dem darin enthaltenen Eva Green nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die einzelnen Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl setzten sich wie folgt zusammen:

- 4 µl QPCR Mix
- Je 2 µl Primer
- 20 ng Template DNA
- MilliQ-H₂O

Wie bei der zuvor beschriebenen qPCR zur Berechnung des Transkriptspiegels wurden auch hier die Primerpaare ohne Template gemessen, um die Dimerbildung der Primer auszuschließen (NTC-Kontrolle). Als Referenzgene wurden zwei Gene aus dem Genom (*XDH1*, *GXF1*) und drei Sequenzen auf dem integrierten Plasmid (*GFP*, *ADH1t*, *sat1*) gewählt. Für die Messungen wurde das folgende Programm verwendet:

- | | | |
|---------|--------|------------------------|
| - 95 °C | 15 min | } 40 Zyklen |
| - 95 °C | 15 sek | |
| - 60 °C | 20 sek | |
| - 72 °C | 20 sek | |
| - 95 °C | 1 min | } Schmelzkurvenanalyse |
| - 55 °C | 30 sek | |
| - 95 °C | 30 sek | |

Die Effizienz der Primer wurde direkt aus den Kurven der Messungen mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Effizienz} = (dRn_A/dRn_B)^{1/(Ct_{A}-Ct_{B})} - 1$$

Dabei sind A und B Punkte auf der Kurve und dRn die logarithmisch aufgetragene, gemessene Fluoreszenz.

Die Kopiezahl wurde analog zur Berechnung des RTL abgeschätzt:

$$\text{Kopiezahl} = \frac{(\text{Effizienz}_{\text{Referenzgen}})^{Ct_{\text{Referenzgen}}}}{(\text{Effizienz}_{\text{Plasmidsequenz}})^{Ct_{\text{Plasmidsequenz}}}}$$

2.7.16 Transformation

2.7.16.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (RbCl-Methode)

Damit *E. coli*-Zellen Plasmid-DNA aufnehmen können, müssen diese vorher behandelt werden. Dafür wurden 50 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bis zur exponentiellen Phase (OD₆₀₀ 0,4-0,6) bei 37 °C wachsen gelassen. Nach einer Inkubation von 15 min bei 4 °C wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 3 500 Upm, 4 °C) und in 20 ml eiskaltem RF1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 2 h bei 4 °C belassen und erneut abzentrifugiert (10 min, 3 500 Upm, 4 °C). Die Zellen wurden in 4 ml RF2-Puffer (75 mM CaCl₂, 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 6,8) resuspendiert, 15 min bei 4 °C inkubiert und in je 200 – 300 µl aliquotiert. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.7.16.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mit der Rubidiumchlorid-Methode nach Hanahan (1983). Dafür wurden zu 70-100 µl kompetenter *E. coli*-Zellen 10-300 ng Plasmid-DNA gegeben und für mindestens 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock von 90 sek bei 42 °C wurden die Zellen für 1-2 min auf Eis gelagert. Zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurde dem Ansatz 900 µl LB-Medium zugegeben und für 30-60 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Darauf folgte die Zentrifugation der Zellsuspension (5 min, 13 000 Upm) und Resuspension im verbliebenen Restmedium. Nach Ausplattieren auf geeignetem LB-Selektionsmedium folgte die Inkubation bei 37 °C über Nacht.

2.7.16.3 Transformation von *C. utilis*, *P. jadinii* und *C. albicans* mit der Lithiumacetat-Methode

Die Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode nach Mitchell (Wilson *et al.*, 1999). Dafür wurden 5 ml YPD-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 30 °C über Nacht geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml YPD-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert, welche bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 bei 30 °C inkubiert wurde.

Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 3 500 Upm), in 5 ml LATE-Puffer (0,1 M LiAc, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 5,0) gewaschen und in 500 µl LATE-Puffer resuspendiert. Für den Transformationsansatz wurden zu 100 µl Zellsuspension 5 µl Heringsperma-DNA (10 mg/ml) und 2-4 µg Plasmid-DNA hinzugeführt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach Durchmischen des Ansatzes mit 700 µl PLATE-Puffer (40 % (w/v) PEG 3350 in LATE-Puffer) wurde bei 30 °C über Nacht inkubiert. Darauf folgten ein einstündiger Hitzeschock bei 42 °C und die Zentrifugation bei 3 500 Upm für 5 min. Die Zellen wurden in 1 ml YPD-Medium aufgenommen und 4 h bei 30 °C geschüttelt. Nach abschließender Zentrifugation wurde das Zellpellet in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert, auf YPD-Medium mit 10 µg/ml Nourseothricin ausplattiert und 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.7.16.4 Transformation von *C. utilis* und *P. jadinii* durch Elektroporation

Die Transformation durch Elektroporation wird häufig eingesetzt, um eine vielfache Integration des Plasmids in das Genom zu erzielen. Für die Vorkultur wurden 5 ml YPD-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C angezogen. Mit dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur mit 500 ml YPD-Medium auf eine OD_{600} von 0,1 inokuliert und erneut über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Nach der Zentrifugation der Zellen bei 4 000 Upm für 5 min wurden die Zellen zweimal in eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen (1.: 500 ml, 2.: 250 ml). Die pelletierten Zellen wurden zunächst in 20 ml 1 M Sorbitol (eiskalt) resuspendiert und nach erneutem Zentrifugieren in 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gehalten. Für die Transformation wurden 80 µl Zellsuspension und 5 bis 10 µg der linearisierten Plasmid-DNA in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette gegeben und 5 min auf Eis gehalten. Für die Elektroporation wurden die folgenden Einstellungen verwendet: 0,7 kV, 25 µF und 800 Ω (GenePulser, BioRad). Nach der Reaktion wurde zügig 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol in die Küvetten zugegeben und die gesamte Zellsuspension in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einer ein- bis zweistündigen Inkubation der Zellen bei 30 °C wurden diese in unterschiedlichen Zellmengen (100 µl, Rest) auf YPD/Sorbitol-Agarplatten mit 10 µg/ml Nourseothricin ausplattiert. Die Platten wurden zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert bis Transformanten erkennbar waren.

2.7.16.5 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation von *S. cerevisiae* (Gietz *et al.*, 1995) wurden 5 ml YPD-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C angereichert, um eine neue 50 ml Kultur auf OD_{600} von 0,1 zu inokulieren. Diese Hauptkultur wurde bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,3 bis 0,4 bei 30 °C inkubiert und anschließend pelletiert (5 min, 3 500 Upm). Die Zellen wurden in 10 ml H_2O_{dest} gewaschen (5 min, 3 500 Upm) und in 2 ml 0,1 M LiAc-Lösung (in TE-Puffer) resuspendiert. Für einen Ansatz wurden Zellen aus 100 µl Zellsuspension abzentrifugiert (3 min, 13 000 Upm) und mit 240 µl 50 % PEG 3350, 36 µl 1 M LiAc, 10 µl Heringsperma-DNA (10 mg/ml) und 74 µl H_2O_{dest} (Kontrolle) bzw. Plasmid-DNA vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30 °C folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 15 min. Der Ansatz wurde abzentrifugiert (5 min, 13 000 Upm) und die Zellen in 100 µl H_2O_{dest} aufgenommen, um diese dann auf YPD/Nourseothricin (10 µg/ml)-Platten auszustreichen. Die Platten wurden für 3 bis 5 Tage bei 30 °C inkubiert bis Transformanten sichtbar wurden.

2.8 Plasmidstabilitätsanalyse

Zur Überprüfung, wie stabil ein Plasmid in das Genom integriert wurde, wurden Kulturen mit selektivem und nicht-selektivem Medium mit einer Übernachtskultur, die unter selektivem Druck gewachsen war, auf OD_{600} von 0,1 inokuliert und bei 30 °C inkubiert. Die Zellen der Übernachtskultur wurden in H_2O gewaschen, um eventuelle Rückstände des verwendeten Antimykotikums zu entfernen. Der Zeitpunkt der Inokulation wurde als 1. Generation bezeichnet und diese bis zum Erreichen der 50. Generation durch wiederholtes Überimpfen einer neuen Kultur herangezogen. Es wurden Kulturproben vom Zeitpunkt der Inokulation und mindestens von der 50. Generation entnommen und auf nicht-selektiven YPD-Platten ausgestrichen. Anschließend wurden von den nach 2-tägigem Bebrüten bei 30 °C gewachsenen Kolonien 100 auf selektive YPD-Platten transferiert. Nach einer weiteren Inkubation bei 30 °C für 2 Tage wurden die Kolonien basierend auf ihrer Nourseothricin-Resistenz und im Fall der *GFP*-exprimierenden Stämme ebenfalls auf deren Fluoreszenz hin analysiert. Anhand der Anzahl der Kolonien, die die Resistenz und/oder die Fluoreszenz zeigten, konnte auf die Plasmidstabilität geschlossen werden.

2.9 Stabilisierung der Integration durch selektive Kultivierung

Die Transformanten, die nach der Transformation auf selektiven Platten ausgestrichen wurden, wurden erneut in selektivem Flüssigmedium über Nacht bei 30 °C angezogen (Guengerich *et al.*, 2004). Von dieser Vorkultur wurde eine selektive Hauptkultur (50 ml) auf OD_{600} 0,1 beimpft und erneut bei 30 °C über Nacht inkubiert. Dieser Schritt wurde neun Mal wiederholt, um die Integration in alle Allele zu ermöglichen. Anschließend wurden bis zu 19 Mal hintereinander eine nicht-selektive Hauptkultur (50 ml) inokuliert. Diese Kultivierungsreihe diente der Stabilisierung der bereits vorliegenden Integration durch Rekombination. Zum Schluss wurde eine Kulturprobe auf selektivem Medium ausplattiert.

2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.10.1 Herstellung von Rohextrakten

Für die Untersuchung der Proteinmenge in der Zelle wurden zunächst Rohextrakte hergestellt. Dafür wurden die entsprechenden Zellproben aus 1 ml Kulturmedium gewonnen (5 min, 13 000 Upm) und in 1 ml Lysis-Puffer (25 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100, 10 % (v/v) Glycerin, Roche Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit einem halben Volumen Glasperlen versetzt und 45 min auf einem Vibrax (VX 2E, Janke & Kunkel GmbH, Staufen) bei 2 500 Upm und 4 °C geschüttelt. Nach dem Zellaufschluss wurden die Glasperlen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (5 min, 13 000 Upm, 4 °C) vom Überstand getrennt. Der

Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C oder bei längerer Lagerung bei -20 °C aufbewahrt.

2.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Dabei wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 verwendet, welcher durch Wechselwirkung mit dem Protein einen Komplex bildet. Diese Komplexbildung führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Proteins von 465 nm nach 595 nm. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Standardkurve mit definierten Konzentrationen von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µg BSA erstellt. Zu 10 µl Probenvolumen wurden 190 µl Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad) hinzugegeben und der Ansatz 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Messung bei 595 nm erfolgte mit dem Plattenlesegerät (ELx800, BioTek Instruments, Winooski, USA).

2.10.3 Proteinfällung

Zur Aufkonzentrierung der Proteinmenge wurden die Proben mit 1 Volumen 20 % Trichloressigsäure (AppliChem) versetzt und 5 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 13 000 Upm 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 300 µl Aceton gewaschen (5 min, 13 000 Upm, 4 °C) und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Das so gefällte Protein wurde in 20 µl Protein-Ladepuffer resuspendiert.

2.10.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die XCell SureLock™ mini-Cell Gelapparatur der Firma Invitrogen verwendet. Die Gele mit den Konzentrationen 8 %, 10 % und 4-20 % der Firma Pierce wurden mit einem HEPES-Laufpuffer (0,1 M HEPES, 0,1 M Tris, 1 % (w/v) SDS) bei 110 V für ungefähr 45 min behandelt. Die Proben wurden mit 3x Protein-Ladepuffer (30 % Glycerin; 6 % SDS; 188 mM Tris/HCl pH 6,8; 15 % β-Mercaptoethanol; 0,006 % Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 95 °C erhitzt bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

2.10.5 Protein-Größenstandard

Als Protein-Größenstandard wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) mit den definierten Bandengrößen verwendet (kDa): 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130 und 170.

2.10.6 Antikörper

Tab. 2.9: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper

Name	Herstellung	Verdünnung	Quelle
Anti-GFP	IgG/Polyklonal, Kaninchen	1:1 000	Invitrogen
Anti-GFP	Monoklonal, Maus	1:1 000	Invitrogen
Anti-HA	Monoklonal, Ratte	1:2 000	Roche

Tab. 2.10: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper

Name	Herstellung	Verdünnung	Quelle
Anti-Kaninchen, Peroxidase-konjugiert	Ziege	1:20 000	Jackson Immunologie Research Lab. Inc
Anti-Maus, Peroxidase-konjugiert	Ziege	1:10 000	Thermo Scientific
Anti-Ratte, Peroxidase-konjugiert	Ziege	1:10 000	Thermo Scientific

2.10.7 Immunoblot-Analyse

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden zur weiteren Analyse mit dem XCell Blot Module von Invitrogen auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P-Membran, Merck Millipore) übertragen. Der Transfer auf die mit Methanol aktivierten Membran erfolgte in einem Transferpuffer (25 mM Tris, 25 mM Bicin, 10 % (v/v) Methanol) bei 12 V gekühlt (4 °C) über Nacht. Anschließend wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht mit 10 % Magermilchpulver blockiert. Danach folgte ein dreimaliges Waschen mit TBST (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 % (v/v) Tween-20) für je 5 min bei Raumtemperatur. Nach einer einstündigen Inkubation mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur folgten erneut drei Waschschrte mit TBST (je 5 min bei RT). Der Sekundärantikörper wurde mindestens 30 min aber maximal 1 h bei Raumtemperatur zu der Membran gegeben. Nach dem abschließenden viermaligen Waschen mit TBST (je 5 min bei RT) konnte das Chemilumineszenz-Signal mit Hilfe des Substrates SuperSignal® West Dura der Firma Pierce mittels LAS1000 detektiert werden.

2.10.8 Aktivitätsbestimmung der Xylanase

Zur Bestimmung der Xylanaseaktivität wurde das EnzChek® Ultra Xylanase Assay Kit der Firma Invitrogen basierend auf der Detektion des Fluoreszenzsignals bei 455 nm nach Herstellerprotokoll verwendet.

2.10.9 Aktivitätsbestimmung der Lipase

Zur qualitativen Bestimmung der Lipaseaktivität wurden YP-Agarplatten mit 2 % Glukose (YPD) oder 2 % Xylose (YPX) zusätzlich mit 1,5 % Tributyrin und 0,15 % Gummi Arabicum präpariert. Wahlweise wurde wenig Zellmaterial einer Einzelkolonie auf die Platte transferiert oder 5 µl des Medienüberstandes getropft. Die Platten wurden 2 Tage bei 30 °C und anschließend 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Die vorhandene Lipaseaktivität konnte anhand der sichtbaren Klärung um die Kolonie bzw. an der Stelle der getropften Probe identifiziert werden.

Die quantitative Bestimmung der Lipaseaktivität erfolgte photometrisch mit Hilfe des Substrates para-Nitrophenyl-Butyrat (pNPB). Dabei wurden 10 µl der zu untersuchenden Probe mit 190 µl Substratlösung (0,5 mM pNPB in 20 mM NaPi-Puffer pH 7,4) versetzt. Der direkten Messung (t = 0 min) bei 405 nm folgte nach 30 min Inkubation bei 37 °C eine erneute Messung der Absorption. Die Lipaseaktivität konnte schließlich anhand der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Aktivität}_{\text{CalB}} [\text{U/ml}] = \frac{\Delta E \cdot V_{\text{total}}}{e \cdot V_{\text{enz}} \cdot l}$$

ΔE: Steigung aus der Geradengleichung [pro min]

V_{total}: Gesamtvolumen [µl]

E: Extinktionskoeffizient von pNP (10400/(M·cm))

V_{enz}: Probenvolumen [µl]

l: Korrektur des Lichtweges (3,484·10⁻³ [cm] · V [µl])

2.11 Fehlingsche Reaktion

Die Fehlingsche Reaktion wird unter anderem zum Nachweis von Hexosen in einer Lösung verwendet. Von Lösung 1 (1,7 g Kupfer(II)-sulfat in 100 ml H₂O_{dest}) und Lösung 2 (35 g Natriumkaliumtartrat, 10 g NaOH in 100 ml H₂O_{dest}) wurden je 1 ml in ein Reagenzglas gegeben. Nach Zugabe von 20 µl Kulturlösung wurde die Lösung erhitzt. Dabei werden durch die Bildung des Kupfer-Tartrat-Komplexes Cu²⁺-Ionen bereitgestellt, die bei der Reaktion mit der Aldehydgruppe des Zuckers reduziert werden. Als Ergebnis einer positiven Probe wird das gebildete Kupfer(I)-Oxid als rötlich brauner Niederschlag sichtbar.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Expressionssysteme für die heterologe Proteinproduktion in *C. utilis*. Für eine genauere Charakterisierung von *C. utilis* DSM2361 (Anamorph) und seiner vermutlichen teleomorphen Form *P. jadinii* CBS1600 wurden verschiedene Wachstumsbedingungen und die Ploidie untersucht. In weiteren Experimenten wurde die heterologe Genexpression in beiden Hefen mit einem neu-konstruierten Expressionssystem mit Hilfe der Reportergene *GFP* für die intrazelluläre Expression und *CALB* für die extrazelluläre Expression durchgeführt. Für das Expressionssystem wurde neben konstitutiven Promotoren auch ein Xylose-induzierbarer Promotor von *C. utilis* verwendet. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit, war die heterologe Expression der Xylanase aus *Penicillium simplicissimum* in *C. utilis*, um *C. utilis* die Verwertung von Xylan als Kohlenstoffquelle zu ermöglichen.

3.1 Charakterisierung von *C. utilis* und *P. jadinii*

Die Verwendung eines Pilzes als Wirt für die heterologe Genexpression erfordert die Kenntnis seiner morphologischen und metabolischen Eigenschaften, aber auch seiner optimalen Wachstumsbedingungen. Daher sollte das Wachstum von *C. utilis* und *P. jadinii* bei verschiedenen Temperaturen, Kohlenstoffquellen, pH-Werten, sowie die Sensitivität gegenüber einigen Antimykotika untersucht werden. Als Voraussetzung für die integrative Transformation wurde ebenfalls die Ploidie beider Hefen bestimmt.

3.1.1 Einfluss von Temperatur und Kohlenstoffquelle

Für die heterologe Expression ist es unter anderem entscheidend, dass keine unnötigen Produktionskosten durch zu hohe Temperaturen während des Herstellungsverfahrens entstehen. Daher ist es von Vorteil, wenn die Produktion bei Raumtemperatur oder einer ähnlichen Temperatur (25-30 °C) durchgeführt werden kann. Dennoch ist es wichtig, das Wachstumsverhalten und die Produktivität eines Mikroorganismus bei unterschiedlichen Temperaturen zu untersuchen und gegebenenfalls einen Kompromiss zwischen geringer Verdopplungszeit und geringen Prozessführungskosten einzugehen.

Für die Wachstumsanalyse bei verschiedenen Temperaturen wurden *C. utilis* DSM2361 und *P. jadinii* CBS1600 im Vollmedium (YPD) bei 30, 37 und 40 °C bis zum Erreichen des Plateaus der stationären Phase kultiviert. Aus den gemessenen Wachstumskurven konnte dann die entsprechende Verdopplungszeit t_D aus der logarithmischen Phase berechnet werden. Um die Unterschiede zu einer gut bekannten Hefe zu vergleichen, wurden ebenfalls Wachstumskurven von *S. cerevisiae* MC45-5A unter den gleichen Kulturbedingungen erstellt.

Tab. 3.1: Verdopplungszeiten von *C. utilis*, *P. jadinii* und *S. cerevisiae* bei verschiedenen Temperaturen. Die aus den Wachstumskurven errechneten Verdopplungszeiten t_D von *C. utilis* DSM2361, *P. jadinii* CBS1600 und *S. cerevisiae* MC45-5A bei 30, 37 und 40 °C in YPD-Medium.

In YPD-Medium	t_D (30 °C)	t_D (37 °C)	t_D (40 °C)
<i>C. utilis</i> DSM2361	1,48 h	1,16 h	1,99 h
<i>P. jadinii</i> CBS1600	2,7 h	1,62 h	3,85 h
<i>S. cerevisiae</i> MC45-5A	1,33 h	1,55 h	5,51 h

In Tab. 3.1 sind die errechneten Verdopplungszeiten t_D der drei untersuchten Mikroorganismen *C. utilis*, *P. jadinii* und *S. cerevisiae* bei 30, 37 und 40 °C aufgelistet. Dabei ist zu erkennen, dass *C. utilis* eine kürzere Verdopplungszeit bei 37 °C aufweist als bei 30 oder 40 °C. *S. cerevisiae* wächst optimal bei 30 °C (Richards, 1928). Während *P. jadinii* bei 30 und 37 °C langsamer wächst und somit eine höhere Verdopplungszeit von 2,7 bzw. 1,62 h aufweist, benötigt *S. cerevisiae* bei 40 °C mit 5,51 h deutlich länger für die Zellteilung (Tab. 3.1). Da jedoch *C. utilis* auch bei der Kultivierungstemperatur von 30 °C eine annehmbare Verdopplungszeit aufweist und dadurch ein direkter Vergleich mit *S. cerevisiae* möglich ist, wurde für den Großteil der im Folgenden dargestellten Experimente mit *C. utilis* und *P. jadinii* diese Temperatur gewählt.

Für eine genauere Definition der Zellgröße und der Zellzahl pro Volumen von *C. utilis* und *P. jadinii* wurden Untersuchungen am Mikroskop durchgeführt. Die Zellgröße wurde auf ungefähr 5 µm Durchmesser abgeschätzt (Abb. 1.1) und die Gesamtzellzahl bei verschiedenen OD_{600} -Werten mit Hilfe der Thoma-Zählkammer bestimmt. Demnach entspricht eine OD_{600} von 1,0 einer Zellzahl von ca. $4\text{-}5 \times 10^8$ Zellen pro ml.

Seine vielseitige Substratverwertung ist für *C. utilis* ein entscheidender Vorteil gegenüber anderen Hefen. So ist bekannt, dass *C. utilis* nicht nur verschiedene Zucker, sondern auch Alkohole und Carbonsäuren verstoffwechseln kann. Neben den vielen Kohlenstoffquellen werden ebenfalls Stickstoffquellen wie Nitrat und Nitrit zu den für *C. utilis* verwertbaren Substraten gezählt (Kurtzman *et al.*, 2008; Manachini, 1979). Die Eigenschaft zur Assimilierung von verschiedenen Kohlenstoffquellen von *C. utilis* und *P. jadinii* wurde auf zwei verschiedene Arten untersucht. Zum einen wurde Minimalmedium, welches mit einer Aminosäure-Lösung angereichert war (synthetic minimal medium, SM; siehe 2.2.4), mit entweder 2 % Glukose oder Xylose in Flüssigkulturen verwendet, zum anderen wurde Minimalmedium (SM) mit entweder 2 % Inulin, Rhamnose oder Sorbitol in Festmedium untersucht. Zusätzlich wurde das Wachstum von *C. utilis* in Flüssigkulturen (SM) mit 2 % Arabinose, Galaktose oder Glycerin untersucht (Daten nicht gezeigt). Während in Arabinose und Galaktose kein Wachstum nachzuweisen war, konnte *C. utilis* Glycerin verstoffwechseln. Die Verdopplungszeiten t_D von *C. utilis* und *P. jadinii* im Vollmedium (YPD) und in den Minimalmedien mit Glukose (SMD) oder Xylose (SMX) sind in Tab. 3.2 aufgelistet.

Tab. 3.2: Verdopplungszeiten von *C. utilis* und *P. jadinii* in verschiedenen Medien. Aus den gemessenen Wachstumskurven in Vollmedium mit Glukose (YPD) oder Minimalmedium mit Glukose (SMD) oder Xylose (SMX) wurden die Verdopplungszeiten t_D für *C. utilis* DSM2361 und *P. jadinii* CBS1600 bei 30 °C berechnet.

30 °C	t_D (<i>C. utilis</i>)	t_D (<i>P. jadinii</i>)
YPD	1,48 h	2,7 h
SMD	1,65 h	1,73 h
SMX	3,92 h	4,28 h

Auch wenn die Verdopplungszeit t_D von *C. utilis* mit Xylose in Minimalmedium (SMX) fast 2,4-fach verlängert ist als im Vergleich zu Glukose (SMD), wird deutlich, dass *C. utilis* diese Pentose verwertet. Während des Wachstums im Vollmedium (YPD) benötigte *P. jadinii* fast eine Stunde länger als im Minimalmedium mit Glukose (SMD), um sich zu verdoppeln (Tab. 3.2). Bei der Verwertung von Xylose (SMX) ist die Verdopplungszeit von *P. jadinii* mit 4,28 h noch länger. Allerdings wurden im Xylosehaltigen Minimalmedium (SMX) sowohl von *C. utilis* als auch von *P. jadinii* nach einer längeren lag-Phase die gleichen hohen Zelldichten ($OD_{600}=34$) wie mit Glukose (SMD) erreicht (Daten nicht gezeigt). Trotzdem ist die Verdopplungszeit von *P. jadinii* in allen untersuchten Medien länger als bei *C. utilis*.

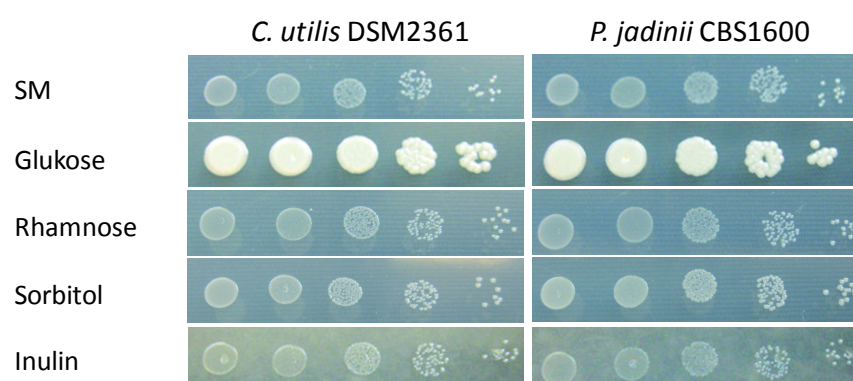


Abb. 3.1: Verdünnungsreihen-Tropftest zur Untersuchung der Substratverwertung von *C. utilis* und *P. jadinii*. Jeweils eine Übernachtskultur von *C. utilis* DSM2361 und *P. jadinii* CBS1600 in YPD-Medium wurden auf eine OD_{600} von 1,0 verdünnt. Je 5 μ l dieser und vier weiterer Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-4} , von links nach rechts) wurden auf Minimalmedium mit 2 % Rhamnose, Sorbitol oder Inulin getropft. Als Negativkontrolle wurde eine Platte ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle (SM) und eine mit 2 % Glukose als Positivkontrolle eingesetzt. Die Platten wurden anschließend bei 30 °C für 48 h inkubiert.

Die drei weiteren Substrate Inulin, Rhamnose und Sorbitol wurden getestet, da laut Manachini (1979) *C. utilis* und *P. jadinii* Inulin verwerten, aber nicht Rhamnose oder Sorbitol. Die Wildtyp-Stämme DSM2361 und CBS1600 wurden über Nacht in Flüssigmedium (YPD) bei 30 °C kultiviert. Die Zellkulturen wurden auf eine OD_{600} von 1,0 verdünnt und daraus vier weitere 1:10 Verdünnungen hergestellt. Aus den Verdünnungen wurden je 5 μ l auf eine Minimalmedium-Agarplatte mit je 2 % Inulin, Rhamnose oder Sorbitol getropft und diese anschließend bei 30 °C für 48 h inkubiert. Als

Kontrollplatten wurde eine Agarplatte ohne weitere Kohlenstoffquelle (SM) und eine Weitere mit 2 % Glukose verwendet. Es zeigte sich, dass *C. utilis* und *P. jadinii* keine von den drei untersuchten Substanzen verwerten können (Abb. 3.1). Auf den Kontrollplatten ohne weitere Kohlenstoffquelle erfolgte nur ein basales Wachstum vermutlich aufgrund der im Minimalmedium enthaltenen Aminosäuren (siehe 2.2.4).

3.1.2 Einfluss des pH-Wertes

Das Wachstumsverhalten eines Mikroorganismus ist nicht nur von der Temperatur abhängig, sondern auch von dem pH-Wert des umgebenden Milieus. Dabei gibt es deutliche Unterschiede, welcher pH-Bereich von den einzelnen Arten bevorzugt wird. Die Modellhefe *S. cerevisiae* wächst am besten im pH-Bereich zwischen 3,5 und 5,0 (Buzas *et al.*, 1989), *P. pastoris* zwischen 5,0 und 6,0 (Cos *et al.*, 2006). Andere Pilze wie z. B. *C. albicans* sind sogar in der Lage in einer sauren Umgebung mit einem pH-Wert von 2,0 zu wachsen (Kobayashi *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu, gibt es andere wie z. B. *Acremonium alcalophilum* mit einem optimalen pH-Wert von 9,0 (Pereira *et al.*, 2013).

Zur Analyse des Wachstumsverhaltens von *C. utilis* und *P. jadinii* bei unterschiedlichen pH-Bereichen wurde zunächst ein geeignetes Puffersystem ausgewählt. Da während des Wachstums und dem gleichzeitigen Glukose-Abbau Kohlenstoffdioxid und organische Säuren entstehen, muss das Puffersystem in der Lage sein, den pH-Wert konstant zu halten. Die bekannten Puffersysteme 25 mM Maleat (pH 2,0), 15 mM Citrat (pH 3,0), und 15, 25 und 50 mM CAPSO (pH 9,0) wurden verwendet, um das Vollmedium (YPD) zu puffern (AppliChem; www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/BioBuffer.pdf). Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH auf den gewünschten Wert gebracht. Außerdem wurde eine Kultur mit YPD-Medium ohne zusätzliches Puffersystem untersucht, um das Wachstum im neutralen Bereich zu untersuchen (ca. pH 7,0). Während der Kultivierung wurde in regelmäßigen Abständen die OD₆₀₀ gemessen und der pH-Wert anhand von pH-Teststreifen überprüft. Nach Auftragung der OD₆₀₀ über die Zeit wurde die Verdopplungszeit t_D aus der logarithmischen Phase errechnet.

Während *C. utilis.*, *P. jadinii* und *S. cerevisiae* keine starke Limitierung im Wachstum bei pH 3,0 aufzeigten, war *P. pastoris* bei diesem pH-Wert nur in der Lage, an die Hälfte des ansonsten erreichten OD₆₀₀-Wertes zu gelangen (OD₆₀₀=16 statt 32). Für eine genauere Eingrenzung wurde dieser Versuch mit einem pH-Wert von 2,0 wiederholt. In diesem besonders saurem Bereich konnte keine der eingesetzten Mikroorganismen wachsen; daher wird davon ausgegangen, dass deren Toleranzgrenze zwischen pH 2,0 und 3,0 liegt. Für die Untersuchung im alkalischen Bereich wurde die Messung durch die zu niedrig gewählte Molarität erschwert. So wurde die eingesetzte Menge an CAPSO von 15 auf 25 mM und letztendlich auf 50 mM erhöht. Allerdings war auch diese zu niedrig, um das Absinken des pH-Wertes während der Kultivierung zu verhindern. Trotzdem konnte beobachtet werden, dass *C. utilis* und *P. pastoris* beide in der Lage sind, nach einer gewissen Zeit zu wachsen und dadurch den pH-Wert zu senken. Bei *P. jadinii* wurde bei pH 9,0 lediglich ein schwaches Wachstum beobachtet. Aus diesen Experimenten ist erkennbar, dass *C. utilis* über den weitesten pH-Bereich (3,0-9,0) wächst, während *P. jadinii* von pH 3,0 bis <9,0, *P. pastoris* von >3,0 bis 9,0 und *S. cerevisiae* von pH 3,0 bis pH 7,0 wachsen können.

Tab. 3.3: pH-abhängiges Wachstum von *C. utilis*, *P. jadinii*, *S. cerevisiae* und *P. pastoris*. Verdopplungszeiten t_D der Wildtyp-Stämme von *C. utilis* DSM2361, *P. jadinii* CBS1600, *S. cerevisiae* MC45-5A und *P. pastoris* X-33 bei pH 2,0, 3,0, 7,0 und 9,0 in YPD-Medium bei 30 °C. Bei pH 2,0 konnte keiner der untersuchten Stämme wachsen (-).

In YPD-Medium	t_D bei pH 2,0	t_D bei pH 3,0	t_D bei pH 7,0	t_D bei pH 9,0
<i>C. utilis</i> DSM2361	-	2,9 h	1,48 h	6,8 h
<i>P. jadinii</i> CBS1600	-	3,1 h	2,7 h	13,1 h
<i>S. cerevisiae</i> MC45-5A	-	2,8 h	1,33 h	-
<i>P. pastoris</i> X-33	-	4,7 h	3,6 h	5,7 h

3.1.3 Einfluss von Antimykotika

Bei typischen Expressionssystemen wird der Wirtsorganismus mit einem Plasmid transformiert, welches neben der Expressionskassette ein weiteres Gen für eine Antibiotikaresistenz beinhaltet. Durch diese Resistenz wird es möglich, Transformanten auf Antibiotika-haltigem Medium zu selektieren. Für *C. utilis* sind bereits Selektionssysteme bekannt, in denen die Antimykotika Hygromycin B, G418 (Geneticin) und Cycloheximid verwendet werden (siehe 1.1). Dabei werden zur Selektion von Transformanten 600 µg/ml Hygromycin B, 200 µg/ml G418 und 20 µg/ml Cycloheximid eingesetzt (Tamakawa *et al.*, 2013a).

Um die Sensitivität der *C. utilis*- und *P. jadinii*-Wildtyp-Stämme DSM2361 und CBS1600 zu analysieren, wurden YPD-Platten mit den entsprechenden Antimykotika Hygromycin B, G418 und Nourseothricin in verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Zum Vergleich wurden neben *C. utilis* und *P. jadinii* ebenfalls die Stämme *S. cerevisiae* MC45-5A und *C. albicans* CAF2-1 untersucht.

Wie in Tab. 3.4 zu sehen, liegt die minimale inhibierende Konzentration (MIC) von Nourseothricin für *C. utilis* bei nur 5 µg/ml. Im Vergleich dazu wirken G418 bei der dreifachen und Hygromycin B erst bei einer über 30-fachen Konzentration inhibierend auf das Wachstum von *C. utilis*. Die hohe Sensitivität von *C. utilis* gegenüber Nourseothricin wurde durch eine zusätzliche Sensitivitätsanalyse in Flüssigmedium mit YPD und Nourseothricin bestätigt (Daten nicht gezeigt). *P. jadinii* CBS1600 zeigte im Vergleich zu *C. utilis* sogar eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Antimykotikum Nourseothricin (Tab. 3.4), wobei geringe Konzentrationen von 2 bis 4 µg/ml ausreichten, um das Zellwachstum zu hemmen. Im Vergleich dazu, erzielten eine Konzentration von 15 bis 20 µg/ml G418 und 100 µg/ml Hygromycin B die gleiche Wirkung bei *P. jadinii*. Wie man Tab. 3.4 entnehmen kann, haben *S. cerevisiae* und *C. albicans* eine deutlich höhere Toleranz gegenüber den getesteten Antimykotika. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass für *C. utilis* und *P. jadinii* Nourseothricin in Verbindung mit dem *sat1*-Gen aus *S. noursei* ein geeigneter Selektionsmarker ist.

Tab. 3.4: Sensitivitätsanalyse von *C. utilis*, *P. jadinii*, *S. cerevisiae* und *C. albicans* gegenüber verschiedenen Antimykotika. Die Wirkung von Hygromycin B, G418 und Nourseothricin auf *C. utilis* DSM2361, *P. jadinii* CBS1600, *S. cerevisiae* MC45-5A und *C. albicans* CAF2-1 wurden getestet. Dabei gibt die inhibierende Konzentration die minimale Menge an Antimykotika wieder, bei der der Pilz kein Wachstum zeigt. Wenn keine oder nur eine geringe Wachstumslimitierung erkennbar war, ist dieser Wert mit „>>“ und „>“ gekennzeichnet.

	Minimale inhibierende Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]			
	<i>C. utilis</i>	<i>P. jadinii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
Hygromycin B	150-170	100	100–150	>>200
G418	15-20	15-20	60	>>70
Nourseothricin	5	2-4	>8	>>8

3.1.4 Bestimmung der Ploidie von *C. utilis* und *P. jadinii*

Eine grundlegende Information, die für die Entwicklung von Expressionssystemen in Hefen erforderlich ist, ist die Klärung der Ploidie des Genoms. Bisher liegen für die Ploidie von *C. utilis* unterschiedliche Ergebnisse vor, die von Tri-, Tetra- bis zur Pentaploidie reichen (Ikushima *et al.*, 2009a; Kondo *et al.*, 1995; Stoltenburg *et al.*, 1992; Tomita *et al.*, 2012). Zu einer eigenen Bestimmung wurde die Ploidie von *C. utilis* DSM2361 und von *P. jadinii* CBS1600 mittels FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorting) untersucht. Dafür wurden Zellen von *C. utilis*, *P. jadinii* sowie drei *S. cerevisiae*-Referenzstämmen TSY812 (haploid), DE3005 (diploid) und JT23727 (triploid) Ethanol-fixiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff SytoxGreen gefärbt (siehe 2.4). Diese Referenzstämmen wurden gewählt, da *S. cerevisiae* (haploid) und *C. utilis* eine vergleichbare Genomgröße von 12,3 Mbp bzw. 12,5 Mbp aufweisen (Buerth *et al.*, 2011; Tomita *et al.*, 2012). Untersucht wurden logarithmisch-wachsende Zellen ($n=10\ 000$). Die Proben wurden vor der FACS-Messung im Fluoreszenzmikroskop auf die gleichmäßige Färbung der Zellen und deren Vereinzelung untersucht.

In Abb. 3.2 sind die Histogramme der Stämme *S. cerevisiae* TSY812, DE3005 und JT23727 sowie *C. utilis* DSM2361 und *P. jadinii* CBS1600 abgebildet. Zu erkennen ist das Fluoreszenzsignal des haploiden (N) *S. cerevisiae*-Stammes TSY812, des diploiden Stammes (2N) DE3005 und des triploiden Stammes (3N) JT23727. Das erste Maximum gibt die durch den Farbstoff gefärbte DNA-Menge in einer einzelnen nicht-replizierenden Zelle an, während das zweite Maximum die Zellen repräsentiert, die sich gerade in der logarithmischen Wachstumsphase befinden (ca. $\text{OD}_{600}=10$). Vergleicht man die jeweils ersten Maxima untereinander, fällt auf, dass das *C. utilis*-Maximum eine ähnliche Höhe wie das des triploiden *S. cerevisiae*-Stammes JT23727 aufweist. Der in *P. jadinii* gemessene DNA-Gehalt stimmt hingegen mit dem des diploiden *S. cerevisiae*-Stammes DE3005 überein. Anhand dieser Daten kann geschlossen werden, dass *C. utilis* DSM2361 wahrscheinlich triploid und *P. jadinii* CBS1600 diploid ist.

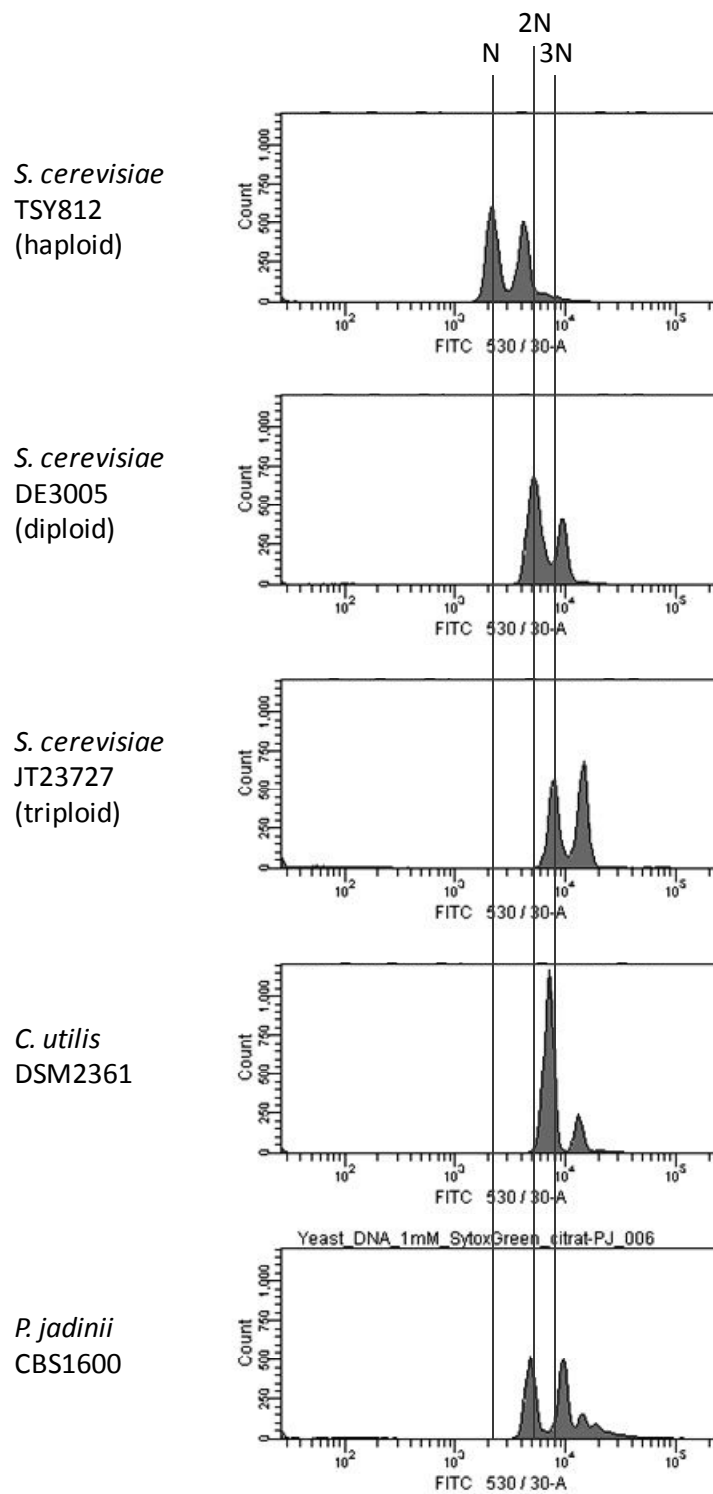


Abb. 3.2: FACS-Analyse von *C. utilis* und *P. jadinii*. Zur Ploidiebestimmung wurden die drei *S. cerevisiae*-Referenzstämme TSY812 (haploid; N), DE3005 (diploid; 2N) und JT23727 (triploid; 3N) sowie *C. utilis* DSM2361 und *P. jadinii* CBS1600 in YPD-Medium bis in die logarithmische Phase wachsen gelassen, in Ethanol fixiert und mit SytoxGreen angefärbt. Die Histogramme der FACS-Analyse geben die Anzahl der Zellen wieder, die die entsprechende Fluoreszenz für ein Chromosomensatz (N), für zwei (2N) und drei (3N) aufweisen ($n=10\,000$).

3.2 Heterologe Expression in der Futterhefe *C. utilis*

Die Hefe *C. utilis* wurde bereits in den vergangenen Jahrzehnten als Industriehefe für die heterologe Genexpression verwendet (Hong *et al.*, 2006; Ikushima *et al.*, 2009c; Kondo *et al.*, 1997; Miura *et al.*, 1999; Miura *et al.*, 1998a; Tamakawa *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2010). Eine der entscheidenden Vorteile gegenüber anderen mittlerweile etablierten Expressionssystemen ist dabei die Fähigkeit, verschiedenste Nährstoffe verwerten zu können und dabei eine sehr hohe Zelldichte zu erreichen (Tomita *et al.*, 2012).

3.2.1 Konstruktion der Expressionsplasmide

Die Verwendung des *sat1*-Gens als Selektionsmarker wurde bereits von Setiadi *et al.* (2006) in *C. albicans* gezeigt. Basierend auf dieser Kenntnis wurde das Ausgangsplasmid pSat1-3HA ausgewählt (Abb. 3.3), weil auf diesem bereits neben dem Gen *bla*, kodierend für die β -Laktamase zur Ausbildung der Ampicillinresistenz in *E. coli*, die *sat1*-Kassette bestehend aus dem *C. albicans* *ACT1*-Promotor (*ACT1p*), dem *sat1*-Gen aus *S. noursei* für die Selektion auf Nourseothricin-haltigem Medium und dem *ACT1*-Terminator (*ACT1t*) aus *C. albicans* vorhanden waren. Zusätzlich befand sich eine Sequenz für ein dreifaches HA-Epitop und anschließend der *C. albicans* *ADH1*-Terminator (*ADH1t*) stromabwärts von der "multiple cloning site" (MCS).

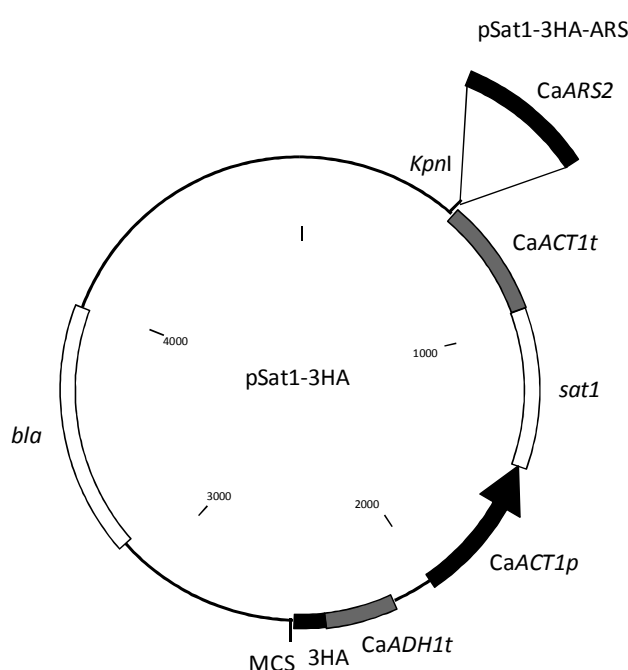


Abb. 3.3: Klonierung von CaARS2 in das Plasmid pSat1-3HA. Durch die Klonierung des chromosomalen Replikators aus *C. albicans* (CaARS2) in die *KpnI*-Schnittstelle im Plasmid pSat1-3HA entsteht das Plasmid pSat1-3HA-ARS. Das Plasmid enthält weitere Sequenzen für β -Laktamase (*bla*), multiple cloning site (MCS), dreifaches HA-Epitop, *ADH1*-Terminator aus *C. albicans* (CaADH1t), *ACT1*-Promotor aus *C. albicans* (CaACT1p), Nourseothricin-Acetyltransferase aus *S. noursei* (*sat1*) und *ACT1*-Terminator aus *C. albicans* (CaACT1t).

Für die Einführung des chromosomalen Replikators *ARS* aus *C. albicans* wurde das 660 bp-Fragment zunächst aus dem Plasmid pARS/AatII (Sonneborn *et al.*, 1999) mittels PCR amplifiziert; dafür wurden die Primer CaARS-KpnI/for und CaARS-KpnI/rev verwendet. Das CaARS2-Fragment mit den entstandenen *KpnI*-Enden wurde anschließend in das zuvor mit *KpnI* linearisierte pSat1-3HA kloniert. Aus dieser Ligation entstand das Plasmid pSat1-3HA-ARS (Abb. 3.3).

3.2.1.1 Konstitutive Promotoren

Für die Wahl des *C. utilis*-Promotors sollten sowohl konstitutive als auch regulierbare Promotoren etabliert werden. Kandidatengene für Promotoren kodieren häufig für glykolytische Enzyme, z. B. die Alkoholdehydrogenase (*ADH1*), Phosphoglyceratkinase (*PGK1*) und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (*TDH3*) (Romanos *et al.*, 1992). Sie gehören zu den stärksten und sehr schwach-regulierten Promotoren auch in *S. cerevisiae* (Partow *et al.*, 2010).

Der *TDH3*-Promotor wurde durch PCR mit den Primern GAPDHp-FW-NarI und GAPDHp Rev 972 bp-Sequenz stromaufwärts des *CuTDH3*-ORFs aus dem *C. utilis*-Genom amplifiziert. Das resultierende PCR-Fragment mit den Enden *NarI* und *HindIII* wurde in die multiple cloning site (MCS) stromaufwärts des 3HA-Epitops in pSat1-3HA-ARS kloniert. Dieses Plasmid wurde pMC1 genannt (Abb. 3.4).

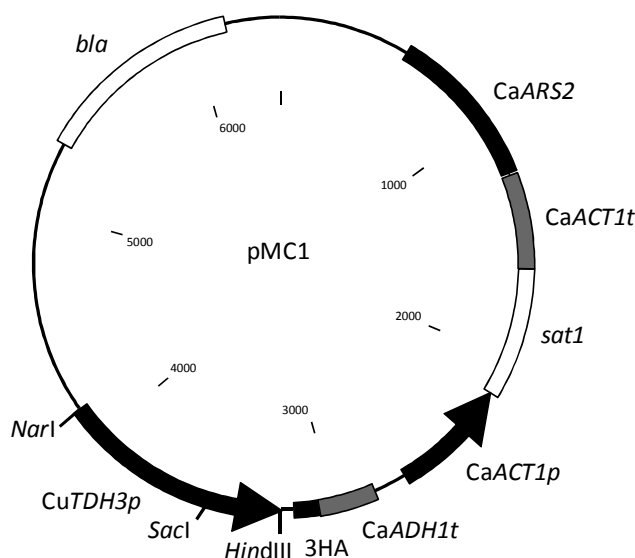


Abb. 3.4: Plasmidkarte von pMC1. Durch das Einführen des *TDH3*-Promotors aus *C. utilis* entsteht aus pSat1-3HA-ARS das Plasmid pMC1. Die anderen Sequenzen auf dem Plasmid entsprechen denen in Abb. 3.3. Die *SacI*-Schnittstelle im *TDH3*-Promotor wurde verwendet, um das Plasmid zu linearisieren und in das Genom von *C. utilis* über homologe Rekombination zu integrieren.

Mit dem gleichen Vorgehen wurden auch weitere *C. utilis*-Promotorregionen in das Plasmid pSat1-3HA-ARS kloniert. Die Promotorbereiche wurden zwischen 940 und 1345 bp stromaufwärts des jeweiligen ORFs gewählt (Tab. 3.5). Die verwendeten Gene kodieren für Aktin (*ACT1p*: 940 bp), Phosphoglyceratkinase (*PGK1p*: 1345 bp), Plasmamembran ATPase (*PMA1p*: 1005 bp) und Proteinmannosyltransferase (*PMT1p*: 1005 bp). Für die PCR wurden die genomische DNA von *C. utilis*

als Template sowie folgende Primer verwendet: ACT1p-FW-NarI/ ACT1p-RV-HindIII, PGK1p-FW-NarI/ PGK1p-RV-HindIII, PMA1p-FW-NarI/ PMA1p Rev, PMT1p-FW-NarI/ PMT1p-RV-HindIII.

Tab. 3.5: Konstruierte Plasmide und die darin enthaltenen konstitutiven *C. utilis*-Promotoren.

Plasmid	<i>C. utilis</i> -Promotor	Länge des Promotors
pMC1	<i>TDH3p</i>	972 bp
pMC11	<i>ACT1p</i>	940 bp
pMC9	<i>PGK1p</i>	1345 bp
pMC13	<i>PMA1p</i>	1005 bp
pMC15	<i>PMT1p</i>	1005 bp

3.2.1.2 Xylose-induzierbarer Promotor

In den letzten Jahren hat die Verwendung von Substraten basierend auf pflanzlichen Komponenten wie Lignocellulose immer mehr zugenommen (Tamakawa *et al.*, 2013b). Ein Hauptziel ist dabei die Produktion von Ethanol aus Biomasse (Tamakawa *et al.*, 2012; Tamakawa *et al.*, 2013b). Allerdings sind die meisten Hefen wie z. B. *S. cerevisiae* nicht in der Lage, die in der Hemicellulose enthaltene Xylose zu verstoffwechseln (Tamakawa *et al.*, 2012; Tamakawa *et al.*, 2013b). Diese Eigenschaft besitzt *C. utilis* und hat so das Potenzial auf kostengünstigen Substraten wie z. B. auf Abfallprodukten aus der Industrie zu wachsen (Aker und Robinson, 1987; Gold *et al.*, 1981; Harris *et al.*, 1948; Li *et al.*, 2009). Da die Wachstumsanalysen gezeigt hatten, dass *C. utilis* bzw. auch *P. jadinii* mit Xylose als Kohlenstoffquelle bis zu sehr hoher Zelldichte wachsen (Tab. 3.2), war das Ziel, eine heterologe Genexpression unter der Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors zu erreichen.

Für die Auswahl eines geeigneten Promotors, der durch Xylose induziert wird, wurde der Xylose-Abbauweg und die darin beteiligten Gene näher betrachtet (Abb. 1.4). Neben den Genen *XYL1*, *XDH1* und *XKS1* wurden in der Literatur weitere Gene identifiziert, die beim Transport eine wichtige Rolle spielen könnten. *GXS1* kodiert für den Glukose/Xylose Symporter und *GXF1* für den Glukose/Xylose Facilitator (Leandro *et al.*, 2006; Leandro *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2011). Die DNA-Sequenzen für die fünf am Xylose-Abbau beteiligten Gene wurden in der *C. utilis*-Genomsequenz (D. Tielker und J. F. Ernst, unveröffentlicht) durch BLAST-Analyse in der UniProt-Datenbank (www.uniprot.org/) identifiziert. Zunächst wurden die relativen Transkriptspiegel der Gene in Glukose- und Xylosehaltigem Minimalmedium in verschiedenen Wachstumsstadien untersucht. Dafür wurde der *C. utilis*-Wildtyp-Stamm DSM2361 in Minimalmedium mit Glukose (SMD) oder Xylose (SMX) als Kohlenstoffquelle kultiviert und es wurden jeweils Zellproben in der frühen und mittleren logarithmischen Phase sowie in der frühen und späten stationären Phase entnommen. Aus diesen Proben wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert (siehe 2.7.3, 2.7.15.3). Die Untersuchung des Transkriptspiegels erfolgte mit Hilfe der qPCR und den Primern RT-CuXYL1 Fw/Rv,

RT-CuXDH1 Fw/Rv, RT-CuXKS1 Fw/Rv, RT-CuGXS1 Fw/Rv, RT-CuGXF1 Fw/Rv. Als Referenz wurde das Transkript des hochkonservierten *ACT1*-Gens gewählt (RT-CuACT1 Fw/Rv). Im ersten Vorversuch zeigte sich, dass die Transkriptspiegel von *XYL1* und *XKS1* sehr niedrig waren, so dass diese für die weiteren Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt wurden (Daten nicht gezeigt).

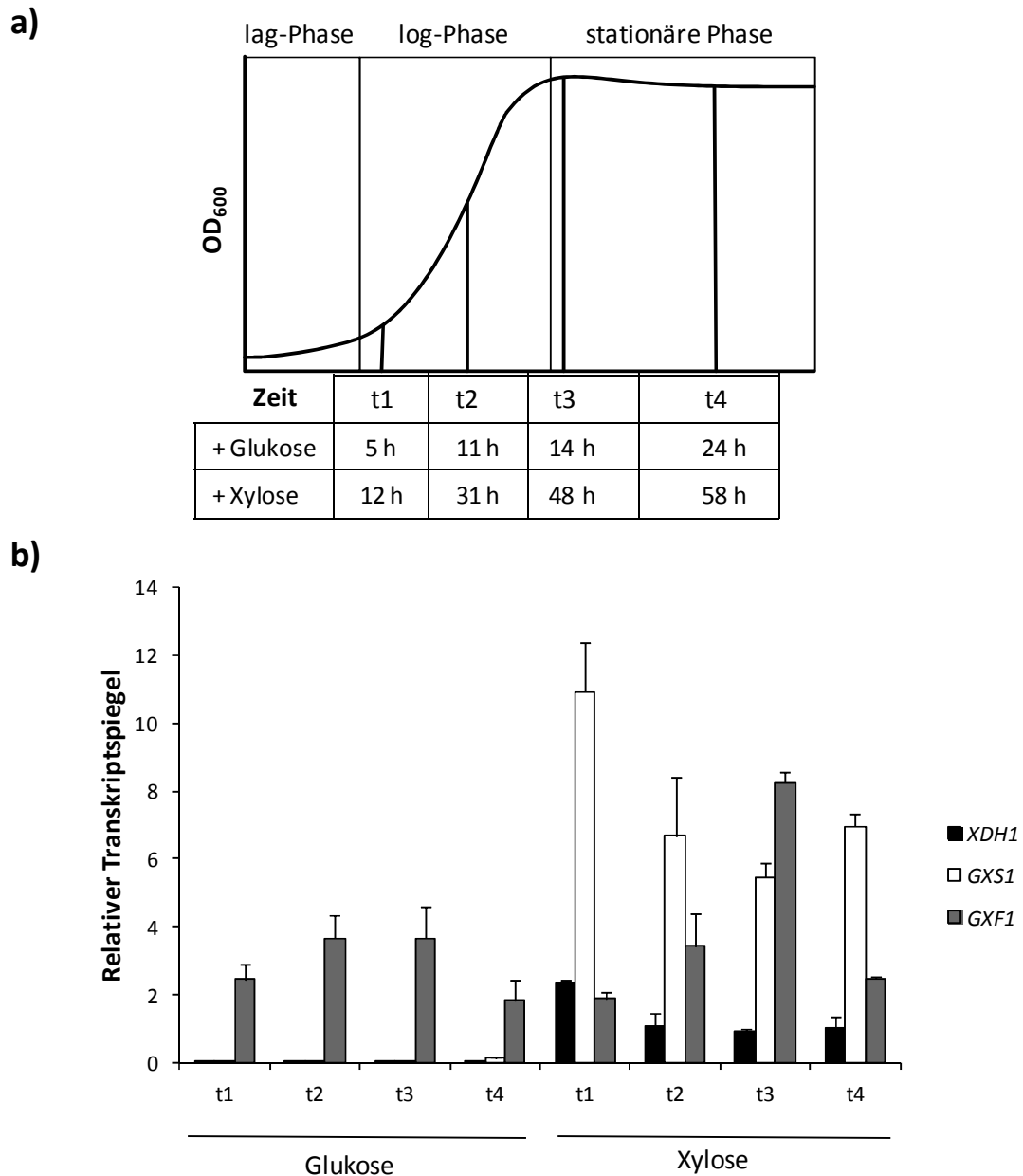


Abb. 3.5: Transkriptspiegel verschiedener am Xylose-Abbau beteiligter Gene. a) Schematische Darstellung der Zeitpunkte für die Probenentnahme während der Wachstumsphase: frühe logarithmische Phase t1, mittlere logarithmische Phase t2, frühe stationäre Phase t3 und späte stationäre Phase t4. b) Transkriptspiegel der untersuchten Gene für Xylosedehydrogenase (*XDH1*), Glukose/Xylose Symporter (*GXS1*) und Glukose/Xylose Facilitator (*GXF1*) in Bezug auf *ACT1* in Glukose- und Xylose-haltigem Minimalmedium bei 30 °C.

Die Transkriptspiegel der Gene *XDH1*, *GXS1* und *GXF1* in Glukose- und Xylose-haltigem Medium unterscheiden sich mit den beiden verwendeten Kohlenstoffquellen. Während der Transkriptspiegel von *GXF1* in beiden Medien ähnlich stark ausgeprägt ist, sind die Transkriptspiegel der anderen

beiden untersuchten Gene *XDH1* und *GXS1* nur im Xylose-haltigen Medium erkennbar erhöht (Abb. 3.5). Daraus lässt sich schließen, dass die Promotoren von *XDH1* und *GXS1* in Xylose aktiviert, aber in Glukose reprimiert werden. Zusätzlich ist dem Ergebnis zu entnehmen, dass der Transkriptspiegel von *GXS1* etwa sechsfach höher als der von *XDH1* ist.

Um eine eindeutige Aussage über die Promotoren treffen zu können, wurden die Promotorbereiche 862 bp stromaufwärts dem *XDH1*-ORF bzw. 1004 bp stromaufwärts dem *GXS1*-ORF mit den Primern *XDH1p-Fw-NarI*, *XDH1p-Rv-HindIII*, *GXS1p-Fw-NarI* und *GXS1p-Rv-HindIII* amplifiziert, wobei die genomische DNA von *C. utilis* DSM2361 als Template diente. Die PCR-Produkte wurden über die Schnittstellen *NarI* und *HindIII* in das Plasmid pSat1-3HA-ARS kloniert (Abb. 3.3); daraus entstanden die Plasmide pMC3 (*GXS1p*) und pMC7 (*XDH1p*) (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Konstruierte Plasmide und die darin enthaltenen Xylose-induzierbaren *C. utilis*-Promotoren

Plasmid	<i>C. utilis</i> -Promotor	Länge des Promotors
pMC3	<i>GXS1p</i>	1005 bp
pMC7	<i>XDH1p</i>	862 bp

3.2.2 Transformation von *C. utilis* mit Expressionsplasmiden

Die Transformation eines Plasmids in eine Hefezelle kann auf verschiedene Weise erfolgen. Die bekanntesten Methoden sind die Lithiumacetat-Methode, die Sphäroplastentransformation und die Elektroporation. Dabei ist die Transformationseffizienz, welche die Anzahl der Transformanten pro μg eingesetzter Plasmid-DNA, sehr unterschiedlich. In *P. pastoris* werden mit der Elektroporationsmethode 10^3 bis 10^4 Transformanten pro μg DNA erreicht, während in *S. cerevisiae* mit der Elektroporation bis zu 5×10^6 Transformanten erzielt werden können (Manivasakam und Schiestl, 1993). In *C. utilis* konnte bisher ebenfalls mit der Elektroporationsmethode die höchsten Transformationseffizienzen von $1,4 \times 10^4$ (Kondo *et al.*, 1995) und 600 bis 700 (Rodriguez *et al.*, 1998) Transformanten pro μg DNA beobachtet werden. Die Effizienz der Lithiumacetat-Methode war im Vergleich dazu mit 15 bis 40 Transformanten pro μg DNA jedoch sehr niedrig (Rodriguez *et al.*, 1998).

Die konstruierten Expressionsplasmide mit den *C. utilis*-Promotoren wurden nach der Methode von Mitchell (Wilson *et al.*, 1999) in *C. utilis* transformiert (siehe 2.7.16.3). Für die Selektion auf Festmedium (YPD-Medium) wurde basierend auf den Ergebnissen der Sensitivitätsanalyse eine Nourseothricin-Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ verwendet (Tab. 3.4). Um die Integration in das Genom über homologe Rekombination zu erreichen, wurden die Expressionsplasmide innerhalb des *C. utilis*-Promotors linearisiert (Abb. 3.6). Aus den Transformationen wurde die Transformationseffizienz bestimmt, welche die Anzahl der Transformanten wiedergibt, die aus $1 \mu\text{g}$ DNA resultiert (Tab. 3.7).

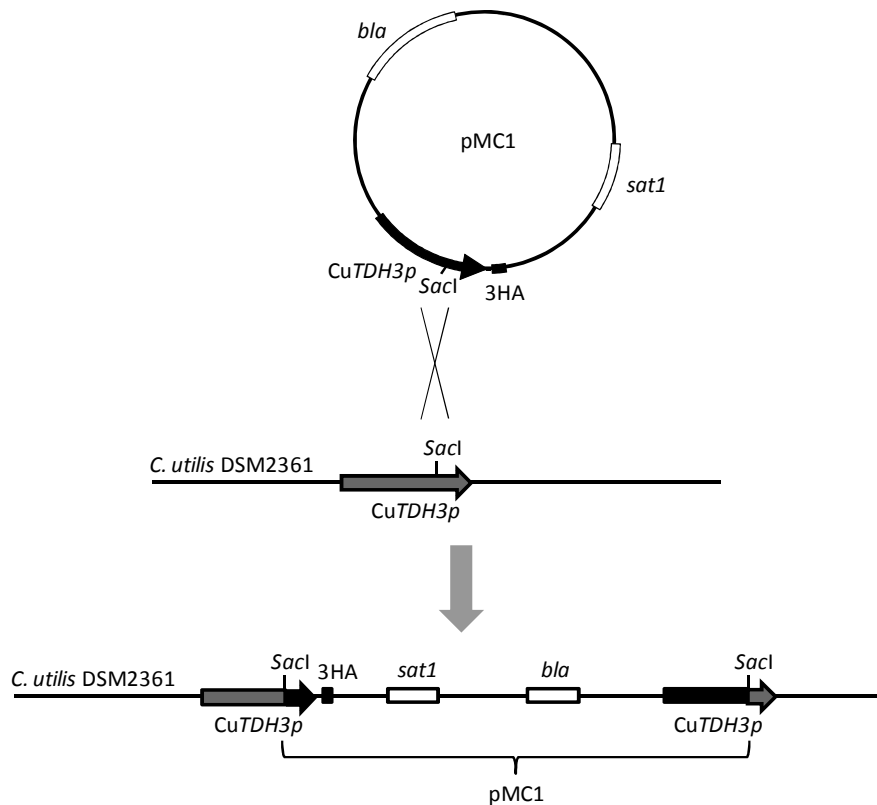


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der Integration von pMC1 in *C. utilis*. Beispiel für die Integration durch homologe Rekombination in das *C. utilis*-Genom anhand des Expressionsplasmids pMC1, das innerhalb des *TDH3*-Promotobereichs mit *SacI* linearisiert und dann in *C. utilis* DSM2361 transformiert wird.

Die Anzahl der Transformanten war bei der Integration in den *TDH3*- und *PGK1*-Promotor mit der Mitchell-Methode (siehe 2.7.16.3) am höchsten, während die Elektroporation (siehe 2.7.16.4) eine maximale Transformationseffizienz von nur 11 Transformanten pro μg DNA ergab (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.7: Transformationseffizienzen der Plasmide mit unterschiedlichen *C. utilis*-Promotoren. Transformationseffizienzen der im Promotorbereich linearisierten Expressionsplasmide in *C. utilis* DSM2361.

Promotor/Plasmid	Restriktionsschnittstelle zur Integration	Transformanten/ μg DNA
Cu <i>TDH3p</i> /pMC1	<i>SacI</i>	697
Cu <i>PMA1p</i> /pMC13	<i>BseRI</i>	385
Cu <i>ACT1p</i> /pMC11	<i>EcoRV</i>	252
Cu <i>PGK1p</i> /pMC9	<i>BmtI</i>	800
Cu <i>PMT1p</i> /pMC15	<i>BseRI</i>	378

3.2.3 Heterologe Expression des Reportergens *GFP*

Um die konstruierten Expressionsplasmide für die heterologe Expression intrazellulärer Gene zu überprüfen, wurden die ausgewählten *C. utilis*-Promotoren an das Reportergen *GFP* (*green fluorescent protein*) fusioniert. Dabei wurde das 726 bp-große *GFP*-Fragment mit den Primern CaGFP FW HindIII und CaGFP+Stop RV SphI aus dem Plasmid pGFP-URA3 mittels PCR amplifiziert. Eine Ausnahme stellte das Plasmid pMC9 (*PGK1p*) dar; für die Insertion von *GFP* in das Plasmid pMC9 wurde statt über *SphI* über die *Sall*-Schnittstelle kloniert, da sich bereits eine *SphI*-Schnittstelle innerhalb des *PGK1*-Promotorbereichs befand (Abb. 3.7 b). Die Primer wurden so gewählt, dass das Stoppkodon für das *GFP*-Gen mit amplifiziert wurde, da ein spezifischer Anti-GFP-Antikörper zum Nachweis des Proteins existiert. Die Expressionsplasmide wurden mit *HindIII* und *SphI* bzw. *Sall* geschnitten und mit dem entsprechenden *GFP*-Fragment ligiert. Dabei entstanden fünf Expressionsplasmide mit den *C. utilis*-Promotoren *TDH3p*, *ACT1p*, *PGK1p*, *PMA1p* und *PMT1p* (Tab. 3.8).

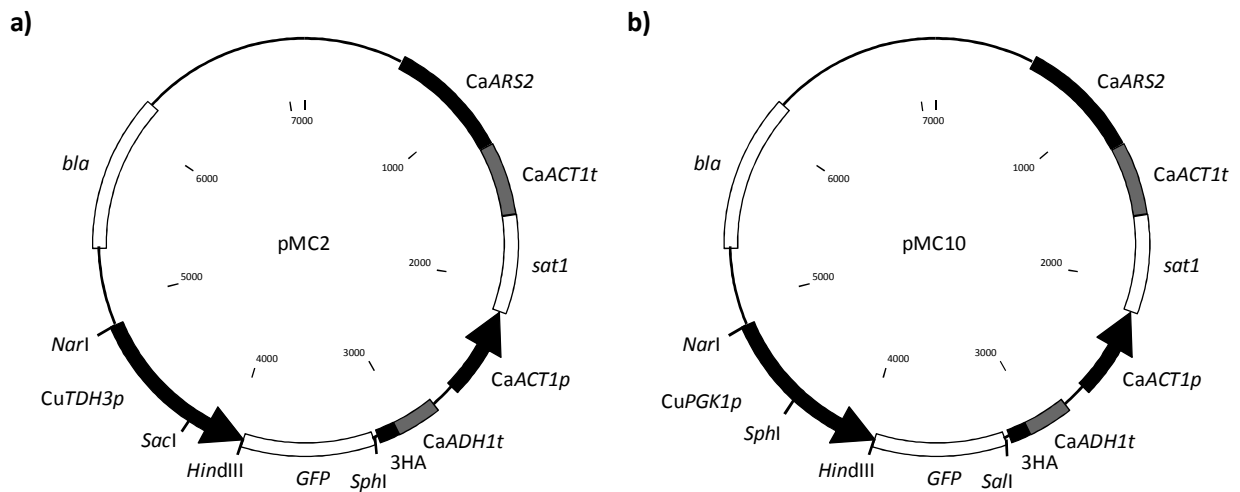


Abb. 3.7: Plasmidkarten von pMC2 und pMC10. a) Expressionsplasmid pMC2 mit *GFP* unter der Kontrolle des *TDH3*-Promotors aus *C. utilis*. b) pMC10 enthält den *PGK1*-Promotor aus *C. utilis* fusioniert mit *GFP*. Die anderen Sequenzen auf den Plasmiden entsprechen denen in Abb. 3.4.

Tab. 3.8: *GFP*-Expressionsplasmide mit *C. utilis*-Promotoren

Plasmid	<i>C. utilis</i> -Promotor	Reportergen
pMC2	<i>TDH3p</i>	<i>GFP</i>
pMC12	<i>ACT1p</i>	<i>GFP</i>
pMC10	<i>PGK1p</i>	<i>GFP</i>
pMC14	<i>PMA1p</i>	<i>GFP</i>
pMC16	<i>PMT1p</i>	<i>GFP</i>

Die funktionelle Expression von *GFP* wurde nach der Transformation in *C. utilis* mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Axioskop 40, Zeiss) überprüft. Dabei wurde mit UV-Licht einer Wellenlänge von 470 nm angeregt und das GFP-Signal bei 525 nm detektiert. Für alle Promotoren wurden die Zellen mit dem Leervektor ohne *GFP* mit denen verglichen, die das *GFP*-Gen auf dem Plasmid aufwiesen. Bei den Zellen ohne *GFP* war keine Fluoreszenz detektierbar, während bei den Zellen mit *GFP* ein eindeutiges Fluoreszenzsignal im Cytoplasma beobachtet werden konnte. In Abb. 3.8 a) sind repräsentativ nur die Mikroskopbilder für den *TDH3p*-Promotor, die *C. utilis*-Stämme MKCu1 (pMC1: *TDH3p*) und MKCu2 (pMC2: *TDH3p-GFP*), dargestellt, da das Ergebnis für die anderen Promotoren ähnlich ausfiel.

Zur weiteren Überprüfung der *GFP*-Expression wurde eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. Dafür wurden zunächst die Stämme MKCu1 (*TDH3p*) und MKCu2 (*TDH3p-GFP*) in YPD-Medium über Nacht kultiviert. Die Zellen aus 1 ml dieser Kulturen wurden mit Glasperlen mechanisch aufgeschlossen und Rohextrakte hergestellt (siehe 2.10.1). Von diesen Rohextrakten (aus ca. 9×10^9 Zellen) wurden 10 μ l auf ein SDS-Gel (4-20 %) aufgetragen und das GFP mit Anti-GFP aus dem Kaninchen (Primärantikörper) und Anti-Kaninchen (Sekundärantikörper) detektiert. Wie in Abb. 3.8 b) zu erkennen, ist ein deutliches GFP-Signal mit einer erwarteten Molekularmasse von ungefähr 27 kDa in den Transformanten MKCu2-1 bis -3 (Spuren 2-4), die das Plasmid pMC2 (*TDH3p-GFP*) tragen, sichtbar.

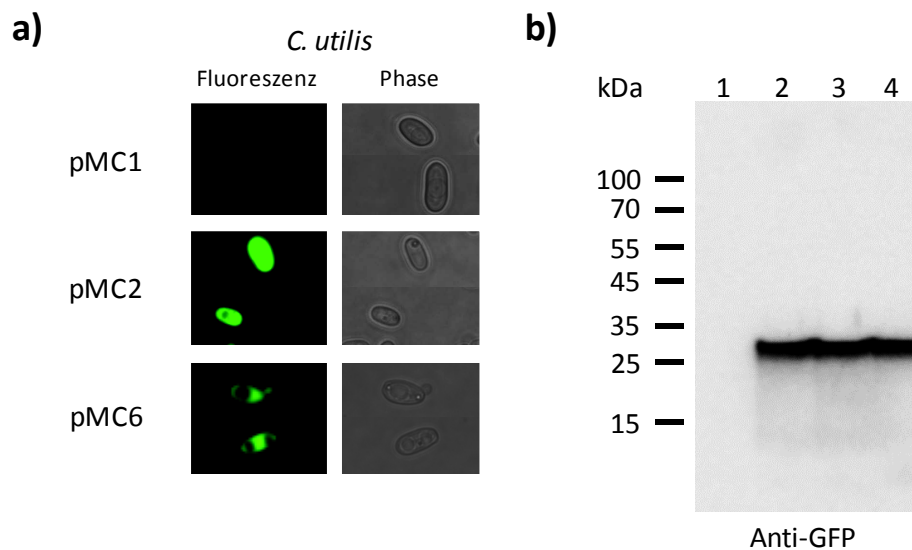


Abb. 3.8: Heterologe Expression von *GFP*. a) Einzelzellen von *C. utilis* DSM2361 aus der Phasen- und Fluoreszenzmikroskopie nach der Transformation von pMC1 (*TDH3p*) und pMC2 (*TDH3p-GFP*) bzw. pMC6 (*TDH3p-GFP HIS3*). b) Immunoblot-Analyse in *C. utilis*, bei welcher das heterolog exprimierte GFP (26,9 kDa) im Stamm MKCu2-1 bis -3 (Spuren 2-4, *TDH3p-GFP*) sichtbar ist. Als Kontrolle diente der Stamm MKCu1 ohne *GFP* (Spur 1, *TDH3p*). Für die Detektion wurde Anti-GFP als Primärantikörper verwendet.

3.2.3.1 Promotoreffizienz

Da die Promotoreffizienz bei Genen unterschiedlich ist, ist es notwendig, verschiedene Promotoren für die Genexpression miteinander zu vergleichen. Um den effizientesten Promotor für die *GFP*-Expression zu ermitteln, wurden jeweils drei Transformanten der Stämme MKCu2 (*TDH3p-GFP*),

MKCu10 (*PGK1p-GFP*), MKCu12 (*ACT1p-GFP*), MKCu14 (*PMA1p-GFP*) und MKCu16 (*PMT1p-GFP*) über Nacht in YPD-Medium bis zur stationären Phase wachsen gelassen und die Fluoreszenz im Fluorometer (Fluoroskan Ascent FL; Labsystems) gemessen. Die Zellen wurden in H₂O gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 1,0 verdünnt. Da in Vorversuchen festgestellt wurde, dass die Fluoreszenzwerte von ganzen Zellen und den entsprechenden Rohextrakten sehr ähnlich sind (Daten nicht gezeigt), wurde auf den Zellaufschluss verzichtet. Die Fluoreszenz der ganzen Zellen wurde anschließend durch Anregung durch Licht bei einer Wellenlänge von 485 nm und Detektion bei 538 nm gemessen. Die Fluoreszenzintensitäten der drei Transformanten wichen teilweise voneinander ab (Abb. 3.9).

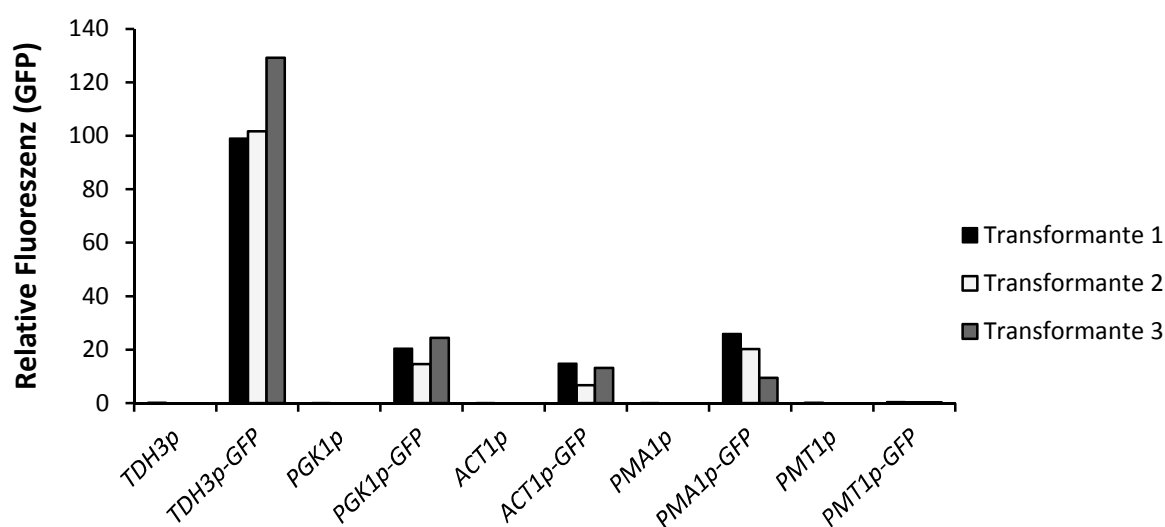


Abb. 3.9: Relative Fluoreszenz der GFP-Expression mit verschiedenen *C. utilis*-Promotoren. Für die Messung der GFP-Fluoreszenz im Fluorometer wurden die in YPD-Medium kultivierten Zellen (Transformante 1-3) der stationären Phase auf eine OD₆₀₀ von 1,0 verdünnt und mit UV-Licht einer Wellenlänge von 485 nm angeregt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 538 nm. Um die Fluoreszenz basierend auf der GFP-Expression zu erfassen, wurde zum Vergleich die entsprechende Vektorkontrolle ohne GFP-Gen gemessen.

Wie in Abb. 3.9 deutlich zu erkennen, ist die GFP-Fluoreszenz bei der Expression unter der Kontrolle des *CuTDH3*-Promotors am höchsten. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist bei den *PGK1*-, *ACT1*- und *PMA1*-Promotoren sehr ähnlich und im Vergleich zum *TDH3*-Promotor um das fünf- bis siebenfache geringer, während mit dem *PMT1*-Promotor fast keine Fluoreszenz messbar war.

3.2.3.2 Integrationsanalyse und Plasmidstabilität

Die konstruierten Plasmide wurden durch Transformation mit der Lithiumacetat-Methode in das *C. utilis*-Genom integriert. Dabei wurden die Expressionsplasmide innerhalb des nativen *C. utilis*-Promotorbereichs linearisiert, um die Integration mittels homologer Rekombination zu ermöglichen (siehe 3.2.2). Zunächst wurde die chromosomale Integration der Plasmide untersucht. Dafür wurde die genomische DNA der Stämme isoliert und zusammen mit der *C. utilis*-Wildtyp-DNA als Negativkontrolle und dem Ausgangsplasmid als Positivkontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurde unter Verwendung einer GFP-Sonde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt.

In Abb. 3.10 ist exemplarisch der Southern-Blot für die Überprüfung der chromosomalen Integration im *TDH3*-Promotorbereich gezeigt.

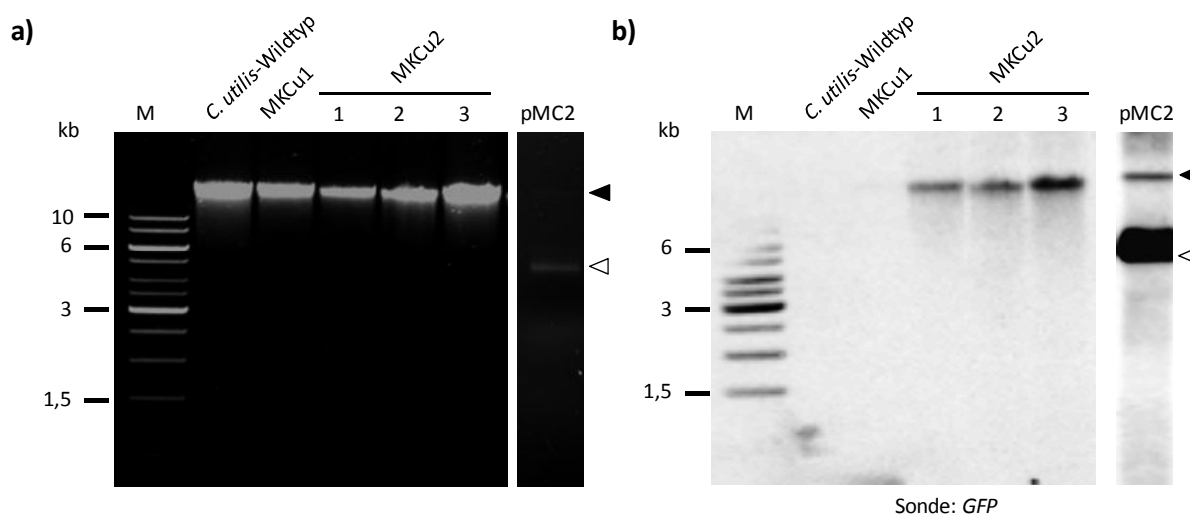


Abb. 3.10: Chromosomale Integration in das *C. utilis*-Genom. Untersuchung der chromosomalen Integration in den Stämmen MKCu1 (*TDH3p*) und drei MKCu2-Transformanten (*TDH3p-GFP*). **a)** Agarosegel nach Ethidiumbromid-Färbung der genomischen DNA von *C. utilis*-Wildtyp DSM2361, MKCu1 und MKCu2-1 bis -3, sowie des Ausgangsplasmids pMC2 in der entspannt-zirkulären (◄) sowie geschlossen-ringförmigen Form (◁). **b)** Southern-Blot-Analyse unter Verwendung einer DNA-Sonde für *GFP*. Detektion der *GFP*-Banden der genomischen DNA der MKCu2-Transformanten verglichen mit pMC2 (◄, ▷). (M: GeneRuler 1 kb DNA ladder, Fermentas)

Das als Kontrolle aufgetragene, ungeschnittene Plasmid pMC2 (*TDH3p-GFP*) zeigte nach Ethidiumbromid-Färbung das für ein ungeschnittenes Plasmid typische Bandenmuster mit Hauptsignalen für die entspannt-zirkuläre (◄) und geschlossen-ringförmige (▷) Form, während die genomische DNA der *C. utilis*-Stämme eine einzelne Bande oberhalb >10 kb des Größenstandards ergibt (Abb. 3.10 a). Auf dem Southern-Blot mit der *GFP*-Sonde sind nur die DNA-Banden für die genomische DNA der Stämme MKCu2-1 bis -3 (Spuren 1-3) und die Plasmid-DNA pMC2 erkennbar (Abb. 3.10 b). Da die *GFP*-Sequenz weder im *C. utilis*-Wildtyp noch im Stamm MKCu1 vorhanden ist, wurden hier keine Banden mit der *GFP*-Sonde detektiert. Da die im Southern-Blot detektierten *GFP*-Banden von MKCu2-1 bis -3 den Banden der genomischen DNA im Agarosegel entsprechen, wurde mit diesem Ergebnis nachgewiesen, dass pMC2 in den Transformanten nicht in frei-replizierender Form vorliegen, sondern in das *C. utilis*-Genom integriert ist. Ein identisches Ergebnis wurde auch für alle anderen Expressionsplasmide nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Bei allen untersuchten Transformanten wurde eine chromosomale Integration in das Genom festgestellt, so dass daraus geschlossen wurde, dass die aus *C. albicans*-stammende Replikatorsequenz (CaARS) in *C. utilis* nicht funktionell ist.

Anschließend sollte die Position der Plasmidintegration untersucht werden. Dafür wurde die genomische DNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten, das außerhalb des *TDH3*-Promotors und einmal im integrierten Plasmid schneidet. Durch die Wahl des Promotorbereichs als DNA-Sonde konnte so die richtige Integration überprüft werden. In Abb. 3.11 b) ist die schematische Darstellung der korrekten Integration in den *TDH3*-Promotor aufgezeigt. Dabei ergibt die Restriktion mit dem

Enzym *PciI* der genomischen DNA des Wildtyps durch die Hybridisierung der *TDH3p*-Sonde eine Bandengröße von 3,8 kb, während nach der Integration des Plasmids im Promotorbereich Banden der Größe von 3,2 und 7,7 kb entstehen sollten.

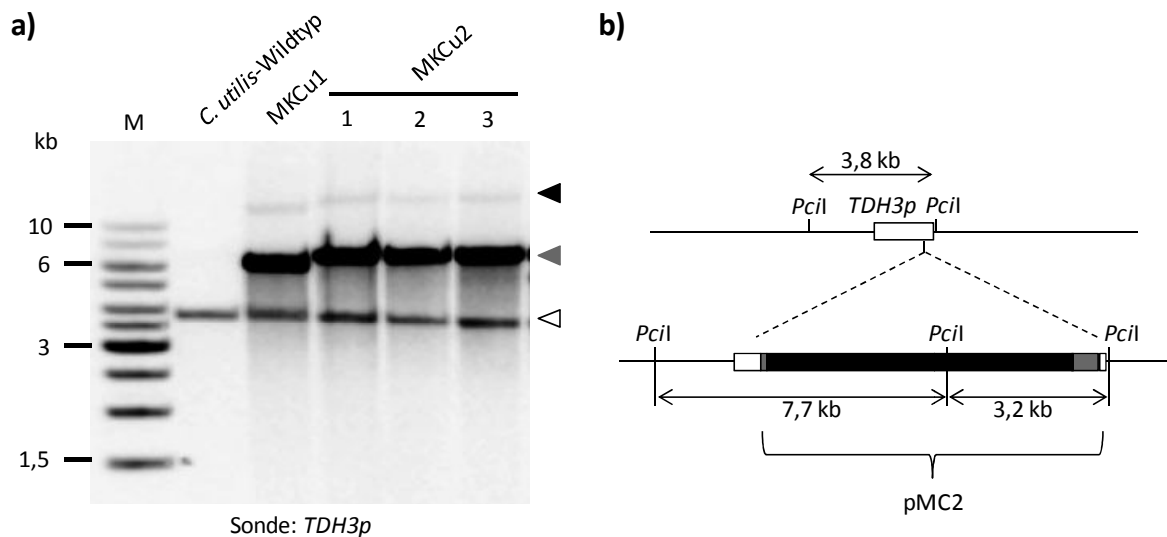


Abb. 3.11: Southern-Blot-Analyse zur Überprüfung der richtigen Integration. **a)** Southern-Blot mit dem *C. utilis*-Wildtyp DSM2361, MKCu1, MKCu2-1 bis -3 und der *TDH3p*-Sequenz als Sonde. (M: GeneRuler 1 kb DNA ladder, Fermentas) **b)** Schematische Darstellung der Integration von pMC2 in den *TDH3p*-Lokus. Während bei fehlender Integration eine Bande mit der Größe von 3,8 kb zu erwarten ist, würden bei einfacher Integration eine 3,2 kb- und eine 7,7 kb-Bande detektiert werden.

Auf dem Southern-Blot (Abb. 3.11 a) ist die 3,8 kb-Bande (◁) des Wildtyps in allen Proben deutlich zu erkennen, bei den Stämmen MKCu1 und MKCu2-1 bis -3 tritt zusätzlich auch eine intensive Bande >6 kb (◄) auf. Über der großen Bande des DNA-Größenstandards von 10 kb ist eine weitere schwache Bande sichtbar (◄). Auch wenn die intensive Bande die erwartete 7,7 kb-Bande darstellen sollte, ist die Bande von 3,2 kb nicht vorhanden. Aus diesem Ergebnis lässt sich vermuten, dass das Plasmid nicht korrekt in den *TDH3p*-Lokus, sondern an einem ektopischen, unbekanntem genomischen Ort integriert wurde.

Aufgrund der Tatsache, dass die Expressionsplasmide in das Genom integriert wurden und die funktionelle *GFP*-Expression nachgewiesen werden konnte, wurde eine Plasmidstabilitätsanalyse durchgeführt. Dadurch sollte herausgefunden werden, wie stabil das Plasmid an dem unbekanntem Ort auf den Chromosomen integriert ist. Dabei wurde untersucht, in wieweit die Zellen die Fähigkeit besitzen, bei Wachstum im nicht-selektiven Medium nach 50 Generationen das Plasmid zu behalten. Untersucht wurden die Stämme MKCu1 (*TDH3p*), MKCu2 (*TDH3p-GFP*) und MKCu10 (*PGK1p-GFP*). Nach dem Wachstum wurden die Zellen auf Nourseothricin-haltigen Agarplatten ausplattiert und die Kolonien auf GFP-Fluoreszenz untersucht (siehe 2.8).

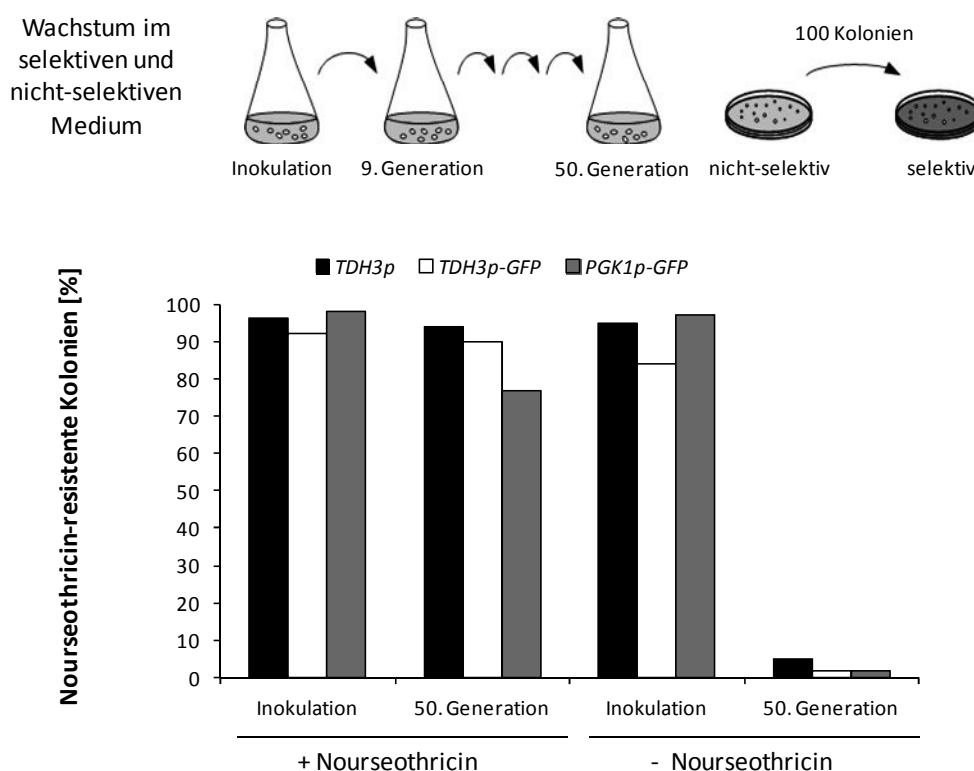


Abb. 3.12: Plasmidstabilitätsanalyse. Oberhalb des Diagramms ist die schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Untersuchung der Plasmidstabilität abgebildet. Zunächst wurde aus der selektiven Vorkultur (mit Nourseothricin) sowohl eine selektive als auch eine nicht-selektive Kultur (ohne Nourseothricin) beimpft (YPD-Medium). Diese Kultur wurde bis zur 9. Generation wachsen gelassen, um dann erneut Kulturen mit der gleichen Medienzusammensetzung (selektiv, nicht-selektiv) zu beimpfen; dieser Vorgang wurde bis zur 50. Zellgeneration wiederholt. Die Zellen der ersten Inokulation und nach der 50. Generation wurden auf nicht-selektiven YPD-Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden je 100 Kolonien auf selektiven Agarplatten wachsen gelassen. Zum Schluss wurde die Prozentzahl der Kolonien bestimmt, die auf selektivem Medium wachsen können. Das Ergebnis der Stämme MKCu1 (*TDH3p*), MKCu2 (*TDH3p-GFP*) und MKCu10 (*PGK1p-GFP*) ist in diesem Diagramm abgebildet.

In Abb. 3.12 ist das Ergebnis der Experimente zur Plasmidstabilität zu erkennen. Gezeigt ist die prozentuale Anzahl an Nourseothricin-resistenten Kolonien und die Einteilung nach den Zellen der Inokulation und der 50. Generation im selektiven bzw. nicht-selektiven Medium. Bei allen Stämmen ist deutlich zu sehen, dass nach 50 Generationen des Wachstums im nicht-selektiven Medium nur noch 2-5 % der Zellen das Plasmid tragen. Die Integration in dem unbekanntem Ort im Genom liefert also keine stabile Integration des Plasmids, trotz der deutlichen Funktionalität des Expressionssystems.

3.2.3.3 Änderung des Integrationsortes

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass das Plasmid pMC2 erfolgreich in das Genom integriert wurde. Da das Ziel der homologen Rekombination in den Promotorbereich von *C. utilis* nicht erreicht wurde, sollte ein weiterer Genlokus für die Plasmidintegration geprüft werden. Als mögliche Integrationsorte wurden die *C. utilis*-Gene *URA3*, *LEU2* und *HIS3* in Betracht gezogen. Um

das Expressionsplasmid (7,1 kb) nicht zu stark zu vergrößern, wurde nicht *LEU2* (1089 bp) oder *URA3* (801 bp), sondern das kleinere *HIS3*-Gen (678 bp; Basabe *et al.*, 2004) ausgewählt. Da eine chromosomale Integration kein *ARS* erfordert (siehe oben), wurde die *CaARS2*-Sequenz aus dem Expressionsplasmid entfernt und durch das *CuHIS3*-Gen ersetzt. Für die PCR wurden die Primer *CuHIS3* Fwd *KpnI*/*CuHIS3* Rev *KpnI* und als Template die genomische DNA von *C. utilis* verwendet. Das PCR-Produkt wurde als *KpnI*-Fragment in das Plasmid pMC2, welchem vorher das *CaARS2*-Fragment durch *KpnI*-Verdau entfernt wurde, ligiert. Das daraus entstandene Plasmid wurde pMC6 genannt.

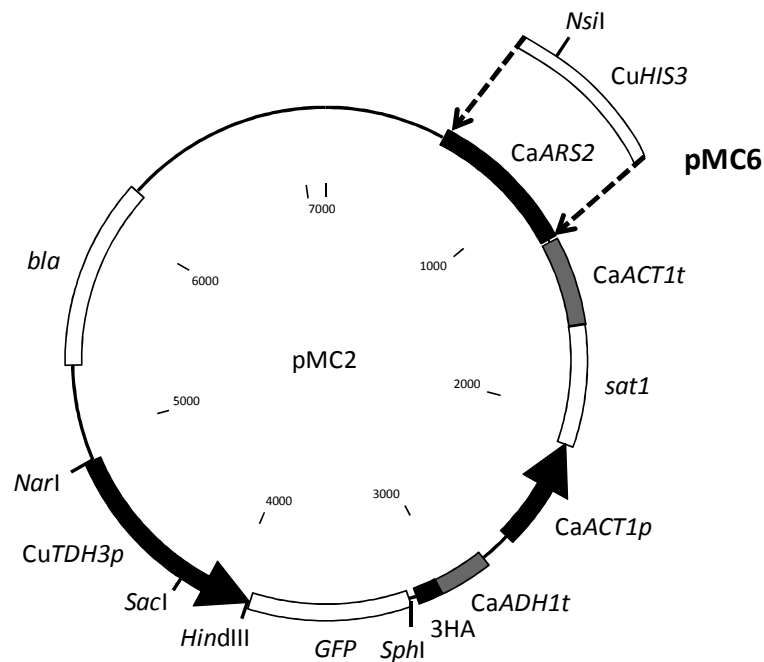


Abb. 3.13: Plasmidkarte von pMC6. Basierend auf dem Plasmid pMC2 wurde *CaARS2* durch das *CuHIS3*-Gen ersetzt. Die *NsiI*-Schnittstelle wurde verwendet, um das Plasmid für die Integration durch homologe Rekombination zu linearisieren. Die anderen Sequenzen auf dem Plasmid entsprechen denen in Abb. 3.4.

Zur Transformation und geplanten Plasmidintegration in *HIS3* wurde pMC6 mit *NsiI* im *HIS3*-Gen linearisiert. Die daraus resultierenden Transformanten wurden zunächst durch Kolonie-PCR mit den *GFP*-Primern *CaGFP* FW *HindIII* und *CaGFP*+Stop RV *SphI* (Daten nicht gezeigt) und zusätzlich durch Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 3.8 a) auf die Anwesenheit der *GFP*-Sequenz bzw. GFP-Fluoreszenz überprüft. Anschließend wurde die chromosomale Integration durch Southern-Blot-Analyse (Sonde: *GFP*) wie in Abb. 3.10 nachgewiesen (Abb. 3.14 a). Außerdem wurde die genomische DNA der Transformanten mit *ScaI* geschnitten und die Richtigkeit des Integrationsortes untersucht.

Wie in Abb. 3.14 c) zu sehen, konnte neben der Bande, die kleiner als die 1,5 kb-Bande des Wildtyps (\blacktriangleleft) ist, auch die für das richtig integrierte Plasmid charakteristischen Banden mit 2,9 (\blacktriangleleft) und 5,5 kb (\blacktriangleleft) von der *HIS3*-Sonde detektiert werden. In Abb. 3.14 c) ist allerdings nur das Ergebnis der drei richtig integrierten Transformanten aus insgesamt 20 untersuchten Transformanten aufgezeigt. In 17 Transformanten war das Plasmid nicht im *HIS3*-Lokus, sondern ektopisch integriert. Dadurch wird

deutlich, dass die Wahrscheinlichkeit der unspezifischen, nicht-homologen Integration in das *C. utilis*-Genom sehr hoch liegt.

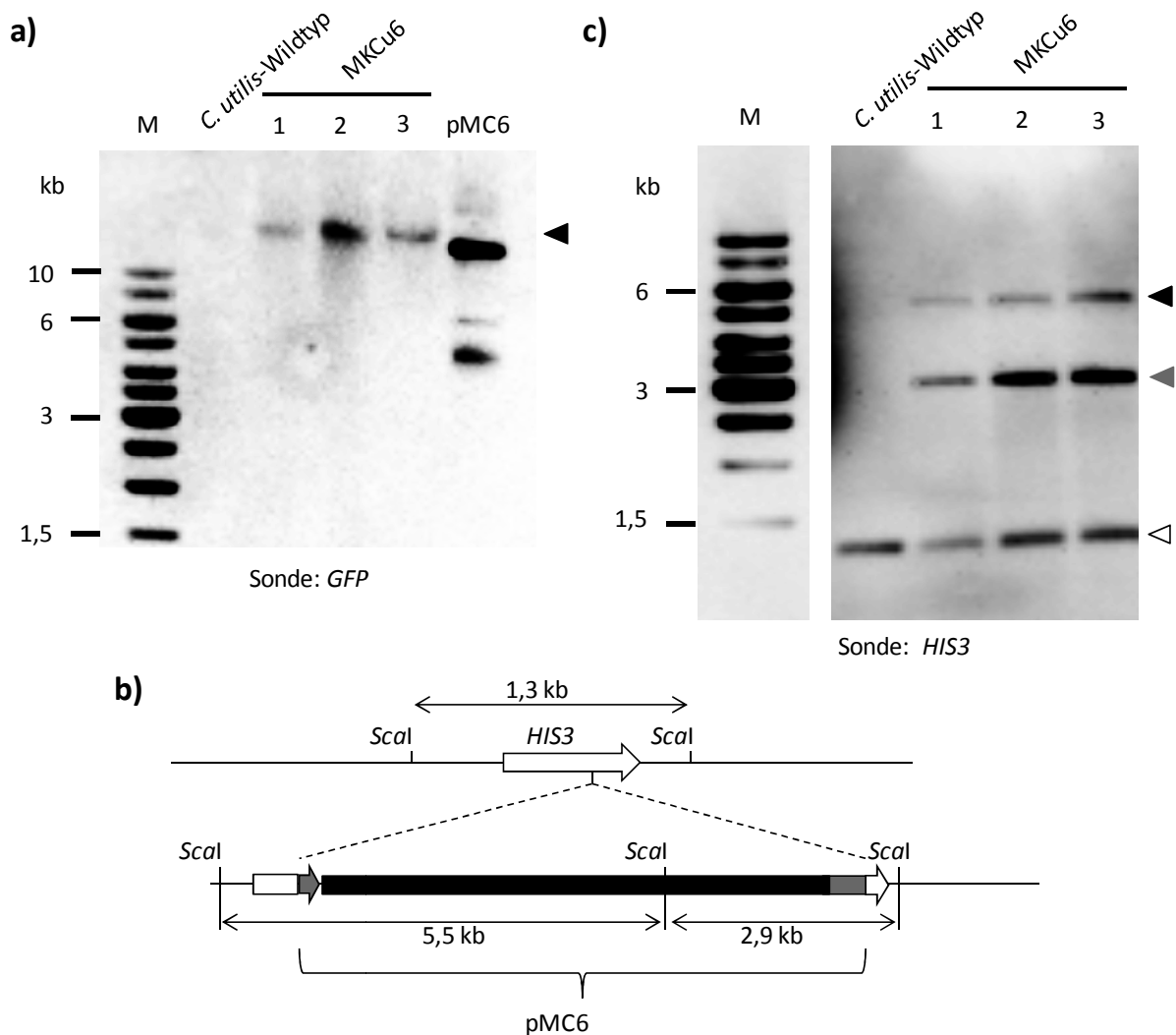


Abb. 3.14: Integrationsanalyse im *HIS3*-Lokus. a) Nachweis der chromosomalen Integration des Plasmids pMC6 in das *C. utilis*-Genom im Southern-Blot. Zu sehen ist die durch die *GFP*-Sonde markierte DNA in den drei Transformanten von MKCu6 (◄) und pMC6 als Positivkontrolle. Das *C. utilis*-Genom weist keine *GFP*-Sequenz auf und wurde deshalb als Negativkontrolle verwendet. (M: GeneRuler 1 kb DNA ladder, Fermentas) **b)** Schematische Darstellung der Integrationsanalyse durch den Southern-Blot. Durch das Schneiden der DNA mit *Scal* entsteht eine 1,3 kb-Bande im Wildtyp und im Falle der richtigen Integration eine 2,9- und eine 5,5 kb-Bande. M ist der DNA-Größenstandard (GeneRuler 1 kb DNA ladder). **c)** Southern-Blot-Analyse zur Überprüfung der richtigen Integration des Plasmids pMC6 in MKCu6. Dafür wurde die genomische DNA mit *Scal* geschnitten und die Integration mittels *HIS3*-Sonde untersucht. Neben der Wildtyp-Bande, die niedriger als 1,5 kb (◄) ist, ist in den Transformanten durch die richtige Integration eine 3- (◄) und eine 5,5 kb (◄)-Bande zu sehen.

Der Grund für die Änderung des Integrationsortes war die niedrige Plasmidstabilität bei ektopischer Integration (Abb. 3.12). Durch die Integration des Plasmids in den *HIS3*-Lokus wurde eine höhere Stabilität erhofft. Daher wurde mit drei Transformanten des Stammes MKCu6 eine Plasmidstabilitätsanalyse durchgeführt (siehe 2.8).

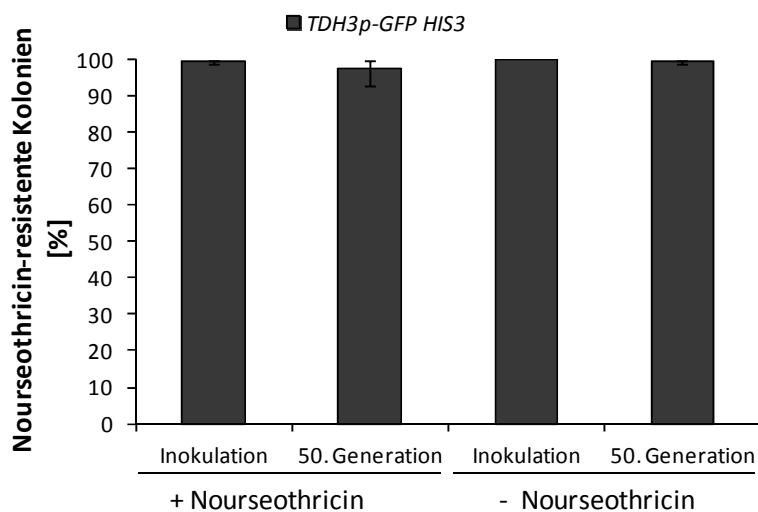


Abb. 3.15: Plasmidstabilitätsanalyse nach Integration in den *HIS3*-Lokus. Abgebildet ist die prozentuale Anzahl der Kolonien des Stammes MKCu6 (Mittelwert aus drei Transformanten) bei Inokulation und nach 50 Generationen, die nach Kultivierung im selektiven (+Nourseothricin) bzw. nicht-selektivem (-Nourseothricin) Medium das Plasmid und die damit verbundene Nourseothricin-Resistenz aufwiesen. Die Plasmidstabilität wurde wie in Abb. 3.12 beschrieben durchgeführt.

Wie in Abb. 3.15 deutlich zu erkennen, konnte durch die korrekte Integration in den *HIS3*-Lokus die Plasmidstabilität auf nahezu 100 % gesteigert werden. Das bedeutet, dass die Transformanten bei Kultivierung im nicht-selektiven Medium, also ohne Nourseothricin, auch nach 50 Generationen das Plasmid stabil im Genom integriert hatten.

Im Southern-Blot in Abb. 3.14 c) fällt jedoch auf, dass die Wildtyp-Bande bzw. die des *HIS3*-Lokus ohne Integration von 1,3 kb in allen Transformanten auftaucht. Daraus kann geschlossen werden, dass auch in diesem Fall zwar das Plasmid im *HIS3*-Lokus integriert ist, aber durch die Polyploidie von *C. utilis* nicht in allen *HIS3*-Allelen vorhanden ist. Um eine Integration in alle Allele zu erreichen, wurden die Transformanten zwei Mal über Nacht in selektivem (mit Nourseothricin) und anschließend neun Mal über Nacht in nicht-selektivem (ohne Nourseothricin) Medium kultiviert (siehe 2.9). Darauf folgte eine Integrationsanalyse mittels Southern-Blot. In der neunten Übernachtskultur im nicht-selektiven Medium konnte im Southern-Blot die 1,3 kb-Bande (<) nicht mehr detektiert werden (Abb. 3.16). In diesem Stamm MKCu6-9 waren nur noch die Banden mit den Größen 2,9 (<) und 5,5 kb (<) detektierbar. Deshalb konnte in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass das Plasmid in alle *HIS3*-Allele in *C. utilis* integriert wurde. Da die Plasmidstabilität schon vorher fast 100 % betrug, war keine Steigerung zu erwarten. Dies wurde auch in einer Plasmidstabilitätsanalyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Unter Berücksichtigung des Southern-Blots (Abb. 3.16) wurde im Vergleich zu MKCu6 (Abb. 3.14 c) zusätzlich eine höhere GFP-Fluoreszenz erwartet, da durch die Integration in alle *HIS3*-Allele möglicherweise das Plasmid in MKCu6-9 in einer höheren Kopiezahl vorlag. Eine Fluoreszenzmessung im Fluorometer (siehe 3.2.3.1) ergab keinen Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen MKCu6 und MKCu6-9 (Daten nicht gezeigt). Unerwarteterweise entsprach die Fluoreszenz beider

Stämme nur einen Viertel der Fluoreszenzintensität von MKCu2 (*TDH3p-GFP*). Deshalb wurde vermutet, dass die heterologe GFP-Expression durch die Integration im *HIS3*-Lokus in *C. utilis*, unabhängig davon, ob das Plasmid in allen *HIS3*-Allelen vorliegt, negativ beeinflusst wird.

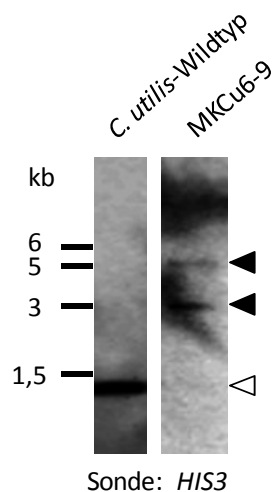


Abb. 3.16: Southern-Blot-Analyse von MKCu6-9 nach Integration in alle *HIS3*-Allele. Untersuchung von MKCu6 nach zweimaliger Kultivierung in selektivem YPD-Medium (mit 10 µg/ml Nourseothricin) und anschließender neunmaliger Kultivierung in nicht-selektivem (ohne Nourseothricin) YPD-Medium. In der Wildtyp-Kontrolle ist die für das *HIS3*-Gen-stehende Bande von 1,3 kb (◁) zu sehen, in der Probe MKCu6-9 hingegen nur noch eine bei unter 3 kb (◄) und eine andere zwischen 5 und 6 kb (◄) (vgl. Abb. 3.14 b). (M: GeneRuler 1 kb DNA ladder, Fermentas)

3.2.3.4 Heterologe Expression von *GFP* mit dem *GXS1*-Promotor

Wie in Abb. 3.5 gezeigt wurde, wurden die Promotoren der Gene *XDH1* und *GXS1* während des Wachstums in Glukose-haltigen Medium reprimiert und in Xylose aktiviert. Für die heterologe *GFP*-Expression wurden die Plasmide pMC3 (*GXS1p*) und pMC7 (*XDH1p*) in der multiple cloning site stromabwärts der Promotoren mit *Hind*III und *Sph*I geschnitten, um das *Hind*III-*Sph*I-*GFP*-Fragment zu klonieren (vgl. Abb. 3.7 a). Die aus den Ligationen entstandenen Plasmide wurden pMC4 (*GXS1p-GFP*) und pMC8 (*XDH1p-GFP*) genannt. Beide Plasmide wurden in *C. utilis* transformiert und die Transformanten auf Nourseothricin-haltigem Festmedium selektiert. Die Regulation der Promotoren und die *GFP*-Expression wurde durch die Kultivierung der Stämme MKCu4 (pMC4) und MKCu8 (pMC8) in SMD- und SMX-Medium und anschließender Fluoreszenzmikroskopie miteinander verglichen. In Abb. 3.17 a) sind die Einzelzellen beider Stämme MKCu4 und MKCu8 abgebildet. Es ist deutlich erkennbar, dass beide Stämme in Glukose-haltigem Medium keine *GFP*-Fluoreszenz zeigten, während Zellen, welche in Xylose-haltigem Medium kultiviert wurden, fluoreszierten. Zusätzlich wurde durch Immunoblot-Analyse das Protein *GFP* mit einer molekularen Masse von ungefähr 27 kDa in Xylose-haltigem Minimalmedium nachgewiesen (Abb. 3.17 b; Spuren 2 und 3: MKCu4-1, -2). Als Negativkontrolle wurde ebenfalls ein Stamm mit dem Leervektor (ohne *GFP*-Sequenz) untersucht (Abb. 3.17 b; Spur 1: MKCu3). Bei näherer Betrachtung der Fluoreszenzbilder fiel auf, dass die Zellen des Stammes MKCu4 eine höhere Fluoreszenzintensität aufweisen. Dieses Ergebnis bestätigt das Ergebnis der qPCR, bei dem auch der *GXS1*-Transkriptspiegel deutlich über dem von *XDH1* lag (Abb. 3.5). Beide Experimente zeigen, dass der *GXS1*-Promotor deutlich stärker als der *XDH1*-Promotor und deshalb für die weitere Xylose-induzierte Genexpression besser geeignet ist.

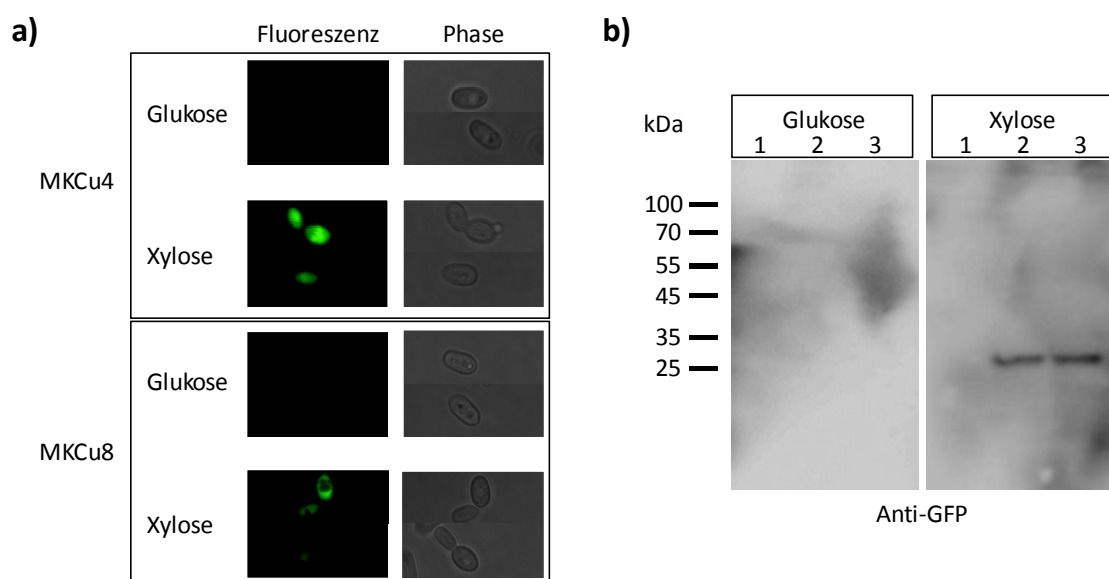


Abb. 3.17: *C. utilis* mit Xylose-induzierbaren Promotoren. a) Einzelzellen der Stämme MKCu4 (*GXS1p-GFP*) und MKCu8 (*XDH1p-GFP*) in Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie. Die Zellen wurden entweder in SMD (Glukose)- oder in SMX (Xylose)-Medium kultiviert. **b)** Immunoblot-Analyse zum Nachweis von GFP unter der Kontrolle des *GXS1*-Promotors. Dabei wurden der Leervektor ohne GFP (Spur 1: MKCu3) und zwei Stämme mit GFP (Spuren 2, 3: MKCu4-1 und -2) bei Wachstum in Glukose- und Xylose-haltigem Minimalmedium untersucht. Für die Detektion wurde Anti-GFP aus der Maus als Primärantikörper verwendet.

3.2.3.5 Regulation des *GXS1*-Promotors durch Glukose und Xylose

Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass der *GXS1*-Promotor für die Xylose-induzierte Expression von *GFP* effizienter als der *XDH1*-Promotor ist. Um die Auswirkung von Glukose auf die *GXS1*-Promotoraktivität näher zu untersuchen, wurde der Stamm MKCu4 (*GXS1p-GFP*) in Minimalmedium verschiedener Zusammensetzungen bei 30 °C kultiviert und sowohl die OD_{600} als auch die relative GFP-Fluoreszenz über die Zeit gemessen. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle wurden je eine Kultur mit 0,5 % Glukose (Glu) und eine mit 2 % Xylose (Xyl) gewählt. Außerdem wurde eine Kultur mit 0,5 % Glukose und zusätzlich 2 % Xylose als Kohlenstoffquellen beimpft (Glu, Xyl). Zur Untersuchung der Induktionsfähigkeit des *GXS1*-Promotors wurde eine Kultur verwendet, die zu Beginn nur 0,5 % Glukose enthielt und erst zu einem späteren Zeitpunkt, nach vollständiger Verwertung der Glukose, 2 % Xylose in das Medium hinzugefügt wurde (Glu+Xyl). Der Zeitpunkt der vollständigen Glukose-Verwertung wurde in einem Vorversuch mit Hilfe der Fehlingschen Reaktion bestimmt (siehe 2.11). In diesem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass die Glukose bereits nach 24 h nicht mehr im Medium nachzuweisen war (Daten nicht gezeigt). Der Induktionszeitpunkt wurde daher auf 30 h nach Inokulation gewählt, um die vollständige Verwertung der Glukose vor der Zugabe von Xylose gewährleisten zu können.

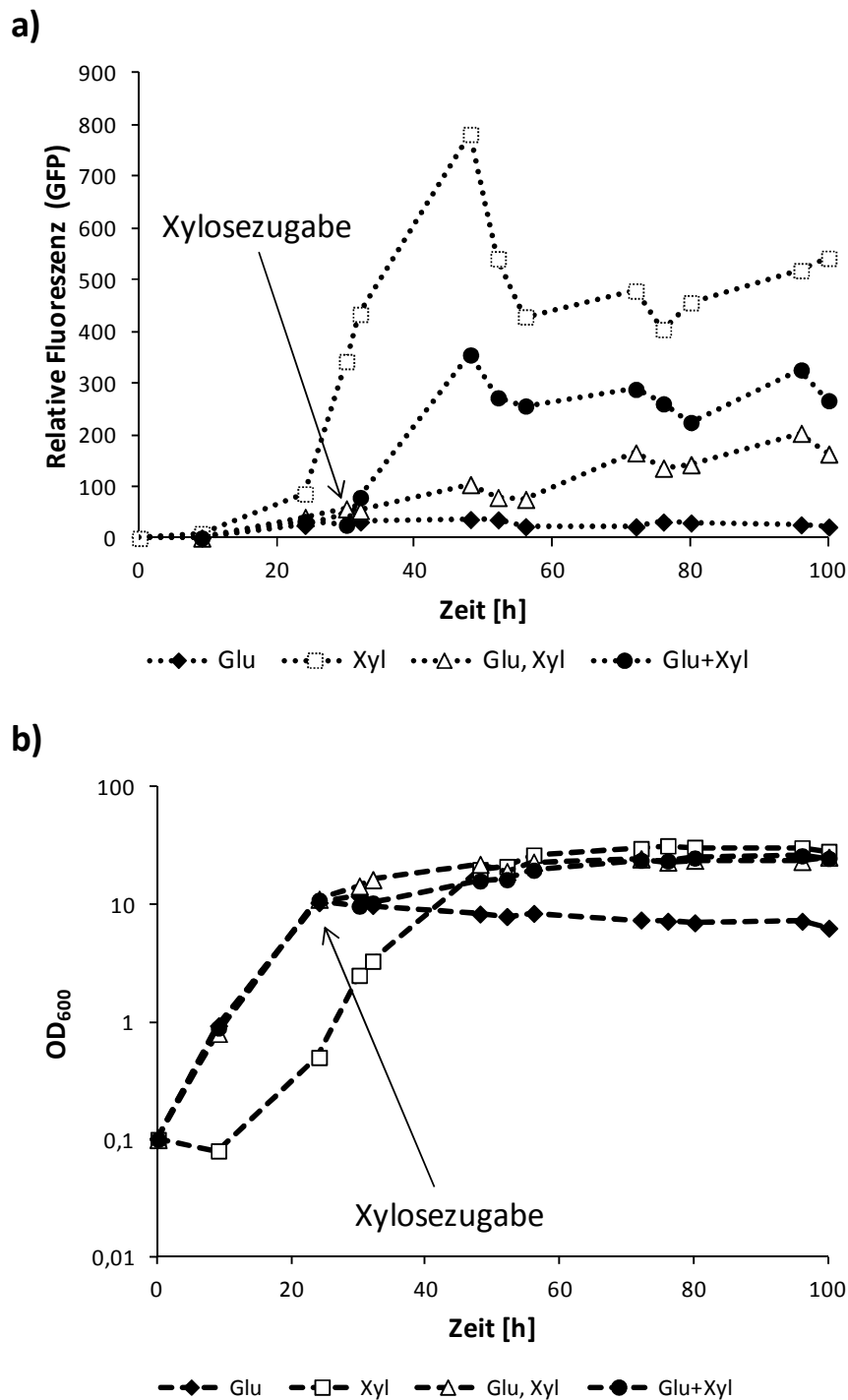


Abb. 3.18: Regulation des *GXS1*-Promotors durch Glukose und Xylose. Der Stamm MKCu4 wurde kultiviert in Minimalmedium (SM) bei 30 °C mit vier verschiedenen Kohlenstoffquellen: 0,5 % Glukose (Glu; ◆), 2 % Xylose (Xyl; □), 0,5 % Glukose und 2 % Xylose (Glu, Xyl; △), 0,5 % Glukose und Zugabe von 2 % Xylose nach 30 h (Glu+Xyl; ●). Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Xylosezugabe nach 30 h in den jeweiligen abgebildeten Kurven wieder. **a)** Relative GFP-Fluoreszenz über die Zeit. **b)** Verlauf der OD₆₀₀ über die Zeit.

Die Kulturen wurden mit einer Übernachtskultur des Stammes MKCu4 auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 30 °C kultiviert. Über die Zeit wurde sowohl die OD₆₀₀ als auch die Fluoreszenz von

GFP gemessen. Nach 30 h wurde der Kultur mit 0,5 % Glukose im Anfangsmedium 2 % Xylose hinzugegeben (Glu+Xyl, ●). Alle Kulturen, die 0,5 % Glukose enthielten, zeigten einen sehr ähnlichen Wachstumsverlauf, während die Kultur mit 2 % Xylose erst zu einem späteren Zeitpunkt in die logarithmische Phase eintrat. In der stationären Phase erreichte diese Kultur wie die anderen Kulturen eine OD₆₀₀ von bis zu 30. Die Kultur mit 0,5 % Glukose erreichte aufgrund der niedrigen Glukosekonzentration nur eine OD₆₀₀ von etwa 6. In Abb. 3.18 a) ist der Verlauf der GFP-Fluoreszenz über die Zeit dargestellt. Es ist deutlich sichtbar, dass der Stamm MKCu4 in Gegenwart von Glukose als einziger Kohlenstoffquelle keine GFP-Fluoreszenz aufweist (Glu; ◆), im Gegensatz zum Wachstum in einem nur Xylose-enthaltenen Medium (Xyl; □). Die Kultur, die beide Kohlenstoffquellen enthielt (Glu, Xyl; △), zeigte eine deutlich niedrigere Fluoreszenz des Reporterproteins GFP als die Kultur, bei welcher die Xylose erst nach vollständiger Verstoffwechslung der Glukose hinzugegeben wurde (Glu+Xyl; ●). Dieses Experiment zeigt, dass die Induktion des *GXS1*-Promotors durch die spätere Zugabe von Xylose zu einer höheren GFP-Fluoreszenz führt. Andererseits wird deutlich, dass die Autoinduktion des *GXS1*-Promotors durch die im Glukose-Medium enthaltene Xylose möglich ist.

3.2.4 Heterologe Expression des Reportergens *CALB*

Zur Untersuchung der Sekretionsfähigkeit von *C. utilis* wurde als weiteres Reportergen die Lipase B aus *C. antarctica* (*CALB*) gewählt. Dieses Modellgen besitzt eine Präpro-Sequenz am N-terminalen Ende und wurde schon in anderen Organismen erfolgreich sekretiert (Blank *et al.*, 2006; Eom *et al.*, 2013; Tamalampudi *et al.*, 2007). Die Expression und Sekretion von CalB in *C. utilis* wurde bereits unter der Kontrolle des *TDH3*-Promotors aus *C. utilis* durchgeführt, wobei jedoch der größte Anteil des synthetisierten Proteins in den Zellen verblieb (Bürth, 2013).

Für die Konstruktion des Expressionsplasmids wurde das Plasmid pMC3 (*GXS1p*) mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Pac*I geschnitten. Die Ligation des linearisierten Plasmids erfolgte mit dem 1060 bp-großen *CALB*-Fragment (NCBI GenBank-Nr.: KC692236), welches für *P. jadinii*, basierend auf 29 Genen (10 740 Kodons) von *P. jadinii* aus der Kazusa-Datenbank (Kazusa DNA Research Institute, Japan), kodonoptimiert wurde (Life Technologies GmbH). Das daraus resultierende Plasmid pMC5 wurde für die Integration durch homologe Rekombination im *GXS1*-Promotorbereich mit *Dr*III linearisiert und in *C. utilis* transformiert. Die Transformanten MKCu5 wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primern *CALB* Fw und *CALB* Rv überprüft. Als Negativkontrolle wurde der *C. utilis*-Wildtyp-Stamm DSM2361 verwendet. Alle untersuchten Transformanten zeigten im Agarosegel die für die *CALB* erwartete Bande von ungefähr 1 kb (Daten nicht gezeigt), so dass daraus geschlossen wurde, dass das Plasmid mit der *CALB*-Sequenz in den Transformanten vorlag. Anschließende Southern-Blot-Analysen zeigten, dass die Plasmide in das *C. utilis*-Genom ektopisch integriert wurden (Daten nicht gezeigt). Um die Funktionalität und die Sekretion der *CALB* nachzuweisen, wurden mehrere Transformanten des Stammes MKCu5 (*GXS1p-CALB*) auf Tributyrinplatten überführt und nach zwei Tagen bei 30 °C für vier Tage bei 37 °C inkubiert.

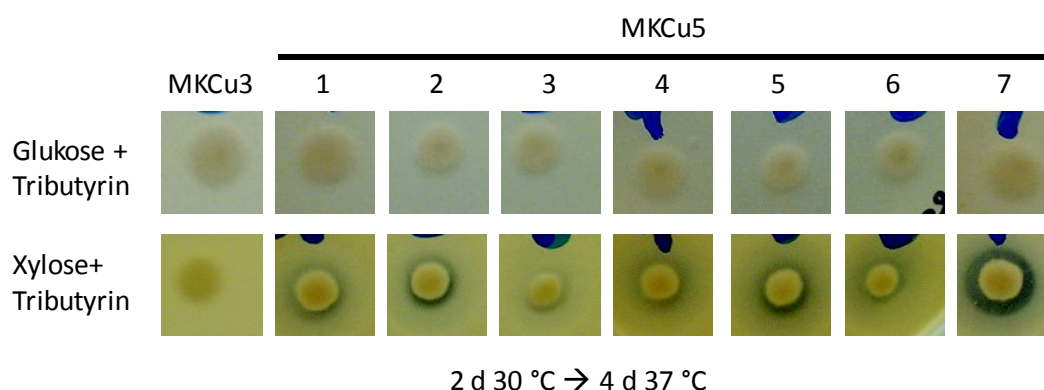


Abb. 3.19: Tributyrinplatten zum Nachweis von CalB. Kolonien von MKCu3 (*GXS1p*) und MKCu5 (*GXS1p-CALB*) auf Glukose- (obere Reihe) oder Xylose-haltigen (untere Reihe) Tributyrinplatten. Die Kolonien der Transformanten MKCu3 und MKCu5-1 bis -7 wurden auf Festmedium überführt und zunächst zwei Tage bei 30 °C und anschließend vier Tage bei 37 °C inkubiert. Die klaren Höfe auf dem Xylose-haltigen Medium sind der Nachweis für den Abbau des Lipids Tributyrin durch die sekretierte und funktionelle CalB.

Wie in Abb. 3.19 dargestellt, waren um die Kolonien der Transformanten mit *CALB* (MKCu5-1 bis -7) auf Xylose-haltigen Tributyrinplatten klare Höfe zu erkennen, während sowohl beim Kontrollstamm ohne *CALB* (MKCu3), als auch bei den Kolonien auf Glukose-haltigen Tributyrinplatten, die Klärung ausblieb. Die Klärung der Platten deutet darauf hin, dass die sekretierte Lipase die Fettsäurebindungen des Lipids spaltet und so das Lipid abgebaut werden kann. Die klaren Höfe sind bei den Transformanten unterschiedlich groß ausgeprägt, was wahrscheinlich auf die nicht bekannte Kopiezahl der Plasmide in den Transformanten zurückzuführen ist. Dieser einfache Test auf Tributyrinplatten zeigt, dass die Lipase durch *C. utilis* exprimiert und sekretiert wird.

Auch die Immunoblot-Analyse der CalB in Xylose- und Glukose-haltigem Medium zeigt, dass die Lipase nur in Gegenwart von Xylose synthetisiert wird (Abb. 3.20). Allerdings ist hier auch deutlich zu sehen, dass nur eine sehr geringe und damit für die Immunoblot-Analyse schwer zu detektierende Menge an CalB in das Medium sekretiert wird (◀). Das Signal für die CalB mit einer molekularen Masse von ungefähr 41 kDa ist jedoch in den Zellproben während des Wachstums in Xylose sehr deutlich erkennbar (◀). Eine schwache Bande zwischen 75 und 90 kDa könnte auf eine Dimerbildung der Lipase hindeuten (◀).

Weitere Versuche hatten gezeigt, dass die Lipasesynthese erst mit der Zeit stärker wird und die Menge des sekretierten Proteins in der stationären Phase am größten ist (Bürth, 2013). Um diese zeitabhängige Zunahme der Lipase im Medium qualitativ zu untersuchen, wurden die gleichen Proben der Immunoblot-Analyse auch auf Lipaseaktivität im Medium und in der entsprechenden Zellmenge gemessen (siehe 2.10.9).

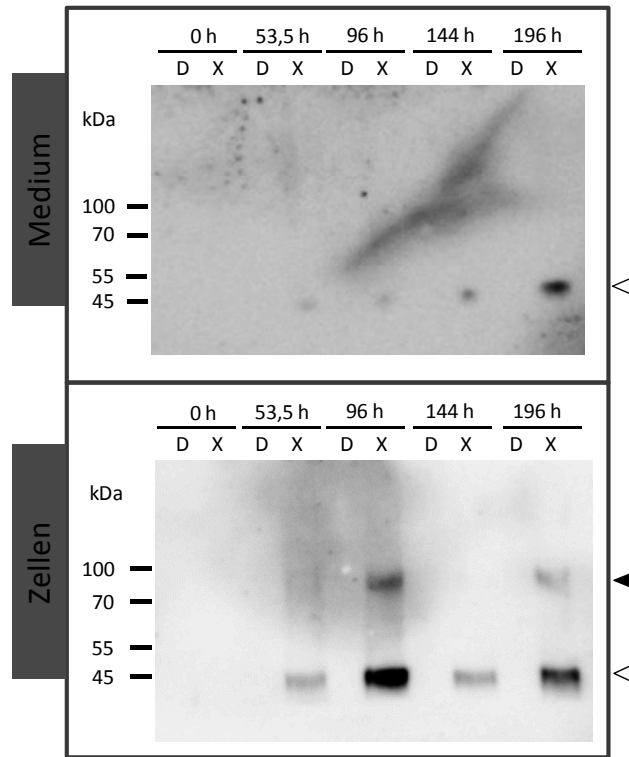


Abb. 3.20: Immunoblot-Analyse des Stammes MKCu5 in Glukose- und Xylose-haltigem Medium. Immunoblots der CalB in Xylose- (Spur X) und Glukose-haltigem (Spur D) Minimalmedium (SMX, SMD) zu verschiedenen Zeitpunkten. Dabei wurden sowohl die intrazelluläre (Zellen) als auch die extrazelluläre (Medium) CalB aus der entsprechenden Menge an Zellkultur untersucht. Als Primärantikörper wurde Anti-HA verwendet.

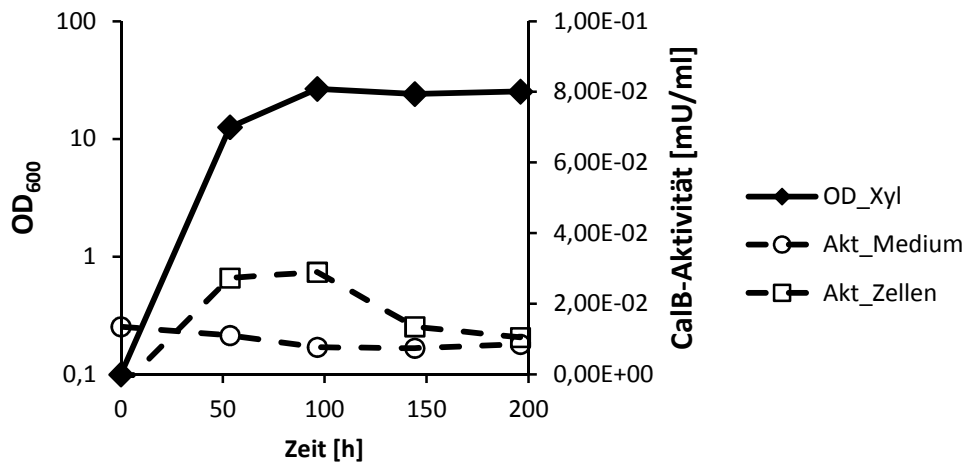


Abb. 3.21: Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der Lipaseaktivität. Lipaseproduktion von Stamm MKCu5 bei Wachstum in Xylose-haltigen Minimalmedium (SMX) bei 30 °C. Im Vergleich zur Wachstumskurve wurde die Lipaseaktivität im Medium und in der entsprechenden Zellmenge gemessen. Die linke Skalierung zeigt die gemessene OD₆₀₀ an, während die rechte Skalierung die Lipaseaktivität in mU/ml angibt. Die durchgezogene Linie zeigt den Verlauf der OD₆₀₀ im Xylose-haltigen Medium (OD_{Xyl}), die gestrichelten Linien die dazu gemessenen Lipaseaktivitäten im Medium (O) und in der entsprechenden gleichen Menge an Zellen (□).

Wie in Abb. 3.21 dargestellt, ist im Medium fast keine Lipaseaktivität über der gesamten gemessenen Zeit nachweisbar. Die Aktivität in den Zellen erreicht bei 100 h Kultivierung ein Maximum und fällt in den darauffolgenden 100 h fast auf die Aktivität im Medium ab. Trotzdem war eine zweifach höhere Aktivität der CalB in den Zellen im Gegensatz zu dem Medium feststellbar. Möglicherweise beruht daher die im Plattentest beobachtete Lipaseaktivität auf Zell-assoziiertes CalB, vermutlich im Periplasma oder der Zellwand von Zellen.

3.2.5 Heterologe Expression einer Xylanase aus *P. simplicissimum*

Xylan ist ein Polysaccharid, welches aus Xylose-Einheiten besteht. Um Xylan abzubauen, ist eine Xylanase erforderlich. Diese spaltet die β -1,4-Bindungen zwischen den einzelnen Xylosemonomeren, so dass kürzere Xyloseketten, sogenannte Xylooligosaccharide, entstehen (Abb. 4.1). Diese werden wiederum durch die Xylosidase zu Xylose abgebaut. Die Futterhefe *C. utilis* besitzt zwar eine Xylosidase, jedoch keine Xylanase, so dass diese nicht in der Lage ist, Xylan direkt als Substratquelle zu nutzen (Yanai und Sato, 2001; Wei *et al.*, 2010). Zur Verwertung von Xylan ist es deshalb erforderlich, eine Xylanase heterolog in *C. utilis* zu exprimieren. Als geeignete Xylanase wurde die aus *P. simplicissimum* (*PsxynA*) gewählt, da bekannt war, dass diese bereits erfolgreich in der Hefe *H. polymorpha* exprimiert und sekretiert wurde (M. Suckow, unveröffentlicht). Die Xylanase wurde dabei als C-terminale Fusion an die Präpro-Sequenz des Paarungstypfaktors α 1 (*Mf α 1*) von *S. cerevisiae* synthetisiert, die im Verlauf der Sekretion in die reife Xylanase prozessiert wurde.

```

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYS DLEGDFDVA
VLPFSNSTNNGLLFINNTTIASIAAKEEGVSLEKRQASV SIDAKFKAHGKKY
LGTIGDQYTLTKNTKNPAIIKADFGQLTPENSMKWDATEPNRGQFTFSG
SDYLVNFAQSNGKLIRGHTLVWHSQLPGWVSSITDKNTLISVLKNHITV
MTRYKGIYAWDVLNEIFNEDGSLRNSVFYNVIGEDYVRIAFETARSVDP
NAKLYINDYNLDSAGYSKVNGMVSHVKKWLAAGIPIDGIGSQTHLGAGA
GSAVAGALNALASAGTKEIAITELDIAGASSTDYVNVVNAACL NQAKCVGI
TVWGVADPDSWRSSSSPLFDGNYNPKAAYNAIANAL

```

 N-Glykosylierungsstelle Kex2-Protease-Erkennungssequenz

Abb. 3.22: Aminosäuresequenz der Präpro-Sequenz und von XynA. Innerhalb der Mf α 1-Präpro-Sequenz aus *S. cerevisiae* (in Schwarz) liegen drei N-Glykosylierungsstellen (blauer Kasten) sowie eine Erkennungssequenz für die Kex2-Protease (roter Kasten) stromaufwärts von XynA (in Grün).

In Abb. 3.22 ist die Aminosäuresequenz von der Fusion der Mf α 1-Präpro-Sequenz und der Xylanase XynA gezeigt. Innerhalb der Pro-Sequenz befinden sich drei N-Glykosylierungsstellen mit der Erkennungssequenz Asn-X-Thr (N-X-T mit X: beliebige Aminosäure, außer Prolin) und die Erkennungssequenz für die Kex2-Protease, die am C-terminalen Ende der Sequenz Lys-Arg (K-R) schneidet.

3.2.5.1 Konstruktion des Expressionsvektors

Für die Klonierung des Expressionsplasmids wurde die gesamte kodierende Sequenz der Fusion aus Präpro-Alphafaktor und der Xylanase aus *P. simplicissimum* (*PsxynA*) synthetisiert (Life Technologies GmbH), wobei die für *P. jadinii* kodonoptimierte Sequenz (*xynA**; DDBJ-Nr.: AB858470) in den GeneArt-Vektor pMA-T inseriert wurde (siehe Anhang, Abb. 9.1). Dabei basierte die Kodonoptimierung auf den Kodongebrauch von 29 *P. jadinii*-Genen aus der NCBI GenBank, der in der Kazusa-Datenbank (www.kazusa.jp) hinterlegt ist. Das *Hind*III-*Sph*I-Fragment *xynA** wurde anschließend in das Plasmid pMC1 stromabwärts des *TDH3*-Promotors ligiert, so dass das Plasmid pMC17 entstand (Abb. 3.23).

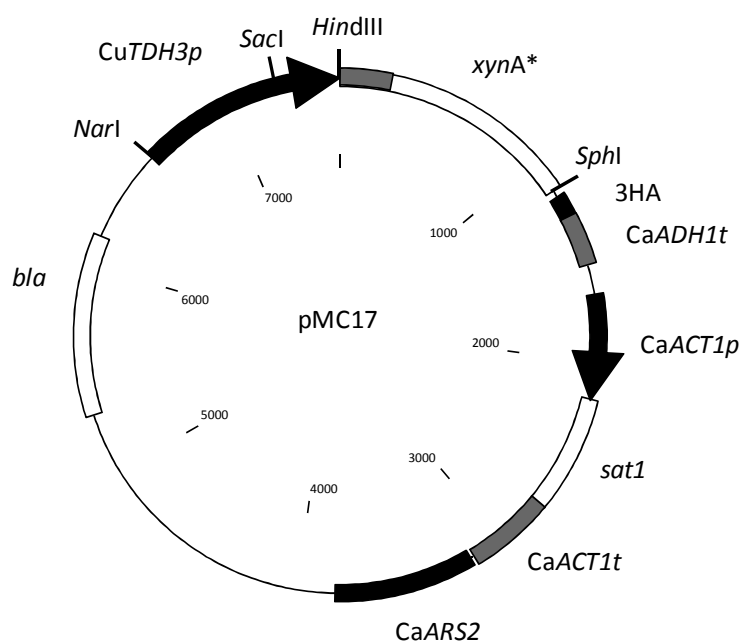


Abb. 3.23: Plasmidkarte von pMC17. pMC17 enthält die Fusion der *MFA1*-Präpro-Sequenz (in grau) an die Xylanase *xynA** stromabwärts des *TDH3*-Promotors aus *C. utilis*. Alle anderen Sequenzen entsprechen denen in Abb. 3.4.

Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym *Sac*I innerhalb des Promotorbereichs linearisiert und in *C. utilis* transformiert. Die mit Nourseothricin selektierten Transformanten wurden anschließend mit Hilfe der Kolonie-PCR mit den Primern XYNA Fw *Hind*III und XYNA Rv *Sph*I überprüft. Alle sieben untersuchten Transformanten zeigten eine Bande über dem 1 kb Größenstandard, welche mit der erwarteten Xylanase-Größe von 1172 bp übereinstimmte (Daten nicht gezeigt). Somit wurde bestätigt, dass die Transformanten das Plasmid pMC17 tragen.

3.2.5.2 Integrationsanalyse und Plasmidstabilität

Das im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Expressionsplasmid pMC17 (*TDH3p-xynA**) wurde für die Transformation im *TDH3*-Promotorbereich mit dem Restriktionsenzym *Sac*I linearisiert. Nach Selektion der Transformanten auf Nourseothricin-haltigen Agarplatten wurden diese auf ihre genomische Integration durch Southern-Blot-Analyse überprüft. Zunächst wurde die Integration in das *C. utilis*-Genom wie in Abb. 3.10 unter Verwendung des *C. albicans* ARS als Sonde untersucht. Die

Southern-Blot-Analyse ergab, dass das Plasmid pMC17 chromosomal im *C. utilis*-Genom integriert war (Daten nicht gezeigt; vgl. Abb. 3.10).

Zur Überprüfung des Integrationsortes wurde die genomische DNA mit *EcoRI* geschnitten und eine Southern-Blot-Analyse mit dem *CuTDH3*-Promotor als Sonde durchgeführt (Abb. 3.24). Die richtige Deutung der Southern-Blot-Analyse war in diesem Fall erschwert, da die Wildtyp-Bande (◄) mit 9,9 kb und die größere Bande im Falle einer einfachen Integration ins Genom mit 10,7 kb (<) schwer zu trennen waren. Trotzdem ist keine Wildtyp-Bande zu erkennen, da sich in diesem Fall die 9,9 kb- und die 10,7 kb-Banden als eine breitere Bande darstellen würden. Eine derartige Bande war jedoch nicht zu erkennen, so dass vermutet wurde, dass die Wildtyp-Bande in keiner Transformante vorhanden war. Die kleinere Bande, die bei einer einfachen Integration entstehen würde, liegt bei 6,9 kb bzw. im Stamm MKCu1 (ohne *GFP*) bei 6,2 kb (◄) und könnte damit der beobachteten niedrigeren Bande entsprechen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass pMC17 im *TDH3*-Promotor integriert wurde.

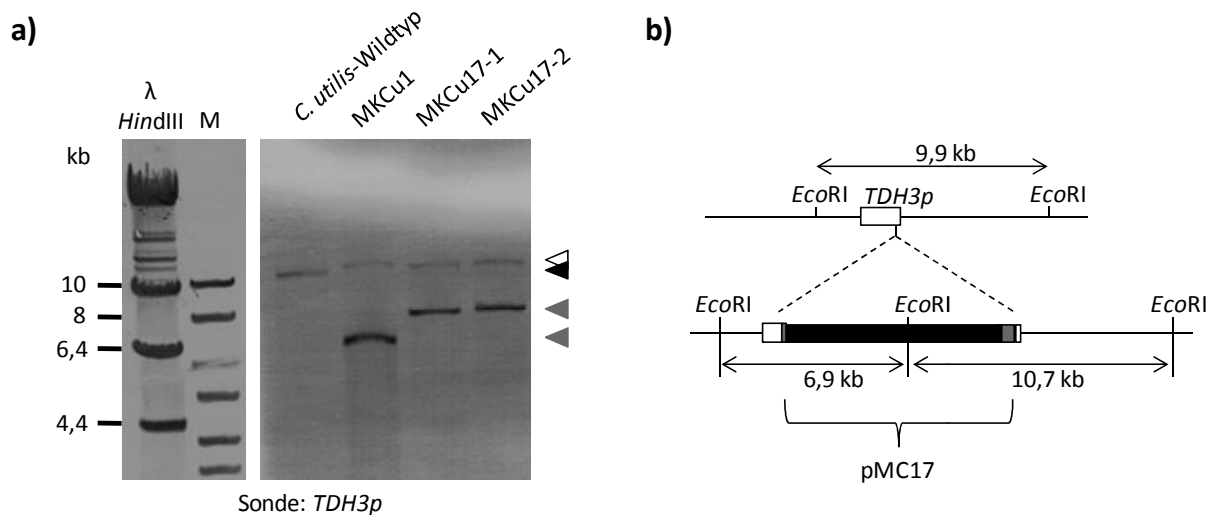


Abb. 3.24: Southern-Blot zur Integrationsanalyse von MKCu17. a) Southern-Blot der Stämme *C. utilis* DSM2361, MKCu1 (*TDH3p*) und MKCu17-1 und -2 (*TDH3p-xynA**) mit der *TDH3p*-Sonde. Als Marker wurde neben dem GeneRuler 1 kb DNA ladder (M; Fermentas) auch die mit *HindIII* geschnittene λ-DNA (λ *HindIII*) verwendet. b) Schematische Darstellung der einfachen Integration des Plasmids pMC17 in *C. utilis*.

Wie in vorherigen Versuchen (siehe 3.4.1.2) wurde neben der Integrationsanalyse auch bei drei pMC17-Transformanten die Plasmidstabilität untersucht (Abb. 3.25). In diesen Stämmen ist die Plasmidstabilität teilweise an die Gegenwart des Nourseothricins gebunden. So konnte in den selektiv gewachsenen Zellen noch bei über 80 % der Zellen das Plasmid nachgewiesen werden, während im nicht-selektiven Medium ungefähr die Hälfte der Zellen nach 50 Generationen das Plasmid bereits verloren hatten (Abb. 3.25).

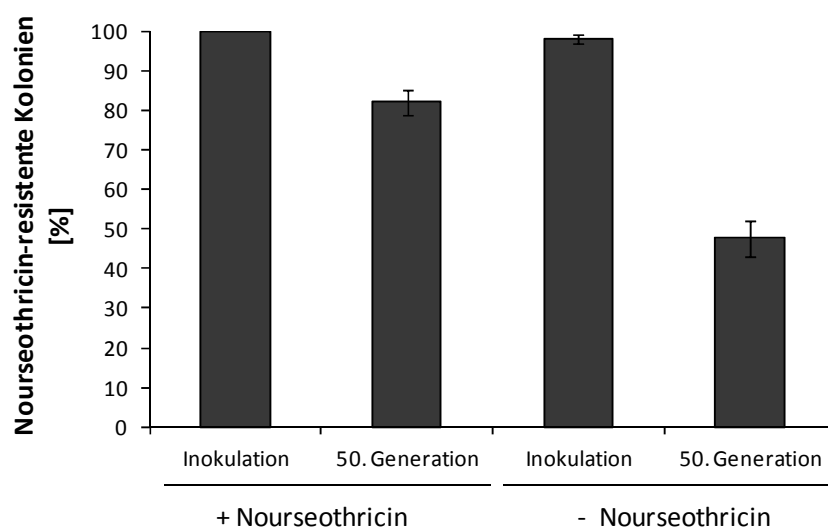


Abb. 3.25: Plasmidstabilitätsanalyse von MKCu17. Prozentuale Anzahl der Nourseothricin-resistenten Zellen von drei Transformanten MKCu17-1 bis -3 (Mittelwert mit Standardabweichung) bei Inokulation und nach 50 Generationen nach Kultivierung im selektiven (+Nourseothricin) bzw. nicht-selektiven (-Nourseothricin) YPD-Medium. Die Untersuchung wurde wie in Abb. 3.12 beschrieben durchgeführt.

3.2.5.3 Heterologe Expression und Sekretion der Xylanase in *C. utilis*

Nachdem durch die Integrationsanalyse festgestellt wurde, dass das Expressionsplasmid im *C. utilis*-Genom integriert ist (Abb. 3.24), wurde die Expression und Sekretion der Xylanase untersucht. Für diese Untersuchung wurden die Stämme MKCu1 (*TDH3p*) und zwei Transformanten des Stammes MKCu17 (*TDH3p-xynA**) in YPD-Medium (10 µg/ml Nourseothricin) über Nacht bei 30 °C kultiviert. Ausgehend von diesen Übernachtskulturen wurden je eine 100 ml Hauptkultur auf OD₆₀₀ 0,1 inokuliert, welche bei 30 °C inkubiert wurden. Es wurden sowohl eine Probe von 1 ml bei 0 h als auch bei 63,5 h, 118,5 h, 135,5 h, 159,5 h und 183,5 h entnommen. Die Proben wurden abzentrifugiert, die Zellen in 1 ml Lysispuffer aufgenommen und aufgeschlossen. Da hier die Xylanaseproduktion über die Zeit untersucht wurde, wurden von dem Medium und von dem hergestellten Rohextrakt je 20 µl für die Immunoblot-Analyse verwendet. Dabei wurden als Primärantikörper Anti-HA und als Sekundärantikörper Anti-Ratte benutzt.

Die berechnete Molekularmasse der Xylanase XynA, zusammen mit dem dreifachen HA-Epitop, liegt bei ungefähr 36 kDa und entspricht wahrscheinlich der unteren Bande (Abb. 3.26). Der Immunoblot zeigte im Medium nur eine Bande unterhalb von 40 kDa (◀), während im Vergleich dazu in den Zellen zusätzlich eine schwache Bande von etwa 60 kDa (◀) vorhanden ist. Die schwache Bande bei 60 kDa entspricht vermutlich dem nicht durch Kex2 prozessierten Protein. Die Präpro-Sequenz hat eine berechnete Molekularmasse von ungefähr 9 kDa, die zusammen mit den drei "Kern"-N-Glykosylierungen mit etwa je 3 kDa eine Molekularmasse von 18 kDa ergibt. Außerdem ist deutlich zu erkennen, dass die Xylanase effektiv sekretiert wird und dass sich mit der Zeit das Verhältnis zwischen intra- und extrazellulärem Anteil auf die Seite der sekretierten Form verschiebt.

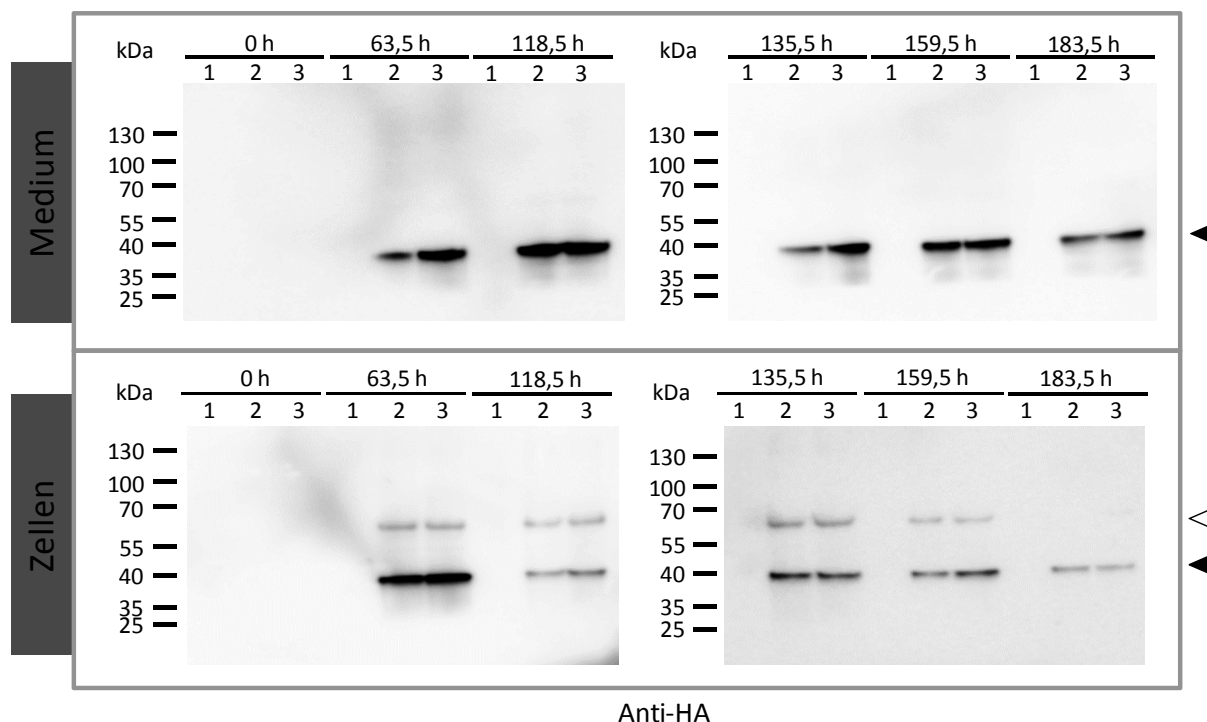


Abb. 3.26: Immunoblot-Analyse zur heterologen Expression der Xylanase. Proben der Stämme MKCu1 (1), MKCu17-1 (2) und MKCu17-2 (3) aus dem Medium und der entsprechenden Menge an Zellrohextrakt während des Wachstums in YPD-Medium (+Nourseothricin) bei 30 °C. Als Primärantikörper wurde Anti-HA verwendet.

Während der Kultivierung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Lebendzellzahl bestimmt, um zu überprüfen, ob die im Medium gemessene Xylanase von den Zellen sekretiert wurde oder durch Zelllyse, besonders in der späten stationären Phase, auftrat. Die Lebendzellzahl blieb jedoch in der stationären Phase konstant. Daher gelangt die Xylanase nicht aufgrund von Zelllyse in das Medium (Daten nicht gezeigt). Die korrekte Prozessierung durch Kex2, die im Golgi stattfindet (Redding *et al.*, 1991), spricht ebenfalls für die reguläre Sekretion von XynA.

3.2.5.4 Bestimmung der Xylanaseaktivität

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Xylanase aus *P. simplicissimum* heterolog in *C. utilis* produziert und effektiv sekretiert wird. Schmidt *et al.* (1998) beschrieben die optimalen Bedingungen für die Xylanaseaktivität bei pH 5,6 und einer Temperatur von 67 °C. Als nächster Schritt sollte die Xylanase-Enzymaktivität von XynA mit Hilfe des EnzChek® Ultra Xylanase Assay Kits (Invitrogen) bestimmt werden. Bei dieser Messung wird mit einer Referenz-Xylanase eine Geradengleichung erstellt. Dabei wird die Fluoreszenz gemessen, welche bei der Umsetzung des Substrates o-Nitrophenyl- β -D-Xylobiosid freigesetzt wird. Durch die bekannte eingesetzte Enzymmenge kann so die Enzymaktivität berechnet werden. Die Enzymaktivität wird in der Einheit unit (U) angegeben, wobei 1 U als Enzymmenge definiert wird, die unter den gegebenen Bedingungen ein μ mol Substrat pro Minute umsetzt.

Die Aktivitätsmessung wurde mit den gleichen Proben, die für die Immunoblot-Analyse verwendet wurden, durchgeführt (Abb. 3.26). Dabei wurden nur die Proben aus dem Medium (SMD) gemessen,

da die Aktivität der sekretierten Xylanase für die spätere Verwertung des Xylans zur Nutzung als Nährstoffquelle von Bedeutung ist. Für die erste Aktivitätsbestimmung wurde die Messung bei 25 °C und einem pH-Wert von 4,6 nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (siehe 2.10.8). Als Referenz wurde die Xylanase aus *Thermomyces lanuginosus* mit einer Aktivität von ≥ 2500 U/mg (Sigma Aldrich) in den Konzentrationen 0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 und 400 mU/ml verwendet. Die Geradengleichung wurde aus dem linearen Bereich der Kurve bis 50 mU/ml bestimmt, so dass die Aktivität der heterolog exprimierten Xylanase aus *C. utilis* bezogen auf 1 ml Kulturmedium berechnet werden konnte.

In Abb. 3.27 sind die Wachstumskurven von MKCu1 (*TDH3p*) und MKCu17-1 und -2 (*TDH3p-xynA**) (durchgezogene Linien) zusammen mit den Xylanaseaktivitäten dargestellt (gestrichelte Linien). Während das Wachstumsverhalten aller Stämme sehr ähnlich war, konnte im Kontrollstamm ohne Xylanase keine Aktivität gemessen werden. Im Vergleich dazu konnte in der stationären Phase eine Xylanaseaktivität im Medium der beiden Transformanten des Stammes MKCu17 zwischen 6-9 U/ml Kulturmedium gemessen werden. Bezogen auf die Referenz-Xylanase mit einer Aktivität von 2,5 U/ μ g, enthält 1 ml Kulturmedium in der stationären Phase ungefähr 2,4-3,6 μ g XynA.

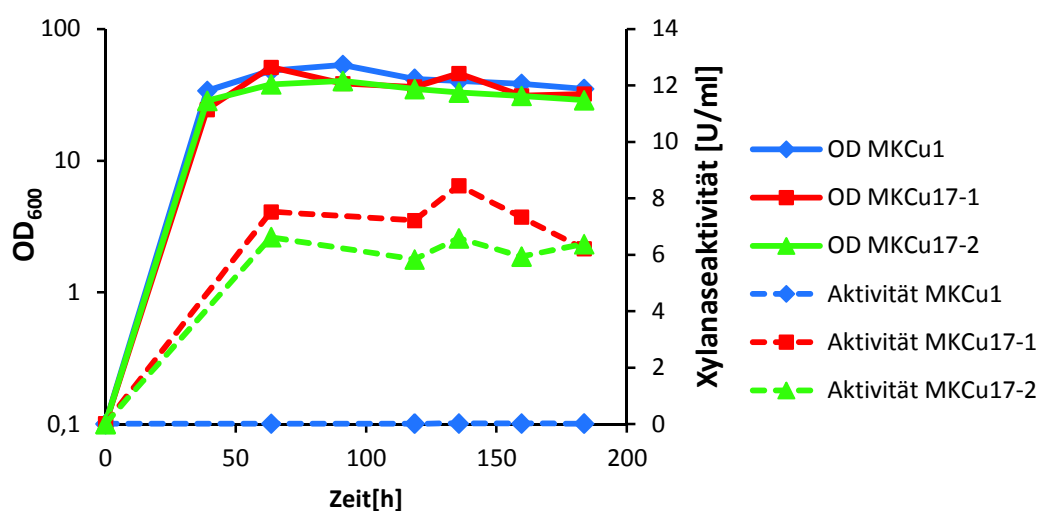


Abb. 3.27: Xylanaseaktivität in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit in SMD-Medium. Wachstumskurven (durchgezogene Linien) basierend auf der linken Skalierung (OD_{600}) sowie die entsprechenden Xylanaseaktivitäten in U/ml Kulturmedium (rechte Skalierung) von MKCu1 (*TDH3p*) und MKCu17-1 und -2 (*TDH3p-xynA**). Die Aktivitätsmessung wurde bei 25 °C und einem pH-Wert von 4,6 mit Hilfe des EnzChek® Ultra Xylanase Assay Kits (Invitrogen) durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist sehr stark abhängig von den vorherrschenden Bedingungen bei der Messung. So spielt neben dem richtigen pH-Wert auch die Temperatur eine große Rolle. Zur Untersuchung des Temperatureinflusses wurde die Xylanaseaktivität bei 25, 30, 37, 45, 60, 65, 70, 75 und 85 °C gemessen.

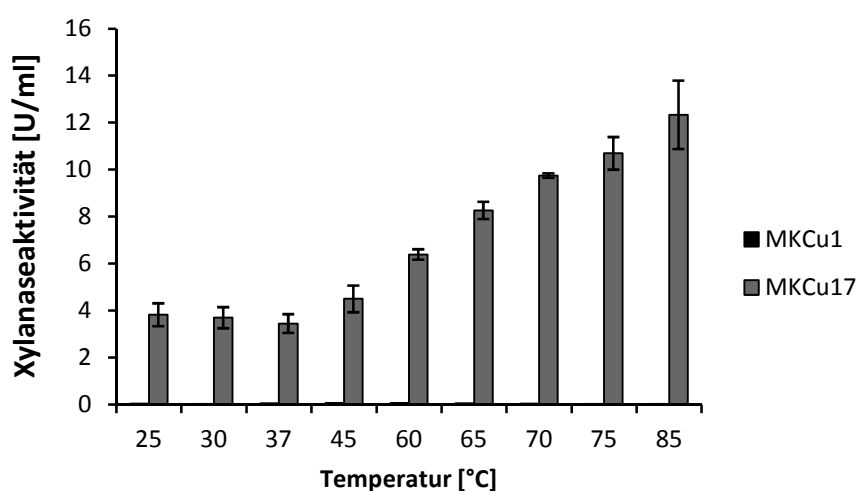


Abb. 3.28: Xylanaseaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Xylanaseaktivität von MKCu1 (*TDH3p*) und zwei Transformanten von MKCu17 (*TDH3p-xynA**) wurden bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Die Messung wurde mit Hilfe einer Referenz-Xylanase aus *T. lanuginosus* durchgeführt.

Wie schon vorher beobachtet wurde, war bei keiner untersuchten Temperatur eine Xylanaseaktivität im Kontrollstamm MKCu1 zu messen. Für den Stamm MKCu17 konnte kein klares Temperaturoptimum bestimmt werden, wobei das Optimum wahrscheinlich im höheren Temperaturbereich zwischen 70 und 85 °C liegt. Bei niedrigeren Temperaturen von 25 bis 37 °C zeigte die Xylanase die geringste Aktivität von 3-4 U/ml Kulturmedium. Im Gegensatz dazu stieg die Aktivität bei 70 bis 85 °C auf das drei- bis vierfache an. Das Ergebnis zeigte keine optimale Temperatur für XynA, jedoch war zu erkennen, dass XynA sehr thermostabil ist.

3.2.5.5 Verwertung von Xylan als Kohlenstoffquelle

Nachdem die Xylanaseaktivität des Stammes MKCu17 bestimmt werden konnte, wurde die Funktionalität des Expressionssystems untersucht. Da *C. utilis* bei einer höheren Temperatur als 37 °C langsamer wächst, wurde die Kultivierung bei 30 °C durchgeführt und die direkte Verwertung von 1 % Xylan (from beechwood, Sigma) in Minimalmedium (SM) mit Nourseothricin untersucht. Als zusätzliche Kohlenstoffquelle wurde zu dem Xylan noch 0,1 % Glukose oder Xylose zugegeben, um den Zellen zu Beginn eine optimale Nährstoffquelle zur Verfügung zu stellen. Als Kontrolle, zur Verwertung der Xylose, wurde eine Kultur nur mit 0,1 % Xylose verwendet. Die Stämme MKCu1, MKCu17-1 und -2 wurden mit den vier verschiedenen Medienzusammensetzungen (+Nourseothricin) bei 30 °C kultiviert. Zur Untersuchung des Wachstums wurde in regelmäßigen Abständen bis weit in die stationäre Phase (240 bis 255 h) die OD_{600} gemessen.

In Abb. 3.29 ist die OD_{600} nach 240 bis 255 h Kultivierung dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Stamm MKCu17 (*TDH3p-xynA**) eine höhere OD_{600} in den Medien mit 1 % Xylan erreichte als der Kontrollstamm MKCu1 (*TDH3p*). Dabei schien die Zugabe von Xylose oder Glukose zu Beginn der Kultivierung das Wachstum positiv zu beeinflussen. In dem Kontrollmedium nur mit 0,1 % Xylose wiesen alle untersuchten Stämme die gleiche OD_{600} auf. In allen Xylan-haltigen Medien war die erreichte Zelldichte von MKCu17 deutlich höher im Vergleich zu MKCu1. Deshalb wurde

angenommen, dass die heterologe Sekretion von XynA des Stammes MKCu17 dazu führt, dass dieser in der Lage ist, Xylan als Kohlenstoffquelle zu nutzen.

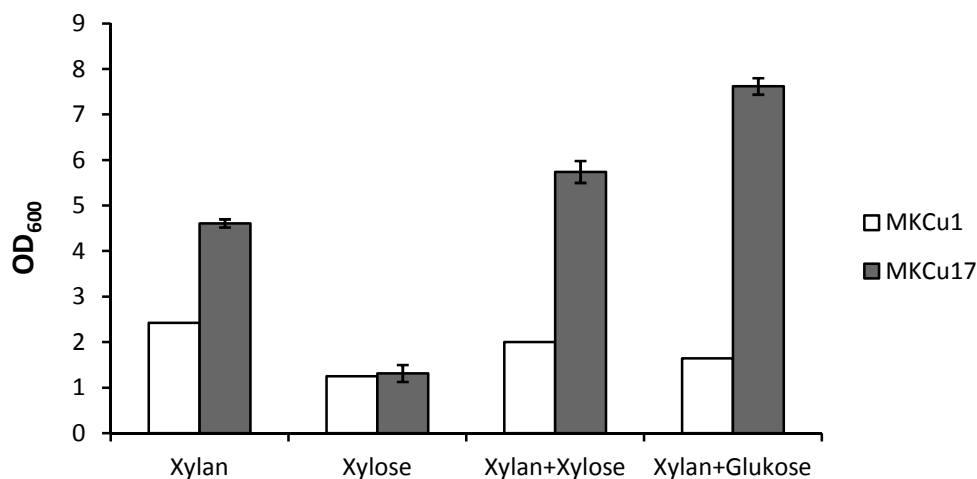


Abb. 3.29: Xylanverwertung des *C. utilis*-Stammes MKCu17. OD₆₀₀-Werte nach 240 bis 255 h Wachstum in selektiven Minimalmedien (SM) mit 1 % Xylan, 0,1 % Xylose, 1 % Xylan und 0,1 % Xylose oder 1 % Xylan und 0,1 % Glukose bei 30 °C. Untersucht wurden der Kontrollstamm MKCu1 (*TDH3p*) ohne Xylanase und zwei Transformanten des Stammes MKCu17 (*TDH3p-xynA**).

3.2.6 Bestimmung der Kopiezahl in *C. utilis*

Die mit Hilfe eines Expressionssystems synthetisierte Proteinmenge hängt von der Höhe der Kopiezahl des Plasmids ab. Da *C. utilis* polyploid ist, besteht die Möglichkeit der Mehrfachintegration. Zur Bestimmung der Kopiezahl kann als Referenz ein chromosomales Gen verwendet werden. Da man im Falle von *C. utilis* aufgrund der FACS-Analyse von einer Triploidie ausgehen konnte (siehe Abb. 3.2), wurde versucht, ein Verhältnis der Kopiezahl zwischen dem Plasmid und einem chromosomalen Locus zu bestimmen. Ausgegangen wurde dabei von dem Stamm MKCu6-3 (*TDH3p-GFP*), in welchem das Plasmid pMC6 nur einfach im Integrationsloкус vorliegt (Abb. 3.14 c) und weiterhin Wildtyp-Allele beobachtet wurden. Zum Vergleich wurde der Stamm MKCu6-9 (pMC6) untersucht, der im Southern-Blot keine Wildtyp-Bande hatte (Abb. 3.16). Zusätzlich wurde für die heterologe Expression der Xylanase der Stamm MKCu17-2 (*TDH3p-xynA**) analysiert. Für dieses Experiment wurden je 1 µg der genomischen DNA der zu untersuchenden Stämme für eine qPCR verwendet (siehe 2.7.15.3). Die Primer wurden so gewählt, dass zwei Gene aus dem Genom amplifiziert werden (*CuXDH1*, *CuGXF1*), die nicht auf dem Plasmid vorhanden sind und andererseits je nach Expressionsvektor zwei von drei möglichen Sequenzen auf dem Plasmid (*GFP*, *sat1*, *ADH1t*). So wurden insgesamt fünf Gene miteinander verglichen und das Verhältnis untereinander bestimmt. Für die qPCR wurden die Primer RT-CuXDH1 Fw, RT-CuXDH1 Rv, RT-CuGXF1 Fw, RT-CuGXF1 Rv, RT-CaGFP Fw, RT-CaGFP Rv, RT-ADH1t Fw, RT-ADH1t Rv, RT-Sat1 Fw und RT-Sat1 Rv verwendet, dabei wurde auf eine vergleichbare, einheitliche Länge des Amplikons geachtet. Sollte das Signal des chromosomalen Gens doppelt so hoch wie das Gen auf dem Plasmid ausfallen, kann vermutet werden, dass das Plasmid nur in der Hälfte aller Allele im Genom vorhanden ist. Bei einem gleich

hohen Signal, wäre das Plasmid in allen Allelen im Genom vorzufinden. Das Schema der Versuchsstrategie ist in Abb. 3.30 dargestellt.

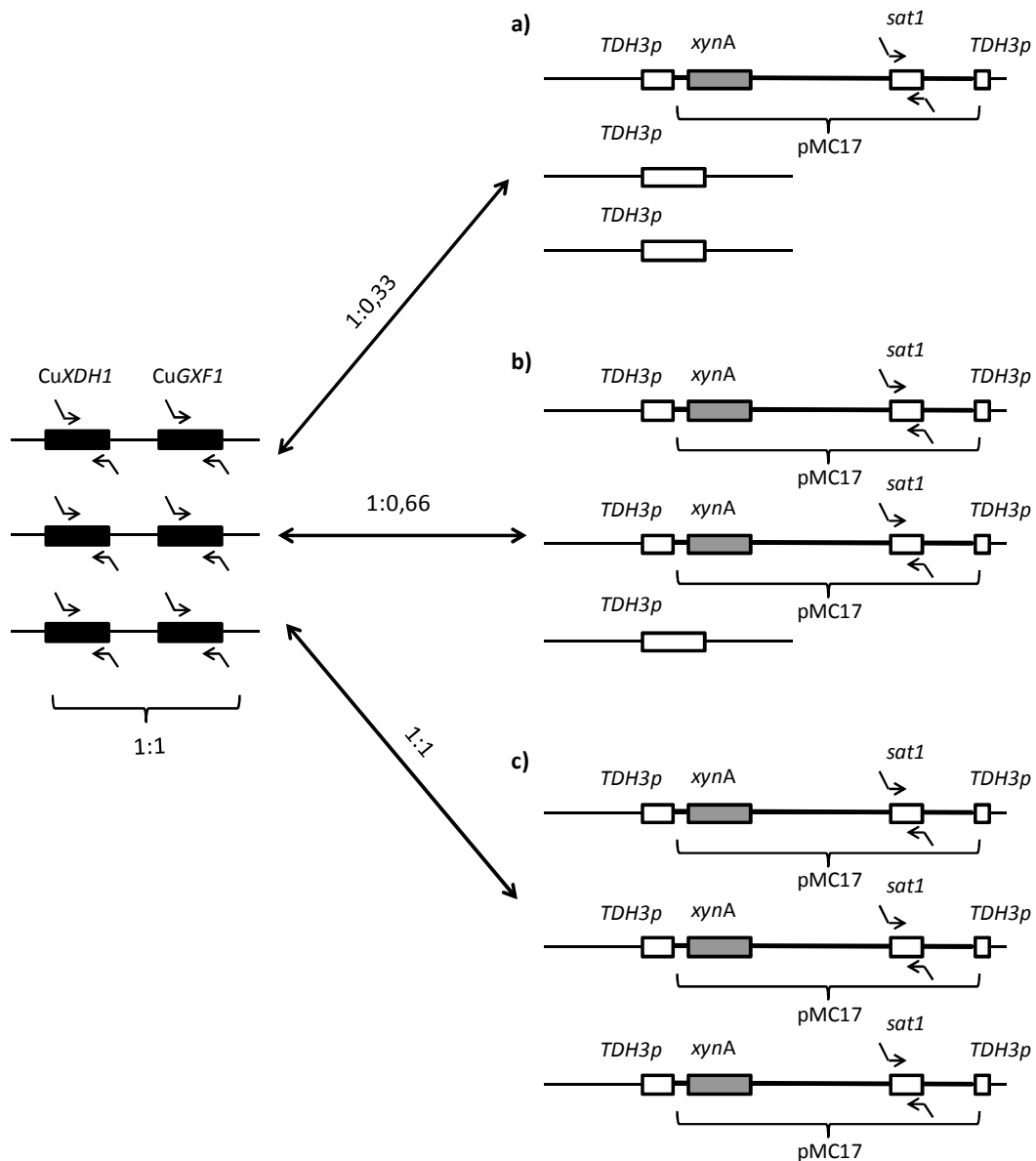


Abb. 3.30: Schematische Darstellung der qPCR für die Abschätzung der Kopiezahl. Die chromosomalen Gene *CuXDH1* und *CuGXF1* liegen im triploiden *C. utilis*-Wildtyp-Stamm DSM2361 in dreifacher Anzahl vor. Ihr Verhältnis zueinander ist 1:1. Die Pfeile stellen die entsprechenden Primer für die qPCR dar. **a)** Im Stamm MKCu17 ist das Plasmid nur in einem *TDH3p*-Allel integriert. Das Verhältnis der chromosomalen Gene *CuXDH1* und *CuGXF1* zum Plasmidgen *sat1* ist 1:0,33. **b)** Ist das Plasmid pMC17 in zwei *TDH3p*-Allele im Stamm MKCu17 integriert, ergibt sich ein Verhältnis der chromosomalen Gene zum Plasmidgen *sat1* von 1:0,66. **c)** Liegt das Plasmid pMC17 in allen *TDH3p*-Allelen integriert vor, ergibt sich ein Verhältnis der chromosomalen Gene zum *sat1*-Gen von 1:1. Als Plasmidsequenz wurden außer das *sat1*-Gen auch *GFP*- und *ADH1t*-Sequenzen verwendet.

Die Primereffizienzen wurden direkt aus den Kurven der qPCR berechnet und lagen zwischen 83 und 145 % (siehe 2.7.15.3; vgl. Tab. 9.1). Aus den gemessenen Ct-Werten und den Effizienzen konnte so

mit einem Schwellenwert von 0,07 und den chromosomalen Referenzgenen *XDH1* und *GXF1* die Kopiezahl abgeschätzt werden. Für die Berechnung wurde das Verhältnis mit folgender Gleichung gebildet (vgl. Tab. 9.1):

$$\text{Kopiezahl} = \frac{(\text{Effizienz}_{\text{Referenzgen}})^{\text{Ct}_{\text{Referenzgen}}}}{(\text{Effizienz}_{\text{Plasmidsequenz}})^{\text{Ct}_{\text{Plasmidsequenz}}}}$$

Tab. 3.9: Ergebnis der qPCR zur Abschätzung der Kopiezahl in *C. utilis*. Untersucht wurden MKCu17-2 (*TDH3p-xynA**) und MKCu6-3/-9 (*TDH3p-GFP*) mit den Primern für die Gene *CuXDH1*, *CuGXF1*, *CaADH1t*, *sat1* und *GFP*. Dargestellt sind die aus den Messungen berechneten Primereffizienzen, sowie die Ct-Werte bei einem Schwellenwert von 0,07 und die Verhältnisse des Plasmidgens zu den chromosomalen Referenzgenen *CuXDH1* und *CuGXF1*.

	Gen	Ort	Verhältnis (<i>CuXDH1</i> /Gen)	Verhältnis (<i>CuGXF1</i> /Gen)
MKCu17-2 (<i>TDH3p-xynA*</i>)	<i>CuXDH1</i>	Genom	1	1
	<i>CuGXF1</i>	Genom	1	1
	<i>ADH1t</i>	Plasmid	1,13	1,13
	<i>sat1</i>	Plasmid	1,18	1,18
MKCu6-3 (<i>TDH3p-GFP</i>)	<i>CuXDH1</i>	Genom	1	1,11
	<i>CuGXF1</i>	Genom	0,9	1
	<i>ADH1t</i>	Plasmid	0,4	0,44
	<i>GFP</i>	Plasmid	0,52	0,58
MKCu6-9 (<i>TDH3p-GFP</i>)	<i>CuXDH1</i>	Genom	1	1,20
	<i>CuGXF1</i>	Genom	0,84	1
	<i>ADH1t</i>	Plasmid	0,24	0,29
	<i>GFP</i>	Plasmid	0,84	1,01

Die Ergebnisse der qPCR zur Abschätzung der Kopiezahl in den Stämmen MKCu17-2, MKCu6-3 und -9 sind in Tab. 3.9 dargestellt. Aufgelistet sind neben den Gen-Namen und deren Vorkommen (*C. utilis*-Genom oder Plasmid), die Verhältnisse bezogen auf die Referenzgene *CuXDH1* und *CuGXF1*. Die Verlässlichkeit der Daten zeigt, dass die Kopiezahl der chromosomalen Gene *CuXDH1* und *CuGXF1* gleich ist, was nahezu in allen Messungen gegeben ist (Verhältniswert von 1,0).

MKCu17-2 (TDH3p-xynA*)

Für den Stamm MKCu17-2, welcher im Southern-Blot keine Wildtyp-Bande zeigte (Abb. 3.24), ist das Ergebnis auch in der qPCR erkennbar. Für die Plasmidgene *ADH1t* und *sat1* sowie für das chromosomale Gen *CuGXF1* ergeben sich bei *CuXDH1* als Referenzgen ähnliche Werte zwischen 1,0 und 1,18 (MKCu17-2). Dieselben Verhältnisse wurden mit *CuGXF1* als Referenzgen erzielt (1,0-1,18). Das bedeutet, dass beide Plasmidgene *ADH1t* und *sat1* genauso häufig vorkommen wie die chromosomalen Gene *CuXDH1* und *CuGXF1* und gleichzeitig, dass das Plasmid in alle Allele integriert ist.

MKCu6-3 (TDH3p-GFP)

Bei MKCu6-3 wurde erwartet, dass das Verhältnis der Plasmidgene (*ADH1t* und *GFP*) zu den chromosomalen Referenzgenen (*CuXDH1* und *CuGXF1*) kleiner ist, da die Southern-Analyse ergeben hatte, dass das Plasmid nicht in alle Allele integriert war (Abb. 3.14). Die Verhältnisse der Plasmidgene *ADH1t* und *GFP* sind mit Werten zwischen 0,4 und 0,58 nur halb so groß wie die Verhältnisse der chromosomalen Gene *CuXDH1* und *CuGXF1* untereinander (0,9-1,11), was darauf schließen lässt, dass diese Gene und damit das Plasmid pMC6 nur in die Hälfte der Allele integriert wurde. Berücksichtigt man die festgestellte Triploidie von *C. utilis*, lässt das Ergebnis vermuten, dass das Plasmid in ein bzw. zwei der Allele integriert wurde.

MKCu6-9 (TDH3p-GFP)

Bei MKCu6-9 war durch die mehrfache Kultivierung im selektiven und nicht-selektiven Medium die Integration des Plasmids in alle *HIS3*-Allele erzielt worden und deshalb war im Southern-Blot die Wildtyp-Bande nicht mehr sichtbar (Abb. 3.14). Die Verhältnisse der chromosomalen Referenzgene *CuXDH1* und *CuGXF1* zueinander liegen bei 0,84 und 1,20 und somit in dem Bereich 1,0. Das Verhältnis *CuXDH1/GFP* ergibt hier genau wie das Verhältnis *CuXDH1/CuGXF1* den Wert von 0,84. Bei Verwendung von *CuGXF1* als Referenzgen ergibt sich für *GFP* 1,01 und für *CuXDH1* 1,20. Die Werte von *ADH1t* werden hier nicht berücksichtigt, da auch der Ct-Wert mit über 25 höher als bei den anderen Messungen war (siehe Anhang, Tab. 9.1). Die ähnlichen Kopiezahl-Verhältnisse des Plasmidgens *GFP* zu den beiden chromosomalen Referenzgenen *CuXDH1* und *CuGXF1* zeigt an, dass, wie im Southern-Blot festgestellt (Abb. 3.16), das Plasmid in alle Allele integriert vorliegt.

Die Untersuchung der Kopiezahlen der Expressionsplasmide in den *C. utilis*-Stämmen MKCu17-2, MKCu6-3 und MKCu6-9 bestätigten die Ergebnisse der Southern-Blot-Analysen. In MKCu17-2 und MKCu6-9, in denen keine Wildtyp-Bande im Southern-Blot nachgewiesen wurde (Abb. 3.24, Abb. 3.16), wurde die gleiche Anzahl an Plasmidgenen im Vergleich zu den chromosomalen Genen *CuXDH1* und *CuGXF1* festgestellt. Im Stamm MKCu6-3 wurde anhand der qPCR-Daten vermutet, dass das Plasmid pMC6 nur in 1/3 bzw. 2/3 der *CuHIS3*-Allele integriert vorliegt (vgl. Abb. 3.14).

3.3 Heterologe Expression in der Hefe *P. jadinii*

P. jadinii wird als teleomorphe (sexuelle) Form von *C. utilis* (Anamorph: asexuelle Form) angesehen (Kurtzman *et al.*, 1979). Die ersten Voruntersuchungen des Stammes *P. jadinii* CBS1600 zeigten starke Ähnlichkeiten zu *C. utilis* (siehe 3.1). Aufgrund der nahen Verwandtschaft zwischen *C. utilis* und *P. jadinii* war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die heterologe Genexpression in *P. jadinii* mit den im zweiten Teil dieser Arbeit für *C. utilis* etablierten Expressionssystemen zu untersuchen.

3.3.1 Heterologe Expression von GFP

Für die Untersuchung von *P. jadinii* CBS1600 als Wirtsorganismus der heterologen Expression wurde vorausgesetzt, dass *C. utilis* und *P. jadinii* miteinander verwandt sind (Buerth *et al.*, 2011; Kurtzman *et al.*, 1979) und deshalb die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Expressionsplasmide verwendet werden können. Außerdem war zu Beginn der Arbeit die Genomsequenz von *P. jadinii* nicht bekannt, so dass für die Transformation genau wie bei *C. utilis* die Plasmide im *C. utilis*-Promotorbereich linearisiert wurden (siehe 3.2.2). Nach der Transformation wurden die Transformanten auf selektiven YPD-Agarplatten (10 µg/ml Nourseothricin) selektiert. In diesem Zusammenhang wurden die Transformationseffizienzen der Expressionsplasmide in *P. jadinii* bestimmt (vgl. 3.2.2). Die Transformationseffizienz gibt die Anzahl der Transformanten wieder, die aus 1 µg DNA resultieren. Bei allen Expressionsvektoren lag die Effizienz zwischen 7 (*PGK1p*) und 60 (*TDH3p*), jedoch insgesamt bis über das 100-fache unter der Transformationseffizienz in *C. utilis* (vgl. Tab. 3.7). Für den Nachweis der GFP-Fluoreszenz wurden die *P. jadinii*-Transformanten unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Repräsentativ sind in Abb. 3.31 a) nur die Fluoreszenzbilder von MKPj1 und MKPj2 (*CuTDH3p/-GFP*) dargestellt, da die der anderen Stämme MKPj3/4 (*CuPGK1p/-GFP*), MKPj5/6 (*CuACT1p/-GFP*), MKPj7/8 (*CuPMA1p/-GFP*) und MKPj9/10 (*CuPMT1p/-GFP*) ähnliche Fluoreszenz zeigten.

Um die Verwendbarkeit der konstruierten Expressionsplasmide auch in anderen Hefen zu untersuchen, wurden die Stämme *S. cerevisiae* MC45-5A und *C. albicans* CAF2-1 mit den Plasmiden pMC1 (*TDH3p*) und pMC2 (*TDH3p-GFP*) transformiert. Nach der Transformation wurden Transformanten von *S. cerevisiae* auf YPD-Medium mit 10 µg/ml Nourseothricin (siehe 2.7.16.5) und von *C. albicans* auf YPD-Medium mit 200 µg/ml Nourseothricin (siehe 2.7.16.3) selektiert. Bei der heterologen GFP-Expression wurde die Funktionalität des chromosomalen Replikators aus *C. albicans*, CaARS, in *S. cerevisiae* und *C. albicans* ausgenutzt (Cannon *et al.*, 1990). Dies bedeutet, dass die Expressionsplasmide vor der Transformation nicht linearisiert werden mussten. Aus der Transformation ergaben sich bis zu 172 *S. cerevisiae*- und 60 *C. albicans*-Transformanten (Daten nicht gezeigt). Die GFP-Fluoreszenz wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (Abb. 3.31 b). Somit wurde gezeigt, dass das für *C. utilis* entwickelte Expressionssystem in vier Hefearten für die heterologe Genexpression eingesetzt werden kann.

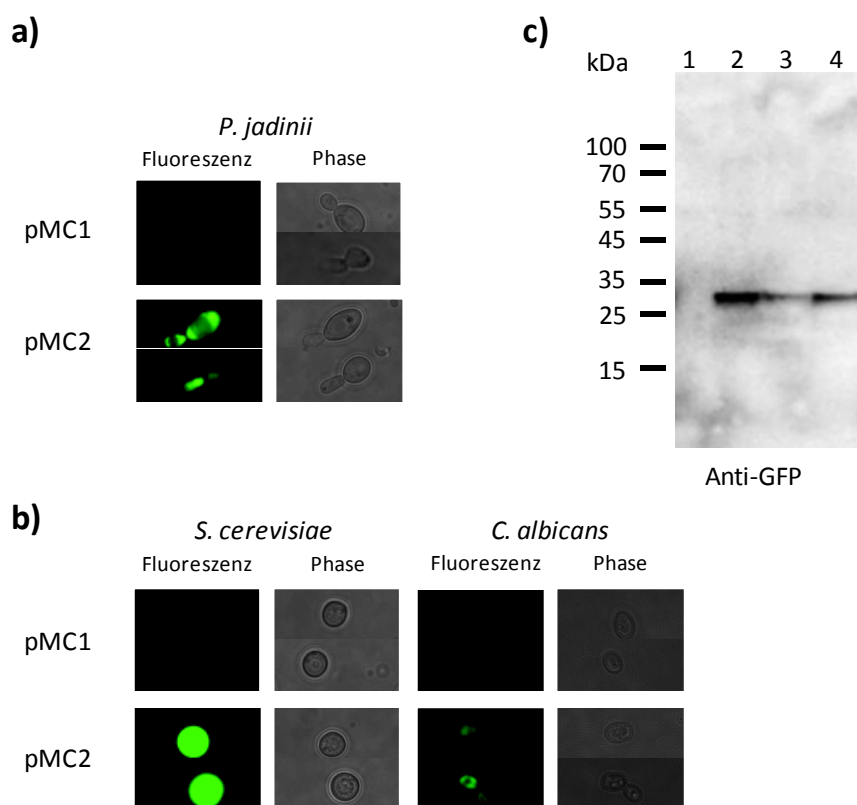


Abb. 3.31: Heterologe Expression von GFP in *P. jadinii*. **a)** Einzelzellen von *P. jadinii* CBS1600 transformiert mit den Plasmiden pMC1 (*TDH3p*) und pMC2 (*TDH3p-GFP*). **b)** Einzelzellen von *S. cerevisiae* MC45-5A und *C. albicans* CAF2-1 nach der Transformation mit pMC1 und pMC2. **c)** Immunoblot-Analyse von MKPj2 und die Detektion von GFP (26,9 kDa) in den Spuren 2-4 (*TDH3p-GFP*). Als Kontrolle wurde der Stamm MKPj1 ohne *GFP* verwendet (Spur 1: *TDH3p*). Für die Detektion wurde Anti-GFP als Primärantikörper verwendet.

Die Proteinsynthese von GFP wurde anhand eines Immunoblots mit dem Antikörper Anti-GFP überprüft. Wie in Abb. 3.31 c) deutlich zu erkennen, ist ein klares GFP-Signal zwischen 25 und 35 kDa des Proteingrößenstandards im Stamm MKPj2 sichtbar. Aufgetragen wurden Zellextrakte der Vektorkontrolle MKPj1 (*TDH3p*, Spur 1) und von drei Transformanten des Stammes MKPj2 (*TDH3p-GFP*, Spuren 2-4).

3.3.1.1 Promotoreffizienz

Zur Ermittlung der Promotoreffizienz für die heterologe Expression des Reportergens *GFP* wurden je drei Transformanten der *P. jadinii*-Stämme MKPj2 (*TDH3p-GFP*), MKPj4 (*PGK1p-GFP*), MKPj6 (*ACT1p-GFP*), MKPj8 (*PMA1p-GFP*) und MKPj10 (*PMT1p-GFP*) über Nacht in YPD-Medium bei 30 °C kultiviert und auf eine OD_{600} von 1,0 verdünnt. Gemessen wurde die Fluoreszenz der ganzen Zellen mit Hilfe des Fluorometers. Die Zellen wurden mit Licht einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und bei 538 nm detektiert.

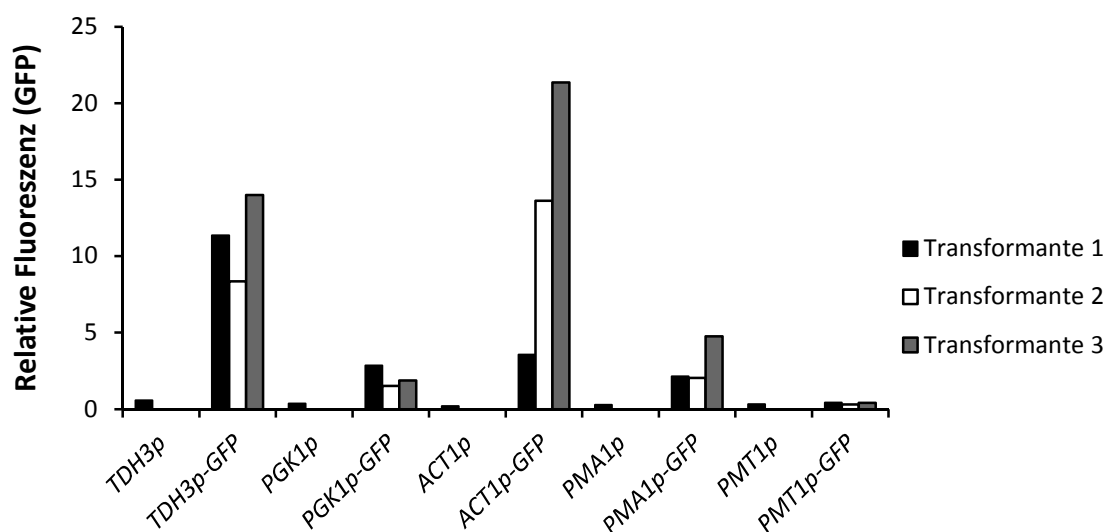


Abb. 3.32: Promotoreffizienz bei der GFP-Expression in *P. jadinii*. GFP-Fluoreszenz ganzer Zellen der stationären Phase, die auf eine OD₆₀₀ von 1,0 verdünnt wurden. Die *P. jadinii*-Stämme MKPj1/MKPj2 (*TDH3p*-*GFP*), MKPj3/MKPj4 (*PGK1p*-*GFP*), MKPj5/MKPj6 (*ACT1p*-*GFP*), MKPj7/MKPj8 (*PMA1p*-*GFP*) und MKPj9/MKPj10 (*PMT1p*-*GFP*) wurden untersucht. Die Anregung erfolgte durch UV-Licht der Wellenlänge 485 nm, während bei 538 nm detektiert wurde. Als Kontrollen wurden die Stämme mit den Plasmiden ohne *GFP* untersucht.

In Abb. 3.32 ist deutlich zu erkennen, dass die Effizienz für die *GFP*-Expression in *P. jadinii* unter der Kontrolle des *CuACT1*-Promotors und des *CuTDH3*-Promotors am höchsten ist. Im Gegensatz dazu zeigten die Promotoren *CuPGK1p* und *CuPMA1p* eine fünf- bis siebenfach geringere Effizienz. Der *CuPMT1*-Promotor wies hingegen fast gar keine *GFP*-Expression auf.

3.3.1.2 Integrationsanalyse und Plasmidstabilität

Nach der erfolgreichen Transformation der Expressionsplasmide in *P. jadinii* und dem Nachweis der funktionalen *GFP*-Expression, wurde die Integration dieser Plasmide in das *P. jadinii*-Genom untersucht. Hierzu wurde die genomische DNA von drei Transformanten des Stammes MKPj2 (*TDH3p*-*GFP*), zusammen mit der Vektorkontrolle MKPj1 (*TDH3p*) und dem Wildtyp CBS1600 auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen und eine Southern-Blot-Analyse mit einer *GFP*-Sonde durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pMC2 (*TDH3p*-*GFP*) mit aufgetragen, um im Southern-Blot die Laufhöhe eines eventuell nicht integrierten Plasmids aufzuzeigen.

In Abb. 3.33 ist exemplarisch der Southern-Blot für das *CuTDH3p*-Expressionsplasmid abgebildet, da die Ergebnisse der anderen *C. utilis*-Promotoren identisch dazu waren. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Banden im Southern-Blot denen der genomischen DNA auf dem Agarosegel >10kb entsprechen. Die zu *GFP* komplementäre Sonde konnte wie erwartet nicht im Wildtyp binden, so dass dort kein Signal detektiert wurde.

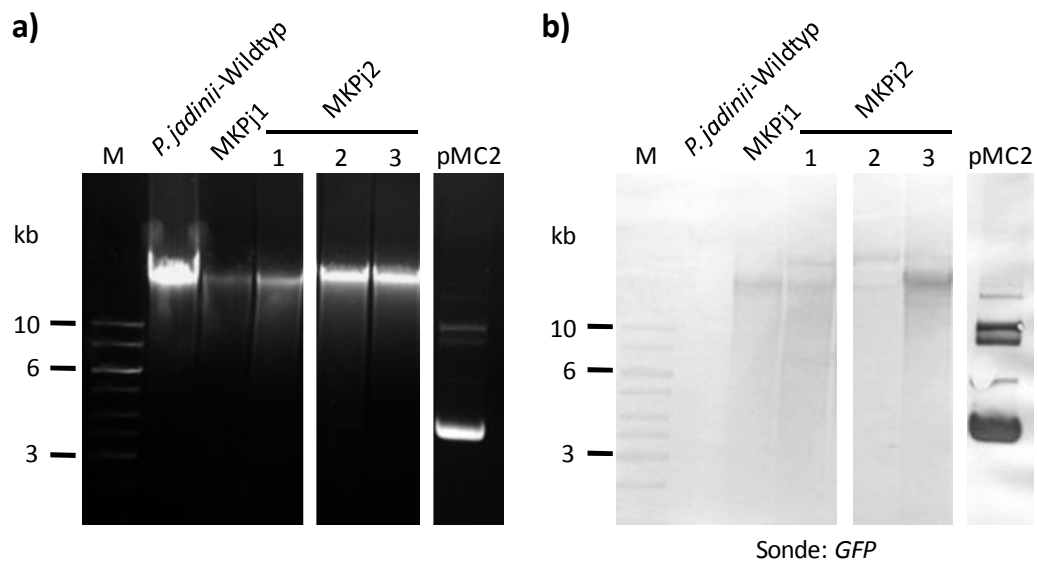


Abb. 3.33: Southern-Blot zur Untersuchung der chromosomalen Integration in *P. jadinii*. **a)** Agarosegel der genomischen DNA und des Plasmids pMC2. Aufgetragen wurde neben dem *P. jadinii*-Wildtyp CBS1600 als Negativkontrolle die Stämme MKPj1 (*TDH3p*) und MKPj2-1 bis -3 (*TDH3p-GFP*). Die Laufhöhe der genomischen DNA liegt deutlich über der 10 kb-Bande des Größenstandards (M: GeneRuler 1 kb DNA ladder, Fermentas). **b)** Southern-Blot des Agarosegels. Zu sehen sind die Banden der genomischen DNA in den Stämmen MKPj1, MKPj2-1 bis -3 und im Plasmid pMC2, die mit der *GFP*-Sonde hybridisiert sind. Im *P. jadinii*-Genom ist *GFP* nicht vorhanden, weshalb auch keine Bande detektiert werden konnte.

Wie der Southern-Blot gezeigt hat, sind die Plasmide im *P. jadinii*-Genom integriert, da keine Banden detektiert werden konnten, die dem Plasmid pMC2 entsprachen (Abb. 3.33 b). Um die Richtigkeit der Integration zu überprüfen, wurde eine weitere Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Xho*I geschnitten. Gegen Ende dieser Arbeit lagen die Genomdaten von *P. jadinii* CBS1600 vor (Brinkrolf *et al.*, 2013), so dass die hohe Identität zwischen den *TDH3*-Promotoren in *C. utilis* und *P. jadinii* durch Analyse der DNA-Sequenz mit 96 % bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe dieser Daten wurden zwei Schnittstellen je eine stromauf- und eine stromabwärts des *TDH3*-Promotors im *P. jadinii*-Genom identifiziert. Eine weitere *Xho*I-Schnittstelle lag im *CaACT1t* des Plasmids vor, so dass im Falle einer einfachen Integration mit Hilfe der *TDH3p*-Sonde zwei Banden mit den Größen von ungefähr 5 und 8 kb detektiert werden sollten (Abb. 3.34 b). Wie in Abb. 3.34 zu sehen, ist die Wildtyp-Bande bei etwa 6 kb (◀) in jeder Probe zu sehen. Im Stamm MKPj1 könnte die intensive Bande eine Doppelbande der 5,8- (◀) und der 8 kb (◀)-Bande sein. Zusätzlich ist in dieser Probe noch eine weitere schwächere Bande bei ungefähr 5 kb (◀) zu erkennen und eine deutlich oberhalb des Größenstandards (◀) und somit über 10 kb (MKPj1). In den Proben von MKPj2 konnten zwei Banden detektiert werden, die eine bei >6 und die andere bei 8 kb (◀). Anhand des Southern-Blots wird vermutet, dass das Plasmid im *P. jadinii*-Genom an einem unbekanntem Ort und nicht im *TDH3*-Promotor integriert ist.

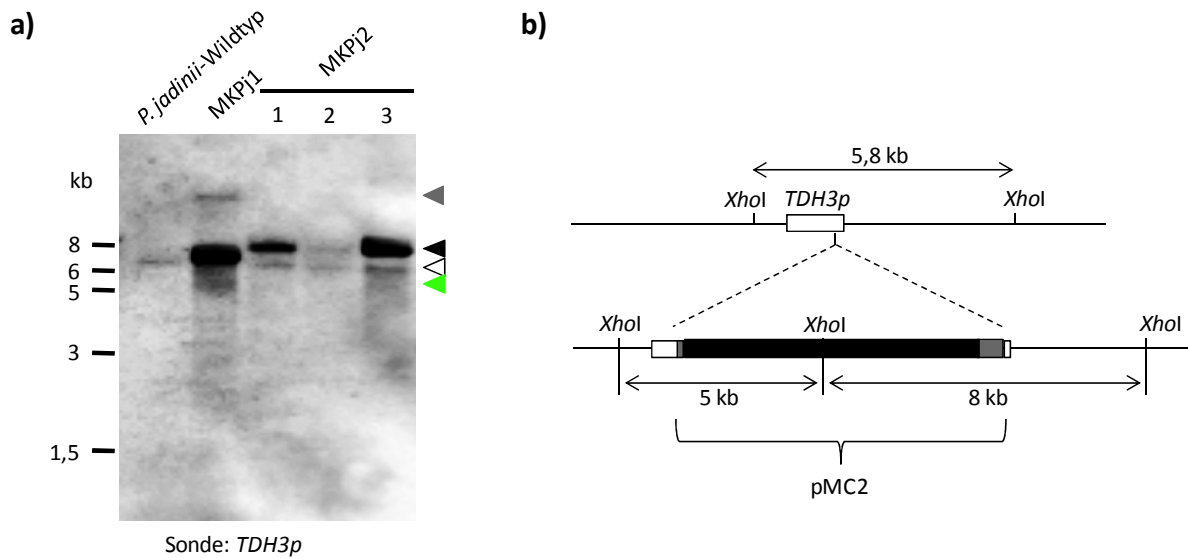


Abb. 3.34: Southern-Blot-Analyse zur Überprüfung der Integration in *P. jadinii*. **a)** Southern-Blot mit *P. jadinii* CBS1600, MKPj1, MKPj2-1 bis -3 und der *TDH3p*-Sequenz als Sonde. **b)** Schematische Darstellung der Integration in den *TDH3p*-Lokus in *P. jadinii* CBS1600. Während bei keiner Integration eine Bande mit der Größe von 5,8 kb zu erwarten ist, würden bei einfacher Integration eine 5 kb und eine 8 kb Bande detektiert werden.

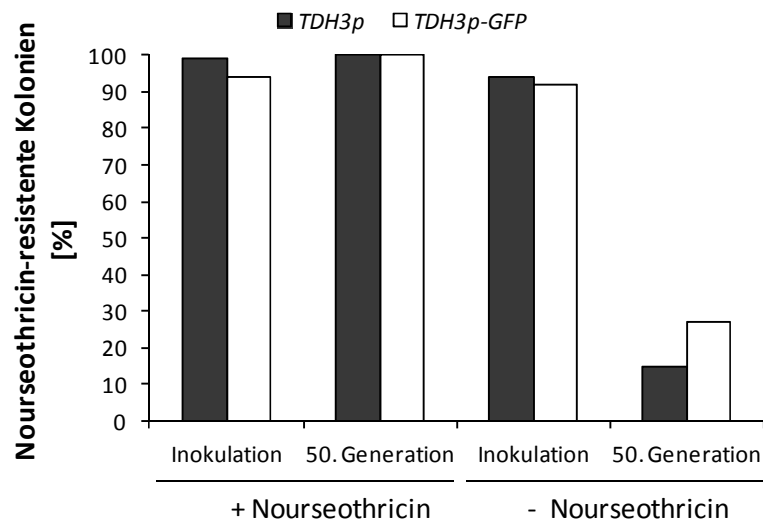


Abb. 3.35: Plasmidstabilitätsanalyse. Prozentuale Anzahl der Kolonien der Stämme MKPj1 (*TDH3p*) und MKPj2 (*TDH3p-GFP*), die bei Inokulation und nach 50 Generationen Wachstum in selektiven (+Nourseothricin) und nicht-selektiven (-Nourseothricin) Medium Nourseothricin-Resistenz aufwiesen. Die Plasmidstabilitätsanalyse wurde wie in Abb. 3.12 beschrieben durchgeführt.

Um die Stabilität der Integration zu überprüfen, wurde eine Plasmidstabilitätsanalyse, wie in 2.8 beschrieben, durchgeführt. In Abb. 3.35 ist das Ergebnis der Plasmidstabilitätsanalyse dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der Nourseothricin-resistenten Kolonien abhängig von der Gegenwart des Antimykotikums ist. So zeigen fast 95 % der Zellen nach Erreichen der 50. Generation

im selektiven Medium (+Nourseothricin) die durch das Plasmid erhaltene Nourseothricin-Resistenz, während im nicht-selektiven Medium (-Nourseothricin) nur noch 10 bis 20 % diese zeigen.

3.3.2 Heterologe Expression von CalB

Ein entscheidender Vorteil für ein Expressionssystem ist es, wenn das Protein extrazellulär vorliegt, da so die Gewinnung und die Aufreinigung des Produktes stark vereinfacht werden. Um die Sekretionsfähigkeit von *P. jadinii* zu überprüfen, wurde das bereits konstruierte Expressionsplasmid pMC5 gewählt, welches als Reportergen das *CALB*-Gen für die Lipase B aus *C. antarctica* unter der Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors *GXS1p* enthält (siehe 3.2.4). Das Plasmid pMC5 wurde wie auch der Leervektor pMC3 (*GXS1p*) in *P. jadinii* transformiert und auf Nourseothricin-haltigem Festmedium ausplattiert. Die darauf identifizierten Transformanten wurden mit den Primerpaaren CALB Fw/ CALB Rv und *GXS1p*-Fw-NarI/ *GXS1p*-Rv-HindIII einer Kolonie-PCR unterzogen (Daten nicht gezeigt). Die positiv getesteten Transformanten wurden auf Tributyrinplatten transferiert, um diese auf die funktionelle Expression und Sekretion der CalB zu untersuchen.

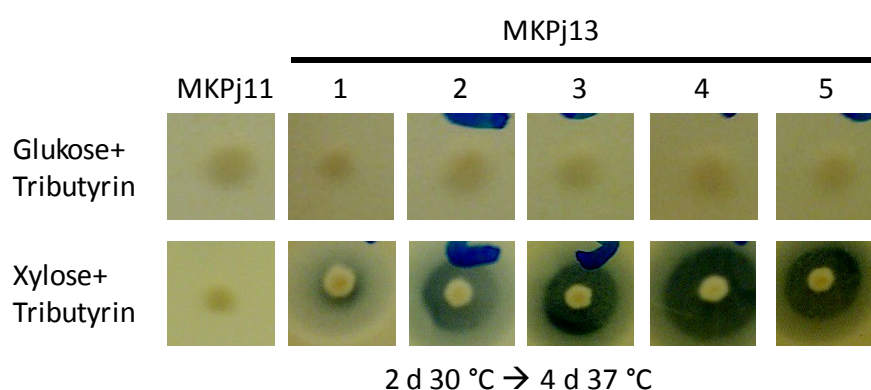


Abb. 3.36: Sekretion von CalB in *P. jadinii*. Die Transformanten der Stämme MKPj11 (*GXS1p*) und MKPj13 (*GXS1p*-*CALB*) wurden auf Tributyrinplatten mit Glukose (obere Reihe) bzw. Xylose (untere Reihe) transferiert und zunächst 2 Tage bei 30 °C und anschließend 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Die klaren Höfe auf dem Xylose-haltigen Medium sind der Nachweis für den Abbau des Lipids Tributyrin durch die funktionelle CalB unter der Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors *GXS1p*.

Nach einer Inkubationszeit von zunächst 2 Tagen bei 30 °C und anschließenden 4 Tagen bei 37 °C konnten an den Kolonien des Stammes MKPj13 (*GXS1p*-*CALB*) klare Höfe auf Xylose-haltigem Medium ausgemacht werden (Abb. 3.36). Im Gegensatz dazu blieben die Klärungen an den Kolonien auf Glukose-haltigem Medium aus. Die Negativkontrolle MKPj11 (*GXS1p*) zeigte auf keiner verwendeten Kohlenstoffquelle eine Lipaseaktivität. Die Größe der Höfe variiert wahrscheinlich nach Integrationshäufigkeit und -ort. So ist bei Transformante 4 der größte und bei Transformante 1 der kleinste Hof vorzufinden.

Nachdem durch die Analyse auf Tributyrinplatten gezeigt werden konnte, dass die Lipase sekretiert wird, wurde mittels Immunoblot-Analyse auf der Proteinebene untersucht, in welchem Verhältnis CalB intra- und extrazellulär vorliegt. Für dieses Experiment wurde die aktivste Transformante (MKPj13-4) ausgewählt, da diese die größte Klärung hervorgebracht hatte. Aus einer Übernachtskultur

wurden je 100 ml Minimalmedium mit Glukose (SMD) oder Xylose (SMX) auf eine OD_{600} von 0,1 inokuliert und bei 30 °C kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurde die OD_{600} gemessen und 1 ml Proben für die Immunoblot-Analyse entnommen.

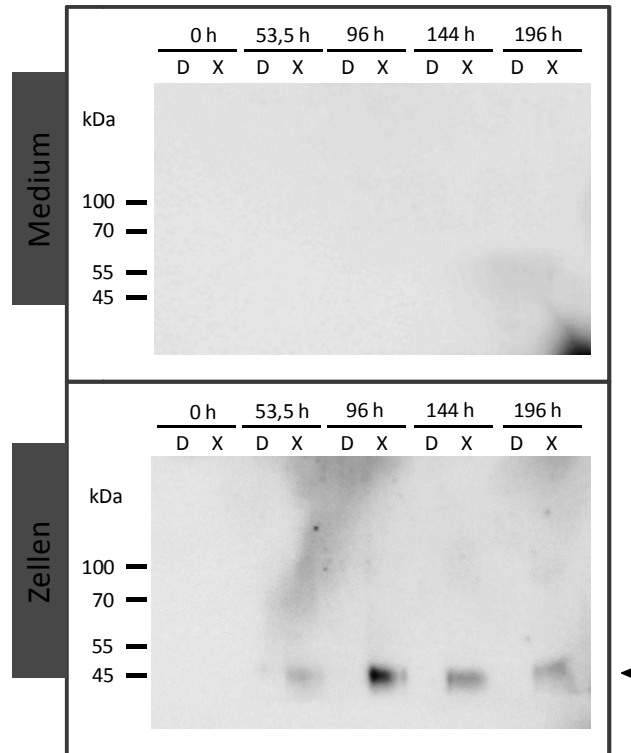


Abb. 3.37: Immunoblot-Analyse des Stammes MKPj13 in Glukose- und Xylose-haltigem Medium. Immunoblot der CalB in Xylose- (Spur X) und Glukose-haltigem (Spur D) Medium zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung. Dabei wurden sowohl die intrazelluläre (Zellen) als auch die extrazelluläre (Medium) CalB aus der gleichen Menge an Zellkultur untersucht. Als Primäntikörper wurde Anti-HA verwendet.

In Abb. 3.37 ist zu erkennen, dass im Medium keine CalB mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu war eine schwache Bande (◄) in den entsprechenden Zellproben sichtbar. Die Banden befinden sich zwischen 45 und 55 kDa des Proteingrößenstandards. Während wie erwartet, in den ersten Proben (0 h) kein Protein vorhanden ist, waren die Banden mit einer ungefähren Größe von 41 kDa (CalB-3HA) nur in den Proben aus der in Xylose gewachsenen Kultur zu beobachten.

Analog zu *C. utilis* wurde auch in *P. jadinii* die Lipaseaktivität über die Zeit gemessen (siehe 3.2.4). Hierzu wurden die gleichen Proben des Mediums sowie der entsprechenden Menge an Zellen, die in der Immunoblot-Analyse verwendet wurden, untersucht (siehe 2.10.9).

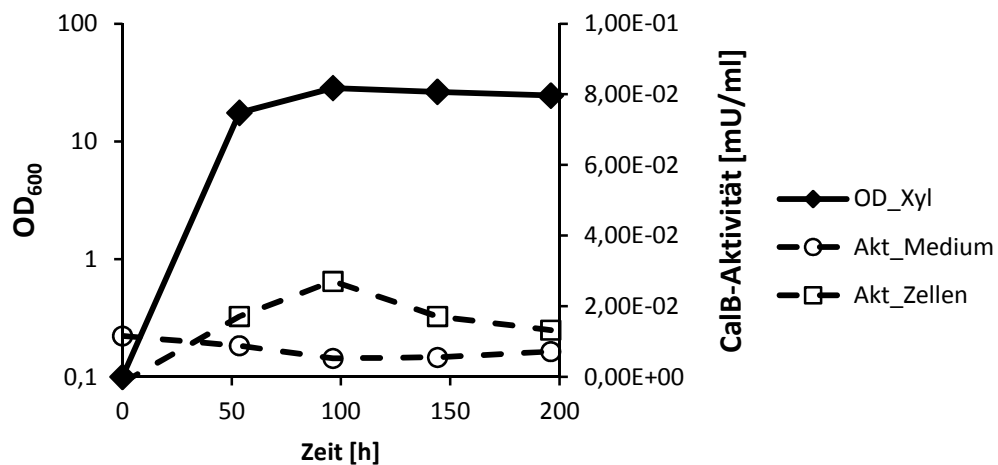


Abb. 3.38: Lipaseaktivität in *P. jadinii* über die Zeit. Wachstumskurve von MKPj13 in SMX-Medium bei 30 °C (linke Skalierung: OD₆₀₀) sowie die Lipaseaktivität im Medium (○) und den Zellen (□) in mU/ml (rechte Skalierung: CalB-Aktivität [mU/ml]).

In Abb. 3.38 ist die Lipaseaktivität über eine Wachstumsdauer von fast 200 h dargestellt. Wie deutlich zu erkennen, ist die Lipaseaktivität in den Zellen (□) mit 0,03 mU/ml wesentlich höher als im Medium (○). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen in der Immunoblot-Analyse. Wie im Falle von *C. utilis* (siehe 3.2.4) kann aus den Untersuchungen zur extrazellulären Sekretion von CalB in *P. jadinii* gefolgert werden, dass die Lipase hauptsächlich im Periplasma verbleibt, da im Medium kein CalB detektiert wurde (Abb. 3.37), während auf den Tributyrinplatten die Aktivität der produzierten Lipase nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.36).

4 Diskussion

Die auch als *Torula*-Hefe bekannte Futterhefe *C. utilis* wird schon seit Jahrzehnten in der Industrie eingesetzt (Kurtzman *et al.*, 1979). In den vergangenen Jahren wurde diese Hefe verstärkt in der Produktion von verschiedenen Substanzen wie z. B. Biotin, Laktat und Ethanol verwendet (Hong *et al.*, 2006; Ikushima *et al.*, 2009c; Tamakawa *et al.*, 2011). Das steigende Interesse lässt sich durch die verschiedenen Vorteile von *C. utilis* gegenüber anderen Hefen wie z. B. *S. cerevisiae* oder *P. pastoris* erklären. So ist *C. utilis* nicht nur in der Lage, unterschiedliche Aminosäuren, Nitrate und Kohlenstoffe zu verwerten, sondern ist zusätzlich Crabtree-negativ (Kondo *et al.*, 1995). Somit wird das Zellwachstum nicht durch produziertes Ethanol bei hohen Glukosekonzentrationen gehemmt. Durch seine Fähigkeit, sich leicht an das vorliegende Nährstoffangebot zu adaptieren, ist es möglich, günstige Abfall- und Nebenprodukte aus anderen Industriezweigen als Substrate zu verwenden (Gold *et al.*, 1981; Li *et al.*, 2009). Ein weiterer besonderer Vorteil ist die Assimilation von Pentosen wie die Xylose, welche eine Monomer-Einheit des Polysaccharids Xylan ist. So kann *C. utilis* in Gegensatz zu *S. cerevisiae* Xylose als Kohlenstoffquelle nutzen und bietet eine Alternative zu den bereits etablierten Wirtsorganismen wie auch *P. pastoris*, wobei speziell im Vergleich mit *P. pastoris* die hohen Kosten für Methanol und die damit verbundene Gefährdung ein weiterer Vorteil für *C. utilis* als Expressionswirt bedeuten (Krainer *et al.*, 2012).

Ziel dieser Arbeit war es, die Hefe *C. utilis* als Expressionswirt für die heterologe Proteinsynthese zu optimieren. Dabei sollte ein neues Expressionssystem konstruiert werden, das die heterologe Genexpression durch die stabile Integration des Expressionsvektors im Wirtsgenom mit Hilfe eines neuen Selektionsmarkers (*sat1*) gewährleistet. In diesem Zusammenhang sollte ein Xylose-induzierbarer Promotor aus *C. utilis* verwendet werden, um die besondere Eigenschaft von *C. utilis*, die Pentose Xylose zu verwerten, für die heterologe Genexpression zu nutzen. Ein weiteres Ziel war die Anwendung des neuen Expressionssystems für die Expression einer heterologen Xylanase, um das Polysaccharid Xylan als Kohlenstoffquelle nutzen zu können. Parallel wurden die Expressionssysteme ebenfalls in *P. jadinii* getestet, um eventuelle Vor- und Nachteile gegenüber *C. utilis* zu identifizieren.

4.1 Enge Verwandtschaft zwischen *C. utilis* und *P. jadinii*

Da *C. utilis* als anamorphe und damit asexuelle Form von *P. jadinii* (teleomorph, sexuell) gilt (Kurtzman *et al.*, 1979), wurde die heterologe Expression in beiden Hefen durchgeführt, um eventuelle Unterschiede aufzuzeigen. Schon bei den physiologischen Untersuchungen wurde deutlich, dass sich beide Mikroorganismen sehr ähneln, so dass nur leichte Abweichungen und keine signifikanten Differenzen beobachtet werden konnten (siehe 3.1). Im Vergleich zu *S. cerevisiae* wird deutlich, dass *C. utilis* sich leichter an verschiedene Wachstumsbedingungen anpassen kann. So wächst *C. utilis* bei Temperaturen von 37-40 °C ohne größere Limitierungen (Tab. 3.1) und ist in der Lage, mit Xylose zu wachsen (Tab. 3.2). Neben Pentosen kann *C. utilis* auch weitere Substrate verwerten. So identifizierten Tomita *et al.* (2012) Gene für die Nitratreduktase und die

Nitritreduktase in *C. utilis*, die in der Nitrat- bzw. Nitrit-Assimilation beteiligt sind, die in anderen Hefen wie z. B. *S. cerevisiae* und *C. albicans* nicht vorkommen. Das zeigt die vielseitige Substratverwertung von *C. utilis* im Gegensatz zu anderen Hefen, da kostengünstige Substrate verwendet werden können. Hinzu kommt die breite pH-Toleranz von *C. utilis* DSM2361 und *P. jadinii* CBS1600, die im Bereich von pH 3,0 bis 9,0 wachsen (vgl. Tab. 3.3). Im Vergleich dazu wurde das Wachstum von *S. cerevisiae* im alkalischen Bereich gehemmt, während *P. pastoris* bei pH 3,0 eine längere Verdopplungszeit aufwies. Ein weiterer Vorteil ist die höhere Sensitivität gegenüber den Antimykotika Hygromycin B, G418 und Nourseothricin, dadurch werden bei der Selektion auf Expressionsplasmide mit entsprechenden Resistenzgenen niedrigere Antimykotika-Konzentrationen benötigt, so dass ein biotechnologischer Prozess kostengünstiger wird.

4.1.1 Genomanalyse von *C. utilis* und *P. jadinii*

Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wird deutlich, dass *C. utilis* und *P. jadinii* in ihren physiologischen Eigenschaften und bei der heterologen Genexpression von *GFP* und *CALB* nur minimale, aber keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Zur Untersuchung der Ploidie wurden hier *C. utilis* und *P. jadinii* miteinander verglichen. Ikushima *et al.* (2009b) wiesen eine Tri-, Tetra- oder Pentaploidie von *C. utilis* NBRC0988 mittels FACS-Analyse nach. Dabei wurde der DNA-Gehalt von *C. utilis* auf das Drei- bis Fünffache von einem haploiden *S. cerevisiae*-Stamm geschätzt. Dadurch wurde das Ergebnis zur Herstellung einer Nullmutante bekräftigt, bei der vier Disruptionszyklen benötigt wurden, um das *URA3*-Gen in allen Allelen zu deletieren (Ikushima *et al.*, 2009b). Des Weiteren wurde zur Erzeugung einer weiteren *C. utilis*-Nullmutante erneut vier *PDC1*-Allele deletiert (Tamakawa *et al.*, 2012). Da die von Ikushima *et al.* (2009b) und Tamakawa *et al.* (2012) bestimmte Tetraploidie hauptsächlich auf der Anzahl der deletierten Allele basierte und nicht Genom-weit durch FACS-Analyse genauer bestätigt wurde, wurde zur Untersuchung der Ploidie von dem in dieser Arbeit verwendeten *C. utilis*-Stamm DSM2361 (andere Bezeichnung für NBRC0988) eine FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurde wie auch bei Ikushima *et al.* (2009a) ein haploider *S. cerevisiae*-Stamm als Referenz verwendet, jedoch zusätzlich noch diploide und triploide *S. cerevisiae*-Stämme. Da die Genomgrößen von *C. utilis* DSM2361 mit 12,5 Mbp (Buerth *et al.*, 2011) und dem haploiden *S. cerevisiae*-Stamm mit 12,3 Mbp (Tomita *et al.*, 2012) ähnlich waren, konnte durch Vergleich der Histogramme aus der FACS-Analyse die Ploidie von *C. utilis* und *P. jadinii* (12,7 Mbp; Brinkrolf *et al.*, 2013) bestimmt werden. Das Ergebnis zeigte, dass *C. utilis* DSM2361 vermutlich triploid und *P. jadinii* CBS1600 vermutlich diploid ist (Abb. 3.2). Die zur Erstellung einer Nullmutante erforderliche Deletion der vier *URA3*- und *PDC1*-Allele kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass diese Gene vermutlich mehrfach auf einem der Chromosomen vorliegen, so dass mehrere Disruptionszyklen notwendig waren. Eine kürzlich durchgeführte Analyse der Genomsequenzen ergab jedoch, dass die Gene *URA3* und *PDC1* in *C. utilis* NBRC0988 und *P. jadinii* CBS1600 nur einmal auf einem der Chromosomen vorliegen. Andererseits könnte *C. utilis* auch aneuploid sein, d. h. dass einzelne Chromosomen mehrfach vorliegen. Aus *S. cerevisiae* und *C. albicans* ist außerdem bekannt, dass die Bedingungen der Transformation zu Mutationen führen, die auch die numerische Anzahl von Chromosomen betreffen können (Bouchonville *et al.*, 2009). Somit könnte der *C. utilis*-Ausgangsstamm triploid sein, aber durch die wiederholten Transformationsansätze eine zusätzliche Kopie eines Chromosoms aufweisen, so dass Allele, die auf dem entsprechenden Chromosomen

liegen, häufiger vorkommen. Die Analyse der *P. jadinii*-Genomsequenz ergab, dass es auf einzelnen Chromosomen Bereiche gibt, die nicht wie für einen diploiden Organismus erwartet nur zweifach, sondern drei- bis vierfach im Genom vorkommen (Brinkrolf *et al.*, 2013). Aufgrund dieses Ergebnisses kann nicht ausgeschlossen werden, dass *C. utilis* ebenfalls Regionen besitzt, die im Genom häufiger vorliegen, so dass bei einer Gendeletion mehr als drei Allele deletiert werden müssten.

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurden die Genomsequenzierungen von *C. utilis* DSM2361 (Buerth *et al.*, 2011) und *P. jadinii* CBS1600 (Brinkrolf *et al.*, 2013) durchgeführt. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Sequenzierungen sowie die von Tomita *et al.* (2012) veröffentlichten Daten von *C. utilis* NBRC0988 sind in Tab. 4.1 zusammengefasst. Eine Analyse der Genomsequenzen von *C. utilis* NBRC0988 und *P. jadinii* CBS1600 ergab, dass die neun längsten Sequenzabschnitte (scaffolds) von *P. jadinii* eine sehr hohe Sequenz-Identität zu den 8 der 13 längsten Chromosomen von *C. utilis* aufweisen (Brinkrolf *et al.*, 2013; Tomita *et al.*, 2012). Durch die Zuordnung der *P. jadinii*-Sequenzabschnitte zu den *C. utilis*-Chromosomen wurde geschlussfolgert, dass *P. jadinii* CBS1600 sieben Chromosomen besitzt (Brinkrolf *et al.*, 2013). Die Chromosomenzahl von *C. utilis* DSM2361 wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt, jedoch ist aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen *C. utilis* und *P. jadinii* wahrscheinlich, dass *C. utilis* ebenfalls sieben Chromosomen besitzt.

Tab. 4.1: Vergleich der Daten aus den Genomsequenzierungen von *C. utilis* und *P. jadinii*. Ergebnisse der Genomsequenzierung von *C. utilis* DSM2361 (Buerth *et al.*, 2011), *C. utilis* NBRC0988 (Tomita *et al.*, 2012) und *P. jadinii* CBS1600 (Brinkrolf *et al.*, 2013). (n. b.: nicht bekannt)

	<i>C. utilis</i> DSM2361	<i>C. utilis</i> NBRC0988	<i>P. jadinii</i> CBS1600
Anzahl ORFs	6417	8864	6147
Anzahl annotierter Gene mit Proteinfunktion	4201	8646	4938
Abdeckung	17	20	>80
Chromosomenzahl	n. b.	13	7
Genomgröße	12,5 Mbp	14,6 Mbp	12,7 Mbp

4.1.2 Verwandtschaft einzelner Gene in *C. utilis* und *P. jadinii*

Aufgrund der nahen Verwandtschaft zwischen *C. utilis* und *P. jadinii* wurden einzelne Gene genauer untersucht. Die Analyse wurde zunächst auf die Stoffwechselwege, die besonders bei der Verwertung von Glukose und Xylose eine Rolle spielen, eingegrenzt. Deshalb wurden die Genomdaten von *C. utilis* DSM2361 (12,5 Mbp; Buerth *et al.*, 2011) und *P. jadinii* CBS1600 (12,7 Mbp; Brinkrolf *et al.*, 2013) auf die Gene untersucht, die in der Glykolyse, im Pentosephosphatweg und im Citratzyklus beteiligt sind. Dabei konnten alle relevanten Gene für die Enzyme dieser

Stoffwechselwege in beiden Hefen identifiziert werden. Die DNA-Sequenz-Analyse ergab eine Identität von 45-79 % zu *S. cerevisiae* und eine 96-100 %-ige Identität der DNA-Sequenzen zwischen *C. utilis* und *P. jadinii* (siehe Anhang, Tab. 9.2). Bei der Analyse der im Xylan- bzw. Xylose-Abbau-beteiligten Gene konnte eine 39-65 %-ige Identität der DNA-Sequenzen zu *P. stipitis* beobachtet werden (siehe Anhang, Tab. 9.3). Eine hohe Identität zwischen den DNA-Sequenzen in *C. utilis* und *P. jadinii* wurde erwartet (98-99 %), da auch der Vergleich der *P. jadinii* CBS1600-Genomsequenz mit den von Tomita *et al.* (2012) veröffentlichten *C. utilis* (NBRC0988)-Daten eine hohe Übereinstimmung in den Sequenzen ergeben hatte (Brinkrolf *et al.*, 2013). Der direkte Vergleich der Genom-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Stämme *C. utilis* DSM2361 und *P. jadinii* CBS1600 wurde erschwert, da die Genomsequenzierung von *C. utilis* mit einer geringeren Abdeckung (17-fach) durchgeführt wurde (Buerth *et al.*, 2011), während das Genom von *P. jadinii* mit einer über 80-fachen Abdeckung sequenziert wurde (Brinkrolf *et al.*, 2013). Im Vergleich dazu wurde die Genomsequenzierung von Tomita *et al.* (2012) mit einer 20-fachen Abdeckung durchgeführt (vgl. Tab. 4.1). Die Höhe der Abdeckung gibt die durchschnittliche Anzahl an, mit der ein Nukleotid in der Sequenz gelesen wurde und somit kann durch eine hohe Abdeckung die Fehlerrate durch falsch gelesene Nukleotide verringert werden. Daher kann geschlossen werden, dass die *P. jadinii*-Genomdaten aufgrund der höheren Abdeckung verlässlicher sind. Trotzdem konnten die Gene, die im Xylose-Abbau beteiligt sind, auch in beiden *C. utilis*-Datensätzen gefunden werden. Da *P. jadinii* wie auch *C. utilis* kein Xylan verwerten kann, wurde wie erwartet keine Gensequenz kodierend für eine Xylanase identifiziert (Daten nicht gezeigt).

Die Genomdaten von *C. utilis* und *P. jadinii* bieten eine Möglichkeit, die genetischen Unterschiede zwischen den beiden Hefen in vielerlei Hinsicht näher zu untersuchen. Dabei können bestimmte Signalwege und die damit verbundenen Regulationen der zahlreichen Gene aufgeklärt werden. Zusätzlich stellt sich die Frage nach der evolutionären Verbindung beider Hefen bevor durch Mutationen und Rekombinationen bestimmte Eigenschaften in dem Ausgangsstamm *P. jadinii* eventuell verloren gingen, während der daraus entstandene Industriestamm *C. utilis* andere Fähigkeiten besitzt.

4.2 Heterologe Genexpression in *C. utilis* und *P. jadinii*

Das in dieser Arbeit entwickelte Expressionssystem basiert auf einem Plasmid, auf dem mehrere Komponenten aus *C. albicans*-Sequenzen bestehen (Abb. 3.3). Der chromosomale Replikator, CaARS, erlaubte die Plasmidreplikation und GFP-Expression in *S. cerevisiae* und *C. albicans* (Abb. 3.31 b), war jedoch ohne Funktion in *C. utilis* und *P. jadinii*. Daher erfolgte die Transformation dieser Hefen durch genomische Integration der Expressionsplasmide. Als Resistenzmarker wurde die *sat1*-Resistenzkassette verwendet, die aus dem *sat1*-Gen aus *S. noursei* unter der Kontrolle des *ACT1*-Promotors und -Terminators aus *C. albicans* besteht (Setiadi *et al.*, 2006). Diese erlaubte die Verwendung von Nourseothricin als neuen Selektionsmarker, zusätzlich zu den verwendeten Markern für die Resistenz gegen Hygromycin B, G418 oder Cycloheximid (Ikushima *et al.*, 2009a; Kondo *et al.*, 1995). Dabei war aufgrund der hohen Sensitivität von *C. utilis* nur eine sehr geringe Konzentration von 10 µg/ml für die Selektion erforderlich (Tab. 3.4). Die höhere Sensitivität von *P.*

jadinii gegenüber Nourseothricin scheint dabei eine mögliche Erklärung für die geringere Transformationseffizienz in *P. jadinii* zu sein. Der bereits in unterschiedlichen Arbeiten eingesetzte *TDH3*-Promotor von *C. utilis* wurde neben anderen Promotoren wie *PGK1p*, *ACT1p*, *PMA1p* und *PMT1p* auch in dieser Arbeit aufgrund der höchsten Effektivität für die intrazelluläre Genexpression des Reporters *GFP* in *C. utilis* ausgewählt (Abb. 3.9, Abb. 3.32). Die Funktionalität der *GFP*-Expression wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 3.8 a, Abb. 3.31 a) und Immunoblot-Analyse (Abb. 3.8 b, Abb. 3.31 c) unter Verwendung eines *GFP*-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Bereits González *et al.* (2013) konnten zeigen, dass der *TDH3*-Promotor aus *C. utilis* auch in anderen Organismen wie *A. tumefaciens* aktiv ist. In dieser Arbeit wurde durch die Analyse der *GFP*-Fluoreszenz die Funktionalität des Expressionsvektors pMC2 (*TDH3p-GFP*) in den vier Hefearten *C. utilis*, *P. jadinii*, *S. cerevisiae* und *C. albicans* nachgewiesen (Abb. 3.8 a, Abb. 3.31 a+b). Somit können die konstruierten Expressionsvektoren ebenfalls für die heterologe Proteinsynthese in anderen Hefen eingesetzt werden.

4.2.1 Die Integration der Expressionsvektoren wird durch nicht-homologe Rekombination dominiert

Die chromosomale Integration der Expressionsplasmide in das *C. utilis*- bzw. *P. jadinii*-Genom konnte anhand von Southern-Blot-Analysen mit den entsprechenden Sonden für Regionen, die nur auf dem Plasmid vorhanden sind, nachgewiesen werden (Abb. 3.10, Abb. 3.14, Abb. 3.33). Alle Stämme, bei denen der Integrationsort unbekannt blieb, zeigten auch in der späteren Plasmidstabilitätsanalyse eine hohe Instabilität der Plasmidintegration und eine deutliche Nourseothricin-Abhängigkeit (Abb. 3.12, Abb. 3.35). Für Stamm MKCu17 (*TDH3p-xynA**) wurde geschlussfolgert, dass die höhere Plasmidstabilität wahrscheinlich auf die richtige Integration zurückzuführen ist (Abb. 3.25). Die Änderung des Integrationsortes durch die Klonierung des *CuHIS3*-Gens in den Expressionsvektor für die Gewährleistung der Integration durch homologe Rekombination in das *C. utilis*-Genom führte letztendlich zu einer fast 100 %-igen Plasmidstabilität auch ohne Zugabe von Nourseothricin in das Kulturmedium (Abb. 3.15). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass nur drei aus 20 untersuchten Transformanten des Stammes MKCu6 die richtige Integration im *CuHIS3*-Lokus aufwiesen. In den meisten Stämmen waren die Plasmide ektopisch im Genom integriert. Dieses ungleiche Verhältnis zwischen der Integration durch homologe und nicht-homologe Rekombination wurde bei allen in dieser Arbeit konstruierten Stämmen beobachtet. Der Grund für die Plasmidinstabilität nach der ektopischen Integration könnten eventuell "cross-over"-Vorgänge während der Rekombination sein, die dazu führen, dass das Plasmid im Laufe der Zellteilung verloren geht (Aguilera *et al.*, 2000). Im Fall, dass das Plasmid nicht in alle Allele integriert ist, kann bei der mitotischen Rekombination im homologen Bereich eines Wildtyp-Allels und des Integrationsortes durch cross-over das Plasmid verloren gehen. Eine andere Möglichkeit ist, dass wenn das Plasmid durch homologe Rekombination integriert wurde, das Plasmid wieder durch den gleichen Mechanismus durch die Bildung einer Schleife ("loop") aufgrund der homologen Sequenzen auf dem entsprechenden Chromosomen verloren geht. Die Triploidie von *C. utilis* und die Diploidie von *P. jadinii* scheinen bei beiden Organismen die Instabilität des Plasmids unabhängig vom Integrationsort in gleichem Maße zu begünstigen. Da jedoch die ektopische Integration eine höhere und effektivere *GFP*-Expression als

bei der richtigen Integration in den *CuHIS3*-Lokus gezeigt hatte, sind weitere Untersuchungen notwendig, um eine hohe, Nourseothricin-unabhängige Plasmidstabilität bei gleichzeitiger hoher Genexpression zu erreichen.

Im Zusammenhang mit der Ploidie wurde auch die Abschätzung der Kopiezahl in *C. utilis* dadurch erschwert, dass nicht bekannt ist, wie häufig ein Gen im *C. utilis*-Genom vorkommt. Die Triploidie von *C. utilis* DSM2361 bedeutet nicht gleichzeitig, dass ein Gen in drei Kopien vorliegt. Durch die wahrscheinlich ausgeprägte mitotische Rekombination, die auch eventuell für die Plasmidinstabilität verantwortlich ist, kann eine Genkopie auch auf einem Chromosom fehlen bzw. häufiger vorliegen (siehe 4.1.1). In den Stämmen MKCu17 (*TDH3p-xynA**) und MKCu6-9 (*TDH3p-GFP*, *CuHIS3*) konnte die richtige Integration in allen Allelen nachgewiesen werden (Abb. 3.14, Abb. 3.24), was auch das Ergebnis der qPCR zeigte, da die Verhältnisse der Plasmidgene zu den chromosomalen Genen nahezu gleich sind (Tab. 3.9). Deshalb kann bei diesen Stämmen davon ausgegangen werden, dass das Plasmidgen in der gleichen Kopiezahl vorliegt wie das chromosomale Gen. Anders verhielt es sich mit dem Stamm MKCu6-3, bei welchem eine einfache Integration des Expressionsplasmids pMC2 (*TDH3p-GFP*) in den *CuHIS3*-Lokus im *C. utilis*-Genom gezeigt wurde (Abb. 3.11). Da die Verhältnisse der Plasmidgene zu den Referenzgenen bis zu 50 % kleiner sind, kann in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass das Plasmidgen seltener als die Allele des Gens im Genom vorhanden ist (Tab. 3.9). Dieses Ergebnis stimmt mit dem Ergebnis des Southern-Blots überein, da das vollständige Wildtyp-Allel des *CuHIS3*-Gens ohne Integration in MKCu6-3 zu erkennen war (Abb. 3.11). Berücksichtigt man, dass *C. utilis* triploid ist, kann vermutet werden, dass das Plasmid in ein bzw. zwei Allele integriert ist. Aufgrund der vorliegenden Triploidie und der Möglichkeit, dass die chromosomalen Referenzgene in höherer Kopiezahl vorliegen, kann jedoch nicht darauf geschlossen werden, in wie vielen Allelen das Plasmid integriert wurde.

4.3 Regulation des *GXS1*-Promotors in *C. utilis*

Für die Verwendung eines Xylose-induzierbaren Promotors zur heterologen Expression in *C. utilis* wurde die Expression der beim Xylose-Abbau beteiligten Gene *XYL1*, *XDH1*, *XKS1*, *GXS1* und *GXF1* untersucht (Abb. 1.4). Zwei Gene, *GXS1* und *XDH1*, wurden identifiziert, die in Xylose exprimiert und in Glukose reprimiert werden (vgl. Abb. 3.5). Für das Expressionssystem wurde der Promotor des *GXS1*-Gens, welches für den Glukose/Xylose- H^+ -Symporter kodiert (Leandro *et al.*, 2006), gewählt, da dieser eine höhere Effizienz bei der heterologen *GFP*-Expression zeigte (Abb. 3.17). Die Induktion der Genexpression ist besonders von Bedeutung, wenn das synthetisierte Produkt toxisch und wachstumshemmend auf die Zellen wirkt (Saida *et al.*, 2006). Um die Genexpression besser kontrollieren zu können, wird bei einem regulierten Expressionssystem erst nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte bzw. Wachstumsphase die Genexpression durch Zugabe eines Induktors gestartet. Ein bekanntes Beispiel ist hierfür der *AOX1*-Promotor in *P. pastoris*, welcher durch die Zugabe von Methanol aktiviert wird (Eom *et al.*, 2013). Zur Untersuchung der Induzierbarkeit des *GXS1*-Promotors durch Xylose wurde die Kultivierung in verschiedenen Medien mit Glukose und/oder Xylose anhand des Reportergens *GFP* durchgeführt. Dabei wurde die Glukose-basierte Repression erkennbar, da in der Kultur nur mit Glukose als Kohlenstoffquelle zu keinem Zeitpunkt der

Kultivierung GFP-Fluoreszenz messbar war. Auch in Autoinduktionsmedium, welches Glukose und Xylose enthielt, wirkte die Gegenwart von Glukose reprimierend auf die Aktivität des *GXS1*-Promotors und die *GFP*-Fluoreszenz stieg erst an, nachdem die Glukose vollständig verstoffwechselt worden war. Tamakawa *et al.* (2013b) diskutierten, dass bei der Verwertung von Glukose und Xylose verschiedene Gene verstärkt exprimiert werden. Diese Umstellung läuft ab, wenn Glukose verbraucht ist. Wurde zu diesem Zeitpunkt die Xylose in das Medium zugegeben, verhielt sich *C. utilis* vergleichbar wie in dem Medium, das nur Xylose als Kohlenstoffquelle enthielt. Ändert sich das Substrat, führt dies zu einem Ungleichgewicht von Transkription und Abbau der mRNA (Garcia-Martinez *et al.*, 2004). Bereits Leandro *et al.* (2006) hatten gezeigt, dass die Genexpression von *GXS1* aus *Candida intermedia* in Glukose reprimiert wird. Bei weiteren Untersuchungen wurde zusätzlich eine *GXS1*-mRNA-Instabilität aufgrund der im Medium vorhandenen Glukose festgestellt (Leandro *et al.*, 2008). Auch Meinander und Hahn-Hägerdal (1997) vermuteten, dass bei der Glukose- und Xylose-Aufnahme die gleichen Komponenten eine Rolle spielen. Hexose-Transporter, die in *S. cerevisiae* (Hxt1-17, Gal2, Snf3, Rgt2) oder in *P. stipitis* (Sut1-3) identifiziert wurden (Diderich *et al.*, 1999; Weierstall *et al.*, 1999), transportieren Glukose und Xylose, wobei die Affinität zu Glukose höher ist (van Zyl *et al.*, 1993). Dadurch wird der Xylose-Transport in die Zelle durch die Gegenwart von Glukose im Medium limitiert (van Zyl *et al.*, 1993). In *C. utilis* wurden 31 mögliche Transporter identifiziert, von denen nur zwei Hexose-Transporter sind, CuHXT6 und CuHXT10 (Tomita *et al.*, 2012). Andere Xylose-verwertende Hefearten besitzen zwei Xylose-Transportsysteme, eins mit niedriger Affinität, welches Glukose und Xylose transportiert, und eins mit hoher Affinität, was Xylose-spezifisch ist (Jeffries und Jin, 2004). Somit ist es denkbar, dass auch *C. utilis* zwei Transportsysteme für die Xylose-Aufnahme besitzt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der *GXS1*-Promotoraktivität zeigen, dass eine Autoinduktion der Genexpression durch den Beginn der Xylose-Verwertung in einem Medium, welches sowohl Glukose als auch Xylose enthält, möglich ist. Eine Induktion der Genexpression durch eine Xylosezugabe in Abwesenheit von Glukose scheint jedoch um ein Vielfaches effektiver zu sein.

4.4 Sekretion von CalB in *C. utilis* und *P. jadinii*

In dieser Arbeit wurde ein Expressionssystem mit dem Xylose-induzierbaren Promotor *GXS1p* entwickelt, welches die *C. antarctica* Lipase CalB in das Medium sekretieren sollte. Durch die Untersuchung auf Tributyrin-haltigen Agarplatten mit Xylose konnte die Expression und Sekretion der Lipase in *C. utilis* und *P. jadinii* nachgewiesen werden (Abb. 3.19, Abb. 3.36). Im Vergleich dazu wurde auf den Kontrollplatten mit Glukose keine Lipaseaktivität beobachtet. Ein wichtiger Punkt war jedoch das Verhältnis zwischen der Lipasemenge in und außerhalb der Zelle. Auf den Immunoblots (Abb. 3.20, Abb. 3.37) wurden deshalb die gleiche Menge an Medium wie auch die der entsprechenden Menge an Zellen untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass wesentlich mehr Lipase in den Rohextrakten vorhanden war. Auch die Lipaseaktivität in der Zelle war höher als die im Medium (Abb. 3.21, Abb. 3.38), was bedeuten könnte, dass die intrazelluläre Lipase aktiv vorliegt. Die Lipase besitzt eine *N*-Glykosylierungsstelle an der 99. Position in der Aminosäuresequenz (N-D-T) und am C-terminalen Ende der Prosequenz eine Kex2-Protease-Erkennungssequenz. Die *N*-Glykosylierung

wurde durch die Behandlung mit PNGase F, was zur Entfernung der Glykosylierungskette führte, durch eine Verschiebung des CalB-Signals im Immunoblot gezeigt (Bürth, 2013). Da aber die *N*-Glykosylierung zu einer Erhöhung der Molekularmasse um lediglich 3-5 kDa und zu einer klar-definierten Bande im Immunoblot führte (Abb. 3.20), wurde vermutet, dass CalB „Kern“-glykosyliert ist. Dabei erfolgt das Anhängen des Zuckerbaums, bestehend aus zwei GlcNAc-Resten (*N*-Acetylglucosamin), neun Mannosen und drei Glukosen verbunden mit der Amidgruppe eines Asparagins, kotranslational im ER-Lumen (Endoplasmatisches Retikulum) (Weerapana und Imperiali, 2006). Die korrekte Prozessierung durch die Kex2-Protease war aufgrund der Bande bei 41 kDa im Immunoblot anzunehmen (Abb. 3.20), da das Signalpeptid zusammen mit dem Propeptid eine molekulare Masse von ca. 2,5 kDa besitzt. Aus der *N*-Glykosylierung kann gefolgert werden, dass die Lipase den Sekretionsweg durch das ER passiert hatte. Der Grund für die höhere Lipasemenge in den Rohextrakten liegt vermutlich daran, dass die sekretierte Lipase mit der Zellmembran oder Zellwand assoziiert vorliegt. Bei der Zellfraktionierung wurde in der Fraktion mit den Zelltrümmern die höchste Lipasemenge im Immunoblot detektiert (Bürth, 2013). Ein weiterer möglicher Grund hätte die Signalsequenz aus *C. antarctica* sein können, jedoch führte ein Austausch der Signalsequenz mit der der Invertase aus *C. utilis* oder der Mfa1-Präpro-Sequenz von *S. cerevisiae* zu keiner Erhöhung der extrazellulären Proteinmenge in *C. utilis* (Bürth, 2013). Möglicherweise ist *P. jadinii* wegen der größeren Höfe auf den Tributyrinplatten ein besserer Produzent der CalB. Obwohl CalB nicht in das Medium gelangt, kann das zellgebundene CalB das Tributyrin-Substrat effektiv hydrolysieren. Durch die zunehmende Permeabilität der Zellwand während der stationären Phase diffundiert vermutlich das Tributyrin durch die Zellwand und wird von der Lipase abgebaut, was die Klärung auf den Tributyrinplatten erklären würde. Das Ersetzen des *ADH1*-Terminators aus *C. albicans* stromabwärts der *CALB*-Sequenz durch einen *C. utilis*- bzw. *P. jadinii*-Terminator sowie die Verwendung eines *P. jadinii*-Promotors in *P. jadinii* könnte die heterologe Expression von *CALB* in *C. utilis* und *P. jadinii* möglicherweise verbessern. Trotzdem konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass das für *C. utilis* entwickelte Expressionssystem auch in *P. jadinii* funktionell ist. Für die Optimierung der Expressionssysteme zur extrazellulären Sekretion von CalB sind jedoch weitere Arbeiten notwendig, die durch die nachgewiesene nahe Verwandtschaft sowohl für *C. utilis* als auch für *P. jadinii* durchzuführen sind.

4.5 Verwertung von Xylan durch *C. utilis*

Xylane gehören zu den Hemicellulosen, die das am zweithäufigsten vorhandene Polysaccharid in der Natur darstellen. Hemicellulose ist Hauptbestandteil in der Zellwand von Pflanzen und Hartholz und besteht aus Monosacchariden wie z. B. D-Xylose, D-Mannose, D-Glukose, D-Galaktose und D-Arabinose, die in unterschiedlichen Mengenverhältnissen vorliegen können (Polizeli *et al.*, 2005; Wakiyama *et al.*, 2008). Das Rückgrat von Xylan ist aus D-Xylopyranosiden aufgebaut, die über β -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verbunden sind (Abb. 4.1; Shallom und Shoham, 2003). Die Hydrolyse dieser Bindungen durch die Endo-1,4- β -Xylanase (EC 3.2.1.8) führt zu kurzkettingen Xylooligosacchariden, die aus einer unterschiedlicher Anzahl an D-Xylose-Einheiten bestehen (Wakiyama *et al.*, 2008).

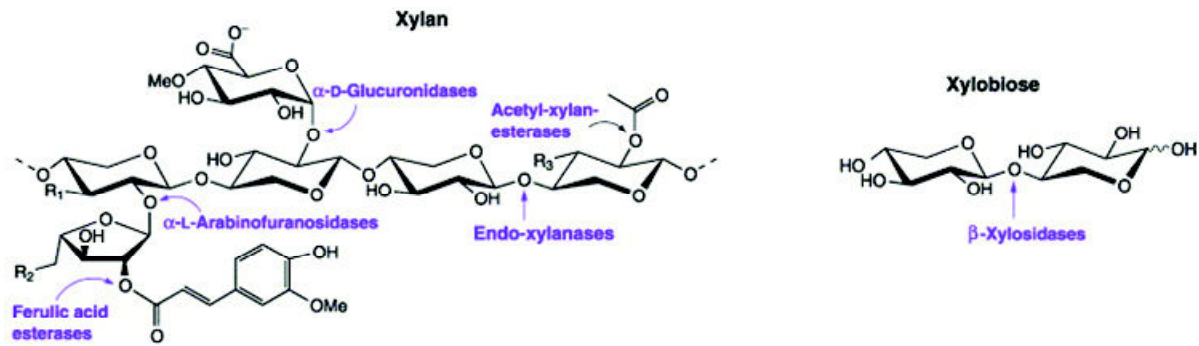


Abb. 4.1: Aufbau von Xylan und Xylobiose. Xylan enthält ein Rückgrat aus β -1,4-verknüpften D-Xylopyranosiden. Diese Verknüpfungen werden durch die Endo-Xylanase gespalten, so dass kurzkettenige Xylooligosaccharide entstehen. Xylobiose besteht aus zwei D-Xylose-Einheiten und wird durch die β -Xylosidase hydrolysiert (Shallom und Shoham, 2003).

Wie in Abb. 4.1 gezeigt, werden die β -1,4-glykosidischen Bindungen von kurzkettenigen Xylooligosacchariden von den Endo-1,4- β -Xylosidasen (EC 3.2.1.37) in D-Xylose gespalten. Aus der Pentose D-Xylose entsteht in mehreren Schritten Xylulose-5-phosphat, welches dann zusammen mit dem Ribose-5-phosphat mit Hilfe der Transketolase zum einen als Glycerinaldehyd-3-phosphat in der Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt wird und zum anderen als Seduheptulose-7-phosphat in den Calvin-Zyklus gelangt (Abb. 1.4; Wohlbach *et al.*, 2011). Bei der Entstehung von Xylulose-5-phosphat aus Xylose wird zunächst Xylose durch die Xylosereduktase *XYL1* zu Xylitol reduziert, welches dann durch die Xylitoldehydrogenase *XDH1* zu Xylulose oxidiert wird. Im letzten Schritt wird die Xylulose mit Hilfe der Xylulosekinase *XKS1* zu Xylulose-5-phosphat phosphoryliert.

Die Verwertung von Xylan und damit auch der Xylose ist in den letzten Jahren zunehmend erforscht worden. Diese erneuerbaren Rohstoffe werden gezielt für die Herstellung von Ethanol und damit auch von Biobrennstoffen eingesetzt (Kim *et al.*, 2013; Wohlbach *et al.*, 2011). Verwendet werden dafür unter anderem verschiedene Pilze, die entweder durch homologe Genexpression wie z. B. in *P. stipitis* oder durch heterologe Genexpression wie z. B. in *S. cerevisiae* Xylan und Xylose als Kohlenstoffquelle nutzen können (Wohlbach *et al.*, 2011). Während *S. cerevisiae* keine Xylose verwerten kann, produziert *C. utilis* kein Ethanol aus Xylose, so dass beide im Gegensatz zu *P. stipitis*, der Ethanol aus Xylose herstellen kann, zusätzliche Expressionssysteme benötigen. Wie bereits beschrieben, konnte in *C. utilis* durch zusätzliche heterologe Genexpression Ethanol aus Xylose hergestellt werden (siehe 1.2.2.1) (Tamakawa *et al.*, 2011). Trotz der heterologen Expression einer Xylanase aus *S. olivaceoviridis*, wurde diese nur intrazellulär exprimiert (siehe 1.2.2.1) (Wei *et al.*, 2010), so dass bisher keine Sekretion einer heterolog exprimierten Xylanase in *C. utilis* beschrieben wurde.

Tamakawa *et al.* (2013b) führten Untersuchungen des Metabolismus und des Transkriptom des *C. utilis*-Wildtyp-Stammes NRBC0988 während des Wachstums in Glukose bzw. in Xylose durch. Dabei wurden die intrazellulären Metabolite und Genexpressionen mittels Massenspektrometer und Microarray analysiert. Interessanterweise wurde eine Ethanol-Konzentration von 19,6 g/l nach vollständiger Verwertung der im YPD-Medium enthaltenen Glukose (50 % (w/v)) nach 24 h gemessen, welches *C. utilis* anschließend als neues Substrat weiter verwertete. Im Gegensatz dazu

wurde keine Ethanol-Bildung beim Wachstum von *C. utilis* in YPX-Medium (50 % (w/v) Xylose) beobachtet. Während keine signifikanten Unterschiede in den gebildeten Metaboliten zwischen Glukose- und Xylose-Verwertung festgestellt werden konnten, wurden in Xylose-haltigen Medium erhöhte Genexpressionen im Pentosephosphatweg, in der Glukoneogenese und im Citratzyklus beobachtet. Dagegen wurden für die Expression der Gene *ADH1* (für Alkoholdehydrogenase) und *PDC1* (für Pyruvatdecarboxylase), die bei der Ethanol-Bildung beteiligt sind, keine Veränderungen in den untersuchten Kohlenstoffquellen gemessen. Die Genexpression von *ADH2*, welches Ethanol oxidiert, war jedoch beim Wachstum in Xylose deutlich erhöht, was wiederum zu einer Zunahme in der NADH-Produktion im Cytoplasma führte. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte aus ihren Untersuchungen, dass der Xylose-Stoffwechselweg in *C. utilis* oxidativ verläuft (Tamakawa *et al.*, 2013b).

Obwohl in dieser Arbeit nur die Eingrenzung der optimalen Temperatur für die höchste Xylanaseaktivität auf einen Bereich von 70 bis 85 °C möglich war (vgl. Abb. 3.28), ist diese hohe Temperatur nicht ungewöhnlich, denn viele Xylanasen, die in Hefen exprimiert werden, haben eine optimale Temperatur von über 50 °C (Harris und Ramalingam, 2010). Die teilweise breiten Temperaturbereiche, in dem die Xylanase aktiv ist, führen dazu, dass die Xylanase in vielen unterschiedlichen Industriezweigen genutzt werden kann. In der Papierindustrie wird die Xylanase unter anderem mit weiteren Enzymen als nicht-chemische Alternative dazu verwendet, um die Menge an Ligninreste und ihre Derivate zu reduzieren, was in der Helligkeit des Papiers erkennbar wird (Subramaniyan und Prema, 2002). Eine weitere Anwendung ist die Herstellung von Biokraftstoffen wie Ethanol aus Xylan und die Nutzung von erneuerbaren Rohstoffen (Dodd und Cann, 2009) mit Hilfe rekombinanter Mikroorganismen. Da der Abbau von Rohstoffen wie z. B. der Lignocellulose, welche aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin besteht, verschiedene Enzyme wie Cellulasen und Glukosidasen erfordert, werden an geeigneten Expressionssystemen in verschiedenen Mikroorganismen gearbeitet (Weber *et al.*, 2010). Neben bakteriellen Systemen wie in *E. coli* und *Zymomonas mobilis*, werden auch in Hefen wie *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* und *P. stipitis* unterschiedliche Strategien verfolgt, um Biokraftstoffe aus Lignocellulose herzustellen (Weber *et al.*, 2010). Da *S. cerevisiae* nicht in der Lage ist, Pentosen wie Xylose zu verwerten, wurden einzelne Gene für die Xylose-Verwertung heterolog exprimiert (Kötter und Ciriacy, 1993; van Maris *et al.*, 2007). Dabei war die Xylose-Verwertung durch den unterschiedlichen Cofaktorgebrauch der Xylosereduktase (NADPH) und Xylitoldehydrogenase (NAD⁺) limitiert. Deshalb wurde z. B. eine Transhydrogenase aus *Azotobacter vinelandii* in *S. cerevisiae* heterolog exprimiert, welche NADH zu NADPH umwandelt (Nissen *et al.*, 2001). Durch weitere Veränderung konnte die Xylose-Verwertung in *S. cerevisiae* verbessert werden, allerdings wurde der Abbau von Lignocellulose durch Inhibitoren wie die Lignin-Abbau-Produkte Essigsäure und Furfural, ein heterocyclischer Aldehyd, limitiert (Weber *et al.*, 2010). Deshalb war es notwendig, *S. cerevisiae* tolerant gegenüber diesen Inhibitoren zu machen (Lee *et al.*, 2011). In neueren Arbeiten wurde ein industrieller *S. cerevisiae*-Stamm entwickelt, der eine gute Xylose-Verwertung und gleichzeitig eine hohe Inhibitor-Toleranz während des Wachstums in Lignocellulose-haltigen Medien aufzeigte (Demeke *et al.*, 2013). Dabei wurde im *S. cerevisiae*-Stamm Ethanol Red, welcher in der industriellen Bioethanol-Produktion eingesetzt wird, 13 Gene heterolog exprimiert, die für die Xylose-Isomerase aus *Clostridium phytofermentans*, die für die Isomerisierung von Xylose zu Xylulose verantwortlich ist (vgl. Abb. 1.4), und Enzyme im Pentosephosphatweg kodieren. Die 17-fach erhöhte Xylose-Isomerase-Aktivität und die verbesserte

Xylose-Aufnahme in die Zelle ergab eine Ethanol-Konzentration von 20,3 g/l. Die wachstumshemmende Wirkung von Inhibitoren beim Lignocellulose-Abbau stellt ein häufiges Problem bei der Bioethanol-Produktion dar (Weber *et al.*, 2010). So werden verstärkt verschiedene Strategien verfolgt, um mit der mikrobiellen Produktion von Bioethanol aus erneuerbaren Rohstoffen eine Alternative zu der Herstellung basierend auf fossilen Ressourcen zu schaffen (Weber *et al.*, 2010). Einfacher gestaltete sich die Lignocellulose-Verwertung durch *P. stipitis*. *P. stipitis* besitzt die Fähigkeit Xylose zu verwerten und hat eine Xylosereduktase, die NADPH und NADH nutzen kann (Verduyn *et al.*, 1985). Durch die Verschiebung der Cofaktorspezifität der Xylosereduktase zu NADH, konnte der Cofaktorgebrauch angepasst werden (Zeng *et al.*, 2009). *P. stipitis* besitzt ein großes Potenzial für die Nutzung von Lignocellulose als Substrat, jedoch sind weitere Arbeiten z. B. die Ethanol-Produktion unter aeroben Bedingungen notwendig, um dieses Ziel zu erreichen (Weber *et al.*, 2010). Betrachtet man im Vergleich zu den beschriebenen Hefen *C. utilis* als potentiellen Wirtsorganismus für die Biokraftstoffherstellung aus Lignocellulose, ist auch hier durch den unterschiedlichen Cofaktorgebrauch, die Ethanolbildung aus Xylose problematisch. Tamakawa *et al.* (2011) zeigten bereits, dass durch die heterologe Expression der Gene für die Xylosereduktase und die Xylitoldehydrogenase aus *C. shehatae* in *C. utilis* zu einer Ethanol-Produktion aus Xylose führt. Da jedoch *C. utilis* ebenfalls Ethanol verwerten kann, ist es notwendig, die Reaktion von Ethanol zu Acetaldehyd durch die Alkoholdehydrogenase, für die das *ADH2*-Gen in *C. utilis* verantwortlich ist, zu verhindern.

Ein Ziel dieser Arbeit war die heterologe Expression einer Xylanase in *C. utilis*, damit *C. utilis* die Hauptkomponente von Hemicellulose, Xylan, als Kohlenstoffquelle nutzen kann. Nach der erfolgreichen Konstruktion eines Expressionssystems zur heterologen Proteinproduktion in *C. utilis* wurde das für *P. jadinii* kodonoptimierte Xylanase-Gen aus *P. simplicissimum* unter der Kontrolle des *CuTDH3*-Promotors exprimiert und das Protein extrazellulär sekretiert (siehe 3.2.5). Vergleicht man diese Sekretionsergebnisse mit denen der Lipase aus *C. antarctica*, können Limitierungen im Sekretionsweg von *C. utilis* ausgeschlossen werden, da die Xylanase sehr effektiv sekretiert wurde. Die Fähigkeit zur Verwertung von Xylan wurde durch das Wachstum des rekombinanten Stammes MKCu17 in Xylan-haltigen Medien überprüft (Abb. 3.29). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Xylanase-exprimierende Stamm in Minimalmedium (SM) wachsen kann, der nur Xylan als hauptsächliche Kohlenstoffquelle enthält (Abb. 3.29). Die Zugabe einer geringen Konzentration Glukose bzw. Xylose zu Beginn des Wachstums konnte zu einer Verbesserung der Xylan-Verwertung beitragen, so dass diese Kulturen höhere Zelldichten erreichten als die ohne Xylose oder Glukose im Medium (Abb. 3.29). Wahrscheinlich wurden diese zusätzlichen Kohlenstoffquellen zuerst von *C. utilis* verstoffwechselt, um eine höhere Zelldichte und eine höhere Xylanase-Konzentration im Medium zu erreichen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die heterologe Expression einer Xylanase *C. utilis* Xylan als Kohlenstoffquelle nutzen kann. Zur Optimierung sind jedoch weitere Arbeiten notwendig, die durch die vorliegenden Genomsequenzen erheblich vereinfacht werden. Es ergeben sich somit für die in dieser Arbeit entwickelten Expressionssysteme in *C. utilis* verschiedene Anwendungsmöglichkeiten. Neben der Xylan- bzw. Xylose-Verwertung für die Herstellung von z. B. Biokraftstoffen, intra- oder extrazellulärer Proteine, besteht die Möglichkeit *C. utilis* als Futterhefe zu verwenden. Dadurch, dass *C. utilis* den GRAS-Status besitzt, kann *C. utilis* z. B. an Tiere verfüttert werden, so dass heterolog exprimierte Proteine immunologisch wirken könnten. Dabei wird durch die breite pH-Toleranz in *C. utilis* die Überlebensfähigkeit z. B. im Magen begünstigt.

5 Zusammenfassung

Die Futterhefe *Candida utilis* verwertet ein breites Spektrum kostengünstiger Substrate einschließlich der Pentose Xylose und wächst damit über einen weiten pH-Bereich zu hohen Zelldichten. Ziel dieser Arbeit war es, *C. utilis* als sicheren Wirtsorganismus für die Produktion heterologer Proteine zu optimieren und neue Expressionsvektoren zu etablieren.

Es konnte festgestellt werden, dass eine Expressionskassette für das bakterielle *sat1*-Gen unter transkriptioneller Kontrolle des *ACT1*-Promotors aus *Candida albicans* auch in *C. utilis* funktionell ist und die Selektion von Transformanten in Gegenwart von Nourseothricin erlaubt. Verschiedene *C. utilis*-Promotoren wurden an das *GFP*-Reportergen fusioniert und in Expressionsvektoren eingebaut. Die Fluoreszenz von Transformanten mit chromosomal integrierten Expressionsplasmiden wurde verglichen. Der Promotor des *TDH3*-Gens für Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase stellte sich als besonders geeignet für die konstitutive Genexpression heraus. Um eine geregelte Genexpression zu erreichen, wurden einige durch Xylose transkriptionell-regulierte Gene identifiziert und ihre Promotoren wurden in *GFP*-Fusionen getestet. Dabei erwies sich der Promotor des *GXS1*-Gens für einen Glukose/Xylose-Symporter als stark Xylose-induzierbar, während er durch Glukose reprimiert wurde. Beide Promotortypen führten auch zu einer effektiven und geregelten Sekretion der Lipase B aus *Candida antarctica* (CaLB). Die neuen Expressionsvektoren waren in vier Hefearten funktionell, da sie außer in *C. utilis* auch in der vermuteten teleomorphen (sexuellen) Form *Pichia jadinii*, der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und dem pathogenen Pilz *C. albicans* die heterologe Genexpression vermittelten.

Für die Entwicklung eines integrativen Transformationssystems ist die Kenntnis der Genomplidie des Wirtsorganismus bedeutend. Daher wurde durch Quantifizierung der nukleären DNA die Ploidie von *C. utilis* und *P. jadinii* im Vergleich zu *S. cerevisiae*-Stämmen mit bekannter Ploidie bestimmt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *C. utilis* ein triploides und *P. jadinii* ein diploides Genom enthält. Überraschenderweise verlief die chromosomale Integration von Expressionsplasmiden in *C. utilis* vorzugsweise nicht über homologe Rekombination, sondern ektopisch, an unbekannter Stelle im Genom. Außerdem wurde ein häufiger Verlust der Expressionsplasmide bei nicht-selektivem Wachstum beobachtet. Bei der homologen Integration im *HIS3*-Lokus wurde eine Verbesserung der genomischen Stabilität der integrierten Expressionsplasmide festgestellt.

Xylan ist als Polymer der Xylose eine reichlich verfügbare und kostengünstige Kohlenstoffquelle. Um die Xylan-Verwertung zu erreichen, wurde die Xylanase *xynA* aus *Penicillium simplicissimum* heterolog in *C. utilis* exprimiert. Hierfür wurde die Präpro-Sequenz des α -Faktor-Vorläuferproteins M α 1 aus *S. cerevisiae* an das *xynA*-Gen fusioniert und in die *sat1*-Expressionsvektoren unter Kontrolle des *TDH3*-Promoters eingebaut. Transformanten mit chromosomal im *TDH3*-Genlokus integrierten Expressionsplasmiden zeigten die effektive Sekretion von korrekt prozessierter und enzymatisch aktiver Xylanase in das Kulturmedium. Von entscheidender Bedeutung war, dass die heterologe *xynA*-Expression das Wachstum von Transformanten mit Xylan als Kohlenstoffquelle erlaubte. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse das große Potenzial von *C. utilis* als effektiver Wirtsorganismus für die Produktion heterologer Proteine.

6 Summary

The fodder yeast *Candida utilis* assimilates a wide range of cost-efficient substrates including the pentose xylose and grows over a broad pH-scale to high cell densities. The aim of this dissertation was to optimize *C. utilis* as a safe host organism for the production of heterologous proteins and to establish new expression vectors.

It was discovered that an expression cassette for the bacterial *sat1* gene under the transcriptional control of the *ACT1* promoter of *Candida albicans* is also functional in *C. utilis* and allows the selection of transformants in the presence of nourseothricin. Different *C. utilis* promoters were fused to the *GFP* reporter gene and inserted into expression vectors. Fluorescence of the transformants containing chromosomally integrated expression plasmids was compared. The promoter of the *TDH3* gene encoding glycerinaldehyd-3-phosphate dehydrogenase was especially effective to drive constitutive gene expression. To achieve regulated gene expression several genes regulated transcriptionally by xylose were identified and their promoters were tested in *GFP* fusions. In particular, the promoter of the *GXS1* gene encoding a glycoxylose symporter was highly inducible by xylose, while it was repressed by glucose. Both promoter types also led to an effective and regulated secretion of lipase B from *Candida antarctica* (CalB). The new expression vectors were functional in four yeast species since they mediated heterologous gene expression not only in *C. utilis* but also in its assumed teleomorphic (sexual) form *Pichia jadinii*, baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the pathogenic fungus *C. albicans*.

For the development of an integrative transformation system, knowledge of the genome ploidy of the host organism is important. Therefore, by quantification of the nuclear DNA, the ploidy of *C. utilis* and *P. jadinii* was determined by comparisons to *S. cerevisiae* strains with known ploidies. The results strongly suggest that *C. utilis* contains a triploid and *P. jadinii* a diploid genome. Surprisingly, chromosomal integration of expression plasmids occurred mostly not by homologous recombination but ectopically at unknown positions in the genome. Furthermore, frequent loss of expression plasmids was observed under non-selective growth. Homologous integration into the *HIS3* locus was found to improve genomic stability of the integrated expression plasmids.

Xylan is as a polymer of xylose, a highly available and cost-effective carbon source. To achieve xylan assimilation the xylanase *xynA* from *Penicillium simplicissimum* was heterologously expressed in *C. utilis*. For this purpose the prepro sequence of α factor precursor Mfa1 from *S. cerevisiae* was fused to the *xynA* gene and was inserted into the *sat1* expression vectors under the control of the *TDH3* promoter. Transformants containing expression plasmids chromosomally integrated in the *TDH3* locus showed effective secretion of correctly processed and enzymatically active xylanase into the culture medium. Importantly, heterologous *xynA* expression allowed the growth of transformants with xylan as the carbon source. In summary, the results demonstrate the great potential of *C. utilis* as an effective host organism for the production of heterologous proteins.

7 Literaturverzeichnis

- Aguilera A, Chavez S, Malagon F (2000) Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence. *Yeast* **16**: 731-754
- Aker KC, Robinson CW (1987) Growth of *Candida utilis* on single- and multicomponent-sugar substrates and on waste banana pulp liquors for single-cell protein production. *MIRCEN J Appl Microbiol Biotechnol* **3**: 255-274
- Arpino JA, Rizkallah PJ, Jones DD (2012) Crystal structure of enhanced green fluorescent protein to 1.35 Å resolution reveals alternative conformations for Glu222. *PLoS One* **7**: e47132
- Barford JP, Hall RJ (1979) An Examination of the Crabtree Effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the Role of Respiratory Adaptation. *J Gen Microbiol* **114**: 267-275
- Basabe L, Dominguez I, Chávez FP (2004) Cloning and sequence analysis of the *Candida utilis* *HIS3* gene. *Biomol Eng* **21**: 15-20
- Bekatorou A, Psarianos C, Koutinas AA (2006) Production of Food Grade Yeasts. *Food Technol Biotechnol* **44**: 407-415
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Blank K, Morfill J, Gump H, Gaub HE (2006) Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **125**: 474-483
- Boer E, Steinborn G, Kunze G, Gellissen G (2007) Yeast expression platforms. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**: 513-523
- Bouchonville K, Forche A, Tang KE, Selmecki A, Berman J (2009) Aneuploid chromosomes are highly unstable during DNA transformation of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1554-1566
- Boze H, Moulin G, Galzy P (1992) Production of food and fodder yeasts. *Crit Rev Biotechnol* **12**: 65-86
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brinkrolf K, Bürth C, Ernst JF, Goesmann A, Jäger KE, Jaenicke S, Kunigo M, Pühler A, Rupp O, Schneider J (2013) The genome sequence of *Pichia jadinii*. *In Vorbereitung*
- Buerth C, Heilmann CJ, Klis FM, de Koster CG, Ernst JF, Tielker D (2011) Growth-dependent secretome of *Candida utilis*. *Microbiology* **157**: 2493-2503
- Bürth C (2013) Heterologe Proteinsekretion in *Candida utilis*. *Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**: 611-622
- Buzas Z, Dallmann K, Szajani B (1989) Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol Bioeng* **34**: 882-884

- Cannon RD, Jenkinson HF, Shepherd MG (1990) Isolation and nucleotide sequence of an autonomously replicating sequence (ARS) element functional in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **221**: 210-218
- Celik E, Calik P (2012) Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv* **30**: 1108-1118
- Chaudhari N, Pereira E, Roper SD (2009) Taste receptors for umami: the case for multiple receptors. *Am J Clin Nutr* **90**: 738S-742S
- Chavez FP, Pons T, Delgado JM, Rodriguez L (1998) Cloning and sequence analysis of the gene encoding invertase (*INV1*) from the yeast *Candida utilis*. *Yeast* **14**: 1223-1232
- Cinell RA, Ferrari A, Pellegrini V, Tyagi M, Giacca M, Beltram F (2000) The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: local fluorescence study at the single-molecule level. *Photochem Photobiol* **71**: 771-776
- Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb Cell Fact* **5**: 17
- Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* **11**: 905-910
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**: 448-455
- Davies J, Jimenez A (1980) A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am J Trop Med Hyg* **29**: 1089-1092
- Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* **27**: 297-306
- Demeke MM, Dietz H, Li Y, Foulquie-Moreno MR, Mutturi S, Deprez S, Den Abt T, Bonini BM, Liden G, Dumortier F, Verplaetse A, Boles E, Thevelein JM (2013) Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol Biofuels* **6**: 89
- Diderich JA, Schepper M, van Hoek P, Luttik MA, van Dijken JP, Pronk JT, Klaassen P, Boelens HF, de Mattos MJ, van Dam K, Kruckeberg AL (1999) Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 15350-15359
- Dodd D, Cann IK (2009) Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Glob Change Biol Bioenergy* **1**: 2-17
- Drepper T, Eggert T, Circolone F, Heck A, Krauss U, Guterl JK, Wendorff M, Losi A, Gartner W, Jaeger KE (2007) Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol* **25**: 443-445
- Eom GT, Lee SH, Song BK, Chung KW, Kim YW, Song JK (2013) High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* **116**: 165-170
- Fonzi WA, Irwin MY (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728
- Foster TJ (1983) Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol Rev* **47**: 361-409

- Garcia-Martinez J, Aranda A, Perez-Ortin JE (2004) Genomic run-on evaluates transcription rates for all yeast genes and identifies gene regulatory mechanisms. *Mol Cell* **15**: 303-313
- Georgiou G, Segatori L (2005) Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 538-545
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**: 355-360
- Gold D, Mohagheghi A, Cooney CL, Wang DIC (1981) Single-Cell Protein Production from Spent Sulfite Liquor Utilizing Cell-Recycle and Computer Monitoring. *Biotechnol Bioeng* **23**: 2105-2116
- Gonzalez T, Eng F, Fraga R, Fonseca J, Amores I (2013) The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter of the food yeast *Candida utilis* strain NRRL Y-660 is functional in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Appl Genet*: published online
- Gritz L, Davies J (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **25**: 179-188
- Gronenborn AM, Clore GM, Hobbs L, Jeffery J (1984) Glucose-6-phosphate dehydrogenase. A transferred nuclear Overhauser enhancement study of NADP⁺ conformations in enzyme-coenzyme binary complexes. *Eur J Biochem* **145**: 365-371
- Guengerich L, Kang HA, Behle B, Gellissen G, Suckow M (2004) A Platform for Heterologous Gene Expression Based on the Methylothrophic Yeast *Hansenula polymorpha*. The Mycota II Genetics and Biotechnology, pp. 273-287.
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **22**: 346-353
- Hamasawa K, Kobayashi Y, Harada S, Yoda K, Yamasaki M, Tamura G (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of the 3-isopropylmalate dehydrogenase gene of *Candida utilis*. *J Gen Microbiol* **133**: 1089-1097
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Harris AD, Ramalingam C (2010) Xylanases and its Application in Food Industry: A Review. *J Exp Sci* **1**: 1-11
- Harris EE, Hannan M, Marquardt RR, Bubl J (1948) Fermentation of Wood Hydrolyzates by *Torula utilis*. *Ind Eng Chem* **40**: 1216-1220
- Heim R, Prasher DC, Tsien RY (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12501-12504
- Helenius A, Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**: 2364-2369
- Hiller K, Grote A, Scheer M, Munch R, Jahn D (2004) PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res* **32**: W375-379
- Hockney RC (1994) Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **12**: 456-463

- Hong YR, Chen YL, Farh L, Yang WJ, Liao CH, Shiuan D (2006) Recombinant *Candida utilis* for the production of biotin. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**: 211-221
- Hsu WH, Magee PT, Magee BB, Reddy CA (1983) Construction of a new yeast cloning vector containing autonomous replication sequences from *Candida utilis*. *J Bacteriol* **154**: 1033-1039
- Ikushima S, Fujii T, Kobayashi O (2009b) Efficient gene disruption in the high-ploidy yeast *Candida utilis* using the Cre-*loxP* system. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 879-884
- Ikushima S, Fujii T, Kobayashi O, Yoshida S, Yoshida A (2009c) Genetic engineering of *Candida utilis* yeast for efficient production of L-lactic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 1818-1824
- Ikushima S, Minato T, Kondo K (2009a) Identification and application of novel autonomously replicating sequences (ARs) for promoter-cloning and co-transformation in *Candida utilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 152-159
- Jeffery J, Wood I, Macleod A, Jeffery R, Jornvall H (1989) Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Characterization of a reactive lysine residue in the *Pichia jadinii* enzyme reveals a limited structural variation in a functionally significant segment. *Biochem Biophys Res Commun* **160**: 1290-1295
- Jeffries TW, Jin YS (2004) Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**: 495-509
- Kane JF (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**: 494-500
- Kawaguchi Y, Honda H, Taniguchi-Morimura J, Iwasaki S (1989) The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature* **341**: 164-166
- Kim B, Du J, Eriksen DT, Zhao H (2013) Combinatorial design of a highly efficient xylose-utilizing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for the production of cellulosic biofuels. *Appl Environ Microbiol* **79**: 931-941
- Kobayashi H, Takahashi S, Shibata N, Miyauchi M, Ishida M, Sato J, Maeda K, Suzuki S (1994) Structural modification of cell wall mannans of *Candida albicans* serotype A strains grown in yeast extract-Sabouraud liquid medium under acidic conditions. *Infect Immun* **62**: 968-973
- Kondo K, Miura Y, Sone H, Kobayashi K, Iijima H (1997) High-level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida utilis*. *Nat Biotechnol* **15**: 453-457
- Kondo K, Saito T, Kajiwarra S, Takagi M, Misawa N (1995) A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *J Bacteriol* **177**: 7171-7177
- Kötter P, Ciriacy M (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**: 776-783
- Koyama Y, Ichikawa T, Nakano E (1996) Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the *Candida utilis* urate oxidase (uricase). *J Biochem* **120**: 969-973
- Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, Herwig C, Spadiut O, Glieder A (2012) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb Cell Fact* **11**: 22
- Krugel H, Fiedler G, Haupt I, Sarfert E, Simon H (1988) Analysis of the nourseothricin-resistance gene (*nat*) of *Streptomyces noursei*. *Gene* **62**: 209-217

- Krugel H, Fiedler G, Smith C, Baumberg S (1993) Sequence and transcriptional analysis of the nourseothricin acetyltransferase-encoding gene *nat1* from *Streptomyces noursei*. *Gene* **127**: 127-131
- Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T (2008) *Lindnera jadinii* (A. & R. Sartory, Weill & J. Meyer) Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers (2008), Vol. 1, The Yeasts: A Taxonomic Study.
- Kurtzman CP, Johnson CJ, Smiley MJ (1979) Determination of conspecificity of *Candida utilis* and *Hansenula jadinii* through DNA reassociation. *Mycologia* **11**: 844-847
- Lang-Hinrichs C, Berndorff D, Seefeldt C, Stahl U (1989) G418 resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of the neomycin resistance genes from *Tn5* and *Tn903**. *Appl Microbiol Biotechnol* **30**: 388-394
- Leandro MJ, Goncalves P, Spencer-Martins I (2006) Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. *Biochem J* **395**: 543-549
- Leandro MJ, Spencer-Martins I, Goncalves P (2008) The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xylose facilitator. *Microbiology* **154**: 1646-1655
- Leboul J, Davies J (1982) Enzymatic modification of hygromycin B in *Streptomyces hygrosopicus*. *J Antibiot* **35**: 527-528
- Lee H, Cho DH, Kim YH, Shin SJ, Kim SB, Han SO, Lee J, Kim SW, Park C (2011) Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* K35 to Lignocellulose-derived Inhibitory Compounds. *Biotechnol Bioprocess Eng* **16**: 755-760
- Leuker CE, Ernst JF (1994) Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (anticodon CAG) in the pathogen *Candida albicans*: in vivo evidence for non-standard decoding of CUG codons. *Mol Gen Genet* **245**: 212-217
- Li X, Ouyang J, Xu Y, Chen M, Song X, Yong Q, Yu S (2009) Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology. *Bioresour Technol* **100**: 3613-3617
- Lilie H, Schwarz E, Rudolph R (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* **9**: 497-501
- Liu X, Wen M, Li J, Zhai F, Ruan J, Zhang L, Li S (2011) High-yield expression, purification, characterization, and structure determination of tag-free *Candida utilis* uricase. *Appl Microbiol Biotechnol* **92**: 529-537
- Lubertozzi D, Keasling JD (2009) Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnol Adv* **27**: 53-75
- Manachini PL (1979) DNA sequence similarity, cell wall mannans and physiological characteristics in some strains of *Candida utilis*, *Hansenula jadinii* and *Hansenula petersonii*. *Antonie van Leeuwenhoek* **45**: 451-463
- Manivasakam P, Schiestl RH (1993) High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Nucleic Acids Res* **21**: 4414-4415
- Meinander NQ, Hahn-Hagerdal B (1997) Influence of cosubstrate concentration on xylose conversion by recombinant, XYL1-expressing *Saccharomyces cerevisiae*: a comparison of different sugars and ethanol as cosubstrates. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1959-1964

- Meinhardt F, Stahl U, Ebeling W (1989) Highly efficient expression of homologous and heterologous genes in *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* **30**: 343-350
- Miura Y, Kettoku M, Kato M, Kobayashi K, Kondo K (1999) High level production of thermostable alpha-amylase from *Sulfolobus solfataricus* in high-cell density culture of the food yeast *Candida utilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 129-134
- Miura Y, Kondo K, Saito T, Shimada H, Fraser PD, Misawa N (1998b) Production of the carotenoids lycopene, beta-carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1226-1229
- Miura Y, Kondo K, Shimada H, Saito T, Nakamura K, Misawa N (1998a) Production of lycopene by the food yeast, *Candida utilis* that does not naturally synthesize carotenoid. *Biotechnol Bioeng* **58**: 306-308
- Müller H, Ziegler B, Schweizer B (1993) UV/VIS-Spektroskopie in der Nukleinsäureanalytik. *Bio Tec* **4**: 25-29
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350
- Nasser MW, Pooja V, Abdin MZ, Jain SK (2003) Evaluation of Yeast as an Expression System. *Indian J Biotechnol* **2**: 477-493
- Nevalainen KM, Te'o VS, Bergquist PL (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends Biotechnol* **23**: 468-474
- Nissen TL, Anderlund M, Nielsen J, Villadsen J, Kielland-Brandt MC (2001) Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. *Yeast* **18**: 19-32
- Olofsson K, Runquist D, Hahn-Hagerdal B, Liden G (2011) A mutated xylose reductase increases bioethanol production more than a glucose/xylose facilitator in simultaneous fermentation and co-fermentation of wheat straw. *AMB Express* **1**: 4
- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**: 1392-1395
- Partow S, Siewers V, Bjorn S, Nielsen J, Maury J (2010) Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **27**: 955-964
- Pereira EO, Tsang A, McAllister TA, Menassa R (2013) The production and characterization of a new active lipase from *Acremonium alcalophilum* using a plant bioreactor. *Biotechnol Biofuels* **6**: 111
- Petsch D, Anspach FB (2000) Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol* **76**: 97-119
- Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 577-591
- Pronk JT (2002) Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2095-2100
- Reid BG, Flynn GC (1997) Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* **36**: 6786-6791
- Richards OW (1928) The Growth of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Bot* **62**: 271-283

- Riedel K, Kunze G (1997) Rapid physiological characterization of microorganisms by biosensor technique. *Microbiol Res* **152**: 233-237
- Rodriguez L, Chavez FP, Basabe L, Rivero T, Delgado JM (1998) Development of an integrative DNA transformation system for the yeast *Candida utilis*. *FEMS Microbiol Lett* **165**: 335-340
- Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**: 423-488
- Rotticci-Mulder JC, Gustavsson M, Holmquist M, Hult K, Martinelle M (2001) Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Protein Expr Purif* **21**: 386-392
- Sahdev S, Khattar SK, Saini KS (2008) Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem* **307**: 249-264
- Saida F, Uzan M, Odaert B, Bontems F (2006) Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. *Curr Protein Pept Sci* **7**: 47-56
- Sambrook J, Fritsch EF; Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York, USA
- Schmid U (1999) Lipase-Katalysierte Synthese strukturierter Triglyceride: Verfahrensoptimierung und Erzeugung selektiver Lipasemutanten durch gerichtete Evolution. *Dissertation, Universität Stuttgart*
- Schmidt A, Schlacher A, Steiner W, Schwab H, Kratky C (1998) Structure of the xylanase from *Penicillium simplicissimum*. *Protein Sci* **7**: 2081-2088
- Seltmann G (1989) Biochemical aspects of the resistance to nourseothricin (streptothricin) of *Escherichia coli* strains. *J Basic Microbiol* **29**: 547-559
- Setiadi ER, Doedt T, Cottier F, Noffz C, Ernst JF (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J Mol Biol* **361**: 399-411
- Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* **6**: 219-228
- Sharp PM, Li WH (1987) The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* **15**: 1281-1295
- Shimada H, Kondo K, Fraser PD, Miura Y, Saito T, Misawa N (1998) Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2676-2680
- Singh SM, Panda AK. (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* **99**: 303-310
- Sonneborn A, Tebarth B, Ernst JF (1999) Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**: 4655-4660
- Stoltenburg R, Klinner U, Ritzerfeld P, Zimmermann M, Emeis CC (1992) Genetic diversity of the yeast *Candida utilis*. *Curr Genet* **22**: 441-446
- Subramaniyan S, Prema P (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol* **22**: 33-64
- Suen WC, Zhang N, Xiao L, Madison V, Zaks A (2004) Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling. *Protein Eng Des Sel* **17**: 133-140

- Suzuki T, Yokoyama A, Tsuji T, Ikeshima E, Nakashima K, Ikushima S, Kobayashi C, Yoshida S (2011) Identification and characterization of genes involved in glutathione production in yeast. *J Biosci Bioeng* **112**: 107-113
- Tamakawa H, Ikushima S, Yoshida S (2011) Ethanol production from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain expressing protein-engineered xylose reductase and xylitol dehydrogenase. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 1994-2000
- Tamakawa H, Ikushima S, Yoshida S (2012) Efficient production of L-lactic acid from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain. *J Biosci Bioeng* **113**: 73-75
- Tamakawa H, Mita T, Yokoyama A, Ikushima S, Yoshida S (2013a) Metabolic engineering of *Candida utilis* for isopropanol production. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 6231-6239
- Tamakawa H, Tomita Y, Yokoyama A, Konoeda Y, Ikushima S, Yoshida S (2013b) Metabolomic and transcriptomic analysis for rate-limiting metabolic steps in xylose utilization by recombinant *Candida utilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**: 1441-1448
- Tamalampudi S, Talukder MM, Hama S, Tanino T, Suzuki Y, Kondo A, Fukuda H (2007) Development of recombinant *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst expressing lipase-encoding gene from *Candida antarctica*. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**: 387-395
- Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* **28**: 33-36
- Tegel H, Tourle S, Ottosson J, Persson A (2010) Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3). *Protein Expr Purif* **69**: 159-167
- Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 211-222
- Tielker D, Eichhof I, Jaeger KE, Ernst JF (2009) Flavin mononucleotide-based fluorescent protein as an oxygen-independent reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **8**: 913-915
- Tomita Y, Ikeo K, Tamakawa H, Gojobori T, Ikushima S (2012) Genome and transcriptome analysis of the food-yeast *Candida utilis*. *PLoS One* **7**: e37226
- Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509-544
- Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA (1994) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2**: 293-308
- Uppenberg J, Ohrner N, Norin M, Hult K, Kleywegt GJ, Patkar S, Waagen V, Anthonsen T, Jones TA (1995) Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry* **34**: 16838-16851
- Vadhana AK, Samuel P, Berin RM, Krishna J, Kamatchi K, Meenakshisundaram S (2013) Improved secretion of *Candida antarctica* lipase B with its native signal peptide in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* **52**: 177-183
- van Dijken JP, Weusthuis RA, Pronk JT (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* **63**: 343-352

- van Maris AJ, Winkler AA, Kuyper M, de Laat WT, van Dijken JP, Pronk JT (2007) Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **108**: 179-204
- van Zyl C, Prior BA, Kilian SG, Brandt EV (1993) Role of D-ribose as a cometabolite in D-xylose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1487-1494
- Verduyn C, van Kleef R, Frank J, Schreuder H, Van Dijken JP, Scheffers WA (1985) Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem J* **226**: 669-677
- Wakiyama M, Tanaka H, Yoshihara K, Hayashi S, Ohta K (2008) Purification and properties of family-10 endo-1,4-beta-xylanase from *Penicillium citrinum* and structural organization of encoding gene. *J Biosci Bioeng* **105**: 367-374
- Ward OP (2012) Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnol Adv* **30**: 1119-1139
- Weber C, Farwick A, Benisch F, Brat D, Dietz H, Subtil T, Boles E (2010) Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 1303-1315
- Weerapana E, Imperiali B (2006) Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* **16**: 91R-101R
- Wei W, Hong-Lan Y, HuiFang B, Daoyuan Z, Qi-mu-ge S, Wood AJ (2010) The effective expression of xylanase gene in *Candida utilis* by 18S rDNA targeted homologous recombination in pGLR9K. *Mol Biol Rep* **37**: 2615-2620
- Weierstall T, Hollenberg CP, Boles E (1999) Cloning and characterization of three genes (*SUT1-3*) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Mol Microbiol* **31**: 871-883
- Westers L, Westers H, Quax WJ (2004) *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 299-310
- Wilson RB, Davis D, Mitchell AP (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**: 1868-1874
- Wohlbach DJ, Kuo A, Sato TK, Potts KM, Salamov AA, Labutti KM, Sun H, Clum A, Pangilinan JL, Lindquist EA, Lucas S, Lapidus A, Jin M, Gunawan C, Balan V, Dale BE, Jeffries TW, Zinkel R, Barry KW, Grigoriev IV, Gasch AP (2011) Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 13212-13217
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478
- Yamada Y, Matsuda M, Mikata K (1995) The phylogenetic relationships of *Pichia jadinii*, formerly classified in the genus *Hansenula*, and related species based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (*Saccharomycetaceae*). *Biosci Biotechnol Biochem* **59**: 518-520
- Yanai T, Sato M (2001) Purification and characterization of an beta-D-xylosidase from *Candida utilis* IFO 0639. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 527-533
- Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**: 1246-1251

Zeng QK, Du HL, Wang JF, Wei DQ, Wang XN, Li YX, Lin Y (2009) Reversal of coenzyme specificity and improvement of catalytic efficiency of *Pichia stipitis* xylose reductase by rational site-directed mutagenesis. *Biotechnol Lett* **31**: 1025-1029

Zhang F, Klebansky B, Fine RM, Xu H, Pronin A, Liu H, Tachdjian C, Li X (2008) Molecular mechanism for the umami taste synergism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 20930-20934

Zhang G, Gurtu V, Kain SR (1996) An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **227**: 707-711

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
ARS	autonomously replicating sequence (autonom replizierende Sequenz)
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
ca.	circa
CalB	<i>C. antarctica</i> Lipase B
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CAPSO	N-Cyclohexyl-2-hydroxyl-3-aminopropansulfonsäure
cDNA	chromosomale DNA
Cl	Chlorid
C-terminal	carboxyterminal
<i>C. utilis</i>	<i>Candida utilis</i>
d. h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Farad
FACS	fluorescence-activated cell sorting
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
h	Stunde
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IU	international unit (internationale Einheit)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KOG	eukaryotic orthologous groups
l	Liter

LB	Luria-Bertani (Nährmedium)
Li	Lithium
log	Logarithmisch
m	milli
M	Molar
Mbp	Megabasenpaare
Mg	Magnesium
min	Minute
Mn	Mangan
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
n	Nano
Na	Natrium
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
N-terminal	aminoterminal
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
p. a.	per analysis
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
<i>P. jadinii</i>	<i>Pichia jadinii</i>
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PrediSi	prediction of signal peptides
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
qPCR	quantitative PCR
RbCl	Rubidiumchlorid
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SMD	synthetisches Minimalmedium mit Glukose
SM	synthetic minimal medium (synthetisches Minimalmedium)
SMX	synthetisches Minimalmedium mit Xylose
SSC	Standard saline citrate
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol

tRNA	Transfer-RNA
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
YNB	Yeast nitrogen base (Hefe Stickstoffbasis)
YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose (Vollmedium)
YPX	Yeast extract-Pepton-Xylose
z. B.	zum Beispiel
Ω	Ohm

Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Adenin	M	Methionin
C	Cytosin	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

9 Anhang

```

1 atgagattcc catccatcct caccgctggt ttgttcgctg cttcttctgc tttggctgct
61 ccagttaaca ccaccacaga agatgagaca gctcaaatcc cagctgaggc tgttatcggt
121 tactctgatt tggagggtga cttcgacggt gccgttttgc cattctctaa ctccaccaac
181 aacgggttgt tgttcatcaa caccacaatc gcttctatcg ccgctaagga agagggtggt
241 tctttggaga agagacaggc ttctgtttcc atcgacgcta agttcaaggc tcacggtaag
301 aagtacttgg gtacaatcgg tgaccagtac accttgacca agaacacaaa gaaccagcc
361 atcatcaagg ctgacttcgg tcaattgaca ccagagaact ctatgaagtg ggatgtacc
421 gagccaaaaca gaggtcaatt caccttctct ggttccgact acttggttaa ctccgctcag
481 tccaacggta agttgatcag aggtcacacc ttggtttggc actctcaatt gccagggtgg
541 gtttcttcta tcaccgacaa gaacaccttg atctccgtct tgaagaacca catcaccacc
601 gtcatgacca gatacaaggg taagatctac gcctgggacg tcttgaacga gatcttcaac
661 gaggacggtt ccttgagaaa ctccgttttc tacaacgtca tcggtgagga ctacgtcaga
721 atcgctttcg agacagctag atccggtgac ccaaacgcca agttgtacat caacgactac
781 aacttgactc ccgccgggta ctctaaggtc aacggtatgg tttcccacgt caagaagtgg
841 ttggctgctg gtatcccaat cgtatggatc ggttctcaaa cccacttggg tgctgggtgct
901 gggtctgctg ttgctgggtc tttgaacgct ttggcttctg ctggtacaaa ggaaatcgct
961 atcaccgagt tggatatcgc tgggtcttct tctaccgact acgtaacgtg tgtcaacgcc
1021 tgtttgaacc aggcacaagt tgttgggtac accgtttggg gtgtgctga tccagattct
1081 tggagatctt ctctctcccc attgtgttgc gacggtaact acaacccaaa ggctgcctac
1141 aacgctatcg ctaacgcttt g

```

Abb. 9.1: DNA-Sequenz der Fusion von *MFa1*-Präpro-Sequenz und *xynA** in *C. utilis* (DDBJ-Nr.: AB858470).

Tab. 9.1: Ergebnis der qPCR zur Abschätzung der Kopiezahl in *C. utilis*. Untersucht wurden MKCu17 (*TDH3p-xynA**) und MKCu6-3/-9 (*TDH3p-GFP*) mit den Primern für die Gene *CuXDH1*, *CuGXF1*, *CaADH1t*, *sat1* und *GFP*. Dargestellt sind die aus den Messungen berechneten Primereffizienzen, sowie die Ct-Werte bei einem Schwellenwert von 0,07 und die Verhältnisse des Plasmidgens zu den chromosomalen Referenzgenen *CuXDH1* und *CuGXF1*.

	Gen	Ort	Primereffizienz [%]	Ct-Wert	Verhältnis (CuXDH1/Gen)	Verhältnis (CuGXF1/Gen)
MKCu17-2 (<i>TDH3p-xynA*</i>)	<i>CuXDH1</i>	Genom	90	21,3	1	1
	<i>CuGXF1</i>	Genom	88	21,57	1	1
	<i>ADH1t</i>	Plasmid	90	21,12	1,13	1,13
	<i>sat1</i>	Plasmid	145	15,07	1,18	1,18
MKCu6-3 (<i>TDH3p-GFP</i>)	<i>CuXDH1</i>	Genom	94	19,7	1	1,11
	<i>CuGXF1</i>	Genom	92	20,18	0,9	1
	<i>ADH1t</i>	Plasmid	88	22,21	0,4	0,44
	<i>GFP</i>	Plasmid	100	19,69	0,52	0,58
MKCu6-9 (<i>TDH3p-GFP</i>)	<i>CuXDH1</i>	Genom	89	21,93	1	1,20
	<i>CuGXF1</i>	Genom	90	22,04	0,84	1
	<i>ADH1t</i>	Plasmid	83	25,62	0,24	0,29
	<i>GFP</i>	Plasmid	89	22,25	0,84	1,01

Tab. 9.2: Identitätsanalyse der kodierenden Regionen der Gene aus *C. utilis* und *P. jadinii* zu *S. cerevisiae*. Die DNA-Sequenzen der Gene aus *C. utilis* DSM2361 (Tomita *et al.*, 2012) und *P. jadinii* CBS1600, die in der Glykolyse, dem Pentosephosphatweg und dem Citratzyklus beteiligt sind, wurden auf die Identität zu *S. cerevisiae* und die Identität zueinander untersucht.

Gen (<i>S. cerevisiae</i>)	Genprodukt	<i>C. utilis</i> DSM2361 zu <i>S. cerevisiae</i> [%]	<i>P. jadinii</i> CBS1600 zu <i>S. cerevisiae</i> [%]	<i>C. utilis</i> zu <i>P. jadinii</i> [%]
<i>HXK1</i>	Hexokinase	64	65	98
<i>PGI1</i>	Glukose-6-phosphat- Isomerase	75	75	99
<i>PFK1</i>	6-Phosphofrukto-Kinase α -Untereinheit	62	61	96
<i>PFK2</i>	6-Phosphofrukto-Kinase β - Untereinheit	65	62	97
<i>FBA1</i>	Aldolase	75	75	99
<i>TPI1</i>	Triosephosphat-Isomerase	70	70	99
<i>TDH1</i>	Glyceraldehyd-3- phosphat-Dehydrogenase	79	79	99
<i>PGK1</i>	3-Phosphoglycerat-Kinase	76	76	99
<i>GPM1</i>	Phosphoglycerat-Mutase	73	73	98
<i>ENO2</i>	Enolase	78	78	97
<i>CDC19</i>	Pyruvatkinase	69	72	96
<i>ZWF1</i>	Glukose-6-phosphat- Dehydrogenase	65	65	99
<i>SOL3</i>	6- Phosphogluconolactonase	55	54	98
<i>GND1</i>	6-Phosphogluconat- Dehydrogenase	74	73	99
<i>RPE1</i>	Ribulose-phosphat-3- Epimerase	67	67	99
<i>RKI1</i>	Ribose-5-phosphat-ketol- Isomerase	59	59	98
<i>TKL1</i>	Transketolase	69	70	97

Gen (<i>S. cerevisiae</i>)	Genprodukt	<i>C. utilis</i> DSM2361 zu <i>S. cerevisiae</i> [%]	<i>P. jadinii</i> CBS1600 zu <i>S. cerevisiae</i> [%]	<i>C. utilis</i> zu <i>P. jadinii</i> [%]
<i>TAL1</i>	Transaldolase	70	70	98
<i>PYC1</i>	Pyruvat-Carboxylase	71	71	99
<i>CIT1</i>	Citratsynthase	69	69	99
<i>CIT3</i>	Citratsynthase	56	56	99
<i>ACO1</i>	Aconitathydratase	60	60	99
<i>ACO2</i>	Aconitathydratase	59	59	99
<i>IDH2</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	66	66	99
<i>IDH1</i>	Isocitrat-Dehydrogenase Untereinheit	65	65	100
<i>KGD1</i>	α -Ketoglutarat- Dehydrogenase Untereinheit	68	68	99
<i>KGD2</i>	Dihydrolipoyl- Transsuccinylase Untereinheit	65	65	98
<i>LPD1</i>	Dihydrolipoamid- Dehydrogenase	66	45	96
<i>LSC1</i>	Succinyl-CoA-Synthetase α -Untereinheit	62	63	98
<i>LSC2</i>	Succinyl-CoA-Synthetase β -Untereinheit	60	60	99
<i>SDH1</i>	Succinatdehydrogenase Flavoprotein	74	74	99
<i>SDH2</i>	Succinatdehydrogenase Eisen-Schwefel- Untereinheit	66	66	99
<i>SDH3</i>	Succinatdehydrogenase Cytochrom b	51	51	99

Gen (<i>S. cerevisiae</i>)	Genprodukt	<i>C. utilis</i> DSM2361 zu <i>S. cerevisiae</i> [%]	<i>P. jadinii</i> CBS1600 zu <i>S. cerevisiae</i> [%]	<i>C. utilis</i> zu <i>P. jadinii</i> [%]
<i>SDH4</i>	Succinatdehydrogenase Membrananker- Untereinheit	-	-	-
<i>FUM1</i>	Fumarathydratase	68	68	99
<i>MDH1</i>	Malatdehydrogenase	67	67	99

Tab. 9.3: Identitätsanalyse der kodierenden Regionen der Gene aus *C. utilis* und *P. jadinii* zu *P. stipitis*. Die DNA-Sequenzen der Gene aus *C. utilis* DSM2361 (Tomita *et al.*, 2012) und *P. jadinii* CBS1600, die im Xylose-Abbau beteiligt sind, wurden auf die Identität zu *P. stipitis* und zueinander untersucht.

Gen (<i>P. stipitis</i>)	Genprodukt	<i>C. utilis</i> DSM2361 zu <i>P. stipitis</i> [%]	<i>P. jadinii</i> CBS1600 zu <i>P. stipitis</i> [%]	<i>C. utilis</i> zu <i>P. jadinii</i> [%]
<i>YIC1</i>	β -Xylosidase	61	61	99
<i>XYL1</i>	Xylosereduktase (NADH- abhängig)	62	62	98
<i>XYL2</i>	Xylitoldehydrogenase (NAD ⁺ -abhängig)	55	56	98
<i>XKS1</i>	Xylulosekinase	47	47	98
<i>RGT2</i>	Xylose-Transporter	65	65	98
<i>SUT1</i>	Hexose-Transporter	39	39	99

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst für die Betreuung sowie die vielen konstruktiven und motivierenden Diskussionen während der Doktorarbeit und besonders für die Geduld und die Unterstützung in der Schlussphase.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Freudl für die Übernahme des Korreferats und das schnelle Erstellen des Gutachtens danken, sowie CLIB2021 für die finanzielle Förderung der Doktorarbeit.

Ich bedanke mich bei allen im Institut für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Vielen lieben Dank an meine Labor-Mädels für die vielen lustigen und aufmunternden Momente. Besonderer Dank gilt Denis für die Unterstützung und die vielen Anregungen während der Doktorarbeit. Vielen Dank auch an Christoph, es ist doch schöner, wenn man zu zweit zwischen den vielen „albicans-Leuten“ ist. Danke auch an alle Menschen, die manches während der Arbeit erleichtert haben (insbesondere Anna und Visnja) und an Prof. Dr. A. Pühler, Karina Brinkrolf, Oliver Rupp und Alexander Goesmann für die interessante Zusammenarbeit und die vielen neuen Erkenntnisse.

Ein sehr herzliches Danke an meine Freunde und meine Familie, dafür, dass ihr in jeder Lebenslage für mich da seid. Liebe Eva, liebe Theres, ihr seid einfach die Besten. Vielen Dank für Alles! Liebe Michaela, auch dir danke ich sehr. Du weißt, wofür. Ein ganz großes Danke an meinen Freund Matthias, dafür, dass du immer für mich da bist. Was für ein Glück, dass wir uns kennengelernt haben.

Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kunigo M, Buerth C, Tielker D, Ernst JF (2013) Heterologous protein secretion by *Candida utilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 7357-7368

Düsseldorf, 28.10.2013

Maya Kunigo
