

Heterologe Proteinsekretion von *Candida utilis*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Christoph Bürth
aus Heilbronn

Düsseldorf, Dezember 2013

aus dem Institut für Molekulare Mykologie, Department Biologie
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: 27.01.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rekombinante Proteinherstellung	1
1.1.1	Prokaryotische Sekretionssysteme	1
1.1.2	Sekretionssysteme in Pilzen	3
1.2	Heterologe Proteinsekretion in Hefen	4
1.2.1	Promotoren	5
1.2.2	Kodongebrauch.....	6
1.2.3	Signalsequenzen.....	6
1.2.4	Prozessierung sekretorischer Proteine in Pilzen	7
1.2.4.1	Glykosylierung	7
1.2.4.2	Proteinfaltung im ER.....	9
1.3	Oberflächenpräsentation von Proteinen in Hefen	10
1.4	Die Futterhefe <i>Candida utilis</i>	12
1.4.1	<i>C. utilis</i> Genom.....	13
1.4.2	<i>C. utilis</i> als Expressionswirt.....	14
1.5	<i>Candida antarctica</i> Lipase B als Modellenzym der Proteinsekretion	16
1.6	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Mikrobiologische Methoden.....	18
2.1.1	Stämme und Medien	18
2.1.2	Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.1.3	Hefe-Transformation	21
2.1.4	Stabilitätstest der Transformanten	22
2.2	Molekularbiologische/gentechnische Methoden.....	22
2.2.1	Oligonukleotide	22
2.2.2	Plasmide	23
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.2.3.1	Mutagenese-PCR	24
2.2.3.2	Quantitative PCR	25
2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	26
2.2.5	Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen	26
2.2.6	Restriktionsverdau/ Ligation	27
2.2.7	DNA-/ Genom-Sequenzierung	27
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.2.9	Agarose-Gele	28
2.2.10	Southern-Blot	28

2.3	Proteinbiochemische Methoden	29
2.3.1	SDS-PAGE.....	29
2.3.2	Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot Analyse	30
2.3.3	Massenspektrometrische Bestimmung der Proteinmassen.....	30
2.3.4	Lipaseaktivitätstest.....	30
2.3.5	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	31
2.3.6	Deglykosylierung von Proteinen.....	32
2.3.7	Immunofluoreszenz.....	32
2.3.8	Herstellung von Proteinrohextrakten	33
2.3.9	Zellfraktionierung.....	33
2.3.10	Affinitätschromatographie	33
2.3.11	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.3.12	Aufkonzentrieren der Proteine	34
2.3.13	Bioinformatische Untersuchungen	34
2.4	Mausmodell/ <i>in vivo</i> Methoden	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Das Sekretom von <i>C. utilis</i>	36
3.1.1	Das wachstumsabhängige Sekretom von <i>C. utilis</i>	36
3.1.2	Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Sekretom	39
3.1.3	Die Invertase im Sekretom von <i>C. utilis</i>	41
3.2	Sekretion heterologer Proteine in <i>C. utilis</i>	43
3.2.1	Expressionsplasmide	43
3.2.2	Transformation der Expressionsplasmide	45
3.2.3	Integrationsanalyse und Plasmidstabilität	47
3.2.4	Änderung des Integrationsortes	48
3.2.5	Glykosylierung der CalB.....	50
3.2.6	CalB-Aktivität in Medium und Zellen	51
3.2.7	Einfluss der Signalsequenz auf die CalB-Sekretion	53
3.2.8	Aufreinigung und Ausbeute der CalB aus <i>C. utilis</i> und <i>P. pastoris</i>	57
3.2.9	Sekretion der <i>U. maydis</i> Lipase 2 (Uml2) in <i>C. utilis</i>	59
3.2.10	Plasmidkopieanzahl	61
3.3	Oberflächenpräsentation von Proteinen bei <i>C. utilis</i>	64
3.3.1	Expressionsplasmide	64
3.3.2	Lokalisation der Gas1-CalB-Fusion.....	67
3.3.3	Lokalisation der Gas1- β -Galaktosidase-Fusion.....	70
3.3.4	Oberflächenpräsentation des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins....	70
3.3.4.1	Plasmidkonstruktion.....	71
3.3.4.2	Lokalisation der Gas1-MOG-Fusion	73
3.3.4.3	Plasmidintegration und Stabilität	74
3.3.5	Mauskolonisierung	76
3.3.6	Induktion einer oralen Toleranz in Mäusen	79
3.4	<i>P. jadinii</i> als alternatives Sekretionssystem zu <i>C. utilis</i>	80
3.4.1	Vergleich der Phänotypen von <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i>	81
3.4.1.1	Flokkulation	81

3.4.1.2	Pseudohyphen.....	82
3.4.2	CalB-Sekretion bei <i>P. jadinii</i>	82
4	Diskussion.....	85
4.1	Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i> ...	85
4.1.1	Die Genome von <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i>	85
4.1.2	Proteine der Sekretion und Glykosylierung bei <i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i>	86
4.1.3	<i>C. utilis</i> und <i>P. jadinii</i> bilden unterschiedliche Phänotypen aus.....	88
4.2	Das wachstums- und kohlenstoffregulierte Sekretom von <i>C. utilis</i>	88
4.2.1	Das <i>C. utilis</i> -Sekretom im Vergleich zu anderen Pilzen	90
4.3	Heterologe Proteinsekretion von <i>C. utilis</i>	92
4.3.1	Homologe und nicht-homologe Rekombination in <i>C. utilis</i>	92
4.3.2	Plasmidkopieanzahl	95
4.3.3	Die Glykosylierung der heterologen Lipasen Uml2 und CalB.....	96
4.3.4	Limitierende Faktoren der Proteinsekretion in <i>C. utilis</i>	96
4.3.5	CalB-Sekretion bei <i>C. utilis</i> , <i>P. pastoris</i> und <i>P. jadinii</i>	99
4.4	Oberflächenpräsentation von Gas1-Fusionsproteinen bei <i>C. utilis</i>	99
4.4.1	<i>C. utilis</i> vermittelt eine orale Toleranz	101
5	Zusammenfassung	103
6	Summary	104
7	Literatur	105
8	Abkürzungsverzeichnis	124
9	Anhang	126

1 Einleitung

1.1 Rekombinante Proteinherstellung

Die industrielle Herstellung rekombinanter Biopharmazeutika, Proteine und Chemikalien erreicht eine immer größer werdende Bedeutung in der industriellen Biotechnologie. 2011 betrug allein der Umsatz der medizinischen Biotechnologie 6,4 Mrd. Euro (BCG Report: Medizinische Biotechnologie in Deutschland, 2012). In Deutschland besaßen 197 zugelassene Biopharmazeutika zu diesem Zeitpunkt einen Anteil von 19 % des gesamten Pharma-Marktes. Diese Zahlen machen deutlich, welchen wichtigen Stellenwert die rekombinante Proteinherstellung in der heutigen Medizin und Industrie hat.

Durch die Fortschritte in der rekombinanten DNA-Technologie wurden ab 1970 mit Hilfe von *Escherichia coli* therapeutische Produkte in großem Maßstab hergestellt. Das erste von der "Food and Drug Administration" (FDA) zugelassene rekombinante Therapeutikum war Humaninsulin, hergestellt in *E. coli* (Goeddel *et al.*, 1979). Anschließend wurden viele weitere Organismen als Expressionswirte entwickelt und eingesetzt. Für die rekombinante Proteinherstellung stehen seitdem verschiedene Expressionsplattformen zur Verfügung. Die Wahl der geeigneten Plattform richtet sich nach wirtschaftlichen und/oder patentrechtlichen Gründen, sowie nach der gewünschten Applikation und der Produktquantität und -qualität. Für jede dieser Anforderungen muss ein geeignetes System gefunden werden.

1.1.1 Prokaryotische Sekretionssysteme

Viele Expressionsplattformen sind bereits etabliert und werden erfolgreich in der industriellen Biotechnologie eingesetzt. Hierzu zählen unter anderem prokaryotische Plattformen, wie z. B. *E. coli* oder *Bacillus subtilis*. Prokaryotische Expressionssysteme werden oft eingesetzt, da sie leicht zu kultivieren sind und eine hohe Produktausbeute erreichen. Weitere Vorteile sind das schnelle Wachstum und die einfache genetische Modifikation (Sahdev *et al.*, 2008). Der Durchbruch der rekombinanten Proteinherstellung gelang 1979 mit der heterologen Expression des humanen Insulins in *E. coli* (Goeddel *et al.*, 1979; Johnson, 1983). Seitdem wurde *E. coli* als Expressionsplattform immer bedeutender, so dass heutzutage ein Drittel der von der FDA zugelassenen Therapeutika meist intrazellulär von *E. coli* produziert werden (Graumann und Premstaller, 2006; Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). Die prokaryotischen Expressionssysteme besitzen jedoch einige Nachteile, weshalb sie in der Herstellung sekretierter Proteine nicht immer eingesetzt werden können. Ein Problem liegt in der Löslichkeit der überexprimierten sekretorischen Proteine. Auf Grund der begrenzten Kapazität der Exportmaschine kann es bei *E. coli* zu einer intrazellulären Lokalisation und Aggregation dieser Proteine in Form von *inclusion bodies* kommen (Mergulhao *et al.*, 2005), was eine zeit- und kostenaufwendige

Reinigung zur Folge hat (Makrides, 1996; Vincentelli *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009). Ein weiterer Nachteil der intrazellulären Proteinproduktion in *E. coli* sind Endotoxine (Lipopolysaccharide), die schon in kleinsten Mengen gefährlich für den Menschen sind und daher kosten- und zeitaufwändig entfernt werden müssen (Petsch und Anspach, 2000).

In gramnegativen Bakterien gibt es verschiedene Sekretionssysteme. Der Sec- und Tat-Weg sind für die Sekretion von einigen sekretorischen Proteinen durch die innere Membran verantwortlich, wobei ungefaltete Proteine durch den Sec-Weg, gefaltete Proteine durch den Tat-Weg sekretiert werden (Harwood und Cranenburgh, 2008). Die Sekretionssysteme TypI bis TypVI sind für die Sekretion durch die innere und äußere Membran verantwortlich. Das TypI-Sekretionssystem, durch welches bei einigen *E. coli*-Stämmen natürlicherweise Toxine sekretiert werden, ist auf Grund seiner relativ einfachen Bauweise das am meisten genutzte System in der rekombinanten Proteinsekretion in *E. coli* (Ni und Chen, 2009). Im Unterschied zu Eukaryoten können die biotechnologisch verwendeten Prokaryoten der Domäne Bacteria typischerweise keine posttranslationalen Proteinmodifikationen, wie z. B. Glykosylierungen, an sekretorischen Proteinen durchführen. Bioaktive Proteine tragen aber oftmals Glykosylierungen, ohne die es zu inkorrektur Faltung und damit zu inaktiven Proteinen kommt. Dieses gilt beispielsweise für monoklonale Antikörper, die ohne korrekte Glykosylierung und Faltung nicht funktionell sind. Auf Grund dieser Einschränkungen werden Möglichkeiten gesucht, um die Sekretion in *E. coli* zu verbessern. So wurde durch die Ko-Überexpression von Chaperonen in *E. coli* bereits die Sekretionsleistung erhöht (Ni und Chen, 2009) und durch die Expression eines Gen-Clusters aus *Campylobacter jejuni*, welcher für einen kompletten N-Glykosylierungsweg kodiert, wurde außerdem eine N-Glykosylierung sekretorischer Proteine in *E. coli* erreicht (Pandhal *et al.*, 2011; Merritt *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu gramnegativen Bakterien besitzen grampositive Bakterien keine äußere Membran mit Lipopolysacchariden. Ihr großes sekretorisches Potential beruht auf den Sec- und Tat-Sekretionswegen. Zusätzlich dazu gibt es einige grampositive Bakterien (z. B. *Mycobacterium tuberculosis*), die ein weiteres Sekretionssystem (Typ VII) tragen, welches für die Sekretion von Virulenzfaktoren verantwortlich ist (Freudl, 2013). Das meistgenutzte grampositive Bakterium in der heterologen Proteinherstellung ist *B. subtilis*, ein "generally recognized as safe" (GRAS)-Organismus (Palomares *et al.*, 2004). Ein Nachteil bei der heterologen Proteinherstellung in *B. subtilis* ist zum einen die geringe Plasmidstabilität, welche durch eine chromosomale Integration der Plasmide erhöht werden muss (Palomares *et al.*, 2004) und zum anderen die Sekretion von Proteasen (z. B. Subtilisin), welche die Proteinausbeute verringern können. Die Produktion von rekombinanten, sekretorischen Proteinen kann in *B. subtilis* aber trotzdem hoch sein (>20 g/l) (Harwood und Cranenburgh, 2008).

Zusätzlich zu der konventionellen Sekretion stellt die Oberflächenpräsentation von Proteinen eine biotechnologisch interessante Alternative dar. Heterologe Gene werden dabei an die Gensequenz von "Ankerproteinen", die normalerweise in der äußeren Membran sitzen, fusioniert. Das dabei entstehende Fusionsprotein wird mit

Hilfe des "Ankerproteins" in die Zelloberfläche eingebaut. Solche Oberflächenpräsentationen von Proteinen bieten viele Anwendungsmöglichkeiten in der industriellen Biotechnologie, z. B. in der Erstellung von Genbibliotheken, für den Einsatz als Biokatalysatoren oder als lebende Vakzine. Die Oberflächenpräsentation von Proteinen in Prokaryoten existiert bereits in gramnegativen (*E. coli*) und grampositiven (*B. subtilis*) Bakterien (Lee *et al.*, 2003; van Bloois *et al.*, 2011).

1.1.2 Sekretionssysteme in Pilzen

Eukaryotische Mikroorganismen können, wie Bakterien, sehr schnell auf günstigen Substraten wachsen. Insbesondere Hefen (einzellige Pilze) besitzen Vorteile gegenüber prokaryotischen Expressionssystemen, da sie posttranslationale Proteinmodifikationen, wie Glykosylierungen, an sekretorischen Proteinen durchführen. Die Glykosylierung erfolgt auf dem Sekretionsweg im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat und beeinflusst die Stabilität, Aktivität, Faltung und Löslichkeit von Proteinen (Yamaguchi *et al.*, 1991). Zwischen den einzelnen Hefearten bestehen große Unterschiede in der Länge, Verknüpfung, Art und Häufigkeit der verknüpften Zuckerketten (Delic *et al.*, 2013). Zusätzlich können stabile Transformanten durch die gezielte Integration der Expressionsplasmide in das Hefegenom hergestellt werden, was in prokaryotischen Systemen oft nicht möglich ist. Multiple Plasmidintegrationen erlauben in Pilzen eine erhöhte Genexpression und somit Proteinausbeute (Mansur *et al.*, 2005; Norden *et al.*, 2011).

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die methylotrophen Hefen *Pichia pastoris* und *Hansenula polymorpha* werden bei pilzlichen Expressionssystemen auf Grund ihrer sehr gut untersuchten Genome, etablierter Transformationssysteme und hohen Produktausbeuten häufig für die Herstellung rekombinanter Proteine eingesetzt. Bei *P. pastoris* und *H. polymorpha* sind zusätzlich die limitierte Glykosylierung heterologer, sekretierter Proteine und die Sekretionseffizienz ein Grund für den häufigen Einsatz in der rekombinanten Proteinsekretion. Industriell bedeutende Produkte, die in *S. cerevisiae* und *P. pastoris* hergestellt werden, sind z. B. Insulin (Wang *et al.*, 2001), ein Hepatitis B-Antigen, Urat-Oxidase (Demain und Vaishnav, 2009), humanes Serum-Albumin (Cregg *et al.*, 1993) und Gelatin (Werten *et al.*, 1999).

Filamentöse Pilze wie *Aspergillus oryzae*, *A. nidulans* und *A. niger* sind ebenfalls effiziente eukaryotische Expressionssysteme mit einem GRAS-Status. Diese Pilze besitzen eine außerordentlich hohe Sekretionskapazität für Proteine (25 g/l Glucoamylase bei *A. niger*). Organische Säuren, Sekundärmetabolite und Polysaccharide sind weitere Beispiele von biotechnologischen Produkten, welche von filamentösen Pilzen hergestellt werden (Conesa *et al.*, 2001; Shoji *et al.*, 2008; Fleissner und Dersch, 2010; Ward, 2012). Diese filamentösen Pilze können jedoch nicht effizient transformiert werden und sekretieren eine Vielzahl an Proteasen, was die Produktausbeute oftmals erheblich verringert (Ward, 2012). Auch bei dem Mais-

pathogenen Basidiomyceten *Ustilago maydis* verringern sekretierte Proteasen die Ausbeute des gewünschten Produkts. Kürzlich wurde für *U. maydis* ein neuartiges Sekretionssystem beschrieben, bei dem das heterologe Protein auf einem unkonventionellen Weg, nicht über das ER und den Golgi-Apparat, sondern direkt in das Medium abgegeben wurde (Stock *et al.*, 2012).

1.2 Heterologe Proteinsekretion in Hefen

Die Sekretion, der Transport/ die Translokation von Molekülen (Proteinen, Enzymen), vom intrazellulären in den extrazellulären Raum oder die Zellwand ist eine überlebenswichtige Funktion von Pilzen. Sekretorische Proteine haben unterschiedlichste Funktionen. Sie können zum einen für die Nahrungsaufnahme, den Abbau von komplexen Nährstoffen oder den Schutz der Mikroorganismen vor Toxinen und Chemikalien zuständig sein. Zum anderen können sie für die Pathogenität eines Organismus und dessen Adhäsion und Penetration verantwortlich sein (Sorgo *et al.*, 2013).

Die Proteinsekretion ist bei Pilzen eine bevorzugte Methode der rekombinanten Proteinproduktion. Daher stellt sich die Frage, welche Anzahl und Art der Proteine der Expressionswirt natürlicherweise in das Medium abgibt. Diese Gesamtheit der in das Medium sekretierten Proteine eines Organismus wird als Sekretom bezeichnet. Das Sekretom kann von den Organismen je nach Nährstoffverfügbarkeit, Stressbedingungen und Wachstumsphase angepasst werden. Mit Hilfe der Sekretom-Daten müssen optimale Fermentationsbedingungen gefunden werden, um Kontaminationen durch wirtseigene Proteine minimal zu halten und das rekombinant hergestellte Protein zu schützen und aufzureinigen. In den letzten Jahren wurden die Sekretome der biotechnologisch relevanten Pilze *Kluyveromyces lactis* (Swaim *et al.*, 2008; Madinger *et al.*, 2009), *P. pastoris* (Mattanovich *et al.*, 2009) und der humanpathogenen Pilze *C. albicans* (Sorgo *et al.*, 2010) und *C. glabrata* (Stead *et al.*, 2010) untersucht. In den meisten dieser Sekretome wurden Proteasen (Swaim *et al.*, 2008; Madinger *et al.*, 2009) und Aspartyl-Proteasen (SAP) (Sorgo *et al.*, 2010; Stead *et al.*, 2010) identifiziert.

Die Sekretion rekombinanter Proteine wird oftmals einer intrazellulären Herstellung vorgezogen, weil dadurch eine mögliche Toxizität von intrazellulär aggregierten Proteinen verhindert wird und Kontaminationen durch Wirts-Proteine und der proteolytische Abbau des gewünschten Produktes geringer sind. Des Weiteren ist die Reinigung sekretierter Proteine aus dem Medium leicht durchzuführen, da die Zellen nicht aufgeschlossen werden müssen, wodurch die Gefahr proteolytischen Abbaus steigt.

Für die erfolgreiche Sekretion von Proteinen in das Medium müssen Voraussetzungen erfüllt sein. Zunächst muss ein geeigneter Wirtstamm gefunden werden, welcher die Bedingungen an das gewünschte Produkt (Glykosylierung der Proteine, Sicherheit, Sekretion) erfüllt. Des Weiteren muss ein geeignetes Transformations- und Selektionssystem vorliegen, um eine effiziente und stabile

Integration des Vektors zu gewährleisten. Von größter Bedeutung ist ein effizientes Expressionssystem, wozu besonders ein effizienter Promotor benötigt wird, welcher regulierbar oder konstitutiv sein kann. Der Kodongebrauch des heterologen Gens muss an den jeweiligen Wirtsorganismus angepasst werden und für eine optimale Sekretion ist außerdem eine Signalsequenz erforderlich.

1.2.1 Promotoren

Der stromaufwärts eines "open reading frame" (ORF)-liegende Genabschnitt, der Promotor, ermöglicht die regulierte Transkription eines Gens. Daher ist ein starker und gut regulierbarer Promotor für die rekombinante Proteinherstellung von großer Bedeutung.

Auf Grund des sehr starken und streng regulierten Promotors des *AOX1*-Gens, das für die Alkohol-Oxidase1 (Aox1) kodiert, wird die methylotrophe Hefe *P. pastoris* häufig in der rekombinanten Proteinherstellung eingesetzt. Die Expression des *AOX1*-Gens wird auf transkriptioneller Ebene reguliert (Ellis *et al.*, 1985; Cregg *et al.*, 1989) und durch Glucose, Glycerin und Ethanol reprimiert, aber durch die Zugabe von Methanol stark induziert. In *P. pastoris*-Kulturen, die mit Methanol als Kohlenstoffquelle inkubiert wurden, erreichte das Aox1-Protein bis zu 30 % der gesamten löslichen Proteinmenge (Couderc und Baratti, 1980). Der Einsatz von Methanol ist aber nicht immer möglich, da explosions sichere Fermenter eingesetzt werden müssen und Methanol eine relativ teure Kohlenstoffquelle ist (Julien, 2006). Daher wird bei *P. pastoris* vermehrt der Einsatz anderer, regulierter und konstitutiver, Promotoren untersucht. Der konstitutive Promotor des *TDH3*-Gens für *GAPDH* wird verwendet, da er bereits in anderen Pilzen erfolgreich eingesetzt wurde. Bei *C. utilis* wurden rekombinante Gene unter der Kontrolle des *TDH3*-Promotors exprimiert (Tabelle 1.1) und bei *S. cerevisiae* kommen neben den konstitutiven *TDH3*- und *PGK1*-Promotoren oftmals auch die *GAL1/10*-Promotoren zum Einsatz, welche durch Galaktose induziert und durch Glucose reprimiert werden (Nehlin *et al.*, 1991). In Bezug auf die Sekretion besteht zwischen der Promotorstärke und Genexpression jedoch kein einfacher Zusammenhang. Bei *S. cerevisiae* führte z. B. ein relativ schwacher Promotor zu einer besseren Sekretionseffizienz als ein vermeintlich starker Promotor (Ernst, 1986).

Nicht nur der stromaufwärts liegende Bereich des ORFs hat einen gewissen Einfluss auf die Genexpression, sondern auch der stromabwärts des ORFs liegende Transkriptionsterminator. Der Transkriptionsterminator sorgt für das Stoppen der Transkription und für ein definiertes 3'-Ende des Transkripts, welches wiederum polyadenyliert wird. Diese Prozessierung trägt zur Stabilität und Ausbildung einer Sekundärstruktur der mRNA bei, damit diese effektiv in das Cytoplasma transportiert werden kann (Kück *et al.*, 2005).

1.2.2 Kodongebrauch

Der bevorzugte Gebrauch einzelner Kodons bei der Translation hat eine entscheidende Rolle in der heterologen Proteinherstellung. Frühere Studien zeigten, dass es einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit bestimmter Kodons und der Genexpression gibt (Ernst, 1988a). Stark exprimierte Gene, wie z. B. glykolytische Gene, besitzen ein reduziertes Repertoire an Triplets, welches bevorzugt benutzt wird (Sharp *et al.*, 1986; Jansen *et al.*, 2003). Bei der Benutzung seltener Kodone kann die geringe Häufigkeit der dazugehörigen tRNAs zu einer geringeren Translation führen (Ernst, 1988b). Zusätzlich muss beachtet werden, dass eine veränderte Gensequenz den mRNA-Spiegel verändern kann und damit letztendlich die Proteinausbeute beeinflusst (Coghlan und Wolfe, 2000). Dass die Anpassung des Kodongebrauchs an die des Wirtsorganismus eine große Auswirkung auf die Proteinausbeute hat, wurde von Chang *et al.* (2006) und Huang *et al.* (2013) für *P. pastoris* beschrieben. In der Arbeit von Chang und Mitarbeitern (2006) wurde die Produktausbeute einer sekretierten Lipase Crl aus *C. rugosa* und bei Huang *et al.* (2013) die des intrazellulär hergestellten humanen knochenmorphogenetischen Proteins hBMP4 durch die Anpassung des Kodongebrauchs um mindestens das 4-fache gesteigert. Andererseits wurde für die Sekretion bei *S. cerevisiae* gezeigt, dass der Kodon-Bias nicht notwendigerweise einen Einfluss auf die Genexpression/Sekretion in *S. cerevisiae* hat (Ernst und Kawashima, 1988). Des Weiteren wurden in einigen Hefegenen sogenannte "downstream activating sequences" (DAS) identifiziert (Mellor *et al.*, 1987), die in der kodierenden Gen-Region liegen und die Transkription des Gens regulieren. Durch die Anpassung der Kodon-Bias des heterologen Gens an den Expressionsorganismus wird die DAS verändert, was zu einer Verringerung des Transkriptspiegels und der Proteinkonzentration führen kann.

Eine Abweichung des Standard-Kodongebrauchs ist bei bestimmten *Candida*-Arten ("CUG-clade") vorzufinden. Dabei wird durch eine spezielle tRNA das CUG-Kodon nicht wie im Standardgebrauch in Leucin, sondern in Serin translatiert. Einige *Candida*-Spezies (z. B. *C. albicans*) gehören zu dieser CUG-Gruppe. Bei diesen Pilzen führt daher der Einsatz der üblichen Reportergene (*lacZ*, *GFP*), welche mehrere CUG-Kodons besitzen, zu einer Translation in inaktive Proteine.

1.2.3 Signalsequenzen

Mit Ausnahme bestimmter Proteine, die über einen nicht-konventionellen Sekretionsweg sekretiert werden (Nickel und Rabouille, 2009; Nickel, 2010), ist die Mindestanforderung für die Sekretion eines Proteins eine N-terminale Sekretions-Signalsequenz. Signalsequenzen können in Klassen für die kotranslationale Sekretion und für die posttranslationale Sekretion eingeteilt werden (Brodsky, 1998). Über welchen dieser beiden Wege ein Protein sekretiert wird, hängt maßgeblich von der Hydrophobizität der Signalsequenz, welche die Bindung des "signal recognition

particles" (SRP) beeinflusst (Ng *et al.*, 1996) sowie der Zusammensetzung und Konformation der Signalsequenz, ab (Yaver *et al.*, 1992).

Eukaryotische Signalsequenzen können eine Länge von 15-50 Aminosäuren erreichen und enthalten drei Regionen (von Heijne, 1986). In der Mitte der Sequenz befindet sich eine hydrophobe (h-) Kernregion, die am C-terminalen Ende von einer polaren (C-) Region flankiert wird, welche die Erkennungssequenz für die Signalpeptidase enthält (von Heijne, 1990). Auf der N-terminalen Seite der h-Region befindet sich eine polare Sequenz, welche eine positive Ladung aufweist. Auf Grund dieser gemeinsamen Strukturmerkmale der Signalsequenzen können diese Sequenzen untereinander, zwischen verschiedenen Proteinen und sogar Organismen erfolgreich ausgetauscht werden (Gierasch, 1989; Izard und Kendall, 1994). Diese Erkenntnis war wichtig für die Etablierung von Expressionssystemen in Hefen, da auch Fusionen aus einer (art-) fremden Signalsequenz und einem homologen oder heterologen Protein sekretiert werden können.

Durch den Austausch der Signalsequenz wurden die Ausbeuten an sekretierten Proteinen oftmals erhöht. Die Prä-Pro-Sequenz des Vorläufers des Paarungs-Pheromons Alpha1 von *S. cerevisiae* (Mf α 1) wurde dabei als sehr effiziente Signalsequenz identifiziert (Ng *et al.*, 1996) und wird seither oft für die Sekretion heterologer Proteine eingesetzt (Sreekrishna *et al.*, 1997; Brocca *et al.*, 1998; Rakestraw *et al.*, 2009). Im Zusammenhang mit der Prä-Pro-Sequenz von Mf α 1 wurde gezeigt, dass für die Sekretion und Prozessierung einiger heterologer Proteine die Prä-Sequenz des Mf α 1 unabdingbar ist, wohingegen die Pro-Sequenz nicht unbedingt benötigt wird (Ernst, 1988b). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die natürliche Signalsequenz eines Proteins oftmals nicht die beste Wahl für die Sekretion des Proteins in das Medium ist und dass auch keine pauschale Aussage über die beste Kombination aus Signalsequenz und Protein getroffen werden kann.

Wichtig bei der Prozessierung einiger sekretorischer Proteine mit "leader"-Sequenz aus einer Prä-Region (Signalsequenz) und einer Pro-Region (z. B. Mf α 1, CalB) ist die Calcium²⁺-abhängige Serin-Protease Kex2 (Fuller *et al.*, 1989a; Fuller *et al.*, 1989b). Kex2 ist im Golgi-Apparat lokalisiert und schneidet C-terminal neben zwei basischen Aminosäuren (oftmals Lysin-Arginin), um das Propeptid des Zielproteins zu entfernen und ist somit für die Herstellung des reifen Proteins verantwortlich (Julius *et al.*, 1984).

1.2.4 Prozessierung sekretorischer Proteine in Pilzen

1.2.4.1 Glykosylierung

Der erste Schritt der Sekretion ist der Transfer des Proteins in die Sec61-Sekretionspore der ER-Membran. In Abhängigkeit der Signalsequenz geschieht dieses entweder ko- oder posttranslational. Nachdem das Protein in das ER-Lumen

transloziert wurde, wird die Signalsequenz abgespalten und weitere Reifungsprozesse laufen ab.

Die wichtigste Proteinmodifikation stellen die Glykosylierungen in Form von *N*- und *O*-Glykosylierungen dar. Bei der *N*-Glykosylierung wird ein Oligosaccharid-Vorläufer ($\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) mit Hilfe eines Dolichol-Pyrophosphats durch Oligosacharyltransferasen an die Amidgruppe eines Asparagins geknüpft (Aebi, 2013). Eine Voraussetzung dafür ist die Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr, wobei X kein Prolin sein darf. Es werden aber nur ca. 50 % der Konsensussequenzen sekretorischer Protein tatsächlich *N*-glykosyliert (Lodish *et al.*, 2000). Nach der Verknüpfung des Oligosaccharid-Vorläufers an das Asparagin werden zwei der drei Glucosereste des Oligosaccharids durch Glukosidasen wieder abgespalten (Abb. 1.1 A). Das im ER lokalisierte Lectin Calnexin erkennt während der Proteinfaltung speziell den letzten terminalen Glucoserest der Zuckerstruktur und bindet an das Protein. Wenn das Protein korrekt gefaltet ist, wird der letzte Glucoserest entfernt und das Protein verlässt den Calnexin-Kreislauf (Caramelo und Parodi, 2008). Ist das Protein nicht korrekt gefaltet, wird durch sensitive Faltungssensoren, wie z. B. die UDP-Glucose:Glycoprotein-Glucosyltransferase (UGGT), nochmals ein Glucoserest an die Zuckerstruktur angefügt, so dass das Protein wieder in den Calnexin Kreislauf eintritt (Trombetta und Parodi, 1992; Hebert *et al.*, 1995). Dieser nochmalige Kreislauf verschafft dem Protein mehr Zeit, in die korrekte Konformation überzugehen. Bei korrekter Faltung können die Proteine den Calnexinkreislauf verlassen und falsch gefaltete Proteine werden letztendlich mit Hilfe des "*ER-associated protein degradation*" (ERAD) wieder abgebaut (Ruddock und Molinari, 2006). Die Glykosylkette korrekt gefalteter Proteine wird anschließend weiter modifiziert. Eine terminale Mannose wird durch die Mannosidase Mns1 entfernt und nach dem Transport in den Golgi-Apparat wird ein Mannoserest in α 1,6-glykosydischer Bindung angehängt, welche der Ausgangspunkt für die weitere Prozessierung der Kernglykosylstruktur ist (Nakayama *et al.*, 1992) (Abb. 1.1 B). Bei *S. cerevisiae* kann durch das Anknüpfen von bis zu 75 weiteren Mannoseresten ein hochglykosyliertes Protein hergestellt werden. Ob ein Protein nur die Kernglykosylierung oder die erweiterte, hochglykosylierte Struktur erhält, lässt sich jedoch nicht vorhersagen.

Die *N*-Glykosylierungsstruktur in Säugerzellen unterscheidet sich von der in Hefen. In humanen Zellen wird die Zuckerstruktur im Golgi-Apparat bis auf $\text{GlcNAc}_2\text{-Man}_3$ verkürzt ("*trimming*") (Hamilton und Gerngross, 2007). Des Weiteren unterscheidet sich auch die Art der Zucker. In Säugerzellen können unter anderem Sialinsäure, Galaktose und Mannosen im Golgi-Apparat angefügt werden (Hamilton und Gerngross, 2007). Da in der rekombinanten Proteinherstellung oftmals Therapeutika und humane Proteine hergestellt werden und die Glykosylierung eine wichtige Rolle spielt, wird versucht, die Glykosylierung in Hefen an humane Strukturen anzugleichen. Dieses gelang bei *P. pastoris* für die *N*-Glykosylierung bereits teilweise (Vervecken *et al.*, 2004; Hamilton *et al.*, 2006).

Im Unterschied zur *N*-Glykosylierung ist für die *O*-Glykosylierung in Hefen bis zum heutigen Zeitpunkt keine Konsensussequenz bekannt. Bei der *O*-Glykosylierung wird ein Mannoserest von einem Dolichol-Phosphat-Mannose-Vorläufermolekül mit Hilfe

1. Einleitung

von Protein-O-Mannosyltransferasen (Pmt-Proteine) im ER-Lumen auf ein Serin- oder Threoninrest des Proteins übertragen (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999; Delic *et al.*, 2013). Die Verlängerung der Mannosekette erfolgt anschließend im Golgi-Apparat, wo durch verschiedene Mannosyltransferasen Mannosereste in α 1,2- oder α 1,3-glykosidischer Bindung angehängt werden können (Lussier *et al.*, 1997; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Im Unterschied zur N-Glykosylierung werden bei der O-Glykosylierung nur wenige (bis zu 7) Mannosereste angefügt (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). In einigen Hefearten können Mannosereste auch in β 1,2-glykosidischer Bindung verknüpft werden. Diese Verknüpfung kann eine entscheidende Rolle bei der Pathogenität von Pilzen spielen, wurde jedoch auch in nicht-pathogenen Hefen wie *P. pastoris* gefunden (Mille *et al.*, 2008).

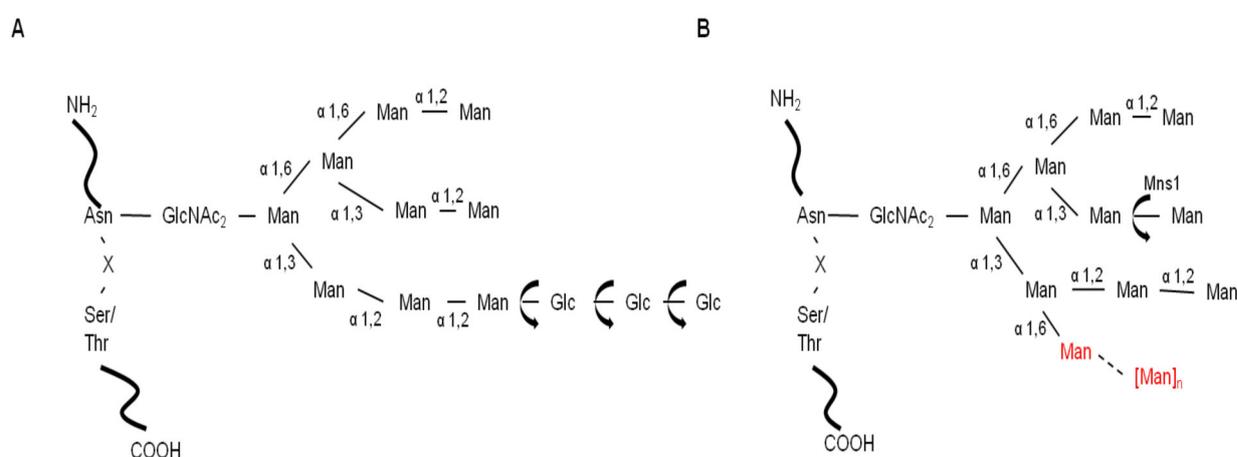


Abb. 1.1: Kernstruktur der N-Glykosylierung in Hefen. (A) Drei terminale Glucosereside werden, nachdem das Vorläufer Glycangerüst an das Asparagin des Proteins geknüpft wurde und das Protein mit Hilfe von Calnexin die korrekte Faltung eingenommen hat, entfernt. **(B)** Im Golgi-Apparat wird ein Mannoserest durch Mns1 entfernt und an den α 1,3-Mannoserest ein weiterer Mannoserest durch eine α 1,6-glykosidische Bindung verlängert (rot). An diesem Mannoserest kann eine weitere Kettenverlängerung (bis $n = 75$) erfolgen.

1.2.4.2 Proteinfaltung im ER

Durch die Überexpression eines Gens kommt es oftmals auf Grund der Überlastung des ERs zu einer Anhäufung nicht-gefalteter Proteine (Zhu *et al.*, 2009). Derartige Proteine werden durch den ERAD-Kontrollmechanismus aussortiert und in Proteasomen (Hampton, 2002) oder in Vakuolen (Hong *et al.*, 1996) abgebaut. Im ERAD-Weg spielen Chaperone eine wichtige Rolle (Hoseki *et al.*, 2010). Dazu gehören bei Hefen die im ER-Lumen lokalisierten Proteine Kar2 und Pdi1. Das Kar2-Chaperon bindet an nicht-, oder falsch-gefaltete Proteine im ER-Lumen und transportiert sie aus dem ER in das Cytoplasma, wo das Protein polyubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom abgebaut wird (Nishikawa *et al.*, 2001). Zusätzlich bindet Kar2 während der posttranslationalen Sekretion an das entstehende Protein, „zieht“ es dabei in das ER-Lumen und verhindert die vorzeitige und falsche Faltung des Proteins (Matlack *et al.*, 1999). Wenn eine Anhäufung falsch gefalteter Proteine im

ER stattfindet, wie z. B. bei der starken Produktion eines heterologen Proteins, wird die Expression des *KAR2*-Gens stark erhöht (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989). Durch die vermehrte Bindung von Kar2 an entfaltete Proteine wird dann der "unfolded protein response" (UPR)-Weg eingeleitet (Kimata *et al.*, 2003).

Eine weitere Faltungskontrolle im ER-Lumen übernimmt ein Proteinkomplex aus der Protein-Disulfid-Isomerase1 Pdi1 und der Exomannosidase Mnl1. Dieser Komplex erkennt falsch gefaltete Glykoproteine und verkürzt die GlcNAc₂-Man₈ N-Glykosylstruktur eines Proteins zu GlcNAc₂-Man₇. Diese verkürzte Zuckerstruktur kann anschließend als Signal für den Abbau des Proteins durch den ERAD-Weg dienen und dadurch ungefaltete Glykoproteine aus dem ER entfernen (Gauss *et al.*, 2011).

Eine zusätzliche Proteinmodifikation, die im ER-Lumen von Hefen stattfindet, sind Disulfidbrückenbindungen, welche mit Hilfe der Oxidase Ero1 gebildet werden (Gross *et al.*, 2006). Durch die Protein-Disulfid-Isomerase1 Pdi1 werden diese Disulfidbrücken bei sekretorischen Proteinen immer wieder gelöst, bis das Protein seine korrekte 3-dimensionale Struktur eingenommen hat (Laboissiere *et al.*, 1995). In einigen Fällen wurde gezeigt, dass durch die gezielte Überexpression von *KAR2* bei *S. cerevisiae* (Robinson *et al.*, 1994; Harmsen *et al.*, 1996) und von *PDI1* bei *P. pastoris* (Inan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011) die Ausbeute sekretorischer Proteine erhöht werden kann. In anderen Fällen gelang dieses jedoch nicht (Robinson *et al.*, 1996). Gleiches gilt für filamentöse Pilze, wo in manchen, aber nicht allen Fällen, die Sekretion durch die Überexpression der Chaperone verbessert wurde (Conesa *et al.*, 2001). Es kann daher keine Vorhersage gemacht werden, ob eine Ko-Überexpression von Chaperonen in einem Sekretionssystem zu einer verbesserten Sekretion führt.

1.3 Oberflächenpräsentation von Proteinen in Hefen

Die kovalente Verankerung von heterologen Proteinen an die Zelloberfläche/ Zellwand von Hefen bietet einige Vorteile gegenüber der konventionellen Sekretion von Proteinen. Der Vorteil der Oberflächenpräsentation von Proteinen liegt in der Wiederverwendung der Zellen als Biokatalysator und einem Einsatz als orale Ganzzell-Vakzine (Lee *et al.*, 2003; Muller, 2011; Tanaka *et al.*, 2012). Verschiedene Kombinationen aus einem Zellwandprotein und einem gewünschten Protein wurden bereits auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* und *P. pastoris* präsentiert. Der Einsatz von *S. cerevisiae* als Ganzzell-Biokatalysator wurde in Form einer Oberflächenpräsentation der Sucrose-Isomerase durch die Produktion von Isomaltulose demonstriert (Lee *et al.*, 2011). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Oligosaccharidsynthese mit einem *S. cerevisiae* Oberflächendisplay möglich ist (Zhang *et al.*, 2006). Su *et al.* (2010) benutzten ein Oberflächendisplay der Lipase B aus *C. antarctica* bei *P. pastoris* für die Estersynthese (Su *et al.*, 2010). Bei *Y. lipolytica* und dem filamentösen Pilz *A. oryzae* gelang ebenfalls eine effektive

Oberflächenpräsentation von Proteinen (Adachi *et al.*, 2008; Tabuchi *et al.*, 2010; Yuzbasheva *et al.*, 2011). Für *P. pastoris* wurde außerdem gezeigt, dass es sogar möglich ist, Pilze als orales Vakzin einzusetzen (Wasilenko *et al.*, 2010).

Die Zellwand von Hefen besteht aus einem Glucangerüst, Chitin und hoch *N*- und *O*-glykosylierten Mannoproteinen. Sie dient unter anderem dem Schutz der Zellen, zum Adhären an Oberflächen und der Erhaltung der Zellform. Viele dieser Glykoproteine sind durch den Rest eines Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers kovalent an das β 1,6-Glucan der Zellwand geknüpft (Abb. 1.3). Die Funktionen von GPI-verankerten Proteinen stehen im Zusammenhang mit dem Zellwandauf- und umbau, der Aufnahme von Nährstoffen, Zell-Zell-Interaktionen und dem Schutz der Zelle (Staab *et al.*, 1999; Protchenko *et al.*, 2001; de Groot *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2005). Für die Verankerung in der Zellwand muss zuerst ein GPI-Anker an ein sekretiertes Protein im ER angehängt werden und das GPI-Protein an der Plasmamembran der Zelle weiter prozessiert werden. Für das Anhängen eines GPI-Ankers an ein sekretiertes Protein gibt es keine klare Konsensussequenz. Voraussetzung ist jedoch eine Sekretions-Signalsequenz, da der GPI-Vorläufer im ER aufgebaut und angeheftet wird. Am C-Terminus dieser Proteine befindet sich eine GPI-Signalsequenz, die für die Addition eines GPI-Ankers notwendig ist (Caras *et al.*, 1987). Diese Sequenz besteht aus einer C-terminalen, hydrophoben Region, welche durch eine kurze, hydrophile Sequenz von der GPI-Anheftungsstelle (ω -Stelle) getrennt ist. Dabei wird während der Verknüpfung des GPI-Ankers an das Protein die GPI-Signalsequenz durch eine Transamidase entfernt (Moran und Caras, 1991; Gerber *et al.*, 1992; Nuoffer *et al.*, 1993). Das GPI-Vorläufer-Molekül besteht aus einem konserviertem Glucangerüst mit einem Phosphatidylinositol-Anteil, welches durch einen Phosphoethanolamin-Linker an das C-terminale Ende eines Proteins übertragen wird (Abb. 1.2). Oftmals ist dieser Glycankern mit weiteren Zuckerketten verknüpft (Deeg *et al.*, 1992). Nachdem das GPI-Protein das ER verlassen hat, wird es über den Vesikel-Transportweg in die Plasmamembran eingebaut (Abb. 1.2). Von dort kann das Protein durch eine Transglykosylierung eines Mannoserestes an das β 1,6-Glucan der Zellwand kovalent gekoppelt werden, wobei der Phosphatidylanteil des GPI-Ankers verloren geht (Abb. 1.2) (Lu *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1996; Vossen *et al.*, 1997; Fujii *et al.*, 1999).

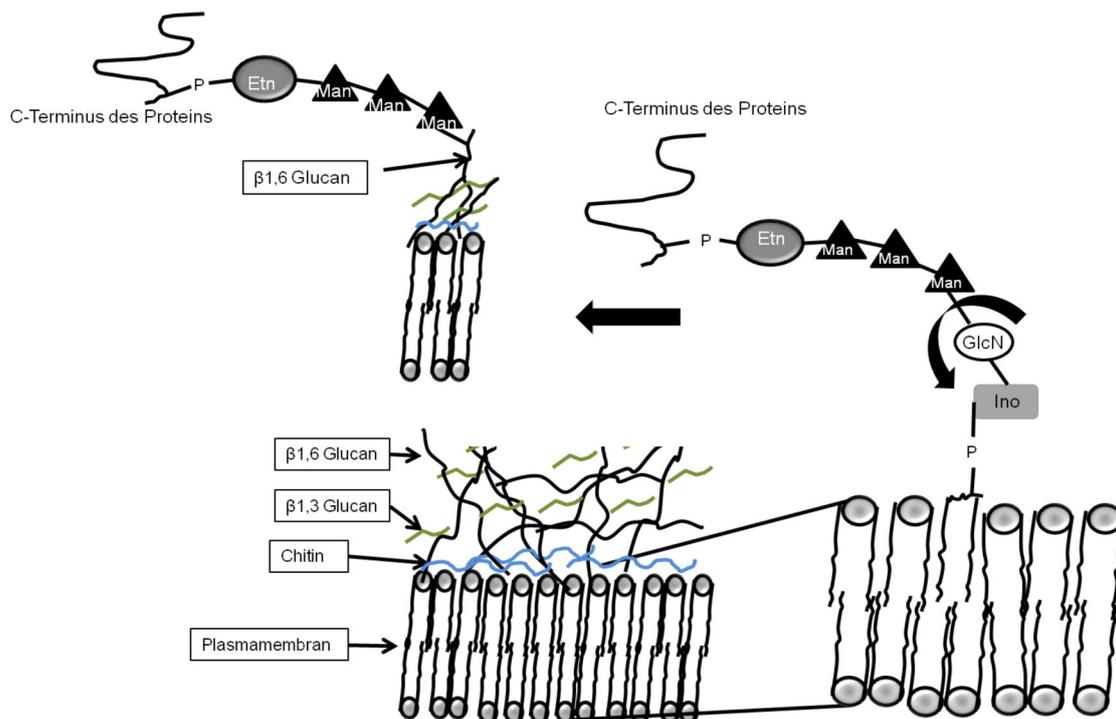


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Transfers eines GPI-Proteins in die Zellwand. Der GPI-Anker ist mit Hilfe des Phosphatidylinositols in der Plasmamembran verankert. Durch eine Transglykosylierung wird der GPI-Anker gespalten und ein Mannoserest des GPI-Restes mit dem β 1,6-Glucan der Zellwand verknüpft. Ino= Inositol, P= Phosphat, Glc= Glucosamin, Man= Mannose, Etn= Ethanolamin.

1.4 Die Futterhefe *Candida utilis*

Die Hefe *C. utilis* gehört zu der Klasse der Deuteromyceten. Deuteromyceten sind imperfekte Pilze, welche sich nicht mit Hilfe sexueller Vermehrung, sondern nur durch Knospung fortpflanzen können. *C. utilis* wird bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts als Futterhefe für Menschen und Tiere eingesetzt und wurde von Wilhelm Henneberg aus verschiedenen Hefefabriken isoliert und mit dem Namen *Torula utilis* versehen (Henneberg, 1926). Im Laufe der Zeit wurden für *Torula utilis* die Synonyme *Saccharomyces jadinii*, *Pichia jadinii*, *Lindnera jadinii* benutzt, was zeigt, wie schwer sich *C. utilis* in die taxonomischen Klassen einordnen lässt (Gronenborn *et al.*, 1984; Jeffery *et al.*, 1989; Riedel und Kunze, 1997). 1970 legten Wickerham und Mitarbeiter den Fokus auf phänotypische Gemeinsamkeiten zwischen *C. utilis* und einem bekannten Ascomyceten, *Hansenula jadinii*, auch *P. jadinii* genannt. Mit Hilfe von DNA-Reassoziationsstudien wurde festgestellt, dass mehr als 85 % der DNA zwischen *C. utilis* und *H. jadinii* übereinstimmen und schlossen daraus, dass *C. utilis* die asexuelle (anamorphe) Form von *P. jadinii* ist (Kurtzman *et al.*, 1979). Diese Ergebnisse wurden bestätigt (Manachini, 1979) und durch phänotypische Gemeinsamkeiten (Wickerham *et al.*, 1970) sowie Sequenzvergleiche der ribosomalen 18S und 26S DNA (Yamada *et al.*, 1995) unterstützt. Der natürliche Lebensraum von *P. jadinii* ist bisher nicht genau bekannt. Da er jedoch wie *C. utilis* Pentosen und Lignin Abbauprodukte toleriert und verwertet,

spielt *P. jadinii* vermutlich eine Rolle bei der Kompostierung von Pflanzenmaterial in der Natur (Kurtzman, 2008).

Aus biotechnologischer Sicht hat *P. jadinii* bisher noch keine Bedeutung. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden weder endo- noch exogene Produkte aus *P. jadinii* isoliert oder hergestellt. Einzig die kodierenden Region für die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (Ostermann *et al.*, 2006) und die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Jeffery *et al.*, 1993) wurden identifiziert und charakterisiert. Wegen der unklaren Verwandtschaft zu *C. utilis*, ist *P. jadinii* möglicherweise ein geeigneter Wirt für die Herstellung rekombinanter Proteine.

Die industrielle Bedeutung von *C. utilis* wuchs mit der Einstufung als GRAS-Organismus der FDA. Durch diese Eingruppierung war es nun möglich, *C. utilis* unbedenklich als Futterhefe, Einzellerprotein, sowie als Expressionsstamm zu nutzen. Der Vorteil von *C. utilis* gegenüber anderen Pilzen besteht darin, dass er nicht nur Hexosen (z. B. Glucose) verwertet, sondern auch auf vielen preiswerten Abfallprodukten, wie dem Abwasser der Papierindustrie (Kurtzman und Fell, 1998), oder auch auf Abfällen der Holzindustrie und Sulfitablaugen der Papierindustrie wächst. Dieses gelingt der Hefe, da sie sehr effizient die Pentose Xylose verwerten kann (Bekatorou *et al.*, 2006). Zusätzlich assimiliert *C. utilis* Nitrat, welches als natürliche Stickstoffquelle für den Pilz dient (Bruinenberg *et al.*, 1983). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* ist *C. utilis* ein "Crabtree-negativer" Pilz, der bei aeroben Bedingungen mit hohen Glucosekonzentrationen keinen Alkohol bildet, welcher oftmals das Wachstum bei anderen Hefespezies behindert (Boze *et al.*, 1992). Auf Grund seiner wichtigen Rolle in der Nahrungsmittelindustrie muss aber darauf hingewiesen werden, dass *C. utilis* auch in Candidosen neonataler Patienten (Lukic-Grlic *et al.*, 2011) und aus dem Blut von AIDS-Patienten (Alsina *et al.*, 1988) isoliert wurde.

1.4.1 *C. utilis* Genom

Über die genomischen Eigenschaften und Besonderheiten von *C. utilis* ist bisher nur wenig bekannt. Unter den vielen untersuchten *C. utilis*-Stämmen besteht eine ausgeprägte Heterogenität bezüglich des Chromosomensatzes, wobei für viele der Stämme die Ploidie jedoch unbekannt ist (Stoltenburg *et al.*, 1992). Auf Grund von Vergleichen des DNA-Gehaltes des *C. utilis*-Stammes ATCC9950 mit haploiden, di- und tetraploiden *S. cerevisiae* Stämmen wurde angenommen, dass *C. utilis* einen drei- bis fünffachen Chromosomensatz besitzt (Ikushima *et al.*, 2009a). Für die Polyploidie von *C. utilis* spricht auch, dass auxotrophe *ura3*-Stämme (Ikushima *et al.*, 2009a) und *pdc1*-Stämme (Ikushima *et al.*, 2009c) erst nach viermaliger Gendisruption erreicht wurden. Jedoch wurde für andere *C. utilis*-Stämme ein haploider Chromosomensatz festgestellt (Rodriguez *et al.*, 1998; Iwakiri *et al.*, 2005b). In einem Vergleich der DNA-Mengen von *C. utilis* DSMZ2361 mit di-, tri- und tetraploiden *S. cerevisiae*-Stämmen wurde durch FACS-Analysen festgestellt, dass dieser *C. utilis*-Stamm einen triploiden Chromosomensatz besitzt (Kunigo, 2013).

Da bisher keine exakten Aussagen über das Genom von *C. utilis* getroffen werden konnten, wurde das komplette Genom von *C. utilis* DSMZ2361 sequenziert (D. Tielker und J. F. Ernst, unveröffentlicht). Dabei wurde eine Genomgröße von 12,5 Mb mit einer 17-fachen Abdeckung durch 454-Sequenzierung bestimmt. Die Annotation des Genoms ergab 6417 mögliche ORFs und 4201 homologe Proteine in der SwissProt-Datenbank. Eine weitere Genomsequenzierung von *C. utilis* NRBC0988 (DSMZ2361) wurde kürzlich veröffentlicht (Tomita *et al.*, 2012). Hierbei wurden 14,6 Mb sequenziert und 8646 potentielle Gene wurden identifiziert, welche für Proteine kodieren.

1.4.2 *C. utilis* als Expressionswirt

Auf Grund der oben genannten Eigenschaften ist *C. utilis* prädestiniert für die Herstellung endogener, sowie rekombinanter Stoffe. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden einige endogene Produkte, wie zum Beispiel Glutathion (Liang *et al.*, 2008), Biotin (Hong *et al.*, 2006), Gluconmannan (Ruszova *et al.*, 2008) L-Phenylacetylcarbinol (Khan und Daugulis, 2011), RNA, NAD⁺ (Chakravorty *et al.*, 1962) und einige Enzyme, wie zum Beispiel Invertase (Belcarz *et al.*, 2002), aus *C. utilis* gewonnen (Tabelle 1.1). Mit der Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie, sowie der Entwicklung von Expressionsvektoren und Transformationssystemen wurden erstmals auch rekombinante Proteine in *C. utilis* produziert. Von Ikushima und Mitarbeiter wurde die "*autonomous replicating sequence*" (ARS) für die effiziente Transformation von Expressionsplasmiden identifiziert und für die Transformation eingesetzt (Ikushima *et al.*, 2009a). Des Weiteren wurden bereits einige Resistenzmarker in *C. utilis* für die Transformation und Gendisruption benutzt. Dieses gelang durch die Überexpression des ribosomalen *RPL41*- bzw. des *YAP1*-Gens, die zu einer Resistenz gegenüber Cycloheximid führen (Kondo *et al.*, 1995; Iwakiri *et al.*, 2005a). Zusätzlich wurden Geneticin- und Hygromycin-resistente Stämme durch die heterologe Expression der bakteriellen *aph*- und *hph*-Gene konstruiert (Ikushima *et al.*, 2009a). Ikushima und Mitarbeiter (2009) konstruierten zum ersten Mal einen auxotrophen *ura3*-Stamm mit Hilfe eines *cre-lox* Rekombinationssystems (Ikushima *et al.*, 2009b).

Durch diese Fortschritte in der rekombinanten DNA-Technologie war es erstmals möglich, heterologe Proteine intrazellulär in *C. utilis* zu produzieren. Dieses erfolgte hauptsächlich durch die chromosomale Integration der Expressionsplasmide und der Expression der Gene unter der Kontrolle von starken, konstitutiven glykolytischen Promotoren, wie dem *TDH3*-Promotor. Zu diesen heterolog hergestellten Proteinen zählen unter anderem der Süßstoff Monellin (Kondo *et al.*, 1997), eine α -Amylase aus *Sulfolobulus solfataricus* (Miura *et al.*, 1999) und eine Xylanase (Wei *et al.*, 2009). Durch intrazelluläre Produktion konnten große Mengen der gewünschten Produkte gewonnen werden- Monellin stellte 50 % der löslichen Proteine dar und die α -Amylase-Ausbeute betrug 12,3 g/l. Zusätzlich dazu wurde *C. utilis* für die

1. Einleitung

Herstellung von verschiedenen Carotinoiden und Isopropanol benutzt (Miura *et al.*, 1998a; Miura *et al.*, 1998b; Shimada *et al.*, 1998; Tamakawa *et al.*, 2013). Die höchste jemals erreichte Ausbeute an Milchsäure in Hefen (103,3 g/l) wurde durch einen rekombinanten *C. utilis*-Stamm nach Wachstum auf Glucose erzielt (Ikushima *et al.*, 2009c) (Tabelle 1.1). Zusätzlich dazu wurde die Fähigkeit von *C. utilis* auf Xylose zu wachsen und diese effizient zu verwerten für die Produktion von Milchsäure und Bioethanol benutzt. Im Fall der Milchsäureherstellung wurde ein Pyruvat-Decarboxylase (*PDC1*)-defizienter Stamm eingesetzt, welcher drei Gene mit veränderter Coenzympräferenz des Xylose-Stoffwechsels heterolog exprimiert. Dabei wurden pro Gramm Xylose 0,91 g Milchsäure produziert (Tamakawa *et al.*, 2012). Die Umwandlung von Xylose in Ethanol wurde durch die genomische Integration einer Xylose-Reduktase und einer Xylitol-Dehydrogenase verbessert, so dass aus 50 g/l Xylose 17,4 g/l Ethanol produziert wurden (Tamakawa *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass *C. utilis* ein geeigneter Wirt für die heterologe Proteinproduktion ist. All diesen Studien ist gemeinsam, dass die rekombinante Proteinherstellung intrazellulär stattfand. Bisher wurde noch keine heterologe Proteinsekretion in *C. utilis* dokumentiert.

Tabelle 1.1: *C. utilis* als Expressionswirt. Diese Tabelle gibt einen Ausschnitt der bisher hergestellten Produkte in *C. utilis* wieder. Alle der aufgelisteten Produkte wurden intrazellulär hergestellt.

Produkt	(heterolog) exprimierte Gene	Promotor	Ausbeute	Referenz
Invertase	-	-	1496,8 U/mg	Belcarz <i>et al.</i> , 2002
L-Phenylacetylcarbinol	-	-	11,6 g/l	Khan und Daugulis, 2011
β-D-Xylosidase	-	-	0,3 mg/l	Yanai und Sato, 2001
Biotin	<i>BIO2 (C. utilis)</i>	<i>CuTDH3</i>	1,8 mg/l	Hong <i>et al.</i> , 2006
L- Milchsäure	<i>L-LDH (Bos taurus)</i> , <i>XR</i> , <i>XDH (C. shehatae)</i> , <i>XK (P. stipitis)</i>	<i>CuTDH3</i>	93,3 g/l aus 105 g/l Xylose	Tamakawa <i>et al.</i> , 2012
L- Milchsäure	<i>L-LDH (Bos taurus)</i>	<i>CuPDC1</i>	103,3 g/l	Ikushima <i>et al.</i> , 2009c
Xylanase	<i>XYNA (S. olivaceoviridis)</i>	<i>CuTDH3</i>	60 IU/ml	Wei <i>et al.</i> , 2008
Monellin	<i>MNE1 (D. cumminisii)</i>	<i>CuTDH3</i>	10 mg/g Nassgewicht	Kondo <i>et al.</i> , 1997
Lycopene	<i>CRTE</i> , <i>CRTB</i> , <i>CRT1 (Erwinia uredovora)</i> , <i>HMG (C. utilis)</i>	<i>CuTDH3</i> , <i>CuPGK1</i> , <i>CuPMA1</i>	7,8 mg/g Trockengewicht	Shimada <i>et al.</i> , 1998
Isopropanol	<i>ACS2</i> , <i>ERG10 (C. utilis)</i> ; <i>ctfa</i> , <i>ctfb (C. acetobutylicum)</i> ; <i>adc</i> , <i>sadh (C. beijerinckii)</i>	<i>CuTDH3</i>	27,2 g/l	Tamakawa <i>et al.</i> , 2013
α-Amylase	<i>AMYA (Sulfolobulus solfataricus)</i>	<i>CuTDH3</i>	12,3 g/l	Miura <i>et al.</i> , 1999
β-Carotin	<i>CRTY</i> , <i>CRTE</i> , <i>CRTB</i> , <i>CRTI (E. uredovora)</i>	<i>CuP57</i> , <i>CuTDH3</i> , <i>CuPGK1</i> , <i>CuP14</i>	0,4 mg/g Trockengewicht	Miura <i>et al.</i> , 1998a, b
Ethanol	<i>XR</i> , <i>XDH (C. shehatae)</i> , <i>XK (P. stipitis)</i>	<i>CuTDH3</i>	17,4 g/l aus 50 g/l Xylose	Tamakawa <i>et al.</i> , 2011

1.5 *Candida antarctica* Lipase B als Modellenzym der Proteinsekretion

Lipasen sind Enzyme, welche die Hydrolyse von Estern und Fetten katalysieren. Ein Vertreter dieser Enzymgruppe ist die *C. antarctica* Lipase B (CalB). Wie viele andere Lipasen besitzt CalB die typische α/β -Hydrolase Faltung (Uppenberg *et al.*, 1994). Die Proteinsequenz der CalB besteht aus 342 Aminosäuren, inklusive einer 18 Aminosäure-langen Sekretions-Signalsequenz und einem Propeptid mit 7 Aminosäuren, welche am C-terminalen Ende eine Erkennungssequenz (K-R) für die Serinprotease Kex2 besitzt (Abb. 1.3). CalB wird posttranslational durch eine Glykosylierung an Asparagin99 (N99) und durch drei Disulfidbrücken (C47-C89; C241-C283; C318-C336) modifiziert (Uppenberg *et al.*, 1994).

Auf Grund ihres breiten Substratspektrums, sowie der Synthese optisch reiner Chemikalien, der Stabilität in organischen Lösungsmitteln und der Enantioselektivität gegenüber sekundären Alkoholen (Magnusson *et al.*, 2005), wird CalB vor allem in der chemischen Industrie gerne verwendet. Eine heterologe Produktion der CalB wurde bisher extrazellulär in Pilzen (Rotticci-Mulder *et al.*, 2001; Larsen *et al.*, 2008; Emond *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2010) erfolgreich durchgeführt und konnte auch in *E. coli* erzielt werden, da die Glykosylierung an N99 nicht für die Aktivität notwendig ist (Blank *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2008).

```

CalB  1  MKLLSLTGVAGVLATCVAATPLVKRLPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGASPSSVSKPIL
CalB  61  LVPGTGTTGPQSFDSNWIPLSTQLGYTPCWISPPPFMLNDTQVNTTEYMVNAITALYAGSG
CalB 121  NNKLPVLTWSQGGLVAQWGLTFFPSIRSKVDRMLMAFAPDYKGTVLAGPLDALAVSAPSVW
CalB 181  QQTGGSALTTALRNAGGLTQIVPTTNLYSATDEIVQPQV SNSPLDSSYL FNGKNVQAQAV
CalB 241  CGPLFVIDHAGSLTSQFSYVWGRSALRSTTGQARSADYGITDCNPLPANDLTPEQKVAAA
CalB 301  ALLAPAAAAIIVAGPKQNCPEPLMPYARPFVAVGKRTC SGIVTP

```

Abb. 1.3: Aminosäuresequenz der CalB. Die Aminosäuresequenz der CalB mit der N-terminalen Signalsequenz. Die mutmaßliche Schnittstelle für die Signalsequenz ist mit einem offenen Dreieck gekennzeichnet, die Kex2-Schnittstelle, nach der Prä-Pro-Sequenz, mit einem Pfeil. Die N-Glykosylierungsstelle (N99) der CalB ist mit einem schwarzen Kreis markiert, die katalytischen Aminosäuren sind **fett** dargestellt.

Die Beliebtheit der CalB als Reporterprotein für die Sekretion ist mit einem einfachen lipolytischen Aktivitätsnachweis zu erklären. Eine lipolytische Aktivität ist durch eine Aufhellung trüber Tributyrin-Agarplatten nachweisbar (Kok *et al.*, 1993). Ein quantitativer Nachweis lässt sich mit spektrometrischen Flüssigtests durchführen. Hierbei können verschiedene, kommerziell erhältliche para-Nitrophenol (pNP) Derivate eingesetzt werden, die in para-Stellung eine beliebige Fettsäure/ Ester enthalten. Durch Hydrolyse dieser pNP-Derivate entsteht eine Farbänderung, welche sich spektrometrisch messen lässt (Huggins und Lapidés, 1947).

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein heterologes Sekretionssystem in *C. utilis* zu etablieren. Hierfür wurde in einem ersten Schritt das Sekretom unter verschiedenen Wachstums- und Nährstoffbedingungen charakterisiert, um das sekretorische Potential von *C. utilis* zu bestimmen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollte mit Hilfe der CalB ein heterologes Sekretionssystem in *C. utilis* konstruiert und untersucht werden. Dabei wurde der Einsatz verschiedener Sekretionssignalsequenzen und Promotoren untersucht.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollten verschiedene Reporterproteine durch die Fusion an ein GPI-Zellwandprotein auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Hierfür wurden die Sekretions- und GPI-Signalsequenzen des Zellwandproteins Gas1 verwendet.

2 Material und Methoden

Chemikalien und Enzyme

Enzyme, sowie Chemikalien für die Herstellung von Puffern und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, im Reinheitsgrad „*pro analysis, p.a.*“ von den Firmen Agilent Technologies (Böblingen), Ambion (Kassel), Amersham (Braunschweig), Biorad (München), B. Braun (Melsungen), Calbiochem (Bad Soden), Difco (Michigan), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), Merck AG (Darmstadt), MBI Fermentas (St. Leon Rot), New England Biolabs (Schwalbach), Pierce (Rockford), Promega (Madison), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), Stratagene (La Jolla, USA), ThermoFisher (Schwerte), WERNER BioAgents (Jena), Whatman (Maidstone, GB), Zymo Research (Freiburg) bezogen.

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Stämme und Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete Stämme.

Art	Stamm	Genotyp	Referenz/ Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α F'	F- [Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15] Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 recA1 endA1 hsdR17 rk-mk + supE44 thi-1 gyrA1 relA</i>	Hanahan, 1983; Woodcock <i>et al.</i> , 1989
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	B76/4	<i>MATaα, trp1/trp1, ura3-52/ura3-52, put2-57/put2-57, gal1/gal1</i>	Stammsammlung Molekulare Mykologie
	CBSc1	<i>MATa trp1-901 leu2,3-112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ mit Plasmiden pGBD-C1 und pCl2</i>	Stammsammlung Molekulare Mykologie
<i>Candida utilis</i>	DSMZ2361 (ATCC 9950)	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig
	MKCu1	wie DSMZ 2361, aber mit pMC1 (<i>TDH3p</i>)	Diese Arbeit
	CBCu1	wie DSMZ 2361, aber mit pCB1 (<i>TDH3p-CALB^{HA}</i>)	Diese Arbeit
	CBCu2	wie DSMZ 2361, aber mit pCB2 (<i>TDH3p-GAS1</i>)	Diese Arbeit
	CBCu3	wie DSMZ 2361, aber mit pCB4 (<i>TDH3p-gas1Δ-CALB^{HA}</i>)	Diese Arbeit
	CBCu4	wie DSMZ 2361, aber mit pCB5 (<i>TDH3p-CALB^{His}</i>)	Diese Arbeit
	CBCu5	wie DSMZ 2361, aber mit pCB7 (<i>TDH3p-gas1Δ-lacZ</i>)	Diese Arbeit
	CBCu6	wie DSMZ 2361, aber mit pCB9 (<i>TDH3p-INV1-CALB^{HA}</i>)	Diese Arbeit
	CBCu7	wie DSMZ 2361, aber mit pCB13 (<i>TDH3p-gas1Δ-MOG</i>)	Diese Arbeit
	CBCu8	wie DSMZ 2361, aber mit pCB10	Diese Arbeit

2. Material und Methoden

		(<i>TDH3p-gas1Δ-MOG-MOG</i>)	
	CBCu9	wie DSMZ 2361, aber mit pCB14 <i>TDH3p-CALB-3×HA-CuHIS3</i>)	Diese Arbeit
	CBCu10	wie DSMZ 2361 aber mit pCB15 (<i>TDH3p-gas1Δ-MOG-MOG-CuHIS3</i>)	Diese Arbeit
	CBCu11	wie DSMZ 2361, aber mit CalB mit pCB11 (<i>MFA1-CALB</i>)	Diese Arbeit
	CBCu12	wie DSMZ 2361, aber mit pCB12 (<i>TDH3p-UML2^{HA}</i>)	Diese Arbeit
	CBCu13	wie DSMZ 2361, aber mit pCB16 (<i>PGK1p-CALB^{HA}</i>)	Diese Arbeit
	CBCu16	wie DSMZ 2361, aber mit pCB17 (<i>PMA1^{HA}</i>)	Diese Arbeit
	CBCu17	Wie CBCu8, aber nach Stabilitätstest	Diese Arbeit
<i>Pichia jadinii</i>	CBS 1600	Wildtyp prototroph	CBS, Utrecht, Niederlande
	CBPj1	wie CBS16500, aber mit pMC1 (<i>TDH3p</i>)	Diese Arbeit
	CBPj2	wie CBS16500, aber mit pCB1 <i>TDH3-CALB^{HA}</i>)	Diese Arbeit
<i>Pichia pastoris</i>	X-33	Wildtyp prototroph	Life Technologies, Darmstadt
	CBPp	wie X-33, aber mit pPICZ-A (<i>AOX1p</i>)	Diese Arbeit
	CBPp1	wie X-33, aber mit pPICZ-CALB (<i>AOX1p-CALB^{myc-His}</i>)	Diese Arbeit
	PpUml2	wie X-33, aber mit pPICZ-UML2 (<i>AOX1p-UML2^{myc-His}</i>)	Diese Arbeit
<i>Ustilago maydis</i>	AB33	<i>a2 b2 Pnar1:bW2 bE1</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 2001

Folgende Medien wurden für die Anzucht von *E. coli* Kulturen verwendet:

- **Luria-Bertani-Medium (LB)** 1 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
0,5 % NaCl

Für die Herstellung fester Nährböden wurden 2 % Agar hinzugefügt.

Zur Selektion plasmidkodierter Antibiotikaresistenzen wurden dem Medium nach dem Autoklavieren entweder Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) oder Zeocin (100 µg/ml) hinzugefügt. Selektion auf LacZ-Aktivität erfolgte auf IPTG-X-Gal-Platten (50 µg/ml X-Gal, 50 µg/ml IPTG).

- **Tributylin-Agarplatten**

Für die qualitative Detektion von Lipaseaktivität wurden Tributyrinplatten benutzt (Kok *et al.*, 1993). Hierfür wurden 15 ml einer Tributyrinlösung (7,5 ml Tributyrin, 0,75 g Gummi Arabicum, 7,5 ml H₂O) mit Hilfe von Ultraschall emulgiert und zu 475 ml autoklaviertem YPD-Agar (YPD-Medium mit 2 % Agar) hinzugefügt. Lipaseaktivität wurde durch eine Klärung der trüben Platte in der Umgebung der Kolonie/ aufgetragenen Probe nachgewiesen.

Folgende Medien wurden für die Anzucht von Hefestämmen verwendet:

- **YP (Vollmedium):**

- 2 % (w/v) Pepton
- 1 % (w/v) Hefeextrakt

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 2 % Glucose (YPD) oder 2 % Xylose (YPX) hinzugefügt.

- **SD (Minimalmedium mit Glucose)**

- 0,67 % Yeast Nitrogen Base (YNB) ohne Aminosäuren
- 2 % Glucose

- **SX (Minimalmedium mit Xylose)**

- 0,67 % YNB ohne Aminosäuren
- 2 % Xylose

Den Minimalmedien wurden nach dem Autoklavieren 50 ml Aminosäurelösung (0,28 g/l Adenin, 0,48 g/l Arginin, 0,72 g/l Tyrosin, 1,44 g/l Isoleucin, 0,72 g/l Lysin, 1,2 g/l Phenylalanin, 0,72 g/l Valin, 0,72 g/l Threonin, 0,48 g/l Methionin, 0,40 g/l Histidin) hinzugefügt. Diese angereicherten Minimalmedien wurden mit SMD (Glucose) oder SMX (Xylose) bezeichnet.

- **BMMY**

Das BMMY-Medium wurde für die heterologe Proteinherstellung in *P. pastoris* benutzt.

- 1 % Hefeextrakt
- 2 % Pepton
- 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0
- 1,34 % YNB
- 4×10^{-5} % Biotin
- 1 % Methanol

Die Zugabe von 1 % Methanol (Endkonzentration) wurde während des Wachstums alle 24 h wiederholt.

- **Pseudohyphenwachstum**

Für die Induktion von Pseudohyphen wurden SLAD-Agarplatten (1,7 g/l YNB ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ohne Aminosäuren, 2 % Glucose, 2 % Agar) verwendet. Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 50 μM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hinzugefügt und die Platten bei 30 °C inkubiert.

Zur Selektion auf Nourseothricin-Resistenz wurde den Medien nach dem Autoklavieren 10 $\mu\text{g/ml}$ Nourseothricin hinzugefügt. Für die Selektion auf Zeocinresistenz wurde dem Medium Zeocin in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ hinzugefügt. Die Herstellung fester Nährböden erfolgte durch die Zugabe von 2 % Agar.

Alle Medien wurden vor Benutzung für 20 min bei 121 °C hitzesterilisiert. Hitzeempfindliche Substanzen wurden mit Hilfe eines Filters (Porengröße 0,2 µm) steril-filtriert.

2.1.2 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mit der Rubidiumchlorid-(RbCl) Methode nach Hanahan *et al.* (1983). 25 ml LB-Medium werden mit einer *E. coli* Übernachtskultur auf eine $OD_{600\text{ nm}} = 0,1$ angeimpft und bei 37 °C bis zur exponentiellen Phase der Zellen ($OD_{600\text{ nm}} = 0,3- 0,5$) inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 4 ml kaltem RF1-Puffer (100 mM RbCl, 30 mM KAc, 10 mM $CaCl_2$, 15 % Glycerin (v/v), pH 5,8) resuspendiert und für 2 h bei 4 °C gelagert. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 5 min, 3.500 Upm) wurden die Zellen in 1 ml RF2-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2$, 15 % (v/v) Glycerin, pH 6,8) aufgenommen, 15 min auf Eis gelagert und in 100 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen pro Transformationsansatz langsam auf Eis aufgetaut. 10-100 ng Plasmid-DNA wurden hinzugefügt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 90 s bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen nochmals für 2 min auf Eis inkubiert. Zur Regeneration wurden 900 µl LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 60 min bei 37 °C geschüttelt (110 Upm). 100 µl der Ansätze wurden auf Selektivagarplatten ausgestrichen und der Rest des Ansatzes abzentrifugiert (5 min, 3.500 Upm). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Restmedium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht (üN) bei 37 °C.

2.1.3 Hefe-Transformation

Die Transformation von Plasmiden in Hefezellen erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode von Mitchell (Wilson *et al.*, 1999). Hierfür wurden 50 ml YPD-Medium mit einer Übernachtskultur der Hefen auf eine $OD_{600\text{ nm}} = 0,1$ eingestellt und 4-6 h (bis zum Erreichen der exponentiellen Phase, $OD_{600\text{ nm}} = 1-5$) bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C für 5 min bei 3.500 Upm abzentrifugiert und das Zellepellet in 5 ml LATE-Puffer (0,1 M Lithiumacetat, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 5,0) gewaschen. Das Pellet wurde in 0,5 ml LATE-Puffer resuspendiert und in 100 µl Volumina aliquotiert. Ein Zellaliquot wurde mit 5 µl Heringsperma (10 mg/ml), 2-10 µg Plasmid-DNA oder 80 µl PCR-Produkt gemischt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 700 µl PLATE-Puffer (40 % PEG3350 (w/v) in LATE-Puffer) hinzugefügt und der Transformationsansatz über Nacht bei 30 °C inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 1 h, bevor der Ansatz zentrifugiert (5 min, 3.500 Upm) und in 5 ml YPD-Medium resuspendiert wurde. Die Regeneration der Zellen erfolgte bei 30 °C für mindestens 4 h. Abschließend wurde der Ansatz nochmals zentrifugiert (5 min, 3.500 Upm) in 100 µl H_2O resuspendiert und auf selektiven Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.1.4 Stabilitätstest der Transformanten

Um die Stabilität einzelner Stämme zu testen wurden diese auf die Beibehaltung des transformierten Plasmids getestet. Hierfür wurden 50 ml YPD-Medium auf eine $OD_{600\text{ nm}} = 0,1$ mit einer Übernachtskultur des Stammes angeimpft. Einer weiteren Kultur wurden zusätzlich 10 $\mu\text{g/ml}$ Nourseothricin zugesetzt um die Hefen unter Selektionsdruck wachsen zu lassen. Die Kulturen wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die optische Dichte wurde gemessen und daraus die Generation der Kultur bestimmt. Da eine Verdopplung der optischen Dichte der Erhöhung der Generation um 1 entspricht, lässt sich mit folgender Gleichung die Generation berechnen:

$$G_{\text{akt}} = \frac{\ln \frac{OD_{600\text{ nm}}}{0,1}}{\ln(2) + Gen_{\text{alt}}}$$

Wobei hier 0,1 der $OD_{600\text{ nm}}$ der Startkultur entspricht, „Gen_{alt}“ für die Generation des vorherigen Tages steht, und G_{akt} die Zahl der aktuellen Generation angibt.

Die Kulturen wurden bis zur 50. Generation überimpft. Daraufhin wurden die Kulturen abzentrifugiert (5 min, 3.500 Upm) und ein Aliquot jeder Kultur auf YPD-Agarplatten in einem Vereinzelausstrich aufgetragen. Nach 48 h Inkubation bei 30 °C wurden 100 Einzelkolonien gepickt und auf YPD-Platten mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Nourseothricin transferiert. Nach abschließender Inkubation für 48 h bei 30 °C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt. Die Versuche wurden mit drei biologischen Replikaten durchgeführt.

2.2 Molekularbiologische/gentechnische Methoden

2.2.1 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 2.2: Primerliste. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind kursiv dargestellt.

Name	Sequenz
TDH3p Rev	5'-CCAAGCTTTATGTTGTTTGTAAGTGTG-3'
TDH3p FWD	5'-TTGGCGCCCTTACAGCGAGCACTCAAATC-3'
PGK1p FWD	5'-GGGGGCGCCTTGTCTTTTAGGAG
PGK1p REV	5'-CCCAAGCTTCTTTATCCGCCAGTATG
PMA1p FWD	5'-GAAGGCGCCTCTAGAGCTGTGCAC
PMA1p REV	5'-CCAAGCTTCTATATCAATGGTTAG
Gas1 Fwd	5'- CCCAAGCTTAATAATGAGATTCAACTGGGCCTTGGCTTCTGCGTTCGCTG- 3'
Gas1 Rev	5'- GATATCTCAGAACAAGAAAGCACCCATGCTAACTGTGAAGAAAGTACCG- 3'
CalB his Fwd	5'-CGCGGCCGCATATCTCATCATCATCATCATTGAGCAT-3'
CalB his Rev	5'-GCTCAATGATGATGATGATGATGAGATATCGCGGCCGCGAT-3'
CalB Nhe1 Fwd	5'-CTAGCTAGCGCTACCCATTGGTCAAG-3'
CalB Nhe1 Rev	5'-CTAGCTAGCTGCGAAGTGGCGCGCCTC-3'
SP-GPI Fwd	5'-GCTAGCTCAACTTCTTCATCTACCG-3'
SP-GPI Rev	5'-CTGGTTAGCAAGAGCAAC-3'
CalB PICZ Fwd	5'-CGAATTCAATAATGGAAGTTGTTGTCCTTGAC-3'

2. Material und Methoden

CalB PICZ Rev	5'- AAGGGCCCTGGGGTGACGATACCAGAACA-3'
INV-SP-FWD	5'- GCAAGCTTATGTCGTTGACAAAAG-3'
INV-SP-REV	5'- CGGATATCGGAATCAACTAACTAG-3'
Prä-Pro-CalB-FWD	5'-GATATCTTGCCATCTGGTTCTGAC-3'
Prä-Po-CalB-REV	5'-TCTCTTGACCAATGGGGTAG-3'
lacZ Fwd	5'- CTAGCTAGCATGAACATGACT-3'
lacZ Rev	5'- CTAGCTAGCATTAGTGGTTC-3'
CuHIS3 Fwd	5'-TTGGTACCATGGCTGAAACGAACGGGG-3'
CuHIS3 Rev	5'-GGGGTACCCTAGAACAAAACACCCTTTG-3'
Sonde CuHIS3 Rev	5'-CAGTGAGCGCAACGCAATTAATG-3'
Sonde CalB	5'- CGATAACGAACAATGGACCAC-3'
α Prä-Pro Fwd	5'-TTAAGCTTATGAGATTCCCATCCATC-3'
α Prä-Pro Rev	5'-GGGGATATCTCTCTTCTCCAAAGAAACAC- 3'
Uml2 Fwd	5'- GGAATTCAATAATGAAGACAACCTCGGTCATC- 3'
Uml2 rev	5'-AAGGGCCCATTGATCGTTCAGAGCACGTC- 3'
Uml2PICZ-FWD	5'- GGAATTCAATAATGAAGACAACCTCGGTCATC-3'
Uml2PICZ-FWD	5'- AAGGGCCCATTGATCGTTCAGAGCACGTC-3'
RT-CuXDH1 Fw	5'-CAAGGTCAACATCGAGCCTA-3'
RT-CuXDH1 Rv	5'-CCATTGTGCAGGTTGAAGTC-3'
sat1-FWD	5'-GCGGCATTGACCTATTCACGTA-3'
sat1-Rev	5'-CTCCCGAGAACCAGTACCAGTA-3'

2.2.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten oder hergestellten Plasmide sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 2.3: Plasmidliste.

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pSat1-3HA	3×HA-ADH1t, ACT1p-sat1-ACT1t	Setiadi <i>et al.</i> , 2006
pSat1-3HA-ARS	wie pSat1-3HA aber mit CaARS2 Sequenz	Diese Arbeit
pSat1-3HA-ARS-CALB	wie pSat1-3HA-ARS aber mit CALB-ORF in Phase mit 3×HA Epitop	Diese Arbeit
pMC1	wie pSat1-3HA-ARS aber mit CuTDH3p	Diese Arbeit
pMC9	wie pSat1-3HA-ARS aber mit CuPGK1p	Kunigo, 2013
pMC13	wie pSat1-3HA-ARS aber mit CuPMA1p	Kunigo, 2013
pGeneArt-CALB	Plasmid mit Kodon-optimierter CALB-Sequenz für <i>C. utilis</i>	GeneArt
pCB1	wie pSat1-ARS-CALB aber mit TDH3p-CALB ^{HA}	Diese Arbeit
pCB2	wie pCB5 aber mit TDH3p-Gas1	Diese Arbeit
pCB3	wie pCB2 aber mit TDH3p-gas1Δ (interne Deletion)	Diese Arbeit
pCB4	wie pCB3 aber mit TDH3p-gas1Δ-CALB ^{HA}	Diese Arbeit
pCB5	wie pCB1 aber mit TDH3p-CALB ^{His6}	Diese Arbeit
pAU36	CaACT1p-StlacZ	Uhl und Johnson, 2001
pCB7	wie pCB3 aber TDH3p-gas1Δ-lacZ	Diese Arbeit
pCB8	wie pCB1 aber mit EcoRV-Schnittstelle nach Prä-Pro-Sequenz von CALB	Diese Arbeit
pCB9	wie pCB8 aber mit CuINV1 Prä-Sequenz an Stelle CALB-Prä-Pro Sequenz	Diese Arbeit
pCB10	wie pCB3 aber mit TDH3p-gas1Δ-MOG-MOG-3×HA	Diese Arbeit
pCB11	wie pCB8 aber mit Prä-Pro Sequenz des MFα1 anstatt der	Diese Arbeit

	CALB-Prä-Pro-Sequenz	
pCB12	wie pCB1 aber mit <i>TDH3p-UML2^{HA}</i>	Diese Arbeit
pCB13	wie pCB3 aber mit <i>TDH3p-gas1Δ- MOG</i>	Diese Arbeit
pCB14	wie pCB1 aber mit <i>CuHIS3</i>	Diese Arbeit
pCB15	wie pCB10 aber mit <i>CuHIS3</i>	Diese Arbeit
pCB16	wie pSat1-3HA-ARS-CALB aber mit <i>PGK1p-CALB^{HA}</i>	Diese Arbeit
pCB17	wie pSat1-3HA-ARS-CALB aber mit <i>PMA1p^{HA}</i>	Diese Arbeit
pMOG	GeneArt Plasmid mit MOG-Sequenz	GeneArt
pPICZ-A	<i>P. pastoris</i> Expressionsvektor mit <i>AOX1p</i> und <i>ble</i> (Zeocin Resistenz)	Invitrogen
pPICZ-CALB	wie pPICZ-A aber mit <i>AOX1p-CALB^{myc-His}</i>	Diese Arbeit
pPICZ-Uml2	wie pPICZ-A aber mit <i>AOX1p-UML2^{myc-His}</i>	Diese Arbeit

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987) diente zur Amplifikation und Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen. Die Reaktionen wurden in einem Gradientencycler (Mastercycler pro, Eppendorf) oder einem Thermocycler von Biometra durchgeführt.

Das Gesamtvolumen einer Reaktion betrug, soweit nicht anders angegeben, 50 µl und wurde folgendermaßen zusammengesetzt: 1-10 ng "template-" DNA, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP), je 1 µl (20 µM) des 5'- und 3'- Primers, 5 µl 10x Puffer, 1-5 U Polymerase, mit dH₂O wurde auf 50 µl aufgefüllt. Für Verifizierungsversuche wurde die "OneTaq" DNA-Polymerase (NEB) laut Herstellerangaben benutzt. Für PCR-Fragmente, welche für Klonierungen oder Transformationen benutzt wurden, wurde die Phusion High-Fidelity-Polymerase (NEB) laut Herstellerangaben eingesetzt. Die Annealing-Temperatur der Primer, sowie die Elongationszeit wurden entsprechend der Primereigenschaften und erwarteten DNA-Produktgröße angepasst. Für die Reinigung von PCR-Produkten wurde das "NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up"-Kit von Machery und Nagel benutzt.

Für eine Kolonie-PCR (cPCR) wurden die Zellen für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend für die PCR wie oben beschrieben eingesetzt.

2.2.3.1 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR wurde dazu benutzt, in DNA-Fragmenten bestimmte Mutationen (Insertion, Deletion, Basenaustausch) durchzuführen. Hierfür wurde die Phusion High-Fidelity Polymerase (NEB) laut Herstellerangaben benutzt. Wie bei der Standard-PCR wurde auch hier die Elongationszeit der Polymerase sowie die Annealing Temperatur dem PCR-Produkt bzw. den Primerspezifikationen angepasst. Nach erfolgter PCR wurden dem Reaktionsansatz 10 U *DpnI* zugefügt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Amplifikat transformiert oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Quantitative PCR

Die quantitative PCR basiert auf dem Prinzip der normalen PCR wie sie im vorigen Abschnitt beschrieben wurde. Allerdings kann bei der qPCR die Amplifikation eines bestimmten PCR-Produktes während der gesamten Reaktion beobachtet werden und ermöglicht somit nicht nur eine Endpunktbestimmung der DNA, sondern eine Quantifizierung in Echtzeit. Eine unbekannte Menge an Ausgangs-DNA kann somit bestimmt werden und in Relation zu bekannten Mengen an DNA oder der Genkopieanzahl in einem Genom gesetzt werden. Die Quantifizierung erfolgt hierbei durch ein Fluoreszenzmolekül, welches sequenzunspezifisch an das neu gebildete, doppelsträngige DNA-Molekül interkaliert. In dieser Arbeit wurde der "my-Budget 5x EvaGreen (R) QPCR-Mix II (ROX)"-Kit (BioBudget) benutzt. Als Fluoreszenzfarbstoff dient hierbei EvaGreen, welcher bei Anwesenheit von dsDNA Licht bei 520 nm emittiert. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge an dsDNA. Alle Messungen wurden in einem Mx3000P (Stratagene) in 96well-Platten durchgeführt. Die PCR-Ansätze wurden wie folgt angesetzt:

4 µl my-Budget 5x EvaGreen (R) QPCR-Mix II (ROX)
400 nM Primer 1
400 nM Primer 2
5 ng DNA
mit H₂O auf 20 µl auffüllen

Alle gDNA Proben wurden in einer Dreifachbestimmung gemessen. Außerdem wurde von jedem Primerpaar eine „no template control“ (NTC) (gDNA durch H₂O ersetzt) als Kontrolle gemessen um Primer-Dimerprodukte oder auch DNA-Kontaminationen auszuschließen. Des Weiteren wurden Kontrollen ohne Fluoreszenzfarbstoff und ein Ansatz nur aus Wasser angesetzt. Das PCR-Reaktionsschema wurde folgendermaßen programmiert:

95 °C 15 min
95 °C 15 sec
60 °C 20 sec
72 °C 20 sec } 40x

Im Anschluss daran wurde eine Analyse der Schmelzkurve der PCR-Produkte durchgeführt. Dazu wurden die Reaktionsansätze zunächst für 1 min bei 95 °C erhitzt um die entstandenen PCR-Produkte zu denaturieren. Anschließend wurde die Temperatur auf 55 °C abgesenkt, gefolgt von einer kontinuierlichen Erhöhung der Temperatur von 55 °C auf 95 °C (0,2 °C/sec). Dabei erfolgte eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten. Wenn die spezifische Schmelztemperatur eines PCR-Produkts erreicht ist, liegt dieses zu 50 % in Einzelsträngen vor. Dies führt zu einem plötzlichen Fluoreszenzabfall da der Fluoreszenzfarbstoff sich von der Einzelstrang-DNA löst.

Für die Auswertung der Daten wurde der Threshold Cycle (Ct-Wert) der jeweiligen Reaktion genutzt. Der Ct-Wert gibt die Zyklenzahl an, bei welcher die Fluoreszenz des Reporters die Hintergrundfluoreszenz zum ersten Mal signifikant übertrifft. Die PCR-Reaktion befindet sich dabei in der exponentiellen Phase und wird somit nicht durch eine Limitierung der Nukleotide oder Primer, sowie ein Nachlassen der Polymeraseaktivität beeinflusst.

2. Material und Methoden

Für die Bestimmung der relativen integrierten Plasmidkopieanzahl wurde *XDH1* als Referenzgen verwendet. Bei bekannter Kopieanzahl des *XDH1*-Gens konnte somit die Anzahl der integrierten Plasmide in das Hefegenom bestimmt werden. Dieses geschah durch folgende Gleichung:

$$\text{Plasmidkopieanzahl} = \frac{(\text{Effizienz}_{\text{Referenz}})^{\text{Ct}_{\text{Referenz}}}}{(\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}})^{\text{Ct}_{\text{Zielgen}}}}$$

Der Wert der Plasmidkopieanzahl gibt an, wie oft das Plasmid im Vergleich zu dem *XDH1*-Gen im Genom der Hefe vorhanden ist.

Die Effizienz der eingesetzten Primer wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus einem "Pool" der gDNA bestimmt. Hierfür wurde ein Aliquot (10 ng) von jeder eingesetzten gDNA ein Reaktionsgefäß pipettiert. Aus diesem gDNA Pool heraus wurde eine Verdünnungsreihe (von 1:10- 1:10.000) als Template für die Bestimmung der Standardkurve eingesetzt. Für jedes Primerpaar wurde eine eigene Verdünnungsreihe und Standardkurve hergestellt. An Hand der Steigung der Standardkurve konnte mit folgender Gleichung die Effizienz der Primer berechnet werden:

$$\text{Effizienz} = 10^{-\left(\frac{1}{\text{Steigung}}\right)}$$

Bei einer Steigung der Geraden von -3,32 erhält man eine Effizienz von 100 %, was nach obiger Gleichung einen Wert der Effizienz für 2 ergibt. Dieses bedeutet, dass nach jedem PCR-Zyklus die DNA-Menge verdoppelt wird.

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

Die Isolierung plasmidaler DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe der alkalischen Lyse nach Sambrook *et al.* (1989). Hierfür wurden 2x 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur zentrifugiert (1 min, 13.000 Upm) und in 300 µl P1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 300 µl P2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) hinzugefügt. P3 (3 M KAc, pH 5,5) wurde hinzugefügt um die Zellbestandteile zu fällen (Komplexbildung aus SDS, Proteinen, Lipiden). Chromosomale DNA wird dabei ebenfalls gefällt, wobei plasmidale DNA renaturiert und in Lösung bleibt. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 0,7 Volumen Isopropanol gemischt und nochmals für 30 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird in 500 µl 70 % EtOH gewaschen und nach kurzem Trocknen in 50 µl H₂O aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen

Chromosomale DNA aus Hefen wurden nach einer modifizierten Methode von Sherman *et al.* (1986) isoliert. Hierfür wurden 5 ml einer YPD-Übernachtskultur für 5 min bei 3.500 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 5 ml dH₂O gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen in 1 ml SCE/Z/DTT-Puffer (1,2 M

Sorbitol, 0,1 M Natriumcitrat, 10 mM EDTA pH 7, 200 µg/ml Zymolyase (100T), 20 mM DTT) resuspendiert und 1 h bei 30 °C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen für 5 min bei 4.000 Upm wurden dem Pellet 500 µl 50 mM EDTA und 50 µl 10 % SDS hinzugefügt. Die Proben wurden bei 65 °C für 30 min inkubiert. Nach der Zellyse erfolgte eine Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur. Für die Fällung der Proteine wurden 100 µl 5 M Kaliumacetat (pH 6,0) hinzugefügt und 30-90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine bei 13.000 Upm für 15 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 900 µl kaltem absolutem Ethanol gemischt. Nachdem das DNA-Pellet für 15 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert wurde, erfolgte der RNA-Verdau durch Zugabe von 400 µl RNase A-Lösung (150 mM Natriumacetat pH 5,9, 200 µg/ml RNase A) für 30 min bei 30 °C. Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe eines Phenol-Chlorform Gemisches. Hierfür wurden nach dem RNA-Verdau 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl hinzugefügt, 30 sec gevortext und 2 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die Extraktion wiederholt. Anschließend erfolgte eine weitere Extraktion mit 400 µl Chloroform. Nach abschließender Zentrifugation (2 min, 13.000 Upm) wurde die obere, wässrige Phase mit 800 µl kaltem absolutem Ethanol über Nacht bei -70 °C gefällt. Am folgenden Tag wurde das DNA-Pellet bei 13.000 Upm für 15 min (4 °C) abzentrifugiert und in 50 µl dH₂O aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert

2.2.6 Restriktionsverdau/ Ligation

Für den Verdau von Plasmiden wurden die dafür benötigten Restriktionsenzyme von New England Biolabs verwendet. Die Endkonzentration der Enzyme betrug 1-10 U pro Ansatz. Falls notwendig wurde dem Ansatz 100 µg/ml BSA zugesetzt und mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Reaktion fand, soweit nicht anders angegeben, bei 37 °C für 1 h statt.

Um die Religation eines geschnittenen Vektors zu minimieren, wurde dem Ansatz nach erfolgter Restriktion 1 µl AP (antarktische Phosphatase) mit dazugehörigem Puffer zugesetzt und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Ligationen von Nukleotidfragmenten wurden mit dem "Quick Ligation"-Kit (NEB) laut Herstellerangaben durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden 80 ng Vektor und die 5-fache molare Menge des DNA-Fragments eingesetzt.

2.2.7 DNA-/ Genom-Sequenzierung

Die Genomsequenzierung des *C. utilis*-Stammes (DSMZ2361) wurde von der Firma G2L (Göttingen) auf einem Roche GS-FLX-Pyrosequencer durchgeführt. Die Assemblierung der Daten wurde mit dem Programm Newbler durchgeführt. Das Augustus Programm (Stanke *et al.*, 2006) wurde für die Genvorhersage benutzt. Dabei wurden die annotierten Gene, sowie die entsprechenden Proteinsequenzen systematisch von g1 bis g6417 durchnummeriert. Das Genom des *P. jadinii*-Stammes (CBS1600) wurde von der Abteilung Cebitec der Universität Bielefeld sequenziert und automatisch annotiert. Hierfür wurde eine kombinierte 454/Roche und Illumina *next-generation* Sequenzierung durchgeführt.

Plasmidsequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm CloneManager 9 (Scientific & Educational Software) analysiert.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden photometrisch mit Hilfe der Extinktion bei 260 nm gemessen (Sambrook *et al.*, 1989). Hierfür wurde der NanoDrop2000C Photometer von PeqLab benutzt. Die Berechnung erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz:

$$c_{DNA} \left[\frac{\mu g}{\mu l} \right] = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{20}$$

Hierbei entspricht eine Extinktion $E_{260\text{nm}}$ von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA (Müller *et al.*, 1993).

2.2.9 Agarose-Gele

Für die Größenauftrennung von Nukleinsäuren wurden 0,8 %ige (w/v) Agarosegele benutzt. Hierfür wurde die Agarose (Ultra-Pure-Agarosepulver, Invitrogen) in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl pH 7,5, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) in der Mikrowelle aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen der Agarose wurden 2 μl einer 0,07 %igen Ethidiumbromid-Lösung (AppliChem, Darmstadt) zu 50 ml Agarose hinzugefügt und das Gel vollständig ausgehärtet.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit DNA-Laufpuffer (6x DNA Loading Dye, Thermo Scientific) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 90 Volt. Als DNA-Größenstandard dienten 5 μl einer 1 kb DNA-Leiter (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific) mit definierten Bandengrößen.

Für die Isolierung aufgetrennter DNA Fragmente aus Agarosegelen wurde das "NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up"-Kit von Machery und Nagel laut Herstellerangaben verwendet.

2.2.10 Southern-Blot

Der Southern-Blot (Southern, 1975) wurde benutzt, um die Integration linearer Plasmide in das Genom von Hefen nachzuweisen. Hierbei konnte die Integration an spezifischen Stellen, sowie die Integration in unbekannte Loci (ektopisch), nachgewiesen werden. Für die Überprüfung einer Integration wurden 2 μg gDNA benutzt und über ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetrennt. Für den Nachweis einer Integration in einem vorher ausgewählten Locus (z. B. *TDH3*) wurde die gDNA mit einer Restriktionsendonuklease behandelt.

Die gDNA wurde über ein Agarose-Gel aufgetrennt und im Anschluss 20 min in 0,25 M HCl gewaschen. Anschließend wurde das Gel für dieselbe Zeit in 0,4 M NaOH geschüttelt. Der Transfer der DNA auf eine Hybond N-Nylonmembran (Amersham) erfolgte mit Hilfe eines "downward Kapillar-Blots". Der Transfer fand über Nacht in 0,4 M NaOH statt. Am folgenden Tag wurde die Membran in 4x SSC

Puffer (0,6 M NaOH, 20 mM Na₃-Citrat× 2H₂O) neutralisiert und die DNA mittels UV-Licht (265 nm, 3 min) auf der Membran fixiert.

Die Markierung spezifischer DNA-Sonden erfolgte mit Hilfe des "DIG DNA labeling and Detection"-Kits (Roche, Mannheim) laut Herstellerangaben. Änderungen zum Protokoll waren in dieser Arbeit die Verdünnung des DIG-dNTP Mix von 1/5 mit dem im Kit vorhandenen dNTP-Mix. Hiervon wurde pro Ansatz 1 µl eingesetzt. Die Zyklenzahl der anschließenden PCR wurde auf 30 begrenzt.

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurde die Membran anschließend für 30 min bei 65 °C in Prähybridisierungspuffer (12,5 ml 20x SSC, 5 ml 10x NRB2, 100 µl 10 % SDS, 500 µl Lauroylsarcosin, ad 50 ml H₂O) abgesättigt. Währenddessen wurde die Sonde (1-4 µl PCR-Produkt in 15 ml Prähybridisierungspuffer) für 10 min bei 95 °C aufgeköcht und auf Eis abgeschreckt. Die Hybridisierung der Membran mit der Sonde erfolgte über Nacht bei 65 °C. Am nächsten Tag wurde die Sonde abgenommen, die Membran je 1x für 15 min mit NRW1 (2x SSC, 0,1 % SDS), NRW 1.1 (1x SSC, 0,1 % SDS) und NRW2 (0,1x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen. Die Membran wurde nochmals für 5 min mit 10 ml DIG-Waschpuffer (0,3 % (v/v) Tween20 in NRB1) gewaschen und für 30 min in 25 ml NRB2 (1% Roche Blocking Reagenz in NRB1) blockiert. Zur Detektion der DIG-Sonde wurden 10 ml Antikörperlösung (anti-DIG-Antikörper 1/10.000 in NRB2) für 30 min auf die Membran gegeben. Durch zweimaliges Waschen für 15 min mit DIG-Wasch-Puffer wurde der ungebundene Antikörper wieder entfernt. Die Äquilibrierung der Membran erfolgte mit 20 ml NRB3 für 5 min. Für die Detektion der Banden wurden 200-300 µl CDP-Star-Lösung (CDP-Star 1/100 in NRB3) benutzt und das Signal mit einer CCD-Kamera detektiert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wird im Allgemeinen zur analytischen Trennung von Makromolekülen benutzt. In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Methode nach Laemmli (1970) benutzt.

Die XCell SureLock™ Mini-Cell Gelapparatur (Invitrogen) wurde für die Elektrophorese verwendet. Es wurden Polyacrylamid-Gele mit einem Acrylamid-Anteil von 8 %, 10 %, 4- 20 % (Pierce) eingesetzt. Falls abweichend davon Gele anderer Acrylamidkonzentrationen benötigt wurden, wurden diese selbständig mit Hilfe des BioRad Mini-PROTEAN® Tetra handcast-Systems gegossen.

Die Proben wurden mit 3x SDS-Probenpuffer (30 % Glycerin, 6 % SDS, 188 mM Tris/HCl pH 6,8, 15 % β-Mercaptoethanol, 0,006 % Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 120 V für 45-60 min. Als Laufpuffer diente HEPES (100 mM Tris, 100 mM HEPES, 1 % (w/v) SDS) und als Größenstandard der "Page Ruler PreStained Protein Ladder" (ThermoScientific). Anschließend wurden die Gele 3x 5 min mit H₂O gewaschen und mit Coomassie-Brilliant-Blue R-250 für mindestens 1 h gefärbt. Die Entfärbung fand mit H₂O so lange bei RT statt, bis Proteinbanden zu erkennen waren.

2.3.2 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot Analyse

Für den Nachweis spezifischer Proteine wurde eine Immunoblot-Analyse der Probe nach dem Tankblot-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979) durchgeführt. Dabei wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine durch Methanol aktivierte PVDF-Membran übertragen (Immobilon-Membran von Millipore). Alle verwendeten Whatmanpaper sowie das Polyacrylamid-Gel wurden zur Äquilibrierung kurz in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, und 20 % Methanol) gelegt. Anschließend wurde die "XCell SureLock® Mini-Cell" Blotkammer laut Herstellerangaben aufgebaut. Der Proteintransfer erfolgte über Nacht bei 4 °C und einer konstanten Spannung von 15 V. Am folgenden Tag wurde die Membran für mindestens 1 h mit 5 % Magermilchpulver in TBST (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 % (w/w) Tween20) inkubiert um die Bindungsstellen zu blockieren. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen, bevor der Primärantikörper für 1 h auf die Membran gegeben wurde. Nach erneutem Waschen (zweimal 15 Minuten) mit TBST, wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Abschließend wurde die Membran nochmals viermal für 5 Minuten mit TBST gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Chemolumineszenz mit Hilfe einer CCD-Kamera. Hierfür wurde das "SuperSignal® West Dura" (Pierce) Peroxidase-Substrat laut Herstellerangaben verwendet.

2.3.3 Massenspektrometrische Bestimmung der Proteinmassen

Die Identifizierung von Proteinen wurde vom Zentrum für molekulare Medizin Köln (ZMMK) durchgeführt. Hierfür wurden Proteinbanden aus dem Polyacrylamid-Gel geschnitten und in einem Reaktionsgefäß verschickt.

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinproben wurden von Clemens J. Heilmann vom Swammerdam Institut der Universität Amsterdam durchgeführt.

2.3.4 Lipaseaktivitätstest

Der quantitative Nachweis von Lipaseaktivität wurde mit Hilfe von para-Nitrophenylbutyrat (pNPB) photometrisch durchgeführt. Die Lipase hydrolysiert das pNPB-Ester zu para-Nitrophenyl (pNP) und Butansäure. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des pNP auf 410 nm. Mit Hilfe des ELx800 Plate Reader (BioTek Instruments, Winooski, USA) wurde die Absorptionsänderung bei 410 nm gemessen. Eine Einheit an Enzymaktivität wurde dabei definiert als die Menge an Enzym die benötigt wird, um 1 µmol an Substrat pro Minute unter den angegebenen Bedingungen zu hydrolysieren. Für die Berechnung der Aktivität wurde nur der lineare Bereich der Absorptionsänderung benutzt um störende Effekte zu auszuschließen.

Für die Versuche wurden in einer 96-well Platte 0,5 mM pNP-Ester in 20 mM NaPi Puffer (20 mM Natriumphosphat Puffer, pH 7,4) mit einem Aliquot an Lipase pipettiert und bei 37 °C inkubiert, das Endvolumen betrug dabei 200 µl. Mit dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ von pNP ($\epsilon = 10.400 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) ließ sich nach folgender Gleichung die Enzymaktivität berechnen:

$$U/ml = \frac{\Delta A_{410\text{ nm}} \times V_{total}}{\min V_{Enzym} \times l \times \varepsilon}$$

Wobei gilt:

$\Delta A_{410\text{ nm}}$ = Absorptionsänderung bei 410nm pro Minute

V_{total} = Endvolumen in μl

V_{Enzym} = Volumen des eingesetzten Enzyms in μl

l = Lichtweg in cm

ε = molarer Absorptionskoeffizient in $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

Für die Versuche in 96-well Platten musste der Lichtweg nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$l\text{ (cm)} = 3,484 \times 10^{-3} \times V_{total}$$

Alle Messungen wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt, als Leerprobe diente eine Probe mit Wasser an Stelle des Enzyms. Wenn die Konzentration des eingesetzten Enzyms bekannt war, so ließ sich die spezifische Aktivität des Enzyms in U/mg berechnen:

$$U/mg = \frac{(U/ml)}{c}$$

Wobei c die Konzentration des Enzyms in mg/ml ist.

2.3.5 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Für eine quantitative Bestimmung der LacZ-Aktivität wurde ein abgeändertes Protokoll nach Sherman *et al.* (1986) benutzt.

Hierfür wurde die $OD_{600\text{ nm}}$ einer Hefekultur bestimmt und anschließend bei 3.500 Upm für 5 min geerntet. Das Zellepellet wurde 2x mit 1 ml Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4) gewaschen und anschließend in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. 500 μl dieser Zellsuspension wurden mit 500 μl ONPG-Lösung (1 mg/ml ONPG in Z-Puffer) gemischt und bei 30 °C inkubiert bis eine Gelbfärbung sichtbar wurde. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 3.500 Upm) und die Absorption des Überstandes bei 420 nm gemessen. Die Enzymaktivität wurde in Miller Units ausgedrückt und nach folgender Formel berechnet:

$$1\text{ Miller Unit} = \frac{1000 \times OD_{420\text{ nm}}}{\text{Inkubationszeit [min]} \times OD_{600\text{ nm}}}$$

Für den qualitativen Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität von Hefestämmen wurden X-Gal-Overlay-Platten benutzt. Hierbei wurden die Hefestämme auf YPD-NST-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. 0,1 g Agarose wurden mit 10 ml H_2O aufgekocht und anschließend mit 10 ml Phosphat-Puffer

(pH 7,0) gemischt. Nach Abkühlen dieser Lösung wurden 400 µl 10 % SDS und 200 µl X-Gal (4 mg/ml in Dimethylformamid) dazugegeben. Die Agarplatten wurden mit 10 ml der Lösung überschichtet und bei 30 °C inkubiert. β-Galaktosidase-Aktivität war vorhanden, wenn sich die Hefekolonien blau färbten.

2.3.6 Deglykosylierung von Proteinen

Die Abspaltung der *N*-Glykosylierungsstruktur von Proteinen wurde mit Hilfe der Peptid *N*-Glykosidase F (PNGase F) durchgeführt. PNGase F ist eine Amidase, welche in der Lage ist die α1,6-glykosidische Bindung zwischen Asparagin und dem ersten *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) zu schneiden. Hierfür wurde das PNGase F-Kit von NEB laut Herstellerangaben benutzt.

Die Abspaltung von *O*-Glykosylierungen an Proteinen wurde chemisch mit Hilfe der β-Eliminierung durchgeführt. Hierfür wurde das GlycoProfile™ β-Eliminierungs Kit (Sigma-Aldrich) laut Herstellerangaben verwendet.

2.3.7 Immunofluoreszenz

Stationäre Hefezellen wurden für 30 min bei 30 °C mit 4 % Formaldehyd fixiert. Die Zellen wurden geerntet (5 min, 3.500 Upm), gewaschen und in S-Puffer (50 mM HEPES, 1,2 M Sorbitol, pH 7,5) resuspendiert. Um die Zellen auf Deckgläschen zu fixieren wurden diese mit 15 µl einer 0,1 % Poly-Lysin Lösung für 2 min inkubiert und anschließend dreimal mit H₂O gewaschen. 20 µl der Zellsuspension wurden durch 5-minütige Inkubationen auf den vorbehandelten Deckgläschen fixiert. Nicht fixierte Zellen wurden durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt. 20 µl einer Blockierlösung (2 % Magermilchpulver in PBS) wurden hinzugefügt und für 15 min inkubiert. Die Blockierlösung wurde entfernt und 40 µl der Primäantikörperlösung (Antikörper in Blockierlösung) wurden auf die Probe gegeben und für mindestens 90 min bei RT inkubiert. Der Zweitantikörper, gekoppelt an Fluoresceinisothiocyanat (FITC), wurde nach viermaligem Waschen mit PBS dazu pipettiert und ebenfalls für mindestens 90 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Alle nachfolgenden Schritte wurden im Dunkeln ausgeführt um ein Abklingen der Fluoreszenz möglichst gering zu halten. Mit Hilfe einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol- (DAPI-) Färbung wurde die DNA des Zellkerns angefärbt. Hierfür wurden 20 µl einer DAPI-Lösung (1 µg/ml DAPI) für 10 min auf die Zellen gegeben und im Dunkeln inkubiert. Die Lösung wurde anschließend entfernt und die Probe viermal mit PBS gewaschen. Um die Farbstoffe während der Belichtung vor dem Ausbleichen zu beschützen wurde die "Pro long gold Antifade"-Lösung (Life Technologies GmbH, Darmstadt) laut Herstellerangaben benutzt. Die Zellen wurden mit einem Axioskop40 (Zeiss, Köln) Fluoreszenzmikroskop belichtet und untersucht.

2.3.8 Herstellung von Proteinrohextrakten

Für die Herstellung von Proteinrohextrakten wurden 10-50 ml einer Hefekultur durch Zentrifugation geerntet (5 min, 3.500 Upm). Das Zellpellet wurde in KPi-Puffer (0,1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7,0) gewaschen und anschließend in demselben Puffer wieder aufgenommen. Um den proteolytischen Abbau der Proteine zu verhindern wurde zusätzlich eine Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette (Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini, Roche) zu der Lösung hinzugefügt. 1 ml der Zellsuspension wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an Glasperlen (\varnothing 0,45 mm) versetzt. Der Zellaufschluss fand in einem Vibrax (VX, Janke & Kunkel) für 45 min bei 4 °C statt. Die Glasperlen wurden abgetrennt und die erhaltene Zellprobe wurde für 5 min bei 3.500 Upm abzentrifugiert. Der Rohextrakt (Überstand) wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Das Pellet wurde ebenso gelagert.

2.3.9 Zellfraktionierung

Die Herstellung einzelner Zellfraktionen wurde benötigt, um den Verbleib eines sekretierten Proteins in der Zelle feststellen zu können. Hierbei wurde wie folgt vorgegangen:

Eine stationäre Kultur wurde für 5 min bei 3.500 Upm abzentrifugiert. 1 ml des Kulturmediums wurde bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die abzentrifugierten Zellen wurden mit sterilem Wasser (5 ml) gewaschen, in SED (1 M Sorbitol, 25 mM EDTA/pH 8, 50 mM Dithiothreitol) aufgenommen und 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und mit 1 ml 1 M Sorbitol gewaschen. Das Zellepellet wurde daraufhin in 1 ml SCE (1 M Sorbitol, 0,1 M Natriumcitrat/pH 5,8, 0,01 M EDTA +Protease-Inhibitor-Tabletten [Roche]) resuspendiert und mit Zymolyase (2,5 mg/ml) bei 30 °C inkubiert. Nach der vollständigen Sphäroplastierung der Zellen wurden diese für 5 min bei 3.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand (periplasmatischer Inhalt) wurde abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Sphäroplasten wurden in SCE (+Protease-Inhibitor) aufgenommen, das gleiche Volumen an Glasperlen (\varnothing 0,45 mm) wurde dazugegeben und für 45 min in einem Vibrax (VX, Janke & Kunkel) bei 4 °C aufgeschlossen. Der so erhaltene Rohextrakt wurde bei 3.000 Upm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Der Überstand (Cytoplasma) wurde abgenommen und 10 min bei 10.000 x g abzentrifugiert. Das so gewonnene Pellet, in welchem das ER und Golgi angereichert wurde, wurde aufbewahrt. Der Überstand wurde anschließend 1 h bei 4 °C und 40.000 x g zentrifugiert. Der Überstand und das Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Alle erhaltenen Überstände und Pellets wurden per SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot analysiert.

2.3.10 Affinitätschromatographie

Das Trennungsprinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der reversiblen, spezifischen Wechselwirkung zwischen zwei Interaktionspartnern, einer stationären und einer mobilen Phase. Für diese Arbeit wurde ausschließlich Nickel-Nitrilo-Tri-Essigsäure-Säule (Ni-NTA) Agarose (Machery-Nagel) als stationäre Phase

verwendet. Um die Bindung zwischen Protein (mobile Phase) und der Ni-NTA-Matrix sicherzustellen wurden die zu reinigenden Proteine mit einem 6x His- (Histidin-) Epitop an ihrem C-Terminus fusioniert. Das His-Epitop (*tag*) besteht aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten (*His₆-tag*) und erlaubt die ionische Wechselwirkung mit drei Ni-Ionen. Die Reinigung erfolgte mit 1 ml Ni-NTA-Agarose Säulen. Nach der Äquilibrierung der Säulen mit dem 10-fachen Säulenvolumen (SV) durch Äquilibrierungspuffer (20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl und 5 mM Imidazol, pH 7,4) wurde die Probe auf die Säule aufgetragen. Durch viermaliges Waschen (20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl and 50 mM Imidazol, pH 7,4) mit dem 2-fachen SV wurden unspezifisch gebundene Verunreinigungen entfernt. Die Elution der Proteine (4x 1 ml) erfolgte mit Elutionspuffer (Waschpuffer mit 0,5 M Imidazol). Von jeder Fraktion wurde ein Aliquot für die spätere Analyse aufgefangen.

2.3.11 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Die Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximum von Coomassie-Brilliant-Blue G-250 während der Bindung an Proteine. Freies Coomassie hat ein Absorptionsmaximum bei 465 nm, an Protein gebundenes Coomassie hat sein Absorptionsmaximum bei 595 nm.

In einer 96well-Platte wurde eine Standardreihe BSA (0,4-2 µg pro well) mit einem Volumen von 10 µl angelegt. 190 µl einer 1/5-verdünnten BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad) Lösung wurden zu den 10 µl BSA hinzugefügt und nach 5-10 min Inkubation bei RT gemessen (595 nm). Die Proteinproben wurden so verdünnt, dass die Absorption (595 nm) zwischen 0,2 und 0,8 lag und wie die BSA-Standardproben gemessen. Das Endvolumen der Ansätze betrug 200 µl.

2.3.12 Aufkonzentrieren der Proteine

Mit Hilfe einer Zentrifugation wurden Proteine aufkonzentriert. Hierfür wurden Vivaspin-Konzentratoren der Firma Sartorius Stedim benutzt. Diese besaßen eine molekulare Ausschlussgrenze von 10.000 Da und ein Volumen von 20 ml. Die Zentrifugation fand bei 4 °C und 4.000 x g statt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden mit dieser Methode aufkonzentriert.

2.3.13 Bioinformatische Untersuchungen

Um potentielle *N*-Glykosylierungsstellen gewünschter Proteine vorherzusagen wurde der NetNGlyc 1.0 Server (Gupta *et al.*, 2004) benutzt.

Für die Vorhersage der Signalsequenz eines Proteins wurde der SignalP3.0 Server verwendet (Bendtsen *et al.*, 2004). Jedes Protein für welches eine Signalsequenz vorhergesagt wurde, wurde anschließend mit dem big-PI Fungal Predictor (Eisenhaber *et al.*, 2004) auf das Vorhandensein einer GPI-Signalsequenz, untersucht. Zusätzlich dazu wurde der TMHMM Server 2.0 (Moller *et al.*, 2001) verwendet um Transmembrandomänen vorherzusagen.

Ähnliche Proteine unterschiedlicher Spezies wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (E-Wert von 1×10^{-20}) identifiziert (Altschul *et al.*, 1990).

2.4 Mausmodell/ *in vivo* Methoden

Die *in vivo* Mausmodellexperimente wurden in Zusammenarbeit mit Frau A. Mausberg (AG Kieseier, Neurologische Uniklinik Düsseldorf) durchgeführt. Für die Besiedelung von Mäusen mit *C. utilis*-Kulturen wurden 6-8 Wochen-alte, weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Die *C. utilis*-Stämme wurden bis zur stationären Phase in YPD-NST-Medium inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS-Puffer gewaschen und in PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Neubauer Improved, Laboroptik, Lancing, England) bestimmt und auf 1×10^9 Zellen pro ml eingestellt.

Um die native Mikroflora der Mäuse im Darm zu reduzieren wurden diese drei Tage vor der erstmaligen Fütterung mit Hefekulturen mit 2 mg/ml Tetrazyklin im Trinkwasser versorgt. Die Hefekulturen wurden mit einem maximalen Volumen von 100 μ l 1x pro Tag den Mäusen oral verabreicht. Um die Darmbesiedelung von *C. utilis* zu dokumentieren wurden jeden Tag ab Beginn der Tetrazyklin-Behandlung Fäkalproben genommen. Das Gewicht der Fäkalproben wurde bestimmt und die Pellets wurden anschließend in 1 ml PBS resuspendiert. In einer Verdünnungsreihe wurden die Proben auf Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C für zwei Tage inkubiert. Für die Bestimmung der gesamten mikrobiologischen Besiedelung wurden YPD-Agarplatten verwendet, um *C. utilis* Kolonien zu identifizieren wurden YPD-Amp-NST (100 μ g/ml Amp, 10 μ g/ml NST) benutzt. Die Kolonie-Bildenden-Einheiten (KBE) wurden gezählt und in das Verhältnis zum Gewicht der Fäkalpellets gesetzt.

Für die Induktion der oralen MOG₃₅₋₅₅-Toleranz wurden die Mäuse 7 Tage vor EAE-Induktion mit 1 mg/ml Tetrazyklin im Trinkwasser versorgt. Die Fütterung der Mäuse mit *C. utilis*-Zellen startete 7 Tage vor EAE-Induktion. Die EAE wurde an Tag0 mit 200 μ g MOG₃₅₋₅₅, in 100 μ l PBS, emulgiert mit 100 μ l komplettes Freund-Adjuvans (4 mg/ml hitzeinaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis*) durch Injektion in die Flanke induziert. Die Immunisierung wurde durch intraperitoneale Zugabe von 500 ng Pertussis Toxin an Tag0 und Tag2 verstärkt. Ab Tag10 wurden die Mäuse auf Symptome untersucht. Die Symptome wurden wie folgt kategorisiert: 0= keine Symptome; 0,5= Parese des Schwanzes; 1,0= Paralyse des Schwanzes; 2,0= Parese der Hinterläufe; 3= Paralyse der Hinterläufe; 3,5= Parese der Vorderläufe; 4,0= Paralyse der Vorderläufe; 5= Tod.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines heterologen Sekretionssystems in *C. utilis*. Hierfür wurde zunächst das Sekretom von *C. utilis* charakterisiert, um das Sekretionspotential von *C. utilis* zu bestimmen und stark sekretierte Proteine von *C. utilis* zu identifizieren. Hierbei sollte die Präsenz von Proteasen untersucht werden sowie Promotoren und Signalsequenzen stark sekretierter Proteine identifiziert werden, um diese für die Expression heterologer Proteine einzusetzen.

Für die Etablierung des Sekretionssystems wurde die *C. antarctica* Lipase B (CalB), sowie eine weitere Lipase aus *U. maydis* (Uml2) verwendet. Des Weiteren wurde die Oberflächenpräsentation verschiedener Proteine gezeigt und lebende *C. utilis*-Zellen wurden erstmals erfolgreich als orales Ganzzell-Immunogen eingesetzt. Abschließend wurde ein genomischer und sekretorischer Vergleich von *C. utilis* mit dem engen Verwandten *P. jadinii* (vermutliche teleomorphe Form von *C. utilis*) durchgeführt.

3.1 Das Sekretom von *C. utilis*

Die Gesamtheit aller in das Medium sekretierter Proteine eines Organismus wird als Sekretom bezeichnet. Die Kenntnis des Sekretoms ist für die heterologe Proteinherstellung von großer Bedeutung, denn Kontaminationen des Mediums durch sekretierte Proteasen können die Proteinausbeute verringern oder empfindliche Produkte zerstören und inaktivieren. Des Weiteren können Promotoren und Signalsequenzen stark sekretierter Proteine identifiziert und für die heterologe Proteinsekretion eingesetzt werden.

Um das sekretorische Potential von *C. utilis* zu bestimmen wurde die Sekretomzusammensetzung von *C. utilis* in der exponentiellen und stationären Phase, sowie nach Wachstum in unterschiedlichen Medien charakterisiert.

3.1.1 Das wachstumsabhängige Sekretom von *C. utilis*

Für die Analyse des Sekretoms wurden *C. utilis*-Zellen in SMD-Medium (Glucose) bis zur exponentiellen Phase ($OD_{600\text{ nm}} = 6,0$) und stationären Phase ($OD_{600\text{ nm}} = 18$) inkubiert. Das Kulturmedium wurde anschließend durch Zentrifugation (5 min, 3.500 Upm) von den Zellen getrennt und untersucht. Es zeigte sich, dass *C. utilis* in der stationären Phase 54 % mehr Protein in Relation zur Biomasse (Trockengewicht) sekretiert als in der exponentiellen Phase (Tabelle 3.1). Eine Erklärung hierfür könnte die Zelllyse sein, welche vermehrt in der stationären Phase auftritt. Andererseits kann die hohe Proteinausbeute in der stationären Phase auch durch eine gesteigerte

3. Ergebnisse

Sekretion oder eine gesteigerte Durchlässigkeit der Zellwand für periplasmatische Proteinen zustande kommen.

Tabelle 3.1: Biomasse und Medium-Proteine bei *C. utilis*. *C. utilis* wurde in SMD-Medium bis zur exponentiellen und stationären Phase bei 30 °C inkubiert. Die Standardabweichung wurde aus drei biologischen Replikaten berechnet. TG= Trockengewicht.

Wachstumsphase (OD _{600 nm})	Biomasse TG (mg/ml)	Proteinkonzentration im Medium (µg/ml)	Medium-Protein pro Biomasse (µg/mg)
Exponentiell (6,0)	1,14 ± 0.19	0,27 ± 0.14	0,24 ± 0.12
Stationär (16)	3,73 ± 0.43	1,38 ± 0.09	0,37 ± 0.06

Für die Identifikation der sekretierten Proteine wurden die Kulturmedien steril-filtriert und massenspektrometrisch von C. Heilmann (Swammerdam Institute for Life Sciences, Universität von Amsterdam) analysiert. Insgesamt wurden so nach Wachstum in SMD-Medium 37 Proteine identifiziert (Tabelle 9.1, Anhang). Unter diesen 37 identifizierten Proteinen befand sich keines mit proteolytischer Aktivität.

Gruppierung der sekretierten Proteine an Hand ihrer Struktur:

24 der identifizierten Proteine des SMD-Kulturmediums besitzen eine vorhergesagte N-terminale Signalsequenz (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>). Bei vier Proteinen (Msb2, g2592, Tos1, g4668) war die Vorhersage einer Signalsequenz nicht möglich, da die ORFs am 5'-Ende verkürzt waren. Zwei dieser offenen Leserahmen haben jedoch Identitäten zu Proteinen aus *S. cerevisiae* (Msb2: 27%, Tos1: 43 %) und daher kann angenommen werden, dass auch diese Proteine eine Signalsequenz in *C. utilis* aufweisen.

Für sechs der identifizierten Proteine wurde zusätzlich zu der Sekretions-Signalsequenz eine C-terminale GPI-Signalsequenz vorhergesagt (http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html). Unter ihnen sind die Phospholipase Plb3, die Chitintransglycosidase Crh1, die Glucanosyltransferase Gas1 und das Zellwandprotein Ecm33. Für drei ORFs (ein hypothetisches Protein, ein Protein mit Flo11-Domäne, sowie die Endochitinase Cts1) konnte keine Vorhersage gemacht werden, da die ORFs an ihrem 3'-Ende verkürzt waren. In *S. cerevisiae* enthält Cts1 eine GPI-Signalsequenz und da die Identität zu der Cts1 aus *C. utilis* bei 61 % liegt, ist es wahrscheinlich, dass die *C. utilis* Cts1 ebenfalls eine GPI-Signalsequenz enthält.

Zusätzlich tragen vier der identifizierten Proteine eine Transmembrandomäne (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Fet3, Tip1, Flo5 und Msb2). Msb2, Fet3 und Tip1 besitzen eine Typl-Transmembrandomäne während Flo5 eine Typll-Transmembrandomäne enthält. In *C. utilis* wurde nur ein N-terminaler Teil des Msb2-Proteins im Sekretom detektiert. Dieses stimmt mit den Beobachtungen bei

3. Ergebnisse

C. albicans überein, bei welchem ein N-terminaler Teil des Msb2 abgespalten wird und in das Medium freigesetzt wird (Swidergall *et al.*, 2013).

Für fünf der 37 extrazellulären Proteine wurden durch BLASTP-Suche keine homologen Proteine mit bekannter Funktion oder konservierten Domänen gefunden. Die übrigen 32 Proteine wurden manuell an Hand ihrer molekularen Funktion gruppiert (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl>) (Abb. 3.1). Unter diesen Proteinen hatten 30 % keine bekannte Funktion. Die zweitgrößte Gruppe dieser 32 Proteine hat eine Funktion, die im Zusammenhang mit dem Erhalt und dem Aufbau der Zellwand steht, wie die Glucanasen Bgl2 und Exg2 (Abb. 3.1; Tabelle 9.1, Anhang). Zusätzlich hatten zehn Proteine eine intrazelluläre Funktion (Emg1, Met2, Hht1, Osh6, Rpl8b, Tdh3, Trx1, Zps1, g3555, g4439). Diese Proteine besitzen keine Signalsequenz und sind möglicherweise durch einen unkonventionellen Sekretionsweg oder durch Zellyse in das Medium gelangt.

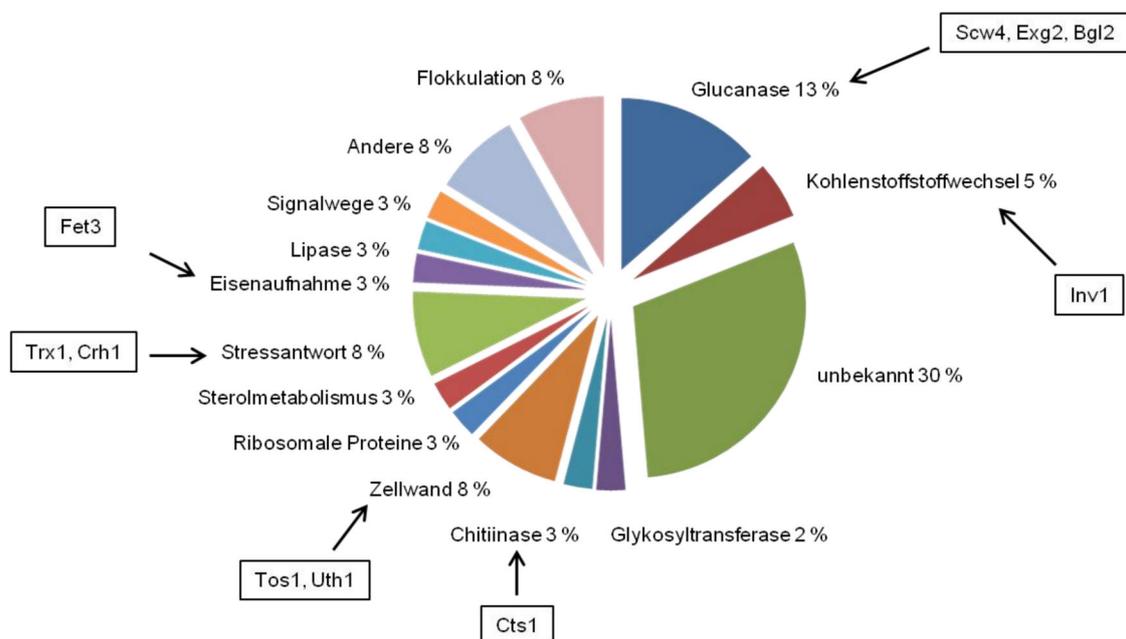


Abb. 3.1: Gruppierung der von *C. utilis* sekretierten Proteine. Die nach Wachstum in SMD-Medium identifizierte Proteine wurden an Hand der Funktion ihrer *S. cerevisiae*-Homologen gruppiert.

Das Sekretom in der exponentiellen und stationären Phase:

In der exponentiellen Wachstumsphase wurden insgesamt 20 Proteine identifiziert, wobei drei davon (Ecm33, Msb2, g2811) ausschließlich in dieser Wachstumsphase vorkamen (Abb. 3.2; Tabelle 9.1, Anhang). Bei *C. albicans* ist Msb2 ein Zellwandsensor und ein hoch O-glykosyliertes, N-terminales extrazelluläres Fragment von Msb2 ist unter anderem für den Schutz vor anti-mikrobiellen Peptiden (AMPs) verantwortlich (Swidergall *et al.*, 2013). Bei *S. cerevisiae* und *C. albicans* hat Msb2 während des filamentösen Wachstums unter anderem regulatorische Aufgaben im MAPK-Weg (Cullen *et al.*, 2004; Roman *et al.*, 2009). Das zweite Protein, Ecm33,

3. Ergebnisse

ist ein GPI-verankertes Zellwandprotein, welches bei *S. cerevisiae* die Knospung ermöglicht (Terashima *et al.*, 2003) und ebenfalls im Sekretom von *C. albicans* (Sorgo *et al.*, 2010) und *C. glabrata* (Stead *et al.*, 2010) identifiziert wurde.

In der stationären Phase befanden sich insgesamt 34 Proteine im Kulturmedium, wobei die Hälfte der Proteine dabei ausschließlich in der stationären Phase aufzufinden war und acht dieser Proteine keine Signalsequenz tragen (Abb. 3.2, Tabelle 9.1, Anhang). Dieses Ergebnis zeigt, dass *C. utilis* das Sekretom während des Wachstums umstellt, denn ausschließlich in der stationären Phase wurden Proteine identifiziert, die bei Nährstoffmangel und Stress benötigt werden. Eines dieser Proteine zeigt eine Identität von 68 % zu dem Thioredoxin Trx1 aus *S. cerevisiae*. Trx1 schützt *S. cerevisiae*-Zellen vor oxidativem und reduktivem Stress, indem es die Disulfidbindungen anderer Proteine reduziert (Holmgren, 1989). Ein weiteres Protein, die Transglycosylase Crh1, wird von *S. cerevisiae* bei Zellwandstress benötigt, um die Chitinschicht in der Zellwand aufrecht zu erhalten (Cabib *et al.*, 2007). Zu den identifizierten cytoplasmatischen Proteinen zählen das ribosomale Rpl8B-Protein oder die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Tdh3 (Tabelle 9.1, Anhang).

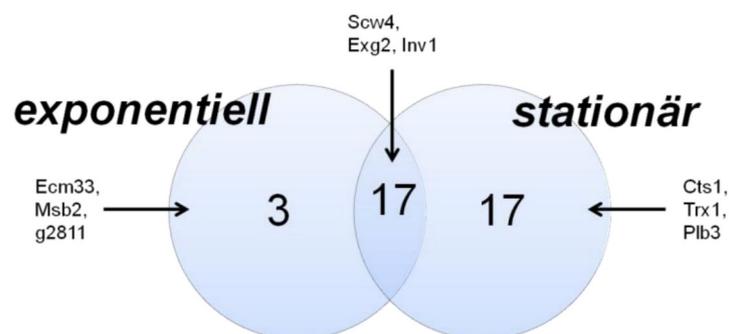


Abb. 3.2: Venndiagramm der Sekretome. Die Anzahl der sekretierten Proteine in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase von *C. utilis* nach Wachstum in SMD-Medium. Beispielhaft sind je drei Proteine der exponentiellen, stationären und beider Phasen angegeben.

3.1.2 Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Sekretom

Die Pentose Xylose ist eine relativ kostengünstige Kohlenstoffquelle und wird vorwiegend aus Abfallprodukten gewonnen. Ein Vorteil von *C. utilis* gegenüber anderen Pilzen ist die effiziente Aufnahme und Verwertung von Xylose als einzige Kohlenstoffquelle (Chakravorty *et al.*, 1962). In Zusammenarbeit mit M. Kunigo (Kunigo, 2013) wurde gezeigt, dass *C. utilis* auf Xylose-Medium dieselben Zelldichten erreicht wie auf Glucose und die Verdoppelungszeit (t_D) nur minimal länger ist (t_{DSMD} : 2,2 h; t_{DSMX} : 2,9 h) (Abb. 3.3). Für den Vergleich der Sekretome in unterschiedlichen Medien wurden *C. utilis*-Zellen bis zur stationären Phase in SMD ($OD_{600\text{ nm}} = 16$) und SMX ($OD_{600\text{ nm}} = 18$), mit oder ohne Ammoniumsulfat, kultiviert, wobei die Unterschiede in der Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit zwischen den Medien mit und ohne Ammoniumsulfat gering waren (Daten nicht gezeigt). Die

3. Ergebnisse

extrazellulären Proteine wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und die stärksten Banden wurden zur massenspektrometrischen Analyse ausgeschnitten. (Abb. 3.4). *C. utilis*-Zellen in den SMD-Kulturen erreichten ca. 15 h vor den SMX-Kulturen die stationäre Phase (Abb. 3.3.). Um auszuschließen, dass das verzögerte Wachstum in SMX-Medium zu abweichenden Ergebnissen führt, wurden auch die Sekretomzusammensetzungen von Kulturen nach 33 h Wachstum in SMD mit denen nach 48 h in SMX verglichen. Es ließen sich hierbei jedoch keine Unterschiede in der Sekretomzusammensetzung feststellen. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse nach 48 h Wachstum in SMD- und SMX-Medium beschrieben.

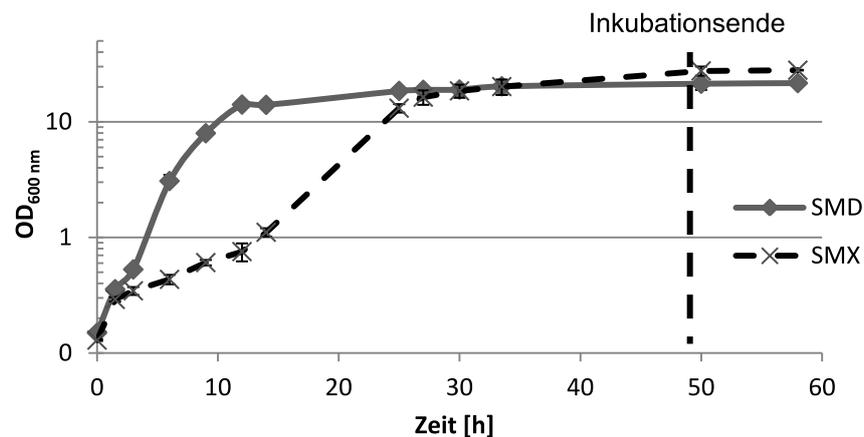


Abb. 3.3: Wachstumsskurven von *C. utilis* DSMZ2361 in SMD- und SMX-Medium. *C. utilis* DSMZ2361-Zellen wurden parallel in SMD- und SMX-Medium bei 30 °C inkubiert. Das Sekretom wurde nach 48 h (Inkubationsende) analysiert.

Das Bandenmuster der Xylose- und Glucosemedien (mit Ammoniumsulfat) unterscheidet sich im Bereich zwischen 100-140 kDa deutlich (Abb. 3.4 A). Dieser Unterschied war in den Medien ohne Ammoniumsulfat noch ausgeprägter (Abb. 3.4 B). In diesem Größenbereich wurden drei Proteine identifiziert: Invertase, Scw4 (ein Zellwandprotein) und ein putatives Protein (g4439) (Abb. 3.4 A, B). Des Weiteren enthielt das SMX-Medium (mit und ohne Ammoniumsulfat) bei etwa 55 kDa eine Bande, welche in SMD-Medium fehlte (Abb. 3.4 A, B). In dieser Xylose-spezifischen 55 kDa-Bande war Invertase das Hauptprotein. Zusätzlich wurde in der 55 kDa-Bande ein Protein mit einer Identität von 38 % zu der *S. cerevisiae* Endomannosidase Dfg5 identifiziert. Dfg5 ist während des Zellwachstums sowie der Zellwandbiogenese und möglicherweise an dem Transport von GPI-Zellwandproteinen von der Plasmamembran zur Zellwand beteiligt (Kitagaki *et al.*, 2002).

3. Ergebnisse

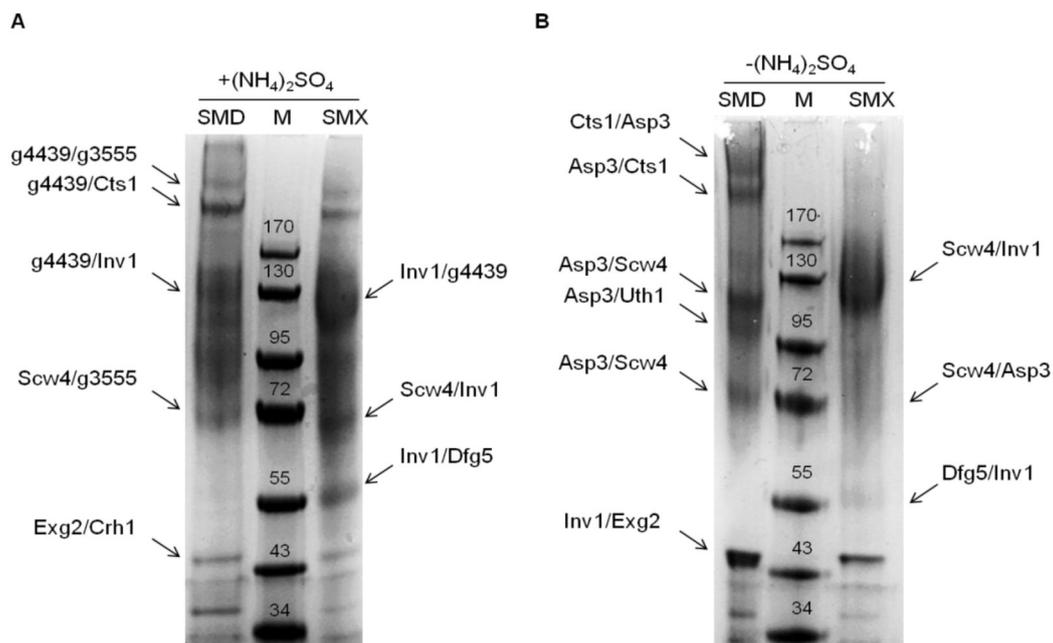


Abb. 3.4: SDS-PAGE der extrazellulären Proteine von *C. utilis*. Kulturmedien von stationären *C. utilis*-Zellen (6 µg Protein) wurden nach dem Wachstum in 2 % Glucose (SMD)- oder 2 % Xylose (SMX)-Medium mit (A) oder ohne (B) Ammoniumsulfat durch eine SDS-PAGE (4-20 % Acrylamid) aufgetrennt. Proteine wurden mit Coomassie-Brilliant-Blau sichtbar gemacht. Die mit Pfeilen markierten Banden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die molekularen Massen des Proteinstandards (M) sind in kDa angegeben.

3.1.3 Die Invertase im Sekretom von *C. utilis*

In den Sekretomen des SMD- und SMX-Mediums stellte die Invertase das häufigste sekretierte Protein dar (Tabelle 9.1, Anhang; Abb. 3.4 A, B). Die stärkste Invertasebande erstreckte sich auf der SDS-PAGE zwischen 100 und 140 kDa (Abb. 3.4 A, B). Zusätzlich wurde eine weitere Invertase-Bande bei 70 kDa und 55 kDa in SMX-Medium (Abb. 3.4 A, B) und bei ca. 48 kDa in SMD-Medium ohne Ammoniumsulfat identifiziert (Abb. 3.4 B). Die Invertasebanden zwischen 100-140 kDa und bei 55 kDa entsprechen der hoch *N*-glykosylierten "slow-migrating" S-Form bzw. der "fast-migrating" F-Form der Invertase (Belcarz *et al.*, 2002). Da die Invertase oberhalb der erwarteten Größe von 65 kDa (Chavez *et al.*, 1997) identifiziert wurde, sollte die Glykosylierung der Invertase untersucht werden. Chavez *et al.* (1998) beschrieben, dass die *C. utilis*-Invertase 13 potentielle *N*-Glykosylierungsstellen besitzt und deshalb während der Sekretion stark *N*-glykosyliert werden kann. Die Glykosylierung der sekretierten Invertase wurde durch Behandlung des SMX-Kulturmediums mit der Peptid-*N*-Glycosidase F (PNGase F) untersucht. Das Kulturmedium wurde durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und Invertase in einem Immunoblot mit einem Antiserum nachgewiesen, das gegen die *S. cerevisiae*-Invertase (Suc2) gerichtet ist. Ohne Behandlung mit PNGase F migriert die Invertase zwischen 95 und 140 kDa (Abb. 3.5 A). Nach PNGase F-Behandlung verringerte sich die Masse der Invertase auf ca. 65 kDa (Abb. 3.5 A).

3. Ergebnisse

Diese Masse entspricht der berechneten Masse der unglykosylierten Invertase (Chavez *et al.*, 1997). Zusätzlich dazu wurden weitere verkürzte oder degradierte Invertase-Fragmente bei 30-45 kDa nach der PNGase F-Behandlung detektiert. Auch bei Zugabe von Proteaseinhibitoren in das Kulturmedium traten diese Banden auf (Daten nicht gezeigt). Die Invertase wird also durch *C. utilis* hochglykosyliert sekretiert, aber es ist unbekannt, wie viele der potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen tatsächlich glykosyliert werden. Interessanterweise stellte sich in einem Vergleich der Invertase-Sekretion zwischen der exponentiellen und stationären Phase des SMX-Mediums heraus, dass erst in der stationären Phase die Sekretion der Invertase stattfand, während in der exponentiellen Phase wenig Invertase sekretiert wurde (Abb. 3.5 B).

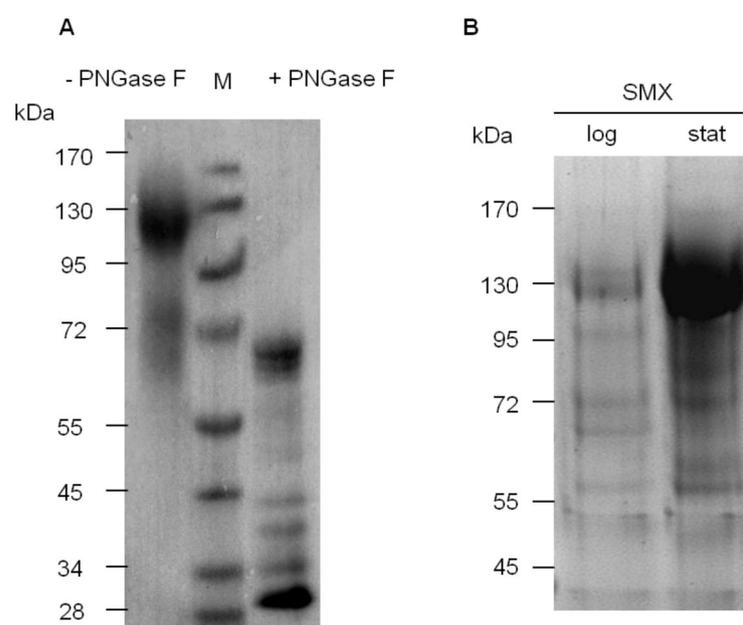


Abb. 3.5: Glykosylierung und Sekretion der Invertase in SMX-Medium. (A) Stationäre SMX-Kulturmedien vor (-) und nach (+) PNGase F-Behandlung wurden durch eine SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und Invertase wurde in einem Immunoblot durch ein Anti-ScSuc2-Antiserum detektiert. (B) 20 µl von Kulturmedien logarithmischer (log, OD_{600 nm} = 6) und stationärer (stat, OD_{600 nm} = 18) *C. utilis* DSMZ2361-Zellen wurden nach Wachstum in SMX-Medium durch eine SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Die Proteinmassen sind in kDa angegeben. M= Proteinstandard.

Da die massenspektrometrische Analyse des Sekretoms mehrere Teilsequenzen der *C. utilis*-Invertase ergeben hatte, war es möglich den CUG-Kodongebrauch bei *C. utilis* zu überprüfen. Bis zu diesem Zeitpunkt war nicht bekannt, ob *C. utilis* zu der CUG-Gruppe gehört, welche das CUG-Kodon nicht in Leucin, sondern in Serin translatieren. Mit Hilfe eines identifizierten Peptids der sekretierten Invertase, welches Leucin beinhaltet, wurde in einem Vergleich mit der Genomsequenz des *C. utilis* DSMZ2361-Stammes gezeigt, dass *C. utilis* das CUG-Kodon in Leucin und nicht in Serin translatiert (Abb. 3.6). Demzufolge gehört *C. utilis* nicht zur CUG-Gruppe der *Candida*-Spezies (Leuker und Ernst, 1994).

1563 1665
 ggagaagg gcaagccatc aaacgtcgat atcgtggcaa gctcctccaa ggaggettac accgtggacc agctgactgt gagatgtctc actgttgacg aatag
 cctcttcc cgttcggtag tttgcagcta tagcaccggt cgaggaggtt cctccgaatg tggcacctgg tcgactgaca ctctacagag tgacaactgc ttatc
 E K G K P S N V D I V A S S S K E A Y T V D Q L T V R C L T V D E -

Abb. 3.6: CUG-Kodongebrauch bei *C. utilis*. Ausschnitt des *C. utilis* *INV1*-Gens und der Aminosäuresequenz. Das durch Massenspektrometrie gefundene tryptische Peptid (blaue Box) beinhaltet ein Leucin (grün) welches durch ein CTG-Triplett (rot) kodiert wird. Die entsprechende genomische DNA-Sequenz entstammt aus dem *C. utilis* DSMZ2361 Wildtyp (D. Tielker und J. F. Ernst, unveröffentlicht).

3.2 Sekretion heterologer Proteine in *C. utilis*

Die heterologe Proteinherstellung, zum Beispiel von Monellin (Kondo *et al.*, 1997), gelang in *C. utilis* bisher nur intrazellulär, deshalb sollte in dieser Arbeit die Sekretion von heterologen Proteinen in das Kulturmedium von *C. utilis* untersucht werden. Die Ergebnisse der Sekretomanalyse lassen vermuten, dass *C. utilis* ein geeigneter Sekretionswirt ist. Diese Annahme sollte am Beispiel zweier Lipasen, der *C. antarctica* Lipase B (CalB) und der *U. maydis* Lipase 2 (Uml2), untersucht werden.

3.2.1 Expressionsplasmide

Für die heterologe Expression der *CALB*- und *UML2*-Gene wurde ein Expressionsplasmid verwendet, in welchem das bakterielle *sat1*-Gen unter der Kontrolle des *C. albicans* *ACT1*-Promotors steht (Kunigo, 2013). Das *sat1*-Gen vermittelt eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Nourseothricin (Abb. 3.7). Nach Vorversuchen von M. Kunigo wurde für die Selektion von *C. utilis*-Transformanten eine Nourseothricin-Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt (Kunigo, 2013). Zusätzlich zu diesem Selektionsmarker enthielt das Ausgangsplasmid die Sequenz für ein dreifaches HA-Epitop um C-terminale Fusionen für das gewünschte Protein zu konstruieren. Als Transkriptionsterminator diente die *C. albicans* *ADH1t*-Sequenz (Abb. 3.7). Die ebenfalls auf dem Plasmid vorhandene chromosomale Replikationssequenz *CaARS2* aus *C. albicans* hatte sich in Vorversuchen als nicht funktionell in *C. utilis* erwiesen (Kunigo, 2013).

Das Modellenzym CalB (342 Aminosäuren) besitzt eine für die Sekretion notwendige Signalsequenz (18 Aminosäuren), die an eine Pro-Sequenz (7 Aminosäuren) fusioniert ist (Abb. 1.3). Am C-Terminus der Pro-Sequenz befindet sich eine Erkennungssequenz (Lysin-Arginin) für die Kex2-Protease, welche die Pro-Sequenz im Golgi-Apparat vom reifen Protein abtrennt. Zusätzlich trägt CalB eine N-X-S/T-Erkennungssequenz für eine mögliche N-Glykosylierung (Abb. 1.3). Die kodierende Region für *CALB* (NCBI GenBank-Nr.: KC692236) wurde künstlich synthetisiert, wobei der Kodongebrauch von 29 *P. jadinii* Genen verwendet wurde (www.kazusa.jp) und in Form von Plasmid pGene-ART-CalB (GeneArt) zur

3. Ergebnisse

Verfügung gestellt wurde. Ein 1046 bp-langes, Kodon-optimiertes *SmaI/HindIII*-*CALB*-Fragment aus pGene-ART-CalB wurde anschließend in Plasmid pSat1-3×HA-ARS kloniert. Das resultierende Plasmid, pSat1-3HA-ARS-CALB, enthielt nun die *CALB*-kodierende-Sequenz in Phase mit der Sequenz für das dreifache HA-Epitop (Abb. 3.7).

Für die Expression des *CALB*-Gens wurden die Promotorsequenzen der *TDH3*-, *PGK1*- und *PMA1*-Gene ausgewählt. Alle drei Sequenzen stellen starke, konstitutiv aktive Promotoren dar. *TDH3* und *PGK1* kodieren für Proteine der Glykolyse (McAlister und Holland, 1985; Piper *et al.*, 1986) und ihre Gene enthalten starke Promotoren, die konstitutiv aktiv sind. *PMA1* kodiert für die Plasmamembran H^+ -ATPase (Serrano *et al.*, 1986) und enthält einen starken, konstitutiven Promotor. Da in Hefen typischerweise die ersten 1000 bp stromaufwärts eines ORFs den Promotor dieses Gens enthalten, wurde ein 1011 bp-langes Fragment stromaufwärts des *PMA1*-ORFs mit Hilfe der Primer PMA1pFWD/REV aus dem *C. utilis* Genom amplifiziert, wobei flankierende Restriktionsschnittstellen für *HindIII* und *NarI* angehängt wurden. Ebenso wurde ein 972 bp-langes Fragment stromaufwärts des *TDH3*-ORFs, sowie ein 1351 bp-langes Fragment stromaufwärts des *PGK1*-ORFs mit Hilfe der Primer TDH3p-FWD/REV beziehungsweise PGK1p-FWD/REV, amplifiziert.

Die Promotorsequenzen wurden in Plasmid pSat1-3HA-ARS-CALB eingefügt, so dass das *CALB*-Gen unter der Kontrolle einer dieser drei Promotorsequenzen steht (Abb. 3.7). Die Plasmide wurden mit pCB1 (*TDH3p*-*CALB*^{HA}), pCB16 (*PGK1p*-*CALB*^{HA}) und pCB17 (*PMA1p*-*CALB*^{HA}) bezeichnet.

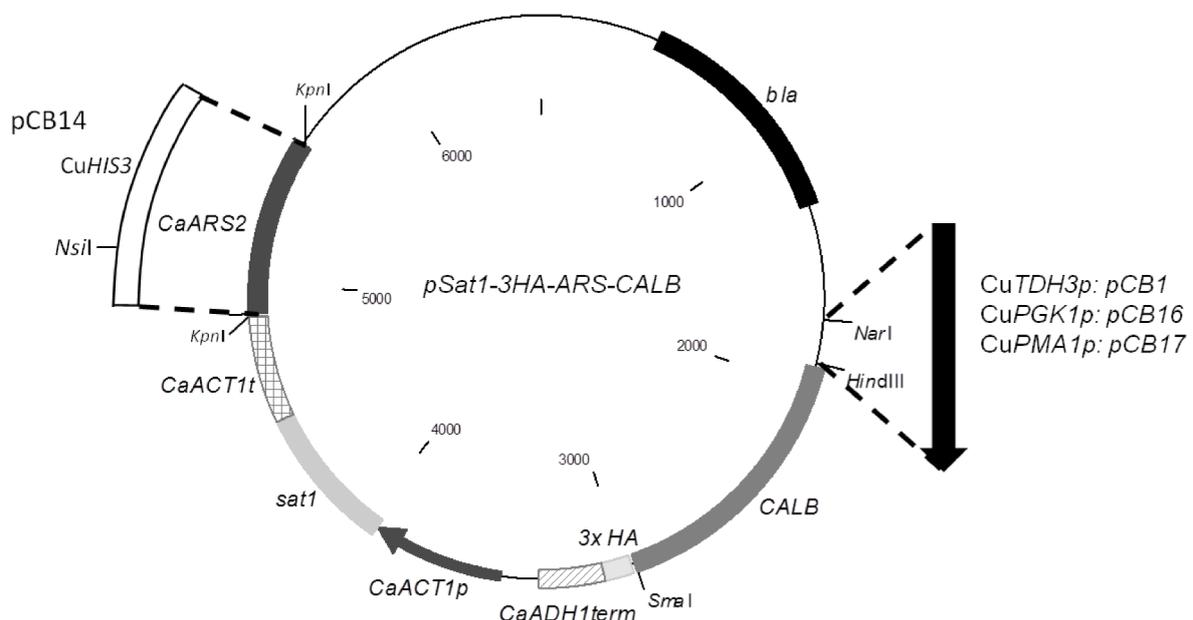


Abb. 3.7: *CALB*-Expressionsplasmide. Die Plasmidkarte von pSat1-3×HA-ARS-CALB mit folgenden Sequenzen: *C. albicans* ARS (*CaARS2*), *C. albicans* *ACT1*- und *ADH1*-Terminatoren (*CaACT1t*, *CaADH1term*), *C. albicans* *ACT1*-Promotor (*CaACT1p*), der Nourseothricin N-Acetyltransferase kodierenden Sequenz (*sat1*) und der kodierenden Sequenz für *CALB*. Mit Hilfe der Schnittstellen für *NarI* und *HindIII* wurden die *CuTDH3p*, *CuPGK1p* und *CuPMA1p*-Promotorsequenzen eingefügt. Für Plasmid pCB14 wurde die *CaARS2*-Sequenz durch die *CuHIS3*-Sequenz ausgetauscht.

3.2.2 Transformation der Expressionsplasmide

Die drei konstruierten Plasmide pCB1 (*TDH3p-CALB^{HA}*), pCB16 (*PGK1p-CALB^{HA}*) und pCB17 (*PMA1p-CALB^{HA}*) wurden nach der Methode von Mitchell (Wilson *et al.*, 1999) in *C. utilis* DSMZ2361 transformiert (Abschnitt 2.1.3). Dafür wurden die Plasmide in der Promotorsequenz linearisiert, um sie durch homologe Rekombination chromosomal in die entsprechenden Promotorloci von *C. utilis* zu integrieren. Als Negativkontrolle dienten Plasmide (pMC1 mit *TDH3p*; pMC9 mit *PGK1p*; pMC13 mit *PMA1p*), bei welchen die *CALB*-Sequenz nicht eingefügt wurde. Die Selektion auf Transformanten erfolgte auf YPD-Agarplatten mit 10 µg/ml Nourseothricin.

Die genomische Integration der Plasmide wurde mit Hilfe einer Southern-Blot-Analyse in unverdauter gDNA von je einem CBCu1, CBCu13 und CBCu16-Transformanten überprüft. gDNA der Transformanten, die mit EtBr auf einem Agarosegel sichtbar gemacht wurde, lief oberhalb einer Größe von 10 kb (Abb. 3.8 A). Mit Hilfe einer *CALB*-Sonde wurde in den Transformanten CBCu1 (*TDH3p-CALB^{HA}*), CBCu13 (*PGK1p-CALB^{HA}*) und CBCu16 (*PMA1p-CALB^{HA}*) das Plasmid auf Höhe der chromosomalen DNA detektiert (> 10 kb) (Abb. 3.8 B), während in der gDNA des Kontrollstammes MKCu1 (mit pMC1) das Plasmid nicht detektiert wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expressionsplasmide in den Transformanten nicht episomal vorliegen, sondern chromosomal integriert wurden.

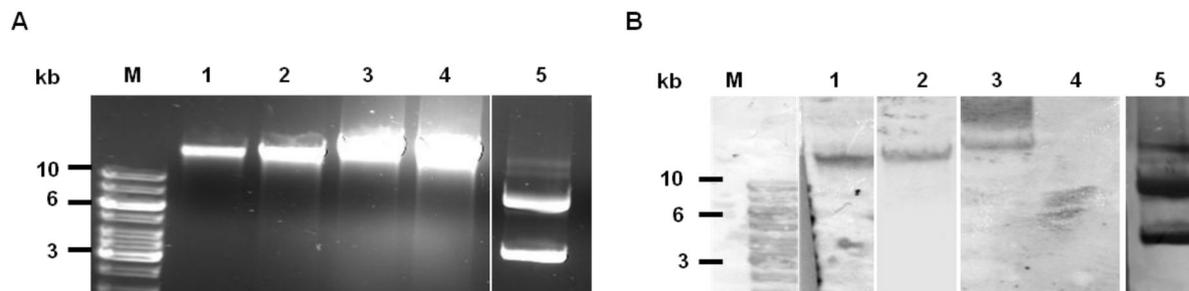


Abb. 3.8: Chromosomale Plasmidintegration. Die gDNA der Transformanten wurde auf Plasmidsequenzen durch Southern-Blot-Analyse mit Hilfe einer *CALB*-Sonde untersucht. **(A)** Die ungeschnittene gDNA der Transformanten von CBCu16 (Spur 1), CBCu1 (Spur 2) und CBCu13 (Spur 3) wurde mit Hilfe von EtBr gefärbt oder **(B)** durch eine *CALB*-Sonde auf einem Southern-Blot detektiert. Als Negativkontrolle diente Stamm MKCu1 (Spur 4). Plasmid-DNA von pSat1-3HA-ARS-CALB diente als Positivkontrolle (500 ng, Spur 5). M= Größenstandard.

Es sollte anschließend untersucht werden, welcher der drei Promotoren der effizienteste für die Sekretion von CalB in das Kulturmedium ist. Für die qualitative Detektion der CalB-Sekretion wurden Tributyrin-Agarplatten benutzt. Das Glycerinester Tributyrin sorgt für eine Trübung der Agarplatten, welche durch die Hydrolyse des Tributyrins durch Lipasen wieder verschwindet. Dabei wird ein Klärungshof („halo“) um Kolonien sichtbar, welche Lipasen sekretieren. Die Ausbildung solcher „halos“ war nach einer Inkubation der Platten für mindestens 4 Tage bei 30 °C zu beobachten (Abb. 3.9). Die Kontrolltransformanten (ohne CalB) zeigten keine Aufklärungshöfe, was darauf schließen lässt, dass *C. utilis* ohne die Transformation des Plasmids nicht in der Lage ist, Tributyrin zu hydrolysieren. Bei

3. Ergebnisse

Stamm CBCu16 (*PMA1p-CALB^{HA}*) zeigte sich, im Gegensatz zu den anderen beiden Stämmen (CBCu1; CBCu13), ein kleinerer Hof um die Kolonie und somit eine geringere CalB-Sekretion.

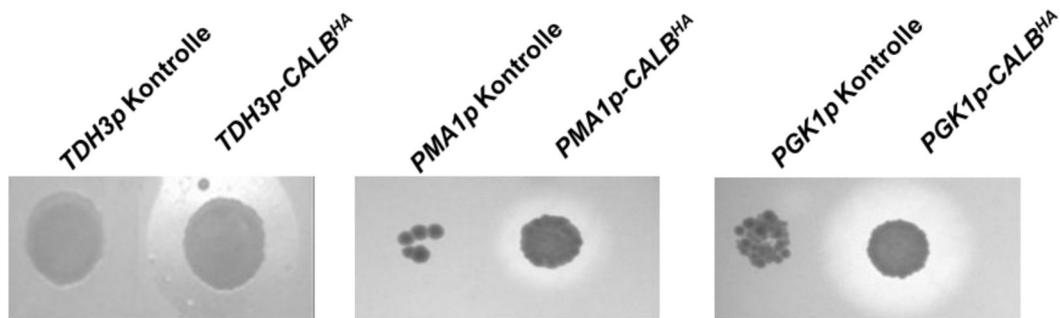


Abb. 3.9: Nachweis der CalB-Sekretion auf Tributyrin-Agarplatten. CalB-Aktivität wird durch die Klärung der Platten um die Kolonien angezeigt. Die Inkubation der Platten erfolgte für 4 Tage bei 30 °C.

Um die CalB-Sekretion zu bestätigen, wurden die Transformanten für 48 h in YPD-Medium bei 30 °C inkubiert und 20 µl der Kulturmedien von CBCu1, CBCu13 und CBCu16 wurden anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt und CalB in einem Immunoblot detektiert. In allen drei Stämmen befand sich CalB im Kulturmedium, wobei in Stamm CBCu16 (*PMA1p-CALB^{HA}*) eine schwächere CalB-Bande als bei CBCu1 (*TDH3p-CALB^{HA}*) und CBCu13 (*PGK1p-CALB^{HA}*) zu sehen ist (Abb. 3.10). Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen auf den Tributyrin-Agarplatten, bei denen ebenfalls die sekretierte CalB-Menge unter der Kontrolle des *PMA1*-Promotors am geringsten ausfiel (Abb. 3.9). Somit sind der *TDH3*- und der *PGK1*-Promotor für die CalB-Sekretion in *C. utilis* am geeignetsten.

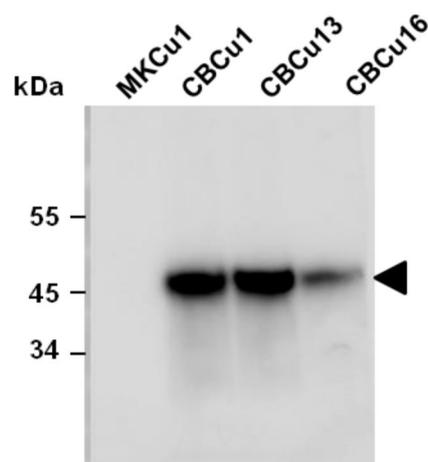


Abb. 3.10: Immunoblot der CalB-Sekretion von CBCu1, CBCu13 und CBCu16. Der Nachweis der CalB-Sekretion in das Kulturmedium erfolgte durch eine Immunoblotanalyse. Vergleichbare Mengen (20 µl) an Kulturmedien wurden durch eine SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt. Die Detektion der CalB-Banden fand mit Hilfe eines Anti-HA-Antikörpers statt (◄). Aufgetragen wurden Proben von Stamm CBCu1 (*TDH3p-CALB^{HA}*), Stamm CBCu13 (*PGK1p-CALB^{HA}*), Stamm CBCu16 (*PMA1p-CALB^{HA}*) und dem Kontrollstamm MKCu1 (*TDH3p*). Proteinmassen sind in kDa angegeben.

3.2.3 Integrationsanalyse und Plasmidstabilität

Es war erwartet worden, dass das im *TDH3p*-Bereich linearisierte Plasmid pCB1 bei der Transformation durch homologe Rekombination in den *TDH3*-Bereich des *C. utilis*-Genoms integriert wurde. Um dieses zu überprüfen, wurde eine Southern-Blot-Analyse mit der gDNA von drei CBCu1-Transformanten durchgeführt. Dabei wurde die gDNA mit einem Restriktionsenzym (*KpnI*) verdaut, welches innerhalb der Plasmidsequenz und einmal in der gDNA schneidet (Abb. 3.11 A).

Durch das Verdauen der gDNA mit *KpnI* sollte im Wildtyp mit Hilfe einer *TDH3p*-Sonde ein DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 8,64 kb detektiert werden. Falls das Plasmid in eines der drei *TDH3*-Allele integriert, sollten Banden mit einer Größe von 4,07 und 11,33 kb entstehen (Abb. 3.11 A).

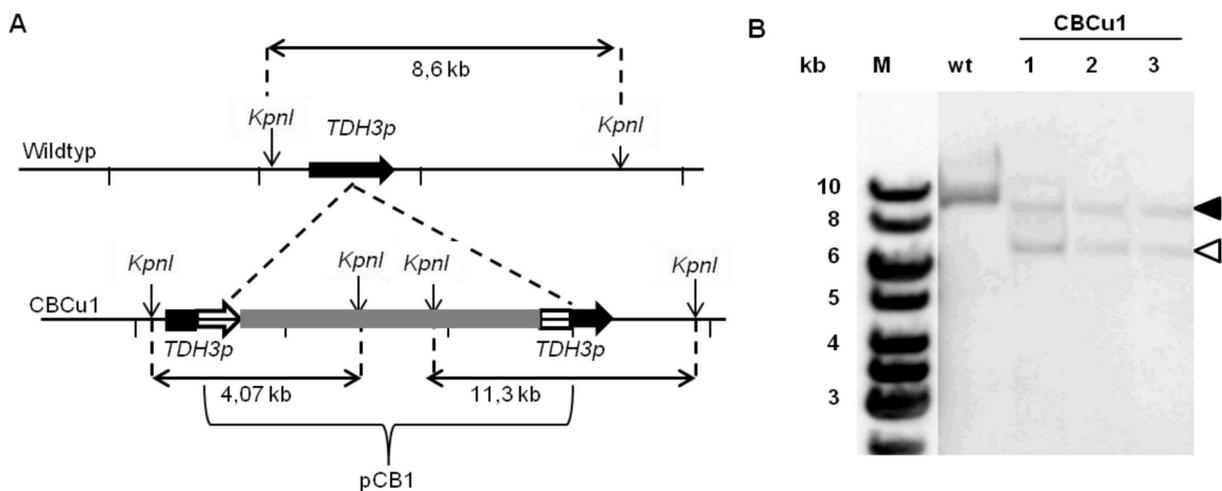


Abb. 3.11.: Ausschnitt des genomischen *TDH3*-Locus vor und nach Integration von Plasmid pCB1 und Southern-Blot-Analyse von CBCu1. (A) Der genomische *TDH3*-Locus in *C. utilis* vor (oben) und nach der Integration von pCB1 (unten). Nach dem Verdau der gDNA durch *KpnI* entsteht ein 8,4 kb großes Fragment im Wildtyp (oben). Nach der einfachen Integration von pCB1 entsteht ein 4,07 kb und ein 11,33 kb großes Fragment. (B) Die DNA-Fragmente wurden mit einer *TDH3p*-Sonde in einem Southern-Blot detektiert. Die gDNA wurde mit *KpnI* verdaut. Aufgetragen wurde die gDNA des *C. utilis* Wildtyps (wt), sowie die dreier CBCu1-Transformanten (1, 2, 3). Die Wildtyp-*TDH3p*-Bande ist mit ◀ gekennzeichnet, die *TDH3p*-Sequenz des Plasmids mit ◁. M= Größenstandard.

Die Southern-Blot-Analyse zeigt, dass alle drei untersuchten Transformanten (CBCu1-1, -2, -3) ein anderes Bandenmuster als der *C. utilis* Wildtyp aufweisen (Abb. 3.11 B). Die Bandengrößen bei den Transformanten entsprachen aber nicht den bei homologer Rekombination erwarteten Größen von 4,07 und 11,3 kb (Abb. 3.11 A), sondern zeigten weiterhin die *TDH3p*-Wildtyp Bande (Abb. 3.11 B, ◀). Zusätzlich war eine weitere Bande auf einer Höhe von ca. 6,7 kb sichtbar, die der *TDH3p*-Sequenz des Plasmids an einem unbekanntem Integrationsort entspricht (Abb. 3.11 B, ◁). Demzufolge integrierte das Plasmid zwar chromosomal, jedoch nicht in die *TDH3*-Promotorregion, sondern ektopisch an anderer, unbekannter Stelle. 13 weitere Transformanten wurden auf diese Weise überprüft, jedoch war bei allen dasselbe Bandenmuster zu sehen (Daten nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

Anschließend sollte durch eine Plasmidstabilitätsanalyse herausgefunden werden, wie stabil das Plasmid in den unbekanntem Genlocus integriert ist. Hierfür wurden die Stämme in An- und Abwesenheit von Nourseothricin (10 µg/ml) für 50 Generationen in YPD-Medium inkubiert und anschließend auf YPD-Agarplatten ausplattiert. Um die Resistenz zu überprüfen, wurden 100 der gewachsenen Kolonien daraufhin auf Agarplatten mit 10 µg/ml Nourseothricin ausplattiert. Es zeigte sich, dass bei Nourseothricin-Anwesenheit das Plasmid effizient in den Zellen der Transformanten beibehalten wurde. Fehlte der Selektionsdruck (kein Nourseothricin) so behielten nur 21 % der Zellen das Plasmid (Abb. 3.12).

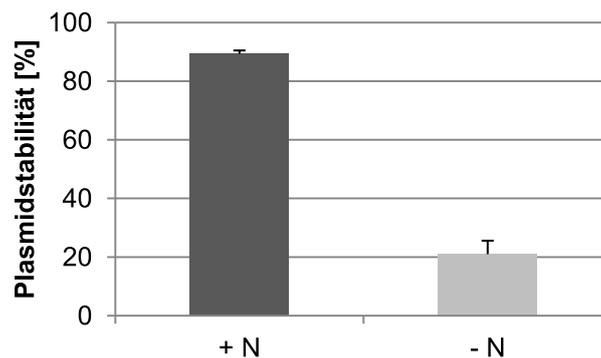


Abb. 3.12: Plasmidstabilitätstest von CBCu1. Kulturen von CBCu1 wurden für 50 Generationen in YPD-Medium mit (+ N) oder ohne (- N) Nourseothricin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf YPD-Platten ausplattiert, bevor 100 Einzelkolonien auf Selektionsplatten (mit 10 µg/ml Nourseothricin) ausgestrichen wurden. Die Anzahl der Zellen auf der Selektionsplatte wurde ins Verhältnis zur Anzahl der Zellen auf der YPD-Platte gesetzt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Integration des Plasmids an einem unspezifischen Locus instabil ist, obwohl das Plasmid funktionell ist und CalB in das Medium sekretiert wird (Abb. 3.10). Möglicherweise wird bei nicht-selektivem Wachstum das Plasmid durch mitotische Rekombination teilweise aus dem Genom entfernt.

3.2.4 Änderung des Integrationsortes

Da die Integration von pCB1 in die chromosomale *TDH3*-Promotorregion nicht erfolgreich war, wurde der chromosomale *HIS3*-Locus als alternativer Integrationsort ausgewählt. Hierfür wurde die in Plasmid pCB1 vorhandene *CaARS2*-Sequenz durch die *C. utilis* *HIS3*-kodierende Sequenz ersetzt (Abb. 3.7). Mit den Primern CuHIS3FWD/REV wurde ein 691 bp-langes *HIS3*-Fragment aus der chromosomalen *C. utilis*-DNA amplifiziert und durch die *CaARS2*-Sequenz in Plasmid pCB1 ersetzt (entstandenes Plasmid pCB14). Plasmid pCB14 wurde mit *NsiI* in der CuHIS3 Sequenz linearisiert und in Stamm DSMZ2361 transformiert. Die gDNA von drei ausgewählten Transformanten wurde mit *Scal* geschnitten und mit einer *HIS3*-Sonde in einem Southern-Blot analysiert. Die erwartete Bandengröße im Wildtyp liegt bei 1,3 kb und bei einer einfachen Integration von Plasmid pCB14 in den *HIS3*-Locus bei 5,6 kb und 3,1 kb (Abb. 3.13 A). In einer Southern-Blot-Analyse wurde in allen drei Transformanten ein Signal der Wildtyp *HIS3*-Sequenz detektiert (Abb. 3.13 B, ◀) und

3. Ergebnisse

zusätzlich war eine Bande der Plasmid-*HIS3*-Sequenz bei ca. 8,0 kb zu sehen (Abb. 3.13 B, ◀). Dieses Bandenmuster entspricht nicht den erwarteten Größen bei einer homologen Integration von pCB14 in den *HIS3*-Locus (Abb. 3.13 A). Somit ist bei keinem dieser drei Transformanten das Plasmid korrekt im chromosomalen *HIS3*-Locus integriert, sondern, wie bei Stamm CBCu1 (Abb. 3.11 B), ektopisch an unbekannter Stelle. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass in *C. utilis* die korrekte Plasmidintegration durch homologe Rekombination selten vorkommt. Dennoch konnte auch in diesen CBCu9-Transformanten die Funktionalität von Plasmid pCB14 durch einen Immunoblot bestätigt werden. Allerdings war gegenüber dem Stamm CBCu1 keine verbesserte CalB-Sekretion festzustellen (Daten nicht gezeigt).

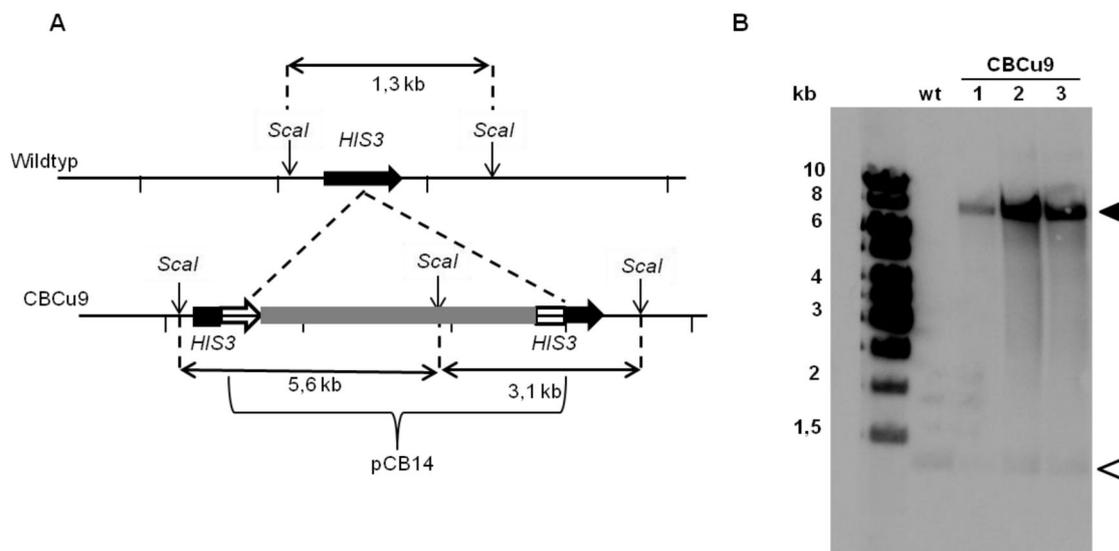


Abb. 3.13: Southern-Blot-Analyse der CBCu9-Transformanten. (A) Schematische Darstellung des *HIS3*-Locus vor (oben) und nach (unten) der Integration von pCB14. Die erwarteten Bandengröße betragen im Wildtyp (wt) = 1,3 kb und in den Transformanten 3,1 kb und 5,6 kb. (B) Die gDNA des Wildtyp-Stammes (wt) sowie von drei CBCu9-Transformanten (1, 2, 3) wurde mit *Scal* verdaut. Für die Detektion der Banden wurde eine *HIS3*-Sonde eingesetzt.

Mit CBCu9-Transformanten wurde, wie bei Stamm CBCu1 (Abschnitt 3.2.3), ein Plasmidstabilitätstest durchgeführt. Auch hier wurde festgestellt, dass ein Großteil der Zellen (62 %) das Plasmid innerhalb von 50 Generationen verlor, wenn kein Selektionsdruck vorhanden war (Abb. 3.14 A). Um zu überprüfen, ob sich die Plasmidintegration stabilisieren lässt, wurde mit drei der auf Nourseothricin-Agarplatten gewachsenen Kolonien (nach 50 Generationen) der Stabilitätstest wiederholt, so dass diese Kolonien 100 Generationen in nicht selektivem Medium gewachsen waren. Dabei stellte sich heraus, dass im Anschluss dieses 2. Stabilitätstests die Integration des Plasmids stabilisiert wurde und 74 % der Zellen das Plasmid behalten haben (Abb. 3.14 B). Dieses Verhalten führte jedoch zu keiner Verbesserung der CalB-Sekretion (Daten nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

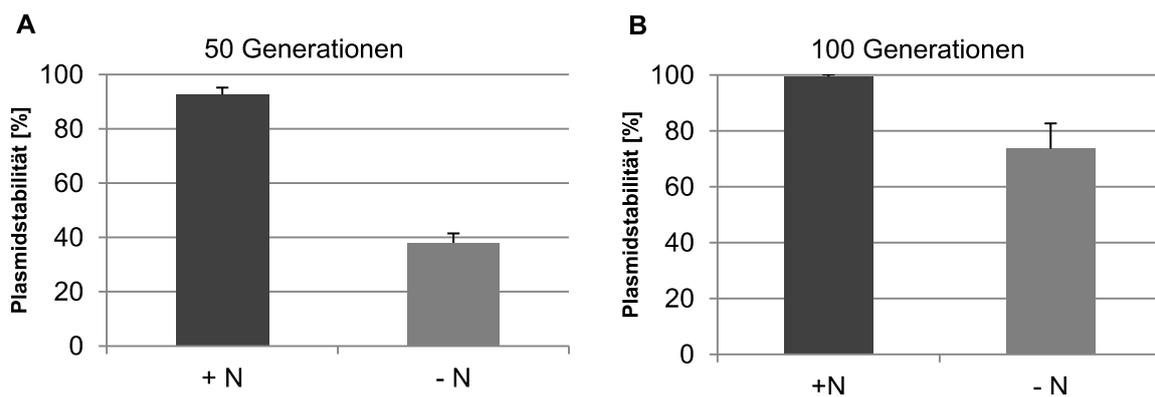


Abb. 3.14: Plasmidstabilitätstest von CBCu9. (A) Drei CBCu9-Transformanten wurden für 50 Generationen in YPD-Medium mit (+ N) und ohne (- N) Nourseothricin inkubiert. Anschließend wurde die Nourseothricin-Resistenz der Zellen durch Ausplattieren auf YPD-NST-Agarplatten bestimmt. (B) Drei Kolonien, welche nach 50 Generationen das Plasmid behalten hatten, wurden nochmals in selektivem bzw. nicht-selektivem Medium über 50 Generationen inkubiert. Die Plasmidstabilität wurde wie oben beschrieben berechnet. Angezeigt sind die Mittelwerte und die daraus berechneten Standardabweichungen der drei Transformanten.

3.2.5 Glykosylierung der CalB

In Hefen durchlaufen sekretorische Proteine das ER-Lumen, in welchem ko- und posttranslationale Modifikationen stattfinden. Eine wichtige Modifikation ist die *N*-Glykosylierung an einem Asparagin der Erkennungssequenz N-X-S/T. In der CalB-Sequenz befindet sich eine einzelne N-X-S/T-Erkennungssequenz für eine mögliche *N*-Glykosylierung (Abb. 1.3). Ob diese in *C. utilis* tatsächlich verwendet wird, kann allerdings nicht vorhergesagt werden. Des Weiteren kann nicht vorausgesagt werden, ob bei *C. utilis*, wie bei *S. cerevisiae*, durch eine Kettenverlängerung hochglykosylierte Proteine entstehen können (Abb. 1.1). Um festzustellen, ob CalB bei *C. utilis* *N*-glykosyliert wird, wurden CBCu1-Zellen in YPD-NST-Medium inkubiert und 20 µl des Kulturmediums wurden mit PNGase F behandelt und in einem Immunoblot analysiert (Abb. 3.15). In unbehandeltem Kulturmedium wandert CalB in der SDS-PAGE mit einer apparenten Molekülmasse von ca. 45 kDa, während nach PNGase F-Behandlung die Masse der CalB ca. 39 kDa beträgt. Die um ca. 5 kDa reduzierte Masse des Proteins nach PNGase F-Behandlung entspricht der berechneten Masse des CalB^{HA}-Proteins (39 kDa) und ist durch die Entfernung einer Zuckerkette der Struktur GlcNAc₂Man₁₀₋₁₄ zu erklären (Abb. 3.15). Diese Masse entspricht ungefähr einer Kern-*N*-Glykosylierung. Somit kann festgehalten werden, dass CalB bei *C. utilis*, wie auch bei *P. pastoris* und *A. oryzae* (Rotticci-Mulder *et al.*, 2001; Eom *et al.*, 2013), *N*-glykosyliert wird, die *N*-Glykosylkette jedoch nicht hoch glykosyliert wird.

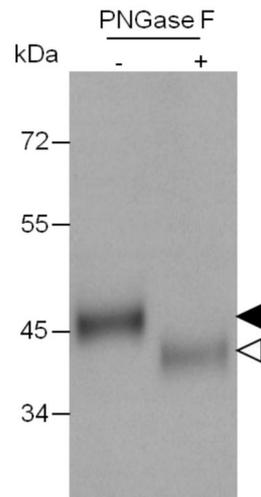


Abb. 3.15: Immunoblot der Deglykosylierung von CalB. 20 μ l des Kulturmediums von stationären CBCu1-Zellen ($OD_{600\text{ nm}} = 25$) wurden mit (+) und ohne (-) PNGase F behandelt. Proteine wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt (10 % Acrylamid) und CalB wurde durch einen Anti-HA-Antikörper in einem Immunoblot nachgewiesen. Die Abspaltung der Zuckerketten wird durch die Verringerung der Proteinmasse dargestellt. Proteinmassen sind in kDa angegeben. Die glykosylierte Form der CalB ist mit \blacktriangle gekennzeichnet, die de-glykosylierte Form mit \triangle .

3.2.6 CalB-Aktivität in Medium und Zellen

Die bisherigen Experimente zeigten, dass CalB von *C. utilis* in das Medium sekretiert wird. Es blieb aber unklar, wie viel der insgesamt produzierten CalB in das Medium sekretiert wird und welcher Anteil in den Zellen bleibt. Um dieses zu überprüfen wurde Stamm CBCu1 für 72 h in YPD-Medium unter Selektionsdruck inkubiert. Anschließend wurde eine vergleichbare Menge an Zellen und Kulturmedium durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Immunoblot analysiert (Abb. 3.16). In Spur 4 (Zellen) ist ein deutlich stärkeres CalB-Signal als in Spur 2 (Kulturmedium) zu sehen. Da die aufgetragenen Mengen vergleichbar sind, lässt sich somit feststellen, dass trotz der Sekretion von CalB ein der Großteil der Lipase Zell-assoziiert bleibt.

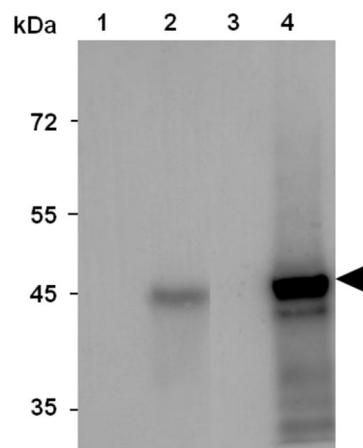


Abb. 3.16: CalB in Medium und Zellen von Stamm CBCu1. CBCu1 wurde für 72 h in YPD-Medium mit 10 μ g/ml Nourseothricin inkubiert. Die Proteine des Kulturmediums und Zell-assoziierte Proteine

3. Ergebnisse

wurden durch eine SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und CalB (◀) wurde durch einen Anti-HA-Antikörper in einem Immunoblot detektiert. Die aufgetragene Menge an Protein in Spur 1 und 2 entspricht 1 ml Kulturmedium, in Spur 3 wurde eine äquivalente Menge an Zellen von CBCu1 aufgetragen. In den Spuren 1 und 3 befinden sich das Kulturmedium bzw. die Zellen des Kontrollstamms MKCu1. Die Proteinmassen sind in kDa angegeben.

Um festzustellen, in welchem Zellkompartiment CalB akkumuliert, wurde eine Zellfraktionierung von Stamm CBCu1 durchgeführt. Dafür wurde zuerst die Zellwand durch eine β 1,3-Glucanase abgebaut und die Sphäroplasten durch Zentrifugation (5 min, 3.500 Upm) vom freigesetzten Periplasma (PP) getrennt. Mit Hilfe von Glasperlen wurden die Sphäroplasten anschließend aufgeschlossen. Durch Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellen bei $2.000 \times g$ wurden Zelltrümmer und restliche, nicht-aufgeschlossene Zellen in Pellet P1 angereichert, wobei der Überstand (Ü1) das Cytoplasma enthält. Dieser Überstand Ü1 wurde anschließend mit $10.000 \times g$ zentrifugiert, wobei das ER- und der Golgi-Apparat in diesem Pellet P2 angereichert wurden und das Cytoplasma ohne ER und Golgi-Apparat im Überstand (Ü2) vorlag. In einer weiteren Zentrifugation dieses Überstandes Ü2 bei $40.000 \times g$ wurden Transportvesikel in Pellet P3 angereichert und in Überstand (Ü3) befand sich das Cytoplasma. Die Proben der differentiellen Zellfraktionierung wurden in vergleichbaren Mengen auf eine SDS-PAGE aufgetragen und CalB wurde mit einem Anti-HA-Antikörper in einem Immunoblot nachgewiesen. Der Immunoblot zeigt, dass im Periplasma (PP) im Vergleich zum Kulturmedium (KM) weniger CalB vorhanden war, wohingegen in P1 (Pellet $2.000 \times g$, Zellwandbestandteile, Zelltrümmer) ein deutlich stärkeres Signal sichtbar war. In der Cytoplasmafraktion mit ER und Golgi-Apparat (Ü1) wurde ebenfalls CalB detektiert, aber im Cytoplasma ohne ER und Golgi-Apparat (Ü3) befand sich keine CalB. Zusätzlich wurde in Pellet P2 ($10.000 \times g$) ein CalB-Signal detektiert, wobei es sich möglicherweise um ER- und Golgi-assoziierte CalB handelt. Ein geringer Teil der Lipase befand sich in Membranvesikeln (P3), welche wahrscheinlich den Transport zwischen den einzelnen Zellorganellen und zur Zellwand übernehmen. An Hand dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass die Zellwand(-durchlässigkeit), sowie das ER die Sekretion von CalB ins Medium behindern.

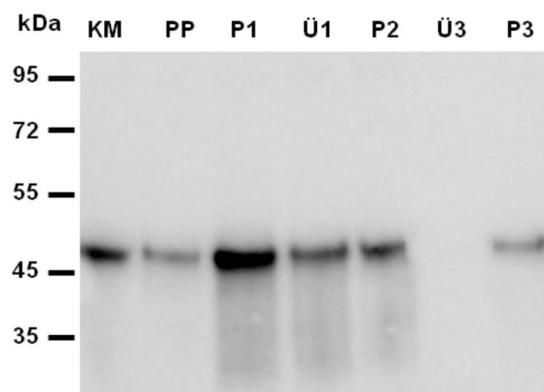


Abb. 3.17: Immunoblot der Zellfraktionierung von CBCu1. In den Spuren wurden vergleichbare Mengen (20 μ l) der Proben aufgetragen. KM= Kulturmedium, PP= Periplasma, P1= Pellet $2.000 \times g$, Ü1= Cytoplasma, P2= Pellet $10.000 \times g$, Ü3= Überstand $40.000 \times g$, P3= Pellet $40.000 \times g$. CalB wurde mit Hilfe eines Anti-HA-Antikörpers detektiert. Die Proteinmassen sind in kDa angegeben.

3.2.7 Einfluss der Signalsequenz auf die CalB-Sekretion

Eine Voraussetzung für die Sekretion von Proteinen ist die Anwesenheit einer N-terminalen Signalsequenz. Diese ist in ihrem Kernbereich hydrophob und sorgt für die Translokation des Proteins in das ER-Lumen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Signalsequenz die Sekretion der CalB beeinflusst. Dafür wurden die heterologen Signalsequenzen der CalB, die *C. utilis*-eigene Signalsequenz der Invertase, sowie die heterologe Prä-Pro-Sequenz des Vorläufers des Paarungspheromons α (Mfa1) aus *S. cerevisiae* miteinander verglichen. Um die natürliche Prä-Pro-Sequenz der CalB auszutauschen, wurde zunächst durch eine Mutagenese-PCR mit den Primern Prä-Pro-CalB-FWD/REV eine *EcoRV*-Schnittstelle stromabwärts der kodierenden Sequenz für das CalB Prä-Pro-Peptid eingefügt (Abb. 3.18 oben), so dass diese Prä-Pro-kodierende-Sequenz durch ein *HindIII/EcoRV*-Fragment mit der Information für eine alternative Signalsequenz ausgetauscht werden konnte.

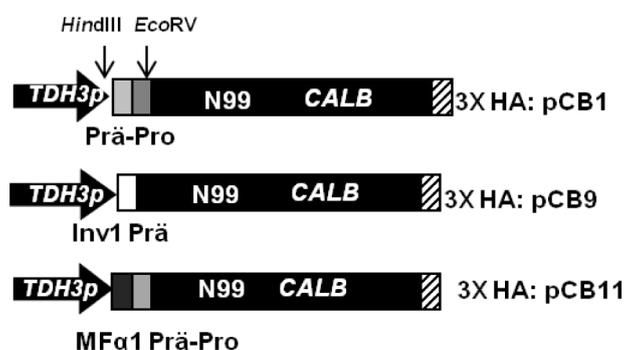


Abb. 3.18: Expressionseinheiten für die CalB-Sekretion. Die *CALB*-Sequenz in pCB1 beinhaltet eine Prä-Pro-Sequenz, sowie ein dreifaches HA-Epitop am C-Terminus. Durch eine Mutagenese-PCR wurde eine *EcoRV*-Schnittstelle für den Austausch der Prä-Pro-Sequenz (*HindIII*, *EcoRV*) eingefügt. Die singuläre *N*-Glykosylierungsstelle (N99) ist angegeben. Plasmid pCB9 kodiert für ein Fusionsprotein, bestehend aus der Signalsequenz der *C. utilis*-Invertase (Prä), sowie der reifen *CALB*-Sequenz (ohne Prä-Pro-Sequenz). Bei Plasmid pCB11 wurde die CalB-Prä-Pro-kodierende-Sequenz durch die Prä-Pro-Sequenz für die des Paarungspheromons-Vorläuferproteins Mfa1 aus *S. cerevisiae* ersetzt.

Die Signalsequenz der Invertase wurde ausgewählt, da Invertase als das am besten sekretierte Protein im Sekretom des SMD-Mediums identifiziert worden war (Tabelle 9.1; Abb. 3.4). Durch die Primer INV-SP-FWD/REV wurde die *INV1*-Signalsequenz aus der gDNA von *C. utilis* DSMZ2361 amplifiziert, wobei endständige *HindIII*- und *EcoRV*-Schnittstellen eingefügt wurden. Die Sequenz für die Prä-Pro-Region des Mfa1-Proteins wurde mit Hilfe der Primer α -Prä-Pro-Fwd/REV aus Plasmid pMA-T (Kunigo, 2013) amplifiziert, wobei flankierende *HindIII*- und *EcoRV*-Schnittstellen eingefügt wurden. Mit Hilfe der Schnittstellen wurde die Information für die natürliche Prä-Pro-Sequenz der CalB durch die Sequenzen für die Inv1- und des Mfa1-Proteine ausgetauscht. Die erhaltenen Plasmide wurden mit pCB9 (*INV1-CALB^{HA}*) bzw. pCB11 (*Mfa1-CALB^{HA}*) bezeichnet (Abb. 3.18 Mitte, unten). Die Plasmide wurden anschließend mit *SacI* im *TDH3*-Promotor linearisiert und in *C. utilis* DSMZ2361 transformiert. Für die Auswahl der besten Transformanten

3. Ergebnisse

wurden 16 CBCu6- (*INV1-CALB^{HA}*) Transformanten semiquantitativ in einem Immunoblot miteinander verglichen und die CBCu6-Transformante mit dem stärksten CalB-Signal wurde für die folgenden Versuche benutzt. Ebenso wurde mit 16 CBCu11-Transformanten (*MFa1-CALB^{HA}*) verfahren (Daten nicht gezeigt).

Die Transformanten CBCu6 (*INV1-CALB^{HA}*) und CBCu11 (*MFa1-CALB^{HA}*) wurden auf die korrekte chromosomale Integration der Plasmide in den *TDH3*-Promotorlocus durch einen Southern-Blot überprüft. Dabei wurde nach dem Verdau der gDNA mit *KpnI* eine 8,6 kb-große Bande in *C. utilis*-DSMZ2361 erwartet. Bei einer einfachen Integration der Plasmide in den *TDH3*-Locus wurden Bandengrößen von 4,1 kb und 11,33 kb bei CBCu6 (mit pCB9) bzw. von 4,3 und 11,5 kb bei CBCu11 (mit pCB11) erwartet (Abb. 3.19 A, B).

Wie auch bei Stamm CBCu1 (Abb. 3.11) wurde zwar eine chromosomale Integration der Plasmide festgestellt (Abb. 3.19 C), jedoch fand die Integration nicht in den *TDH3*-Locus statt, sondern, wie bei CBCu1, ektopisch an unbekannter, aber gleicher Stelle wie bei CBCu1 (Abb. 3.11). Die zusätzliche *TDH3p*-Bande auf einer Höhe von ca. 6,7 kb (Abb. 3.19 C, ◀) in den beiden Stämmen zeigte eine deutliche größere Intensität als die der Wildtyp-*TDH3p*-Bande (8,6 kb) (Abb. 3.19 C, ◁). Dieses lässt die Vermutung zu, dass mehr als eines dieser unbekanntes Allele durch das Plasmid besetzt ist.

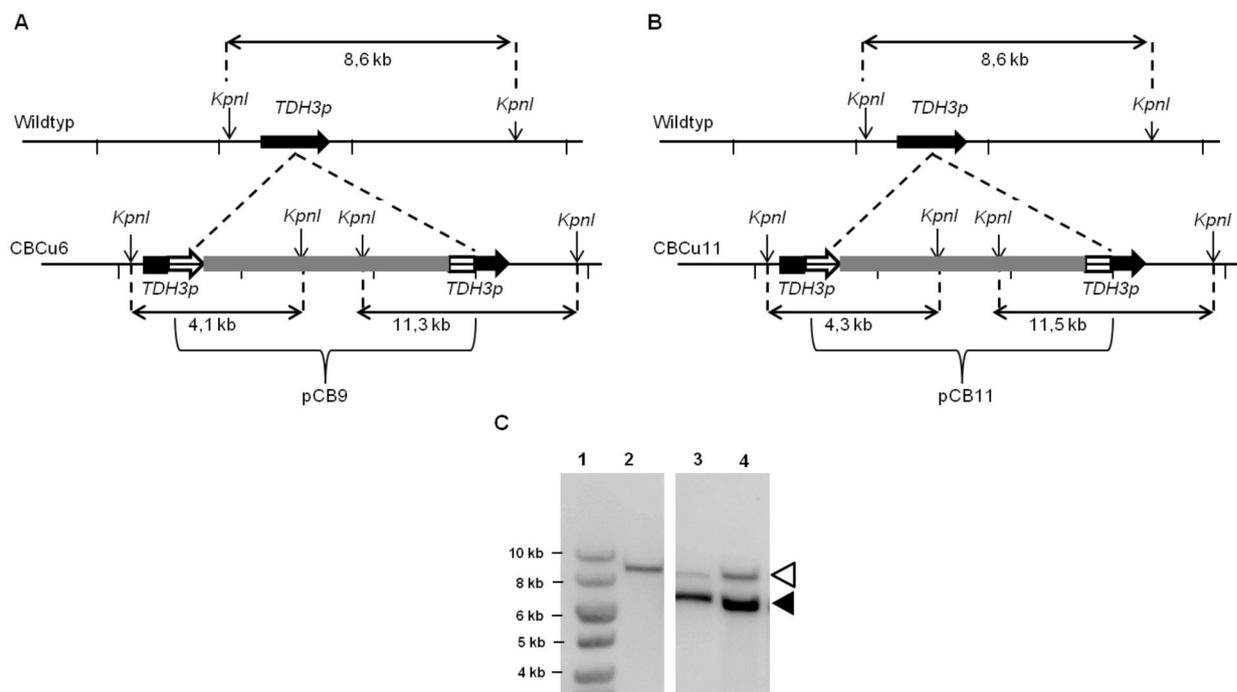


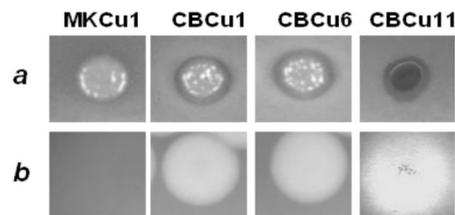
Abb. 3.19: Southern-Blot-Analyse von CBCu6 und CBCu11. (A) Der genomische *TDH3*-Bereich von DSMZ2361 vor (oben) und nach (unten) der Integration von pCB9. (B) Der genomische *TDH3*-Bereich vor (oben) und nach (unten) der Integration von pCB11. (C) Die gDNA des *C. utilis*-Wildtyps (2) und der CBCu11- (3) und CBCu6- (4) Transformanten wurde mit *KpnI* verdaut. Die Wildtyp-*TDH3p*-Bande ist durch ◁ gekennzeichnet, die *TDH3p*-Plasmidsequenz mit ◀. Die Detektion der Banden fand mit Hilfe einer *TDH3p*-Sonde statt. 1 = Größenstandard.

Für den Vergleich der Sekretionseffizienzen der drei Stämme, CBCu1 (mit pCB1), CBCu6 (mit pCB9) und CBCu11 (mit pCB11), wurden die Kulturen über 145 h in

3. Ergebnisse

YPD-Medium inkubiert und in bestimmten Zeitabschnitten Aliquots der Kulturen abgenommen. 20 µl der Kulturmedien sowie der Zellpellets wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch einen Immunoblot analysiert. Für den Nachweis der lipolytischen Aktivität in den Kulturmedien wurden Tributyrin-Agarplatten verwendet (Abb. 3.20 A). Auf den Tributyrin-Agarplatten ist zu erkennen, dass sich um die Kolonien von CBCu1, CBCu6, CBCu11 ein Klärungshof gebildet hatte und somit aktive CalB produziert und sekretiert wurde. Dabei war der Klärungshof um Stamm CBCu11 (Mfα1-CalB) früher vorhanden und geringfügig größer als bei den anderen beiden Stämmen (Abb. 3.20 A, a). Dasselbe gilt für die steril-filtrierte Kulturmedien der drei Stämme, wobei im Medium von CBCu11 früher ein Klärungshof zu sehen war und dieser größer als bei CBCu1 und CBCu6 war (Abb. 3.20 A, b). Diese Ergebnisse liefern einen ersten Hinweis auf den Einfluss der N-terminalen Sekretions-Signalsequenz auf die Sekretion der CalB. Insbesondere die Mfα1-Prä-Pro-Sequenz scheint die CalB-Sekretion positiv beeinflusst zu haben.

A



B

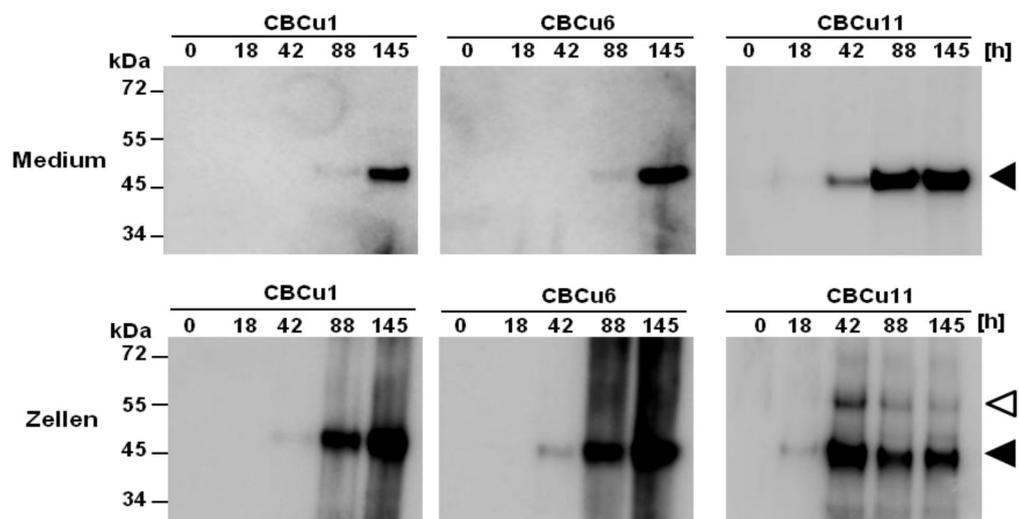


Abb. 3.20: Zeitabhängige Sekretion von CalB. (A) CBCu1 (*TDH3p-CALB^{HA}*), CBCu6 (*TDH3p-INV1-CALB^{HA}*), CBCu11 (*TDH3p-Mfα1-CALB^{HA}*) und Kontrollstamm MKCu1 (*TDH3p*) wurden für 4 Tage bei 37 °C auf Tributyrin-Agarplatten inkubiert (a). 5 µl steril-filtrierter Kulturmedien der Stämme wurden auf Tributyrin-Agarplatten getropft (b). Der Nachweis der lipolytischen Aktivität erfolgt durch die Aufnahme der Aufklärungshöfe. (B) Zell-assoziierte und sekretierte CalB wurde mit Hilfe eines Immunoblots nachgewiesen. 20 µl der Kulturmedien sowie eine vergleichbare Menge an Zellen wurden aufgetragen. Das CalB-Signal wird durch ◀ angezeigt, ◁ zeigt das unprozessierte Mfα1-CalB-Fusionsprotein an.

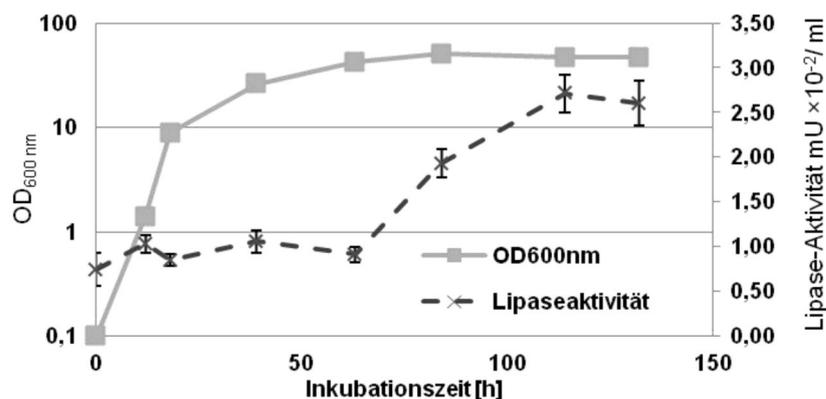
Durch einen Immunoblot sollte die Abhängigkeit der CalB-Sekretion von der Wachstumsphase-/dauer untersucht werden. Hierfür wurden Proben des

3. Ergebnisse

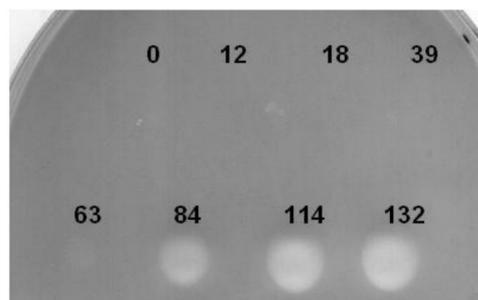
Kulturmediums und der Zellen aus verschiedenen Wachstumszeitpunkten analysiert (Abb. 3.20 B). Interessanterweise wurde bei Stamm CBCu1 und Stamm CBCu6 erst in der stationären Phase ($OD_{600\text{ nm}} = 30\text{-}35$, 88 h Inkubation) CalB im Kulturmedium nachgewiesen. Die Menge an CalB stieg danach im Verlauf der Inkubation bis zu 145 h weiter an (Abb. 3.20 B). Im Gegensatz dazu war bei Stamm CBCu11 bereits nach 42 h ein CalB-Signal im Kulturmedium sichtbar. Das CalB-Signal von CBCu11 war nach 88 h Inkubation deutlich stärker als nach 42 h, wobei die Intensität im Verlauf bis zu 145 h nicht weiter anstieg. In den Zellen von CBCu1 und CBCu6 wurde nach 42 h ein CalB-Signal nachgewiesen, während bei Stamm CBCu11 CalB bereits nach 18 h in den Zellen nachweisbar war. Die größte Zell-assoziierte CalB-Menge ließ sich in Stamm CBCu11 nach 42 h erkennen und nahm anschließend bis zum Ende (145 h) wieder ab. In den Zellen von CBCu11 wurde zusätzlich zu reifer CalB ein schwaches Signal auf einer Höhe von ca. 70 kDa detektiert, das dem unprozessierten Mfa1-CalB Fusionsprotein entspricht (Abb. 3.20 B). CalB wird, was besonders bei Stamm CBCu11 zu beobachten war, in den Zellen aller drei Stämme angehäuft, bevor es in das Medium abgegeben wird.

Mit Hilfe von Tributyrin-Agarplatten und einem spektrometrischen Flüssigttest zeigte sich bei Stamm CBCu1, dass die Menge an sekretierter CalB mit der lipolytischen Aktivität im Kulturmedium korreliert (Abb. 3.21 A). Lipolytische Aktivität war im Kulturmedium erst in der stationären Phase nachweisbar. Die Aktivität (pNPB-Assay) stieg bis zum Ende der Inkubation kontinuierlich an, was auch durch den Durchmesser der Klärungshöfe in Tributyrin-Plattentests bestätigt wird (Abb. 3.21 B).

A



B



3. Ergebnisse

Abb. 3.21.: Diagramm der wachstumsabhängigen CalB-Sekretion in Stamm CBCu1. (A) CBCu1 wurde in YPD-Medium bei 30 °C inkubiert. Die optische Dichte der Kultur (graue Linie) sowie die Lipaseaktivität (pNPB Assay) im Kulturmedium (gestrichelte Linie) wurden dabei zu ausgewählten Zeitpunkten bestimmt. Der Mittelwert der Lipaseaktivität sowie die Standardabweichung wurden mit drei biologischen Replikaten bestimmt. (B) 5 µl der Proben wurden ebenfalls auf eine Tributyrin-Agarplatte getropft und bei 37 °C für 4 Tage inkubiert. Die lipolytische Aktivität in den Proben ist durch die Klärungshöfe deutlich nachweisbar. Die Zahlen entsprechen der Inkubationszeit in Stunden.

3.2.8 Aufreinigung und Ausbeute der CalB aus *C. utilis* und *P. pastoris*

Da mit den vorherigen Ergebnissen bereits gezeigt wurde, dass eine aktive Form der CalB von *C. utilis* in das Medium sekretiert wird, sollte anschließend die Ausbeute und Reinigung von CalB bei *C. utilis* mit der in dem etablierten Sekretionswirt *P. pastoris* verglichen werden.

Um die Aufreinigung der CalB durch eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie zu ermöglichen, wurde eine CalB-Variante mit einem C-terminalen His₆-Epitop verwendet. Hierfür wurde Plasmid pCB1 durch eine singuläre *PacI*-Schnittstelle am 3'-Ende der *CALB*-Sequenz linearisiert und eine DNA-Sequenz, bestehend aus den komplementären Primern CalB-his-FWD/REV, eingefügt. Die dabei entstandene Sequenz kodiert für das Fusionsprotein CalB^{His} (Abb. 3.22 A). Die genomische Plasmidintegration in Stamm CBCu4 wurde, wie in Stamm CBCu1 (Abb. 3.11), durch eine Southern-Blot-Analyse untersucht. Die erwartete Bandengröße im Wildtyp beträgt nach einem Verdau der gDNA mit *KpnI* 8,6 kb und bei einer einfachen Integration von pCB5 in den *TDH3*-Locus 4,1 kb und 11,3 kb. Es wurde festgestellt, dass die detektierten Banden nicht den erwarteten Größen entsprachen und Plasmid pCB5 somit nicht im *TDH3*-Promotorlocus, sondern an einem unbekanntem Ort ektopisch integriert wurde (Abb. 3.22 B).

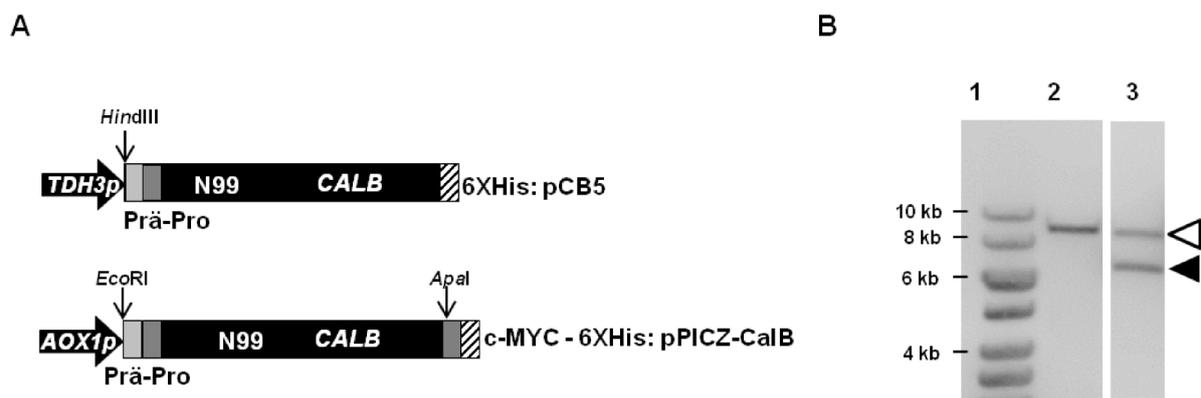


Abb. 3.22: Expressionseinheiten für die CalB-Reinigung und Southern-Blot von CBCu4. (A) Für die CalB-Reinigung aus *C. utilis* wurde mit Hilfe komplementärer Primer eine 6×His kodierende Sequenz an den C-Terminus der CalB-Sequenz angefügt. Für die Reinigung aus *P. pastoris* musste die kodierende *CALB*-Sequenz stromabwärts des *AOX1*-Promotors in Phase mit der für ein 6×His-Epitop sowie ein *c-myc* Epitop kodierenden Sequenzen in das pPICZ-A Plasmid (Invitrogen) kloniert werden. (B) Southern-Analyse von CBCu4 (*TDH3p-CALB^{His}*). 1= Größenstandard, 2= *C. utilis* Wildtyp, 3= CBCu4. Die gDNA der Stämme wurde mit *KpnI* verdaut, für die Detektion der Banden wurde eine *TDH3p*-Sonde benutzt. Die Wildtyp *TDH3*-Bande ist mit ◁ gekennzeichnet, die Plasmidsequenz mit ◼.

3. Ergebnisse

Für die CalB-Reinigung wurden CBCu4-Zellen (mit pCB5) für 72 h bei 30 °C in YPD-Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Lipase durch eine Affinitätschromatographie aufgereinigt. Für die Detektion der sekretierten Lipase wurden 5 µl jeder aufgefangenen Probe auf eine Tributyrinplatte getropft (Abb. 3.23 A). Auf der Tributyrin-Agarplatte ist in den Waschfraktion keine lipolytische Aktivität zu erkennen, wohingegen in den Eluaten (E1- E4) ein deutlicher Klärungshof zu sehen ist. Die lipolytische Aktivität im Durchfluss (FT) der Reinigung lässt sich dadurch erklären, dass ein kleiner Teil der Lipase nicht von der Ni-NTA-Säule gebunden wurde. 20 µl dieser aufgefangenen Proben wurden zusätzlich durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Hierdurch wurden die Beobachtungen der Tributyrinplatte bestätigt. In den Eluaten 1 und 2 zeigte sich eine deutliche Bande in Höhe von ca. 45 kDa (Abb. 3.23, ◀) und eine schwächere Bande ist bei ca. 35 kDa zu sehen (Abb. 3.23, ◁).

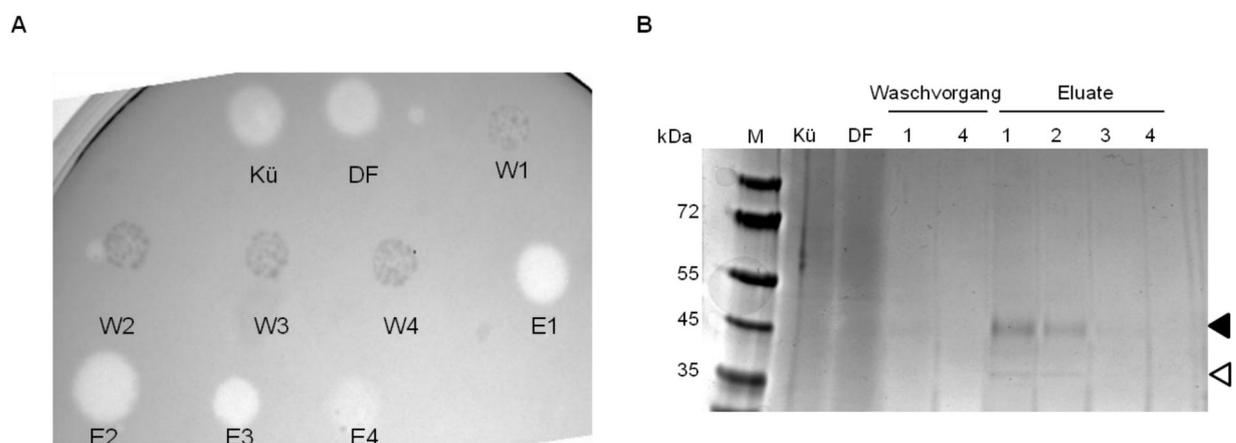


Abb. 3.23: Nachweis und Aktivität aufgereinigter CalB. (A) 5 µl der Fraktion der Ni-NTA-Reinigung wurden auf eine Tributyrin-Agarplatte getropft und für 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Kü= Kulturmedium, DF= Durchfluss, W1-W4= Waschvorgang 1- 4, E1- E4= Eluate 1- 4. (B) SDS-PAGE (10 % Acrylamid) mit 20 µl der Fraktionen der CalB-Reinigung. Aufgetragen wurden Proben des Kulturüberstandes (Kü), des Durchflusses (DF), des ersten (1) und vierten (4) Waschvorganges, sowie aller vier (1-4) Eluate. Die Proteine wurden durch Coomassie-Brilliant-Blau sichtbar gemacht. Die Proteinmassen sind in kDa angegeben, M= Proteinstandard.

Für einen Vergleich mit *P. pastoris* wurde die kodierende CALB-Sequenz mit den Primern CalB-PICZ-FWD/REV aus Plasmid pGeneArt-CalB amplifiziert, wobei flankierende *EcoRI*- und *ApaI*-Schnittstellen eingefügt wurden. Das PCR-Fragment wurde mit *EcoRI/ApaI* geschnitten und in Plasmid pPICZ-A (EasySelect Pichia Expression Kit, Life Technologies GmbH, Darmstadt) stromabwärts des AOX1-Promotors ligiert. Das dabei entstandene Plasmid pPICZ-CalB enthielt einerseits das *ble*-Gen aus *Streptoalloteichus hindustanus*, welches eine Resistenz gegenüber Zeocin vermittelt und kodierte außerdem für das Fusionsprotein CalB^{Myc-His}. Plasmid pPICZ-CalB wurde mit *SacI* linearisiert und anschließend in *P. pastoris* X-33 transformiert. Transformanten wurden mit Hilfe von 100 µg/ml Zeocin auf YPD-Agarplatten identifiziert und mit CBPp1 bezeichnet. Die Integration des Plasmids wurde durch eine Kolonie-PCR überprüft (Daten nicht gezeigt).

Die Expression des Fusionsproteins fand in CBPp1 durch Induktion des AOX1-Promotors mit 0,5 % Methanol laut den Herstellerangaben statt. 100 ml-Kulturen von

CBPp1 und CBCu4 wurden für 144 h bei 30 °C inkubiert und anschließend wurde CalB durch eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Konzentration der Lipase in den zusammengeführten Eluaten wurde durch einen Bradford-Assay bestimmt und die CalB-Aktivität wurde mit Hilfe eines flüssigen pNPB-Assays gemessen. Erstaunlicherweise wurde, mit dem in dieser Arbeit entwickelten *C. utilis* Sekretionssystem, bereits eine beachtliche Menge an CalB produziert und aufgereinigt (1,32 mg/l). Obwohl dieses *C. utilis*-System noch nicht optimiert wurde, liegt die Menge der gereinigten CalB im Bereich des kommerziellen Expressionssystems von *P. pastoris* (3,12 mg/l). Ebenso sind die spezifischen Lipaseaktivitäten zwischen der gereinigten CalB aus *C. utilis* und *P. pastoris* vergleichbar (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Tabelle der CalB-Ausbeuten und Aktivitäten nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die Eluate der Reinigung wurden zusammengefügt bevor die Proteinkonzentration mit einem Bradford-Assay bestimmt wurde. Die Lipaseaktivität in den Eluaten wurde mit 0,5 mM pNPB als Substrat bestimmt. Als Puffer wurden 20 mM NaPi pH 7,4 eingesetzt.

Stamm	CalB-Ausbeute (mg/l)	Lipase-Aktivität (mU/mg)
<i>P. pastoris</i> CBPp1	3,12	21,8
<i>C. utilis</i> CBCu4	1,32	12,3

3.2.9 Sekretion der *U. maydis* Lipase 2 (Uml2) in *C. utilis*

Um die Ergebnisse der CalB-Sekretion zu bestätigen wurde versucht, eine weitere heterologe Lipase durch *C. utilis* zu sekretieren. Dafür wurde die *U. maydis* Lipase 2 (Uml2) ausgewählt. Ein Strukturvergleich zwischen CalB und Uml2 zeigt, dass Uml2 eine Identität von 72 % zu CalB hat und zwei potentielle *N*-Glykosylierungsstellen (N63, N94) enthält, wobei nur eine (N94) in CalB konserviert ist (Abb. 3.24 A). CalB besitzt ein Signalpeptid, bestehend aus einer 18 AS-langen Signalsequenz, welche mit einem 7 AS-langen Propeptid fusioniert ist. Am C-terminalen Ende dieses Propeptids befindet sich eine Kex2-Erkennungssequenz (K-R). In der Uml2-Aminosäuresequenz fehlt dieses Propeptid (Abb. 3.24 A).

Für die Uml2-Sekretion in *C. utilis* wurde der 1022 bp-lange *UML2*-ORF aus der gDNA von *U. maydis* AB33 mit den Primern Uml2-FWD/REV amplifiziert, wobei endständige *Hind*III- und *Pac*I-Schnittstellen eingefügt wurden. Die *CALB*-Sequenz in Plasmid pCB1 wurde durch das *Hind*III/*Pac*I-Fragment ersetzt und die kodierende *UML2*-Sequenz wurde in Phase mit der HA-Epitop-Sequenz ligiert; das entstandene Plasmid (*TDH3p-UML2^{HA}*) wurde pCB12 genannt (Abb. 3.24 B). Plasmid pCB12 wurde in der *TDH3p*-Sequenz mit *Sac*I linearisiert und in Stamm DSMZ2361 transformiert. In zwei Transformanten wurde die gDNA mit *Kpn*I verdaut und die Integration des Plasmids wurde beispielhaft in einer Transformante durch eine Southern-Blot-Analyse mit einer *TDH3p*-Sonde überprüft. Die erwartete Bandengröße der Wildtyp-Konformation beträgt 8,6 kb, bei einer homologen

3. Ergebnisse

Rekombination von Plasmid pCB12 in den *TDH3*-Locus 4,1 kb und 11,3 kb (Abb. 3.25 A). In der Southern-Blot-Analyse wurde die Wildtyp-*TDH3p*-Bande (◁) weiterhin in der CBCu12-Transformante detektiert und zusätzlich ist eine Bande bei ca. 6,5 kb zu sehen, die der *TDH3p*-Plasmidsequenz an einem unbekanntem Integrationsort entspricht (Abb. 3.25 B, ◁). Das Plasmid integrierte demzufolge nicht in eines der *TDH3*-Allele, sondern wie zuvor, ektopisch an einer unbekanntem Stelle (Abb. 3.11).

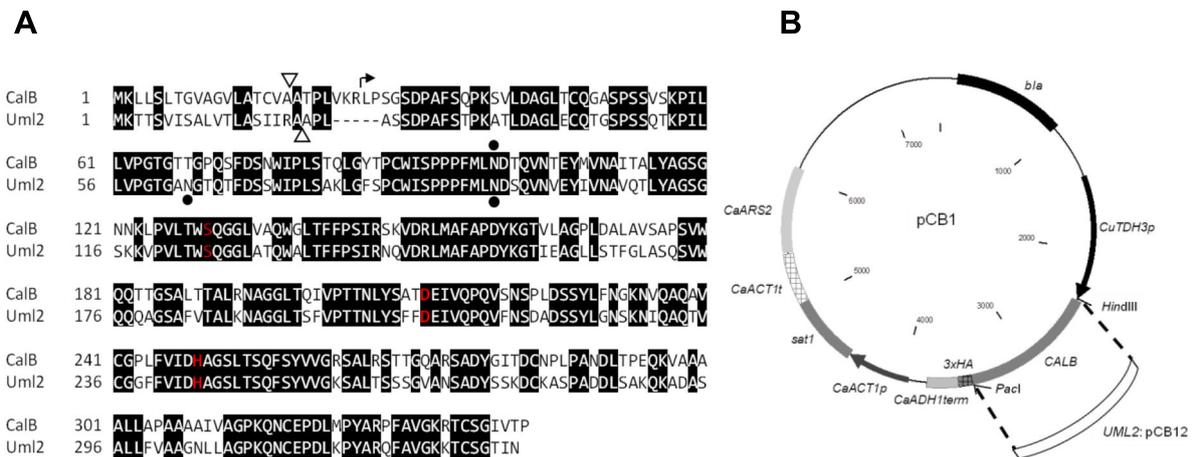


Abb. 3.24: Strukturvergleich zwischen Uml2 und CalB und das UML2-Expressionsplasmid. (A) Vergleich der Aminosäuresequenzen von CalB und Uml2. Die vorhergesagten Schnittstellen der Signalsequenz sind mit Dreiecken gekennzeichnet. Das Amino-Ende der reifen CalB nach der Abspaltung des Pro-Peptids ist mit einem gekrümmten Pfeil gekennzeichnet. Die potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen sind mit schwarzen Punkten markiert. In rot ist die potentielle katalytische Triade dargestellt. Identische Aminosäuren sind durch schwarze Boxen gekennzeichnet. **(B)** Expressionsplasmid pCB12. Die *CALB*-Sequenz wurde durch die *UML2*-kodierende Sequenz ausgetauscht. Alle anderen Sequenzen des Plasmids sind identisch mit pCB1 (Abb. 3.7).

Für die Überprüfung der Uml2-Sekretion wurden CBCu12-Zellen in YPD-Medium für 72 h inkubiert und das Kulturmedium wurde anschließend in einem Immunoblot analysiert. Dabei wurde eine Uml2-Bande auf einer Höhe von ca. 45 kDa detektiert (Abb. 3.25 C). Diese Masse ist ca. 5-7 kDa größer als die berechnete Masse des Uml2^{HA}-Fusionsproteins (38 kDa). Nach der Behandlung mit PNGase F verringerte sich die Masse der Lipase um ca. 5 kDa (Abb. 3.25 C). Dieses spricht dafür, dass mindestens eine der potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen (N63, N94) (Abb. 3.24 A) in Uml2 mit einer Glykostruktur in Form von GlcNAc₂Man₁₀₋₁₄ versehen ist.

Für einen Vergleich der Uml2-Glykosylierung wurde die Lipase zusätzlich in *P. pastoris* produziert. Der *UML2*-ORF wurde dabei mit den Primern UML2PICZ-FWD/REV aus dem Genom von *U. maydis* AB33 amplifiziert und mit Hilfe flankierender *EcoRI*- und *Apal*-Schnittstellen in Plasmid pPICZ-A kloniert, woraus Plasmid pPICZ-UML2 entstand. Das durch *SacI* in der *AOX1p*-Sequenz linearisierte Plasmid wurde in *P. pastoris* X-33 transformiert und PpUml2-Transformanten (mit *pPICZ-UML2*) wurden auf YPD-Agarplatten mit 100 µg/ml Zeocin selektiert. Die Plasmidintegration in das Genom wurde durch eine Kolonie-PCR der PpUml2-Transformante bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die *UML2*-Expression wurde in PpUml2-Flüssigkulturen durch Zugabe von 0,5 % Methanol induziert (siehe Abschnitt

3. Ergebnisse

3.2.8). Wie bei CBCu12 wurde das Kulturmedium von PpUml2 mit PNGase F behandelt und die Proteine wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Uml2-Lipase fand mit Hilfe eines Anti-myc-Antikörpers statt. Dabei wurde festgestellt, dass Uml2 bei *P. pastoris* auf einer SDS-PAGE das gleiche Laufverhalten wie bei *C. utilis* zeigt (Abb. 3.25 C). Demzufolge wird Uml2 in beiden Organismen wahrscheinlich nur an einer der beiden potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen glykosyliert.

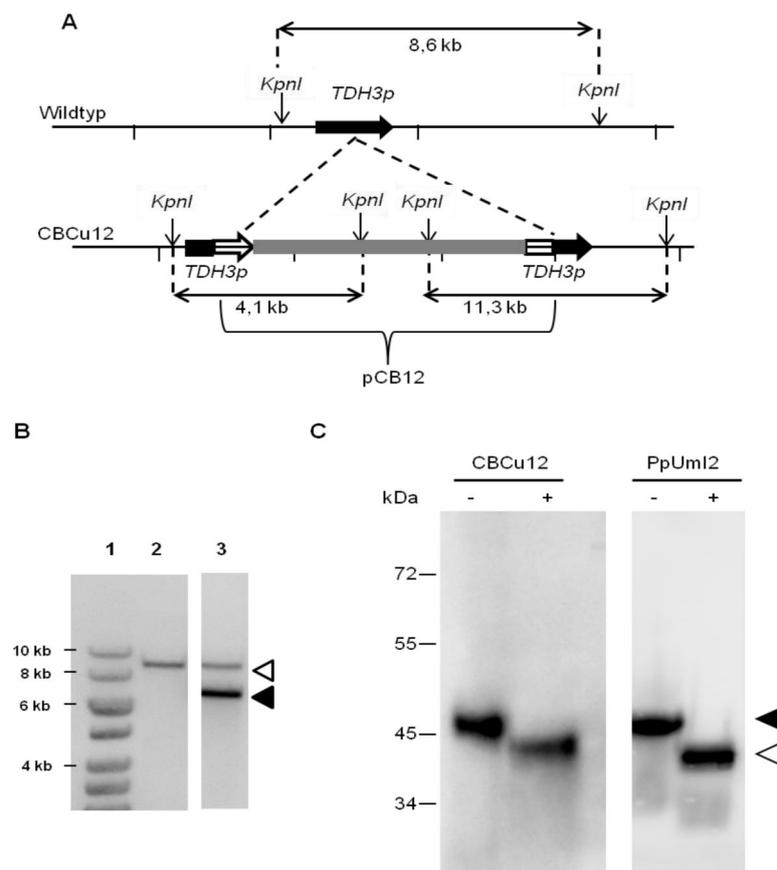


Abb. 3.25: Southern- und Immunoblot-Analyse der Uml2-Sekretion und Glykosylierung. (A) Schematische Darstellung der pCB12-Integration in den genomischen *TDH3*-Bereich von DSMZ2361. Ein Verdau der Wildtyp gDNA sollte eine Bande in einer Höhe von 8,6 kb geben, während bei einer einfachen pCB12-Integration Banden von 4,1 kb und 11,3 kb auftreten sollten. (B) Die mit *KpnI* verdaute gDNA wurde in einem Southern-Blot mit Hilfe einer *TDH3p*-Sonde untersucht. Dabei wurde die *TDH3p*-Wildtypbande (◁) und die *TDH3p*-Plasmidsequenz (◼) detektiert. 1= Größenstandard, 2= *C. utilis* Wildtyp gDNA, 3= gDNA CBCu12. (C) 20 µl der Kulturmedien wurden nach 72 h Inkubation in einer SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und Uml2 wurde in einem Immunoblot mit einem Anti-HA-Antikörper bei CBCu12 und Anti-myc-Antikörper bei PpUml2 detektiert. Für die De-Glykosylierung wurden die Kulturmedien von CBCu12 und PpUml2 mit PNGase F behandelt. "+" mit PNGase F-Behandlung, "-" ohne PNGase F-Behandlung. Die glykosylierten Proteine (◼) und die de-glykosylierten (◁) Proteinmassen sind in kDa angegeben.

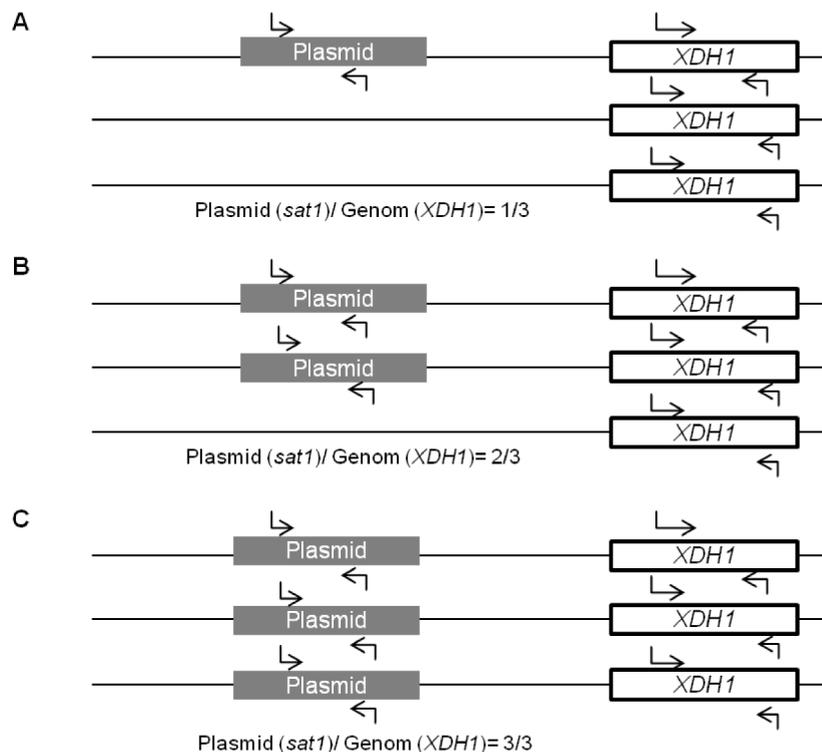
3.2.10 Plasmidkopieanzahl

Einen großen Einfluss auf die Synthese und Sekretion von heterologen Proteinen hat die Kopieanzahl der kodierenden Gene (Mansur *et al.*, 2005; Norden *et al.*, 2011). In dieser Arbeit sollten die bereits konstruierten Stämme auf die Kopieanzahl der

3. Ergebnisse

transformierten Plasmide untersucht werden. Dieses hat den Hintergrund, dass *C. utilis* vermutlich triploid ist (Kunigo, 2013) und eine Plasmidintegrationen somit in jedem Allel der homologen Chromosomen auftreten kann.

Durch Southern-Blot-Analysen wurde die ektopische Integration der Plasmide bereits gezeigt (Abb. 3.11; Abb. 3.19; Abb. 3.25). Jedoch wurde dabei nicht die Plasmidkopieanzahl bestimmt. Für die Bestimmung der Plasmidkopieanzahl wurde eine quantitative PCR der gDNA von Stamm CBCu1 (*TDH3p-CALB^{HA}*), CBCu6 (*TDH3p-INV1-CALB^{HA}*), CBCu11 (*TDH3p-MF α 1-CALB^{HA}*), CBCu12 (*TDH3p-UML2^{HA}*) und CBPj2 (*TDH3p-CALB^{HA}*) durchgeführt. Dabei wurden spezifische Primer für das chromosomale *CuXDH1*-Gen benutzt. Bei einem triploiden Genotyp von *C. utilis* ist das *XDH1*-Gen dreimal im Genom vorhanden. Wenn nun eine plasmidspezifische Sequenz (z. B. *sat1*) amplifiziert wird, kann man unter Berücksichtigung der Primereffizienzen und mit Hilfe der ermittelten Ct-Werte die Plasmidkopieanzahl bestimmen. In Abbildung 3.26 ist eine einfache und mehrfache Integration eines Plasmids in das Genom von *C. utilis* DSMZ2361 dargestellt. Für den Wildtypstamm gilt, dass dort die plasmidspezifischen Primer nicht binden können, sondern nur die genomspezifischen *XDH1*-Primer. Für den Fall, dass eine Integration eines Plasmids in die gDNA stattgefunden hat, wird durch spezifische Primer ein Teil der Plasmidsequenz amplifiziert. Das Verhältnis der Fluoreszenz von plasmidalem und genomischem Amplifikat beträgt demzufolge 0,33. Bei einer zweifachen Integration 0,66 und bei einer dreifachen 1. Dabei ist es unerheblich, wo das Plasmid integriert wurde. An Hand dieser Methode lässt sich weder der Integrationsort bestimmen, noch kann eine Aussage über Tandem-Integrationen getroffen werden.



3. Ergebnisse

Abb. 3.26: schematische Darstellung der Plasmidintegration in *C. utilis* DSMZ2361. Das triploide Genom von *C. utilis* DSMZ2361 besitzt drei Kopien des *XDH1*-Gens. Mit Hilfe der Primer *XDH1* RT Fwd/Rev wird diese Sequenz während der qPCR amplifiziert. Nach der chromosomalen Integration eines Plasmids wird mit Hilfe der Primer *sat1* RT Fwd/Rev die plasmidspezifische *sat1*-Sequenz amplifiziert. An Hand der Ct-Werte wurde das Verhältnis der beiden amplifizierten Sequenzen (*sat1*, *XDH1*) in den untersuchten Stämmen bestimmt und daraus die Plasmidkopieanzahl abgeschätzt. **(A)** Bei einer Plasmidintegration in einem Allel ergibt sich dadurch ein Verhältnis von *sat1* zu *XDH1* von 0,33, **(B)** bei einer Integration in zwei Allelen von 0,66 und **(C)** bei einer Integration in alle drei Allele von 1,0. Die Anlagerungsstellen der Primer sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Nachfolgende Tabelle zeigt das Verhältnis von plasmidaler zu chromosomaler amplifizierter DNA und die abgeschätzte Plasmidkopiezahl an. Die Primereffizienzen wurden direkt aus der Amplifikationskurve ermittelt und lagen zwischen 76 und 114 % (Tabelle 9.4). Durch die zusätzlich ermittelten Ct-Werte wurde die Plasmidkopieanzahl in den untersuchten Stämmen abgeschätzt.

Tabelle 3.3: qPCR-Ergebnisse der Plasmidkopieanzahl. In dieser Tabelle sind die ermittelten Plasmidkopieanzahlen in den angegebenen Stämmen dargestellt. Die Bestimmung der Plasmidkopieanzahl erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben. Auf Grund des triploiden Chromosomensatzes muss das Verhältnis von *XDH1* und *sat1* immer ein Vielfaches von 0,33 sein. Bei dem diploiden *P. jadinii* Stamm CBPj2 muss das Verhältnis immer ein Vielfaches von 0,5 sein.

Wirt	Stamm	Verhältnis <i>sat1</i> / <i>XDH1</i>	Anzahl Plasmidkopien
<i>C. utilis</i>	CBCu1 (<i>TDH3p-CALB^{HA}</i>)	1,43	4
	CBCu4 (<i>TDH3p-CALB^{His}</i>)	0,32	1
	CBCu6 (<i>TDH3p-INV1-CALB^{HA}</i>)	0,96	3
	CBCu11 (<i>TDH3p-MFα1-CALB^{HA}</i>)	1,66	5
	CBCu12 (<i>TDH3p-UML2^{HA}</i>)	0,89	3
<i>P. jadinii</i>	CBPj2 (<i>TDH3p-CALB^{HA}</i>)	0,96	2

In Abschnitt 3.2.7 wurde die Abhängigkeit der Sekretion von der N-terminalen Sekretions-Signalsequenz beschrieben. Die bei diesem Versuch benutzten Stämme, CBCu1 (*TDH3p-CALB^{HA}*), CBCu6 (*TDH3p-INV1-CALB^{HA}*) und CBCu11 (*TDH3p-MFα1-CALB^{HA}*), weisen alle eine unterschiedliche Plasmidkopieanzahl auf. In Stamm CBCu1 wurde eine 4-fache Integration des Plasmids bestimmt, in Stamm CBCu11 eine 5-fache Integration und in CBCu6 eine 3-fache Integration. Diese Beobachtungen bestätigen die Southern-Blot-Analysen, da die plasmidspezifische *TDH3p*-Bande bei CBCu1 (Abb. 3.11), CBCu6 und CBCu11 (Abb. 3.19) stärker als die Wildtyp-*TDH3p*-Bande war. Hieraus kann geschlossen werden, dass das Plasmid mindestens 3-mal integriert sein muss. Die verbesserte CalB-Sekretion bei CBCu11 (Mfα-CalB; Abb. 3.20 B) könnte daher auf Grund der höheren Plasmidkopieanzahl im Vergleich zu CBCu1 und CBCu6 erfolgt sein und nicht nur auf Grund der besseren Sekretionseigenschaften des Mfα1-Prä-Pro-Peptids. Da jedoch nur eine CBCu11-Transformante untersucht wurde, muss dieses Ergebnis noch weiter bestätigt werden.

3.3 Oberflächenpräsentation von Proteinen bei *C. utilis*

Die Zellwände von Hefezellen bestehen zu einem großen Teil aus Mannoproteinen, welche kovalent mit dem Rest eines Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Ankers an das β 1,6-Glucan gebunden sind. Fusionen von GPI-Zellwandproteinen an heterologe Proteine lassen sich auch an die Oberfläche der Zellen bringen (Tanaka *et al.*, 2012). So genannte "surface displays" besitzen einige Vorteile gegenüber der normalen Sekretion von Proteinen in das Medium. So lassen sich die Zellen als Biokatalysator mehrmals wiederverwenden und die verankerten Proteine besitzen eine größere Stabilität und/ oder Aktivität als in das Medium sekretierte Proteine. Des Weiteren können spezielle Antigene auf der Oberfläche präsentiert werden und die Hefezellen so als orale Vakzin dienen (Wasilenko *et al.*, 2010). In dieser Arbeit sollten Fusionen aus einem Zellwandprotein mit zwei Enzymen (CalB, LacZ) und einem immunogenen Epitop (MOG) hergestellt und an die Zelloberfläche von *C. utilis* geknüpft werden.

3.3.1 Expressionsplasmide

Um die Möglichkeiten von *C. utilis* für die Oberflächenpräsentation von Proteinen zu untersuchen, wurde zunächst ein potentiell Zellwandprotein im Genom von *C. utilis* identifiziert. Hierfür wurde die β 1,3-Glucanosyltransferase Gas1 ausgewählt. Bei *S. cerevisiae* ist Gas1 ein Zellwand-lokalisiertes Protein und für die Verknüpfung des β 1,3-Glucans verantwortlich (De Sampaio *et al.*, 1999). Das *C. utilis*-GAS1-Gen hat eine Identität von 55 % zu dem *S. cerevisiae* GAS1-Gen und enthält ein Intron (Abb. 3.27 A), welches bei GAS1 aus *S. cerevisiae* fehlt. Zusätzlich besitzt Gas1 eine N-terminale Signalsequenz, sowie eine C-terminale GPI-Signalsequenz (Abb. 3.27 C, oben).

Die folgenden Schritte hatten das Ziel, das CuGAS1-Gen zu klonieren und in einem weiteren Schritt einen Großteil des GAS1-Leserasters zu entfernen, so dass zwischen die Gas1-Signalsequenz und die Gas1-GPI-Signalsequenz eine Sequenz mit der Information für ein beliebiges Protein kloniert werden kann. Dafür wurde zuerst der GAS1-Leserahmen durch die Primer Gas1 FWD/REV aus dem Genom von *C. utilis* DSMZ2361 amplifiziert und mit Hilfe flankierender *Hind*III- und *Eco*RV-Schnittstellen in Plasmid pCB5 (*TDH3p-CALB^{His}*) eingefügt (Abb. 3.27 A). Das entstandene Plasmid pCB2 kodiert für GAS1, welches unter der transkriptionellen Kontrolle des *TDH3*-Promotors steht (Abb. 3.27 A). Durch eine inverse PCR wurde mit Hilfe des Primerpaars SP-GPI FWD/REV ein Großteil des GAS1-Leserasters deletiert und eine einzelne *Nhe*I-Schnittstelle zwischen der N-terminalen Signalsequenz und der C-terminalen GPI-Signalsequenz eingefügt, woraus Plasmid pCB3 entstand (*TDH3p-gas1 Δ* ; Abb. 3.27 B). Dadurch war es möglich, eine beliebige DNA-Sequenz im Leseraster der Translation zwischen die beiden Signalsequenzen einzufügen. Um dieses durchzuführen, wurde zuerst die kodierende Region für das CalB^{HA}-Fusionsprotein ohne ihre natürliche Signalsequenz aus Plasmid pCB1 mit Hilfe der Primer CalB-Nhe1-FWD/REV amplifiziert. Durch die flankierenden *Nhe*I-

3. Ergebnisse

Schnittstellen wurde das PCR-Fragment in Plasmid pCB3 (*TDH3p-gas1Δ*) kloniert (entstandenes Plasmid pCB4, Abb. 3.27 B). Auf dieselbe Weise wurde die kodierende Region für die *Streptococcus thermophilus* β -Galaktosidase aus Plasmid pAU36 (Uhl und Johnson, 2001) mit den Primern lacZ FWD/REV amplifiziert und zwischen die kodierenden Signalsequenzen von *GAS1* eingefügt (entstandenes Plasmid pCB7, Abb. 3.27 B).

Abbildung 3.27 C und D zeigen den schematischen Aufbau der auf den Plasmiden kodierten Sequenzen für die Fusionsproteine. Das Gas1-CalB-Fusionsprotein besitzt 448 Aminosäuren, wobei das Serin417 die mit dem Programm *big-PI Fungal Predictor* (Eisenhaber *et al.*, 2004) vorausgesagte ω -Aminosäure ist. An dieses Serin wird der GPI-Anker während der Sekretion im ER angehängt. Die Fusionsproteine durchlaufen den sekretorischen Weg und werden dabei im ER und Golgi-Apparat prozessiert. Nach der Prozessierung des Proteins im Golgi-Apparat beträgt die Größe des Gas1-CalB Fusionsproteins ca. 41 kDa. Bei der Fusion aus Gas1 und LacZ (1102 AS) ist die vorhergesagte ω -Aminosäure das Serin1071 (Abb. 3.27 C). In Abb. 3.27 D ist eine detaillierte Ansicht der umgebenden Sequenzen der *NheI*-Schnittstellen gezeigt.

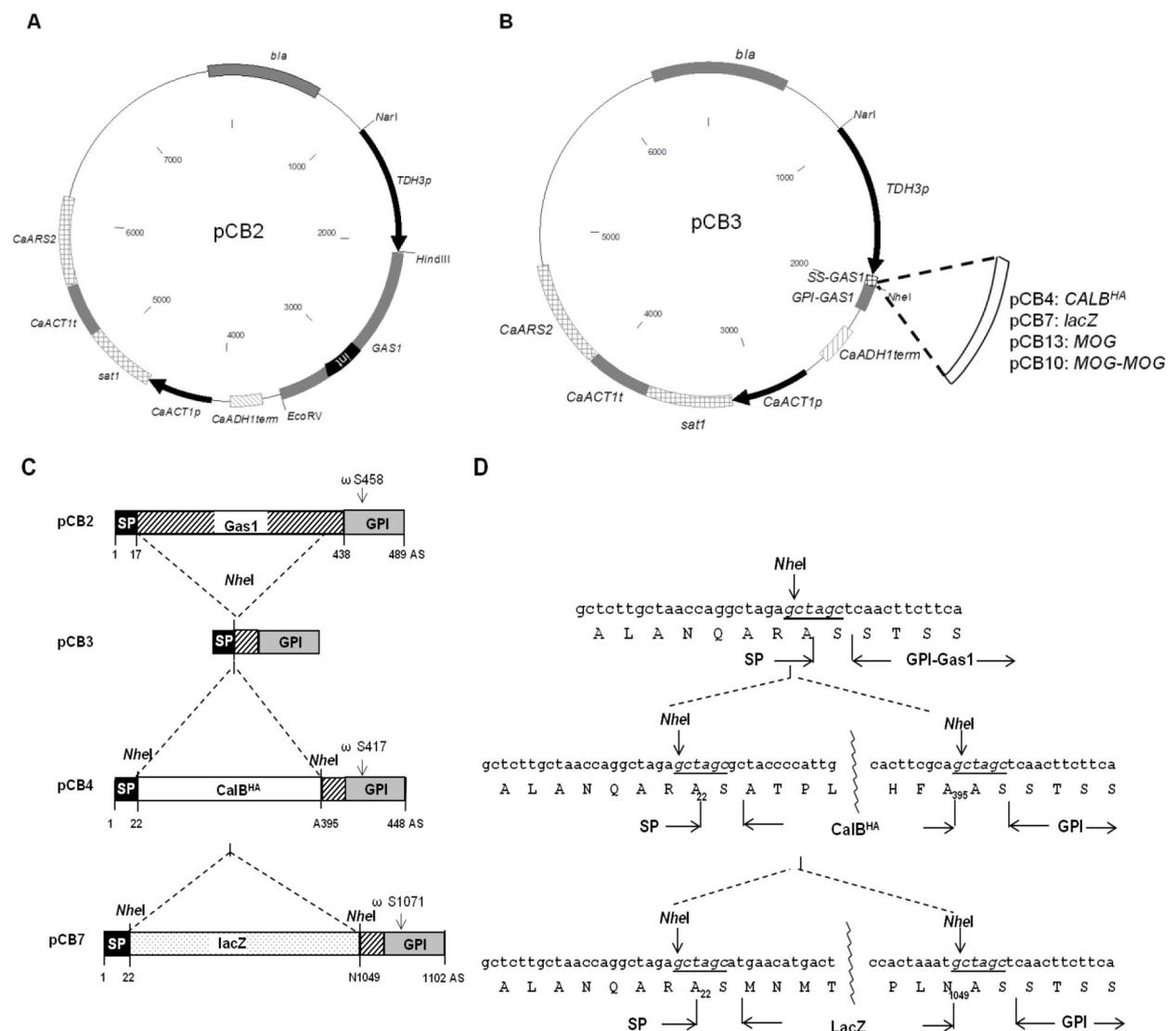


Abb. 3.27: Ausschnitt der Expressionseinheiten für die Oberflächenpräsentation. Plasmid pCB2 kodiert für *GAS1*, welches unter der Kontrolle des *CuTDH3p* steht. Alle anderen Sequenzen sind identisch mit pCB1 (Abb. 3.7). **(B)** Plasmid pCB3 enthält den verkürzten *GAS1*-Leserahmen. Mit Hilfe der *NheI*-Schnittstelle konnten Sequenzen mit der Information für beliebige Proteine zwischen die *Gas1*-Signal- und GPI-Sequenz kloniert werden. **(C)** Schematische Darstellung des *Gas1*-Proteins (oben). *Gas1* enthält eine Signalsequenz (SP), sowie eine C-terminale GPI-Signalsequenz (GPI). Die potentielle GPI-Verknüpfungsstelle ω ist das Serin458. Plasmid pCB3 enthält die Information für das verkürzte *Gas1*-Protein. Ein Großteil der *GAS1*-Sequenz wurde durch eine Mutagenese-PCR deletiert. Dabei wurde eine einzelne *NheI*-Schnittstelle eingefügt. Plasmid pCB4 trägt die Information für das Fusionsprotein *Gas1* Δ -*CalB*^{HA}. Die ω -Aminosäure ist das Serin417. Plasmid pCB7 (unten) kodiert für das *Gas1* Δ -*LacZ*-Fusionsprotein. Die ω -Aminosäure ist das Serin1071. **(D)** Ausschnitt der DNA- und Aminosäuresequenz des verkürzten *Gas1* (oben). Angezeigt sind die *NheI*-Schnittstelle, sowie ein Teil des *Gas1*-Prä-Peptids und ein Teil der GPI-Signalsequenz. In der Mitte ist ein Ausschnitt des *Gas1*-*CalB*-Fusionsproteins zu sehen, unten ein Teil des *Gas1*-*LacZ*-Fusionsproteins. Die durch die *NheI*-Schnittstellen zusätzlich eingefügten Sequenzen sind kursiv und unterstrichen.

Beide Plasmide (pCB4 und pCB7) wurden in der *TDH3p*-Sequenz durch *SacI* linearisiert und in *C. utilis* DSMZ2361 transformiert. Die auf Nourseothricin-Agarplatten selektierten Transformanten mit Plasmid pCB4 (*TDH3p-gas1* Δ -*CALB*^{HA}) wurden mit CBCu3 bezeichnet, Transformanten mit Plasmid pCB7 (*TDH3p-gas1* Δ -*lacZ*) mit CBCu5. Zur Überprüfung der chromosomalen Plasmidintegration wurde die gDNA von zwei CBCu3-Transformanten und drei CBCu5-Transformanten mit *KpnI* verdaut und in einem Southern-Blot überprüft. Die erwartete Bandengröße im Wildtyp beträgt 8,6 kb, bei einer einfachen Integration von pCB4 betragen die Bandengrößen 4,3 kb und 11,3 kb (Abb. 3.28 A). Bei den CBCu5-Transformanten (mit pCB7, *TDH3p-gas1* Δ -*lacZ*) waren die erwarteten Bandengrößen bei einer einfachen Integration von pCB7 (*TDH3p-gas1* Δ -*lacZ*) in den *TDH3*-Locus 6,3 kb und 11,3 kb (Abb. 3.28 C). Die Southern-Analyse zeigte, dass eine korrekte Integration von Plasmid pCB4 (*TDH3p-gas1* Δ -*CALB*^{HA}) in den *TDH3*-Locus erfolgt war (Abb. 3.28 B). Dabei ist zu sehen, dass die Wildtyp *TDH3p*-Bande (8,6 kb) in den beiden CBCu3-Transformanten erhalten bleibt. Dieses spricht dafür, dass das Plasmid nicht alle *TDH3*-Allele besetzt hat, sondern mindestens eines unbesetzt ist. Die Southern-Blot-Analyse der drei CBCu5-Transformanten zeigt eine Wildtyp-*TDH3p*-Bande (8,6 kb) in allen Transformanten (Abb. 3.28 D). In einer Transformante (CBCu5-2) wurde eine zusätzliche Bande auf einer Höhe von ca. 5,5 kb detektiert, wohingegen bei den anderen Transformanten kein Signal detektiert wurde. Demzufolge scheint das Plasmid bei CBCu5-2 ektopisch an unbekannter Stelle integriert worden zu sein. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Integration des Plasmids pCB4 (*TDH3p-gas1* Δ -*CALB*^{HA}) in den *TDH3*-Locus erfolgreich war. Bei der CBCu5-2-Transformante (*TDH3p-gas1* Δ -*lacZ*) wurde, wie bei den bisherigen Transformanten, eine ektopische Integration von pCB7 festgestellt.

3. Ergebnisse

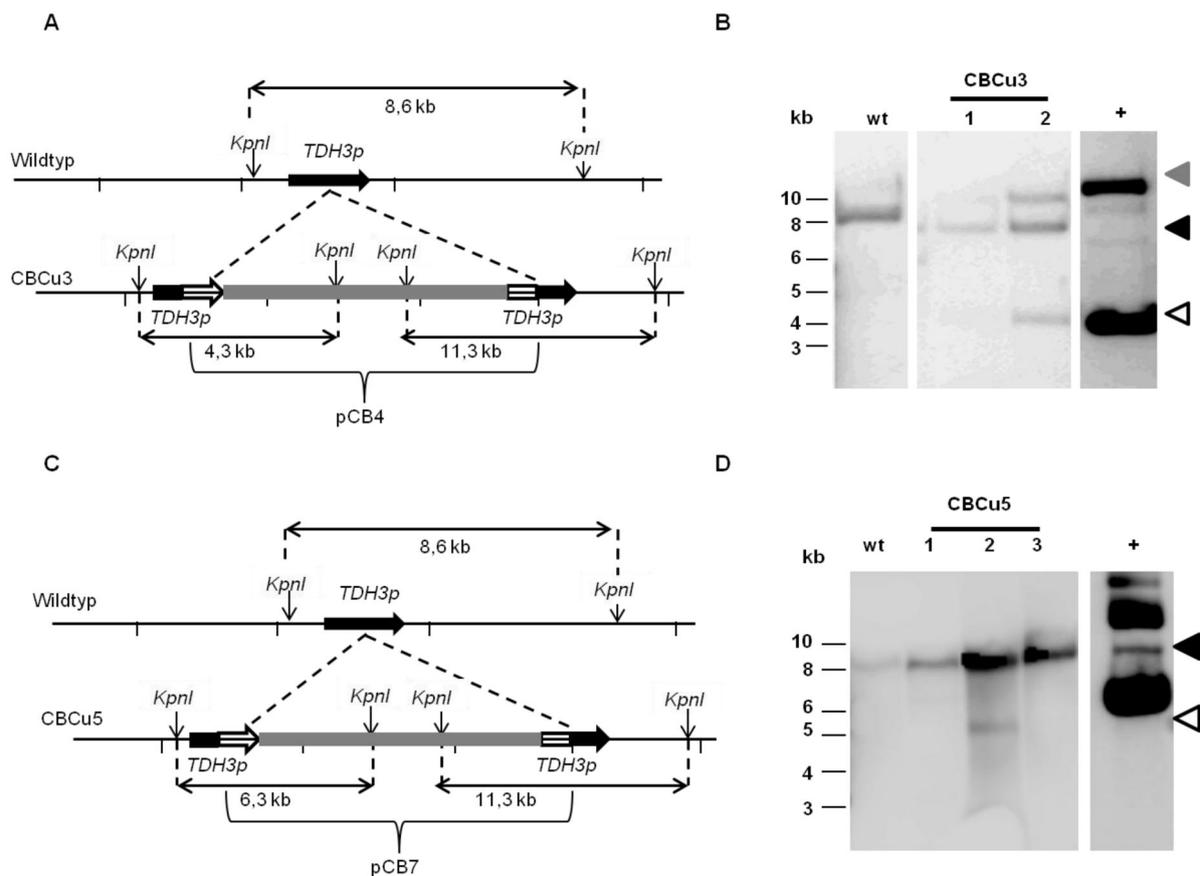


Abb. 3.28: Genomische Integration von pCB4 und pCB7 für die Oberflächenpräsentation. (A) Schematische Darstellung des *C. utilis* TDH3-Bereichs vor (oben) und nach (unten) der Integration von pCB4. (B) Die gDNA des *C. utilis* Wildtyps (wt) und zweier CBCu3 (*TDH3p-gas1* Δ -*CALB^{HA}*) Transformanten (Spur 1 und 2) wurde mit *KpnI* geschnitten und mit einer TDH3p-Sonde in einem Southern-Blot hybridisiert. pCB2 (500ng, *TDH3p-GAS1*) diente als Plasmidkontrolle (+). Die TDH3p-Wildtypbande ist durch \blacktriangleleft gekennzeichnet, die 4,3 kb Plasmidbande durch \blacktriangleleft und die 11,3 kb Plasmidbande durch \triangleleft . (C) Schematische Darstellung des *C. utilis* TDH3-Bereichs vor (oben) und nach (unten) der Integration von pCB7. (D) Die gDNA des *C. utilis* Wildtyps (wt) und dreier CBCu5 (*TDH3p-gas1* Δ -*lacZ*) Transformanten (Spur1, 2 und 3) wurde mit *KpnI* geschnitten und mit einer TDH3p-Sonde hybridisiert. pCB2 (*TDH3p-GAS1*) diente als Plasmidkontrolle (+). Die TDH3p-Wildtypbande ist durch \blacktriangleleft gekennzeichnet, die pCB7-Plasmidbande durch \triangleleft .

3.3.2 Lokalisation der Gas1-CalB-Fusion

Die Anwesenheit des Gas1-CalB-Fusionsproteins auf der Zelloberfläche in zwei CBCu3-Transformanten wurde mit Hilfe verschiedener Methoden nachgewiesen. Zuerst wurde durch einen flüssigen pNPB-Assay gezeigt, dass im Medium keine lipolytische Aktivität vorhanden war, während in der Zellfraktion Lipaseaktivität detektiert wurde (Abb. 3.29).

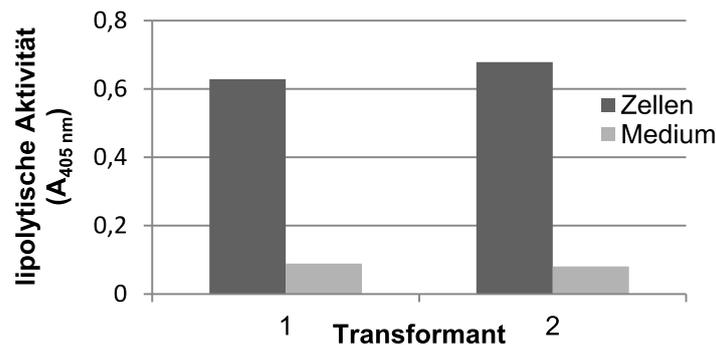


Abb. 3.29: Lipolytische Aktivität der CBCu3-Transformanten im Kulturmedium und den Zellen. Die lipolytische Aktivität von zwei CBCu3-Transformanten wurde mit Hilfe eines pNPB-Assays durchgeführt. Die Zellen wurden nach 72 h in YPD-Medium durch Zentrifugation (5 min, 3.500 Upm) geerntet. Die Enzymaktivität wurde im Kulturmedium sowie in einer äquivalenten Menge an Zellen bei 37 °C für 30 min gemessen.

Zusätzlich wurde die Verknüpfung der CalB an die Zelloberfläche mit Hilfe einer differentiellen Zellfraktionierung nachgewiesen. Dabei wurde wie bei Stamm CBCu1 (Abschnitt 3.2.6) vorgegangen. Bei der Fraktionierung wurden Proben des Kulturmediums, der Zellwände (P1, 2.000 × g), des Pellets mit ER und Golgi-Apparat (P2, 10.000 × g) und ein Pellet der Membranvesikel (P3, 40.000 × g) gesammelt. Es wurde erwartet, dass im Kulturmedium keine CalB-Bande sichtbar wird und in Pellet P1 eine CalB-Bande in Höhe von ca. 41 kDa sichtbar wird, denn das prozessierte Gas1-CalB-Fusionsprotein besitzt eine berechnete Masse von 41 kDa. Wie erwartet, wurde in den Kulturmedien der beiden Transformanten kein CalB-Signal detektiert. Im Gegensatz dazu war ein starkes CalB-Signal in der mit Zelltrümmern und Zellwandbestandteilen angereicherten Fraktion P1 im Bereich zwischen 45 und 55 kDa sichtbar (Abb. 3.30; P1), eine weitere CalB-Bande wurde auch in Pellet P2 (10.000 × g) und in Pellet P3 (40.000 × g) detektiert (Abb. 3.30; P2, P3). Dieser Versuch bestätigt somit die Annahme, dass ein Großteil der CalB tatsächlich eine Zellwand-assoziierte Lokalisation besitzt. Jedoch lag die apparente Masse des detektierten Gas1-CalB-Fusionsproteins in P1 zwischen 45 und 55 kDa und war somit größer als die berechnete Masse von 41 kDa. Diese vergrößerte Masse kann zum einen an der N-Glykosylierung der CalB liegen (Abb. 3.15), zum anderen wurde womöglich ein Teil des Gas1-CalB-Fusionsproteins auf dem Weg zur Zellwand schon mit dem β 1,6-Glucan verknüpft. Ein weiterer Teil des Fusionsproteins, welches bereits an die Zellwand geknüpft wurde, konnte möglicherweise nicht detektiert werden.

3. Ergebnisse

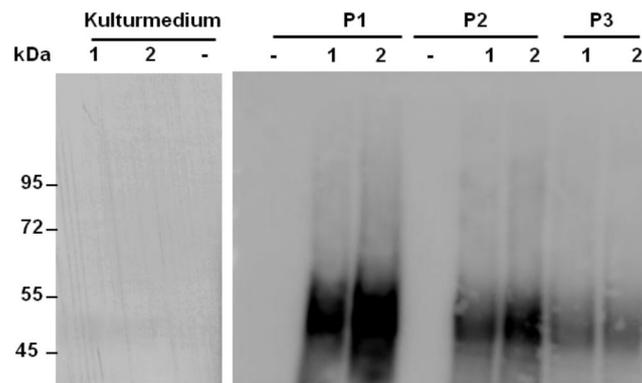


Abb. 3.30: Immunoblot der Zellfraktionierung von CBCu3. Zellen zweier CBCu3-Transformanten wurden nach 72 h geerntet und nach einer differentiellen Zentrifugation wurden die Pellets P1 (2.000 × g), P2 (10.000 × g) und P3 (40.000 × g) durch eine SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt. Dabei wurde wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben vorgegangen. Die Detektion der CalB fand mit Hilfe eines Anti-HA-Antikörpers statt. Aufgetragen wurden 20 µl des Kulturmediums, sowie äquivalente Mengen der Pellets. Als Kontrollstamm "-" diente MKCu1. Die Proteinmassen sind in kDa angegeben.

Um dieses Ergebnis mit einer anderen Methode zu verifizieren, wurde eine Immunofluoreszenz der Zellen durchgeführt. Dafür wurden stationäre CBCu3-Zellen auf einem mit Poly-Lysin behandeltem Deckglas fixiert und anschließend wurde ein primärer Anti-HA-Antikörper hinzugefügt. Mit Hilfe eines Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten Sekundärantikörpers wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Der Zellkern wurde zur Kontrolle mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. CBCu3-Zellen wiesen eine ungleichmäßige Lokalisation von CalB an der Zelloberfläche auf (Abb. 3.31). In CBCu3-1 ist eine punktierte Verteilung/Anhäufung der Lipase auf der gesamten Zelloberfläche erkennbar, während bei CBCu3-2 eine CalB-Anhäufung am unteren Pol der Zelle auftrat.

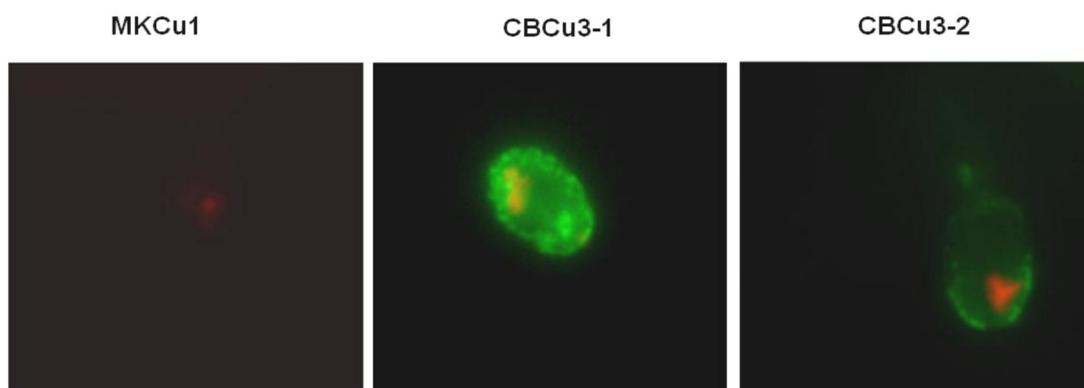


Abb. 3.31: Immunofluoreszenzmikroskopie von CBCu3. Die Gegenwart von CalB auf der Zelloberfläche wurde in stationären Zellen von CBCu3 (-1 und -2) mit Hilfe eines primären Anti-HA-Antikörpers, sowie eines FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht (grün). Zellkern-DNA wurde mit Hilfe einer DAPI-Färbung (rot) sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle diente Stamm MKCu1 (*TDH3p*).

3.3.3 Lokalisation der Gas1- β -Galaktosidase-Fusion

Die β -Galaktosidase-Aktivität der CBCu5-Transformanten (-1, -2, -3) wurde mit Hilfe eines ONPG-Assays sowie eines X-Gal-Overlay-Tests bestimmt. Kolonien dreier CBCu5 (-1, -2, -3) Transformanten zeigten durch Hydrolyse des X-Gal-Substrats auf X-Gal-Overlay-Agarplatten eine blaue Färbung (Abb. 3.32 A). Ebenso wurde eine β -Galaktosidase-Aktivität in intakten, nicht permeabilisierten Zellen in einem ONPG-Flüssig-Test gezeigt (Abb. 3.32 B).

Durch diese beiden Tests wurde nachgewiesen, dass aktives LacZ ebenfalls an der Oberfläche von *C. utilis* präsentiert werden kann. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass verschiedene Enzyme mit Hilfe der Gas1-Sekretions- und GPI-Signal-Sequenzen an die Zelloberfläche von *C. utilis* transportiert und dort verankert werden können.

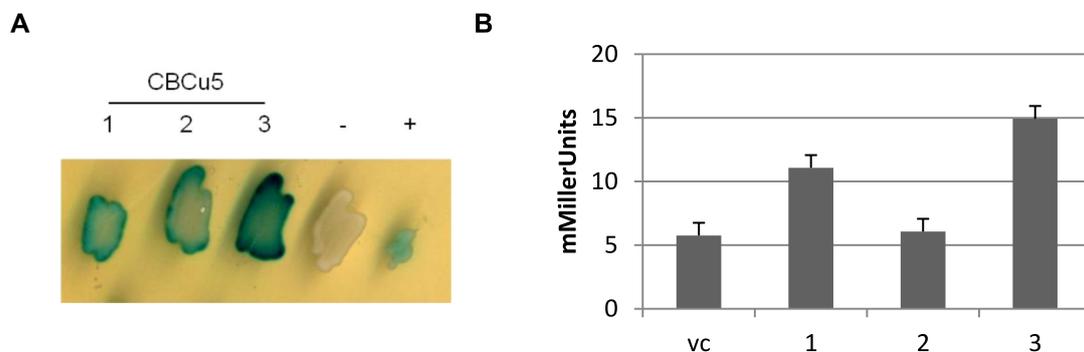


Abb. 3.32: Qualitativer (A) und quantitativer (B) Nachweis der LacZ-Aktivität von CBCu5. (A) Der qualitative Nachweis erfolgte durch X-Gal-Indikatorplatten. Stamm MKCu1 diente als Negativkontrolle (-), Stamm CBSc1 als Positivkontrolle (+). (B) Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte mit stationären CBCu5-Zellen durch einen ONPG-Test. Als Negativkontrolle (vc) diente der Stamm MKCu1. Die Standardabweichungen wurden aus drei technischen Replikaten erstellt.

3.3.4 Oberflächenpräsentation des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins

Bei den vorigen Versuchen wurde festgestellt, dass heterologe Enzyme an der Zelloberfläche von *C. utilis* präsentiert werden können. Daher sollte untersucht werden, ob mit modifizierten, lebenden *C. utilis*-Zellen eine Immunantwort ausgelöst, bzw. unterdrückt werden kann. In dieser Arbeit wurde für die Oberflächenpräsentation in *C. utilis* ein Peptid des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins (MOG) verwendet. Das MOG-Protein ist ein Strukturprotein der Myelinscheide der Nervenzellen und stellt gleichzeitig ein starkes Auto-Antigen dar, gegen welches sich Auto-Antikörper bilden können. Diese MOG-Auto-Antikörper können zu einer Demyelinisierung der Nervenzellen bei Multipler Sklerose führen (Berger *et al.*, 2003). Normalerweise entsteht aber während der Reifung des Immunsystems im Menschen eine Toleranz für die Antigeneigenschaft von MOG. Es wurde gezeigt, dass durch die Injektion relativ hoher MOG-Konzentration die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) in Mäusen ausgelöst und

beobachtet werden kann (Amor *et al.*, 1994; Mendel *et al.*, 1995). Diese EAE ist der humanen multiplen Sklerose sehr ähnlich und es sollte daher überprüft werden, ob die Fütterung mit einem MOG-präsentierendem *C. utilis*-Stamm eine Immunantwort gegen das MOG-Peptid unterdrücken kann. Diese Vorgehensweise hatte den Hintergrund, dass wiederholte kleine Dosen eines Antigens die Antikörperproduktion nicht anregen, sondern im Gegenteil, sogar unterdrücken (Weiner *et al.*, 2011).

3.3.4.1 Plasmidkonstruktion

Für den Einbau in die *C. utilis*-Zelloberfläche wurde das bekannte immunogene Epitop des MOG-Proteins ausgewählt (Mendel *et al.*, 1995). Dieses MOG₃₅₋₅₅-Peptid löst eine EAE in Mäusen aus (Rich *et al.*, 2004) und sollte als Fusion mit der Gas1-GPI-Signalsequenz auf der Zelloberfläche von *C. utilis* präsentiert werden.

Als Sequenz für das MOG-Protein diente die kodierende Sequenz des *Mus musculus* MOG-Proteins (GenBank-Nr.: AAB08096.1), die sich von der humanen MOG-Sequenz nur in einem Austausch des Serin42 durch ein Prolin unterscheidet. Die für die Gas1-Fusion verwendete Teilsequenz kodiert für die Aminosäuren 34 (Glycin) bis 114 (Asparaginsäure). Dieses Peptid beinhaltet das relevante MOG₃₅₋₅₅-Epitop und eine 59 Aminosäuren-lange, nicht-immunogene Füllsequenz (Abb. 3.33 A). Die kodierende Sequenz des MOG₃₄₋₁₁₄-Peptids wurde künstlich synthetisiert und in Form eines Plasmids (pMOG, GeneArt) zur Verfügung gestellt, wobei der Kodongebrauch von *P. jadinii* für die MOG-Synthese benutzt wurde (www.kazusa.jp). Mit Hilfe flankierender *NheI*-Schnittstellen wurde das MOG-Fragment in Plasmid pCB3 (*TDH3p-gas1Δ*) kloniert (Abb. 3.27 B). Da sowohl am 3'-, als auch am 5'-Ende der MOG-Sequenz eine *NheI*-Schnittstelle vorhanden war, kam es zufällig während der Ligation zu einer Verknüpfung zweier MOG-Fragmente, so dass eine doppelte MOG-Sequenz im korrekten Leserahmen zwischen die GAS1-Signalsequenzen eingefügt wurde (Abb. 3.27 B; Abb. 3.33 B). Das so entstandene Plasmid, mit der doppelt kodierenden MOG-Sequenz, wurde mit pCB10 bezeichnet. Ein weiteres Plasmid, bei welchem nur eine singuläre MOG-Sequenz inseriert wurde, wurde mit pCB13 bezeichnet. Die Fusionsproteine besitzen nach der Prozessierung im ER und Golgi-Apparat eine berechnete Masse von 12 kDa bei Gas1-MOG und 21 kDa bei Gas1-MOG-MOG, wobei die vorausgesagte ω-Aminosäure bei Gas1-MOG das Serin129 (Abb. 3.33 A, orange) ist und bei Gas1-MOG-MOG das Serin215 (Abb. 3.33 B, orange).

3. Ergebnisse

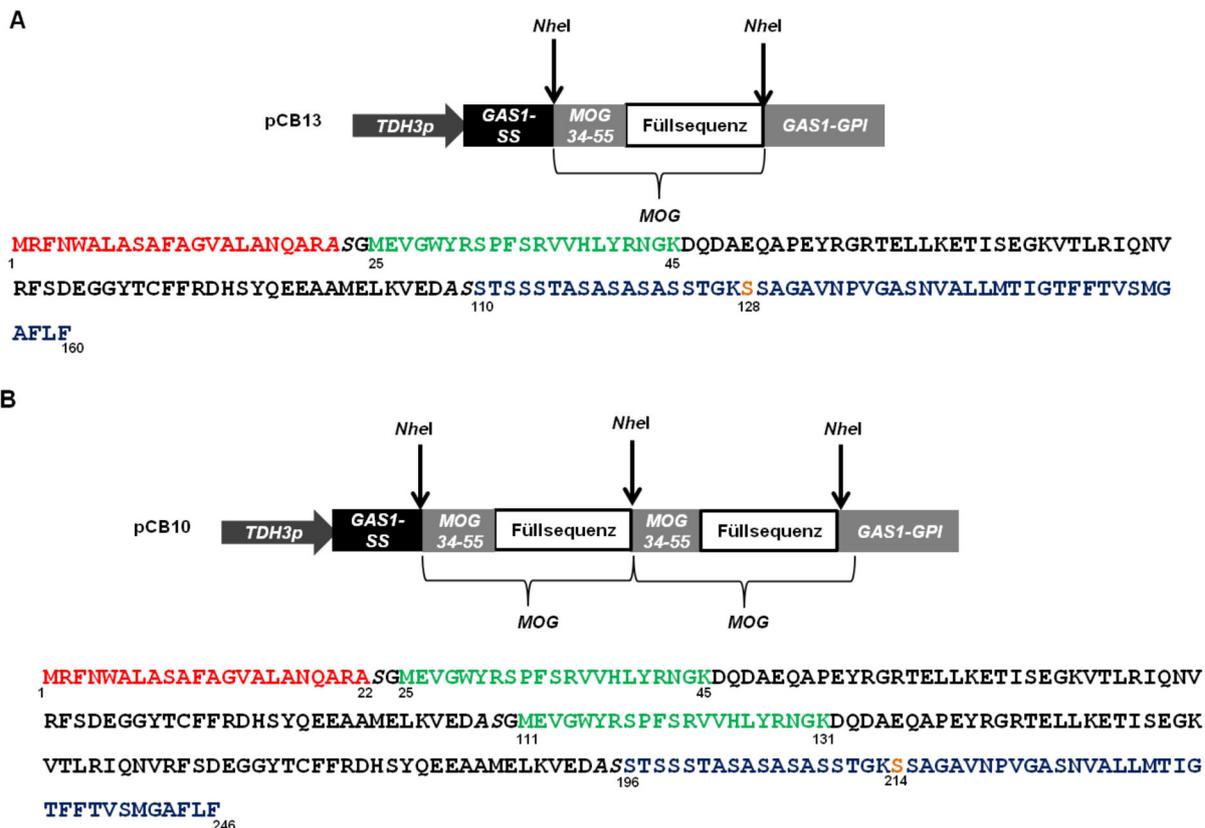


Abb. 3.33: Expressionseinheiten für die MOG-Oberflächenpräsentation. (A) Schema der Expressionseinheit von pCB13 und die Aminosäuresequenz des Gas1-MOG-Fusionsproteins (unten). **(B)** Schema der Expressionseinheit von pCB10 und die Aminosäuresequenz des Gas1-MOG-MOG-Fusionsproteins (unten). *GAS1* besitzt eine Signalsequenz (schwarzer Balken), sowie eine durch Mutagenese-PCR eingefügte *NheI*-Schnittstelle. Das immunogene MOG₃₅₋₅₅-Epitop (grauer Balken) wird durch eine nicht-immunogene 59 Aminosäuren-lange Füllsequenz (weißer Balken) von der C-terminalen *GAS1*-GPI-Signalsequenz (dunkelgrau) getrennt. Die Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine sind unterhalb der Expressionseinheiten dargestellt. Das Gas1-Signalpeptid ist in rot dargestellt, die durch die *NheI*-Schnittstelle zusätzlich eingefügten Aminosäuren kursiv. Das immunogene MOG₃₅₋₅₅-Peptid ist grün, die Füllsequenz ist in schwarzer Schrift und die Gas1-GPI-Signalsequenz blau. Die potentielle ω -Aminosäure ist orange.

Beide Plasmide wurden in der *TDH3*-Promotor-Sequenz durch *SacI* linearisiert und in *C. utilis* DSMZ2361 transformiert. Je drei Transformanten von CBCu7 (*TDH3p-gas1* Δ -MOG, singuläres MOG) und drei von CBCu8 (*TDH3p-gas1* Δ -MOG-MOG, Tandem MOG) wurden auf die Produktion von MOG untersucht. Die Stämme wurden dafür 72 h in YPD-Medium inkubiert und Zellextrakte wurden auf Präsenz des MOG-Peptids mit Hilfe eines Maus-Anti-MOG₃₅₋₅₅-Antikörpers (Aviva Systems Biology) in einem Immunoblot untersucht (Abb. 3.34).

Interessanterweise wurde festgestellt, dass in den CBCu7-Transformanten (mit pCB13, singuläres MOG), kein MOG-Signal vorhanden war, während bei den drei CBCu8-Transformanten (mit pCB10, Tandem-MOG) auf einer Höhe von ca. 27 kDa ein deutliches MOG-Signal detektiert wurde (Abb. 3.34). Somit war die zufällige Verknüpfung zweier *MOG*-Sequenzen während der Ligation für die heterologe Produktion des MOG-Peptids von Vorteil.

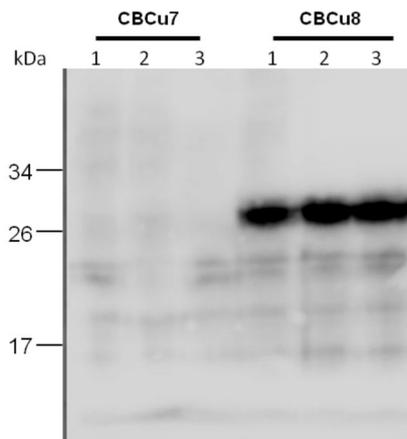


Abb. 3.34: Nachweis der MOG-Expression. Drei CBCu7- und CBCu8-Transformanten wurden für 72 h in YPD-Medium inkubiert. Die Zell-assoziierten Proteine wurden durch eine SDS-PAGE (4-20% Acrylamid) aufgetrennt bevor die MOG-Signale durch einen Anti-MOG-Antikörper auf einem Immunoblot detektiert wurden. Die Proteinmassen sind in kDa angegeben.

3.3.4.2 Lokalisation der Gas1-MOG-Fusion

Durch den Immunoblot der Transformanten wurde gezeigt, dass die MOG-Sequenz produziert wird (Abb. 3.34). Um die Zellwand-Lokalisation festzustellen, wurde eine Immunofluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt. Dabei wurde wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben vorgegangen, außer dass hier der Primärantikörper ein Maus-Anti-MOG₃₅₋₅₅-Antikörper war.

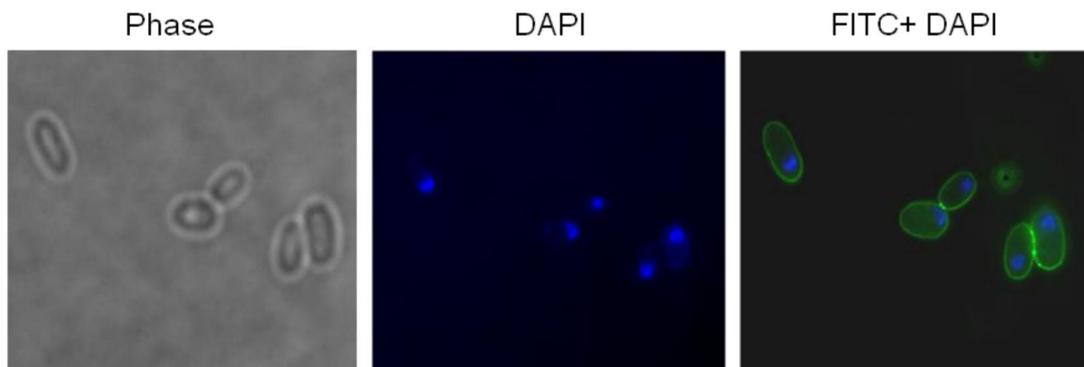


Abb. 3.35: Immunofluoreszenz von Stamm CBCu8. Das Zellwand-assoziierte MOG-Peptid wurde auf der Oberfläche von nicht-permeabilisierten *C. utilis* CBCu8-Zellen durch einen primären Maus-Anti-MOG₃₅₋₅₅-Antikörper und einen sekundären, FITC-gekoppelten, Antikörper (grün) detektiert. Die Zellen wurden zuvor für 72 h in YPD inkubiert. Für die Färbung nuklearer DNA wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) benutzt (blau).

In Abb. 3.35 ist die gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz und somit des MOG-Peptides auf der Oberfläche der CBCu8-Zellen zu sehen.

Diese Beobachtungen wurden mit Hilfe einer differentiellen Zellfraktionierung bestätigt. Hierfür wurden CBCu8-Zellen nach 72 h geerntet und mit Hilfe von Gasperlen aufgeschlossen. Durch Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellen bei $2.000 \times g$ wurden Zelltrümmer und restliche, nicht-aufgeschlossene Zellen in Pellet

P1 angereichert, wobei der Überstand (Ü1) das Cytoplasma enthält. Zusätzlich dazu wurde dieses Pellet P1 mit der β 1,3-Glucanase Zymolyase behandelt, zentrifugiert (5 min, 3.500 Upm) und der Überstand dieser Probe 10-fach konzentriert (Ü2). Der Überstand der ersten Zentrifugation, Ü1, wurde mit $10.000 \times g$ zentrifugiert, wobei das ER und der Golgi-Apparat in Pellet P2 angereichert wurden und das Cytoplasma ohne ER und Golgi-Apparat im Überstand (Ü3) vorlag. In einer weiteren Zentrifugation dieses Überstandes Ü3 bei $40.000 \times g$ wurden Transportvesikel in Pellet P3 angereichert. Das Kulturmedium (KM), Pellet P1, Überstand Ü2 und Pellet P3 wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und die MOG-Peptide wurden anschließend durch einen Anti-MOG₃₅₋₅₅-Antikörper in einem Immunoblot nachgewiesen (Abb. 3.36). Im Kulturmedium (KM) ist kein MOG-Signal sichtbar, während eine intensive MOG-Bande in der $2.000 \times g$ Pelletprobe (P2), in welcher Zelltrümmer und Zellwandbestandteile angereichert wurden, zu sehen ist. Ein weiterer Teil des MOG-Peptids wurde in Pellet P3, in welchem Membranvesikeln angereichert wurden, detektiert (P3). Ebenso wurde ein schwaches MOG-Signal in Überstand 2 (Ü2) detektiert. Somit ließ sich ein kleiner Teil des MOG-Peptids durch die β 1,3-Glucanase Zymolyase von der Zellwand abtrennen.

Die detektierten MOG-Banden besaßen alle eine größere Masse als berechnet (22 kDa). Dieses kann zum einen an dem angehängten Gas1-GPI-Rest (ca. 1 kDa) liegen, welcher bereits mit einem β 1,6-Glucan verknüpft ist. Zum anderen kann ein Teil des Peptids womöglich noch nicht korrekt an die Zellwand geknüpft worden sein, sondern befindet sich im Transit von der Plasmamembran zur Zellwand.

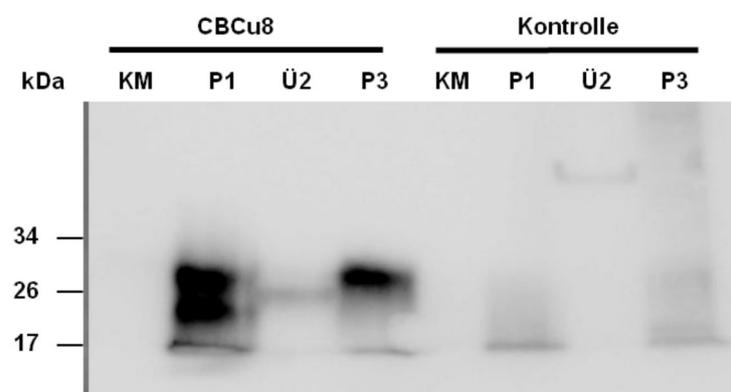


Abb. 3.36: MOG-Peptid in Zellfraktionen von Stamm CBCu8. Die Zellbestandteile stationärer Zellen von CBCu8 wurden mit Hilfe einer differentiellen Zentrifugation aufgetrennt. Aufgetragen wurde das Kulturmedium (KM), äquivalente Mengen von Pellet P1 (P1) und Pellet P3 (P3). Ein Äquivalenz von Pellet P1 wurde für 1 h mit 10μ l ZymolyaseT100 (5 mg/ml) behandelt und zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde 10-fach konzentriert (Ü2). Proteine wurden durch eine SDS-PAGE (4-20 % Acrylamid) aufgetrennt und MOG wurde mit Hilfe eines Anti-MOG₃₅₋₅₅-Antikörpers in einem Immunoblot nachgewiesen. Als Kontrolle diente Stamm MKCu1 (Kontrolle).

3.3.4.3 Plasmidintegration und Stabilität

Da keine MOG-Produktion von Stamm CBCu7 festgestellt wurde, sollte die chromosomale Plasmidintegration nur in den CBCu8-Transformanten durch eine

3. Ergebnisse

Southern-Blot-Analyse überprüft werden. Dazu wurde die gDNA dreier CBCu8-Transformanten (-1, -2, -3) mit *KpnI* verdaut und die Integration der Plasmide durch eine *TDH3p*-Sonde analysiert. Die erwarteten Bandengrößen betragen im Wildtyp 8,6 kb und bei einer korrekten Integration von pCB10 in den *TDH3*-Locus 3,9 kb und 11,33 kb (Abb. 3.37 A). Wie in Abbildung 3.37 B zu sehen ist, wurden in allen drei CBCu8-Transformanten *TDH3p*-Signale auf der richtigen Bandenhöhe detektiert. Zusätzlich dazu war in den Transformanten aber immer noch ein Signal auf Höhe der Wildtyp *TDH3p*-Bande zu sehen (Abb. 3.37, ◀). Dieses lässt den Schluss zu, dass Plasmid pCB10 durch homologe Rekombination korrekt in eines der drei *TDH3*-Allele integriert wurde, wobei aber mindestens eines der *TDH3*-Allele in allen drei Transformanten unbesetzt ist.

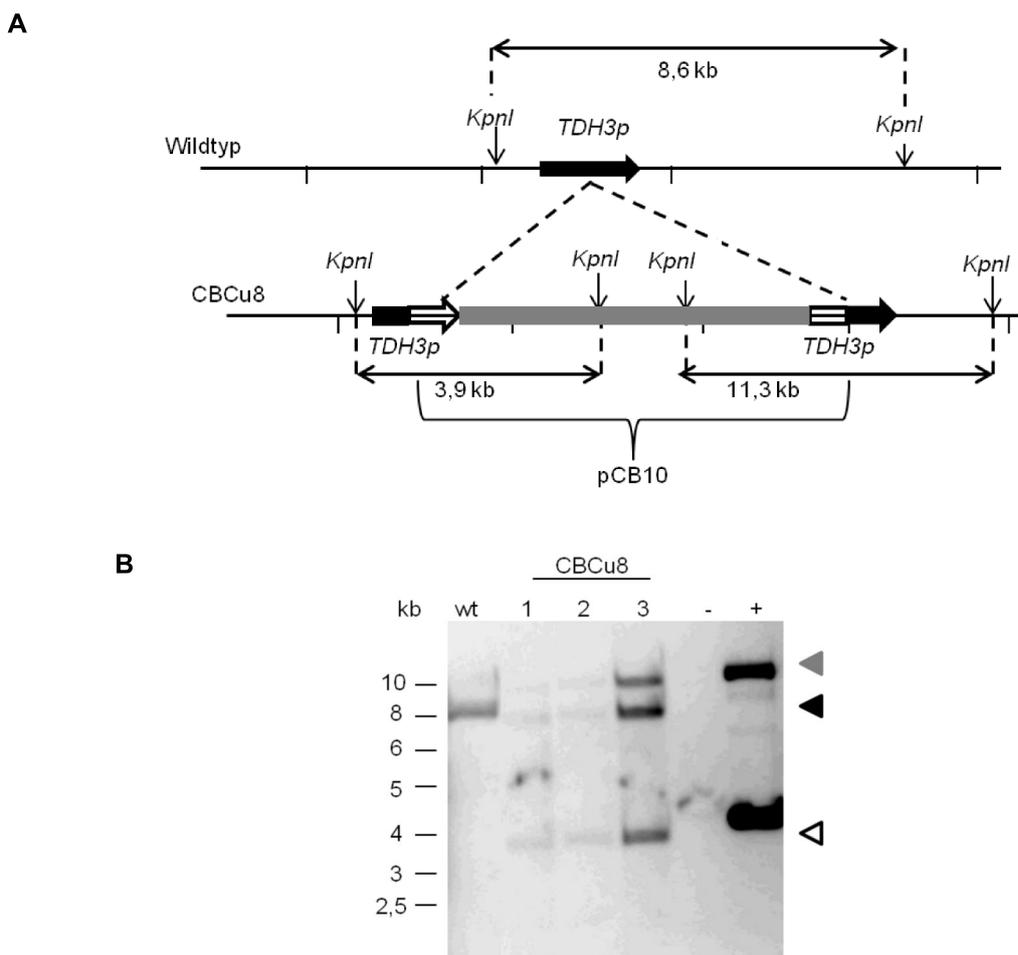


Abb. 3.37: Schema der Plasmidintegration sowie Southern-Blot-Analyse von CBCu8. (A) *TDH3*-Promotorlocus der chromosomalen *C. utilis*-DNA. Durch Restriktion der gDNA mit *KpnI* entsteht im Wildtyp ein 8,6 kb großes Fragment. Bei einer einfachen Integration von Plasmid pCB10 entstehen 3,9 kb- und 11,3 kb-große Fragmente. **(B)** Die mit *KpnI* verdaut gDNA der CBCu8-Transformanten (1, 2 und 3) sowie des *C. utilis* DSMZ2361 Wildtyps (wt) wurde mittels Southern-Blot analysiert. Die Plasmidfragmente wurden durch eine *TDH3p*-Sonde detektiert. Als Positivkontrolle (+) wurde Plasmid pMC1 eingesetzt. Die chromosomale *TDH3p*-Bande ist durch ◀ gekennzeichnet, die 11,3 kb *TDH3p*-Plasmidbande durch ◀ und die 3,9 kb *TDH3p*-Plasmidbande durch ◀.

Da die Integration des Plasmids pCB10 (*TDH3p-gas1Δ-MOG-MOG*) in den *TDH3*-Locus korrekt war und das Plasmid funktionell war, sollte anschließend überprüft werden, ob die Plasmidintegration stabil ist. Hierfür wurde ein

Plasmidstabilitätstest, wie bei CBCu9 beschrieben (Abschnitt 3.2.4; Abb. 3.14), durchgeführt. Es zeigte sich, dass über 80 % der Zellen tatsächlich in der Lage sind, das Plasmid über 50 Generationen in nicht-selektivem Medium zu behalten (Abb. 3.38). In einem Immunoblot der Zellpellets dreier Transformanten wurde ein MOG-Signal detektiert und somit das Ergebnis bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Die Stabilität der Zellen ist im Vergleich zu Stamm CBCu1 (ektopische Plasmidintegration) deutlich erhöht (Abb. 3.12). Um zu überprüfen, ob diese Zellen auch über einen längeren Zeitraum stabil bleiben, wurden drei dieser NST-resistenten CBCu8-Kolonien nochmals über 50 Generationen in nicht-selektivem Medium, wie bei CBCu9 (Abb. 3.14), inkubiert. Die Plasmidstabilität erhöhte sich nach diesem zweiten Stabilitätstest (insgesamt 100 Generationen) auf 99,5 % (Daten nicht gezeigt). Somit scheint die korrekte Integration in den *TDH3*-Locus wichtig für die Stabilität der Transformanten zu sein und wiederholtes Inkubieren erhöht die Stabilität. Eine dieser stabilen Kolonien (CBCu17) wurde für die folgenden *in vivo* Versuche verwendet (Abschnitt 3.3.5).

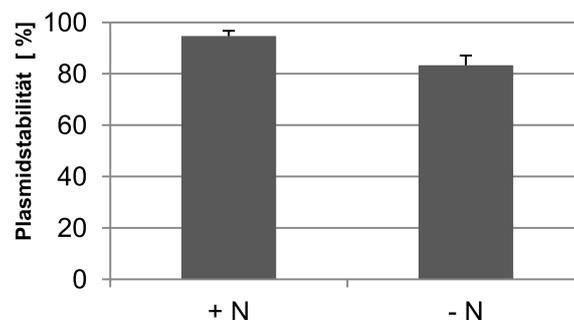


Abb. 3.38: Plasmidstabilitätstest. CBCu8-Zellen wurden für 50 Generationen mit (+ N) oder ohne (- N) Nourseothricin inkubiert. Anschließend fand die Selektion resistenter Zellen auf YPD-NST-Platten statt. Die Plasmidstabilität wurde aus der Resistenz von 100 Kolonien berechnet. Es wurden drei biologische Replikate für dieses Experiment verwendet.

3.3.5 Mauskolonisierung

Ziel der folgenden Vorversuche war es, durch eine Fütterung von Mäusen eine Besiedelung des Magen-Darm-Traktes mit dem *C. utilis*-Stamm CBCu17 zu erreichen und dadurch eine orale Toleranz gegenüber des MOG-Epitops zu erzeugen. Anschließend sollte in einem weiteren Versuch eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) in den Mäusen induziert werden, um zu untersuchen ob CBCu17 eine Immunantwort gegen MOG unterdrücken kann und womöglich eine abgeschwächte Form der EAE zu erreichen oder einen Ausbruch der EAE zu verhindern. Da bei *C. utilis* noch keine derartigen Studien durchgeführt wurden, musste zuerst getestet werden, welche Konzentration an *C. utilis*-Zellen für eine Besiedelung notwendig ist, oder ob eine solche Besiedelung überhaupt möglich ist. In Zusammenarbeit mit A. Mausberg (AG Kieseier, Neurologie, Universitäts-Klinikum Düsseldorf) wurde zunächst untersucht, ob Stamm CBCu17 in der Lage ist, im Intestinaltrakt von Mäusen zu überleben. Hierfür wurden 6-8 Wochen alte

3. Ergebnisse

weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Der erste Schritt war die Zählung der Mikroorganismen in den Fäkalpellets. Dafür wurden drei Tage vor Beginn der *C. utilis*-Fütterung (d-3) Fäkalpellets aufgefangen, in PBS resuspendiert und auf YPD-Agarplatten ausplattiert um die Kolonie-bildenden-Einheiten (KBE) zu zählen. Durch an d-2 (2 Tage vor CBCu17-Fütterung) dem Trinkwasser zugegebenes Tetrazyklin (1 mg/ml) sollte die natürliche Darmflora der Mäuse reduziert werden um so das Wachstum von *C. utilis* zu erleichtern. Das Fäkalpellet wurde zum Zeitpunkt d0 erneut aufgefangen und auf YPD-Agarplatten ausplattiert. Die Anzahl der KBE wurde mit denen von Zeitpunkt d-3 verglichen. Es wurde festgestellt, dass die Tetrazyklin-Zugabe zu einer Reduktion von 1×10^3 Zellen in den Fäkalpelletproben führte. Die Mehrzahl dieser Kolonien waren Bakterien, nur vereinzelt ließen sich typische Pilzkolonien vorfinden (Daten nicht gezeigt).

An Tag 0 wurde dann eine Gruppe von Mäusen (n= 5) mit 1×10^7 CBCu17-Zellen geschlundet, eine weitere Gruppe (n= 5) wurde mit 1×10^8 CBCu17-Zellen geschlundet. Nach 48 h (d2) wurde die Fütterung wiederholt und alle 24 h wurde das Fäkalpellet aufgefangen und analysiert. Der zeitliche Ablauf des Versuchs sowie die Ergebnisse der Kolonisierung sind in Abbildung 3.39 dargestellt.

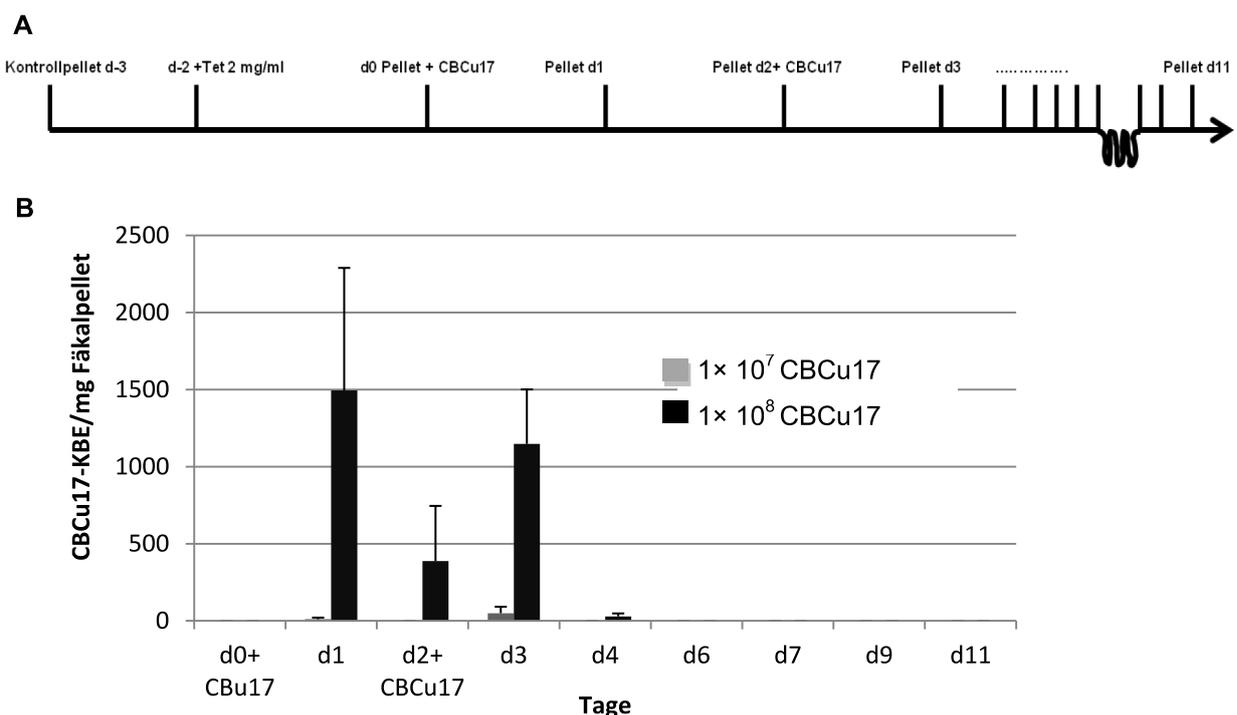


Abb. 3.39: Kolonisierung der Mäuse durch CBCu17. (A) Der zeitliche Ablauf der Kolonisierung. Ein Kontrollpellet wurde drei Tage (d-3) vor der ersten *C. utilis*-Fütterung genommen, um die Quantität des natürlichen Mikrobioms zu bestimmen. Zwei Tage vor der ersten *C. utilis*-Fütterung (d-2) wurde dem Trinkwasser 2 mg/ml Tetrazyklin hinzugefügt. An Tag 0 (d0) wurde ein weiteres Fäkalpellet aufgefangen und einer Gruppe von Mäusen (n= 5) 1×10^7 Zellen, einer anderen Gruppe 1×10^8 Zellen verabreicht. Alle 24 h wurden die Fäkalpellets aufgefangen. Eine weitere *C. utilis*-Zugabe fand an Tag 2 (d2) statt. Elf Tage nach der ersten Fütterung wurde das Experiment beendet. (B) Die aufgefangenen Fäkalpellets wurden ab Tag 0 auf YPD-Agarplatten mit 10 μ g/ml Nourseothricin und 100 μ g/ml Ampicillin (YPD-NA) ausplattiert. Die Kolonie-bildenden-Einheiten (KBE) wurden gezählt und in Relation zur Massen der Fäkalpellets gesetzt. d= Tag. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler der Mittelwerte.

3. Ergebnisse

Deutlich zu sehen ist, dass 1×10^7 CBCu17-Zellen nicht ausreichen, um den Magen-Darm-Trakt zu passieren und in den Fäkalpellets detektiert zu werden. Bei einer Menge von 1×10^8 CBCu17-Zellen hingegen wurden einen Tag nach der ersten Fütterung (d1) über 1000 Kolonie-bildende-Einheiten (KBE) pro mg Fäkalpellet identifiziert, jedoch waren diese nach einem Tag ohne CBCu17-Fütterung (d2) schon nicht mehr in den Fäkalpellets vorhanden. Nach erneuter Fütterung der Mäuse mit 1×10^8 CBCu17-Zellen an Tag2 (d2), wurden einen Tag später (d3) erneut über 1000 CBCu17 KBE pro mg Fäkalpellet gezählt, die wiederum einen Tag später (d4) schon nicht mehr vorhanden waren. So scheint es, dass eine zweimalige Fütterung der Mäuse mit CBCu17-Zellen nicht ausreicht, um eine dauerhafte Besiedelung zu erreichen. Mit drei der in den Fäkalpellets identifizierten CBCu17-Kolonien von Zeitpunkt d3 wurde ein Immunoblot durchgeführt, um das Vorhandensein des MOG-Peptids zu überprüfen. Dabei wurde ein Signal in allen drei Zellpellets in Höhe des MOG-Peptids detektiert (Daten nicht gezeigt).

Da eine ein- oder zweimalige Fütterung der Mäuse für eine Kolonisierung nicht ausreichend war, wurden in einem folgenden Versuch die Mäuse kontinuierlich über einen Zeitraum von 5 Tagen alle 24 h mit 1×10^8 CBCu17-Zellen gefüttert. Dabei wurde festgestellt, dass bei einer kontinuierlichen Fütterung CBCu17-Zellen im Fäkalpellet vorzufinden waren. Wurde die Fütterung jedoch für einen Tag ausgesetzt (d5), wurden erneut keine CBCu17-KBE in den Fäkalpellets nachgewiesen (d6). Nach nochmaliger Fütterung wurden KBE von CBCu17 wieder detektiert (Abb. 3.40). Demzufolge kann auch durch eine kontinuierliche Fütterung keine dauerhafte Besiedelung des Magen-Darm-Traktes erreicht werden. Um zu überprüfen, ob die *C. utilis*-Zellen überhaupt im Intestinal-Trakt vorhanden sind und nicht auf direktem Weg wieder ausgeschieden werden, wurden histologische Proben des Duodenums (Zwölffingerdarm), Ileums (Dünndarm), Colons (Dickdarm) und Caecums (Blinddarm) genommen. Dabei wurden CBCu17-Zellen vorwiegend im Caecum gefunden, wohingegen nur vereinzelt Zellen in den anderen Darmstücken aufzufinden waren (Daten nicht gezeigt).

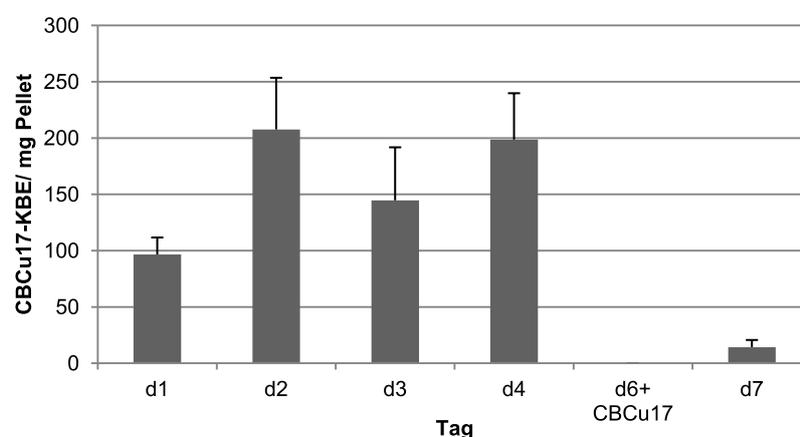


Abb. 3.40: Kontinuierliche Mausfütterung. Eine Gruppe von Mäusen (n= 4) wurde für 5 Tage (d0 bis d4) alle 24 h mit 1×10^8 CBCu17-Zellen gefüttert. An Tag 5 wurden den Mäusen keine Zellen verabreicht. An Tag 6 (d6) nochmals 1×10^8 Zellen. Um die Anzahl der KBE vergleichen zu können wurde die Zahl der KBE in Relation zu der Masse der Fäkalpellets gesetzt. d= Tag. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler der Mittelwerte.

3.3.6 Induktion einer oralen Toleranz in Mäusen

Im Folgenden sollte versucht werden, eine orale Toleranz für das MOG₃₅₋₅₅-Epitop durch die Fütterung mit CBCu17-Zellen zu erreichen. Wegen der obigen Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass die Mäuse über einen längeren Zeitraum mit CBCu17-Zellen gefüttert werden müssen, damit das Immunsystem der Maus genügend Zeit hat, das MOG₃₅₋₅₅ Epitop zu erkennen.

Für die Induktion einer oralen Toleranz für das MOG₃₅₋₅₅-Peptid in Mäusen, wurde einer Gruppe von Mäusen (Gruppe 1, n= 6) 7 Tage (d-7) vor der EAE-Induktion 1×10^8 CBCu17-Zellen alle 24 h für 10 Tage bis Tag3 (d3) präventiv verabreicht. Einer Kontrollgruppe (Gruppe 2, n= 5) wurde der *C. utilis* DSMZ2361 Wildtyp-Stamm (1×10^8 Zellen) verabreicht und eine weitere Gruppe (Gruppe 3, n= 9) erhielt weder den *C. utilis*-Wildtyp noch CBCu17-Zellen. Die EAE wurde in allen Gruppen durch Injektion des MOG₃₅₋₅₅-Peptids in die Flanke an Tag 0 (d0) induziert. An Zeitpunkt d3 wurde die Fütterung der Mäuse mit *C. utilis*-Zellen (CBCu17 und Wildtyp) gestoppt (Abb. 3.41) und die Mäuse wurden bei Auftreten der ersten Krankheitszeichen (ab d10) an Hand der Symptome klassifiziert. Die Symptome wurden wie folgt eingeteilt: 0= keine Symptome; 0,5= Parese des Schwanzes; 1,0= Paralyse des Schwanzes; 2,0= Parese der Hinterläufe; 3= Paralyse der Hinterläufe; 3,5= Parese der Vorderläufe; 4,0= Paralyse der Vorderläufe; 5= Tod.

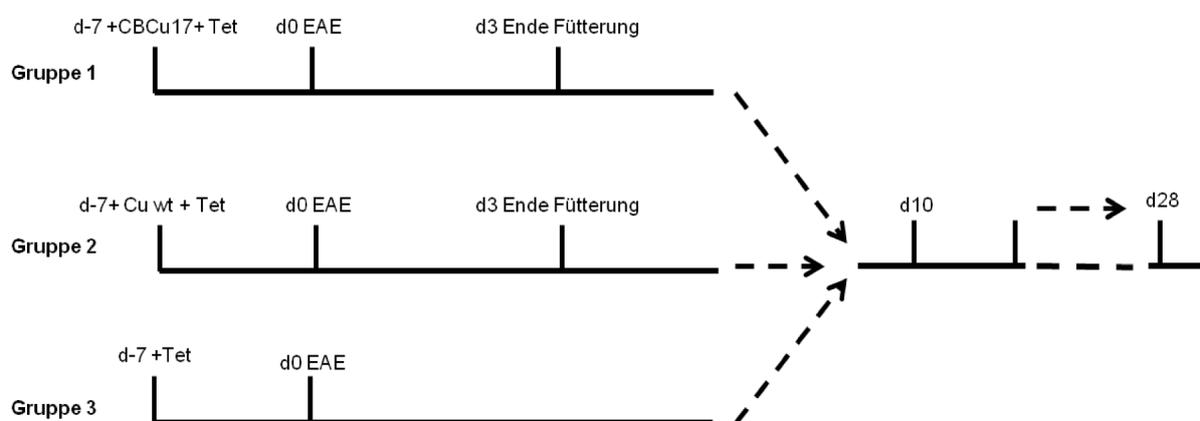


Abb. 3.41: Zeitlicher Ablauf der Induktion einer oralen Toleranz. Gruppe 1 wurde 7 Tage (d-7) vor der EAE-Induktion alle 24 h mit 1×10^8 *C. utilis* CBCu17-Zellen bis d3 geschlundet. Gruppe 2 wurde 7 Tage (d-7) vor EAE-Induktion mit dem *C. utilis* Wildtyp-Stamm DSMZ2361 ebenfalls für 10 Tage geschlundet. Gruppe 3 erhielt keine *C. utilis*-Zellen. In allen Gruppen wurde die EAE an Zeitpunkt d0 induziert. Die Tiere wurden anschließend über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet.

Gruppe 1 (präventive Verabreichung von CBCu17) zeigte keine EAE typischen Symptome, wohingegen die Gruppen 2 und 3 (mit *C. utilis* Wildtyp, bzw. ohne *C. utilis*) ab Zeitpunkt d10 erste Symptome aufwiesen, welche sich in beiden Gruppen bis d18 verstärkten (Abb. 3.42). Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, durch lebende, MOG-präsentierende *C. utilis*-Zellen den Ausbruch der EAE in Mäusen bei einer präventiven Fütterung der Zellen zu unterbinden. Auf Grund der unzureichenden Inzidenz der EAE in Gruppe 3 (55,5 %), d. h. nur 55 % der Mäuse wiesen Symptome auf, müssen allerdings weitere Versuche durchgeführt werden, um diese ersten Hinweise zu bestätigen.

3. Ergebnisse

Ein weiterer Versuchsansatz, bei welcher die CBCu17-Zellen therapeutisch, d. h. 10 Tage nach der Immunisierung, verabreicht wurden, brachte keine Verbesserung der EAE-Symptome im Vergleich zu einer Kontrollgruppe die den *C. utilis* Wildtyp oder keine *C. utilis*-Zellen bekam (Daten nicht gezeigt). Da in allen untersuchten Kontrollgruppen die EAE nicht in der gewünschten Stärke induziert wurde, müssen diese Versuche wiederholt werden, um signifikante Unterschiede feststellen zu können. Jedoch geben diese ersten Versuche einen deutlichen Hinweis darauf, dass eine orale Fütterung mit Antigen-präsentierenden *C. utilis*-Zellen eine Immunantwort in Mäusen unterdrücken kann.

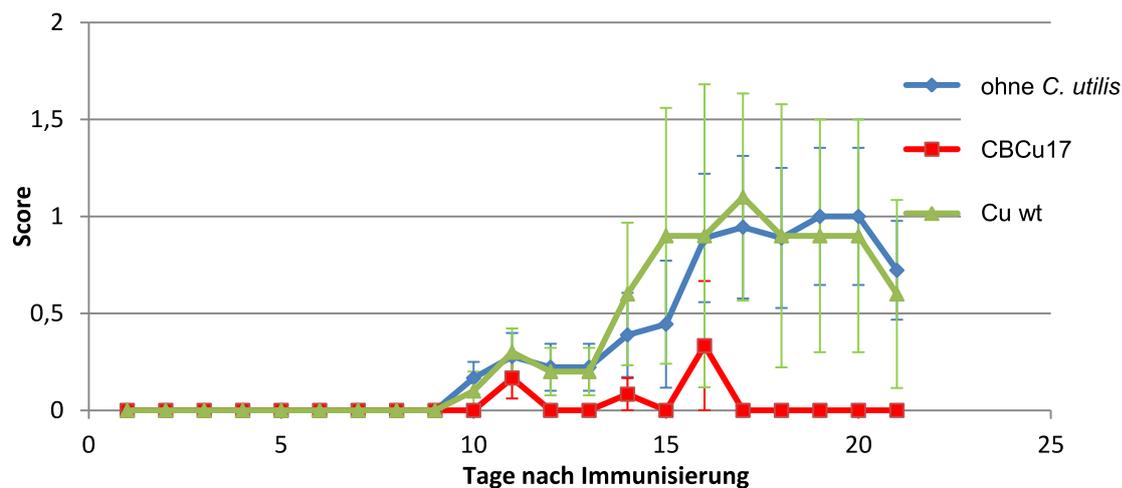


Abb. 3.42: EAE-Toleranz durch *C. utilis*. Drei Gruppen wurden an Zeitpunkt d0 mit MOG immunisiert. Eine Gruppe (1×10^8 CBCu17-Zellen, n= 6) bekam 7 Tage vor Immunisierung alle 24 h bis d3 1×10^8 CBCu17-Zellen. Eine weitere Gruppe (1×10^8 *C. utilis*-Wildtyp-Zellen n= 5) wurde der *C. utilis* Wildtyp verabreicht. Gruppe 3 (kein *C. utilis*, n= 9) bekam keine *C. utilis*-Zellen. Die klinischen Scores waren wie folgt: 0= keine Symptome; 0,5= Parese des Schwanzes; 1,0= Paralyse des Schwanzes; 2,0= Parese der Hinterläufe; 3= Paralyse der Hinterläufe; 3,5= Parese der Vorderläufe; 4,0= Paralyse der Vorderläufe 5= Tod. Angegeben sind die Mittelwerte der Scores, sowie die Standardfehler des Mittelwertes der einzelnen Gruppen.

3.4 *P. jadinii* als alternatives Sekretionssystem zu *C. utilis*

Der Ascomycet *P. jadinii* wird als die teleomorphe Form von *C. utilis* angesehen (Kurtzman *et al.*, 1979). Diese Annahme beruht allein auf DNA-DNA-Reassoziationsstudien und phänotypischer Gemeinsamkeiten beider Pilze (Kurtzman *et al.*, 1979). Auf Grund dieser Ergebnisse sollte die Verwandtschaft zwischen *C. utilis* und *P. jadinii* untersucht werden. Dabei wurden einerseits verschiedene Phänotypen beider Pilze charakterisiert, andererseits wurde das in *C. utilis* etablierte CalB-Sekretionssystem in *P. jadinii* eingesetzt und überprüft.

3.4.1 Vergleich der Phänotypen von *C. utilis* und *P. jadinii*

Um die Verwandtschaft der beiden Pilze genauer zu untersuchen, sollten in dieser Arbeit unterschiedliche Phänotypen beider Pilze bestimmt werden, um so eventuelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Pilzen festzustellen.

Es wurden zwei Phänotypen untersucht, zum einen die Flokkulation, welche sich leicht durch das Absinken der Zellen in Flüssigkulturen beobachten lässt. Zum anderen sollte versucht werden, Pseudohyphen auf speziellen Agarplatten zu induzieren.

3.4.1.1 Flokkulation

Bei Kultivierungen von *P. jadinii* in YPD-Medium (24 h, 30 °C) wurde beobachtet, dass die *P. jadinii*-Zellen bereits nach kurzer Ruhezeit flokkulieren und sich am Reagenzglasboden absetzen. Bei *C. utilis* hingegen konnte eine solche Aggregation und ein Absinken der Zellen nicht beobachtet werden. Hier blieben die Zellen in einer homogenen Suspension in den Flüssigkulturen (Abb. 3.43 A).

Um diese Beobachtungen zu quantifizieren wurde die Zelldichte in Flüssigkulturen (24 h, 30 °C), vor und nach Ruhepausen, bestimmt. Diese Messungen bestätigten die vorangegangenen Beobachtungen (Abb. 3.43 B). Mikroskopisch war die Aggregation von *P. jadinii*, aber nicht von *C. utilis*, ebenfalls zu sehen (Abb. 3.43 C).

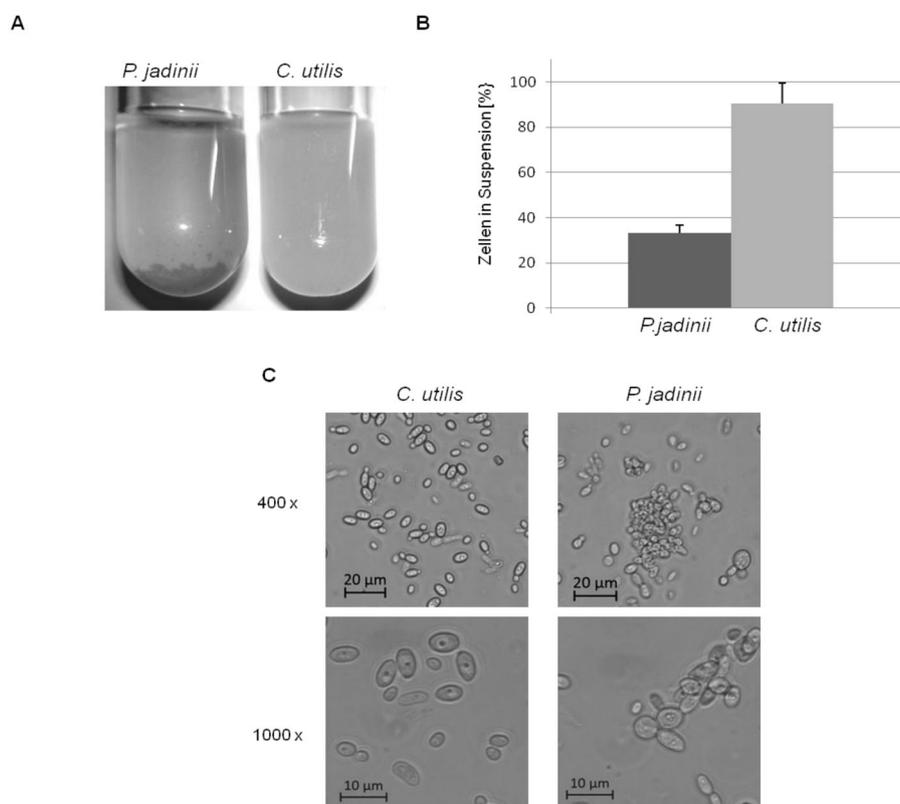


Abb. 3.43: Flokkulation von *P. jadinii* und *C. utilis*. (A) Kulturen von *P. jadinii* CBS1600 und *C. utilis* DSMZ2361 wurden für 24 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Ruhezeit von 5 min bildete

3. Ergebnisse

P. jadinii Zellflocken aus, während *C. utilis*-Zellen weiterhin in Suspension blieben. **(B)** Kulturen der beiden Pilze wurden geschüttelt und anschließend 30 min stehen gelassen. Danach wurde die $OD_{600\text{ nm}}$ am oberen Rand der Kultur gemessen. Angegeben ist das Verhältnis der optischen Dichten vor und nach Ruhezeit (%). **(C)** Mikroskopie von *C. utilis* DSMZ2361- und *P. jadinii* CBS1600-Zellen nach Wachstum für 2 Tage bei 30 °C in YPD-Medium. Die Bilder sind in 400-facher (400x) und 1000-facher (1000x) Vergrößerung aufgenommen worden.

3.4.1.2 Pseudohyphen

Es sollte überprüft werden, ob *C. utilis* und *P. jadinii* in der Lage sind, Pseudohyphen auszubilden. Dafür wurden beide Pilze auf Stickstoff-limitierenden SLAD-Agarplatten bei 30 °C inkubiert. Dabei bildeten sich bei *P. jadinii* bereits nach 4 Tagen kurze Pseudohyphen aus, wohingegen *C. utilis* weiterhin in Hefeform wuchs (Abb. 3.44 A). Nach 14 Tagen wies *P. jadinii* ein starkes pseudohyphales Wachstum mit Ketten aus elongierten Zellen auf, während *C. utilis* weiterhin die normale Hefeform zeigte (Abb. 3.44 B, C).

Weitere Phänotypen, wie z. B. Sporulation und Biofilmbildung, wurden weder bei *C. utilis*, noch bei *P. jadinii* beobachtet (Daten nicht gezeigt).

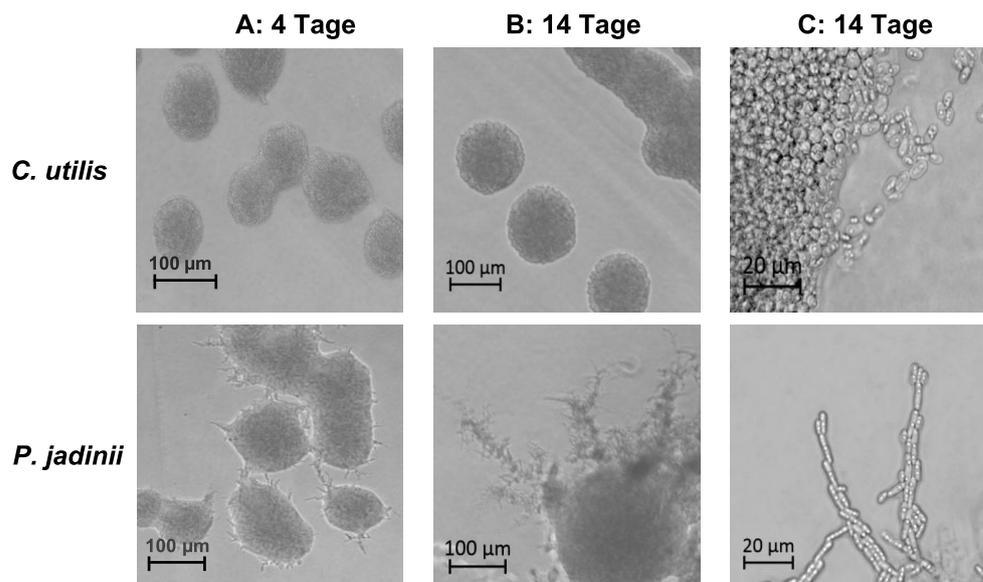


Abb. 3.44: Pseudohyphenbildung von *C. utilis* und *P. jadinii*. Mikroskopie von *C. utilis* und *P. jadinii* nach 4 Tagen **(A)** und 14 Tagen **(B und C)** Wachstum auf SLAD-Agarplatten mit 50 µM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei 30 °C. **A und B:** 400-fache Vergrößerung, **C:** 1000-fache Vergrößerung.

3.4.2 CalB-Sekretion bei *P. jadinii*

Sequenzvergleiche zwischen *C. utilis* DSMZ2361 und *P. jadinii* CBS1600 hatten eine hohe Homologie ergeben (Brinkroff *et al.*, 2013). Des Weiteren wurde durch die intrazelluläre GFP-Synthese festgestellt, dass *C. utilis* Plasmide auch in *P. jadinii* funktionell sind (Kunigo, 2013). Parallel dazu wurde gezeigt, dass mit Hilfe des Xylose-regulierten *GXS1*-Promotors CalB in *P. jadinii* sekretiert wird (Kunigo, 2013).

3. Ergebnisse

Daher sollte die Sekretion von CalB, welche unter der Kontrolle des *CuTDH3p* (pCB1) steht, in *P. jadinii* untersucht werden.

Dafür wurde Plasmid pCB1 in der *TDH3p*-Region durch *SacI* linearisiert und nach der Methode von Mitchell in *P. jadinii* CBS1600 transformiert. 8 ausgewählte CBPj2-Transformanten (mit pCB1) wurden in einem Immunoblot auf die CalB-Produktion überprüft. Der Transformant mit dem stärksten CalB-Signal wurde für die folgenden Versuche ausgewählt (Daten nicht gezeigt). Um die Integration des Plasmids in der CBPj2-Transformante zu überprüfen, wurde eine Southern-Blot-Analyse der mit *XhoI*-verdauten gDNA durchgeführt. Bei dem *P. jadinii*-Wildtyp wurde eine 5,8 kb Bande erwartet und bei einer einfachen Integration von Plasmid pCB1 in den *TDH3p*-Locus wurden Banden bei 3,8 kb und 9,5 kb erwartet (Abb. 3.45 A). Die Southern-Analyse zeigte bei CBPj2 die *TDH3p*-Wildtypbande sowie weitere Banden bei ca. 6,2 kb und oberhalb der 10 kb Markerbande (Abb. 3.45 B). Diese Bandengrößen entsprechen nicht den erwarteten Größen. Daraus kann gefolgert werden, dass Plasmid pCB1 zwar chromosomal integriert wurde, jedoch nicht wie gewünscht im *TDH3p*-Locus, sondern ektopisch an unbekannter Stelle.

Für den CalB-Sekretionsvergleich wurden CBCu1- und CBPj2-Zellen für 120 h in YPD-Medium bei 30 °C inkubiert und vergleichbare Mengen der Kulturmedien, sowie der Zellpellets wurden anschließend durch einen Immunoblot untersucht (Abb. 3.45 D).

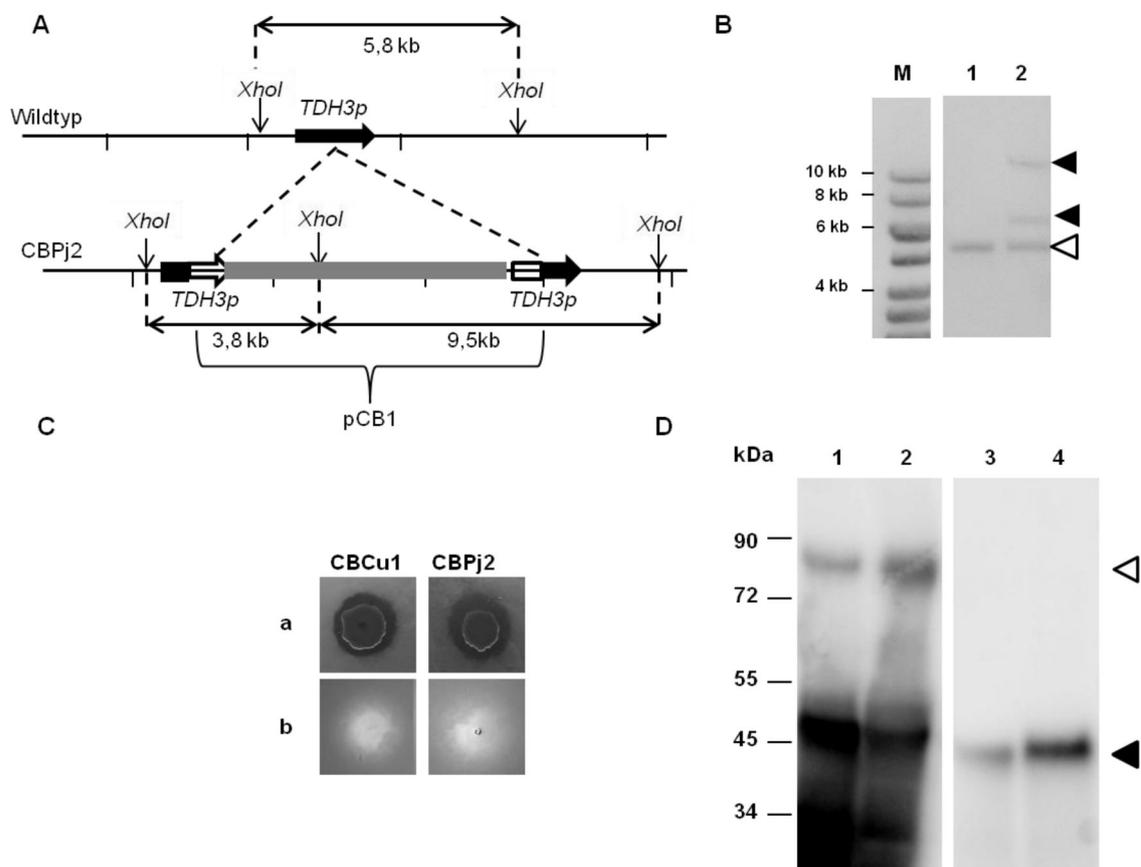


Abb. 3.45: chromosomale Plasmidintegration und Immunoblot der Zellen und Kulturmedien von CBCu1 und CBPj2. (A) Schematische Darstellung des *TDH3p*-Bereichs in *P. jadinii* vor (oben) und (unten) nach der Integration von pCB1. (B) Die mit *XhoI*-verdauten gDNA des *P. jadinii* Wildtyps (1)

3. Ergebnisse

und der Transformante CBPj2 (2) wurden in einem Southern-Blot mit einer *TDH3p*-Sonde untersucht. Die Wildtyp *TDH3p*-Bande ist mit ◀ gekennzeichnet, die Banden der Plasmidsequenz mit ◀. (C) CBCu1 (*C. utilis*) und CBPj2 (*P. jadinii*) wurden für 4 Tage bei 37 °C auf Tributyrin-Agarplatten inkubiert. Die lipolytische Aktivität Zell-assoziiierter (a) und sekretierter CalB in 5 µl Kulturmedium (b) wird durch die Klärungshöfe nachgewiesen. (D) Immunoblotanalyse der CalB Sekretion. CBCu1 und CBPj2 wurden für 120 h in YPD-Medium bei 30 °C inkubiert. Vergleichbare Mengen der Kulturmedien und Zellen wurden durch eine SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und in einem Immunoblot wurde CalB mit einem Anti-HA-Antikörper detektiert. 1= Zellen CBCu1, 2= Zellen CBPj2, 3= Kulturmedium CBCu1, 4= Kulturmedium CBPj2. Die CalB-Bande ist durch ◀ gekennzeichnet, eine Kreuzreaktion des Anti-HA-Antikörpers mit ◀ .

Dabei wurde festgestellt, dass bei CBPj2 und CBCu1 ein Großteil der Lipase in der Zelle assoziiert bleibt (Abb. 3.45 D). Im Medium von CBPj2 (Spur 4) wurde jedoch ein stärkeres CalB-Signal detektiert als bei CBCu1 (Spur 3). Ebenso wurde eine größere lipolytische Aktivität in dem CBPj2-Kulturmedium und bei der CBPj2-Kolonie als bei CBCu1 auf Tributyrin-Agarplatten nachgewiesen.

Für den Vergleich der beiden Pilze wurde zusätzlich die Plasmidkopieanzahl bestimmt (Abschnitt 3.2.10). Dabei wurde festgestellt, dass Stamm CBPj2 nur 2 Plasmidkopien von pCB1 besitzt und nicht wie Stamm CBCu1 4 Plasmidkopien (Tabelle 3.3). Die verbesserte Sekretion der CalB in CBPj2 kann also nicht auf eine höhere pCB1-Plasmidkopieanzahl zurückzuführen sein. Es kann also festgehalten werden, dass auch *P. jadinii* Potential für die Sekretion heterologer Proteine besitzt und CalB unter den getesteten Bedingungen effizienter sekretiert als *C. utilis*.

4 Diskussion

Die Futterhefe *C. utilis* wurde bereits 1920 aus verschiedenen Hefefabriken isoliert und wird seit dieser Zeit als Einzellerprotein, Nahrungszusatz und Futterhefe eingesetzt (Henneberg, 1926).

Die Vorteile von *C. utilis* sind einerseits die Eingruppierung als GRAS-Organismus sowie die Vielseitigkeit der verwerteten Nährstoffe. Andererseits wächst *C. utilis* nicht nur auf Glucose-haltigen Medien, sondern ist auch in der Lage Pentosen (z. B. Xylose) zu verwerten. Im Gegensatz zu vielen anderen Hefearten, wie zum Beispiel *S. cerevisiae*, ist *C. utilis* ein "Crabtree-negativer" Organismus. Trotz dieser Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten von *C. utilis* wurde bisher noch kein endo- oder exogenes Produkt extrazellulär hergestellt.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Sekretionssystems in *C. utilis*. Hierfür wurde in einem ersten Schritt das Sekretom charakterisiert um aufbauend auf diesen Ergebnissen die heterologe Sekretion der CalB bei *C. utilis* zu untersuchen. Zusätzlich sollte die Präsentation verschiedener Proteine auf der Zelloberfläche gezeigt werden und überprüft werden, ob mit *C. utilis* eine orale Toleranz für ein immunogenes Epitop induziert werden kann. Zusätzlich wurden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede von *C. utilis* und *P. jadinii* untersucht.

4.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen *C. utilis* und *P. jadinii*

Ein enger Verwandter von *C. utilis* ist der Ascomycet *P. jadinii*. *P. jadinii* wurde bisher auf Grund von phänotypischen Gemeinsamkeiten und einer großen genomischen Homologie als die teleomorphe Form von *C. utilis* dargestellt (Kurtzman *et al.*, 1979). Der natürliche Lebensraum von *P. jadinii* ist nicht genau bekannt, da *P. jadinii* Pentosen und andere Lignin-Abbauprodukte verwerten kann, ist *P. jadinii* womöglich beim Abbau von Pflanzenprodukten in der Natur beteiligt. Da bisher nur wenige Informationen über *P. jadinii* und seine Verwandtschaft zu *C. utilis* vorliegen, wurde genauer untersucht, inwieweit sich diese beiden Spezies auf genomischer Ebene und ihrer Phänotypen gleichen oder unterscheiden.

4.1.1 Die Genome von *C. utilis* und *P. jadinii*

Um Vergleiche zwischen *C. utilis* und *P. jadinii* festzustellen wurden die Genome von *C. utilis* DSMZ2361 (D. Tielker und J.F. Ernst, unveröffentlicht) und *P. jadinii* CBS1600 sequenziert (Brinkrolf, 2013). Die Genomsequenzierung von *P. jadinii* brachte eine Größe von 12,71 Mb mit 7 Chromosomen und 6147 ORFs hervor

(Brinkrolf, 2013). Bei der Genomsequenzierung von *C. utilis* DSMZ2361 wurden 12,5 Mb sequenziert, innerhalb welcher 6417 mögliche ORFs identifiziert wurden.

Das Kerngenom von *P. jadinii* und *C. utilis* beinhaltet 5227 Gene, wobei 920 Gene nur in *P. jadinii* vorkommen und 462 in *C. utilis* (Brinkrolf, 2013). Durch FACS-Analysen wurde zudem festgestellt, dass der *C. utilis* Stamm DSMZ2361 einen triploiden Chromosomensatz und *P. jadinii* CBS1600 einen diploiden Chromosomensatz besitzt (Kunigo, 2013).

4.1.2 Proteine der Sekretion und Glykosylierung bei *C. utilis* und *P. jadinii*

An Hand von BLASTP-Suchen wurden die kodierenden Sequenzen von Glykosylierungs- und Sekretions-relevanten Proteinen bei *C. utilis* und *P. jadinii* mit Hilfe der Identität zu den entsprechenden *S. cerevisiae* S288C Proteinen identifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass ein Großteil der Proteine in beiden Hefen vorhanden ist. Jedoch waren auch einige Bereiche dabei, die nur in *P. jadinii* vorkamen, so z. B. das Chaperon Sec62, welches Teil des Heptameren Sec63-Komplexes (Sec61, Sbh1, Sss1, Sec62, Sec63, Sec71, Sec72) ist. Dieser ist für den kotranslationalen und posttranslationalen, SRP-unabhängigen Transport von Proteinen in das ER-Lumen verantwortlich (Rothblatt *et al.*, 1989; Craven *et al.*, 1996; Steel *et al.*, 2004; Spiller und Stirling, 2011). Mit Hilfe der Chaperone Kar2 und Lhs1 bildet der Sec63-Komplex einen Tunnel, durch welchen die Proteine in das ER-Lumen gelangen. Sec62 erkennt die Signalsequenz des Proteins und bindet dabei anstatt des SRPs an die Signalsequenz des Proteins (Plath *et al.*, 2004).

Eine Möglichkeit der posttranslationalen Proteinmodifikation ist die Glykosylierung von Proteinen in Form von *N*- und *O*-Glykosylierungen. Eine entscheidende Rolle bei der *O*-Glykosylierung spielen die Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt-Proteine). Diese katalysieren die Translokation eines aktivierten Dolichol-Phospho-Mannosylrestes an ein Serin- oder Threoninrest des Proteins im ER-Lumen. In *S. cerevisiae* gibt es 7 Pmt-Isoformen, die in drei Familien (Pmt1, Pmt2 und Pmt4) eingruppiert sind (Gentzsch und Tanner, 1997). Die Pmts bilden Dimere, wobei jedes Dimer für die Glykosylierung eines spezifischen Proteins verantwortlich ist (Gentzsch und Tanner, 1997). In *C. utilis* wurde zu jeder Pmt-Familie mindestens ein homologer Bereich gefunden (Pmt1, Pmt2, Pmt4 und Pmt6) (Tabelle 4.1). In *P. jadinii* wurde zusätzlich zu diesen Pmt-Isoformen (Pmt1, Pmt2, Pmt4, Pmt6) eine weitere Form mit einer hohen Identität zu ScPmt2 (74 %) und ScPmt3 (73 %) identifiziert.

Die begrenzte Anzahl an Pmts in *C. utilis* und *P. jadinii* ist kein Alleinstellungsmerkmal, da *P. pastoris* ebenfalls 5 Pmt-Isoformen (Prill *et al.*, 2005; Nett *et al.*, 2013) besitzt und die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* nur 3 Pmt-Isoformen (Willer *et al.*, 2005). Diese Anzahl an Pmts ist ausreichend für die *O*-Glykosylierung eines Proteins, da die Pmts der einzelnen Familien sich untereinander komplementieren können. Es muss jedoch erwähnt

werden, dass die Pmt-Proteine große Sequenzidentitäten untereinander besitzen, so dass eine genaue Zuordnung der Proteine schwierig ist.

Ein weiterer Unterschied zu *S. cerevisiae*, *K. lactis* und *S. pombe* wurde in *P. jadinii* und *C. utilis* festgestellt. Beide Pilze besitzen eine UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT), welche eine α 1,3-Glucose an die Mannosestruktur glykosylierter Proteine im ER hängt, was eine erneute Anlagerung von Calnexin an das falsch gefaltete Protein zur Folge hat (Hebert *et al.*, 1995).

<i>S. cerevisiae</i> S288C	<i>C. utilis</i> NRBC0988 (Tomita <i>et al.</i> , 2012)	<i>P. jadinii</i> CBS1600 (Brinkrolf <i>et al.</i> , 2013)
Pmt1	56%/ 28 %	56%/ 28 %
Pmt2	47%	64%
Pmt3	-	-
Pmt4	50%	52%
Pmt5	-	-
Pmt6	51%	55%/ 49 %
Pmt7	-	-

Tabelle 4.1: Identitäten der *C. utilis* und *P. jadinii* Pmt-Sequenzen zu *S. cerevisiae*. Die Aminosäuresequenzen der *S. cerevisiae* Pmts wurden mit Hilfe einer BLASTP-Suche auf die Identität in *C. utilis* (Tomita *et al.*, 2012) und *P. jadinii* (Brinkrolf *et al.*, 2013) untersucht.

Des Weiteren wurde bei *C. utilis* und *P. jadinii* eine *N*-Acetylglucosamintransferase (Gnt1, 27 % Identität zu ScGnt1) identifiziert, welche auch im humanen Glykosylierungsvorgang vorkommt (Delic *et al.*, 2013). Gnt1 transferiert ein einzelnes *N*-Acetylglucosamin-Molekül auf die endständige α 1,3-Mannose eines sekretorischen, glykosylierten Proteins, welche nach dem „trimmen“ von Man₈-GlcNAc₂ zu Man₅-GlcNAc₂ entsteht. Solch eine *N*-Acetylglucosamintransferase existiert auch in *S. cerevisiae*, jedoch nicht in *P. pastoris* (Yoko-o *et al.*, 2003). Die Verlängerung der Glycosylkette mit einem GlcNAc ist ein wichtiger Schritt in der humanisierten Glykostruktur von heterolog hergestellten Proteinen in Hefen.

Bei den Untersuchungen der Genome stellte sich heraus, dass es Unterschiede in der Genomsequenzierung dieser Arbeit (D. Tielker und J. F. Ernst, unveröffentlicht) und einer weiteren von Tomita *et al.* (2012) gibt. So fehlen bei Tomita *et al.* die kodierenden Bereiche der UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT), von Sec65 einem Protein des SRP und von Sil1, einem Nukleotidaustauschfaktor im ER. Umgekehrt gibt es auch bei Tomita *et al.* (2012) Sequenzen, die in der Genomsequenzierung dieser Arbeit nicht enthalten sind. Dieses kann an der Abdeckung der Sequenzierungen liegen. Während bei Tomita *et al.* eine 20-fache Abdeckung erreicht wurde, liegt sie bei Ernst und Tielker bei 17. Daher sind die Daten von Tomita *et al.* (2012) womöglich genauer und ein Vergleich der beiden Sequenzen wird dadurch erschwert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *P. jadinii* bei einzelnen Genen mehrere Kopien im Genom besitzt (PMTs) und auch kodierende Sequenzen hat, die in *C. utilis* fehlen (SEC62). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass *C. utilis*

während der evolutionären Entwicklung diese Gene verloren hat, wohingegen bei anderen, essentiellen Proteinen (Sec62) noch geklärt werden muss, welche anderen Proteine diese Aufgaben übernehmen.

4.1.3 *C. utilis* und *P. jadinii* bilden unterschiedliche Phänotypen aus

Für weitere Untersuchungen wurden die Unterschiede zwischen *P. jadinii* und *C. utilis* hinsichtlich der Flokkulation und Pseudohyphenbildung bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass *P. jadinii* unter den getesteten Bedingungen flokkulierte (Abb. 3.43) und Pseudohyphen ausbildete (Abb. 3.44). Im Zusammenhang mit der Etablierung eines heterologen Expressionssystem spielt die Flokkulation eine wichtige Rolle. So können flokkulierende Zellen sehr leicht vom Kulturmedium abgetrennt werden, was unter anderem in der Bierherstellung breite Anwendung findet und in der Ethanolproduktion zum Einsatz kommt (Cunha *et al.*, 2006). Unter Stickstoffmangel zeigte *P. jadinii* innerhalb von 4 Tagen erste Pseudohyphen, wohingegen *C. utilis* in Hefeform wuchs (Abb. 3.44). Dieses bestätigt die Ergebnisse früherer Arbeiten, bei welchen pseudohyphales Wachstum bei *P. jadinii* gezeigt wurde (Kurtzman *et al.*, 2008). Bei *C. utilis* dagegen wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt weder Flokkulation noch Pseudohyphen beobachtet.

4.2 Das wachstums- und kohlenstoffregulierte Sekretom von *C. utilis*

Für die Etablierung eines heterologen Expressionssystem ist die Sekretion der Proteine in das Kulturmedium von großem Interesse, da die Reinigungsprozesse erleichtert und unerwünschte Kontaminationen minimiert werden. Um das sekretorische Potential von *C. utilis* als Expressionsstamm zu untersuchen und mögliche proteolytisch aktive Proteine zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit das Sekretom von *C. utilis* in verschiedenen Wachstumsphasen und Nährstoffbedingungen untersucht.

Dabei wurden nach Wachstum in SMD-Medium insgesamt 37 Proteinen identifiziert, wobei keine Proteine mit proteolytischer Aktivität gefunden wurden. Eine Gruppierung der sekretierten Proteine an Hand ihrer Funktion verdeutlichte, dass ein Großteil der Proteine eine unbekannte Funktion besitzt (Abb. 3.1). Die zweithäufigste Gruppe waren Glucanasen, was in Übereinstimmung mit den Sekretomen von *P. pastoris* (Mattanovich *et al.*, 2009), *K. lactis* (Swaim *et al.*, 2008) und *C. albicans* (Sorgo *et al.*, 2010) ist.

Die Anzahl der sekretierten Proteine ist bei *C. utilis* stark von der Wachstumsphase abhängig (Tabelle 9.1, Anhang). Während in der exponentiellen Wachstumsphase 20 Proteine identifiziert wurden, waren es in der stationären Phase 34 (Abb. 3.2). Die

Hälfte der nur in der stationären Phase gefundenen Proteine besitzt keine Signalsequenz und wurde somit nicht auf dem konventionellen Sekretionsweg in das Kulturmedium abgegeben. Diese Proteine könnten durch Zelllyse in das Medium gelangt sein, welche besonders in der stationären Phase auftritt. So kann auch die Detektion der ribosomalen Rpl8B und Emg1-Proteine erklärt werden, da auch in den stationären Sekretomen anderer Pilze ribosomale Proteine identifiziert wurden (Swaim *et al.*, 2008; Mattanovich *et al.*, 2009; Sorgo *et al.*, 2010; Stead *et al.*, 2010). Der semiquantitative Vergleich dieser cytosolischen Proteine zeigte, dass diese Proteine in geringer Menge im Sekretom auftreten. Es wurde jeweils nur 1 Peptid von Rpl8B und Emg1 in der stationären Phase gefunden (Tabelle 9.1, Anhang). Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass diese Kontaminationen auf Grund von Zelllyse in das Medium gelangten. Des Weiteren verdeutlichte der semiquantitative Vergleich von Proteinen, die in beiden Wachstumsphasen vorhanden waren, dass in beiden Wachstumsphasen die Proteine mit vergleichbarer Häufigkeit auftraten (Tabelle 9.1, Anhang). An Hand der Proteinmengen ließ sich demzufolge keine Regulation des Sekretoms feststellen.

Einen Hinweis auf den Stress der Zelle in der stationären Phase liefert die Identifikation Stress-induzierter Proteine, wie zum Beispiel die Chitintransglycosidase (Crh1), welche durch Zellwandstress induziert wird (Bermejo *et al.*, 2008) und das Thioredoxin1 (Trx1), welches in der stationären Phase von *S. cerevisiae* (Jakubowski *et al.*, 2000) und unter oxidativem Stress in *C. albicans* (Enjalbert *et al.*, 2003) gefunden wurde. Gleiches gilt für die Ferroxidase Fet3, welche bei geringen Eisenkonzentrationen sekretiert wird (Askwith *et al.*, 1994). Wie auch bei *C. utilis* wurde die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Tdh3) in den Sekretomen von *P. pastoris* (Mattanovich *et al.*, 2009), *K. lactis* (Swaim *et al.*, 2008) und *C. glabrata* (Stead *et al.*, 2010) detektiert, obwohl Tdh3 keine N-terminale Signalsequenz enthält. Die im Sekretom vorhandenen GPI-Zellwandproteine (z. B. Gas1, Plb3) könnten durch Proteolyse (Swaim *et al.*, 2008) oder durch das Freisetzen der Proteine während des Transports von der Zellmembran zur Zellwand in das Medium gelangt sein (Sorgo *et al.*, 2010).

Ein Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glucose zu Xylose zeigte, dass die Endomannosidase Dfg5 nur nach Wachstum in SMX-Medium, aber nicht nach Wachstum in SMD-Medium im Sekretom von *C. utilis* vorhanden war. Zusätzlich war eine starke Invertase-Bande zwischen 90 und 140 kDa in SMX-Medium sichtbar, welche in SMD-Medium weniger stark ausgeprägt war (Abb. 3.4 A, B). Des Weiteren wurde eine Asparaginase (Asp3) in Medium ohne Ammoniumsulfat bei ca. 72 kDa detektiert (Abb. 3.4 B). Diese Beobachtung bestätigt vorherige Arbeiten, bei denen eine extrazelluläre Asparaginase in Medium ohne Ammonium nachgewiesen wurde (Kil *et al.*, 1995). Auch bei *S. cerevisiae* wird das für die Asparaginase kodierende ASP3-Gen unter Stickstoffmangel induziert (Kim *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2010).

Das häufigste Protein in Glucose- und Xylose-basiertem Medium war die Invertase (Tabelle 9.1, Anhang). Die Sekretion der Invertase bei *C. utilis* in SMD-Medium (Glucose) steht im Widerspruch zur Regulierung des für die Invertase kodierenden *SUC2*-Gens in *S. cerevisiae* und *A. nidulans*, wo die Expression des *INV1*- (*SUC2*-) Gens durch Glucose unterdrückt wird (Hackel und Khan, 1978; Vainstein und Peberdy, 1991; Roca *et al.*, 2004). In früheren Arbeiten wurde aber bereits gezeigt, dass *C. utilis* unter Glucosebedingungen Invertase produziert (Chavez *et al.*, 1997). Ebenso wurde von Belcarz *et al.* (2002) Invertase nach Wachstum in Glucose und Glycerin nachgewiesen. Chavez *et al.* (1998) beschrieben eine Bindestelle für den Mig1-Repressor in der *INV1*-Promotorsequenz. Der Mig1-Repressor unterdrückt bei Anwesenheit von Glucose spezifisch die Expression von Genen, die für die Verwertung anderer Zucker, wie z. B. Galaktose und Sucrose, verantwortlich sind (Carlson, 1999). Chavez *et al.* (1997) zeigten zusätzlich, dass unter hohen Glucosekonzentrationen (> 1%) das *INV1*-Gen reprimiert wird, was darauf schließen lässt, dass das *INV1*-Gen in *C. utilis*, wie in *S. cerevisiae*, durch die Kohlenstoff-Katabolitrepression reguliert wird.

Des Weiteren wurde die Glykosylierung der Invertase überprüft. Die *C. utilis* Invertase-Sequenz besitzt 13 mögliche *N*-Glykosylierungsstellen (Chavez *et al.*, 1998). Eine diffuse Invertasebande wurde nach Wachstum in SMX-Medium in einem Immunoblot zwischen 95 und 140 kDa und bei 72 kDa detektiert (Abb. 3.5). Diese breite Verteilung der Bande lässt auf unterschiedliche Glykosylierungsstufen der sekretierten Invertase schließen. Es scheint so, dass womöglich nicht alle potentiell möglichen Asparagine *N*-glykosyliert sind, oder unterschiedlich große Zuckerketten angehängt wurden. Eine genaue Aussage über die Anzahl und Größe, sowie die Art der Zuckerstruktur der Invertase kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht getroffen werden.

Festgestellt wurde außerdem, dass die Invertase erst in der stationären Phase im Medium aufzufinden war (Abb. 3.5 B). Normalerweise wird die Invertase aber bei *S. cerevisiae* in das Periplasma sekretiert. Das Auffinden der Invertase im stationären Sekretom von *C. utilis* liegt womöglich daran, dass die Zellwand in der stationären Phase durchlässiger für periplasmatische Proteine wird und somit auch Invertase in das Medium gelangt.

4.2.1 Das *C. utilis*-Sekretom im Vergleich zu anderen Pilzen

Die Anzahl der sekretierten Proteine bei *C. utilis* (37) liegt in der Größenordnung der Sekretome von *K. lactis* (81) (Swaim *et al.*, 2008; Madinger *et al.*, 2009) und *P. pastoris* (20) (Mattanovich *et al.*, 2009). Diese Spannweite an sekretierten Proteinen lässt sich nur zum Teil dadurch erklären, dass unterschiedliche experimentelle Methoden bei der Identifizierung der Proteine benutzt wurden. Bei *P. pastoris* fand die Identifikation der Proteine massenspektrometrisch im Anschluss an eine SDS-PAGE statt (Mattanovich *et al.*, 2009), wodurch hoch-glykosylierte

Proteine oftmals nicht nachzuweisen sind. Bei *K. lactis* hingegen wurde ein sensitives 2D-LC Verfahren genutzt (Swaim *et al.*, 2008; Madinger *et al.*, 2009).

Unter den drei Pilzen wurde ein gemeinsames Kernsekretom von 10 Proteinen nach Wachstum in Glucose-haltigem Medium ermittelt (Abb. 4.1 A, Tabelle 9.2 Anhang). Acht dieser gemeinsamen Proteine bilden Glucanasen und Zellwandproteine wie z. B. Scw4, Scw11, Bgl2 und Exg2 oder die Isoform Exg1 (*K. lactis* und *P. pastoris*). Die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Tdh3 gehört ebenfalls zu diesem Kernsekretom, obwohl es als einziges Protein des Kernsekretoms keine Signalsequenz besitzt (Tabelle 9.2, Anhang). *C. utilis* und *P. pastoris* sekretieren zusätzlich zu diesen 10 Proteinen das O-mannosylierte Hitzeschock-Protein Hsp150, welches für die Stabilität der Zellwand benötigt wird und in *S. cerevisiae* unter oxidativem- und Hitze-Stress sekretiert wird (Tabelle 9.2, Anhang). *C. utilis* und *K. lactis* besitzen vier weitere gemeinsame extrazelluläre Proteine. Zu diesen gehören die Invertase Inv1, das Mucin Msb2, das Zellwandprotein Ecm33, sowie ein Mitglied der Proteinfamilie mit internen Wiederholungen (PIR) Pir1 (Tabelle 9.2, Anhang).

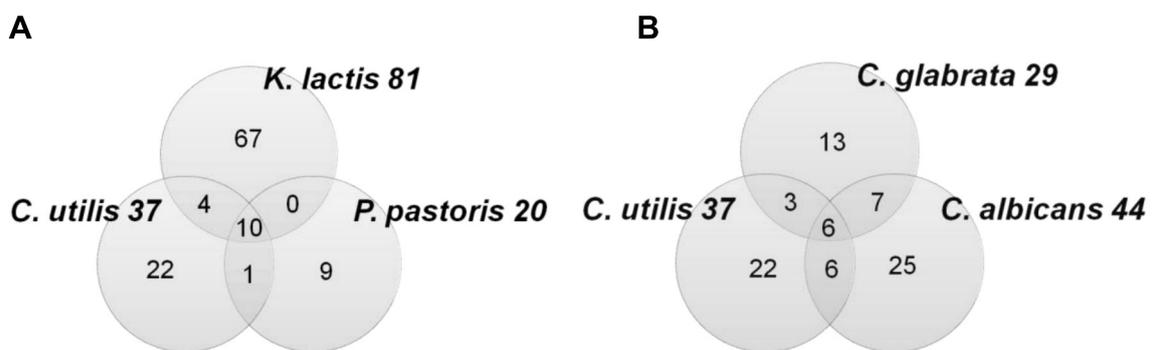


Abb. 4.1: Venndiagramm der Sekretome. (A) Kernsekretom der biotechnologisch relevanten Pilze *P. pastoris*, *K. lactis* und *C. utilis*. (B) Kernsekretom von *C. utilis* und der human-pathogenen Pilze *C. albicans* und *C. glabrata*.

Zusätzlich wurden die Sekretome der pathogenen Pilze *C. albicans* und *C. glabrata* mit dem von *C. utilis* verglichen (Abb. 4.1 B). Die Anzahl der sekretierten Proteine liegt dabei zwischen 29 (*C. glabrata*) und 44 (*C. albicans*). Diese drei Pilze besitzen ein gemeinsames Sekretom aus sechs Proteinen, Cts1 (Cht1 bei *C. albicans*), Crh1, Ecm33, Gas1 (Phr1 bei *C. albicans*), Exg2 (Xog1 bei *C. albicans*), Scw4 (Mp65 bei *C. albicans*) (Tabelle 9.3), wobei alle sechs Proteine in der Zellwanderhaltung und dem Zellwandaufbau beteiligt sind.

C. utilis und *C. albicans* sekretieren sechs weitere Proteine (Msb2, Bgl2, Tos1, Zps1 [Pra1 in *C. albicans*], Tdh3 und Plb3 [Plb4.5 in *C. albicans*]), die in einem Kernsekretom zusammengefasst wurden (Tabelle 9.3, Anhang). Im Unterschied zu *C. utilis* lassen sich im Medium von *C. albicans* "Secreted Aspartyl Proteasen" (SAPs) finden. Diese stehen ebenso in Verbindung mit der Pathogenität von *C. albicans* (Parra-Ortega *et al.*, 2009) wie auch Op4, welches im white/opaque Phänotypwechsel von *C. albicans* von Bedeutung ist und bei *C. albicans* im Sekretom auftritt (Soll *et al.*, 1994). Im Vergleich dazu besitzen *C. utilis* und

C. glabrata nur drei weitere gemeinsame Proteine. Hierzu gehören das "SUN"-Mitglied Uth1, das Thioredoxin Trx1, sowie Pry1 (Tabelle 9.3, Anhang).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *C. utilis* sein Sekretom sehr effizient reguliert. Dabei gehören Proteine die im Zellwandaufbau und der Zellwanderhaltung beteiligt sind zu der größten Gruppe identifizierter Proteine, unabhängig in welchem Medium oder Wachstumsphase sich *C. utilis* befindet. Im Vergleich zu anderen biotechnologisch wichtigen Pilzen besitzt *C. utilis* eine moderate Anzahl an sekretierten Proteinen, unter welchen sich keine Proteasen befinden. Die Expression des Invertase-Gens unterscheidet sich von der Expression des *INV1*-Gens in *S. cerevisiae* und der *C. utilis* *INV1*-Promotor, sowie die *INV1*-Signalsequenz sind womöglich für den Einsatz in heterologen Expressionssystemen geeignet.

4.3 Heterologe Proteinsekretion von *C. utilis*

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal rekombinante Proteine durch *C. utilis* sekretiert. Bisherige Studien befassten sich ausschließlich mit der intrazellulären Herstellung von (rekombinanten) Proteinen in *C. utilis* (Tabelle 1.1). An Hand der Genomdaten und Sekretomanalyse ist *C. utilis* jedoch ein vielversprechender Expressionswirt für die Proteinsekretion. Die Grundlage für die heterologe Genexpression und Proteinsekretion war die Konstruktion eines Expressionsplasmids. Dieses Expressionsplasmid besitzt eine *sat1*-vermittelnde Nourseothricin-Resistenz und kodierende Sequenzen aus dem human-pathogenen Pilz *C. albicans* (*CaARS2*; *CaACT1p*; *CaADH1t*; Abb. 3.7) (Kunigo, 2013). Es wurde gezeigt, dass diese *sat1*-Resistenzkassette sowohl in *C. utilis* als auch in *P. jadinii*, *C. albicans* und *S. cerevisiae* funktionsfähig ist (Kunigo, 2013).

Als Modellprotein für die Proteinsekretion diente in dieser Arbeit die *C. antarctica* Lipase B. Diese besitzt eine natürliche Sekretionssignalsequenz und eine potentielle *N*-Glykosylierungsstelle (Abb. 1.3). Für die Konstruktion des Expressionsplasmids wurden die 5'-Promotorbereiche der *PMA1*-, *PGK1*- und *TDH3*-Gene für die heterologe Genexpression ausgewählt. Dabei stellte sich heraus, dass die Sequenzen der *PGK1*- und *TDH3*-Promotoren effizienter als die des *PMA1*-Promotors waren (Abb. 3.10). Diese Beobachtungen werden durch frühere Arbeiten bestätigt, bei welchen der *TDH3*-Promotor ebenfalls als effizienter als der *PMA1*-Promotor beschrieben wurde (Kondo *et al.*, 1997).

4.3.1 Homologe und nicht-homologe Rekombination in *C. utilis*

Alle eingesetzten Plasmide in dieser Arbeit wurden vor der Transformation in *C. utilis* oder *P. jadinii* linearisiert, um eine chromosomale Integration der Plasmide zu ermöglichen. Die chromosomale Integration des Expressionsplasmids ist oftmals von

Vorteil, da episomale Plasmide nur in geringer Kopieanzahl vorliegen, mitotisch instabil sind und verloren gehen (Scheirlinck *et al.*, 1989). In *S. cerevisiae* geschieht die chromosomale Plasmidintegration durch homologe Rekombination, wobei die Plasmide in Bereiche integriert werden, die homolog zu den Enden des linearisierten Plasmids sind. Dabei können Einfach-, oder Mehrfach-Integrationen (Orr-Weaver und Szostak, 1983), z. B. durch die wiederholte Integration des Plasmids in demselben Allel, stattfinden.

Die Überprüfung der Plasmidintegration in den Transformanten mittels Southern-Blot-Analyse zeigte, dass eine chromosomale Integration der Plasmide bei *C. utilis* sehr effizient durchgeführt wurde (Abb. 3.11; Abb. 3.13; Abb. 3.19). Jedoch fand die Integration bei 16 CBCu1- und 16 CBCu9-Transformanten nicht wie gewünscht durch homologe Rekombination in der *TDH3*-Promotorregion bzw. dem *HIS3*-Locus statt, sondern durch nicht-homologe Rekombination ektopisch an anderer Stelle (Abb. 3.8, Abb. 3.13). Diese ektopische Integration war instabil, nur noch 20 % der CBCu1-Zellen bzw. 38 % der CBCu9-Zellen besaßen das Plasmid nach 50 Generationen in nicht-selektivem Medium (Abb. 3.12, Abb. 3.14). Anders verhielt es sich, wenn das Plasmid korrekt in den *TDH3*-Locus integriert wurde; dort war die Plasmidstabilität 4-mal höher (Abb. 3.38). Dieses wurde auch bei einer korrekten Plasmidintegration in den *HIS3*-Locus festgestellt (Kunigo, 2013). Eine Erklärung für den Verlust von Plasmiden ist, dass diese nicht nur durch homologe Rekombination in das Genom integriert werden, sondern durch denselben Vorgang wieder aus dem Genom entfernt werden können. Zusätzlich können mitotische "cross-over"-Vorgänge zwischen homologen Chromosomen für den Plasmidverlust verantwortlich sein. Dieses ist aber nur möglich, wenn das Plasmid nicht in alle Allele integriert wurde. Im Umkehrschluss können durch mitotische Rekombinationen aber auch Zellen entstehen, die das Plasmid in allen Allelen tragen und somit stabil sind. Ein Hinweis, dass dieses in *C. utilis* möglich ist, ergab sich aus der Stabilisierung von Nourseothricin-resistenten *C. utilis* CBCu8-Transformanten nach 100 Generationen (Abschnitt 3.3.4.3). Dabei wurde möglicherweise durch mitotische Rekombination die Plasmidsequenz in alle Allele des *TDH3*-Promotors integriert. Dieser Vorgang muss mit einer Southern-Analyse noch weiter bestätigt werden. Ebenso wurde nach mehrmaligen Inkubieren von *C. utilis*-Zellen ein Plasmid in alle Allele des *HIS3*-Locus integriert (Kunigo, 2013).

Ein Vergleich der Bandenmuster der Southern-Analysen zeigt, dass das Bandenmuster bei einer ektopischen Plasmidintegration in allen untersuchten Stämmen gleich ist (Abb. 3.11, Abb. 3.19, Abb. 3.22). So scheint es, zumindest für die *TDH3p*-Sequenzen, einen bevorzugten, aber unbekanntem genomischen Integrationsort zu geben. Beispielhaft sind in Abb. 4.2 die möglichen Bandenmuster nach Verdau der gDNA mit *KpnI* des *C. utilis* Wildtyps und von CBCu1 bei einer Integration von pCB1 in den *TDH3*-Locus dargestellt. Im Wildtyp erscheint eine 8,6 kb Bande (Wildtyp *TDH3p*) (Abb. 4.2 A). Bei einer einfachen Integration des Plasmids in eines der drei *TDH3*-Allele erhält man zusätzlich zu der Wildtyp-*TDH3p*-Bande zwei weitere Banden bei ca. 4,1 und 11,3 kb (Abb. 4.2 B). Dieses

Bandenmuster lässt sich jedoch nur an Hand der Bandenintensitäten von einer doppelten Integration in zwei der drei *TDH3*-Allele unterscheiden (Abb. 4.2 C). Falls eine wiederholte Integration des Plasmids in demselben *TDH3*-Allel stattfindet, entsteht folgendes Bandenmuster: 8,64 kb Wildtyp *TDH3p*, 4,1, 6,7 und 11,3 kb durch die plasmidale *TDH3p*-Sequenz (Abb. 4.2 D).

Es wurden jedoch nur bei Transformanten von CBCu3 und CBCu8 Bandenmuster, wie in Abb. 4.2 B oder C gezeigt, detektiert (CBCu3: Abb. 3.45; CBCu8: Abb. 3.37). Bei allen anderen *C. utilis*-Stämmen wurde in den Southern-Blot-Analysen zusätzlich zu der Wildtyp *TDH3p*-Bande eine Bande der *TDH3p*-Plasmidsequenz bei ca. 6,7 kb detektiert (Abb. 3.11; Abb. 3.25; Abb. 3.19; Abb. 3.22). Eine mögliche Erklärung für dieses Bandenmuster ist in Abb. 4.2 E dargestellt. In diesen Stämmen entspricht der *TDH3*-Locus dem Wildtyp. Möglicherweise hat an der unbekanntem Plasmidintegrationsstelle eine doppelte Plasmidintegration stattgefunden (Abb. 4.2 E, Mitte). Die zusätzliche *TDH3p*-Bande durch eine doppelte Plasmidintegration entspricht der 6,7 kb Bande, die auf den Southern-Blot-Analysen zu sehen ist (Abb. 3.11; Abb. 3.25; Abb. 3.19; Abb. 3.22). Dieses kann entweder in einem, in zwei oder allen drei dieser Allele aufgetreten sein. Je intensiver diese plasmidale *TDH3p*-6,7 kb-Bande im Vergleich zu der 8,6 kb-Wildtyp *TDH3p*-Bande ist, desto öfter wurde das Plasmid integriert. Eine 6,7 kb-Bande wäre ebenfalls vorhanden, wenn außerhalb der Plasmidsequenz, im entsprechenden Abstand, eine *KpnI*-Schnittstelle innerhalb des unbekanntem Locus vorhanden ist (Abb. 4.2 E, rechts).

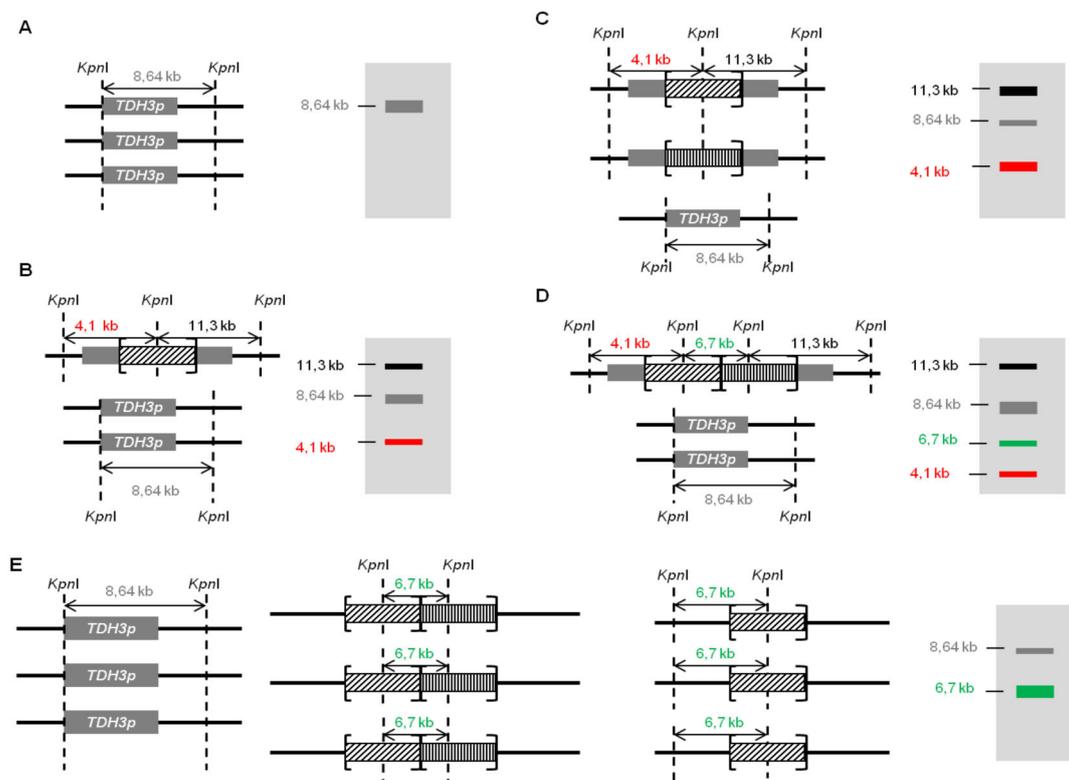


Abb. 4.2: mögliche Plasmidintegrationen bei *C. utilis*. (A) Der Wildtypzustand des *TDH3*-Locus in *C. utilis* DSMZ2361. Ein Verdau der gDNA mit *KpnI* führt zu einer singulären 8,6 kb *TDH3p*-Bande. (B)

Die einfache Integration von pCB1 in eines oder mehrere der *TDH3*-Allele ergibt Banden von 4,1 und 11,3 kb der plasmidalen *TDH3p*-Sequenz und einer 8,6 kb Wildtyp *TDH3p*-Bande. Wenn alle drei Allele besetzt sind, verschwindet die 8,6 kb Bande. **(C)** Doppelte Plasmidintegration in zwei der drei *TDH3*-Allele. Wenn die 8,6 kb-Wildtypbande nicht mehr vorhanden ist, sind alle drei *TDH3*-Allele besetzt. Das Bandenmuster verändert sich dabei nicht. **(D)** Doppelte Plasmidintegration in demselben *TDH3*-Allel. Wenn alle der drei *TDH3*-Allele besetzt sind, verschwindet auch hier die 8,6 kb große *TDH3p*-Wildtyp Bande und eine 6-fache Plasmidintegration liegt vor. **(E)** Der Wildtyp *TDH3*-Locus (links) und die möglichen Konformationen einer ektopischen Integration (mitte, rechts). Bei einer doppelten Plasmidintegration in einem Allel erscheint zusätzlich zu der Wildtyp-*TDH3p*-Bande eine 6,7 kb Bande auf dem Southern-Blot. Dabei verschwindet die *TDH3p*-Wildtyp Bande (8,6 kb) ebenfalls nicht, wenn alle drei der unbekanntenen Allele besetzt sind. Ebenso ist die einfache Integration des Plasmids möglich. Eine 6,7 kb Bande wäre auch zu detektieren, wenn außerhalb der Plasmidsequenz eine *KpnI*-Schnittstelle in dem entsprechenden Abstand vorliegt. Die Plasmidsequenzen sind durch schraffierte Rechtecke dargestellt.

4.3.2 Plasmidkopieanzahl

Da die Bestimmung der Plasmidkopieanzahl durch eine Southern-Blot-Analyse schwierig war, wurde in dieser Arbeit eine qPCR für die Bestimmung der Plasmidkopieanzahl durchgeführt. Eindeutige Vergleiche zwischen unterschiedlichen Expressionswirten, oder der Vergleich der Signalsequenzen können nur durch Sicherstellung der gleichen Plasmidkopieanzahl durchgeführt werden, denn die Anzahl der integrierten Plasmide hat einen großen Einfluss auf die Sekretionseffizienz und Produktausbeute (Norden *et al.*, 2011).

Bei dem Vergleich, welchen Einfluss die unterschiedlichen Signalsequenzen auf die CalB-Sekretion haben, wurde die M α 1-Prä-Pro-Sequenz als die effizienteste identifiziert (Abb. 3.20). In Stamm CBCu11 (*TDH3p-MF α 1-CALB^{HA}*) wurden 5 Plasmidkopien festgestellt, während bei CBCu1 (*TDH3p-CALB^{HA}*) und CBCu6 (*TDH3p-INV1-CALB^{HA}*) nur eine 4- bzw. 3-fache Integration festgestellt wurde. Somit kann bei diesen Stämmen kein genauer Einfluss der N-terminalen Signalsequenz auf die CalB Sekretion getroffen werden und die erhöhte CalB-Sekretion bei CBCu11 ist womöglich auf die höhere Plasmidkopieanzahl zurückzuführen. Bei *P. pastoris* wurde beschrieben, dass es eine optimale Plasmidkopieanzahl gibt und dass bei einer zu hohen bzw. zu geringen Plasmidkopieanzahl die Sekretion eines heterologen Proteins vermindert ist. Dabei wurde gezeigt, dass die verringerte Sekretion bei einer hohen Plasmidkopieanzahl auf Grund der Überlastung des ERs erfolgte (Liu *et al.*, 2013).

Ebenso verhält es sich bei dem Vergleich von *C. utilis* mit *P. jadinii*. Während bei dem *C. utilis* Stamm CBCu1 eine 4-fache Integration von pCB1 vorlag, wurde bei dem *P. jadinii* Stamm CBPj2 eine 2-fache Integration gezeigt. Erschwert wurde die Bestimmung der Plasmidkopieanzahl durch die Triploidie von *C. utilis* (Kunigo, 2013). Diese Triploidie bedeutet nicht, dass ein Gen (z. B. *TDH3*) dreimal im Genom vorkommt. Durch mitotische Rekombination kann es dadurch zu Deletionen und Verdoppelungen der Genkopieanzahl kommen.

4.3.3 Die Glykosylierung der heterologen Lipasen Uml2 und CalB

Obwohl die Plasmide in den Stämmen CBCu1, CBCu12 ektopisch integrierten, wurde die Sekretion der heterologen CalB und Uml2 bestätigt (Abb. 3.10; Abb. 3.25). Dabei wurde gleichzeitig eine Kernglykosylierung der sekretierten Lipasen festgestellt (Abb. 3.15; Abb. 3.25).

Die Glykosylierung von sekretorischen Proteinen ist eine der komplexesten und wichtigsten Proteinmodifikationen in Hefen. In Eukaryoten sind die ersten Schritte der *N*-Glykosylierung hoch konserviert. Die Kernstruktur der *N*-Glykosylierung ist in Abb. 1.1 dargestellt. Die *N*-Glycanstruktur des Proteins erhält im Golgi-Apparat eine α 1,6-Mannose durch Och1 (Nakayama *et al.*, 1992). Diese Mannose ist die Verzweigungsstelle der weiteren Kettenverlängerung (Nakayama *et al.*, 1992; Nakanishi-Shindo *et al.*, 1993). In *C. utilis* wurde keine solche Kettenverlängerung bei der Sekretion von CalB und Uml2 festgestellt. CalB und Uml2 besitzen bei *C. utilis* eine ca. 3-5 kDa größere Masse als angenommen (Abb. 3.15; Abb. 3.25). Die berechneten Größen der CalB^{HA} und Uml2^{HA}-Fusionsproteine betragen ca. 39 kDa. Die verringerte Masse der Lipasen von ca. 5 kDa nach der PNGase F-Behandlung (Abb. 3.15, Abb. 3.25) entspricht der Größe einer Kernglykosylstruktur. Diese limitierte *N*-Glykosylstruktur wurde schon bei der Uml2- (Abb. 3.25) und CalB-Sekretion in *P. pastoris* und bei CalB in *A. oryzae* (Rotticci-Mulder *et al.*, 2001; Eom *et al.*, 2013) gezeigt. Eine solche limitierte Glykosylierung von rekombinanten Proteinen ist oftmals erwünscht, da eine Glykosylierung immunogenisch wirken kann (Dasgupta *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2007; Luong *et al.*, 2007).

4.3.4 Limitierende Faktoren der Proteinsekretion in *C. utilis*

Bei der Sekretion der CalB wurde an Hand von differentiellen Zellfraktionierungen festgestellt, dass ein Großteil der CalB in der Zellwand und dem ER akkumuliert und nur ein relativ geringer Teil in das Kulturmedium abgegeben wird (Abb. 3.17).

Dieses kann daran liegen, dass es während der heterologen Proteinsekretion zu einer Überlastung des ERs kommt, weshalb das ER oftmals der Flaschenhals in der heterologen Proteinsekretion ist (Smith und Robinson, 2002). Dabei spielt vor allem die Proteinfaltung eine wichtige Rolle, da falsch gefaltete Proteine das ER nicht verlassen können und abgebaut werden. Zwei ER-lokalisierte Chaperone, Kar2 und die Protein Disulfidisomerase Pdi, besitzen dabei wichtige Funktionen (Hammond und Helenius, 1994; Laboissiere *et al.*, 1995). Eine Ko-Überexpression dieser Chaperone führt zu einer erhöhten Faltungskapazität im ER und kann somit zu einer erhöhten Sekretion des gewünschten Proteins führen. In früheren Studien wurde gezeigt, dass eine Ko-Überexpression von Kar2 zu einer verbesserten Sekretion eines "single chain"-Antikörperfragments und des bovinen Prochymosin führt (Harmsen *et al.*, 1996; Shusta *et al.*, 1998). Auch die Ko-Überexpression der

Pdi führte zu einer verbesserten Sekretion eines potentiellen Vakzins, einer sauren Phosphatase und eines "single chain"-Antikörperfragments (Robinson *et al.*, 1994; Inan *et al.*, 2006; Damasceno *et al.*, 2007). Jedoch wurde vor kurzem gezeigt, dass eine Überexpression des Kar2-Chaperons bei *P. pastoris* keinen positiven Effekt auf die CalB-Sekretion hat (Samuel *et al.*, 2013). Das gleiche gilt für die Überexpression dieser Chaperone in filamentösen Pilzen. Dort erhöhte sich die Sekretion heterologer Proteine in einigen Fällen, in anderen Fällen nicht (Conesa *et al.*, 2001). Daher lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob eine Überexpression dieser Chaperone in *C. utilis* zu einer verbesserten CalB-Sekretion führt.

Darüber hinaus scheint das ER in diesem Zusammenhang bei *C. utilis* weniger die Sekretionsleistung in *C. utilis* zu behindern, da die detektierten Zell-assoziierten CalB-Signale in den Stämmen CBCu1 und CBCu6 alle die glykosylierte Form aufweisen (Abb. 3.17). Demzufolge muss das Protein im ER bereits glykosyliert worden sein und den Golgi-Apparat erreicht haben. Bei Stamm CBCu11 (M α 1-CalB) hingegen wurde zusätzlich eine Bande bei ca. 70 kDa detektiert (Abb. 3.20). Dieses entspricht der Masse des unprozessierten M α 1-CalB-Fusionsproteins (ca. 70 kDa). Das 86 Aminosäuren-lange M α 1-Prä-Pro-Peptid hat eine berechnete Masse von 9 kDa und enthält drei *N*-Glykosylierungsstellen, die zusammen eine Masse von ca. 9-15 kDa haben. Zusammen mit der *N*-glykosylierten CalB besitzt das unprozessierte M α 1-CalB-Fusionsproteineine eine Masse von ca. 70 kDa. Das glykosylierte M α 1-Peptid wird erst im Golgi-Apparat durch die Serinprotease Kex2 von der CalB-Sequenz abgetrennt, wodurch das reife CalB eine Größe von ca. 45 kDa nach der Prozessierung im Golgi-Apparat zeigt. Dieses lässt darauf schließen, dass ein Teil des M α 1-CalB-Fusionsproteins im ER assoziiert ist und noch nicht im Golgi-Apparat prozessiert wurde (Abb. 4.3). Durch eine Ko-Überexpression von Chaperonen wie z. B. Kar2 kann womöglich die Faltung/Prozessierung des M α 1-CalB-Fusionsproteins im ER verbessert werden.

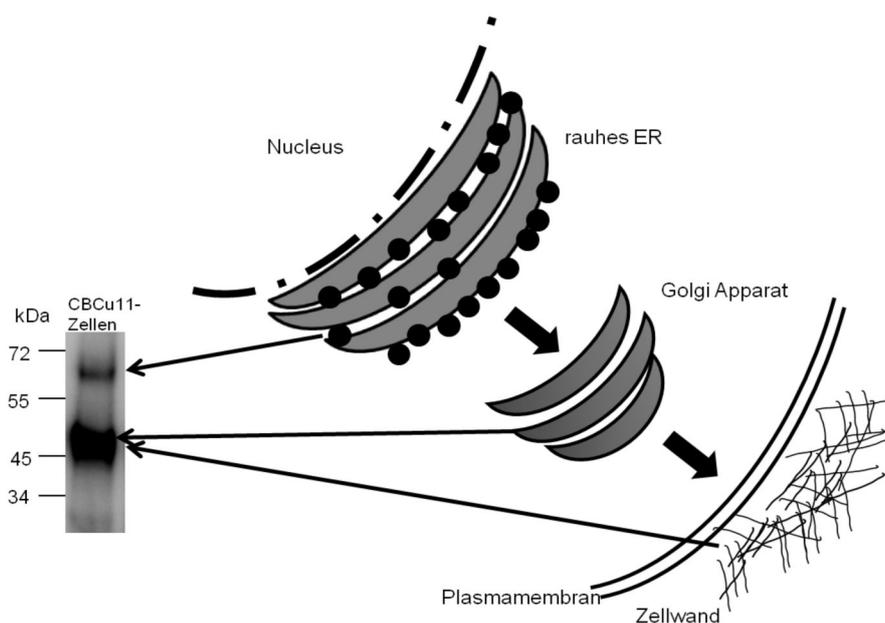


Abb. 4.3: Prozessierung des Mfa1-CalB-Fusionsproteins auf dem Sekretionsweg. Das Fusionsprotein aus dem Mfa1-Prä-Pro-Peptid und der CalB wird im ER glykosyliert, gleichzeitig wird die Prä-Sequenz des Mfa1 durch eine Signalpeptidase entfernt, das Fusionsprotein besitzt dann eine Masse von ca. 70 kDa. Im Golgi-Apparat wird die glykosylierte Pro-Sequenz des Mfa1 durch die Protease Kex2 entfernt, die Masse des Mfa1-CalB-Fusions-Proteins reduziert sich auf ca. 45 kDa. Diese Masse behält es während dem Weg aus der Zelle bei (reifes CalB ca. 45 kDa).

In Abbildung 3.17 ist zu sehen, dass das stärkste CalB-Signal nach der Zellfraktionierung von CBCu1 in der Zellwandfraktion (P1) vorhanden war. Es scheint, dass die Zellwand von *C. utilis* das größte Hindernis für die Sekretion von CalB darstellt und womöglich die Durchlässigkeit der Zellwand eine Rolle spielt. De Nobel und Mitarbeiter beschrieben, dass die Mannoproteinschicht der Zellwand und deren Glykosylierung maßgeblich an der Durchlässigkeit der Zellwand beteiligt sind (de Nobel *et al.*, 1990). Die Zellwand fungiert dabei aber nicht wie ein Sieb, in welchem große Moleküle hängen bleiben und kleinere die Zellwand passieren können. Ein 400 kDa schweres, glykosyliertes Hüllprotein des Epstein-Barr-Virus wurde bei *S. cerevisiae* besser sekretiert als kleinere und weniger glykosylierte Fragmente (Schultz *et al.*, 1987). In verschiedenen Arbeiten wurde des Weiteren gezeigt, dass eine Deletion der GPI-verankerten β 1,3-Glucanosyltransglycosylase (Gas1), welche für die Verknüpfung der β 1,3-Glucane verantwortlich ist, die Durchlässigkeit der Zellwand und somit die Sekretionsleistung der Zelle erhöht (Vai *et al.*, 2000; Marx *et al.*, 2006). Ebenso können Reduktionsmittel Disulfidbrückenbindungen der Zellwand aufbrechen und somit die Porosität der Zellwand erhöhen (de Nobel, 1989). Rossini *et al.* (1993) zeigten, dass die Sekretion einer β -Galaktosidase bei *S. cerevisiae* nach Zugabe von β -Mercaptoethanol gesteigert wurde. Demzufolge muss bei *C. utilis* untersucht werden, ob eine Deletion des *GAS1*-Gens und/ oder der Zusatz von Reduktionsmitteln in das Medium zu einer erhöhten CalB-Sekretion führt. Dafür, dass die Zellwanddurchlässigkeit ein Problem bei der Sekretion in *C. utilis* darstellt, spricht auch, dass CalB erst in der stationären Phase, wenn die Zellwand durch den Einfluss von Stress poröser wird, in das Medium gelangt (Abb. 3.20). Gleiches wurde bei der Sekretion der Invertase beobachtet; auch hier war erst in der stationären Phase ein Großteil des Proteins im Sekretom sichtbar (Abb. 3.5). Daher kann vermutet werden, dass CalB, wie die Invertase, im Periplasma verbleibt bzw. Membran-assoziiert ist.

Auffällig bei der Sekretion mit unterschiedlichen Signalsequenzen war, dass die CalB mit der *C. utilis* endogenen Inv1-Prä- und der natürlichen CalB-Prä-Pro-Sequenz nicht so effizient in das Medium abgegeben wird wie die Fusion mit dem Mfa1-Prä-Pro-Peptid. Die Menge der Zell-assoziierten CalB nimmt bei CBCu1 (CalB^{HA}) und CBCu6 (Inv1-CalB^{HA}) während der Inkubation zu, bei CBCu11 (Mfa1-CalB^{HA}) dagegen ab (Abb. 3.20). Somit scheint eine Anhäufung der CalB in der Zelle bei CBCu1 und CBCu6 der Fall zu sein, während bei CBCu11 durch die Mfa1-Prä-Pro-Sequenz CalB effizienter sekretiert wird.

Daher bleibt vorerst festzuhalten, dass die Mfa1-Prä-Pro-Sequenz auch in *C. utilis* eine vielversprechende Sekretionssequenz darstellt. Dieses wurde auch durch die

Sekretion einer Xylanase mit der Mf α 1-Prä-Pro-Sequenz bei *C. utilis* (Kunigo, 2013) und bei *S. cerevisiae* und *P. pastoris* (Brocca *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2010) bestätigt. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Ergebnisse früherer Arbeiten nur Hinweise für eine Verbesserung der Sekretion liefern, jedoch muss die optimale Kombination aus Promotor, Prä-Pro-Sequenz und heterologem Protein, sowie Überexpression von Chaperonen für jedes System und heterologe Protein einzeln geprüft werden.

4.3.5 CalB-Sekretion bei *C. utilis*, *P. pastoris* und *P. jadinii*

Für einen Vergleich der Sekretionsleistungen zwischen *C. utilis* und *P. pastoris* wurde ein CalB^{His}-Fusionsprotein aus dem Kulturmedium beider Pilze aufgereinigt. Interessanterweise wurden dabei vergleichbare Mengen an aktiver CalB aus dem Medium beider Pilze gewonnen (Tabelle 3.2). Diese Ausbeute aus *C. utilis* ist erstaunlich, da dieses die ersten Sekretionsversuche mit diesem System waren und keine Optimierungen daran vorgenommen wurden. Die relativ hohe Ausbeute an CalB kann auch daran liegen, dass *C. utilis* wenige eigene Proteine und keine Proteasen sekretiert (Tabelle 9.1). Trotzdem muss angemerkt werden, dass für die CalB-Sekretion bei *P. pastoris* keine Kodon-optimierte CALB-Sequenz benutzt wurde, sondern die Kodon-optimierte Sequenz für *P. jadinii*. CalB-Ausbeuten bei *P. pastoris* können bei Benutzung der CalB eigenen Prä-Pro Sequenz bis zu 44 mg/l Medium erreichen (Larsen *et al.*, 2008) und die Ausbeute lässt sich mit Hilfe des Mf α 1-Prä-Pro-Peptids auf 1,2 g/l bei *P. pastoris* erhöhen (Eom *et al.*, 2013).

Ein Vergleich der Sekretionsleistungen zwischen *C. utilis* und *P. jadinii* verdeutlichte, dass *P. jadinii* CalB effizienter sekretiert als *C. utilis* (Abb. 3.45). Allerdings kann keine spezifische Aussage über die Proteinausbeute getroffen werden, da die Vergleiche nur semiquantitativ durch einen Immunoblot und Tributyrin-Agarplatten durchgeführt wurden. Ein Vergleich der Plasmidkopieanzahl beider Stämme zeigte außerdem, dass bei *P. jadinii* CBPj2 das Plasmid pCB1 zweimal chromosomal integriert wurde, bei *C. utilis* CBCu1 dagegen viermal (Tabelle 3.3). Demzufolge könnte bei einer gleichen Anzahl an Plasmidkopien *P. jadinii* noch höhere CalB-Ausbeuten erzielen. Zusätzlich wurde durch einen Immunoblot gezeigt, dass im Vergleich zu *C. utilis* bei *P. jadinii* weniger Zell-assoziierte CalB vorliegt (Abb. 3.45), was die Vermutung zulässt, dass der Sekretionsmechanismus, bzw. die Zellwand-Durchlässigkeit bei *P. jadinii* besser ist als bei *C. utilis*.

4.4 Oberflächenpräsentation von Gas1-Fusionsproteinen bei *C. utilis*

Erstmalig wurde in dieser Arbeit die Oberflächenpräsentation von Proteinen in *C. utilis* gezeigt. Die heterologe Lipase CalB wurde mit Hilfe der N- und C-terminalen Sekretions- bzw. GPI-Signalsequenzen von CuGas1 an die Zelloberfläche von

C. utilis geknüpft. Die Zellwand-Lokalisation der CalB wurde durch Immunofluoreszenz (Abb. 3.31) und differentielle Zentrifugation (Abb. 3.30) bestätigt. Dabei wurde festgestellt, dass womöglich nur eine geringe Menge CalB an das β 1,6-Glucan der Zelle geknüpft wurde und ein Teil des CalB-GPI-Proteins sich möglicherweise noch im Periplasma auf dem Weg von der Plasmamembran zur Zellwand befindet.

GPI-Proteine können einerseits in der Plasmamembran verankert sein oder an die Zellwand von Hefen geknüpft werden. Beide Proteintypen erhalten im ER an der ω -Verknüpfungsstelle einen GPI-Anker und werden durch den Phosphatidylinositolrest des GPI-Ankers zuerst in die Cytoplasmamembran eingebaut. Von dort können sie durch eine Transglykolyse eines Mannoserestes des GPI-Ankers an das β 1,6-Glucan der Zellwand geknüpft werden (Lu *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1999). Es ist bekannt, dass die stromaufwärts der ω -Region liegenden Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Translokation von Zellwand GPI-Proteinen spielen (Hamada *et al.*, 1998). Plasmamembran-GPI-Proteine besitzen ein dibasisches Motiv an der ω -1 und ω -2 Stelle, wohingegen Zellwand-GPI-Proteine kein solches Motiv besitzen (Caro *et al.*, 1997). Ebenso wurde gezeigt, dass die ω -4 und ω -5 Aminosäuren wichtig für die Lokalisation sind. Dort sitzen bei GPI-Zellwandproteinen häufig Valin- oder Isoleucin-Reste und an der ω -2-Stelle Valin oder Tyrosin (Hamada *et al.*, 1998). Der Austausch dieser ω -1-5-Region eines GPI-Plasmaproteins gegen die ω -1-5-Region eines GPI-Zellwandproteins führte zur Lokalisation dieses Plasmaproteins in die Zellwand (Hamada *et al.*, 1998; Terashima *et al.*, 2003). Eine Analyse der CuGas1 ω -Region zeigt, dass diese Region zum Teil der eines Plasmamembran-GPI-Proteins entspricht (Abb. 4.4). An der ω -2-Stelle befindet sich ein Lysin (basisch) aber weder an der ω -2, -4 oder -5-Stelle befinden sich die typischen Aminosäurereste (Valin, Isoleucin oder Tyrosin) für ein GPI-Zellwandprotein. Daher ist es möglich, dass die Fusion eines Proteins an die CuGas1-GPI-Signalsequenz nur zu einer teilweisen Lokalisation in die Zellwand führt und ein Teil in der Plasmamembran bleibt. Dafür spricht auch, dass Gas1 bei *S. cerevisiae* in der Plasmamembran und der Zellwand lokalisiert ist (Nuoffer *et al.*, 1991; De Sampaio *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 2005).

Zusätzlich wurde aber gezeigt, dass ein Serin/Threonin-reicher C-Terminus das dibasische Motiv eines Plasmamembran-GPI-Proteins überlagert und es in die Zellwand eingebaut wird (Frieman und Cormack, 2004). Der Bereich des Gas1-CalB-Fusionsproteins zwischen der carboxyterminalen Aminosäure der CalB (A395) und der des ω -Serin (S417) ist sehr Serin/Threonin-reich (38 %) (Abb. 4.4). Diese Beobachtungen könnten zeigen, dass das Fusionsprotein trotzdem in die Zellwand eingebaut wird. Demzufolge hat nicht nur die die ω -Region einen Einfluss bei der Lokalisation von GPI-Proteinen, sondern mehrere Faktoren tragen dazu bei. Eine effizientere Zellwandlokalisierung der Gas1-GPI-Fusionsproteine in *C. utilis* kann womöglich durch die Optimierung der ω -Region erreicht werden. Dieses muss aber für *C. utilis* noch überprüft werden.

GRAS-Zertifizierung, z. B. bei *C. utilis*, eine Immunantwort gegen den Hefeorganismus moduliert werden. Solche Hefesysteme wurden bereits erfolgreich für die Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort eingesetzt (Schreuder *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010; Wasilenko *et al.*, 2010). In dieser Arbeit sollten allerdings keine MOG-Antikörper gebildet werden, sondern eine korrespondierende Immunantwort durch die Ausbildung einer oralen Toleranz ausgelöst werden. Als Modellprotein wurde das MOG₃₅₋₅₅-Peptid ausgewählt, da bei der EAE in Mäusen Auto-Antikörper gegen dieses Peptid gebildet werden.

In *C. utilis* führte die Fusion des MOG₃₅₋₅₅-Peptids an die Gas1-GPI-Signalsequenz zu einer Oberflächen-Lokalisation des Proteins (Abb. 3.35; Abb. 3.36). Diese Zellen wurden für *in-vivo* Vorversuche benutzt um die Kolonisierung von *C. utilis* im Intestinal-Trakt von Mäusen zu untersuchen. Dabei wurde festgestellt, dass nach oraler Gabe die MOG-präsentierenden *C. utilis*-Zellen in den Fäkalpellets der Mäuse vorhanden waren, aber den Intestinaltrakt nicht dauerhaft besiedeln können (Abb. 3.39; Abb. 3.40). Das Auffinden von *C. utilis*-Zellen in den Fäkalpellets ist dabei abhängig von der gefütterten Zellzahl. Es wurden mindestens 1×10^8 *C. utilis*-Zellen benötigt um ein Auffinden in den Fäkalpellets zu gewährleisten. In Studien mit dem human-pathogenen Pilz *C. albicans* wurde gezeigt, dass bereits eine Fütterung von 1×10^5 Zellen genügt, um eine dauerhafte Kolonisierung von *C. albicans* im Magen-Darm-Trakt herbeizuführen (Chen *et al.*, 2011). Histologische Untersuchungen verschiedener Darmstücke zeigten, dass lediglich im Caecum der Mäuse, welcher der bevorzugte Besiedelungsort von *C. albicans* ist (Wiesner *et al.*, 2001), *C. utilis*-Zellen aufzufinden waren.

Die Induktion der oralen MOG₃₅₋₅₅-Toleranz wurde in Mäusen durch eine 10-tägige präventive Fütterung von MOG-präsentierenden *C. utilis*-Zellen erzielt (Abb. 3.42). Dabei wurde der Ausbruch einer durch MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE unterdrückt. In einer Kontrollgruppe (Zugabe des *C. utilis* Wildtyps) hingegen, wurde ein normaler Krankheitsverlauf beobachtet. Demzufolge genügt es, wenn diese MOG-präsentierenden *C. utilis*-Zellen den Magen-Darm-Trakt in geeigneter Menge und Zeit passieren und das Immunsystem des Organismus Zeit bekommt, das MOG-Antigen zu erkennen und eine Toleranz auszubilden. Die *C. utilis*-Zellen müssen nicht dauerhaft im Intestinaltrakt vorhanden sein. Dieser kurzzeitige Verbleib der Zellen stellt möglicherweise sogar einen Vorteil dar, da das MOG-Antigen so nur in geringer Dosis und Zeit dem Immunsystem präsentiert wird und dadurch die orale Toleranz ausgebildet wird und keine MOG-Antikörper gebildet werden. In anderen Arbeiten wurde eine orale Toleranz nur bei einer Zugabe des reinen MOG₃₅₋₅₅-Peptids erreicht (Peron *et al.*, 2010). Zusätzlich wurde beschrieben, dass die orale MOG₃₅₋₅₅-Zugabe die Sekretion von Interleukin-17 in die Peripherie und die Zahl der Th17-Zellen reduziert (Peron *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit wurde damit erstmals gezeigt, dass die orale Zugabe von lebenden, MOG-präsentierenden *C. utilis*-Zellen eine orale Toleranz in Mäusen induziert und den Ausbruch der EAE verhindert. Um zu prüfen, welche genauen Immunologischen Vorgänge bei dieser oralen Toleranz ablaufen, müssen weitere Untersuchungen unternommen werden.

5 Zusammenfassung

Die Futterhefe *Candida utilis* verwertet ein breites Substratspektrum und wächst auch mit Xylose als Kohlenstoffquelle zu hohen Zelldichten. Der bisherige biotechnologische Einsatz von *C. utilis* beschränkte sich auf die intrazelluläre Herstellung von endo- und exogenen Produkten. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Sekretionssystems für heterologe Proteine in *C. utilis*, wodurch sowohl eine effektive Sekretion in das Kulturmedium, als auch in die Pilzzellwand in Form einer Oberflächenpräsentation erreicht werden sollte.

Die massenspektrometrische Analyse des natürlichen Sekretoms von *C. utilis* zeigte die ausgeprägte Sekretionsfähigkeit dieser Hefe. Im Kulturmedium wurden 37 Proteine identifiziert, von denen *N*-glykosylierte Invertase eines der Hauptproteine war. Weiterhin stellt die Abwesenheit von Proteasen im Sekretom eine günstige Voraussetzung für die Verwendung von *C. utilis* als Sekretionswirt dar.

Zur Etablierung und Optimierung der heterologen Proteinsekretion wurde die Lipase CalB aus *Candida antarctica* als Modellprotein eingesetzt. Verschiedene Expressionsvektoren für *CALB* wurden konstruiert und durch integrative Transformation in das *C. utilis*-Genom inseriert. Unter Kontrolle von *C. utilis*-Promotoren wurde die *CALB*-Expression und eine effektive Sekretion von *N*-glykosylierter, enzymatisch aktiver CalB in das Kulturmedium erreicht. Optimierungsversuche ergaben, dass der Promotor des glykolytischen *TDH3*-Gens am effizientesten für die Sekretion der CalB ist. Sekretionsvergleiche von CalB-Varianten, in denen die heterologe CalB-Signalsequenz gegen die heterologe Signalsequenz des Mf α 1-Vorläuferproteins aus *Saccharomyces cerevisiae* oder die homologe Signalsequenz der *C. utilis*-Invertase ausgetauscht worden waren, zeigten überraschend die höchsten Sekretionswerte für die Mf α 1-CalB Fusion. Die Ergebnisse beweisen die Eignung von *C. utilis* als Sekretionswirt, zeigen aber auch weitere Verbesserungsmöglichkeiten zur Erhöhung der homologen Integration und Stabilität der Expressionsplasmide auf.

Um die Oberflächenpräsentation eines heterologen Proteins bei *C. utilis* zu zeigen, wurden Expressionsvektoren konstruiert, die für die Fusion des *C. utilis* Gas1-Zellwandproteins an CalB oder β -Galaktosidase kodieren. In Transformanten waren beide Enzyme in aktiver Form an die Zelloberfläche gebunden. In einem weiteren Versuchsansatz wurde ein antigenes Epitop in Form einer Gas1-Fusion auf der *C. utilis*-Zelloberfläche präsentiert. Durch Fütterung mit Antigen-präsentierenden *C. utilis*-Zellen wurde in einem Mausmodell eine korrespondierende Immunantwort ausgelöst. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass in Zukunft lebende *C. utilis*-Zellen als essbare Vakzine oder zur Modulation der Immunantwort eingesetzt werden können.

6 Summary

The fodder yeast *Candida utilis* is able to use broad spectrum of substrates and also grows to high cell densities using xylose as the single carbon source. Previously, the biotechnological use of *C. utilis* was limited to the intracellular production of endo- and exogenous products. The aim of this thesis was to establish a secretion system for heterologous proteins in *C. utilis* attempting to achieve efficient secretion into the culture medium and into the fungal cell wall leading to a surface display.

Mass spectrometric analysis of the natural secretome of *C. utilis* demonstrated the high secretion potential of this yeast. In the culture medium 37 proteins were identified, among which *N*-glycosylated Invertase was one of the most abundant proteins. In addition, absence of proteases in the secretome is advantageous for the use of *C. utilis* as a secretion host.

To establish and optimize heterologous protein secretion the lipase CalB of *Candida antarctica* was used as a model enzyme. Different expression vectors for *CALB* were constructed and inserted into the *C. utilis* genome by integrative transformation. Under control of *C. utilis* promoters, *CALB* expression and effective secretion of *N*-glycosylated and enzymatically active CalB into the culture medium was achieved. Optimization experiments showed that the promoter of the glycolytic *TDH3*-gene is the most efficient promoter for secretion of CalB. Secretion comparisons of CalB variants, in which the heterologous CalB signal sequence was replaced by the heterologous signal sequence of the Mfa1-precursor protein of *Saccharomyces cerevisiae* or the homologous signal sequence of the *C. utilis* invertase, surprisingly revealed highest secretion levels for the Mfa1-CalB fusion. These results prove the suitability of *C. utilis* as an expression host, but also suggest further improvements to increase the homologous integration and stability of the expression plasmids.

To present heterologous proteins on the cell surface of *C. utilis*, expression vectors were constructed, which encode for the fusion of the *C. utilis* Gas1 cell wall protein to CalB or β -galactosidase. In transformants both enzymes were bound to the fungal cell surface in an active form. In another approach an antigenic epitope was linked to the cell surface of *C. utilis* using a fusion to Gas1. Feeding with antigen-presenting *C. utilis* cells led to a corresponding immune response in a mouse model. This result suggests that live *C. utilis* cells may be used in the future as an oral vaccine or to modulate immune responses.

7 Literatur

Aebi M (2013) N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 2430–2437.

Adachi T, Ito J, Kawata K, *et al.* (2008) Construction of an *Aspergillus oryzae* cell-surface display system using a putative GPI-anchored protein. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 711–719.

Alsina A, Mason M, Uphoff RA, Riggsby WS, Becker JM und Murphy D (1988) Catheter-associated *Candida utilis* fungemia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: species verification with a molecular probe. *J Clin Microbiol* **26**: 621–624.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW und Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.

Amor S, Groome N, Linington C, Morris MM, Dornmair K, Gardinier MV, Matthieu JM und Baker D (1994) Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol* **153**: 4349–4356.

Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM und Kaplan J (1994) The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**: 403–410.

Belcarz A, Ginalska G, Lobarzewski J und Penel C (2002) The novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). *Biochim Biophys Acta* **1594**: 40–53.

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G und Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783–795.

Benson JM und Whitacre CC (1997) The role of clonal deletion and anergy in oral tolerance. *Res Immunol* **148**: 533–541.

Bekatorou A, Psarianos C und Koutinas AA (2006) Production of food grade yeasts. *Food Technol Biotechnol* **44**:407–415.

Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, Dilitz E, Deisenhammer F und Reindl M (2003) Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* **349**: 139–145.

Bermejo C, Rodriguez E, Garcia R, *et al.* (2008) The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* **19**: 1113–1124.

Blank K, Morfill J, Gump H und Gaub HE (2006) Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **125**: 474–483.

Boze H, Moulin G und Galzy P (1992) Production of food and fodder yeasts. *Crit Rev Biotechnol* **12**: 65-86.

Brachmann A, Weinzierl G, Kamper J und Kahmann R (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**: 1047-1063.

Brinkrolf K, Bürth C, Kunigo M, Schneider J, Goesmann A, Jaeger KE, Jaenicke S, Rupp O, Pühler A und Ernst JF (2013) The genome sequence of *Pichia jadinii*. *In Vorbereitung*.

Brocca S, Schmidt-Dannert C, Lotti M, Alberghina L und Schmid RD (1998) Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa lip1* gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci* **7**: 1415-1422.

Brodsky JL (1998) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Int Rev Cytol* **178**: 277-328.

Bruinenberg PM, van Dijken JP und Scheffers WA (1983) An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *J Gen Microbiol* **129**: 965-971.

Cabib E, Blanco N, Grau C, Rodriguez-Pena JM und Arroyo J (2007) Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **63**: 921-935.

Caramelo JJ und Parodi AJ (2008) Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles. *J Biol Chem* **283**: 10221-10225.

Caras IW, Weddell GN, Davitz MA, Nussenzweig V und Martin DW, Jr. (1987) Signal for attachment of a phospholipid membrane anchor in decay accelerating factor. *Science* **238**: 1280-1283.

Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**: 202-207.

Caro LH, Tettelin H, Vossen JH, Ram AF, van den Ende H und Klis FM (1997) In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1477-1489.

Chang SW, Lee GC und Shaw JF (2006) Codon optimization of *Candida rugosa lip1* gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J Agric Food Chem* **54**:815-22.

Chakravorty M, Veiga LA, Bacila M und Horecker BL (1962) Pentose metabolism in *Candida*. II. The diphosphopyridine nucleotide-specific polyol dehydrogenase of *Candida utilis*. *J Biol Chem* **237**: 1014-1020.

Chavez FP, Pons T, Delgado JM und Rodriguez L (1998) Cloning and sequence analysis of the gene encoding invertase (*INV1*) from the yeast *Candida utilis*. *Yeast* **14**: 1223-1232.

Chavez FP, Rodriguez L, Diaz J, Delgado JM und Cremata JA (1997) Purification and characterization of an invertase from *Candida utilis*: comparison with natural and recombinant yeast invertases. *J Biotechnol* **53**: 67-74.

- Chen C, Pande K, French SD, Tuch BB und Noble SM (2011) An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis. *Cell Host Microbe* **10**: 118-135.
- Coghlan A und Wolfe KH (2000) Relationship of codon bias to mRNA concentration and protein length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 1131-1145.
- Conesa A, Punt PJ, van Luijk N und van den Hondel CA (2001) The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet Biol* **33**: 155-171.
- Couderc R und Baratti J (1980) Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agric Biol Chem* **44**: 2279–2289.
- Craven RA, Egerton M und Stirling CJ (1996) A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *EMBO J* **15**: 2640-2650.
- Cregg JM, Vedvick TS und Raschke WC (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)* **11**: 905-910.
- Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP und Stillman CA (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* **9**: 1316-1323.
- Cullen PJ, Sabbagh W, Jr., Graham E, Irick MM, van Olden EK, Neal C, Delrow J, Bardwell L und Sprague GF, Jr. (2004) A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev* **18**: 1695-1708.
- Cunha AF, Missawa SK, Gomes LH, Reis SF und Pereira GA (2006) Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. *FEMS Yeast Res* **6**: 280-287.
- Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, Cregg JM, Old LJ und Batt CA (2007) Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**: 381-389.
- Dasgupta S, Navarrete AM, Bayry J, *et al.* (2007) A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8965-8970.
- Demirci A, Pongtharangkul T und Pometto AL (2007) Applications of biofilm reactors for production of value-added products by microbial fermentation. Blaschek HP, Wang HH, Agle ME. *Biofilms in the Food Environment*. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, 167–189.
- de Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, de Jong L, Hellingwerf KJ, de Koster C und Klis FM (2004) Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell* **3**: 955-965.
- de Nobel JG, Klis FM, Priem J, Munnik T und van den Ende H (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**: 491-499.

- De Sampaio G, Bourdineaud JP und Lauquin GJ (1999) A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Mol Microbiol* **34**: 247-256.
- Deeg MA, Humphrey DR, Yang SH, Ferguson TR, Reinhold VN und Rosenberry TL (1992) Glycan components in the glycoinositol phospholipid anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Novel fragments produced by trifluoroacetic acid. *J Biol Chem* **267**: 18573-18580.
- Delic M, Valli M, Graf AB, Pfeffer M, Mattanovich D und Gasser B (2013) The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 872-914.
- Demain AL und Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* **27**: 297-306.
- Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M und Eisenhaber F (2004) A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* **337**: 243-253.
- Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM und Gingeras TR (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* **5**: 1111-1121.
- Emond S, Montanier C, Nicaud JM, Marty A, Monsan P, Andre I und Remaud-Simeon M (2010) New efficient recombinant expression system to engineer *Candida antarctica* lipase B. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2684-2687.
- Enjalbert B, Nantel A und Whiteway M (2003) Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol Biol Cell* **14**: 1460-1467.
- Eom GT, Lee SH, Song BK, Chung KW, Kim YW und Song JK (2013) High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* **116**: 165-170.
- Ernst JF (1986) Improved secretion of heterologous proteins by *Saccharomyces cerevisiae*: effects of promoter substitution in alpha-factor fusions. *DNA* **5**: 483-491.
- Ernst JF (1988a) Codon usage and gene expression. *Trends Biotechnol* **6**: 196-199.
- Ernst JF und Kawashima E (1988b) Variations in codon usage are not correlated with heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *E. coli*. *J Biotechnol* **7**: 1-10.
- Faria AM und Weiner HL (1999) Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol* **73**: 153-264.
- Ferrer-Miralles N, Domingo-Espin J, Corchero JL, Vazquez E und Villaverde A (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact* **8**: 17.
- Fleissner A und Dersch P (2010) Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 1255-1270.

- Freudl R (2013) Leaving home ain't easy: protein export systems in Gram-positive bacteria. *Res Microbiol* **164**: 664-674.
- Frieman MB und Cormack BP (2004) Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **150**: 3105-3114.
- Fujihashi K, Dohi T, Rennert PD, Yamamoto M, Koga T, Kiyono H und McGhee JR (2001) Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3310-3315.
- Fujii T, Shimoi H und Imura Y (1999) Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1427**: 133-144.
- Fuller RS, Brake A und Thorner J (1989a) Yeast prohormone processing enzyme (*KEX2* gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 1434-1438.
- Fuller RS, Brake AJ und Thorner J (1989b) Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* **246**: 482-486.
- Gauss R, Kanehara K, Carvalho P, Ng DT und Aebi M (2011) A complex of Pdi1p and the mannosidase Htm1p initiates clearance of unfolded glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **42**: 782-793.
- Gentsch M und Tanner W (1997) Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* **7**: 481-486.
- Gerber LD, Kodukula K und Udenfriend S (1992) Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. *J Biol Chem* **267**: 12168-12173.
- Gierasch LM (1989) Signal sequences. *Biochemistry* **28**: 923-930.
- Gilbert RS, Kobayashi R, Sekine S und Fujihashi K (2011) Functional transforming growth factor-beta receptor type II expression by CD4⁺ T cells in Peyer's patches is essential for oral tolerance induction. *PLoS One* **6**: e27501.
- Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, *et al.* (1979) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 106-110.
- Graumann K und Premstaller A (2006) Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J* **1**: 164-186.
- Gronenborn AM, Clore GM, Hobbs L und 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.
- Gross E, Sevier CS, Heldman N, Vitu E, Bentzur M, Kaiser CA, Thorpe C und Fass D (2006) Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 299-304.

- Hackel RA und Khan NA (1978) Genetic control of invertase formation in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Isolation and characterization of mutants conferring invertase hyperproduction in strain EK-6B carrying the *SUC3* gene. *Mol Gen Genet* **164**: 295-302.
- Hamada K, Terashima H, Arisawa M und Kitada K (1998) Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 26946-26953.
- Hamilton SR und Gerngross TU (2007) Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr Opin Biotechnol* **18**: 387-392.
- Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, *et al.* (2006) Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* **313**: 1441-1443.
- Hammond C und Helenius A (1994) Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol* **126**: 41-52.
- Hampton RY (2002) ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 476-482.
- Harmsen MM, Bruyne MI, Raue HA und Maat J (1996) Overexpression of binding protein and disruption of the *PMR1* gene synergistically stimulate secretion of bovine prochymosin but not plant thaumatin in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**: 365-370.
- Harwood CR und Cranenburgh R (2008) *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol* **16**: 73-79.
- Hebert DN, Foellmer B und Helenius A (1995) Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**: 425-433.
- Heinemann A, Hildinger M und Bädeler M (2012) Medizinische Biotechnologie in Deutschland. Report *Boston Consulting Group*.
- Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **264**: 13963-13966.
- Hong E, Davidson AR und Kaiser CA (1996) A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *J Cell Biol* **135**: 623-633.
- Hong YR, Chen YL, Farh L, Yang WJ, Liao CH und Shuan D (2006) Recombinant *Candida utilis* for the production of biotin. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**: 211-221.
- Hoseki J, Ushioda R und Nagata K (2010) Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem* **147**: 19-25.
- Huang Y, Zhen B, Lin Y, Cai Y, Lin Z, Deng C, Zhang Y (2013) Expression of Codon Optimized Human Bone Morphogenetic Protein 4 in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem*. Vor Veröffentlichung.
- Huang YC, Chen HT und Teng SC (2010) Intragenic transcription of a noncoding RNA modulates expression of *ASP3* in budding yeast. *RNA* **16**: 2085-2093.

- Huggins C und Lapidus J (1947) Chromogenic substrates: iv. Acyl esters of *p*-nitrophenol as substrates for the colorimetric determination of esterase *J Biol Chem* **170**: 467-482.
- Ikushima S, Minato T und Kondo K (2009a) Identification and application of novel autonomously replicating sequences (ARSs) for promoter-cloning and co-transformation in *Candida utilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 152-159.
- Ikushima S, Fujii T und 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 und Yoshida A (2009c) Genetic engineering of *Candida utilis* yeast for efficient production of L-lactic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 1818-1824.
- Inan M, Aryasomayajula D, Sinha J und Meagher MM (2006) Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioeng* **93**: 771-778.
- Iwakiri R, Noda Y, Adachi H und Yoda K (2005a) Isolation of the *YAP1* homologue of *Candida utilis* and its use as an efficient selection marker. *Yeast* **22**: 1079-1087.
- Iwakiri R, Eguchi S, Noda Y, Adachi H und Yoda K (2005b) Isolation and structural analysis of efficient autonomously replicating sequences (ARSs) of the yeast *Candida utilis*. *Yeast* **22**: 1049-1060.
- Izard JW und Kendall DA (1994) Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol Microbiol* **13**: 765-773.
- Jakubowski W, Bilinski T und Bartosz G (2000) Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* **28**: 659-664.
- Jansen R, Bussemaker HJ und Gerstein M (2003) Revisiting the codon adaptation index from a whole-genome perspective: analyzing the relationship between gene expression and codon occurrence in yeast using a variety of models. *Nucleic Acids Res* **31**: 2242-2251.
- Jeffery J, Wood I, Macleod A, Jeffery R und 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.
- Jeffery J, Persson B, Wood I, Bergman T, Jeffery R und Jornvall H (1993) Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Structure-function relationships and the *Pichia jadinii* enzyme structure. *Eur J Biochem* **212**: 41-49.
- Johnson IS (1983) Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* **219**: 632-637.
- Julien C (2006) Production of Humanlike Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*: From Expression Vector to Fermentation Strategy. *BioProcess Int* **4**: 22-31.
- Julius D, Brake A, Blair L, Kunisawa R und Thorner J (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. *Cell* **37**: 1075-1089.

- Khan TR und Daugulis AJ (2011) The effects of polymer phase ratio and feeding strategy on solid-liquid TPPBs for the production of L-phenylacetylcarbinol from benzaldehyde using *Candida utilis*. *Biotechnol Lett* **33**: 63-70.
- Kil JO, Kim GN und Park I (1995) Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**: 749-750.
- Kim JM, Jung DI, Eom YJ, Park SM, Yoo HS, Jang YS, Yang MS und Kim DH (2010) Surface-displayed expression of a neutralizing epitope of ApxIIA exotoxin in *Saccharomyces cerevisiae* and oral administration of it for protective immune responses against challenge by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**: 1362-1367.
- Kim KW, Kamerud JQ, Livingston DM und Roon RJ (1988) Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of the ASP3 gene. *J Biol Chem* **263**: 11948-11953.
- Kimata Y, Kimata YI, Shimizu Y, Abe H, Farcasanu IC, Takeuchi M, Rose MD und Kohno K (2003) Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell* **14**: 2559-2569.
- Kitagaki H, Wu H, Shimoi H und Ito K (2002) Two homologous genes, *DCW1* (*YKL046c*) and *DFG5*, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **46**: 1011-1022.
- Kok RG, Christoffels VM, Vosman B und Hellingwerf KJ (1993) Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J Gen Microbiol* **139**: 2329-2342.
- Kondo K, Saito T, Kajiwara S, Takagi M und 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.
- Kondo K, Miura Y, Sone H, Kobayashi K und Iijima H (1997) High-level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida utilis*. *Nat Biotechnol* **15**: 453-457.
- Kunigo M (2013) Expressionssysteme für die heterologe Proteinproduktion in *Candida utilis*, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Kück, U (2005) Heterologe Genexpression. *Praktikum der Molekulargenetik XVI*, Springer-Lehrbuch, Springer Berlin Heidelberg 291-322.
- Kurtzman CP, Johnson CJ und Smiley MJ (1979) Determination of conspecificity of *Candida utilis* and *Hansenula jadinii* through DNA reassociation. *Mycologia* **11**: 844-847.
- Kurtzman CP, Fell JW und 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 und Fell JW (1998) *The Yeast, A Taxonomic Study*. 4. Edition, Elsevier Science B. V., Amsterdam.

- Laboissiere MC, Sturley SL und Raines RT (1995) The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds. *J Biol Chem* **270**: 28006-28009.
- Lam JS, Huang H und Levitz SM (2007) Effect of differential N-linked and O-linked mannosylation on recognition of fungal antigens by dendritic cells. *PLoS One* **2**: e1009.
- Larsen MW, Bornscheuer UT und Hult K (2008) Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. *Protein Expr Purif* **62**: 90-97.
- Lee GY, Jung JH, Seo DH, Hansin J, Ha SJ, Cha J, Kim YS und Park CS (2011) Isomaltulose production via yeast surface display of sucrose isomerase from *Enterobacter* sp. FMB-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* **102**: 9179-9184.
- Lee SY, Choi JH und Xu Z (2003) Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol* **21**: 45-52.
- Leuker CE und 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.
- Liang G, Liao X, Du G und Chen J (2008) Elevated glutathione production by adding precursor amino acids coupled with ATP in high cell density cultivation of *Candida utilis*. *J Appl Microbiol* **105**: 1432-1440.
- Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D und Darnell J (2000) *Molecular Cell Biology*, 4. Edition New York: W. H. Freeman.
- Liu H, Qin Y, Huang Y, Chen Y, Cong P und He Z (2013) Direct evaluating the effect of gene dosage on secretion of protein from yeast *Pichia pastoris* by expressing EGFP. *J Microbiol Biotechnol*.
- Lu CF, Kurjan J und Lipke PN (1994) A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. *Mol Cell Biol* **14**: 4825-4833.
- Lukic-Grlic A, Mlinaric-Missoni E, Skaric I, Vazic-Babic V und Svetec IK (2011) *Candida utilis* candidaemia in neonatal patients. *J Med Microbiol* **60**: 838-841.
- Luong M, Lam JS, Chen J und Levitz SM (2007) Effects of fungal N- and O-linked mannosylation on the immunogenicity of model vaccines. *Vaccine* **25**: 4340-4344.
- Lussier M, Sdicu AM, Bussereau F, Jacquet M und Bussey H (1997) The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *J Biol Chem* **272**: 15527-15531.
- Madinger CL, Sharma SS, Anton BP, Fields LG, Cushing ML, Canovas J, Taron CH und Benner JS (2009) The effect of carbon source on the secretome of *Kluyveromyces lactis*. *Proteomics* **9**: 4744-4754.
- Magnusson AO, Rotticci-Mulder JC, Santagostino A und Hult K (2005) Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B. *Chembiochem* **6**: 1051-1056.

Makrides SC (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**: 512-538.

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.

Mansur M, Cabello C, Hernandez L, *et al.* (2005) Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* **27**: 339-345.

Marx H, Sauer M, Resina D, Vai M, Porro D, Valero F, Ferrer P und Mattanovich D (2006) Cloning, disruption and protein secretory phenotype of the *GAS1* homologue of *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Lett* **264**: 40-47.

Matlack KE, Misselwitz B, Plath K und Rapoport TA (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* **97**: 553-564.

Mattanovich D, Graf A, Stadlmann J, *et al.* (2009) Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **8**: 29.

McAlister L und Holland MJ (1985) Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem* **260**: 15019-15027.

Mellor J, Dobson MJ, Kingsman AJ und Kingsman SM (1987) A transcriptional activator is located in the coding region of the yeast *PGK* gene. *Nucleic Acids Res* **15**: 6243-6259.

Mendel I, Kerlero de Rosbo N und Ben-Nun A (1995) A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* **25**: 1951-1959.

Mergulhao FJ, Summers DK und Monteiro GA (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv* **23**: 177-202.

Merritt JH, Ollis AA, Fisher AC und Delisa MP (2013) Glycans-by-design: engineering bacteria for the biosynthesis of complex glycans and glycoconjugates. *Biotechnol Bioeng* **110**: 1550-1564.

Mille C, Bobrowicz P, Trinel PA, *et al.* (2008) Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J Biol Chem* **283**: 9724-9736.

Miura Y, Kettoku M, Kato M, Kobayashi K und 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 und Misawa N (1998a) 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 und Misawa N (1998b) Production of lycopene by the food yeast, *Candida utilis* that does not naturally synthesize carotenoid. *Biotechnol Bioeng* **58**: 306-308.
- Moller S, Croning MD und Apweiler R (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* **17**: 646-653.
- Moran P und Caras IW (1991) Fusion of sequence elements from non-anchored proteins to generate a fully functional signal for glycosylphosphatidylinositol membrane anchor attachment. *J Cell Biol* **115**: 1595-1600.
- Mowat AM (1987) The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol Today* **8**: 93-98.
- Mowat AM, Lamont AG und Bruce MG (1987) A genetically determined lack of oral tolerance to ovalbumin is due to failure of the immune system to respond to intestinally derived tolerogen. *Eur J Immunol* **17**: 1673-1676.
- Muller G (2011) Novel applications for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in pharmaceutical and industrial biotechnology. *Mol Membr Biol* **28**: 187-205.
- Muller G, Gross E, Wied S und Bandlow W (1996) Glucose-induced sequential processing of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoprotein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 442-456.
- Mullis KB und Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Nakanishi-Shindo Y, Nakayama K, Tanaka A, Toda Y und Jigami Y (1993) Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of alpha-1,6-polymannose outer chain from *och1*, *och1 mnn1*, and *och1 mnn1 alg3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**: 26338-26345.
- Nakayama K, Nagasu T, Shimma Y, Kuromitsu J und Jigami Y (1992) *OCH1* encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides. *EMBO J* **11**: 2511-2519.
- Nehlin JO, Carlberg M und Ronne H (1991) Control of yeast *GAL* genes by *MIG1* repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J* **10**: 3373-3377.
- Nett JH, Cook WJ, Chen MT, et al. (2013) Characterization of the *Pichia pastoris* protein-O-mannosyltransferase gene family. *PLoS One* **8**: e68325.
- Neutra MR, Phillips TL, Mayer EL und Fishkind DJ (1987) Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res* **247**: 537-546.
- Ng DT, Brown JD und Walter P (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**: 269-278.
- Ni Y und Chen R (2009) Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* **31**: 1661-1670.

Nickel W (2010) Pathways of unconventional protein secretion. *Curr Opin Biotechnol* **21**: 621-626.

Nickel W und Rabouille C (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 148-155.

Nishikawa SI, Fewell SW, Kato Y, Brodsky JL und Endo T (2001) Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol* **153**: 1061-1070.

Norden K, Agemark M, Danielson JA, Alexandersson E, Kjellbom P und Johanson U (2011) Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* **11**: 47.

Normington K, Kohno K, Kozutsumi Y, Gething MJ und Sambrook J (1989) *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell* **57**: 1223-1236.

Nuoffer C, Horvath A und Riezman H (1993) Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J Biol Chem* **268**: 10558-10563.

Nuoffer C, Jenö P, Conzelmann A und Riezman H (1991) Determinants for glycosylphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* **11**: 27-37.

Orr-Weaver TL und Szostak JW (1983) Multiple, tandem plasmid integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **3**: 747-749.

Ostermann K, Richter M, Zscharnack M, Rothe R, Walther T und Rodel G (2006) Identification of the genes *GPD1* and *GPD2* of *Pichia jadinii*. *DNA Seq* **17**: 452-457.

Palomares LA, Estrada-Mondaca S und Ramirez OT (2004) Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol* **267**: 15-52.

Pandhal J, Ow SY, Noirel J und Wright PC (2011) Improving *N*-glycosylation efficiency in *Escherichia coli* using shotgun proteomics, metabolic network analysis, and selective reaction monitoring. *Biotechnol Bioeng* **108**: 902-912.

Pappo J und Ermak TH (1989) Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. *Clin Exp Immunol* **76**: 144-148.

Parra-Ortega B, Cruz-Torres H, Villa-Tanaca L und Hernandez-Rodriguez C (2009) Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**: 505-512.

Peron JP, Yang K, Chen ML, Brandao WN, Basso AS, Commodaro AG, Weiner HL und Rizzo LV (2010) Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. *J Neuroimmunol* **227**: 10-17.

Petsch D und Anspach FB (2000) Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol* **76**: 97-119.

Piper PW, Curran B, Davies MW, Lockheart A und Reid G (1986) Transcription of the phosphoglycerate kinase gene of *Saccharomyces cerevisiae* increases when fermentative cultures are stressed by heat-shock. *Eur J Biochem* **161**: 525-531.

Plath K, Wilkinson BM, Stirling CJ und Rapoport TA (2004) Interactions between Sec complex and prepro-alpha-factor during posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **15**: 1-10.

Prill SK, Klinkert B, Timpel C, Gale CA, Schroppel K und Ernst JF (2005) *PMT* family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* **55**: 546-560.

Protchenko O, Ferea T, Rashford J, Tiedeman J, Brown PO, Botstein D und Philpott CC (2001) Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 49244-49250.

Rakestraw JA, Sazinsky SL, Piatasi A, Antipov E und Wittrup KD (2009) Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **103**: 1192-1201.

Rich C, Link JM, Zamora A, *et al.* (2004) Myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55 peptide induces severe chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR2-transgenic mice. *Eur J Immunol* **34**: 1251-1261.

Riedel K und Kunze G (1997) Rapid physiological characterization of microorganisms by biosensor technique. *Microbiol Res* **152**: 233-237.

Robinson AS, Hines V und Wittrup KD (1994) Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology (N Y)* **12**: 381-384.

Robinson AS, Bockhaus JA, Voegler AC und Wittrup KD (1996) Reduction of BiP levels decreases heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 10017-10022.

Roca C, Haack MB und Olsson L (2004) Engineering of carbon catabolite repression in recombinant xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**: 578-583.

Rodriguez L, Chavez FP, Basabe L, Rivero T und Delgado JM (1998) Development of an integrative DNA transformation system for the yeast *Candida utilis*. *FEMS Microbiol Lett* **165**: 335-340.

Roman E, Cottier F, Ernst JF und Pla J (2009) Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1235-1249.

Rose MD, Misra LM und Vogel JP (1989) *KAR2*, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* **57**: 1211-1221.

Roth MP, Malfroy L, Offer C, Sevin J, Enault G, Borot N, Pontarotti P und Coppin H (1995) The human myelin oligodendrocyte glycoprotein (*MOG*) gene: complete nucleotide sequence and structural characterization. *Genomics* **28**: 241-250.

7. Literaturverzeichnis

- Rothblatt JA, Deshaies RJ, Sanders SL, Daum G und Schekman R (1989) Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol* **109**: 2641-2652.
- Rotticci-Mulder JC, Gustavsson M, Holmquist M, Hult K und 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.
- Ruddock LW und Molinari M (2006) N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci* **119**: 4373-4380.
- Ruszova E, Pavek S, Hajkova V, Jandova S, Velebny V, Papezikova I und Kubala L (2008) Photoprotective effects of glucomannan isolated from *Candida utilis*. *Carbohydr Res* **343**: 501-511.
- Sahdev S, Khattar SK und 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.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- Samuel P, Prasanna Vadhana AK, Kamatchi R, Antony A und Meenakshisundaram S (2013) Effect of molecular chaperones on the expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *Microbiol Res* **168**: 615-620.
- Scheirlinck T, Mahillon J, Joos H, Dhaese P und Michiels F (1989) Integration and expression of alpha-amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2130-2137.
- Schreuder MP, Deen C, Boersma WJ, Pouwels PH und Klis FM (1996) Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. *Vaccine* **14**: 383-388.
- Schultz LD, Tanner J, Hofmann KJ, Emini EA, Condra JH, Jones RE, Kieff E und Ellis RW (1987) Expression and secretion in yeast of a 400-kDa envelope glycoprotein derived from Epstein-Barr virus. *Gene* **54**: 113-123.
- Serrano R, Kielland-Brandt MC und Fink GR (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* **319**: 689-693.
- Setiadi ER, Doedt T, Cottier F, Noffz C und Ernst JF (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J Mol Biol* **361**: 399-411.
- Sharp PM, Tuohy TM und Mosurski KR (1986) Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res* **14**: 5125-5143.
- Sherman F, Fink GR und Hicks JB (1986) *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Shimada H, Kondo K, Fraser PD, Miura Y, Saito T und 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.

Shin SJ, Bae JL, Cho YW, Lee DY, Kim DH, Yang MS, Jang YS und Yoo HS (2005) Induction of antigen-specific immune responses by oral vaccination with *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIIA. *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**: 155-164.

Shoji JY, Arioka M und Kitamoto K (2008) Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production. *Biotechnol Lett* **30**: 7-14.

Shusta EV, Raines RT, Pluckthun A und Wittrup KD (1998) Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat Biotechnol* **16**: 773-777.

Siebers A und Finlay BB (1996) M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol* **4**: 22-29.

Smith JD und Robinson AS (2002) Overexpression of an archaeal protein in yeast: secretion bottleneck at the ER. *Biotechnol Bioeng* **79**: 713-723.

Soll DR, Morrow B, Srikantha T, Vargas K und Wertz P (1994) Developmental and molecular biology of switching in *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **78**: 194-201.

Sorgo AG, Heilmann CJ, Brul S, de Koster CG und Klis FM (2013) Beyond the wall: *Candida albicans* secret(e)s to survive. *FEMS Microbiol Lett* **338**: 10-17.

Sorgo AG, Heilmann CJ, Dekker HL, Brul S, de Koster CG und Klis FM (2010) Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*. *Yeast* **27**: 661-672.

Spiller MP und Stirling CJ (2011) Preferential targeting of a signal recognition particle-dependent precursor to the Ssh1p translocon in yeast. *J Biol Chem* **286**: 21953-21960.

Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A und Birkenberger LA (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**: 55-62.

Staab JF, Bradway SD, Fidel PL und Sundstrom P (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**: 1535-1538.

Stanke M, Keller O, Gunduz I, Hayes A, Waack S und Morgenstern B (2006) AUGUSTUS: ab initio prediction of alternative transcripts. *Nucleic Acids Res* **34**: W435-439.

Stead DA, Walker J, Holcombe L, Gibbs SR, Yin Z, Selway L, Butler G, Brown AJ und Haynes K (2010) Impact of the transcriptional regulator, Ace2, on the *Candida glabrata* secretome. *Proteomics* **10**: 212-223.

Steel GJ, Fullerton DM, Tyson JR und Stirling CJ (2004) Coordinated activation of Hsp70 chaperones. *Science* **303**: 98-101.

- Stock J, Sarkari P, Kreibich S, Brefort T, Feldbrugge M und Schipper K (2012) Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *J Biotechnol* **161**: 80-91.
- Stoltenburg R, Klinner U, Ritzerfeld P, Zimmermann M und Emeis CC (1992) Genetic diversity of the yeast *Candida utilis*. *Curr Genet* **22**: 441-446.
- Strahl-Bolsinger S, Gentsch M und Tanner W (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 297-307.
- Su GD, Huang DF, Han SY, Zheng SP und Lin Y (2010) Display of *Candida antarctica* lipase B on *Pichia pastoris* and its application to flavor ester synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1493-1501.
- Swaim CL, Anton BP, Sharma SS, Taron CH und Benner JS (2008) Physical and computational analysis of the yeast *Kluyveromyces lactis* secreted proteome. *Proteomics* **8**: 2714-2723.
- Swidergall M, Ernst AM und Ernst JF (2013) *Candida albicans* mucin Msb2 is a broad-range protectant against antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 3917-3922.
- Tabuchi S, Ito J, Adachi T, Ishida H, Hata Y, Okazaki F, Tanaka T, Ogino C und Kondo A (2010) Display of both N- and C-terminal target fusion proteins on the *Aspergillus oryzae* cell surface using a chitin-binding module. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 1783-1789.
- Tamakawa H, Ikushima S und 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 und 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 und Yoshida S (2013) Metabolic engineering of *Candida utilis* for isopropanol production. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 6231-6239.
- Tanaka T, Yamada R, Ogino C und Kondo A (2012) Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **95**: 577-591.
- Terashima H, Hamada K und Kitada K (2003) The localization change of Ybr078w/Ecm33, a yeast GPI-associated protein, from the plasma membrane to the cell wall, affecting the cellular function. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 175-180.
- Tomita Y, Ikeo K, Tamakawa H, Gojobori T und Ikushima S (2012) Genome and transcriptome analysis of the food-yeast *Candida utilis*. *PLoS One* **7**: e37226.
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- Trombetta SE und Parodi AJ (1992) Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *J Biol Chem* **267**: 9236-9240.

- Uhl MA und Johnson AD (2001) Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*. *Microbiology* **147**: 1189-1195.
- Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S und Jones TA (1994) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2**: 293-308.
- Vai M, Brambilla L, Orlandi I, Rota N, Ranzi BM, Alberghina L und Porro D (2000) Improved secretion of native human insulin-like growth factor 1 from *gas1* mutant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5477-5479.
- Vainstein MH und Peberdy JF (1991) Regulation of invertase in *Aspergillus nidulans*: effect of different carbon sources. *J Gen Microbiol* **137**: 315-321.
- van Bloois E, Winter RT, Kolmar H und Fraaije MW (2011) Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **29**: 79-86.
- Vervecken W, Kaigorodov V, Callewaert N, Geysens S, De Vusser K und Contreras R (2004) In vivo synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2639-2646.
- Vincentelli R, Canaan S, Campanacci V, et al. (2004) High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Sci* **13**: 2782-2792.
- Vinogradov E, Petersen BO und Duus JO (2000) Isolation and characterization of non-labeled and ¹³C-labeled mannans from *Pichia pastoris* yeast. *Carbohydr Res* **325**: 216-221.
- von Heijne G (1986) Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol* **189**: 239-242.
- von Heijne G (1990) The signal peptide. *J Membr Biol* **115**: 195-201.
- Vossen JH, Muller WH, Lipke PN und Klis FM (1997) Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *cwh6/gpi3* yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins. *J Bacteriol* **179**: 2202-2209.
- Wang Y, Liang ZH, Zhang YS, Yao SY, Xu YG, Tang YH, Zhu SQ, Cui DF und Feng YM (2001) Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol Bioeng* **73**: 74-79.
- Ward OP (2012) Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnol Adv* **30**: 1119-1139.
- Wasilenko JL, Sarmiento L, Spatz S und Pantin-Jackwood M (2010) Cell surface display of highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin on the surface of *Pichia pastoris* cells using alpha-agglutinin for production of oral vaccines. *Biotechnol Prog* **26**: 542-547.
- Wei W, Hong-Lan Y, Huifang B, Daoyuan Z, Qi-Mu-Ge S und Wood AJ (2009) The effective expression of xylanase gene in *Candida utilis* by 18S rDNA targeted homologous recombination in pGLR9K. *Mol Biol Rep*.

Weiner HL (2001) Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* **3**: 947-954.

Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F und Wu H (2011) Oral tolerance. *Immunol Rev* **241**: 241-259.

Werten MW, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H und de Wolf FA (1999) High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* **15**: 1087-1096.

Wickerham C (1951) Taxonomy of Yeasts. *U.S. Dept. of Agriculture* **1**.

Wickerham LJ, Kurtzman CP und Herman AI (1970) Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science* **167**: 1141.

Wiesner SM, Jechorek RP, Garni RM, Bendel CM und Wells CL (2001) Gastrointestinal colonization by *Candida albicans* mutant strains in antibiotic-treated mice. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**: 192-195.

Willer T, Brandl M, Sipiczki M und Strahl S (2005) Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol Microbiol* **57**: 156-170.

Wilson RB, Davis D und Mitchell AP (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**: 1868-1874.

Yamada Y, Matsuda M und 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.

Yamaguchi K, Akai K, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S und Sasaki R (1991) Effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties. *J Biol Chem* **266**: 20434-20439.

Yanai T und Sato M (2001) Purification and characterization of an beta-D-xylosidase from *Candida utilis* IFO 0639. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 527-533.

Yaver DS, Matoba S und Ogrydziak DM (1992) A mutation in the signal recognition particle 7S RNA of the yeast *Yarrowia lipolytica* preferentially affects synthesis of the alkaline extracellular protease: in vivo evidence for translational arrest. *J Cell Biol* **116**: 605-616.

Yin QY, de Groot PW, Dekker HL, de Jong L, Klis FM und de Koster CG (2005) Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem* **280**: 20894-20901.

Yoko-o T, Wiggins CA, Stolz J, Peak-Chew SY und Munro S (2003) An N-acetylglucosaminyltransferase of the Golgi apparatus of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that can modify N-linked glycans. *Glycobiology* **13**: 581-589.

Yuzbasheva EY, Yuzbashev TV, Laptev IA, Konstantinova TK und Sineoky SP (2011) Efficient cell surface display of Lip2 lipase using C-domains of glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 645-654.

Zhang HC, Bi JY, Chen C, Huang GL, Qi QS, Xiao M und Wang PG (2006) Immobilization of UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* on the yeast cell surface. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 2303-2306.

Zhang ST, Fang HM, Zhao L, Tian QN, Qin YF, Lu P, Chen SJ, Bao ZX und Liang F (2011) Co-overexpression of PpPDI enhances secretion of ancrod in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol* **164**: 1037-1047.

Zhang T, Xu X, Shen L, Feng Y, Yang Z, Shen Y, Wang J, Jin W und Wang X (2009) Modeling of protein refolding from inclusion bodies. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **41**: 1044-1052.

Zhu H, Yao S und Wang S (2010) MFalpha signal peptide enhances the expression of cellulase *eg1* gene in yeast. *Appl Biochem Biotechnol* **162**: 617-624.

Zhu T, Guo M, Tang Z, Zhang M, Zhuang Y, Chu J und Zhang S (2009) Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol* **107**: 954-963.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	Alpha
μ	Mikro
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	antarktische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ARS	autonomous replicating sequence
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CalB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
C-Terminal	Carboxyterminal
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
l	Liter
<i>LacZ</i>	β-Galaktosidase Gen aus <i>S. thermophilus</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LiAc	Lithiumacetat
log	logarithmisch
M	Molar
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter

8. Abkürzungsverzeichnis

mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulare Masse
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze
NADH	Nicotinamidadeninnukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NST	Nourseothricin
OD _{xxx}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx Nanometer
ORF	Open reading frame
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAA	Poly-Acrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minuten
RT	Raumtemperatur
<i>sat1</i>	Gen für N-Acetyltransferase
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SMD	angereichertes, synthetisches Minimalmedium mit Glucose
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
s	Sekunde(n)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	Standard Saline Citrat
SMX	angereichertes, synthetisches Minimalmedium mit Xylose
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiemin
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-Propan-1,3-diol
TWEEN	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Unit
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract- Peptone-Dextrose (Vollmedium)

9 Anhang

Tabelle 9.1: Massenspektrometrische Analyse der sekretierten Proteine von *C. utilis* DSMZ2361 nach Wachstum in SMD-Medium. Die *S. cerevisiae* S288C Homologen wurden mittels BLASTP Suche (E-Wert 1×10^{-20}) identifiziert. MOPI= Durchschnitt der gefundenen Peptide aus 4 biologischen Replikaten (Sorgo *et al.*, 2010). SP= vorhergesagtes Signalpeptid; GPI= vorhergesagter GPI-Anker; exp= exponentielle Phase; stat= stationäre Phase; n.p.= Vorhersage auf Grund eines verkürzten ORFs nicht möglich. Die in Klammern angegebenen Prozente geben die Identität des *C. utilis* Proteins zu den homologen *S. cerevisiae* Proteinen an.

ORF ID	<i>S. cerevisiae</i> S288C	vorausgesagte Funktion	SP	GPI	Durchschnitt der gefundenen Peptide	
	Homolog				exp	stat
exponentielle Phase						
<i>g4347</i>	Ecm33 (44 %)	Zellwandprotein mit unbekannter Funktion	Ja	Ja	0,5	-
<i>g3158</i>	Msb2 (27 %)	Mucin	n.p.	Nein	0,5	-
<i>g2592/g2811</i>	kein Homolog	Protein mit Homologie zur Flo11 Familie	n.p.	n.p.	0,25	-
exponentielle und stationäre Phase						
<i>g5908</i>	Suc2 (48 %)	Invertase, Sucrose Hydrolyse	Ja	Nein	12,5	15,75
<i>g1121</i>	Scw4 (67 %)	Zellwandprotein mit Ähnlichkeit zu Glucanasen	Ja	Nein	14,5	12,75
<i>g3105</i>	Bgl2 (65 %)	endo- β 1,3-Glucanase, Zellwanderhaltung	Ja	Nein	7,5	5,75
<i>g4105</i>	Exg2 (56 %)	exo- β 1,3-Glucanase, Zellwand β -Glucan Aufbau	Ja	Nein	5,5	6,5
<i>g165</i>	Scw10 (60 %)	Zellwandprotein mit Glucanasen Ähnlichkeit	Ja	Nein	3,5	4,75
<i>g4226</i>	Tos1 (43 %)	Zellwandprotein unbekannter Funktion	n.p.	Nein	4,5	3,00
<i>g3474</i>	Uth1 (70 %)	"SUN"-Mitglied der "SUN"-Familie, Zellwand Biogenese	Ja	Nein	3,75	2,25
<i>g6254</i>	Hsp150 (59 %)	Hitzeschock-Protein, Zellwand-Stabilität	Ja	Nein	2,75	2,75
<i>g943</i>	Pry1 (64 %)	sekretiertes Sterol-bindendes Protein	Ja	Nein	1,75	2,5
<i>g1681</i>	Gas1 (55 %)	β 1,3-Glucanosyltransferase, Zellwandaufbau	Ja	Ja	2,5	2,25
<i>g5579</i>	Scw11 (64 %)	Zellwandprotein mit Glucanasen Ähnlichkeit	Ja	Nein	2,25	1,75
<i>g3796</i>	Fet3 (56 %)	ferro-O ₂ -Oxidoreductase, Eisenaufnahme	Ja	Nein	1	2
<i>g464</i>	Knh1 (39 %)	ähnlich Kre9 (Zellwand β 1,6-Glucan Synthese)	Ja	Nein	1,5	1,25
<i>g3498</i>	Asp3 (22 %)	L-Asparaginase, hydrolysiert Asn zu Asp	Ja	Nein	0,5	1
<i>g1137</i>	Osh6 (66 %)	Oxysterol-bindendes Protein, Sterol Metabolismus	Nein	Nein	0,75	0,75
<i>g6286</i>	kein Homolog	hypothetisches Protein mit Tip1 Domäne	Ja	Nein	0,25	0,5
<i>g174</i>	Met2 (59 %)	Homoserin-O-Acetyltransferase, Met Biosynthese	Nein	Nein	0,5	0,25
stationäre Phase						
<i>g457</i>	kein Homolog	hypothetisches Protein	Ja	Ja	-	4,75
<i>g3555</i>	kein Homolog	hypothetisches Protein	Nein	Nein	-	3,25
<i>g6140</i>	Zps1 (32 %)	Zink- und pH-reguliertes Oberflächenprotein	Nein	Nein	-	1,5
<i>g5411</i>	Trx1 (68 %)	Thioredoxin Isoenzym, oxidativer/reduktiver Stress	Nein	Nein	-	1,5
<i>g5050</i>	kein Homolog	hypothetisches Protein	Ja	n.p.	-	1,5

9. Anhang

<i>g4439</i>	kein Homolog	hypothetisches Protein	Nein	Nein	-	1,25
<i>g5643</i>	kein Homolog	Protein mit Domäne ähnlich der von Flo5	Ja	Nein	-	1
<i>g4668</i>	kein Homolog	Protein mit Domäne ähnlich der von Flo11	n.p.	Nein	-	0,75
<i>g1537</i>	Crh1(57 %)	Chitin-Transglycosylase, induziert bei Zellwandstress	Ja	Ja	-	0,75
<i>g1791/g2236</i>	kein Homolog	hypothetisches Protein mit Tip1 Domäne	Ja	Nein	-	0,75
<i>g2175</i>	Hht1 (100 %)	Histon Kernprotein H3	Nein	Nein	-	0,5
<i>g6131</i>	Tdh3 (81 %)	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	Nein	Nein	-	0,5
<i>g2628</i>	Plb3 (57 %)	Lysophospholipase 3, Phospholipid-Metabolismus	Ja	Ja	-	0,5
<i>g6715</i>	Rpl8b (78 %)	Protein L4 der großen ribosomalen Untereinheit	Nein	Nein	-	0,25
<i>g3620</i>	Cts1 (61 %)	Endochitinase, benötigt für die Zellteilung	Ja	n.p.	-	0,25
<i>g19</i>	Emg1 (83 %)	α/β -Methyltransferase	Nein	Nein	-	0,25
<i>g2360</i>	kein Homolog	hypothetisches Protein	Ja	Nein	-	0,25

Tabelle 9.2: Kernsekretom von *C. utilis*, *K. lactis* und *P. pastoris*. Die sekretierten Proteine von *K. lactis* (Madinger *et al.*, 2009) und *P. pastoris* (Mattanovich *et al.*, 2009) wurden an Hand einer BLASTP-Suche mit den sekretierten Proteinen von *C. utilis* verglichen.

<i>C. utilis</i> + <i>P. pastoris</i>	<i>C. utilis</i> + <i>K. lactis</i>	<i>C. utilis</i> + <i>P. pastoris</i> und <i>K. lactis</i>	Proteinfunktion
Scw4	Scw4	Scw4	Zellwandprotein mit Ähnlichkeit zu Glucanasen
Scw11	Scw11	Scw11	Zellwandprotein mit Glucanasen Ähnlichkeit
Bgl2	Bgl2	Bgl2	endo- β 1,3-Glucanase, Zellwanderhaltung
Exg2	Exg2	Exg2	exo- β 1,3-Glucanase, Zellwand β -Glucan Aufbau
Gas1	Gas1	Gas1	β 1,3-Glucanosyltransferase, Zellwandaufbau
Cts1	Cts1	Cts1	Endochitinase, benötigt für die Zellteilung
Uth1	Uth1	Uth1	Mitglied der "SUN"-Familie, Zellwand Biogenese
Tdh3	Tdh3	Tdh3	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Tos1	Tos1	Tos1	Zellwandprotein unbekannter Funktion
Pry1	Pry1	Pry1	sekretiertes Sterol-bindendes Protein
Hsp150			Hitzeschock-Protein, Zellwand-Stabilität
	Ecm33 Msb2		Zellwandprotein unbekannter Funktion Mucin
	Inv1		Invertase, Sucrose Hydrolyse
	Pir1		Protein mit internen Wiederholungen

Tabelle 9.3: Kernsekretom von *C. utilis*, *C. glabrata* und *C. albicans*. In dieser Tabelle sind die Kernsekretome von *C. utilis*, *C. albicans* (Sorgo *et al.*, 2010) und *C. glabrata* (Stead *et al.*, 2010) dargestellt. Die Proteine wurden Hand einer BLASTP-Suche mit den sekretierten Proteinen von *C. utilis* verglichen.

<i>C. utilis</i> + <i>C. albicans</i>	<i>C. utilis</i> + <i>C. glabrata</i>	<i>C. utilis</i> + <i>C. albicans</i> und <i>C. glabrata</i>	Genprodukt
Crh1	Crh1	Crh1	Chitin Transglycosylase, induziert bei Zellwandstress
Ecm33	Ecm33	Ecm33	Zellwandprotein mit unbekannter Funktion
Exg2	Exg2	Exg2	exo- β 1,3-Glucanase, Zellwand β -Glucan Aufbau
Cts1	Cts1	Cts1	Endochitinase, benötigt für die Zellteilung
Scw4	Scw4	Scw4	Zellwandprotein mit Ähnlichkeit zu Glucanasen
Gas1	Gas1	Gas1	β 1,3-Glucanosyltransferase, Zellwandaufbau
Bgl2			endo- β 1,3-Glucanase, Zellwanderhaltung
Scw11			Zellwandprotein mit Glucanasen Ähnlichkeit
Tos1			Zellwandprotein unbekannter Funktion
Msb2			Mucin
Plb3			Lysophospholipase 3, Phospholipid-Metabolismus
Zps1			Zink- und pH-reguliertes Oberflächenprotein
	Pry1		sekretiertes Sterol-bindendes Protein
	Trx1		Thioredoxin Isoenzym, oxidativer/reduktiver Stress
	Uth1		Mitglied der "SUN"-Familie, Zellwandbiogenese

Tabelle 9.4: qPCR-Daten für die Bestimmung der Plasmidkopieanzahl. Dargestellt sind die berechneten Primereffizienzen, sowie die Ct-Werte der qPCR und das daraus berechnete Verhältnis des Plasmidgens (*sat1*) und chromosomalen Gens (*XDH1*).

Stamm	Primereffizienz <i>XDH1</i>	Primereffizienz <i>sat1</i>	ct- Wert <i>XDH1</i>	ct- Wert <i>sat1</i>	Verhältnis <i>sat1</i> / <i>XDH1</i>	Plasmidkopien
CBCu1 (<i>TDH3p</i> - <i>CALB^{HA}</i>)	1,76	2,05	22,91	17,46	1,50	4,50
CBCu4 (<i>TDH3p</i> - <i>CALB^{HIS}</i>)	1,76	2,05	23,83	20,34	0,32	0,97
CBCu6 (<i>TDH3p</i> - <i>INV1-CALB^{HA}</i>)	1,94	2,14	15,43	13,49	0,96	2,88
CBCu11 (<i>TDH3p</i> - <i>MFα1-CALB^{HA}</i>)	1,94	2,14	19,12	15,99	1,66	4,98
CBCu12 (<i>TDH3p</i> - <i>UML2^{HA}</i>)	1,76	2,05	23,91	19,0	0,89	2,67
CBPj2 (<i>TDH3p</i> - <i>CALB^{HA}</i>)	1,76	2,05	18,24	14,42	0,96	1,92

Tabelle 9.5: Identitätsanalyse von kodierenden Sequenzen aus *C. utilis* und *P. jadinii* Die Aminosäuresequenzen von Proteinen der Sekretion und Glykosylierung aus *C. utilis* (Tomita *et al.*, 2012) und *P. jadinii* (Brinkrolf *et al.*, 2013) wurden an Hand einer BLASTP-Suche auf Identität zu den *S. cerevisiae* S288C Proteinen untersucht. *= Auf Grund großer Homologien von Proteinen innerhalb einer Proteinfamilie konnte kein eindeutiges Protein zugeordnet werden. SRP= *Signal recognition particle*.

	<i>S. cerevisiae</i> S288C Genprodukt	Identität zu <i>C. utilis</i> NRBC0998 (Tomita <i>et al.</i>, 2012) [%]	Identität zu <i>P. jadinii</i> CBS1600 (Brinkrolf <i>et al.</i>, 2013) [%]
Sekretionspore:	ScSec61	69	73
	ScSec63	40	39
	Sec71/Sec66	43	43
	Sec72	33	33
	Sss1	61	61
	Sbh1	51	51
	Ssh1	48	49
	Lhs1	34	34
	Sil1	nur in Tielker und Ernst Daten,	25
	Kar2	78	78
	Sec62	-	42
SRP:	Srp14	36	36
	Srp21	40	40
	Srp54	59	59
	Srp72	28	28
	Sec65/Srp19	nur in Tielker und Ernst Daten,	44
	Srp68	24	24
Glykosylierung:	OST1	36	36
	OST2	50	50
	OST3	31	31
	OST4	-*	-*
	OST5	-*	-*
	OST6	28	28
	STT3	69	66
	SWP1	33	34
	WBP1	39	39
	CWH41	42	42
	ROT2	43	50
	GTB1	27	27
	CNE1	33	37
	KRE5	-	-
	MNS1	50	49
	MNL1	39	39
	MNL2	29	29
	OCH1	36	36
	MNN9	66	65
	VAN1	68	57
	ANP1	71	71
	HOC1	45	45
	MNN10	66	67
MNN11	39	39	
KRE2=MNT1	61	61	
KTR1	69	69	
KTR2	-	-	

	KTR3	-*	-*
	KTR4	47	47
	KTR5	-*	-*
	KTR6 (MNN6)	-	-
	KTR7	-*	-*
	MNN4	-*	-*
	MNN1	-*	-*
	MNT2	-*	-*
	MNT3	-*	-*
	MNT4	-*	-*
	MNN2	42	37
	MNN5	32	37
	GNT1	27	27
<i>S. pombe 972h</i>	SpGPT1:	nur in Tielker und Ernst Daten	44
<i>C. albicans</i>	CaBMT1	-	-
	CaBMT2	-	-
	CaBMT3	-	-
	CaBMT4	-	-
	CaBMT5	-	-
	CaBMT6	-	-
	CaBMT7	-	-
	CaBMT8	-	-
	CaBMT9	-	-

Tabelle 9.6 Identitätsanalyse von Proteinen der Sekretion und Glykosylierung. Proteine die in der *C. utilis* Genomsequenzierung von Tomita *et al.* (2012) nicht gefunden wurden, wurden in der Genomsequenzierung von D. Tielker und J. F. Ernst (unveröffentlicht) identifiziert und Hand einer BLASTP-Suche auf Identität zu *S. cerevisiae* S288C Proteinen untersucht.

		Identität zu <i>C. utilis</i> DSMZ2361 (Tielker und Ernst, unveröffentlicht) [%]
<i>S. cerevisiae</i> S288C	Sec65	45
	Sil1	26
<i>S. pombe 972h</i>	SpGPT1:	34

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. J.F. Ernst für die Betreuung, konstruktiven und hilfreichen Ratschläge und die Einblicke nicht nur in die Welt der Hefen bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Freudl für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Und auch Danke an Anne Mausberg für die super Zusammenarbeit bei den Mausversuchen, sowie an alle anderen, die mir bei dieser Arbeit geholfen haben.

Ein Dank geht natürlich auch an die gesamte AG Ernst und vor allem auch an Denis, der das alles möglich gemacht hat und der immer mit Rat und Tat zur Seite stand, auch außerhalb des Laboralltags. Vielen Dank liebe Ernstis für die tolle Zeit im Labor und auch außerhalb davon. Und auch bei Maya möchte ich mich bedanken, die zusammen mit mir den *C. albicans* Leuten Paroli geboten hat- war nicht immer leicht, aber wir haben's geschafft.

Danke auch an Marc und René für das ein oder andere Erfrischungsgetränk an heißen Sommertagen- manchmal macht das Arbeiten doch Spaß!

Bei meiner Familie möchte ich mich bedanken, die mich immer seltener zu Gesicht bekam und dass es trotzdem, oder gerade deswegen, immer "schwäbische" Köstlichkeiten gab.

Ein besonderer Dank geht an meine Freundin Inga. Auch wenn es nicht immer leicht war mit mir, vor allem in den letzten Wochen und Monaten, so hast du immer über meine Launen hinweggesehen, mir geholfen und an mich geglaubt- Danke!

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 bereits veröffentlicht

Publikationen:

Buerth C, Heilmann CJ, Klis M, de Koster CG, Ernst JF und Tielker D (2011) Growth-dependent secretome of *Candida utilis*. *Microbiol* **157**: 2493-2503

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

Poster:

Buerth C, Heilmann CJ, Klis FM, de Koster C, Ernst JF und Tielker D (2011) The growth-dependent secretome of *Candida utilis*. VAAM Jahrestagung, 03.-06.04.2011, Karlsruhe

Kunigo M, Buerth C, Tielker D und Ernst JF (2012) New expression systems for heterologous protein production in *Pichia jadinii* and *Candida utilis*. Pichia 2012, 29.02. – 03.03.2012, Alpbach, Österreich

Düsseldorf, den 02.12.2013

Christoph Bürth