



## Synthetische Promotoren für die Hefe *Pichia pastoris* basierend auf regulatorischen Elementen des AOX1 Gen

### *Synthetic Pichia pastoris promoters based on AOX1 regulatory elements*

Die Hefe *Pichia pastoris* hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einem sehr weit verbreiteten Produktionsorganismus für Proteine entwickelt. Die Hauptgründe dafür sind sehr einfache und billige Kultivierbarkeit, effiziente gentechnische Methoden und außerordentlich hohe Produktivität. Obwohl die industrielle Bedeutung dieses Produktionssystems stark im Steigen begriffen ist, ist das System und dessen Funktionsweise bis heute nur sehr wenig verstanden. Dies zu ändern war Teil meiner Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biotechnologie der TU Graz.

*Pichia pastoris* ist in der Lage sich von Methanol zu ernähren, das für viele andere Organismen (wie z.B. auch dem Menschen) toxisch ist. Die Enzyme des Stoffwechselwegs der für die Methanolverwertung notwendig ist, werden in massiven Mengen gebildet sobald die Hefe auf Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle wächst. Die Menge des Schlüsselenzyms Alkoholoxidase 1 (Aox1p) macht dabei bis zu 30% der gesamten löslichen Proteinmenge der Zelle aus. Diese Eigenschaft nutzt man auch, um Proteine aus anderen Organismen anstatt des Aox1p Proteins zu produzieren.

Das entscheidende Werkzeug für die Übertragung der hohen Produktivität vom AOX1 Gen zu „fremden“ Genen ist der Promotor. Der Promotor kennzeichnet den Start eines Gens auf der DNA, der gleichzeitig als sog. „Genschalter“ dient und in dieser Eigenschaft sowohl die Menge als auch den Zeitpunkt der Produktion des nachfolgenden Gens reguliert. Durch eine gentechnische Fusion dieses Promotors mit verschiedensten anderen Genen ist es möglich die entsprechenden Proteine in der Hefe in sehr großen Mengen zu produzieren (Abb. 2).

In meiner Forschungsarbeit habe ich durch Sequenzanalyse mögliche regulatorische Bereiche in der Promotor-DNA identifiziert und in weiterer Folge experimentell auf deren Funktionen und Eigenschaften untersucht. Mit Hilfe der dabei identifizierten regulatorischen Elemente stellen wir neue, synthetische Promotoren mit neuen und technologisch interessanten Eigenschaften her. Diese Promotoren, die wir zurzeit weiterentwickeln dienen als Toolbox für die Produktion von Enzymen (sog. Biokatalysatoren), die wir im Rahmen einiger Forschungsprojekte im Kompetenzzentrum Angewandte Biokatalyse verwenden. Die Anwendung unserer Promotoren ist aber nicht nur auf die Produktion von Enzymen beschränkt, auch therapeutische Proteine können in gleicher Weise reiner und effizienter hergestellt werden.

Ein weiteres Einsatzgebiet, für das wir gerade neue Promotoren entwickeln ist der Bereich des „Metabolic Engineering“. In diesem

Bereich bringen wir Hefezellen die Produktion einer neuen chemischen Verbindung bei. Dabei ist es notwendig die an der Produktion dieser Verbindung beteiligten Enzyme jeweils in optimaler Menge innerhalb der Zellen zu produzieren. Dafür wird ebenfalls eine große Bandbreite an Promotoren mit unterschiedlicher Stärke benötigt.

Im Frühjahr dieses Jahres haben wir, unterstützt von Mag. Thomas Bereuter von der Technologieverwertung der TU Graz, ein PCT Patent eingereicht um die Ergebnisse dieser Arbeit für eine zukünftige kommerzielle Verwertung zu schützen.

#### Zu meinem Werdegang

Nach der Matura an der HTL für Chemische Betriebstechnik in Wels habe ich an der TU Graz Technische Chemie studiert, wobei ich den Studiengang Biotechnologie, Biochemie und Lebensmittelchemie gewählt habe. Meine Diplomarbeit habe ich schließlich am Institut für Molekulare Biotechnologie bei Prof. Anton Glieder im Rahmen des EU-Projektes ANTICO durchgeführt. Dieser Arbeitsgruppe bin ich auch während meiner Dissertation treu geblieben, die ich derzeit im Kompetenzzentrum Angewandte Biokatalyse ([www.a-b.tugraz.at](http://www.a-b.tugraz.at)) bzw. am Institut für Molekulare Biotechnologie ([www.imbt.tugraz.at](http://www.imbt.tugraz.at)) durchführe.

Meine Dissertation beschäftigt sich mit dem Metabolic Engineering in *Pichia pastoris* für eine Anwendung als Ganzzellbiokatalysatoren sowie der Entwicklung der dafür notwendigen Tools, wie ich es oben im Bereich der Promotor-Entwicklung beschrieben habe, wobei dies auch über die Betreuung von Diplomanden der Arbeitsgruppe Glieder geschieht.

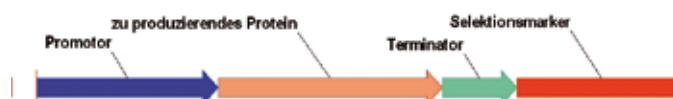


Abb. 2: Eine typische Expressionskassette für die Proteinproduktion mit *Pichia pastoris*. Die Expressionskassette beinhaltet folgende Elemente: ein Promotor (z.B. AOX1, steuert die Enzymproduktion), das zu produzierende Enzym, einen Terminator (Ende des Gens, stoppt die RNA Produktion an dieser Stelle, aus der RNA wird in weiterer Folge das Protein produziert), einen Selektionsmarker (ermöglicht die Stabilisierung der Kassette in der Hefezelle).

### *Synthetic Pichia pastoris promoters based on AOX1 regulatory elements*

*During the last decade, the methylotrophic yeast, Pichia pastoris, has become a major eukaryotic host for recombinant protein production in both academic and industrial research. Up to now the expression of more than 500 proteins has been reported. One major reason for the success of this yeast as an expression system is the inducible promoter of its alcohol oxidase I (AOX1) gene. Its key features include an exceptional expression strength as well as a very strong glucose repression.*

*By computational sequence analysis I identified several putative cis-acting elements within the AOX1 promoter sequence. Based on this sequence analyses, we performed deletion studies and identified both, positively and negatively acting promoter elements. Consequently, these elements were tested by adding them to basal promoter elements and finally they were rearranged to generate synthetic and hybrid promoter libraries with different expression levels and regulation patterns.*

*This particular promoter library can be used to adapt promoter regulation and strength for recombinant protein production and moreover represents a novel toolbox for fine-tuning genetic control of genes used for metabolic engineering.*

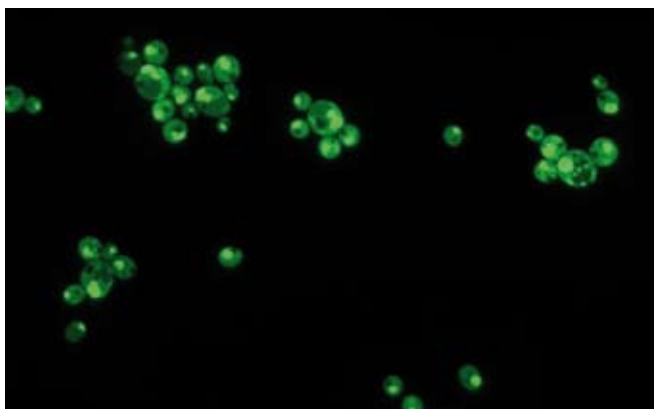


Abb. 1: *Pichia pastoris* Zellen, die das so genannte „Green Fluorescent Protein (GFP)“ produzieren, betrachtet mit 1000-facher Vergrößerung durch ein Fluoreszenzmikroskop. Die grüne Fluoreszenz des Proteins, welches innerhalb der Zelle produziert wird, ist deutlich zu sehen.