

Sebastian Hofzumahaus

**Evolutionäre Entwicklung von sekretorischen
Signalen in *Pichia pastoris***

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Diplom-Ingenieurs (Dipl.-Ing.)

der Studienrichtung Biotechnologie
erreicht an der

Technischen Universität Graz

Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Helmut Schwab
Institut für Molekulare Biotechnologie
Technische Universität Graz

Graz, April 2010

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schwab dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Masterarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, für seine Betreuung und seine Hilfe bei Fragestellungen, die ich nicht alleine klären konnte.

Dann möchte ich mich insbesondere bei Mag. Ingund Anderl und Patricia Inschlag für ihre Hilfsbereitschaft, die lustigen Gespräche und die gemeinsamen Mittagessen bedanken.

Auch bedanke ich mich bei meiner Freundin Isabell, die mir während der gesamten Zeit zur Seite stand und mich immer wieder motivierte, wenn es mit der Arbeit einmal nicht weiter ging.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Eltern und Großeltern, ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre, meine Masterarbeit in Österreich zu absolvieren.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei all meinen Freunden bedanken, mit denen ich in Graz auch während meiner Freizeit sehr viel Spass hatte.

Kurzfassung

Bereits seit vielen Jahren werden methylotrophe Hefen als Expressionssysteme für heterologe Proteine verwendet. *Pichia pastoris* zählt zu den erfolgreichsten Expressionssystemen unter diesen Hefen und bis zum heutigen Tag wurden über 550 Fremdproteine, inklusive 180 eukaryotischer Proteinen, mit ihrer Hilfe mit Erfolg exprimiert. Sie besitzt, wie alle methylotrophen Hefen, viele Vorteile gegenüber anderen eukaryotischen und prokaryotischen Expressionssystemen: Sie wächst auf einfachen günstigen Medien zu sehr hohen Zelldichten, kann mit einfachen Methoden genetisch modifiziert werden und ist in der Lage, heterologe Proteine zu modifizieren. Ein besonderer Vorzug von *P.pastoris* ist der P_{AOXI} -Promotor des *AOXI* Gens, bei dem es sich um einen sehr starken Methanol induzierbaren Promotor handelt. Desweiteren können mit ihr heterologe Proteine sekretiert werden, wozu hauptsächlich Plasmide verwendet werden, in die direkt im Anschluss an den P_{AOXI} die α mating factor Signalsequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* kloniert worden ist. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden vier lizenzfreie Plasmid-Varianten generiert, mit denen es auf einfache Weise möglich ist, heterologe Proteine in *Escherischia coli* zu klonieren und anschließend in *P.pastoris* zu exprimieren und bei Bedarf in das Fermentationsmedium zu sekretieren. Die Klonierung, Expression und Sekretion eines heterologen Proteins mit Hilfe der generierten Plasmide konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die α mating factor Signalsequenz durch gerichtete Evolution in *P.pastoris* verbessert und die Sekretion optimiert werden. Jedoch konnte keine zufriedenstellende Fermentation der transformierten Variantenbibliothek durchgeführt werden und es stellte sich heraus, dass die erzeugten error prone PCR nicht mit dem Zielplasmid ligiert werden konnten. Dies führte zu einer mangelhaften Variantenbibliothek, die nicht zum Screening nach Klonen mit einem erhöhtem Sekretionslevel verwendet werden konnte.

Abstract

Since several years methylotrophic yeasts have been used as expression systems for heterologous proteins. *Pichia pastoris* is one the most successful expression systems of these yeasts and until now more than 550 heterologous proteins, including 180 eukaryotic proteins, have been successfully expressed with it. Like all of the methylotrophic yeasts it has many advantages compared to other eukaryotic and prokaryotic expression systems: It grows on cheap and simple media to very high cell densities, it can be easily genetically modified and is able to modify heterologous proteins. An additional advantage of *P.pastoris* is its P_{AOX1} promoter of the *AOX1* gene, which is a very strong methanol inducible promoter. Furthermore it can secrete heterologous proteins, when plasmids are used, in which the α mating factor signal sequence from *Saccharomyces cerevisiae* is cloned directly behind the P_{AOX1} promoter. In the first part of this work four licence free plasmids were generated, with which one easily can perform cloning steps of heterologous proteins in *Escherischia coli* and then express them in *P.pastoris* and even secrete the proteins into the culture supernatant, if needed. The expression and secretion of a heterologous protein in *P.pastoris* was verified. In the second part of this work the α mating factor signal sequence should have been enhanced in *P.pastoris* by directed evolution, resulting in an increased secretion level. However no satisfying fermentation of the mutant library could be performed and it turned out that the generated error prone PCR products could not be ligated with the target plasmid. This resulted in an insufficient mutant library, which could not be used to screen for clones with an increased secretion level.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	2
Kurzfassung	3
Abstract	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	13
1.1 <i>Pichia pastoris</i> als Expressionssystem	13
1.1.1 Posttranslationale Modifikationen in <i>P.pastoris</i>	14
1.1.2 Mut ⁺ , Mut ^S , Mut ⁻	15
1.1.3 P _{AOX1} -Promotor	15
1.2 α mating factor Signalsequenz	16
1.3 <i>Bacillus subtilis</i> Levanase	17
1.4 Ziele	18
1.4.1 Generieren der Plasmide.....	18
1.4.2 Verbesserung der α mating factor Signalsequenz in <i>Pichia pastoris</i>	18
2 Methoden und Materialien	19
2.1 Allgemeine Methoden	19
2.1.1 Anzuchten von Zellen (ONC)	19
2.1.2 Glycerolstocks	19
2.1.3 Miniprep Plasmidisolierung	19
2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese	20
2.1.5 DNA-Präparation aus dem Agarosegel	21
2.1.6 Restriktion von DNA.....	22
2.1.7 Ligation.....	22
2.1.8 EtOH-Fällung	23
2.1.9 Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i> -Zellen	24
2.1.10 Transformation in <i>E.coli</i>	25
2.1.11 Transformation in <i>P.pastoris</i>	25
2.2 Generieren der Plasmide pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl	26
2.2.1 Austausch <i>Bgl</i> III gegen <i>Sph</i> I und <i>Sph</i> I gegen <i>Bgl</i> III	26
2.2.2 Integration der α mating factor signal sequence.....	31

2.3	Generieren der Referenzplasmide	32
2.3.1	pEHvarA	32
2.3.2	pEHvarB und pEHvarC	33
2.3.3	pEHvarA/B/CLevK	37
2.4	Verbesserung der α -Faktor Signalsequenz	38
2.4.1	Generieren des pEHAOX1 α His4BglIILevK-Plasmids	38
2.4.2	Error prone PCR	38
2.4.3	Transformation der Plasmide in GS200 und Einzelkolonieselektion.....	40
2.4.4	Flüssigkultur Fermentation.....	41
2.4.5	Levanaseaktivitäts-Assay	42
2.4.6	SDS-PAGE	44
2.4.7	Bestimmung der Mutationsfrequenz	45
2.4.8	Sequenzierung der stärksten Mutanten.....	45
3	Ergebnisse und Diskussion	47
3.1	Generieren der Plasmide pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl	47
3.1.1	Austausch <i>Bgl</i> III gegen <i>Sph</i> I und <i>Sph</i> I gegen <i>Bgl</i> III	47
3.1.2	Integration der α mating factor signal sequence.....	49
3.2	Generieren der Referenzplasmide	50
3.2.1	pEHvarA	51
3.2.2	pEHvarB und pEHvarC	52
3.2.3	pEHvarA/B/CLevK	54
3.3	Verbesserung der α -Faktor Signalsequenz	56
3.3.1	Generieren des pEHAOX1 α His4BglIILevK-Plasmids	56
3.3.2	Error prone PCR	57
3.3.3	Transformation der Plasmide in GS200 und Einzelkolonieselektion.....	59
3.3.4	Flüssigkultur Fermentation.....	60
3.3.5	Levanaseaktivitäts-Assay	60
3.3.6	SDS-PAGE	63
3.3.7	Bestimmung der Mutationsfrequenz	63
3.3.8	Sequenzierung der stärksten Mutanten.....	65
3.4	Zusammenfassung	65
3.4.1	Generieren der Plasmide.....	65
3.4.2	Verbesserung der α mating factor Signalsequenz in <i>Pichia pastoris</i>	65
3.4.3	Outlook	66
4	Anhang.....	68
4.1	Stämme	68
4.1.1	<i>E. coli</i>	68
4.1.2	<i>P. pastoris</i>	68
4.2	Antibiotika	68
4.3	Enzyme	68

4.3.1	Restriktionsenzyme	68
4.3.2	Sonstige Enzyme	69
4.4	Standards & Kits.....	69
4.4.1	DNA Größenstandard:.....	69
4.4.2	Protein Größenstandard	70
4.4.3	Kits	70
4.5	Chemikalien.....	70
4.6	Medien, Puffer & Lösungen	71
4.6.1	Puffer und Lösungen	71
4.6.2	Medien.....	73
4.7	Primer	75
4.8	Plasmidkarten	76
4.8.1	pEVAHis4SphI.....	77
4.8.2	pGAPZalphaLevKex	77
4.8.3	pEHAOX1His4Sph (3098) / pEHAOX1His4Bgl (3097).....	78
4.8.4	pEHAOX1 α His4Sph (3096) / pEHAOX1 α His4Bgl (3095).....	79
4.8.5	pEHAOX1 α His4BglLevK	80
4.8.6	pEHvarALevK / pEHvarBLevK / pEHvarCLevK.....	80
4.8.7	0704534pGA4	82
4.8.8	pPIC9.....	82
	Literaturverzeichnis	83
	Erklärung	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sucrose [33].....	17
Abbildung 2: Fragment 3a mit ausgetauschter Restriktionsschnittstelle und Primern...	27
Abbildung 3: Fragment 3b mit ausgetauschter Restriktionsschnittstelle und Primern...	27
Abbildung 4: <i>sacC</i> -Signalsequenz.....	34
Abbildung 5: Mutation Frequency vs. Initial Target Quantity [28]	39
Abbildung 6: Reaktion Levanaseaktivitäts-Test.....	43
Abbildung 7: oePCR-Fragmente 3a/3b und verdautes pEVAHis4SphI-Plasmid: 1 O'GeneRuler, 2-3 Fragment 3a (<i>PvuI</i> , <i>HindIII</i>), 4-5 pEVAHis4SphI (<i>PvuI</i> , <i>HindIII</i>), 6-7 Fragment 3b (<i>PvuI</i> , <i>PstI</i>), 8-9 pEVAHis4SphI (<i>PvuI</i> , <i>PstI</i>).....	47
Abbildung 8: Kontrollschnitt pEHAOX1His4Sph/pEHAOX1His4Bgl: 1 O'GeneRuler, 2-4 pEHAOX1His4Sph (<i>SphI</i>), 5-7 pEHAOX1His4Bgl (<i>BglII</i>).....	48
Abbildung 9: alphaFSS27Aalone aus 0704534pGA4 + verdaute pEHAOX1His4Sph und pEHAOX1His4Bgl-Plasmide: 1 O'GeneRuler, 2-3 pEHAOX1His4Sph (<i>HindIII</i> , <i>NotI</i>), 4-5 pEHAOX1His4Bgl (<i>HindIII</i> , <i>NotI</i>), 6-7 alphaFSS27Aalone (<i>HindIII</i> , <i>NotI</i>).....	49
Abbildung 10: Kontrollschnitt pEHAOX1 α His4Sph/pEHAOX1 α His4Bgl: 1 O'GeneRuler, 2-3 pEHAOX1 α His4Sph (<i>HindIII</i> , <i>NotI</i>), 4-5 pEHAOX1 α His4Bgl (<i>HindIII</i> , <i>NotI</i>).....	50
Abbildung 11: α FSP-Sequenz aus pEHAOX1 α His4Sph: 1 O'GeneRuler, 2 α FSP.....	51
Abbildung 12: Restriktion α FSP und pEHAOX1 α His4Bgl: 1 O'GeneRuler, 2 α FSP (<i>SacI</i> <i>NotI</i>), 3 pEHAOX1 α His4Bgl (<i>SacI</i> , <i>NotI</i>)	52
Abbildung 13: α FSS _{Invitrogen} und <i>sacC</i> -SS: 1 O'Generuler, 2 α FSS _{Invitrogen} , 3 O'GeneRuler, 4-5 <i>sacC</i> -SS.....	53
Abbildung 14: Restriktion α FSS _{Invitrogen} und pEHAOX1His4Bgl: 1 O'GeneRuler, 2-4 α FSS _{Invitrogen} (<i>HindIII</i> , <i>NotI</i>), 4 O'GeneRuler, 5-6 pEHAOX1His4Bgl (<i>HindIII</i> , <i>NotI</i>).....	53
Abbildung 15: PCR <i>sacC</i> und Restriktion <i>sacC</i> : 1 O'GeneRuler, 2 PCR-Produkt <i>sacC</i> , 3 O'GeneRuler, 3-4 <i>sacC</i> (<i>XhoI</i> , <i>NotI</i>)	55
Abbildung 16: Restriktion pEHvarA und pEHvarC: 1 O'GeneRuler, 2 pEHvarA (<i>XhoI</i> , <i>NotI</i>), 3 pEHvarC (<i>XhoI</i> , <i>NotI</i>), 4 O'GeneRuler, 5 pEHvarB (<i>XhoI</i> , <i>NotI</i>)	55
Abbildung 17: Restriktionsansatz pEHAOX1 α His4Bgl: 1 O'GeneRuler, 2 pEHAOX1 α His4Bgl (<i>XhoI</i> , <i>NotI</i>).....	57
Abbildung 18: epPCR-Produkte: 1 O'GeneRuler, 2-11 epPCR-Produkte 1 bis 10	58
Abbildung 19: Restriktion pEHAOX1 α His4BglLevK: 1 O'GeneRuler, 2-3 pEHAOX1 α His4BglLevK (<i>HindIII</i> , <i>XhoI</i>), 4 pEHAOX1 α His4BglLevK (ungeschnitten).....	58
Abbildung 20: Trafo-Platte <i>P.pastoris</i>	59
Abbildung 21: Vorkultur der Flüssigkultur Fermentation.....	60
Abbildung 22: Levanaseaktivitäts-Assay nach 72h Hauptkultur 1	61
Abbildung 23: Levanaseaktivitäts-Assay nach 72h Hauptkultur 2	61

Abbildung 24: Levanaseaktivitäts-Assay nach 72h Hauptkultur 3	62
Abbildung 25: SDS-PAGE: 1 Proteinmarker, 2 pEHMut1.5, 3 pEHMut1.6, 4 pEHMut1.7, 5 pEHMut2.1, 6 pEHMut3.5, 7 pEHMu5.2, 8 pEHMut5.7, 9 pEHMut6.5, 10 pEHMut6.5, 11 pEHMut9.8, pEHMut9.6, 12 pEHvarALevK Kolonie 2, 13 pEHvarBLEvK Kolonie 2, 14 pEHvarCLEvK Kolonie 2, 15 pEHAOX1 α His4BglLev Kolonie 1 – Alle Proben wurden zuvor denaturiert und mit Endo-H deglycosyliert.....	63
Abbildung 26: O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use [35]	69
Abbildung 27: PageRuler™ Prestained Protein Ladder	70
Abbildung 28: pEVAHis4SphI.....	77
Abbildung 29: pGAPZalphaLevKex	77
Abbildung 30: pEHAOX1His4Sph	78
Abbildung 31: pEHAOX1His4Bgl.....	78
Abbildung 32: pEHAOX1 α His4Sph.....	79
Abbildung 33: pEHAOX1 α His4Bgl	79
Abbildung 34: pEHAOX1 α His4BglLevK	80
Abbildung 35: pEHvarALevK.....	80
Abbildung 36: pEHvarBLEvK.....	81
Abbildung 37: pEHvarCLEvK.....	81
Abbildung 38: 0704534pGA4	82
Abbildung 39: pPic9	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung Ligationsansatz	23
Tabelle 2: Ansatz PCR Fragmente 1+2	28
Tabelle 3: PCR-Bedingungen Fragmente 1+2.....	28
Tabelle 4: Primer Schnittstellenaustausch PCR 1.....	29
Tabelle 5: Ansatz oePCR.....	29
Tabelle 6: oePCR Schritt 1	29
Tabelle 7: oePCR Schritt 2	30
Tabelle 8: Primer oePCR Schritt 2	30
Tabelle 9: Sequenzierprimer pEHAOX1His4Sph/Bgl	31
Tabelle 10: Zusammensetzung PCR-Ansätze.....	32
Tabelle 11: PCR-Bedingungen α FSP	33
Tabelle 12: oePCR-Bedingungen <i>sacC</i> -SS PCR 1	34
Tabelle 13: Primer <i>sacC</i> -SS Fragmente PCR 1	34
Tabelle 14: oePCR <i>sacC</i> -SS Schritt 1 und 2.....	35
Tabelle 15: PCR-Bedingungen α FSS _{Invitrogen} + <i>sacC</i>	36
Tabelle 16: Primer PCR α FSS _{Invitrogen} + <i>sacC</i>	36
Tabelle 17: Sequenzierprimer pEHvarA/B/C	36

Tabelle 18: Sequenzierprimer pEHvarA/B/CLevK	37
Tabelle 19: Ansatz epPCR-Ansatz	39
Tabelle 20: epPCR-Bedingungen	40
Tabelle 21: Belegung DWP-Platten.....	41
Tabelle 22: Ansatz Colony-PCR.....	45
Tabelle 23: Colony-PCR-Bedingungen	45
Tabelle 24: Primer	75

Abkürzungsverzeichnis

α FSS	alphaFSS27Aalone aus 0704534pGA4
α FSS _{Invitrogen}	α mating factor Signalsequenz von Invitrogen aus dem pPic9-Plasmid
α FSP	„ α Faktor Signalpeptid“: pre-Sequenz der α mating factor Signalsequenz
AGE	Agarose-Gelelektrophorese
bp	Basenpaare
c	Konzentration
c _{END}	Endkonzentration
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
DWP	Deep-Well-Platte
<i>E.coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo-H	Endoglycosidase H
epPCR	error prone PCR
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
LBA	Agarplatten: LB-Medium mit c = 100 μ g/ml Ampicillin
LBZ	Agarplatten: LB-Medium mit c = 25 μ g/ml Zeocin
MCS	multiple cloning site
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
Mini	Miniprep-Ansatz (siehe 2.1.3)
MSM-Platten	Minimal-Sucrose-Methanol-Platten
MTP	Mikrotiterplatte
<i>sacC</i> -SS	Sekretions-Signalsequenz der Levanase (<i>sacC</i>) aus <i>Bacillus subtilis</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm

ONC	„over night culture“: Zum Anzüchten von Zellen
oePCR	overlap extension PCR
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>P.pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>sacC</i>	Levanase Gen aus <i>Bacillus subtilis</i>
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese
SeSaM	Sequence Saturation Mutagenesis
Std	Standard
TCA	Trichloressigsäure
TUGraz	Technische Universität Graz
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
YNB	yeast nitrogen base
GS200	GS200 <i>aox1::uidAHis4 aox2::ARG4</i>

1 Einleitung

Bereits seit Jahrzehnten nimmt die Produktion von Fremdproteinen in heterologen Wirtssystemen immer mehr zu. Als vielversprechende Alternativen zur Gewinnung von Proteinen aus ihren natürlichen Wirtssystemen gewannen molekularbiologische und biotechnologische Methoden in den letzten Jahren stark an Bedeutung. Aufgrund der hohen Umsatzspannen vieler heterolog produzierter Proteine wurden großer Aufwand und viel Energie in die Weiter- und Neuentwicklung heterologer Wirtssysteme und der effizienten Produktion von Fremdproteine gesteckt [1].

Da viele dieser Proteine ursprünglich aus eukaryotischen Wirtssystem stammen, müssen die heterologen Wirtssysteme, in denen diese Proteine hergestellt werden sollen, einige grundlegende Kriterien erfüllen. Damit die Funktionalität der Proteine erhalten bleibt, müssen sie von dem Wirtsorganismus korrekt gebildet werden und die Prozessierung und Modifikationen müssen ähnlich wie im natürlichen Wirtssystem durchgeführt werden. Des Weiteren sollen die Produktion günstig und die Methoden einfach und sicher in ihrer Durchführung sein. Hefen haben sich in dieser Hinsicht als hervorragende Möglichkeit mit vielen Vorteilen gegenüber anderen eukaryotischen und prokaryotischen heterologen Wirtssystemen erwiesen. Sie wachsen auf günstigen Medien schnell zu hohen Zelldichten, sie sind genetisch leicht zu modifizieren und sind in der Lage, Fremdproteine zu modifizieren. Zusätzlich können sie Proteine in das Kulturmedium sekretieren, was die Aufreinigung der Proteine um ein Vielfaches einfacher macht, da kaum wirtseigenes Protein abgetrennt werden muss [2].

Die Gattungen *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* und *Torulopsis* gehören zu den sogenannten methylotrophen Hefen, die Methanol verstoffwechseln können [2]. Methylotrophe Hefen wurden ursprünglich von der Firma Phillips Petroleum Company zur Entwicklung von Tierfutter in Form von „Single Cell Protein“ genutzt [3], da das zum Wachstum benötigte Methanol vor der Ölkrise in den 70er Jahren als günstige C-Quelle zu haben war. Im Anschluss an die Krise verloren die methylotrophen Hefen diesen Vorteil und wurden zunächst nicht weiter beachtet, bis sie als heterologe Wirtssysteme für aus Eukaryoten stammende Proteine wieder an Bedeutung gewannen [2].

1.1 *Pichia pastoris* als Expressionssystem

Zu den methylotrophen Hefen zählt, wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, auch die Hefe *Pichia pastoris*. Nachdem die Phillips Petroleum Company zunächst versucht hatte, mit *P.pastoris* Tierfutter herzustellen, entwickelte sie gemeinsam mit der Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (SIBIA, La Jolla, CA) auf ihrer Basis

ein heterologes Expressionssystem [3]. Sie isolierten das Gen für die Alkoholoxidase (*AOXI*) und den dazugehörigen durch Methanol induzierbaren Promotor P_{AOXI} . Um *P.pastoris* erfolgreich als Expressionssystem nutzen zu können, entwickelten sie zusätzlich Protokolle, modifizierte Stämme und Vektoren. Sie kombinierten diese mit dem P_{AOXI} Promotor und den Fermentationsbedingungen der Single Cell Protein-Produktion und etablierten so ein sehr gut funktionierendes heterologes Expressionssystem. Phillips Petroleum Company verkaufte die Patente für das entwickelte Expressionssystem an die Research Corporation Technologies (Tucson, AZ, USA) und gestattete es der Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA), Teile davon zu vertreiben (*Pichia pastoris* Expression Kit) [3].

Dass das *P.pastoris* Expressionssystem bereits sehr effektiv genutzt worden ist, zeigte ein im Jahre 2005 veröffentlichter Artikel, nach dem bereits über 550 Fremdproteine, inklusive 180 eukaryotischer Proteine, mit Hilfe des *P.pastoris* Expressionssystem erfolgreich hergestellt worden waren [4]. Der Erfolg des Systems ist auf die vielen Vorteile zurückzuführen, die es bietet: Die genetische Modifikation von *P.pastoris* ist einfach und es liegen gut etablierte Protokolle vor. Mit dem P_{AOXI} -Promotor besitzt *P.pastoris* einen äußerst starken induzierbaren Promotor, mit dem die Expression heterologer Proteine leicht steuerbar wird. *P.pastoris* wächst auf günstigen Medien zu sehr hohen Zelldichten und ist in der Lage, fast alle Proteine zu sekretieren, so dass eine günstige Isolation und Aufreinigung des Proteins möglich wird [5].

1.1.1 Posttranslationale Modifikationen in *P.pastoris*

Einer der großen Vorteile *P.pastoris* gegenüber *Escherichia coli* ist die Fähigkeit zur posttranslationalen Modifikation heterolog exprimierter Proteine. Sie ist zu einer ganzen Reihe von translationalen Modifikationen fähig: Zur Prozessierung von Signalsequenzen, wie zum Beispiel der α mating factor Signalsequenz (siehe 1.2), der Proteinfaltung, der Ausbildung von Disulfidbrücken und sogar der O- und N-Glykosylierung. Die N-Glykosylierung findet in der Asn – X – Ser / Thr-Konsensussequenz statt. Es werden unterschiedlich viele Mannoseeinheiten aneinandergehängt, wodurch sich nicht vorhersagen lässt, bis zu welcher Kettenlänge die Glykosylierung voranschreiten wird. Anders als bei *Saccharomyces cerevisiae* findet eine Hypermannosylierung jedoch seltener statt. *P.pastoris* besitzt keine α -1,3 Mannosyl-Transferase Aktivität, kann daher keine α -1,3-Verknüpfungen zwischen den Mannoseresten durchführen und die von ihr exprimierten und modifizierten heterologen Proteine können leichter als therapeutische Agenzien eingesetzt werden [3, 19]. Die O-Glykosylierung wurde im Gegensatz zur N-Glykosylierung noch nicht so genau untersucht.

1.1.2 Mut⁺, Mut^S, Mut⁻

Aufgrund der starken methanolabhängigen Promotoren *P.pastoris* ist eine starke und gut steuerbare Expression von Fremdproteinen möglich. Diese Promotoren stammen von unterschiedlichen Proteinen des Methanol-Stoffwechselweges.

Dies trifft auch und vor allen Dingen auf den P_{AOX1}-Promotor aus *P.pastoris* zu [6]. Er reguliert die Expression des *AOX1* Gens, das eine Alkoholoxidase, das erste Enzym des Methanolstoffwechsels, codiert, welches Methanol zu Formaldehyd umsetzt [7]. Das *AOX1* Gen ist verantwortlich für ganze 5 % der mRNA und 30 % des Gesamtzellproteinhaushaltes. Ein zweites Gen *AOX2* codiert ebenfalls für eine Alkoholoxidase und besitzt eine fast identische Sequenz wie *AOX1*. Allerdings unterscheidet sich der dazugehörige Promotor P_{AOX2} deutlich von dem P_{AOX1}-Promotor [4, 8, 9, 10]. Der P_{AOX1}-Promotor ist um ein vielfaches stärker und für ungefähr 90 % der Alkoholoxidasen Aox1 und Aox2 in der Zelle verantwortlich. Nachgewiesen werden konnte dies 1989 von Cregg *et al.*, in dem er die beiden Promotoren miteinander vertauschte [9].

Insgesamt gibt es drei verschiedene Phenotypen in *P.pastoris*: Mut⁺, Mut^S, Mut⁻. Der erste Phenotyp Mut⁺ (methanol utilization plus phenotype) besitzt beide Gene *AOX1* und *AOX2* und kann normal auf Methanol wachsen. Der zweite Phenotyp Mut^S (methanol utilization slow phenotype) wächst langsamer auf Methanol. Das *AOX1* Gen wurde ausgeknockt, so dass ihm nur noch die durch *AOX2* codierte Alkoholoxidase unter Kontrolle des viel schwächeren P_{AOX2} Promotors geblieben ist. Bei dem letzten Phenotyp Mut⁻ wurden beide *AOX*-Gene ausgeknockt, so dass das Wachstum auf Methanol nicht länger möglich ist [8]. Zur Expression im großtechnischen Maßstab werden hauptsächlich Mut^S- und Mut⁻-Stämme herangezogen, da diese eine geringere Menge Methanol zur effektiven Induktion des P_{AOX1}-Promotors benötigen, was sich sowohl in den Kosten, als auch in der Sicherheit niederschlägt [11, 12].

1.1.3 P_{AOX1}-Promotor

Der P_{AOX1}-Promotor wird hauptsächlich aufgrund von zwei Eigenschaften für die Expression der meisten heterologen Proteine genutzt [13]. Zum einen handelt es sich beim P_{AOX1}-Promotor um einen sehr starken Promotor und es können sehr hohe Expressionsniveaus erreicht werden. Dies führt dazu, dass es sich – wie im vorigen Abschnitt erwähnt – bei bis zu 5 % der mRNA der Zelle und 30 % des Gesamtzellproteins um das Transkript und Protein des durch den P_{AOX1}-Promotor regulierten Gens handelt [4, 10]. Zum anderen wird der Promotor durch Glukose oder Glycerin so stark reprimiert, dass weder mRNA oder Protein nachzuweisen sind [12, 14]. Verschiedene andere C-Quellen wurden auf die Repression des Promotors getestet, unter anderem Sorbitol, welches jedoch nahezu keinen reprimierenden Effekt besitzt

[12, 15]. Während der Promotor unter dereprimierenden Bedingungen ungefähr 2 % der Aktivität unter induzierten Bedingungen besitzt, ist die Aktivität unter induzierten Bedingungen 1000 mal höher, als unter reprimierten Bedingungen [4, 16].

Die genaue Art der Regulation des Promotors durch Methanol ist bislang noch nicht bekannt [4]. Bisher konnte nur ein einziger Transkriptionsfaktor (MXR1) identifiziert werden, der in der *AOX1* Promotorregion bindet. In Zellen in denen dieser Transkriptionsfaktor fehlt, ist keine Induktion durch Methanol mehr möglich [17]. Dies zeigte Johnson *et al.* 1999 bei der Entwicklung von Klonen zum Screening für Peroxisomen-Biogenese defekte Mutanten.

Aufgrund des hohen Methanol-Verbrauchs in großtechnischen Anlagen, insbesondere bei Mut⁺-Stämmen, wurden mehrere unterschiedliche Promotoren als Alternative zum P_{AOX1}-Promotor isoliert und untersucht. Ein erfolgreiches Beispiel für einen solchen Promotor ist der GAP Promotor, der Promotor der Glycerinaldehyde 3-Phosphat Dehydrogenase. Er wurde 1997 von Waterham *et al.* [18] isoliert und wird zur konstitutiven Expression heterologer Proteine in *P.pastoris* benutzt [8]. Bei einigen Proteinen erreicht der GAP Promotor Expressionsniveau sogar das des P_{AOX1}-Promotors. Zwei weitere Beispiele wären der Formaldehyde Dehydrogenase Promoter P_{F_{LD1}} oder der Isocitrate Lyase Promoter P_{ICL1} [8].

1.2 α mating factor Signalsequenz

Die α mating factor Signalsequenz aus *S.cerevisiae* ist die meistgenutzte und effektivste Signalsequenz, die in *P.pastoris* Expressionssystemen zur Sekretion von heterologen Proteinen verwendet wird. In einigen Fällen werden Proteine mit der α mating factor Signalsequenz besser sekretiert, als mit ihrer eigenen natürlichen Signalsequenz [1]. Der α mating factor in *S.cerevisiae* besteht aus 165 Nucleotiden: Zunächst der Signalsequenz (85 Nucleotide), gefolgt von 4 α mating factor codierenden Regionen, unterbrochen von kurzen Spacersequenzen [3, 25]. Die α mating factor Signalsequenz, die sogenannte PrePro-Sequenz, besteht wiederum aus der Pre- (19 Nucleotide) und der Pro-Sequenz (66 Nucleotide). In der Pro-Sequenz sind neben drei N-Glykosylierungsstellen, eine KEX2-Protease- und eine Ste13-Protease-Schnittstellen codiert, damit das Signalprotein von dem zu sekretierenden Protein abgespalten werden kann [3]. Die Prozessierung der Signalsequenz erfolgt in drei Schritten: Zuerst wird die Pre-Sequenz im Endoplasmatischen Reticulum von einer Signalpeptidase abgespalten, dann folgt der Angriff der Kex2-Protease zwischen Arg-Lys und direkt danach der abschließende Schnitt durch die Ste13-Protease. Die Effektivität dieser Schritte hängt auch von der Umgebung ab, so schränkt ein in der Nähe gelegenes Prolin die Aktivität sowohl von der Kex2-, als auch von der Ste13-Protease ein [3].

Die in dieser Arbeit verwendete α mating factor Signalsequenz ist die von Michaela Prischl veränderte alphaFSS27Aalone-Sequenz [27], die aufgrund der Ergebnisse der Doktorarbeit von Sandra Majer designed wurde [24]. Sie beinhaltet das letzte Stück des P_{AOX1} -Promotors inklusive der *Hind*III-Schnittstelle. Das Start-ATG wurde so gewählt, dass es mit dem Start-ATG des *AOX1* Gens in *P.pastoris* übereinstimmt.

1.3 *Bacillus subtilis* Levanase

Bei der aus *Bacillus subtilis* stammenden Levanase handelt es sich um ein Enzym aus der Gruppe der β -D-Fructofuranosidasen. Enzyme dieser Gruppe können α -(1-2)-glycosidische Bindungen spalten, werden entsprechend ihres jeweiligen Substrates benannt, sind jedoch häufig in der Lage, mehr als nur ein Substrat spalten zu können. So spaltet die Levanase aus *B.subtilis* nicht nur Levan, sondern auch Sucrose und Inulin. Besonders interessant ist hierbei die Sucrose (siehe Abbildung 1), da sie in dieser Arbeit dazu genutzt wurde, um nach positiven Mutanten zu screenen.

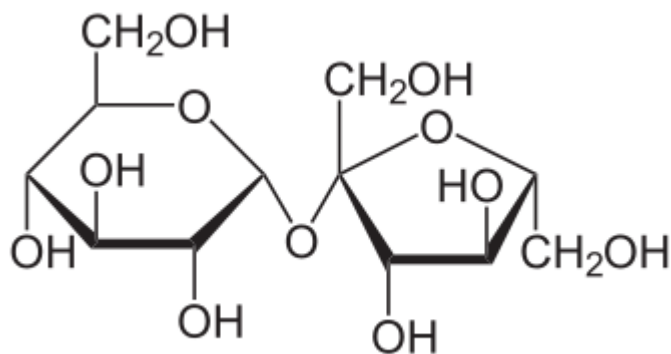


Abbildung 1: Sucrose [33]

Levanase wird von *B.subtilis* in das Kulturmedium sekretiert und das Gen ist unter den Namen *sacC*, *sacL* oder *lev* bekannt [20]. Bislang wurde sie erfolgreich in *E.coli*, *S.cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus casei* exprimiert [21, 22]. Das erste Mal wurde sie von Kunst *et al.* im Jahre 1977 untersucht [23]. Die erfolgreiche Expression und Sekretion von Levanase in *P.pastoris* und das erfolgreiche Wachstum von *P.pastoris* mit Sucrose als einziger C-Quelle konnten bereits 2004 von Sandra Majer in ihrer Doktorarbeit nachgewiesen werden. Dazu wurde die ursprüngliche Bakteriensignalsequenz durch die α mating factor Signalsequenz aus *S.cerevisiae* ersetzt [24].

1.4 Ziele

Ziel der Arbeit war die Fortführung der Arbeiten an der Entwicklung der lizenzfreien *P.pastoris* Plasmide pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl bzw. ihrer Gegenstücke ohne Sekretionsfaktor. Das zweite Ziel war die evolutionäre Weiterentwicklung der α mating factor Signalsequenz in *P.pastoris*.

1.4.1 Generieren der Plasmide

Der bequemen Handhabung des von Eva Hoffman erstellten Plasmids pEVAHis4SphI [26] halber sollten zwei Varianten des Plasmids generiert werden, mit denen es möglich ist, das Plasmid vor der Transformation in *P.pastoris* mit einem einzelnen Restriktionsenzym zu linearisieren. Dazu sollten eine Variante (pEHAOX1His4Sph), in der die *Bgl*III-Restriktionsschnittstelle gegen *Sph*I ausgetauscht werden sollte, und eine zweite Variante (pEHAOX1His4Bgl), in der die *Sph*I-Restriktionsschnittstelle gegen *Bgl*III ausgetauscht werden sollte, hergestellt werden. Damit die Plasmide auch die Sekretion von heterologen Proteinen ermöglichen, sollten zusätzlich eine dritte und eine vierte Plasmidvariante generiert werden: pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl. Diese sollten neben den ausgetauschten Restriktionsschnittstellen die von Michaela Prischl von Geneart geordnete α FSS alphaFSS27Aalone [27] enthalten und so die Sekretion des heterologen Proteins in *P.pastoris* ermöglichen.

1.4.2 Verbesserung der α mating factor Signalsequenz in *Pichia pastoris*

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die alphaFSS27Aalone-Sequenz in *P.pastoris* verbessert werden, so dass ein signifikant erhöhtes Sekretionsniveau in das umgebende Kulturmedium erreicht werden würde. Aus einer Variantenbibliothek sollten mit Hilfe eines Levanase Selektions- und Screening-Systems positive Mutanten isoliert und identifiziert werden. Zur Kontrolle sollten drei Referenzplasmide konstruiert werden, um so einen Vergleich zu weiteren Signalsequenzen ziehen zu können. Es wurden die folgenden Signalsequenzen gewählt: Die α mating factor Signalsequenz aus dem pPIC9-Plasmid von Invitrogen, die natürliche Levanase-Signalsequenz und die Pre-Sequenz der α mating factor Signalsequenz aus *S.cerevisiae*.

2 Methoden und Materialien

2.1 Allgemeine Methoden

2.1.1 Anzüchten von Zellen (ONC)

Material:

- 30 ml LB-Medium bzw. 30 ml YPD-Medium (siehe 4.6.2)
- Antibiotika (siehe 4.2)

Durchführung:

- a. *E.coli* K12 X11-blue und *E.coli* K12 Top10F

Zum Anzüchten der *E.coli*-Stämme wurden 30 ml LB-Medium mit einer Antibiotikakonzentration von $c_{\text{Ampicillin}} = 100 \mu\text{g/ml}$ oder $c_{\text{Zeocin}} = 25 \mu\text{g/ml}$ hergestellt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde das Medium in einem Falcon-Röhrchen mit dem entsprechenden Stamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler des Typs AG20 der Firma Infors HT bei 110 rpm inkubiert.

- b. *P.pastoris* GS200 aox1::uidAHis4 aox2::ARG4

Zum Anzüchten des *P.pastoris*-Stammes GS200 aox1::uidAHis4 aox2::ARG4 wurden 30 ml YPD in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben mit dem Stamm beimpft und über Nacht bei 30 °C im Schüttler des Typs AG20 der Firma Infors HT bei 110 rpm inkubiert.

2.1.2 Glycerolstocks

Material:

- 2 x Glycerol (4.6.1)
- ONC

Durchführung:

500 ml der ONC wurden mit 500 μl des 2 x Glycerol gemischt und bei -80 °C eingefroren.

2.1.3 Miniprep Plasmidisolierung

Die Plasmide wurden mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas isoliert. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf Centrifuge 5415R mit

dem Rotor F45-24-11 mit 13000 rpm durchgeführt. Pro zu isolierendem Plasmid wurden von der jeweiligen ONC 2 Glycerolstocks hergestellt und 2 Minipreps durchgeführt.

Material:

- GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
- ONC

Durchführung:

Am Vorabend der Plasmidisolierung wurde pro Plasmid ein ONC angesetzt. Pro Miniprep-Ansatz wurden 10 ml ONC in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert. Dazu wurde 10-mal hintereinander 1 ml 1 min in dasselbe Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert und der Überstand direkt nach dem Zentrifugationsschritt und vor dem nächsten verworfen. Die Pellets der Minipreps (aus jeweils 10 ml ONC) wurden in 250 µl Resuspension Solution resuspendiert und mit 250 µl Lysis Solution durch 6-maliges Invertieren vorsichtig durchmischt. Anschließend wurden 350 µl Neutralization Solution hinzupipettiert und erneut durch 6-maliges Invertieren vorsichtig vermischt. Die Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden durch 10 min Zentrifugation abgetrennt, der Überstand in GeneJET™ spin columns überführt und die DNA durch 1 min Zentrifugation auf die Säule aufgetragen. Nach 2-maligem Waschen mit 500 µl Wash Solution und je einem Zentrifugationsschritt von 1 min wurden die GeneJET™ spin columns 2 min leer zentrifugiert, um alle Reste an EtOH von der Säule zu entfernen. Die Säulen wurden in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße gesetzt und 50 µl H₂O_{dest} auf die Säulen aufgetragen. Nach 15 min Inkubation wurde das Plasmid durch 1 min Zentrifugation eluiert und anschließend die Konzentration aller Plasmidlösungen durch Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Material:

- 6X MassRuler™ DNA Loading Dye (Fermentas)
- O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use (Fermentas)
- SUB-CELL® GT (Bio-Rad)
- PowerPac-Basic (Bio-Rad)
- TAE-Puffer (siehe 4.6.1)

Durchführung:

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA-Proben wurde ein 1 % Agarosegel mit 0,0015 % EtBr hergestellt. Dazu wurde 1 g Agarose in 200 ml 1 x TAE-Puffer gelöst

und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die gesamte Agarose gelöst hatte. Die Agaroselösung wurde auf Handtemperatur heruntergekühlt und 3 µl EtBr-Lösung hinzupipettiert. Die Lösung wurde in die Gießform gefüllt und 2 Kämmen mit je 20 Taschen hineingesteckt. Die Gelkammer wurde mit 2200 ml 1 x TAE-Puffer befüllt und das erstarrte Gel hineingegeben. Die Proben für die Gelelektrophorese wurden wie folgt vorbereitet:

- 1 µl DNA-Probe
- 2 µl 6X MassRuler™ DNA Loading Dye
- 9 µl H₂O

Zusätzlich zu den Proben wurden in die erste Tasche 5 µl (0,5 µg DNA) des O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use aufgetragen. Das Gel wurde mit 120 V für 60 min gefahren, anschließend mit Hilfe des GelDoc-It™ Imaging System der Firma UVP fotografiert und die Konzentration der DNA-Proben mit Hilfe des Standards abgeschätzt.

2.1.5 DNA-Präparation aus dem Agarosegel

Zur Präparation von PCR- und Restriktionsansätzen wurde das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System der Firma Promega verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden in der Eppendorf Tischzentrifuge Centrifuge 5415R mit dem Rotor F45-24-11 durchgeführt. Bei dem Thermomixer handelte es sich um den Thermomixer comfort der Firma Eppendorf.

Material:

- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
- DNA-Proben

Durchführung:

Der PCR- bzw. Restriktionsansatz wurden mit 6X MassRuler™ DNA Loading Dye für die AGE vorbereitet und auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen. Dieses wurde auf dieselbe Weise hergestellt wie ein Agarosegel zur Konzentrationsbestimmung (siehe 2.1.4), mit der Ausnahme, dass Kämmen mit 10 Taschen verwendet wurden, da jeweils der gesamte Ansatz in eine Tasche aufgetragen werden musste. Das Agarosegel wurde 90 min bei 90 V gefahren, mit UV-Licht bestrahlt und die fluoreszierenden DNA-Banden mit einem Skalpell herausgeschnitten. Diese wurden in zuvor austarierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen gewogen und pro 10 mg Gelbande 10 ml Membrane Binding Solution des Kits hinzupipettiert. Die Ansätze wurden 10 min bei 55 °C im Thermomixer inkubiert um die Gelbanden vollständig zu lösen. Eine SV Minicolumn wurde in ein Collection Tube gesetzt und die DNA-Lösung auf die SV Minicolumn

durch 1 min Zentrifugation aufgetragen. Es durften jedoch nicht mehr als 350 mg Gel mit 350 µl Membrane Binding Solution pro Zentrifugationsschritt auf eine einzige SV Minicolumn und insgesamt nicht mehr als 10 µg DNA aufgetragen werden. Waren es mehr als 700 µl Gelbande/Membrane Binding Solution-Gemisch, wurden mehrere Zentrifugationsschritte hintereinander geschaltet. Anschließend folgte ein Waschschriff mit 700 µl Membrane Wash Solution und einer Zentrifugation von 1 min. Der Durchfluss wurde verworfen und ein Waschschriff mit 500 µl Membrane Wash Solution und einer 5 min Zentrifugation angeschlossen. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Ansätze 2 min leer zentrifugiert. Die SV Minicolumns wurden in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße gesetzt, die Collection Tubes verworfen und die DNA mit 50 µl H₂O_{dest} durch Zentrifugation von 1 min eluiert. Vor der Elution wurde der Ansatz mit dem zupipettierten H₂O_{dest} 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.1.6 Restriktion von DNA

Material:

- Restriktionsenzyme (siehe 4.3)
- 10 x Puffer (Fermentas) [34]
- Template-DNA (PCR-Fragment, Plasmid)

Durchführung:

Pro 1 µg Template-DNA wurden 0,5 µl jedes an der Reaktion beteiligten Restriktionsenzym (c_{End} = 5 U/µg) eingesetzt. Insgesamt durften pro Ansatz nicht mehr als 10 % Enzym und kein Volumen größer als 100 µl gewählt werden. Der Puffer für eine Doppelrestriktion kann auf der Homepage der Firma Fermentas mit Hilfe des Tools „DoubleDigest™“ nachgeschlagen werden [34]. Der Ansatz wurde mit H₂O_{dest} auf das Endvolumen aufgefüllt und über Nacht für 14 bis 16 h bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Restriktionsansätze entweder durch EtOH-Fällung (siehe 2.1.8) oder über AGE aufgereinigt (siehe 2.1.5).

2.1.7 Ligation

Material :

- T4 DNA Ligase 3 U/µl (Promega)
- 10 x T4 Ligase Puffer (Promega)
- Geschnittene DNA (Plasmid + Insert, siehe 2.1.6)

Durchführung:

Pro Ligationsansatz wurden 100 ng Plasmid und für jedes Plasmidmolekül 5 Moleküle Insert eingesetzt. Die notwendige Menge Insert-DNA wurde mit folgender Formel berechnet:

$$m_{\text{Insert}} = (L_{\text{Insert}} / L_{\text{Vektor}}) / m_{\text{Vektor}} * 5$$

$$L_{\text{Insert}} = \text{Länge des Insert in Basenpaaren}$$

$$L_{\text{Vektor}} = \text{Länge des Plasmid in Basenpaaren}$$

$$m_{\text{Vektor}} = 100 \text{ ng}$$

Die Ligationsansätze wurden folgendermaßen zusammenpipettiert:

Tabelle 1: Zusammensetzung Ligationsansatz

	Volumen	c_{End}
T4 Ligase Puffer	2	1 x
Plasmid	je nach Konzentration	100 ng
Insert-DNA	je nach Konzentration	5 Insert / 1 Plasmid
T4 DNA Ligase	1	0,15 U/μl
H ₂ O _{dest}	auf 20 μl auffüllen	-

Zusätzlich zu jedem Plasmid, das ligiert wurde, wurde ein Religationsansatz zur Kontrolle der Restriktion des Plasmids angesetzt, in dem keine Insert-DNA eingesetzt wurde und das fehlende Volumen durch H₂O_{dest} ersetzt wurde. Die Ansätze wurden 1 h bei 22 °C inkubiert, die Ligase anschließend 20 min bei 65 °C inaktiviert und die Ansätze direkt im Anschluss in *E.coli* K12 X11-blue transformiert (siehe 2.1.10).

2.1.8 EtOH-Fällung

Die Zentrifugationsschritte wurden mit der Eppendorf Centrifuge 5415 R mit dem Rotor F 45-24-11 mit 13000 rpm durchgeführt.

Material:

- DNA-Lösung (PCR- oder Restriktionsansatz)
- 96 % EtOH
- 70 % EtOH
- 3 M Natriumacetat

Durchführung:

Um die DNA zu fällen, wurden zu der DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 96 % EtOH zugegeben und gemischt. Diese Lösung wurde über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die DNA wurde durch 45 min Zentrifugation in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette entfernt, das Pellet in 150 µl 70 % EtOH resuspendiert und erneut für 30 min zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt, der Überstand entfernt und die DNA-Pellets im geöffneten Eppendorf-Reaktionsgefäß im Thermomixer comfort der Firma Eppendorf bei 50 °C getrocknet. Das Pellet wurde im gewünschten Volumen H₂O_{dest} gelöst.

2.1.9 Herstellung elektrokompetenter *E.coli*-Zellen

Alle Zentrifugationsschritte bis auf den letzten wurden in einer zuvor auf 4 °C heruntergekühlten Avanti™ J-20 XP Centrifuge der Firma Beckman Coulter mit einem JA-10 Rotor der Firma Beckman Coulter durchgeführt. Der letzte Zentrifugationsschritt mit 4000 rpm wurde in einer Eppendorf Centrifuge 5810 R mit einem Eppendorf A-4-62 Rotor durchgeführt. Die OD₆₀₀ wurde mit einem Beckman Coulter DU® 800 Spectrophotometer gemessen.

Material:

- LB-Medium (siehe 4.6.2)
- Steriles H₂O_{dest}, eiskalt
- 10 % Glycerol (2 x Glycerol (siehe 4.6.1) 1:2 verdünnt mit H₂O_{dest}, eiskalt)
- Flüssiger Stickstoff

Durchführung:

Am Vorabend wurde eine Vorkultur – 50 ml LB – *E.coli* K12 X11-blue gestartet und über Nacht bei 37 °C und 110 rpm in einem Schüttler des Typs AG20 der Firma Infors HT inkubiert. Vier Hauptkulturen – je 400 ml LB Medium – wurden mit 2,5 ml der Vorkultur beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 herangezüchtet. Die Kulturen wurden 30 min auf Eis inkubiert und die Zellen durch 30 min Zentrifugation mit 2500 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und es folgten drei Waschschriffe mit eiskaltem H₂O_{dest}: Die Pellets wurden in 400 ml, 250 ml und in 100 ml vorsichtig auf Eis resuspendiert, die Zellen 20 min mit 2000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden im Anschluss gemeinsam vorsichtig in 40 ml eiskaltem 10 % Glycerol resuspendiert und 30 min mit 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml 10 % Glycerol aufgenommen, zu je

85 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Transformation gelagert.

2.1.10 Transformation in *E.coli*

Die Elektroporation wurde mit einem BIO-RAD Micropulser™ durchgeführt, die „Elektroporationsküvetten, 2m Artikelnummer 748020“ stammten von der Firma Biozyme. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis getätigt.

Material:

- Elektrokompente *E.coli* K12 X11-blue-Zellen (siehe 2.1.9)
- Plasmid-DNA oder Ligationsansatz
- LB-Medium (siehe 4.6.2)
- Agarplatten (siehe 4.6.2)

Durchführung:

Pro Transformationsansatz wurden entweder 1 µl Plasmid-DNA oder 20 µl Ligationsansatz mit 40 µl elektrokompenten *E.coli* K12 X11-blue-Zellen vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und mit dem Programm „bacteria: Ec2“ elektroporiert. Es wurde sofort 1 ml LB-Medium hinzugegeben, der Ansatz in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß dekantiert und 1 h bei 37 °C im Eppendorf Thermomixer comfort regeneriert. Dann wurden 50 µl, 100 µl und 150 µl pro Ansatz auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Antibiotika wurden entsprechend dem Plasmid gewählt.

2.1.11 Transformation in *P.pastoris*

Die *P.pastoris*-Transformation wurde nach dem Condensed protocol von Lin-Cereghino et al. [29] durchgeführt. Die Zentrifugationsschritte wurden mit einer Eppendorf Centrifuge 5810 R mit einem Eppendorf A-4-62 Rotor, die Elektroporation mit einem BIO-RAD Micropulser™ und Elektroporationsküvetten, 2m Artikelnummer 748020 der Firma Biozyme durchgeführt. Die OD₆₀₀ wurde mit einem Beckman Coulter DU® 800 Spectrophotometer gemessen.

Material:

- *P.pastoris* GS 200
- YPD-Medium (siehe 4.6.2)
- BEDS (siehe 4.6.1)

- 1 M DTT (siehe 4.6.1)
- 1 M Sorbitol (siehe 4.6.1)
- Linearisierte Plasmid-DNA
- MSM-Platten (siehe 4.6.2)

Durchführung:

Eine 50 ml YPD-Vorkultur wurde mit *P.pastoris* GS 200 angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 110 rpm in einem Schüttler des Typs AG20 der Firma Infors HT inkubiert. Die Hauptkultur – 50 ml YPD – wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,2 gestartet und für ca. 4 bis 5 h bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 inkubiert. Die Zellen wurden 10 min mit 4000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 9 ml BEDS mit 1 ml 1 M DTT vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 30 °C inkubiert und erneut 5 min mit 4000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml BEDS resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Transformation auf Eis gelagert.

4 µl linearisierte Plasmid-DNA (ca. 500 bis 1000 ng) wurde mit 80 µl der kompetenten *P.pastoris*-Zellen gemischt, 5 min auf Eis inkubiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Ansätze wurden mit dem Programm „yeast: Pic“ elektroporiert und es wurde sofort 1 ml YPD/Sorbitol-Gemisch (50 % YPD, 50 %, 1 M Sorbitol) hinzugegeben. Die Ansätze wurden in sterile Eppendorf-Reaktionsküvetten dekantiert und 1 h bei 30 °C regeneriert. Es wurden pro Ansatz jeweils 50 µl, 100 µl und 150 µl auf MSM-Platten ausplattiert und die Platten 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2 Generieren der Plasmide pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl

Um die Plasmide pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl zu generieren, mussten zunächst die Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Sph*I in pEVAHis4SphI gegeneinander ausgetauscht werden. Dann wurde die veränderte α mating factor Signalsequenz (alphaFSS27Aalone) aus dem 0704534pGA4-Plasmid (siehe 4.8.7) in die neu generierten Plasmide pEHAOX1His4Sph und pEHAOX1His4Bgl integriert.

2.2.1 Austausch *Bgl*II gegen *Sph*I und *Sph*I gegen *Bgl*II

Im ersten Schritt wurden die beiden Plasmidvarianten generiert, in denen in der ersten Variante pEHAOX1His4Sph die *Bgl*II-Restriktionsschnittstelle gegen *Sph*I und in der zweiten Variante pEHAOX1His4Bgl die *Sph*I-Restriktionsstelle gegen *Bgl*II ausgetauscht wurden. Dazu wurden Fragmente mit ausgetauschter Restriktionsschnittstelle hergestellt, geschnitten und in das Plasmid ligiert. Die beiden

Fragmente (pEHAOX1His4Sph: Fragment 3a, pEHAOX1His4Bgl: Fragment 3b; siehe Abbildung 2 und Abbildung 3) wurden durch overlap extension PCR (oePCR) hergestellt und amplifiziert.

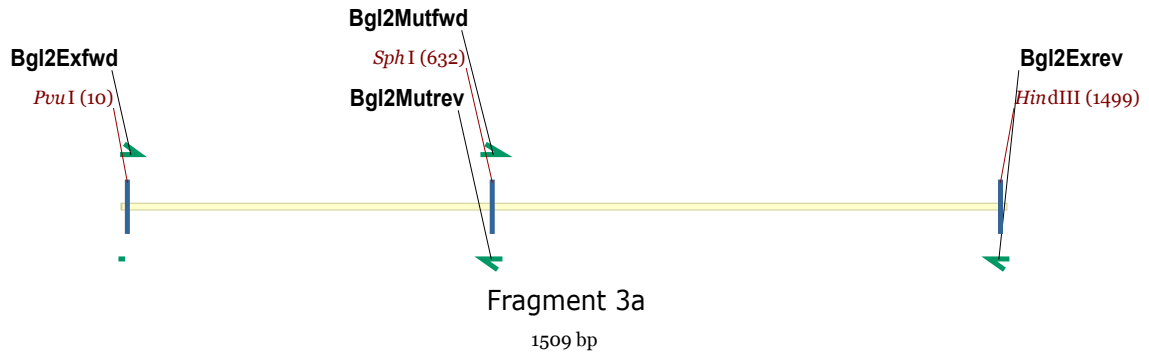


Abbildung 2: Fragment 3a mit ausgetauschter Restriktionsschnittstelle und Primern

Zielsequenz mit angrenzender Umgebung:

Vor dem Austausch: ACGAGGCCCTTTCGTCAGATCTAACATCCA (*BglII*)

Nach dem Austausch: ACGAGGCCCTTTCGTCGCATGCAACATCCA (*SphI*)

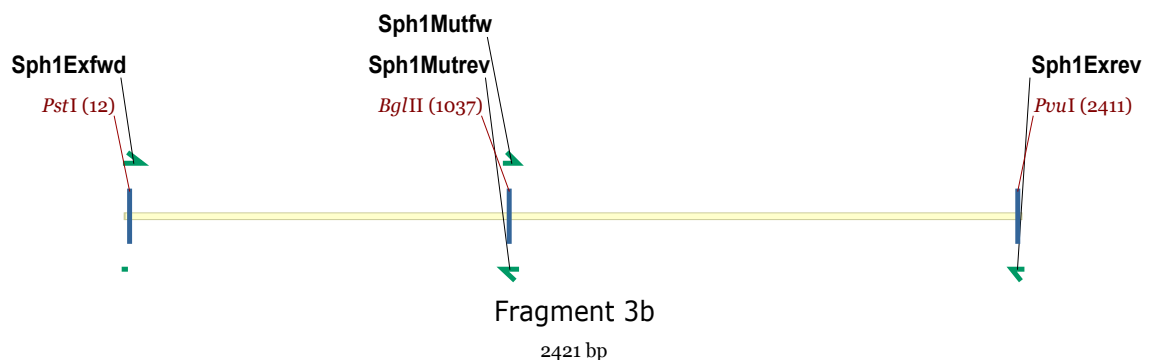


Abbildung 3: Fragment 3b mit ausgetauschter Restriktionsschnittstelle und Primern

Zielsequenz mit angrenzender Umgebung:

Vor dem Austausch: GTGAAATTTATCTCAGCATGCTCACTGAC (*SphI*)

Nach dem Austausch: GTGAAATTTATCTCAAGATCTTCACTGACT (*BglII*)

2.2.1.1 oePCR

Material:

- Phusion™ High Fidelity Polymerase, 2U/μl (Finnzymes)
- 5 x HF-Puffer (Finnzymes)

- 2,5 mM dNTP (siehe 4.6.1)
- Primer (siehe 4.7)
- pEVAHis4SphI (siehe 4.8.1)

Durchführung:

Die oePCR bestand aus 2 Teilschritten: Zunächst der Amplifikation der Teilfragmente 1a und 2a (Austausch *Bgl*III) bzw. 1b und 2b (Austausch *Sph*I) durch eine gewöhnliche PCR und anschließend der eigentlichen oePCR, dem Aneinanderlagern der Teilfragmente 1a/1b und 2a/2b und der Amplifikation der Gesamtfragmente 3a und 3b. Die oePCR wurden mit dem GeneAmp® PCR System 2700 der Firma AB Applied Biosystems durchgeführt.

Die Zusammensetzung der Ansätze zum Austausch der *Bgl*III und *Sph*I-Restriktionsschnittstellen für die Amplifikation der Ausgangsfragmente 1 und 2 und die Bedingungen für die PCR waren wie folgt:

Tabelle 2: Ansatz PCR Fragmente 1+2

	Volumen [µl]	c_{End}
5 x HF Phusion Buffer	10	1 x
2,5 mM dNTP	4	200 µM
pEVAHis4SphI	je nach Konzentration	100 ng / Ansatz
Primer A, 5 µM	5	0,5 µM
Primer B, 5 µM	5	0,5 µM
Phusion Polymerase	1	0,04 U/µl
H ₂ O	auf 50 µl auffüllen	-

Tabelle 3: PCR-Bedingungen Fragmente 1+2

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturieren	98 °C	30 s	1 x
Denaturieren	98 °C	10 s	30 x
Annealing	58 °C	20 s	
Elongation	72 °C	25 s	
Elongation	72 °C	7 min	1 x

Lagerung	4 °C	∞	1 x
----------	------	---	-----

Die Primer, die für diese PCR verwendet wurden, können Tabelle 4 entnommen werden:

Tabelle 4: Primer Schnittstellenaustausch PCR 1

Variante	Sequenz	Primer A	Primer B
pEHAOX1His4Sph	<i>Bgl</i> II zu <i>Sph</i> I: Fragment 1a	Bgl2Exfwd	Bgl2Mutrev
	<i>Bgl</i> II zu <i>Sph</i> I: Fragment 2a	Bgl2Mutfwd	Bgl2Exrev
pEHAOX1His4Bgl	<i>Sph</i> I zu <i>Bgl</i> II: Fragment 1b	Sph1Exfwd	Sph1Mutrev
	<i>Sph</i> I zu <i>Bgl</i> II: Fragment 2b	Sph1Mutfw	Sph1Exrev

Die Fragmente wurden über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und die Konzentration über AGE abgeschätzt. Die Fragmente 1 und 2 wurden in der folgenden oePCR genutzt, um das vollständige DNA-Fragment Fragmente 3 zu produzieren und zu amplifizieren. Die Konzentration aller Komponenten wurde im Voraus so gewählt, dass sie im zweiten oePCR-Schritt wieder in der richtigen Konzentration vorlagen:

Tabelle 5: Ansatz oePCR

	Volumen [µl]	c _{End}
5 x HF Phusion Buffer	8	1 x
2,5 mM dNTP	4	250 µM
Fragment 1	je nach Konzentration	100 ng / Ansatz
Fragment 2	je nach Konzentration	100 ng / Ansatz
Phusion Polymerase	1	0,05 U/µl
H ₂ O	auf 40 µl auffüllen	-

Tabelle 6: oePCR Schritt 1

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturieren	98 °C	3 min	1 x
Denaturieren	98 °C	30 s	6 x

Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	4 min	
Elongation	72 °C	1 s	1 x

Direkt im Anschluss an den ersten oePCR-Schritt wurden jeweils 5 µl der beiden Primer (c = 5 µM, siehe Tabelle 8) zu dem Ansatz pipettiert und der zweite oePCR-Schritt gestartet. Die Primer wurden zuvor in 1 x HF-Puffer verdünnt.

Tabelle 7: oePCR Schritt 2

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturieren	98 °C	3 min	1 x
Denaturieren	98 °C	30 s	18x
Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	5 min s	
Elongation	72 °C	10 min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	1 x

Tabelle 8: Primer oePCR Schritt 2

Sequenz	Primer A	Primer B
<i>BglII</i> zu <i>SphI</i>	Bgl2Exfwd	Bgl2Exrev
<i>SphI</i> zu <i>BglII</i>	Sph1Exfwd	Sph1Exrev

2.2.1.2 Austausch der Restriktionsschnittstellen

Im nächsten Schritt wurden die Fragmente 3a und 3b und das Plasmid pEVAHis4LevK geschnitten und miteinander ligiert.

Für die erste Variante pEHAOX1His4Sph wurden Fragment 3a und das pEVAHis4SphI-Plasmid mit *PvuI* und *HindIII* geschnitten, für die zweite Variante pEHAOX1His4Bgl Fragment 3b und pEVAHis4SphI mit den Restriktionsenzymen *PvuI* und *PstI*. Die Restriktionsansätze wurden über AGE aufgereinigt, kontrolliert und zur Ligation verwendet. Die Ligationsansätze wurden direkt im Anschluss in *E.coli* K12 X11-blue transformiert. Das pEVAHis4SphI-Plasmid wurde vor dem letzten Schritt durch Miniprep Plasmidisolierung aus *E.coli* K12 Top10F isoliert.

2.2.1.3 Kontrolle der Plasmide pEHAOX1His4Sph und pEHAOX1His4Bgl

Um sicher zu gehen, dass die Restriktionsschnittstellen korrekt ausgetauscht wurden, und um Mutationen durch die oePCR auszuschließen, wurden die Plasmide durch einen Kontrollrestriktionsansatz und durch Sequenzierung der amplifizierten Regionen überprüft.

Pro Plasmidvariante wurden zwei Kolonien der Transformation ausgewählt, die näher isoliert und die Konzentration mittels AGE bestimmt. pEHAOX1His4Sph wurde mit *SphI* und pEHAOX1His4Bgl mit *BglII* geschnitten und die Fragmente über AGE überprüft. Zusätzlich wurden beide Plasmide zur Sequenzierung bei AGOWA genomics [37] eingeschickt. Pro Ansatz wurden 10 µl Plasmid (ca. 100 ng/µl) mit 4 µl 5 µM Primer (siehe Tabelle 9) eingeschickt:

Tabelle 9: Sequenzierprimer pEHAOX1His4Sph/Bgl

Variante	Sequenzierrichtung	Primer
pEHAOX1His4Sph	5' -> 3'	seq8for
	3' -> 5'	seq1rev
pEHAOX1His4Bgl	5' -> 3'	seq4for
	3' -> 5'	seq4rev

2.2.2 Integration der α mating factor signal sequence

Um pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl zu generieren, wurde die α FSS aus dem 0704534pGA4-Plasmid in die zuvor hergestellten Plasmide ligiert.

2.2.2.1 Ligation der α mating factor signal sequence

Die Plasmide pEHAOX1His4Sph, pEHAOX1His4Bgl und 0704534pGA4 wurden mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *NotI* geschnitten, anschließend die α FSS mit den beiden Plasmiden ligiert und die Ligationsansätze direkt in *E.coli* K12 X11-blue transformiert.

2.2.2.2 Kontrolle der Plasmide pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl

Da die α FSS aus 0704534pGA4 mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten und nicht mittels PCR amplifiziert wurde, reichte zur Kontrolle der Plasmide ein einfacher Restriktionsansatz aus. Die beiden Plasmide wurden mit *HindIII* und *NotI* geschnitten und die Fragmente über AGE kontrolliert.

2.3 Generieren der Referenzplasmide

Als Referenzplasmide wurden 3 Plasmidvarianten des pEHAOX1 α His4BglLevK-Plasmides generiert: pEHvarALevK, pEHvarALevK und pEHvarALevK.

2.3.1 pEHvarA

In der pEHvarA-Variante wurde die Pre-Sequenz der α FSS mit pEHAOX1His4Bgl ligiert.

2.3.1.1 PCR α FSS

Die PCR wurde im GeneAmp® PCR System 2700 der Firma AB Applied Biosystems durchgeführt.

Material:

- Phusion™ High Fidelity Polymerase, 2U/ μ l (Finnzymes)
- 5 x HF-Puffer (Finnzymes)
- 2,5 mM dNTP (siehe 4.6.1)
- Primer (siehe 4.7)
- pEHAOX1 α His4SphI (siehe 2.2)
- pEHAOX1His4Bgl (siehe 2.2)

Durchführung:

Da die Pre-Sequenz sehr kurz ist und nur aus 19 Aminosäuren besteht, wurden die Primer aFSPfwd und aFSPrev (siehe 4.7) für die PCR so gewählt, dass der Bereich von der *SacI*-Restriktionsschnittstelle upstream der α FSS im P_{AOX1} -Promotor bis Ende der Pre-Sequenz des pEHAOX1 α His4SphI-Plasmid amplifiziert wurde.

Tabelle 10: Zusammensetzung PCR-Ansätze

	Volumen [μ l]	c _{End}
5 x HF Phusion Buffer	10	1 x
2,5 mM dNTP	4	200 μ M
Template DNA	je nach Konzentration	100 ng / Ansatz
Primer A, 5 μ M	5	0,5 μ M
Primer B, 5 μ M	5	0,5 μ M
Phusion Polymerase	1	0,04 U/ μ l

H ₂ O	auf 50 µl auffüllen	-
------------------	---------------------	---

Die PCR wurde mir folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 11: PCR-Bedingungen α FSP

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturieren	98 °C	30 s	1 x
Denaturieren	98 °C	10 s	30 x
Annealing	62 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Elongation	72 °C	10 min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	1 x

Im Anschluss an die PCR wurde der PCR-Ansatz über AGE aufgereinigt und die Konzentration des α FSP-Insert und des pEHAOX1His4Bgl-Plasmids durch AGE abgeschätzt. Das Plasmid und das Insert wurden über Nacht mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *NotI* verdaut, wiederum über AGE aufgereinigt und die Konzentration abgeschätzt. Im Anschluss wurden das α FSP und pEHAOX1His4Bgl miteinander ligiert und direkt danach in *E.coli* K12 X11-blue transformiert.

2.3.1.2 Kontrolle des pEHvarA-Plasmids

pEHvarA wurde mittels Miniprep isoliert, die Konzentration durch ein Agarosegel abgeschätzt und das Plasmid gemeinsam mit den beiden anderen Referenzplasmiden zur Sequenzierung zu AGOWA genomics [37] eingeschickt (siehe 2.3.2.3).

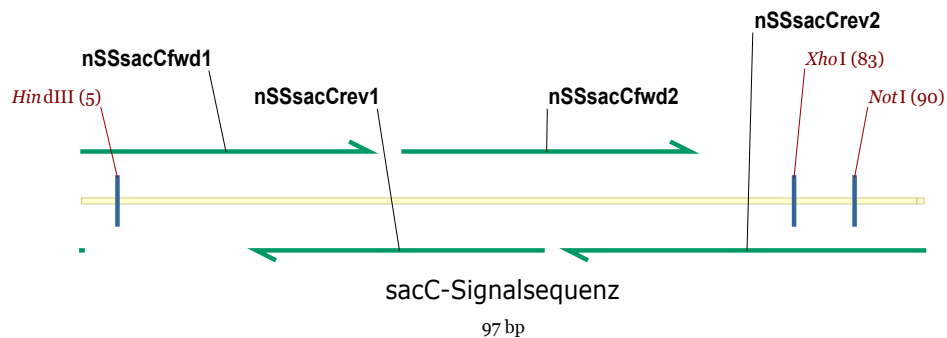
2.3.2 pEHvarB und pEHvarC

Die beiden anderen Referenzplasmide waren pEHvarB und pEHvarC. pEHvarB enthielt die natürliche Levanase Signalsequenz *sacC*-SS und pEHvarC die α mating factor Signalsequenz α FSS_{Invitrogen} aus pPIC9 der Firma Invitrogen.

Die *sacC*-SS wurde durch eine oePCR generiert, die α FSS_{Invitrogen} durch eine gewöhnliche PCR aus dem Plasmid pPic9 amplifiziert.

2.3.2.1 oePCR *sacC*-SS

Die *sacC*-SS wurde gänzlich ohne Template-DNA nur durch Annealing und Amplifikation der bestellten Primer hergestellt (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: *sacC*-Signalsequenz

sacC-SS:

aagcttatgaaaaagagactgattcaagtcgatcatgatggtccacctgctggttgactatggcattttcgg
cagatgcactcgaggcgccgc (*HindIII*, *XhoI*, *NotI*)

Der Ansatz, um die Fragmente 1 und 2 zu amplifizieren, entspricht dem in Tabelle 10 aufgeführten Ansatz, mit der Ausnahme, dass keine Template-DNA eingesetzt wurde. Die PCR-Bedingungen und Primer können den beiden folgenden Tabellen entnommen werden:

Tabelle 12: oePCR-Bedingungen *sacC*-SS PCR 1

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturieren	98 °C	30 s	1 x
Denaturieren	98 °C	10 s	30 x
Annealing	58 °C	20 s	
Elongation	72 °C	35 s	
Elongation	72 °C	10 min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	1 x

Tabelle 13: Primer *sacC*-SS Fragmente PCR 1

Sequenz	Primer A	Primer B
Fragment 1	nSSsacCfwd1	nSSsacCrev1
Fragment 2	nSSsacCfwd2	nSSsacCrev2

Der zweite oePCR-Schritt wurde wie in Abschnitt 2.2.1.1 (Ansatz siehe Tabelle 5) geschildert mit den PCR-Bedingungen laut Tabelle 14 durchgeführt. Als Primer wurden nSSsacCfwd1 und SSSacCrev2 (jeweils $c = 5 \mu\text{M}$) verwendet:

Tabelle 14: oePCR *sacC*-SS Schritt 1 und 2

PCR-Schritt 1	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturieren	98 °C	3 min	1 x
Denaturieren	98 °C	30 s	6 x
Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 s	1 x
PCR-Schritt 2	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturieren	98 °C	3 min	1 x
Denaturieren	98 °C	30 s	18 x
Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	10 min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	1 x

Die fertigen *sacC*-SS-Sequenzen wurden über AGE aufgereinigt und die Konzentration abgeschätzt. Die *sacC*-SS und das pEHAOX1His4Bgl-Plasmid wurden mit *Hind*III und *Not*I geschnitten, die *sacC*-SS durch EtOH-Fällung aufgereinigt, pEHAOX1His4Bgl durch AGE, die gefällte *sacC*-SS direkt im Ligationsansatz aufgenommen, mit pEHAOX1His4Bgl ligiert und in E.coli K12 X11-blue transformiert.

2.3.2.2 PCR $\alpha\text{FSS}_{\text{Invitrogen}}$ und *sacC*

Die $\alpha\text{FSS}_{\text{Invitrogen}}$ -Sequenz wurde gleichzeitig mit *sacC* aus pGAPZ α LevKex amplifiziert, da die PCR-Bedingungen identisch waren und die Levanase-Sequenz bereits im folgenden Schritt benötigt wurde. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze stimmte mit der aus Tabelle 2 überein und die PCRs wurden unter folgenden Bedingungen (Tabelle 15) und mit folgenden Primern (Tabelle 16) durchgeführt:

Tabelle 15: PCR-Bedingungen α FSS_{Invitrogen} + *sacC*

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturieren	98 °C	30 s	1 x
Denaturieren	98 °C	10 s	30 x
Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Elongation	72 °C	10 min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	1 x

Tabelle 16: Primer PCR α FSS_{Invitrogen} + *sacC*

Sequenz	Primer A	Primer B	Template-DNA
Levanase (<i>sacC</i>)	P1 Levfwd	P2 Levrev	pGAPZ α LevK
α FSS _{Invitrogen}	InvitroaFSSfwd	InvitroaFSSrev	pPic9

Die PCR-Ansätze wurden über AGE aufgereinigt und die Konzentration über ein Agarosegel abgeschätzt. *sacC* wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren und gelagert, die α FSS_{Invitrogen} wurde über Nacht mit *HindIII* und *NotI* verdaut, am folgenden Tag wieder über AGE aufgereinigt, die Konzentration wurde abgeschätzt und das verdaute α FSS_{Invitrogen}-Insert mit dem verdauten pEHAOX1His4Bgl-Plasmid aus Abschnitt 2.3.1 ligiert. Der Ligationsansatz wurde direkt im Anschluss in *E.coli* K12 X11-blue transformiert.

2.3.2.3 Kontrolle der Plasmide

Beide Referenzplasmide – pEHvarB und pEHvarC – wurden mittels Miniprep Plasmidisolierung isoliert und ihre Konzentration abgeschätzt. Zusammen mit pEHvarA wurden sie zu AGOWA genomics [37] zur Sequenzierung eingeschickt (Primer siehe Tabelle 17) und auf Mutationen in den amplifizierten Gensequenzen untersucht.

Tabelle 17: Sequenzierprimer pEHvarA/B/C

Variante	Sequenzierrichtung	Primer
pEHvarA	5' -> 3'	seq1fwd
	3' -> 5'	seq7rev

pEHvarB	5' -> 3'	seq1fwd
	3' -> 5'	seq7rev
pEHvarC	5' -> 3'	seq1fwd
	3' -> 5'	seq7rev

2.3.3 pEHvarA/B/CLevK

Um die endgültigen Versionen der Referenzplasmide pEHvarALevK, pEHvarBLevK und pEHvarCLevK herzustellen, musste die *sacC*-Sequenz in die zuvor generierten pEHvarA/B/C-Plasmide eingefügt werden.

2.3.3.1 Komplettieren der drei Referenzplasmide

Die drei Plasmide und die *sacC*-Sequenz wurden mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NotI* verdaut, über AGE aufgereinigt und ihre Konzentration über AGE abgeschätzt. *sacC* wurde mit jedem der Plasmide ligiert und die Ligationsansätze anschließend sofort in *E.coli* K12 X11-blue transformiert.

2.3.3.2 Kontrolle der Referenzplasmide

Um Mutationen in der Levanase-Sequenz auszuschließen, wurden die drei Plasmide zunächst mittels Miniprep Plasmidisolierung isoliert, dann ihre Konzentration bestimmt und anschließend zur Sequenzierung zu AGOWA genomics [37] eingeschickt (Primer siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Sequenzierprimer pEHvarA/B/CLevK

Variante	Sequenzierrichtung	Primer
pEHvarA/B/CLevK	5' -> 3'	seq1fwd
	5' -> 3'	seqLfwd1
	3' -> 5'	seqLrev1
	5' -> 3'	seqLfwd2
	3' -> 5'	eqLrev2
	5' -> 3'	seqLfwd3
	3' -> 5'	eqLrev3
	3' -> 5'	seq7rev

2.4 Verbesserung der α -Faktor Signalsequenz

Um eine effektivere Sekretion heterologer Proteine in *P.pastoris* zu ermöglichen, sollte die α FSS in *P.pastoris* GS200 *aox1::uidAHis4 aox2::ARG4* [30] verbessert werden. Dazu sollte eine Variantenbibliothek mit Klonen des pEHAOX1 α His4BglIILevK-Plasmids erstellt werden, in dessen α FSS Mutationen durch error prone PCR eingebracht werden sollten. Die Variantenbibliothek sollte auf Mutanten mit einem signifikant erhöhtem Sekretionslevel untersucht, positive Mutanten identifiziert und isoliert werden. Dies sollte mit Hilfe eines Levanase Selektions- und Screening-Systems geschehen, bei dem Levanase von *P.pastoris* sekretiert werden und so ein Wachstum auf Minimal-Sucrose-MeOH-Platten ermöglichen sollte. Die so isolierten Mutanten sollten durch einen Levanase-Aktivitätsassay getestet und Mutanten mit einem erhöhten Sekretionsniveau so identifiziert werden.

2.4.1 Generieren des pEHAOX1 α His4BglIILevK-Plasmids

Bevor die Variantenbibliothek hergestellt werden konnte, musste zunächst das pEHAOX1His4BglIILevK-Plasmid hergestellt werden.

2.4.1.1 Restriktion und Ligation von pEHAOX1 α His4BglII und *sacC*

pEHAOX1 α His4BglII (siehe Abschnitt 2.2) und *sacC* (siehe Abschnitt 2.3) wurden mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NotI* verdaut, über AGE aufgereinigt, die Konzentration der geschnittenen DNA-Fragmente über ein Agarosegel abgeschätzt und *sacC* mit pEHAOX1His4BglII ligiert. Die Ligationsansätze wurden sofort im Anschluss in *E.coli* K12 X11-blue transformiert.

2.4.1.2 Kontrolle des pEHAOX1 α His4BglIILevK-Plasmids

Das Plasmid wurde durch Miniprep Plasmidisolierung isoliert, die Konzentration abgeschätzt und das Plasmid zu AGOWA genomics [37] zur Sequenzierung eingeschickt. Die verwendeten Primer waren dieselben, die zur Sequenzierung der Referenzplasmide (siehe 2.2.2.2) benutzt wurden.

2.4.2 Error prone PCR

Material:

- GeneMorph[®] II Random Mutagenesis Kit (Stratagene)
- Primer (siehe 4.7)

Durchführung:

Die epPCR wurde mit dem GeneMorph[®] II Random Mutagenesis Kit der Firma Stratagene im GeneAmp[®] PCR System 2700 der Firma AB Applied Biosystems

durchgeführt. Die theoretische Mutationsfrequenz kann Abbildung 5 entnommen werden.

TABLE I**Mutation Frequency vs. Initial Target Quantity**

Mutation rate	Mutation frequency (mutations/kb) ^a	Initial target amount (ng) ^{b,c}	Recommended fold amplification
Low	0–4.5	500–1000	1.5–10
Medium	4.5–9	100–500	10–100
High	9–16	0.1–100	100–10,000

Abbildung 5: Mutation Frequency vs. Initial Target Quantity [28]

Insgesamt wurden 10 epPCRs angesetzt: 5 epPCR-Ansätze mit 10 ng Initial target amount und 5 epPCR mit 30 ng Initial target amount. Die theoretische Mutationsrate wurde so hoch gewählt, da die alphaFSS27Aalone-Sequenz nur 312 Basenpaare lang ist. Auf diese Weise sollten theoretisch zwischen 2,8 und 5 Mutationen in die Sequenz eingebracht werden. Für die ersten 5 Ansätze wurden jeweils 1 µl mit 300 ng/µl Plasmid-DNA eingesetzt und für die zweiten 5 Ansätze 3 µl mit 300 ng/µl Plasmid-DNA. Die genaue Berechnung der notwendigen Menge an Plasmid-DNA kann im Handbuch des GeneMorph[®] II Random Mutagenesis Kit [28] nachgeschlagen werden. Die Zusammensetzung der epPCR-Ansätze ist Tabelle 19 entnommen werden:

Tabelle 19: Ansatz epPCR-Ansatz

	Volumen [µl]	c _{End}
10 x Mutazyme II reaction buffer	5	1 x
40 mM dNTP	1	800 µM
Primermix	0,5 µl	2,5 ng/µl
pEHAOX1αHis4Sph	siehe oben	siehe oben
Mutazyme II DNA polymerase (2,5 U/µl)	1	0,05 U/µl
H2O	auf 50 µl auffüllen	-

Der Primermix bestand aus je 250 ng/µl aFSSerrfwd und 250 ng/µl aFSSerrrev.

Tabelle 20: epPCR-Bedingungen

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturieren	95 °C	2 min	1 x
Denaturieren	95 °C	1 min	30 x
Annealing	58 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	10 min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	1 x

Die epPCR-Produkte wurden über AGE aufgereinigt und die Konzentration über ein Agarosegel abgeschätzt. Die aufgereinigten epPCR-Produkte und das pEHAOX1 α His4BglIlevK-Plasmid wurden mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XhoI* geschnitten und aufgereinigt. Der Restriktionsverdau wurde in diesem Schritt besonders sorgfältig durchgeführt: Erst erfolgte der Verdau mit *HindIII*, gefolgt von einer Aufreinigung durch EtOH-Fällung, dann folgte der zweite Restriktionsschritt mit *XhoI*, ebenfalls gefolgt von einer Aufreinigung durch EtOH-Fällung. Die Konzentration der epPCR-Produkte wurde über ein Agarosegel bestimmt. Jedes der epPCR-Produkte wurde mit dem geschnittenen pEHAOX1 α His4BglIlevK ligiert und in *E.coli* K12 X11-blue transformiert. Die erzeugten Konstrukte wurden mit pEHMut1 bis pEHMut10 benannt: pEHMut1 bis pEHMut5 enthielten die epPCR-Produkte mit der hohen Mutationsrate, pEHMut6 bis pEHMut10 die epPCR-Produkte mit der niedrigeren Mutationsrate. Am Folgetag wurden alle Transformanten in jeweils einem ONC aufgenommen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die pEHMut-Plasmide wurden mittels Miniprep Plasmidisolierung isoliert und ihre Konzentration durch AGE abgeschätzt.

2.4.3 Transformation der Plasmide in GS200 und Einzelkolonieselektion

Um die Variantenbibliothek zu erzeugen, wurden die pEHMut-Plasmide in *P.pastoris* GS200 transformiert. Zusätzlich wurden die Referenzplasmide pEHvarALevK, pEHvarBLevK, pEHvarCLevK und das pEHAOX1 α His4BglIlevK-Plasmid in *P.pastoris* GS200 transformiert. Um die Transformanten von dem Hintergrundwachstum zu trennen, wurden 2 Vereinzlungen durchgeführt. Pro pEHMut-Plasmid wurden 10 Kolonien, pro Kontrollplasmid 4 Kolonien auf MSM-Platten ausgestrichen. Hierzu wurden unterschiedlich große Kolonien gewählt. Nach 5-tägiger Inkubation bei 30 °C wurde der Vereinzlungsausstrich mit den vereinzelt

Kolonien der zuvor ausgestrichenen Kolonien wiederholt. Die Platten wurden erneut für 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.4.4 Flüssigkultur Fermentation

Material:

- BMMSucrose(1%)MeOH(0,5%) (siehe 4.6)
- BMMSorbitol(0,5%), BMMSorbitol(0,5%)MeOH(1%) (siehe 4.6)
- 96 Well Deep-Well-Platten (autoklaviert)
- 2 x Glycerin

Durchführung:

Die DWP wurden im Infors HT Multitron Schüttler inkubiert. Die Belegung der Wells der DWP kann in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** eingesehen werden:

Tabelle 21: Belegung DWP-Platten

	1	2	3	4	5	6
A	Mut1.1	Mut1.2	Mut1.3	Mut1.4	Mut1.5	Mut1.6
B	Mut2.5	Mut2.6	Mut2.7	Mut2.8	Mut3.1	Mut3.2
C	Mut4.1	Mut4.2	Mut4.3	Mut4.4	Mut4.5	Mut4.6
D	Mut5.4	Mut5.5	Mut5.6	Mut5.7	Mut5.8	Mut5.9
E	Mut6.7	Mut6.8	Mut7.1	Mut7.2	Mut7.3	Mut7.4
F	Mut7.10	Mut8.1	Mut8.2	Mut8.3	Mut8.4	Mut8.5
G	Mut9.1	Mut9.3	Mut9.4	Mut9.5	Mut9.6	Mut9.7
H	Mut10.1	Mut10.2	Mut10.3	Mut10.4	Mut10.5	Mut10.6
	7	8	9	10	11	12
A	Mut1.7	Mut1.8	Mut2.1	Mut2.2	Mut2.3	Mut2.4
B	Mut3.3	Mut3.4	Mut3.5	Mut3.6	Mut3.7	Mut3.8
C	Mut4.7	Mut4.8	Mut4.9	Mut5.1	Mut5.2	Mut5.3
D	Mut5.10	Mut6.1	Mut6.2	Mut6.3	Mut6.4	Mut6.5
E	Mut7.5	Mut7.6	Mut7.7	Mut7.8	varA.1	varA.2
F	Mut8.6	Mut8.7	Mut8.8	Mut8.9	varB.1	varB.2
G	Mut9.8	Mut9.9	Mut9.10	Ster.Kontr1	varC.1	varC.2
H	Mut10.7	Mut10.9	Mut10.10	Ste.Kontr2	pEHα.1	pEHα.2

Legende:

- MutX.Y: pEHMutX, Kolonie Y
- varX.Y : pEHvarXLevK, Kolonie Y
- pEH α .Y: pEHAOX1 α His4BglILevK, Kolonie Y
- Ster.KontrX : Sterilkontrolle X

Am ersten Tag wurde zunächst eine Vorkultur gestartet um zu gewährleisten, dass die Hauptkulturen mit annähernd gleich viel Zellmaterial angeimpft wurden. Für die Vorkultur wurden in jedes Well 250 μ l BMMSucrose(1%)MeOH(0,5%) mittels einer Multi-Kanal-Pipette pipettiert. Die Wells wurden entsprechend Tabelle 21: Belegung DWP-Platten angeimpft und über Nacht bei 30 °C, 300 rpm und 80 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am Folgetag wurden 3 Hauptkulturen angeimpft. 3 DWP wurden mit jeweils 250 μ l BMMSorbitol(0,5%) pro Well befüllt und mit jeweils 10 μ l Vorkultur angeimpft. Der Rest der Vorkultur wurde genutzt, um Glycerolstocks herzustellen: Zu den verbliebenen 220 μ l Zellsuspension wurden 220 μ l 2 x Glycerin gemischt. Jeweils 200 μ l wurden in eine gefrierstabile MTP überführt und bei -80 °C eingefroren (1 back-up und 1 working-plate). Die drei DWP-Hauptkulturen wurden bei 30 °C, 300 rpm und 80 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. 24 h nach Start der Fermentation wurden die Hauptkulturen mit MeOH induziert. Pro Well wurden 250 μ l BMMSorbitol(0,5%)MeOH(1%) hinzupipettiert und so eine Endkonzentration von 0,5 % MeOH eingestellt. Nach 48 h wurden jeweils 50 μ l für den ersten Levanaseaktivitäts-Assay entnommen. Das entnommene Volumen wurde durch 50 μ l 5 % MeOH/H₂O-Gemisch aufgefüllt und erneut eine Endkonzentration von 0,5 % MeOH eingestellt. Am dritten Tag wurden die Hauptkulturen nach 72 h geerntet. Die DWP wurden in einer Eppendorf Centrifuge 5810 R mit einem Eppendorf A-4-62 Rotor 30 min 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Zellmaterial pelletiert. Jeweils 50 μ l Überstand wurden für den zweiten Levanaseaktivitäts-Assay verwendet. Der Überstand von zehn der Mutanten mit der höchsten messbaren Aktivität wurde mittels SDS-PAGE auf Levanase untersucht.

2.4.5 Levanaseaktivitäts-Assay

Der Nachweis der Levanaseaktivität beruht auf der Fähigkeit der Levanase die glycosidische Bindung in Sucrose zu spalten und so Fructose und Glucose in das umgebende Medium freizugeben. Der Levanaseaktivitäts-Assay wurde mit dem GLUCOSE UV Reagenz der Firma DIPROmed durchgeführt. Der Test ist in der Lage, freie Glucose in der zu untersuchenden Lösung nachzuweisen (siehe Abbildung 6).

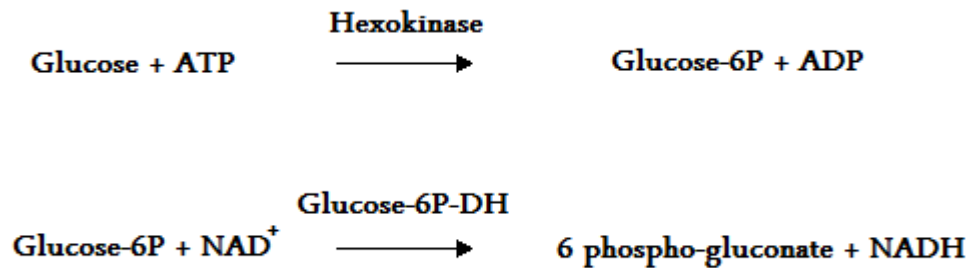


Abbildung 6: Reaktion Levanaseaktivitäts-Test

Messbar wird die Reaktion durch die Zunahme der Extinktion bei $\lambda = 340$ nm durch die Reduktion von NAD^+ zu NADH , wobei die Zunahme der Extinktion proportional zur Konzentration der Glucose ist. Der Levanaseaktivitäts-Assay wurde von Sandra Majer in ihrer Dissertation an die Volumina von MTP angepasst [24].

Material:

- Überstand der Hauptkulturen aus der Flüssigkultivierung
- 1 % Sucrose-Lösung (siehe 4.6.1)
- GLUCOSE UV Reagenz (DIPROmed)

Durchführung:

Es wurden 2 Levanaseaktivitäts-Test durchgeführt: Der erste 48 h nach Start der Fermentation, der zweite nach 72 h im Anschluss an das Abernten der Fermentations-Überstände. Beide Test wurden grundsätzlich gleich durchgeführt, mit Ausnahme der Probenvorbereitung, da bei dem ersten Levanaseaktivitäts-Test vor der Messung die Hefezellen abzentrifugiert und vom Überstand getrennt werden mussten. Die entnommenen 50 μl Kulturüberstand wurden in MTP mit V-Boden überführt und in einer Eppendorf Centrifuge 5810 R mit einem Eppendorf A-4-62 Rotor 30 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in normale MTP überführt. Für den zweiten Levanaseaktivitäts-Test wurden jeweils 50 μl der bereits abzentrifugierten Fermentationsüberstände in normale MTP überführt. Ab diesem Schritt wurden beide Tests gleich durchgeführt:

50 μl Kulturüberstand wurden mit 50 μl 1 % Sucrose-Lösung vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. 190 μl des GLUSCOSE UV Reagenz wurden in eine UV durchlässige MTP pipettiert und 10 μl des ersten Inkubationsansatzes hinzugegeben. Der Ansatz wurde gut gemischt und weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden direkt im Anschluss an die zweite Inkubation im Photometer (SPECTRAMax PLUS 384 der Firma Molecular Devices) bei $\lambda = 340$ nm vermessen.

2.4.6 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde mit dem NuPAGE® System der Firma Invitrogen durchgeführt. Bevor die Proben auf die Gele aufgetragen wurden, wurde ein Teil des Überstandes mit Endo-H behandelt, um die in der Probe enthaltenen Proteine zu deglycosylieren.

2.4.6.1 Deglycosylierung

Material:

- Endo-H (New England Biolabs® Inc.)
- 10 x Glycoprotein Denaturing Buffer (New England Biolabs® Inc.)
- 10 x G5 Reaction Buffer (New England Biolabs® Inc.)
- NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) (Invitrogen)

Durchführung:

Zu 20 µl Überstand wurden 3 µl 10 x Glykoprotein Denaturing Buffer und 7 µl H₂O_{dest} pipettiert und der Ansatz 10 min bei 100 °C denaturiert. Anschließend wurden 4 µl 10 x G5 Reaction Buffer, 2 µl Endo-H und 4 µl H₂O_{dest} hinzupipettiert und der Ansatz 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 13,3 µl 4 x SDS Loading Dye abgestoppt.

2.4.6.2 SDS-PAGE

Material:

- NuPAGE®-Gele (15 Taschen, Invitrogen)
- NuPAGE® System (Invitrogen)
- NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) (Invitrogen)
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Durchführung:

Zur Vorbereitung der Proben, die direkt ohne Deglycosylierung auf das SDS-Gel aufgetragen wurden, wurden 20 µl Überstand mit 6,6 µl 4 x SDS Loading Dye gemischt. Alle Proben, inklusive der deglycosylierten, wurden 10 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf die SDS-Gele aufgetragen. In die erste Tasche wurden jeweils 5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder aufgetragen. In den Taschen 2 bis 11 wurden der Überstand der Mutanten und in den Taschen 12-15 der Überstand der Referenzplasmide und des unmutierten pEHAOX1αHis4BglLevK-Plasmids aufgetragen. Das Gel wurde 50 min mit den Standardbedingungen des NuPAGE® Systems für NuPAGE®-Gele gefahren, anschließend mit Coomassie Blue angefärbt, mit 10 % Essigsäure über Nacht entfärbt und ausgewertet.

2.4.7 Bestimmung der Mutationsfrequenz

Um die Mutationsfrequenz genau zu bestimmen, wurde von allen pEHMut-Plasmiden in *E.coli* K12 X11-blue mit Hilfe eines Glycerolstocks ein Vereinzlungsausstrich auf LBA-Platten ausgestrichen. Diese wurden direkt im Anschluss ein zweites Mal vereinzelt. Pro Plasmid wurden 3 Kolonien ausgewählt, die zur Sequenzierung zu AGOWA genomics [37] geschickt wurden. Einzige Ausnahme waren pEHMut5 und pEHMut10: Von diesen Plasmiden wurden jeweils 4 Kolonien eingeschickt. Die verwendeten Primer waren MFBfwd und MFBrev.

2.4.8 Sequenzierung der stärksten Mutanten

Die 10 Mutanten, die zur SDS-PAGE eingesetzt worden waren, wurden zur Sequenzierung zu AGOWA genomics geschickt.

2.4.8.1 Colony-PCR

Von jeder Mutante wurde eine MSM-Platte frisch ausgestrichen und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Mit einem Zahnstocher wurde wenig Zellmaterial in 50 µl H₂O_{dest} resuspendiert. Die Ansätze wurden 10 min bei 95 °C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt. 1 µl dieser Ansätze wurde zur Colony-PCR eingesetzt. Die Zusammensetzung der Colony-PCR-Ansätze und -Bedingungen können in den Tabellen Tabelle 22 und Tabelle 23 eingesehen werden.

Tabelle 22: Ansatz Colony-PCR

	Volumen [µl]	c _{End}
5 x HF Phusion Buffer	5	1 x
2,5 mM dNTP	2	200 µM
pEVAHis4SphI	1 µl	100 ng / Ansatz
MFBfwd, 5 µM	2,5	0,5 µM
MFBrev, 5 µM	2,5	0,5 µM
Phusion Polymerase	1	0,08 U/µl
H ₂ O	auf 25 µl auffüllen	-

Tabelle 23: Colony-PCR-Bedingungen

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturieren	98 °C	2 min	1 x

Denaturieren	98 °C	30 s	30 x
Annealing	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2 min	
Elongation	72 °C	7 min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	1 x

Die Ansätze wurden über AGE aufgereinigt und die Konzentration über ein Agarosegel abgeschätzt.

2.4.8.2 Sequenzierung

Die PCR-Ansätze wurden zur Sequenzierung zu AGOWA genomics eingeschickt. Als Sequenzierprimer wurden MFBfwd und MFBrev verwendet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Generieren der Plasmide pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl

3.1.1 Austausch *Bgl*II gegen *Sph*I und *Sph*I gegen *Bgl*II

Die Plasmide pEHAOX1His4Sph und pEHAOX1His4Bgl konnten erfolgreich generiert und in *E.coli* K12 X11-blue transformiert werden.

3.1.1.1 Austausch der Restriktionsschnittstellen

Die Fragmente für den Austausch der Restriktionsschnittstellen konnten ohne Probleme mit Hilfe der oePCR synthetisiert (in Abbildung 7 zu erkennen) und gegen die entsprechenden Sequenzen im pEVAHis4SphI-Plasmid ausgetauscht werden.

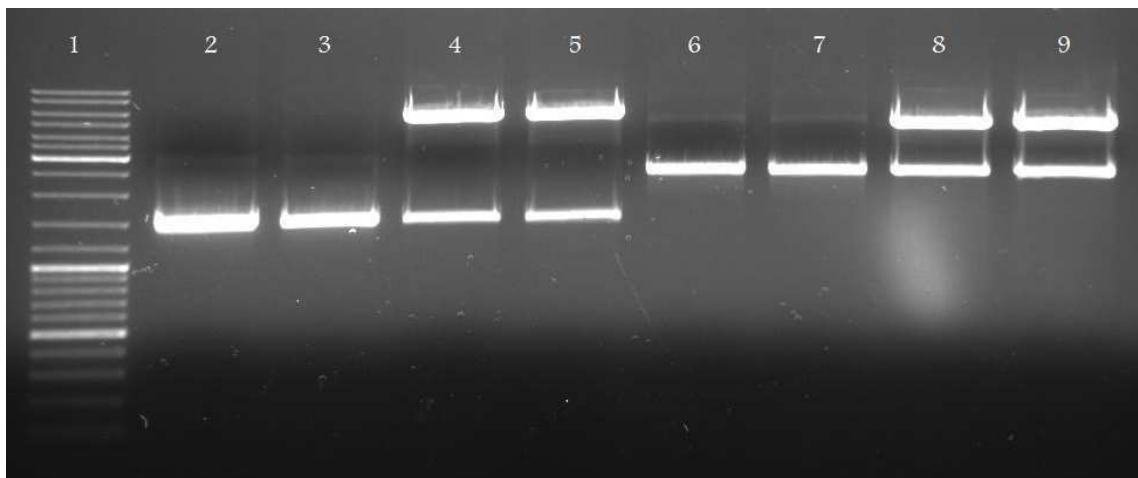


Abbildung 7: oePCR-Fragmente 3a/3b und verdautes pEVAHis4SphI-Plasmid: 1 O'GeneRuler, 2-3 Fragment 3a (*Pvu*I, *Hind*III), 4-5 pEVAHis4SphI (*Pvu*I, *Hind*III), 6-7 Fragment 3b (*Pvu*I, *Pst*I), 8-9 pEVAHis4SphI (*Pvu*I, *Pst*I)

3.1.1.2 Kontrolle der Plasmide pEHAOX1His4Sph und pEHAOX1His4Bgl

Der erfolgreiche Austausch der Restriktionsschnittstellen wurde durch einen Kontrollschnitt und durch die Sequenzierung der amplifizierten Bereiche nachgewiesen. Wie in Abbildung 8 zu erkennen, befinden sich die geschnittenen Plasmide auf einer Höhe von ca. 7000 bp, was beiden Plasmiden (7111 bp) in geschnittenem Zustand entspricht.

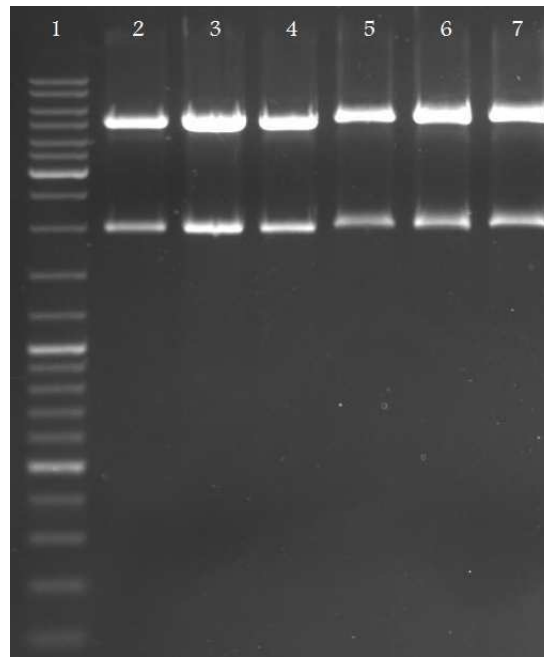


Abbildung 8: Kontrollschnitt pEHAOX1His4Sph/pEHAOX1His4Bgl: 1 O'GeneRuler, 2-4 pEHAOX1His4Sph (*SphI*), 5-7 pEHAOX1His4Bgl (*BglII*)

In den Sequenzierungen der ausgetauschten Sequenzen beider Plasmide war deutlich zu erkennen, dass der Austausch der Restriktionsschnittstellen erfolgreich durchgeführt werden konnte und die amplifizierten Sequenzen keine Mutationen aufwiesen. Von beiden Plasmiden wurde jeweils Klon 1 in *E.coli* K12 X11-blue in die Stammsammlung des Instituts für Molekulare Biotechnologie der TUGraz gegeben (pEHAOX1His4Sph: 3098; pEHAOX1His4Bgl: 3097).

pEHAOX1His4Sph-Sequenzierung:

```
GTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCAC
ATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGG
CGTATCACGAGGCCCTTTCGTGCGATGCAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATC
CGACATCCACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACC
GTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCTTCTCTCAACACCCACTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGT
TATTGGG (SphI)
```

pEHAOX1His4Bgl-Sequenzierung:

```
ATGCTTACCTTCTGGACCTTCAAGAGGTATGTAGGGTTTGTAGATACTGATGCCAACTTCAGTGACAACG
TTGCTATTTTCGTTCAAACCATTCCGAATCCAGAGAAATCAAAGTTGTTTGTCTACTATTGATCCAAGCCA
GTGCGGTCTTGAACTGACAATAGTGTGCTCGTGTGTTTGGAGTCATCTTTGTATGAATAAATCTAGTCTT
TGATCTAAATAATCTTGACGAGCCAGACGATAATACCAATCTAAACTCTTTAAACGTTAAAGGACAAGTA
TGTCTGCCTGTATTAACCCCAAATCAGCTCGTAGTCTGATCCTCATCAACTTGAGGGGCACTATCTTGT
TTTAGAGAAATTTGCGGAGATGCGATATCGAGAAAAAGGTACGCTGATTTTAAACGTGAAATTTATCTCA
AGATCTTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGT
AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCC
AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAA
ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAG
```



```
CTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGA
AGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGG
GCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCCGACCCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAA
CCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGC (BgIII)
```

3.1.2 Integration der α mating factor signal sequence

Genau wie ihre beiden Gegenstücke pEHAOX1His4Sph und pEHAOX1His4Bgl konnten die Plasmide pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl erfolgreich generiert und in *E.coli* K12 X11-blue transformiert werden.

3.1.2.1 Ligation der α mating factor signal sequence

Die alphaFSS27Aalone-Sequenz wurde erfolgreich aus 0704534pGA4 geschnitten und die Plasmide pEHAOX1His4Sph und pEHAOX1His4Bgl erfolgreich mit *HindIII* und *NotI* verdaut. In Abbildung 9 ist die alphaFSS27Aalone-Sequenz auf einer Höhe von 300 bis 400 bp erkennen, was der Größe der alphaFSS27Aalone-Sequenz von 339 bp entspricht. Auch der erfolgreiche Schnitt der beiden Plasmide, beide auf einer Höhe von ca. 7000 bp, kann auf dem Gelfoto nachgewiesen werden. Auf einer Höhe von ca. 4000 bp ist in den Taschen 2 bis 5 eine schwache Bande zu erkennen, was darauf zurückzuführen ist, dass das Plasmid nicht vollständig geschnitten wurde, was jedoch die erfolgreiche Ligation mit der alphaFSS27Aalone-Sequenz nicht verhinderte (siehe Abbildung 10).

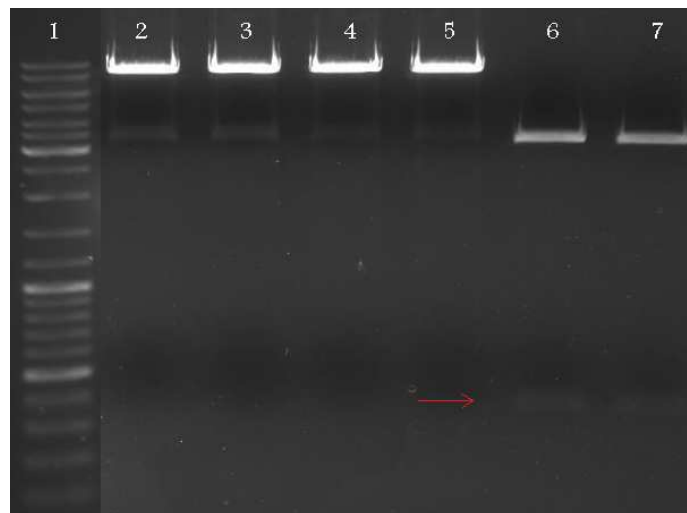


Abbildung 9: alphaFSS27Aalone aus 0704534pGA4 + verdaute pEHAOX1His4Sph und pEHAOX1His4Bgl-Plasmide: 1 O'GeneRuler, 2-3 pEHAOX1His4Sph (*HindIII*, *NotI*), 4-5 pEHAOX1His4Bgl (*HindIII*, *NotI*), 6-7 alphaFSS27Aalone (*HindIII*, *NotI*)

3.1.2.2 Kontrolle der Plasmide pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl

Da die alphaFSS27Aalone-Sequenz nicht amplifiziert und somit keine Mutationen eingebracht werden konnten, sondern durch einen Restriktionsverdau aus dem 0704534pGA4-Plasmid isoliert wurde, reichte ein Kontrollschnitt zum Nachweis der erfolgten Ligation der beiden Plasmide mit der α FSS aus.

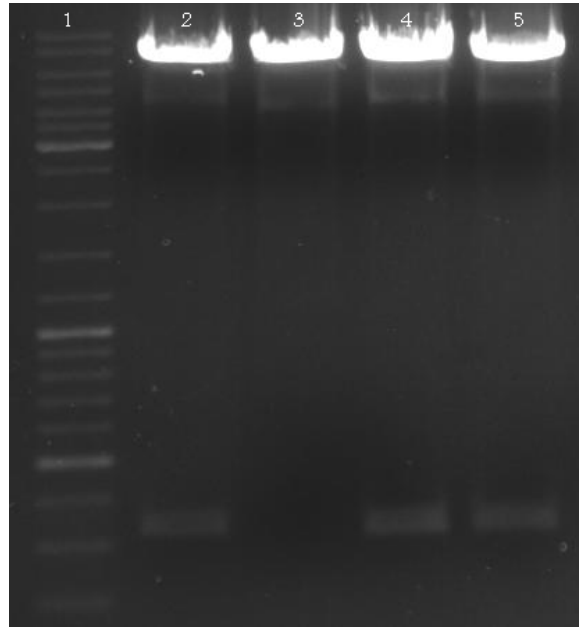


Abbildung 10: Kontrollschnitt pEHAOX1 α His4Sph/pEHAOX1 α His4Bgl: 1 O'GeneRuler, 2-3 pEHAOX1 α His4Sph (*Hind*III, *Not*I), 4-5 pEHAOX1 α His4Bgl (*Hind*III, *Not*I)

Wie in Abbildung 10 zu erkennen, befinden sich beide Plasmide ungefähr auf einer Höhe von ca. 7000 bp und bei drei der vier getesteten Kolonien ist deutlich eine α FSS auf einer Höhe von ca. 330 bp zu erkennen. Die Plasmide konnten erfolgreich in *E.coli* K12 Xl1-blue transformiert werden und es wurde jeweils die Kolonie 1 die Stammsammlung des Instituts für Molekulare Biotechnologie der Technischen Universität Graz gegeben (pEHAOX1 α His4Sph: 3096; pEHAOX1 α His4Bgl: 3095). Das pEHAOX1 α His4Bgl Plasmid wurde zur weiteren Arbeit im zweiten Teil der Masterarbeit (siehe Abschnitt 2.4) verwendet. Bei dem Plasmid aus Kolonie 2 in Tasche 3 handelt es sich vermutlich um ungeschnittenes Plasmid (siehe oben), welches bereits in Abbildung 9 zu erkennen ist.

3.2 Generieren der Referenzplasmide

Alle drei Referenzplasmide konnten hergestellt, in *E.coli* K12 Xl1-blue transformiert und der erfolgreiche Einbau des Levanase-Gens *sacC* nachgewiesen werden.

3.2.1 pEHvarA

Da es sich bei der α FSP-Sequenz um eine kurze Sequenz von nur 57 bp handelt und die Arbeit mit der Sequenz dadurch erschwert würde, wurden die Primer für die PCR so gewählt, dass der gesamte Sequenzbereich von der *SacI*-Restriktionsschnittstelle bis zum Ende der α FSP-Sequenz amplifiziert wurde (siehe Abbildung 11).

3.2.1.1 PCR, Ligation und Transformation

Die α FSP-Sequenz konnte mit Erfolg aus pEHAOX1 α His4Bgl amplifiziert werden: In Abbildung 11 ist die α FSP-Sequenz auf Höhe von ca. 700 bp zu erkennen.

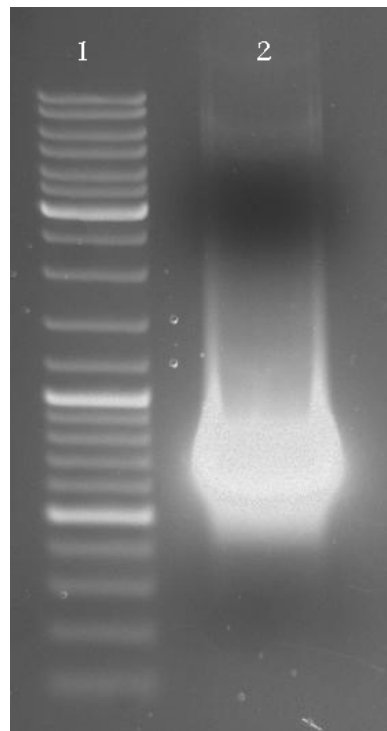


Abbildung 11: α FSP-Sequenz aus pEHAOX1 α His4Sph: 1 O'GeneRuler, 2 α FSP

Die α FSP-Sequenz (ca. 700bp) und pEHAOX1His4Bgl (ca. 6500 bp) wurden erfolgreich geschnitten (siehe Abbildung 12) und miteinander ligiert.

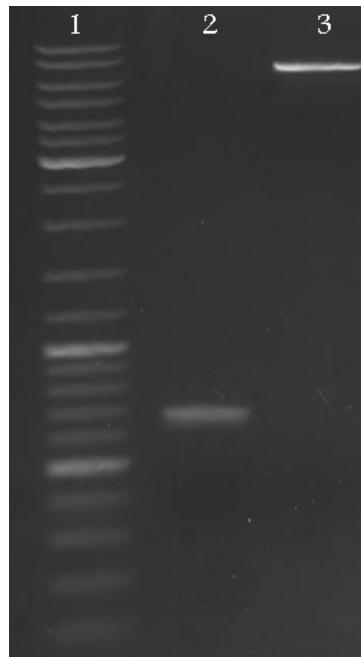


Abbildung 12: Restriktion α FSP und pEHAOX1 α His4Bgl: 1 O'GeneRuler, 2 α FSP (*SacI NotI*), 3 pEHAOX1 α His4Bgl (*SacI, NotI*)

3.2.1.2 Kontrolle des Plasmids

In der Sequenzierung des pEHvarA-Plasmids konnten keine Abweichungen der amplifizierten Sequenz von der originalen α FSP-Sequenz festgestellt werden:

pEHvarA-Sequenzierung:

```
CAGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTT
GGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAAC
GTTTCATGATCAAATTTAACTGTTCTAACCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCT
GTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAG
CTTTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAACCTAATTATTCCTCGAGAAAA
GAGCGGCCGCAAACGGTTTTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGA
CCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTT
TGATACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTTGTCATTTTGTTCCTTCTCGTACGAGC
TTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGTTTTGGGAAAATCATTTCGAGT
TTGATGTTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTGC
GGATCCGGAACGGAACGTATCTTAGCATGGTTGTGCG ( $\alpha$ FSP)
```

3.2.2 pEHvarB und pEHvarC

Beide Plasmide konnten konstruiert und in *E.coli* K12 X11-bue transformiert werden.

3.2.2.1 oePCR, PCR, Ligation und Transformation

Die *sacC*-SS konnte durch die oePCR erfolgreich generiert und die α FSS_{Invitrogen} erfolgreich aus pPic9 amplifiziert werden. In Abbildung 13 (siehe nächste Seite) ist

links die α FSS_{Invitrogen} auf einer Höhe von ca. 250 bp und rechts die *sacC*-SS auf einer Höhe von ca. 100 bp zu erkennen. Bei dem Schmier handelt es sich sicher wahrscheinlich um unvollständige Fragmente aus der oePCR, die jedoch bei der anschließenden Aufreinigung entfernt wurden.

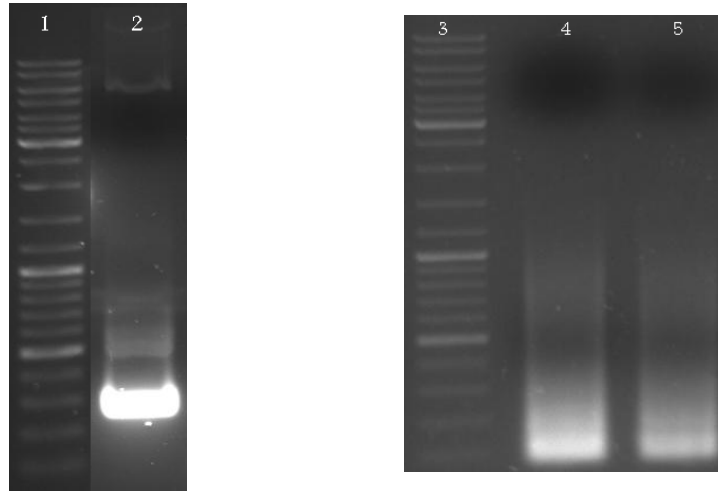


Abbildung 13: α FSS_{Invitrogen} und *sacC*-SS: 1 O'GeneRuler, 2 α FSS_{Invitrogen}, 3 O'GeneRuler, 4-5 *sacC*-SS

Nach der gelungenen Restriktion der beiden Signalsequenzen und des pEHAOX1His4Bgl-Plasmids (siehe Abbildung 14) wurden beide Signalsequenzen mit pEHAOX1His4Bgl ligiert und in *E.coli* K12 X11-bue transformiert.

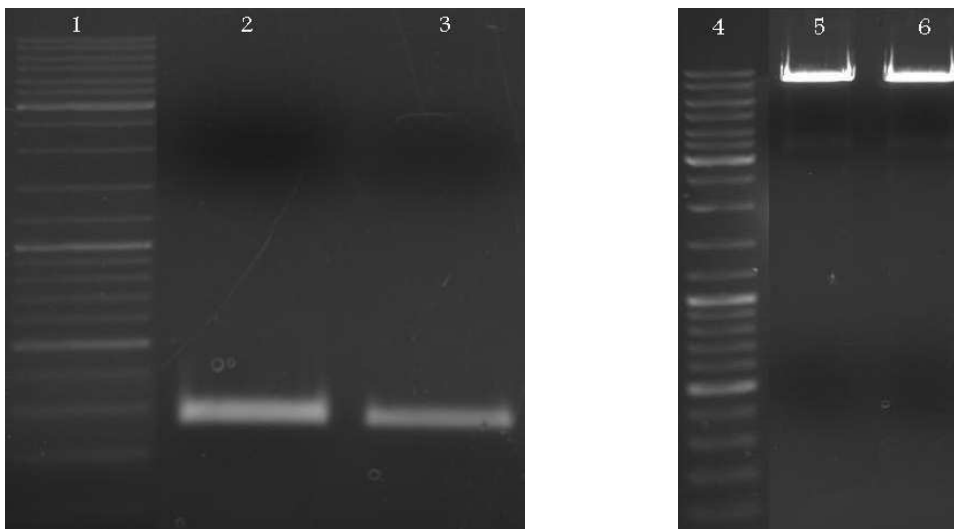


Abbildung 14: Restriktion α FSS_{Invitrogen} und pEHAOX1His4Bgl: 1 O'GeneRuler, 2-4 α FSS_{Invitrogen} (*Hind*III, *Not*I), 4 O'GeneRuler, 5-6 pEHAOX1His4Bgl (*Hind*III, *Not*I)

3.2.2.2 Kontrolle der Plasmide

Die erfolgreiche Ligation der beiden Sequenzen mit pEHAOX1His4Bgl wurde durch die Sequenzierung der amplifizierten Sequenzen in beiden Plasmiden überprüft: Beide Signalsequenzen waren mutationsfrei und konnten zur weiteren Arbeit herangezogen werden:

pEHvarB-Sequenzierung:

```
CAGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTT
GGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAAC
GTTTCATGATCAAATTTAACTGTTCTAACCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCT
GTCTTAAACCTTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAG
CTTATGAAAAGAGACTGATTCAAGTCATGATCATGTTACCCTGCTGTTGACTATGGCATTTCGGCAG
ATGCACTCGAGGCGGCCGCAAACGGTTTTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACCT
ACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGG
CTTCATTTTTGATACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTTGTTCATTTTGTTCCTTCT
CGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTGGGAAAAT
CATTTCGAGTTTGATGTTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTT
CGTTTGTGCGGATCCGGAACGGAACGTATCTTAGCATGGTTGTGCG (sacC-SS)
```

pEHvarC-Sequenzierung:

```
CAGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTT
GGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAAC
GTTTCATGATCAAATTTAACTGTTCTAACCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCT
GTCTTAAACCTTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAG
CTTATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCA
ACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGG
GGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACT
ATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGGCGGCCGCAAACGGTTTTAGCCTTAGAC
ATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACCTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGAT
GTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGT
ATAGGATTTTTTTTTGTTCATTTTGTTCCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGA
TGAATATCTTGTGGTAGGGGTTGGGAAAATCATTTCGAGTTTGATGTTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCT
CTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTGCGGATCCGGAACGGAACGTATCTTAGCATGG
TTGTGCG (αFSSInvitrogen)
```

3.2.3 pEHvarA/B/CLevK

Im Anschluss an die Kontrolle der pEHvarA-, pEHvarB- und pEHvarC-Plasmide wurden die pEHvarALevK-, pEHvarBLevK- und pEHvarCLevK-Plasmide generiert.

3.2.3.1 PCR, Ligation und Transformation

Die *sacC*-Sequenz (ca. 2000 bp) konnte aus pGAPZαLevKex amplifiziert und anschließend erfolgreich verdaut (siehe Abbildung 15) werden.

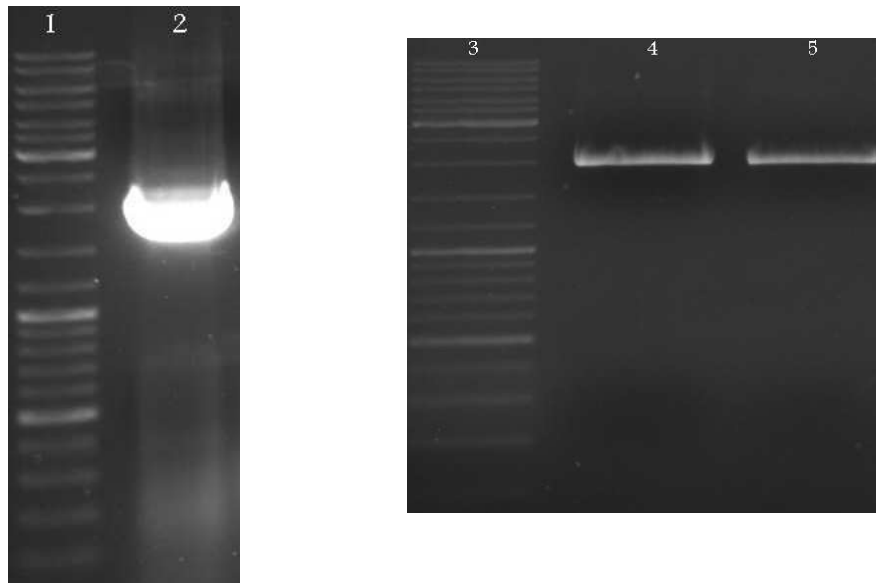


Abbildung 15: PCR *sacC* und Restriktion *sacC*: 1 O'GeneRuler, 2 PCR-Produkt *sacC*, 3 O'GeneRuler, 3-4 *sacC* (*XhoI*, *NotI*)

Die pEHvarA-, pEHvarB- und pEHvarC-Plasmide wurden verdaut (siehe Abbildung 16) und mit dem Levanasegen ligiert.

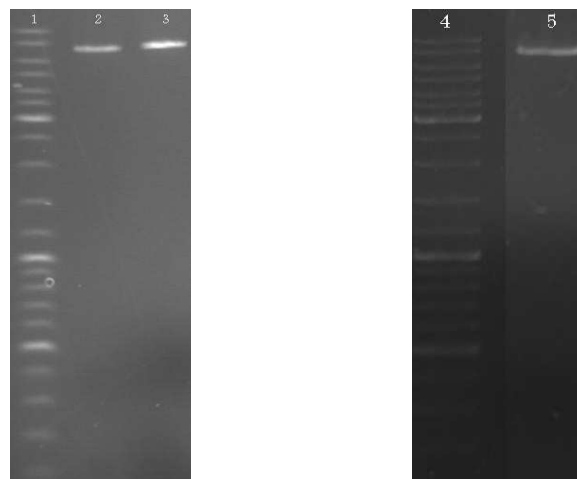


Abbildung 16: Restriktion pEHvarA und pEHvarC: 1 O'GeneRuler, 2 pEHvarA (*XhoI*, *NotI*), 3 pEHvarC (*XhoI*, *NotI*), 4 O'GeneRuler, 5 pEHvarB (*XhoI*, *NotI*)

3.2.3.2 Kontrolle der Plasmide

Die erfolgte Ligation der drei Plasmide wurde durch die Sequenzierung der amplifizierten und integrierten *sacC*-Sequenz überprüft: In keinem der drei Plasmide konnte eine Mutation in der *sacC*-Sequenz gefunden werden.

sacC-Sequenzierung:

AAAAGAGCCGATTCAAGCTACTATGATGAGGATTACCGTCTCAATATCACTTCACACCCGGAGGCCAAACT
GGATGAATGACCCAAACGGAATGGTATATTATGCTGGGGAATATCACTTGTTCTATCAATACCATCCATA
CGGGCTTCAGTGGGGGCCATGCATTGGGGGCATGCCGTGAGCAAAGATTTGGTTACATGGGAACACCTT
CCTGTTGCGCTGTATCCGGATGAAAAAGGCACGATCTTTTCTGGAAGCGCAGTTGTAGATAAAAAATAACA
CAAGCGGTTTTTCAAACAGGCAGGAAAGAGAAGCCGCTTGTGGCCATTTATACACAGGATCGGGAAGGCCATCA
AGTGCAAAGTATTGCCTATAGCAACGACAAAGGAAGAACATGGACGAAGTACGCTGGCAACCCTGTCATT
CCAAACCCGGGTAAAAAAGATTTTCGCGATCCAAAAGTCTTTTGGTATGAGAAAGAAAAAAGTGGGTGA
TGGTGCTTGGCGCCGGTGACCGAATCCTCATTATACATCAAAAAATCTGAAGCAGTGGACGTATGCAAG
TGAATTTGGACAGGATCAAGGAAGCCACGGGGGAGTATGGGAATGCCCGGATTTATTTGAGCTTCCGGTA
GACGGCAATCCGAATCAAAGAAATGGGTCATGCAGGTCAGTGTGCGAAACGGAGCGGTCTCGGGAGGAT
CAGGCATGCAATATTTTGTAGGGGACTTTGATGGAACCTATTTAAAAATGAAAACCCGCCAAACAAAGT
TCTCTGGACGGATTACGGCAGAGACTTTTATGCGGCTGTATCCTGGTCTGATATTCATCCACAGACAGC
CGCCGGCTATGGTTAGGGTGGATGAGCAATTGGCAATATGCGAATGATGTTCCGACATCCCCATGGAGAA
GTGCAACGTCCATTCCAAGAGAGTTAAATTTGAAAGCGTTTTACCGAAGGGGTTAGAGTGGTCCAAACACC
GGTGAAAGAGCTGGAACCATTGCGGGAACCTCTAAGAAGTGAAGAATCTGACCATATCGCCTGCAAGT
CATAATGTGTTAGCGGGCAATCTGGAGATGCCTATGAAATAAATGCAGAATTTAAAGTAAGCCCTGGTT
CAGCTGCTGAATTTGGTTTTAAGGTCCGAACAGGTGAAAATCAATTTACGAAGGTCGGCTATGACCGAAG
GAACGCCAAATTGTTGTTGACCGGAGCGAGTCAGGCAACGACACCTTTAATCCGGCCTTTAACACCCGGA
AAAGAAACAGCCCCGTTGAAGCCGGTAAATGGGAAGGTTAAGTTGCGCATTTTTTGTGACCGCTCCTCGG
TTGAAGTATTTGGGAATGACGGAAGCAGGTCATAACGGATATTATTCTCCAGACCGATCAAGCAAAGG
GCTTGAATTATATGCTGCAAATGGCGGTGTAAGGTAAAATCTTTAACGATACACCCTTTAAAAAAGGTA
TGGGGAACGACACCTTTTATGTCCAATATGACTGGCTGGACGACTGTAATGGCACGTGGGCAGACACAA
TTGAGGGGAAACAAGGGAGGTCGGACGGCGATTCTTTATCTTGTCTTCAGCATCCGGGTCAGACTTCAC
TTATGAATCTGATATCACCATTAAGGATGGAACGGAAGAGGGGCAGGAGCACTAATGTTTCGCTCTGAC
AAAGATGCCAAAACGGTTACCTTGCCAATGTGGATGCGAAGCATGACCTAGTGAAATTCCTTTAAATTTG
AGAACGGTGCTGCTTCTGTCTATTGCTGAATACAAAACACCGATAGACGTTAATAAAAAGTATCATCTGAA
AACAGAGGCCGAGGGCGATCGCTTTAAATCTATTTAGATGATCGTCTTGTGATTGATGCACATGATTCC
GTATTTTCAGAAGGCCAATTTGGCTTGAATGTGTGGGACGCGACTGCTGTCTTTTCAGAATGTAACGAAGG
AGTCTTAA (*sacC*)

3.3 Verbesserung der α -Faktor Signalsequenz

Die Verbesserung der α FSS an *P.pastoris* konnte letztendlich nicht erfolgreich durchgeführt werden, da keine Variantenbibliothek erzeugt werden konnte.

3.3.1 Generieren des pEHAOX1 α His4BglIILevK-Plasmids

Das Plasmid pEHAOX1 α His4BglIILevK konnte erfolgreich konstruiert werden.

3.3.1.1 Restriktion, Ligation und Transformation

Das pEHAOX1 α His4Bgl-Plasmid (ca. 7400 bp) wurde mit *XhoI* und *NotI* geschnitten (siehe Abbildung 17), mit der geschnittenen *sacC*-Sequenz (siehe Abbildung 15) ligiert und in *E.coli* K12 X11-blue transformiert werden.

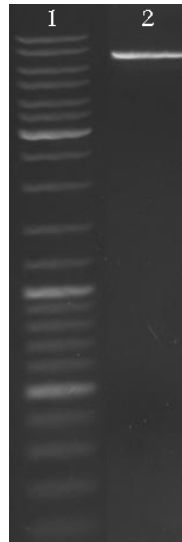


Abbildung 17: Restriktionsansatz pEHAOX1 α His4Bgl: 1 O'GeneRuler, 2 pEHAOX1 α His4Bgl (*Xho*I, *Not*I)

3.3.1.2 Kontrolle des Plasmids

Die Sequenzierung der *sacC*-Sequenz in dem Plasmid wies keine Mutationen auf und das Plasmid konnte zur weiteren Arbeit herangezogen werden.

sacC-Sequenzierung: siehe 3.2.3.2

3.3.2 Error prone PCR

Die epPCR war erfolgreich. Es konnte PCR-Produkt hergestellt werden, zwar konnten in den Sequenzierungsergebnissen der epPCR-Produkte keine Mutationen nachgewiesen werden, dies ist jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine nicht korrekte Restriktion des pEHAOX1His4BglLevK-Plasmids zurückzuführen (siehe 3.3.7).

3.3.2.1 epPCR

Bei allen aufgetragenen Ansätzen ist auf Höhe von ca. 320 bp eine deutliche Bande zu erkennen (siehe Abbildung 18), was den Banden der α FSS auf allen bisherigen Gelbildern (siehe z.B. Abbildung 10) entspricht.

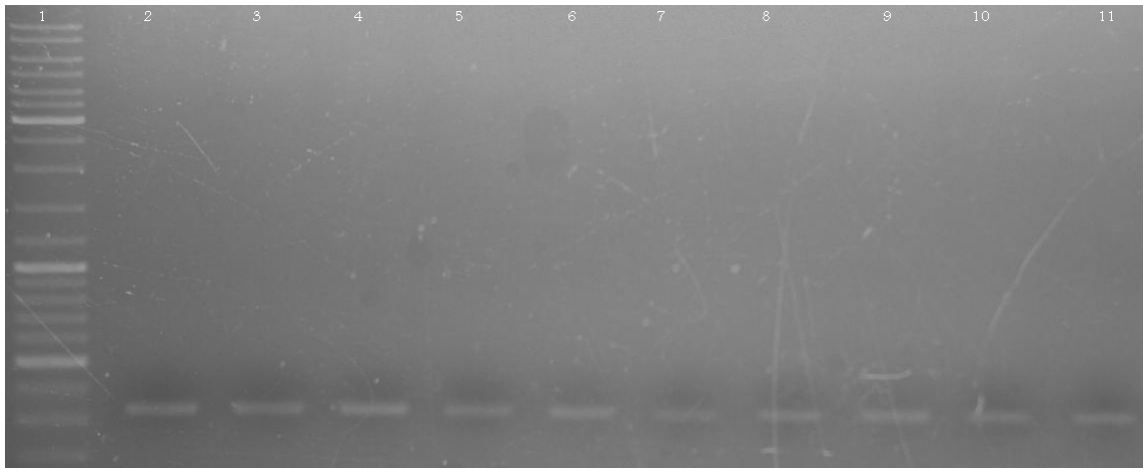


Abbildung 18: epPCR-Produkte: 1 O'GeneRuler, 2-11 epPCR-Produkte 1 bis 10

Die epPCR-Produkte konnten über AGE aufgereinigt werden und wurden zum Restriktionsverdau eingesetzt.

3.3.2.2 Restriktion, Ligation und Transformation

Die epPCR-Produkte und das pEHAOX1 α His4BglLevK-Plasmid wurden verdaut zur Ligation eingesetzt. Wie in Abbildung 19 gut zu erkennen, konnte das Plasmid erfolgreich linearisiert werden: Auf Höhe von ca. 9000 bp (Taschen 2 und 3) ist nur eine einzige klare Bande zu sehen.

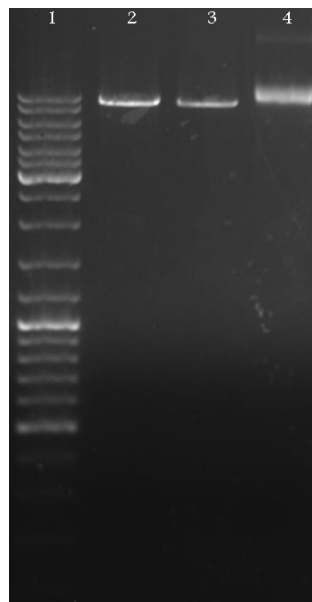


Abbildung 19: Restriktion pEHAOX1 α His4BglLevK: 1 O'GeneRuler, 2-3 pEHAOX1 α His4BglLevK (*Hind*III, *Xho*I), 4 pEHAOX1 α His4BglLevK (ungeschnitten)

Trotz des scheinbar erfolgreichen Restriktionsverdaus des Plasmids (Die Plasmid-DNA wurde linearisiert und die Bande der geschnittenen Plasmid-DNA unterscheidet sich sichtbar von den Banden des ungeschnittenen Plasmids) wuchsen auf der Religationskontrolle fast halb so viele Kolonien an, wie auf den eigentlichen Transformationsplatten. Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass eines der beiden Restriktionsenzyme vermutlich nicht korrekt geschnitten hat, die Plasmid-DNA daher zwar linearisiert wurde, es bei der Ligation des Vektors mit dem Insert jedoch wieder zu einer Religation der Plasmid-DNA gekommen ist.

3.3.3 Transformation der Plasmide in GS200 und Einzelkolonieselektion

Die pEHMut- und die Kontroll-Plasmide konnten erfolgreich in den *P.pastoris*-Stamm GS200 transformiert werden. Wie in Abbildung 20 zu erkennen, wuchsen die Transformanten gut auf den MMSucrose/MeOH-Platten an und waren gut von dem Hintergrundwachstum zu differenzieren. Gut zu beobachten sind ebenfalls die Höfe, die die Transformanten umschließen: Die sekretierte Levanase kann Sucrose in dem an die Kolonie angrenzenden Agarmedium umsetzen und es kommt es zu einem verstärkten Hintergrundwachstum.

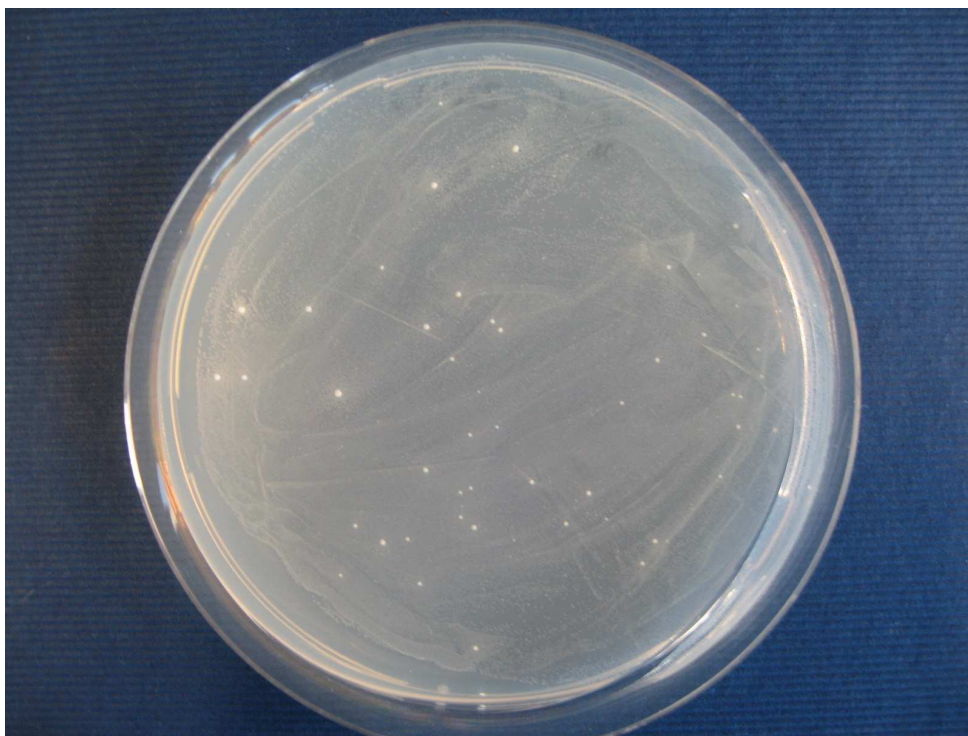


Abbildung 20: Trafo-Platte *P.pastoris*

Aufgrund dieses Phänomens mussten die Kolonien, bevor sie zur Flüssigkultur Fermentation eingesetzt werden konnten, zunächst sorgfältig vereinzelt werden.

3.3.4 Flüssigkultur Fermentation

Wie in Abbildung 21 zu erkennen, wuchs bereits die Vorkultur stark divers an. Manche Kolonien wuchsen gut an, wie etwa A6 oder A7, andere wiederum wuchsen nur sehr schwach an, wie etwa E5.

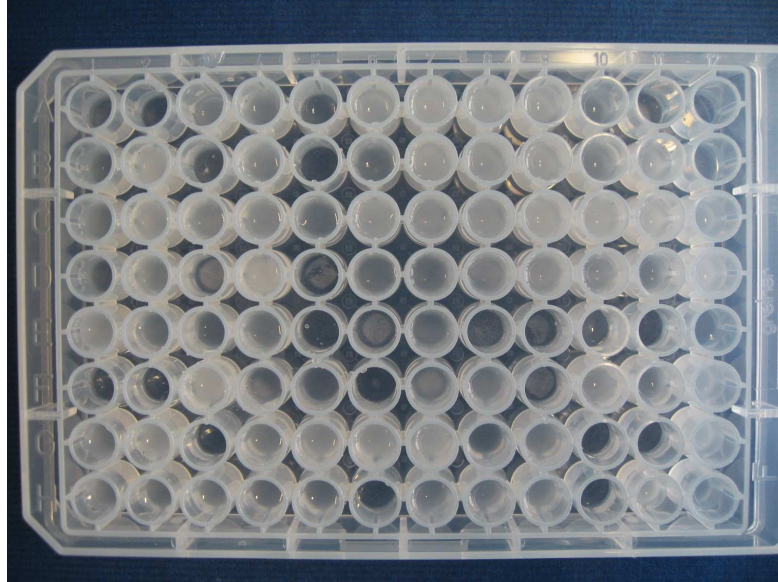


Abbildung 21: Vorkultur der Flüssigkultur Fermentation

Entsprechend dem Wachstum in der Vorkultur wuchsen auch die 3 Hauptkulturen unterschiedlich stark an. Das unterschiedliche Wachstum in der Vorkultur ist auf die erschwerten Wachstumsbedingungen in dem flüssigen Selektivmedium zurückzuführen. Da das flüssige Selektivmedium einen sehr starken selektiven Druck auf die Zellen ausübt und die Wells der Vorkultur mit unterschiedlich großen Kolonien angeimpft wurden, konnten nur die Kolonien anwachsen, die mit einer ausreichend hohen Zellmasse angeimpft wurden. In der Hauptkultur wurde kein Selektivmedium mehr sondern BMMSorbitol(0,5%) verwendet, jedoch wurden die Wells der Hauptkultur mit unterschiedlich viel Zellmaterial entsprechend der Vorkultur beimpft, was dann zu dem unterschiedlich starken Wachstum in der Hauptkultur führte.

3.3.5 Levanaseaktivitäts-Assay

Mit Hilfe des Levanaseaktivitäts-Assay konnte die Sekretion der Levanase erfolgreich nachgewiesen werden. Es konnte jedoch kein Vergleich der Mutanten mit den Referenzplasmiden und dem pEHAOX1 α His4BglLevK-Plasmids durchgeführt werden, da sich das stark unterschiedliche Wachstum in der Vorkultur im selben Maß auf die Levanaseaktivitäts auswirkte, wie auf das Wachstum in den Hauptkulturen. Da eine geringere Zelldichte weniger sekretierte Levanase bedeutete, konnte in einigen Wells nur eine sehr schwache bis teilweise keine Aktivität registriert werden. Da dies auch auf

das Wachstum der drei Referenzplasmide und des pEHAOX1 α His4BglLevK-Plasmids zutrifft, konnte kein Vergleich zu den Mutanten gezogen werden, da die gemessenen Aktivitäten (siehe Abbildung 22 bis Abbildung 24) vollkommen unterschiedliche Werte besaßen. Theoretisch müsste beispielsweise die Aktivität des pEHAOX1 α His4BglLevK-Plasmids und des pEHvarCLevK-Plasmids annähernd gleich hoch sein, da es sich bei den beiden α mating factor Signalsequenzen um ähnliche Sequenzen handelt [27]. Auch unterscheidet sich die Aktivität innerhalb der Doppelbestimmungen der einzelnen Kontrollplasmide drastisch, wie in den Abbildungen Abbildung 22 bis Abbildung 24 gut zu erkennen ist, obwohl diese nahezu identisch sein sollten.

Hauptkultur 1.2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0,008	-0,007	0,262	0,064	0,074	0,291	0,211	0,236	0,151	0,068	-0,010	-0,010
B	0,077	0,118	-0,005	0,151	-0,004	0,037	0,235	0,208	0,256	0,113	0,132	-0,007
C	0,017	0,300	0,072	0,108	0,173	0,156	0,134	0,148	0,097	0,195	0,293	0,145
D	0,001	0,074	-0,004	0,318	-0,005	0,032	0,099	0,151	0,087	0,128	0,068	0,224
E	0,142	0,035	0,082	0,061	-0,006	-0,007	0,118	-0,007	-0,007	0,194	-0,006	-0,004
F	-0,008	-0,010	0,169	0,102	0,032	-0,013	0,097	0,131	-0,014	0,117	0,006	0,199
G	0,027	0,206	-0,003	0,188	0,442	0,296	0,290	0,047	0,076	-0,001	-0,003	0,450
H	0,019	0,044	0,091	0,054	0,088	-0,001	0,043	0,079	0,072	0,001	0,172	0,046

Abbildung 22: Levanaseaktivitäts-Assay nach 72h Hauptkultur 1

Hauptkultur 2.2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0,006	-0,007	0,241	0,205	0,160	0,302	0,250	0,327	0,202	0,081	-0,010	-0,006
B	0,089	0,175	-0,005	0,235	-0,004	0,059	0,319	0,332	0,275	0,133	0,147	-0,003
C	0,023	0,287	0,080	0,115	0,199	0,159	0,228	0,181	0,170	0,165	0,339	0,154
D	0,013	0,086	-0,005	0,303	-0,006	0,046	0,157	0,197	0,099	0,138	0,078	0,274
E	0,141	0,062	0,067	0,069	-0,005	-0,005	0,138	-0,006	-0,005	0,185	-0,004	-0,003
F	-0,009	-0,010	0,176	0,099	0,035	-0,011	0,114	0,160	-0,013	0,108	0,013	0,230
G	0,038	0,186	-0,003	0,134	0,338	0,343	0,330	0,069	0,120	-0,001	-0,001	0,434
H	0,029	0,063	0,099	0,045	0,088	0,001	0,078	0,118	0,119	0,001	0,260	0,076

Abbildung 23: Levanaseaktivitäts-Assay nach 72h Hauptkultur 2

Hauptkultur 3.1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,079	0,006	0,182	0,075	0,091	0,202	0,232	0,256	0,321	0,036	-0,005	-0,011
B	0,034	0,074	-0,001	0,083	-0,006	0,025	0,221	0,192	0,336	0,048	0,081	-0,006
C	0,028	0,143	0,062	0,038	0,061	0,090	0,127	0,085	0,125	0,115	0,248	0,091
D	0,730	0,029	0,000	0,172	-0,008	0,056	0,089	0,063	0,046	0,068	0,061	0,295
E	0,543	0,023	0,021	0,012	-0,007	-0,003	0,072	-0,009	-0,008	0,128	0,037	-0,005
F	1,084	-0,010	0,098	0,033	0,001	-0,013	0,072	0,104	-0,011	0,050	0,023	0,322
G	0,096	0,127	0,291	0,108	0,308	0,215	0,273	0,036	0,037	-0,002	0,000	0,300
H	0,622	0,758	0,811	0,279	0,089	-0,001	0,048	0,051	0,050	0,002	0,104	0,056

Abbildung 24: Levanaseaktivitäts-Assay nach 72h Hauptkultur 3

Trotz der mangelnden Möglichkeit des Vergleichs wurden der Überstand von zehn der aktivitätsstärksten Mutanten auf Levanase untersucht: Die alphaFSS27Aalone-Sequenz der zehn Mutanten wurde amplifiziert und zur Sequenzierung eingeschickt (siehe 3.3.8), um die Fähigkeit der Plasmide zur Sekretion von Zielproteinen weiter zu untermauern und um die Sequenzen ein zweites Mal auf Mutationen in der α FSS zu überprüfen. Die näher untersuchten Mutanten waren: pEHMut1.5 (A5), pEHMut1.6 (A6), pEHMut1.7 (A7), pEHMut2.1 (A9), pEHMut3.5 (B9), pEHMut5.2 (C11), pEHMut5.7 (D4), pEHMut6.5 (D12), pEHMutG5 (G5) und pEHMut9.8 (G7). Desweiteren wurde der Überstand dieser zehn Mutanten mit Hilfe von SDS-PAGE auf Levanase untersucht (siehe 3.3.6).

3.3.6 SDS-PAGE

Auf dem SDS-Gel wurden die deglycosylierten Proben aufgetragen.

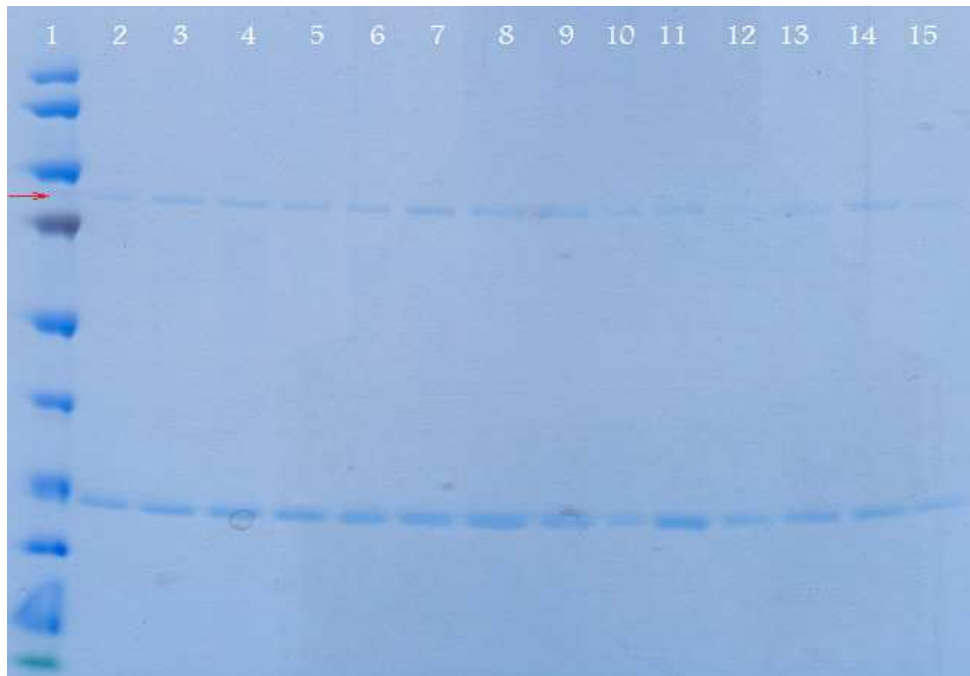


Abbildung 25: SDS-PAGE: 1 Proteinmarker, 2 pEHMut1.5, 3 pEHMut1.6, 4 pEHMut1.7, 5 pEHMut2.1, 6 pEHMut3.5, 7 pEHMu5.2, 8 pEHMut5.7, 9 pEHMut6.5, 10 pEHMut6.5, 11 pEHMut9.8, pEHMut9.6, 12 pEHvarALevK Kolonie 2, 13 pEHvarBLEvK Kolonie 2, 14 pEHvarCLEvK Kolonie 2, 15 pEHAOX1 α His4BglLev Kolonie 1 – Alle Proben wurden zuvor denaturiert und mit Endo-H deglycosyliert.

Laut Wanker *et al.* [20] besitzt Levanase eine Molekulare Masse von 75 kD. In Abbildung 25 ist auf einer Höhe von ca. 75 kD ist eine Bande zu erkennen. Auch Stefanie Kraßnig konnte in ihrem Projektlabor [31] die Bande der Levanase auf einer Höhe von 75 kD feststellen, weshalb man sicher sagen kann, dass es sich bei der Bande bei 75 kD um die Bande von Levanase handelt.

3.3.7 Bestimmung der Mutationsfrequenz

Wie bereits im Abschnitt 3.3.2 erwähnt, konnten in den zur Bestimmung der Mutationsfrequenz eingeschickten Kolonien fast keine Mutationen festgestellt werden. Von den 32 sequenzierten Klonen trugen nur drei Klone Mutationen: Drei Basenaustausche und in einem dieser Klone zusätzlich eine Insertion. Keine der anderen sequenzierten Klone wies eine Mutation auf. Dies kann aus dreierlei Gründen geschehen sein: Zum einen könnten trotz der mutationsbegünstigenden Bedingungen

während der epPCR so gut wie keine Mutationen in die Zielsequenz eingebaut worden sein, zum anderen könnten die Klone nicht ausreichend vereinzelt worden sein oder in den eingeschickten Proben waren jeweils mehrere Plasmide mit unterschiedlichen Mutationen vorhanden. Jedoch wurde epPCR-Produkt erhalten und es wurden zwei Vereinzelausstriche durchgeführt. Die dritte Möglichkeit ist die wahrscheinlichste: Das Plasmid, mit dem die epPCR-Produkte ligiert werden sollten, wurde nicht erfolgreich oder nicht vollständig geschnitten. Auch wenn es auf Abbildung 19 zunächst so aussieht, als wäre der Restriktionsverdau gelungen, spricht das starke Wachstum auf der Religationskontrolle dafür, dass eine hohe Menge an inkorrekt geschnittenem Plasmid transformiert wurde. Wahrscheinlich hat eines der beiden Restriktionsenzyme *HindIII* und *XhoI* nicht korrekt geschnitten und es kam während der Ligation zu einer Religation des Plasmids. Das nur drei der sequenzierten Klone Mutationen aufweisen, weist darauf hin, dass hauptsächlich nur das unmutierte ursprüngliche Plasmid zur Erzeugung der Variantenbibliothek transformiert wurde und nur zu einem sehr geringen Teil Plasmide, die tatsächlich ein epPCR-Produkt enthielten.

epPCR-Ansatz 2 Kolonie 1:

AAGCTTTTGA^TTTTTAACGACTTTTTAACGACAACCTTGAGA^GGATCAAAAAACAAC^TAATTATTTCGAAACG
ATGAGATTTCC^TTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACA
CTACAACAGAAGATGAAACGGCACA^AAATTC^CGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGA
TTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACA^AATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATT
GCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAG (α FSS: **Insertion**, **Basenaustausch A -> G**)

epPCR-Ansatz 3 Kolonie 1:

AAGCTTTTGA^TTTTTAACGACTTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAAC^TAATTATTTCGAAACGA
TGAGATTTCC^TTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACAC
TACAACAGAAGATGAAACGGCACA^AAATTC^CGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGAT
TTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACA^AATAA^TGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTG
CCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAG (α FSS: **Basenaustausch C -> T**)

epPCR-Ansatz 4 Kolonie 1:

AAGCTTTTGA^TTTTTAACGACTTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAAC^TAATTATTTCGAAACGA
TGAGAT^GTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACAC
TACAACAGAAGATGAAACGGCACA^AAATTC^CGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGAT
TTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACA^AATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTG
CCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAG (α FSS: **Basenaustausch T -> G**)

Restliche Sequenzierungen:

AAGCTTTTGA^TTTTTAACGACTTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAAC^TAATTATTTCGAAACGA
TGAGATTTCC^TTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACAC
TACAACAGAAGATGAAACGGCACA^AAATTC^CGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGAT
TTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACA^AATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTG
CCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAG (α FSS:)

3.3.8 Sequenzierung der stärksten Mutanten

In den Sequenzierungsergebnissen der amplifizierten alphaFSS27Aalone-Sequenzen der 10 ausgewählten Mutanten konnte keine einzige Mutation festgestellt werden. Jede der Sequenzen entsprach der originalen alphaFSS27Aalone-Sequenz:

Sequenzierung Mutanten:

```
TGATCAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTT
AAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTT
GATTTTAAACGACTTTTAAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAACCTAATTATTTCGAAACGATGAGATTT
CCTTCAATTTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAG
AAGATGAAACGGCACAATTTCCGGCTGAAGCTGTTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGT
TGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATT
GCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGCCGATTCAAGCTACTATGATGAGGATTACCGTC
CTCAATATCACTTCACACCGGAGGCAAACCTGGATGAATGACCCAAACGGAATGGTATATTATGCTGGGGA
ATATCACTTGTTCATCAATAC ( $\alpha$ FSS)
```

3.4 Zusammenfassung

3.4.1 Generieren der Plasmide

Die zwei Plasmid-Varianten ohne α FSS pEHAOX1His4Sph und pEHAOX1His4Bgl und die beiden Varianten mit α FSS pEHAOX1 α His4Sph und pEHAOX1 α His4Bgl konnten generiert werden. Die Restriktionsschnittstellen wurden mit Erfolg ausgetauscht und die amplifizierten Sequenzen sind mutationsfrei. Die erfolgreiche Sekretion von Zielprotein konnte durch den Levanaseaktivitäts-Assay und durch die SDS-PAGE nachgewiesen werden. Die Plasmide wurden in die Stammsammlung des Instituts für Molekulare Biotechnologie der Technischen Universität gegeben (siehe 4.8) und können nun zu Klonierungsarbeiten in *E.coli* und zur Expression und Sekretion von heterologen Proteinen in *P.pastoris* verwendet werden.

3.4.2 Verbesserung der α mating factor Signalsequenz in *Pichia pastoris*

Die α FSS konnte in dem Expressionssystem *P.pastoris* nicht erfolgreich verbessert werden. Es konnte zwar eine epPCR durchgeführt werden, die epPCR-Produkte jedoch nicht erfolgreich mit dem pEHAOX1 α His4BglLevK-Plasmid ligiert werden. Das Plasmid wurde nur von einem der beiden Restriktionsenzyme korrekt geschnitten und es kam während der Ligation mit dem α FSS-Insert zu einer Religation des Vektors. Dementsprechend wurde zur Erzeugung der Variantenbibliothek hauptsächlich das ursprüngliche Plasmid ohne mutierte α FSS transformiert. Marienhagen *et al.* schrieb 2009: „Die Qualität der Variantenbibliothek ist für jedes Experiment zur gelenkten Evolution entscheidend.“ [32]. Da die Klone der erzeugten Variantenbibliothek in dieser Arbeit größtenteils Plasmide mit einer unmutierten α FSS enthielten, war die Qualität

der Variantenbibliothek sehr schlecht, was dazu führte, dass die Verbesserung der α FSS nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Dass die α FSS generell in einer epPCR-Reaktion mutiert werden kann, wiesen Majer [24] und Prischl [27] in ihren Arbeiten nach, was verstärkt darauf hindeutet, dass die Generierung einer hochqualitativen Variantenbibliothek an der Ligation des Plasmid mit dem epPCR-Produkten scheiterte und nicht an der epPCR selbst.

Unabhängig davon, dass keine qualitative Variantenbibliothek erstellt werden konnte, erwiesen sich die verwendeten Fermentationsparameter als unausgereift. Aufgrund des allgemein schwachen Wachstums auf Sucrose als alleiniger C-Quelle in der Vorkultur der Fermentation, war der Selektionsdruck mit den verwendeten Parametern zu hoch, um ein gleichmäßiges Wachstum der Kulturen zu gewährleisten. Aufgrund des ungleichmäßigen Wachstums in der Vorkultur wuchsen die Kulturen in der Hauptkultur ebenfalls stark divers an, da diese mit unterschiedlich viel Zellmaterial angeimpft wurden. Besonders wichtig ist ein gleichförmiges Wachstum der Kulturen für den folgenden Levanaseaktivitäts-Assay. Da mehr Zellen auch mehr Levanase sekretieren, ist daher auch der Levanaseaktivitäts-Assay zu einem Teil an das Wachstum der Zellen gekoppelt und daher ist ein gleichförmiges Wachstum die Grundlage für einen Vergleich zwischen Referenzplasmiden und Mutanten: Ganz ähnlich dem unterschiedlichen Wachstum, wiesen die Kolonien stark diverse Aktivitätsmesswerte auf. Stark angewachsene Kolonien wiesen hohe Aktivitätsmesswerte auf, schwach angewachsenen niedrige Werte. Die Kontrollplasmide wiesen starke Unterschiede in Wachstum und Aktivität auf, sowohl untereinander, als auch innerhalb ihrer eigenen Doppelbestimmungen, und machten so einen Vergleich mit den Mutanten unmöglich, was jedoch in Anbetracht der mangelhaften Variantenbibliothek zweitrangig wurde.

Es war klar und deutlich zu erkennen, dass das von Sandra Majer entwickelte Screening-System [24] funktioniert und das damit Levanaseaktivität nachgewiesen werden kann. Wären die Zellen gleichmäßig angewachsen und wäre eine hochqualitative Variantenbibliothek erzeugt worden, hätte das Levanase-Screeningsystem verwendet werden können, um nach Mutanten mit einem erhöhten Sekretionsniveau zu screenen. Auch die Selektion der Transformanden auf BMMSucrose/MeOH-Platten funktionierte sehr gut und die Transformanten waren ohne Probleme zu isolieren.

3.4.3 Outlook

Um die Sekretion in *P.pastoris* mit Hilfe des α FSS zu verbessern, müssen die epPCR-Produkte erfolgreich mit dem pEHAOX1 α His4BglLevK-Plasmid ligiert werden. Dazu muss ein erneuter Versuch unternommen werden das Plasmid korrekt und vollständig mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Xho*I zu schneiden. Ist dies geschehen, können die epPCR-Produkte mit dem Plasmid ligiert werden. Die generierten

Konstrukte müssen zunächst in *E.coli* und schließlich in *P.pastoris* transformiert werden, um eine hochqualitative Variantenbibliothek zu generieren, in der dann nach Klonen mit einem erhöhtem Sekretionsniveau gescreent werden kann. Das Selektionssystem der Transformanten auf MMSucrose/MeOH-Platten hat gut funktioniert, jedoch müssen die Parameter der Flüssigkultur Fermentation optimiert werden, um so ein uniformes Wachstum der Kulturen zu gewährleisten und so die Grundlage für einen aussagekräftigen Levanaseaktivitäts-Assay zu schaffen. Ist dies gelungen, muss unter Umständen der Levanase-Screening-Assay optimiert werden, da die Messwerte bei einer starken Expression und Sekretion der Levanase Absorptionswerte von 1 überschreiten könnten. Auch sollten wieder die Referenzplasmide verwendet werden, um so einen direkten Vergleich zu anderen Signalsequenzen zu ermöglichen.

4 Anhang

4.1 Stämme

4.1.1 *E.coli*

- K12 Top10F (Stratagene): F'[lacI^q Tn10(tet^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 λ⁻ (Tetracycline- und Streptomycine-Resistenz)
- K12 X11-blue (Stratagene): endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(τ_K⁻ m_K⁺) (Nalidixinsäure- und Tetracycline-Resistent)

4.1.2 *P. pastoris*

- GS200 aox1::uidAHis4 aox2::ARG4 [30]

4.2 Antibiotika

Die Antibiotika wurden von der Firma Roth bezogen.

- Ampicillin

Es wurde eine 1000 x Ampicillin-Stammlösung mit einer Konzentration $c = 100$ mg/ml hergestellt. 1 g Ampicillin wurde in 10 ml H₂O_{dest} gelöst, steril filtriert ($d = 0,2$ μm) und zu je 500 μl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert.

- Zeocin

Es wurde eine 1000 x Zeocin-Stammlösung mit einer Konzentration von $c = 25$ mg/ml hergestellt. Dazu wurden 0,25 g in 10 ml H₂O_{dest} gelöst, steril filtriert ($d = 0,2$ μm) und zu je 500 μl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert.

Das Sterilfiltrieren wurde mit einem Filtropur S 0,2 PAT US 4900449 Spritzenfilter der Firma SARSTEDT durchgeführt.

4.3 Enzyme

4.3.1 Restriktionsenzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas bezogen.

- *Bgl*III, c = 10 U/ μ l
- *Hind*III, c = 10 U/ μ l
- *Not*I, c = 10 U/ μ l
- *Pst*I, c = 10 U/ μ l
- *Pvu*I, c = 10 U/ μ l
- *Sac*I, c = 10 U/ μ l
- *Sph*I, c = 10 U/ μ l
- *Xho*I, c = 10 U/ μ l

4.3.2 Sonstige Enzyme

- Endo H (500 U/ μ l, New England Biolabs[®] Inc.)

4.4 Standards & Kits

4.4.1 DNA Größenstandard:

- O'GeneRuler[™] DNA Ladder Mix, ready-to-use (Fermentas)

O'GeneRuler[™] DNA Ladder Mix, ready-to-use

IMPROVEMENTS

1. Three reference bands: 3000, 1000 and 500 bp.
2. Amounts of DNA per band equalized for easier quantification.
3. 1031 bp fragment replaced by 1000 bp.

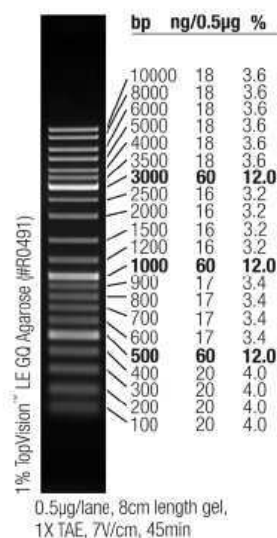


Abbildung 26: O'GeneRuler[™] DNA Ladder Mix, ready-to-use [35]

4.4.2 Protein Größenstandard

- PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

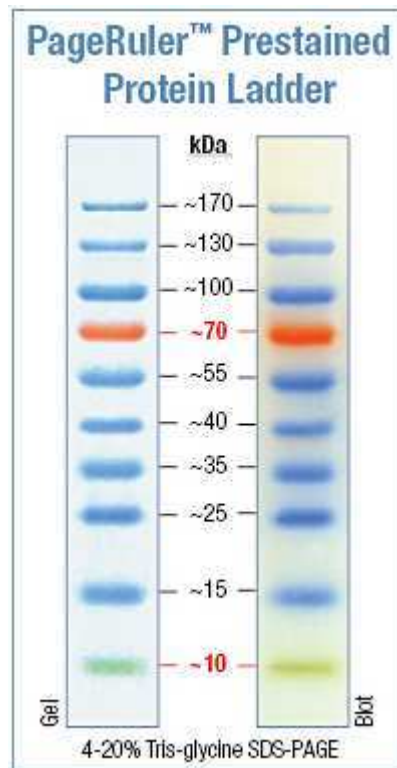


Abbildung 27: PageRuler™ Prestained Protein Ladder

4.4.3 Kits

- GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
- GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit (Stratagene)

4.5 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von der Firma Roth bezogen mit folgenden Ausnahmen:

- Agar No.1 - Lab

4.6 Medien, Puffer & Lösungen

4.6.1 Puffer und Lösungen

4.6.1.1 10 x YNB

13,4 % Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat

134 g YNB wurden in 1 L H_2O_{dest} durch Rühren und Erwärmen vollständig gelöst. Das 10 x YNB wurde 20 min bei 120 °C autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

4.6.1.2 10 x Dextrose

20 % Glucose

200 g Glucose wurden in 1000 ml H_2O_{dest} gelöst, 20 min bei 120 °C autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

4.6.1.3 500 x Biotin

0,02 % Biotin

20 mg Biotin wurden in 100 ml H_2O_{dest} gelöst, steril filtriert, zu je 50 ml aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Das Sterilfiltrieren wurde mit einem Filtropur S 0,2 PAT US 4900449 Spritzenfilter der Firma SARSTEDT durchgeführt.

4.6.1.4 10 x Sucrose

10 % Sucrose

50 g Sucrose wurden in 500 ml H_2O_{dest} gelöst, steril filtriert [27] und bei 4 °C gelagert.

4.6.1.5 1 M KH_2PO_4

1 M KH_2PO_4

68,05 g KH_2PO_4 wurden in 500 ml H_2O_{dest} gelöst und autoklaviert. Lagerung bei 4 °C.

4.6.1.6 1 M K_2HPO_4

1 M K_2HPO_4

87,09 g K_2HPO_4 wurden in 500 ml H_2O_{dest} gelöst und autoklaviert. Lagerung bei 4 °C.

4.6.1.7 Phosphatpuffer (pH7)

1 M Phosphatpuffer

307,5 ml 1 M K_2HPO_4 -Puffer wurden mit 192,5 ml KH_2PO_4 -Puffer gemischt und mit 2 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

4.6.1.8 2 M NaOH

2 M NaOH

4 g NaOH wurde in 50 ml H₂O_{dest} gelöst.

4.6.1.9 BEDS

1 M Sorbitol

10 mM Bicine

3 % Ethylenglycol

5 % DMSO

0,4080 g Bicin und 45,5 g Sorbitol wurden in 230 ml H₂O_{dest} gelöst und der pH-Wert mit 2 M NaOH auf 8,3 eingestellt. Dann wurden 7,5 ml Ethylenglycol und 12,5 ml DMSO hinzugegeben, gemischt und die Lösung steril filtriert (d = 2 µm) und bei 4 °C gelagert. Das Sterilfiltrieren wurde mit einem Filtropur S 0,2 PAT US 4900449 Spritzenfilter der Firma SARSTEDT durchgeführt.

4.6.1.10 2x Glycerol

20 % Glycerol

20 ml Glycerin wurden mit H₂O_{dest} auf 100 ml aufgefüllt und 20 min bei 120 °C autoklaviert.

4.6.1.11 TAE-Puffer

50 x TAE-Puffer: 484 g Tris, 29,2 g EDTA wurden in 1,5 L H₂O_{dest} gelöst, 114,2 ml Essigsäure zupipettiert und mit H₂O_{dest} auf 2 Liter aufgefüllt. Um 1 x TAE Puffer herzustellen, wurden 200 ml 50 x TAE-Puffer mit H₂O_{dest} auf 10 L aufgefüllt.

4.6.1.12 2,5 mM dNTP

2,5 mM dATP

2,5 mM dTTP

2,5 mM dCTP

2,5 mM dGTP

Das Primergemisch wurde aus den vier einzelnen 100 mM dNTP-Lösungen der Firma Fermentas (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) hergestellt. Dazu wurden je 12,5 µl der dNTP-Lösungen gemischt und mit H₂O_{dest} auf 500 µl aufgefüllt und zu je 50 ml aliquotiert.

4.6.1.13 1 M DTT

1 M DTT

1,54 g DTT wurden in 10 ml H₂O_{dest} gelöst und die Lösung mit einem Filtropur S 0,2 PAT US 4900449 Spritzenfilter der Firma SARSTEDT steril filtriert.

4.6.1.14 1 M Sorbitol

1 M Sorbitol

9,11 g Sorbitol wurden in 50 ml H₂O_{dest} gelöst und mit einem Filtropur S 0,2 PAT US 4900449 Spritzenfilter der Firma SARSTEDT steril filtriert.

4.6.1.15 1 % Sucrose-Lösung

1 % Sucrose

1 g Sucrose wurde in 100 ml H₂O_{dest} gelöst und bei 4 °C gelagert.

4.6.1.16 5 % MeOH

2,5 ml MeOH wurden mit H₂O_{dest} (steril) auf 50 ml aufgefüllt.

4.6.1.17 10 % Essigsäure

10 % Essigsäure

20 ml Essigsäure wurden mit 180 ml H₂O_{dest} gemischt.

4.6.2 Medien

4.6.2.1 LB-Medium

1 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

0,5 % NaCl

Es wurden 20 g LB-Medium (Lennox) in 1000 ml H₂O_{dest} gelöst. Autoklavieren für 20 min bei 120 °C. Für Agarplatten wurden zusätzlich 15 g/L Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Antibiotika wurde nach Abkühlen auf ca. 30 °C zugegeben: Jeweils 1 ml 1000 x Ampicillin bzw. 1 ml 1000 x Zeocin.

4.6.2.2 YPD-Medium

1 % Hefeextrakt

2 % Pepton

2 % Dextrose (Glucose)

10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton wurden in einem Volumen von 900 ml H₂O_{dest} gelöst und 20 min bei 120 °C autoklaviert, 100 ml 10 x Dextrose zupipettiert und das Medium bei 4 °C gelagert. Für Agarplatten wurden 20 g Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

4.6.2.3 Minimalmedium-Sucrose/Methanol-Platten

0,05 % MeOH

1 % Sucrose

1,34 % YNB

4 x 10⁻⁵ % Biotin

20 g Agar wurden in 793 ml H₂O_{dest} gelöst, für 20 min bei 120 °C autoklaviert, dann 2 ml 500 x Biotin, 100 ml 10 x YNB und 100 ml 10 x Sucrose zugefügt. Durch Rühren wurde auf Handtemperatur gekühlt, 5 ml MeOH vorsichtig (mit der Pipettenspitze wurde in das Medium eingetaucht) zugefügt und die Platten gegossen.

4.6.2.4 BMMSucrose(1%)MeOH(0,5%)

0,05 % MeOH

1 % Sucrose

1,34 % YNB

4 x 10⁻⁵ % Biotin

200 mM Phosphatpuffer pH 7

593 ml H₂O_{dest} wurden 20 min bei 120 °C autoklaviert, im Anschluss wurden 2 ml 500 x Biotin, 100 ml 10 x YNB, 200 ml Phosphatpuffer (pH 7) und 100 ml 10 x Sucrose zugefügt. Durch Rühren wurde auf Handtemperatur gekühlt, 5 ml MeOH vorsichtig (mit der Pipettenspitze wurde in das Medium eingetaucht) zugefügt.

4.6.2.5 BMMSorbitol(0,5%)

1 % Sorbitol

1,34 % YNB

4 x 10⁻⁵ % Biotin

200 mM Phosphatpuffer pH 7

2,5 g Sorbitol wurden in 349 ml H₂O_{dest} gelöst und autoklaviert. 1 ml 500 x Biotin, 50 ml 10 x YNB und 100 ml Phosphatpuffer wurden hinzugegeben und das fertige Medium bei 4 °C gelagert.

4.6.2.6 BMMSorbitol(0,5%)MeOH(1%)

1 % Sorbitol

1,34 % YNB

4×10^{-5} % Biotin

200 mM Phosphatpuffer pH 7

1 % MeOH

2,5 g Sorbitol wurden in 344 ml H₂O_{dest} gelöst und autoklaviert. 1 ml 500 x Biotin, 50 ml 10 x YNB und 100 ml Phosphatpuffer wurden hinzugegeben und das Medium bei 4 °C gelagert. Kurz vor dem Einsatz des Mediums wurden 5 ml MeOH hinzupipettiert und das Medium gründlich durchmischt.

4.7 Primer

Die Primer wurden bei der Firma Invitrogen bestellt. Die Primer wurden in H₂O_{dest} gelöst (pro 1 nmol Primer 10 µl H₂O_{dest}, c_{End} = 100 pmol/µl) bei -20 °C gelagert.

Tabelle 24: Primer

Name	Sequenz	Zusatz
Bgl2Exfwd	TCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGG	<i>PvuI</i>
Bgl2Exrev	AATCAAAGCTTGTC AATTGGAACCGATCG	<i>HindIII</i>
Bgl2Mutfwd	GCCCTTTCGTCGCATGCAACATCCAAAGACGAAAG	<i>SphI</i>
Bgl2Mutrev	TCTTTGGATGTTGCATGCGACGAAAGGGCC	<i>SphI</i>
Sph1Exfwd	ATTTAACTGCAGTATACTGAGTTTGTTAATGATACAATAA ACTG	<i>PstI</i>
Sph1Exrev	TTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGG	<i>PvuI</i>
Sph1Mutfw	TTTATCTCAAGATCTTCACTGACTCGCTGCGCTC	<i>BglII</i>
Sph1Mutrev	GCAGCGAGTCAGTGAAGATCTTGAGATAAATTCACG	<i>BglII</i>
P1 Levfwd	CTCTCGAGAAAAGAGCCGATTCAAGCTACTATGATGAGG	<i>XhoI</i> , <i>KEX2</i>
P2 Levrev	ACGCGGCCGCTTAAGACTCCTTCGTTACATTCTG	<i>NotI</i>
aFSErrfwd	TGAAAGCTTTTGATTTAACGACTTTAACGACAAC	<i>HindIII</i>
aFSErrrev	GACTCGAGAGATACCCCTTCTTCTTTAGCAG	<i>XhoI</i>
aFSPfwd	TGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGG	<i>SacI</i>
aFSPrev	TCGCGGCCGCTCTTTCTCGAGGAATAATTAGTTGTTTTT GATCTTC	<i>NotI</i> , <i>KEX2</i> , <i>XhoI</i>

nSSsacCfwd1	TGAAAGCTTATGAAAAAGAGACTGATTCAAGTC	<i>HindIII</i>
nSSsacCrev1	AGCAGGGTGAACATGATCATGACTTGAATCAGTC	
nSSsacCfwd2	TCATGTTACCCCTGCTGTTGACTATGGCATTTC	
nSSsacCrev2	AGGCGGCCGCCTCGAGTGCATCTGCCGAAAATGCCATAG TC	<i>NotI, XhoI</i>
InvitroaFSSfwd	TTAAAGCTTATGAGATTCCTTCAATTTTACTG	<i>HindIII</i>
InvitroaFSSrev	AGGCGGCCGCCTCGAGAGATACCCCTTCTTCTTAGC	<i>NotI, XhoI</i>
SeqLfwd1	GGGGAATATCACTTGTCTATCAATACCATC	
SeqLrev1	CGGTCACCGGCCGCAAGCACCATCAC	
SeqLfwd2	CTGTATCCTGGTCTGATATCCATCCACAG	
SeqLrev2	CTTACTTTAAATTCTGCATTTATTCATAG	
SeqLfwd3	CTGGACGACTGTAAATGGCACGTGGGC	
SeqLrev3	AGGTCATGCTTCGCATCCACATTGGC	
seq8fwd	GTTATTGTCTCATGAGCGG	
seq1rev	CCCAATAACTGGGCTGGTT	
seq4fwd	ACTAACTGACTGTCGTACGG	
seq4rev	GCTCTGCTAATCCTGTTACCA	
seq1fwd	CAGTCTCTCTATCGCTTCTGAAC	
seq7rev	CGCACAACCATGCTAAGATA	
MFBfwd	TGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCC	
MFBrev	GTATTGATAGAACAAGTGATATTCCCC	

Vor die Restriktionsschnittstellen zu Beginn der Primer wurden zusätzlich so viele Basen angehängt, dass die Funktion des Restriktionsenzym nicht beeinträchtigt wurde [36].

4.8 Plasmidkarten

Stammsammlungsnummern der vier generierten Plasmide in der Stammsammlung des Instituts für Molekulare Biotechnologie der Technischen Universität Graz:

1. pEHAOX1aHis4Bgl: 3095
2. pEHAOX1aHis4Sph: 3096
3. pEHAOX1His4Bgl: 3097
4. pEHAOX1His4Sph: 3098

4.8.1 pEVAHis4SphI

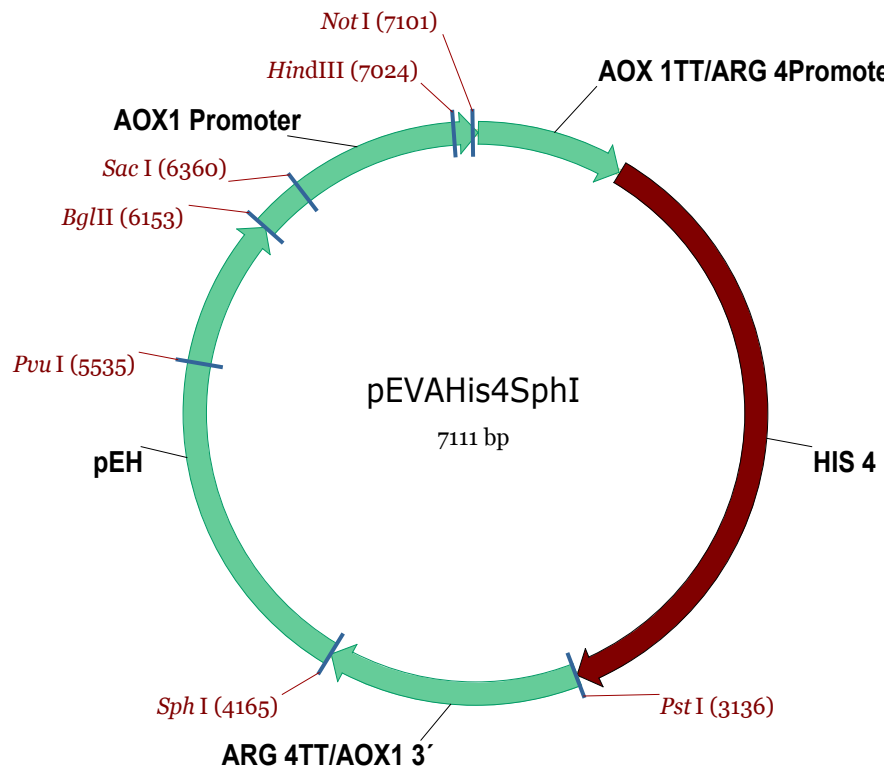


Abbildung 28: pEVAHis4SphI

4.8.2 pGAPZalphaLevKex

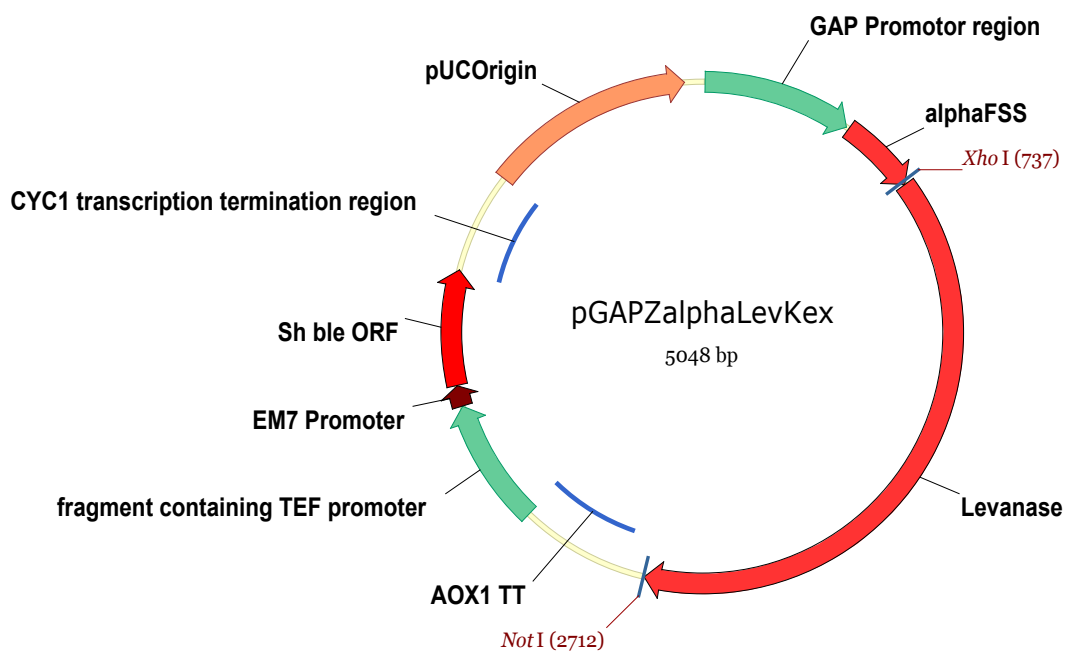


Abbildung 29: pGAPZalphaLevKex

4.8.3 pEHAOX1His4Sph (3098) / pEHAOX1His4Bgl (3097)

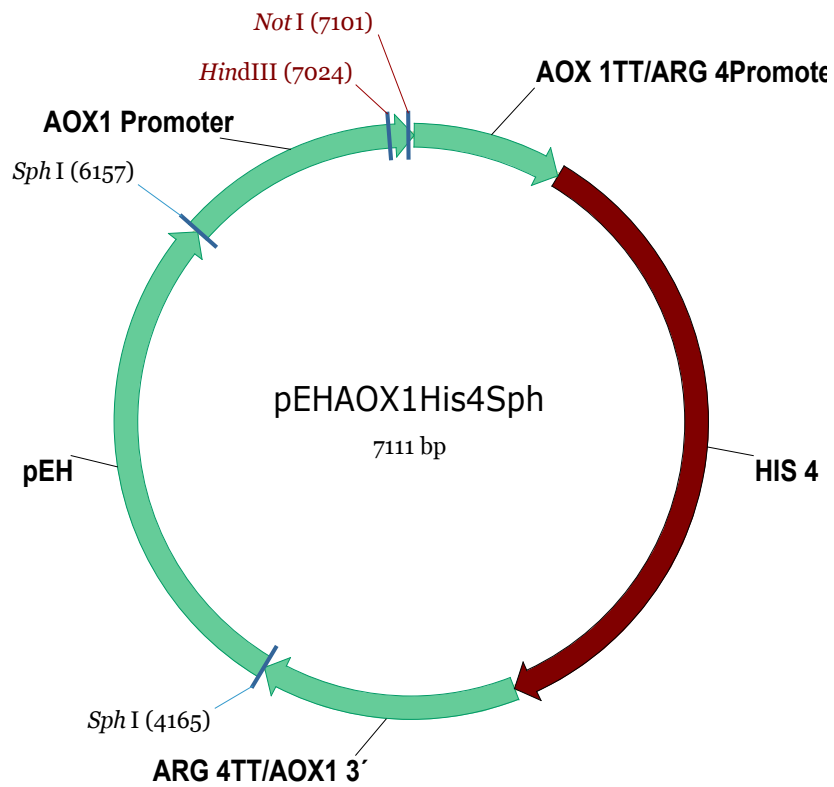


Abbildung 30: pEHAOX1His4Sph

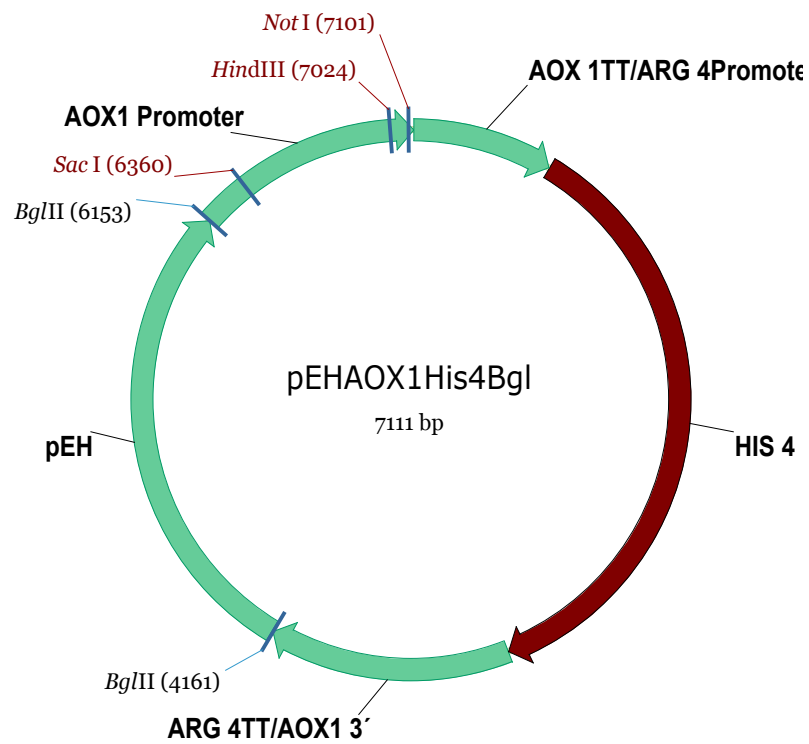
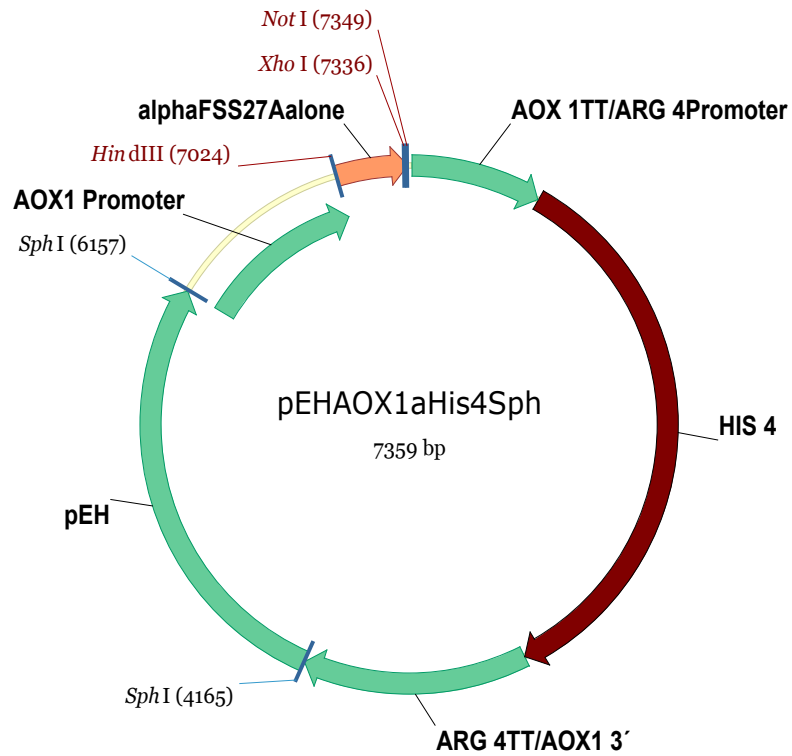
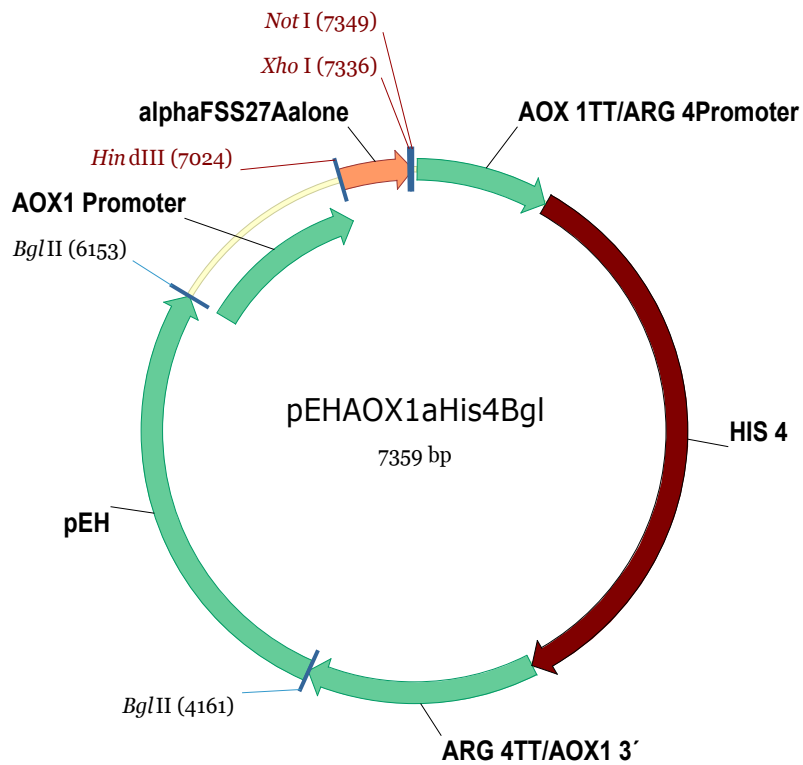


Abbildung 31: pEHAOX1His4Bgl

4.8.4 pEHAOX1 α His4Sph (3096) / pEHAOX1 α His4Bgl (3095)Abbildung 32: pEHAOX1 α His4SphAbbildung 33: pEHAOX1 α His4Bgl

4.8.5 pEHAOX1 α His4BglLevK

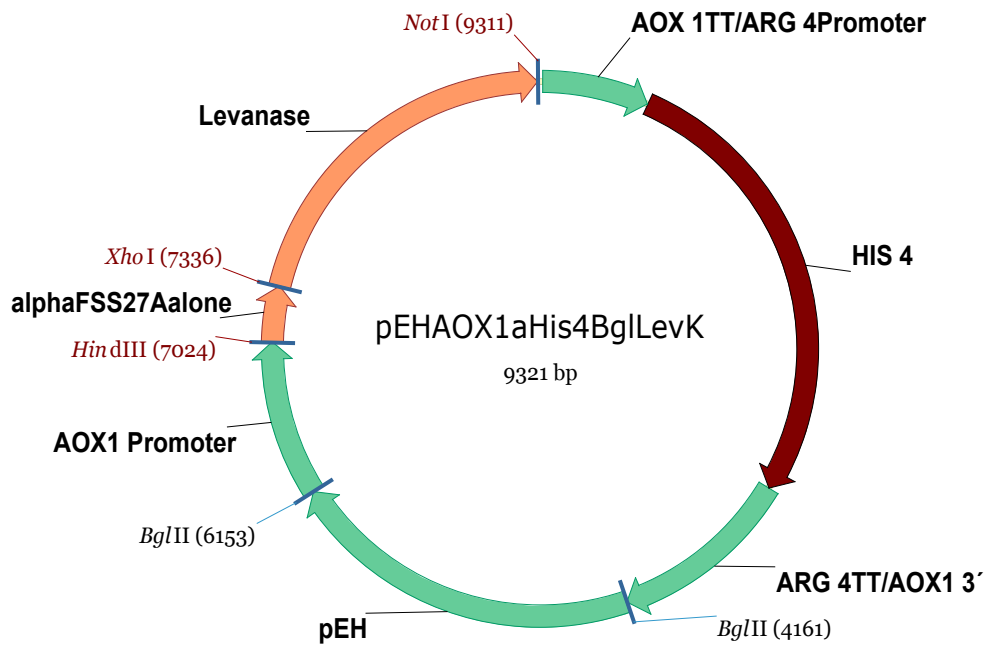


Abbildung 34: pEHAOX1 α His4BglLevK

4.8.6 pEHvarALevK / pEHvarBLevK / pEHvarCLevK

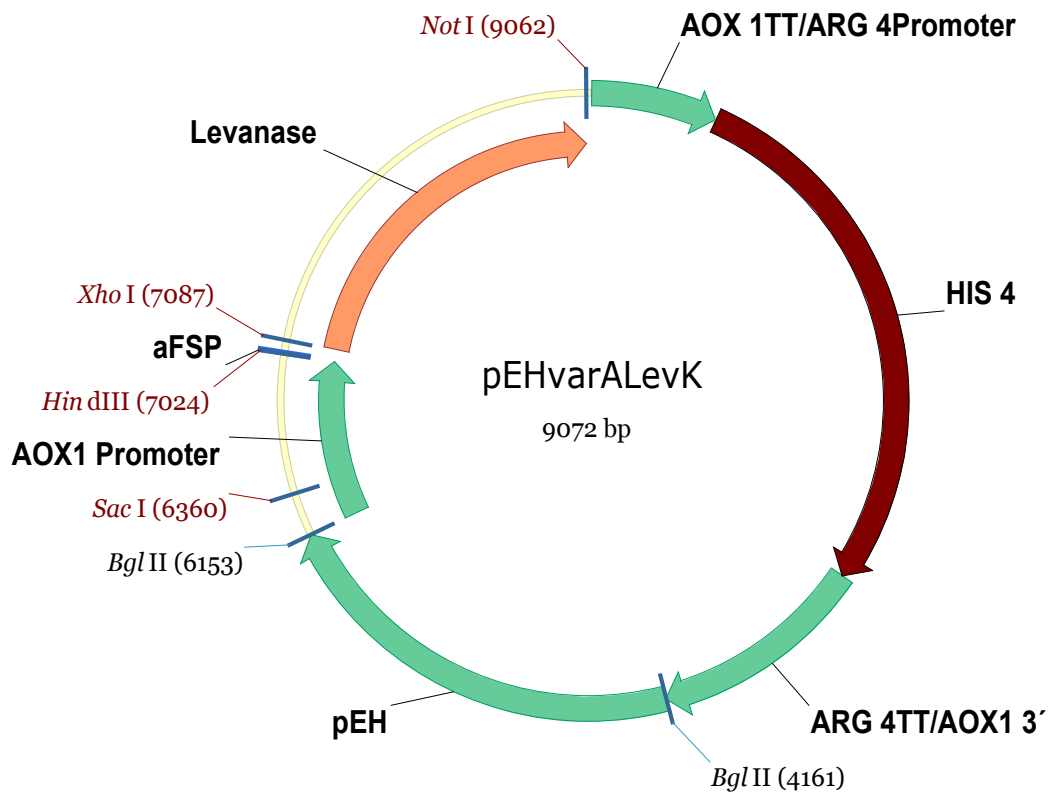


Abbildung 35: pEHvarALevK

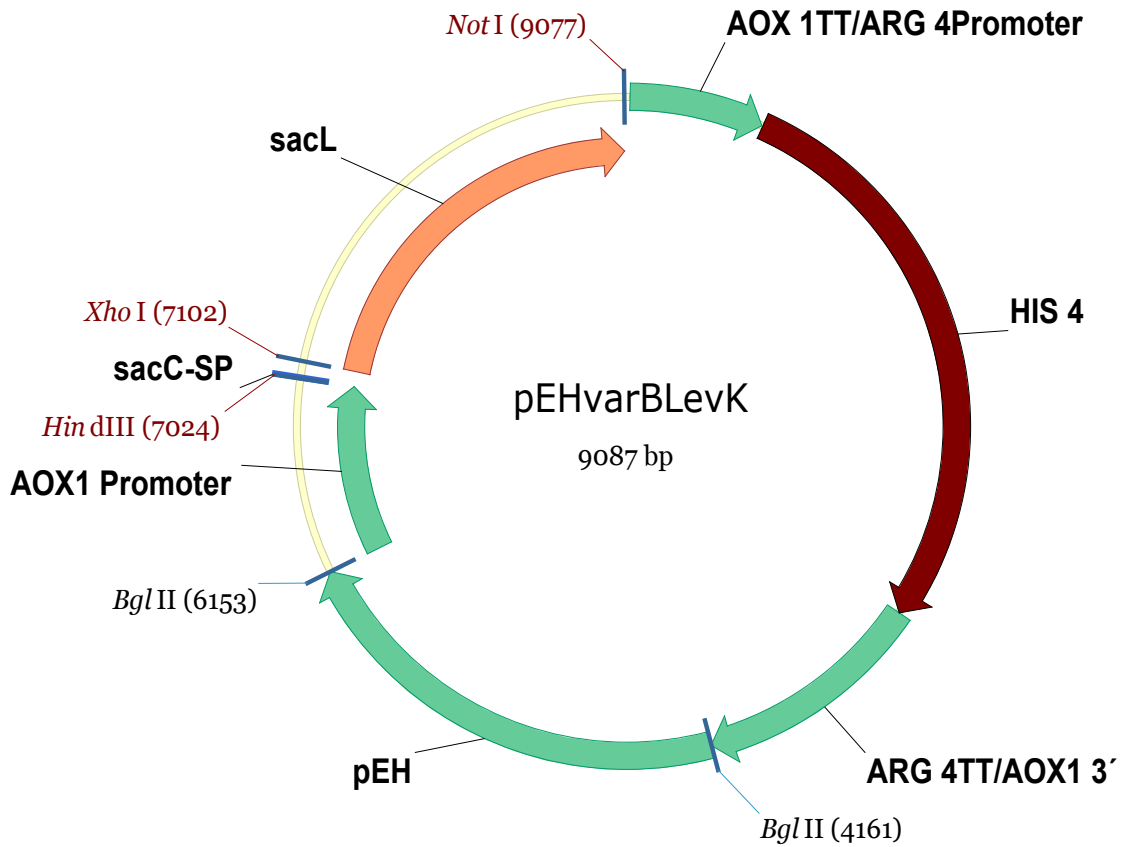


Abbildung 36: pEHvarBLevK

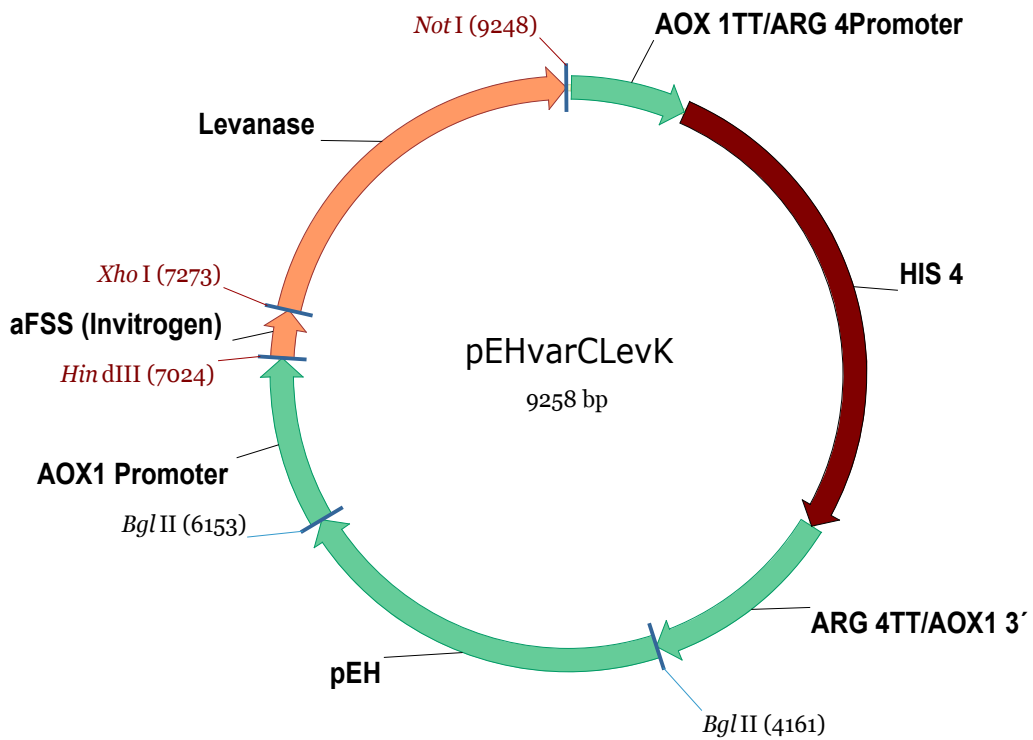


Abbildung 37: pEHvarCLevK

4.8.7 0704534pGA4

Das 0704534pGA4-Plasmid wurde von der Firma Geneart synthetisiert.

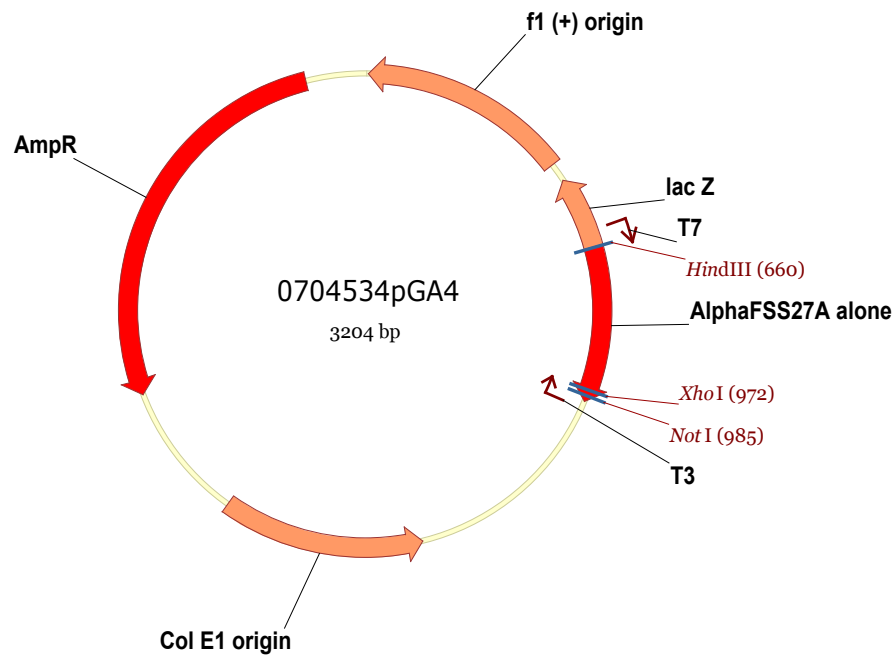


Abbildung 38: 0704534pGA4

4.8.8 pPIC9

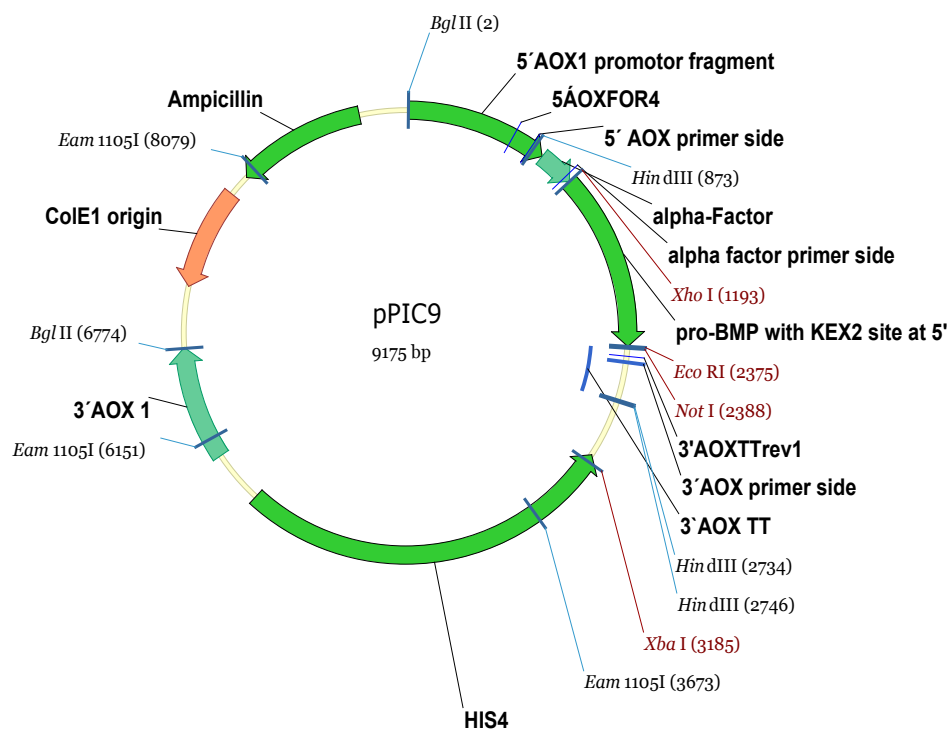


Abbildung 39: pPic9

Literaturverzeichnis

1. S. Macauley-Patrick, M.L. Fazenda, B. McNeil, L.M. Harvey. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005. 22(4): 249-70.
2. G. Gellissen. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000. 54(6): 741-50.
3. J.L. Cereghino, J.M. Cregg, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000. 24(1): 45-66.
4. G.P. Lin-Cereghino, L. Godfrey, B.J. de la Cruz, S. Johnson, S. Khuongsathiene, I. Tolstorukov, M. Yan, J. Lin-Cereghino, M. Veenhuis, S. Subramani, J.M. Cregg. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(3): 883-97.
5. M. Jahic, A. Veide, T. Charoenrat, T. Teeri, S.O. Enfors. Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog*, 2006. 22(6): 1465-73.
6. F.S. Hartner, A. Glieder. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact*, 2006. 5: 39.
7. H.R. Waterham, K.A. Russell, Y. Vries, J.M. Cregg. Peroxisomal targeting, import, and assembly of alcohol oxidase in *Pichia pastoris*. *J Cell Biol*, 1997. 139(6): 1419-31.
8. O. Cos, R. Ramon, J.L. Montesinos, F. Valero. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb Cell Fact*, 2006. 5: 17.
9. J.M. Cregg, K.R. Madden, K.J. Barringer, G.P. Thill, C.A. Stillman. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*, 1989. 9(3): 1316-23.
10. Couderc, R., Baratti, J., (1980). Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: Purification and properties of alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.* 44: 2279-89
11. V.G. Chiruvolu, J. M. Chiruvolu, M.M. Meagher. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in

- fedbatch fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997. 21: 277-283.
12. M. Inan, M.M. Meagher. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, 2001. 92(6): 585-9.
 13. I.B. Sears, J. O'Connor, O.W. Rossanese, B.S. Glick. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 1998. 14(8): 783-90.
 14. G.P. Lin Cereghino, J. Lin Cereghino, A. Jay Sunga, M.A. Johnson, M. Lim, M.A.G. Gleeson, J.M. Cregg. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene*, 2001. 263(1-2): 159-169.
 15. M. Inan, M.M. Meagher. The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, 2001. 92(4): 337-41.
 16. J.F. Tschopp, P.F. Brust, J.M. Cregg, C.A. Stillman, T.R. Gingeras. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res*, 1987. 15(9): p. 3859-76.
 17. M.A. Johnson, H.R. Waterham, G.P. Ksheminska, L.R. Fayura, J.L. Cereghino, O.V. Stasyk, M. Veenhuis, A.R. Kulachkovsky, A.A. Sibirny, J.M. Cregg. Positive selection of novel peroxisome biogenesis-defective mutants of the yeast *Pichia pastoris*. *Genetics*, 1999. 151(4): p. 1379-91.
 18. H.R. Waterham, M.E. Digan, P.J. Koutz, S.V. Lair, J.M. Cregg. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 1997. 186(1): 37-44.
 19. L.O. Tremblay, Campbell Dyke, N., Herscovics, A. Molecular cloning, chromosomal mapping and tissue-specific expression of a novel human alpha-1,2- mannosidase gene involved in N-glycan maturation. *Glycobiology*, 1998 8: 585-95
 20. E. Wanker, A. Huber, H. Schwab. Purification and characterization of the *Bacillus subtilis* levanase produced in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1995. 61(5): 1953-8.
 21. E. Wanker, K. Schorgendorfer, H. Schwab. Expression of the *Bacillus subtilis* levanase gene in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 1991. 18(3): 243-54.
 22. E. Wanker, R.J. Leer, P.H. Pouwels, H. Schwab. Expression of *Bacillus subtilis* levanase gene in *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995. 43(2): 297-303.

23. F. Kunst, M. Steinmetz, J.A. Lepesant, R. Dedonder. Presence of a third sucrose hydrolyzing enzyme in *Bacillus subtilis*: constitutive levanase synthesis by mutants of *Bacillus subtilis* Marburg 168. *Biochemie*, 1977. 59(3): 289-92.
24. Sandra Majer. Expression of human growth hormone and human growth hormone binding protein. Doctorial Thesis, 2004 (Institut für Molekulare Biotechnologie, Technische Universität Graz).
25. A.J. Brake, J.P. Merryweather, D.G. Coit, U.A. Heberlein, F.R. Masiarz, G.T. Mullenbach, M.S. Urdea, P. Valenzuela, P.J. Barr. α -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984. 81: 4642-4646,
26. Eva Hoffmann. Development of a New Expression System in *Pichia pastoris*. Diplomarbeit, 2007 (Institut für molekulare Biotechnologie, Technische Universität Graz).
27. Michaela Prischl. Mutagenesis of the α -factor signal sequence. Annual report May 2006 – May 2007, 2007 (Institut für Molekulare Biotechnologie, Technische Universität Graz).
28. Stratagene. GeneMorph[®] II Random Mutagenesis Kit. INSTRUCTION MANUAL: 4.
29. Joan Lin-Cereghino, William W. Wong, See Xiong, William Giang, Linda T. Luong, Jane Vu, Sabrina D. Johnson, and Geoff P. Lin-Cereghino. (2005). Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BioTechniques* 38:44-48
30. Michael Tscherner. Enhancing heterologous protein expression in *Pichia pastoris*. Master thesis, 2007 (Institut für Molekulare Biotechnologie, Technische Universität Graz)
31. Stefanie Kraßnig. Protokoll Projektlabor Molekulare Biotechnologie, 2009 (Institut für Molekulare Biotechnologie, Technische Universität Graz)
32. J. Marienhagen, U. Schwaneberg. *Biochemistry and molecular biology* 2008, *Nachrichten aus der Chemie*, 2009. 3: 278-286.
33. <http://de.wikipedia.org/wiki/Saccharose>
34. <http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>
35. http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/coa_pdf/coa_sm1173.pdf

36. <http://www.fermentas.com/en/support/technical-reference/restriction-enzymes/cleavage-efficiency>
37. <http://www.agowa.de/>

Deutsche Fassung:
Beschluss der Curricula-Kommission für Bachelor-, Master- und Diplomstudien vom 10.11.2008
Genehmigung des Senates am 1.12.2008

EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....
(Unterschrift)

Englische Fassung:

STATUTORY DECLARATION

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

.....
date

.....
(signature)