

**Struktur und Funktionsuntersuchungen  
von Zygotin - ein kanalbildendes Proteintoxin  
mit antimykotischem Potential**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von  
Dipl.-Biol. Marc Lind

Saarbrücken 2010

Tag des Kolloquiums: 19.04.2011

Dekan: Prof. Dr. W. F. Maier

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. I. Bernhardt

Berichterstatter: Prof. Dr. M.J. Schmitt

Prof. Dr. F. Giffhorn

Akad. Mitarbeiter: Dr. F. Hannemann

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>                            | <b>3</b>  |
| <b>1. Einleitung .....</b>                                 | <b>7</b>  |
| 1.1. Killertoxine von Hefen .....                          | 7         |
| 1.2. Genetischer Hintergrund des Killerphänomens .....     | 8         |
| 1.3. Wirkungsweise der Killertoxine .....                  | 11        |
| 1.4. Das Killertoxin Zygotin.....                          | 13        |
| 1.5. Ziele dieser Arbeit.....                              | 18        |
| <b>2. Material und Methoden.....</b>                       | <b>19</b> |
| 2.1. Organismen .....                                      | 19        |
| 2.1.1. <i>E. coli</i> Stämme .....                         | 19        |
| 2.1.2. Hefestämme .....                                    | 19        |
| 2.2. Plasmide.....   | 20        |
| 2.3. Oligonukleotide .....                                 | 23        |
| 2.4. Nährmedien .....                                      | 26        |
| 2.4.1. Nährmedien Bakterien.....                           | 27        |
| 2.4.2. Nährmedien Hefen .....                              | 28        |
| 2.5. Arbeitsmaterialien.....                               | 34        |
| 2.6. Kulturbedingungen .....                               | 35        |
| 2.6.1. Kultivierung <i>E. coli</i> .....                   | 35        |
| 2.6.2. Kultivierung Hefen .....                            | 36        |
| 2.7. Stammhaltung und Lagerung.....                        | 37        |
| 2.8. Allgemeine molekularbiologische Methoden .....        | 37        |
| 2.8.1. Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i> ..... | 37        |
| 2.8.2. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA .....            | 38        |
| 2.8.3. Agarose-Gelelektrophorese .....                     | 39        |
| 2.8.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....            | 40        |
| 2.8.5. Bestimmung der DNA-Konzentration.....               | 40        |
| 2.8.6. Ligation.....                                       | 40        |
| 2.8.7. Polymerasekettenreaktion (PCR).....                 | 41        |
| 2.8.8. TA-Klonierung.....                                  | 45        |
| 2.8.9. DNA-Sequenzierung.....                              | 46        |
| 2.8.10. Transformationsmethoden .....                      | 47        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.8.11. RNA Präparation aus Hefen nach der Hot Phenol Methode.....   | 52        |
| 2.8.12. Gesamt-RNA-Präparation aus Hefe .....  | 53        |
| 2.8.13. Fällung von dsRNA .....  | 54        |
| 2.8.14. Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden .....  | 54        |
| 2.8.15. Northernblot .....   | 54        |
| 2.9. Arbeiten mit Proteinen .....  | 57        |
| 2.9.1. Zellaufschluss .....  | 57        |
| 2.9.2. Reinigung von Inclusion bodies .....  | 59        |
| 2.9.3. Proteinfällung mittels Trichloressigsäure und DOC .....   | 61        |
| 2.9.4. Proteinfällung mittels Ethanol .....  | 61        |
| 2.9.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....   | 62        |
| 2.9.6. Coomassie-Färbung .....   | 63        |
| 2.9.7. Silberfärbung.....  | 64        |
| 2.9.8. Western Analyse .....   | 65        |
| 2.9.9. Herstellung von Zygotin Killertoxinkonzentrat .....   | 66        |
| 2.9.10. Agardiffusionstest (MBA-Test) .....  | 67        |
| 2.9.11. Proteinbestimmung.....   | 67        |
| 2.9.12. Fluoreszenzmikroskopie .....   | 68        |
| 2.9.13. Indirekte Immunfluoreszenz.....  | 68        |
| 2.10. Proteinreinigung.....  | 70        |
| 2.10.1. Umpufferung .....  | 70        |
| 2.10.2. Kationenaustauschchromatographie .....   | 70        |
| 2.10.3. Anionenaustauschchromatographie .....  | 71        |
| 2.10.4. Affinitätschromatographie.....   | 71        |
| 2.11. Kryo-Elektronenmikroskopie.....  | 71        |
| 2.12. Fermentation <i>P. pastoris</i> .....  | 72        |
| 2.12.1. Glycerol-Batch-Phase.....  | 73        |
| 2.12.2. Glycerol-Fed-Batch-Phase .....   | 74        |
| 2.12.3. Methanol-Fed-Batch-Phase .....   | 74        |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>   | <b>75</b> |
| 3.1. Native Reinigung von Zygotin .....  | 75        |
| 3.2. Analytische Ultrazentrifugation, Kristallisation und Kryo-Elektronen-mikroskopie von Zygotin .....            | 78        |
| 3.3. Konstruktion von Plasmiden zur Expression von Wildtyp-Zygotin und Zygotin-Varianten in <i>Z. bailii</i> ..... | 82        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.3.1. Konstruktion von Zygocin-Varianten mit Punktmutationen und Deletionen .....                                 | 84         |
| 3.3.2. Konstruktion von Expressionsplasmiden mit „getaggten“ Toxinvarianten .....                                  | 87         |
| 3.4. Expression von Zygocin und dessen Varianten in <i>Z. bailii</i> .....   | 90         |
| 3.5. Heilung des Wildtypkillerstammes <i>Z. bailii</i> 412 .....   | 93         |
| 3.5.1. Heilung von <i>Z. bailii</i> 412 durch die VBS-Struktur von M28 .....                                       | 94         |
| 3.5.2. Northern Analyse der mit der M28-VBS-Struktur geheilten Klone des Wildtypkillers .....                      | 96         |
| 3.5.3. Heilung von <i>Z. bailii</i> 412 durch Expression einer <i>antisense</i> -VBS-Struktur von Zygocin .....    | 97         |
| 3.5.4. Northern Analyse der mit der Zygocin <i>antisense</i> VBS-Struktur geheilten Klone des Wildtypkillers ..... | 98         |
| 3.6. Zygocin Expression in geheilten Nichtkiller-Stämmen .....   | 99         |
| 3.7. Zygocin-Expression in <i>Kluyveromyces lactis</i> .....   | 100        |
| 3.8. Zygocin Expression in <i>E. coli</i> .....  | 105        |
| 3.8.1. Periplasmatische Expression von Zygocin in <i>E. coli</i> .....   | 105        |
| 3.8.2. Zytoplasmatische Zygocin Expression in <i>E. coli</i> .....   | 109        |
| 3.8.3. Reinigung von <i>inclusion bodies</i> .....   | 115        |
| 3.8.4. Rückfaltung gereinigter (His) <sub>6</sub> -Zygocin <i>inclusion bodies</i> .....                           | 121        |
| 3.9. Heterologe Expression von Zygocin und von Zygocin-Varianten in <i>Pichia pastoris</i> .....                   | 123        |
| 3.9.1. Erstellung der Expressionskonstrukte und Expressionsplasmide .....  | 123        |
| 3.9.2. Transformation und Zygocin Expression in <i>P. pastoris</i> .....   | 127        |
| 3.9.3. Optimierung der Zygocin Expression in <i>P. pastoris</i> .....  | 131        |
| 3.9.4. Transformation und Expression der Zygocinvarianten in <i>P. pastoris</i> .....                              | 133        |
| 3.9.5. Transformation und Expression von getaggten Zygocin-Varianten in <i>P. pastoris</i> .....                   | 136        |
| 3.9.6. Fermentation von <i>P. pastoris</i> GS115 zur Zygocin Produktion .....                                      | 139        |
| 3.9.7. Fermentation von <i>P. pastoris</i> GS115 zur mRFP-Zygocin Produktion .....                                 | 142        |
| <b>4. Diskussion .....</b>   | <b>146</b> |
| 4.1. Reinigung und Strukturuntersuchungen von Zygocin .....  | 148        |
| Analytische Ultrazentrifugation .....  | 149        |
| Kryoelektronenmikroskopie toxinbehandelter Liposomen .....   | 151        |
| 4.2. Expression von Zygocin in <i>Z. bailii</i> .....  | 152        |
| 4.3. Heilung des <i>Z. bailii</i> 412 Wildtypkillerstammes und Zygocinexpression .....                             | 154        |
| 4.4. Expression von Zygocin in <i>Kluyveromyces lactis</i> .....   | 157        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.5. Expression von Zygotin in <i>E. coli</i> .....                                      | 158        |
| 4.6. Expression von Zygotin in <i>P. pastoris</i> .....                                  | 161        |
| Expression von Zygotin-Mutanten in <i>P. pastoris</i> .....                              | 163        |
| Expression getaggtter Zygotin-Varianten in <i>P. pastoris</i> .....                      | 169        |
| 4.7. Fermentation von <i>P. pastoris</i> zur Produktion von Zygotin und mRFP-Zygotin ... | 172        |
| <b>5. Zusammenfassung .....</b>  | <b>177</b> |
| <b>6. Summary .....</b>  | <b>178</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>179</b> |
| <b>8. Abkürzungen.....</b>   | <b>198</b> |
| <b>Veröffentlichung .....</b>  | <b>201</b> |
| <b>Danksagung .....</b>  | <b>202</b> |

## 1. Einleitung

### 1.1. Killertoxine von Hefen

Als Killertoxine werden Proteine bezeichnet, die von Hefen ins Medium sezerniert werden und dabei andere sensitive Hefen meist der gleichen Gattung, seltener einer anderen Gattung, abtöten (Petering *et al.*, 1991). Dieses Phänomen wurde erstmals von Bevan und Makower beschrieben. Sie entdeckten ein Killerphänomen, das bei einer aus einer Brauereikontamination isolierten *Saccharomyces cerevisiae* Hefe auftrat (Bevan & Makower, 1963). Das Phänomen der Produktion von Exotoxinen mit antimikrobieller Aktivität ist bei Hefen weit verbreitet (Breinig & Schmitt, 2002; Maglianin *et al.*, 1997; Somers & Bevan, 1969; Wickner, 1985). Die Killerhefen töten sensitive Hefen derselben oder einer anderen Gattung ohne einen direkten Zell-Zell-Kontakt nur durch die sezernierten Proteine bzw. Glykoproteine ab. Dabei verhalten sich die Killerstämme jeweils gegen ihr eigenes Toxin immun, allerdings nicht gegen die Toxine von anderen Killerstämmen. Neben den Stämmen, die aktiv Toxin sezernieren, gibt es neutrale Hefen, die die Fähigkeit zur Toxinproduktion verloren haben, sich aber gegen bestimmte Toxine resistent verhalten. Nachdem das Killerphänomen zuerst bei *S. cerevisiae* beobachtet wurde, konnte eine Vielzahl weiterer Hefegattungen beschrieben werden, die ebenfalls solche Toxine bilden. Zu diesen Hefegattungen zählen: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Ustilago*, *Williopsis* und *Zygosaccharomyces* (Philliskirk & Young, 1975; Stumm *et al.*, 1977; Hodgson *et al.*, 1995; Stark *et al.*, 1990; Theisen *et al.*, 2000).

Die genetische Grundlage dieser Killertoxine kann dabei sehr unterschiedlich sein. Bei den Toxin-Genomen von *S. cerevisiae* und *Z. bailii* handelt es sich um zytoplasmatisch vererbte, encapsidierte dsRNA-Viren (Tipper & Schmitt, 1991). Die Information zur Toxinexpression kann aber auch auf linearen DNA-Plasmiden (*Kluyveromyces lactis*, *Pichia acaciae*) oder chromosomalen Genen (*Candida glabrata*, *Williopsis californica*) kodiert vorliegen (Hodgson *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 1994; Magliani *et al.*, 1997, Radler *et al.*, 1993). Diese Killerphänotypen konnten sowohl in natürlichen Hefeisolaten als auch bei Laborstämmen beobachtet werden.

Killerhefen finden in biotechnologischen Bereichen der Industrie bereits als Starterkulturen von Fermentationsprozessen Anwendung, um dort Kontaminationen mit unerwünschten Hefestämmen zu verhindern (Javadekar *et al.*, 1995; Petering *et al.*, 1991). Außerdem werden Killerhefen bei der Herstellung von Nahrungsmitteln, Bier und Wein eingesetzt, um Kontaminationen mit Wildtyphefen zu unterbinden (Lowes *et al.*, 2000; Schlaich *et al.*, 2007). Killertoxine können auch zur Herstellung transgener Pflanzen verwendet werden. So konnten nach heterologer Expression des KP4-Toxins aus dem phytopathogenen, filamentösen Pilz *Ustilago maydis* in Tabakpflanzen transgene Pflanzen erhalten werden, welche sich resistent gegenüber PK4-sensitiven Pilzen zeigten (Park *et al.*, 1996). Die Expression viraler Killertoxine in transgenen Pflanzen könnte in Zukunft zur Herstellung von schadpilzresistenten Nutzpflanzen genutzt werden. In der Natur ist die Produktion und Sekretion eines Killertoxins wahrscheinlich bei der Besiedlung von ökologischen Nischen wie verderbenden Früchten von Nutzen. Durch das Killertoxin können sensitive Hefen aus der jeweiligen Nische verdrängt werden, und die Killerhefe kann sich durchsetzen (Pintar & Starmer, 2003; Starmer *et al.*, 1987). Dieser ökologische Vorteil bei den in der Natur begrenzt auftretenden Nährstoffen wiegt den Nachteil der zusätzlichen Proteinproduktion auf.

## **1.2. Genetischer Hintergrund des Killerphänomens**

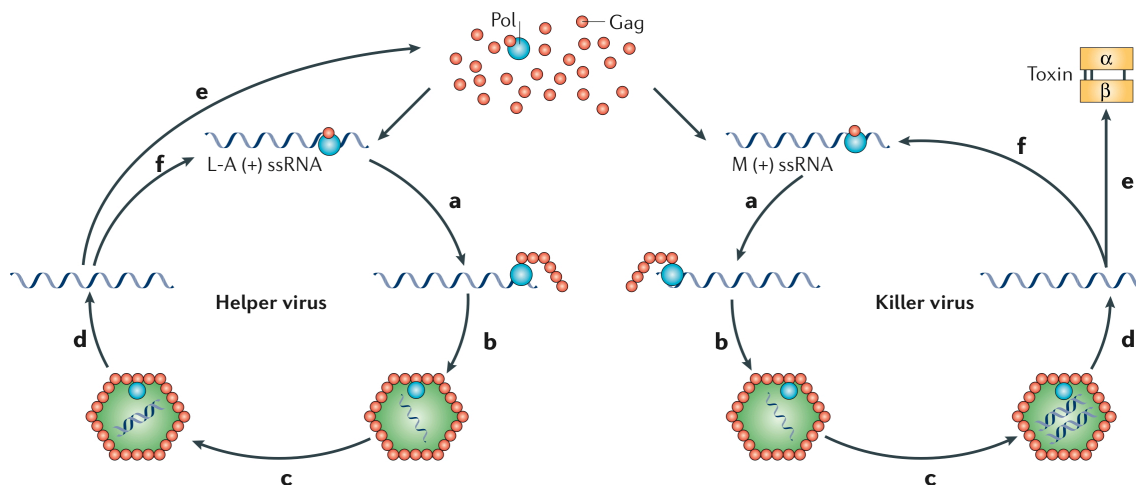
Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Killertoxin Zygocin aus der Hefe *Zygosaccharomyces bailii* wird ebenfalls wie die Killertoxine von *S. cerevisiae* durch dsRNA-Viren kodiert. Bei diesen im Zytoplasma der infizierten Hefezelle lokalisierten dsRNA-Genomen handelt es sich um Mykoviren, die aufgrund ihrer fehlenden Infektiosität auch als *virus like particles* (VLP) bezeichnet werden. Sie werden rein zytoplasmatisch vererbt und sind von einer einfach aufgebauten ikosaedrischen Capsidhülle umgeben. Das bisher am intensivsten untersuchte Killersystem ist das der Hefe *S. cerevisiae*. Hier konnten die verschiedenen Killertoxine aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften und der fehlenden Kreuzimmunität in drei Hauptklassen eingeteilt werden: K1, K2, und K28 (Tipper & Bostian, 1984; Tipper & Schmitt, 1991; Wickner, 1992). Vertreter der jeweiligen Killerklassen können sensitive Hefen sowie Mitglieder anderer Killerklassen



abtöten, sind allerdings gegen ihr eigenes Toxin sowie gegen die Toxine der anderen Stämme der gleichen Killerklasse immun (Schmitt & Tipper, 1990; Breinig *et al.*, 2006). An der Ausprägung des Killerphänotyps sind zwei dsRNA-Genome beteiligt. Diese werden aufgrund der Größe der RNA-Genome als  $L_A$  (*large*)-dsRNA und M (*medium*)-dsRNA bezeichnet (Schmitt & Breinig, 2006; Tipper & Schmitt, 1991). Zur Ausprägung eines stabilen Killerphänotyps müssen in Hefen diese zwei dsRNA-Genome gemeinsam vorliegen. Das kleinere der beiden Genome mit einer Größe von 1,5-1,9 kb wird als M-dsRNA bezeichnet. Es enthält die genetische Information für die jeweilige unprozessierte Vorstufe des Killertoxins sowie die Immunitätskomponente (Wickner, 1996). Das mit einer Größe von 4,7 kb größere dsRNA-Genom des  $L_A$ -Virus enthält auf dem positiven Strang zwei *open reading frames* (ORF), von denen der eine für das Hauptcapsidprotein (Gag) kodiert, welches essentiell für die Verpackung der dsRNA in Partikel ist. Der zweite ORF kodiert für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (Pol), welche durch einen -1 ribosomalen *frameshift* als Gag-Pol Fusion exprimiert wird (Dinman *et al.*, 1991; Fujimura *et al.*, 1992; Icho & Wickner, 1989). Das  $L_A$ -Virus fungiert dabei als Helfervirus, indem es dem toxinkodierenden M-Satellitenvirus sowohl das Capsidprotein (Gag) zur Verpackung als auch die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Pol) als Gag-Pol Fusionsprotein zur Replikation des dsRNA-Genoms zur Verfügung stellt (Wickner, 1993) (vgl. Abbildung 1). Dabei enthält jedes  $L_A$ -Virus eine einzelne Kopie des dsRNA-Genoms, und jedes M-Virus kann aufgrund der geringeren Genomgröße zwei Kopien der M-dsRNA enthalten. Die Capsidhülle besitzt eine ikosaedrische Struktur und besteht aus 60 asymmetrischen Dimeren des 76 kDa großen Hüllproteins Gag und aus zwei Kopien des 171 kDa großen Gag-Pol-Fusionsproteins. Während des konservativen Replikationszyklus wird eine einzelsträngige (+)RNA ((+)ssRNA) durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase im Inneren der Virushülle gebildet und anschließend in das Zytoplasma der Hefe ausgeschleust (Castón *et al.*, 1997; Wickner, 1996). Diese (+)ssRNA dient als mRNA für die Translation in Gag, Gag-Pol und in das Vorläufertoxin des M-Virus. Außerdem stellt sie das RNA-Template dar, welches in neue Viruspartikel verpackt wird (Bostian *et al.*, 1984; Esteban & Wickner, 1986).

Die bislang bei *S. cerevisiae* bekannten M-Viren schließen sich gegenseitig in der Zelle auf Ebene der Replikation aus, so dass in einer Hefezelle immer nur ein Typ

von Killervirus vorliegen kann und die Hefen somit auch immer nur ein Killertoxin bilden können. Da die M-Satellitenviren selbst nur das Präprotoxin kodieren, sind sie auf die vom L<sub>A</sub>-Helfervirus bereitgestellten Genprodukte angewiesen und können natürlicherweise nie ohne dieses Helfervirus existieren. Umgekehrt kann nach Verlust des M-Virus und dem damit verbundenen Verlust des Killerphänotyps das L<sub>A</sub>-Virus weiter in der Zelle existieren. Die Hefe wird durch den Verlust des M-Virus allerdings zu einer sensitiven Nichtkillerhefe und hat keine Immunität mehr gegen das ursprüngliche Toxin (Pfeiffer & Radler, 1984; Schmitt & Tipper, 1992). Das Vorhandensein eines solchen L<sub>A</sub>-Virus alleine in der Hefezelle führt zu keinem erkennbaren Phänotyp und wird daher als kryptisch bezeichnet (Tipper & Schmitt, 1991).



**Abbildung 1: Replikationszyklus eines toxinkodierenden Killervirus und seines Helfervirus im Zytoplasma einer Killerhefe.** Sowohl das Killervirus (M) als auch das Helfervirus (L-A) besitzen ein doppelsträngiges RNA- (dsRNA) Genom. Beide konkurrieren um die von L-A kodierten viralen Proteine Gag und Gag-Pol, welche essentiell sind für (a) die Verpackung der einzelsträngigen RNA (ssRNA), (b) den Virion Aufbau und die Encapsidierung, (c) die (-)Strang RNA-Synthese (Replikation) und (d) die (+)Strang RNA-Synthese (Transkription). (e) (+)ssRNA Translation; (f) Gag-Pol Bindung an ss(+)RNA (Schmitt & Breinig, 2006).

Unter den viral kodierten Killertoxinen sind K1, K2 und K28 von *S. cerevisiae* am besten untersucht. Diese werden im Zytoplasma als Präprotoxine synthetisiert, in den Sekretionsweg eingeschleust, dort prozessiert und schließlich von der Zelle sezerniert. Obwohl sie in ihrer Primärstruktur starke Unterschiede zeigen, lassen sich doch gemeinsame Domänen erkennen: ein N-terminales, hydrophobes Sekretionssignal, eine darauf folgende potenziell N-glykosylierte Pro-Region und je eine α- und β-Toxinuntereinheit, welche durch eine potentiell N-glykosylierte

$\gamma$ -Sequenz voneinander getrennt sind. Bei Eintritt des Präprotoxins in das Endoplasmatische Retikulum (ER) wird das N-terminale Signalpeptid (Prä) von der Signalpeptidase abgespalten. Die  $\gamma$ -Untereinheit der beiden Killertoxine K1 und K28 wird im ER N-glykosyliert und anschließend im späten Golgi durch die Endopeptidase Kex2p prozessiert, indem die  $\gamma$ -Sequenz entfernt wird und die beiden Toxinuntereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) des reifen heterodimeren Toxins sezerniert werden (Dignard *et al.*, 1991; Schmitt & Tipper, 1995). Im reifen Toxin sind die beiden Toxinuntereinheiten bei K28 durch eine und bei K1 durch drei Disulfidbrücken kovalent verbunden. Die Spaltung durch Kex2p erfolgt bei sekretorischen Proteinen C-terminal dibasischer Aminosäuren (Lys-Arg; Arg-Arg). Eine Mutation im *KEX2* Gen führt zu einem Nichtkillerphänotyp, da das betroffene Killertoxin nicht mehr prozessiert und sezerniert werden kann (Schmitt & Tipper, 1995). Nachdem die C-Termini der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit freigesetzt wurden, entfernt die Serincarboxypeptidase Kex1p die C-terminalen Argininreste (Dmochowska *et al.*, 1987). Diese Spaltung durch Kex1p ist im Gegensatz zur Spaltung durch Kex2p nicht essentiell. Sie führt lediglich zu einer Steigerung der Toxinaktivität (Breinig *et al.*, 2006; Sendzik, 2003).

### 1.3. Wirkungsweise der Killertoxine

Die drei Hauptklassen (K1, K2 und K28) der von *S. cerevisiae* gebildeten Killertoxine unterscheiden sich hinsichtlich einer Reihe von physikochemischen Eigenschaften wie pH-Optimum oder Temperaturstabilität sowie ihren Abtötungsspektren. Jedoch besitzen sie hinsichtlich ihrer Wirkung auch Gemeinsamkeiten. So töten sie sensitive Hefen in einem zweistufigen Prozess ab. Der erste Schritt der Toxinwirkung ist die energieunabhängige Bindung an einen toxinspezifischen Rezeptor auf Zellwandebene. Im zweiten Schritt findet ein energieabhängiger Transfer auf Ebene der Plasmamembran statt, bei dem das Toxin mit einem Sekundärrezeptor interagiert.

Bei dem heterodimeren K1 Toxin konnten  $\beta$ -1,6-Glukane als Primärrezeptoren identifiziert werden (Hutchins & Bussey, 1983). Als Membranrezeptor wurde Kre1p identifiziert. Dabei handelt es sich um ein O-glykosyliertes Oberflächenprotein, welches über einen GPI-Anker mit der Zytoplasmamembran verbunden

ist und an  $\beta$ -1,6-Glukansynthese und damit an der Biosynthese des K1 Primärrezeptors beteiligt ist (Breinig *et al.*, 2002). Nach Erkennung des Sekundärrezeptors lagert sich das Toxin in die Lipiddoppelschicht ein und zerstört durch die Ausbildung eines Ionenkanals die Membranfunktion, was schließlich zum Tod der Zelle führt (Bussey, 1991; de la Peña *et al.*, 1981; de la Peña *et al.*, 1982). In der  $\alpha$ -Untereinheit von K1 konnten zwei stark hydrophobe Regionen identifiziert werden, weswegen davon auszugehen ist, dass diese Untereinheit an der Ausbildung des Ionenkanals beteiligt ist (Bussey, 1991). Der  $\beta$ -Untereinheit wird die Funktion der Rezeptorerkennung zugeschrieben.

Das K2 Toxin ist bislang nur unzureichend untersucht, so dass weder über den Primär- noch über den Sekundärrezeptor eine genaue Aussage getroffen werden kann. Allerdings konnte gezeigt werden, dass sich  $\Delta kre1$  Mutanten auch resistent gegen K2 verhielten und somit angenommen werden kann, dass sich die Rezeptoren von K1 und K2 überschneiden aber nicht vollständig identisch sind (Novotná *et al.*, 2004). Das Toxin zeigt ähnlich zu K1 und dem in dieser Arbeit untersuchten Zygotin aus der Schadhefe *Zygosaccharomyces bailii* eine ionophore Wirkung (Magliani *et al.*, 1997). Jedoch unterscheidet sich das Toxin gegenüber K1 durch ein sehr viel breiteres Wirkungsspektrum.

Das Killertoxin K28 besitzt im Vergleich zur ionophoren Wirkung der Toxine K1 und K2 einen völlig anderen Wirkungsmechanismus. Der erste Schritt der Toxinwirkung von K28 stellt wie bei den anderen beiden Toxinen die schnelle, energie-unabhängige Bindung an den K28-Primärrezeptor auf Zellwandebene dar. Dieser Primärrezeptor konnte bei K28 als ein hochmolekulares  $\alpha$ -1,3-Mannoprotein identifiziert werden (Schmitt & Radler, 1988). Bei dem Sekundärrezeptor auf Plasmamembranebene handelt es sich um Erd2p (Heiligenstein, 2008), den zellulären HDEL-Rezeptor, der neben den Membranen von ER und Golgi in geringen Mengen auch in der Plasmamembran kolokalisiert. Durch die Rezeptorbindung kommt es ähnlich wie bei bakteriellen A/B Toxinen (Cholera- oder Diphtherie-Toxin) zu einer endozytotischen Aufnahme des Toxins in die sensitive Hefezelle und einem anschließenden Transport des Toxins in retrograder Richtung durch den Sekretionsweg bis in das Zytoplasma. Dort angekommen löst die toxische  $\alpha$ -Untereinheit auf bisher unbekannte Weise bei hohen Toxinkonzentrationen im Zellkern eine Blockierung der DNA-Synthese und

damit einen Zellzyklusarrest beim Übergang von G<sub>1</sub>- zur S-Phase aus (Schmitt & Breinig, 2006; Schmitt *et al.*, 1996). Geringe K28 Toxinkonzentrationen führen zu einer Induktion von Apoptose (Reiter *et al.* 2005; Schmitt & Reiter, 2008).

#### 1.4. Das Killertoxin Zygocin

In der vorliegenden Arbeit wurde das antimykotisch wirkende Proteintoxin Zygocin der Hefe *Z. bailii* näher untersucht. Diese bislang nur unzureichend untersuchten Hefen der Gattung *Zygosaccharomyces* werden wegen ihrer Eigenschaften als Schadhefe in der Zucker-, Saft- und Weinindustrie gefürchtet (Fugelsan, 1998; Steel *et al.*, 2000). Sie sind in der Lage, bei sehr niedrigen pH-Werten zu wachsen und besitzen eine hohe Toleranz gegenüber Konservierungsmitteln wie Sorbinsäure und Benzoesäure (Fleet, 1992). *Z. bailii* zeichnet sich durch die Eigenschaft aus, eine Vielzahl von Zuckern fermentieren und selbst bei Zuckerkonzentrationen von 60 % noch wachsen zu können (Kalathenos *et al.*, 1995; Thomas & Davernport, 1985). Ebenso toleriert die Hefe Ethanolkonzentrationen von bis zu 18 %. Daher stellen Trockenfrüchte, Fruchtsäfte, Fruchtkonzentrate und Weine ideale Lebensräume dieser Hefe dar.

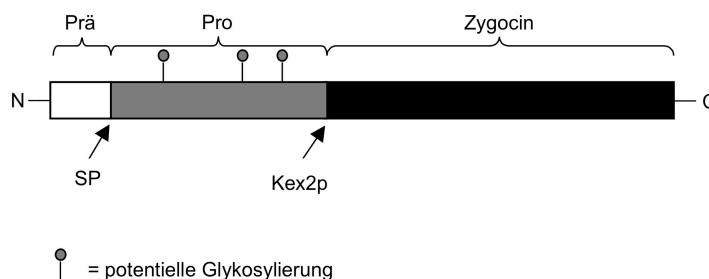
Der Stamm *Z. bailii* 412, der das Killertoxin Zygocin produziert, wurde im Zuge eines Screenings verschiedener Hefen auf Killeraktivität identifiziert (Radler *et al.*, 1993). Ähnlich wie die Killertoxine von *S. cerevisiae* wird auch Zygocin durch zytoplasmatisch persistierende dsRNA-Viren (Mykoviren) kodiert. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* besitzt diese Killerhefe drei unterschiedliche dsRNA-Genome, die als L (*large*), M (*medium*) und Z (*Zygosaccharomyces* spezifisch) bezeichnet werden (Radler *et al.*, 1993; Schmitt & Neuhausen, 1994). Von diesen drei dsRNA-Viren sind allerdings nur zwei (L<sub>Zb</sub>- und M<sub>Zb</sub>-Virus) für die Ausprägung eines stabilen Killerphänotyps verantwortlich. Durch Transfektionsexperimente konnte nachgewiesen werden, dass das 2,1 kb große M-dsRNA-Genom ebenso wie die M-Satellitenviren von *S. cerevisiae* lediglich die genetische Information für ein Zygocin Vorläuferprotein trägt.

Eine Transfektion von *S. cerevisiae* (Nichtkiller), die nur das L<sub>A</sub>-Virus enthielten, mit M<sub>Zb</sub>-VLP führte zu einem zygocinspezifischen Killerphänotyp. Somit konnte gezeigt werden, dass die M<sub>Zb</sub>-dsRNA die Genprodukte Gag und Gag-Pol des

*S. cerevisiae* L<sub>A</sub>-Helfervirus parasitieren und die M<sub>Zb</sub>-dsRNA in die Capsidstruktur verpackt werden konnte (Neuhausen & Schmitt, 1996). Dies deutet auf eine hohe Ähnlichkeit der von der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (von *S. cerevisiae*) erkannten Strukturen hin. Im Gegensatz dazu konnte L<sub>Zb</sub>-dsRNA nach Transfektion in *S. cerevisiae* nicht dauerhaft in der Zelle persistieren. Die Transfektion von *S. cerevisiae* mit M<sub>Zb</sub>-VLPs führte allerdings zu einem Selbstmord Phänotyp, da sich die Hefen durch die Zygocinexpression selbst abtöten. Die Immunität gegen Zygocin wird bei *Z. bailii*, nicht wie bei den *S. cerevisiae* Killertoxinen, durch die M-dsRNA vermittelt (Radler *et al.*, 1993; Schmitt & Neuhausen, 1991; Weiler *et al.*, 2002; diese Arbeit). Allerdings ist die immunitätsvermittelnde Komponente bislang unbekannt. Alle bislang untersuchten *Z. bailii* Stämme zeigten sich resistent gegenüber Zygocin. Das 4,6 kb große dsRNA-Genom des L<sub>Zb</sub>-Helfervirus kodiert für ein 85 kDa großes Hauptcapsidprotein und eine RNA-abhängige RNA-Polymerase beider Viren. Im Unterschied zu *S. cerevisiae* besitzt *Z. bailii* mit dem 3,2 kb großen Z-dsRNA-Virus noch ein weiteres Virus, dessen Funktion bislang völlig unbekannt ist. Das Virus alleine verursacht keinen erkennbaren Phänotyp und ist somit als kryptisch zu bezeichnen. Es benötigt nicht die Proteine Gag und Gag-Pol des L<sub>A</sub>-Helfervirus und stellt somit ein eigenständig replizierendes dsRNA-Replikon dar. Außerdem ist es nicht an der Ausbildung des Killerphänotyps oder der Immunität beteiligt (Rehfeld, 1999; Weiler, 2002; diese Arbeit).

Die M<sub>Zb</sub>-dsRNA enthält einen einzigen ORF, der für ein 238 Aminosäuren langes Präprotoxin von 26,4 kDa kodiert (Abbildung 1). Die dsRNA enthält zudem die drei typischen Strukturmerkmale eines toxinkodierenden Mykovirus: eine intramolekulare Poly(A)-reiche Region, eine 3'-terminale VBS-Struktur (*viral binding site*), die zum Verpacken der Virkuspartikel in die Capsidhülle notwendig ist und 3'-terminale IRE- (*internal replication enhancer*) sowie TRE- (*terminal recognition element*) Struktur motive, welche für die Initiation der Transkription von essentieller Bedeutung sind (Weiler *et al.*, 2002). Das Präprotoxin besitzt eine hydrophobe Signalsequenz, die das Protein in den Sekretionsweg dirigiert und dabei abgespalten wird. Außerdem weist das Protein eine potentiell N-glykosylierte Pro-Region auf, die im späten Golgi durch die Kex2p Endopeptidase entfernt wird.

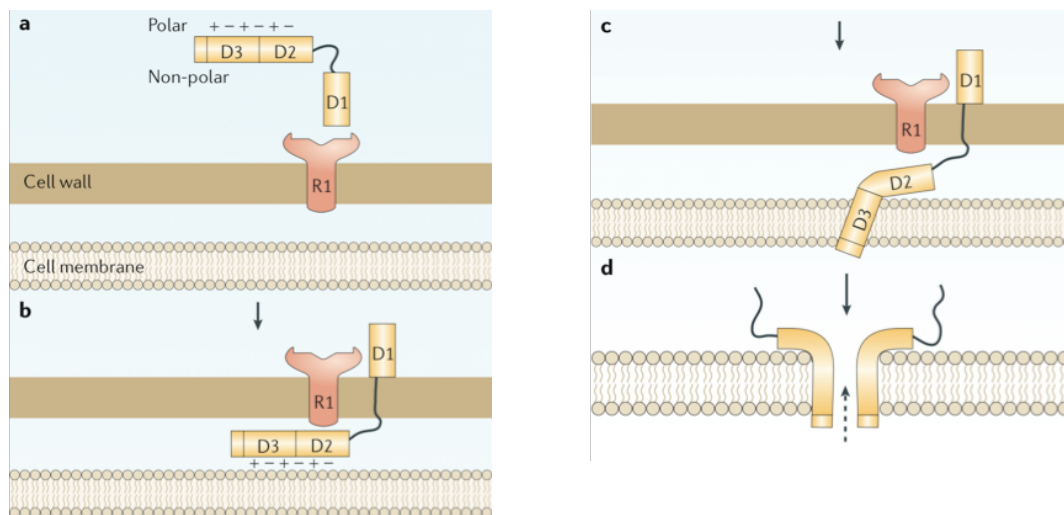
Nach Prozessierung geht aus dem 26,4 kDa Präprotoxin das 10,4 kDa große, aus 99 Aminosäuren bestehende, Zygocin hervor (Weiler *et al.*, 2002).



**Abbildung 2: Struktur und Prozessierungsstellen des Vorläuferzygocins (238 AS).** Die Signalpeptidase-(SP) und Kex2p Endopeptidasespaltstellen sind angezeigt. Nach Prozessierung entsteht das 99 Aminosäuren lange Zygocin (verändert nach Weiler *et al.*, 2002).

Ähnlich wie bei den Killertoxinen von *S. cerevisiae* wird für Zygocin ein zweistufiger Wirkungsmechanismus postuliert. Auf Ebene der Zellwand konnte der Primärrezeptor als ein hochmolekulares Mannoprotein nachgewiesen werden. Dieses Mannoprotein ist essentiell für die Toxinwirkung auf intakte Hefezellen (Radler *et al.*, 1993). In Konkurrenzexperimenten konnte die Überlebensrate zygocinbehandelter, sensibler Hefezellen durch Zugabe von isolierten Mannoproteinen gesteigert werden (Weiler, 2002). Ein Sekundärrezeptor konnte bislang nicht identifiziert werden. Da sich allerdings Sphäroplasten, also osmotisch stabilisierte Zellen ohne Zellwand, sensitiv gegenüber Zygocin zeigten, eine Bindung des Toxins an die Membran aber auch bei sphäroplastierten Killern nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass ein zweiter spezifischer Zygocinrezeptor in der Zytoplasmamembran existiert (Schmitt & Neuhausen, 1994), denn sphäroplastierte Wildtypkillerzellen werden durch Bindung von Zygocin an die Membran nicht abgetötet. Die Abtötung sensibler Hefen durch Zygocin erfolgt sehr schnell und führt zur Permeabilisierung der Plasmamembran exponentiell wachsender Zellen, zeigt also eine ionophore Wirkung (Weiler & Schmitt, 2003). Untersuchungen haben gezeigt, dass eine energetisierte Zytoplasmamembran für die Toxizität von entscheidender Bedeutung ist. So führte eine partielle Depolarisation der Membran bei sensiblen Hefen zu einer vollständigen Resistenz gegenüber Zygocin (Weiler, 2002). Aufgrund dieser experimentellen Ergebnisse, *in silico* Strukturvorhersagen und dem Vergleich mit anderen porenbildenden antimikrobiellen Toxinen, wurde ein

Wirkungsmodell des Toxins aufgestellt (Schmitt & Breinig, 2006; Weiler, 2002). Dieses Modell teilt Zygocin in drei unterschiedliche Funktionsdomänen (D1 bis D3) ein (Abbildung 3). Die N-terminale Domäne D1 ist für die Primärrezeptorerkennung in der Zellwand verantwortlich. Die Bindung des Rezeptors ermöglicht es dem Toxin, die Zellwandbarriere zu überwinden, um zum Ort der Toxinwirkung zu gelangen. Bei Domäne D2 handelt es sich um eine amphipathische  $\alpha$ -Helix, welche eine unspezifische Kontaktaufnahme des Toxins mit der Membran vermittelt. Dieses Strukturmerkmal der amphipathischen  $\alpha$ -Helix ist auch bei Defensinen verbreitet (Fleury *et al.*, 1996; Tytler *et al.*, 1995). Der Domäne D3 wird sowohl die Erkennung des Sekundärrezeptors, als auch die Bildung der Transmembrandomäne zugeschrieben. Die Einlagerung der Transmembranhelix wird durch das Transmembranpotential der sensitiven Hefe angetrieben. Die Integration eines Zygocinmoleküls in die Membran reicht nicht aus, um eine Membranpore auszubilden, daher wird angenommen, dass sich einige in die Membran inserierte Zygocinmoleküle zusammenlagern und einen Ionenkanal ausbilden, der dann zum Tod der Zielzelle führt (Weiler, 2002).



**Abbildung 3: Modell der Zygocin-Membran-Interaktion.** **A:** Domänenstruktur von Zygocin; **B:** Unspezifische Anlagerung der amphipathischen  $\alpha$ -Helix (D2) mit der unpolaren Seite an die Membran, nachdem die Zellwand durch Primärrezeptorerkennung R1 (durch D1) überwunden wurde und Erkennung eines putativen Membranrezeptors oder Dockingproteins. **C:** Membraninsertion der Domäne D3, angetrieben durch das Transmembranpotential der Zielzelle und Ausbildung einer Transmembranhelix. **D:** Toxin Oligomerisierung durch *self-assembly* und Plasmamembranpermeabilisierung (Schmitt & Breinig, 2006).

Zygocin zeichnet sich neben seiner schnellen Abtötung auch durch ein sehr breites Wirkungsspektrum aus. So werden neben den Hefen *P. anomala*,



*P. jadinie*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Hanseniaspora uvarum*, *S. cerevisiae*, *Candida kursei* und *C. vini* auch einige humanpathogene und phytopatogene Pilze abgetötet. Zu den humanpathogenen zygotocinsensitiven Hefen zählen *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* und *Sporothrix schenckii*, wobei hiervon auch jeweils einige Patienten-isolate abgetötet wurden. Zu den phytopathogenen Hefen und filamentösen Pilzen, die durch Zygocin abgetötet bzw. im Wachstum inhibiert werden, zählen *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* und *Colletotrichum graminicola* (Weiler & Schmitt, 2003). Dabei scheint im Hinblick auf eine mögliche Anwendung als Antimykotikum nicht nur das Wirkungsspektrum von Zygocin interessant zu sein, sondern auch seine hohe Aktivität. So konnte gezeigt werden, dass nur ein Bruchteil der molaren Menge an Zygocin benötigt wird, um den gleichen Hemmeffekt zu erzielen, wie er durch in der Medizin verwendete Azole (Clotrimazol und Miconazol) erreicht wird. Der starke Anstieg invasiver Mykosen beim Menschen führt auch zu einer erhöhten Mortalität dieser Erkrankungen. Diese Mykosen werden durch Immunsuppression nach einer Chemotherapie, nach Organ- und Knochenmarktransplantationen, aber auch durch die Langzeitanwendung von Breitspektrumantibiotika und durch den Einsatz zentralvenöser Katheter begünstigt (Edmond *et al.*, 1999; Penk & Pittrow, 1997). Zu einem besonders Mykosen-gefährdeten Personenkreis zählen auch Patienten mit einer krankheitsbedingten Immunschwäche wie AIDS. Problematisch gestaltet sich die Therapie ebenfalls durch das zunehmende Auftreten resistenter Erreger. Die bisher in der Therapie eingesetzten Antimykotika (Azolderivate) zeichnen sich durch starke Nebenwirkungen aus, die darauf zurückzuführen sind, dass sich die Hefen in vielen biologischen Prozessen nur wenig von den menschlichen Zellen unterscheiden. Aus diesem Grund sind Killertoxine wie das in dieser Arbeit untersuchte Zygocin interessant für die Entwicklung zukünftiger, hochselektiver Antimykotika, da sie die sensitiven Hefen durch einen rezeptorvermittelten Mechanismus abtöten und ein großes Wirkungsspektrum aufweisen. Da die Primärrezeptoren der Toxine beim Menschen nicht vorkommen, wäre eine Entwicklung neuartiger und hochselektiver Antimykotika ohne die Nebenwirkungen der Azolderivate möglich.

## 1.5. Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte der bis dato postulierte Wirkungsmechanismus des viralen Toxins Zygocin der Hefe *Z. bailii* genauer untersucht und verifiziert werden. Dazu sollte zuerst eine effektive Methode zur Reinigung des Toxins etabliert werden, bei der das Protein in ausreichenden Mengen aus dem Kulturüberstand des Wildtypkillers bis zur Homogenität gereinigt werden kann, ohne dass ein Verlust der Aktivität zu verzeichnen ist. Mittels Kristallisation oder Kryo-Elektronenmikroskopie sollte die Struktur des Toxins in Kooperation mit Dr. Gilbert (Universität Oxford) aufgeklärt werden und die Ergebnisse mit dem Wirkungsmodell verglichen werden. Durch diese Untersuchungen sollte auch geklärt werden, ob sich mehrere Zygocinmoleküle zu einer Pore zusammenlagern und ob Domäne D3 wirklich eine Transmembranhelix ausbildet.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte ein effektives Expressionssystem zur Herstellung von biologisch aktivem Zygocin etabliert werden. Bislang konnten nur sehr geringe Mengen Toxin mit äußerst geringer Aktivität in *Schizosaccharomyces pombe* exprimiert werden, so dass weitere Untersuchungen zur Wirkungsweise von Zygocin nicht möglich waren (Weiler *et al.*, 2002). Als Expressionssysteme sollten die Hefen *Z. bailii*, *K. lactis* und *P. pastoris* sowie das Bakterium *E. coli* untersucht werden. Nach Etablierung eines Expressionssystems sollten verschiedene Zygocin-Varianten, durch die eine Überprüfung des Wirkungsmodells möglich wäre, erstellt, kloniert und zur Expression gebracht werden. Dazu sollten sowohl Punktmutationen an definierten Stellen in die verschiedenen Domänen des Protoxingens eingeführt, als auch ganze Wirkdomänen deletiert werden. Nach Expression und Konzentrierung der Toxinvarianten sollten diese in einem Toxizitätstest gegen die zygocinsensitive Hefe *S. cerevisiae* eingesetzt werden und die erhaltenen Ergebnisse mit dem Wirkungsmodell verglichen werden. Um eine sensitivere Nachweismöglichkeit des Toxins für weitere Untersuchungen zu ermöglichen, sollten verschiedene Proteintags an das Wildtyp-Zygocin fusioniert werden. Nach Expression der getaggten Zygocin-Varianten sollte der Einfluss des Tags auf die Toxizität gegenüber sensiblen Hefen untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Organismen

#### 2.1.1. *E. coli* Stämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt. Standard-Klonierungen wurden mit den Stämmen DH5 $\alpha$ , NEB-5 $\alpha$  und TOP 10 durchgeführt. TA-Klonierungen erfolgten mit den in den verwendeten Kits enthaltenen Zellen. Für die zytoplasmatische Proteinexpression in *E. coli* wurden BL21(DE3) Zellen, für die periplasmatischen Proteinexpressionen *E. coli* TB1 Zellen verwendet.

Tabelle 1: Verwendete *E. coli* Stämme.

| <i>E. coli</i> Stamm | Genotyp  | Referenz/Anbieter        |
|----------------------|--|--------------------------|
| DH5 $\alpha$         | <i>F</i> - $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>rk</i> -, <i>mk</i> +) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\lambda$ -   | Hanahan u. Meselson 1983 |
| TOP10                | <i>F</i> - <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i> <sup>-</sup>             | INVITROGEN               |
| BL21 (DE3)           | <i>F</i> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) <math>\lambda</math>(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])</i>  | NOVAGEN                  |
| TB1                  | <i>F-ara</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) [ $\phi$ 80 <i>dlac</i> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15] <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>thi hsdR</i>  | NEW ENGLAND BIOLABS      |
| Nova Blue Singles    | <i>endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>K12</sub><sup>-</sup> m<sub>K12</sub><sup>+</sup></i> ) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F</i> '[ <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>R</sup> ZDM15:: <i>Tn10</i> ] (Tet <sup>R</sup> ) | NOVAGEN                  |
| NEB-5 $\alpha$       | <i>fhuA2</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> )U169 <i>phoA glnV44</i> $\Phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>   | NEW ENGLAND BIOLABS      |

#### 2.1.2. Hefestämme

Für die Expression heterologer Proteine und für MBA-Tests wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Hefestämme verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Hefestämme nach Gattungen geordnet.

| Stamm                       | Genotyp  | Referenz/Herkunft             |
|-----------------------------|--|-------------------------------|
| <b><i>K. lactis</i></b>     |  |                               |
| GG799                       | industrielles Isolat, keine Auxotrophien oder genetische Marker  | NEW ENGLAND BIOLABS           |
| <b><i>S. cerevisiae</i></b> |  |                               |
| SEY6210                     | <i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3, 112 his3-<math>\Delta</math>200 lys2-801 trp1-<math>\Delta</math>901 suc2-<math>\Delta</math>9</i> | Robinson <i>et al.</i> (1988) |
| BY4742                      | <i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>    | Winzeler <i>et al.</i> (1999) |

|                           |   |  |
|---------------------------|---|--|
| 192.2d                    | <i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2</i>                                       | Schmitt <i>et al.</i> 1996               |
| TM231                     | <i>MAT<math>\alpha</math> leu2 ura3 his3 pbs2::URA3</i>                       | H.Saito (Harvard Medical School, Boston) |
| <b><i>S. pombe</i></b>    |   |  |
| PW260                     | <i>h<sup>-</sup> leu1.32 ura4. dl18 ade 6.210</i>                             | Heintel <i>et al.</i> (2001)             |
| <b><i>P. pastoris</i></b> |   |  |
| GS115                     | <i>his4</i> (Phänotyp: Mut <sup>+</sup> )                                     | INVITROGEN                               |
| KM71                      | <i>arg4 his4 aox1</i> : ARG4 (Phänotyp: Mut <sup>S</sup> , ARG <sup>+</sup> ) | INVITROGEN                               |
| <b><i>Z. bailii</i></b>   |   |  |
| ATCC60483                 | kein Genotyp verfügbar  | Put & de Jong (1982)                     |
| ATCC36947                 | kein Genotyp verfügbar  | Pandya <i>et al.</i> (1995)              |
| 412                       | Zygocin produzierender Wildtypstamm kein Genotyp verfügbar                    | Radler <i>et al.</i> 1993                |

## 2.2. Plasmide

Die in dieser Arbeit eingesetzten und konstruierten Vektoren sowie deren Grundvektoren sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Verwendete Plasmide sowie deren Marker und Herkunft**

| Plasmid               | Eigenschaften  | Referenz/Herkunft |
|-----------------------|--|-------------------|
| <b><i>E. coli</i></b> |  |                   |
| pET24a(+)             | <i>E. coli</i> -Expressionsvektor (5,3 kb), Kan <sup>R</sup> T7-Tag-Sequenz, His-Tag-Sequenz, T7-Promotor  | NOVAGEN           |
| pET24-HisZygocin      | pET24a(+) mit Zygocin mit N-terminalem (His) <sub>6</sub> -Tag als <i>SacI/SalI</i> Fragment   | diese Arbeit      |
| pET24-Zygocin         | pET24a(+) mit Zygocin-Gen als <i>EcoRI/SalI</i> Fragment   | diese Arbeit      |
| pET24-Zygocin His     | pET24a(+) mit Zygocin und C-terminalem (His) <sub>6</sub> -Tag als <i>EcoRI/SalI</i> Fragment  | diese Arbeit      |
| pET17b                | <i>E. coli</i> Expressionsvektor (3,3 kb) Amp <sup>R</sup> , T7-Promotor, N-term T7-Tag-Sequenz  | NOVAGEN           |
| pASK-IBA6             | <i>E. coli</i> Expressionsvektor (3,3 kb), Amp <sup>R</sup> , TET-Promotor, OmpA-Signalsequenz, N-term Strep-Tag mit nachfolgender Faktor Xa Schnittstelle   | IBA               |
| pASK-IBA6-Zygocin     | pASK-IBA6 mit Zygocin als <i>EcoRI/XhoI</i> Fragment   | diese Arbeit      |
| pMAL-p2X              | <i>E. coli</i> Expressionsvektor zur periplasmatischen Expression des Zielgens als Maltose-Binde-Protein Fusion (N-terminal) mit Faktor Xa Spaltstelle. induzierbarer TAC Promotor, Amp <sup>R</sup> | NEB               |
| pMAL-p2X-FLAG-Zygocin | pMAL-p2x mit FLAG-Zygocin als <i>XmnI/BamHI</i> Fragment   | diese Arbeit      |

|                         |   |                              |
|-------------------------|---|------------------------------|
| pCR II-TOPO®            | TA Klonierungsvektor (4,0 kb),<br><i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>Kan<sup>r</sup></i> , SP6-Promotor, LacZ $\alpha$ -Reporter-Gen zur Blau-Weiß-Selektion                 | INVITROGEN                   |
| pSTBlue-1               | TA-Klonierungsvektor (3,9 kb) <i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>Kan<sup>r</sup></i> , T7-, SP6-Promotor, LacZ $\alpha$ -Reporter-Gen zur Blau-Weiß-Selektion                | NOVAGEN                      |
| pYES2.1/V5-His-TOPO®    | <i>S. cerevisiae</i> Expressionsvektor (5,9 kb) GAL1-Promotor, TA-Klonierung von PCR-Produkten <i>Amp<sup>r</sup></i> , C-term V5-Epitop- und (His) <sub>6</sub> -Tag | INVITROGEN                   |
| pUC18-M-cDNA Klon 130   | Klonierungsvektor, <i>Amp<sup>r</sup></i> , enthält ein 1 kb großes Fragmente der M <sub>z</sub> -cDNA als <i>EcoRI/HindIII</i> Fragment                              | Bautz 1996                   |
| pCR II-TOPO®-VT28       | enthält ein 400 bp großes Fragment mit der VBS, IRE und TRE von M28   | Powilleit 2004               |
| pFB-mRFP                | multicopy Shuttle-Vektor für <i>S. cerevisiae</i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>URA3</i> , enthält <i>KRE1<sub>ss</sub></i> und <i>CWP2</i> -Anker mit mRFP           | Diehl (2008)                 |
| <b><i>S. pombe</i></b>  |   |                              |
| pREP-Zygo               | <i>Leu2</i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>nmt1</i> -Promotor, enthält Zygotin Präprotoxin als <i>NdeI/BamHI</i> Fragment  | Weiler 2002                  |
| <b><i>Z. bailii</i></b> |   |                              |
| pZygo3                  | <i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>Kan<sup>r</sup></i> , TPI- Promotor   | Branduari <i>et al.</i> 2004 |
| pZ3-Zygotin             | pZygo3 mit PräProZygotin als <i>NdeI/BamHI</i> Fragment   | diese Arbeit                 |
| pZ3-ssZygotin           | pZygo3 mit Prä-Zygotin als <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment  | diese Arbeit                 |
| pZ3-Zygo F79P           | pZygo3 mit PräProZygotin mit Mutation F gegen P an Position 79 des reifen Toxins als <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment  | diese Arbeit                 |
| pZ3-Zygo V66N           | pZygo3 mit PräProZygotin, mit Austausch von V gegen N an Position 66 des reifen Toxins, als <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment   | diese Arbeit                 |
| pZ3-Zygo D93L           | pZygo3 mit PräProZygotin als <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment, Austausch von D gegen L an Position 93 des reifen Toxins  | diese Arbeit                 |
| pZ3-Zygo91              | pZygo3 mit PräProZygotin, nur die ersten 91 AS des reifen Toxins, die letzten 9 AS wurden deletiert, <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment                                      | diese Arbeit                 |
| pZ3-ssGFP-Zygotin       | pZygo3, der eine Fusion aus yEGFP und Zygotin trägt, mit dem Sekretionssignal von Zygotin, als <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment  | diese Arbeit                 |
| pZ3-ssGFP               | pZygo3, yEGFP mit dem Sekretionssignal von Zygotin als <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment  | diese Arbeit                 |
| pZ3-Zygo $\Delta$ D1    | pZygo3 mit PräProZygotin, dessen Domäne D1 deletiert wurde, <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment   | diese Arbeit                 |
| pZ3-Zygo $\Delta$ D3    | pZygo3, mit PräProZygotin, mit deletierter D3 Domäne, als <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment   | diese Arbeit                 |
| pZ3 antiVBS             | pZygo3 mit der <i>antisense</i> VBS Sequenz von Zygotin ( <i>EcoRI/BamHI</i> )  | diese Arbeit                 |
| pZ3 VT28                | pZygo3 mit der VBS Sequenz von K28 ( <i>EcoRI/BamHI-BglII</i> )   | diese Arbeit                 |

| <b><i>P. pastoris</i></b>    |  |              |
|------------------------------|--|--------------|
| pPIC9                        | integrativer <i>P. pastoris</i> -Expressionsvektor (8,0 kb), Amp <sup>R</sup> , HIS4, Methanol-induzierbarer AOX1-Promotor und -Terminator, $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> | INVITROGEN   |
| pPIC3.5                      | integrativer <i>P. pastoris</i> -Expressionsvektor (7,8 kb), Amp <sup>R</sup> , HIS4, Methanol-induzierbarer AOX1-Promotor und -Terminator                             | INVITROGEN   |
| pPIC9-Zygocin                | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin ( <i>XhoI/AvrII</i> ) zur sekretorischen Expression   | diese Arbeit |
| pPIC9-Zygocin V66N           | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und ZygocinV66N ( <i>XhoI/AvrII</i> ) zur sekretorischen Expression   | diese Arbeit |
| pPIC9-Zygocin F79P           | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und ZygocinF79P ( <i>XhoI/AvrII</i> ) zur sekretorischen Expression   | diese Arbeit |
| pPIC9-Zygocin D93L           | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin D93L ( <i>XhoI/AvrII</i> ) zur sekretorischen Expression  | diese Arbeit |
| pPIC9-Zygocin $\Delta$ D1    | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin dessen Domäne D1 deletiert wurde ( <i>XhoI/AvrII</i> ) zur sekretorischen Expression                                  | diese Arbeit |
| pPIC9-Zygocin $\Delta$ D2    | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin mit deletierter D2 Domäne ( <i>XhoI/AvrII</i> ) zur sekretorischen Expression   | diese Arbeit |
| pPIC9-Zygocin $\Delta$ D3    | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin mit deletierter D3 Domäne ( <i>XhoI/AvrII</i> ) zur sekretorischen Expression   | diese Arbeit |
| pPIC9-Zygocin91              | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin dessen neun letzten AS deletiert wurden ( <i>XhoI/AvrII</i> ) zur sekretorischen Expression                           | diese Arbeit |
| pPIC9-Zygocin 91 $\Delta$ D1 | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin91 mit deletierter D1 Domäne ( <i>XhoI/AvrII</i> )   | diese Arbeit |
| pPIC9-GFP                    | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und GFP ( <i>XhoI/AvrII</i> ) zur sekretorischen Expression   | diese Arbeit |
| pPIC9-yEGFP                  | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und yEGFP ( <i>XhoI/AvrII</i> ) zur sekretorischen Expression   | diese Arbeit |
| pPIC9-mRFPZygocin            | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Fusionsprotein aus mRFP und Zygocin ( <i>XhoI/AvrII</i> )   | diese Arbeit |
| pPIC9-Zygocin-V5             | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin C-terminalem V5-Tag ( <i>XhoI/AvrII</i> )   | diese Arbeit |
| pPIC9-V5-Zygocin             | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin N-terminalem V5-Tag ( <i>XhoI/AvrII</i> )   | diese Arbeit |
| pPIC9-FLAG-Zygocin-V5        | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin mit N-terminalem FLAG-Tag und C-terminalem V5-Tag ( <i>XhoI/AvrII</i> )   | diese Arbeit |
| pPIC9-His-Zygocin            | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin mit N-terminalem (His) <sub>6</sub> -Tag ( <i>XhoI/AvrII</i> )  | diese Arbeit |
| pPIC9-Strep-Zygocin          | pPIC9 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin mit N-terminalem Strep-Tag ( <i>XhoI/AvrII</i> )  | diese Arbeit |
| pPIC3.5-ssGFP                | pPIC3.5 mit Zygocin Sekretionssignal und yEGFP ( <i>EcoRI/NotI</i> )   | diese Arbeit |

| <b><i>K. lactis</i></b> |  |                     |
|-------------------------|--|---------------------|
| pKLAC1                  | integrativer <i>K. lactis</i> -Expressionsvektor (9,1 kb), Amp <sup>R</sup> , konstitutiver LAC4-PBI-Promotor, $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> , LAC4-Terminator, <i>amdS</i> | NEW ENGLAND BIOLABS |
| pKLAC1-Zygocin-FLAG     | pKLAC1 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin mit C-terminalem FLAG-Tag ( <i>XhoI</i> / <i>Sall</i> , <i>BglII</i> , <i>BamHI</i> )                                  | diese Arbeit        |
| pKLAC1-FLAG-Zyocin      | pKLAC1 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin mit N-terminalem FLAG-Tag ( <i>XhoI</i> , <i>Sall</i> , <i>BglII</i> , <i>BamHI</i> )                                  | diese Arbeit        |
| pKLAC1-Zygocin          | pKLAC1 mit $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> und Zygocin ( <i>XhoI</i> , <i>Sall</i> , <i>BglII</i> , <i>BamHI</i> )  | diese Arbeit        |

## 2.3. Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 dargestellt. Start- bzw. Stopcodons sind fett und kursiv hervorgehoben. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firmen SIGMA-GENOSYS, BIOMERS und MWG BIOTECH.

**Tabelle 4: In der vorliegenden Arbeit verwendete Oligonukleotide.** Die Sequenzen sind jeweils in 5'→ 3' Orientierung angegeben. Start- bzw. Stopcodons sind **fett kursiv** hervorgehoben. (SS = Signalsequenz, His = (His)-Tag, Strep = Strep-Tag, FLAG = FLAG-Tag, c-Myc = cmyc Epitop-Tag)

| Bezeichnung  | 5'→3' Sequenz  |
|--|--|
| <b><i>Z. bailii</i></b>                              |  |
| 5'-Zygo(NdeI)  | <i>NdeI</i><br>CAT <b><i>ATG</i></b> AAA GCA GCC CAA ATA TTA ACA GCA AGT ATA GT  |
| 5'- Zygocin <i>XhoI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i> | <i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> <i>NdeI</i><br>CTCGAG GAATTC CAT <b><i>ATG</i></b> AAA GCA GCC CAA ATA TTA ACA GCA  |
| 5'-Zygo <i>XbaI</i> , <i>EcoI</i> , <i>Nde</i>       | <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> <i>NdeI</i><br>TCTAGA GAATTC CAT <b><i>ATG</i></b> AAA GCA GCC CAA ATA TTA ACA GCA AGT<br>ATA GTA AGC   |
| 5'-Zygo <i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i>                   | <i>EcoRI</i> <i>NdeI</i><br>GAATTC CAT <b><i>ATG</i></b> AAA GCA GCC CAA ATA TTA ACA GCA AGT ATA<br>GTA AGC TTA TTG CCA  |
| 5'-GFP <i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i>                    | <i>EcoRI</i> <i>NdeI</i><br>GAATTCAT <b><i>ATG</i></b> AAA GCA GCC CAA ATA TTA ACA GCA AGT ATA GTA<br>AGC TTA TTG CCA ATA TAT ACT AGT GCT TCT AAA GGT GAA GAA<br>TTA TTC ACT GGT G |
| 5'-ssGFP 1.  | GCA AGT ATA GTA AGC TTA TTG CCA ATA TAT ACT AGT GCT TCT<br>AAA GGT GAA GAA TTA TTC ACT GGT   |
| 5'-ssGFP 2. <i>EcoRI</i> <i>NdeI</i>                 | <i>EcoRI</i> <i>NdeI</i><br>GAATTCAT <b><i>ATG</i></b> AAA GCA GCC CAA ATA TTA ACA GCA AGT ATA GTA<br>AGC TTA TTG CCA A  |
| 5'-ZygoDel-Pro- <i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i>           | <i>EcoRI</i> <i>NdeI</i><br>GAATTC CAT <b><i>ATG</i></b> AAA GCA GCC CAA ATA TTA ACA GCA AGT ATA<br>GTA AGC TTA TTG CCA ATA TAT ACT AGT GCT GGA GGG TGG GTG<br>AAC CCA CAT TGT AG  |
| 5'-Zygo <i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i>                   | <i>EcoRI</i> <i>NdeI</i><br>GAATTCAT <b><i>ATG</i></b> AAA GCA GCC CAA ATA TTA ACA GCA AGT ATA GT  |
| 5'-Zygo <i>BglIII</i> ohne                           | <i>BglIII</i>  |

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| Signal o. Proregion               | AGATCT GGA GGG TGG GTG AAC C  |
| 5'-Zygo-del ss,pro<br>Eco         | <i>EcoRI</i><br>GAATTC GGA GGG TGG GTG AAC CCA  |
| 5'-ZygoD93L                       | CCA GGT GCT TGC ATG AGT CTA GTA GGG TTC TGC TAT GCT TAG   |
| 5'-Zygocin ohne<br>ATG und ss-Pro | GGA GGG TGG GTG AAC CCA   |
| 5'-GFP- 3'-Zygocin                | GAG TGA TGT AGG GTT CTG CTA TGC TTC TAA AGG TGA AGA ATT<br>ATT CAC TGG TGT TG                                       |
| 5'-Rest-3'-Pro                    | ATA CTA CAG ATC AAG CTA GAC TCC AAC GTC GCC AAC AGT TAG<br>CTG AAA ATG TAT GTA ACT GGT GTC A                        |
| 5'-ZygoF79P                       | CGG TGG TGT TAG CGC TCC TGC TAG CAG TAG TTC TGC AC  |
| 5'-GFP-3'-Zygo del<br>D3          | CAA CAG TTA GCT GAA AAT GTA TGT AAC TGG ATG TCT AAA GGT<br>GAA GAA TTA TTC ACT GGT GTT                              |
| 5'-ZygoV66N                       | CAA CAG TTA GCT GAA AAT AAC TGT AAC TGG TGT CAG GTT AAC   |
| 3' Zygocin Sal, BglII,<br>BamHI   | <i>SalI</i> <i>BglII</i> <i>BamHI</i><br>GTCGAC AGATCT GGATCC <b>CTA</b> AGC ATA GCA GAA CCC TAC ATC A              |
| 3'-down-Zygo280                   | <i>BamHI</i><br>GGATCC TTG TTT TGC TTT TTC TTT CAA TCT TGT TGT TTG  |
| 3'-Zygo del D3<br>(Bam)           | <i>BamHI</i><br>GGATCC <b>CTA</b> CCA GTT ACA TAC ATT TTC AGC TAA CTG   |
| 3'-Zygo(Bam)                      | <i>BamHI</i><br>GGATCC <b>CTA</b> AGC ATA GCA GAA CCC TAC ATC ACT CAT GC  |
| 3'-Zygo-c-Myc Bam                 | <i>BamHI</i><br>GGATTC <b>CTA</b> CAA ATC TTC TTC AGA AAT CAA CTT TTG TTC AGC<br>ATA GCA GAA CCC TAC ATC ACT CAT GC |
| 3'-ZygoD93L-Bam                   | <i>BamHI</i><br>GGATCC <b>CTA</b> AGC ATA GCA GAA CCC TAC TAG ACT CAT GC  |
| 3'-Zygo del D3 Sal,<br>Bam        | <i>SalI</i> <i>BamHI</i><br>GTCGAC GGATCC <b>CTA</b> CCA GTT ACA TAC ATT TTC AGC TAA CTG<br>TTG                     |
| 3'-Zygo Xho, Bam                  | <i>BamHI</i> <i>XhoI</i><br>GGATCC CTCGAG <b>CTA</b> AGC ATA GCA GAA CCC TAC ATC ACT C                              |
| 3'-GFP (BamHI)                    | <i>BamHI</i><br>G GGATCC <b>TTA</b> TTT GTA CAA TTC ATC CAT ACC   |
| 3'-ZygoD93L                       | CTA AGC ATA GCA GAA CCC TAC TAG ACT CAT GCA AGC ACC TGG   |
| 3'-Zygcin- 5'-GFP                 | CAA CAC CAG TGA ATA ATT CTT CAC CTT TAG AAG CAT AGC AGA<br>ACC CTA CAT CAC TC                                       |
| 3'-Pro-5'-Rest                    | TGA CAC CAG TTA CAT ACA TTT TCA GCT AAC TGT TGG CGA CGT<br>TGG AGT CTA GCT TGA TCT GTA GTAT                         |
| 3'-zygoF79P                       | GTG CAG AAC TAC TGC TAG CAG GAG CGC TAA CAC CAC CG  |
| 3'-zygoV66N                       | GTT AAC CTG ACA CCA GTT ACA GTT ATT TTC AGC TAA CTG TTG   |
| 3'-Zygo del D3 5'-<br>GFP         | AAC ACC AGT GAA TAA TTC TTC ACC TTT AGA CAT CCA GTT ACA<br>TAC ATT TTC AGC TAA CTG TTG                              |
| <b>E. coli Kolonie-PCR</b>        |   |
| T7 Promotor                       | AGC TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GA  |
| SP6 Promotor                      | GTG CGG CCA TTT AGG TGA   |
| 5'-pET forward                    | TCT CGA TCC CGC GAA ATT AAT ACG ACT CAC   |



|  |  |
|--|--|
| 3'-pET reverse                               | AAA CCC CTC AAG ACC CGT TTA GAG GC   |
| <b><i>P. pastoris</i> / <i>K. lactis</i></b> |  |
| 5'-Zygo- XhoI, Kex                           | <i>Xho</i> I<br>CTCGAG AAA AGA GGA GGG TGG GTG AAC C   |
| 5'-Zygocin XhoI, EcoRI, NdeI                 | <i>Xho</i> I <i>Eco</i> RI <i>Nde</i> I<br>CTCGAG GAATTC CAT <b>ATG</b> AAA GCA GCC CAA ATA TTA ACA GCA                                      |
| 5'-FLAG-Zygocin Xho, Kex                     | <i>Xho</i> I<br>CTCGAG AAA AGA GAT TAC AAG GAT GAT GAT GAT AAG GGA GGG<br>TGG GTG AAC C  |
| 5' V5-Zygocin Xho Kex                        | <i>Xho</i> I<br>CTCGAG AAA AGA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT<br>CTC GAT TCT ACG GGA GGG TGG GTG AAC CC                             |
| 5' Anfang V5 Xho Kex                         | <i>Xho</i> I<br>CTCGAG AAA AGA GGT AAG CCT ATC C   |
| 5' dsRED-Monomer Xho, Kex                    | <i>Xho</i> I<br>CTCGAG AAA AGA GCC TCC TCC GAG GAC GTC AT  |
| 5' eGFP XhoI Kex                             | <i>Xho</i> I<br>CTCGAG AAA AGA GTG AGC AAG GGC GAG GAG   |
| 5' His-Zygocin Xho, Kex                      | <i>Xho</i> I HIS HIS HIS HIS HIS HIS<br>CTCGAG AAA AGA CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGA GGG TGG GTG<br>AAC CC                                     |
| 5' Strep Tag-Zygocin Xho, Kex                | <i>Xho</i> I<br>CTCGAG AAA AGA TGG TCT CAT CCA CAA TTT GAA AAG GGA GGG<br>TGG GTG AAC CCA  |
| 5' Zygo del D1 Xho, Kex                      | <i>Xho</i> I<br>CTCGAG AAA AGA CAA CAG TTA GCT GAA AAT GTA TGT AAC TG  |
| 5' Zygocin del D2 SOE                        | GGT ATG TAG TGG TGC TGA CAG GCA GGT TAA CGG TGG TGT TAG<br>CG  |
| 5' Zygocin- 3' dsRED Monomer                 | CCA CTC CAC CGG CGC CGG AGG GTG GGT GAA CCC ACA T  |
| 3'-FLAG-Zygo-Sal, BglII, BamHI               | <i>Sal</i> I <i>Bgl</i> II <i>Bam</i> HI<br>GTCGAC AGATCT GGATCC <b>CTA</b> CTT ATC ATC ATC ATC CTT GTA ATC<br>AGC ATA GCA GAA CCC TAC ATC A |
| 3'-Zygocin Sal, BglII, BamHI                 | <i>Sal</i> I <i>Bgl</i> II <i>Bam</i> HI<br>GTCGAC AGATCT GGATCC <b>CTA</b> AGC ATA GCA GAA CCC TAC ATC A                                    |
| 3' eGFP AvrII, EcoRI                         | <i>Eco</i> RI <i>Avr</i> II<br>GAATTC CCTAGG <b>CTA</b> CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC   |
| 3' Zygo91 AvrII, EcoRI                       | <i>Eco</i> RI <i>Avr</i> II<br>GAATTC CCTAAG <b>CTA</b> CAT GCA AGC ACC TGG ATG  |
| 3' Zygo del D3 AvrII, EcoRI                  | <i>Eco</i> RI <i>Avr</i> II<br>GAATTC CCTAGG <b>CTA</b> CCA GTT ACA TAC ATT TTC AGC TAA C  |
| 3' Zygocin AvrII, EcoRI                      | <i>Eco</i> RI <i>Avr</i> II<br>GAATTC CCTAGG <b>CTA</b> AGC ATA GCA GAA CCC TAC ATC  |
| 3' Zygocin D93L AvrII, EcoRI                 | <i>Eco</i> RI <i>Avr</i> II<br>GAATTC CCTAGG <b>CTA</b> AGC ATA GCA GAA CCC TAC TAG  |
| 3' Zygocin del D2 SOE                        | CGC TAA CAC CAC CGT TAA CCT GCC TGT CAG CAC CAC TAC ATA<br>CC  |
| 3' dsRED Monomer-5' Zygocin                  | ATG TGG GTT CAC CCA CCC TCC GGC GCC GGT GGA GTG G  |

| <b><i>P. pastoris</i> Kolonie-PCR</b>  |  |
|--|--|
| 5' alpha Factor                        | AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT  |
| 3' AOX1                                | CAG GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC  |
| <b><i>E. coli</i> Expression</b>       |  |
| 5' His-Zygocin-Hind, Sac               | <i>HindIII</i> <i>SacI</i><br>AAGCTT GAGCTC <b>ATG</b> CAC CAC CAC CAC CAC CAC GGA GGG TGG<br>GTG AAC C                                |
| 5' Met Zygocin del ssPro Eco, Xho, Nde | <i>EcoRI</i> <i>XhoI</i> <i>NdeI</i><br>GAATTC CTCGAG CAT <b>ATG</b> GGA GGG TGG GTG AAC C   |
| 5'-Zygo XmnI                           | <i>XmnI</i><br>GAAGGATTTC GGA GGG TGG GTG AAC CCA  |
| 5'-Zygo-Eco,Spe MetX                   | <i>EcoRI</i> <i>SpeI</i><br>GAATTC ACTAGT <b>ATG</b> ATT GAA GGT CGT GGA GGG TGG GTG AAC<br>CCA CAT TGT AG                             |
| 3' Zygocin-His Sal, Not                | <i>SalI</i> <i>NotI</i> HIS HIS HIS HIS HIS HIS<br>GTCGAC GCGGCCGC <b>TCA</b> GTG GTG GTG GTG GTG GTG AGC ATA GCA<br>GAA CCC TAC ATC A |
| <b>Heilung <i>Z. bailii</i> 412</b>    |  |
| 5'- VBS-Zygo minus strang              | <i>EcoRI</i><br>GAATTC CGT ACC TTG TCT GTT GGT AGA AAA ATC   |
| 5'-VBS-M28 EcoRI                       | <i>EcoRI</i><br>GAATTC TTG GTC AAC ACA CTA AGC TAC AAG TG  |
| 3'-VBS Zygo minus strang               | <i>EcoRI</i><br>GGATCC TAT TAA CCT GAC ATC GCT ATT TTG GCT GC  |
| 3'-VBS-M28 BamHI                       | <i>BamHI</i><br>GGATCC AGG ACT GCA TGT TAT GAG GCA AAG   |
| <b><i>K. lactis</i> Kolonie-PCR</b>    |  |
| pKLAC Integr. 1                        | TAC CGA CGT ATA TCA AGC CCA  |
| pKLAC Integr. 2                        | ATC ATC CTT GTC AGC GAA AGC  |
| pKLAC Integr. 3 mod                    | CAG TGA TTA CAT GCA TAT TGT GTG TTC  |
| <b>Sequenzierprimer GATC</b>           |  |
| V5 reverse                             | AGG AGA GGG TTA GGG ATA G  |
| Gal1 forward                           | TAC CTC TAT ACT TTA ACG TC   |

## 2.4. Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> gelöst und durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Zur Herstellung fester Nährmedien erfolgte eine Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar. Zusätze, die nicht autoklavierbar waren (wie z. B. Antibiotika oder Vitamine) wurden durch Filtration sterilisiert (0,2 µm Porengröße, Minisart, SARTORIUS) und der Lösung nach dem Autoklavieren zugegeben. Die Lagerung der Medien erfolgte in der Regel bei Raumtemperatur, Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert.

### 2.4.1. Nährmedien Bakterien

#### LB-Medium

|             |       |
|-------------|-------|
| Trypton     | 1 %   |
| Hefeextrakt | 0,5 % |
| NaCl        | 1 %   |

Der pH-Wert des Mediums wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

#### SOC-Medium

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| Trypton                               | 2 %    |
| Hefeextrakt                           | 0,5 %  |
| NaCl                                  | 10 mM  |
| KCl                                   | 2,5 mM |
| MgCl <sub>2</sub> x 7H <sub>2</sub> O | 10 mM  |
| Mg(SO <sub>4</sub> )                  | 10 mM  |
| Glukose                               | 20 mM  |

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt, die Glukose wurde getrennt autoklaviert.

#### SOB-Medium

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| Trypton                               | 2 %    |
| Hefeextrakt                           | 0,5 %  |
| NaCl                                  | 10 mM  |
| KCl                                   | 2,5 mM |
| MgCl <sub>2</sub> x 7H <sub>2</sub> O | 10 mM  |
| Mg(SO <sub>4</sub> )                  | 10 mM  |

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

#### Pepton/Tryptonmedium

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Glukose                         | 0,25 % |
| Pepton                          | 1,7 %  |
| Soja-Pepton                     | 0,3 %  |
| NaCl                            | 0,5 %  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,25 % |

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

#### Vollmedium + Glukose

|              |       |
|--------------|-------|
| Trypton      | 1 %   |
| Hefe Extrakt | 0,5 % |
| NaCl         | 0,5 % |
| Glukose      | 0,2 % |

### 2.4.1.1. Antibiotika und Medienzusätze

Antibiotika und Lösungen wie IPTG und X-Gal wurden durch Filtration sterilisiert und dem Medium nach dem Autoklavieren zugefügt bzw. auf Agarplatten ausplattiert (Tabelle 5). Die Lagerung dieser Antibiotika und Medienzusätze erfolgte bei -20 °C.

**Tabelle 5: Den Medien zugesetzte Antibiotika, andere Chemikalien und deren Konzentrationen im Medium.**

| Substanz        | Konzentration | Lösungsmittel                     | Endkonzentration |
|-----------------|---------------|-----------------------------------|------------------|
| Ampicillin      | 50 mg/ml      | 50 % Ethanol                      | 50 µg/ml         |
| Kanamycin       | 25 mg/ml      | H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 50 µg/ml         |
| Tetracylin      | 25 mg/ml      | H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 25 µg/ml         |
| Chloramphenicol | 30 mg/ml      | H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 50 µg/ml         |
| X-Gal           | 20 mg/ml      | DMF                               | 80 µl/Platte     |
| IPTG            | 100 mM        | H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 0,1 bis 1 mM     |

### 2.4.2. Nährmedien Hefen

Die im Folgenden aufgelisteten Nährmedien zur Kultivierung der Hefestämme wurden nach Hefe-Gattungen eingeteilt, wenn sie ausschließlich für diese Gattung verwendet wurden.

#### YPD

|             |     |
|-------------|-----|
| Pepton      | 1 % |
| Hefeextrakt | 2 % |
| Glukose     | 2 % |

Die Glukose wurde getrennt autoklaviert.

#### Synthetisches SC- bzw. Drop-out-Medium

|   |          |
|---|----------|
| Glukose   | 2 %      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,5 %    |
| Drop-Out. bzw. SC-Mix                           | 0,71 g/l |
| YNB   | 1,7 g/l  |

Der pH-Wert der Lösung wurde mit K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 7,0 eingestellt. Die Glukose wurde getrennt von den übrigen Medienbestandteilen autoklaviert, das YNB wurde nachträglich als sterilfiltrierte Stammlösung zugegeben.

#### YNB-Stammlösung

|  |        |
|--|--------|
| YNB w/o aminoacids and (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 17 g/l |
|--|--------|

Die Lösung wurde unmittelbar vor dem Gebrauch hergestellt und sterilfiltriert.

SC- bzw. Drop-Out-Mix

|           |       |              |       |
|-----------|-------|--------------|-------|
| Adenin    | 0,4 g | Phenylalanin | 1,0 g |
| Arginin   | 0,4 g | Threonin     | 4,0 g |
| Histidin  | 0,4 g | Tryptophan   | 0,4 g |
| Isoleucin | 0,6 g | Tyrosin      | 0,6 g |
| Leucin    | 2,0 g | Uracil       | 0,4 g |
| Lysin     | 0,6 g | Valin        | 3,0 g |
| Methionin | 0,4 g |              |       |

Die Auflistung gibt die Mengen für eine Einwaage von 14,2 g SC-Pulvermix an. Bei Drop-Out-Medien wurde(n) die entsprechende(n) Aminosäure(n) bzw. Base(n) ausgelassen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Komplex Methylen Blau Agar

|               |                                    |
|---------------|------------------------------------|
| Glukose       | 2 %                                |
| Pepton        | 2 %                                |
| Hefeextrakt   | 1 %                                |
| Zitronensäure | 1,92 %                             |
| Methylenblau  | 2 ml/l einer 0,3 %igen Stammlösung |
| Agar          | 1,9 %                              |

Der pH-Wert wurde mit  $K_2HPO_4$  auf 4,0 eingestellt.

SC-Methylen-Blau-Agar

|                |                                    |
|----------------|------------------------------------|
| Glukose        | 2 %                                |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 0,5 %                              |
| SC-Mix         | 0,71 g/l                           |
| YNB            | 1,5 g/l                            |
| Zitronensäure  | 1,92 %                             |
| Agar           | 1,9 %                              |
| Methylenblau   | 2 ml/l einer 0,3 %igen Stammlösung |

Der pH-Wert der Lösung wurde mit  $K_2HPO_4$  auf 4,0 eingestellt. Die Glukose und der Agar wurden getrennt autoklaviert, das YNB wurde nachträglich sterilfiltriert zugegeben.

### B-Medium (nach Pfeiffer und Radler, 1982)

|   |          |
|---|----------|
| Glukose   | 50 g/l   |
| (Galaktose)                                     | 50 g/l   |
| Inosit  | 0,04 g/l |
| Tri-Natriumcitrat x H <sub>2</sub> O            | 0,5 %    |
| D,L-Äpfelsäure                                  | 20 g/l   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 1 g/l    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1,5 g/l  |
| Mg(SO <sub>4</sub> ) x 7H <sub>2</sub> O        | 1 g/l    |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 0,5 g/l  |
| Glycerin  | 20 %     |
| 10 x Aminosäure-Mix                             | 1,21 g/l |
| 100 x Vitamin Stammlösung                       | 1 %      |
| 100 x Spurenelemente Stammlösung                | 1 %      |

Die Glukose (Galaktose) wurde getrennt autoklaviert und die Stammlösungen wurden nachträglich zugegeben. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 4,0 eingestellt.

### 10 x Aminosäure-Mix

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| Alanin                  | 0,75 g/l |
| Argininmonohydrochlorid | 3,5 g/l  |
| Asparaginsäure          | 0,5 g/l  |
| Glutaminsäure           | 3,0 g/l  |
| Histidinmonochlorid     | 0,2 g/l  |
| Methionin               | 0,4 g/l  |
| Serin                   | 0,5 g/l  |
| Threonin                | 2,0 g/l  |
| Tryptophan              | 0,4 g/l  |
| Leucin                  | 0,5 g/l  |
| Uracil                  | 0,2 g/l  |
| Adenin                  | 0,2 g/l  |

Die Auflistung gibt die Menge für eine Einwaage von 12,15 g SC-Pulvermix an. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### 100 x Vitamin-Stammlösung

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| 4-Aminobenzoesäure  | 20 mg/ml  |
| Biotin              | 20 mg/ml  |
| Folsäure            | 20 mg/ml  |
| Nicotinsäure        | 100 mg/ml |
| Riboflavin          | 50 mg/ml  |
| Thiaminiumdichlorid | 50 mg/ml  |
| Ca-D-Panthotenat    | 100 mg/ml |

Die Lösung wurde 20 min in strömendem Dampf sterilisiert und bei -20 °C gelagert.

100 x Spurenelemente-Stammlösung

|   |            |
|---|------------|
| Borsäure  | 20 mg/ml   |
| $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$         | 200 mg/ml  |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$         | 200 mg/ml  |
| $\text{AlCl}_3$   | 200 mg/ml  |
| $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$         | 100 mg/ml  |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$              | 100 mg/ml  |
| $\text{Li}_2\text{SO}_4 \times \text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ | 100 mg/ml  |
| KI  | 100 mg/ml  |
| K-Hydrogentatrat  | 2000 mg/ml |

Die Lösung wurde autoklaviert und bei -20 °C gelagert.

***Kluyveromyces lactis***YCB-Agar mit 5 mM Acetamid

|                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| YCB                                | 11,7 g/l |
| Agar                               | 20 g/l   |
| 1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) | 3 %      |
| 100 x Acetamid-Stammlösung         | 1 %      |

Die Lösung bestehend aus YCB und Agar wurde nach dem Autoklavieren mit dem Puffer und der Acetamid-Stammlösung komplettiert und Agarplatten wurden gegossen.

100 x Acetamid (500 mM)

|          |         |
|----------|---------|
| Acetamid | 29,5g/l |
|----------|---------|

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,0

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 142 g/l |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ | 138 g/l |

Beide Pufferlösungen wurden getrennt angesetzt. Zur Herstellung einer 1 M Pufferstammlösung mit einem pH-Wert von 7,0 wurden 577 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung mit 423 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung gemischt (Sambrook & Russell, 2001). Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren.

YPG

|             |     |
|-------------|-----|
| Pepton      | 1 % |
| Hefeextrakt | 2 % |
| Galaktose   | 2 % |

Der pH-Wert wurde auf 4,0 eingestellt. Die Galaktose wurde getrennt autoklaviert.

### ***Zygosaccharomyces bailii***

#### YPF + Sorbit

|             |     |
|-------------|-----|
| Hefeextrakt | 1 % |
| Pepton      | 2 % |
| Fruktose    | 2 % |
| Sorbit      | 1 M |

#### YPF Agar

|             |       |
|-------------|-------|
| Hefeextrakt | 1 %   |
| Pepton      | 2 %   |
| Fruktose    | 2 %   |
| Agar        | 1,5 % |

#### G418

|      |           |
|------|-----------|
| G418 | 100 mg/ml |
|------|-----------|

Die Stammlösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

### ***Pichia pastoris***

#### BMG

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| Glycerin  | 2,5 %                         |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1 %                           |
| YNB   | 3,4 g/l                       |
| Biotin  | 2 ml/l einen 500x Stammlösung |
| 1 M Pufferstammlösung                           | 100 ml/l                      |

Das YNB und die Biotin-Stammlösung wurden nach dem Autoklavieren zugegeben.

#### BMM

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| Methanol  | 1 %                           |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1 %                           |
| YNB   | 3,4 g/l                       |
| Biotin  | 2 ml/l einen 500x Stammlösung |
| 1 M Pufferstammlösung                           | 100 ml/l                      |

Nach dem Autoklavieren wurden das Methanol, das YNB und die Biotin-Stammlösung steril zugegeben.



1 M Kalium Phosphatpuffer pH 4,2

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| $K_2HPO_4$ (Lösung A) | 136,09 g/l |
| $KH_2PO_4$ (Lösung B) | 174,18 g/l |

Die beiden Lösungen wurden in einem solchen Verhältnis miteinander gemischt, dass sie einen pH-Wert von 4,2 ergaben. Der Puffer wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

500 x Biotin-Stammlösung

|          |        |
|----------|--------|
| D-Biotin | 0,02 % |
|----------|--------|

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Fermentationsmedium (Tolner *et al.*, 2006)

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Glycerin                        | 62,5 g  |
| $CaSO_4$                        | 0,9 g   |
| $K_2SO_4$                       | 14,76 g |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$           | 11,67 g |
| $(NH_4)_2SO_4$                  | 9 g     |
| $H_2O_{deion}$                  | 833 ml  |
| Na-Hexametaphosphat-Stammlösung | 167 ml  |
| PTM1                            | 4 ml    |

Na-Hexametaphosphat sowie PTM1 wurden sterilfiltriert nach dem Autoklavieren zugegeben. Der pH-Wert wurde im Fermenter mit  $NH_3$  auf den gewünschten Wert eingestellt.

Na-Hexametaphosphat-Stammlösung

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| Na-Hexametaphosphat | 25 g      |
| $H_2O_{deion.}$     | ad 167 ml |

Das Na-Hexametaphosphat wurde langsam in das  $H_2O_{deion}$  gegeben, gelöst und anschließend sterilfiltriert.

Pichia Trace Metal 1 (PTM1) (Tolner *et al.*, 2006)

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| $CuSO_4 \times 5H_2O$                 | 5,99 g/l                                 |
| 10 x NaI (0,4 g in 40 ml $H_2O$ )     | 8 ml/l (0,08 g)                          |
| $MnSO_4 \times H_2O$                  | 3 g/l                                    |
| $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$              | 0,2 g/l                                  |
| $CoCl_2$                              | 0,5 g/l                                  |
| $ZnCl_2 \times 5H_2O$                 | 20,04 g/l                                |
| $FeSO_4 \times 7H_2O$                 | 65,05 g/l                                |
| 100x $H_3BO_3$ (1 g in 40 ml $H_2O$ ) | 800 $\mu$ l/l (0,02 g)                   |
| $H_2SO_4$ (96,2 %)                    | 19,2 ml/l                                |
| D-Biotin                              | 0,4 g/l (nach dem Autoklavieren zugeben) |

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

## 2.5. Arbeitsmaterialien

In den nachfolgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Arbeitsmaterialien wie Antikörper (Tabelle 6 und Tabelle 7), Chemikalien, Enzyme und Labormaterialien (Tabelle 8) sowie die verwendeten Kits (Tabelle 9) aufgeführt.

### Antikörper

**Tabelle 6: In der vorliegenden Arbeit verwendete primäre Antikörper.**

| Antikörper    | Eigenschaft       | Hersteller    |
|---------------|-------------------|---------------|
| Anti-c-myc    | monoklonal (Maus) | ROCHE         |
| Anti-DsRED    | monoklonal (Maus) | CLONTECH      |
| ANTI FLAG® M1 | monoklonal (Maus) | SIGMA         |
| ANTI FLAG® M2 | monoklonal (Maus) | SIGMA         |
| Anti-GFP      | monoklonal (Maus) | ROCHE         |
| Anti-His      | monoklonal (Maus) | GE HEALTHCARE |
| Anti-Strep    | monoklonal (Maus) | IBA           |
| Anti-V5       | monoklonal (Maus) | ABD- SEROTEC  |
| Anti-Zygocin  | polyklonal (Hase) | UKS, HOMBURG  |

**Tabelle 7: In der vorliegenden Arbeit verwendete sekundäre Antikörper-Konjugate.**

| Antikörper      | Konjugat | Hersteller |
|-----------------|----------|------------|
| Anti-Rabbit IgG | HRP      | PIERCE     |
| Anti-Rabbit IgG | AP       | SIGMA      |
| Anti-Mouse IgG  | HRP/ AP  | SIGMA      |

### Chemikalien, Enzyme und Labormaterialien

**Tabelle 8: Die wichtigsten in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und weitere Labormaterialien.**

| Produkte   | Hersteller |
|--|------------|
| X-Gal, T4-DNA-Ligase   | APPLICHEM  |
| Extra Thick Blot Paper, Elektroporationsküvetten   | BIO RAD    |
| yeast nitrogen base w/o amino acids and ammoniumsulfate  | DIFCO      |
| Restriktionsendonukleasen, RNase A   | FERMENTAS  |
| T4-DNA-Ligase  | NEB        |
| PVDF-Membran, Expand™ High Fidelity PCR-System, Complete Protease Inhibitor Cocktail               | ROCHE      |
| Vivaspin Ultrafiltrationseinheiten, Minisart Spritzenvorsatzfilter                                 | SARTORIUS  |
| Taq-Polymerase   | SIGMA      |
| FideliTaq™ PCR Master Mix (2x)   | USB        |
| Ultrafiltrationsmembranen (Amicon), MF-Membrane Filter 0,025 µm, Immobilon-P <sup>SQ</sup> Membran | MILLIPORE  |

## Kits

**Tabelle 9: In der vorliegenden Arbeit verwendete Kits.**

| Kit  | Hersteller    |
|--|---------------|
| innuPREP-Plasmid Mini Kit, innuPREP Gel Extraktion Kit                               | ANALYTIK JENA |
| CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit   | FERMENTAS     |
| TOPO-TA Cloning Kit, <i>Pichia</i> Expression Kit                                    | INVITROGEN    |
| pST-Blue1 Acceptor Vector Giga Kit   | NOVAGEN       |
| <i>K. lactis</i> Protein Expression Kit, pMAL Protein Fusion and Purification System | NEB           |
| E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II  | PEQLAB        |
| BCA-Protein Assay Kit  | PIERCE        |

## Längen und Massenstandards für Nukleinsäuren und Proteine

**Tabelle 10: In den Experimenten eingesetzte Standards für Nukleinsäuren und Proteine.**

| Längen-/Massenstandard                     | Bezugsquelle |
|--|--------------|
| SmartLadder                                | EUROGENTEC   |
| O'GeneRuler™ Low Range DNA Ladder          | FERMENTAS    |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder       | FERMENTAS    |
| PageRuler™ Unstained Protein Ladder        | FERMENTAS    |
| Precision Plus Protein Prestained Standard | BIO-RAD      |

## 2.6. Kulturbedingungen

### 2.6.1. Kultivierung *E. coli*

Die Kultivierung Plasmid-tragender *E. coli* Stämme erfolgte im Reagenzglas in 5 ml antibiotikahaltigem LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm auf einem Rundschüttler (INFORS). Die Kultur wurde dazu mit einer Einzelkolonie beimpft. Zur heterologen Proteinexpression in *E. coli* wurden größere Kulturmaßstäbe verwendet. Dazu wurden 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 250 ml antibiotikahaltigem Pepton/Trypton-Medium mit 4 ml einer frischen Übernachtskultur beimpft und anschließend 24 h bei 20 °C, 28 °C und 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Kultivierung von *E. coli* auf LB-Agarplatten erfolgte bei 37 °C über Nacht im Brutschrank.

## 2.6.2. Kultivierung Hefen

### ***Saccharomyces cerevisiae***

Zur Kultivierung von *S. cerevisiae* in Flüssigmedium wurden ausschließlich die Standard-Medien (YPD- bzw. d/o-Medium) verwendet. Dazu wurden die Kulturen bei 30 °C und 220 rpm im Inkubationsschüttler bis zur gewünschten Zellzahl angezogen. Agarplatten wurden bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Selektion positiver Klone nach Transformation wurden die Zellen auf den entsprechenden d/o Agarplatten drei bis fünf Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

### ***Kluyveromyces lactis***

*K. lactis* Kulturen ohne ein integriertes Plasmid wurden in YPD-Komplexmedium bei 30 °C und 220 rpm in einem Inkubationsschüttler kultiviert. Eine Selektion positiver Klone nach Transformation erfolgte auf YCB-Agarplatten mit 5 mM Acetamid für drei bis fünf Tage bei 30 °C im Brutschrank. Vorkulturen für die Proteinexpression wurden bei 30 °C kultiviert, die Hauptkulturen (YPG-Komplexmedium bzw. B-Medium + Galaktose) bei 20 °C, 180 rpm.

### ***Pichia pastoris***

Die Anzucht von *P. pastoris* Kulturen ohne integriertes Plasmid erfolgte in YPD-Komplexmedium bei 30 °C und 220 rpm in einem Inkubationsschüttler. Die Selektion positiver Klone nach Transformation und Integration erfolgte auf His-d/o-Agarplatten bei 30 °C. Positive Klone wurden zur Stammhaltung auf His-d/o-Agarplatten überimpft und bei 4 °C gelagert. Die Kultivierung der Kulturen erfolgte in BMG-Medium bei 30 °C und 220 rpm. Als Vorkultur für die Proteinexpression diente eine 5 ml His-d/o-Kultur. Mit dieser wurde die Hauptkultur in einem Erlenmeyerkolben 4 %ig angeimpft und zwei Tage bei 29 °C und 220 rpm inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte in BMM-Medium bei 20 °C und 220 rpm auf einem Rundschüttler. Dazu wurde die BMG Kultur geerntet (10 min, 7000 rpm, 20 °C) und in dem gleichen Volumen BMM wieder aufgenommen.

### ***Zygosaccharomyces bailii***

Die Kultivierung Plasmid-freier Zellen erfolgte in YPD-Komplexmedium bei 30 °C und 220 rpm in einem Inkubationsschüttler. Zur Regeneration nach der Transformation wurden die Zellen 6-14 h bei 30 °C und 220 rpm in YPF + Sorbit inkubiert. Zur Selektion positiver Klone wurden die Zellen auf YPF-Agarplatten mit 200 µg/ml G418 ausplattiert

und für vier bis sechs Tage bei 30 °C in Brutschrank inkubiert. Die Expression erfolgte in B-Medium bei 20 °C, 90 rpm für fünf Tage.

## 2.7. Stammhaltung und Lagerung

Die Stammhaltung Fremdgen-tragender *P. pastoris* Zellen erfolgte auf His-d/o-Platten bei 4 °C. Zur Stammhaltung wurden die *P. pastoris* Transformanten im Abstand von ein bis zwei Monaten auf neue Platten überimpft.

Zur Anfertigung von Dauerkulturen (*E. coli* und Hefen) wurden 750 µl einer frischen Übernachtkultur mit 750 µl Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert. Zur Anfertigung von *P. pastoris* Dauerkulturen wurden 7,5 ml BMG-Medium mit einer frischen Übernachtkultur angeimpft und bei 30 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 15 inkubiert. Nach dem Ernten der Kultur wurde das Pellet in 750 µl His-d/o-Medium aufgenommen, mit 750 µl Glycerin versetzt, gemischt und schließlich bei -80 °C gelagert (Tolner *et al.*, 2006).

## 2.8. Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 2.8.1. Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

#### 2.8.1.1. Alkalische Lyse

##### GTE-Lösung

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Glukose              | 50 mM |
| Tris-HCl pH 8,0      | 25 mM |
| Na <sub>2</sub> EDTA | 10 mM |

##### NaOH/SDS-Lösung

|      |        |
|------|--------|
| NaOH | 200 mM |
| SDS  | 1 %    |

##### 5 M Kaliumacetat-Lösung

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Eisessig 99,5 % | 29,5 ml |
|-----------------|---------|

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 4,8 eingestellt.

Die alkalische Lyse wurde nach einem veränderten Protokoll von Birnboim (1983) durchgeführt. Eine transformierte *E. coli* Einzelkolonie wurde über Nacht bei 37 °C in 5 ml LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum als Selektionsmarker kultiviert. 1,5 bis

4 ml dieser Kultur wurden 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl GTE-Lösung vollständig resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS-Lösung vorsichtig durch Invertieren gemischt. Nach 5 min Inkubation wurden 150 µl Kaliumacetat-Lösung zur Neutralisation zugegeben und vorsichtig gemischt um die enthaltenen Proteine, Zelltrümmer und chromosomale DNA zu fällen. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert. Das weißliche Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 15000 rpm, 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 1 ml Ethanol und fünf minütiger Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation (15000 rpm, 4 °C, 15 min) wurde die Flüssigkeit dekantiert und das Pellet 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### **2.8.1.2. Plasmid Miniprep**

Um eine höhere Plasmid-DNA Qualität z. B. für Sequenzierungen zu erhalten, wurde das Plasmid-Miniprep Kit der Firma PEQLAB analog den Angaben des Herstellers verwendet. In diesem Kit wird die DNA ebenfalls nach der Methode der alkalischen Lyse isoliert. Nach Fällung der Zellpräzipitate und Proteine wurde die Plasmid-DNA durch eine Säulenchromatographie an einer Anionenaustauscher Säule von der in der Lösung verbliebenen genomischen DNA und RNA getrennt und mit H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> von der Säule eluiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

### **2.8.2. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA**

Zur hydrolytischen Spaltung von DNA wurden die Restriktionsenzyme der Firmen FERMENTAS, NEW ENGLANG BIOLABS und ROCHE nach Herstellerangaben verwendet. Für einen Standard Kontrollverdau wurde ein 20 µl Ansatz mit jeweils 0,3 µl Restriktionsenzym, 0,1 µl RNase und dem entsprechenden Reaktionspuffer verwendet. Die Menge an eingesetzter DNA variierte zwischen 1-3 µl Plasmid DNA. Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte bei 37 °C für 1,5 h. Für präparative Verdaue wurde ein 100 µl Ansatz mit der entsprechend 5-fach größeren Menge an Puffer, DNA und Enzym verwendet, der für 5 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurde.

### 2.8.3. Agarose-Gelelektrophorese

#### 10 x TBE

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Tris-HCl pH 8,0      | 890 mM |
| Borat                | 890 mM |
| Na <sub>2</sub> EDTA | 20 mM  |

#### Probenpuffer (GLB)

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Glycerin             | 50 %   |
| SDS                  | 1 %    |
| Na <sub>2</sub> EDTA | 125 mM |
| Bromphenolblau       | 0,05 % |
| Xylencyanol          | 0,05 % |

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt ein physikochemisches Verfahren dar, bei dem DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe voneinander getrennt werden können (Sambrook *et al.*, 1989). Die Trennung der linearen doppelsträngigen DNA-Fragmente basiert auf der Wanderung der negativ geladenen DNA im elektrischen Feld von der Anode zur Kathode. Dabei ist die Beweglichkeit der DNA antiproportional zum Logarithmus der Zahl der Basenpaare (Meyers *et al.*, 1976). Die DNA kann durch die Zugabe von Ethidiumbromid detektiert werden. Ethidiumbromid interkaliert in GC-Paare und somit können die DNA-Fragmente unter UV-Licht nachgewiesen werden. Die Methode ermöglicht eine Größenbestimmung der DNA, wenn ein standardisierter DNA Marker mitgeführt wird.

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte, je nach erwarteter Größe, in 0,8-2 %igen Agarosegelen in 1 x TBE-Puffer. Es wurden die horizontalen Elektrophorese Apparaturen BlueMarine (SERVA) benutzt. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 135 V (Blue Marine 100) bzw. 195 V (Blue Marine 200). Dazu wurden die Proben mit 1/5 Volumen GLB-Puffer versetzt und aufgetragen. Als Standard DNA-Leiter wurde der 1 kb Marker Smart Ladder (EUROGENTECH) verwendet. Für die Trennung kleiner DNA-Fragmente wurde der O'GeneRouler Low Range (FERMENTAS) verwendet. Nach erfolgter Trennung wurden die Gele in einem Ethidiumbromid-Bad (0,0004 %) gefärbt. Die DNA konnte anschließend unter UV-Licht bei 312 nm mittels des ChemiDoc XRC Systems (BIO-RAD) detektiert und dokumentiert werden.

#### 2.8.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem innuPREP Kit der Firma ANALYTIC JENA. Die entsprechende DNA-Bande wurde ausgeschnitten und die Reisolierung nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.8.5. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der isolierten DNA (nach Isolierung mittels eines Kits) und ihre Reinheit wurden spektralphotometrisch mittels GeneQuant (PHARMACIA BIOTECH) bestimmt. Dazu wurde die Absorption der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei entspricht die  $A_{260} = 1$  der Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Abschätzung der Reinheit der DNA und des Restproteingehaltes wurde die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient aus  $A_{260}/A_{280}$  gebildet. Das Verhältnis (ratio) reiner DNA beträgt 1,8. Ein höherer Wert weist auf eine Verunreinigung mit RNA hin, ein niedrigerer Wert deutet auf eine Proteinverunreinigung hin.

#### 2.8.6. Ligation

Die mit kompatiblen Restriktionsenzymen geschnitten DNA-Fragmente wurden mit der T4 DNA Ligase (APPLICHEM/ NEB) nach den Angaben des Herstellers ligiert. Hierbei katalysiert die T4-DNA Ligase in einer ATP abhängigen Reaktion die Esterbindung im Nukleinsäure-Rückgrat der DNA zwischen dem 5'-Phosphat- und dem 3'-Hydroxylrest des gleichen DNA-Stranges. Die nach einem Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel getrennt und reisoliert. Anschließend wurden das gereinigte Insert und der Vektor zusammen in einen Reaktionsansatz pipettiert und für 1-2 h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Für einen Standard-Ligationsansatz ergab sich folgende Zusammensetzung:

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Vektor DNA        | 2 µl  |
| Insert DNA        | 15 µl |
| 10 x Ligasepuffer | 2 µl  |
| T4 DNA Ligase     | 1 µl  |



### 2.8.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, die es ermöglicht *in vitro* beliebige DNA-Fragmente zu amplifizieren. Die Methode basiert auf einer zyklischen Verdopplung der DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Saiki *et al.*, 1985). Neben dieser DNA-Polymerase sind noch mindestens zwei kurze, synthetisch hergestellte DNA-Oligonukleotide (Primer) sowie freie Desoxyribonukleotide (dNTPs) und eine Template-DNA nötig. Je einer dieser Primer ist komplementär zu einem der beiden Enden des gewünschten DNA-Fragmentes. Jeder Zyklus besteht aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt. Bei der Denaturierung werden die DNA-Stränge durch Kochen voneinander getrennt. Eine Absenkung der Temperatur unter die spezifische Schmelztemperatur der verwendeten im Überschuss vorhandenen Oligonukleotide ermöglicht eine Hybridisierung mit der einzelsträngigen Template-DNA (Annealing). Die Elongation erfolgt bei der für die thermostabile DNA-Polymerase optimalen Temperatur. Es erfolgt die Verlängerung der Primersequenzen in 5'→3'-Richtung, komplementär zum Template-Strang. Die sich in jedem Zyklus verdoppelnde Zahl an Template-DNA-Molekülen führt zu einem exponentiellen Anstieg des Amplifikates. Ein typischer in der vorliegenden Arbeit verwendeter PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| Template-DNA (1:10 verdünnt)      | 1 µl     |
| 5'-Primer (100 pM)                | 0,4 µl   |
| 3'-Primer (100 pM)                | 0,4 µl   |
| dNTP-Mix (25 mM)                  | 0,4 µl   |
| Polymerase (5 U/µl)               | 0,4 µl   |
| 10 x Polymerasepuffer             | 3 µl     |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | ad 30 µl |

Als Template wurde eine 10-fache Verdünnung von Plasmid-DNA nach alkalischer Lyse eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in den Thermocyclern Primus96<sup>advanced</sup> (PEQLAB), MyCycler (BIO-RAD) und Mastercycler<sup>®</sup> ep S (EPPENDORF). Die Elongationsdauer wurde jeweils an die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes angepasst. Ein typisches PCR Programm ist in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11: Beispiel für ein typisches PCR Programm.**

| PCR-Schritt          | Temperatur [°C] | Dauer [min] | Zyklen |
|----------------------|-----------------|-------------|--------|
| 1. Denaturierung     | 94              | 3,00        | 1      |
| 2. Denaturierung     | 94              | 0,25        | 26     |
| 3. Annealing         | 58              | 0,25        |        |
| 4. Elongation        | 72              | 0,50        |        |
| 5. Finale Elongation | 72              | 7,00        | 1      |

Generell wurden DNA-Polymerasen mit Proof-Reading-Funktion verwendet (Expand High Fidelity PCR System [ROCHE], Fidelity™ PCR Mastermix (2x) [USB], Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase [NEB]), um die Wahrscheinlichkeit von Mutationen während der Amplifikation möglichst gering zu halten. Nach erfolgter PCR wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel reisoliert und zur TA-Klonierung (vgl. 2.8.8, S. 45) eingesetzt.

### 2.8.7.1. SOE-PCR

Zur Konstruktion von Zygocin-Fusionen, Zygocin-Mutanten oder zum Einfügen von Punktmutationen wurde die Technik der SOE-PCR („splicing by overlapping extension“) angewandt (Horton *et al.*, 1989; ). Diese Methode erlaubt es, DNA Moleküle an genau definierten Verbindungsstellen durch eine PCR-Reaktion zusammenzufügen, ohne Restriktionsschnittstellen verwenden zu müssen. Es ist somit möglich, an genau definierten Stellen der DNA Punktmutationen einzufügen.

### 2.8.7.2. Kolonie-PCR

Um den Erfolg von Ligationen, TA-Klonierungen oder Hefetransformationen schnell und effizient überprüfen zu können, wurde die Technik der Kolonie-PCR angewandt. Diese Methode basiert auf einer PCR, bei der bakterielle- oder Hefe-Kolonien als DNA-Template eingesetzt werden. Sie ersetzt die übliche Prozedur von Anzucht, Plasmid Präparation und Restriktionsverdau. Für diese Art der PCR werden Primer verwendet, die sequenz-spezifisch für das verwendete Plasmid sind (im Falle der TA-Klonierung) und eine Sequenz von bekannter Länge amplifizieren. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung je eines plasmidspezifischen und eines genspezifischen Primers, wenn der Erfolg einer Ligation überprüft werden soll. Kolonien, die im Kontrollgel ein Amplifikat der erwarteten Größe aufweisen, enthalten mit hoher Wahrscheinlichkeit das gewünschte Insert.

***E. coli***

Bei *E. coli* wurden jeweils die ganzen Zellen in Form einer Einzelkolonie in die PCR-Reaktion eingesetzt. Dabei wurden die Kolonien parallel mit sterilen Zahnstochern auf eine Replikaplatte aus LB<sub>Kan</sub>- bzw. LB<sub>Amp</sub>-Medium überimpft, damit die positiven Klone erhalten bleiben und für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Die bakteriellen Zellen werden bei der PCR durch die Hitze soweit destabilisiert, dass Plasmid-DNA austreten kann, welche dann in der PCR als Template für die Amplifikation dient. Sofern das Plasmid das gewünschte Insert mit bekannter Sequenz trägt, wird es mit Hilfe genspezifischer oder vektorspezifischer Primer amplifiziert. Der Erfolg wird in einem Agarosegel überprüft. Ein typischer Kolonie-PCR-Ansatz für die Überprüfung einer TA-Klonierung setzte sich wie folgt zusammen:

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| 5'-T7 Promotor Primer (100 pM)    | 0,10 µl  |
| 3'-SP6 Promotor Primer (100 pM)   | 0,10 µl  |
| dNTP's (25 mM)                    | 0,10 µl  |
| DMSO                              | 0,60 µl  |
| 10 x Reaktionspuffer              | 1,00 µl  |
| Taq-Polymerase (SIGMA) (5 U/µl)   | 0,08 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | ad 10 µl |

Mit einem Zahnstocher wurde eine Kolonie zuerst auf eine Replikaplatte (LB mit entsprechendem Antibiotikum) überimpft und dann in ein PCR Gefäß mit vorgelegtem PCR Ansatz überführt. Nach erfolgter PCR (Programm vgl. Tabelle 12) wurde der Ansatz mit 1 µl Probenpuffer versetzt und in einem Agarosegel aufgetrennt.

**Tabelle 12: Kolonie-PCR-Programm für *E. coli*.**

| PCR-Schritt          | Temperatur [°C] | Dauer [s] | Zyklen |
|----------------------|-----------------|-----------|--------|
| 1. Denaturierung     | 96              | 120       | 1      |
| 2. Denaturierung     | 94              | 10        | 25     |
| 3. Annealing         | 60              | 10        |        |
| 4. Elongation        | 72              | 10        |        |
| 5. Finale Elongation | 72              | 180       | 1      |

**Z. bailii**

Die Überprüfung des Transformationserfolges erfolgte bei *Z. bailii* mittels Kolonie-PCR. Die Vorgehensweise war ähnlich wie bei der Kolonie-PCR von Bakterienzellen, allerdings wurde hier das Volumen des PCR-Ansatzes mit 20 µl gewählt, auf DMSO wurde verzichtet (Programm siehe Tabelle 13). Für die PCR wurden jeweils genspezifische Primer verwendet. Es war darauf zu achten, dass eine möglichst große Menge an Hefezellen (eine ganze Kolonie) dem PCR-Ansatz zugeführt wurde. Nach erfolgter PCR wurde der Ansatz mit 2 µl Probenpuffer versetzt und in einem Agarosegel aufgetrennt.

## PCR-Ansatz:

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| 5'-Primer (100 pM)                | 0,2 µl   |
| 3'-Primer (100 pM)                | 0,2 µl   |
| dNTP's (25 mM)                    | 0,2 µl   |
| 10 x Reaktionspuffer              | 2,0 µl   |
| Taq-Polymerase (SIGMA) (5 U/µl)   | 0,2 µl   |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | ad 20 µl |

Tabelle 13: Kolonie-PCR-Programm für *Z. bailii*.

| PCR-Schritt          | Temperatur [°C] | Dauer [s] | Zyklen |
|----------------------|-----------------|-----------|--------|
| 1. Denaturierung     | 94              | 300       | 1      |
| 2. Denaturierung     | 94              | 20        | 28     |
| 3. Annealing         | 58              | 20        |        |
| 4. Elongation        | 72              | 30        |        |
| 5. Finale Elongation | 72              | 180       | 1      |

**P. pastoris**

Bei *P. pastoris* wurde die Plasmidintegration in das Genom nach der Transformation mittels Kolonie-PCR überprüft. Hierzu wurde eine genügend große *P. pastoris* Kolonie, die zuvor auf eine Replikplatte überimpft wurde, in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> suspendiert und 20 s in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt. Von diesem DNA-Rohextrakt wurden 10 µl für die PCR Reaktion eingesetzt. Die verwendeten Primer waren homolog der Vektorsequenz. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 14 dargestellt. Nach erfolgter PCR wurde der Ansatz mit 5 µl Probenpuffer versetzt und komplett auf ein Agarosegel aufgetragen.

## PCR-Ansatz:

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| DNA-Rohextrakt                       | 10 µl    |
| 5'- $\alpha$ -Mating Factor (100 pM) | 0,2 µl   |
| 3'-AOX (100 pM)                      | 0,2 µl   |
| dNTP's (25 mM)                       | 0,2 µl   |
| 10 x Reaktionspuffer                 | 2,0 µl   |
| Taq-Polymerase (SIGMA) (5 U/µl)      | 0,2 µl   |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>    | ad 20 µl |

Tabelle 14: Kolonie-PCR Programm für *P. pastoris*.

| PCR-Schritt          | Temperatur [°C] | Dauer [s] | Zyklen |
|----------------------|-----------------|-----------|--------|
| 1. Denaturierung     | 95              | 300       | 1      |
| 2. Denaturierung     | 94,5            | 23        | 28     |
| 3. Annealing         | 60              | 23        |        |
| 4. Elongation        | 72              | 30        |        |
| 5. Finale Elongation | 72              | 180       | 1      |

### 2.8.8. TA-Klonierung

Um nach erfolgter PCR eine Sequenzierung der Amplifikate zu ermöglichen, wurden die PCR-Produkte in TA-Vektoren eingefügt. Diese Vektoren ermöglichen eine leichte Klonierung von PCR-Produkten, die durch DNA-Polymerasen amplifiziert wurden, die 3'-dATP-Überhänge erzeugen (z.B. Taq-Polymerase) (Clark, 1988). Die verwendeten Vektoren besitzen 3'-dTTP-Überhänge (bzw. 3'-dUTP Überhänge beim AccepTor Vektor), was eine direkte Ligation des Amplifikates in den Vektor ermöglicht.

#### 2.8.8.1. TOPO TA-Cloning®

Der bei der TOPO TA-Klonierung (INVITROGEN) verwendete Vektor pCR®II-TOPO® liegt in linearisierter, aktivierter Form vor und weist 3'-dTTP-Überhänge sowie eine kovalent gekoppelte Topoisomerase I auf. Dadurch wird eine Insertion des PCR-Produktes in den Vektor ermöglicht und eine kovalente Bindung mit Hilfe der Topoisomerase I geknüpft (Shuman, 1994). Die Klonierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Vektor trägt sowohl einen Ampicillin- als auch einen Kanamycin-Resistenz-Marker, die Möglichkeit der Blau-Weiß-Selektion und in den MCS-flankierenden Regionen über eine SP6 und T7-Promotor-Region, die für Standard-Sequenzierungen eingesetzt werden können.

Klonierungsansatz:

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| PCR-Produkt bzw. Reisolat   | 4 $\mu$ l |
| Salz Lösung                 | 1 $\mu$ l |
| TOPO <sup>®</sup> II-Vektor | 1 $\mu$ l |

Die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen erfolgte durch Hitzeschock nach den Angaben des Herstellers. Die einzelnen Inkubationsschritte wurden mit der maximal angegebenen Dauer durchgeführt. Die Selektion erfolgte auf Kanamycin-haltigen LB-Platten und durch Blau-Weiß-Screening (Brown, 1999).

### 2.8.8.2. AccepTor™-Klonierung

Ein anderes in dieser Arbeit verwendetes Kit zur Klonierung von PCR-Produkten ist das AccepTor™ Vector Giga Kit (NOVAGEN). Dieser Vektor verfügt über 3'-dUTP-Überhänge, die eine direkte Ligation des Amplifikates in den Vektor ermöglichen. Wie der TOPO Vektor verfügt er sowohl über Ampicillin- als auch Kanamycin-Resistenz Marker, SP6 und T7-Promotor Regionen als auch über eine MCS und die Möglichkeit zur Blau-Weiß-Selektion. Zur Ligation eines PCR-Produktes in den pST-Blue-1 Vektor wurden die Komponenten in folgendem Verhältnis zusammengegeben:

|                                  |             |
|----------------------------------|-------------|
| PCR-Produkt bzw. Reisolat        | 2 $\mu$ l   |
| AccepTor Vektor [50 ng/ $\mu$ l] | 0,5 $\mu$ l |
| 2 x Clonables™ Ligation Premix   | 2,5 $\mu$ l |

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 2 h bei 16 °C inkubiert. Die Transformation in chemisch kompetente NovaBlue Singles™-Zellen (NOVAGEN) erfolgte durch Hitzeschock nach Angaben des Herstellers. Die Selektion erfolgte auf Kanamycin-haltigen LB-Platten mit X-Gal und IPTG zur Blau-Weiß-Selektion.

### 2.8.9. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Didesoxynukleotid-Verfahren mit Hilfe des automatischen Sequenzierers LiCor 4200 (MWG-BIOTECH). Die Sequenzierreaktion wurde mit dem CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit (FERMENTAS) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Verfahren der Didesoxy-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977) basiert auf der partiellen Neusynthese

eines DNA-Stranges anhand einer vorgegebenen Matrize mit gezieltem Kettenabbruch, durch die Verwendung eines Didesoxynukleotids. Die 2',3'-Didesoxynukleotide zeichnen sich durch das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe aus, die an der Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen Desoxyribose und Nukleosidmonophosphat beteiligt ist. Fehlt sie, so kann keine neue Bindung mehr gebildet werden, und die Polymerisationsreaktion bricht ab. Alternativ wurde der Sequenzierservice der Firma GATC BIOTECH AG (Konstanz) genutzt, um die Sequenz der DNA-Proben zu bestimmen.

## 2.8.10. Transformationsmethoden

### 2.8.10.1. Elektroporation von *E. coli*

Bei der Elektroporation kommt es durch das kurzzeitige Anlegen eines starken elektrischen Feldes zur Disruption der Zellmembran, wodurch die Einschleusung von Plasmid-DNA in die Zelle ermöglicht wird (Calvin & Hanawalt, 1988; Dower *et al.*, 1988; Hanahan, 1983). Aufgrund der hohen Feldstärke muss die Leitfähigkeit des Mediums sehr gering gehalten werden.

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde eine 200 ml LB-Flüssigkultur mit 1/100 Volumen einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,6 bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen für 15 min bei 4 °C und 6000 rpm geerntet. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 100 ml eiskaltem 10 % Glycerin gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml eiskaltem 10 % Glycerin aufgenommen, in 50 µl Ansätzen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Durch diesen letzten Zentrifugationsschritt wurden die *E. coli* Zellen zu einem Titer von ca.  $3 \times 10^7$  Zellen/ml konzentriert.

Um bei der Elektroporation von Ligationsansätzen einen Kurzschluss und somit die Entstehung eines Lichtbogens zu verhindern, wurden die Ansätze zuvor eine Stunde gegen 10 % Glycerin dialysiert (MILLIPORE MF-Membrane Filter 0,025 µm). Der dialysierte Ansatz wurde auf Eis zu einem 50 µl Aliquot elektrokompetenter Zellen gegeben, gemischt und in eine zuvor gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte mit einem Gene Pulser™ (BIO-RAD) bei 400 Ω, 2,48 kV/cm und 2,5 µF. Direkt nach dem Puls wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 60 min bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Anschließend folgte das Ausplattieren der Transformationsansätze auf LB<sub>Kan</sub>- bzw. LB<sub>Amp</sub> Platten und eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

### 2.8.10.2. Chemisch kompetente *E. coli* Zellen

#### TB-Puffer

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| PIPES (0,5 M pH 6,7)                  | 10 mM (20 ml/l einer 0,5 M Stocklösung) |
| CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 15 mM                                   |
| KCl                                   | 250 mM                                  |
| MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O | 55 mM                                   |

Der Puffer wurde sterilfiltriert und in 100 ml Aliquots aufgeteilt, die bei -20 °C gelagert wurden.

Zur Herstellung von ultrakompetenten *E. coli* Zellen (Inoue, 1990, Sambrook & Russell, 2006) wurde eine Einzelkolonie einer frisch aufplattierten Kryo-Kultur von *E. coli* TOP10 Zellen in 2 ml LB Medium angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 250 ml SOB-Medium angeimpft und bei 20 °C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 inkubiert. Nach Erreichen der OD wurden die Zellen 10 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 4000 rpm, 4 °C für 10 min geerntet. Das Pellet wurde vorsichtig in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, und 1,4 ml DMSO wurden zugegeben. Die Zellen wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße zu 100 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation der chemisch kompetenten Zellen wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA versetzt (bis zu 25 µg DNA pro Ansatz), vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis belassen. Bei der Transformation von Ligationsansätzen wurden 10 µl des nicht dialysierten Ansatzes eingesetzt. Danach erfolgte für 90 s ein Hitzeschock bei 42 °C. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden 800 µl SOC-Medium zugegeben und 60 min bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Selektion erfolgte auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C.

### 2.8.10.3. Lithiumacetat Transformation von Hefen

#### 10 x Lithiumacetat

|               |     |
|---------------|-----|
| Lithiumacetat | 1 M |
|---------------|-----|

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

#### 10 x TE

|                  |        |
|------------------|--------|
| Tris-HCl; pH 7,5 | 100 mM |
|------------------|--------|



|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Na <sub>2</sub> EDTA  | 10 mM |
| <u>LiAc/TE Lösung</u> |       |

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| 10 x TE                           | 1 Teil  |
| 10 x Lithiumacetat                | 1 Teil  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 8 Teile |

PEG-Lösung

|                    |         |
|--------------------|---------|
| 50 % PEG 4000      | 8 Teile |
| 10 x TE            | 1 Teil  |
| 10 x Lithiumacetat | 1 Teil  |

Die Transformation nach der Lithiumacetat-Methode beruht auf der Eigenschaft von Alkali-Kationen, Hefezellen zur Aufnahme von DNA über die Zelloberfläche zu befähigen. Die Transformation in Kombination mit sogenannter Carrier-DNA (fragmentierte DNA aus Heringsperma) erhöht die Transformationseffizienz etwa um das 100-fache. Die eigentliche Aufnahme der DNA wird durch die Zugabe von Polyethylenglykol und durch Hitzeschock bei 42 °C induziert (Schiestl & Gietz 1989; Gietz *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1983). Für die Transformation von *S. cerevisiae* und *Z. bailii* wurden 100 ml YPD-Komplexmedium mit einer frischen Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,7 bei 30 °C und 220 rpm über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden bei 5000 rpm für 5 min geerntet und in 10 ml sterilem H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500 µl LiAc/TE aufgenommen und in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Zu dieser Zellsuspension wurden 20 µl hitzedenaturierte Carrier-DNA, 2 µl Plasmid-DNA und 1,2 ml PEG-Lösung hinzugefügt und bei 220 rpm bei 30 °C für 30 min inkubiert. Anschließend folgte ein 15 minütiger Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert (10 s, 14000 rpm) und zweimal mit 500 µl TE-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 500 µl TE aufgenommen, zur Selektion auf die entsprechenden Drop-Out-Platten ausplattiert und bis zur Kolonienbildung (drei bis fünf Tage) bei 30 °C inkubiert. Abweichend zum normalen Protokoll wurden bei *Z. bailii* die Zellen nach dem Hitzeschock und dem Waschen mit TE in 1 ml YPD aufgenommen und zur Ausbildung der Geneticin-Resistenz für 6 h bei 30 °C inkubiert und anschließend auf Geneticin-haltigem Medium ausplattiert.

**2.8.10.4. Elektroporation von *Z. bailii***LiAc/DTT/Tris-Lösung

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Lithiumacetat   | 100 mM |
| Tris-HCl pH 7,5 | 10 mM  |
| Dithiothreitol  | 10 mM  |

Lithiumacetat und Tris wurden autoklaviert. DTT wurde jeweils nachträglich unmittelbar vor der Transformation als sterile Stammlösung zugegeben.

#### 1 M Sorbitol-Lösung

Sorbitol 1 M

Die Lösung wurde autoklaviert.

Für die Transformation von *Z. bailii* wurde eine Kombination aus Lithiumacetat Transformation und Elektroporation angewandt (Branduardi *et al.*, 2004).

Zur Herstellung der elektrokompetenten Hefen wurden 100 ml YPD mit 1-10 µl einer frischen Über-Nacht-Kultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,5 inkubiert (ca.  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml). Anschließend wurden die Zellen geerntet (5 min bei 7000 rpm), in 10 ml LiAc/DTT/Tris resuspendiert (ca.  $1 \cdot 10^8$  Zellen/ml) und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet, einmal mit 10 ml sterilem H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> und nachfolgend mit 10 ml 1 M Sorbit gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml 1 M Sorbit-Lösung aufgenommen und zu 200 µl aliquotiert, die für die folgende Elektroporation eingesetzt wurden. Eine Lagerung der kompetenten Zellen ist nicht möglich, daher müssen für jede Transformation neue Zellen hergestellt werden.

Zur Transformation wurden die Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA versetzt und mit einem GenePulser II (BIO-RAD) bei 200 Ω, 1,5 kV/cm und 25 µF elektroporiert. Nach dem elektrischen Puls wurde den Zellen 500 µl YPF mit 1 M Sorbit zugegeben und für 6-14 h bei 30 °C und 220 rpm zur Ausbildung der Antimycotikumresistenz inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf selektive YPF-Platten mit 200 µg/ml G418 ausplattiert und für drei bis sechs Tage bei 30 °C bis zur Kolonienbildung inkubiert.

#### **2.8.10.5. Transformation von *K. lactis***

Die Transformation der chemisch kompetenten *K. lactis* Zellen erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll des *K. lactis* Protein Expression Kit (NEW ENGLAND BIOLABS). Für die Expression in *K. lactis* muss eine lineare Expressionskassette in die native LAC4-PBI-Promotorregion des *K. lactis* Genom integrieren. Hierfür wurde das entsprechende Expressionsplasmid mit SacII linearisiert und zur Transformation eingesetzt. Die Selektion erfolgt durch das ebenfalls in der Expressionskassette enthaltene *amdS*-Gen. Die kodierte Acetamidase ist in der Lage, Acetamid zu Ammonium umzusetzen, wodurch den Klonen ein Wachstum auf Acetamid als einzig verfügbarer Stickstoffquelle ermöglicht wird.

Zur Transformation wurden 50 µl Aliquots der chemisch kompetenten *K. lactis* GG799-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 155 µl Yeast Transformation Reagent und 1 µg (max. 3,7 µl) linearisierter Plasmid-DNA versetzt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Es folgte für 1 h ein Hitzeschock bei 37 °C und eine anschließende Zentrifugation bei 7000 rpm für 5 min. Die Zellen wurden in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> gewaschen, in 1 ml YPD resuspendiert und für 30 min bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Danach wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> gewaschen, die Zellen in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> aufgenommen und auf YCB-Platten mit Acetamid ausplattiert. Die Kolonienbildung erfolgte nach drei bis fünf Tagen bei 30 °C.

### 2.8.10.6. Elektroporation von *P. pastoris*

#### 10 x Bicin-NaOH pH 8,3

|       |        |
|-------|--------|
| Bicin | 100 mM |
|-------|--------|

Der pH-Wert des Puffers wurde mit NaOH auf 8,3 eingestellt.

#### DTT

|                |     |
|----------------|-----|
| Dithiothreitol | 1 M |
|----------------|-----|

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

#### BEDS

|                         |                              |
|-------------------------|------------------------------|
| Bicin-NaOH; pH 8,3      | 10 mM (10 % der Stammlösung) |
| Ethylenglykol           | 3 % (v/v)                    |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | 5 % (v/v)                    |
| Sorbitol                | 1 M                          |

#### 1 M Sorbitol

|          |     |
|----------|-----|
| Sorbitol | 1 M |
|----------|-----|

Die Transformation von *P. pastoris* wurde nach einem Protokoll von Lin-Cereghino *et al.* (2005) durchgeführt. Dabei wurde die Herstellung kompetenter Zellen nach Dohmen *et al.* (1991) mit der Elektroporationsmethode von Cregg & Russel (1998) kombiniert. Die *P. pastoris* Zellen werden mit BEDS-Lösung aufgenommen und mit DTT behandelt, was eine Erhöhung der Transformationseffizienz um den Faktor 20 bewirkt (Wu & Letchworth, 2004). Die so hergestellten kompetenten Zellen sind bei -80 °C lagerfähig und müssen nicht jeweils frisch hergestellt werden.

Für die Herstellung der elektrokompetenten Zellen wurden 50 ml YPD Medium mit einer Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 eingestellt und bei 30 °C und 220 rpm bis zum Erreichen

einer  $OD_{600}$  von 1 inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen (5 min, 5000 rpm, 4°C) wurden diese in 9 ml BEDS-Puffer aufgenommen und um 1 ml 1 M DTT ergänzt. Dieser Ansatz wurde bei 30 °C für 5 min und 100 rpm inkubiert, anschließend für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und mit 1 ml BEDS-Puffer gewaschen, um vorhandenes DTT weitgehend zu entfernen. Diese Zellsuspension wurde in 55 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 5 µg des entsprechenden, linearisierten Plasmids (mit *SacI*, *Sall* oder *StuI*) zu den Zellen gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit dem GenePulser II (BIO-RAD) bei 200 Ω, 1,5 kV/cm und 25 µF. Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen direkt in eiskaltem 500 µl YPD mit 1 M Sorbit aufgenommen und für 3 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit  $H_2O_{deion}$  wurde der Ansatz auf His-d/o-Platten ausplattiert und bis zur Kolonienbildung (drei bis fünf Tage) bei 30 °C inkubiert.

### 2.8.11. RNA Präparation aus Hefen nach der Hot Phenol Methode

#### TES

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Tris-HCl pH 7,5      | 10 mM |
| Na <sub>2</sub> EDTA | 10 mM |
| SDS                  | 0,5%  |

Der Puffer wurde mit  $H_2O_{deion}$  /DEPC angesetzt.

#### 3 M Natriumacetat

|               |     |
|---------------|-----|
| Natriumacetat | 3 M |
|---------------|-----|

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 5,2 eingestellt.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Hefen wurden 10 ml YPD-Medium mit einer Vorkultur beimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 1,0 inkubiert (Asubel *et al.* 1995). Nach Ernten der Zellen (5 min, 7000 rpm) wurden diese mit eiskaltem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 400 µl TES-Puffer aufgenommen, mit 400 µl sauer gepuffertem Phenol versetzt und 10 s gevortext. Anschließend erfolgte eine 60 minütige Inkubation bei 65 °C mit gelegentlichem Vortexen. Nach 5 min auf Eis wurde der Ansatz bei 15000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut mit 400 µl sauer gepuffertem Phenol versetzt und

10 s gevortext. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und dem Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde diese mit 400 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach 10 s vortexen wurde die Probe 10 min zentrifugiert und die wässrige Phase mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat sowie dem 2,5 fachen Volumen eiskaltem Ethanol (100%) versetzt, gemischt und für eine Stunde bei -80 °C gefällt. Die gefällte RNA wurde für 10 min bei 15000 rpm, 4 °C zentrifugiert und das erhaltene Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol (-20 °C) gewaschen. Nach dreiminütigem Trocknen der RNA bei Raumtemperatur wurde diese in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> DEPC aufgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

### 2.8.12. Gesamt-RNA-Präparation aus Hefe

#### Tris-Sulfat

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| Tris-SO <sub>4</sub> pH 9,3 | 50 mM |
| β-Mercaptoethanol           | 2,5 % |

Mercaptoethanol wurde unmittelbar vor dem Gebrauch zugegeben.

#### Tris-HCl

|                      |     |    |
|----------------------|-----|----|
| Tris-HCl pH 8,0      | 10  | mM |
| NaCl                 | 100 | mM |
| Na <sub>2</sub> EDTA | 1   | mM |

#### EDTA-Lösung

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| Na <sub>2</sub> EDTA pH 7,0 | 50 mM |
|-----------------------------|-------|

6 ml YEPD-Medium wurden mit 10 µl einer frischen Hefekultur angeimpft und bei 30 °C, 220 rpm über Nacht inkubiert. Nach Ernten der Zellen bei 7000 rpm, 5 min wurde das Pellet mit 1 ml EDTA-Lösung gewaschen, anschließend in 1 ml Tris-Sulfat resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension in 400 µl Tris-HCl wurden 400 µl sauer gepuffertes Phenol zugegeben, die Zellen einen Minute gevortext, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und gelegentlich gevortext. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 21000 x g wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gevortext. Während der 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde gelegentlich gevortext. Nach 10 min Zentrifugation (21000 x g, 4 °C) wurde die obere wässrige Phase abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 40 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 1 ml eiskaltem Ethanol versetzt. Die Fällung der Nukleinsäuren

erfolgte für 2-16 h bei -20 °C. Das nach Zentrifugation (20 min, 4 °C, 21000 x g) erhaltene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 23 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> DEPC aufgenommen. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C.

### **2.8.13. Fällung von dsRNA**

#### SSC/ LiCl

|               |        |
|---------------|--------|
| NaCl          | 300 mM |
| Citronensäure | 30 mM  |
| NaOH          | 36 g/l |
| LiCl          | 2 M    |

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

Zur Abtrennung einzelsträngiger RNA nach der Gesamt-RNA Präparation wurde das RNA Pellet (vgl. 2.8.12) in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> DEPC aufgenommen und 100 µl SSC/LiCl zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, wobei die einzelsträngige RNA präzipitierte. Diese wurde durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 15000 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde mit dem 2,5-fachen Volumen 100 % Ethanol gefällt (1 h bei -20 °C) und erneut zentrifugiert (10 min, 15000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die doppelsträngige RNA wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> DEPC aufgenommen.

### **2.8.14. Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden**

Zur Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden wurde das „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (ROCHE) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Template diente Plasmid-DNA.

### **2.8.15. Northernblot**

#### 10 x MOPS-Laufpuffer

|                      |        |
|----------------------|--------|
| MOPS                 | 0,4 M  |
| Na-Acetat            | 0,1 M  |
| Na <sub>2</sub> EDTA | 0,01 M |

Der Puffer wurde mit DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> angesetzt und sterilfiltriert.

20 x SSC

|               |       |
|---------------|-------|
| NaCl          | 3 M   |
| Citronensäure | 0,3 M |

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

2 x SSC/ 0,1 % SDS

|  |        |
|--|--------|
| 20 x SSC                               | 20 ml  |
| 10 % SDS                               | 2 ml   |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> DEPC | 178 ml |

0,5 x SSC/0,1 % SDS

|  |        |
|--|--------|
| 20 x SSC                               | 5 ml   |
| 10 % SDS                               | 2 ml   |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> DEPC | 193 ml |

Maleinsäurepuffer

|             |        |
|-------------|--------|
| Maleinsäure | 0,1 M  |
| NaCl        | 0,15 M |

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

Waschpuffer

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Maleinsäurepuffer | 99,7 % |
| Tween 20          | 0,3 %  |

Blockingstammlösung

Das Blocking-Reagenz (ROCHE) wurde nach den Angaben des Herstellers in Maleinsäurepuffer angesetzt.

FF-Puffer

|             |        |
|-------------|--------|
| 10 x MOPS   | 12,7 % |
| Formaldehyd | 33,2 % |
| Formamid    | 64,1 % |

Um RNasen zu inaktivieren, wurden alle Puffer für den Northern Blot zuvor mit 250 µl DEPC versetzt, über Nacht gerührt und anschließend zur Inaktivierung des DEPC autoklaviert. Eine Ausnahme stellte der MOPS-Puffer dar. Dieser darf nicht autoklaviert werden und wurde mit zuvor DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> angesetzt und sterilfiltriert.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA-Proben fand in denaturierenden Agarosegelen statt. Hierfür wurde 1 g Agarose in 72 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  DEPC gelöst, nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C wurden 10 ml 10 x MOPS Puffer und 18 ml Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen. Je 5,5 µl RNA wurden mit 2,5 µl MOPS, 4,5 µl Formaldehyd und 12,5 µl Formamid versetzt und 2 min im Wasserbad denaturiert, mit 5 µl GLB versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 5 V/cm unter einem Abzug. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel zweimal 15 min in 20 x SSC Puffer äquilibriert. Der Transfer der RNA auf die positiv geladene Nylonmembran (ROCHE) wurde durch Unterdruck-Blotting über einen Zeitraum von 90 min erreicht (HYBAID, Blottingapparatur). Nach dem Blotten wurde durch UV-Crosslinking (3 min) die RNA kovalent an die Membran gebunden. Die Membran wurde mit „DIG-Easy Hyb“ (ROCHE) für 1 h bei 50 °C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 52°C. Dazu wurden 25 ng/ml hitzedenaturierte DIG-markierte Sonde in einem Volumen von 10 ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Anschließend folgten mehrere Waschschriffe mit vorgewärmten Waschpuffern. Zuerst wurde die Membran zweimal für 5 min mit 2 x SSC/0,1 % SDS bei 50 °C gewaschen. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit 0,5 x SSC/0,1 % SDS für jeweils 15 min. Zur Detektion der RNA wurde die Membran zunächst für 5 min in Waschpuffer äquilibriert (20 °C) und anschließend in Blockingpuffer 30 min blockiert, um ein späteres, unspezifisches Binden der Anti-Digoxigenin Antikörper an die Membran zu reduzieren. Der Antikörper (Anti-Digoxigenin AP-Konjugat, ROCHE) wurde 1:2500 in Blockingpuffer verdünnt und 30 min im Hybridisierungssofen mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in Waschpuffer wurde die Membran 5 min in Detektionspuffer äquilibriert. Zum Nachweis der RNA wurde CSPD-Stammlösung (ROCHE) 1:250-fach in 10 ml Detektionspuffer zugegeben und die Membran 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz angetrocknet, in Folie eingeschweißt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz-Signale erfolgte mit Hilfe eines Röntgenfilmes, wobei mit einer Belichtungsdauer von 60 min begonnen wurde.



## 2.9. Arbeiten mit Proteinen

### 2.9.1. Zellaufschluss

#### 2.9.1.1. S80-Zellaufschluss von Hefen

Der S80-Aufschluss von Hefezellen stellt ein schnelles Verfahren zur Gewinnung von Hefe-Rohextrakten dar (Powilleit, 2004). Hierbei wurde 1 ml einer über Nacht Hefekultur durch 3 min Zentrifugation bei 7000 rpm sedimentiert, das erhaltene Pellet mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  gewaschen und die Zellen in der verbliebenen Flüssigkeit vollständig resuspendiert. Nach 15 min Inkubation bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  wurden die Proben auf Eis aufgetaut und mit  $100\text{ }\mu\text{l}$  reduzierendem 3 x Tricin Probenpuffer (vgl. 2.9.5) versetzt. Nach Vortexen der Proben wurden diese 10 min bei  $100\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert, wobei sie nach 5 min nochmals gevortext wurden. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (5 min bei 15000 rpm,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, wovon  $5\text{-}20\text{ }\mu\text{l}$  für eine SDS-PAGE (vgl. 2.9.5) eingesetzt wurden. Die Lagerung erfolgte bis zum weiteren Gebrauch bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 2.9.1.2. Ultraschallaufschluss von *E. coli*

Bei den verwendeten *E. coli* Expressionssystemen zur intrazellulären Proteinproduktion war es nötig die Bakterien zum Nachweis der Expression aufzuschließen. Nach 24 h Induktionsdauer wurden die *E. coli* Zellen bei 5000 rpm, 15 min und  $4\text{ }^\circ\text{C}$  geerntet. Das Zellpellet wurde in 3 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Puffer (50mM, pH 7,0) pro 1 g Feuchtgewicht resuspendiert und mittels Ultraschall (SONIPREP) aufgeschlossen. Die Beschallung erfolgte in 5 Intervallen von 15 s bei 20 microns. Zwischen den Beschallungsphasen wurde die Zellsuspension 30 s auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das Lysat 10 min bei  $23000 \times g$  und  $4\text{ }^\circ\text{C}$  (Evolution RC, SORVALL) zentrifugiert. Der zellfreie Rohextrakt wurde für weitere Proteinanreicherungen und SDS-PAGE (vgl. 2.9.5) verwendet.

#### 2.9.1.3. Kalter osmotischer Schock von *E. coli*

##### Säulenpuffer

|                                  |                                  |
|----------------------------------|----------------------------------|
| Tris-HCl pH 7,4                  | 20 mM                            |
| NaCl                             | 200 mM                           |
| $\text{Na}_2\text{EDTA}$ (0,5 M) | 2,0 ml/l (1 mM Endkonzentration) |

### Tris-Saccharose Puffer

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Tris-HCl pH 8,0 | 30 mM |
| Saccharose      | 20 %  |

### EDTA-Stammlösung

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,0 | 0,5 M |
|-----------------------------|-------|

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

### 5 mM MgSO<sub>4</sub>

|  |      |
|--|------|
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | 5 mM |
|--|------|

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Bei der Verwendung des pMAL™-p2X Vektors aus dem *Protein Fusion and Purification System* (NEB) und des pASK-IBA6 Vektors (IBA) zur Expression von Proteinen im Periplasma von *E. coli*, war es notwendig, die periplasmatischen Proteine zu präparieren, ohne dabei die Zellen komplett aufzuschließen. Dazu wurden die plasmidtragenden *E. coli* TB1 Zellen in Erlenmeyer Kolben mit 80 ml Vollmedium mit Glukose angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 0,3 mM IPTG (pMAL-p2X) bzw. 200 ng/ml Anhydrotetracyclin (pASK-IBA6) für 3 h. Zur Präparation der periplasmatischen Proteine wurden die Zellen 10 min bei 4000 x g pelletiert, in 10 ml Tris/Saccharose-Puffer (8 ml/0,1 g Zellnassgewicht) mit 20 µl 0,5 mM EDTA (1 mM Endkonzentration) resuspendiert und bei Raumtemperatur unter Schütteln für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz pelletiert (8000 x g, 4 °, 10 min), die komplette Flüssigkeit abgenommen und in 10 ml eiskaltem 5 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert. Der Ansatz wurde für 10 min in einem Eis-Wasserbad gerührt und anschließend pelletiert (8000 x g, 4 °C, 10 min). Der Überstand, der die periplasmatischen Proteinen enthielt, wurde abgenommen, das Pellet verworfen. Zur Kontrolle der Expression wurden 10 µl der periplasmatischen Fraktion (kalter osmotischer Schock Fluid) in einem SDS-Gel (vgl. 2.9.5) untersucht. Die Lagerung der Fraktion erfolgte bei -20 °C.

## 2.9.2. Reinigung von Inclusion bodies

### 2.9.2.1. *Inclusion bodies* Solubilisierung mittels Harnstoff

#### Waschpuffer

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Tris-HCl pH 7,5      | 50 mM  |
| Na <sub>2</sub> EDTA | 10 mM  |
| β-Mercaptoethanol    | 1 mM   |
| Harnstoff            | 2 M    |
| Triton X 100         | 2 %    |
| NaCl                 | 200 mM |

#### Tris-HCl pH 7,5

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl pH 7,5   | 20 mM  |
| β-Mercaptoethanol | 1 mM   |
| NaCl              | 200 mM |

#### Solubilisierungspuffer

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl pH 8,0   | 50 mM  |
| Harnstoff         | 8 M    |
| NaCl              | 500 mM |
| β-Mercaptoethanol | 1 mM   |

Die nichtlöslichen Proteine aus 200 ml Bakterienkultur wurden nach dem Zellaufschluss durch Ultraschall (vgl. 2.9.1.2) in 20 ml Waschpuffer aufgenommen, mit Ultraschall behandelt (Weigang *et al.* 2006) und anschließend zentrifugiert (15000 x g, 15 min, 4 °C). Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die gereinigten *inclusion bodies* wurden zweimal mit Tris-HCl pH 7,5 gewaschen, um Triton X 100 und EDTA zu entfernen. Das erhaltene Pellet wurde mit 20 ml Solubilisierungspuffer versetzt und bei Raumtemperatur durch Vortexen resuspendiert. Die Denaturierung der *inclusion bodies* erfolgte schließlich bei 4 °C durch Rühren über Nacht. Die restlichen nichtlöslichen Partikel wurden durch eine weitere Zentrifugation (40000 x g, 25 min, 8 °C) pelletiert. Die gelöst vorliegenden *inclusion bodies* wurden auf eine 1 ml Ni-Sepharosesäule (0,35 ml/min Laufgeschwindigkeit) aufgetragen, mit Solubilisierungspuffer gewaschen und mittels eines linearen Gradienten von bis zu 0,5 M Imidazol in Solubilisierungspuffer eluiert (0,7 ml/min).

### 2.9.2.2. *Inclusion bodies* Solubilisierung mittels Guanidin-Hydrochlorid

#### Guanidinhydrochlorid Waschpuffer

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Tris-HCl pH 8,0       | 50 mM |
| Guanidin-Hydrochlorid | 1 M   |
| Triton X-100          | 1 %   |

#### Guanidin-Hydrochlorid Solubilisierungspuffer

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Tris-HCl pH 8,0       | 50 mM |
| DTT                   | 20 mM |
| Guanidin-Hydrochlorid | 6 M   |

Nach Expression und Aufschluss der *E. coli* Zellen (400 ml Kultur) wurde in einem SDS-Gel überprüft, ob das exprimierte Protein in löslicher Form vorlag oder als unlösliche *inclusion bodies*. Im Fall des Vorliegens von *inclusion bodies* wurden diese mittels Guanidin-Hydrochlorid wieder solubilisiert. Das erhaltene Pellet nach Ultraschallaufschluss (vgl. 2.9.1.2) und Zentrifugation (15 min, 15000 x g, 4 °C) wurde entweder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert oder zur Solubilisierung eingesetzt (Liu *et al.*, 2006). Hierzu wurde das *inclusion body* haltige Pellet in Waschpuffer resuspendiert, drei mal für 15 s mit Ultraschall beschallt (im Eis/Wasserbad) und anschließend zentrifugiert (15 min, 15000 x g, 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde mit 40 ml Tris (50 mM, pH 8,0) gewaschen. Die gereinigten *inclusion bodies* wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Solubilisierung wurden die *inclusion bodies* in 40 ml Solubilisierungspuffer aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gerührt. Das unlösliche Material wurde bei 26000 x g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Die gelösten Proteine wurden nach Ethanol-fällung (siehe 2.9.4) auf ein SDS-Gel aufgetragen und auf Reinheit überprüft. Die solubilisierten *inclusion bodies* wurden auf eine 1 ml Ni-Sepharosesäule (0,35 ml/min Laufgeschwindigkeit) aufgetragen und mittels eines linearen Gradienten von bis zu 0,5 M Imidazol in Guanidin-Hydrochlorid-Solubilisierungspuffer von der Säule eluiert (0,7 ml/min).



### 2.9.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### 5 x Anodenpuffer

|                 |     |
|-----------------|-----|
| Tris-HCl pH 8,9 | 1 M |
|-----------------|-----|

#### 5 x Kathodenpuffer

|        |       |
|--------|-------|
| Tris   | 0,5 M |
| Tricin | 0,5 M |
| SDS    | 5 %   |

#### Tris-HCl/SDS

|                  |       |
|------------------|-------|
| Tris-HCl pH 8,45 | 3 M   |
| SDS              | 0,5 % |

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

#### 3 x SDS-Probenpuffer

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| 5 M Tris-HCl pH 6,8        | 20 %  |
| SDS                        | 1 %   |
| Glycerin                   | 24 %  |
| Coomassie-Blau 0,05 %      | 4 %   |
| ( $\beta$ -Mercaptoethanol | 10 %) |

$\beta$ -Mercaptoethanol wurde nur bei der Herstellung von reduzierendem Probenpuffer zugegeben.

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine entsprechend ihrer Molmasse getrennt (Shapiro *et al.*, 1967). Durch Inkubation der Proteine mit SDS und reduzierenden Substanzen wie  $\beta$ -2-Mercaptoethanol werden diese vollständig reduziert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine, dabei werden die Ladungen durch das stark negativ geladene SDS verdeckt, so dass sich alle Proteine in einem gleichen Ladungszustand befinden.

In dieser Arbeit wurden 12 %ige SDS-Gele mit einem Tris-Tricin-Puffersystem verwendet (Schägger & von Jagow, 1987). Zur Fokussierung der Proteine und der damit einhergehenden verbesserten Bandentrennung wurde ein diskontinuierliches System verwendet. Dazu wurde das 12 %ige Trenngel mit einem 3,5 %igen Sammelgel überschichtet. Es wurde die Gelelektrophoresapparatur Mini Protean III (BIO-RAD) verwendet.

Ein Trenngel setzte sich folgendermaßen zusammen:

Trenngel

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Rotiphorese Gel 30                | 5,88 ml |
| Tris-HCl/SDS                      | 5,00 ml |
| Glycerin (79 %)                   | 2,00 ml |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 2,12 ml |
| APS (10 %)                        | 80 µl   |
| TEMED                             | 25 µl   |

Die Mengenangaben beziehen sich auf zwei Gele.

Die Trenngellösung wurde bis zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach dem vollständigen Polymerisieren wurde das Isopropanol entfernt und das Gel mit H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> gespült. Danach wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und mit einem Taschenkamm versehen. Ein Sammelgel setzte sich folgendermaßen zusammen:

Sammelgel

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Rotiphorese Gel 30                | 1,62 ml |
| Tris-HCl/SDS                      | 3,10 ml |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 7,78 ml |
| APS (10 %)                        | 80 µl   |
| TEMED                             | 25 µl   |

Die Mengenangaben beziehen sich auf zwei Gele.

Vor dem Auftragen der zu untersuchenden Proben wurden diese mit Probenpuffer versetzt und bei 100 °C für 5 min denaturiert. Als Proteingrößenstandard diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (FERMENTAS) und der Precision Plus Protein Prestained Standard (BIO-RAD). Die Elektrophorese erfolgte für 20 min bei einer Spannung von 60 V und für den Rest der Zeit bei 115 V.

**2.9.6. Coomassie-Färbung**Entfärberlösung

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Methanol            | 30 %  |
| Essigsäure (99,5 %) | 7,5 % |

Färbelösung

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Coomassie Blue R 250 | 0,1 % |
| in Entfärbelösung    |       |

Die Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen erlaubt eine schnelle Detektion der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine bei einem klaren Hintergrund. Die Nachweisgrenze liegt bei der konventionellen Methode bei etwa 100 ng Protein, sie lässt sich aber durch unterschiedliche Modifikationen bis zu einer Grenze von 1 ng senken (Fazekas *et al.*, 1963; Wang *et al.*, 2007).

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Trenngel in Färbelösung inkubiert und 3 x 30 s in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt, um die Färbung zu beschleunigen. Anschließend wurde das Gel so lange in Entfärber inkubiert, bis der Hintergrund farblos war (Zehr *et al.*, 1989, Weber & Osborn, 1969). Dazu wurde der Entfärber mehrmals gewechselt. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt.

### **2.9.7. Silberfärbung**

#### Fixierer

|            |      |
|------------|------|
| Ethanol    | 30 % |
| Essigsäure | 10 % |

#### Sensibilisierer

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Kaliumtetrathionat | 3 g/l |
| Kaliumacetat       | 0,5 M |
| Ethanol            | 30 %  |

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

#### Silbernitrat

|              |       |
|--------------|-------|
| Silbernitrat | 2 g/l |
|--------------|-------|

#### Entwickler

|                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| Kaliumcarbonat                     | 30 g/l   |
| Formaldehyd (37 %)                 | 300 µl/l |
| 10 % Natriumthiosulfat-pentahydrat | 125 µl/l |

#### Reaktionsstopp

|            |        |
|------------|--------|
| Tris       | 40 g/l |
| Essigsäure | 2 %    |

Die Silberfärbung stellt eine hochsensitive Methode dar, um Proteine in SDS-Gelen zu detektieren (Sinha *et al.*, 2001). Die Sensitivität dieser Methode liegt bei 1-10 ng pro Proteinbande. Zunächst wurde das SDS-Gel für 1 h in Fixierlösung bei Raumtemperatur inkubiert, um dann über Nacht in neuem Fixierer inkubiert zu werden. Über einen Zeit-



raum von 45 min wurde das Gel sensibilisiert und anschließend sechs mal für 10 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  gewaschen. Die Inkubation mit Silbernitrat erfolgte für 1-2 h bei 4 °C. Anschließend wurde das Gel einmal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  abgespült und zweimal für 2 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  gewaschen. Die Entwicklung des Gels erfolgte durch Zugabe von Entwickler so lange, bis die Banden die gewünschte Intensität der Färbung erreicht hatten. Sobald sich der Entwickler verfärbte, wurde er durch frischen ersetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Reaktionsstopp für 30 min abgestoppt. Anschließend wurde das Gel bis zur Dokumentation in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  gelagert.

## 2.9.8. Western Analyse

### Transferpuffer

|          |        |
|----------|--------|
| Tris     | 25 mM  |
| Glycin   | 190 mM |
| Methanol | 20 %   |
| SDS      | 0,1 %  |

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

### 10 x TBS

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Tris-HCl pH 7,6 | 0,2M   |
| NaCl            | 1,37 M |

### Waschpuffer

|          |        |
|----------|--------|
| 10 x TBS | 10 M   |
| Tween 20 | 0,05 % |

### Blockingpuffer

|                  |                      |
|------------------|----------------------|
| Magermilchpulver | 3 % (in Waschpuffer) |
|------------------|----------------------|

Der Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran (ROCHE) erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach der Semidry-Blotting Methode. Hierfür wurden das Gel nach der Elektrophorese sowie die Whatman-Blotting-Papiere für 15 min in kaltem Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde zuerst kurz in Methanol benetzt, um dann ebenfalls für 15 min in Transferpuffer äquilibriert zu werden. Das Blotting erfolgte in einer Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) für 60 min bei einer konstanten Stromstärke von 55 mA pro Gel. Um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, wurden die freien reaktiven Bereiche auf der Membran durch 1 h Inkubation in Blockingpuffer abgesättigt. Anschließend wurde die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und in 10 ml primärer Antikörperlösung (Anti-Zygocin

1:70 verdünnt, alle anderen nach den Angaben des Herstellers) für 1 h bei Raumtemperatur im Hybridisierungssofen (Hybridizer HB 1000, UVP LABORATORY PRODUCTS) inkubiert. Der Blot wurde danach drei mal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Anschließend folgte eine Inkubation mit sekundärem Antikörper-Konjugat in 10 ml Blockingpuffer (Verdünnung nach Herstellerangaben) für 1 h bei Raumtemperatur. Die überschüssigen, sekundären Antikörper wurden durch drei Waschschrte mit Waschpuffer für je 5 min entfernt. Die Membran wurde leicht getrocknet, bevor das Chemilumineszenz-Substrat (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, THERMO SCIENTIFIC) zugegeben und die Membran mit Klarsichtfolie bedeckt wurde. Die am sekundären Antikörper gekoppelt vorliegende Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert die Überführung des im Substrat enthaltenen Luminols in dessen oxidierte Form. Das hierbei entstehende, angeregte Intermediärprodukt geht unter Emission eines Photons der Wellenlänge  $\lambda_{E=}$  425 nm in den Grundzustand über. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte im ChemiDoc XRS System (BIO-RAD), mit einer Belichtungsdauer von 10 min.

### **2.9.9. Herstellung von Zygocin Killertoxinkonzentrat**

Für die Gewinnung von Zygocin Konzentrat aus dem Killerstamm *Z. bailii* 412 wurde ein 10 l Ansatz B-Medium verwendet. Hierzu wurde eine erste Vorkultur in YEPD über Nacht bei 30 °C angezogen, mit  $H_2O_{deion}$  gewaschen und damit eine zweite Vorkultur (250 ml B-Medium) beimpft. Diese wurde bei 20 °C, 120 rpm für 48 h inkubiert. Mit der zweiten Vorkultur wurde die Hauptkultur (10 l B-Medium pH 4,0) angeimpft und für weitere fünf Tage bei 20 °C, 90 rpm inkubiert. Nach dem Ernten der Kultur wurde der Kulturüberstand durch Ultrafiltration (SARTORIUS Crossflow System, Hydrosart® Ultrafiltration Cassettes, 10 kDa Ausschlussgrenze) bei einem Druck von 1 bar und 4 °C konzentriert. Anschließend wurde das Konzentrat sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Zur Gewinnung von Toxinkonzentraten aus *P. pastoris* wurde der Kulturüberstand mittels Vivaspin 20 zentrifugal Ultrafiltrationseinheiten (SARTORIUS) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa konzentriert oder über AMICON Ultrafiltrationszellen mit einer Zellulosetriacetat Membran (Ausschlussgrenze 10 kDa) eingengt. Um ein Verstopfen der Filtrationseinheiten zu verhindern, wurde der Kulturüberstand zuvor sterilfiltriert. Standardisiert wurde der Kulturüberstand 50-fach konzentriert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Konzentrat bei -20 °C gelagert.

### 2.9.10. Agardiffusionstest (MBA-Test)

Der Nachweis der Killertoxinaktivität der zu untersuchenden Toxinvarianten gegen Hefezellen erfolgte im Agardiffusionstest. Hierzu wurden  $10^5$  Zellen des zu testenden Hefe-Stammes in 15 ml (für 94 mm Petrischalen und 5,1 ml für 60 mm Petrischalen) verflüssigtem, auf 50 °C abgekühltem Methylenblau-Agar eingebettet. Als zygotinhypermotiver Stamm diente für diesen Test *S. cerevisiae* 192.2d oder TM231. Nach Erkalten des Agars wurde mit einem Korkbohrer ein 10 mm großes Loch in den Agar gestanzt, in das 100 µl des zu testenden Toxinkonzentrates appliziert wurde. Die Platten wurden für vier bis fünf Tage bei 20 °C inkubiert. Die Killeraktivität der Toxine zeigt sich durch die Bildung einer klaren Hemmzone, innerhalb der kein Wachstum des sensitiven Hefestammes mehr möglich ist, sowie eine äußere blaue Abtötungszone, in der abgestorbene Zellen durch die Aufnahme von Methylenblau dunkelblau gefärbt werden.

### 2.9.11. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA Protein Assay Kit (PIERCE) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Modifikation der Lowry-Methode (Hartree, 1972), die auf dem kolorimetrischen Nachweis eines violetten Bicinchoninsäure/ $\text{Cu}^+$ -Farbkomplexes beruht. Der Test basiert auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Proteine und anschließender Inkubation mit Bicinchoninsäure (Redinbaugh & Turley, 1986; Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988). Der entstehende Chelatkomplex zeigt eine starke Absorptionsbande bei 562 nm, die linear mit der Proteinkonzentration (von 25-2000 µg/ml) ansteigt. Diese Methode ist zehnfach empfindlicher als die herkömmliche Lowry-Methode und gleichzeitig unempfindlich gegen höhere Salzkonzentrationen (Kessler und Fanestil, 1986).

Als Referenz wurde eine Eichgerade mit BSA im Konzentrationsbereich von 25 bis 2000 µg/ml verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden in drei verschiedenen Verdünnungen eingesetzt und genau wie die Standards behandelt. Zur Messung wurden 25 µl Probe pro Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 200 µl Arbeitslösung (BCA und Kupfersulfat in Verhältnis 50:1) gemischt. Die Inkubation der Ansätze (37 °C für 30 min) erfolgte wie die anschließende Detektion der Absorption bei  $\lambda=562$  nm im Microplate Reader Model 680 XR (BIORAD).

### 2.9.12. Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie werden fluoreszierende Moleküle, sogenannte Fluorochrome, beobachtet. Diese absorbieren Licht einer definierten Wellenlänge und emittieren Licht in einer anderen, längeren Wellenlänge. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden am Fluoreszenz-Mikroskop BZ-8000K (KEYENCE) durchgeführt und anschließend mit dem Programm BZ Analyzer (KEYENCE) bearbeitet.

In dieser Arbeit wurden das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) aus der Leuchtqualle *Aequorea victoria*, sowie das rot fluoreszierende mRFP aus *Discosoma spec.* als Reporterproteine verwendet. Dabei weist das GFP eine Anregung im blauen Licht bei einer Wellenlänge von  $\lambda_A = 488$  nm auf und emittiert grünes Licht ( $\lambda_E = 509$  nm), wohingegen mRFP bei  $\lambda_A = 558$  nm angeregt wird und rotes Licht emittiert ( $\lambda_E = 583$  nm). mRFP zeichnet sich sowohl durch eine geringe Tendenz zum Ausbleichen, als auch durch eine relativ große Stabilität gegenüber pH-Wert Änderungen aus (Baird *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2000).

### 2.9.13. Indirekte Immunfluoreszenz

#### Fixativ

2 g Paraformaldehyd wurden in 50 ml  $H_2O_{\text{deion}}$  unter Erhitzen gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 350  $\mu$ l 6 M NaOH. Der Ansatz wurde bis zum Aufklaren gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 0,68 g  $KH_2PO_4$  und 50  $\mu$ l 1 M  $MgCl_2$  zugegeben. Die Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

#### TEB

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| Tris-HCl pH 8,0          | 200 mM     |
| EDTA                     | 20 $\mu$ l |
| $\beta$ -Mercaptoethanol | 1 %        |

Lösung wurde frisch zubereitet.

#### SPB-Puffer

|            |       |
|------------|-------|
| Sorbit     | 1,2 M |
| $KH_2PO_4$ | 50 mM |
| $MgCl_2$   | 1 mM  |

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,3 eingestellt.

#### Sorbit

|        |       |
|--------|-------|
| Sorbit | 1,2 M |
|--------|-------|

Sorbit SDS

|        |       |
|--------|-------|
| Sorbit | 1,2 M |
| SDS    | 4 %   |

10 x PBS

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| NaCl                            | 80 g/l   |
| KCl                             | 2 g/l    |
| Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 26,8 g/l |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2,4g/l   |

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.

PBS-BSA Puffer

|     |                      |
|-----|----------------------|
| BSA | 5 mg/ml (in 1 x PBS) |
|-----|----------------------|

Der Puffer wurde jeweils frisch angesetzt.

Mounting Medium

|                  |                              |
|------------------|------------------------------|
| Glycerin         | 4,5 ml                       |
| p-Phenylendiamin | 0,5 ml (10 mg/ml in 1 x PBS) |
| DAPI             | 0,1 µl (1 mg/ml)             |

**Fixierung der Zellen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Roberts *et al.*, 1991)**

10 ml Medium wurden 1 %ig mit einer frischen Hefekultur angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1,2 ml Formaldehyd wurde die Kultur für 1 h bei 30 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 8000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 2 ml Fixativ aufgenommen und unter leichtem Schütteln bei 30 °C für 16 h inkubiert. Das erhaltene Pellet nach Zentrifugation wurde in 1 ml TEB aufgenommen und bei 30 °C für 10 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml SPM Puffer aufgenommen, 25 µl Glusulase sowie 15 µl Zymolyase 100 T (100 mg/ml in SPM) zugegeben und für 60 min bei 30 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Die sphäroplastierten und fixierten Zellen wurden bei 4000 x g für 5 min pelletiert und anschließend mit 1 ml 1,2 M Sorbit gewaschen. Das Pellet wurde vorsichtig in 500 µl 1,2 M Sorbit resuspendiert, anschließend 500 µl Sorbit-SDS zugegeben und für 2 min inkubiert. Die Zellen wurden für 1 min bei 4000 x g zentrifugiert, zweimal mit je 1 ml Sorbit gewaschen und schließlich in 1 ml 1,2 M Sorbitol resuspendiert.

**Färbung der fixierten Zellen mit markierten Antikörpern**

40 µl der fixierten Zellen wurden auf Polysin-Objekträger aufgebracht und 10 min inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und dreimal mit 20 µl PBS-BSA

gewaschen. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l PBS-BSA wurden die Ansätze für 30 min bei 20 °C in einer feuchten Kammer inkubiert, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Nach dem Abnehmen der Flüssigkeit wurden 20  $\mu$ l primäre Antikörperlösung (Verdünnung nach Angaben des Herstellers in PBC-BSA) aufgetropft und bei Raumtemperatur für 60 min in der Feuchtekammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sechsmal mit 20  $\mu$ l PBS-BSA gewaschen, danach 20  $\mu$ l sekundäre FITC markierte Antikörperlösung (1:1000 in PBS-BSA) zugegeben und für 60 min bei Raumtemperatur in der Feuchtekammer inkubiert. Nach neunmaligem Waschen mit PBS-BSA wurden 10  $\mu$ l Mounting Medium aufgetropft, ein Deckglas aufgelegt und die Proben mikroskopiert.

## **2.10. Proteinreinigung**

Alle Proteinreinigungsschritte wurden mit Hilfe des FPLC-Systems ÄKTApurifier™ (GE HEALTHCARE) durchgeführt. Die Fraktionen wurden mit dem Fraktionssammler Frac-950 (GE HEALTHCARE) aufgefangen. Die Detektion der Proteine erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280$  nm. Für die Detektion der Fusionsproteine mit mRFP-Reporterprotein wurde zusätzlich die Absorption bei 558 nm verfolgt.

### **2.10.1. Umpufferung**

Die Umpufferung wurde eingesetzt, um Toxinkonzentrate (eingeeengte, zellfreie Kulturüberstände) schnell und effizient in den für die Ionenaustauschchromatographie benötigten Puffer zu überführen oder um das Imidazol nach der Affinitätschromatographie aus der Probe zu entfernen. Die Umpufferung wurde mittels einer XK26/20 Phenyl Sepharose G25 Säule bei einer Flussrate von 9 ml/min durchgeführt.

### **2.10.2. Kationenaustauschchromatographie**

Zur Reinigung von Zygocin aus den konzentrierten, umgepufferten Kulturüberständen wurde die Lösung (maximal 40 ml) auf eine 5 ml SP-Sepharose Säule (HiTrap SP HP 5 ml, GE HEALTHCARE) aufgetragen, welche zuvor mit drei Säulenvolumen Citratpuffer (15 mM, pH 4,0) äquilibriert wurde. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule ein weiteres mal mit Citratpuffer gespült, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die Elution des Zygocins erfolgte mit einem linearen Gradienten von 15 mM Citratpuffer und 15 mM Citrat, 1 M NaCl, pH 4,0. Die Flussrate betrug bei der Elution und den Waschsritten 5 ml/min, beim Probenauftrag 2,5 ml/min, die Fraktionsgröße 1 ml.

### 2.10.3. Anionenaustauschchromatographie

Um mRPF-Zygocin aus dem umgepufferten Kulturüberstand zu reinigen, wurde der Überstand auf eine 5 ml SP-Sepharose Säule (HiTrap Q HP 5 ml, GE HEALTHCARE) aufgetragen, die zuvor mit dem dreifachen Säulenvolumen Bindepuffer (15 mM Citrat pH 4,95) äquilibriert wurde. Nach dem Auftragen der Probe (15 ml umgepuffertes Fermenterkulturüberstand) wurden mit dem dreifachen Säulenvolumen Citrat-Puffer die ungebundenen Proteine von der Säule gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 15 mM Citrat pH 4,95 und 15 mM Citrat 0,5 M NaCl, pH 5,2. Die Flussrate betrug beim Auftragen der Probe 2,5 ml/min, bei der Elution 5 ml/min, die Fraktionsgröße wurde mit 1 ml gewählt.

### 2.10.4. Affinitätschromatographie

Zur Anreicherung der (His)<sub>6</sub>-getaggtten Zygocin-Varianten aus der *E. coli* Expression wurde eine 1 ml Ni-Sepharose Säule verwendet (HisTrap Crude fast flow, GE HEALTHCARE). Diese Säule ist mit Agarose-Perlen gepackt, die eine immobilisierte Chelatgruppe tragen, an welche Nickel (Ni<sup>2+</sup>) gebunden vorliegt. Einige Aminosäuren (z.B. Histidinreste) bilden Komplexe mit vielen Metallionen (z.B. Nickel). Somit werden Proteine, die komplex-bildende Aminosäurereste an der Oberfläche exponiert tragen, an einer Ni-Sepharose-matrix selektiv zurückgehalten. Durch eine Modifikation des Proteins mit einem zusätzlichen (His)<sub>6</sub>-Tag wird die Affinität für Ni<sup>2+</sup> erhöht. Im Allgemeinen binden diese Fusionsproteine im Vergleich zu anderen Proteinen (z.B. aus *E. coli* Extrakt) am stärksten an die Matrix, wodurch eine Reinigung dieser Fusionsproteine in einem Schritt ermöglicht wird.

Zur Reinigung von (His)<sub>6</sub>-getaggtten Proteinen wurde eine 1 ml Ni-Sepharose Säule verwendet, welche zuerst mit Bindepuffer äquilibriert wurde. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit Bindepuffer gespült. Zur Elution der Fusionsproteine wurde ein linearer Gradient (Bindepuffer mit 0,5 M Imidazol) angelegt. Bei der gesamten Reinigung betrug die Flussrate 1 ml/min, die Fraktionsgröße 1 ml.

## 2.11. Kryo-Elektronenmikroskopie

Die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) ist eine Methode zur 3D-Strukturbestimmung von Makromolekülen. Ein Vorteil der Kryo-EM gegenüber der Röntgenkristallographie ist der, dass die erforderliche Probenmenge um zwei bis drei Größenordnungen geringer ist. Somit ist sie besonders für Proteine, die in geringer Konzentration in den Zellen vorliegen

und sich schwierig reinigen lassen, geeignet. Der größte Vorteil der Methode liegt darin, dass die Kristallisation der Proteine entfällt und sie in Lösung untersucht werden können. Die bislang erreichte Auflösung kryo-elektronenmikroskopisch ermittelter 3D-Strukturen liegt im Bereich von ca. 6-30 Å (Zhou et al., 2001, Stark, 2002). Bei dieser Methode werden anhand von elektronenmikroskopischen Projektionsbildern eines Protein-Komplexes, dessen dreidimensionale Struktur mit Hilfe computergestützter Bildverarbeitungsmethoden rekonstruiert. Dabei werden die bei den zweidimensionalen Projektionsbildern auftretenden Helligkeitsunterschiede der Bildpunkte im Computer zu einer dreidimensionalen Struktur umgerechnet. Die Proben werden durch Eiseinbettung präpariert. Dabei werden die zu untersuchenden Moleküle durch extrem schnelles Abkühlen in flüssigem Ethan in einer etwa 100 nm dünnen, vitrifizierten Eisschicht eingebettet. Vitrifiziertes Eis ist eine amorphe, glasartige Form des Wassers mit fast identischer Dichte wie flüssiges Wasser. Die Kryo-Präparation erlaubt es, schnell Markomoleküle in einem nativen Zustand ohne aufwändige Kristallisation einzubetten und zu visualisieren, um so eine große Anzahl von Molekülen elektronenmikroskopisch untersuchen zu können. Eine Schwermetallkontrastierung ist für die Abbildung der Makromoleküle nicht erforderlich.

## **2.12. Fermentation *P. pastoris***

Die Fermentation von *P. pastoris* fand in einem 2 l Bioreaktor (Biostat, BRAUN) in Anlehnung des Manulas „*P. pastoris* Expression Kit Version F“ (INVITROGEN) statt. Die zu fermentierenden Klone wurden zuerst durch eine Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des gewünschten Gens und dann auf ihren Methanol Phänotyp untersucht. Für die Fermentationen wurden nur *P. pastoris* GS115 Klone vom Phänotyp Mut<sup>+</sup> (methanol utilization plus) verwendet, Mut<sup>s</sup>-Phänotypen wurden durch die gewählte Restriktionsspaltung des Plasmids vor der Integration nicht erhalten.

Die Fermentation von *P. pastoris* umfasst drei Phasen: Glycerol-Batch-Phase, Glycerol-Fed-Batch-Phase und Methanol-Fed-Batch-Phase. Die erste Phase der Fermentation stellt die Glycerol-Batch-Phase dar. Diese dient der Biomassebildung auf Basis von Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle. In der zweiten Phase (Glycerol-Fed-Batch) wird unter limitierenden Kohlenstoff-Bedingungen weiter Biomasse produziert, was sich durch die wahrscheinliche Derepression des *AOX1*-Promotors (Stratton et al., 1998) förderlich auf die folgende Induktionsphase auswirkt. In der Induktionsphase (Methanol-Fed-Batch) wird die Induktion der Expression durch Zugabe von Methanol als einziger Kohlenstoffquelle gestartet.



Während der gesamten Fermentation wurden in regelmäßigen Abständen Proben genommen und damit die  $OD_{600}$ , das Nassgewicht und die Aktivität des sezernierten Proteins bestimmt.

### 2.12.1. Glycerol-Batch-Phase

#### Fermentationsmedium

|   |        |
|---|--------|
| Glycerin  | 38,9 g |
| CaSO <sub>4</sub>                               | 0,56 g |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                  | 9,19 g |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O           | 7,23 g |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 5,6 g  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>               | 519 ml |

Das Medium wurde im Fermenter autoklaviert.

Nach dem Autoklavieren wurde hinzugefügt:

|                     |         |
|---------------------|---------|
| PTM1                | 2,49 ml |
| Na-Hexametaphosphat | 15,57 g |

Na-Hexametaphosphat wurde in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> gelöst und durch Filtration sterilisiert.

#### Pichia Trace Metal 1 (PTM1) (Tolner *et al.*, 2006)

|   |  |
|---|--|
| CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O                               | 5,99 g/l                                 |
| 10 x NaI (0,4 g in 40 ml H <sub>2</sub> O)                          | 8 ml/l (0,08 g)                          |
| MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O                                | 3 g/l                                    |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O                | 0,2 g/l                                  |
| CoCl <sub>2</sub>   | 0,5 g/l                                  |
| ZnCl <sub>2</sub> x 5H <sub>2</sub> O                               | 20,04 g/l                                |
| FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                               | 65,05 g/l                                |
| 100x H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (1 g in 40 ml H <sub>2</sub> O) | 800 µl/l (0,02 g)                        |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96,2 %)                             | 19,2 ml/l                                |
| D-Biotin  | 0,4 g/l (nach dem Autoklavieren zugeben) |

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Die Vorkultur für die Fermentation wurde in 100 ml BMG-Medium angeimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 4-6 kultiviert. Nach Autoklavieren des Fermenters mit Medium wurde der pH mit 25 % NH<sub>3</sub> auf einen Wert von 5,0 eingestellt. Die Grenze für den gelösten Sauerstoff wurde auf DO= 25 %, die Temperatur auf 29 °C und die Belüftungsrate auf 2,5 ml/min festgelegt. Der Fermenter wurde mit der Vorkultur angeimpft und bis zum vollständigen Verbrauch des Glycerins kultiviert (Dauer 18-24 h).

Während der Fermentation sinkt die Gelöstsauerstoffkonzentration mit zunehmender Biomasse ab, um dann plötzlich anzusteigen. Dieser Anstieg („DO spike“) signalisiert den vollständigen Verbrauch des vorgelegten Glycerins und damit das Ende der ersten Fermentationsphase.

### **2.12.2. Glycerol-Fed-Batch-Phase**

#### 50 % Glycerol

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Glycerol                          | 88,2 g  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 70 ml   |
| PTM1                              | 1,68 ml |

Die Spurenelement-Lösung (PTM1) wurde nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

Zur weiteren Steigerung der Biomasse wurde PTM1-suppliemierter Glycerin-Lösung mit einer Fütterungsrate von 10 ml/h/Liter Anfangsfermentervolumen zugegeben. Bei Bedarf wurde reiner Sauerstoff zugefüttert, um die Gelöstsauerstoffkonzentration bei mindestens 25 % zu halten.

### **2.12.3. Methanol-Fed-Batch-Phase**

#### Methanol Fütterung

|          |        |
|----------|--------|
| Methanol | 750 ml |
| PTM1     | 9 ml   |

Nach vollständigem Verbrauch des Glycerins, was durch den starken Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration zu erkennen war, wurde mit der Fütterung von Methanol und somit der Induktion der Expression begonnen. Die Temperatur wurde auf 20 °C und der pH-Wert auf 4,0 (bei mRFP-Zygocin auf 5,3) reduziert. Hierzu wurde die Kultur für die ersten 4-5 h an Methanol adaptiert und nur mit einer Fütterungsrate von 3,6 ml/h/Liter Anfangsfermentervolumen gefüttert. Bei Bedarf wurde reiner Sauerstoff zugemischt. Nach einer weiteren Stunde war die Kultur an das Methanol adaptiert, was am limitierenden Wachstum zu beobachten war (nach manueller Unterbrechen der Fütterung stieg innerhalb von 30-60 sec die Gelöstsauerstoffkonzentration im Fermenter stark an). Die Fütterungsrate wurde auf 7,2 ml/h/Liter Anfangsfermentervolumen gesteigert. Nach weiteren 3-4 h wurde die Fütterungsrate auf 10,9 ml/h/Liter Anfangsfermentervolumen erhöht und mit dieser Fütterungsrate bis zum Ende der Fermentation kultiviert.

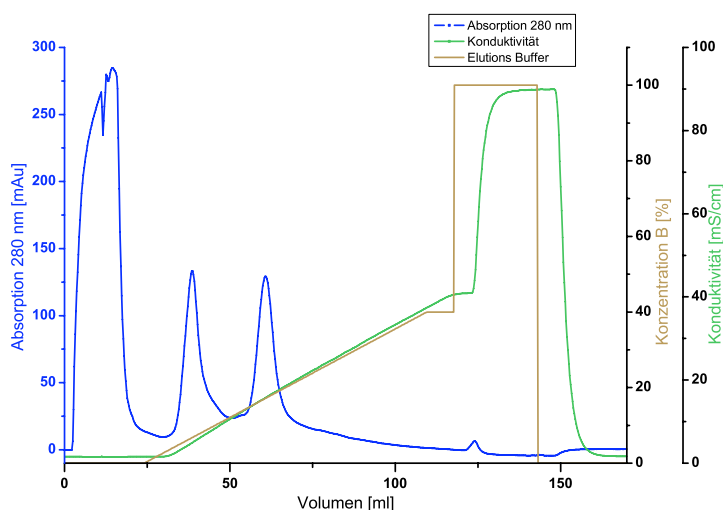
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Native Reinigung von Zygocin

Bislang existiert von der Wirkungsweise des Proteintoxins Zygocin nur ein Arbeitsmodell, welches im Wesentlichen aufgrund von Strukturvorhersagen, die von der Aminosäuresequenz abgeleitet wurden (Weiler & Schmitt, 2003), von Beobachtungen, dass sensitive Hefezellen schnell abgetötet werden und die Plasmamembran permeabilisiert wird, aufgestellt wurde. Zur Verifizierung dieses Modells ist die Aufklärung der Toxinstruktur durch Kristallisation notwendig.

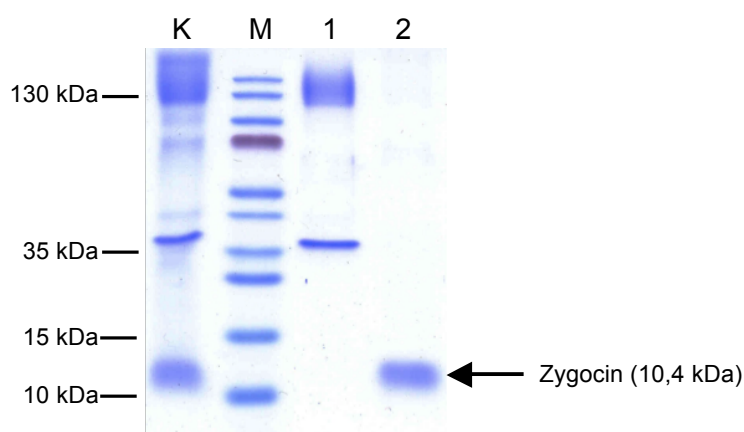
Um die Struktur von Zygocin aufklären zu können, entweder durch Kristallisation oder Kryo-Elektronen-Mikroskopie (Kryo-EM), war es notwendig, das Toxin in ausreichender Menge bis zur Homogenität zu reinigen, um die störenden Einflüsse von Verunreinigungen durch Medienbestandteile sowie durch sonstige von *Z. bailii* sezernierte Proteine zu vermeiden. Hierzu wurde der Wildtypkillerstamm *Z. bailii* 412 im 30 l Maßstab in 10 l Schottflaschen mit B-Medium bei 20 °C (vgl. 2.9.9 S. 66) für fünf Tage kultiviert. Die Kultur erreichte dabei eine  $OD_{600}$  von 15. Der zellfreie Kulturüberstand, der das sezernierte Toxin enthielt, wurde über Ultrafiltration (vgl. 2.9.9 S. 66) um das 100-fache eingeeengt. Das erhaltene Toxinkonzentrat wurde anschließend dreimal mit je 2 l 15 mM Citratpuffer pH 4,0 versetzt und jeweils wieder auf das ursprüngliche Volumen eingeeengt. Durch diesen Schritt wurden das Konzentrat umgepuffert und die im Medium enthaltenen Salze entfernt, wodurch der Schritt der Dialyse entfiel. Anhand der vorliegenden Toxinsequenz (Rehfeld, 1999, Weiler *et al.*, 2002) wurde der isoelektrische Punkt des Proteins mit pH 5,85 errechnet (DNASTAR Lasergene 7, Protean). Für die native Reinigung des Proteins wurde die Kationenaustauschchromatographie (vgl. 2.10.2 S. 70) mit einem 15 mM Citrat-Puffersystem bei pH 4,0 gewählt. Zygocin trägt bei pH 4,0 eine Nettoladung von 3,6. Bei diesem pH-Wert besitzt Zygocin die höchste Toxizität (Weiler & Schmitt, 2003), wodurch kein Verlust der Toxizität durch einen für das Protein ungünstigen pH-Wert zu befürchten war. Maximal wurden 50 ml des umgepufferten Toxinkonzentrates bei einem Chromatographie-Lauf auf eine 5 ml SP-Sepharose

HP Säule aufgetragen. Ein exemplarisches Elutionsdiagramm eines solchen Laufes, bei dem 14 ml natives Toxin aufgetragen wurden, ist in Abbildung 4 dargestellt.



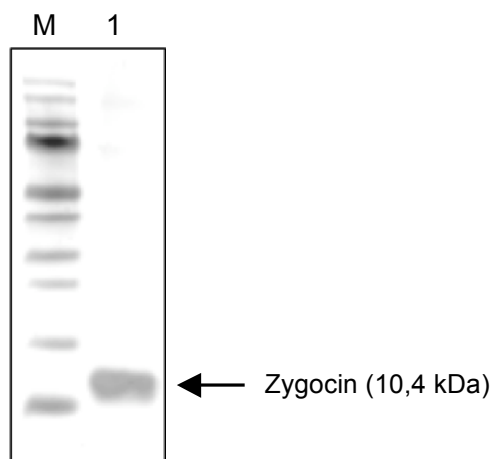
**Abbildung 4: Elutionsdiagramm der Kationenaustauschchromatographie von Zygocin.** Verwendet wurde eine HiTrap HP S 5 ml Säule mit 15 mM Citrat pH 4,0 als Laufpuffer. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten aus Laufpuffer und Elutionspuffer (15 mM Citrat, 1 M NaCl, pH 4,0). Aufgetragen wurden 14 ml Toxinkonzentrat mit einer Flussrate von 2,5 ml/min. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 5 ml/min, die Fraktionsgröße betrug 1 ml.

Nach dem Auftrag des Toxinkonzentrates und dem Waschen zum Entfernen ungebundener Proteine erfolgte die Elution der gebundenen Proteine durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0 bis 400 mM NaCl im Citratpuffer bei pH 4,0. Während der Elution der Proteine von der Säule konnten zwei Proteinpeaks anhand der Absorption bei 280 nm detektiert werden. Der erste Peak wurde bei 6,7 % Elutionspuffer und 4,8 mS/cm, der zweite bei 17,2 % Elutionspuffer und 15,7 mS/cm erhalten. Die einzelnen Fraktionen der jeweiligen Peaks wurden gepoolt, in einem 12 %igen Tris-Tricin Gel aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung auf das Vorhandensein und die Reinheit des Toxins überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: SDS-PAGE nach Reinigung des nativen Zygocins über Kationenaustauschchromatographie.** Es wurden jeweils 15  $\mu$ l Toxinkonzentrat (K), Elutionspeak 1 (1) und Elutionspeak 2 (2) in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. Als Marker (M) diente der PageRuler™. In Fraktion 2 ist Zygocin bei 10,4 kDa zu erkennen.

In Abbildung 5 ist in den gepoolten Fraktionen des zweiten Elutionspeaks eine einzelne Bande bei ca. 11 kDa zu erkennen, die das Zygocin darstellt. Die gepoolten Fraktionen des ersten Elutionspeaks zeigten zwei Banden, eine hochmolekulare Proteinbande bei ca. 130 kDa und eine weitere bei etwa 37 kDa, jedoch keine bei ca. 11 kDa. Somit konnte Zygocin durch Kationenaustauschchromatographie in einem Schritt gereinigt werden. Um die Reinheit des Toxins genauer zu bestimmen, wurde die Probe nochmals in einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Diese Färbemethode zeichnet sich durch eine wesentlich höhere Empfindlichkeit als die Coomassie Färbung aus. Bereits Proteinmengen von ca. 1-10 ng Protein pro Bande lassen sich detektieren (Sinha *et al.*, 2001), womit auch kleinste Verunreinigungen des gereinigten Toxins detektiert werden könnten. Abbildung 6 zeigt das Gel nach Silberfärbung, es wurden lediglich 5  $\mu$ g Protein der gepoolten Fraktionen des zweiten Elutionspeaks aufgetragen. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, konnte Zygocin über diese Einzschrittreinigung aus dem konzentrierten Kulturüberstand bis zur Homogenität gereinigt werden.



**Abbildung 6: SDS-PAGE nach Silberfärbung zur Überprüfung der Reinheit von Zygocin nach Kationenaustauschchromatographie.** Es wurden 5 µg gereinigtes Zygocin (1) in einem 12 %igen Tris-Tricin Gel aufgetrennt und anschließend Silber gefärbt (M: PageRuler™).

Die beiden gepoolten Fraktionen der jeweiligen Proteinpeaks wurden noch Aktivitätstest unterzogen. Dabei zeigte lediglich die gepoolte Fraktion des zweiten Peaks im MBA-Test eine Killeraktivität gegen die sensitive Hefe *S. cerevisiae* 192.2d. Die Fraktion des ersten Peaks, die bereits im SDS-Gel keine Zygocin-Bande aufwies, zeigte auch im MBA-Test keine Aktivität. Somit konnte das Ergebnis der SDS-PAGE bestätigt werden, dass der zweite Proteinpeak bei der Kationenaustauschchromatographie Zygocin darstellt. Durch die Reinigung war kein Verlust der Aktivität zu verzeichnen. Insgesamt konnten aus der 30 Liter Kultur 12,1 mg Zygocin gereinigt werden. Damit sezerniert der Wildypkillerstamm *Z. bailii* 412 etwa 0,4 mg/l Zygocin.

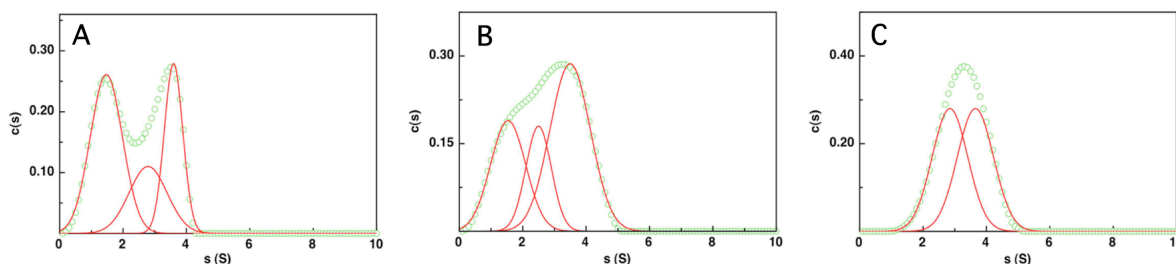
### **3.2. Analytische Ultrazentrifugation, Kristallisation und Kryo-Elektronenmikroskopie von Zygocin**

Die nachfolgenden Ergebnisse wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Gilbert (Universität Oxford) erzielt. Die von der Gruppe durchgeführte analytische Ultrazentrifugation (Sedimentationsgleichgewichtsanalyse) zur Detektion von Zygocin-Oligomeren wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen gereinigten Zygocins und bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass das gereinigte Zygocin in Lösung als Monomer vorliegt. Die Masse von Zygocin konnte mit 10,5 kDa bestimmt werden. Diese

Größe stimmt mit der über MALDI-TOF bestimmten Größe von 10,47 kDa (Weiler *et al.* 2002) überein. Aufgrund der ionophoren Toxinwirkung kann somit angenommen werden, dass Zygocin eine Membranumgebung zur Oligomerisierung und zur Ausbildung einer Pore benötigt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden neutrale Detergens-Mizellen ( $C_8E_6$ ) mit Zygocin rekonstituiert und einer analytischen Ultrazentrifugation (Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse) unterzogen (Abbildung 7, Tabelle 15). Dabei wurden unterschiedliche molare Verhältnisse von Zygocin und den Mizellen eingesetzt (1:7; 1:16 und 1:33). Bei einer niedrigen Detergens-Konzentration konnten drei unterschiedliche Zygocin:Mizellen Spezies beobachtet werden. Die am langsamsten sedimentierende Form hatte einen Sedimentationskoeffizienten von 1,47 S. Ein ideales Monomer von 10,4 kDa sedimentiert mit einer maximalen Rate von 1,71 S (vgl. Tabelle 15; Sedimentationskoeffizienten von Zygocin). Dies zeigt, dass die beobachtete Spezies bei etwa 1,47 S und einer Zygocin zu Mizellen Ratio von 1:6 und 1:16 wahrscheinlich die monomere, in die Mizellen inkorporierte Form oder die frei in Lösung vorliegende Form von Zygocin darstellt. Im Gegensatz zu diesem Monomer-Peak konnte die schneller sedimentierende Spezies bei allen Protein:Detergens-Verhältnissen beobachtet werden. Diese Spezies bei etwa 2,55 S zeigt ein in die Detergens-Mizelle integriertes Zygocin-Dimer. Der ideale Sedimentationskoeffizient für ein 20,08 kDa großes Zygocin-Dimer liegt bei 2,72 S. Der dritte und höchste beobachtete Sedimentationspeak bei etwa 3,72 S könnte entweder ein Zygocin-Trimer oder ein Tetramer aus zwei Zygocin-Dimeren darstellen. Der ideale Sedimentationskoeffizient für ein Trimer liegt bei 3,52, der für ein Tetramer bei 4,32 S. Dieser dritte bestimmte Sedimentationskoeffizient war bei allen drei untersuchten Detergens-Konzentrationen höher als der eines idealen Trimers mit 31,2 kDa. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei diesem Peak um ein Zygocin-Tetramer handelt, bei dem die Oberflächenreibung zu dieser signifikant reduzierten Sedimentationsrate führte. Diese Ergebnisse zeigen, dass Zygocin in Gegenwart hydrophober Detergens-Mizellen Oligomere ausbildet.

**Tabelle 15: Sedimentationskoeffizienten von Zygocin-Oligomeren.** Ideale und beobachtete Sedimentationskoeffizienten von Zygocin-Oligomeren. Die idealen Koeffizienten wurden mit SEDFIT berechnet. Das partielle spezifische Volumen für Zygocin wurde mit SEDNTERP anhand der Aminosäuresequenz bei 20 °C bestimmt. (verändert nach Gilbert und Sonnen).

| Oligomer zu Mizelle | Sedimentationskoeffizient (S) |      |      |
|---------------------|-------------------------------|------|------|
| ideales Monomer     | 1,71                          |      |      |
| ideales Dimer       | 2,72                          |      |      |
| ideales Trimer      | 3,52                          |      |      |
| ideales Tetramer    | 4,32                          |      |      |
| 1:7                 | 1,47                          | 2,69 | 3,65 |
| 1:16                | 1,53                          | 2,50 | 3,66 |
| 1:33                | 2,52                          | 3,82 |      |



**Abbildung 7: Oligomerisierung von Zygocin in CE-Mizellen.** Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeiten von Zygocin rekonstituierten CE-Mizellen durch analytische Ultrazentrifugation. Die Detergenz Konzentration steigt von A nach C an. Die Konzentrationen wurden mit 1:7, 1:16 und 1:33 mol Zygocin Oligomer: mol Mizellen gewählt. Die Detergens Konzentration betrug in (A) 8 mM, in (B) 18,2 mM und in (C): 37,5 mM. Die Zygocin-Konzentration betrug bei allen Scans 36,3  $\mu$ M. Für ein potentielles Zygocin-Tetramer wurde eine Menge von 65 Molekülen pro Mizelle angenommen (verändert nach Gilbert).

Die Kristallisation von Zygocin wurde unter 384 verschiedenen Kristallisationsbedingungen durchgeführt, bei der jeweils eine gleiche Menge Zygocin mit Präzipitations-Kristallisationpuffer gemischt wurde. Es ließ sich unter keinen der getesteten Bedingungen die Bildung von Zygocin-Kristallen beobachten. Da eventuell die Konzentration des Proteins in Lösung zur Kristallisation zu gering war, wurde versucht, die Proteinlösung weiter zu konzentrieren. Dies führte dazu, dass Zygocin ein unlösliches Präzipitat bildete und ausfiel. Daher wurde versucht, die 3D-Struktur von Zygocin durch Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM, vgl. 2.11 S. 71) zu ermitteln. Dabei wurden unterschiedliche Liposomen aus verschiedenen Lipiden hergestellt und mit Zygocin inkubiert. Die Liposomen (100 nm) wurden durch Einfrieren und Auftauen mit anschließender Extrusion



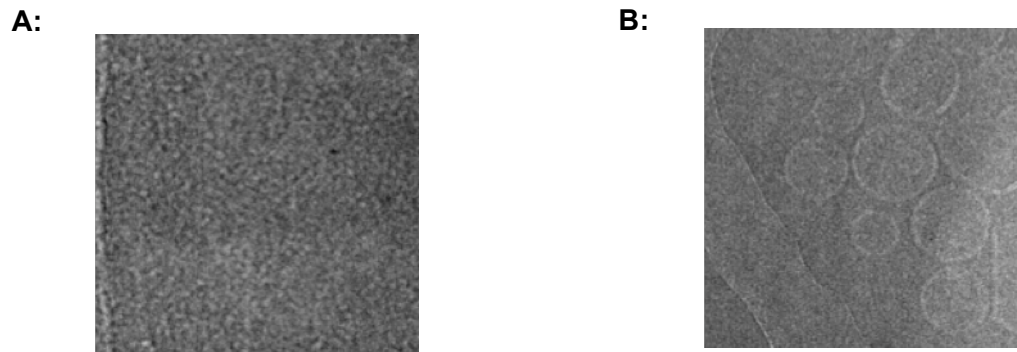
durch eine Membran mit 100 nm Porengröße hergestellt. Die Lipide wurden aus Ei-Phosphatidylcholin (PC), Gehirn-Phosphatidylserin (PS) und Ei-Phosphatidsäure (PA) hergestellt und in unterschiedlichen molaren Verhältnissen zu Liposomen geformt. Tabelle 16 zeigt die unterschiedlichen Liposomen und die Inkubationsbedingungen. Die Liposomen besaßen jeweils eine Lipidkonzentration von 6 mM. Nach Inkubation der Liposomen mit Zygocin für 5 min bei 36 °C wurden je 3 µl dieser Mischung auf ein Kohlenstoff beschichtetes EM-Gitter gegeben und in flüssigem Ethan schockgefroren, wodurch es zur Vitrifizierung des im Präparat enthaltenen Wassers kam. Die Lagerung der Präparate bis zur Analyse erfolgte in flüssigem Stickstoff.

**Tabelle 16: Hergestellte Liposomen und ihre Ladung.** Die Verhältnisse sind in mol:mol angegeben (verändert nach Gilbert). (PC: Ei-Phosphatidylcholin; PS: Gehirn-Phosphatidylserin ; PA: Ei-Phosphatidsäure)

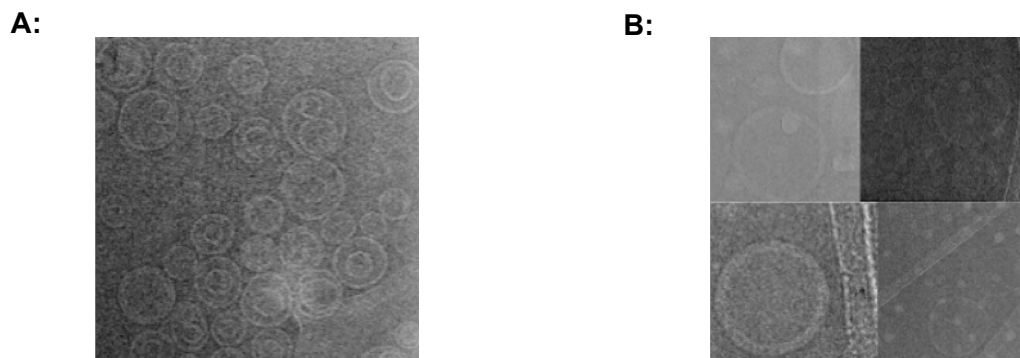
|                 | PC              | PC:PS           | PC:PA           |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lipid:Lipid     | -               | 6:4             | 6:4             |
| Ladung bei pH 4 | neutral         | neutral**       | negativ         |
| Durchmesser nm  | 100             | 100             | 100             |
| Protein:Lipid   | 1:1000          | 1:1000          | 1:1000          |
| Inkubation      | 5 min bei 36 °C | 5 min bei 36 °C | 5 min bei 36 °C |

\*\* Bei pH 7 ist PS negativ geladen; bei pH 4 in Citrat Puffer nahezu neutral.

Abbildung 8 zeigt die Aufnahmen der negativ geladenen PC/PA-Liposomen. Es konnten keine Liposomen detektiert werden, welche zuvor mit Zygocin behandelt wurden. Die Negativkontrolle zeigte, dass die Präparation der Liposomen erfolgreich war und sich genügend Liposomen im Ansatz befanden. Abbildung 9 A und B zeigen die elektronenmikroskopischen Bilder der neutral geladenen Liposomen. Es konnten zahlreiche PC-Liposomen detektiert werden (Abbildung 9 A), obwohl die gleiche Inkubationsdauer mit Zygocin eingehalten wurde wie zuvor. Ebenfalls konnten einige PC/PS-Liposomen detektiert werden (Abbildung 9 B), allerdings nicht in gleicher Anzahl wie die PC-Liposomen.



**Abbildung 8: Kryo-EM von negativ geladenen PC/PA Liposomen in Gegenwart und Abwesenheit von Zygodin. A:** 5 min bei 37 °C mit Zygodin inkubiert (molares Verhältnis Zygodin:Lipid 1:1000); **B:** Negativkontrolle, ohne Zygodin inkubiert.



**Abbildung 9: Kryo-EM von neutral geladenen PC und PC/PS Liposomen in Gegenwart von Zygodin.** Jeweils für 5 min bei 36 °C mit Zygodin inkubiert. Molares Protein zu Lipid Verhältnis: 1:1000. **A: PC-Liposomen** mit Zygodin inkubiert; **B: PC/PS-Liposomen** mit Zygodin inkubiert.

### 3.3. Konstruktion von Plasmiden zur Expression von Wildtyp-Zygodin und Zygodin-Varianten in *Z. bailii*

Für die heterologe Expression von Zygodin wurden zwei Nichtkillerstämme (siehe Tabelle 2, S. 19) von *Z. bailii* gewählt, die gegen von außen appliziertem Toxin immun sind. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei der Expression von Zygodin in *S. cerevisiae* unter Verwendung des zygodineigenen Sekretions-signals ein schwacher Killerphänotyp erhalten werden konnte. Dieser war auf eine sehr geringe Expressions- und Sekretionsrate zurückzuführen. Durch Western Blots mit Zygodin-spezifischen Antikörpern konnte eine geringe Toxinmenge nachgewiesen werden. Dies führte zu dem Schluss, dass das Toxin in korrekter Faltung, aber in geringer Menge sezerniert wurde (Weiler, 2002) und nicht, dass

der schwache Killerphänotyp auf fehlgefaltetes, Toxin zurückzuführen ist. Auch war eine Selbstabtötung der Zellen nach Zygocin Expression zu beobachten (Bies, 1998).

Für die homologe Expression in *Z. bailii* wurde der episomale Vektor pZ3 (siehe Tabelle 3) verwendet. Bei diesem stehen die klonierten Gene unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors der Triosephosphat-Isomerase (TPI). Als Selektionsmarker dient eine Kanamycin-Resistenz-Kassette, welche den Hefen ein Wachstum auf Geneticin-haltigem Medium ermöglicht. Für die Expression rekombinanter Proteine spielt *Z. bailii* zwar bislang nur eine untergeordnete Rolle, allerdings konnten Branduardi *et al.* (2004) mit dem von ihnen entwickelten Plasmid pZ3 erfolgreich Fremdproteine exprimieren und mit dem Zygocin-Sekretionssignal zur Sekretion bringen (Branduardi *et al.*, 2004). Als Basis für dieses Plasmid diente der *S. cerevisiae* Expressionsvektor pYX022, bei welchem der *HIS3*-Marker gegen eine Kanamycin-Resistenz-Kassette ausgetauscht sowie eine ARS-Centromer-Region eingefügt wurde.

Zur Herstellung des Expressionsplasmides wurde die cDNA-Sequenz des Zygocins aus dem Vektor pREP-Zygocin (Weiler *et al.*, 2002) amplifiziert und mit zusätzlichen Schnittstellen versehen. Die verwendeten PCR-Primer 5'-Zygocin Nde und 3'-Zygocin Bam (vgl. Tabelle 4, S. 23) ermöglichten eine Amplifikation der Präpro-Zygocin Sequenz (717 bp). Das Konstrukt wurde am 5'-Ende mit einer *NdeI* Schnittstelle und einem Startcodon versehen. Am 3'-Ende wurde die Sequenz durch ein Stopcodon und eine *BamHI* Schnittstelle ergänzt. Das erhaltene Amplifikat wurde mittels TOPO TA-Cloning in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor zwischenkloniert und sequenziert. Korrekt sequenzierte Plasmide wurden mit *NdeI* und *BamHI* verdaut und das herausgeschnittene Gen gerichtet in den mit den gleichen Enzymen verdauten pZ3 Vektor ligiert. Nach Kontrolle der Ligation durch Kolonie-PCR (siehe 2.8.7.2, Seite 42) wurde das Expressionsplasmid pZ3-Zygo (Abbildung 10) in die *Z. bailii* Stämme ATCC36946 und ATCC60483 mittels Elektroporation (siehe 2.8.10.4, S. 49) transformiert und auf Geneticin-haltigem Medium kultiviert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR (siehe 2.8.7.2, S. 42) auf das Vorhandensein des gewünschten Genes untersucht.

### 3.3.1. Konstruktion von Zygocin-Varianten mit Punktmutationen und Deletionen

Zur weiteren Charakterisierung des Proteintoxins und zur Verifizierung des Zygocin-Wirkungsmodells wurden verschiedene Toxinvarianten mit teils ortsgerichteter Mutagenese sowie Varianten mit fusionierten Tags hergestellt, ebenfalls in den pZ3 Vektor ligiert und in *Z. bailii* zur Expression gebracht. Bei allen Konstrukten wurden am 5'-Ende die Schnittstellen *EcoRI* und *NdeI* gefolgt von einem Startcodon eingefügt. Am 3'-Ende wurden alle Konstrukte nach dem Stopcodon um eine *BamHI* Schnittstelle ergänzt. Die gerichtete Ligation in pZ3 erfolgte bei allen Konstrukten über *EcoRI/BamHI* (außer bei Zygocin, dort wurde über *NdeI/BamHI* kloniert). Im Nachfolgenden sind die verschiedenen Konstrukte und ihre Herstellung über PCR näher beschrieben (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11). Alle Plasmide wurden nach der Ligation über Kolonie-PCR überprüft. Die korrekten Expressionsvektoren wurden mittels Elektroporation in *Z. bailii* ATCC36956 und ATCC60483 transformiert und die erhaltenen Transformanten vor der Expression auf das Vorhandensein des gewünschten Genes untersucht (mittels *Z. bailii* Kolonie PCR).

#### ZygocinV66N

Das postulierte Wirkungsmodell von Zygocin beschreibt eine amphipathische  $\alpha$ -Helix als zweite Wirkdomäne (vgl. Abbildung 3, S. 16) im Bereich der Aminosäuren 60-70, der die unspezifische Anlagerung des Toxins an die Membran zugeschrieben wird. Zur Überprüfung dieser Eigenschaft wurde eine Toxinvariante hergestellt, bei der an Position 66 des reifen Toxins (nach Abspaltung der PräPro-Domäne) das hydrophobe Valin gegen ein hydrophiles Asparagin ausgetauscht wurde, um damit die Amphipathizität der  $\alpha$ -Helix zu zerstören, ohne hierdurch die Ausbildung der Helix selbst zu beeinträchtigen.

Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde die Technik der SOE-PCR angewandt (siehe 2.8.7, S. 41). Die beiden komplementären Mittelprimer 5'-ZygoV66N und 3'-ZygoV66N (siehe Tabelle 4, S. 23) tragen in der Mitte der Sequenz die Punktmutation für den Austausch von Valin gegen Asparagin. Das Konstrukt wurde durch zwei getrennte PCR Reaktionen mit den Primern 5'-Zygocin Eco,Nde /3'-

ZygoV66N und 5'-ZygoV66N/3'-Zygo Xho,Bam mit pREP-Zygo als Template hergestellt. In einer dritten PCR wurden die beiden PCR-Produkte als Template eingesetzt und mit den Primern 5'-Zygocin Eco, Nde und 3'-Zygo Xho, Bam zu einem Produkt zusammengefügt. Nach Klonierung in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor und Sequenzierung wurde das Gen (717 bp) über *EcoRI* und *BamHI* gerichtet in den pZ3 Vektor ligiert (Abbildung 10). Nach Überprüfung der Ligation wurde das korrekte Plasmid (pZ3-ZygoV66N) in *Z. bailii* ATCC 60483 transformiert.

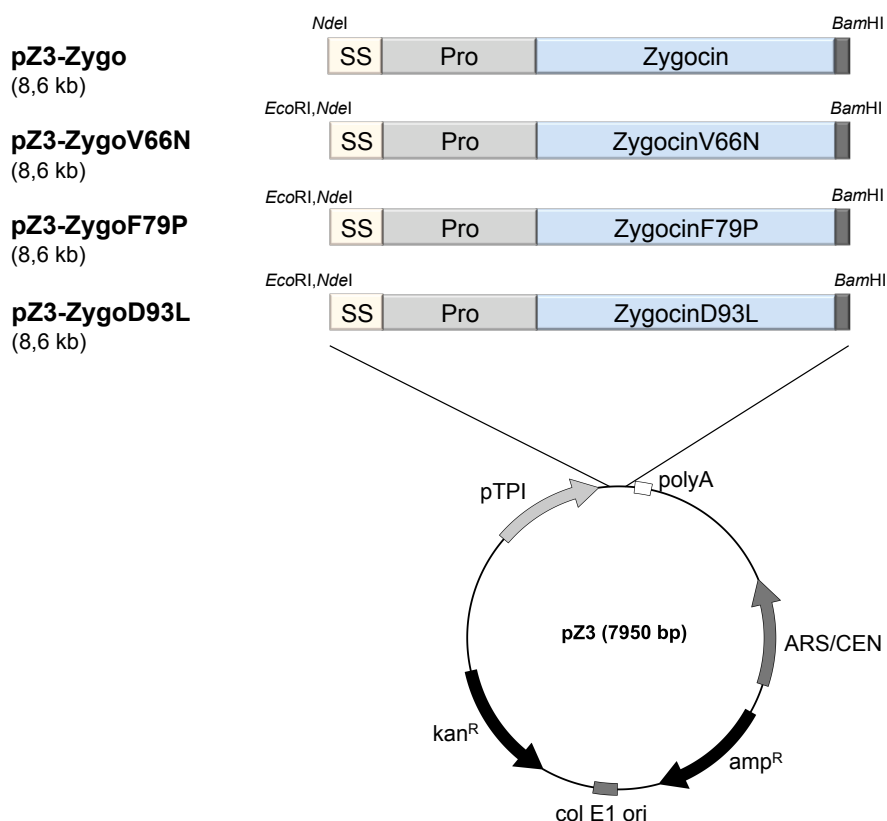
### **ZygocinF79P**

Das Wirkungsmodell von Zygocin beschreibt im Bereich der Aminosäuren 71-91 eine Transmembranhelix. Dieser Domäne D3 wird nach Zusammenlagerung mehrerer Zygocinmoleküle die Bildung der eigentlichen Membranpore zugesprochen. Um diese Eigenschaft zu untersuchen, wurde an Position 79 des reifen Toxins Phenylalanin gegen Prolin ausgetauscht, was die Zerstörung der  $\alpha$ -Helix an dieser Position zur Folge hat.

Zur Einführung dieser Punktmutation wurden bei der PCR die Primer 5'-Zygo Eco, Nde und 3'-ZygoF79P sowie 5'-ZygoF79P und 3'-Zygo Xho, Bam eingesetzt und pREP-Zygo als Template verwendet. Das weitere Vorgehen entsprach dem des Konstruktes ZygocinV66N. Das entstandene Plasmid pZ3-ZygoF79P (Abbildung 10) wurde in *Z. bailii* ATCC 60483 transformiert und zur Expression gebracht.

### **ZygocinD93L**

Der postulierten Transmembranhelix folgen C-terminal neun weitere Aminosäuren, von denen alle bis auf das Aspartat 93 unpolar sind. Zur Untersuchung, ob diesem Aspartat-Rest eine gewisse Ankerfunktion (Weiler & Schmitt, 2003) zugeschrieben werden kann, wurde dieser gegen ein unpolares Leucin, welches eine ähnliche Struktur besitzt, ausgetauscht. Der Austausch von Aspartat an Position 93 gegen Leucin wurde durch PCR mit den Primern 5'-Zygo Eco, Nde und 3'-Zygo D93L Bam eingeführt. Nach TA-Zwischenklonierung und Sequenzierung wurde das Konstrukt gerichtet über *EcoRI/BamHI* in den mit den gleichen Enzymen restringierten pZ3 Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid pZ3-ZygoD93L (Abbildung 10) wurde in *Z. bailii* ATCC 60484 transformiert und zur Expression gebracht.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der konstruierten *Z. bailii* Expressionsvektoren mit punktmutierten Zygotocin-Varianten.** Die Konstrukte wurden durch SOE-PCR hergestellt und mit den im Text angegebenen Primern amplifiziert. Am 5'-Ende wurden die Schnittstellen *EcoRI* und *NdeI* angefügt, bei pZ3-Zygo nur *NdeI*. Am 3'-Ende wurde bei allen Varianten eine *BamHI* Schnittstelle angefügt. Kloniert wurde über *EcoRI/BamHI* (bei pZ3-Zygo über *NdeI/BamHI*) in pZ3. Alle Konstrukte stehen unter Kontrolle des konstitutiven Triosephosphat-Isomerase Promotors (pTPI). Die Größen der erhaltenen Plasmide sind in Klammern angegeben (SS: Signalsequenz, Pro: Pro-Region).

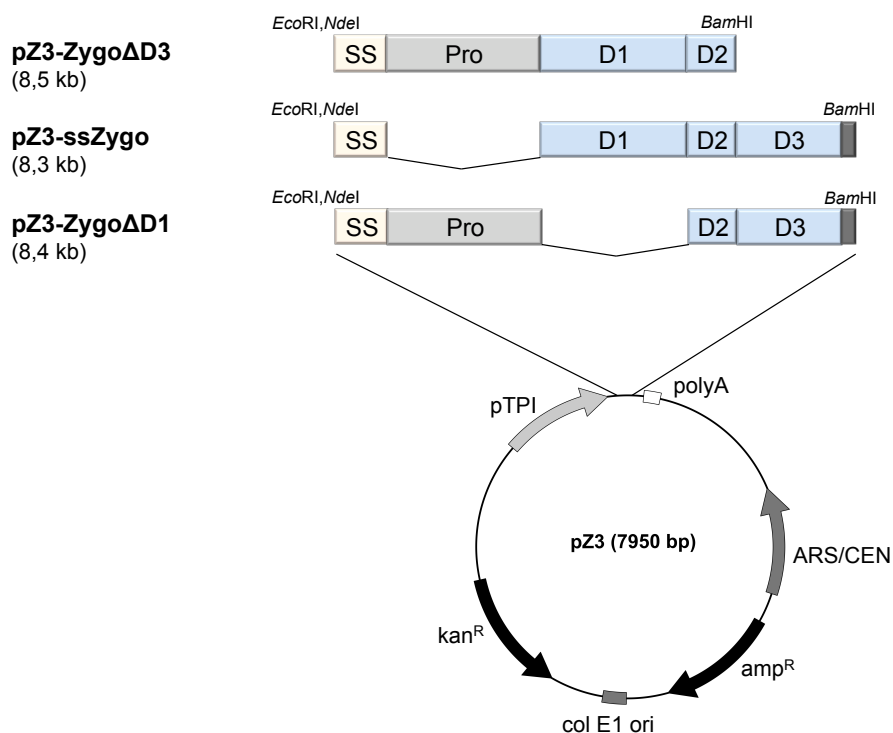
### Zygotocin $\Delta$ D3

Bei dieser Zygotocin-Variante wurde die gesamte vorhergesagte Transmembranhelix D3 deletiert, wodurch kein aktives Toxin mehr erhalten werden sollte. Diese Toxinvariante wurde durch PCR mit den Primern 5'-Zygo Eco, Nde und 3'-Zygo del D3 Sal, Bam und dem Template pREP-Zygo hergestellt. Nach Sequenzierung und Ligation (über *EcoRI/BamHI*) wurde das Plasmid pZ3-Zygo $\Delta$ D3 (Abbildung 11) erhalten.

### ssZygotocin (ohne Pro-Region)

Um die eventuelle Chaperon-Funktion der Pro-Region als Faltungshelfer des Toxins untersuchen zu können, wurde eine Toxinvariante hergestellt, bei der die Pro-Region deletiert wurde, das zygotocineigene Sekretionssignal blieb erhalten.

Dabei wurde das komplette Sekretionssignal von Zygotin über einen Primer eingefügt. Mit den Primern 5'-ZygoDel-Pro-EcoRI, NdeI und 3'-Zygo Bam wurde das Gen amplifiziert. Das nach Klonierung über *EcoRI/BamHI* erhaltene Plasmid pZ3-ssZygotin ist in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der konstruierten *Z. bailii* Expressionsvektoren mit Zygotin-Deletionsvarianten.** Die Konstrukte wurden durch SOE-PCR mit den im Text angegebenen Primer amplifiziert. Am 5'-Ende wurden die Schnittstellen *EcoRI* und *NdeI* angefügt, am 3'-Ende *BamHI*. Kloniert wurde über *EcoRI/BamHI* in pZ3. Alle Konstrukte stehen unter Kontrolle des konstitutiven Triosephosphat-Isomerase Promotors (pTPI). Die Größen der erhaltenen Plasmide sind in Klammern angegeben (SS: Signalssequenz, Pro: Pro-Region).

### 3.3.2. Konstruktion von Expressionsplasmiden mit „getaggten“ Toxinvarianten

Die Zygotin-spezifischen polyklonalen Antikörper (Weiler, 2002) zeichnen sich sowohl durch eine hohe Kreuzreaktivität als auch eine geringe Sensitivität aus und müssen in geringer Verdünnung eingesetzt werden (1:70). Daher wurden Toxinvarianten mit „tags“ versehen, um kommerziell erhältliche, monoklonale Antikörper verwenden zu können. Mit diesen sollte ein spezifischer Nachweis des Toxins auch in geringer Protein-Konzentration gelingen. Im Nachfolgenden sind

die Varianten und deren Herstellung sowie die dazu verwendeten Primer näher beschrieben. Abbildung 12 zeigt die daraus resultierenden Expressionsplasmide.

### **ssGFP-Zygocin**

Zum besseren Nachweis von Zygocin mit monoklonalen Antikörpern gegen GFP, aber auch um eine fluorometrische Detektion des Toxins zu ermöglichen, wurde eine N-terminale Fusion aus GFP und Zygocin hergestellt. Um eine Sekretion des Fusionsproteins zu ermöglichen, wurde GFP die 63 bp große Zygocin-Signalsequenz vorgeschaltet. Das Konstrukt wurde durch zwei getrennte PCRs hergestellt. Verwendet wurden die Primer 5'-GFP *EcoRI* *NdeI* und 3'-GFP *Bam* ohne Stopp sowie 5'-Zygo *BglII* ohne Signal, ohne Proregion und 3'-Zygo *Bam*. Anschließend wurden beide Gene in pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> zwischenkloniert und sequenziert. Zuerst wurde das GFP-Konstrukt mit der Zygocin-Signalsequenz in pZ3 kloniert (über *EcoRI* und *BamHI*). Danach wurde der erhaltene Vektor mit *BamHI* restringiert und das *BglII* und *BamHI* Zygocin-Fragment ungerichtet kloniert. Dabei erfolgte die Ligation über die kompatiblen Restriktionsenzyme *BglII* und *BamHI*, wobei die Schnittstelle zerstört wurde. Da der Vektor zum Einfügen des Zygocin-Gens nur mit einer Restriktionsendonuklease (*BamHI*) linearisiert wurde, konnte das Gen in zwei Orientierungen eingebaut werden. Die korrekte Orientierung wurde durch Kolonie-PCR mit Gen-spezifischen Primern überprüft (5'-GFP *EcoRI* *NdeI* und 3'-Zygo *Bam*) und nur bei korrekter Orientierung konnte ein PCR-Produkt erhalten werden. Das erhaltene Plasmid pZ3-ssGFP-Zygo (siehe Abbildung 12) wurde in *Z. bailii* transformiert und die Expression untersucht.

### **Zygocin-GFP**

Die Zygocin-Variante mit C-terminalem GFP wurde durch SOE-PCR in zwei Schritten hergestellt. Das Zygocin-Gen mit Signalsequenz und Pro-Region wurde mit den Primern 5'- Zygocin *XhoI*, *EcoRI*, *NdeI* und 3'-Zygocin- 5'-GFP amplifiziert, das GFP mit den Primern 5'-GFP- 3'-Zygocin und 3'-GFP *BamHI*. Im zweiten Schritt der SOE-PCR wurden beide Amplifikate als Template für die anschließende Fusion der beiden Gene mit den Primern 5'- Zygocin *XhoI*, *EcoRI*, *NdeI* und 3'-GFP *BamHI* eingesetzt. Nach Zwischenklonierung in pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> und Sequenzierung wurde das korrekte Zygocin-Konstrukt über *EcoRI/BamHI* in



den mit den gleichen Restriktionsendonukleasen restringierten pZ3 Vektor gerichtet ligiert. Das erhaltene Plasmid pZ3 Zygo-GFP ist in Abbildung 12 dargestellt.

### **Zygocin $\Delta$ D3-GFP**

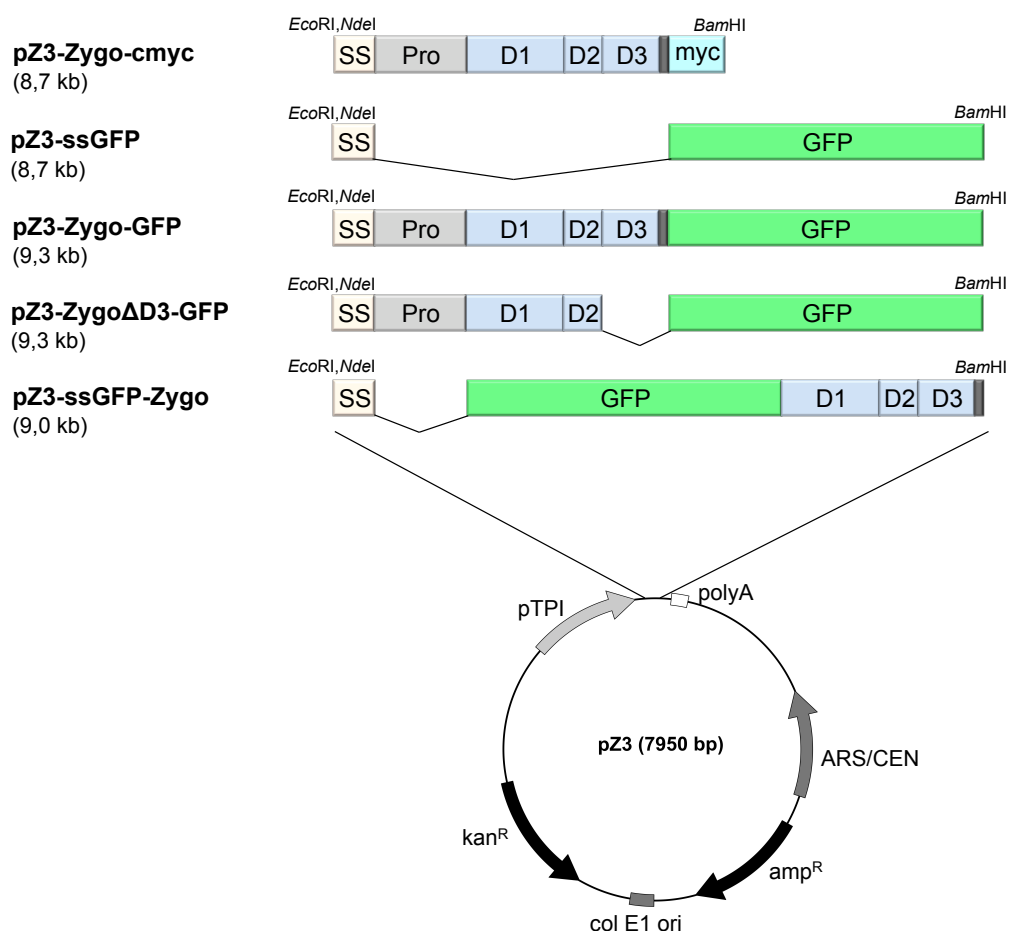
Bei diesem Konstrukt wurde Zygocin ohne die Transmembranhelix D3 C-terminal mit GFP fusioniert. Dazu wurden die beiden Gene im ersten Schritt der SOE-PCR mit den Primern 5'- Zygocin XhoI, EcoRI, NdeI und 3'-Zygo del D3 5'-GFP sowie das GFP mit den Primern 5'-GFP-3'-Zygo del D3 und 3'-GFP BamHI amplifiziert. Im zweiten Schritt wurden die beiden Gene mit 5'- Zygocin XhoI, EcoRI, NdeI und 3'-GFP BamHI fusioniert und in pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> zwischenkloniert. Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde das Fusionsgen in den Vektor pZ3 über *EcoRI/BamHI* gerichtet ligiert. Das erhaltene Plasmid pZ3-Zygo $\Delta$ D3-GFP ist in Abbildung 12 dargestellt.

### **Zygocin-cmyc**

Bei diesem Konstrukt wurde das Volllängen-Zygocin mit einem C-terminalen c-Myc Epitop-Tag versehen, um das Protein mit dem monoklonalen Antikörper gegen c-Myc detektieren zu können. Der Tag wurde mit dem 3'-Primer angefügt. Das Gen wurde mit 5'-Zygocin XhoI, EcoRI, NdeI und 3'-Zygo-c-myc Bam amplifiziert und nach Zwischenklonierung und Sequenzierung gerichtet über *EcoRI/BamHI* in pZ3 kloniert. Das erhaltene Plasmid pZ3-Zygo-cmyc (siehe Abbildung 12) wurde in *Z. bailii* transformiert und zur Expression gebracht.

### **ssGFP**

Bei diesem Konstrukt wurde lediglich das 63 bp lange Sekretionssignal von Zygocin dem GFP vorgeschaltet, welches über den 5'-Primer angefügt wurde. Amplifiziert wurde das Gen mit den Primern 5'-GFP EcoRI NdeI und 3'-GFP BamHI. Dieses Konstrukt sollte als Positivkontrolle der Sekretion für die verwendeten Expressionsstämme sowie des verwendeten Vektors dienen. Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde das Gen über *EcoRI/BamHI* in den pZ3 Vektor ligiert (Abbildung 12), anschließend in *Z. bailii* transformiert und zur Expression gebracht.



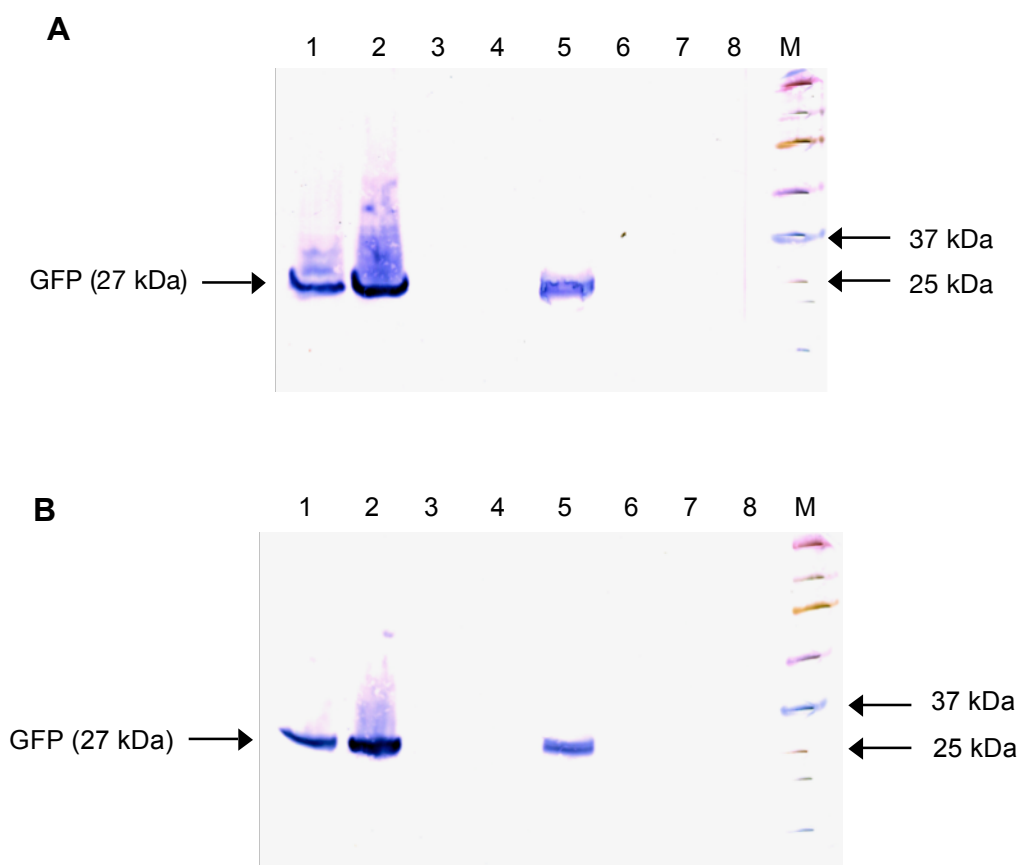
**Abbildung 12: Schematische Darstellung der konstruierten Hefeexpressionsvektoren für *Z. bailii* mit „getaggten“ Zygocin-Varianten.** Die Konstrukte wurden durch SOE-PCR mit den im Text angegebenen Primern amplifiziert. Am 5'-Ende wurden die Schnittstellen *EcoRI* und *NdeI* angefügt, am 3'-Ende *BamHI*. Kloniert wurde über *EcoRI/BamHI* in pZ3. Alle Konstrukte stehen unter Kontrolle des konstitutiven Triosephosphat-Isomerase Promotors (pTPI). Die Größen der erhaltenen Plasmide sind in Klammern angegeben (SS: Signalsequenz, Pro: Pro-Region).

### 3.4. Expression von Zygocin und dessen Varianten in *Z. bailii*

Die Expression des klonierten Zygocins sowie seiner Varianten erfolgte in den *Z. bailii* Stämmen ATCC36947, ATCC60483 und als Kontrolle im Wildtyp-killerstamm *Z. bailii* 412. Zur Expression gebracht wurden alle oben genannten Expressionsplasmide sowie pZ3-GFP, bei dem GFP intrazellulär ohne Sekretionssignal exprimiert wurde. Hierfür wurden jeweils 250 ml synthetisches B-Medium (pH-Wert 4,0, 100  $\mu$ g/ml G418) 2 %ig mit einer frischen Übernachtskultur beimpft. Die Expression erfolgte bei 20 °C und 90 rpm für fünf Tage. Die zellfreien Kulturüberstände wurden sterilfiltriert und über eine Amicon-Filtrations-Zelle etwa 100-fach konzentriert (vgl. 2.9.9). Alternativ wurden jeweils 2 ml Kulturüberstand mit

Trichloressigsäure gefällt. Die konzentrierten Kulturüberstände wurden für die Untersuchungen auf Killeraktivität im MBA Test (vgl. 2.9.10) eingesetzt. Sowohl die gefällten Überstände als auch die Konzentrate wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend geblottet. Der Nachweis der sezernierten Proteine erfolgte mit Hilfe Zygocin-spezifischer Antikörper (Verdünnung 1:70) für alle nichtgetaggtten Zygocin-Varianten. Der Nachweis der GFP-getaggtten Varianten erfolgte mit spezifischen monoklonalen Anti-GFP-Antikörpern (Verdünnung 1:1000). Bei keiner der getesteten Proben konnte in den gefällten bzw. konzentrierten Kulturüberständen oder in den Zelllysaten eine Expression einer Zygocinvariante nachgewiesen werden. Die Blots zeigten lediglich Signale der Zygocin Positivkontrolle (Kulturüberstand des Wildtyp *Z. bailii* 412). Außerdem waren schwache Signale im hochmolekularen Bereich zu erkennen, die auf eine unspezifische Antikörperbindung zurückzuführen waren, da diese auch bei der Negativkontrolle auftraten (Ergebnis nicht dargestellt).

Abbildung 13 zeigt zwei Western Blots, bei welchen lediglich die Zygocin-GFP-Varianten mit N-terminalem oder C-terminalem GFP-Tag, sezerniertes GFP und zur Kontrolle intrazelluläres GFP auf ein 12 %iges Tris-Tricin-Gel aufgetragen wurden. Es wurden sowohl konzentrierte Kulturüberstände als auch Zelllysate der jeweiligen Expressionsstämme aufgetragen. Die Zellen wurden nach der S80-Methode aufgeschlossen (vgl. 2.9.1.1). Als Expressionswirt dienten im Blot A der Wildtypkillerstamm *Z. bailii* 412 und der Stamm ATCC36947. In Blot B wurden ebenfalls Proteinproben des Wildtypstammes sowie des Stammes ATCC60483 aufgetragen. Entwickelt wurden beide Blots mit GFP-spezifischen monoklonalen Antikörpern. Auf beiden Blots ließ sich nur das intrazellulär exprimierte GFP (27 kDa) in den *Z. bailii* Lysaten und das mit Hilfe des Zygocin-Sekretionssignals in das Medium sezernierte GFP bei beiden *Z. bailii* Stämmen detektieren. Als Negativkontrolle dienten die mit dem Leervektor pZ3 transformierten Stämme ATCC36947 bzw. ATCC60483. Der Nachweis der GFP-getaggtten Zygocinvarianten (ssGFP-Zygocin und Zygocin-GFP) gelang weder im konzentrierten Zellüberstand noch im Zelllysate. Auch die verkürzte Variante Zygocin $\Delta$ D3-GFP konnte weder sekretorisch, noch zytoplasmatisch detektiert werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 13: Western Blot zum Nachweis der Expression von GFP bzw. GFP-getaggtter Toxinvarianten im Kulturüberstand oder im Zelllysat der Hefe *Z. bailii* 412 und ATCC36947 (A) und *Z. bailii* 412 und ATCC60483 (B).** Aufgetragen wurden jeweils 20  $\mu$ l konzentrierter Kulturüberstand bzw. 20  $\mu$ l aufgeschlossene Zellen nach der S80 Methode. Verwendet wurde ein 12 %iges Tris-Tricin-Gel. Die Detektion erfolgte mit primärem anti-GFP (1:1000) Antikörper und sekundärem anti-Mouse AP (1:4000) colorimetrisch. Marker: Kaleidoskop-Marker (BioRAD).

Spur 1: Zellaufschluss GFP  
 Spur 2: Zellaufschluss 412 GFP  
 Spur 3: Konzentrat Zygocon-GFP  
 Spur 4: Konzentrat ssGFP-Zygocon  
 Spur 5: Konzentrat ssGFP  
 Spur 6: Zelllysat Zygocon-GFP  
 Spur 7: Zelllysat ssGFP-Zygocon  
 Spur 8: Negativkontrolle  
 M: Marker

Um zu überprüfen, ob die fehlenden Signale auf ein Nicht-Sezernieren der Toxinvarianten zurückzuführen war, wurden die Zellen dieser Kulturen aufgeschlossen, in einem SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot überprüft. Auch hier konnten weder mit den Zygocon-spezifischen Antikörpern, noch mit den GFP-Antikörpern Signale im Western Blot detektiert werden (Ergebnis nicht dargestellt). Um eine eventuell zu geringe Sensitivität der Methode der colorimetrischen Detektion mittels Western Blot auszuschließen, wurden Zellen,

die eine GFP-Variante exprimieren sollten, einer indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie (vgl. 2.9.13, S. 68) unterzogen. Bei diesem Verfahren wurden die fixierten Zellen auf einem Polysin beschichteten Objektträger immobilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit primärem Antikörper (anti-GFP) und mit einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper. Die Proben wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Auch hier konnten keine positiven Signale bei den GFP-Zygocin-Varianten erhalten werden (nicht dargestellt).

Bei Tests auf Killeraktivität konnte bei keiner der in *Z. bailii* exprimierten Toxinvarianten bzw. dem Zygocin-WT eine Toxizität nachgewiesen werden. Die sensitiven Hefen zeigten keinen Hemmhof im Zellrasen. Sie wurden somit nicht in ihrem Wachstum beeinträchtigt (nicht dargestellt).

### **3.5. Heilung des Wildtypkillerstammes *Z. bailii* 412**

Bei der Expression von Zygocin und seinen Varianten konnten weder im Western Blot Banden detektiert werden, noch zeigten die Überstand-Konzentrate eine Killeraktivität. Dies könnte eventuell an den beiden verwendeten Expressionsstämmen ATCC36947 und ATCC60483 liegen, von denen keine Genotypen bekannt sind. Zwar konnte von Branduardi *et al.* (2004) mit diesen Stämmen und dem verwendeten Expressionsvektor eine Expression verschiedener Proteine nachgewiesen werden, aber dennoch wäre es möglich, dass sie nicht in der Lage sind, Zygocin zu exprimieren und zu sezernieren. Alternativ könnte der Wildtypkillerstamm *Z. bailii* 412 zur Expression eingesetzt werden, da dieser natürlicherweise Zygocin in aktiver Form sezerniert. Um diesen Stamm als Expressionsstamm verwenden zu können, müsste er zuvor von seinen RNA-Viren, die für die Killeraktivität verantwortlich sind, geheilt werden. Ein bereits durch Cycloheximidbehandlung erhaltener geheilter Killer (Schmitt & Neuhausen, 1994) zeichnete sich durch ein extrem langsames Wachstum aus, so dass angenommen werden muss, dass durch die Behandlung Mutationen entstanden sind. Daher schied dieser als Expressionswirt aus, da ein zum Wildtypkillerstamm *Z. bailii* 412 möglichst genetisch identischer *Z. bailii* Stamm verwendet werden sollte. Zur Heilung des Wildtypstamms wurden zwei nicht mutagene Methoden verwendet.

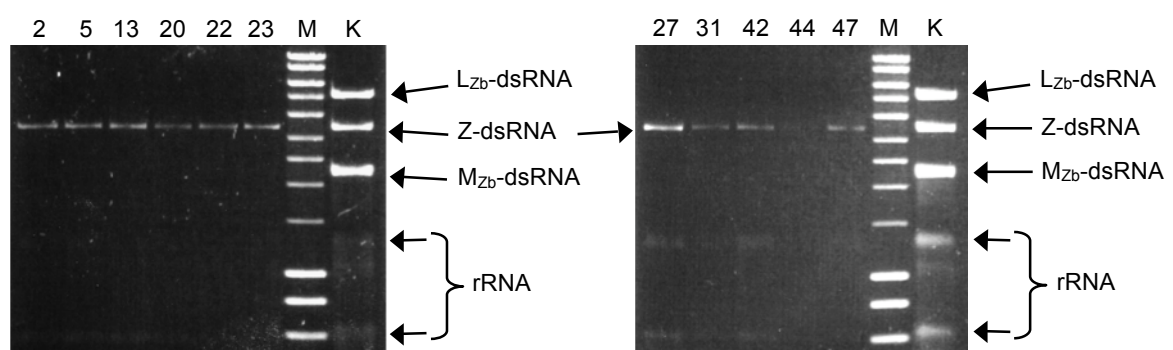
### 3.5.1. Heilung von *Z. bailii* 412 durch die VBS-Struktur von M28

Die Beobachtung, dass das  $M_{zb}$ -Virus nach Transfektion in einen *S. cerevisiae* M28 Killerstamm zu einem Verlust des  $M_{zb}$ -Virus führt und nicht zu einem Doppelkiller, sollte als Grundlage für die versuchte Heilung des *Z. bailii* 412 Wildtypkillers genutzt werden. Hierzu sollte die M28 VBS-Struktur in das *Z. bailii* Expressionsplasmid pZ3 kloniert und zur Expression gebracht werden. Nach Expression der RNA sollte diese anstelle der Zygotin mRNA in die Capsidstrukturen verpackt werden, dadurch das  $M_{zb}$ -Virus nach und nach verdrängen und zu einem Verlust des Virus führen.

Zur Herstellung der *Z. bailii* Expressionsplasmide für die funktionelle Komplementation wurde die VBS-Sequenz von M28 aus dem pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-VT28 (Powilleit, 2004) mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BglII* herausgeschnitten. Dieses 400 bp große DNA-Fragment enthielt die VBS, IRE (*internal replication enhancer*) und TRE (*terminal recognition element*) der M28-dsRNA. Der Vektor pZ3 wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten. Durch den Verdau mit *BamHI* entstehen kompatible Enden zu *BglII*, wodurch eine Ligation über *EcoRI/BamHI-BglII* möglich wurde. Dabei wurde allerdings die *BamHI* Schnittstelle zerstört. Beide Restriktionsansätze wurden zuvor in einem Agarosegel aufgetrennt und die Insert- sowie Vektor-spezifischen Banden aus dem Gel reisoliert. Nach erfolgter Ligation wurde das Plasmid in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Um den Erfolg der Ligation zu bestätigen, wurden sowohl eine Kolonie-PCR als auch ein Kontrollverdau durchgeführt. Die Plasmid-DNA eines positiven Klonen wurde ausgewählt und zur Elektroporation (vgl. 2.8.10.4 S. 49) in den Wildtypkillerstamm *Z. bailii* 412 eingesetzt. Insgesamt 50 der auf den selektiven Platten (mit G418) erhaltenen Klone wurden auf Verlust ihrer Killeraktivität untersucht. Dazu wurden die Klone auf eine MBA-Masterplatte mit dem zuvor eingebetteten, Zygotin hypersensitiven *S. cerevisiae* Stamm 192.2d ausgestrichen und für vier Tage bei 20 °C inkubiert. Insgesamt 23 untersuchte Klone zeigten keine Killeraktivität mehr, haben somit die Viren zur Zygotinproduktion verloren. Die restlichen Klone zeigten im MBA-Test noch Killeraktivität welche sich durch eine Hemmzone im Zellrasen zeigte. Die 23 Klone, die ihre Killereigenschaft verloren hatten, wurden auf YPD-Masterplatten (ohne Selektionsmarker) überimpft und bei

30°C über Nacht inkubiert. Nach Wachstum auf den Masterplatten wurden die Zellen erneut auf frische Masterplatten passagiert. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Anschließend wurden die Klone parallel auf eine YPD-Platte mit und eine Platte ohne G418 als Selektionsmarker überimpft, um zu überprüfen, welche Klone sich durch das Wachstum ohne Selektionsdruck durch den Verlust des Plasmides auszeichneten. Insgesamt zeigten elf Klone kein Wachstum mehr auf Antimykotikum-haltigen Agarplatten (Klone 2, 5, 13, 20, 22, 23, 27, 31, 42, 44 und 47). Diese Klone wurden nun weiter untersucht, um zu überprüfen, ob die fehlende Killeraktivität auf den Verlust der dsRNA-Viren zurückzuführen und ob ein Verlust der Plasmide zu verzeichnen war.

Dazu wurde in einem ersten Schritt die Gesamt-RNA der geheilten *Z. bailii* Klone isoliert, die dsRNA gefällt (vgl. 2.8.13 S. 54) und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Abbildung 14 zeigt ein solches Agarosegel, bei welchem jeweils 8 µl der isolierten RNA aufgetragen wurden. Es ist zu erkennen, dass bei allen getesteten Klonen lediglich die dsRNA des Z-Virus (3,2 kbp) nachweisbar war, sowohl die  $L_{Zb}$ -dsRNA (4,6 kbp) als auch die  $M_{Zb}$ -dsRNA (2,1 kbp) ließen sich nicht mehr detektieren. Alle geheilten Klone wurden im MBA Test auf Immunität gegen von außen appliziertes Zygotin getestet. Sie zeigten sich auch nach Verlust der beiden Viren immun gegen das Toxin.



**Abbildung 14: Gesamt-RNA Präparation von *Z. bailii* 412 nach Heilung durch Expression der VBS-Struktur des M28-Killervirus von *S. cerevisiae*.** In einem 1 %igen Agarosegel wurden jeweils 8 µl Gesamt-RNA aufgetrennt. Die Zahlen geben die jeweiligen Klone an. M: Smart Ladder DNA Marker, K: Positivkontrolle (*Z. bailii* 412 Wildtyp). Die Position der jeweiligen dsRNA-Genome ist gekennzeichnet.

### 3.5.2. Northern Analyse der mit der M28-VBS-Struktur geheilten Klone des Wildtypkillers

Die Analyse der Gesamt-RNA lieferte einen Hinweis auf den Verlust der beiden dsRNA Viren ( $L_{Zb}$  und  $M_{Zb}$ ). Da die Detektion im Agarosegel nicht sehr sensitiv und nicht spezifisch war sollten Northern Analysen durchgeführt werden, wobei DIG-markierte DNA-Sonden gegen Teile der Zygotin-Sequenz eingesetzt werden sollten. Hiermit wäre es möglich, den Verlust der  $M_{Zb}$ -dsRNA nachzuweisen. Zur Herstellung der DIG-markierten DNA-Sonden (vgl. 2.8.14 S. 54) wurde das Plasmid pREP-Zygo als Template für die PCR gewählt. Mit den Primern 5'-Zygo Nde und 3'-Zygo $\Delta$ D3 Bam wurde eine 624 bp große Sonde amplifiziert. Bei keinem der untersuchten Klone (Abbildung 15) ließ sich auf dem Northern Blot (vgl. 2.8.15 S. 54) eine Bande mit der Größe der  $M_{Zb}$ -RNA nach Hybridisierung mit der Zygotin-Sonde detektieren. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass nach RNA-Präparation nur noch das Z-Virus zu erkennen ist. Es ist davon auszugehen, dass bei den untersuchten Klonen die ds-RNA Viren  $L_{Zb}$  und  $M_{Zb}$  verdrängt wurden. Die auf diese Weise erhaltenen geheilten Wildtypkiller Klone standen nunmehr zur Transformation mit den bereits konstruierten Expressionsplasmiden (vgl. Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 12) für weitere Untersuchungen als Expressionsstamm zur Verfügung.



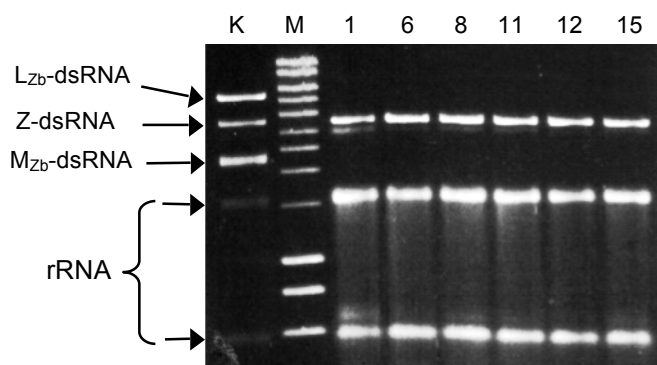
**Abbildung 15: Northern Analyse der durch Expression der VBS-Struktur des M28 Killervirus von *S. cerevisiae* geheilten *Z. bailii* 412 Klone.** Es wurden jeweils 9  $\mu$ l der Gesamt-RNA-Präparation in einem denaturierenden Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG-markierten Zygotin Sonde. Die Zahlen stellen die aufgetragenen Klone dar. M: RNA Marker I, DIG-labeled (ROCHE); K: Positivkontrolle (*Z. bailii* 412 Wildtyp).



### 3.5.3. Heilung von *Z. bailii* 412 durch Expression einer *antisense*-VBS-Struktur von Zygotin

Eine weitere Möglichkeit der Verdrängung der  $L_{Zb}$ - und  $M_{Zb}$ -dsRNA Viren in *Z. bailii* 412 ist die Überexpression einer *antisense* VBS-Struktur des Zygotin kodierenden M-dsRNA-Virus. Bei der Replikation des Virus wird die einzelsträngige (+)-RNA in VLP verpackt und dort durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase zum doppelsträngigen RNA-Genom des Virus komplettiert (Wickner, 1996; Schmitt & Breinig, 2006). Eine Verpackung von doppelsträngiger RNA in die Capsid-Hülle ist nicht möglich. Um diesen Effekt auszunutzen, wurde ausgehend von dem Plasmid pUC18-M-cDNA Klon 130 (enthält ein 1 kbp großes cDNA Fragment der  $M_{Zb}$ -dsRNA; Bautz, 1996) mit den Primer 5'-VBS-Zygo-Minusstrang und 3'-VBS-Zygo-Minusstrang ein 450 bp großes DNA-Fragment über PCR amplifiziert, das den Minusstrang der VBS, IRE und TRE enthielt. Dieses DNA-Fragment wurde zuerst über TA-Cloning in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> Vektor kloniert. Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde das DNA-Fragment aus dem Vektor mit *EcoRI* und *BamHI* herausgeschnitten, in den mit den gleichen Enzymen restringierten pZ3 Vektor ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die Ligation wurde sowohl mittels Kolonie-PCR, als auch mittels eines Kontrollverdaues überprüft. Die Plasmid-DNA (pZ3-antiVBS) eines korrekten Klones wurde für die Elektroporation in den Wildtypkillerstamm *Z. bailii* 412 eingesetzt (vgl. 2.8.10.4 S. 49). Nach Koloniebildung auf YPF-Platten mit G418 als Selektionsmarker wurden 15 Klone ausgewählt, die auf den Verlust ihrer Killereigenschaft untersucht wurden. Auf den MBA-Masterplatten, mit *S. cerevisiae* 192.2d als sensitivem Stamm, zeigten neun der getesteten Klone noch eine Toxinsekretion, die restlichen sechs untersuchten Klone hatten ihre Killereigenschaft verloren. Diese sechs Nichtkiller wurden insgesamt siebenmal auf YPD-Masterplatten überimpft (jeweils bei 30 °C bis zum Wachstum), bevor sie parallel auf YPD-Platten mit und ohne G418 als Selektionsmarker ausgestrichen wurden. Damit wurde überprüft, welche Klone das Plasmid noch tragen, welches ein Wachstum auf Geneticin-haltigem (G418) Medium ermöglicht und welche das Plasmid verloren haben. Keiner der getesteten sechs Klone (1, 6, 8, 11, 12, 15) zeigte ein Wachstum auf Geneticin-haltigen Agarplatten. Diese Klone wurden in je 6 ml YPD-Flüssig-

medium angeimpft (jeweils mit und ohne G418) und über Nacht bei 30 °C und 220 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Auch im Flüssigmedium mit Antimykotikum zeigten die untersuchten Hefen kein Wachstum mehr. Die Gesamt-RNA der Klone ohne Killereigenschaft wurde isoliert und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. In Abbildung 16 sind deutlich die RNA-Banden der ribosomalen RNA und der Z-dsRNA (3,2 kbp) zu erkennen, nicht aber Banden der L<sub>Zb</sub> und M<sub>Zb</sub>-dsRNA (4,6 bzw. 2,1 kbp). Somit ist davon auszugehen, dass die beiden Viren durch die Überexpression der *antisense*-VBS-RNA verdrängt wurden. Die sechs Klone wurden im MBA-Test gegen ihre Immunität gegen Zygotin getestet. Alle untersuchten Klone verhielten sich vollkommen resistent gegen Zygotin, der Verlust der Viren hatte somit keine Auswirkung auf die Immunität.

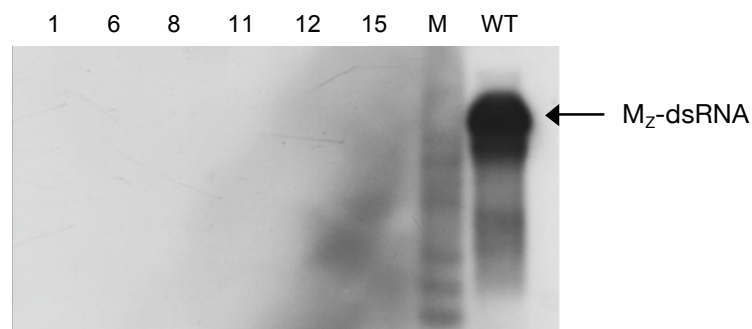


**Abbildung 16: Gesamt RNA-Präparation von *Z. bailii* 412 nach der Heilung durch die Expression einer Zygotin antisense VBS-Struktur.** In einem 1 %igen Agarosegel wurden jeweils 8 µl Gesamt-RNA aufgetrennt. Die Zahlen geben die jeweiligen Klone an. M: Smart Ladder DNA Marker; K: Positivkontrolle (*Z. bailii* 412 Wildtyp). Die Position der jeweiligen RNA-Genome (dsRNA, rRNA) ist gekennzeichnet.

#### 3.5.4. Northern Analyse der mit der Zygotin *antisense* VBS-Struktur geheilten Klone des Wildtypkillers

Die Analyse der Gesamt-RNA zeigte den Verlust des für die Toxizität verantwortlichen M<sub>Zb</sub>-Virus sowie des für die Replikation verantwortlichen L<sub>Zb</sub>-Virus. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde die isolierte Gesamt-RNA (jeweils 9 µl) der geheilten Klone in einem denaturierenden Formaldehyd-Gel aufgetrennt und einer Northern Analyse unterzogen. Als Sonde für die Hybridisierung diente

die oben erwähnte DIG-markierte DNA Sonde. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis des Northern Blots. Kein untersuchter Klon zeigte Banden der Größe der  $M_{Zb}$ -RNA im Northern Blot. Bei der ebenfalls mit aufgetragenen Positivkontrolle (*Z. bailii* 412 Wildtyp) ließ sich die  $M_{Zb}$ -dsRNA detektieren. Somit wurde das Ergebnis des Agarosegels bestätigt. Die  $M_{Zb}$ -Viren wurden durch die Plasmid-getriebene Expression der *antisense* VBS-Struktur verdrängt und ein Nicht-Killer-Stamm wurde erzeugt. Die so erhaltenen, geheilten Killerstämme konnten nun für Expressionsstudien von Zygocin eingesetzt und mit den Zygocin-Expressionsplasmiden transformiert werden.



**Abbildung 17: Northern Analyse der durch Expression einer Zygocin *antisense* VBS-Struktur geheilten *Z. bailii* 412 Klone.** Es wurden jeweils 9  $\mu$ l der Gesamt-RNA-Präparation in einem denaturierenden Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG-markierten Zygocin Sonde. Die Zahlen geben die aufgetragenen Klone an. M: RNA Marker I, DIG-labeled (ROCHE); K: Positivkontrolle (*Z. bailii* 412 Wildtyp).

### 3.6. Zygocin Expression in geheilten Nichtkiller-Stämmen

Einige der geheilten Klone wurden mit den Expressionsplasmiden pZ3-Zygo, pZ3-Zygo-cmyc, pZ3-ssGFP und pZ3-ssGFP-Zygo transformiert (vgl. Abbildung 10 und Abbildung 12). Die nach Transformation erhaltenen Klone wurden mittels Kolonie-PCR überprüft. Bei keinem der geheilten Stämme konnte nach Transformation und Expression, weder bei Ethanol gefällten noch bei 100-fach konzentrierten Kulturüberständen, noch im Zytoplasma der aufgeschlossenen Zellen, Zygocin im Western Blot detektiert werden (nicht dargestellt). Ein Nachweis der Tags mit den jeweils spezifischen Antikörpern verlief ebenfalls negativ. Die konzentrierten Kulturüberstände zeigten im MBA-Test gegen die

sensitive Hefe *S. cerevisiae* 192.2d keine Toxizität. Aus diesem Grund wurde auf weitere Untersuchungen und Expressionsversuche mit den geheilten Stämmen verzichtet, da sich diese als ungeeignet für die Sekretion von Zygotin erwiesen. Es wurde weiter nach einem geeigneten Expressionsstamm für aktives Zygotin gesucht.

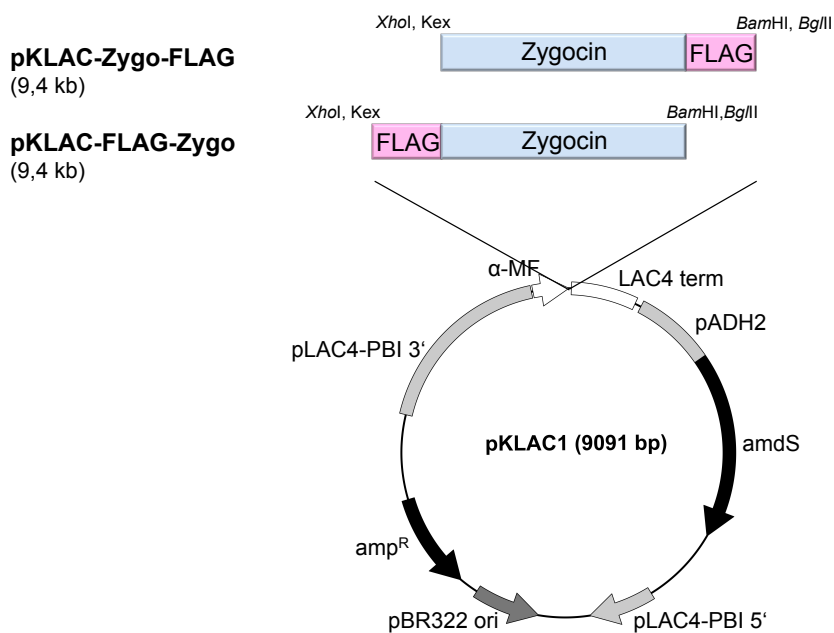
### 3.7. Zygotin-Expression in *Kluyveromyces lactis*

Für die Expression in *K. lactis* wurde das *K. lactis* Protein Expression Kit der Firma NEW ENGLAND BIOLABS verwendet. Der in diesem Kit verwendete Vektor pKLAC1 (Abbildung 18) ermöglicht die Sekretion von Proteinen durch die den klonierten Genen vorgeschaltete  $\alpha$ -mating-factor-Domäne ( $\alpha$ -MF) der Hefe *K. lactis*. Das klonierte Gen wird als  $\alpha$ -MF-Fusionsgen exprimiert und durch den sekretorischen Weg der Hefe transportiert. Im Endoplasmatischen Reticulum wird durch die Signalpeptidase das Sekretionssignal abgespalten und im Golgi-Apparat spaltet die Kex-Endoprotease die  $\alpha$ -MF-pro-Domäne ab, sodass schließlich die native Form des exprimierten Proteins sezerniert wird. Der Vektor ermöglicht die Proteinexpression unter der Kontrolle einer mutierten Form des induzierbaren LAC4-Promotors (Colussie & Taron, 2005). Die Integration des linearisierten Vektors in das Genom der Hefe erfolgt über den *LAC4*-Locus. Das in der Expressionskassette enthaltene Acetamidase-Gen *amdS* ermöglicht die Selektion positiver Klone nach Transformation mit dem Plasmid auf Nährmedien mit Acetamid als alleiniger Stickstoffquelle. Transformanten, die die Acetamidase exprimieren, sind in der Lage, Acetamid zu Ammonium umzusetzen und dieses als alleinige Stickstoffquelle zu nutzen. Dabei bietet die Selektion von positiven Klonen auf Acetamid noch den Vorteil, dass 90 % der Transformanten multiple Insertionen der Expressionskassette aufweisen und somit auch eine gesteigerte Produktion des gewünschten Proteins erreicht werden kann (Van Ooyen *et al.*, 2006).

Für die Expression von Zygotin in *K. lactis* wurden zwei neue Konstrukte hergestellt: Eine Zygotin-Variante mit N-terminalem FLAG-Tag und eine Variante mit einem C-terminalen FLAG-Tag. Der FLAG-Tag wurde gewählt, da für dessen

Erkennung sehr spezifische monoklonale Antikörper zur Verfügung standen. Im Falle einer N-terminalen Fusion lässt sich der Tag mittels Enterokinase-Spaltung entfernen. Die letzten fünf C-terminalen Aminosäuren (DDD-DK) stellen die Erkennensequenz dar. Der FLAG-Tag wurde über die jeweiligen Primer bei der PCR angefügt. Zur Herstellung der N-terminalen FLAG Zygocin-Variante wurden die Primer 5'-FLAG-Zygocin Xho, Kex und 3'-Zygocin Sal, BglIII, BamHI und pREP-Zygo als Template für die PCR eingesetzt. Durch die Primer wurden am 5'-Ende eine XhoI und eine Kex-Protease-Schnittstelle gefolgt von dem FLAG-Tag angefügt. Die Kex-Protease-Schnittstelle wird zwischen dem  $\alpha$ -MF-Sekretions-signal und dem Zielprotein benötigt, um beim Durchlaufen des Sekretionsweges eine korrekte Prozessierung des Fusionsproteins zu ermöglichen. Durch die gewählte XhoI Schnittstelle mit nachfolgender Kex-Protease-Schnittstelle entsteht nach Prozessierung das native-Ende des FLAG-Tags, ohne dass eine zusätzliche Aminosäure angefügt wurde. Die Zygocin-Variante mit C-terminal fusioniertem FLAG-Tag wurde analog hergestellt. Bei der PCR wurden die Primer 5'-Zygo-XhoI, Kex und 3'-FLAG-Zygo-Sal, BglIII, BamHI und pREP-Zygo als Template eingesetzt. Die 3'-Primer enthielten jeweils ein Stopcodon gefolgt von den Schnittstellen. Die erhaltenen Amplifikate wurden mittels TOPO TA-Cloning in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert und in *E. coli* transformiert. Nach Kolonie-PCR wurde je ein positiver Klon ausgewählt, das Plasmid präpariert und sequenziert. Ein korrekt sequenziertes Plasmid wurde nach XhoI/BglIII Verdau in den mit den gleichen Enzymen restringierten pKLAC1-Vektor kloniert und in *E. coli* TOP10 transformiert (vgl. Abbildung 18).

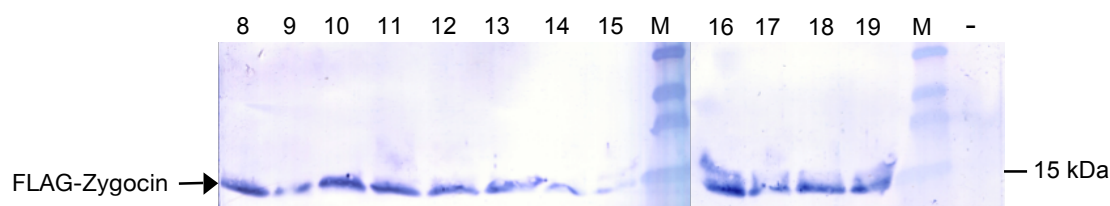
Die Kontrolle der Ligation erfolgte über Kolonie-PCR. Je ein Plasmid mit dem korrekten Gen wurde nach Linearisierung mit SacII in *K. lactis* GG799 kompetente Zellen transformiert (vgl. 2.8.10.5 S. 50) und auf Acetamid-haltigen Agarplatten ausplattiert. Jeweils zwölf Klone wurden im Western Blot auf Sekretion der beiden getaggen Zygocin-Varianten untersucht. Die Expression erfolgte in 5 ml YPG-Medium (pH 7,0) bei 30 °C, 220 rpm für drei Tage. Für Western Blots wurden sowohl Ethanol gefällte als auch ungefällte Kulturüberstände in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mit monoklonalen anti-FLAG Antikörpern und sekundären Anti-Maus Antikörpern detektiert.



**Abbildung 18: Schematische Darstellung der konstruierten Hefeexpressionsvektoren für *K. lactis* mit FLAG-Zygocin-Varianten.** Die Konstrukte wurden durch PCR mit den im Text angegebenen Primern amplifiziert. Am 5'-Ende wurden eine *XhoI*-Schnittstelle und die Sequenz einer KEX-Proteaseschnittstelle, am 3'-Ende ein Stopcodon sowie die Schnittstellen *Bam*HI und *Bg*II angefügt. Kloniert wurde über *XhoI/BgII* in pKLAC1. Die Integration in das Wirtsgenom erfolgte nach *Sac*II Restriktion über homologe Rekombination in den *LAC4*-Lokus. Die Konstrukte stehen unter der Kontrolle des *LAC4* Promotors. Die Proteine werden als  $\alpha$ -mating-factor-Fusion exprimiert. Die Größen der erhaltenen Plasmide sind in Klammern angegeben.

## FLAG-Zygocin

Abbildung 19 zeigt einen Western Blot, bei welchem jeweils 30  $\mu$ l unkonzentrierter Kulturüberstand aufgetragen wurden. Die Detektion der sezernierten Proteine erfolgte mittels eines monoklonalen anti-FLAG-M2 Antikörpers colorimetrisch. Als Negativkontrolle wurde der Kulturüberstand des untransformierten *K. lactis* Stammes GG799 mitgeführt. Der Western Blot zeigte bei allen untersuchten Klonen eine einzelne deutliche Bande bei etwa 12 kDa, was der erwarteten Größe des FLAG-Zygocins von 11,4 kDa entsprach (vgl. Abbildung 19). Das Ergebnis des Western Blots lässt den Schluss zu, dass die Milchehefe *K. lactis* im Gegensatz zu *Z. bailii* ein effektives Expressionssystem für die Sekretion von Zygocin darstellt und dass das Toxin in signifikanter Menge sezerniert wird.

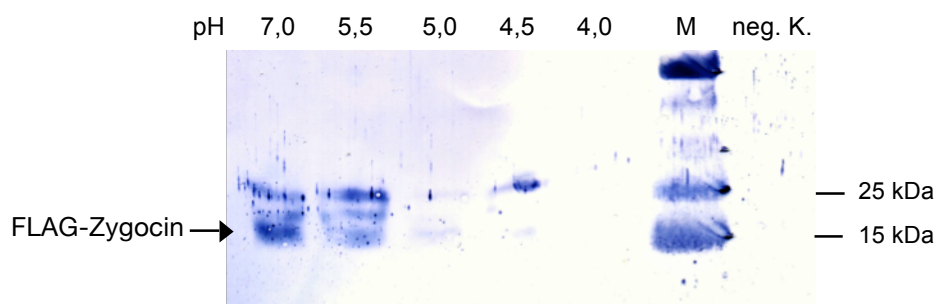


**Abbildung 19: Western Blot zum Nachweis der FLAG-Zygocin Expression und Sekretion in *K. lactis*.** Aufgetragen wurden jeweils 30 µl Kulturüberstand (reduzierende Bedingungen) von transformierten *K. lactis* GG799 Zellen, die für 3 Tage bei 30 °C in YPG kultiviert wurden. Die Trennung erfolgte in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel. Die Proteine wurden auf eine PVDF Membran geblottet und immunologisch mittels monoklonaler anti-FLAG M2 (1:10000) und sekundärer anti-Mouse IgG Antikörper (1:4000) colorimetrisch detektiert. Die Zahlen geben die aufgetragenen Klone wieder. M: Marker (PageRuler™ [FERMENTAS]), -: Negativkontrolle (untransformierter *K. lactis* Stamm GG799).

Die erste Expression von FLAG-Zygocin wurde in Komplexmedium mit Galaktose zur Induktion der Expression und bei einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt. Für einen Test auf Toxizität des sezernierten Toxins war es erforderlich, die Expression bei einem pH-Wert von etwa 4,0 durchzuführen, da bei diesem Wert das pH-Optimum des Toxins liegt. Auch war es notwendig, die Expression in synthetischem Medium durchzuführen, da eine Konzentrierung des Kulturüberstandes durch Ultrafiltration über eine 10 kDa Membran mit Vollmedium nicht möglich ist. Da in den vorangegangenen Western Analysen nahezu alle untersuchten Klone hinsichtlich der Stärke der Sekretion etwa gleich starke Signale lieferten, wurde ein Klon (Nr. 19) für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Nach Kultivierung und Expression der Hefe *K. lactis* in B-Medium (vgl. 2.4.2) mit Galaktose bei einem pH-Wert von 4,0 war im Western Blot keine Sekretion von FLAG-Zygocin zu detektieren (Ergebnis nicht gezeigt). Die Kulturüberstände zeigten keine Toxizität im MBA-Test. Dies konnte auch bei den ebenfalls untersuchten 50-fach konzentrierten Kulturüberständen beobachtet werden. Um ausschließen zu können, dass das beobachtete Ergebnis auf den pH-Wert oder auf das verwendete Medium zurückzuführen war, wurden weitere Expressionsversuche bei unterschiedlichen pH-Werten und in verschiedenen Medien durchgeführt. Zwei Klone (Nr. 8 und 19) wurden in fünf verschiedenen Ansätzen mit jeweils 20 ml YPG-Medium im Erlenmeyerkolben kultiviert. Folgende pH-Werte

wurden eingesetzt: 7,0; 5,5; 5,0; 4,5 und 4,0. Jeweils 30 µl zellfreier Kulturüberstand wurden für die SDS-PAGE eingesetzt. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis des Western Blots nach colorimetrischer Entwicklung mit monoklonalem anti-FLAG-M2 Antikörper.



**Abbildung 20: Western Blot zum Nachweis der FLAG-Zygocin Expression und Sekretion in *K. lactis* bei verschiedenen pH-Werten.** *K. lactis* GG799 wurde in YPG mit den angegebenen pH-Werten bei 30 °C über zwei Tage inkubiert. Jeweils 30 µl Kulturüberstand wurden unter nichtreduzierenden Bedingungen in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels eines monoklonalen anti-FLAG-M2 (1:10000) und eines sekundären anti-Maus IgG AP (1:4000) Antikörpers colorimetrisch. M: Marker (PageRuler™ [FERMENTAS]), neg. K.: Negativkontrolle (untransformierter *K. lactis* GG799 Stamm).

Der Kulturüberstand einer nicht transformierten *K. lactis* GG799 Kultur diente in diesem Blot als Negativkontrolle. Der Blot zeigte eine deutliche Bande bei etwa 15 kDa, was dem FLAG-Zygocin entspricht, und eine größere Bande bei etwa 25 kDa. Da der Blot unter nichtreduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde, könnte diese Bande ein Dimer des FLAG-Zygocins darstellen. Die Negativkontrolle zeigte keinerlei Signale. Es war zu beobachten, dass bei einem pH-Wert von 7,0 die am stärksten ausgeprägte Proteinbande detektiert werden konnte. Bei einem pH-Wert von 5,5 wurde deutlich weniger Protein nachgewiesen. Bei den pH-Werten 5,0 und 4,5 ließen sich nur noch äußerst geringe Mengen des Proteins detektieren. Bei einem pH-Wert von 4,0 ließ sich im Vollmedium keinerlei Protein mehr nachweisen. Diese Ergebnisse wurden auch bei Verwendung des synthetischen B-Mediums bei den entsprechenden pH-Werten erhalten, wobei hier die Signale im Western Blot insgesamt schwächer ausgeprägt waren (nicht gezeigt). Bei niedrigen pH-Werten scheint *K. lactis* nicht in der Lage zu sein, Zygocin zu sezernieren, wobei die Kulturen bei den unterschiedlichen pH-Bedingungen



keinerlei Unterschiede im Zellwachstum zeigten. Die Expressionsversuche bei verschiedenen pH-Werten wurden zusätzlich mit unterschiedlichen SC-Medien wiederholt, allerdings zeigte sich immer das gleiche Ergebnis. Bei pH-Werten unter 5,5 ließ sich nur noch eine sehr geringe Expression des getaggen Toxins nachweisen. Aufgrund dieser Beobachtung und dem Fehlen der Toxizität wurden keine weiteren Toxinvarianten mehr in *K. lactis* zur Expression gebracht. Diese Hefe scheint für eine Sekretion von nativem Zygotin bei niederen pH-Werten ungeeignet zu sein.

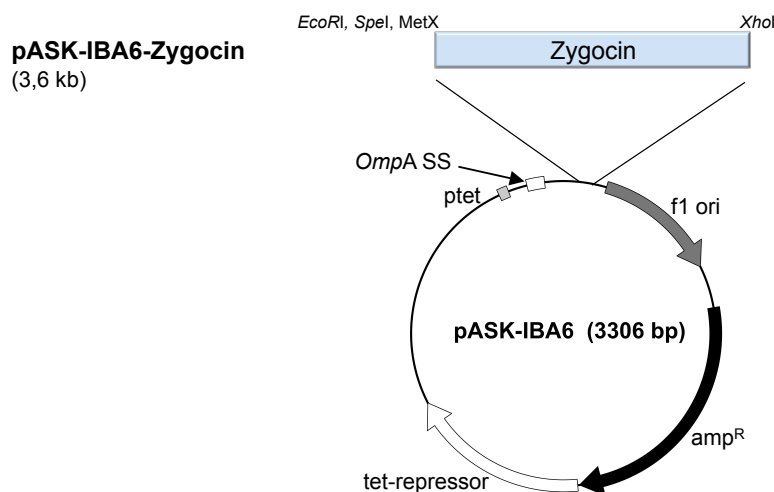
### **3.8. Zygotin Expression in *E. coli***

#### **3.8.1. Periplasmatische Expression von Zygotin in *E. coli***

Ein weiterer Versuch zur Expression und Sekretion von Zygotin in das Periplasma von *E. coli* wurde mit dem pASK-IBA6 Vektor der Firma IBA unternommen. Die Expression der klonierten Zielgene wird bei diesem Vektor durch den stark induzierbaren Tetracyclin-Promotor (*tetA*) gesteuert. Dieser Promotor erreicht etwa 25 % der Expressionsstärke des T7 Promotors (Serka, 1997; Korpela *et al.*, 1998) und wird durch Zugabe von 200 ng/ml Anhydrotetracyclin voll induziert. Diese geringe Menge Anhydrotetracyclin hat noch keinen antibiotischen Effekt auf *E. coli*. Der Promotor wird durch den ebenfalls auf dem Plasmid lokalisierten *tet*-Repressor kontrolliert und verhindert ohne den Inducer (Anhydrotetracyclin) vollständig die Expression. Da der Repressor ebenfalls auf dem Plasmid lokalisiert ist, gibt es bei der Wahl des geeigneten *E. coli* Stamms bzw. des verwendeten Mediums keine Beschränkung, denn der *tetA*-Promotor/Repressor ist mit keinem zellulären Regulationsmechanismus gekoppelt. Der hier verwendete Vektor pASK-IBA6 verfügt über einen Ampicillin-Resistenz Marker, ein *OmpA*-Sekretionssignal, ein N-terminales *Strep*-tag II<sup>®</sup> und einer nachfolgenden MCS. Das *OmpA*-Sekretionssignal führt zu einer Sekretion des zu exprimierenden Proteins in das Periplasma. Während der Sekretion wird das Sekretionssignal abgespalten, so dass ein N-terminal *Strep*-tag II<sup>®</sup>-markiertes Zielprotein im Periplasma lokalisiert vorliegt. Das in diesem Vektor verwendete

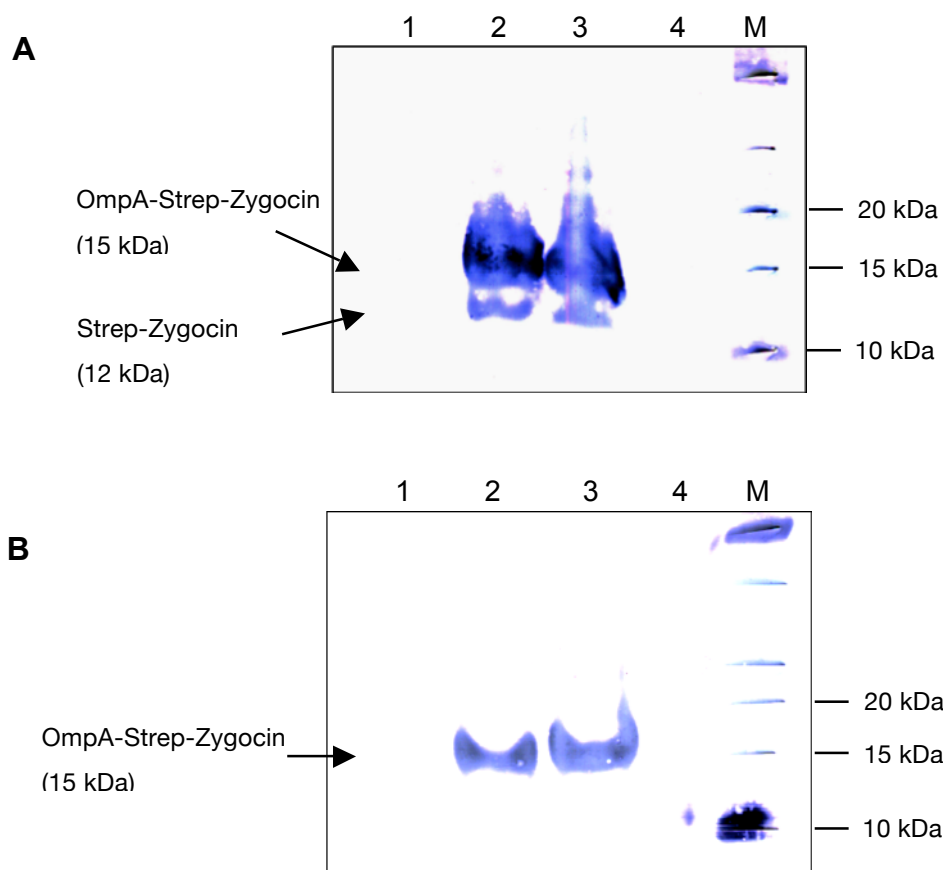
*Strep*-tag II<sup>®</sup> ist ein acht Aminosäure kurzes Peptid (WSHPQFK), welches sowohl die Detektion der heterolog exprimierten Proteine im Western Blot über monoklonale anti-Strep Antikörper ermöglicht, als auch eine Einschritt-Reinigung des exprimierten Proteins über eine *Strep*-Tactin<sup>®</sup> Säule (Skerra & Schmidt, 2000; Schmidt *et al.*, 2000; Schmidt & Skerra, 2007). Zwischen dem *OmpA* Sekretionssignal und dem *Strep*-tag II<sup>®</sup> befindet sich ein zwei Aminosäure langer Linker (AS). Dem *Strep*-tag II<sup>®</sup> folgt eine Faktor Xa Proteaseschnittstelle, die es ermöglicht, den Tag nach der Reinigung über *Strep*-Tactin<sup>®</sup> komplett zu entfernen. Nach Angaben des Manuals der Firma IBA ist eine solche Spaltung nicht notwendig, da der Tag keinen Einfluss auf den Fusions-Partner ausübt.

Zur Klonierung des Zygozins wurde das Gen mit den Primern 5'-Zygo-Eco,Spe MetX und 3'-Zygo Xho, Bam amplifiziert, als Template für die PCR diente pREP-Zygo. Mit dem 5'-Primer wurden sowohl *EcoRI* und *SpeI* Schnittstellen als auch ein Startcodon und eine Faktor Xa Protease-Schnittstelle eingefügt. Am 3'-Ende wurde das Gen nach dem Stopcodon um eine *XhoI* und eine *BamHI* Schnittstelle ergänzt. Die eingefügte Proteaseschnittstelle diente dazu, einen nach Spaltung möglichst unveränderten N-Terminus des Zygozins zu erhalten. Durch die gewählte Klonierung über *EcoRI/BamHI* würde der N-Terminus um acht Aminosäuren verlängert, wenn die Vektor-eigene Faktor Xa Protease Schnittstelle zur Spaltung verwendet würde. Mit der durch den Primer eingefügten Faktor Xa Schnittstelle würde nach Spaltung der korrekte N-Terminus des Zygozins entstehen. Nach erfolgter PCR wurde das Gen in den pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> Vektor zwischengeklont und sequenziert. Die Klonierung in den pASK-IBA6 Vektor erfolgte über Ligation nach *EcoRI/BamHI* Verdau, in den mit den gleichen Enzymen restringierten Vektor (Abbildung 21). Nach Transformation in *E. coli* TB1 Zellen, wurde der Erfolg der Ligation mittels Kolonie-PCR und Kontrollverdau überprüft.



**Abbildung 21: Schematische Darstellung des konstruierten *E. coli* Expressionsvektors für die periplasmatische Sekretion von Zygotin.** Das Zygotin-Konstrukt wurde durch PCR mit den Primern 5'-Zygo-Eco, Spe, MetX und 3'-Zygo Xho, Bam amplifiziert, wodurch ein Startcodon und eine Faktor Xa Proteaseschnittstelle vor das Zygotin-Gen angefügt wurden. Kloniert wurde Zygotin über EcoRI/XhoI in den mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen geschnittenen pASK-IBA6 Vektor. Das Zygotin-Gen steht unter der Kontrolle des induzierbaren tet-Promotors (ptet). Die Transformation erfolgte in *E. coli* TB1 Zellen. Die Größe des entstandenen Plasmids ist in Klammern angegeben (OmpA SS: OmpA Signal Sequenz).

Die Anzucht der Zellen, die das korrekte Plasmid trugen, erfolgte in 11 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben. Dazu wurde die Hauptkultur 2 %ig mit einer frischen Übernachtskultur beimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 220 rpm, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde. Die Kultur wurde durch Zugabe von 200 ng/ml Anhydrotetracyclin induziert und für drei weitere Stunden bei 37 °C inkubiert. Vor und während der Induktion wurden 1000 µl Probe entnommen, die nach Pelletieren in 40 µl reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und bis zur SDS-PAGE bei -20 °C gelagert wurden. Drei Stunden nach Induktion wurden die periplasmatischen Proteine durch einen kalten osmotischen Schock isoliert (vgl. 2.9.1.3, S.57). Um die Expression und die Sekretion von Zygotin in das Periplasma zu verifizieren, wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Von den beiden Ganzzelllysaten (vor und nach Induktion) wurden jeweils 12 µl, sowie 7,5 µl auf ein 12 %iges Tris-Tricin-Gel aufgetragen, von den periplasmatischen Proteinen nach dem kalten osmotischen Schock wurden 38 µl aufgetragen. Der Western Blot wurde mit monoklonalen anti-Strep Antikörpern (Verdünnung 1:5000, IBA) und sekundären anti-Maus-AP Antikörpern (Verdünnung 1:3300, SIGMA) colorimetrisch entwickelt. Das Ergebnis des Western Blots ist in Abbildung 22 A dargestellt.



**Abbildung 22: Western Blot zum Nachweis von Strep-Zygocin aus *E. coli*.** Mit pASK-IBA6-Zygocin transformierte *E. coli* TB1 Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert und danach mit 200 ng/ml Anhydrotetracycline induziert und für 3 h bei 37 °C kultiviert. Die Zellysate wurden aus 500 µl und 1000 µl Kultur präpariert. Die Proben wurden in einem 10 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die immunologische Detektion erfolgte mit anti-Strep (1:5000, IBA) und sekundären anti-Maus-AP-Antikörpern (1:3300, SIGMA) **A**: **1**: Gesamtzelllysate nicht induziert (12,5 µl) **2**: Gesamtprotein aus 500 µl Kultur 3 h induziert (12,5 µl) **3**: Gesamtprotein auf 1000 µl Kultur 3 h induziert (12,5 µl) **4**: Periplasmatische Proteine nach osmotischem Schock (37 µl) **M**: Precision Plus Kaleidoscope Marker (BIORAD) **B**: Gleiche Proben wie in A, je 7,5 µl Lysat und 37 µl periplasmatische Proteine wurden aufgetragen.

Im durchgeführten Western Blot ließ sich kein *Strep*-markiertes Zygocin in der periplasmatischen Fraktion nachweisen. Allerdings ließen sich zwei distinkte Banden bei den Gesamtzellprotein-Proben nachweisen. Die schwächere der beiden Banden besitzt eine Größe von etwa 12 kDa und stellt somit das *Strep*-getaggte Zygocin dar. Die stärkere Bande und somit größere Proteinmenge ist bei 15 kDa zu erkennen. Aufgrund der Größe des nachgewiesenen Proteins und auch der hohen Spezifität des verwendeten Antikörpers ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser Bande um das *Strep*-Zygocin mit nicht abgespaltener OmpA-Signal-Sequenz handelt, welches eine Größe von etwa 15 kDa besitzt. Die Wiederholung des Western Blots mit einer geringeren Proteinmenge (Abbildung

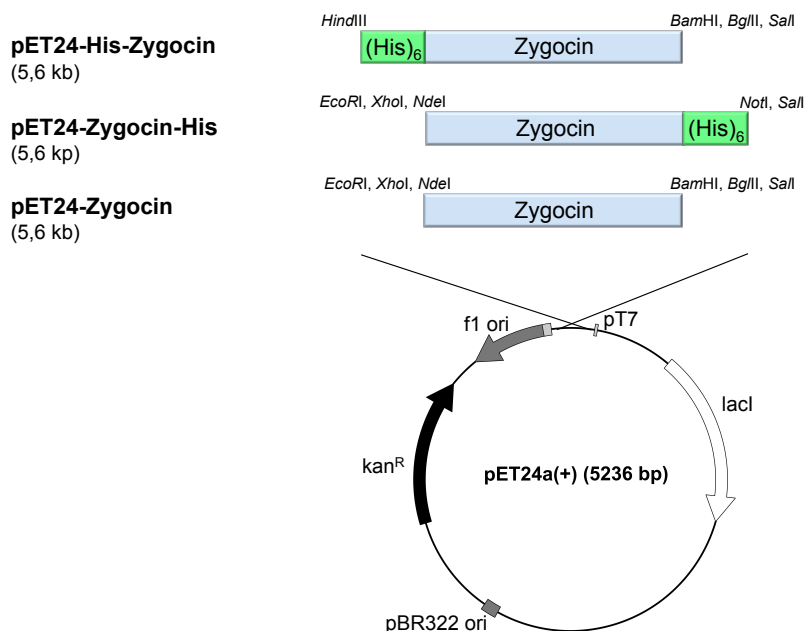
22 B) zeigte nur noch die Bande des etwa 15 kDa großen OmpA-Strep-Zygocins. Dies ist auf die geringere Proteinmenge zurückzuführen, wodurch die Menge von Strep-Zygocin unter die Nachweisgrenze des Antikörpers reduziert wurde. Ein ähnliches Ergebnis konnte mit den Zygocin-spezifischen Antikörpern gezeigt werden. Obwohl der Antikörper eine geringe Spezifität aufweist, wodurch viele Banden im hochmolekularen Bereich zu erkennen waren, ließ sich bei 15 kDa die Bande des OmpA-Strep-Zygocins detektieren (nicht dargestellt). Auch bei der Wiederholung der Expression in einem größeren Maßstab und einer längeren Expressionsdauer konnte kein Strep-Zygocin im Periplasma detektiert werden. Eine durchgeführte Reinigung des Strep-Zygocins aus der zytoplasmatischen Fraktion von *E. coli* nach Ultraschallaufschluss (vgl. 2.9.1.2, S. 57) mittels Strep-Tactin®-Säule zeigte, dass nur eine sehr geringe Menge Strep-Zygocin in löslicher Form vorlag. Der größte Teil des Proteins lag in Form von unlöslichen *inclusion bodies* vor (mittels Coomassie gefärbtem SDS-Gel nachgewiesen, nicht dargestellt). Expressionsversuche mit einer variierten Expressionsdauer, unterschiedlichen Induktionszeitpunkten (bei OD<sub>600</sub> von 0,2; 0,5; 1,0 und 1,5) und bei verschiedenen Induktionstemperaturen (20 °C, 28 °C und 30 °C) führten nicht zu einer signifikanten Steigerung an löslichem Strep-Zygocin. Fast das gesamte Protein lag in unlöslicher Form als *inclusion bodies* vor. Da auch die zytoplasmatischen Proteine keine Killeraktivität im MBA-Test (vgl. 2.9.10, S. 67) zeigten, weder vor noch nach einer versuchten Spaltung mit Faktor Xa, bei welcher das Strep-tag II® abgespalten und damit der native N-Terminus des Zygocins erhalten wurde, wurde auf eine weitergehende Untersuchung dieses Expressionssystems verzichtet.

### **3.8.2. Zytoplasmatische Zygocin Expression in *E. coli***

Zur zytoplasmatischen Expression von Zygocin in *E. coli* wurde das pET System der Firma NOVAGEN verwendet. Der gewählte Expressionsvektor pET24a(+) besitzt den stark induzierbaren T7-Promotor zur Expression des Zielgens. Durch die T7-RNA-Polymerase wird die Transkription induziert. Diese RNA-Polymerase liegt in dem verwendeten *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) chromosomal kodiert vor

und steht unter Kontrolle des IPTG induzierbaren lacUV5-Promotors (Studier & Moffatt, 1986). Nach vollständiger Induktion des Promotors werden fast die gesamten Ressourcen des Bakteriums zur Transkription des Zielgens verwendet. Das rekombinante Protein kann laut Herstellerangaben bereits nach wenigen Stunden die Hälfte der gesamten bakteriellen Proteinmenge ausmachen. Zur Selektion verfügt der verwendete pET24a(+) Vektor über einen Kanamycin-Resistenz Marker und die Möglichkeit, sowohl einen T7-Tag als auch einen (His)<sub>6</sub>-Tag direkt durch Klonierung in die MCS anzufügen.

Um das Zygocin-Gen in pET24a(+) klonieren zu können, wurden zusätzliche Restriktionsschnittstellen über PCR angefügt. Des Weiteren wurde eine Variante des Zygocins mit N-terminalem und eine Variante mit C-terminalem (His)<sub>6</sub>-Tag hergestellt, wobei die Tags ebenfalls über die Primer angefügt wurden. Die zur Expression konstruierten Vektoren sind in Abbildung 23 schematisch dargestellt. Die nicht getaggte Variante wurde mit den Primern 5'-Met Zygocin del ssPro Eco, Xho, Nde und 3'-Zygocin Sal, BglIII, BamHI amplifiziert. Die Variante mit N-terminalem (His)<sub>6</sub>-Tag wurde mit den Primern 5'-His-Zygocin-Hind, Sac und 3'-Zygocin Sal, BglIII, BamHI amplifiziert. Das C-terminal (His)<sub>6</sub> getaggte Konstrukt wurde mit den Primern 5'-Met Zygocin del ssPro Eco, Xho, Nde und 3'-Zygocin-His Sal, Not über PCR hergestellt. Alle erstellten Konstrukte besitzen sowohl ein Start- als auch ein Stopcodon, welche ebenfalls über die verwendeten Primer mit eingefügt wurden. Als Template für die PCR diente jeweils pREP-Zygo. Nach Zwischenklonierung in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor wurden die Gene sequenziert. Jeweils ein korrekt sequenziertes Plasmid wurde ausgewählt und über *HindIII/SalI* (His-Zygocin) bzw. *EcoRI/SalI* (Zygocin-His, Zygocin) in den mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen pET24a(+)-Vektor ligiert und mittels Elektroporation in *E. coli* BL21(DE3) transformiert (vgl. 2.8.10.1. S.47). Der Erfolg der Ligation wurde mittels Kolonie-PCR überprüft.

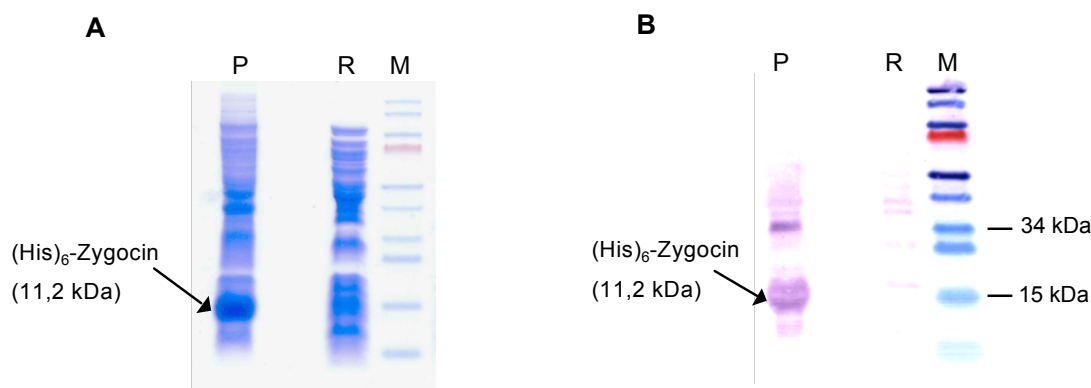


**Abbildung 23: Schematische Darstellung der konstruierten *E. coli* Expressionsvektoren.** Die Zygocin-Konstrukte wurden mittels PCR mit den Primern 5'-His-Zygocin-Hind, Sac und 3'-Zygocin Sal, BglIII, BamHI (His-Zygocin), 5'-Met Zygocin del ssPro Eco, Xho, Nde und 3'-Zygocin Sal, BglIII, BamHI (Zygocin) sowie 5'-Met Zygocin del ssPro Eco, Xho, Nde und 3'-Zygocin-His Sal, Not (Zygocin-His) amplifiziert. Es wurden jeweils ein Start- und ein Stopcodon durch die Primer eingefügt. Kloniert wurde über *SacI/SalI* (His-Zygocin) bzw. *EcoRI/SalI* (Zygocin, Zygocin-His) in den pET24a(+) Vektor. Das Zygocin-Gen steht unter der Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors (pT7). Die Transformation erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) Zellen. Die Größen der entstandenen Plasmide sind in Klammern angegeben.

### (His)<sub>6</sub>-Zygocin

Die Anzucht der (His)<sub>6</sub>-Zygocin exprimierenden *E. coli* BL21(DE3) Zellen erfolgte in 50 ml Kanamycin-haltigem Pepton/Trypton Medium in 300 ml Erlenmeyerkolben. Dazu wurde die Hauptkultur 10 %ig mit einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zur Induktion bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden beim Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 2 durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert und für weitere 24 h bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Um den Einfluss der Temperatur auf die Bildung von *inclusion bodies* bei der Expression verfolgen zu können, wurden die Kulturen bei unterschiedlichen Temperaturen (20 °C, 28 °C, 30 °C und 37 °C) unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (15 min, 5000 rpm, 4 °C) und in 3 ml 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer pro Gramm Feuchtgewicht aufgenommen. Nach erfolgtem Ultraschallaufschluss (vgl. 2.9.1.2, S. 57) wurden die Zelltrümmer und unlöslichen Proteine durch Zentrifugation (10 min, 23000 x g, 4 °C) von den löslichen Proteinen getrennt. Zur Überprüfung der (His)<sub>6</sub>-Zygocin Expression wurden sowohl die löslichen als auch die unlöslichen Fraktionen in einem SDS-Gel getrennt und zum Nachweis der

Proteine Coomassie gefärbt (vgl. 2.9.6, S. 63) und im Western Blot eingesetzt. Abbildung 24 zeigt exemplarisch ein Expressionsergebnis bei 37 °C. Bei allen weiteren getesteten Temperaturen konnte das gleiche Ergebnis beobachtet werden. (His)<sub>6</sub>-Zygocin (11,2 kDa) ließ sich in der Pellet Fraktion als deutlich überexprimierte Proteinbande detektieren (vgl. Abbildung 24 A), wohingegen in der die löslichen Proteine enthaltene Rohextraktfraktion keine überexprimierte Proteinbande zu erkennen war. Das Protein liegt somit in Form unlöslicher *inclusion bodies* vor. Ein mit den gleichen Proben durchgeführter Western Blot (vgl. Abbildung 24 B), der mit spezifischen anti-(His)<sub>6</sub>-Antikörpern (ROCHE) entwickelt wurde, zeigte bei den Proben der unlöslichen Proteine ein starkes Signal bei etwa 14 kDa, welches das (His)<sub>6</sub>-Zygocin darstellt. Ein im Blot ebenfalls zu detektierendes Signal bei etwa 34 kDa ist auf unspezifische Wechselwirkungen des anti-(His)<sub>6</sub> Antikörpers zurückzuführen. Sowohl im Western Blot als auch im Coomassie gefärbten Gel ließ sich kein überexprimiertes (His)<sub>6</sub>-Zygocin im Rohextrakt nachweisen, somit ist davon auszugehen, dass das Protein ausschließlich in Form unlöslicher *inclusion bodies* vorliegt.



**Abbildung 24: SDS-PAGE und Western Blot nach Expression von (His)<sub>6</sub>-Zygocin in *E. coli* BL21(DE3).** Mit pET24-His-Zygocin transformierte *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert und durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert und für 20 h bei 37 °C inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Die Proben wurden in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt (A) oder auf eine PVDF-Membran geblottet und mit primären anti-(His)<sub>6</sub> Antikörpern und sekundären anti-Maus-AP Antikörpern im Western Blot nachgewiesen (B). **P:** Pellet nach Ultraschallaufschluss; **R:** Rohextrakt nach Zellaufschluss; **M:** PageRuler™ Prestained Protein Ladder (FERMENTAS).

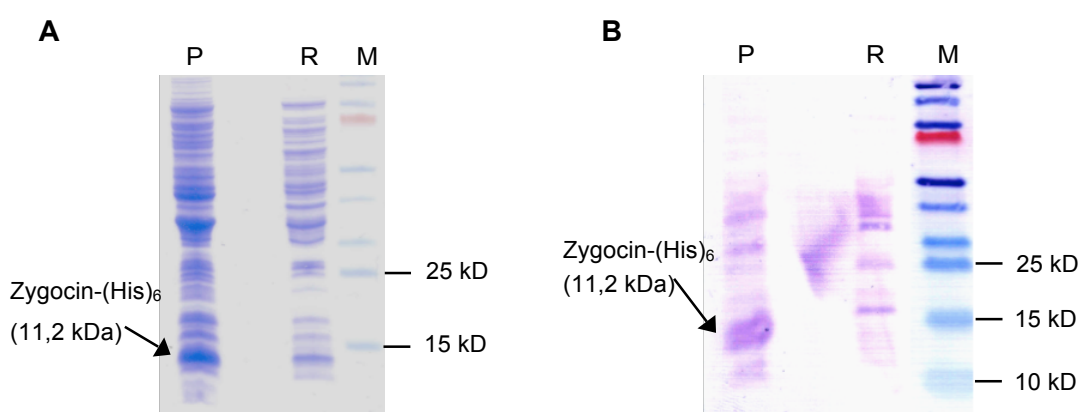
Expressionsversuche mit unterschiedlichen Induktionszeitpunkten (OD<sub>600</sub> 0,6; 1,4; 1,5 und 4,0) sowie unterschiedlicher Induktionsdauer (zwischen 1 und 20 h) bei jeweils verschiedenen Temperaturen (20 °C, 28 °C, 30 °C und 37 °C) zeigten keinen Einfluss auf die Löslichkeit von (His)<sub>6</sub>-Zygocin. Bei allen untersuchten



Bedingungen lag das Protein ausschließlich in Form von *inclusion bodies* vor. Im Weiteren wurde daher versucht, die *inclusion bodies* zu denaturieren, um das Protein anschließend wieder zu renaturieren und in biologisch aktive Form zu überführen.

### Zygocin-(His)<sub>6</sub>

Zur Expression der C-terminal (His)<sub>6</sub>-getaggtten Zygocin-Variante wurde ausgehend vom vorherigen Ergebnis die Expression bei drei unterschiedlichen Temperaturen untersucht (20 °C, 28 °C und 37 °C). Die entsprechenden *E. coli* BL21(DE3) Kulturen mit pET24-Zygocin-His wurden dazu bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,0 mit 100 µM IPTG induziert und bei den entsprechenden Temperaturen für 20 h unter Schütteln kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. 2.9.1.2, S. 57). Zur Überprüfung der Expression wurden die Proben des Rohextraktes und der nichtlöslichen Proteine in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abbildung 25 A). Abbildung 25 zeigt exemplarisch ein solches Gel und einen entsprechenden Western Blot eines Expressionsergebnisses bei 37 °C. Der Nachweis des C-terminal (His)<sub>6</sub>-getaggtten Zygocins erfolgte mit monoklonalen anti-(His)<sub>6</sub> Antikörpern und sekundären anti-Maus-AP Antikörpern im Western Blot (Abbildung 25 B).



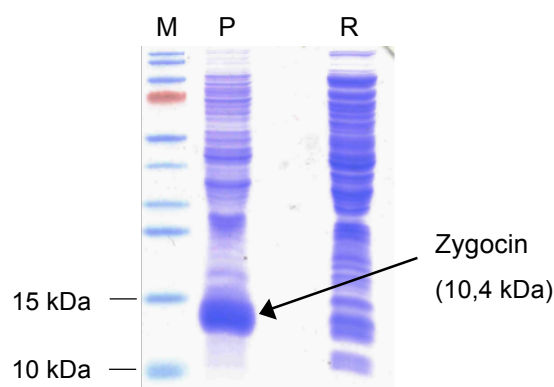
**Abbildung 25: SDS-PAGE und Western Blot nach Expression von Zygocin-(His)<sub>6</sub> in *E. coli* BL21(DE3).** Mit pET24-Zygocin-His transformierte *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 kultiviert und durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert und für 20 h bei 37 °C inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die Proben wurden in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt (A) oder auf eine PVDF-Membran geblottet und mit primären anti-(His)<sub>6</sub> Antikörpern und sekundären anti-Maus-AP Antikörpern im Western Blot nachgewiesen (B). **P:** Pellet nach Ultraschallaufschluss; **R:** Rohextrakt nach Zellaufschluss; **M:** PageRuler™ Prestained Protein Ladder (FERMENTAS).

Im Coomassie gefärbten Gel zeigte sich deutlich eine überexprimierte Bande in der Pelletfraktion (vgl. Abbildung 25 A), was darauf hindeutet, dass auch das C-terminal (His)<sub>6</sub>-getaggte Zygocin in Form von unlöslichen *inclusion bodies* vorliegt. Im Rohextrakt ließ sich eine etwas stärkere Bande von etwa gleicher Größe wie das überexprimierte Zygocin-(His)<sub>6</sub> in der Pelletfraktion detektieren. Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem Protein um die löslich Form des Zygocin-(His)<sub>6</sub> handelte, wurde mit den Proben ein Western Blot durchgeführt, der mit anti-(His)<sub>6</sub> spezifischen monoklonalen Antikörpern und sekundären anti-Maus-AP Antikörpern entwickelt wurde (vgl. Abbildung 25 B). Der Western Blot zeigte nur in der Pelletfraktion ein starkes Signal bei etwa 13 kDa, welches Zygocin-(His)<sub>6</sub> darstellt. Im Rohextrakt ließ sich kein entsprechendes Protein detektieren. Die Bande im Coomassie gefärbten Gel stellt somit ein *E. coli* eigenes Protein dar. Die ebenfalls im Western Blot zu detektierenden Banden im höhermolekularen Bereich und die Bande bei etwa 16 kDa im Rohextrakt sind auf unspezifische Wechselwirkungen des verwendeten Antikörpers zurückzuführen. Eine mit dem erhaltenen Rohextrakt durchgeführte Affinitätschromatographie (Ni-Sepharose-Matrix) (vgl. 2.10.4, S. 71) bestätigte das Ergebnis des Western Blots, es war keine Reinigung von Zygocin-(His)<sub>6</sub> aus dem Rohextrakt möglich (nicht dargestellt). Die Induktionsversuche bei unterschiedlichen Temperaturen lieferten das gleiche Ergebnis. Eine Detektion des C-terminal (His)<sub>6</sub>-getaggtten Zygocins war nur in der Pelletfraktion möglich. Somit lag auch diese Zygocin-Variante ausschließlich in Form unlöslicher *inclusion bodies* vor.

### **Zygocin**

Die ebenfalls in pET-24a(+) klonierte, nichtgetaggte Variante von Zygocin wurde ausgehend von den vorherigen Versuchen in *E. coli* BL21(DE3) zur Expression gebracht. Dazu wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bei 37 °C kultiviert, danach mit 100 µM IPTG induziert und bei 20 °C, 28 °C und 37 °C für 20 h inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen erfolgte der Zellaufschluss per Ultraschall (vgl. 2.9.1.2, S. 57). Abbildung 26 zeigt exemplarisch ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel. Hier wurden Proben der Expression bei 20 °C aufgetragen. Deutlich ist ein stark überexprimiertes Protein in der Pelletfraktion bei etwa 13 kDa zu

erkennen. Bei diesem Protein handelt es sich wahrscheinlich um nichtlösliches Zygocin in Form von *inclusion bodies*. Im Rohextrakt war kein überexprimiertes Protein dieser Größe zu detektieren. Aufgrund der unspezifischen polyklonalen anti-Zygocin Antikörper war keine spezifische Detektion von Zygocin in der Pelletfraktion bzw. im Rohextrakt möglich (nicht dargestellt).



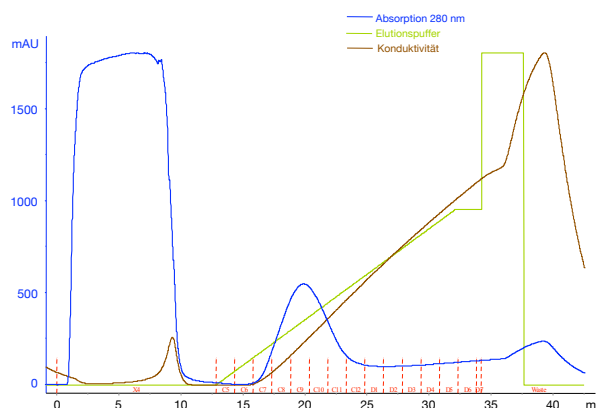
**Abbildung 26: SDS-PAGE nach Expression von Zygocin in *E. coli* BL21(DE3).** Mit pET24-Zygocin transformierte *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 kultiviert, durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert und für 20 h bei 20 °C kultiviert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Die Proben wurden in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt **P**: Pellet nach Ultraschallaufschluss; **R**: Rohextrakt nach Zellaufschluss; **M**: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, (FERMENTAS).

### 3.8.3. Reinigung von *inclusion bodies*

In *E. coli* konnten keine löslichen Varianten von (His)<sub>6</sub>-Zygocin, Zygocin bzw. Zygocin (His)<sub>6</sub> zytoplasmatisch exprimiert werden, daher wurde eine Reinigung der *inclusion bodies* durchgeführt. Die Denaturierung der *inclusion bodies* wurde sowohl mit Harnstoff als auch mit Guanidin-Hydrochlorid durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der chromatographischen Reinigungen nach den beiden Denaturierungsmethoden am Beispiel von (His)<sub>6</sub>-Zygocin dargestellt. Die Reinigung von Zygocin-(His)<sub>6</sub> erfolgte nach gleicher Vorgehensweise, allerdings gelang damit keine Reinigung über Ni-Sepharose Affinitäts-Chromatographie (nicht dargestellt). Daher wurde im Weiteren die Reinigung und das Rückfalten des Proteins (His)<sub>6</sub>-Zygocin aus *inclusion bodies* untersucht.

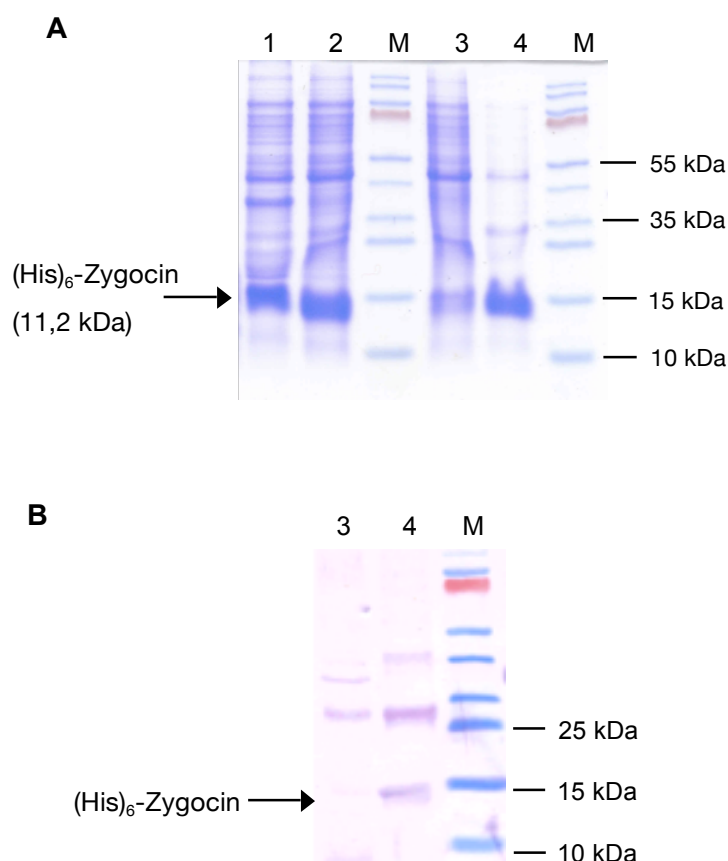
### 3.8.3.1. Denaturierung und Reinigung von *inclusion bodies* mittels Harnstoff

Um (His)<sub>6</sub>-Zygocin *inclusion bodies* zu reinigen, wurde eine 250 ml Kultur (pET24-(His)<sub>6</sub>-Zygocin in BL21(DE3)) in Pepton/Trypton-Medium bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 2,0 wurde die Produktion des Proteins durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration im Medium 100 µM) induziert. Nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen abzentrifugiert, in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (50mM, pH 7,0) resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. 2.9.1.2, S.57). Das nach erneuter Zentrifugation erhaltene Pellet mit den *inclusion bodies* wurde in 20 ml Waschpuffer aufgenommen, zur besseren Resuspendierung mit Ultraschall beschallt (vgl. 2.9.2.1, S. 59) und anschließend abzentrifugiert. Die gereinigten *inclusion bodies* wurden in 10 ml Solubilisierungspuffer aufgenommen, bei Raumtemperatur zum Resuspendieren des Pellets gevortext und über Nacht bei 4 °C gerührt. Die unlöslichen Partikel wurden durch Zentrifugation (40000 x g, 25 min, 8 °C) pelletiert. Die denaturierten *inclusion bodies* wurden einer Ni-Sepharose Affinitätschromatographie unterzogen (vgl. 2.10.4, S.71). Dazu wurde der gesamte Ansatz auf eine 1 ml FF-Chelating Crude Säule (GE HEALTHCARE) mit einer Geschwindigkeit von 0,35 ml/min aufgetragen. Abbildung 27 zeigt das Elutionsdiagramm einer solchen Reinigung. Die Elution der Proteine erfolgte mit Hilfe eines linearen Gradienten 0 bis zu 0,5 M Imidazol in Solubilisierungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M Harnstoff, 0,5 M NaCl) bei einer Geschwindigkeit von 0,7 ml/min. Das denaturierte Protein wurde in fünf 1,5 ml Fraktionen eluiert.



**Abbildung 27: Elutionsdiagramm der Ni-Sepharose Affinitätschromatographie der mit Harnstoff denaturierten (His)<sub>6</sub>-Zygocin *inclusion bodies*.** Verwendete Säule: 1 ml His-Trap-FF-Crude (GE HEALTHCARE); Laufpuffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M Harnstoff, 0,5 M NaCl; Auftraggeschwindigkeit: 0,35 ml/min, Elutionsgeschwindigkeit: 0,7 ml/min, Elutionsgradient: 20 CV bis 0,26 M Imidazol. **blau:** Absorption bei 280 nm; **braun:** Konduktivität; **grün:** Konzentration Puffer B (bis 0,5 M Imidazol), Fraktionsgröße 1,5 ml.

Um die Reinheit des (His)<sub>6</sub>-Zygocin nach der Chromatographie zu bestimmen, wurden die gepoolten Elutionsfraktionen sowie Proben der Zwischenschritte bei der *inclusion bodies* Denaturierung auf ein SDS-Gel aufgetragen, Coomassie gefärbt und in einem Western Blot untersucht (Abbildung 28). Die Proben wurden dazu in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. In Spur 4, in welcher die gepoolten Elutionsfraktionen aufgetragen wurden, ist im Coomassie gefärbten Gel eine starke Bande bei etwa 14 kDa zu erkennen, welche (His)<sub>6</sub>-Zygocin darstellt (Abbildung 28 A). Im gefärbten Gel waren in dieser Spur zwei weitere schwächere Banden bei etwa 50 kDa und 34 kDa zu erkennen, welche Verunreinigungen darstellen, die durch die Affinitätschromatographie nicht entfernt werden konnten. Es konnte somit keine vollständige Reinigung von (His)<sub>6</sub>-Zygocin erreicht werden. Für die weiteren Untersuchungen zur Rückfaltung des Proteins sollte diese Reinheit ausreichend sein. Auf dem Gel war auch zu erkennen, dass nicht das gesamte aufgetragene (His)<sub>6</sub>-Zygocin von der Säulenmatrix gebunden wurde, da im Durchfluss noch ein Teil des (His)<sub>6</sub>-Zygocins nachweisbar war. Der Western Blot, der mittels monoklonaler anti-(His)<sub>6</sub>-Antikörper und sekundärer anti-Maus-AP Antikörper entwickelt wurde (Abbildung 28 B), bestätigte, dass es sich bei der starken Bande um (His)<sub>6</sub>-Zygocin handelt. Die beiden Verunreinigungen (Banden bei etwa 50 kDa und 34 kDa) ließen sich ebenfalls mit dem verwendeten Antikörper detektieren, was die geringe Spezifität der verwendeten Antikörper deutlich macht.

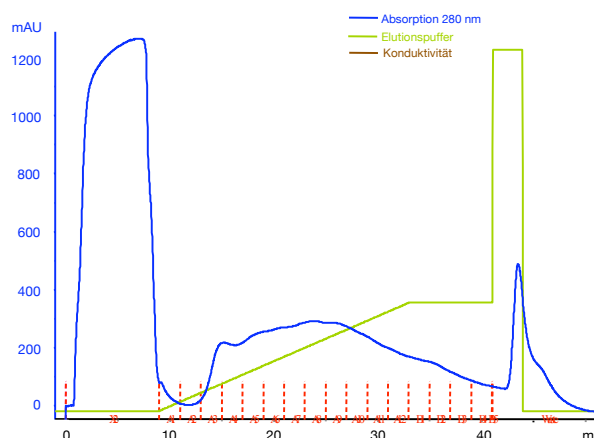


**Abbildung 28: SDS-PAGE nach *inclusion body* Denaturierung mit Harnstoff und anschließender Affinitätschromatographie.** Verwendet wurde ein 12 %iges Tris-Tricin-Gel **A: Coomassie gefärbtes Gel.** **1:** Pellet nach Ultraschall; **2:** Denaturierte *inclusion bodies*; **3:** Durchfluss der Affinitätschromatographie; **4:** gepoolter Elutionspeak der Chromatographie; **M:** PageRuler™ Prestained Protein Ladder (FERMENTAS) **B: Western Blot,** entwickelt mit anti-(His)<sub>6</sub> Antikörpern (ROCHE) und sekundären anti-Maus-AP Antikörpern (SIGMA).

### 3.8.3.2. Denaturierung und Reinigung von *inclusion bodies* mittels Guanidin-Hydrochlorid

Um *inclusion bodies* mittels Guanidin-Hydrochlorid zu denaturieren (vgl. 2.9.2.2, S. 60), wurden 400 ml Pepton/Trypton-Medium mit der entsprechenden (His)<sub>6</sub>-Zygocin exprimierenden *E. coli* BL21(DE3) Kultur beimpft, bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2,0 kultiviert, anschließend durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert und für 24 h bei 37 °C kultiviert. Die pelletierten Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen, die nichtlöslichen Bestandteile mit Waschpuffer gewaschen, die *inclusion bodies* danach in 40 ml Solubilisierungspuffer (50 mM Tris pH 8,0; 20 mM DTT; 6 M Guanidin-Hydrochlorid) aufgenommen und bei 4 °C über Nacht

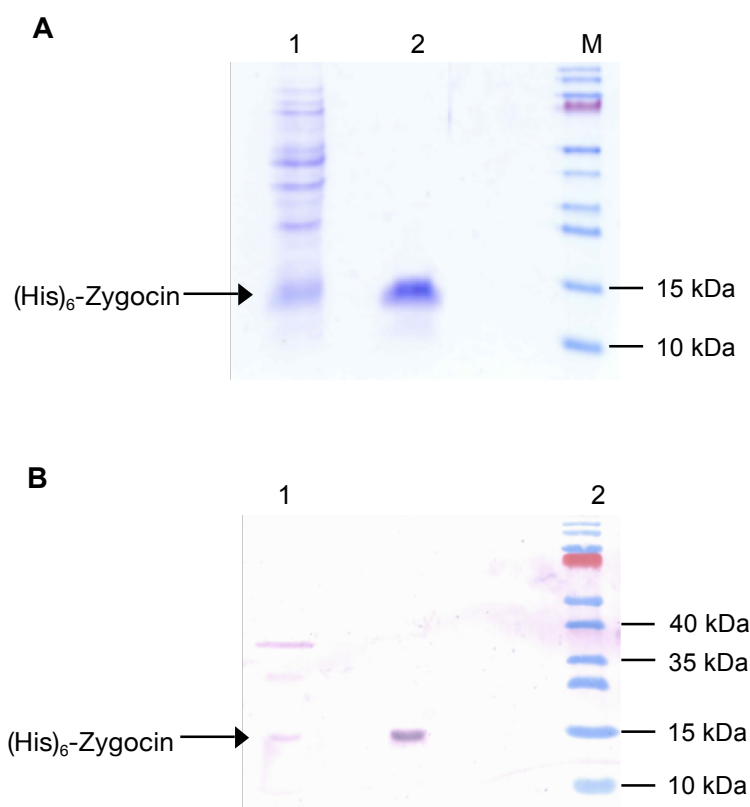
gerührt. Durch Zentrifugation (26000 x g, 30 min; 4 °C) wurden die nichtlöslichen Bestandteile entfernt. Um die Proben in einer SDS-PAGE untersuchen zu können, musste zuerst das Guanidin-Hydrochlorid durch Fällung entfernt werden (vgl. Ethanol-fällung 2.9.4, S. 61), da es das Laufverhalten im SDS-Gel beeinträchtigt. Zur Überprüfung der Denaturierung wurden die gefällten Proben anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Coomassie gefärbt (nicht dargestellt). Die denaturierten Proteine wurde auf eine 1 ml FF Chelating Crude Säule (GE HEALTHCARE) bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,35 ml/min aufgetragen. Als Laufpuffer diente der Solubilisierungspuffer, die Elution der Proteine erfolgte mittels eines linearen Imidazol-Gradienten (bis 0,15 M Imidazol) in Laufpuffer über eine Länge von 25 Säulenvolumen mit einer Geschwindigkeit von 0,7 ml/min. Das Elutionsdiagramm eines solchen Laufes, bei dem 10 ml gelöste *inclusion bodies* aufgetragen wurden, ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Elution des (His)<sub>6</sub>-Zygocins erfolgte in einem breiten Peak über 14 Fraktionen (je 1,5 ml Fraktionen).



**Abbildung 29: Elutionsdiagramm einer Ni-Sepharose Affinitätschromatographie der mit Guanidin-Hydrochlorid denaturierten (His)<sub>6</sub>-Zygocin *inclusion bodies*.** Verwendete Säule: 1 ml His-Trap-FF-Crude, Laufpuffer: Guanidin-Hydrochlorid-Solubilisierungspuffer, Auftrageschwindigkeit: 0,35 ml/min, Elutionsgeschwindigkeit: 0,7 ml/min, Elutionsgradient: 25 CV bis 0,15 M Imidazol. **blau:** Absorption bei 280 nm; **grün:** Konzentration Puffer B (bis 0,5 M Imidazol in Laufpuffer), Fraktionsgröße 1,5 ml.

Sowohl eine Probe der nicht an die Säule gebundenen Proteine als auch eine Probe des gepoolten Elutionspeaks wurden mittels Ethanol gefällt und auf ein 12 %iges Tris-Tricin-Gel aufgetragen. Abbildung 30 zeigt das Coomassie gefärbte Gel und den Western Blot, welcher mit monoklonalen anti-(His)<sub>6</sub>-Antikörpern (GE HEALTHCARE) entwickelt wurde. Im Coomassie gefärbten Gel ist zu

erkennen, dass (His)<sub>6</sub>-Zygocin bis zur Homogenität gereinigt werden konnte, keinerlei Verunreinigungen waren zu detektieren. Allerdings ließen sich sowohl im Coomassie Gel als auch im Western Blot (His)<sub>6</sub>-Zygocin Signale im Durchfluss der Chromatographie nachweisen. Die aufgetragene Proteinmenge überstieg somit die Bindekapazität der Säulenmatrix.



**Abbildung 30: SDS-PAGE nach Denaturierung der (His)<sub>6</sub>-Zygocin inclusion bodies mit Guanidin-Hydrochlorid und anschließender Affinitätschromatographie.** Verwendet wurde ein 12 %iges Tris-Tricin-Gel **A: Coomassie gefärbtes Gel.** **1:** Durchfluss bei der Affinitätschromatographie; **2:** gepoolter Elutionspeak der Chromatographie; **M:** PageRuler™ Prestained Protein Ladder (FERMENTAS) **B: Western Blot,** entwickelt mit anti-(His)<sub>6</sub>-Antikörpern (GE HEALTHCARE) und sek. anti-Maus-AP Antikörpern (SIGMA).

Im Western Blot ließen sich noch zwei weitere Banden bei der Durchfluss-Probe erkennen (bei etwa 25 kDa und bei etwa 37 kDa). Hierbei handelt es sich um eine unspezifische Wechselwirkung des verwendeten anti-(His)<sub>6</sub>-Antikörpers. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Denaturierung und anschließende affinitätschromatographische Reinigung von (His)<sub>6</sub>-Zygocin inclusion bodies mittels 6 M Guanidin-Hydrochlorid effektiver funktionierte und ein reineres Protein



erhalten werden konnte, als dies durch eine Denaturierung mittels 8 M Harnstoff und anschließender Affinitätschromatographischen Reinigung der Fall war. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Rückfaltungsversuche die Methode der Denaturierung mittels Guanidin-Hydrochlorid angewendet.

#### **3.8.4. Rückfaltung gereinigter (His)<sub>6</sub>-Zygodin *inclusion bodies***

Für die Versuche der Rückfaltung von (His)<sub>6</sub>-Zygodin aus *inclusion bodies* wurden 500 ml Pepton/Trypton-Medium mit den entsprechenden pET24-His-Zygodin tragenden *E. coli* BL21(DE3) Zellen angeimpft und, wie oben bereits beschrieben, bei einer OD<sub>600</sub> von 2,0 mittels IPTG induziert und anschließend durch Ultraschall aufgeschlossen. Die erhaltenen *inclusion bodies* wurden dreimal gewaschen, mit 50 ml Guanidin-Hydrochlorid Solubilisierungspuffer versetzt und bei 4 °C unter Rühren über Nacht denaturiert. Die nichtlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (26000 x g, 30 min; 4 °C) entfernt. Anschließend wurde versucht, die denaturierten Proteine durch verschiedene Methoden wieder rückzufalten, einerseits über Dialyse gegen einen nicht denaturierenden Puffer, andererseits durch starke Verdünnung der denaturierten Proteine in einen Puffer mit geringer Guanidin-Hydrochlorid Konzentration. Auch wurde eine Säulen-basierte Variante der Rückfaltung untersucht. Dazu erfolgte zuerst eine Bindung der solubilisierten *inclusion bodies* an die Ni-Sepharose Matrix einer Säule (vgl. 3.8.3.2), ohne dass das Protein von der Säule eluiert wurde. Anschließend wurde sowohl eine Umpufferung als auch eine kontinuierliche Reduktion der Konzentration des denaturierenden Reagenz (Guanidin-Hydrochlorid) an der Matrix durchgeführt. Als Puffer diente dabei ein 20 mM Citrat-Phosphat Puffer mit 200 mM NaCl und einem pH-Wert von 6,0. Dieser Puffer wurde in einem linearen Gradienten über 60 Säulenvolumen (Li *et al.*, 2004) bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,2 ml/min über die Säule gegeben. Anschließend erfolgte eine Elution von (His)<sub>6</sub>-Zygodin mittels 0,5 M Imidazol in 20 mM Citrat-Phosphatpuffer. Die gepoolten Fraktionen des Elutionspeaks wurden anschließend über eine Gelfiltration-Chromatographie (vgl. 2.10.1, S. 70) in 20 mM Citrat-Puffer pH 4,0 umpuffert. Dieser Schritt diente der Entfernung des Imidazols und einer weiteren Reduktion des pH-Wertes

auf den für Zygocin idealen pH-Wert von 4,0. Eine vorherige Verwendung eines solch niedrigen pH-Wertes war aufgrund der eingesetzten Ni-Sepharose-Matrix nicht möglich, da bereits ab einem pH-Wert von 6,0 das gekoppelte Nickel und somit die daran gebundenen Proteine von der Sepharosematrix dissoziiert. Anschließend wurde das so behandelte (His)<sub>6</sub>-Zygocin im MBA-Test auf Toxizität gegen die sensitive Hefe *S. cerevisiae* 192.2d und damit auf den Erfolg der Rückfaltung untersucht. Es konnte allerdings im MBA-Test keine Killeraktivität nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Effektivität der Rückfaltung der denaturierten *inclusion bodies* durch Dialyse oder starke Verdünnung wurden affinitätschromatographisch gereinigte *inclusion bodies* (vgl. 3.8.3.2) eingesetzt. Die Dialyse erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde gegen 20 mM Citrat-Puffer pH 4,0 mit 1,5 M Guanidin-Hydrochlorid über Nacht dialysiert (bei 4 °C). Anschließend erfolgte eine Dialyse gegen 20 mM Citrat pH 4,0 mit zweifachem Pufferwechsel über Nacht bei 4 °C, um das Guanidin-Hydrochlorid zu entfernen. Diese Methode wurde mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen und unterschiedlichen Konzentrationen an rückfaltungshelfenden Additiven (L-Arginine 0,2 bis 1 M; DMSO, PEG) (Arora & Khanna, 1996; Arakawa & Tsumoto, 2003; De Bernardez *et al.*, 1999) durchgeführt. Allerdings zeigten die rückgefalteten Proteine im MBA-Test keine Aktivität. Auch eine direkte Verdünnung der affinitätschromatographisch gereinigten *inclusion bodies* (Konzentration 10-50 µg/ml) in 20 mM Citrat Puffer pH 4,0 mit unterschiedlichen Konzentrationen an L-Arginin und einer Inkubation der Ansätze über Nacht bis zu einer Woche bei 4 °C lieferte im MBA Test, auch nach Konzentrierung der Proben, keine Toxizität. Aus diesem Grund wurde auf eine weitere Untersuchung der Rückfaltung von (His)<sub>6</sub>-Zygocin *inclusion bodies* verzichtet und stattdessen ein anderer Wirt für die Zygocin-Expression untersucht.

### 3.9. Heterologe Expression von Zygocin und von Zygocin-Varianten in *Pichia pastoris*

#### 3.9.1. Erstellung der Expressionskonstrukte und Expressionsplasmide

Ein weiterer untersuchter eukaryotischer Expressionswirt stellt die Hefe *P. pastoris* dar. Sie hat wie alle eukaryotischen Expressionssysteme die Vorteile der Proteinprozessierung, die Einführung posttranslationaler Modifikationen und die Möglichkeit der leichten Manipulation wie bei *E. coli* und *S. cerevisiae*. Im Vergleich zu *S. cerevisiae* zeichnet sich *P. pastoris* durch eine 10 - 100-fach höhere heterologe Protein-Expressionsrate aus. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit Methanol als alleinige und vor allem kostengünstige Kohlenstoffquelle zu metabolisieren. Die für die Metabolisierung nötige Alkohol-Oxidase besitzt allerdings eine geringe Affinität zu Sauerstoff, so dass die Hefe dies über eine große Menge an produziertem Enzym kompensieren muss. *P. pastoris* verfügt über zwei Gene für die Alkohol-Oxidase, *AOX1* und *AOX2*, welche durch unterschiedlich stark induzierbare Promotoren kontrolliert werden. Das *AOX1*-Gen besitzt einen sehr starken Promotor, der für die Expression großer Mengen an Alkohol-Oxidase verantwortlich ist, welche etwa 85 % des gesamten Methanolumsatzes ausmachen (Cregg *et al.*, 1989), während das Wachstum auf Methanol bei alleinigem Vorhandensein des *AOX2*-Gens sehr viel langsamer ist, da eine geringere Menge an *AOX2* gebildet wird. Der *AOX1*-Promotor wird zur heterologen Expression von Proteinen auf kommerziellen Plasmiden verwendet (Cregg *et al.*, 2000).

Zur Expression von Zygocin und seinen Varianten wurde der Vektor pPIC9 aus dem *Pichia* Expression Kit der Firma INVITROGEN gewählt. Dieser Vektor trägt einen Ampicillin-Marker zur Selektion in *E. coli* und einen *His4*-Marker zur Selektion positiver *Pichia*-Klone nach Transformation. pPIC9 enthält der MCS vorgeschaltet die  $\alpha$ -MF-Signalsequenz, so dass eine *in frame*-Klonierung des Zielgens über die Schnittstellen *XhoI*, *EcoRI*, *BlnI* und *NotI* möglich ist und das kodierte Protein auf Grund der Signalsequenz in das Medium sezerniert wird. Der *XhoI* Schnittstelle folgt das Erkennungsmotiv der Kex2p Protease, welche für die Abspaltung des Signalpeptids während der Prozessierung verantwortlich ist. Die

Expression des Zielgens wird über den starken Methanol induzierbaren Promotor *AOX1* kontrolliert.

Vor der Klonierung der Zygocin-Konstrukte in den pPIC9-Vektor mussten diese mit neuen Schnittstellen versehen werden. Dazu wurden mittels PCR (vgl. 2.8.7, S. 41) am 5'-Ende durch die verwendeten Primer eine *XhoI* Schnittstelle sowie die Codons für Lys-Arg eingefügt und am 3'-Ende eine *EcoRI* und eine *AvrII* (*BlnI*) Schnittstelle sowie ein Stopcodon. Durch das Einfügen der beiden Aminosäuren Lys-Arg wurde die Kex2p-Proteaseschnittstelle wieder hergestellt, so dass nach Abspalten des Sekretionssignals der korrekte N-Terminus des gewünschten Proteins nach Sekretion erhalten wurde. In Tabelle 17 sind die hergestellten Zygocin-Konstrukte sowie die bei der PCR verwendeten Primer angegeben. Als Template dienten die bereits zuvor beschriebenen Vektoren. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Zygocin-Varianten (vgl. 3.3.1, S. 84 und 3.3.2, S. 87) wurden noch weitere Varianten erstellt, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

**Tabelle 17: Mittels PCR hergestellte Zygocin-Konstrukte für die Klonierung und Expression in *P. pastoris* und die dafür verwendeten Primer.**

| Konstrukt             | 5'-Primer                      | 3'-Primer                    |
|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Zygocin               | 5'-Zygo-XhoI, Kex              | 3'-Zygocin AvrII, EcoRI      |
| ZygocinV66N           | 5'-Zygo-XhoI, Kex              | 3'-Zygocin AvrII, EcoRI      |
| ZygocinF79P           | 5'-Zygo-XhoI, Kex              | 3'-Zygocin AvrII, EcoRI      |
| ZygocinD93L           | 5'-Zygo-XhoI, Kex              | 3'-Zygocin D93L AvrII, EcoRI |
| Zygocin $\Delta$ D1   | 5'-Zygo del D1 Xho, Kex        | 3'-Zygocin AvrII, EcoRI      |
| Zyocin $\Delta$ D3    | 5'-Zygo-XhoI, Kex              | 3'-Zygo del D3 AvrII, EcoRI  |
| Zyocin91              | 5'-Zygo-XhoI, Kex              | 3'-Zygo91 AvrII, EcoRI       |
| Zygocin91 $\Delta$ D1 | 5'-Zygo del D1 Xho, Kex        | 3' Zygo91 AvrII, EcoRI       |
| V5-Zygocin            | 5'-V5-Zygocin Xho Kex          | 3'-Zygocin AvrII, EcoRI      |
| Zygocin-V5            | 5'-Zygo- XhoI, Kex             | 3'-Zygocin V5 SacII BgIII    |
| FLAG-Zygocin-V5       | 5'-FLAG-Zygocin Xho, Kex       | 3'-Zygocin V5 SacII BgIII    |
| Strep-Zygocin         | 5'-Strep Tag- Zygocin Xho, Kex | 3'-Zygocin AvrII, EcoRI      |

### **Zygocin $\Delta$ D2**

Bei diesem Konstrukt wurde die Sequenz der postulierten amphipathischen  $\alpha$ -Helix deletiert, um den Effekt dieser Domäne auf die Toxizität überprüfen zu können. Das Gen-Konstrukt wurde unter Verwendung der SOE-PCR-Methode (siehe 2.8.7, S. 41) erstellt. Als Template für die beiden ersten PCRs diente pREP-Zygo. In zwei getrennten PCR Ansätzen wurde einmal ein Teil des Gens mit den Primern 5'-Zygo- XhoI, Kex und 3'-Zygocin del D2 SOE amplifiziert und der andere Teil mit den Primern 5'-Zygocin del D2 SOE und 3'-Zygocin AvrII, EcoRI. Nach erfolgter PCR wurden die beiden PCR-Produkte in einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden reisoliert. Als Template für die dritte PCR, bei der die beiden Genfragmente miteinander verbunden wurden, dienten die beiden gereinigten PCR-Produkte.

### **Zyocin91**

Bei dieser Toxinvariante handelt es sich um eine C-terminal verkürzte Zyocin-form, bei der die letzten neun Aminosäuren des Zyocins deletiert wurden, um deren Funktion zu überprüfen. Die Variante wurde mit den Primern 5'-Zyoc Eco, Nde und 3'-Zygo91 Bam hergestellt, als Template diente pREP-Zygo.

### **Zygocin91 $\Delta$ D1**

Diese Toxinvariante stellt eine Kombination aus dem zuvor beschriebenen Zyocin91 und der N-terminal verkürzten Zyocin $\Delta$ D1 Variante dar, bei der die Zellwandbindedomäne deletiert wurde. Als Template für die PCR wurde Zyocin $\Delta$ D1 verwendet, als Primer dienten 5'-Zygo del D1 Xho, Kex und 3'-Zygo91 AvrII, EcoRI.

### **mRFP-Zyocin**

Bei diesem Konstrukt wurde N-terminal zum Zyocin die Sequenz des rot fluoreszierenden Proteins (mRFP) vorgeschaltet. Dieser Tag sollte zum einen den Nachweis des Zyocins im Western Blot mittels monoklonaler Antikörper gegen mRFP ermöglichen, zum andern die fluorometrische Detektion des Fusionsproteins. Das Fusionsprotein wurde mittels SOE-PCR hergestellt. Das mRFP wurde in einer ersten PCR mit den Primern 5'-dsRED-Monomer Xho, Kex und 3'-

dsRED-Monomer- 5'-Zygocin amplifiziert, als Template diente pFB-mRFP. Zygocin wurde mit den Primern 5'-Zygocin-3'-dsRED Monomer und 3'-Zygocin AvrII, EcoRI amplifiziert. Beide gereinigten PCR Produkte dienten als Template für die dritte PCR, diese wurde mit den Primern 5'-dsRED-Monomer Xho, Kex und 3'-Zygocin AvrII, EcoRI durchgeführt.

### **V5-Zygocin und Zygocin-V5**

Bei diesen beiden Toxinvarianten wurde Zygocin N- bzw. C-terminal mit dem V5-Tag versehen, um das Toxin mit den sehr spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen das V5-Epitop Tag im Western Blot nachweisen zu können. Das Tag wurde jeweils mittels der Primer angefügt (vgl. Tabelle 17).

### **FLAG-Zygocin-V5**

Bei diesem Konstrukt wurde Zygocin N-terminal mit einem FLAG-Tag versehen und C-terminal mit einem V5-Tag. Die Tags wurden mit den in Tabelle 17 angegebenen Primern angefügt. Dieses Konstrukt diente ebenfalls der besseren Nachweisbarkeit des Toxins im Western Blot durch die spezifischen monoklonalen Antikörper für das jeweiligen Tag.

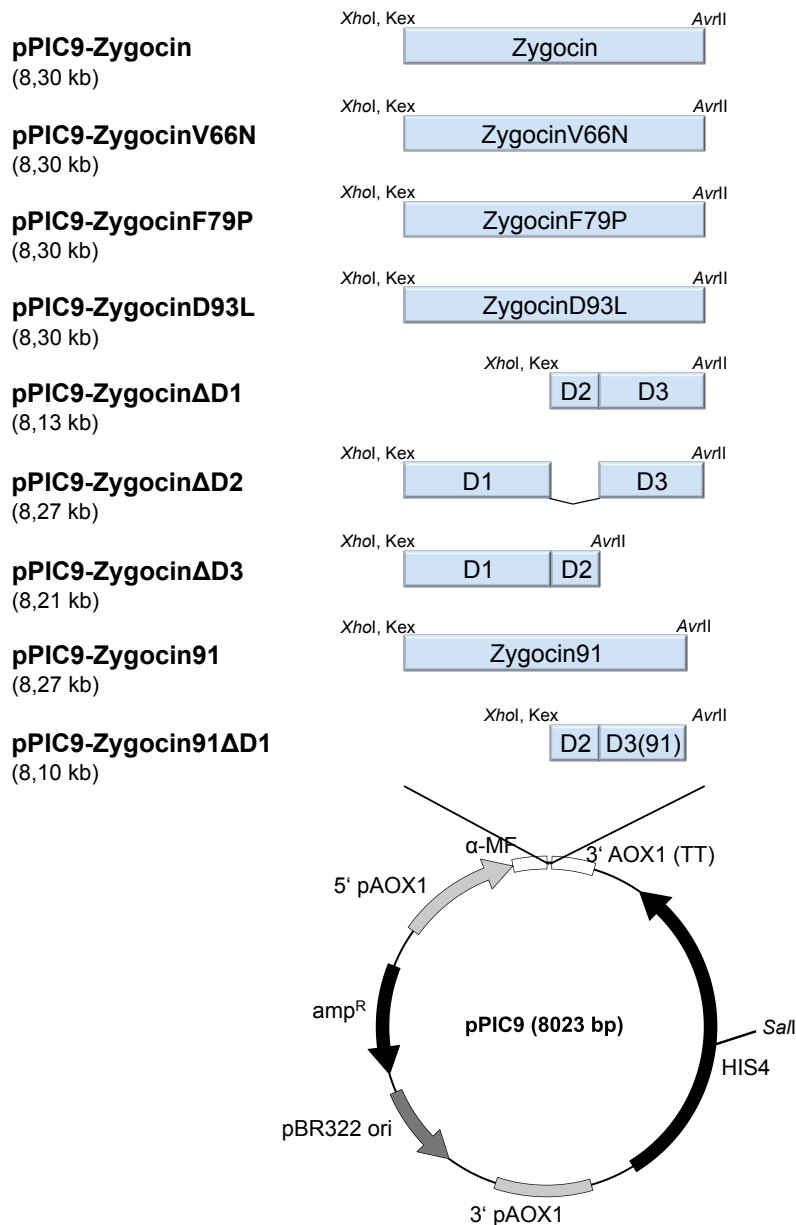
Alle Zygocin-Konstrukte wurden nach erfolgter PCR in einem Agarosegel aufgetrennt, daraus reisoliert und zur Überprüfung der Sequenz in den pST-Blue1 Vektor zwischenkloniert (vgl. 2.8.8.2, S. 46). Die Sequenzanalyse der unterschiedlichen Konstrukte wurde von der Firma GATC BIOTECH durchgeführt. Korrekt sequenzierte Gene wurden über *XhoI* und *AvrII* bzw. über *XhoI* und *EcoRI* (für FLAG-Zygocin-V5 und Zygocin-V5) in den pPIC9 Expressionsvektor ligiert und in *E. coli* TOP10 transformiert. Die nach Ligation erhaltenen Expressionsvektoren sind in Abbildung 31 und Abbildung 33 dargestellt. Die Selektion korrekter Klone erfolgte über Kolonie-PCR.

### 3.9.2. Transformation und Zygocin Expression in *P. pastoris*

Die Transformation und Expression des Wildtyp-Zygocins in *P. pastoris* fand parallel in den beiden Stämmen GS115 und KM71 aus dem *Pichia* Expression Kit (INVTROGEN) statt. Die beiden Stämme zeichnen sich durch eine unterschiedliche Verwertung von Methanol aus. Während GS115 über zwei funktionale Alkohol-oxidasen (AOX1 und AOX2) verfügt, die einen Mut<sup>+</sup>-Phänotyp (*methanol utilizing plus*) bewirken, verfügt KM71 aufgrund einer *aox1:ARG4*-Disruption nur über die schwächer exprimierte AOX2, die einen Mut<sup>S</sup>-Phänotyp (*methanol utilizing slow*) hervorruft, der sich durch ein langsames Wachstum mit Methanol als alleiniger C-Quelle auszeichnet.

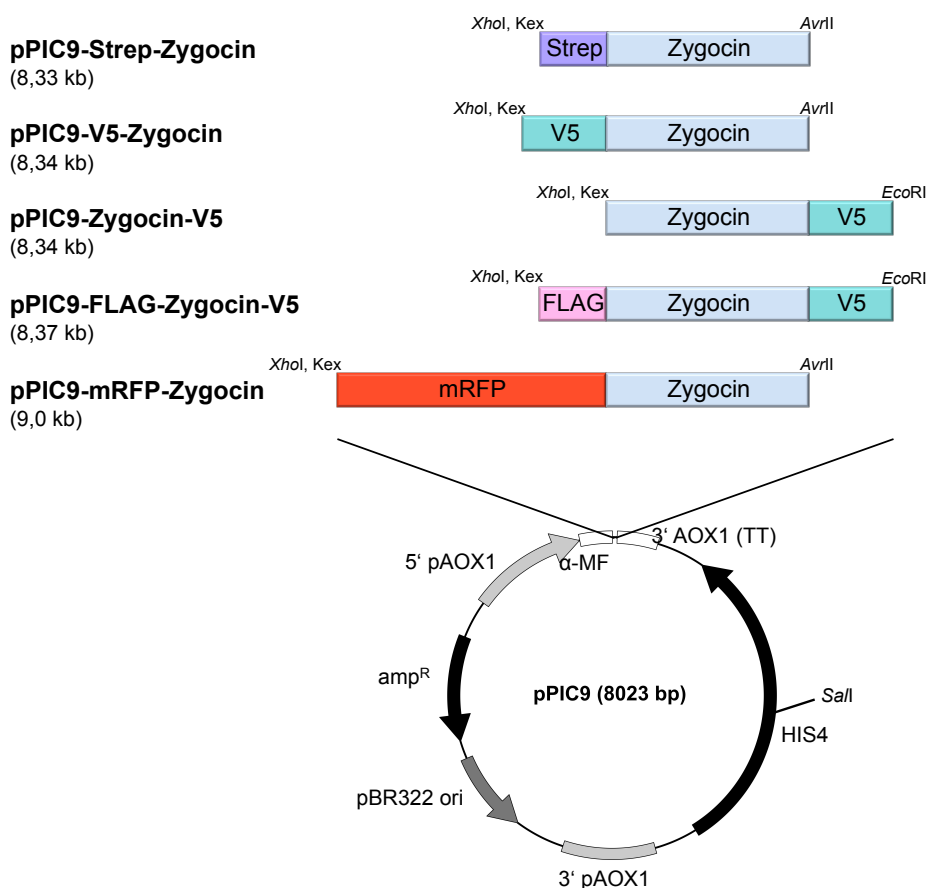
Die Transformation der linearisierten, integrativen pPIC9-Expressionsvektoren (vgl. Abbildung 31 und Abbildung 32) erfolgte über Elektroporation in *P. pastoris* (vgl. 2.8.10.6, S. 51). Durch die Verwendung der *Sall* Restriktionsschnittstelle zur Linearisierung des Vektors integriert dieser durch einfaches *crossover* homolog in den *his4*-Locus des *P. pastoris* Genoms. Dies führt zu einer weiterhin mutanten Kopie des Histidinol Dehydrogenase Gens und zu einer funktionellen Kopie des Gens, da durch die homologe Rekombination der mutierte *his4*-Genabschnitt durch die Wildtyp-Form aus dem Vektor ersetzt wurde. Somit lassen sich Transformanten auf His d/o-Agarplatten selektieren. In etwa 10 % der Fälle erfolgt eine Mehrfachintegration in den *his4*-Locus. Da die gewählte Integration nicht die Bereiche des *AOX1*-Gens betrifft, blieben die ursprünglichen Methanolverwertungs-Phänotypen Mut<sup>+</sup> für GS115 und Mut<sup>S</sup> für KM71 weiterhin erhalten und mussten nicht bestimmt werden.

Zur Transformation wurden 5 µg Plasmid-DNA mit *Sall* restringiert, gereinigt und zur Elektroporation in *P. pastoris* (vgl. 2.8.10.6, S. 51) eingesetzt. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf His d/o-Platten, die bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert wurden. Jeweils die vier größten Klone wurden auf Integration des gewünschten Gens in das *Pichia*-Genom mittels Kolonie-PCR überprüft (vgl. 2.8.7.2, S. 42), da bei ihnen davon auszugehen war, dass eine Mehrfachintegration stattgefunden hatte, da eine größere Menge der Histidinol-Dehydrogenase ein schnelleres Wachstum auf His d/o-Medium ermöglicht. Jeweils zwei Klone mit starken Signalen bei der *Pichia*-Kolonie-PCR wurden für die Expressionsuntersuchungen verwendet.



**Abbildung 31: Schematische Darstellung der konstruierten *P. pastoris* Expressionsvektoren zur heterologen Expression von Zygodin und seiner Varianten.** Die Zygodin-Konstrukte wurden mittels PCR mit den in **Tabelle 17** oder im Text angegebenen Primern amplifiziert. Über die 3'-Primer wurde ein Stopcodon eingefügt. Die Klonierung erfolgte gerichtet über *XhoI* und *AvrII* in den pPIC9-Vektor. Die Gene stehen unter der Kontrolle des Methanol induzierbaren AOX1 Promotors. Die Sekretion der Proteine erfolgt durch das vektoreigene  $\alpha$ -MF-Sekretionssignal. Die gewählte *XhoI* Schnittstelle zur Klonierung führt dazu, dass nach Prozessierung des Proteins der korrekte N-Terminus entsteht. Zur Transformation/Integration wurden die Plasmide mit *SalI* linearisiert und in *P. pastoris* transformiert.

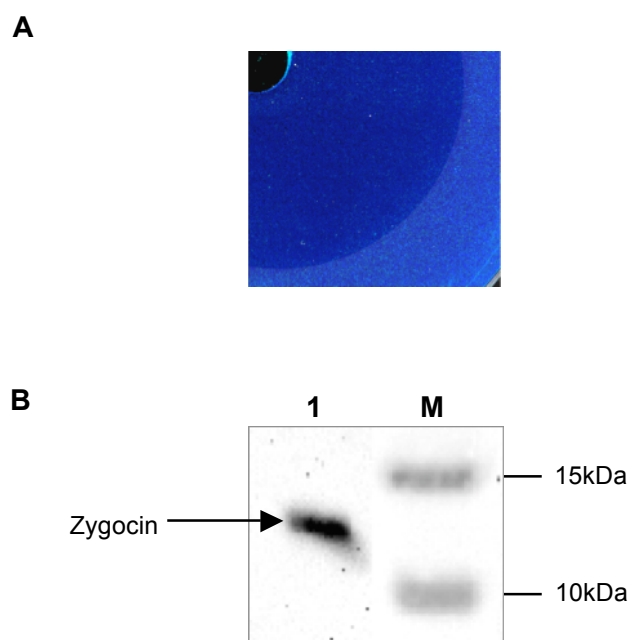




**Abbildung 32: Schematische Darstellung der konstruierten *P. pastoris* Vektoren zur heterologen Expression getaggtter Zygocin-Varianten.** Die Zygocin-Konstrukte wurden mittels PCR mit den in **Tabelle 17** oder im Text angegebenen Primern amplifiziert. Über den 3'-Primer wurde ein Stopcodon eingefügt. Die Klonierung erfolgte gerichtet über *XhoI* und *AvrII* bzw. über *XhoI* und *EcoRI* (FLAG-Zygocin-V5 und Zygocin-V5) in den pPIC9-Vektor. Die Gene stehen unter der Kontrolle des Methanol induzierbaren AOX1 Promotors. Die Sekretion der Proteine erfolgt durch das vektoreigene  $\alpha$ -MF-Sekretionssignal. Die gewählte *XhoI* Schnittstelle zur Klonierung führt nach Prozessierung und Sekretion zum korrekten N-Terminus des Proteins. Zur Transformation wurden die Plasmide mit *SalI* linearisiert und in *P. pastoris* transformiert.

Zum Animpfen von 5 ml His d/o-Flüssigmedium als Vorkultur wurde ein großer Teil einer Kolonie von der Masterplatte mit einem sterilen Zahnstocher abgeimpft. Die Kultur wurde bei 30°C, 220 rpm für 24 h inkubiert. Die gesamte Vorkultur diente zum Animpfen von 100 ml BMG-Medium (vgl. 2.4.2, S. 28) mit 100 mM Phosphatpuffer pH 4,0, welches anschließend für drei Tage bei 20 °C und 180 rpm inkubiert wurde. Zur Induktion der Expression wurde die Kultur in methanolhaltiges BMM-Medium (mit 100 mM Phosphatpuffer pH 4,0) überführt. Dazu wurde die BMG-Kultur bei 7000 rpm, 20 °C für 10 min geerntet, das Pellet in 100 ml BMM-Medium resuspendiert und in einen Erlenmeyerkolben überführt. Die Induktion erfolgte bei 20 °C, 180 rpm für weitere 72 h. Alle 24 h wurde dem Medium 0,5 % Methanol zugeführt. Der zellfreie Kulturüberstand wurde

sterilfiltriert und anschließend im MBA-Test (vgl. 2.9.10, S. 67) auf Toxizität gegenüber dem hypersensitiven *S. cerevisiae* Stamm TM231 untersucht. Abbildung 33 zeigt einen solchen MBA-Test mit dem Kulturüberstand von *P. pastoris* GS115. Im Agardiffusionstest konnte erstmals eine Toxinaktivität und somit die heterologe Expression und Sekretion von aktivem Zygocin nachgewiesen werden. Es konnte ein Hemmhof von 34 mm gegenüber der hypersensitiven Hefe *S. cerevisiae* TM231 nachgewiesen werden. Damit überstieg die Aktivität des von *P. pastoris* sezernierten Toxins die des Wildtyps (*Z. ballii*) um ein Vielfaches, denn beim Wildtyp konnte nur ein Hemmhof von 22 mm beobachtet werden, wenn ein 50-fach konzentriertes Toxinkonzentrat eingesetzt wurde, wobei von *P. pastoris* nur der nichtkonzentrierte Kulturüberstand eingesetzt wurde. Im Western Blot konnte mit Zygocin-spezifischen Antikörpern eine Bande von etwa 13 kDa detektiert werden, bei welcher es sich um das heterolog exprimierte Zygocin handelt (Abbildung 33). Die Ergebnisse zeigten die Fähigkeit von *P. pastoris*, Zygocin in aktiver Form zu sezernieren, weshalb diese Hefe ein vielversprechender Kandidat für die heterologe Expression der verschiedenen Zygocin-Varianten zur Untersuchung der Wirkungsweise von Zygocin ist. Alle bisher untersuchten Expressionssysteme und Organismen waren nicht in der Lage, Zygocin in biologisch aktiver Form herzustellen bzw. zu sezernieren. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde daher ausschließlich das *Pichia pastoris*-Expressionssystem verwendet. Als Expressionsstamm für alle weiteren Expressionen wurde *P. pastoris* GS115 gewählt, da er im Vergleich zum Stamm KM71 eine größere Menge aktiven Toxins (22 mm Hemmhof) sezernierte. Bei gleichen Kulturbedingungen konnte mit dem Stamm KM71 maximal ein Hemmhof von 12 mm erreicht werden.



**Abbildung 33: Heterologe Expression von Zygotin in *P. pastoris*. GS115** **A: Agar-Diffusionstest:** 100  $\mu$ l Kulturüberstand von *P. pastoris* GS115 transformiert mit pPIC9-Zygotin nach dreitägiger Expression wurden im MBA-Test gegen die sensitive Hefe *S. cerevisiae* TM231 eingesetzt. Hemmhof 49 mm. **B: Western Blot:** Der Kulturüberstand wurde in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. Der immunologische Nachweis erfolgte nach Transfer auf PVDF-Membran mittels polyklonaler anti-Zygotin-Antikörper und sekundärer anti-Rabbit-HRP Antikörper (PIERCE) mittels Chemilumineszenz. **1:** Zygotin; **M:** PageRuler™ Prestained Protein Ladder (FERMENTAS).

### 3.9.3. Optimierung der Zygotin Expression in *P. pastoris*

Um einen Aktivitäts-Vergleich der verschiedenen sezernierten Zygotin-Varianten untereinander zu ermöglichen, war es notwendig, die Expression zu optimieren und zu standardisieren, so dass gleiche Proteinmengen erhalten werden konnten. Die Optimierung der Expression hatte auch die Aufgabe, die größtmögliche Menge an aktivem Toxin zu sezernieren. Dazu wurden die Medienzusammensetzungen bezüglich der Pufferung und Zugabe von Additiven, die Kultivierungsparameter wie Sauerstoffeintrag, Induktionszeitpunkt und Induktionsdauer, Fütterungsmenge und Induktionstemperatur, variiert. Die Pufferkapazität des anfangs verwendeten 100 mM Phosphatpuffers reichte bei dem verwendeten pH-Wert nicht aus. Bereits nach eintägiger Expression konnte eine pH-Veränderung von 4,0 auf 2,6 beobachtet werden. Allerdings erwies sich auch die Pufferkapazität des anschließend verwendeten 100 mM Citratpuffers als nicht ausreichend, um den pH-Wert während der Expression stabil bei 4,0 zu halten.

Während der dreitägigen Expression sank der pH-Wert jeweils bis auf Werte von 2,8. Ein Versuch, den pH-Wert durch Zugabe von Ammoniumhydroxid stabil zu halten, verlief erfolgreich, allerdings zeigte der Aktivitätstest keinen Unterschied bei relativ stabilem pH-Wert von 4,0 gegenüber einem sinkenden Wert bis auf 2,8. Daher wurden alle weiteren Expressionsversuche mit 100 mM Citratpuffer durchgeführt und auf eine Zugabe von Ammoniumhydroxid verzichtet. Als Additiv wurden Casaminoacids (1 % w/v) untersucht, wobei es sich um säurehydrolysiertes Casein handelt, welches den von *P. pastoris* ins Medium sezernierten Proteasen als zusätzliches Substrat dient und daher eventuell den Abbau des gewünschten Proteins vermindern helfen kann (Clare *et al.*, 1991; Werten *et al.*, 1999). Der Effekt dieser Zugabe war eine deutliche Steigerung der Zelldichte bis auf OD<sub>600</sub> von 120, allerdings konnte kein aktives Toxin in Kulturüberstand nachgewiesen werden, weshalb auf eine weitere Zugabe verzichtet wurde. Zur Steigerung des Sauerstoffeintrages wurden Erlenmeyerkolben mit seitlichen Schikanen verwendet (1 l Schikane- bzw. normale Erlenmeyerkolben). Eine Verwendung von Schikanekolben war nur durch die Zugabe von Antischaum (BREOX FM30, 0,05 % v/v) möglich. Zuvor wurde der Einfluss des Antischaummittels auf die Aktivität von Zygocin untersucht, indem Zygocin-Konzentrat mit Antischaum versetzt und zu MBA-Tests eingesetzt wurde. Es zeigte sich kein Effekt auf die Toxizität. Allerdings zeigte sich eine geringere Aktivität des Toxins nach Kultivierung im Schikanekolben mit Antischaum, weshalb auf eine weitere Verwendung dieser Kolben verzichtet wurde. Auch wurde die Methanol Fütterungsrate während der Induktionsphase im Methanolmedium variiert. Es zeigte sich, dass eine Zugabe von 0,8 % Methanol pro Tag die größte aktive Proteinmenge lieferte. Bei den Induktionszeitpunkten zeigte sich eine OD<sub>600</sub> von 15 als bester Kompromiss aus Proteinmenge und gesamter Kultivierungsdauer. Eine anfängliche Kultivierung bei 28 °C lieferte schneller die gewünschte Zelldichte von 15. Danach wurde während der Induktionsphase auf 20 °C geschiftet, da sich diese Temperatur im Vergleich zu 25 °C als vorteilhaft für ein aktives Zygocin herausgestellt hat. Die Variation der Induktionsdauer war von entscheidender Bedeutung. Bei einer zu kurzen Induktionsdauer (<45 h) konnten weder im Western Blot Banden detektiert werden, noch ließ sich eine Killeraktivität nachweisen. Eine Induktionsdauer von

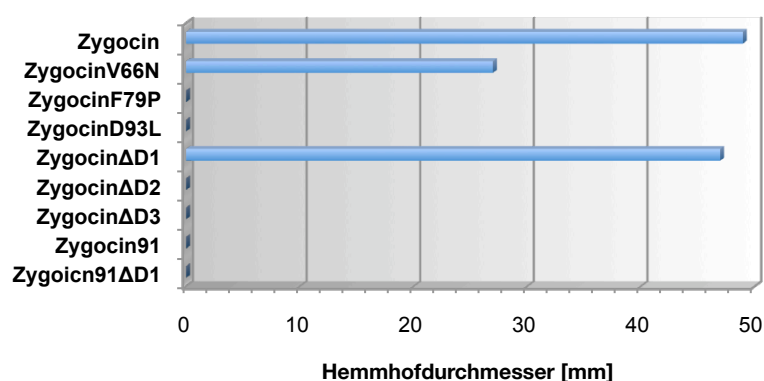
80-90 h stellte sich als die am besten geeignete heraus, um eine hohe Menge an aktivem Toxin zu erhalten.

Alle weiteren Expressionen wurden in BMM mit 100 mM Citratpuffer pH 4,0 durchgeführt, wobei bis zu einer  $OD_{600}$  von 15 auf BMG bei 28 °C, 220 rpm kultiviert und danach auf BMM bei 20 °C, 180 rpm geshiftet wurde. Die Kultivierung fand in normalen Erlenmeyerkolben über einen Zeitraum von 90 h statt. Alle 24 h wurden 0,8 % (v/v) Methanol zugefüttert. Zygocin exprimierende *P. pastoris* GS115 Kulturen, die auf diese optimierte Weise kultiviert wurden, erzielten in den abschließenden Toxizitätstests gegen die sensitive Hefe *S. cerevisiae* TM231 einen Hemmhof von 49 mm. Durch die Optimierung der Kulturbedingungen konnte somit eine Steigerung der Toxizität von 34 mm auf 49 mm Hemmhof erreicht werden.

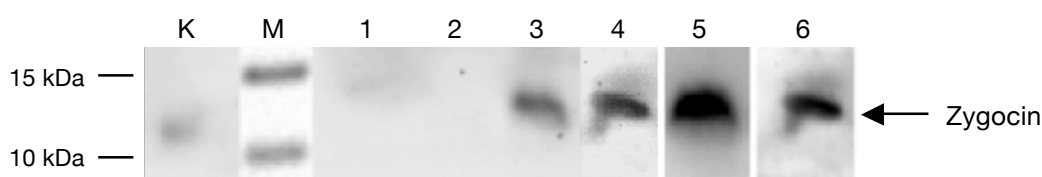
#### **3.9.4. Transformation und Expression der Zygocin-Varianten in *P. pastoris***

Für die Expression der beschriebenen Zygocin-Varianten wurde ausschließlich der *P. pastoris* Stamm GS115 verwendet. Die Linearisierung der konstruierten Expressionsplasmide (Abbildung 31) erfolgte durch *Sa*I. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation (vgl. 2.8.10.6, S. 51) in kompetente GS115 Zellen. Nach viertägiger Inkubation der His d/o-Selektionsplatten bei 30 °C wurden jeweils vier der erhaltenen Klone mittels Kolonie-PCR auf die korrekte Integration hin überprüft. Je zwei positive Klone pro Zygocin-Variante wurden ausgewählt und für die weitere Expression verwendet (vgl. 3.9.3, S. 131). Dazu wurde je ein Teil einer Kolonie von der Master-platte in 5 ml His d/o Flüssigmedium überführt und für 24 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Mit 4 ml dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur (100 ml BMG im 300 ml Erlenmeyerkolben) beimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 15 bei 28 °C kultiviert. Nach Erreichen der optischen Dichte wurden die Zellen abzentrifugiert und in derselben Menge BMM-Medium resuspendiert. Das im Medium enthaltene Methanol induzierte die Zygocin-expression. Die Kulturen wurden für 90 h bei 20 °C, 180 rpm inkubiert und alle 24 h mit 0,8 % Methanol (v/v) komplettiert. Die Kulturen erreichten während dieser Inkubationsdauer eine  $OD_{600}$  von  $50 \pm 5$ . Um Schwankungen der Toxin-

aktivitäten durch eventuell leicht unterschiedliche Medienzusammensetzungen oder Kulturbedingungen zu vermeiden, wurden alle Expressionen immer mit der selben Charge Medium gleichzeitig durchgeführt und der Wildtyp-Zygodin exprimierende *P. pastoris* Stamm wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Abbildung 34 zeigt die im Agardiffusionstest ermittelten Killeraktivitäten der nichtkonzentrierten Kulturüberstände nach Expression der einzelnen Toxinvarianten in *P. pastoris* gegen die hypersensitive Hefe *S. cerevisiae* TM231. In der Abbildung ist zu erkennen, dass lediglich zwei weitere Toxinvarianten eine Killeraktivität aufwiesen. Zygodin $\Delta$ D1, bei der die vollständige Zellwandbindedomäne deletiert wurde, zeigte im MBA-Test mit 47 mm Hemmhof eine ähnliche Killeraktivität wie der Wildtyp (49 mm). Die zweite Variante, die eine Aktivität auswies, war ZygodinV66N, bei welcher ein Aminosäureaustausch von Valin nach Asparagin an Position 66 durchgeführt wurde. Diese Mutation betrifft die zweite Wirkungsdomäne von Zygodin, die nach dem Modell für die Anlagerung des Toxins an die Membran verantwortlich ist. Hierbei wurde der amphipatische Charakter der  $\alpha$ -Helix durch die Einführung der geladenen Aminosäure Asparagin im Austausch gegen das unpolare Valin zerstört. Diese Variante zeigte mit 26 mm Hemmhof einen stark verminderten Killerphänotyp. Alle weiteren exprimierten Toxinvarianten zeigten keine Killeraktivität, auch nach hundertfacher Konzentrierung des Kulturüberstandes konnte keine Toxizität nachgewiesen werden.



**Abbildung 34: Toxinaktivitäten der verschiedenen in *P. pastoris* exprimierten Zygodin-Varianten im MBA-Test.** Je 100  $\mu$ l der nicht konzentrierten Kulturüberstände der jeweiligen *P. pastoris* Transformanten wurden im MBA-Test auf Killeraktivität gegen die hypersensitive Hefe *S. cerevisiae* TM231 untersucht. Angegeben ist der Hemmhofdurchmesser in mm.



**Abbildung 35: Western Blot zum Nachweis der in *P. pastoris* heterolog exprimierten Toxinvarianten.** Verwendet wurde ein 12 %iges Tris-Tricin-Gel. Jeweils 20  $\mu$ l Kulturüberstand wurde aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels polyklonalen anti-Zygocin Antikörpern und sek. anti-Rabbit-HRP Antikörpern. **K:** *Z. bailii* 412 Positivkontrolle (50-fach konzentriert); **M:** PageRuler™ Prestained Protein Ladder (FERMENTAS); **1:** Zygocin $\Delta$ D1; **2:** Zygocin $\Delta$ D3; **3:** Zygocin91; **4:** ZygocinD93L; **5:** ZygocinF79P; **6:** ZygocinV66N

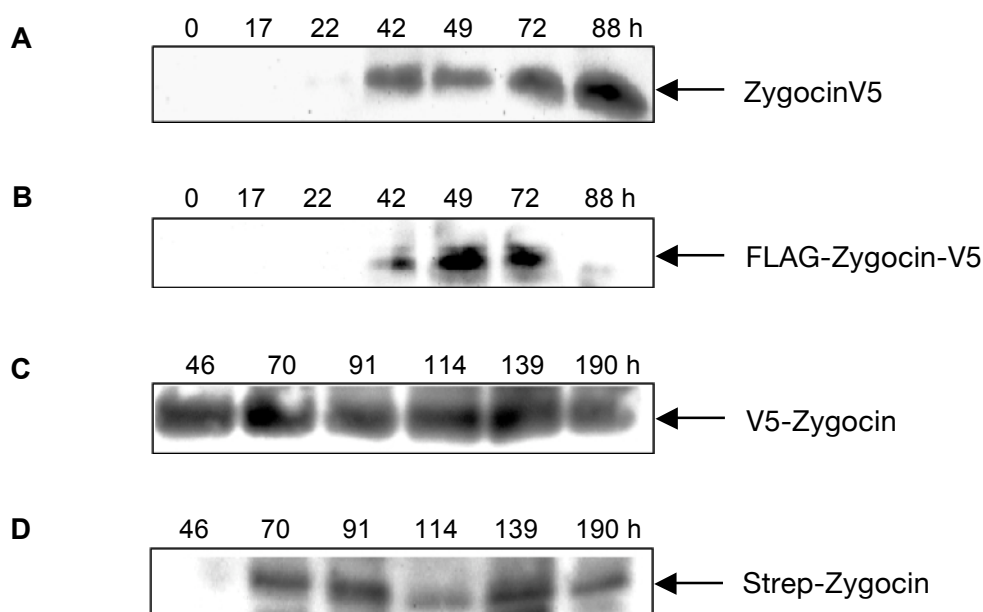
Alle Toxinvarianten wurden im Western Blot auf Expression und Sekretion hin untersucht. In Abbildung 35 ist das Ergebnis eines Western Blots dargestellt, bei dem jeweils 20  $\mu$ l der unterschiedlichen Kulturüberstände unter denaturierenden Bedingungen in einem Tris-Tricin-Gel aufgetrennt wurden. Der immunologische Nachweis der Proteine fand mit polyklonalen Zygocin-spezifischen Antikörpern und sekundären anti-Rabbit-HRP Antikörpern statt. Es konnte bei den Proben von Zygocin91, ZygocinD93L, ZygocinF79P und ZygocinV66N jeweils ein etwa 12 kDa schweres Protein detektiert werden, welches die jeweilige heterolog exprimierte Zygocin-Variante darstellt. Der Größenunterschied des um neun Aminosäuren verkürzten Proteins Zygocin91 (9,5 kDa) im Vergleich zum Volllängen-Zygocin war zu gering, um mit dem verwendeten SDS-Gel detektiert werden zu können. Eine Detektion von Zygocin $\Delta$ D1 (4,1 kDa), Zygocin91 $\Delta$ D1 (3,2 kDa) und Zygocin $\Delta$ D2 (9,2 kDa) war mit den verwendeten polyklonalen anti-Zygocin Antikörpern nicht möglich, da das zur Herstellung des Antikörpers verwendete synthetisierte Peptid-Epitop genau die bei diesen Proteinen deletierten Aminosäuren umfasst. Von einer erfolgreichen Expression und Sekretion von Zygocin $\Delta$ D1 ist auszugehen, da im Kulturüberstand eine Killeraktivität nachgewiesen werden konnte. Zygocin $\Delta$ D3 ließ sich weder im Western Blot detektieren, noch zeigte der Kulturüberstand dieser Kultur im MBA-Test eine Killeraktivität.

### 3.9.5. Transformation und Expression getaggtter Zygocin-Varianten in *P. pastoris*

Um die mit dem anti-Zygocin Antikörper nicht nachweisbaren Toxinvarianten detektieren zu können, wurde das unveränderte Toxin mit verschiedenen Tags versehen. Anschließend sollte der Einfluss dieser Proteintags auf die Killeraktivität untersucht werden. Die konstruierten Expressionsplasmide (vgl. Abbildung 32, S. 129) für die getaggtten Toxinvarianten wurden mit *SalI* linearisiert, gereinigt und standardmäßig durch Elektroporation in *P. pastoris* GS115 transformiert (vgl. 2.8.10.6, S. 51). Die Identifizierung positiver Klone erfolgte mittels *Pichia*-Kolonie PCR. Positive Klone wurden zuerst in 4 ml His d/o Medium angezogen, danach in 100 ml BMG überführt und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 15 bei 28 °C inkubiert. Die Expression wurde durch Überführung der Zellen in BMM induziert. Die Inkubation erfolgte für 88 h (Zygocin-V5, FLAG-Zygocin-V5) bzw. für 190 h (V5-Zygocin, Strep-Zygocin) bei 20 °C und 180 rpm, wobei alle 24 h mit 0,5 % Methanol gefüttert wurde. Am Ende der Inkubationsdauer wurde bei allen Kulturen eine OD<sub>600</sub> von 50±5 erreicht. Um die Expression und Sekretion der getaggtten Zygocin-Varianten zu untersuchen, wurden sie in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit den jeweils für das Tag spezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Abbildung 36 zeigt die Western Blots dieser Expressionsversuche. Mit den SDS-Gelen wurden Proben unterschiedlicher Induktionszeitpunkte aufgetrennt, um Aussagen über die Stabilität bzw. einen eventuellen Abbau der sezernierten Proteine treffen zu können und um nochmals die am besten geeignete Induktionsdauer für eine möglichst hohe sezernierte Proteinmenge verifizieren zu können. In allen Blots ließen sich Signale des jeweiligen getaggtten Zygocins nachweisen. In Abbildung 36 A und B ist zu erkennen, dass erstmals nach 42 h eine Detektion von Zygocin-V5 (11,8 kDa) und FLAG-Zygocin-V5 (12,8 kDa) möglich war. Die Signalstärke der Banden im Blot und somit die Proteinmenge steigt bis zu einer Expressionsdauer von 70-90 h weiter an. Somit bestätigte sich die in den Toxizitätsuntersuchungen mit dem Wildtyp-Zygocin ermittelte Expressionsdauer von 80-90 h. Um die Stabilität der exprimierten und sezernierten Toxinvarianten zu ermitteln, wurden V5-Zygocin (11,8 kDa) und Strep-Zygocin (11,8 kDa) über eine Dauer von 190 h induziert. V5-Zygocin ließ sich erstmals



nach 46 h Expressionsdauer im Western Blot nachweisen (Abbildung 36 C), ab 70 h Induktionsdauer bis zum Ende der Expression waren die Signale etwa gleich stark. Strep-Zygocin ließ sich erstmals nach 70 h Expressionsdauer nachweisen, die Signalstärke stieg bis 90 h leicht an, um dann relativ konstant bis zum Ende der Expression nach 190 h zu bleiben (Abbildung 36 D). Zusammenfassend bestätigten diese Ergebnisse der getaggten Toxinvarianten die Toxizitätsuntersuchungen für eine optimale Expressionsdauer mit dem Wildtypzygocin. Es zeigte sich auch, dass die Proteine über einen langen Zeitraum stabil im Kulturüberstand vorlagen und keinem Abbau unterworfen waren.



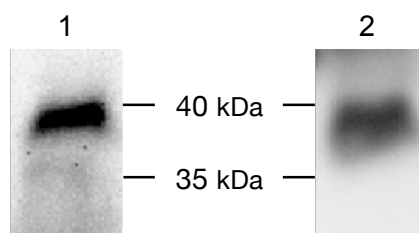
**Abbildung 36: Western Blot zum Nachweis der in *P. pastoris* GS115 heterolog exprimierten getaggten Zygocin-Varianten.** Jeweils 20  $\mu$ l Kulturüberstand wurden in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. Die Zahlen geben die Induktionsdauer der aufgetragenen Proben in Stunden an. **A: Zygocin-V5:** entwickelt mit monoklonalen anti-V5 Antikörpern; **B: FLAG-Zygocin-V5:** entwickelt mit monoklonalen anti-V5 Antikörpern; **C: V5-Zygocin:** mit anti-V5 Antikörpern entwickelt; **C: Strep-Zygocin:** mit monoklonalen anti-Strep Antikörpern entwickelt. Als sekundärer Antikörper diente jeweils ein anti-Rabbit-HRP gekoppelter Antikörper (PIERCE).

Zur Expression von mRFP-Zygocin wurde BMM, welches mit 100 mM Phosphat pH 5,0 gepuffert war, verwendet, da der Chromophor von mRFP bei geringeren pH-Werten irreversible zerstört würde (Baird *et al.*, 2000). Der pH-Wert wurde in regelmäßigen Abständen überprüft und gegebenenfalls durch Zugabe von

Ammoniumhydroxid wieder auf pH 5,0 eingestellt. 30 Stunden nach Induktion war bereits eine leichte Rotfärbung der *P. pastoris* Kultur zu beobachten, die auf die Expression des rot fluoreszierenden Proteins (mRFP) zurückzuführen war. Die Kultur zeigte bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eine sehr starke rote Fluoreszenz. Nach 45 h Induktion zeigte bereits der zellfreie Kulturüberstand eine leichte Rotfärbung, was auf die Sekretion des Fusionsproteins hindeutete. Der Nachweis von mRFP-Zygotin gelang unter nichtreduzierenden Bedingungen mit anti-DsRed und anti-Zygotin Antikörpern im Western Blot (Abbildung 37). Hier ließ sich deutlich eine einzige Bande bei etwa 40 kDa detektieren, die das mRFP-Zygotin mit berechneter Größe von 36 kDa darstellt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Expression und Sekretion aller konstruierten getaggten Toxinvarianten erfolgreich und die Detektion mittels Tag-spezifischen Antikörpern möglich war. Die getesteten Antikörper zeigten nicht die hohe Kreuzspezifität des anti-Zygotin Antikörpers.

Proben aller getaggten Zygotin-Varianten nach 90 h Induktion wurden auch für Toxizitätsuntersuchungen im Agardiffusionstest gegen die sensitive Hefe *S. cerevisiae* TM231 eingesetzt. Dabei zeigte lediglich mRFP-Zygotin mit einem Hemmhof von 21 mm eine Killeraktivität (nicht dargestellt). Alle anderen getaggten Zygotin-Varianten zeigten keine Killeraktivität im MBA-Test. Daher wurde für die nachfolgende *P. pastoris* Hochzelllichtfermentation lediglich der Stamm verwendet, der mRFP-Zygotin exprimiert.



**Abbildung 37: Western Blot von mRFP-Zygotin heterolog in *P. pastoris* GS115 exprimiert.** Jeweils 20  $\mu$ l Kulturüberstand wurden in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. **1:** Nachweis mittels polyklonaler anti-Zygotin und sekundärer anti-Rabbit-HRP (SIGMA) Antikörper; **2:** Nachweis mittels monoklonaler anti-DsRED (CLONETECH) und sekundärer anti-Maus-HRP (SIGMA) Antikörper.

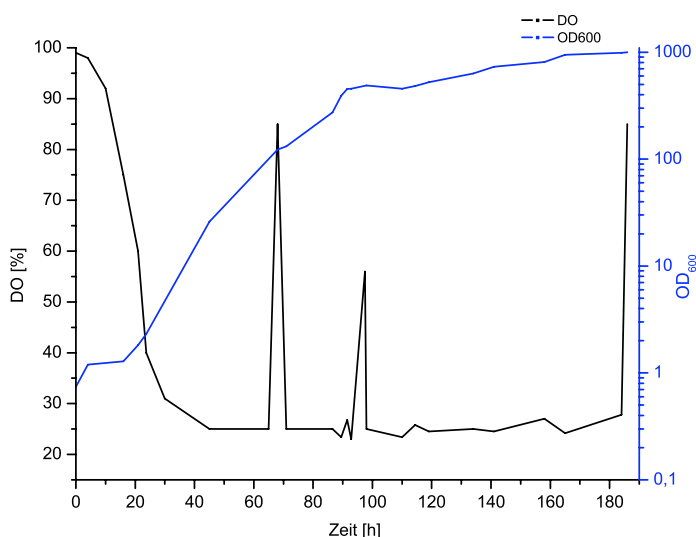
### 3.9.6. Fermentation von *P. pastoris* GS115 zur Zygocin Produktion

Die Fermentationsstudien wurden mit *P. pastoris* GS115 mit dem transformierten pPIC9-Zygocin Plasmid durchgeführt. Ziel der Fermentation war es, Zygocin in großer Menge und hoher Aktivität für Kristallisationsuntersuchungen herzustellen und dabei ein preisgünstiges Medium zu verwenden. Für die Reinigung von Zygocin aus *Z. bailii* 412 wurden 50 l Kultur eingesetzt und daraus konnten nur 20 mg Protein isoliert werden. Ein weiteres Ziel der Fermentation war es, für Untersuchungen der Toxinaktivität ein möglichst reproduzierbares Expressions-System zu entwickeln, da bei Schüttelkulturen die Sauerstoffsättigung im Medium nicht überwacht werden und daher nicht die genaue Fütterungsrate an Methanol ermittelt werden konnte. Für eine optimale Expression ist es bei *P. pastoris* extrem wichtig, während des Wachstums auf Methanol für eine ausreichende Sauerstoffversorgung der einzelnen Zellen zu sorgen. Des Weiteren stellte die große Verdunstung des Mediums bei einer dreieinhalb-tägigen Inkubation ein Problem bei der Interpretation der erhaltenen Toxizitäten dar, da die Kulturüberstände durch die Verdunstung konzentriert wurden. Auch war die Beibehaltung eines konstanten pH-Wertes von 4,0 im Schüttelkolben wegen der starken Ansäuerung des Mediums durch *P. pastoris* nicht möglich.

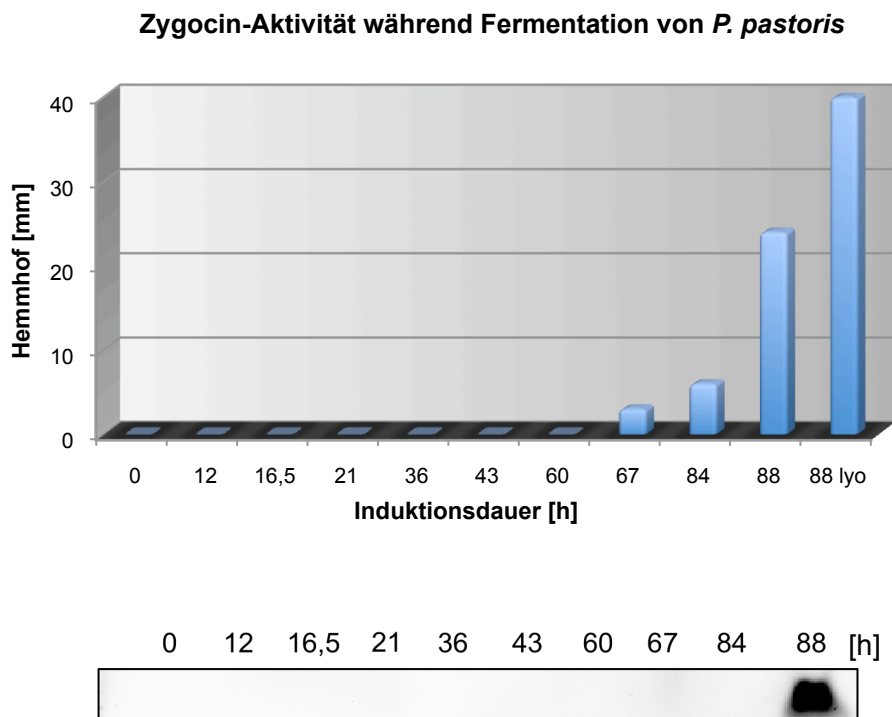
Die Fermentationen wurden in einem 2 l Bioreaktor (Biostat, BRAUN) bei 20 °C durchgeführt (vgl. 2.12, S. 72). Als Vorkultur dienten 100 ml Fermentermedium, welches bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von etwa 10 bei 30 °C und 220 rpm inkubiert wurde. Mit dieser wurde der Fermenter (550 ml Startvolumen, pH 5,5; 20 °C) angeimpft. In der ersten Phase der Fermentation wurden die Zellen angezogen, bis das Glycerin im Fermentationsmedium vollständig verbraucht war. Der Verbrauch des Substrates und somit die Wachstumsphase der Zellen wurde indirekt über den gelösten Sauerstoffgehalt (DO, *dissolved oxygene*) online in der Kulturlösung überwacht. In dieser Zeit wurde eine  $OD_{600}$  von 123 erreicht und der Fermenter bis zu einer Zellmasse von 94 g/l Feuchtwicht angezogen. Die logarithmische Wachstumsphase der Zellen ist in Abbildung 38 zu sehen. Während dieser Phase fiel der DO-Wert unter die eingestellte Minimalsauerstoffsättigung von 25 %, was zu einer Zufütterung von Reinsauerstoff führte, um den Wert konstant bei 25 % zu halten. Am Ende der Phase stieg der DO-Wert auf fast 90 % an, was eine Reduzierung der Rührgeschwindigkeit zur Folge hatte. Der

erreicht, was bedeutete, dass das Feuchtgewicht während dieser 27-stündigen Phase nochmals um 205 g/l Zellen gestiegen war. Durch das starke Wachstum während dieser Phase sank der DO-Wert auch auf unter 25 %. Die Steuerelektronik des Fermenters versuchte durch Erhöhung der Rührgeschwindigkeit auf bis zu 1200 rpm und durch Zufütterung von reinem Sauerstoff den Wert auf diesem Niveau zu halten. Nach Zufütterung des gesamten Glycerins konnte durch den Anstieg des DO-Werts in der Kulturlösung und der damit einhergehenden Reduzierung der Rührgeschwindigkeit das Ende der Glycerol-Fed-Batch-Phase verzeichnet werden. In der dritten Stufe der Fermentation wurden die Zellen an Methanol als einzige C-Quelle angepasst, um die Expression und Sekretion von Zygodin zu induzieren. Diese Anpassung erfolgte sehr langsam, da die Zellen durch eine zu hohe Methanolkonzentration abgetötet würden und die Alkohol-Oxygensasen erst gebildet werden müssen. Die Zellen reagierten mit einem sehr starken Sauerstoffverbrauch auf die Zufütterung des neuen Substrates. Anfangs wurde mit einer Geschwindigkeit von 3,7 ml/h/l Anfangsfermentervolumen Methanol zugefüttert. Die Anpassung der Zellen war nach etwa 12 h erreicht, was durch eine kurzzeitige Unterbrechung der Methanolfütterung untersucht wurde. Stieg während einer etwa 30 sekündigen Unterbrechung der Methanolzufuhr der DO-Wert stark an, so war davon auszugehen, dass die Zellen unter limitierenden (Kohlenstoffquelle) Bedingungen wuchsen und das gesamte Methanol verstoffwechselt wurde, ohne dass es zu einer Akkumulation im Fermenter kam. Nach der Anpassung wurde die Fütterungsgeschwindigkeit für weitere 5 h auf 5,7 ml/h/l Anfangsfermentervolumen angehoben. Nach dieser Zeit wurde die Fütterungsrate bis auf 10,8 ml/h/l Anfangsfermentervolumen Methanol eingestellt und diese Geschwindigkeit bis zum Ende der Fermentation beibehalten. Während der ersten 12 h der Anpassung an die neue C-Quelle sank die Zellmasse auf 248 g/l und die  $OD_{600}$  auf 465. Am Ende der Fermentation (88 h nach Induktion) wurde eine  $OD_{600}$  von 996 und eine maximale Zellmasse von 526 g/l Zellen erreicht. Insgesamt wurden 600 ml Methanol zugefüttert. Während der gesamten Fermentationsdauer wurden Proben genommen, deren zellfreie Kulturüberstände im Western Blot auf Sekretion von Zygodin und im Agardiffusionstest auf Killeraktivität hin untersucht wurden. In Abbildung 39 ist ein solcher Western Blot und die zu den unter-

schiedlichen Induktionszeitpunkten erhaltene Killeraktivität dargestellt. Es ist zu erkennen (Abbildung 39 A), dass erstmals ab einer Induktionsdauer von 67 h eine geringe Killeraktivität (3 mm Hemmhof) zu verzeichnen war. Eine geringfügige Steigerung der Toxizität konnte nach 84 h mit 6 mm Hemmhof festgestellt werden. Die höchste Aktivität konnte am Ende der Fermentation nach 88 h Induktion mit 24 mm Hemmhof erhalten werden. Um auszuschließen, dass der erhaltene Hemmhof auf eventuell nicht verbrauchtes Methanol zurückzuführen ist, wurden die Proben lyophilisiert und in der gleichen Menge Wasser wieder aufgenommen. Es konnte durch die Lyophilisierung ein leichter Aktivitätsverlust registriert werden, allerdings zeigten die Kulturüberstände immer noch eine starke Aktivität (nicht dargestellt). Eine vollständige Lyophilisierung und anschließende Rehydratisierung des Proteins in Wasser mit der Hälfte des ursprünglichen Volumens führte zu einem Hemmhof von 40 mm. Damit konnte festgestellt werden, dass eine Produktion und Sekretion von aktivem Zygocin im Fermenter erfolgreich möglich war. Allerdings blieb die maximal erreichte Aktivität mit 24 mm Hemmhof weit hinter der maximalen Aktivität im Schüttelkolben (49 mm Hemmhof) zurück, obwohl die erreichte Zelldichte mit OD<sub>600</sub> von 996 fast 20-fach höher als im Schüttelkolben (OD<sub>600</sub> 50 ± 5) war.



**Abbildung 38: Fermentationsverlauf *P. pastoris* GS115 zur Zygocinexpression.** Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 5 ml Proben entnommen und die OD<sub>600</sub> (blau). Der gelöste Sauerstoff (DO, schwarz) wurde während der Fermentation erfasst.



**A** **Abbildung 39: Aktivitätstest und Western Blot der während der Fermentation von *P. pastoris* GS115 zur Zygocin-Produktion genommenen Proben. A: Agardiffusionstest:** Die Killeraktivität von jeweils 100  $\mu$ l zellfreiem Kulturüberstand der Fermenterproben wurde gegen *S. cerevisiae* TM231 im MBA-Test untersucht. **88 lyo:** Probe nach 88 h durch Lyophilisierung 2-fach konzentriert. **B: Western Blot:** Je 20  $\mu$ l Kulturüberstand wurde in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die immunologische Detektion erfolgte mittels polyklonalen anti-Zygocin und sekundären anti-Rabbit-HRP Antikörpern (PIERCE) mittels Chemilumineszenz.

### 3.9.7. Fermentation von *P. pastoris* GS115 zur mRFP-Zygocin Produktion

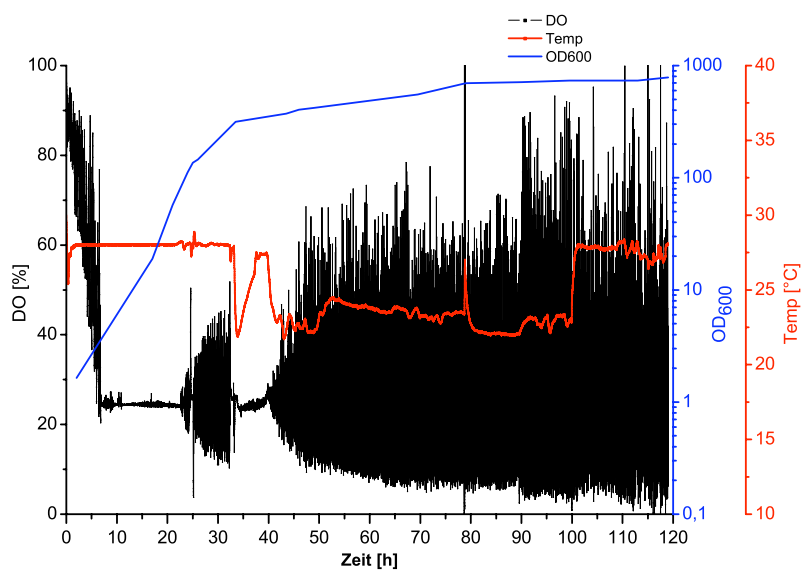
Die Fermentationsstudien wurden in synthetischem Medium in einem 2 l Bioreaktor (Biostat, BRAUN) durchgeführt. Die Vorkultur (*P. pastoris* GS115 pPIC9-mRFP-Zygocin in 100 ml Fermentermedium) wurde bis zum Erreichen einer Zelldichte von  $OD_{600}$  von 15 bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur **B** wurde der Fermenter (550 ml Startvolumen) angeimpft. Im Gegensatz zur Zygocin-Produktion im Fermenter wurden die Glycerol-Batch-Phase und die Glycerol-Fed-Batch-Phase bei 29 °C durchgeführt, um ein schnelleres Wachstum der Zellen zu erreichen. Die Menge an zugegebenem Antischaum (BREOX FM 30) wurde so gering wie möglich gehalten. Der pH-Wert wurde auf 5,3, die gelöste Sauerstoffsättigung (DO, *dissolved oxygene*) auf 25 % eingestellt. Um diesen DO-Wert von 25 % zu halten, wurde der Fermenter so programmiert, dass zuerst die Rührgeschwindigkeit erhöht wurde, um einen höheren Sauerstoffeintrag in die

Kulturlösung zu erreichen; erst nach Erreichen der maximalen Drehzahl wurde reiner Sauerstoff zugefüttert. Am Ende der Glycerol-Batch-Phase, die durch einen Anstieg des zuvor niedrigen DO-Wertes und einer Reduzierung der Rührgeschwindigkeit erkennbar war (Abbildung 40), wurde eine  $OD_{600}$  von 136 und eine Zellmasse von 145 g/l Feuchtgewicht erreicht. Die logarithmische Wachstumsphase der Zellen ist in Abbildung 40 zu sehen. Nachdem das gesamte Glycerin aus der Glycerol-Batch-Phase verbraucht war, erfolgte der Start der Glycerol-Fed-Batch-Phase mit einer Glycerin-Fütterungsgeschwindigkeit von 12 ml/h/l Anfangsfermentervolumen und einer Gesamtmenge von 140 ml 50 % Glycerin. Am Ende dieser Phase wurde eine Zellmasse von 315 g/l Feuchtgewicht und eine  $OD_{600}$  von 316 erreicht. Die Glycerol-Fed-Batch-Phase ist als zweite logarithmische Wachstumsphase in Abbildung 40 zu erkennen. Während dieser Phase sank der DO unter 25 %. Mit Hilfe der Steuerelektronik des Fermenters wurde versucht, den Wert durch eine Anhebung der Rührgeschwindigkeit auf bis zu 1200 rpm und durch Zufütterung von reinem Sauerstoff auf diesem Niveau zu halten. Nachdem die gesamte Menge an Glycerol zugefüttert war, wurde der Fermenter für die Produktion von mRFP-Zygocin auf 20 °C abgekühlt. Nachdem der DO-Wert in der Kulturlösung wieder auf 56 % anstieg und die Rührgeschwindigkeit reduziert wurde, wurde mit der dritten Phase, der Methanol-Fed-Batch-Phase, und damit der Induktion der mRFP-Zygocin Expression begonnen. Hierbei wurden die Zellen über einen Zeitraum von 10 h und einer Fütterungsgeschwindigkeit von 4,3 ml/h/l Anfangsfermentervolumen langsam an die neue C-Quelle angepasst, damit sich keine toxische Konzentration an Methanol im Fermenter akkumulieren konnte. Die Überprüfung der Anpassung der Kultur an die neue Kohlenstoffquelle erfolgte durch kurzzeitiges Ausschalten der Fütterungspumpe. Ein starker Anstieg des DO-Wertes innerhalb von 30 s nach Unterbrechung der Methanolfütterung deutete auf eine vollständige Verstoffwechslung des Methanols und somit die Anpassung der Kultur an die neue C-Quelle hin und führte zu einer Erhöhung der Fütterungsgeschwindigkeit auf 8,7 ml/h/l Anfangsfermentervolumen. Nach 2,5 h mit dieser Fütterungsrate wurde auf die maximale Rate von 10,7 ml/h/l Anfangsfermentervolumen Methanol erhöht. Diese Geschwindigkeit wurde bis zum Ende der Fermentation beibehalten. Insgesamt wurden 750 ml Methanol über einen Zeitraum von 85 h

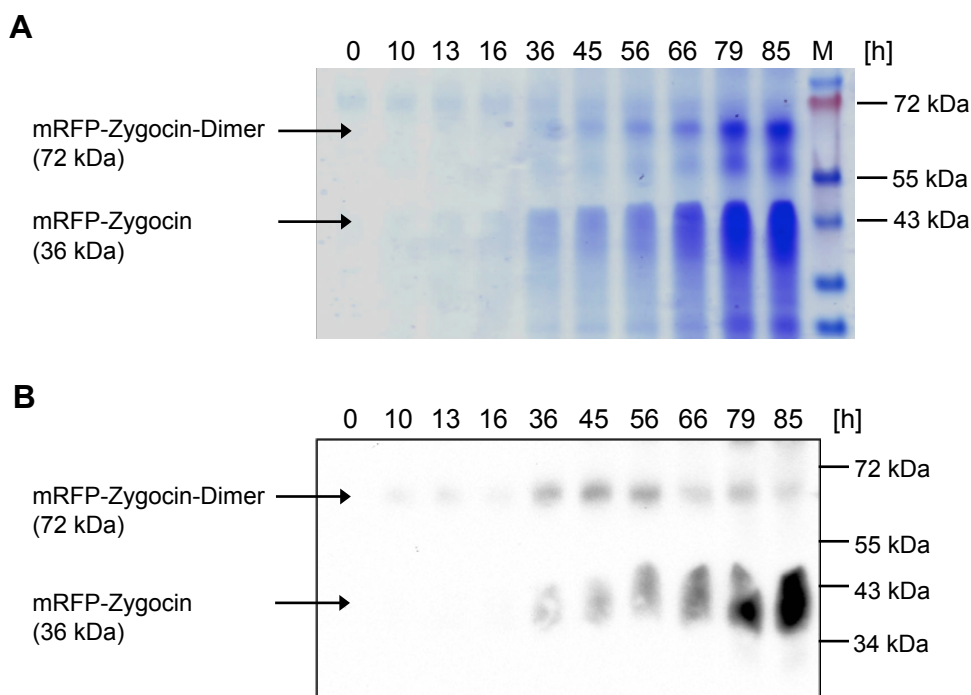
zugefüttert. Während der ersten 12,5 h der Anpassung stieg die  $OD_{600}$  auf 404 und die Zellmasse leicht auf 321 g/l Nassgewicht. Bereits 12,5 h nach Beginn der Induktion konnte eine Rotfärbung der Kultur und eine Rosafärbung des Kulturüberstandes und somit die Expression und die Sekretion von mRFP-Zygocin beobachtet werden. Am Ende der Fermentation konnte eine maximale  $OD_{600}$  von 784 und eine Zellmasse von 590 g/l Feuchtwicht erreicht werden. Der Kulturüberstand wies zu diesem Zeitpunkt eine tiefrote Färbung auf. Während der Methanol-Fed-Batch-Phase stieg die Temperatur trotz Kühlung aufgrund der Methanolverstoffwechslung von den eingestellten 20 °C auf bis zu 28 °C an.

Die zu verschiedenen Zeitpunkten während der Fermentation genommenen Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf Sekretion von mRFP-Zygocin hin untersucht und Toxizitätstests unterzogen (Abbildung 41). Die Proben für die SDS-PAGE wurden nicht aufgeköcht, da eine Detektion mit dem primären anti-DsRED-Antikörper sonst nicht mehr möglich wäre. Daher wurden keine scharfen Banden erhalten. Im Coomassie gefärbten Gel (Abbildung 41 A) ließ sich ab der Probe nach 16 h Induktionsdauer eine etwa 40 kDa große Bande zu detektieren, deren Intensität bis zum Ende der Fermentation nach 85 h Induktionsdauer immer weiter anstieg. Diese Bande stellt das 36 kDa große mRFP-Zygocin dar. Im Western Blot (Abbildung 41 B) ließ sich das mRFP-Zygocin als eine etwa 40 kDa große Bande detektieren, bei der ebenfalls mit zunehmender Induktionsdauer eine verstärkte Intensität zu erkennen war. Bei den Banden bei etwa 70 kDa, die sowohl im Coomassie gefärbten Gel als auch im Western Blot zu detektieren waren, handelt es sich aufgrund der Größe vermutlich um dimerisierte mRFP-Zygocin-Moleküle. Diese Banden zeigten bei Anregung durch UV-Licht ebenfalls wie die 40 kDa Bande eine Fluoreszenz. Die mit den Fermenterproben durchgeführten Toxizitätstests zeigten im Agardiffusionstest gegen die sensitive Hefe *S. cerevisiae* TM231 keinen Hemmhof. Zu keinem Zeitpunkt der Expression konnte eine Killeraktivität festgestellt werden. Dahingegen wies die verwendete Kultur nach Kultivierung im Kolben einen 21 mm großen Hemmhof auf und war somit aktiv.





**Abbildung 40: Fermentationsverlauf von *P. pastoris* GS115 zur mRFP-Zygocin Expression.** Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 5 ml Proben entnommen und die OD<sub>600</sub> (blau) ermittelt. Der gelöste Sauerstoff (DO, schwarz) und die Temperatur (rot) wurden während der Fermentation erfasst.



**Abbildung 41: SDS-PAGE nach Fermentation von *P. pastoris* GS115 zur mRFP-Zygocin Produktion.** Die Proben (nicht denaturiert) wurden in einem 12 %igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. Die Zahlen geben die Dauer der Induktion in Stunden an. **A: Coomassie gefärbtes SDS-Gel;** M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (FERMENTAS); **B: Western Blot:** entwickelt mit monoklonalem anti-DsRED und sekundärem anti-Maus-IgG HRP gekoppelt (PIERCE).

#### 4. Diskussion

In den letzten Jahren ist ein Anstieg von Mykosen beim Menschen zu beobachten. Die Ursache hierfür ist einerseits der zunehmende Gebrauch von immunsupprimierenden Medikamenten, auf der anderen Seite aber auch der infektionsauslösende Organismus selbst. Zudem gibt es opportunistische Pilze und Hefen, die Infektionen nur bei immungeschwächten Organismen hervorrufen. Diese Pilze und Hefen sind ubiquitär vorkommende Organismen mit einer geringen inhärenten Virulenz, die allerdings in den letzten Jahren für eine steigende Zahl an Infektionen sorgten. Zu diesen Organismen zählen besonders *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* und *Zygomyceten* (Jahagrida & Morrison, 2002). Dabei ist *Candida albicans* die am häufigsten isolierte Spezies bei invasiver Pilzinfektion in der Intensivmedizin. Invasive Mykosen sind mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität verbunden. Die Zunahme der Infektionen wird durch eine immer steigende Zahl an immungeschwächten Patienten bedingt durch Organtransplantationen, AIDS, Chemotherapien und Autoimmunerkrankungen hervorgerufen, die mit 70-80 % zu den opportunistischen systemischen Mykosen beitragen. Faktoren, die diese Pilzinfektionen in der Intensivmedizin begünstigen, sind die Überwindung der Hautbarriere (durch Katheter, Operation, Intubation), künstliche Ernährung, Nierenfunktionseinschränkungen, Behandlung mit Corticosteroiden in der Chemotherapie und Breitspektrumantibiotika (Picazo *et al.*, 2008).

Bedingt durch den massiven Einsatz von Antimykotika in der Humanmedizin kommt es zur Ausprägung und starken Verbreitung von Resistenzen der infektionshervorrufenden Erreger. Die zum Teil prophylaktische Verwendung der Azol-Antimykotika in der Landwirtschaft trägt ebenfalls zur Ausbildung von Resistenzen bei (Wolfe & Barret, 1986). Da es nur eine relativ kleine Anzahl an antimykotisch wirksamen Substanzklassen gibt und diese aufgrund der molekularbiologischen Ähnlichkeit zwischen Mensch, Pilzen und Hefen oftmals mit starken Nebenwirkungen behaftet sind, gibt es ein Interesse an neuen Antimykotika mit verbesserten therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten.

Das von der Hefe *Zygosaccharomyces bailii* gebildete Zygocin ist ein von seinem Wirkungsspektrum her interessantes Killertoxin, da es sowohl humanpathogene

Pilze wie *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Sporothrix schenckii* (jeweils auch klinische Isolate) sowie phytopathogene Pilze wie *Fusarium oxysporum* und *Colletotrichum graminicola* abtötet (Radler *et al.*, 1993; Schmitt & Neuhausen, 1994; Weiler & Schmitt, 2003). Darüber hinaus wird durch das Toxin eine ungleich größere Vielfalt an Organismen abgetötet als dies bei anderen Killertoxinen der Fall ist (Weiler, 2002; Weiler & Schmitt, 2003). Bei filamentösen Pilzen wird aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Zellwand im Luft- und Substratmycel und den damit einhergehenden unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften nur das Substratmycel im Wachstum gehemmt, nicht aber das Luftmycel (Weiler, 2002). Nicht nur das breite Wirkungsspektrum von Zygocin und seine schnelle Wirkung machen das Protein interessant für eine mögliche Anwendung als Antimykotikum, sondern besonders seine im Vergleich zu kommerziellen Azol-Antimykotika hohe Aktivität. Im Vergleich zu Clotrimazol konnte mit Zygocin eine 5000-fach höhere zytotoxische Aktivität beobachtet werden und im Vergleich zu Miconazol eine immerhin noch 35-fach höhere Aktivität (Weiler, 2002). Für eine solche Nutzung wäre eine heterologe Expression mit hoher Ausbeute und Aktivität sowie die genaue Klärung der Wirkungsweise des Toxins notwendig.

Bislang gelang die heterologe Expression von Zygocin in seiner aktiven Form lediglich in den Hefen *S. pombe* und *S. cerevisiae* (Weiler *et al.*, 2002). Dabei blieb sowohl die maximal erreichte Proteinmenge als auch die Toxizität weit hinter der des aus *Z. bailii* 412 gewonnenen Toxins und erwies sich für weiterführende Untersuchungen als ungeeignet. Um die genaue Wirkungsweise aufklären zu können, wäre die Struktur des Proteins sehr hilfreich. Anhand dieser Struktur ließen sich eventuell Regionen identifizieren, die eine Optimierung des Toxins hin zu einer größeren Temperatur- und einer höheren pH-Stabilität ermöglichen würden. Sowohl dieses „rationelle Design“ als auch die Toxinoptimierung über Zufallsmutagenese würden ein effektives Expressionssystem voraussetzen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines effektiven Expressionssystems für das Killertoxin Zygocin. Weiterführend sollten aufbauend auf dem Wirkungsmodell Mutationen in das Toxin eingeführt werden, die eine Überprüfung

des Modells gewährleisten sollten (Schmitt & Breinig, 2006; Weiler, 2002). Dazu sollte das zuvor etablierte Expressionssystem verwendet werden. In einem zweiten Teil der Arbeit sollte das Wildtypotoxin aus *Z. bailii* 412 nativ bis zur Homogenität gereinigt werden, um die Kristallstruktur des Proteins durch Röntgenkristallanalyse aufklären zu können.

#### **4.1. Reinigung und Strukturuntersuchungen von Zygocin**

Die Reinigung von biologisch aktivem Zygocin gelang erstmals über eine Affinitätschromatographie mit an Sepharosematrix gekoppelten Hefe-Zellwandmannoproteinen (Weiler & Schmitt, 2003), welche den ersten Rezeptor von Zygocin bei der Abtötung sensibler Hefezellen darstellen (Radler *et al.*, 1993). Dabei war allerdings die Bindekapazität der verwendeten Säule sehr gering und damit die erhaltene Ausbeute an Zygocin. Darüber hinaus zeigte das gereinigte Zygocin eine Verunreinigung mit hochmolekularen Glykoproteinen (Weiler, 2002). Daher erwies sich diese Methode zur Gewinnung großer Mengen reinen Zygocins für Kristallisations- und Röntgenstrukturanalysen als ungeeignet.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Ein-Schritt-Reinigung von Zygocin mittels Kationenaustauschchromatographie etabliert werden, die ausreichende Zygocin-Mengen für die Kristallisation lieferte. Bedingt durch den verwendeten pH-Wert während der Reinigung, der dem physiologischen pH-Wert des Toxins entsprach, war kein Aktivitätsverlust zu verzeichnen (Weiler & Schmitt, 2002). Ein weiterer Vorteil dieses pH-Wertes lag darin, dass nur wenige andere von *Z. bailii* sezernierte Proteine an die Matrix binden konnten, wodurch Zygocin mit hoher Ausbeute und bis zur Homogenität in nur einem chromatographischen Schritt gereinigt werden konnte. Dabei erfolgte die Bindung von Zygocin quantitativ an die Säulenmatrix, da im Säulendurchlauf keine zytotoxische Aktivität detektiert werden konnte. Somit konnte eine Methode etabliert werden, die genügend große Mengen an reinem Toxin für weiterführende Experimente wie Kristallisation, analytische Ultrazentrifugation und Kryo-EM lieferte.

Die Kristallisationsuntersuchungen von Zygocin wurden in Kooperation mit Dr. Gilbert (Oxford) durchgeführt. Dabei konnte unter allen 384 bisher untersuchten Bedingungen kein Kristallwachstum beobachtet werden. Dabei zeigte sich das

Problem, dass Zygocin nicht bis zu der für die Kristallisation benötigten Proteinkonzentration eingeeengt werden konnte. Das gereinigte aktive Zygocin tendierte in Lösung zur Aggregatbildung, dies zeigte, dass das lösliche Stadium des Proteins ein höher energetisches metastabiles Stadium darstellt (pers. Mitteilung A. Sonnen). Daher war eine Kristallisation aus dem löslichen Stadium des Toxins nicht möglich. Eine weitere Möglichkeit zur Strukturaufklärung wäre die Kristallisation des Toxins im Membranstadium. Dazu müsste Zygocin stabil in Detergenzmizellen integriert werden (Privé, 2007; Zhang *et al.*, 2006).

### **Analytische Ultrazentrifugation**

Nach bisherigen Ergebnissen über die Wirkungsweise von Zygocin ist davon auszugehen, dass das Toxin einen inonophoren Wirkungsmechanismus aufweist (Weiler, 2002; Weiler & Schmitt, 2002). Nahezu alle bisher charakterisierten, die Zytoplasmamembran permeabilisierenden Proteine zeigen eine Oligomerisierung an der Membran und schließlich die Insertion der Oligomere in die Membran zur Ausbildung der Pore (Gilbert, 2002; Iacovache *et al.*, 2008; Lesieur *et al.*, 1997). Ein einzelnes Protein ist nicht in der Lage, eine Pore auszubilden. Allerdings gibt es auch Poren formende Toxine wie das Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila*, einem humanpathogenen Bakterium, bei welchem nicht nur eine Oligomerisierung nach Rezeptorerkennung nachgewiesen werden konnte, sondern auch eine Oligomerisierung zu Heptameren in Lösung. Diese wurde jedoch bei etwa  $10^5$ -fach höherer Protein-Konzentration gezeigt (Abrami & van der Goot, 1999). Bisherige Untersuchungen von Zygocin zur Oligomerisierung zeigten lediglich Monomere in Lösung, wobei zum Nachweis bei der nativen Western Analyse nur auf die sehr unspezifischen anti-Zygocin Antikörper zurückgegriffen werden konnte (Weiler, 2002).

Die analytische Ultrazentrifugation stellt neben der Massenspektrometrie eine sehr genaue Methode zur Molekulargewichtsbestimmung von Makromolekülen dar, mit welcher sich auch Protein-Oligomere nachweisen lassen. Daher wurde mit dem chromatographisch gereinigten Toxin eine analytische Ultrazentrifugation in Kooperation mit Dr. Gilbert (Universität Oxford) durchgeführt. Das hierdurch experimentell bestimmte Molekulargewicht ergab eine Größe von 10,5 kDa,

weicht somit nur geringfügig von der mittels MALDI-TOF ermittelten Größe von 10,47 kDa ab (Weiler *et al.*, 2002). Die geringe Abweichung des Molekulargewicht ist auf die Tendenz des Zygocins zur Aggregatbildung in Lösung zurückzuführen, so dass nur geringe Toxin-Konzentrationen untersucht werden konnten, wodurch der Fehler der Methode erhöht wurde. Auch mit Hilfe dieser Methode konnten keine Zygocin-Oligomere nachgewiesen werden, was zeigt, dass Zygocin in Lösung bei den untersuchten Konzentrationen keinerlei Tendenz zur Oligomerisierung besitzt. Eine Oligomerisierung von Zygocin bereits in Lösung ist allerdings auch nicht für die ionophore Wirkung von Zygocin notwendig.

Um Zygocin-Oligomere eventuell in einer Membranumgebung nachweisen zu können, wurde die Oligomerisierung von Zygocin nach Inkubation mit dem neutralen Detergenz C8E5 (Octylpentaglycol) mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht, da erste Versuche bereits eine Integration des Toxins in diese Mizellen zeigten. Die erhaltenen Sedimentationsgeschwindigkeiten für die mit Zygocin behandelten Mizellen deuteten auf eine Dimerisierung und Tetramerisierung des Toxins in den Mizellen hin. So konnte ein Oligomer mit etwa 2,55 S nachgewiesen werden, welches einem rechnerisch ermittelten, optimalen Zygocin-Dimer (20,8 kDa) von 2,72 S zugeordnet werden konnte. Der Sedimentationskoeffizient von 3,71 S deutet auf ein weiteres Oligomer hin. Bei diesem handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Tetramer, da es bei allen untersuchten Detergenz:Zygocin-Verhältnissen schneller als ein theoretisches, ideales Zygocin-Trimer mit 31,4 kDa sedimentiert. Der ideale Sedimentationskoeffizient eines theoretischen Tetramers liegt bei 4,32 S. Es ist daher davon auszugehen, dass das Tetramer eine leicht veränderte Form besitzt, die zu einer geringeren Oberflächenreibung führt und somit in einer signifikanten Reduzierung der Sedimentationsrate begründet ist. Diese Untersuchungen zeigten erstmals, dass Zygocin in Umgebung hydrophober Detergenz-Mizellen oligomerisieren kann. Diese Ergebnisse liefern somit weitere Hinweise darauf, dass Zygocin innerhalb der Zytoplasmamembran oligomerisiert und eine Pore ausbildet.

## Kryoelektronenmikroskopie toxinbehandelter Liposomen

Um die 3D-Struktur von Zygocin bzw. seiner Oligomere ohne Kristallisation aufklären zu können, sollte Zygocin in Membranen inseriert und mittels Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) die entstehenden Poren untersucht werden. Bei der Kryo-EM handelt es sich um eine schonende Methode, bei der im Vergleich zur Kristallisation sehr geringe Mengen Protein benötigt werden und bei der die nativen Proteine in Lösung oder eben auch in Lipidmembranen untersucht werden können (Bleicken *et al.*, 2010; Eifler *et al.*, 2006). Mittels dieser computer-gestützten Bildverarbeitungsmethode können Protein-3D-Struktur mit einer Auflösung von 6-30 Å erhalten werden (Zhou *et al.*, 2001; Stark, 2002). Mit dieser Technik konnten bereits die 3D-Strukturen der porenbildenden Toxine Pneumolysin aus *Streptococcus pneumoniae* und Cytotoxin ClyA aus *E. coli* aufgeklärt werden (Eifler *et al.*, 2006; Tilley *et al.*, 2005).

Liposomen mit unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen wurden mit Zygocin inkubiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Die mit Zygocin behandelten neutral geladenen PC-Liposomen zeigten keinen Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei den PC/PS-Liposomen war deutlich zu erkennen, dass die Anzahl an Liposomen nach Behandlung mit Zygocin im Vergleich zur Kontrolle stark vermindert war. Allerdings konnten keine oligomeren Zygocin-Komplexe in den Liposomen detektiert werden. Nach Inkubation negativ geladener PC/PA Liposomen mit Zygocin ließen sich im Elektronenmikroskop keinerlei Liposomen mehr detektieren. Die Negativkontrolle, die nicht mit Zygocin behandelt wurde, zeigte dagegen viele Liposomen. Anhand dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass Zygocin eine hohe Affinität zu negativ geladenen Membranen besitzt und die Liposomen durch die Integration von Zygocin in die Membran vollständig zerstört wurden. Die verminderte Anzahl an PC/PS-Liposomen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass PS bei dem verwendeten pH-Wert von 4,0 nicht vollkommen neutral ist, sondern eine leicht negative Ladung auf der Oberfläche der Liposomen ausbildet. Daraus ist zu schließen, dass Zygocin eine negativ geladene Membran für die Integration und die Ausbildung einer Pore benötigt. Diese Schlussfolgerung können auch damit begründet werden, dass die Plasmamembran von Hefen und Pilzen, das natürliche Ziel von Zygocin, überwiegend negativ geladene Membranlipide

aufweist. Dadurch lässt sich eventuell auch die selektive Toxizität von Zygocin auf Hefen und Pilze erklären. Das Fehlen detektierbarer, stabiler Zygocin-Oligomeren in den PC/PS Membranen ist wahrscheinlich auf die hohe Inkubationstemperatur von 36 °C zurückzuführen, da das Temperaturoptimum von Zygocin bei 20 °C liegt und eine Inkubation bei höheren Temperaturen zu einer starken Reduzierung der Toxizität bis hin zum vollständigen Verlust der Killeraktivität führt (Radler *et al.*, 1993).

#### **4.2. Expression von Zygocin in *Z. bailii***

Für Studien zur Wirkungsweise von Zygocin war die Etablierung eines heterologen Expressionssystems notwendig. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Expression von aktivem Zygocin in *S. cerevisiae* möglich ist, aber nur geringe Proteinmengen sezerniert werden, da sich die Hefen bei der Expression des Toxins selbst abtöten. Die Expression von Zygocin verleiht im Gegensatz zu den *S. cerevisiae* Toxinen keine schützende Immunität, weshalb *S. cerevisiae* nicht als Expressionswirt eingesetzt werden konnte (Bies, 1998; Schmitt & Neuhausen, 1994; Weiler, 2002). Eine von Weiler (2002) durchgeführte Zygocinexpression in *S. pombe* erwies sich als erfolgreich, allerdings war die maximal erzielte Proteinmenge so gering, dass für einen Aktivitätstest der Kulturüberstand 2000-fach konzentriert werden musste, um Aktivität feststellen zu können. Die so erhaltene Aktivität blieb weit hinter der des Wildtyps zurück, weshalb dieser Wirt ebenfalls nicht für die Expression von mutierten Zygocin-Varianten verwendet werden konnte. Eine solch hohe Konzentrierung aller exprimierten Zygocin-Varianten wäre unpraktikabel und aufgrund der geringen Aktivität könnte keine Aussage über Aktivitätsminderungen getroffen werden. Auch wäre eine Konzentrierung der Toxinvarianten, bei der ganze Domänen des Toxins deletiert wurden, sehr schwierig, da die erhaltenen Varianten eine so geringe Proteingröße aufwiesen, dass eine Ultrafiltration nur unter großen Proteinverlusten durchzuführen wäre. Deshalb fiel die Wahl auf *Z. bailii* als Expressionswirt, da sich dieser natürlicherweise auf Zellwand- und Membranebene resistent gegenüber Zygocin verhält und bereits als geeigneter Wirt zur Fremdproteinproduktion beschrieben wurde (Sauer *et al.*, 2004). Auch konnte mit



dem Plasmid von Branduardi *et al.* (2004) und dem zygocineigenen Sekretionssignal bereits erfolgreich das humane Interleukin-1 $\beta$  sezerniert werden, allerdings spielt diese Hefe bislang eine sehr untergeordnete Rolle bei der heterologen Protein-Expression. Verschiedene Zygocin-Varianten (Abbildung 10 und Abbildung 11) wurden erfolgreich kloniert und in unterschiedlichen *Z. bailii* Stämmen exprimiert. Jedoch zeigten die konzentrierten Kulturüberstände keine zytotoxische Aktivität. Western Analysen zeigten ein vollständiges Fehlen detektierbarer Mengen an Toxin im Kulturüberstand. Somit ist der fehlende Killerphänotyp nicht auf eine qualitative Ursache, also ein fehlgefaltetes Toxin zurückzuführen, sondern hat eine quantitative Ursache. Eine zur Kontrolle durchgeführte Northern Analyse (nicht dargestellt) zeigte nur eine äußerst geringe Menge an Zygocin-mRNA beim Wildtyp. Die mRNA der Zygocin-Varianten ließ sich nicht detektieren. Daher ist davon auszugehen, dass das Fehlen der mRNA auf einen Defekt während der Transkription zurückzuführen ist, welcher sich jedoch nicht schlüssig begründen lässt. Ein möglicher Grund wäre ein sehr schneller Abbau der Zygocin-mRNA. Eine Kontrollexpression von GFP mit N-terminal fusioniertem Zygocin-Sekretionssignal im gleichen Expressionsplasmid und in den gleichen *Z. bailii* Stämmen zeigte jedoch eine starke Expression und Sekretion von GFP in Western Analysen. Somit weist die Promotorregion des Plasmids keine Mutationen auf, was aufgrund des vollständigen Fehlens der Zygocin-mRNA zu vermuten wäre. Es ist daher davon auszugehen, dass die Zygocinsequenz zu einer extrem reduzierten Halbwertszeit der mRNA führt, denn das gleiche GFP-Konstrukt, welches zuvor zu einer großen Menge an sezerniertem GFP geführt hatte, zeigte mit C-terminal fusionierter Zygocinsequenz keine Proteinexpression und es waren keine mRNA-Transkripte detektierbar. Allerdings sind die verwendeten *Z. bailii* Expressionsstämme nicht genetisch charakterisiert, so dass eventuell genetische Unterschiede zwischen ihnen und dem ebenfalls nicht charakterisierten Wildtypkillerstamm (*Z. bailii* 412) bestehen. Daher wurde im folgenden eine Heilung des Wildtypkillers durchgeführt, mit dem Ziel, diesen Stamm als Expressionsstamm für biologisch aktives Zygocin nutzen zu können.

### 4.3. Heilung des *Z. bailii* 412 Wildtypkillerstammes und Zygotocinexpression

Der bislang existierende, geheilte *Z. bailii* Wildtypkillerstamm FN207 wurde durch Cycloheximid-Behandlung erzeugt (Radler *et al.*, 1993; Weiler, 2002). Er zeichnet sich jedoch durch einen unnormal langsames Wachstum aus, so dass auf eine Verwendung als Expressionsstamm verzichtet wurde. Stattdessen wurde durch Anwendung zweier verschiedener Strategien versucht den Killerstamm von den M<sub>Zb</sub>-dsRNA Viren zu heilen, so dass durch den Verlust der M<sub>Zb</sub>-dsRNA kein viral kodiertes Zygotocin mehr gebildet werden kann. Der so erzeugte geheilte Killerstamm sollte in der Lage sein, plasmidkodiertes Zygotocin zu exprimieren und in aktiver Form zu sezernieren. Bei der ersten Strategie wurde eine Sequenz der M28-dsRNA, die die cis-aktiven Elemente (VBS, TRE und IRE) enthielt, im Wildtypkiller zur Expression gebracht. Es ist bekannt, dass ein *S. cerevisiae* Stamm, der das L-A Helfervirus enthält, nach Transfektion mit M<sub>Z</sub>-dsRNA-VLP einen stabilen Zygotocin Killerphänotyp ausbildet (Schmitt & Neuhausen, 1994), da die zur Replikation und Encapsidierung notwendigen Sekundärstrukturen der VLP von *S. cerevisiae* und *Z. bailii* funktionell ähnlich sind (Neuhausen & Schmitt, 1994; Zorg *et al.*, 1988). Die Expression der klonierten DNA führte zu einem Verlust der Killeraktivität einiger Klone. Nachfolgend durchgeführte Northern Analysen bestätigten den vollständigen Verlust des L<sub>Zb</sub>- und des M<sub>Zb</sub>-Virus bei diesen Klonen. Die VBS-Struktur von M28 führte demnach bereits nach wenigen Zellteilungen zum vollständigen Verlust der L<sub>Zb</sub>- und M<sub>Zb</sub>-Viren, mit Ausnahme des Z-dsRNA-Virus, welches für die Replikation nicht auf die Gegenwart des L-A-Virus angewiesen ist, da es ein eigenständiges Replikon darstellt (Rehfeld, 1999). Auf diese Weise konnte ein geheilter Killerstamm hergestellt werden, der im Vergleich zu dem FN207 Stamm (Radler *et al.*, 1993) über eine normale Wachstumsgeschwindigkeit verfügt, sich aber immer noch durch seine Immunität gegenüber Zygotocin auszeichnet, da die bislang für Zygotocin unbekannt Immunitätskomponente nicht wie bei *S. cerevisiae* Killertoxinen durch das M-Virus vermittelt wird (Radler, 1993; Schmitt & Breinig, 2006). Die zweite Strategie, die in dieser Arbeit zur Heilung des Wildtypkillers genutzt wurde, machte sich die besondere Art der Virusreplikation zu Nutze. Während der Replikation der dsRNA-Viren wird eine (+)RNA mit der VBS-Struktur in die Capsidstruktur verpackt und dort von der viruseigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase zum dsRNA-Genom

komplettiert (Schmitt & Breinig, 2006; vgl. Abbildung 1, S. 10). Aus den VLP wird wiederum eine (+)RNA ausgeschleust, die einerseits als mRNA für das Hauptcapsidprotein, die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L-A-Virus) und das Vorläuferkillertoxin (M-Virus) dient und auf der anderen Seite als RNA-Genom, welches für die Replikation der VLP in Capsidstrukturen verpackt wird. Zur Heilung des *Z. bailii* 412 Wildtypkillers wurde eine *antisense* VBS-Struktur des  $M_{zb}$ -Virus eingesetzt. Diese *antisense*-DNA enthielt die komplementäre Sequenz der VBS-Struktur, der TRE und des IRE. Die Heilung des Wildtypkillers sollte dadurch erfolgen, dass nur einzelsträngige RNA an ihrer VBS-Struktur erkannt und schließlich in die Viruscapsidhülle verpackt werden kann, nicht aber doppelsträngige oder teilweise doppelsträngige RNA. Nach Expression der *antisense* VBS-RNA zeigten die untersuchten Hefen den Verlust der Killeraktivität. Nachfolgend durchgeführte Northern Analysen bestätigten den vollständigen Verlust des  $L_{zb}$ - und des  $M_{zb}$ -Virus. Die Expression der *antisense* VBS-RNA führt demnach zu einer partiell doppelsträngigen Virus-RNA, welche nicht mehr in VLP verpackt werden kann. Das Z-Virus wurde bei dieser Methode der Heilung nicht verdrängt, da es zur Replikation nicht auf die Proteine des L-A-Virus zurückgreift, sondern eigene Proteine kodiert. Die Funktion dieses kryptischen Virus ist noch unbekannt, es konnte bislang lediglich in der Hefe *Z. bailii* nachgewiesen werden (Rehfeld, 1999). Nach mehrmaligem Passagieren der Hefen ohne Selektionsdruck konnte der Verlust des Expressionsplasmids verzeichnet werden, so dass durch Anwendung beider Methoden relativ schnell geheilte *Z. bailii*-Nichtkiller für weitere Expressionsuntersuchungen hergestellt werden konnten. Beide Killerstämme verfügen über die gleiche genetische Ausstattung wie der Wildtypkiller, da keine der verwendeten Methoden mutagene Wirkung hatte. Des Weiteren zeichnen sich die erzeugten Stämme durch eine vollständige Resistenz gegenüber von außen zugeführtem Zygocin aus, da bei *Z. bailii* die spezielle Zusammensetzung der Zytoplasmamembran als Ursache für die Resistenz vermutet wird (Weiler, 2002) und sie nicht wie bei den *S. cerevisiae* Killertoxinen viruskodiert wird (Breinig *et al.*, 2006; Schmitt & Tipper 1995).

Neben dem Präprotoxin wurden noch zwei getaggte Zygocin-Varianten hergestellt, um die Probleme bei der Detektion mit den anti-Zygocin Antikörpern zu umgehen. Die für die Tags erhältlichen monoklonalen Antikörper sollten eine

spezifischere, sensitivere Detektion in Western Analysen ermöglichen. Bei keinem der untersuchten Transformanten konnte jedoch im konzentrierten Kulturüberstand das Killertoxin immunologisch nachgewiesen werden und es konnte auch keine Killeraktivität detektiert werden. Da allerdings GFP durch die Fusion mit der Zygocin-Signalsequenz in großer Menge sezerniert und immunologisch nachgewiesen werden konnte, kann ein Mutation im Promotorbereich des Plasmids als Ursache für die fehlende Zygocin-Sekretion ausgeschlossen werden. Auch bestätigt diese Kontrolle die Eignung der geheilten Killerhefe als Expressionswirt mit dem verwendeten Plasmid. In Northern Analysen lies sich keine Zygocin-mRNA detektieren, was zeigt, dass die Ursache nicht bei der Sekretion oder Translation zu suchen ist, sondern vielmehr schon auf Transkriptionsebene. Daher ist zu vermuten, dass die klonierte Zygocin cDNA nicht effektiv von der RNA-Polymerase des *Z. bailii* Stammes transkribiert werden kann. Im Wildtypkiller wird die kodierende (+)RNA von der viruseigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase und nicht von der RNA-Polymerase des Wirtes transkribiert (Icho & Wickern, 1989; Wickern, 1996). Die Analyse der RNA-Sequenz gibt keinen Rückschluss darauf, warum die RNA-Polymerase von *Z. bailii* die Zygocinsequenz nicht translatiert. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die klonierte cDNA, welche nur den ORF des Toxingens enthält, in eine extrem un stabile mRNA transkribiert und sofort abgebaut wird, ohne dass sie in einem detektierbaren Maße translatiert bzw. im Northern Blot nachgewiesen werden konnte. Die auf dem  $M_{zb}$ -dsRNA Genom 3'-wärts des ORF von Zygocin gelegenen cis-aktiven Elemente wie TRE und IRE tragen im Wildtypkiller eventuell zu einer höheren Stabilität der mRNA bei, diese fehlen jedoch bei den klonierten cDNAs von Zygocin (Weiler *et al.* 2002). Daher kann die fehlgeschlagene homologe Expression von Zygocin in den geheilten Wildtypkillerstämmen von *Z. bailii* nicht schlüssig begründet werden. Um den Einfluss dieser Regionen und Strukturen, die 3'-wärts der kodierenden Sequenz liegen, auf die Stabilität der mRNA und damit der Toxinexpression und Sekretion überprüfen zu können, wäre es erforderlich, die komplette Sequenz des  $M_{zb}$ -Genoms zu klonieren und in *Z. bailii* zur Expression zu bringen.

#### 4.4. Expression von Zygocin in *Kluyveromyces lactis*

Ein weiterer möglicher Zygocin-Expressionswirt stellte die Milchhefe *K. lactis* dar, die für weitere Untersuchungen eingesetzt wurde. Diese Hefe zeichnet sich sowohl auf Zellwand- als auch auf Membranebene durch eine Resistenz gegen Zygocin aus, was eine unabdingbare Voraussetzung für die erfolgreiche Expression ist. Außerdem konnte bereits das K28 Killertoxin aus *S. cerevisiae* in großer Menge und aktiver Form erfolgreich sezerniert werden (Guida, 2008). Um die Sensitivität des immunologischen Nachweises zu erhöhen, wurden Toxinvarianten mit C- und N-terminalem FLAG-Tag konstruiert und exprimiert. Zur Sekretion des Killertoxins wurde statt der Zygocin-Signalsequenz das starke  $\alpha$ -MF-Sekretionssignal aus *S. cerevisiae* verwendet. Das Toxin konnte in großen Mengen im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Jedoch war weder im Kulturüberstand noch in dessen Konzentrat eine Killeraktivität zu verzeichnen. Dies zeigt, dass der fehlende Killerphänotyp nicht auf einen Mangel an sezerniertem Toxin, sondern vielmehr auf eine fehlerhafte Faltung zurückzuführen ist. Eine Ursache hierfür könnte der verwendete Protein-Tag sein. Neben einer möglichen Fehlfaltung des Proteins, könnte durch die Fusion mit dem stark kationischen FLAG-Tag die Ladung des Fusionsproteins so weit gesunken sein, dass eine Bindung des Toxins an die negativ geladene Membran der sensitiven Zielzelle nicht möglich war und es somit zu keiner zytotoxischen Aktivität kam (Hopp *et al.*, 1988). So besitzt das Fusionsprotein einen pI von 4,71, im Gegensatz dazu das Wildtypotoxin einem pI von 5,6. Um die geringere Ladung des getaggen Toxins bei pH 4,0 als mögliche Ursache ausschließen zu können, wäre es erforderlich eine Zygocin-Variante ohne Tag zu exprimieren. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung eines Tags, das die Ladung des Proteins nicht so stark verändert.

Eine weitere Ursache für ein Fehlen der Killeraktivität könnte das verwendete Medium sein. Bei diesem handelte es sich um das für *S. cerevisiae* entwickelte B-Medium, bei welchem die C-Quelle (Glukose gegen Galaktose) ausgetauscht wurde. Dieses Medium wurde verwendet, da eine Konzentrierung durch Ultrafiltration des angegebenen Komplexmediums nicht möglich war und im B-Medium ein ausreichend gutes Wachstum erzielt wurde. Möglich wäre auch, dass

die vollständig fehlende Aktivität während der Expression auf den verwendeten pH-Wert von 6,0 zurückzuführen war, zumal Zygocin bereits bei einer Inkubationsdauer von 24 h bei pH 6,0 50 % seiner Aktivität verliert (Radler *et al.*, 1993). Mit diesem Wert wurde gearbeitet, da bei geringeren pH-Werten ein sukzessiver Rückgang der Toxin-Sekretionsrate zu verzeichnen war und schließlich bei pH 4,0 kein Protein mehr im Kulturüberstand detektiert werden konnte. Ob die geringe Toxinmenge bei niedrigeren pH-Werten auf eine geringere Sekretionsleistung der Hefe zurückzuführen ist oder auf einem schnelleren Abbau des sezernierten Toxins, konnte nicht festgestellt werden. Worauf letztendlich das vollständige Fehlen der Toxinaktivität zurückzuführen ist, lässt sich nicht schlüssig begründen. Aufgrund des Fehlens jeglicher Toxizität des exprimierten Zygocins und dem Fehlen der Möglichkeit, Zygocin bei pH-Werten unter 5,5 zu sezernieren, wurde auf eine weitere Untersuchung dieses Expressionswirtes verzichtet.

#### **4.5. Expression von Zygocin in *E. coli***

*E. coli* bietet sich als Wirt für die heterologe Zygocin Expression an, da es sich durch seine Resistenz gegenüber außen appliziertem Zygocin und einer hohen Produktionsrate von heterologen Proteinen auszeichnet. Zygocin zeigt nach bisherigen Untersuchungen keine posttranslationalen Modifizierungen, so dass eine aktive Expression in *E. coli* möglich sein sollte (Weiler *et al.*, 2003). Der Sequenz des reifen Strep-getaggen Zygocin (ohne PräPro-Region) wurde zur periplasmatischen Expression in *E. coli* die OmpA Leadersequenz angefügt. Nach Isolierung der periplasmatischen Proteine konnte im Western Blot kein Strep-Zygocin detektiert werden, im Rohextrakt dagegen schon. Auffällig war dabei, dass der größte Teil des exprimierten Proteins eine Größe von etwa 15 kDa aufwies und nur ein geringer Teil die korrekte Größe von 12 kDa. Daher ist davon auszugehen, dass die geringe Löslichkeit von Zygocin, die schon bei den Kristallisationsversuchen auffiel und die hohe Expressionsrate des tet-Promotors dazu führten, dass sich das Protein nach der Expression in Form unlöslicher *inclusion bodies* in den Zellen akkumulierte. Dies kann dadurch erklärt werden,

dass der Transport über die Membran limitierend war und somit die Expression die mögliche Transportrate überstieg. Dadurch lässt sich die beobachtete Größe des Proteins erklären, denn erst beim Transport durch die Zytoplasmamembran wird die OmpA-Signalsequenz durch die *leader peptidase* abgespalten (Cornelis, 2000). Der Nachweis des korrekt prozessierten Strep-Zygocins im Zellextrakt und dessen Ausbleiben in der periplasmatischen Fraktion lässt sich mit der Membranaffinität des Zygocins erklären. Eine geringe Menge Toxin wurde durch die Membran Richtung Periplasma transportiert, dabei wurde die OmpA-Signalsequenz abgespalten. Das Protein lag nicht frei im Periplasma, sondern membranassoziiert vor und konnte somit durch die gewählten Extraktionsbedingungen nicht von der Membran gelöst werden und ließ sich daher nicht in der periplasmatischen Fraktion detektieren. Die versuchte Reinigung des Toxins aus dem Rohextrakt über eine Strep-Tactin Matrix führte nur zu einer äußerst geringen Ausbeute an Protein. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das verwendete Strep-Tag-System für die Reinigung von Zygocin mit seinem teilweise hydrophoben Charakter vollkommen ungeeignet war. Möglich wäre auch, dass sich das Tag nicht an einer exponierten Position des Proteins befand und so eine Bindung an das Strep-Tactin nur schwer möglich war. Ein Toxizitätstest des Rohextraktes gegen eine sensitive Hefe zeigte keine Aktivität des Zygocins. Nach Abspaltung des N-terminalen Strep-Tags durch Factor Xa Behandlung zeigte das Protein ebenfalls keine Aktivität. Es ist daher davon auszugehen, dass Zygocin nicht in der korrekten Sekundärstruktur vorlag und daher auch die Abspaltung des eventuell störenden Protein-Tags keinen Erfolg hatte und damit der Aktivitätsverlust begründet werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass die sekretorische *E. coli* Expression ein ungeeignetes Expressionssystem für Zygocin darstellt und dass das Strep-Tag nicht für die Reinigung von Zygocin geeignet ist.

Da sich die sekretorische Expression als ungeeignet herausstellte, wurden sowohl das reife Zygocin (ohne PräPro-Region), als auch N- bzw. C-terminal (His)<sub>6</sub>-getaggte Varianten kloniert und zytoplasmatisch exprimiert. Alle drei rekombinanten Proteine konnten erfolgreich nachgewiesen werden, allerdings lagen die Toxinvarianten fast ausschließlich in Form von *inclusion bodies* vor. Eine Erniedrigung der Kultivierungstemperatur nach Induktion führte nicht zu löslichem

Zygocin, so dass im Weiteren eine Denaturierung und anschließende Rückfaltung des Proteins durchgeführt wurde.

Das Vorliegen des Zielproteins in Form von *inclusion bodies* muss kein Nachteil darstellen. Ein Vorteil liegt darin, dass die Expressionsrate mehr als 30 % der zellulären Proteine erreichen kann. Des Weiteren wird die Isolierung der Proteine mit einem hohen Reinheitsgrad erleichtert, wodurch eventuell spätere Reinigungsschritte entfallen. Auch sind die in aggregierter Form vorliegenden Proteine weitgehend vor proteolytischem Abbau geschützt (Singh & Panda, 2005; Vallejo & Rinas, 2004; Walsh, 2003). Allerdings müssen die Proteine zuvor teilweise oder vollständig denaturiert werden, um anschließend unter geeigneten Bedingungen wieder in die aktive Form rückgefaltet zu werden. Da nach Reinigung der Zygocin *inclusion bodies* ein sehr viel geringerer Reinheitsgrad als in der Literatur angegeben (70-80 %) erreicht wurde (Lin *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2009), mussten die Proteine vor einer anschließenden Rückfaltung chromatographisch gereinigt werden. Die Denaturierung der *inclusion bodies* erfolgte sowohl mit Harnstoff als auch mit Guanidinhydrochlorid. Bei der affinitätschromatographischen Reinigung konnte (His)<sub>6</sub>-Zygocin in Guanidinhydrochlorid haltigem Puffern bis zur Homogenität gereinigt werden, wohingegen es unter Harnstoff-Bedingungen nicht gelang. Nach Denaturierung der *inclusion bodies* mittels Guanidinhydrochlorid konnten im Coomassie gefärbten Gel geringere (His)<sub>6</sub>-Zygocin Konzentrationen im Vergleich zu anderen Proteinen beobachtet werden. Zur Entfernung des Guanidinhydrochlorids wurden die Proben gefällt, da dieses das Laufverhalten der Proteine im Gel zu stark beeinträchtigt. (His)<sub>6</sub>-Zygocin fällt im Vergleich zu den anderen Proteinen mit höheren Molekulargewichten wesentlich schlechter aus, wodurch sich die geringe Konzentration im Gel erklären lässt. Die detektierten höhermolekularen Proteine (34 kDa und 50 kDa) sind auf die geringe Spezifität des verwendeten Antikörpers zurückzuführen und stellen keine Zygocin Oligomere dar. In keinem Ansatz des gereinigten (His)<sub>6</sub>-Zygocins konnte nach den unterschiedlichen Rückfaltungsversuchen eine zytotoxische Aktivität nachgewiesen werden. Daher ist zu vermuten, dass die richtigen Bedingungen zur Rückfaltung bislang nicht gefunden wurden. Allerdings muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Zygocin nach vollständiger Denaturierung nicht wieder in die biologisch aktive Form rückzufalten ist. Eine weitere Möglichkeit



wäre auch, dass das verwendete (His)<sub>6</sub>-Tag mit seinem anionischen Charakter die toxische Aktivität des Proteins unterbindet bzw. eine korrekte Faltung verhindert. Diese Möglichkeit muss vor allem daher in Betracht gezogen werden, da alle in *P. pastoris* exprimierten Varianten mit Tag sich durch ein vollständiges Fehlen einer zytotoxischen Aktivität auszeichneten. Worauf letztendlich das Fehlen der Toxizität des rückgefalteten Zygocins zurückzuführen ist, lässt sich nicht feststellen. Um einen eventuellen Verlust der Toxizität durch das (His)<sub>6</sub>-Tag ausschließen zu können, müsste eine Variante kloniert werden, die durch eine proteolytische Spaltung (Faktor Xa oder Enterokinase) das Entfernen des Tags vor oder nach der Rückfaltung erlaubt.

Eventuell spielt bei der korrekten Faltung des Toxins im *Z. bailii* Wildtyp die Pro-Region eine entscheidende Rolle als intramolekulares Chaperon, wie es schon für andere Proteine beschrieben wurde (Riffer *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2001). Um den Einfluss der Proregion auf die Bildung von aktivem löslichem Zygocin untersuchen zu können, wäre es erforderlich, diese in *E. coli* parallel *in trans* zu exprimieren. Die Funktion der Pro-Region als Faltungshelfer könnte auch durch Zugabe des Proteins in unterschiedlichen Konzentrationen zu Rückfaltungsansätzen untersucht werden, dazu müsste das Protein vorher in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden.

#### **4.6. Expression von Zygocin in *P. pastoris***

Um Zugang zu größeren Mengen aktiven Zygocins zu erhalten wurde das Toxin in der Hefe *P. pastoris* exprimiert, da bislang alle untersuchten Expressionswirte aufgrund von fehlender Expression bzw. Aktivität ausschieden. Diese methylotrophe Hefe zeichnet sich durch eine Zygocin-Resistenz auf Zellwand- und Membranebene aus, was eine absolute Notwendigkeit für eine erfolgreiche Expression darstellt. Die Vorteile dieser Hefe liegen in der Verwendung der kostengünstigen Kohlenstoffquelle Methanol, der Fermentierbarkeit bis zu hohen Zelldichten, einer möglichen Sekretion des gewünschten Proteins in das Kulturmedium und einer sehr hohen Expressionsrate (Clare *et al.*, 1991; Hagenson *et al.*, 1991; Paifer *et al.*, 1994). Bis zu 6,4 g Protein werden pro Liter *P. pastoris* Kultur heterolog exprimiert (Chen *et al.*, 2004; Macauley-Patrick *et al.*,

2005). Ein weiterer Vorteil der Hefe liegt in der Möglichkeit, Proteine auch bei dem für Zygocin nötigen pH-Wert von 4,0 zu sezernieren, ohne dass das Wachstum der Hefe beeinträchtigt wird. Zygocin konnte erfolgreich in *P. pastoris* GS115 rekombinant produziert und sezerniert werden, wobei hier nur die Sequenz des reifen Toxins kloniert wurde und die Sekretion durch die Fusion mit der  $\alpha$ -MF Leader-Sequenz erfolgte. Um eine möglichst hohe Toxinaktivität zu erhalten und eine Denaturierung durch zu hohe Temperaturen auszuschließen, wurde die Expression bei reduzierten Temperaturen durchgeführt. In der Literatur ist beschrieben, dass eine Erniedrigung der Kultivierungstemperatur zu einer höheren rekombinanten Proteinmenge und einer höheren Stabilität des produzierten Proteins führt (Hong *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2001). Diese Beobachtung kann durch die gesteigerte Menge freigesetzter Proteasen aus abgestorbenen Zellen begründet werden, welche bei höheren Temperaturen vermehrt freigesetzt werden. Die Aktivität des durch *P. pastoris* GS115 heterolog exprimierten Killerphänotyps übertraf die des Wildtypkillers *Z. bailii* 412 um ein Vielfaches. Die maximal bei *Z. bailii* erreichte Killeraktivität eines 100-fachen Konzentrates lag bei 22 mm Hemmhof im Aktivitätstest, die durch *P. pastoris* erreichte im nicht-konzentrierten Kulturüberstand bei 49 mm. Dabei ist zu beachten, dass der Hemmhofdurchmesser im MBA-Test nicht linear mit der Proteinmenge, sondern logarithmisch ansteigt. Im Western Blot konnte die stark gesteigerte Aktivität allerdings nicht einer ebenso gesteigerten sezernierten Toxinmenge zugeschrieben werden. Vielmehr zeigte sich im Western Blot eine geringere sezernierte Proteinmenge als beim Wildtypkiller (*Z. bailii* 412). Die stark gesteigerte Aktivität des Toxins lässt sich mit einer höheren Qualität des sezernierten Toxins begründen. Wahrscheinlich liegt beim Wildtypkiller ein großer Teil des Toxins nicht in einer aktiven Konformation vor. Daher zeigten sich auch die quantitativ stärkeren Signale im Western Blot aber die geringere Toxizität des Proteins. Ob Zygocin in *P. pastoris* eventuell Modifikationen erfahren hat und dadurch die gesteigerte Aktivität zu begründen ist, müsste mittels MALDI-TOF Untersuchungen weiter untersucht werden.

Die bei dem ebenfalls untersuchten *P. pastoris* KM71 Stamm stark verminderte Killeraktivität und geringere sezernierte Proteinmenge ist durch die schlechtere Verwertung von Methanol, bedingt durch die Alkoholoxidase 2 und der damit

geringeren maximal erreichten Zelldichte zu erklären. Mit *P. pastoris* GS115 stand somit ein geeigneter Zygocin-Expressionswirt zur Verfügung, der es erlaubte, die Wirkungsweise von Zygocin, durch die Herstellung mutierter Toxinvarianten, genauer zu untersuchen.

### **Expression von Zygocin-Mutanten in *P. pastoris***

Aufbauend auf dem Zygocin Wirkungsmodell von Weiler (Weiler & Schmitt, 2003) wurden Zygocin-Mutanten abgeleitet, die eine Verifizierung des Modells ermöglichen sollten. Das Modell teilt das Toxin in drei Wirkdomänen D1 bis D3 ein (vgl. Abbildung 3, S. 16). Dabei wird der ersten Domäne D1 (N-Terminus) die Rolle der Primärrezeptorerkennung auf Zellwandebene zugeschrieben, die dem Toxin eine erste unspezifische Kontaktaufnahme mit der sensitiven Hefezelle vermittelt und somit die Überwindung der Zellwand-Barriere ermöglicht, um zum eigentlichen Ort der Toxinwirkung, der Zytoplasmamembran, zu gelangen. Dieser erste Schritt ist energieunabhängig. Der aus einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix aufgebauten Domäne D2 wird die Vermittlung einer ersten unspezifischen Anlagerung des Toxins an die Zytoplasmamembran zugesprochen. Dabei erfolgt die Anlagerung der  $\alpha$ -Helix mit ihrer unpolaren Seite an die Zytoplasmamembran, die polare Seite ist dem Medium zugewandt. Diese amphipathische  $\alpha$ -Helix ist ein bei Defensinen und Bacteriocinen weit verbreitetes Strukturmerkmal (Fleur *et al.*, 1996; Kaur *et al.*, 2004). Sie kommt ebenfalls bei anderen Poren formenden Toxinen, wie dem Cytolysin A einiger *E. coli* und *Salmonelle enterica* Stämmen vor (Mueller *et al.*, 2009). Bei diesem Protein ist die amphipathische  $\alpha$ -Helix zuerst an der Anlagerung des Toxins an die Membran beteiligt und bildet nach Oligomerisierung und Einlagerung in die Membran die eigentliche Membranpore. Bei Zygocin wird angenommen, dass nach Erkennung eines spezifischen, bislang unbekanntem Rezeptors auf Plasmamembranebene in einem energieabhängigen Schritt die Ausbildung der eigentlichen membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helix, welche der Domäne D3 entspricht, erfolgt. Diese Transmembranhelix bildet im Modell nach Oligomerisierung mehrerer Zygocinmoleküle die ionenpermeable Membranpore in der Zytoplasmamembran, welche das Zusammenbrechen des

Transmembranpotentials bewirkt. Die Abtötung der Zellen erfolgt in kürzester Zeit; innerhalb von 60 min werden  $10^7$  Zellen abgetötet (Weiler & Schmitt, 2003). Zur Überprüfung des Wirkungsmodells wurden eine Reihe von Zygocin-Varianten konstruiert, bei denen zum Teil Punktmutationen eingeführt oder ganze Domänen deletiert wurden (vgl. 3.9.1, S. 123). Die hergestellten Mutanten wurden als sekretorische Toxinvarianten in *P. pastoris* GS115 exprimiert. Die Induktion und Expression erfolgte unter den zuvor für das Wildtyptoxin optimierten Kultivierungsbedingungen, um eine möglichst hohe Aktivität des sezernierten Proteins zu erhalten. Immunologisch konnten im Western Blot alle punktmutierten Zygocin-Varianten nachgewiesen werden. Bei den Deletionsmutanten gelang lediglich der Nachweis der C-terminal verkürzten Zygocin91 Variante. Die drei Deletionsmutanten Zygocin $\Delta$ D1, Zygocin $\Delta$ D2 und Zygocin91 $\Delta$ D1 konnten im Western Blot mit Zygocin-spezifischen Antikörpern nicht detektiert werden, da sie nicht von den verwendeten Antikörpern erkannt wurden. Das zur Antikörper-Produktion verwendete synthetisch hergestellte Peptid umfasst sowohl den C-terminalen Bereich der D1-Domäne sowie den N-terminalen Bereich der D2-Domäne, also genau den Bereich, der bei den Mutanten deletiert wurde. Da allerdings die zur Expression eingesetzten *P. pastoris* Stämme zuvor auf die Integration des jeweiligen Gens mittels Kolonie-PCR untersucht und eine standardisierte Expression durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass die Proteine erfolgreich sezerniert wurden. Warum allerdings Zygocin $\Delta$ D3 nicht detektiert werden konnte, lässt sich nicht schlüssig erklären.

Die mit den Kulturüberständen der einzelnen Mutanten durchgeführten Toxizitätstests zeigten lediglich bei ZygocinV66N und Zygocin $\Delta$ D1 eine Aktivität. Wobei die Aktivität der N-terminal verkürzten Mutante, bei der die postulierte Zellwandbindedomäne deletiert wurde, mit der des Wildtyps übereinstimmte. Die Zygocin-VarianteV66N mit der Mutation in der amphipathischen  $\alpha$ -Helix der Domäne D2 zeigte dagegen einen stark reduzierten Killerphänotyp, der allerdings nicht auf eine verminderte Quantität des sezernierten Toxins zurückzuführen ist, sondern auf dessen Aktivität. Alle anderen Toxinvarianten zeichneten sich durch ein vollständiges Fehlen einer Aktivität aus. Bei ZygocinV66N ist die geringe Aktivität durch den Austausch von Valin gegen Asparagin im Bereich der amphipathischen  $\alpha$ -Helix der Domäne D2 an Position 66 zu erklären. Der Austausch der unpolaren

gegen die strukturell ähnliche polare Aminosäure innerhalb der amphipathischen  $\alpha$ -Helix, führte zu einem teilweisen Verlust der Amphipathizität, ohne die Tendenz zur Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix zu beeinträchtigen. Die Veränderung der Ladungsverteilung innerhalb der  $\alpha$ -Helix, durch die Einführung einer polaren statt einer unpolaren Aminosäure, wurde die Anlagerung des Toxins an die negativ geladene Zytoplasmamembran erschwert, allerdings wie die geringe Restaktivität zeigt, nicht vollständig unterbunden. Somit konnte gezeigt werden, dass die unspezifische Anlagerung durch hydrophobe Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle bei der Toxinwirkung spielt. Um den Effekt der unspezifischen Anlagerung dieser  $\alpha$ -Helix genauer untersuchen zu können, wäre es erforderlich, weitere Aminosäuren an anderen Positionen auszutauschen oder die  $\alpha$ -Helix durch die Einführung von Prolin vollständig zu zerstören. In beiden Fällen, sollte es, wie bei der Zygocin-Mutante  $\Delta D2$  beobachtet wurde, zu einem vollständigen Verlust der Toxizität kommen.

Die Zerstörung der angenommenen Transmembranhelix in ZygocinF79P zeigte durch den Verlust der zytotoxischen Aktivität die Bedeutung dieser Helix bei der Toxinwirkung auf. Mit Hilfe der erhaltenen Daten lässt sich nicht erkennen, ob diese Domäne wirklich die Membranpore nach Oligomerisierung mehrerer Zygocinmoleküle ausbildet. Die dritte eingeführte Punktmutation (ZygocinD93L) befand sich in einem der D3 Domäne C-terminal folgenden Bereich. Dieser umfasst neun hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren unbekannter Funktion, wobei sich an Position 93 die polare Aminosäure Asparagin befindet. Durch den Austausch dieses Asparaginrestes gegen Leucin sollte dessen Funktion untersucht werden. Der Austausch dieser Aminosäure führte zu einem vollständigen Verlust des Toxins, wodurch die Bedeutung dieser Aminosäure, nicht aber deren Funktion deutlich wird. Möglich wäre, dass diesem Bereich eine Art Ankerfunktion zukommt, wodurch das Toxin stabil in die Membran integriert wird. Um Aussagen über diesen Bereich treffen zu können, wären weitere Untersuchungen notwendig. Es wäre denkbar, den C-Terminus sukzessive zu verkürzen, um herauszufinden, wie weit das Toxin verkürzt werden kann, ohne seine Killeraktivität zu verlieren oder ob dies überhaupt möglich ist, ohne die Eigenschaften des Toxins grundlegend zu verändern.

Von den Deletionsmutanten (vgl. 3.9.2, S. 127) zeigte lediglich Zygotin $\Delta$ D1 einen Killerphänotyp, welcher eine vergleichbare Aktivität wie das Wiltyptoxin zeigte. Die anderen Toxin-Mutanten zeichneten sich durch ein vollständiges Fehlen der Aktivität aus. Da der D1 Domäne die Funktion der ersten Kontaktaufnahme und Primärrezeptorerkennung zugeschrieben wird, die dem Toxin die Überwindung der Hefezellwand ermöglicht, erscheint dieses Ergebnis verwunderlich. Ein solch verkürztes Toxin sollte lediglich sphäroplastierte Zellen abtöten, nicht aber Hefen mit intakter Zellwand. Allerdings ist Zygotin $\Delta$ D1 sowohl gegen Hefen mit Zellwand als auch gegen sphäroplastierte Hefezellen aktiv. Dies ist bei der Betrachtung des Molekulargewichts nicht verwunderlich, so besitzt das Wildtyptoxin eine Größe von 10,4 kDa, das N-terminal verkürzte ist lediglich 4,1 kDa groß. Es ist davon auszugehen, dass auf Grund der geringen Größe der verkürzten Toxinvariante die Zellwand kein Hindernis darstellt und dass die Zellwand ohne Primärrezeptorerkennung durch Diffusion nahezu ungehindert überwunden werden kann. Aufgrund der vergleichbaren Aktivitäten ist davon auszugehen, dass beide Transporte gleich schnell und effektiv verlaufen.

Untersuchungen der Zygotin $\Delta$ D2 zeigten, dass die Anlagerung des Toxins durch die amphipathische  $\alpha$ -Helix einen essentiellen Schritt bei der Toxinwirkung darstellt. Die Deletion dieser Helix führte zu einem vollständigen Verlust der Aktivität, da wahrscheinlich durch die fehlende Anlagerung des Toxins an die Zytoplasmamembran keine Einlagerung mehr in die Membran erfolgen und in Folge dessen keine Membranpore ausgebildet werden konnte.

Die große Bedeutung der neun der Transmembranhelix C-terminal folgenden Aminosäuren bei der Toxinwirkung zeigte die Doppelmutante Zygotin<sup>91</sup> $\Delta$ D1. Hier wurden neben der Zellwandbindedomäne D1 die neun Aminosäuren unbekannter Funktion deletiert. Entgegen der Beobachtung, dass die Deletion der D1 Domäne zu einem dem Wildtyp vergleichbaren Killerphänotyp führt, zeichnete sich die Doppelmutante durch das vollständige Fehlen einer zytotoxischen Aktivität aus. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen, die bereits für Zygotin<sup>D93L</sup> und Zygotin<sup>91</sup> erzielt wurden. Die neun überwiegend unpolaren Aminosäuren spielen eine wichtige Rolle bei der Toxinwirkung, welche allerdings durch die erhaltenen Ergebnisse weiter unklar bleiben. Ein konservativer Austausch dieser Aminosäuren könnte klären, ob der beobachtete Effekt lediglich auf die hydrophobe

Ladung zurückzuführen ist oder ob eine bestimmte Sequenz ausschlaggebend für die Toxizität ist. Für weitere Analysen wäre es notwendig, das Protein zu reinigen, um damit Liposomen- bzw. analytische Ultrazentrifugations-Untersuchungen durchführen zu können, die möglicherweise Aufschluss darüber geben könnten, ob der Einbau in negativ geladene Mizellen oder die Tendenz zur Oligomerisierung gehemmt bzw. ganz unterbunden wird (Eifler *et al.*, 2006).

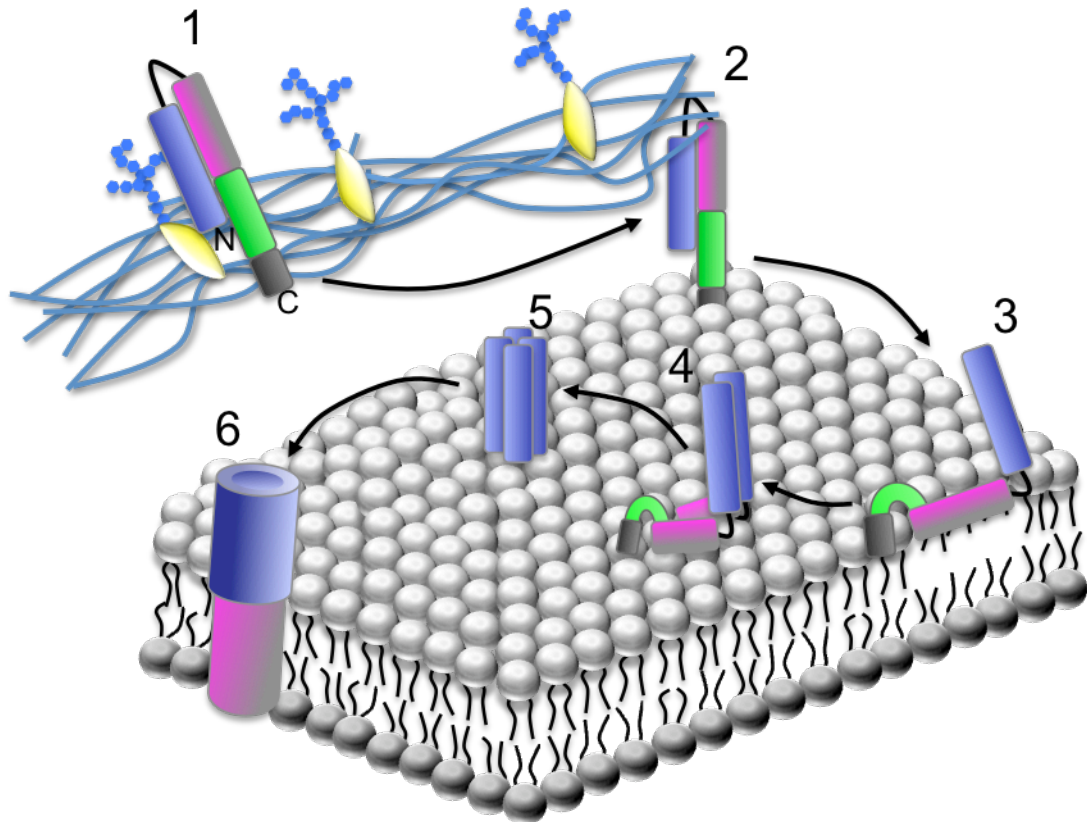
Mit Zygotin $\Delta$ D3 konnte eine weitere Toxinvariante in *P. pastoris* erfolgreich exprimiert und sezerniert werden. Die Mutante zeichnete sich durch das vollständige Fehlen der Toxizität aus, welches durch die Deletion der Transmembrandomäne D3 erklärt werden kann. Damit stimmt das beobachtete Ergebnis mit dem Wirkungsmodell von Weiler (2002) überein, beweist allerdings nicht die tatsächliche Ausbildung einer Transmembranhelix von Domäne D3, der beobachtete Effekt könnte auch andere Ursachen haben.

Die erhaltenen Ergebnisse der verschiedenen Toxinvarianten zeigten zum Teil die erwarteten Eigenschaften. Lediglich Zygotin $\Delta$ D1 zeigte ein unerwartetes Ergebnis, da anzunehmen war, dass diese Variante nur sphäroplastierte Hefezellen abtöten sollte, nicht aber Hefen mit einer intakten Zellwand. Allerdings lässt sich diese Beobachtung mit der geringen Größe des Proteins erklären. Mutationen am C-Terminus des Toxins deuten auf die für die Toxizität wichtige Eigenschaft dieser Region hin, die genauer untersucht werden müsste. Für einen genauen Nachweis des Mechanismus der Toxinwirkung und die Aufklärung der daran beteiligten Strukturen ist die Ermittlung der Struktur des Proteins durch Kristallographie oder Kryo-EM von entscheidender Bedeutung. Ohne das Vorliegen dieser Daten wird der Wirkungsmechanismus nicht aufzuklären sein. Alle sonstigen Untersuchungen geben nur Hinweise auf einen möglichen Mechanismus. Sinnvoll wäre ein vollständiges Screening der Toxinsensitivität aller Hefemutanten, deren Mutationen sich auf Zellwand- bzw. Plasmamembranebene zeigen. Auf diese Weise könnten an der Toxizität beteiligte Proteine identifiziert werden.

Aufbauend auf dem hypothetischen Wirkungsmechanismus von Zygotin (Weiler, 2002) wurde unter Einbeziehung der Ergebnisse der Mutantanalyse, der Kryo-EM Untersuchungen, den Oligomerisierungsstudien mittels Detergenzien, dem

Vergleich mit anderen Poren formenden Proteintoxinen und durch *in silico* Strukturvorhersagen ein neues Modell zur Porenbildung entwickelt (Abbildung 42). Dabei wird das Toxin in vier Funktions-Domänen eingeteilt und folgender Mechanismus zur Porenbildung vorhergesagt. Im ersten Schritt bindet die Domäne1 den Primärrezeptor in der Zellwand und ermöglicht dem Toxin zur Plasmamembran zu gelangen. Dort angekommen, interagiert die C-terminale hydrophobe Domäne4 mit der Plasmamembran. Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung und die amphipathische Helix der Domäne3 lagert sich peripher in die Zytoplasmamembran ein. Dabei scheint einzig die negative Ladung und Zusammensetzung der Membran für die Bindung ausschlaggebend zu sein. Anhand der erhaltenen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass kein Sekundärrezeptor auf Membranebene benötigt wird. Somit ist die Membranzusammensetzung von *Z. bailii* der Grund für die Immunität gegen Zygocin. Die zuerst periphere Bindung einer amphipathischen Helix ist ein bei Poren formenden Proteinen weit verbreitetes Wirkungsmuster. Allerdings befinden sich diese amphipathischen Helices meist am C-Terminus des Proteins und nicht mitten im Protein (Bayley, 2009; Eifler *et al.*, 2006, Malovrh *et al.*, 2003). In diesem Bindungsstadium kommt es wahrscheinlich zu einer Oligomerisierung mehrerer Zygocinmoleküle zu einer Prä-Pore. Diese inseriert, angetrieben durch das Membranpotential, mit der amphipathischen Helix in die Zytoplasmamembran. Die Helix ist mit ihrer hydrophilen Seite der Membran zugewandt, so dass sich eine hydrophile Pore aus vermutlich vier Zygocin-Einheiten in der Membran ausbildet, welche den Ausstrom von Ionen und somit die Zerstörung des Membranpotentials und in Folge dessen den Tod der Zellen zur Folge hat. Welche Orientierung die Domänen3 und 4 erfahren, lässt sich aus den bisherigen Ergebnissen nicht schließen. Hierfür wären die Kristallisation oder Kryo-EM Untersuchungen von Poren im Membranstadium notwendig.





**Abbildung 42: Modell der Porenbildung von Zygotin:** 1: Das Killertoxin Zygotin bindet mit der N-terminalen Domäne1 (blau) den Zellwandrezeptor (gelb) und wird durch die Zellwand geschleust. 2: Die C-terminale Domäne4 (grau) interagiert in einem ersten Schritt mit der Membran. 3: Die amphipathische Helix der Domäne3 (pink) bindet die Membranoberfläche, 4: es kommt zur Oligomerisierung und 5: zur Prä-Porenbildung wobei diese noch nicht in die Membran eingedrungen ist. 6: Membran Insertion der amphipathischen Helix (rosa) und Ausbildung einer Pore aus vier Zygotin-Untereinheiten.

### Expression getaggtter Zygotin-Varianten in *P. pastoris*

Um für weiterführende Untersuchungen auf spezifische monoklonale Antikörper zurückgreifen und um Zygotin spezifisch affinitätschromatographisch reinigen zu können, wurde das Toxin mit verschiedenen Tags versehen und die entstanden Varianten auf ihre Toxizität getestet. Alle getaggtten Toxinvarianten konnten in den Kulturüberständen immunologisch in großen Mengen detektiert werden (Abbildung 36, S. 137). Die Blots zeigten eine große Stabilität des sezernierten Toxins über einen langen Zeitraum, so dass eine Fermentation zur Toxinproduktion durchgeführt werden konnte, da Zygotin nicht durch die *Pichia* Proteasen abgebaut wurde. Nach 90 stündiger Expression lies sich die größte Menge sezernierten Toxins detektieren, womit die Ergebnisse bei der

Expressionsoptimierung von Zygocin in *P. pastoris* bestätigt wurden. Nach dieser Expressionsdauer wurde mit dem Wildtyp-toxin die höchste Aktivität im Kulturüberstand erreicht. Toxizitätstests der getaggen Toxinvarianten zeigten lediglich bei mRFP-Zygocin eine Aktivität, alle anderen Varianten waren vollkommen inaktiv. Die fehlende Aktivität ist auf eine Fehlfaltung des Toxins oder auf eine Ladungsveränderung des Proteins durch das jeweilige Tag zurückzuführen und nicht auf einen Mangel an Protein. Es ist zu vermuten, dass die C-terminal angefügten Tags die Ausbildung einer Transmembranhelix bzw. die Einlagerung in die Membran unterbinden, ob dies durch die veränderte Gesamtladung oder eine Fehlfaltung des Proteins begründet ist, lässt sich mit den erhaltenen Ergebnissen nicht beantworten. Auffällig ist dabei, dass jede Veränderung des C-Terminus zu einem inaktiven Toxin führt. Dies deutet auf eine sehr bedeutende Rolle dieser Region bei der Toxinwirkung hin. Die N-terminal angefügten Tags führten wahrscheinlich zu einer Fehlfaltung des Toxins, so dass eine Rezeptorerkennung und damit die Überwindung der Zellwand nicht möglich ist. Um Fehlfaltungen bzw. Ladungsveränderungen als Ursache für den beobachteten Aktivitätsverlust ausschließen zu können, müssten Varianten mit abspaltbaren Tags konstruiert werden, um durch Abspaltung der Tags die Aktivität des Toxins wieder herstellen zu können, falls diese durch die eingeführten Ladungsveränderungen verursacht wurden.

Um eine *in vivo* Fluoreszenzlokalisierung zu ermöglichen, wurde Zygocin mit dem rot fluoreszierenden Protein mRFP aus *Discosoma spec.* fusioniert. Dieses 25 kDa große Protein wurde statt GFP gewählt, da es sich durch eine größere Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten, wie sie für die Aktivität von Zygocin benötigt werden, auszeichnet (Baird *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2000). Der Killerphänotyp des in *P. pastoris* exprimierten Fusionsproteins blieb weit hinter dem des Wildtyp-toxins aus dem gleichen Stamm zurück. Dabei lies sich im Western Blot und SDS-Gel eine größere Proteinmenge als beim Wildtyp-toxin nachweisen, womit der geringe Killerphänotyp einer verminderten Aktivität zugeordnet werden konnte und nicht einer geringeren sezernierten Proteinmenge. Ob die größere sezernierte Proteinmenge auf eine effektivere Sekretion des Fusionsproteins, eine höhere Stabilität des Proteins im Medium oder auf eine höhere exprimierte Menge zurückzuführen war, ließ sich dabei nicht feststellen. Eine Möglichkeit wäre auch,

dass bei der Transformation von mRFP-Zygocin eine Mehrfachintegration stattgefunden hat und die höhere Proteinmenge auf die höhere Anzahl an Genkopien zurückzuführen ist. Allerdings schwanken die maximal produzierten Proteinmengen in der Literatur auch zwischen 1 mg/L und 6,4 g/L (Chen *et al.*, 2004; Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Nourizad *et al.*, 2003), weshalb die unterschiedlichen Mengen bei Zygocin und mRFP-Zygocin keine ungewöhnliche Ausnahme darstellen. Die deutlich geringere Aktivität des Fusionsproteins könnte mehrere Ursachen haben. Aufgrund der Größe des mRFP-Anteils im Fusionsprotein (25 kDa) und dem damit dreifach höheren Molekulargewicht wäre es möglich, dass der Transport über die Zellwand der sensitiven Hefezelle extrem erschwert ist und es damit zu einer geringeren Toxizität kommt. Allerdings zeigten sphäroplastierte Zellen keine höhere Aktivität, so dass davon auszugehen ist, dass der mRFP-Anteil die Überwindung der Zellwand nicht behindert. Möglich wäre auch, dass die Anlagerung an die Membran durch den mRFP-Anteil im Fusionsprotein erschwert wird. Ob dies durch eine Ladungsveränderung oder eine sterische Hinderung geschieht, lässt sich dabei nicht genau sagen. Auch könnte es bei der Oligomerisierung des Fusionsproteins zu einer sterischen Hinderung bedingt durch die Größe des mRFP-Anteils kommen, wodurch die Ausbildung einer Pore erschwert würde. Anhand der bisherigen Ergebnisse lässt sich keine der möglichen Ursachen ausschließen.

Mit mRFP-Zygocin steht erstmals ein aktives Zygocin mit einem Tag zur Verfügung, welches einen selektiven Nachweis über spezifische Antikörper und auch direkte fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ermöglicht. Eventuell ist mit diesem Fusionsprotein die Kristallisation möglich, da bereits die Struktur von mRFP aufgeklärt werden konnte und damit bekannte Kristallisationsbedingungen vorliegen (Yarbrough *et al.*, 2001). Bisherige Untersuchungen scheiterten, da bislang keine Bedingungen gefunden wurden, bei denen es zur Kristallbildung von Zygocin kam.

#### **4.7. Fermentation von *P. pastoris* zur Produktion von Zygocin und mRFP-Zygocin**

In dieser Arbeit konnte erfolgreich die Expression von Zygocin in *P. pastoris* etabliert werden. Allerdings stellte sich die Kultivierung im Schüttelkolben als sehr schwierig heraus, da eine Beibehaltung eines bestimmten pH-Wertes nicht möglich war. Ein stabiler pH-Wert war allerdings besonders für die mit dem Fluoreszenzprotein mRFP fusionierte Variante unabdingbar, da sonst das Chromophor zerstört würde. Daher war es notwendig die Fermentation von *P. pastoris* zur Produktion von Zygocin zu etablieren, sowohl um konstante genau wählbare Kultivierungsbedingungen zu schaffen und um eine höhere Zelldichte und damit eine größere Produktmengen zu erreichen. Die Hochzelldichte-Fermentation von *P. pastoris* hat den Vorteil, dass extrem hohe Zelldichten (Veenhuis *et al.*, 1983; Wegner, 1990) mit bis zu 130 g/L Zelltrockenmasse (Cereghino *et al.*, 2000) erreicht werden können und damit auch eine hohe Produktausbeute erzielt werden kann.

Zur Etablierung der rekombinanten Expression von Zygocin im Fermenter wurde der konstruierte *P. pastoris* Stamm verwendet welcher bereits erfolgreich für die Expression im Kulturkolben eingesetzt wurde. Zygocin konnte erfolgreich im Fermenter rekombinant produziert werden. Der durch *P. pastoris* im Fermenter exprimierte Killerphänotyp blieb jedoch hinter dem des Schüttelkolbens erzielten zurück. So lag die maximal erreichte Aktivität im Fermenter bei 24 mm Hemmhof, während im Schüttelkolben eine Aktivität von 49 mm Hemmhof erreicht wurde. Die Ursache dieser geringen Aktivität konnte in einer Western Analyse einer geringen Toxinmenge zugeordnet werden. Durch vollständige Lyophilisierung des Kulturüberstandes und spätere Hydratisierung konnte die Aktivität erhalten bzw. gesteigert werden, wodurch deutlich gezeigt wurde, dass die Killeraktivität nicht auf das während der letzten Phase der Fermentation akkumulierte Methanol, sondern einzig auf das sezernierte Zygocin zurückzuführen war. Aufgrund der etwa 20-fach höheren Zelldichte im Fermenter im Vergleich zum Schüttelkolben sollte eine ähnliche Steigerung bei der Aktivität und Proteinmenge erreicht werden. Die Ausbeute war jedoch geringer als im Kulturkolben. Die unterschiedlichen Medien können als Ursache ausgeschlossen werden, da bei beiden ein

gutes Wachstum erzielt werden konnte. Eine Möglichkeit der Erklärung der geringen Aktivität wäre das verwendete Antischaummittel, welches während der Fermentation eingesetzt werden musste. Die zuvor durchgeführten Tests auf Aktivitätsminderung von Zygocin durch das Antischaummittel verliefen negativ. Dabei wurde das Toxin lediglich ein paar Minuten mit dem Antischaummittel inkubiert statt mehrerer Tage wie im Fermenter. Auch wurde während der Fermentation mehr Antischaum eingesetzt als bei den Aktivitätstests. Eine weitere Möglichkeit für die geringere Aktivität des Toxins ist die Oxidation und somit Denaturierung des Toxins durch den bei der Fermentation zugeführten molekularen Sauerstoff. Molekularer Sauerstoff musste während der Methanol-verstoffwechslung zugefüttert werden, um die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Medium aufrechtzuerhalten. Diese beiden Möglichkeiten können die geringe Aktivität des Toxins erklären, allerdings nicht die geringe im Western Blot detektierte Zygocinmenge. Sowohl die geringe Menge als auch die damit einhergehende geringe Aktivität des Toxins sind wahrscheinlich auf Degradation durch Proteasen zurückzuführen. *P. pastoris* verfügt über Aspartat-, Serin- und Cysteinproteasen (Shi *et al.*, 2003), die für den Abbau von Zygocin verantwortlich sein könnten. Diese Proteasen weisen bei niederen pH-Werten sowie bei niedrigeren Temperaturen, wie sie bei der Zygocin Expression verwendet wurden, eine geringere Aktivität auf, sind allerdings nicht vollkommen inaktiv (Clare *et al.*, 1991; Kobayashi, *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Bei der Kultivierung der *P. pastoris* Stämme im Kulturkolben wurde nach der Glycerol-Phase die Kultur geerntet und das Zellpellet im methanolhaltigen Medium resuspendiert. Somit wurden die bereits in der Glycerolphase sezernierten Proteasen entfernt. Bei der Fermentation allerdings verblieben die Zellen während der gesamten Fermentationsdauer in der gleichen Kulturbrühe. Nach Ende der Glycerolphase und dem gesamten Verbrauch der Kohlenstoffquelle wurde die Expression durch Zugabe von Methanol induziert. Alle Proteasen, die bis dahin ins Medium sezerniert wurden, waren weiterhin aktiv. Somit ließ sich erst nach über 60 h Induktion Zygocin im Western Blot detektieren und eine geringe Aktivität nachweisen. Wahrscheinlich wurde mit dem weiteren Anstieg der Zellzahl und der zunehmenden Induktionsstärke durch die vermehrte Methanolfütterung erst ab diesem Zeitpunkt mehr

Zygocin produziert, als es durch die Proteasen abgebaut werden konnte. Somit wäre auch der leichte Anstieg der Aktivität bei 80-88 Stunden Induktionsdauer zu erklären. Eine verminderte Aktivität durch das verwendete Antischaummittel und eine Oxidation durch die Zufuhr von molekularem Sauerstoff lässt sich allerdings nicht ausschließen. In der Literatur ist beschrieben, dass bei Kultivierung von *P. pastoris* durch Zugabe von Serin-Protease-Inhibitoren die Gesamtproteaseaktivität um 53 % reduziert werden konnte und durch Zugabe von Aspartat-Protease-Inhibitoren um 30 % (Shi *et al.*, 2003). Um nachzuweisen, ob die Degradation von Zygocin durch Proteasen verursacht wird und die damit geringe detektierbare sezernierte Proteinmenge zu erklären ist, wäre es erforderlich, zukünftige Fermentationen mit den entsprechenden Protease-Inhibitoren durchzuführen. Eine weitere Reduzierung des pH-Wertes und der Expressionstemperatur könnte auch wie in der Literatur beschrieben (Koganesawa *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2002) zu einem stabileren Toxin und somit zu einer größeren Ausbeute an Protein führen. Eventuell negative Effekte des Antischaummittels auf die Aktivität könnten durch die Verwendung verschiedener Mittel untersucht werden. Um eine mögliche Oxidation des Zygocins durch den während der Fermentation in großer Menge eingebrachten molekularen Sauerstoff zu reduzieren, wäre es erforderlich, eine geringere Methanol-fütterungsrate zu etablieren, was einen geringeren Sauerstoffverbrauch zur Folge hätte und damit auch einer geringeren notwendigen Zufütterung von reinem Sauerstoff bedürfte. Allerdings würde sich dabei die gesamte Fermentationsdauer erheblich verlängern.

Um genügend Protein für eine Kristallisation von mRFP-Zygocin zu erhalten, sollte diese Variante ebenfalls mittels Fermentation produziert werden. Die Fermentation zur Produktion von mRFP-Zygocin wurde in Anlehnung an die bereits beschriebene erfolgreiche Zygocin Produktion im Fermenter durchgeführt, wobei aufgrund des mRFP-Tags der pH-Wert im Medium von 4,0 auf 5,2 erhöht werden musste. Ein geringerer pH-Wert war aufgrund der geringen Säuretoleranz des mRFP-Chromophors nicht möglich. Voruntersuchungen im Schüttelkolben zeigten bereits bei diesem pH-Wert eine Aktivität des Fusionsproteins. Diese Toxinvariante konnte schon früher als das Wildtypotoxin im Western Blot

nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Wildtypotoxin ließ sich das Fusionsprotein bereits nach 36 h im Western Blot detektieren. Die sezernierte Fusionsproteinmenge stieg bis zum Ende der Fermentation nach 85 h Induktionsdauer kontinuierlich an. Im Western Blot konnte eine Bande bei 70 kDa detektiert werden, die vermutlich ein Dimer des Fusionsproteins darstellt. Beide Banden, sowohl die monomere Form des Fusionsproteins als auch die dimere Form, zeigten bei Anregung durch UV-Licht eine starke Rotfluoreszenz. Während der gesamten Fermentation war die sezernierte Proteinmenge des mRFP-Zygocin Fusionsproteins größer als die zuvor beim Wildtypotoxin erreichte Proteinmenge. Es ist zu vermuten, dass das Fusionsprotein eine größere Stabilität gegenüber dem Abbau durch die von *P. pastoris* sezernierten Proteasen besitzt. Beide Proteine, sowohl mRFP-Zygocin als auch Zygocin, wurden im gleichen *P. pastoris* Stamm exprimiert, womit auch die sezernierten Proteasen identisch waren. Es ist nicht davon auszugehen, dass der höhere pH-Wert von 5,2 während der Fermentation des Fusionsproteins (4,0 bei Zygocin) eine höhere Stabilität gegenüber dem Abbau durch Proteasen bewirkt hatte, denn die Proteasen zeichnen sich eher durch eine höhere Aktivität bei neutralen pH-Werten aus (Clare *et al.*, 1991). Alle während der Expression im Fermenter untersuchten Proben zeigten im Toxizitätstest keine Killeraktivität. Da allerdings bereits Voruntersuchungen dieses Klons dessen Fähigkeit zur Sekretion von aktivem Toxin bewiesen haben, sind die Bedingungen während der Fermentation als Ursache für die fehlende Aktivität zu sehen. Eine Möglichkeit wäre die Veränderung des Toxins durch das verwendete Antischaummittel, wie schon bei der Expression von Zygocin im Fermenter vermutet wurde. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass die erhöhte Temperatur während der Induktionsphase zu einer teilweisen Denaturierung des Zygocinanteils des Fusionsproteins geführt hat, da sich Zygocin durch eine geringe Temperaturstabilität auszeichnet und bei höheren Temperaturen seine Killeraktivität verliert (Radler *et al.*, 1993). So stieg die Temperatur während der Induktionsphase von den gewählten 20 °C, bedingt durch die Methanolverstoffwechslung und die Rührenergie, auf 28 °C an. Eine weitere Erklärung der fehlenden Aktivität des Fusionsproteins ist in der Oxidation durch reinen Sauerstoff zu sehen. Während der Fermentation stieg die Gelöstsauer-

stoffkonzentration zeitweise bis auf über 86 % an und kann zu einer Oxidation des Toxins geführt haben. Die Schwankungen sind auf eine fehlerhafte Analytik und Steuerung des verwendeten Fermenters zurückzuführen. Um die Möglichkeit der Inaktivierung durch das verwendete Antischaummittel ausschließen zu können, wäre es wie bei der Fermentation von Zygodin erforderlich, eine Reihe alternativer Mittel zu testen.



## 5. Zusammenfassung

Das viral kodierte, antimykotisch wirksame Killertoxin Zygocin der Hefe *Z. bailii* konnte in aktiver Form ohne Aktivitätsverlust bis zur Homogenität gereinigt werden. Kryo-EM Untersuchungen negativ geladener PC/PA-Liposomen zeigten nach Inkubation mit gereinigtem Zygocin eine vollständige Zerstörung, neutral geladene Liposomen dagegen blieben intakt. Analytische Ultrazentrifugationsanalysen zygocinbehandelter, hydrophober Detergensmizellen zeigten eine Oligomerisierung des Toxins in den Mizellen. Es kann daher angenommen werden, dass Zygocin *in vivo* Plasmamembranporen ausbildet, vermutlich aus vier Untereinheiten bestehend. Zygocin zeigte eine geringe Löslichkeit und neigte bei hohen Konzentrationen zur Präzipitatbildung.

Eine Plasmid-getriebene Expression und Sekretion von biologisch aktivem Zygocin in *P. pastoris* wurde erfolgreich etabliert. Das Toxin wies eine deutlich höhere Aktivität auf als das natürlicherweise vom Wildtypkillerstamm produzierte Virustoxin. Die Hochzell-dichtefermentation von *P. pastoris* zur Produktion von aktivem Zygocin und mRFP-Zygocin konnte etabliert werden.

Das postulierte Modell zur ionophoren Toxinwirkung konnte durch die *in vivo* Expression verschiedener Toxinvarianten und deren Phänotypanalyse verifiziert werden. Deletionen der amphipathischen  $\alpha$ -Helix sowie der Transmembranhelix führten ebenso wie einzelne Punktmutationen zu einem vollständigen Aktivitätsverlust des Toxins. Überraschenderweise führte die Deletion der bislang für die Primärrezeptor-Erkennung als relevant postulierten D1-Domäne zu einem unverändert aktiven Toxin, so dass angenommen werden kann, dass die geringe Größe des Toxins (4,1 kDa) auch ohne Bindung des Mannoprotein-Rezeptors die Überwindung der Zellwand erlaubt.

## 6. Summary

The viral encoded antimycotic killertoxin zygocin of the yeast *Z. bailii* could be purified to homogeneity and in an active form. Cryo-EM analysis showed a complete destruction of negatively charged PC/PA-liposomes after incubation with purified zygocin. In contrast, neutral loaded liposomes stayed intact. Oligomerization of the toxin could be observed via analytical ultracentrifugation analysis of zygocin treated hydrophobic detergent micells. Based on this observation, it can be suggested that zygocin builds pores containing four subunits in the plasma membrane *in vivo*. Zygocin possesses a low solubility and tends to precipitate at higher concentrations. The plasmid-driven expression and secretion of biological active zygocin in *P. pastoris* was established yielding a significant higher activity compared to the toxin of the wild-type killer strain. Further, production of both active zygocin and mRFP-zygocin in *P. pastoris* could be established using high cell density fermentation.

The postulated model of zygocin's ionophoric effect could be verified *in vivo* by expression of different toxin variants and phenotypical analysis of these variants. Deletion of the amphipathic  $\alpha$ -helix or the transmembrane helix as well as single point mutations led to a complete loss of toxin activity; the same was true for single point mutations. Surprisingly, deletion of the D1-domain, which should be necessary for the primary receptor recognition, showed no negative effect on activity. Therefore, it could be assumed that the small size of the toxin (4,1 kDa) allows the overcoming of the cell wall even without binding the mannoprotein receptor.

## 7. Literaturverzeichnis

**Abrami L, van Der Goot FG.** Plasma membrane microdomains act as concentration platforms to facilitate intoxication by aerolysin. *J Cell Biol.* **1999**, 147: 175-84.

**Arora D, Khanna N.** Method for increasing the yield of properly folded recombinant human gamma interferon from inclusion bodies. *J Biotechnol.* **1996**, 52: 127-33.

**Arakawa T, Tsumoto K.** The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochem Biophys Res Commun.* **2003**, 304: 148-52.

**Austin BP, Nallamsetty S, Waugh DS.** Hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner for the production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol.* **2009**, 498: 157-72.

**Ausubel FB Kingston R, Moore R, Seidman D, Smith J, Struhl J,** Preparation and analysis of RNA, *Current Protocols on Molekular Biology*. New York **1995**, p. pp 2.0.12.19.10.

**Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY.** Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**, 97: 11984-9.

**Bautz F.** Synthese und Klonierung einer cDNA-Kopie der viralen M-dsRNA aus *Zygosaccharomyces bailii*. Diplomarbeit Universität Mainz **1996**.

**Hagan Bayley.** Membrane-protein structure: Piercing insights. *Nature.* **2009**, 459: 651-652

**Bevan EA, Makower M.** The physiological basis of the killer character in yeast. In *Proc Xlth Int Congr Genetics*, **1963** Volume I. 203.

**Birnboim HC.** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **1983**, 100: 243-255.

**Bies C.** Versuche zur heterologen Expression eines viralen Killertoxingens [KT412] der Hefe *Zygosaccharomyces bailii* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes **1998**

**Bleicken S, Classen M, Padmavathi PV, Ishikawa T, Zeth K, Steinhoff HJ, Bordignon E.** Molecular details of bax activation, oligomerization, and membrane insertion. *J Biol Chem.* **2010**, 285: 6636-47.

**Bostian KA, Elliott Q, Bussey H, Burn V, Smith A, Tipper DJ.** Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell.* **1984**, 36: 741-51.

**Botstein D, Chervitz SA, Cherry J M.** Yeast as a model organism. *Science* **1997**, 277: 1259-1260.

**Branduardi P, Valli M, Brambilla L, Sauer M, Alberghina L, Porro D.** The yeast *Zygosaccharomyces bailii*: a new host for heterologous protein production, secretion and for metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Res.* **2004**, 4: 493-504.

**Breinig F, Schleinkofer K, Schmitt MJ.** Yeast Kre1p is GPI-anchored and involved in both cell wall assembly and architecture. *Microbiology.* **2004**, 150: 3209-18.

**Breinig F, Sendzik T, Eisfeld K, Schmitt MJ.** Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006**, 103: 3810-5.

**Breinig F, Tipper DJ, Schmitt MJ.** Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell.* **2002**, 108: 395-405.

**Brown, T. A. 1999,** Gentechnologie für Einsteiger. 2 ed., *Spektrum Akademischer Verlag.*

**Burnette WN.** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **1981**, 112, 195-203.

**Bussey H.** Proteases and the processing of precursors to secreted proteins in yeast. *Yeast* **1988**, 4: 17-26.

**Bussey H.** K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol Microbiol.* **1991**, 5: 2339-43.

**Cailliez JC, Seguy N, Aliouat EM, Polonelli L, Camus D, Dei-Cas E.** The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Med Hypotheses* **1994**, 43: 167- 171.

**Calvin NM, Hanawalt PC.** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol.* **1988**, 170: 2796-801.

**Castón JR, Trus BL, Booy FP, Wickner RB, Wall JS, Steven AC.** Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J Cell Biol.* **1997**, 138: 975-85.

**Chen CC, Wu PH, Huang CT, Cheng KJ.** A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of a *Escherichia coli* phytase. *Enz Microb Technol* **2004**, 35: 315-320.

**Chen WB, Han YF, Jong SC, Chang SC.** Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl Environ Microbiol* **2000**, 66: 5348-52.

**Cereghino JL, Cregg JM.** Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* **2000**, 24: 45-66.

**Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K, Henwood CA.** Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene.* **1991**, 105: 205-12.

**Clark JM.** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16: 9677-86.

**Colussi PA, Taron CH.** *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **2005**, 71: 7092-8

**Cooper A, Bussey H.** Yeast Kex1p is a Golgi-associated membrane protein: deletions in a cytoplasmic targeting domain result in mislocalization to the vacuolar membrane. *J Cell Biol.* **1992**, 119: 1459-1468.

**Cornelis P.** Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr Opin Biotechnol.* **2000**, 11: 450-4.

**Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA.** Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* **1989**, 9: 1316-23.

**Cregg JM, Russell KA.** Transformation. *Methods Mol Biol.* **1998**, 103: 27-39.

**Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR.** Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* **2000**, 16: 23-52.

**Day PJ, Pinheiro TJ, Roberts LM, Lord JM.** Binding of ricin A-chain to negatively charged phospholipid vesicles leads to protein structural changes and destabilizes the lipid bilayer. *Biochemistry.* **2002**, 41: 2836-2843.

**De la Peña P, Barros F, Gascón S, Lazo PS, Ramos S.** Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **1981**, 256: 10420-5.

**De la Peña P, Barros F, Gascón S, Ramos S, Lazo PS.** The electrochemical proton gradient of *Saccharomyces*. The role of potassium. *Eur J Biochem.* **1982**, 123: 447-53.

**De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R.** Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol.* **1999**, 309: 217-36.

**Dignard D, Whiteway M, Germain D, Tessier D, Thomas DY.** Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Mol Gen Genet.* **1991**, 227: 127-36.

**Dinman JD, Icho T, Wickner RB.** A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1991**, 88: 174-8.

**Dmochowska A, Dignard D, Henning D, Thomas DY, Bussey H.** Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and alpha-factor precursor processing. *Cell.* **1987**, 50: 573-84.

**Dohmen RJ, Strasser AWM, Höner CB & Hollenberg CP.** An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast.* **1991**, 7: 691-692.

**Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW.** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16: 6127-45.

**Duan W, Wang S, Chen M, Wang C, Zhang L, Liu J, Sun L, Yan M.** Harvest active recombinant Rho kinase from *Escherichia coli*. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, 29: 38-42.

**Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP.** Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis.* **1999**, 29: 239-44.

**Eifler N, Vetsch M, Gregorini M, Ringler P, Chami M, Philippsen A, Fritz A, Müller SA, Glockshuber R, Engel A, Grauschopf U.** Cytotoxin ClyA from *Escherichia coli* assembles to a 13-meric pore independent of its redox-state. *EMBO J.* **2006**, 5: 2652-61.

**El-Sherbeini M, Bostian KA.** Viruses in fungi: infection of yeast with the K1 and K2 killer viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **1987**, 84: 4293-4297.

**Esteban R, Wickner RB.** Three different M1 RNA-containing viruslike particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: in vitro M1 double-stranded RNA synthesis. *Mol Cell Biol.* **1986**, 6: 1552-61.

**Fazekas de St Groth S, Webster RG, Datyner A.** Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta.* **1963**, 71: 377-91.

**Fleet, G.** Spoilage yeasts. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1992**, 12: 1-44.

**Fleury Y, Dayem MA, Montagne JJ, Chaboisseau E, Le Caer JP, Nicolas P, Delfour A.** Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *J Biol Chem.* **1996**, 271: 14421-9.

**Fugelsan KC.** *Zygosaccharomyces*, A Spoilage Yeast Isolated from Grape Juice. *CAT/ Pub* **1998** #980902.

**Fujimura T, Ribas JC, Makhov AM, Wickner RB.** Pol of gag-pol fusion protein required for encapsidation of viral RNA of yeast L-A virus. *Nature.* **1992**, 359: 746-9.

**Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA.** Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast.* **1995**, 11: 355-60.

**Gietz RD, Schiestl RH.** Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single- stranded nucleic acids as carrier. *Yeast.* **1991**, 7: 253-263.

**Gilbert JC.** Pore-forming toxins. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59: 832-44.

**Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG.** Life with 6000 genes. *Science*, 1996, 274: 563-567.

**Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldrige KK, Tsien RY.** The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2000** 97: 11990-5

**Hagenson MJ.** Production of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bioprocess Technol.* **1991**, 12: 193-212.

**Hanahan D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **1983**, 166: 557-80.



**Hartree EF.** Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **1972**, 48: 422-427.

**Heiligenstein S.** Endozytose, Retrotranslokation und Ubiquitinierung des viralen K28-Toxins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, **2008**.

**Heintel T, Zagorc T, Schmitt MJ.** Expression, processing and high level secretion of a virus toxin in fission yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2001**, 56: 165-72.

**Hodgson VJ, Button D, Walker GM.** Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology.* **1995**, 141: 2003-12.

**Hong F, Meinander NQ, Jönsson LJ.** Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng.* **2002**, 79: 438-49.

**Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Cerretti DP, Urdal DL, Conlon PJ.** A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nature Biotechnology.* **1988**, 6: 1204 -1210.

**Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR.** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene.* **1989**, 77: 61-8.

**Hutchins K, Bussey H.** Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan. *J Bacteriol.* **1983**, 154: 161-9.

**Iacovache I, van der Goot FG, Pernet L.** Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochim Biophys Acta.* **2008**, 1778: 1611-23.

**Icho T, Wickner RB.** The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames *J Biol Chem.* **1989**, 264: 6716-23.

**Inoue H, Nojima H, Okayama H.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **1990**, 96: 23-8.

**Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A.** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* **1983**, 153: 163-8.

**Jahagirdar BN, Morrison VA.** Emerging fungal pathogens in patients with hematologic malignancies and marrow/stem-cell transplant recipients. *Semin Respir Infect.* **2002**, 17: 113-20.

**Javadekar VS, SivaRaman H, Gokhale DV.** Industrial yeast strain improvement: construction of a highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. *J Ind Microbiol.* **1995**, 15: 94-102.

**Kalathenos P, Sutherland JP, Roberts TA.** Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. *J. Appl. Bacteriol.* **1995**, 78: 245-50.

**Kaur K, Andrew LC, Wishart DS, Vederas JC.** Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic alpha helix as a receptor-binding region. *Biochemistry.* **2004**, 43: 9009-20.

**Kessler RJ, Fanestil DD.** Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1986**, 159: 138-142.

**Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Tomomitsu K.** Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the AOX2 promoter in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng.* **2000**, 89: 479-84.

**Koganesawa N, Aizawa T, Shimojo H, Miura K, Ohnishi A, Demura M, Hayakawa Y, Nitta K, Kawano K.** Expression and purification of a small cytokine growth-blocking peptide from armyworm *Pseudaletia separata* by an optimized fermentation method using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* **2002**, 25: 416-25.

**Korpela MT, Kurittu JS, Karvinen JT, Karp MT.** A recombinant *Escherichia coli* sensor strain for the detection of tetracyclines. *Anal Chem.* **1998**, 70: 4457-62.

**Lebionka A, Servienê E, Melvydas V.** Isolation and purification of yeast *Saccharomyces cerevisiae* K2 killer toxin. *Biologija* **2002**, 4: 7-9.

**Lesieur C, Vecsey-Semjen B, Abrami L, Fivaz M, Gisou van der Goot F.** Membrane insertion: The strategies of toxins (review). *Mol Membr Biol* **1997**, 14: 45-64.

**Li M, Su ZG, Janson JC.** In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr Purif.* **2004**, 33: 1-10.

**Li Z, Xiong F, Lin Q, d'Anjou M, Daugulis AJ, Yang DS, Hew CL.** Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* **2001**, 21: 438-45.

**Lin-Cereghino J, Wong WW, Xiong S, Giang W, Luong LT, Vu J, Johnson SD, Lin-Cereghino GP.** Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques.* **2005**, 38: 44, 46, 48.

**Liu XQ, Yang XQ, Xie FH, Song LY, Zhang GQ, Qian SJ.** On-column refolding and purification of transglutaminase from *Streptomyces fradiae* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* **2007**, 51: 179-86.

**Lowes KF, Shearman CA, Payne J, MacKenzie D, Archer DB, Merry RJ, Gasson MJ.** Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Appl Environ Microbiol.* **2000**, 66: 1066-76.

**Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM.** Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* **2005**, 22: 249-70.

**Malovrh P, Viero G, Serra MD, Podlesek Z, Lakey JH, Macek P, Menestrina G, Anderluh G.** A novel mechanism of pore formation: membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of equinatoxin. *J Biol Chem.* **2003**. 278: 22678-85.

**Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L.** Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev.* **1997**, 10: 369-400.

**Marquina D, Santos A, Peinado JM.** Biology of killer yeasts. *Int Microbiol.* **2002**, 5: 65-71.

**McCracken DA, Martin VJ, Stark MJ, Bolen PL.** The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia acaciae*: characterization and comparison with the toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology*. **1994**, 140: 425-31.

**Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S.** Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **1976**, 127: 1529-1537

**Neuhausen F, Schmitt MJ .** Transgenic expression of a toxin-coding killer virus of the yeast *Zygosaccharomyces bailii* in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a possible function of "cryptic" mycoviruses in the evolution of their hosts. In: *Biosafety: Stability of DNA, Horizontal Gene Transfer and Expression of Transgenes*. Schmidt ER, Hankeln T (eds.), Springer Verlag, **1996**: 117-124.

**Nourizad N, Ehn M, Gharizadeh B, Hober S, Nyrén P.** Methylophilic yeast *Pichia pastoris* as a host for production of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Protein Expr Purif.* **2003**, 27: 229-37.

**Novotná D, Flegelová H, Janderová B.** Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2004**, 4: 803-13.

**Paifer E, Margolles E, Cremata J, Montesino R, Herrera L, Delgado JM.** Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast*. **1994** 10: 1415-19.

**Pandya Y, Jewett FF, Hoover DG.** Concurrent effects of high hydrostatic pressure, acidity and heat on the destruction and injury of yeasts. *J Food Prot.* **1995**, 58: 301-304.

**Park CM, Berry JO, Bruenn JA.** High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol.* **1996**, 30: 359-66.

**Parker MW, Feil SC.** Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol.* **2005**, 88: 91-142.

**Penk, A., und Pittrow, L.** High-dose therapy with fluconazole > or = 800 mg/day. *Mycoses* **1997**, 40: 33-42.

**Petering JE, Symons MR, Langridge P, Henschke PA.** Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. *App. Env. Microbiol.* **1991**, 57: 3232-3236.

**Pfeiffer P, Radler F.** Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J. Gen. Microbiol.* **1982**, 128: 2699-2709.

**Pfeiffer P, Radler F.** Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. *Arch Microbiol.* **1984**, 137: 357-61.

**Philliskirk G, Young TW.** The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **1975**, 41: 147-51.

**Picazo JJ, González-Romo F, Candel FJ.** Candidemia in the critically ill patient. *Int J Antimicrob Agents.* **2008**, 32 Suppl 2: 83-5.

**Pintar J, Starmer WT.** The costs and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **2003**, 83: 89-97.

**Polonelli L, Castagnola M, Rossetti DV, Morace G.** Use of killer toxins for computer-aided differentiation of *Candida albicans* strains. *Mycopathologia.* **1985**, 91: 175-179.

**Powilleit F,** Entwicklung viraler Expressionssysteme und deren Anwendungsmöglichkeiten in Hefe. *Dissertation* Universität des Saarlandes **2004**.

**Privé GG.** Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods.* **2007**, 4: 388-97.

**Put HMC & de Jong J.** Heat resistance studies of yeasts; vegetative cells versus ascospores: erythromycin inhibition of sporulation in *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* species. *J Appl Bacteriol.* **1982**, 53: 73-79

**Radler F, Herzberger S, Schönig I, Schwarz P.** Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J Gen Microbiol.* **1993**, 139: 495-500.

**Redinbaugh MG, Turley RB.** Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal. Biochem.* **1986**, 153: 267-271.

**Rehfeld K.** Genetische und strukturelle Analyse viraler dsRNA-Genome aus der Hefe *Zygosaccharomyces bailii*. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, **1999**.

**Reiter, J. (2004)** Untersuchung zur Wirkungsweise eines viralen A/B- Toxins der Hefe: Kernlokalisation, Apoptose und Zellzyklusarrest, *Dissertation* Universität des Saarlandes, **2004**.

**Reiter J, Herker E, Madeo F, Schmitt MJ.** Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Biol.* **2005**; 168: 353-8.

**Riffer F, Eisfeld K, Breinig F, Schmitt MJ.** Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* **2002**, 148: 1317-28.

**Roberts CJ, Raymond CK, Yamashiro CT, Stevens TH.** Methods for studying the yeast vacuole. *Methods Enzymol.* **1991**, 194: 644-61.

**Robinson JS, Klionsky DJ, Banta LM, Emr SD.** Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol* **1988**, 8: 4936-48.

**Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **1988**, 239: 487-491.

**Sakai, Y. nd Tani, Y.** Cloning and sequencing of the alcohol oxidase-encoding gene (AOD1) from formaldehyde-producing asporogenous methylotropic yeast, *Candida boidinii* S2. *Gene* **1992**, 114: 67-73.

**Sambrook J, Russell DW**, The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *E. Coli*: "Ultra-Competent" Cells, *CSH Protocols*; **2006**; doi:10.1101/pdb.prot3944

**Sambrook J, Russell DW**, Molecular Cloning - A Laboratory Manual. *CSHL Press* **2001**  
Vol. 3, A1.5

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T**. Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*, **1989**

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR**. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1977**, 74: 5463-5467.

**Santos A, Marquina D**. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*. **2004**, 150: 2527-34.

**Sauer M, Branduardi P, Valli M, Porro D**. Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Appl Environ Microbiol*. **2004**, 70: 6086-91.

**Schaffrath R, Breunig KD**. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol*. **2000**, 30: 173-190.

**Schagger, H., und von Jagow, G. (1987)**. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **1987**, 166: 368-379.

**Schiestl RH, Gietz RD**. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*. **1989**, 16: 339-46.

**Schlaich T, Urbaniak B, Plissonnier ML, Malgras N, Sautter C**. Exploration and Swiss field-testing of a viral gene for specific quantitative resistance against smuts and bunts in wheat. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. **2007**, 107: 97-112.

**Schmidt TG, Koepke J, Frank R, Skerra A.** Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol.* **1996**, 255: 753-66.

**Schmidt TG, Skerra A.** The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc.* **2007**, 2(6): 1528-35.

**Schmitt MJ, Breinig F.** Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol.* **2006**, 4: 212-21.

**Schmitt MJ, Klavehn P, Wang J, Schonig I, und Tipper D J.** Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology* **1996**, 142: 2655-62.

**Schmitt MJ, Neuhausen F.** Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. *J Virol.* **1994**, 68: 1765-72.

**Schmitt M, Radler F.** Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **1988**, 170: 2192-6.

**Schmitt MJ, Reiter J.** Viral induced yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* **2008**, 1783: 1413-7.

**Schmitt MJ, Tipper DJ.** K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **1990**, 10: 4807-15.

**Schmitt MJ, Tipper DJ.** Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol.* **1991**, 5: 2331-8.

**Schmitt MJ, Tipper DJ.** Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast.* **1992**, 8: 373-84.

**Schmitt MJ, Tipper DJ.** Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology.* **1995**, 213: 341-51.

**Sendzik, T.** Untersuchung zur in vivo Toxizität und Immunität der Alpha/beta-heterodimeren Virustoxine K1 und K28 durch regulierte Expression einzelner Toxin-Untereinheiten. *Dissertation* Universität des Saarlandes, **2006**.



**Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV** (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**, 28: 815-20.

**Shi X, Karkut T, Chamankhah M, Alting-Mees M, Hemmingsen SM, Hegedus D.** Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* **2003**, 28: 321-30.

**Shuman S.** Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269: 32678-84

**Sinha P, Poland J, Schnolzer M, Rabilloud T.** A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **2001**, 1: 835-40.

**Singh SM, Panda AK.** Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng.* **2005**, 99: 303-10.

**Singh SM, Sharma A, Panda AK.** High throughput purification of recombinant human growth hormone using radial flow chromatography. *Protein Expr Purif.* **2009**, 68: 54-9.

**Skerra A.** Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene.* **1994**, 151: 131-5.

**Skerra A, Schmidt TG.** Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **2000**, 326: 271-304.

**Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, 150: 76-85.

**Somers JM, Bevan EA.** The inheritance of the killer character in yeast. *Genet Res.* **1969**, 13: 71-83.

**Stark H.** Three-dimensional electron cryomicroscopy of ribosomes. *Curr Protein Pept Sci.* **2002**, 3: 79-91.

**Stark MJ, Boyd A, Mileham AJ, Romanos MA.** The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. *Yeast.* **1990**, 6: 1-29.

**Starmer WT, Ganter PF, Aberdeen V, Lachance MA, Phaff HJ.** The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can J Microbiol.* **1987**, 33: 783-96.

**Steels H, James SA, Roberts IN, Stratford M.** Sorbic acid resistance: the inoculum effect. *Yeast.* **2000**, 16: 1173-83.

**Studier FW, Moffatt BA.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* **1986**, 189: 113-30.

**Stumm C, Hermans JM, Middelbeek EJ, Croes AF, de Vries GJ.** Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **1977**, 43: 125-8.

**Takahashi S, Ueda M, Tanaka A.** Function of the prosequence for in vivo folding and secretion of active *Rhizopus oryzae* lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2001**, 55: 454-62.

**Theisen S, Molkenau E, Schmitt MJ.** Wicaltin, a new protein toxin secreted by the yeast *Williopsis californica* and its broad-spectrum antimycotic potential. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2000**,10: 547-50.

**Thomas DS, Davenport RR.** *Zygosaccharomyces bailii*, a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiology* **1985**, 2: 157-169.

**Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJ, Andrew PW, Saibil HR.** Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell.* **2005**,121: 247-56.

**Tipper DJ, Bostian KA.** Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. *Microbiol Rev.* **1984**, 48: 125-56.

**Tipper DJ, Schmitt MJ.** Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol.* **1991**, 5: 2331-8.

**Tolner B, Smith L, Begent RH, Chester KA.** Production of recombinant protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *Nat. Protoc* **2006**, 1: 1006-21.

**Tytler EM, Anantharamaiah GM, Walker DE, Mishra VK, Palgunachari MN, Segrest JP.** Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry.* **1995**, 34: 4393-401.

**Van Ooyen AJ, Dekker P, Huang M, Olsthoorn MM, Jacobs DI, Colussi PA, Taron CH.** Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* **2006**, 6: 381-92.

**Vallejo LF, Rinas U.** Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact.* **2004**, 3: 11.

**Veenhuis M, Van Dijken JP, Harder W.** The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv Microb Physiol.* **1983**, 24: 1-82.

**Walsh G.** Biopharmaceutical Benchmarks-2003. *Nat Biotechnol.* **2003**, 21: 865-70.

**Wang X, Li X, Li Y.** A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnol Lett.* **2007**, 29: 1599-603.

**Weber K, Osborn M.** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244: 4406-12.

**Wegner G.** Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* **1990**, 7: 279-83.

**Weiler F.** Molekularbiologische Charakterisierung des Antimykotikums Zygocin. *Dissertation* Universität des Saarlandes **2002**.

**Weiler F, Rehfeldt K, Bautz F, Schmitt MJ.** The *Zygosaccharomyces bailii* antifungal virus toxin zygocin: cloning and expression in a heterologous fungal host. *Mol Microbiol.* **2002**, 46: 1095-105.

**Weiler F, Schmitt MJ.** Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res.* **2003**, 3: 69-76.

**Werten MW, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, de Wolf FA.** High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast.* **1999**, 15: 1087-96.

**Wickner RB.** Killer yeasts. *Curr Top Med Mycol.* **1985**, 1: 286-312.

**Wickner RB.** Double-stranded RNA virus replication and packaging. *J Biol Chem.* **1993**, 268: 3797-800.

**Wickner RB.** Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* **1996**, 60: 250-65.

**Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD.** Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for colour formation. *Anal. Biochem.* **1988**, 175: 231-237

**Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Véronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW.** Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **1999**, 285: 901-6.

**Wolfe MS, Barrett JA.** Response of Plant Pathogens to Fungicides. In Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management. *Washington, D. C.: National Academy Press. 1986.*

**Wu S, Letchworth GJ.** High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques.* **2004**, 36: 152-4.

**Yarbrough D, Wachter RM, Kallio K, Matz MV, Remington SJ.** Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001**, 98: 462-7.

**Young TW, Yagiu M.** A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **1978**, 44: 59-77.

**Zhang X, El-Bourawi MS, Wei K, Tao F, Ma R.** Precipitants and additives for membrane crystallization of lysozyme. *Biotechnol J.* **2006**, 1:1302-11.

**Zehr BD, Savin TJ, Hall RE.** A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **1989**, 182: 157-159.

**Zhou ZH, Baker ML, Jiang W, Dougherty M, Jakana J, Dong G, Lu G, Chiu W.** Electron cryomicroscopy and bioinformatics suggest protein fold models for rice dwarf virus. *Nat Struct Biol.* **2001**, 8: 868-73.

**Zorg J, Kilian S, Radler F.** Killer toxin producing strains of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *Arch Microbiol* **1987**, 149: 261-267.

## 8. Abkürzungen

|              |  |
|--------------|--|
| $\alpha$ -MF | <i><math>\alpha</math>-mating factor</i>   |
| Amp          | Ampicillin                                 |
| AOX          | Alkoholoxidase                             |
| AP           | Alkalische Phosphatase                     |
| APS          | Ammoniumpersulfat                          |
| AS           | Amiosäure                                  |
| bp           | Basenpaare                                 |
| BCA          | Bicinchoninsäure                           |
| BMG          | <i>Buffered Minimal Glycerol</i>           |
| BMM          | <i>Buffered Minimal Methanol</i>           |
| BSA          | Rinderserumalbumin                         |
| CV           | <i>column volume</i>                       |
| C-Quelle     | Kohlenstoffquelle                          |
| DEPC         | Diethylpyrocarbonat                        |
| DIG          | Digoxigenin                                |
| DMF          | Dimethylformamid                           |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid                           |
| DNA          | Desoxyribonukleinsäure                     |
| DNase        | Desoxyribonuklease                         |
| dNTP         | Desoxyribonukleosidtriphosphat             |
| DO           | <i>Dissolved Oxygen</i>                    |
| DOC          | Natriumdesoxycholat                        |
| dsRNA        | doppelsträngige Ribonukleinsäure           |
| DTT          | Dithiothreitol                             |
| EDTA         | Ethylendiamintetraacetat                   |
| GFP          | grün fluoreszierendes Protein              |
| GLB          | <i>gel loading buffer</i>                  |
| HRP          | <i>horse radish peroxidase</i>             |
| IPTG         | Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid |
| IRE          | <i>internal replication enhancer</i>       |
| Kan          | Kanamycin                                  |
| kbp          | Kilobasenpaare                             |
| kDa          | Kilo Dalton                                |
| LB           | Luria Bertani Broth                        |

---

|           |   |
|-----------|---|
| MALDI-TOF | <i>Matrix Assisted Laser-Desorption Ionisation Time Of Flight</i> |
| MBA       | Methylenblau Agar   |
| MCS       | <i>multiple cloning site</i>                                      |
| MF        | <i>mating factor</i>  |
| MOPS      | 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure                                |
| mRFP      | rot fluoreszierendes Protein                                      |
| Mut+      | Methanol toleranter Phänotyp von <i>Pichia pastoris</i>           |
| MutS      | Methanol sensibler Phänotyp von <i>Pichia pastoris</i>            |
| OD        | Optische Dichte   |
| ORF       | <i>open reading frame</i>   |
| PA        | Phosphatidsäure   |
| PAGE      | Polyachrylamid-Gelelektrophorese                                  |
| PBS       | <i>phosphate buffered saline</i>                                  |
| PC        | Phosphatidylcholin  |
| PCR       | <i>polymerase chain reaction</i>                                  |
| PEG       | Polyethylenglykol   |
| pI        | isoelektrischer Punkt   |
| PS        | Phosphatidylserin   |
| PTM1      | <i>Pichia Trace Metal</i>   |
| RNase     | Ribonuklease  |
| RT        | Raumtemperatur  |
| rpm       | <i>rotations per minute</i>                                       |
| SC        | <i>synthetic complete</i>   |
| SDS       | Natriumdodecylsulfat  |
| SOE       | <i>Splicing by overlap extension</i>                              |
| SS        | Signal Sequenz  |
| SSC       | Sodium/Sodiumcitrat   |
| ssRNA     | einzelsträngige RNA   |
| TBE       | Tris-Borat-EDTA   |
| TCA       | Trichloressigsäure  |
| TE        | Tris-EDTA   |
| TEMED     | N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin                             |
| TRE       | <i>terminal recognition element</i>                               |
| Tris      | Tris(hydroxymethyl)-Amino-Methan                                  |
| UV        | Ultraviolett  |
| VBS       | <i>viral binding site</i>   |

|       |   |
|-------|---|
| VLP   | <i>virus like particle</i>                          |
| V5    | Epitoptag aus dem Affen Paramyxovirus Virus 5 (SV5) |
| WT    | Wildtyp   |
| X-Gal | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-+-D-Galactopyranosid     |
| YCB   | <i>yeast carbon base</i>                            |
| YNB   | <i>yeast nitrogen base</i>                          |
| YPD   | yeastextract pepton dextrose                        |
| YPG   | <i>yeastextrakt pepton galaktose</i>                |



## Veröffentlichung

Kanno T, Bucher E, Daxinger L, Huettel B, Kreil DP, Breinig F, **Lind M**, Schmitt MJ, Simon SA, Guna Ranjan Gurazada S, Meyers BC, Lorkovic ZJ, Matzke AJM, Matzke M. RNA-directed DNA methylation and plant development require an IWR1-type transcription factor. *EMBO Rep.* **2010**, 11: 65-71.

## **Danksagung**

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt für die Überlassung des sehr interessanten, vielfältigen und herausfordernden Themas sowie die fortwährende theoretische und moralische Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Friedrich Giffhorn für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft danke ich für die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung dieser Arbeit.

Meinen ehemaligen Diplomanten Andreas Rehlinger und Katja Schu möchte ich für ihr Engagement und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Dr. Andreas Sonnen und Dr. Gilbert, Institut für strukturelle Biologie, Universität Oxford, England möchte ich für die Durchführung der Cryo-EM und der analytischen Ultrazentrifugation danken.

Der Arbeitsgruppe Giffhorn danke ich für Möglichkeit der Nutzung der Fermenter und der ÄKTA, sowie der stetigen Hilfsbereitschaft. Ganz besonders danken möchte ich Dr. Christian Zimmer, der mich in die Feinheiten der ÄKTA eingeführt hat und für sein ständiges Interesse an meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Frank Breinig für sein stetiges Interesse und seine Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit, aber auch für die Espressorunden und die gefühlten Millionen Niederlagen beim Skifahren; nie durfte ich die große Kristallkugel mein eigen nennen. Auf das der Rekord in Wengen ewig besteht.

Weiterhin möchte ich meinen ehemaligen Weggefährten Dr. Jochen Reiter, Dr. Tanja Sendzik, Dr. Diane Drescher-Petersen, Dr. Susanne Heiligenstein und Dr. Frank Powilleit danken.

Mein besonderer Dank gilt auch meine beiden Laborkolleginnen Andrea Karrenbauer und Sabine Prediger die mein geordnetes Chaos ertragen haben und mir immer gerne mit Platz auf ihren Laborbänken ausgeholfen haben, wenn es davon bei mir mal wieder zu wenig gab.

Mein Dank gilt auch Dr. Björn Diehl, Thorsten Hoffmann, Björn Becker, Nina Müller und Esther Giesselmann für den sehr netten, nie langweiligen Laboralltag.

Weiterhin gilt mein Dank dem Rest der Arbeitsgruppe Molekular und Zellbiologie für die gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima, ich werde immer gerne an die Zeit der Promotion zurückdenken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern die immer für mich da waren und mich in allen Lebenslagen bedingungslos unterstützt haben und daran, dass sie immer an mich geglaubt haben.

Schlussendlich möchte ich mich bei meiner Freundin Eva Düppre für ihre Geduld, ihre Anregungen, ihre Motivation und ihr Drängen und überhaupt für alles bedanken.  
Unendlich viele Dank.

## **Lebenslauf**

Geburtsdatum                      31.01.1974  
Geburtsort:                         Saarbrücken

### **Schulbildung**

1985-1991                         Willi Graf Realschule Saarbrücken  
1991-1994                         Wirtschaftswissenschaftliches Gymnasium Saarbrücken

### **Wissenschaftlicher Werdegang**

1994-2003                         Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes,  
Saarbrücken  
Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfächer: Genetik, Biochemie  
Diplomarbeit: Transposon Mutagenese zur Identifizierung  
Resistenz-vermittelnder Hefegene gegen das Killertoxin  
Zygocin

2003-2009                         wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität des Saar-  
landes, ZHMB, Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie

ab 2003                             Promotion am Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie an  
der Universität des Saarlandes, Saarbrücken

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung andere als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus an anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.