

**Untersuchung zur Optimierung der  
Zelloberflächenexpression in *Saccharomyces cerevisiae***

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

von

**Matthias Lermen (M. Sc.)**

Saarbrücken

2024

Tag des Kolloquiums: 19.02.2025  
Dekan: Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre  
Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Frank Breinig  
Prof. Dr. Marc Schneider  
  
Vorsitz: Prof. Dr. Uli Müller  
Akad. Mitarbeiter: Dr. Mark Lommel

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	10
<b>1. Einleitung</b> .....	11
1.1 Proteinexpressionssysteme in der Biotechnologie.....	11
1.2 Hefen als biotechnologisches Oberflächenexpressionssystem.....	14
1.3 Zellwandimmobilisierung durch direkte Verankerung.....	17
1.4 Zellwandimmobilisierung durch Verankerungssysteme.....	22
1.4.1 Zellwandverankerung durch Kohäsin-Dockerin-Interaktion.....	22
1.4.2 Zellwandverankerung durch ZZ-Fc-Interaktion.....	23
1.5 Zellwandverankerung unterschiedlicher Enzymklassen.....	24
1.5.1 Esterase A aus <i>Burkholderia gladioli</i> .....	24
1.5.2 Mannitol- und Sorbitoldehydrogenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ...	25
1.5.3 Formiatdehydrogenase aus <i>Rhodococcus jostii</i> .....	26
1.5.4 Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus <i>Escherichia coli</i> .....	27
1.6 Zielsetzung.....	28
<b>2. Material und Methoden</b> .....	29
2.1 Organismen und Kultivierung.....	29
2.1.1 Organismen.....	29
2.1.1.1 Hefen und Bakterien.....	29
2.1.2 Kultivierungsbedingungen.....	30
2.1.2.1 Hefen.....	30
2.1.2.2 Bakterien.....	33
2.2 Plasmide.....	34
2.3 Oligonukleotide.....	51
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	56
2.4.1 Anzucht elektrokompetenter <i>E. coli</i> .....	56
2.4.2 Elektroporation von <i>E. coli</i> .....	56
2.4.3 DNA-Klonierung.....	57
2.4.3.1 Anfügen von A-Überhängen.....	57
2.4.3.2 „TOPO TA-Cloning“.....	58
2.4.3.3 Ligation.....	58
2.4.3.4 „In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning“.....	59
2.4.3.5 „Modular Cloning“ mittels „MoClo-YTK Plasmid Kit“.....	59
2.4.4 DNA-Isolation aus Bakterien.....	62
2.4.4.1 Alkalische Lyse.....	62

---

2.4.4.2 „MiniPrep“ .....	64
2.4.5 Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA.....	64
2.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	64
2.4.7 SOE-PCR.....	66
2.4.8 Agarosegelelektrophorese.....	66
2.4.9 DNA-Reisolation.....	67
2.4.10 Hefe-Transformation.....	68
2.4.10.1 Lithiumacetat-Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	68
2.4.10.2 Transformation von <i>P. pastoris</i> mittels Elektroporation.....	69
2.5 Assays zur Messung der enzymatischen Aktivität.....	71
2.5.1 Assay zur Messung der EstA-Aktivität.....	71
2.5.2 Assay zur Messung der LDH-Aktivität.....	72
2.5.3 Assay zur Messung der SDH- und MDH-Aktivität.....	72
2.5.4 Assay zur Messung der RjFDH-Aktivität.....	73
2.5.5 Assay zur Messung der G6PDH-Aktivität.....	74
2.6 Proteinbiochemische Methoden.....	74
2.6.1 BCA-Assay.....	74
2.6.2 Affinitätsreinigung T7-getaggtter Proteine.....	75
2.6.3 SDS-PAGE.....	75
2.6.4 Coomassie-Färbung.....	77
2.6.5 Semi-Dry Western Blot.....	77
2.7 Weitere Methoden.....	79
2.7.1 Zellzahlbestimmung.....	79
2.7.2 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	79
2.7.3 Zellaufschluss.....	79
2.7.3.1 Bakterien.....	79
2.7.3.2 Hefen.....	80
2.7.4 TCA-Fällung.....	81
2.7.5 Isolation von Hefezellwänden.....	81
2.7.6 Zellwandanker-Extraktion mittels Glukanase-Verdau.....	82
2.7.7 Indirekte Immunfluoreszenz.....	83
2.7.8 Durchflusszytometrie (FACS).....	83
2.8 Berechnungen.....	84
2.8.1 Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon$ .....	84
2.8.2 Berechnung der Esterase-Volumenaktivität.....	84

---

<b>3. Ergebnisse</b> .....	85
3.1 Zelloberflächenexpression der bakteriellen Esterase A in <i>S. cerevisiae</i> .....	85
3.1.1 Zelloberflächenexpression N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in <i>S. cerevisiae</i> .....	87
3.1.2 Zelloberflächenexpression C-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in <i>S. cerevisiae</i> .....	93
3.1.3 Zelloberflächenexpression N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in <i>P. pastoris</i> .....	95
3.2 Optimierung der Zelloberflächenimmobilisierung in <i>S. cerevisiae</i> mithilfe von synthetischer Biologie.....	99
3.2.1 Zelloberflächenimmobilisierung der EstA in Deletionsmutanten der Zellwand.....	100
3.2.2 Zelloberflächenimmobilisierung von EstA-Fusionskonstrukten mit inserierten Linkersequenzen.....	103
3.2.3 Effekte einer UPR-Aktivierung und gesteigerten Proteinbiosynthese auf die Zelloberflächenimmobilisierung der EstA.....	106
3.2.4 Effekte unterschiedlicher Promotoren und Terminatoren auf die Zelloberflächenimmobilisierung der EstA.....	109
3.3 Zellwandverankerung der EstA über Protein-Protein-Interaktion basierte Verankerungssysteme.....	116
3.3.1 Zellwandverankerung der EstA durch Kohäsin-Dockerin-Interaktion.....	116
3.3.2 Zellwandverankerung der EstA durch ZZ-Fc-Interaktion.....	123
3.4 Zelloberflächenexpression bakterieller Dehydrogenasen.....	130
3.4.1 Zelloberflächenexpression der SDH und MDH in <i>S. cerevisiae</i> .....	132
3.4.2 Zelloberflächenexpression der RjFDH und G6PDH in <i>S. cerevisiae</i> .....	137
<b>4. Diskussion</b> .....	139
<b>5. Ausblick</b> .....	185
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	187
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	190
<b>8. Anhang</b> .....	231
<b>Danksagung</b> .....	236

---

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -MF <sub>SS</sub>	Signalsequenz des $\alpha$ -Mating-Faktors
Agg	$\alpha$ -Agglutinin
Amp	Ampicillin
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
AOX	Alkoholoxidase
APC	„antigen-presenting cells“
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure
BGL	$\beta$ -Glukosidase
BirA	Biotin Ligase A
BMG	„buffered minimal glycerol“
BMM	„buffered minimal methanol“
Bp	Basenpaare
bZIP	„basic leucine zipper“
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CbFDH	<i>Candida boidinii</i> Formiatdehydrogenase
CBM	„cellulose-binding module“
Chl <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
CWI	„cell wall integrity“
CWP	„cell wall protein“
d/o	„drop/out“
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dest.	destilliert
DF	Durchfluss
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„deoxyribonucleic acid“/Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dock	Dockerin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	„fluorescence activated cell sorting“

---

FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid-Dihydrogen
FDH	Formiatdehydrogenase
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FnBPB	„fibronectin binding protein B“
FSC	„forward scatter“
GFP	„green fluorescent protein“
GLB	„gel loading buffer“
GLUASP	Glukoamylase-Signalpeptid
Gly	Glyzerin
GOx	Glukoseoxidase
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GRAS	„generally regarded as safe“
GS	Glycin-Serin
GTE	Glukose-Tris-EDTA
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
HPLC	„high performance liquid chromatography“/Hochleistungsflüssigchromatografie
HRP	„horseradish peroxidase“/Meerrettichperoxidase
Hsp	„heat shock protein“
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
kodonopt.	kodonoptimiert
Koh.	Kohäsin
Koh1	Kohäsin 1
Koh2	Kohäsin 2
<i>KRE</i>	„Killertoxin resistant“
L-LDH	L-Laktatdehydrogenase
LB	„lysogeny broth“
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
MCS	„multiple cloning site“
MDH	Mannitoldehydrogenase

---

MHC	„major histocompatibility complex“
MiniPrep	„Mini-Preparation“
MoClo	„modular cloning“
mRNA	„messenger ribonucleic acid“
MUT	„methanol utilization“
Mut <sup>+</sup>	„methanol utilization plus“
Mut <sup>S</sup>	„methanol utilization slow“
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogen
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat-Hydrogen
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge $\lambda$ von 600 nm
OmpA	„outer membrane protein A“
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate-buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“/Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RjFDH	<i>Rhodococcus jostii</i> Formiatdehydrogenase
RNA	„ribonucleic acid“/Ribonukleinsäure
rpm	„revolutions per minute“
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SC	„synthetic complete“
scFv	„single chain fragment variable“
scTCR	„single-chain T-cell receptor“
SDH	Sorbitoldehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SOE	„splicing by overlapping extension“
SS	Signalsequenz
SSC	„side scatter“
Strep	Streptavidin
SUMEB	SDS-Urea-MOPS-EDTA-Bromphenolblau
TBE	Tris-Borat-EDTA



---

TBS	„Tris-buffered saline“
TCA	„trichloroacetic acid“/Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Trp	Tryptophan
UPR	„Unfolded Protein Response“
Ura	Uracil
UV	ultraviolett
v/v	„volume per volume“
VLP	„virus-like particles“
w/v	„weight per volume“
yeGFP	„yeast-enhanced green fluorescent protein“
YNB	„yeast nitrogen base“
YPD	„yeast peptone dextrose“
YSD	„yeast surface display“
YTK	„yeast toolkit“

---

**Abstract**

By means of anchor proteins, different proteins can be immobilized on the surface of yeast cells, which enables the generation of whole-cell biocatalysts for the usage in different research areas. In this study, surface display systems of the bacterial esterase A (EstA) from *Burkholderia gladioli* were optimized by the variation of different components and the combination with approaches from synthetic biology. Here, the EstA immobilization efficiency in *Saccharomyces cerevisiae* was dependent on the cell wall anchor protein, the cell wall composition of the yeast strain as well as a differentially regulated gene expression by varying promoter-terminator pairings. Thereby, the enzyme activity could be enhanced by the factor of 4.1. Furthermore, the immobilization of EstA by two systems based on specific protein-protein-interactions was investigated. The expression of the components could be confirmed; however the formation of the interaction was not successful. The results ought to be transferred to the anchorage of cofactor-dependent dehydrogenases to gain new insights into the immobilization of enzymes with different conformations and to facilitate the generation of cofactor regeneration systems in yeast. The insights into cell wall anchorage of enzymes in yeast were successfully expanded and essential factors of its efficiency were identified.

Mithilfe von Ankerproteinen können unterschiedliche Proteine in der Zellwand von Hefezellen immobilisiert werden, was die Herstellung von Ganzzellbiokatalysatoren für den Einsatz in verschiedenen Forschungsgebieten ermöglicht. In dieser Arbeit wurden Verankerungssysteme der bakteriellen Esterase A (EstA) aus *Burkholderia gladioli* durch die Variation verschiedener Komponenten und die Kombination mit Ansätzen aus dem Bereich der synthetischen Biologie optimiert. Die Immobilisierungseffizienz der EstA in *Saccharomyces cerevisiae* war hierbei vom Ankerprotein, der Zellwandzusammensetzung des Hefestamms und einer durch verschiedene Promotor-Terminator-Paarungen regulierten Genexpression abhängig. Die Enzymaktivität konnte um einen Faktor von 4,1 gesteigert werden. Weiterhin wurde die Immobilisierung der EstA über zwei auf spezifischen Protein-Protein-Interaktionen beruhenden Systemen untersucht. Die Expression der Komponenten konnte bestätigt werden, jedoch war die Ausbildung der Interaktion nicht erfolgreich. Die Ergebnisse sollten auf die Verankerung von Kofaktor-abhängigen Dehydrogenasen übertragen werden, um neue Einblicke in die Immobilisierung von Enzymen mit verschiedenen Konformationen zu erhalten und die Generierung von Kofaktor-Regenerationssystemen in Hefen zu erleichtern. Die Erkenntnisse zur Zellwandverankerung von Enzymen in Hefen wurden erfolgreich erweitert und essenzielle Faktoren für deren Effizienz identifiziert.

---

## 1. Einleitung

### 1.1 Proteinexpressionssysteme in der Biotechnologie

In den letzten Jahrzehnten führte die Entwicklung diverser biologischer Systeme zur Herstellung rekombinanter Proteine zu einer Revolution der biotechnologischen Forschung. Neben der Möglichkeit der intrazellulären Expression können Proteine oder Peptide inzwischen auch auf der Oberfläche von verschiedenen Wirtsorganismen immobilisiert werden, wodurch der Einsatz von großen Mengen an tierischen oder pflanzlichen Materialien zur Gewinnung von Proteinen mit meist geringen Erträgen deutlich reduziert werden konnte (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Rosano & Ceccarelli, 2014). Die Wahl des Expressionssystems kann hierbei je nach Eigenschaften des zu exprimierenden Proteins variieren. Die Systeme können z. B. auf Bakteriophagen, Bakterien, Hefen, Algen, Säuger- oder auch Insektenzellen basieren und besitzen unterschiedliche Limitierungen, die ausschlaggebend für den Erfolg der Expression sind (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Demain & Vaishnav, 2009; Rosano & Ceccarelli, 2014). Die Anwendungsgebiete des sogenannten „Surface Displays“ reichen hierbei von biochemischen, biotechnologischen und pharmazeutischen Belangen bis hin zur Entwicklung von Biosensoren, Biokatalysatoren oder Impfstoffen (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Kondo & Ueda, 2004; Lozančić *et al.*, 2019; Park, 2020).

Die Anfänge der Oberflächenimmobilisierung von Proteinen lagen in Bakteriophagen und wurden erstmalig im Jahre 1985 an filamentösen Phagen (Inoviridae) beschrieben (Smith, 1985). Bei diesem System werden Fusionsproteine aus dem zu exprimierenden Fremdprotein und den Hüllproteinen pIII oder pVIII exprimiert. Sie können in die Virionhülle eingebaut und auf der Oberfläche der M13-Bakteriophagen frei zugänglich präsentiert werden. Zusätzlich zeigt die Fusion mit dem Fremdprotein keinen Einfluss auf die Infektiosität der Phagen gegenüber *Escherichia coli* (Endemann & Model, 1995; Paschke, 2006; Sidhu, 2001; Smith, 1985). Neben dieser Art des Phagen-Displays können auch sogenannte „Phagemid-Vektoren“ genutzt werden, welche neben dem Fusionsprotein aus Peptid und Hüllprotein auch Sequenzen zur Verpackung der DNA in Phagenpartikel beinhalten, was jedoch eine Ko-Infektion mit einem Helfer-Phagen nötig macht (Barbas *et al.*, 1991; Bass *et al.*, 1990; Paschke, 2006; Sidhu, 2001). Eingesetzt wird das Phagen-Display inzwischen vor allem bei der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen oder auch beim Display von Peptid- und Antikörperbibliotheken (Devlin *et al.*, 1990; Hoogenboom *et al.*, 1991; McCafferty *et al.*, 1990; Paschke, 2006; Sidhu, 2001; Sidhu *et al.*, 2003; Smith, 1985).

Neben Bakteriophagen wurden in der Vergangenheit auch sogenannte „virus-like particles“ (VLP) zur Expression von Fremdproteinen eingesetzt. VLPs sind Nanopartikel, die den strukturellen Aufbau und die Konformation von Viren nachahmen, sich aber aufgrund der fehlenden genetischen Information nicht durch eine Infektiosität auszeichnen. Sie können mit Fremdproteinen beladen oder ihre Oberfläche mit Antigenen dekoriert werden (Brune *et al.*, 2016; De Gregorio & Rappuoli, 2014; Nooraei *et al.*, 2021). Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie für die Biotechnologie insbesondere im Entwicklungsfeld der Vakzine oder in der biomedizinischen Forschung relevant. Es konnte gezeigt werden, dass VLPs aufgrund ihrer Größe von 20-200 nm verstärkt über die Lymphknoten in Antigen-präsentierende Zellen (APC) aufgenommen und starke zelluläre sowie humorale Immunantworten auslösen können (Bachmann & Jennings, 2010; Brune *et al.*, 2016; Nooraei *et al.*, 2021; Zabel *et al.*, 2014).

Das Hauptaugenmerk der rekombinanten Proteinexpressionssysteme liegt hingegen auf bakteriellen Systemen, die in der Forschung als hauptsächliche Expressionsplattform genutzt werden (Jose & Meyer, 2007; Rosano & Ceccarelli, 2014). Bereits im Jahr 1977 wurde zum ersten Mal das Hormon Somatostatin in *E. coli* rekombinant hergestellt (Itakura *et al.*, 1977). Erste Studien zur Oberflächenexpression von Fremdproteinen in *E. coli* identifizierten das Oberflächenprotein OmpA („outer membrane protein A“) und das Porin LamB (Maltoporin) als mögliche Kandidaten für ein „Surface-Display“, was den Grundstein für eine Vielzahl weiterer Expressionssysteme in anderen gram-negativen und -positiven Bakterien legte (Charbit *et al.*, 1986; Freudl *et al.*, 1986; Jose & Meyer, 2007). Bei gram-positiven Bakterien erfolgt die kovalente Verankerung des C-Terminus der zu immobilisierenden Proteine mit dem Peptidoglykan, wohingegen das Sekretionssignal am N-Terminus des Fusionsproteins lokalisiert ist (Navarre & Schneewind, 1999; Ton-That *et al.*, 2000; Wernéus & Ståhl, 2004). Hierbei wurden beispielsweise die Verankerungsdomänen der Oberflächenproteine M6 aus *Streptococcus pyogenes* oder FnBPB („fibronectin binding protein B“) aus *Staphylococcus aureus* erfolgreich immobilisiert (Dieye *et al.*, 2001; Jose, 2006; Strauss & Götz, 1996; Wernéus & Ståhl, 2004). Bei gram-negativen Bakterien zeichnet sich insbesondere *E. coli* durch mehrere Vorteile, wie z. B. hohe Wachstumsraten und Zelldichten, eine einfache genetische Manipulation durch Transformation sowie niedrige Kosten aus (Lee, 1996; Pope & Kent, 1996; Rosano & Ceccarelli, 2014; Sezonov *et al.*, 2007; Shiloach & Fass, 2005). Limitierend für *E. coli* als prokaryotisches Expressionssystem ist vor allem, dass keine posttranslationalen Modifikationen möglich sind, die zur korrekten Expression bzw. Faltung eukaryotischer Proteine erforderlich sein können (Rosano & Ceccarelli, 2014; Sahdev *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2007).

---

Basierend auf den Eigenschaften der Familie der Autotransporterproteine konnte das sogenannte „Autodisplay“-System in *E. coli* etabliert werden. Der Sekretionsmechanismus wurde erstmalig anhand der Entdeckung des ersten Vertreters dieser Proteinfamilie in *Neisseria gonorrhoeae* beschrieben, welcher die Immunglobulin-A1-Protease (IgA1) darstellte (Halter *et al.*, 1984; Jose *et al.*, 1995; Jose & Meyer, 2007; Pohlner *et al.*, 1987). Diese Autotransporterproteine werden als Vorläuferprotein synthetisiert und bestehen aus einer N-terminalen Signalsequenz, dem „Passenger“-Protein, einer Linker- ( $\alpha$ -helikale Domäne) und einer „ $\beta$ -barrel“-Domäne. Die Signalsequenz wird für den Transport über die innere Membran benötigt, wonach die „ $\beta$ -barrel“-Domäne eine porinartige Struktur in der äußeren Membran bildet, was zur Translokation des zu passagierenden Proteins über die Zelloberfläche und dessen Oberflächendisplay führt (Jose, 2006; Jose & Meyer, 2007; Klauser *et al.*, 1990, 1993; Maurer *et al.*, 1997). In *E. coli* konnte mittels Computeranalysen neben weiteren Proteinen das Protein AIDA-I identifiziert werden, welches aufgrund seiner zu IgA1 ähnlichen Eigenschaften als Autotransporter beschrieben wurde und im Gegensatz zu IgA1 natürlicherweise in *E. coli* vorkommt (Jose *et al.*, 1995). Ein erstes Autodisplay-System in *E. coli* konnte durch die Fusion der Linker- und „ $\beta$ -barrel“-Domänen von AIDA-I mit der Signalsequenz der B-Untereinheit des Cholera-toxins etabliert werden. Hierbei konnten die Cholera-toxin B-Untereinheit oder auch ein Peptidtag erfolgreich auf der Oberfläche immobilisiert werden (Jose, 2006; Maurer *et al.*, 1997). Die Anwendungsbereiche des Autodisplays wurden durch die Etablierung weiterer Systeme immer vielfältiger. Das Autodisplay wurde z. B. auch zur Herstellung von Ganzzell-Katalysatoren durch das Display von Hydrolasen, Esterasen, Dehydrogenasen oder Ferredoxinen angewandt (Jose, 2006; Jose *et al.*, 2001; Jose & Meyer, 2007; Jose & von Schwichow, 2004; Lattemann *et al.*, 2000; Schultheiss *et al.*, 2002). Weitere Ansätze des Autodisplays beschäftigten sich mit der Oberflächenexpression von Peptid-Libraries und Enzyminhibitoren sowie der Immobilisierung von Epitopen in der Vakzinentwicklung (Jose, 2006; Jose *et al.*, 2005; Jose & Meyer, 2007; Konieczny *et al.*, 2000).

---

## 1.2 Hefen als biotechnologisches Oberflächenexpressionssystem

Hefen zählen neben den Bakterien zur größten Organismengruppe, die zur Oberflächenexpression diverser Proteine bzw. Peptide eingesetzt werden. Das sogenannte „Yeast Surface Display“ (YSD) bietet eine Vielzahl an Vorteilen, die auf den Eigenschaften der Hefen als Eukaryoten beruhen und sich beispielsweise durch eine schnelle Kultivierung sowie eine einfache genetische Manipulierbarkeit auszeichnen (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Kondo & Ueda, 2004). Aufgrund des Status als GRAS („generally regarded as safe“) können einige Hefen in pharmazeutischen oder auch biomedizinischen Prozessen sowie der Nahrungsmittelproduktion eingesetzt werden. Des Weiteren sind Hefen in der Lage posttranslationale Modifikationen wie z. B. Glykosylierungen oder auch die korrekte Faltung eukaryotischer Proteine durchzuführen, was die Nutzung von Hefen als Expressionssystem für komplexere Proteine ermöglicht (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Kondo & Ueda, 2004; Schreuder *et al.*, 1996). Im YSD werden größtenteils Hefen der Gattung *S. cerevisiae* eingesetzt, jedoch konnten in der Vergangenheit auch Systeme für weitere Gattungen, wie z. B. *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*), *Hansenula polymorpha* oder auch *Yarrowia lipolytica* etabliert werden (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Bielen *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2002; Lozančić *et al.*, 2019; Tanaka *et al.*, 2012).

Die Effizienz der Verankerung von Fusionsproteinen auf der Zelloberfläche hängt beim YSD von mehreren Faktoren ab, die sich je nach zu immobilisierendem Protein unterscheiden und die Art der Fusion (N-, C-terminale oder interne Fusion) bedingen. Ein wichtiger Faktor, der zur Verankerung von Proteinen von Interesse beachtet werden muss, ist die Lage des aktiven Zentrums im Zielprotein. Die Fusion des Ankerproteins sollte hierbei so weit wie möglich vom aktiven Zentrum entfernt erfolgen, da in Experimenten mit den Lipasen Lip7 und Lip8 aus *Y. lipolytica* eine stark verringerte Enzymaktivität bei Fusion des Ankers an das am C-Terminus lokalisierte aktive Zentrum beobachtet werden konnte (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Bordes *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010a; Matsumoto *et al.*, 2002; Washida *et al.*, 2001). Des Weiteren können auch die Länge des Ankerproteins und eine Vergrößerung des Abstands zwischen Zielprotein und Zellwandanker durch das Einbringen von „Spacer“- bzw. „Linker“-Sequenzen Einflüsse auf die Immobilisierungseffizienz besitzen (Sato *et al.*, 2002; Teymennet-Ramírez *et al.*, 2022; Van der Vaart *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierung einer  $\alpha$ -Galaktosidase und der entsprechende Aktivitätsnachweis bei einer Fusion mit dem vergleichsweise kleinsten in der Studie untersuchten Zellwandprotein Cwp2p (67 AS) am höchsten war (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Van der Vaart *et al.*, 1997). Für Fusionskonstrukte einer Glukoamylase aus *Rhizopus oryzae* mit dem Zellwandanker

Flo1p, welcher in unterschiedlichen Längen eingesetzt wurde, konnte eine Zunahme der Enzymaktivität mit steigender Ankerlänge festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass die Ankerlänge einen Einfluss auf die Effizienz des YSD besitzen kann, was sich aber von Ankerprotein zu Ankerprotein unterscheidet und sich entweder vor- oder nachteilig auswirkt (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Sato *et al.*, 2002). Durch die Insertion von sogenannten „Linker“-Sequenzen zwischen Ziel- und Ankerprotein konnte die Zugänglichkeit von Enzymen für ihre Substrate auf der Zelloberfläche erhöht werden, wobei die Konformation des aktiven Zentrums bestehen bleibt. Diese Sequenzen umfassen am häufigsten flexible und einfach zu faltende Aminosäuren, wie z. B. Glycin und Serin, wodurch eine potenzielle sterische Hinderung des Zielproteins mit Zellwandkomponenten minimiert werden soll (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Liu *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2002; Teymenet-Ramírez *et al.*, 2022; Washida *et al.*, 2001). Neben den Eigenschaften des Ankerproteins sind auch die Merkmale des zu immobilisierenden Zielproteins zu beachten. In Experimenten mit Pir-Protein-basierten Expressionssystemen traten Probleme bei der Expression von Proteinen mit einer Größe von über 800 AS auf (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Yang *et al.*, 2014). Zudem konnte festgestellt werden, dass die Expression von Cystein-reichen Proteinen, wie z. B. humanen Glykosyltransferasen, möglicherweise durch Einschränkungen der Proteinfaltung im ER der Hefe aufgrund der hohen Anzahl an Cysteinresten stark verringert und dadurch nur eine geringe Aktivität nachweisbar war (Shimma *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2014). Weitere Elemente eines für das YSD genutzten Fusionskonstrukts sind eine entsprechende Signalsequenz für die Lokalisation in der Zellwand und ein Epitop-Tag, welches für die Detektion über immunologische bzw. Fluoreszenz-basierte Verfahren (FACS) notwendig ist. Durch die Wahl einer idealen Signalsequenz am N-Terminus des Konstrukts sollen eine effiziente Prozessierung im ER und der gezielte Transport des Fusionsproteins zur Zellwand ermöglicht werden (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Tanaka & Kondo, 2015). Die am häufigsten im YSD eingesetzten Signalsequenzen entstammen der Glukoamylase aus *R. oryzae* (GLUASP) und dem  $\alpha$ -Mating-Pheromon aus *S. cerevisiae*, wobei inzwischen auch weitere Signalpeptide von hefeeigenen Proteinen, wie z. B. Kre1p, Sed1p oder auch Flo1p, erfolgreich eingesetzt werden konnten (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Breinig & Schmitt, 2002; Chen *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011; Inokuma *et al.*, 2016; Matsumoto *et al.*, 2002; Yanase *et al.*, 2010). Zusätzlich sollten zur effizienten Expression der Fusionskonstrukte starke konstitutive oder induzierbare Promotoren gewählt werden, da die natürlichen Promotoren der Ankerproteine unterschiedliche Transkriptionslevel zeigen. Zu den am häufigsten eingesetzten Promotoren zählen bei den konstitutiven Promotoren *PGK1* oder

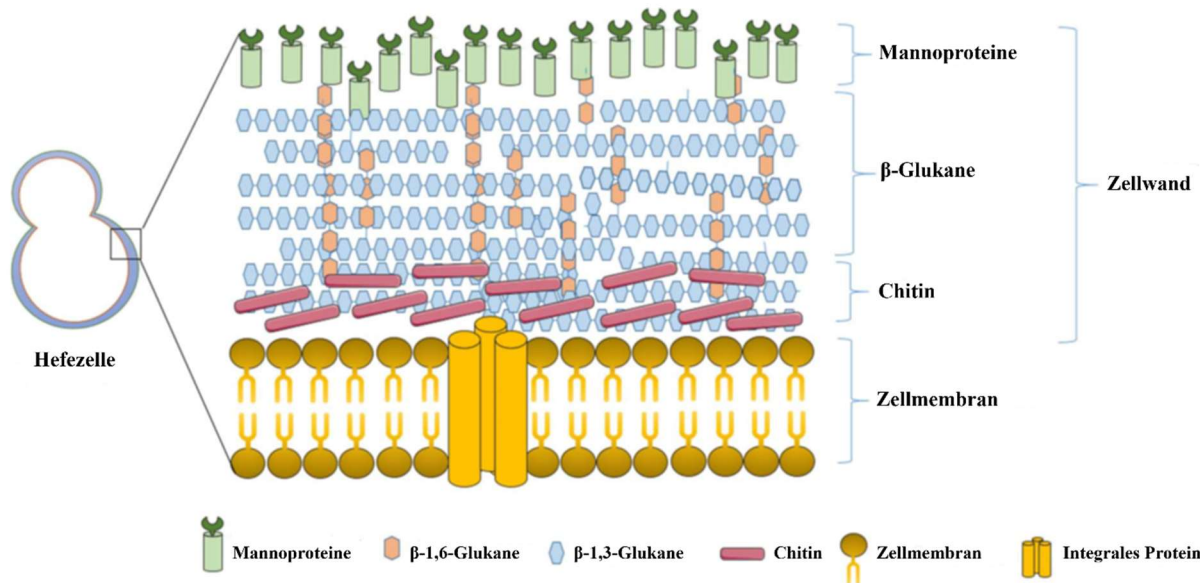
*TDHI-3*, wohingegen bei den induzierbaren Promotoren *GALI* vermehrt genutzt wird (Andreu & L  del Olmo, 2018). Hierbei treten zwischen verschiedenen Promotoren unterschiedliche Transkriptionsstärken auf, die je nach Wachstumsphase der Hefe variieren und so eine wachstumsphasenabh ngige Nutzung der Promotoren ermöglichen können (Andreu & L  del Olmo, 2018; Peng *et al.*, 2015). Ein weiterer Faktor, der zum Erfolg des Oberfl chendisplays beiträgt, ist die Wahl der Hefegattung, da der genomische und metabolische Hintergrund der Hefen die Expression nativer und heterologer Proteine beeinflussen kann (Teymennet-Ram rez *et al.*, 2022). Neben Expressionssystemen in *S. cerevisiae* konnten bereits weitere Systeme in *H. polymorpha*, *Y. lipolytica* oder auch *S. boulardii* etabliert werden, wobei *P. pastoris* am häufigsten genutzt wurde (Andreu & L  del Olmo, 2018; Kim *et al.*, 2002; Teymennet-Ram rez *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2014; Yuzbasheva *et al.*, 2011). *P. pastoris* zeichnet sich durch das Wachstum in hohen Zelldichten und einen methylotrophen Stoffwechsel aus, der auf der Verwertung von Methanol als einziger Kohlenstoffquelle basiert. Der Methanolmetabolismus findet in den Peroxisomen über den sogenannten MUT-Pathway („methanol utilization pathway“) statt. *P. pastoris* besitzt zwei *AOX*-Gene, welche für die Alkoholoxidasen AOX1 und AOX2 kodieren. Sie werden von unterschiedlich starken Promotoren reguliert und machen im Fall von AOX1 30 % des gesamten Proteingehalts aus. Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsregulation ergeben sich zwei MUT-Phänotypen, die entweder als Mut<sup>+</sup> („methanol utilization plus“) oder Mut<sup>S</sup> („methanol utilization slow“) klassifiziert werden. GS115 ist ein häufig eingesetzter Expressionsstamm, der beide funktionellen *AOX*-Gene besitzt, somit den Mut<sup>+</sup>-Phänotyp aufweist und Methanol in hohem Maße verstoffwechseln kann. Einen Vertreter des Mut<sup>S</sup>-Phänotyps stellt der KM71-Stamm dar, der aufgrund einer Deletion des *AOX1*-Gens nur über die geringere *AOX2*-Expression Methanol in verringerter Geschwindigkeit umsetzen kann (Cereghino & Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 1989, 2000; Juturu & Wu, 2018). Außerdem ist *P. pastoris* in der Lage eukaryotische, posttranslationale Proteinmodifikationen durchzuführen, wobei im Vergleich zu *S. cerevisiae* deutlich seltener Hyperglykosylierungen der Proteine auftreten, die eine Nutzung pharmazeutisch relevanter Proteine erschweren können (Cereghino & Cregg, 2000; Juturu & Wu, 2018). Neben dem Einsatz von aus *S. cerevisiae* stammenden Zellwandankern konnten in *P. pastoris* 13 eigene GPI-verankerte Proteine identifiziert werden, mit welchen die aus *Candida antarctica* stammende Lipase B (CALB) erfolgreich auf der Zelloberfläche immobilisiert werden konnte (Andreu & L  del Olmo, 2018; Zhang *et al.*, 2013).



Zusätzlich können inzwischen auch Hefestämme zur Erhöhung der Displayeffizienz genetisch modifiziert werden, was sich beispielsweise anhand der Veränderung der Zellwandmorphologie von *S. cerevisiae* durch einen gleichzeitigen Knockout der beiden GPI-verankerten Zellwandproteine Ccw12p und Ccw14p förderlich auf die Menge an präsentierter *Aspergillus aculeatus*  $\beta$ -Glukosidase (BGL) auswirkte (Inokuma *et al.*, 2021). Weitere Experimente in Deletionsmutanten der Zellwandproteine Mnn2p sowie Cwp2p und Ygp1p zeigten ebenfalls eine Aktivitätszunahme der immobilisierten Endoglukanase II und BGL in *S. cerevisiae* (Arnthong *et al.*, 2022; Matsuoka *et al.*, 2014).

### 1.3 Zellwandimmobilisierung durch direkte Verankerung

Die Grundlage der Proteinimmobilisierung auf der Hefezelloberfläche bilden hefeeigene Zellwandproteine („cell wall proteins“; „CWPs“), welche natürlich in der Zellwand vorkommen, unterschiedliche Eigenschaften besitzen und auch als „Zellwandanker“ bezeichnet werden (Klis *et al.*, 2002; Kondo & Ueda, 2004). Die Zellwand von *S. cerevisiae* weist eine Dicke von 200 nm auf und trägt einen Anteil von 15-30 % zum gesamten Trockengewicht einer Hefezelle bei (Klis *et al.*, 2002; Lipke & Ovalle, 1998). Sie besteht vor allem aus  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glukanen sowie aus Chitin und Zellwandproteinen, die in zwei Schichten organisiert vorliegen (Kapteyn *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2002). Die innere Schicht besteht vornehmlich aus  $\beta$ -1,3-Glukanen und Chitin, welche für die strukturelle Stabilität verantwortlich sind und 50-60 % des Trockengewichts der Zellwand ausmachen (Klis *et al.*, 2002; Kollár *et al.*, 1997). Die äußere Schicht umfasst diverse N- und O-glykosylierte Mannoproteine, die an der Zell-Zell-Erkennung beteiligt sind und eine Zugänglichkeit der inneren Schicht für Fremdproteine oder auch die Permeabilität für gelöste Stoffe einschränken (Cappellaro *et al.*, 1994; De Nobel *et al.*, 1990; Klis *et al.*, 2002; Lipke & Ovalle, 1998; Zlotnik *et al.*, 1984). Sie werden entweder über eine direkte Bindung an  $\beta$ -1,3-Glukane oder indirekt über  $\beta$ -1,6-Glukane kovalent mit dem  $\beta$ -1,3-Glukan-Gerüst verknüpft (s. Abb. 1) (Klis *et al.*, 2002; Lesage & Bussey, 2006; Lipke & Ovalle, 1998).



**Abb. 1: Struktureller Aufbau der Zellwand und -membran von *S. cerevisiae*.** Die zweischichtige Zellwand von *S. cerevisiae* besteht aus einer inneren und äußeren Schicht. Die innere Schicht setzt sich zum größten Teil aus  $\beta$ -1,3-Glukanen und Chitin sowie  $\beta$ -1,6-Glukanen zusammen. In der äußeren Schicht sind N- und O-glykosylierte Mannoproteine vorherrschend, die entweder über GPI-Anker oder nicht-kovalente Bindungen mit dem  $\beta$ -1,3-Glukan-Gerüst verbunden sind. Die Zellmembran liegt als Lipiddoppelschicht vor, in der integrale Membranproteine auftreten können (verändert nach Anwar *et al.*, 2017).

CWPs können anhand ihrer Struktur und der Art der Zellwandverankerung entweder als GPI-CWPs oder Pir-Proteine klassifiziert werden (Kapteyn *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2002). Die Verankerung der GPI-CWPs erfolgt über einen in der hydrophoben Region am C-Terminus eingebauten GPI-Anker. Sie besitzen ein N-terminales Signalpeptid zur Prozessierung im ER, eine Serin- und Threonin-reiche Spacer-Region zwischen N- und C-Terminus sowie ein C-terminales Signal zur GPI-Addition (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Caras *et al.*, 1987; Klis *et al.*, 2002; Pittet & Conzelmann, 2007). Letzteres wird von einer GPI-Transamidase erkannt und mit dem finalen GPI-Anker ersetzt. An der Biosynthese der GPI-Anker in *S. cerevisiae* sind mehr als 20 Enzyme beteiligt, die in einem mehrstufigen Prozess den fertigen GPI-Anker herstellen (Castillon *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2010; Pittet & Conzelmann, 2007). Bisher konnten ungefähr 20 GPI-CWPs identifiziert werden, welche durch die Interaktion des GPI-Ankers mit den  $\beta$ -1,6-Glukanen kovalent an das  $\beta$ -1,3-Glukan-Rückgrat der Zellwand gebunden werden. Eine Glukanase-Behandlung führt demnach zur Extraktion der GPI-CWPs aus der Zellwand (Andreu & Lí del Olmo, 2018; De Groot *et al.*, 2003; Klis *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2005). Zu den am häufigsten im Oberflächendisplay in *S. cerevisiae* eingesetzten GPI-CWPs zählen das  $\alpha$ -Agglutinin Sag1p, die  $\alpha$ -Agglutinine Aga1p und Aga2p sowie

Cwp2p und Sed1p, die mit Ausnahme von Aga1p und Aga2p nur eine N-terminale Proteinfusion erlauben (Andreu & L  del Olmo, 2018; Lozan c  *et al.*, 2019).

Das  $\alpha$ -Agglutinin Sag1p („sexual agglutination 1“) ist zusammen mit seinem Interaktionspartner dem  $\alpha$ -Agglutinin Aga2p für die Zellpaarung und -adh sion verantwortlich. Sie werden konstitutiv in geringen Levels in haploiden  $\alpha$ - bzw.  $\alpha$ -Zellen exprimiert, wobei die Genexpression jeweils durch ein Pheromonsignal des anderen Mating-Typs hochreguliert werden kann (Andreu & L  del Olmo, 2018; Cappellaro *et al.*, 1994; Hauser & Tanner, 1989; Zhao *et al.*, 2001). Die Interaktion der Agglutinine erfolgt hierbei durch die Bindung des  $\alpha$ -Agglutinins an eine Bindestelle im N-terminalen Bereich des  $\alpha$ -Agglutinins, die strukturelle Ähnlichkeiten zur Immunoglobulin-Superfamilie zeigt (Cappellaro *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; Wojciechowicz *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2001). Sag1p wurde erstmalig im YSD von Schreuder *et al.* (1993) genutzt, welches die erfolgreiche Immobilisation einer  $\alpha$ -Galaktosidase auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* ermöglichte (Andreu & L  del Olmo, 2018; Schreuder *et al.*, 1993). In späteren YSD-Experimenten mit einer  $\beta$ -Glukosidase konnte durch eine Deletion des *SEDI*-Gens eineverst rkte Expression von Sag1p- und Sed1p-Fusionskonstrukten erlangt werden (Andreu & L  del Olmo, 2018; Bamba *et al.*, 2018; Kotaka *et al.*, 2010; Kuroda *et al.*, 2009). Weitere Anwendungsbeispiele für den Einsatz von Sag1p als Fusionspartner sind eine Lipase aus *R. oryzae*, die aus *C. antarctica* stammende Lipase B (CALB) oder auch das Co-Display einer  $\alpha$ -Amylase und Glukoamylase zur Ethanolproduktion aus Maisstärke (Han *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2007; Shigechi *et al.*, 2004; Shiraga *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2012).

Das Zelladh sionsprotein  $\alpha$ -Agglutinin besteht im Gegensatz zu Sag1p aus zwei voneinander separierten Untereinheiten, die einerseits zur Verankerung (Aga1p) und andererseits zur Zelladhäsion (Aga2p) dienen. Aga1p liegt GPI-verankert in der Zellwand vor und beide Untereinheiten sind über zwei von den Cysteinresten 7 und 50 des Aga2p ausgebildeten Disulfidbrücken miteinander verbunden (Boder & Wittrup, 1997; Cappellaro *et al.*, 1994; De Nobel *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 2001). Durch die indirekte Verankerung des Adh sionselements Aga2p an der Zellwand erlaubt das zweiteilige Aga1-Aga2-System neben einer N- und C-terminalen Verankerung auch eine duale Präsentation über beide Termini, was bereits über teilweise kommerziell erhältliche Vektoren wie z. B. pCT202, pYD1 und pYD5 ermöglicht wird (Andreu & L  del Olmo, 2018; Boder & Wittrup, 1997; Kieke *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2005). Zusätzlich wird bei dieser Art des YSD der Hefestamm EBY100 genutzt, der das *AGAI*-Gen unter Kontrolle eines induzierbaren *GALI*-Promotors exprimiert, um hohe Expressionslevel zu garantieren (Andreu & L  del Olmo, 2018; Boder &

---

Wittrup, 1997). So konnten beispielsweise neben einzelnen Enzymen wie z. B. den Lipasen Lip7 und Lip8 aus *Y. lipolytica* auch ganze Zellulasesysteme zur Ethanolproduktion oder der humane Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC-II) mithilfe dieses Systems auf der Zelloberfläche präsentiert und funktionell nachgewiesen werden (Jiang & Boder, 2010; Liu *et al.*, 2010a; Mei *et al.*, 2017; Tanaka *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2009, 2010; Wen *et al.*, 2010).

Ein weiterer Vertreter der GPI-CWPs stellt Sed1p („suppression of exponential defect“) dar, welches stark N- und O-glykosyliert vorkommt und von Shimoi *et al.* (1998) nach einer Behandlung mit der Protease I aus *Rarobacter faecitabidus* isoliert wurde (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Shimoi *et al.*, 1998). Das Transkriptionslevel von Sed1p ist abhängig von der Zellzyklusphase und erreicht in der M-Phase sein Maximum. Der Sed1p-Anteil steigt während der stationären Phase auf ca. 30 % aller CWPs an, weshalb für Sed1p auch eine mögliche Rolle an der Stressresistenz der Hefezelle vermutet wird (Caro *et al.*, 1998; Inokuma *et al.*, 2014; Mannazzu *et al.*, 2002; Shimoi *et al.*, 1998). Mithilfe dieses CWPs konnten bereits eine  $\beta$ -Glukosidase aus *A. aculeatus* und die Endoglukanase II aus *Trichoderma reesei* erfolgreich immobilisiert werden (Inokuma *et al.*, 2014, 2016).

Das „cell wall protein 2“ (Cwp2p) wurde erstmalig von Van der Vaart *et al.* (1995) als eines der vorherrschenden Mannoproteine der Zellwand beschrieben und ist für die Zellstabilität verantwortlich (Van der Vaart *et al.*, 1995, 1997). Im Gegensatz zu Sed1p zeigt Cwp2p das höchste Transkriptionslevel in der S/G2-Phase, was ebenfalls eine Zellzyklus-abhängige CWP-Verteilung demonstriert (Caro *et al.*, 1998). In Experimenten zur Immobilisierung einer  $\alpha$ -Galaktosidase mittels verschiedener Zellwandanker konnte die höchste Verankerungseffizienz durch Cwp2p erreicht werden (Van der Vaart *et al.*, 1997). Neben dieser  $\alpha$ -Galaktosidase konnten mithilfe von Cwp2p auch ein HA-Tag, die aus *Burkholderia gladioli* stammende Esterase A (EstA) oder eine hefeeigene, durch *MAL32* kodierte Maltase erfolgreich auf der Hefezelloberfläche präsentiert werden (Breinig *et al.*, 2006; Breinig & Schmitt, 2002; Dietvorst *et al.*, 2007).

Des Weiteren sind auch Vertreter der Zellwandproteine bekannt, welche für die Flokkulation der Hefe verantwortlich sind und deren Verankerungsmechanismus bisher noch nicht völlig aufgeklärt werden konnte. Die Familie der sogenannten Flo-Proteine stellt für Mannose spezifische Lektine dar, wobei Flo1p („flocculation protein 1“) als spezifischstes Adhäsionsprotein gilt und in der Zellwand lokalisiert ist (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Goossens *et al.*, 2011; Govender *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2000; Teunissen *et al.*, 1993; Van Mulders *et al.*, 2009). Flo1p zeichnet sich dadurch aus, dass es am N-Terminus über eine sogenannte „flocculation functional domain“ verfügt, die als Erkennungsdomäne für

Zuckermoleküle dient und somit für die Zelladhäsion durch eine nicht-kovalente Bindung an Zellwandkomponenten, wie z. B. Mannane, verantwortlich ist (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Bony *et al.*, 1997; Goossens *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 1998). Zusätzlich zu dieser Domäne verfügt Flo1p – wie die GPI-CWPs – über einen C-terminalen GPI-Anker. Im Rahmen einer Deletionsanalyse konnte anhand der Sekretion von Flo1p ins Kulturmedium festgestellt werden, dass die N-terminale Domäne für die Zellaggregation und der C-terminale GPI-Anker zur Zellwandverankerung notwendig sind (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Bony *et al.*, 1997). Matsumoto *et al.* (2002) generierten ein System zum Oberflächendisplay einer Lipase aus *R. oryzae*, welches auf einer C-terminalen Fusion mit der „flocculation functional domain“ beruht und somit eine Möglichkeit zum YSD von Proteinen bietet, deren aktives Zentrum C-terminal lokalisiert ist (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Matsumoto *et al.*, 2002). Der Einsatz der C-terminalen GPI-Domäne zur Zellwandverankerung einer Glukoamylase aus *R. oryzae* als auch der EstA aus *B. gladioli* über eine N-terminale Fusion konnte erfolgreich demonstriert werden (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Breinig *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2002).

Die Gruppe der Pir-Proteine („proteins with internal repeats“) umfasst im Gegensatz zu den GPI-CWPs vier Vertreter (*PIR1-4*) und das *PIR1*-Paralog *PIR5*, die sich dadurch auszeichnen, dass sie kein GPI-Signal zur Zellwandverankerung besitzen und untereinander eine hohe Ähnlichkeit aufweisen (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Ecker *et al.*, 2006; Toh-E *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2014). Zusätzlich lassen sie sich durch eine SDS-Behandlung aus der Zellwand lösen (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Castillo *et al.*, 2003). Die ausschließlich O-glykosylierten Proteine besitzen ein N-terminales Signalpeptid, ein durch die Endoprotease Kex2p prozessierbares Propeptid, eine Region mit sich wiederholenden Repeats und einen konservierten C-Terminus mit vier Cysteinresten (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Mrsá *et al.*, 1997; Toh-E *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2014). Die sich wiederholenden Regionen bestehen aus 18-19 Aminosäuren, wovon acht hoch konserviert sind, und sie treten je nach Pir-Protein in unterschiedlichen Häufigkeiten auf. Beispielsweise verfügen Pir1p und Pir3p über acht interne Repeats, wohingegen Pir2p elf und Pir4p nur einen einzelnen Aminosäure-Repeat besitzen (Andrés *et al.*, 2005; Mrsá *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2014). Bei den Pir-Proteinen sind zwei Möglichkeiten zur Zellwandverankerung möglich. Zum einen können die Proteine durch eine Esterbindung der  $\gamma$ -Carboxylgruppe des zweiten Glutamins innerhalb der konservierten Sequenz der Repeats eine Verbindung mit den  $\beta$ -1,3-Glukanen der Hefezellwand eingehen. Hierbei reicht eine repetitive Sequenz für die Zellwandbindung aus; der Grad der Bindung erhöht sich jedoch mit zunehmender Repeat-Anzahl (Sumita *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2014). Zum anderen können Pir-Proteine durch die am C-Terminus lokalisierten Cysteinreste

---

Disulfidbrücken mit spezifischen Zellwandkomponenten eingehen und ebenfalls an die Zellwand von *S. cerevisiae* binden. Anhand von Studien mit Pir4p konnte gezeigt werden, dass dessen Bindung trotz einer Deletion der internen Repeats mithilfe der Disulfidbrücken hergestellt werden konnte, was vermuten lässt, dass nicht beide Bindungsstellen zur Zellwandverankerung notwendig sind (Castillo *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2014). Durch die C-terminale Fusion mit Pir-Proteinen konnten beispielsweise neben hefeeigenen auch humane Glykosyltransferasen funktionell auf der Zelloberfläche verankert werden (Abe *et al.*, 2003; Lozančić *et al.*, 2019; Shimma *et al.*, 2006; Shimma & Jigami, 2004; Yang *et al.*, 2014). Interne Fusionen mit einer Xylanase A aus *Bacillus* sp. BP7, einer Lipase A aus *Bacillus subtilis* oder dem VP8\*-Fragment des Rotavirus-Spikeproteins wurden ebenfalls untersucht (Andrés *et al.*, 2005, 2006; Mormeneo *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2014). N-terminale Fusionskonstrukte zwischen Proteinen und Pir-Proteinen wurden bisher nur durch die Verankerung von eGFP auf der Zelloberfläche von *P. pastoris* nachgewiesen, jedoch konnten inzwischen auch  $\beta$ -Laktamasen nach strukturellen Untersuchungen von Pir2p erfolgreich verankert werden (Martinić Cezar *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2014).

## 1.4 Zellwandimmobilisierung durch Verankerungssysteme

### 1.4.1 Zellwandverankerung durch Kohäsin-Dockerin-Interaktion

Neben der direkten Verankerung von Proteinen über die Fusion mit Zellwandankern kann die Immobilisierung auch über ein zweistufiges System erfolgen, das auf der Interaktion von Kohäsinen mit Dockerinen beruht. Die Interaktionspartner wurden erstmalig im Zusammenhang mit dem sogenannten Zellulosom des thermophilen Bakteriums *Clostridium thermocellum* beschrieben und konnten bereits auch um Systeme in den mesophilen Organismen *Clostridium cellulovorans* und *Clostridium cellulolyticum* erweitert werden (Bayer *et al.*, 2004; Doi & Kosugi, 2004; Ito *et al.*, 2009; Lamed *et al.*, 1983). Das Zellulosom stellt einen Multienzym-Komplex anaerober Bakterien dar, der zur Hydrolyse von pflanzlicher Zellulose durch eine Vielzahl an Zellulasen dient, die in synergistischer Art und Weise die Degradation katalysieren. Es besteht aus nicht-enzymatischen Gerüstproteinen, die mehrere Kohäsin- und Zellulose-bindende Module („cellulose-binding module“, CBM) tragen. Zellulolytische Enzyme besitzen zu den Kohäsin-Domänen komplementäre Dockerin-Module, welche über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen eine starke Interaktion eingehen und die Verankerung der Enzyme über das Zellulosom an der Zelloberfläche ermöglichen (Adams *et al.*, 2006; Bayer *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2003;

Mechaly *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2018). Dockerine besitzen eine Größe von ca. 70 AS, wobei sie zwei duplizierte Bereiche besitzen, die in Teilen den „calcium-binding loops“ von EF-Hand-Motiven strukturell ähneln (Bayer *et al.*, 2004; Chauvaux *et al.*, 1990; Salamiou *et al.*, 1992; Tokatlidis *et al.*, 1991). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Dockerin-Interaktion Calcium-abhängig ist und die duplizierten Sequenzen für die Kohäsin-Bindung verantwortlich sind (Bayer *et al.*, 2004; Choi & Ljungdahl, 1996; Fierobe *et al.*, 1999; Lytle *et al.*, 2001; Lytle & Wu, 1998; Pagès *et al.*, 1997; Yaron *et al.*, 1995). Dieses Interaktionsmodell konnte bereits zum Zelloberflächendisplay von Endoglukanasen und  $\beta$ -Glukosidasen über Kohäsine und Dockerine aus *C. cellulovorans* zum Zelluloseabbau durch eine Verankerung über  $\alpha$ -Agglutinin in der Zellwand von *S. cerevisiae* eingesetzt werden (Ito *et al.*, 2009). Wen *et al.* (2010) konnten erstmalig ein funktionelles, dreiteiliges Minizellulosom mithilfe des Aga1-Aga2-Systems erfolgreich zur Ethanolproduktion in *S. cerevisiae* exprimieren. Hierbei konnte eine erhöhte Aktivität der Enzyme im Vergleich zu freien oder direkt immobilisierten Enzymen festgestellt werden (Anandharaj *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2010). In *S. cerevisiae* konnten bisher bis zu zwölf Enzyme gleichzeitig über ein Minizellulosom „displayed“ werden, wohingegen inzwischen ein System für *Kluyveromyces marxianus* generiert wurde, welches bis zu 63 Enzyme gleichzeitig zur Ethanolherstellung erfolgreich präsentieren konnte (Anandharaj *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2012).

#### 1.4.2 Zellwandverankerung durch ZZ-Fc-Interaktion

Ein weiteres Modell zur Immobilisierung von Proteinen auf der Hefezelloberfläche basiert auf einer Interaktion zwischen einer ZZ-Domäne und dem Fc-Fragment des Immunglobulins G (IgG). Die Z-Domäne stellt eine anhand von Sequenzanalysen synthetisch hergestellte Domäne dar, die mittels Protein-Engineering einer der IgG-Bindedomänen des Protein A aus *S. aureus* (Domäne B) zur Konstruktion von Fusionsproteinen nachempfunden wurde (Nilsson *et al.*, 1987; Tashiro *et al.*, 1997). Sie wurde durch das Ersetzen von Aminosäuren an zwei unterschiedlichen Positionen generiert, was keine Beeinträchtigung der IgG-Bindungsaffinität zur Folge hatte (Cedergren *et al.*, 1993; Nilsson *et al.*, 1987; Shibasaki *et al.*, 2007; Tashiro *et al.*, 1997). Das Protein A besitzt fünf zueinander stark homologe IgG-Bindedomänen (E, D, A, B, C), die jeweils 58 Aminosäurereste umfassen (Cedergren *et al.*, 1993; Uhlén *et al.*, 1984). Auf Grundlage von kristallografischen Untersuchungen der Protein A-IgG-Interaktion konnte für die Domäne B festgestellt werden, dass die Bindung durch die Interaktion zweier  $\alpha$ -Helices mit den CH2- und CH3-Domänen des Fc-Fragments zustande kommt (Cedergren *et al.*, 1993; Deisenhofer, 1981). Das Protein A zeigte dabei vor

---

allem eine Affinität für mehrere humane IgG-Klassen (IgG1, IgG2 und IgG4) sowie für alle IgG-Klassen in Hasen (Kronvall & Williams, 1969; Lind & Mansa, 1968; Nakamura *et al.*, 2001).

Z-Domänen wurden im Jahr 2001 als Wiederholung zweier identischer Domänen (ZZ-Domäne) auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* mithilfe des Zellwandankers Sag1p immobilisiert, was mittels ELISA und IgG-Aufreinigungen aus Serumproben erfolgreich nachgewiesen werden konnte (Nakamura *et al.*, 2001). Basierend auf diesem System konnte die Oberflächenexpression von eGFP fluoreszenzmikroskopisch bestätigt und eine Rückgewinnung der *R. oryzae* Lipase aus dem Kulturmedium erreicht werden (Shibasaki *et al.*, 2007). Weiterführend konnte durch die Fusion des Fc-Fragments mit der Endoglukanase II aus *T. reesei* und durch die Immobilisierung über ZZ ein Abbau von Zellulose katalysiert werden (Ito *et al.*, 2009). Die ZZ-Fc-Interaktionssysteme konnten zusätzlich zur Verankerung über Sag1p auch über Flo1p in der Hefezellwand verankert werden (Katsurada *et al.*, 2021; Shimojyo *et al.*, 2003).

## 1.5 Zellwandverankerung unterschiedlicher Enzymklassen

### 1.5.1 Esterase A aus *Burkholderia gladioli*

Die Klasse der Hydrolasen teilt sich in Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) und Triacylglycerollipasen (EC 3.1.1.3) auf. Sie katalysieren die Hydrolyse kurz- und langkettiger Ester niederer Carbonsäuren in einen Alkohol und eine Carbonsäure und besitzen ein breitgefächertes Substratspektrum mit hoher Stereospezifität, was sie für einen verstärkten biotechnologischen Einsatz in der Nahrungsmittel- und Pharmaindustrie oder auch bei der Herstellung medizinischer Produkte attraktiv macht (Bornscheuer, 2002; Jaeger & Reetz, 1998; Schmid & Verger, 1998; Singh *et al.*, 2006). Eine im Jahr 1998 entdeckte Carboxylesterase stellt die Esterase A (EstA) aus dem gram-negativen Bodenbakterium *B. gladioli* dar (Schlacher *et al.*, 1998). Das monomere Enzym umfasst eine Größe von 351 AS und setzt die Substrate *p*-Nitrophenylacetat und *o*-Nitrophenylbutyrat zu *p*-Nitrophenol und Acetat bzw. *o*-Nitrophenol und Butyrat ohne die Notwendigkeit von Kofaktoren um (Breinig *et al.*, 2006; Schlacher *et al.*, 1998; Schultheiss *et al.*, 2002). Zwischenzeitlich konnten neben EstA auch die Esterasen B und C aus *B. gladioli* identifiziert und charakterisiert werden, welche strukturelle Ähnlichkeiten zu  $\beta$ -Laktamasen (EstB) oder pflanzlichen Lyasen (EstC) besitzen (Reiter *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2002). EstA wurde erstmalig mithilfe des Autotransporter-Systems an der Zelloberfläche von *E. coli*



immobilisiert und konnte durch den Umsatz der Substrate *p*-Nitrophenylacetat und  $\alpha$ -Naphthylacetat in einer aktiven Form nachgewiesen werden (Schultheiss *et al.*, 2002). Breinig *et al.* (2006) führten Experimente zur Immobilisierung der EstA auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* durch, bei welchen das Enzym mit den hefeeigenen Ankerproteinen Cwp2p und Flo1p fusioniert wurde. Im Vergleich zum Autotransporter-basierten Oberflächendisplay der EstA konnten für *S. cerevisiae* um ein Vielfaches höhere spezifische Aktivitäten festgestellt werden (Breinig *et al.*, 2006; Schultheiss *et al.*, 2002).

### 1.5.2 Mannitol- und Sorbitoldehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides*

Die Mannitol- und Sorbitoldehydrogenase stellen Vertreter der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Polyoldehydrogenasen dar, die im *Rhodobacter sphaeroides*-Stamm Si4 identifiziert werden konnten (Schauder *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1995; Schneider & Giffhorn, 1989). Das gram-negative, schwefelfreie Bodenbakterium *R. sphaeroides* besitzt einen äußerst vielseitigen Metabolismus, der je nach Wachstumsbedingungen photoautotroph, -heterotroph oder chemoheterotroph bzw. -autotroph sein kann. Hierbei können eine Vielzahl organischer Substrate wie z. B. Zucker, Polyole oder auch Formaldehyd mittels Fotosynthese, Respiration oder Fermentation verstoffwechselt werden (Barber & Donohue, 1998; Kahle *et al.*, 1992; Mackenzie *et al.*, 2001). Die Mannitoldehydrogenase (MDH; D-Mannitol: NAD<sup>+</sup> 2-Oxidoreduktase; EC 1.1.1.67) wurde erstmalig von Schneider & Giffhorn (1989) identifiziert und konnte im Jahr 1993 erfolgreich sequenziert und kloniert werden (Schneider *et al.*, 1993). Sie wird vom *mtlK*-Gen kodiert und umfasst 476 AS mit einem Molekulargewicht von 51,4 kDa. Die Besonderheiten der MDH bestehen darin, dass sie aufgrund ihrer Größe weder zu den „short-“ noch zu den „medium-chain“-Dehydrogenasen zählt und ein Monomer darstellt (Persson *et al.*, 1991b; Schneider *et al.*, 1993). Sie gehört der Gruppe der heterogenen „long-chain“-Dehydrogenasen an, die nur in einzelnen Segmenten Ähnlichkeiten zueinander aufweisen, was sie besonders interessant für biotechnologische Anwendungen macht (Persson *et al.*, 1991a; Schneider, 1994; Schneider *et al.*, 1993). Die MDH ist für die Oxidation der Polyole D-Mannitol, D-Sorbitol, D-Xylitol und D-Arabinol zu D-Fruktose bzw. D-Ribulose unter Reduktion des Kofaktors NAD<sup>+</sup> zuständig. Außerdem kann die MDH auch die Rückreaktion von D-Fruktose zu D-Mannitol unter Oxidation von NADH katalysieren, wobei sie die größte Affinität zu D-Mannitol aufweist (Schneider & Giffhorn, 1989; Schwartz *et al.*, 1994). Im Gegensatz zur MDH zählt die Sorbitol-dehydrogenase (SDH; L-Iditol: NAD<sup>+</sup> 2-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.14) aufgrund ihrer Größe von 256 AS zur Gruppe der „short-chain“-Dehydrogenasen und konnte in einer MDH-defizienten Transposon-

---

Mutante identifiziert werden (Schauder *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1993). Die SDH wird vom *smoS*-Gen kodiert und stellt ein Dimer mit zwei identischen Untereinheiten à 29 kDa dar (Schauder *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 1997). Ebenso wie die MDH ist die SDH auf den Kofaktor NAD<sup>+</sup> angewiesen und katalysiert die Oxidation von D-Sorbitol zu D-Fruktose. Sie zeigt im Vergleich zur MDH eine deutlich höhere Affinität für das Substrat D-Sorbitol und kann zudem den Umsatz von Galaktitol zu D-Tagatose sowie L-Arabinitol zu L-Ribulose katalysieren (Jose & von Schwichow, 2004; Schauder *et al.*, 1995). Neben der Überexpression beider Enzyme konnte die SDH mittels Autodisplay auf der Zelloberfläche von *E. coli* präsentiert werden, um ein System zur Herstellung von seltenen Zuckern und Polyolen zu generieren, welche in der Natur nur in geringer Verfügbarkeit auftreten und deren industrielle Herstellung mit aufwendigen sowie kostenintensiven Prozessen verbunden ist (Jose & von Schwichow, 2004; Mijailovic *et al.*, 2021; Schäfer *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1997).

### 1.5.3 Formiatdehydrogenase aus *Rhodococcus jostii*

Formiatdehydrogenasen (FDH) zählen zu den Vertretern der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Oxidoreduktasen (EC 1.17.1.9) in einer Vielzahl von Organismen wie z. B. methylophilen Bakterien, Hefen oder Pflanzen und wurden erstmalig im Jahr 1950 identifiziert (Boldt & Ansorge-Schumacher, 2020; Mathews & Vennesland, 1950; Nanba *et al.*, 2003; Shabalin *et al.*, 2009; Tishkov & Popov, 2006). Sie katalysieren die Oxidation von Formiat zu Kohlenstoffdioxid bei gleichzeitiger Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH (Castillo *et al.*, 2008). Aufgrund der Fähigkeit zur NADH-Generierung sind FDHs besonders attraktiv für den Einsatz in biotechnologischen Kofaktor-Regenerationssystemen, da die Reaktion irreversibel abläuft und CO<sub>2</sub> als Produkt einfach aus dem Reaktionsmedium entfernt werden kann. Sie zeigen zusätzlich ein breites pH-Optimum und sind nicht auf den Einbau von metallischen Ionen zur Funktionalität angewiesen (Boldt & Ansorge-Schumacher, 2020; Castillo *et al.*, 2008; Krix *et al.*, 1997; Weckbecker *et al.*, 2010). Limitierungen beim Einsatz von FDHs stellen vor allem hohe Kosten bei der Herstellung, geringe spezifische Aktivitäten und Stabilitäten dar (Boldt & Ansorge-Schumacher, 2020; Castillo *et al.*, 2008; Tishkov & Popov, 2006).

Infolge von Datenbankanalysen konnte eine aus *Rhodococcus jostii* stammende Formiatdehydrogenase (RjFDH) identifiziert werden, welche aus 400 AS besteht und ein Homodimer aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 44,7 kDa darstellt. Die RjFDH zeichnet sich im Vergleich zu anderen bereits industriell eingesetzten FDHs durch eine erhöhte spezifische Aktivität und Spezifität über einen größeren pH- und

---

Temperaturbereich aus, wobei gleichzeitig eine geringere RjFDH-Konzentration eingesetzt wurde. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 50 °C und Experimente mit einer optimierten RjFDH-Mutante ermöglichten die Nutzung von NADP<sup>+</sup> als Kofaktor mit einer zum Wildtypenzym vergleichbaren Aktivität, wodurch sich die RjFDH als Alternative zur in Regenerationssystemen herkömmlich eingesetzten FDH aus *Candida boidinii* (CbFDH) empfiehlt (Boldt & Ansorge-Schumacher, 2020; Slusarczyk *et al.*, 2000; Weckbecker *et al.*, 2010).

#### **1.5.4 Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Escherichia coli***

Die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH; EC 1.1.1.49) aus *E. coli* wurde zum ersten Mal von Scott & Cohen (1953) beschrieben. Das dimere Protein wird vom *zwf*-Gen kodiert, besteht aus 491 AS und weist ein Molekulargewicht von 55,7 kDa auf (Banerjee & Fraenkel, 1972; Rowland *et al.*, 1994; Rowley & Wolf, 1991; Schüürmann *et al.*, 2017). Die Oxidoreduktase ist zentraler Bestandteil des Pentosephosphatwegs und katalysiert unter hoher Spezifität die Oxidation von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phospho-D-Glukono-1,5-Lakton unter gleichzeitiger Reduktion des Kofaktors NADP<sup>+</sup> zu NADPH (Banerjee & Fraenkel, 1972; Fraenkel, 1968; Olavarría *et al.*, 2012; Rowley & Wolf, 1991; Scott & Cohen, 1953). Die NADP<sup>+</sup>-Spezifität der G6PDH gegenüber NAD<sup>+</sup> beruht hierbei auf der Interaktion zweier Aminosäurereste mit der Phosphatgruppe des NADP<sup>+</sup> (Fuentealba *et al.*, 2016). Durch die Fähigkeit der enzymatischen Kofaktor-Regeneration der G6PDH bietet sich ein vielseitiger Einsatz in biotechnologischen Prozessen an, um einen kostenintensiven Einsatz von Kofaktoren zu reduzieren (Schüürmann *et al.*, 2017; Weckbecker *et al.*, 2010). Hierzu konnten bereits erste Regenerationssysteme generiert werden, wobei das Enzym entweder in Organismen unterstützend überexprimiert oder auf speziellen Materialien immobilisiert wurde (Fan *et al.*, 2017; Fried *et al.*, 2013). Für *E. coli* konnte ein auf Autotransporterproteinen basierendes Regenerationssystem geschaffen werden, bei welchem durch die auf der Oberfläche immobilisierte G6PDH eine Cytochrom P450-gekoppelte Reaktion erfolgreich katalysiert werden konnte (Schüürmann *et al.*, 2017).

---

## 1.6 Zielsetzung

Eine Vielzahl an Proteinen mit unterschiedlichsten Eigenschaften konnte in der Vergangenheit bereits mithilfe des „Yeast Surface Displays“ auf der Oberfläche von Hefen immobilisiert werden, was ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten eröffnet. Die Ziele der vorliegenden Arbeit bestanden darin, bereits bestehende Zellwandverankerungssysteme zu optimieren und weitere mehrteilige Systeme in Hefen zu etablieren. Basierend auf Vorarbeiten von Breinig *et al.* (2006) mit der bakteriellen EstA aus *B. gladioli* sollten neben dem hefeeigenen Zellwandanker Cwp2p weitere N-terminale Fusionskonstrukte mit Sed1p und Sag1p mit verschiedenen Ankerlängen sowie eine C-terminale Verankerung über Aga1p-Aga2p generiert und in verschiedenen Stämmen der Hefen *S. cerevisiae* und *P. pastoris* getestet werden. Zur weiteren Optimierung der EstA-Expression in *S. cerevisiae* sollten zwei Linkersequenzen zwischen Enzym und Zellwandanker eingefügt werden, um die extrazelluläre Zugänglichkeit und die EstA-Aktivität zu erhöhen. Des Weiteren wurden Effekte der Deletion verschiedener Zellwandkomponenten auf die EstA-Immobilisierung in mutanten Hefestämmen betrachtet. Anhand der Koexpression von ER-Chaperonen und einem Regulatorprotein der UPR („Unfolded protein response“) sollten Auswirkungen einer verstärkten Proteinfaltung auf die Oberflächenexpression betrachtet werden. Potenzielle Einflüsse von Promotoren und Terminatoren auf die EstA-Aktivität wurden durch die Generierung von Konstrukten mit 19 konstitutiven Promotoren sowie sechs Terminatoren untersucht. Neben den direkten Verankerungssystemen sollten zudem auch zwei mehrstufige Systeme zur EstA-Verankerung etabliert werden, die auf Protein-Protein-Interaktionen beruhen. Ein System basierte auf der Interaktion zwischen einer Dockerin Typ 1-Domäne und dem Kohäsin 1 aus *C. cellulovorans*, was durch die Koexpression zweier Fusionskonstrukte bestehend aus Kohäsin 1 mit Cwp2p sowie EstA mit Dockerin mit nachfolgendem Aktivitätsnachweis erzielt werden sollte. Im zweiten System wurde die Interaktion der synthetisch hergestellten ZZ-Domäne aus *S. aureus* und dem Fc-Fragment des Immunglobulins G (IgG) zur EstA-Immobilisierung analysiert.

Darüber hinaus sollten die Erkenntnisse der EstA-Untersuchungen auf die bakteriellen Dehydrogenasen MDH und SDH aus *R. sphaeroides*, RjFDH aus *R. jostii* und G6PDH aus *E. coli* übertragen werden, um sie auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* zu präsentieren. Es sollte untersucht werden, ob die Enzymkonformation und die Verwendung der Kofaktoren NAD<sup>+</sup> bzw. NADP<sup>+</sup> eine Immobilisierung funktionell beeinflussen. Als übergeordnetes Ziel sollten durch die Immobilisierung erstmalig NADH-/NADPH-Regenerationssysteme mit den hier betrachteten Kofaktor-abhängigen Dehydrogenasen in Hefen generiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Organismen und Kultivierung

#### 2.1.1 Organismen

##### 2.1.1.1 Hefen und Bakterien

In Tab. 1 sind die in der Arbeit verwendeten *E. coli*-, *S. cerevisiae*- und *P. pastoris*-Stämme dargestellt.

**Tabelle 1:** In der Dissertation verwendete *E. coli*-, *S. cerevisiae*- und *P. pastoris*-Stämme mit Angaben zu deren Genotyp und Referenz.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
TOP 10	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen
TOP 10 F <sup>+</sup> One Shot	F <sup>+</sup> { <i>lacI<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)</i> } <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>S. cerevisiae</i>		
BY4742	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995
EBY100	MATα <i>ura3-52 trp1 leu2-Δ1 his3-Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1; GAL</i>	Boder & Wittrup, 1997; Invitrogen
S86c	MATα <i>ura3-2 leu2 his3 pra1 prb2 prc1 cps1</i> [L-O], [M-O]	Cooper & Bussey, 1989
SEY6210	MATα <i>leu2-3,122 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801; GAL</i>	Robinson <i>et al.</i> , 1988
W303	MATα/MATα <i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 [phi<sup>+</sup>]</i>	Rothstein, 1983
<i>P. pastoris</i>		
GS115	<i>his4</i> (Phänotyp: Mut <sup>+</sup> )	Invitrogen
KM71	<i>arg4 his4 aox1: ARG4</i> (Phänotyp: Mut <sup>S</sup> , ARG <sup>+</sup> )	Invitrogen

Tab. 2 führt die in der Dissertation verwendeten Deletionsmutanten der Hefe *S. cerevisiae* BY4742 mit systematischem Namen und Genotyp auf, welche von der Firma Euroscarf Deutschland bezogen wurden.

**Tabelle 2:** In der Dissertation verwendete Deletionsmutanten des *S. cerevisiae*-Stamms BY4742 mit Angaben zu deren systematischen Namen und Genotypen in alphabetischer Reihenfolge.

Gen	Systematischer Name	Genotyp
<b>CWP2</b>	YKL096W-A	MAT $\alpha$ ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YKL096W-A::kanMX4</i>
<b>KRE1</b>	YNL322C	MAT $\alpha$ ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YNL322C::kanMX4</i>
<b>KRE2</b>	YDR483W	MAT $\alpha$ ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YDR483W::kanMX4</i>
<b>KRE6</b>	YPR159W	MAT $\alpha$ ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YPR159W::kanMX4</i>
<b>MNN1</b>	YER001W	MAT $\alpha$ ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YER001W::kanMX4</i>
<b>MNN2</b>	YBR015C	MAT $\alpha$ ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YBR015W::kanMX4</i>
<b>MNN5</b>	YJL186W	MAT $\alpha$ ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YJL186W::kanMX4</i>
<b>SED1</b>	YDR077W	MAT $\alpha$ ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YDR077W::kanMX4</i>

## 2.1.2 Kultivierungsbedingungen

### 2.1.2.1 Hefen

Die Kultivierung der *S. cerevisiae*-Stämme erfolgte in den unten angegebenen Flüssigmedien bei 30 °C und 220 rpm im Schüttler. Wildtypische Hefestämme wurden in YPD-Medium kultiviert. Nach der Lithiumacetat-Transformation wurden die Hefetransformanten im jeweiligen d/o-Medium kultiviert. Die Selektion erfolgte anhand ihres Auxotrophie-Markers.

#### YPD-Medium

Glukose	2,0	%
Pepton	2,0	%
Hefeextrakt	1,0	%
Agar	1,5	%

Die Glukose und der Agar wurden getrennt autoklaviert.

SC-MediumSC-Aminosäuremix

Adenin	2,5	g	Phenylalanin	3,0	g
Arginin	1,2	g	Serin	22,5	g
Aspartat	6,0	g	Threonin	12,0	g
Glutamat	6,0	g	Tyrosin	1,8	g
Histidin	1,2	g	Tryptophan	1,2	g
Leucin	3,6	g	Valin	9,0	g
Lysin	1,8	g	Uracil	1,2	g
Methionin	1,2	g			

Die Herstellung von selektiven d/o-Medien erfolgte durch das Auslassen der entsprechenden Aminosäuren im SC-Mix. Die Lagerung des Aminosäuremixes erfolgte bei 4 °C.

Zusammensetzung des d/o-Mediums

Glukose	2,00	%
Ammoniumsulfat	0,50	%
d/o-Aminosäuremix	0,87	g/l
YNB	1,70	g/l
(Agar	1,50	%)

Glukose und Agar wurden getrennt autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das sterilfiltrierte YNB hinzugegeben.

Die Kultivierung der *P. pastoris*-Stämme wurde nach dem „*Pichia* Expression Kit“ (Invitrogen) und Diehl (2008) durchgeführt. Sie erfolgte in den unten aufgeführten Medien bei 30 °C und 220 rpm im Schüttler. Wildtypische Stämme wurden in YPD-Medium kultiviert. Die Selektion transformierter *P. pastoris*-Klone erfolgte auf His d/o-Platten bei 30 °C im Inkubator, wobei große Kolonien für die anschließende Expression ausgewählt, in His d/o-Flüssigmedium angeimpft und bei 30 °C und 220 rpm für 24 h kultiviert wurden. Darauf folgend wurden aus den Übernachtskulturen Hauptkulturen in BMG-Medium angeimpft (4 %) und über Nacht zwischen 26-28 °C und bei 165 rpm kultiviert. Um die Expression der ausgewählten Klone zu induzieren, wurden die Hauptkulturen auf unterschiedlich gepuffertem BMM-Medium bei 8.000 rpm für 5 min geshiftet. Die Expression wurde für

4-5 d bei 165 rpm und verschiedenen Temperaturen (26-28 °C) im Schüttler nach täglicher Zugabe von 0,5-1 % Methanol induziert.

#### BMG-Medium

Glyzerin	2,0	%
Ammoniumsulfat	1,0	%
YNB	3,4	%
Biotin	$4 \times 10^{-5}$	%
1 M Pufferstammlösung	10	%

Glyzerin und Ammoniumsulfat wurden zuerst autoklaviert. Die Zugabe der sterilfiltrierten Biotin-Stammlösung und des YNB erfolgte nach Abkühlen. Vor Gebrauch des Mediums wurde die entsprechende autoklavierte Pufferstammlösung zugegeben.

#### BMM-Medium

Methanol	1,0	%
Ammoniumsulfat	1,0	%
Casaminoacids	1,0	%
YNB	3,4	%
Biotin	$4 \times 10^{-5}$	%
1 M Pufferstammlösung	10	%

„Casaminoacids“ und Ammoniumsulfat wurden zuerst autoklaviert. Die Zugabe der sterilfiltrierten Biotin-Stammlösung, des Methanols und des YNB erfolgte nach Abkühlen. Vor Gebrauch des Mediums wurde die entsprechende autoklavierte Pufferstammlösung zugegeben.

#### 1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 6,0

Kalium-Dihydrogenphosphat	118,1	g/l
Dikalium-Hydrogenphosphat	23,0	g/l

#### 1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,0

Natrium-Dihydrogenphosphat-dihydrat	118,1	g/l
Dinatrium-Hydrogenphosphat-dihydrat	23,0	g/l



500 x Biotin-Stammlösung

Biotin	20,0 %
--------	--------

Die Lösung wurde nach Sterilfiltration bei 4 °C gelagert.

YNB-Stammlösung

YNB	34,0 g/l
-----	----------

Die YNB-Stammlösung wurde vor Gebrauch der BMG- und BMM-Medien frisch angesetzt und sterilfiltriert.

**2.1.2.2 Bakterien**

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme in LB-Flüssigmedium erfolgte bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler bzw. auf LB-Agarplatten bei 37 °C im Inkubator. Die Selektion Plasmidtragender *E. coli*-Kulturen erfolgte entweder durch die Zugabe von 50 µg/ml sterilfiltriertem Ampicillin (Stammlösung 50 mg/ml in 50 % Ethanol), 25 µg/ml Chloramphenicol (Stammlösung 25 mg/ml in Ethanol) oder 50 µg/ml Kanamycin (Stammlösung 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O dest.) zum Flüssigmedium bzw. zu den Agarplatten.

LB-Medium

Trypton	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %
(Agar	1,5 %)

Das Medium wurde autoklaviert.

Zur Proteinexpression mithilfe des pET24a(+)-Vektorsystems in *E. coli* wurde der BL21 (DE3)-Stamm verwendet. Dieses Expressionssystem wurde erstmalig von Studier & Moffatt (1986) etabliert und stellt eines der meist verwendeten Expressionssysteme dar, welches auf der Interaktion der aus dem Bakteriophagen DE3 stammenden T7-RNA-Polymerase und dessen T7-Promotor beruht (Rosano & Ceccarelli, 2014; Studier & Moffatt, 1986). Die T7-Polymerase wird unter Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors in den Bakterien exprimiert, wohingegen das Zielgen über einen T7-Promotor exprimiert wird, der in einem multi-copy-Plasmid (z. B. pET-Vektor) vorliegt. Durch die Induktion des *lacUV5*-Promotors

mit IPTG können unterschiedlichste Zielgene in hohem Maße transkribiert werden (Daegelen *et al.*, 2009; Rosano & Ceccarelli, 2014; Studier & Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990).

Die Expression wurde anhand des „pET System Manuals“ der Firma Novagen durchgeführt. Hierbei wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin versetzt und mit einer Übernachtskultur (2 %) angeimpft. Bis zum Erreichen einer  $OD_{600} = 0,6-1,0$  wurden die Bakterienkulturen bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kulturen wurden über variable Zeiträume (mindestens 3 h) bei unterschiedlichen Temperaturen (20 °C, 28 °C, 30 °C) inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen 5 min auf Eis gekühlt, wonach die Bakterien dann bei 5.000 x g und 4 °C 5 min geerntet wurden. Die Zellpellets wurden nach einem Waschschrift in kaltem 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) je nach weiterer Verwendung bei -80 °C gelagert oder zum Zellaufschluss (s. 2.7.3.1) eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden die jeweiligen Plasmid-tragenden Kulturen ohne IPTG-Induktion bei ansonsten gleichen Kultivierungsbedingungen eingesetzt.

## 2.2 Plasmide

Die in der Dissertation eingesetzten Plasmide sind in Tab. 3 mit Angaben zu Eigenschaften und Referenzen aufgeführt. Die Sequenzen der Enzyme G6PDH, MDH und RjFDH lagen ausschließlich kodonoptimiert für *S. cerevisiae* vor. Weitere Kodonoptimierungen sind an den entsprechenden Stellen in Tab. 3 vermerkt. Zur Zwischenklonierung und Sequenzierung wurde der multi-copy-Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> genutzt. Für die Proteinexpression wurden die Vektoren pET24a(+), pFB2, pPIC9, pYD1, pYTK083 und pYX242 verwendet. Mithilfe des „MoClo-YTK Plasmid Kits“ wurden Plasmide aus unterschiedlichen „Parts“ hergestellt, welche wiederum in einzelnen Plasmiden (pYTK001-pYTK096) vorlagen und je nach Verwendung zur Klonierung durch „Golden Gate-Assembly“ eingesetzt wurden (Lee *et al.*, 2015).

**Tabelle 3:** In der Dissertation verwendete Plasmide mit Angaben zu deren Eigenschaften und Referenz. Die Sequenzen der Enzyme G6PDH, MDH und RjFDH wurden zur Expression in Hefe für *S. cerevisiae* kodonoptimiert. Zur Herstellung von Plasmiden aus unterschiedlichen „Parts“ wurde das „MoClo-YTK Plasmid Kit“ verwendet.

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
<b>pBG1805-ERO1</b>	Gateway-Expressionsvektor mit <i>ERO1</i> -ORF, Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i> -Marker, (His) <sub>6</sub> -Tag, HA-Epitop, 3C-Protease-Schnittstelle, Protein A Bindestelle (ZZ-Domäne), induzierbarem <i>GALI</i> -Promotor	Horizon
<b>pBG1805-KAR2</b>	Gateway-Expressionsvektor mit <i>KAR2</i> -ORF, Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i> -Marker, (His) <sub>6</sub> -Tag, HA-Epitop, 3C-Protease-Schnittstelle, Protein A Bindestelle (ZZ-Domäne), induzierbarem <i>GALI</i> -Promotor	Horizon
<b>pBG1805-PDI1</b>	Gateway-Expressionsvektor mit <i>PDI1</i> -ORF, Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i> -Marker, (His) <sub>6</sub> -Tag, HA-Epitop, 3C-Protease-Schnittstelle, Protein A Bindestelle (ZZ-Domäne), induzierbarem <i>GALI</i> -Promotor	Horizon
<b>pET24a(+)</b>	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor (5,3 kb), IPTG-induzierbarer T7-Promotor, Kan <sup>R</sup> , N-terminales T7- und C-terminales (His) <sub>6</sub> -Tag	Novagen
<b>pET24a(+)</b> EstA-Dock	pET24a(+) mit Fusionskonstrukt aus EstA aus <i>B. gladioli</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> , als <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I-Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pET24a(+)</b> EstA-Fc	pET24a(+) mit Fusionskonstrukt aus EstA aus <i>B. gladioli</i> und Fc-Domäne des humanen IgG1. Fc besteht aus hinge-, CH2- sowie CH3-Region und ist für <i>E. coli</i> kodonoptimiert, als <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I-Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pET24a(+)</b> G6PDH-Dock	pET24a(+) mit Fusionskonstrukt aus G6PDH aus <i>E. coli</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> , als <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I-Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pET24a(+)</b> G6PDH-Fc	pET24a(+) mit Fusionskonstrukt aus G6PDH aus <i>E. coli</i> und Fc-Domäne des humanen IgG1. Fc besteht aus hinge-, CH2- sowie CH3-Region und ist für <i>E. coli</i> kodonoptimiert, als <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I-Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pET24a(+)</b> MDH-Dock	pET24a(+) mit Fusionskonstrukt aus MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> , als <i>Eco</i> RI/ <i>Not</i> I-Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pET24a(+)</b> MDH-Fc	pET24a(+) mit Fusionskonstrukt aus MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Fc-Domäne des humanen IgG1. Fc besteht aus hinge-, CH2- sowie CH3-Region und ist für <i>E. coli</i> kodonoptimiert, als <i>Eco</i> RI/ <i>Not</i> I-Fragment kloniert	Diese Arbeit

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pET24a(+)</b> RjFDH-Dock	pET24a(+) mit Fusionskonstrukt aus RjFDH aus <i>R. jostii</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> , als <i>EcoRI/NotI</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pET24a(+)</b> RjFDH-Fc	pET24a(+) mit Fusionskonstrukt aus RjFDH aus <i>R. jostii</i> und Fc-Domäne des humanen IgG1. Fc besteht aus hinge-, CH2- sowie CH3-Region und ist für <i>E. coli</i> kodonoptimiert, als <i>EcoRI/NotI</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pET24a(+)</b> SDH-Dock	pET24a(+) mit Fusionskonstrukt aus SDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> , als <i>EcoRI/NotI</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pET24a(+)</b> SDH-Fc	pET24a(+) mit Fusionskonstrukt aus SDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Fc-Domäne des humanen IgG1. Fc besteht aus hinge-, CH2- sowie CH3-Region und ist für <i>E. coli</i> kodonoptimiert, als <i>EcoRI/NotI</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2</b>	Multi-copy Shuttle-Vektor für <i>S. cerevisiae</i> , konstitutiver <i>PGK1</i> -Promotor, Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i> -Marker enthält <i>KRE1</i> -SS und C-Terminus des CWP2-Ankers, basiert auf YEp352 bzw. pPGK (Kang <i>et al.</i> , 1990)	Breinig & Schmitt, 2002
<b>YEp352</b>	2 $\mu$ Hefe/ <i>E. coli</i> „shuttle“-Vektor (5,6 kb), konstitutiver <i>PGK1</i> -Promotor, Amp <sup>R</sup> und <i>URA3</i> -Marker; MCS aus pUC18	Hill <i>et al.</i> , 1986
<b>pFB2-EstA</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Esterase A aus <i>B. gladioli</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers	Breinig <i>et al.</i> , 2006
<b>pFB2-SDH</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Sorbitoldehydrogenase aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers	Rau, 2004
<b>pFB2-Avi-CWP2</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Avi-Tag und C-Terminus des CWP2-Ankers, als <i>XhoI/BglIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-EstA-Agg</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-Terminus des $\alpha$ -Agglutinin-Ankers ( <i>SAG1</i> ), als <i>XhoI/BglIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-EstA-Dock (kodonopt.)</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimierter Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i>	Diese Arbeit
<b>pFB2-EstA-Dock-V5</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-terminal V5-getaggtter Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i>	Diese Arbeit

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pFB2-EstA-Fc-IgG1</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und Fc-Domäne des humanen IgG1. Fc besteht aus hinge-, CH2- sowie CH3-Region und ist für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert, Fc als <i>HindIII/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-EstA-SED1</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-Terminus des SED1-Ankers, als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-G6PDH-Agg</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, G6PDH aus <i>E. coli</i> und C-Terminus des $\alpha$ -Agglutinin-Ankers ( <i>SAG1</i> ), als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-G6PDH-CWP2</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, G6PDH aus <i>E. coli</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers, als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-G6PDH-SED1</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, G6PDH aus <i>E. coli</i> und C-Terminus des SED1-Ankers, als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-Koh-CWP2</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Kohäsion-Domäne 1 aus <i>C. cellulovorans</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers, als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-MDH-Agg</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des $\alpha$ -Agglutinin-Ankers ( <i>SAG1</i> ), als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-MDH-CWP2</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers, als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-MDH-SED1</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des SED1-Ankers, als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-RjFDH-Agg</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, RjFDH aus <i>R. jostii</i> und C-Terminus des $\alpha$ -Agglutinin-Ankers ( <i>SAG1</i> ), als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-RjFDH-CWP2</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, RjFDH aus <i>R. jostii</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers, als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-RjFDH-SED1</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, RjFDH aus <i>R. jostii</i> und C-Terminus des SED1-Ankers, als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-SDH-Agg</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des $\alpha$ -Agglutinin-Ankers ( <i>SAG1</i> ), als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pFB2-SDH-SED1</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des SED1-Ankers, als <i>XhoI/BglIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-Strep-CWP2</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Streptavidin aus <i>Streptomyces avidinii</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers, als <i>XhoI/BglIII</i> -Fragment kloniert	Diese Arbeit
<b>pFB2-V5-Koh-CWP2</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, N-terminal V5-getaggtter Kohäsin-Domäne 1 aus <i>C. cellulovorans</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers	Diese Arbeit
<b>pFB2-yeGFP-Dock</b>	pFB2 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, yeGFP und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i>	Diese Arbeit
<b>pMS109</b>	<i>HAC1</i> -single-copy Centromer-Vektor, konstitutiver <i>PGK1</i> -Promotor, Amp <sup>R</sup> , <i>LEU2</i> -Marker	Valkonen <i>et al.</i> , 2003
<b>pPGK-6xHis/Xa/GST</b>	Episomaler <i>S. cerevisiae</i> -multi-copy-Expressionsvektor (7,0 kb), konstitutiver <i>PGK1</i> -Promotor und -Terminator, <i>URA3</i> -Marker; basiert auf YEp352 bzw. pPGK (Kang <i>et al.</i> , 1990)	Bernardy, 2006
<b>pPGK-Kre1-BirA</b>	pPGK mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS und Biotin Ligase A (BirA) aus <i>E. coli</i> , kloniert als <i>XhoI/BglIII</i> -Fragment in pPGK-6xHis/Xa/GST	Diese Arbeit
<b>pPIC9</b>	integrativer <i>P. pastoris</i> -Expressionsvektor (8,0 kb), Methanol-induzierbarer <i>AOX1</i> -Promotor und -Terminator, Amp <sup>R</sup> , <i>HIS4</i> -Marker, $\alpha$ -MF <sub>SS</sub>	Invitrogen
<b>pPIC9-EstA-CWP2</b>	pPIC9 mit Fusionskonstrukt aus EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers	Müller, 2008
<b>pPIC9-EstA-Agg</b>	pPIC9 mit Fusionskonstrukt aus EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-Terminus des $\alpha$ -Agglutinin-Ankers ( <i>SAG1</i> ) als <i>EcoRI/AvrII</i> -Fragment hinter $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> kloniert	Diese Arbeit
<b>pPIC9-EstA-Dock</b>	pPIC9 mit Fusionskonstrukt aus EstA aus <i>B. gladioli</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> als <i>EcoRI/AvrII</i> -Fragment hinter $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> kloniert	Diese Arbeit
<b>pPIC9-EstA-SED1</b>	pPIC9 mit Fusionskonstrukt aus EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-Terminus des SED1-Ankers als <i>EcoRI/AvrII</i> -Fragment hinter $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> kloniert	Diese Arbeit
<b>pPIC9-Koh-CWP2</b>	pPIC9 mit Fusionskonstrukt aus Kohäsin-Domäne 1 aus <i>Clostridium cellulovorans</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers als <i>EcoRI/AvrII</i> -Fragment hinter $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> kloniert	Diese Arbeit

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pPIC9-MDH-Agg</b>	pPIC9 mit Fusionskonstrukt aus MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des $\alpha$ -Agglutinin-Ankers ( <i>SAG1</i> ) als <i>EcoRI</i> / <i>AvrII</i> -Fragment hinter $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> kloniert	Diese Arbeit
<b>pPIC9-MDH-CWP2</b>	pPIC9 mit Fusionskonstrukt aus MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers als <i>EcoRI</i> / <i>AvrII</i> -Fragment hinter $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> kloniert	Diese Arbeit
<b>pPIC9-MDH-SED1</b>	pPIC9 mit Fusionskonstrukt aus MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des SED1-Ankers als <i>EcoRI</i> / <i>AvrII</i> -Fragment hinter $\alpha$ -MF <sub>SS</sub> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYD1</b>	<i>S. cerevisiae</i> -Expressions- und Displayvektor (5,0 kb), induzierbarer <i>GAL1</i> -Promotor, Amp <sup>R</sup> , <i>TRP1</i> -Marker, <i>AGA2</i> -Gen zur Fusion und zum Display von Zielproteinen auf Zelloberfläche von EBY100, Nachweis über Xpress <sup>TM</sup> -, V5- oder (His) <sub>6</sub> -Tag	Invitrogen
<b>pYD1-EstA-V5-Stopp</b>	pYD1 mit Fusionskonstrukt aus C-terminaler Fusion von <i>AGA2</i> und EstA aus <i>B. gladioli</i> mit C-terminalem V5-Tag, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYD1-Koh1-Koh2-ZZ (<i>Bam</i>HI/<i>Eco</i>RI)</b>	pYD1 mit Fusionskonstrukt aus C-terminaler Fusion von <i>AGA2</i> , den Kohäsin-Domänen 1 und 2 aus <i>C. cellulovorans</i> und doppelter Z-Domäne aus <i>S. aureus</i> mit Gly-Ser-Linker vor jeder Z-Domäne. Sequenz für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert; 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Eco</i> RI	Diese Arbeit
<b>pYD1-Koh1-Koh2-ZZ (<i>Bam</i>HI/<i>Eco</i>RI/Stopp/<i>Not</i>I)</b>	pYD1 mit Fusionskonstrukt aus C-terminaler Fusion von <i>AGA2</i> , den Kohäsin-Domänen 1 und 2 aus <i>C. cellulovorans</i> und doppelter Z-Domäne aus <i>S. aureus</i> mit Gly-Ser-Linker vor jeder Z-Domäne. Sequenz für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert; 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Eco</i> RI, Stopp, <i>Not</i> I	Diese Arbeit
<b>pYD1-MDH-V5-Stopp</b>	pYD1 mit Fusionskonstrukt aus C-terminaler Fusion von <i>AGA2</i> und MDH aus <i>R. sphaeroides</i> mit C-terminalem V5-Tag, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYD1-SDH-V5-Stopp</b>	pYD1 mit Fusionskonstrukt aus C-terminaler Fusion von <i>AGA2</i> und SDH aus <i>R. sphaeroides</i> mit C-terminalem V5-Tag, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pYES2.1/V5-His-TOPO®</b>	<i>S. cerevisiae</i> -Expressionsvektor (5,9 kb), induzierbarer <i>GALI</i> -Promotor, Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i> -Marker, C-terminaler V5- und (His) <sub>6</sub> -Tag, verwendet zur Sequenzierung	Invitrogen
<b>pYES2.1-Avi-CWP2</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Avi-Tag und C-Terminus des CWP2-Ankers mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Dockerin-Stopp (kodonopt.)</b>	pYES2.1 mit Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> . Sequenz für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert. Ohne Start- und mit Stopp-Kodon; 5' <i>HindIII/XbaI</i> , 3' <i>BamHI/BgIII</i>	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Dock-V5</b>	pYES2.1 mit C-terminal V5-getaggtter Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> . Ohne Start- und mit Stopp-Kodon; 5' <i>HindIII/XbaI</i> , 3' <i>BamHI/BgIII</i>	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-EstA-Agg</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-Terminus des $\alpha$ -Agglutinin-Ankers ( <i>SAG1</i> ) mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-EstA-Avi</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und Avi-Tag mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-EstA-Dock</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-EstA-Dock-V5</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-terminal V5-getaggtter Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> . Klonierung als <i>XhoI/BgIII</i> -Fragment in pFB2	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-EstA-SED1</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-Terminus des SED1-Ankers mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-EstA-V5-sekret.</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-terminalem V5-Tag. Mit Start- und Stopp-Kodon; 5' <i>XhoI</i> , 3' <i>BamHI</i> , <i>BgIII</i>	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Fc-IgG1</b>	pYES2.1 mit Fc-Domäne des humanen IgG1. Fc besteht aus hinge-, CH2- sowie CH3-Region und ist für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert, ohne Start- und mit Stopp-Kodon; 5' <i>HindIII/XbaI</i> , 3' <i>BamHI/BgIII</i>	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-G6PDH (5' <i>EcoRI</i>, 3' <i>HindIII/XbaI</i>)</b>	pYES2.1 mit G6PDH aus <i>E. coli</i> . 5' <i>EcoRI</i> und 3' <i>HindIII/XbaI</i> mittels PCR amplifiziert, ohne Start- und Stopp-Kodon	Diese Arbeit



Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pYES2.1-G6PDH (5' HindIII/XbaI, 3' BamHI/BgII)</b>	pYES2.1 mit G6PDH aus <i>E. coli</i> . 5' HindIII/XbaI und 3' BamHI/BgII mittels PCR amplifiziert, ohne Start- und mit Stopp-Kodon	Diese Arbeit
<b>pYES2.1 G6PDH-Dock (pET24a(+))</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus G6PDH aus <i>E. coli</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> , ohne Start- und mit Stopp-Kodon, zur Klonierung in pET24a(+)	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Koh-CWP2</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Kohäsin-Domäne 1 aus <i>C. cellulovorans</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers mit C-terminaler AvrII-Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Koh1-Koh2-ZZ</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus den Kohäsin-Domänen 1 und 2 aus <i>C. cellulovorans</i> und doppelter Z-Domäne aus <i>S. aureus</i> mit Gly-Ser-Linker vor jeder Z-Domäne. Sequenz für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert; 5' NheI, BamHI, 3' EcoRI, Stopp, NotI	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Kre1-BirA</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS und Biotin Ligase A (BirA) aus <i>E. coli</i> mit C-terminaler AvrII-Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-MDH (5' EcoRI, 3' HindIII/XbaI)</b>	pYES2.1 mit MDH aus <i>R. sphaeroides</i> . Sequenz für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert. 5' EcoRI und 3' HindIII/XbaI mittels PCR amplifiziert, ohne Start- und Stopp-Kodon	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-MDH (5' HindIII/XbaI, 3' BamHI/BgII)</b>	pYES2.1 mit MDH aus <i>R. sphaeroides</i> . Sequenz für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert. 5' HindIII/XbaI und 3' BamHI/BgII mittels PCR amplifiziert, ohne Start- und mit Stopp-Kodon	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-MDH-Avi</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Avi-Tag mit C-terminaler AvrII-Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-MDH-Dock</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> mit C-terminaler AvrII-Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-RjFDH (5' EcoRI, 3' HindIII/XbaI)</b>	pYES2.1 mit RjFDH aus <i>R. jostii</i> . Sequenz für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert. 5' EcoRI und 3' HindIII/XbaI mittels PCR amplifiziert, ohne Start- und Stopp-Kodon	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-RjFDH (5' HindIII/XbaI, 3' BamHI/BgII)</b>	pYES2.1 mit RjFDH aus <i>R. jostii</i> . Sequenz für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert. 5' HindIII/XbaI und 3' BamHI/BgII mittels PCR amplifiziert, ohne Start- und mit Stopp-Kodon	Diese Arbeit

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pYES2.1-SDH (5' <i>EcoRI</i>, 3' <i>HindIII/XbaI</i>)</b>	pYES2.1 mit SDH aus <i>R. sphaeroides</i> , 5' <i>EcoRI</i> und 3' <i>HindIII/XbaI</i> mittels PCR amplifiziert, ohne Start- und Stopp-Kodon	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-SDH (5' <i>HindIII/XbaI</i>, 3' <i>BamHI/BgII</i>)</b>	pYES2.1 mit SDH aus <i>R. sphaeroides</i> , 5' <i>HindIII/XbaI</i> und 3' <i>BamHI/BgII</i> mittels PCR amplifiziert, ohne Start- und mit Stopp-Kodon	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-SDH-Avi</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Avi-Tag mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-SDH-Dock</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Strep-CWP2</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Streptavidin aus <i>S. avidinii</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Strep-EstA</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Streptavidin aus <i>S. avidinii</i> und EstA aus <i>B. gladioli</i> mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Strep-G6PDH</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Streptavidin aus <i>S. avidinii</i> und G6PDH aus <i>E. coli</i> mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Strep-MDH</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Streptavidin aus <i>S. avidinii</i> und MDH aus <i>R. sphaeroides</i> mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Strep-RjFDH</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Streptavidin aus <i>S. avidinii</i> und RjFDH aus <i>R. jostii</i> mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-Strep-SDH</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Streptavidin aus <i>S. avidinii</i> und SDH aus <i>R. sphaeroides</i> mit C-terminaler <i>AvrII</i> -Schnittstelle zur Klonierung in pPIC9	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-V5-Koh</b>	pYES2.1 mit N-terminal V5-getaggtter Kohäsin-Domäne 1 aus <i>C. cellulovorans</i> . Ohne Start- und Stopp-Kodon; 5' <i>EcoRI</i> ; 3' <i>HindIII/XbaI</i>	Diese Arbeit
<b>pYES2.1-V5-Koh-CWP2</b>	pYES2.1 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, N-terminal V5-getaggtter Kohäsin-Domäne 1 aus <i>C. cellulovorans</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers; 5' <i>XhoI</i> ; 3' <i>BamHI/BgII</i>	Diese Arbeit

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pYES2.1-yeGFP</b>	pYES2.1 mit yeGFP-Sequenz zu Klonierung in pFB2- und pYX242-Dock-Konstrukte. Ohne Start- und Stopp-Kodon; 5' <i>EcoRI</i> ; 3' <i>HindIII/XbaI</i>	Diese Arbeit
<b>pYTK</b>	pYTK-Vektorreihe des „MoClo-Yeast Toolkits“ von Addgene (Addgene Kit #1000000061); Kit umfasst 96 pYTK-Vektoren mit unterschiedlichen „Parts“ zur Generierung von Plasmiden zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK001</b>	„Part plasmid entry vector“ zur Klonierung neuer „Parts“ mit GFP-Expressionsdropout und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsmBI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK002</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 1 „ConLS“ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK009</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pTDH3</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK010</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pCCW12</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK011</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pPGK1</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK012</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pHMF2</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK013</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pTEF1</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK014</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pTEF2</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK015</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pHMF1</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK016</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pHTB2</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK017</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pRPL18B</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pYTK018</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pALD6</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK019</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pPAB1</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK020</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pRET2</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK021</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pRNR1</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK022</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pSAC6</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK023</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pRNR2</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK024</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pPOP6</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK025</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pRAD27</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK026</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pPSP2</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK027</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 2 „ <i>pREVI</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK056</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 4 „ <i>tTDH1</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK067</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 5 „ <i>ConR1</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK075</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 6 „ <i>LEU2</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK082</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 7 „ <i>2micron</i> “ für Assembly in „Part Plasmid“ und $\text{Chl}^{\text{R}}$ zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pYTK083</b>	pYTK-Vektor mit Part-Typ 8 „AmpR-ColE1“ für Assembly in „Part Plasmid“, mRFP1-Expressionsdropout und Amp <sup>R</sup> zur Selektion; „Golden Gate-Assembly“ über <i>BsaI</i>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<b>pYTK001-EstA-CWP2</b>	pYTK001 mit durch „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsmBI</i> inseriertem EstA-CWP2-Fusionskonstrukt, bestehend aus <i>KRE1</i> -SS, Esterase A aus <i>B. gladioli</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers; Sequenz ist für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pALD6-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pALD6“ (pYTK018), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pCCW12-EstA-CWP2-tADH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pCCW12“ (pYTK010), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tADH1“ (pYTK053), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pCCW12-EstA-CWP2-tENO1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pCCW12“ (pYTK010), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tENO1“ (pYTK051), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pCCW12-EstA-CWP2-tENO2</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pCCW12“ (pYTK010), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tENO2“ (pYTK055), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pCCW12-EstA-CWP2-tPGK1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pCCW12“ (pYTK010), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tPGK1“ (pYTK054), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pCCW12-EstA-CWP2-tSSA1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pCCW12“ (pYTK010), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tSSA1“ (pYTK052), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pYTK-pCCW12-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pCCW12“ (pYTK010), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pHHF1-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pHHF1“ (pYTK015), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pHHF2-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pHHF2“ (pYTK012), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pHTB2-EstA-CWP2-tADH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pHTB2“ (pYTK016), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tADH1“ (pYTK053), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pHTB2-EstA-CWP2-tENO1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pHTB2“ (pYTK016), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tENO1“ (pYTK051), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pHTB2-EstA-CWP2-tENO2</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pHTB2“ (pYTK016), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tENO2“ (pYTK055), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pHTB2-EstA-CWP2-tPGK1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pHTB2“ (pYTK016), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tPGK1“ (pYTK054), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pHTB2-EstA-CWP2-tSSA1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pHTB2“ (pYTK016), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tSSA1“ (pYTK052), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pYTK-pHTB2-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pHTB2“ (pYTK016), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pPAB1-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pPAB1“ (pYTK019), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pPGK1-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pPGK1“ (pYTK011), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pPOP6-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pPOP6“ (pYTK024), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pPSP2-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pPSP2“ (pYTK026), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pRAD27-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pRAD27“ (pYTK025), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pRET2-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pRET2“ (pYTK020), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pREV1-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pREV1“ (pYTK027), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pYTK-pRNR1-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pRNR1“ (pYTK021), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pRNR2-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pRNR2“ (pYTK023), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pRPL18B-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pRPL18B“ (pYTK017), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pSAC6-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pSAC6“ (pYTK022), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pTDH3-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pTDH3“ (pYTK009), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pTEF1-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pTEF1“ (pYTK013), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit
<b>pYTK-pTEF2-EstA-CWP2-tTDH1</b>	pYTK083-Grundvektor mit „AmpR-ColE1“, „ConLS“ (pYTK002), „pTEF2“ (pYTK014), „EstA-CWP2“ (pYTK001-EstA-CWP2), „tTDH1“ (pYTK056), „ConR1“ (pYTK067), „LEU2“ (pYTK075) und „2micron“ (pYTK082); über „Golden Gate-Assembly“ mit <i>BsaI</i> kloniert	Diese Arbeit



Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pYX242</b>	Hefe-Expressionsvektor (9,5 kb), konstitutiver <i>TPI</i> -Promotor, Amp <sup>R</sup> , <i>LEU2</i> -Marker	Novagen
<b>pYX242-EstA-Avi</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und Avi-Tag, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-EstA-CWP2</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-EstA-Dock</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> , über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-EstA-Dock (kodonopt.)</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimierter Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> , über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-EstA-Fc-IgG1</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und Fc-Domäne des humanen IgG1. Fc besteht aus hinge-, CH2- sowie CH3-Region und ist für <i>S. cerevisiae</i> kodonoptimiert, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-EstA-GS-CWP2</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> , GS-Linker und C-Terminus des CWP2-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-EstA-GS-SED1</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> , GS-Linker und C-Terminus des SED1-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-EstA-L2-CWP2</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> , L2-Linker und C-Terminus des CWP2-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-EstA-L2-SED1</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> , L2-Linker und C-Terminus des SED1-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-EstA-SED1</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, EstA aus <i>B. gladioli</i> und C-Terminus des SED1-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-Kre1-BirA</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS und Biotin Ligase A (BirA) aus <i>E. coli</i> , über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-MDH-Avi</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Avi-Tag, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit

Tabelle 3: Fortsetzung

<b>pYX242-MDH-CWP2</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-MDH-Dock</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> , über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-MDH-GS-CWP2</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> , GS-Linker und C-Terminus des CWP2-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-MDH-GS-SED1</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> , GS-Linker und C-Terminus des SED1-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-MDH-L2-CWP2</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> , L2-Linker und C-Terminus des CWP2-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-MDH-L2-SED1</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> , L2-Linker und C-Terminus des SED1-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-MDH-SED1</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, MDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des SED1-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-SDH-Avi</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Avi-Tag, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-SDH-CWP2</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des CWP2-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-SDH-Dock</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> und Dockerin Typ 1-Domäne aus <i>C. cellulovorans</i> , über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-SDH-GS-CWP2</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> , GS-Linker und C-Terminus des CWP2-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-SDH-GS-SED1</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> , GS-Linker und C-Terminus des SED1-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-SDH-L2-CWP2</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> , L2-Linker und C-Terminus des CWP2-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-SDH-L2-SED1</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> , L2-Linker und C-Terminus des SED1-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit

**Tabelle 3:** Fortsetzung

<b>pYX242-SDH-SED1</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, SDH aus <i>R. sphaeroides</i> und C-Terminus des SED1-Ankers, über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-Strep-EstA</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Streptavidin aus <i>S. avidinii</i> und EstA aus <i>B. gladioli</i> , über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-Strep-MDH</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Streptavidin aus <i>S. avidinii</i> und MDH aus <i>R. sphaeroides</i> , über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit
<b>pYX242-Strep-SDH</b>	pYX242 mit Fusionskonstrukt aus <i>KRE1</i> -SS, Streptavidin aus <i>S. avidinii</i> und SDH aus <i>R. sphaeroides</i> , über In-Fusion-Cloning kloniert	Diese Arbeit

### 2.3 Oligonukleotide

In Tab. 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer mit Angaben zu Sequenz, Eigenschaften und Verwendung dargestellt. Die Primer wurden mithilfe des Programms PrimerSelect der Firma DNASTar entworfen und von Sigma-Aldrich synthetisiert.

**Tabelle 4: Auflistung der in der Dissertation verwendeten Primer.** Die jeweiligen *Restriktionsschnittstellen* sind kursiv dargestellt. Start- und Stopp-Kodons sind unterstrichen. Die zum pYD1- oder pYX242-Vektor komplementären Enden der In-Fusion-Primer sind **fett** markiert. Mittels PCR angefügte **V5-Tags** sind unterstrichen und fett markiert. Die durch SOE-PCR angefügten Linkersequenzen sind in grün (GS-) und hellblau (L2-Linker) dargestellt.

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz
<b>PCR</b>	
5'-EcoRI-yeGFP	<i>EcoRI</i> GAA TTC TCT AAA GGT GAA GAA TTA TTC ACT GGT G
3'-XbaI/HindIII-yeGFP	<i>XbaI</i> <i>HindIII</i> TCT AGA AAG CTT TTT GTA CAA TTC ATC CAT ACC AT
5'-Dock-V5	<i>HindIII</i> <i>XbaI</i> AAG CTT TCT AGA AAA ATC ACA TAT GGA GAT
3'-Dock-V5	<i>BglII</i> <i>BamHI</i> AGA TCT GGA TCC TTA <b><u>AGT ACT ATC AAG ACC TAG TAG TGG</u></b> <b><u>ATT TGG AAT TGG TTT ACC</u></b> TGA TGG GAA AAT TGA TAA ATT ACC AAG TAG G
3'-EstA-V5	<i>BglII</i> <i>BamHI</i> AGA TCT GGA TCC TTA AGT ACT ATC AAG ACC TAG TAG TGG ATT TGG AAT TGG TTT ACC CTT GGT GAC GCC GGC CGC CGC GAT CTG CTG
5'-G6PDH (5'-HindIII/XbaI)	<i>HindIII</i> <i>XbaI</i> AAG CTT TCT AGA GCT GTT ACT CAA ACT GCT CAA
3'-G6PDH (3'-BglII/BamHI)	<i>BglII</i> <i>BamHI</i> AGA TCT GGA TCC TTA TTC GAA CTC ATT CCA GGA TCT ACC AT
5'-MDH (5'-HindIII/XbaI)	<i>HindIII</i> <i>XbaI</i> AAG CTT TCT AGA ACC CGC TCC GTC ACC CGT CCC
3'-MDH (3'-BglII/BamHI)	<i>BglII</i> <i>BamHI</i> AGA TCT GGA TCC TTA GGC CGC GAG GAA GCG CCG CAG CAC
5'-RjFDH (5'-HindIII/XbaI)	<i>HindIII</i> <i>XbaI</i> AAG CTT TCT AGA GCC AAG ATT TTG TGC GTC TTG TAC G
3'-RjFDH (3'-BglII/BamHI)	<i>BglII</i> <i>BamHI</i> AGA TCT GGA TCC TTA GCC CTT TTT AAA CTT AGC AGC TTC TTC AG
5'-SDH (5'-EcoRI)	<i>EcoRI</i> GAA TTC CGG CTC GAC GGC AAG ACC
3'-SDH (3'-XbaI/HindIII)	<i>XbaI</i> <i>HindIII</i> TCT AGA AAG CTT GCT CAT CCA GTT GCC GCC GTC CAC GTT GTA GGT C

**Tabelle 4:** Fortsetzung

5'-SDH (5'- <i>HindIII/XbaI</i> )	<i>HindIII XbaI</i> AAG CTT TCT AGA CGG CTC GAC GGC AAG ACC GCC CTC ATC AC
3'-SDH (3'- <i>BglII/BamHI</i> )	<i>BglII BamHI</i> AGA TCT GGA TCC <u>TCA</u> GCT CAT CCA GTT GCC GCC GTC CAC GTT GTA GGT C
5'-V5-Koh	<i>EcoRI</i> GAA TTC <b><u>GGT AAA CCA ATT CCA AAT CCA CTA CTA GGT CTT</u></b> <b><u>GAT AGT ACT</u></b> GTA ACA GCT ACA ATT GGA AAA GTA CAA GTA AAT G
3'-V5-Koh	<i>HindIII XbaI</i> AAG CTT TCT AGA GAT AGT TAC TGT TCC TGG G
<b>pPIC9-Klonierung</b>	
5'-Kre1SS- <i>AvrII</i>	<i>XhoI</i> CTC GAG <u>ATG</u> CGT CGC ACG CTA TTA
3'-Agg- <i>AvrII</i>	<i>AvrII BglII BamHI</i> CCT AGG AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> GAA TAG CAG GTA CGA CAA A
3'-Avi- <i>AvrII</i>	<i>AvrII BglII BamHI</i> CCT AGG AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> CTC GTG C
3'-CWP2- <i>AvrII</i>	<i>AvrII BglII BamHI</i> CCT AGG AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> TAA CAA CAT AGC GGC
3'-Dock- <i>AvrII</i>	<i>AvrII BglII BamHI</i> CCT AGG AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> TGA TGG G
3'-Kre1-BirA- <i>AvrII</i>	<i>AvrII BglII BamHI HindIII</i> CCT AGG AGA TCT GGA TCC AAG CTT <u>TTA</u> TTT
3'-SED1- <i>AvrII</i>	<i>AvrII BglII BamHI</i> CCT AGG AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> TAA GAA TAA CAT AGC AAC A
3'-Strep-EstA- <i>AvrII</i>	<i>AvrII BglII BamHI</i> CCT AGG AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> CTT GGT GAC
<b>In-Fusion® HD Cloning in pYD1</b>	
5'-pYD1-EstA	<i>EcoRI</i> <b>cagtggtg</b> GAA TTC <u>ATG</u> GTC CAG CTC CAT ATG G
5'-pYD1-MDH	<i>EcoRI</i> <b>cagtggtg</b> GAA TTC <u>ATG</u> ACC AGA TCA GTT ACC AGA CC
5'-pYD1-SDH	<i>EcoRI</i> <b>cagtggtg</b> GAA TTC <u>ATG</u> CGG CTC GAC GGC AAG ACC
3'-EstA-V5-Stopp-pYD1	<b>gatatctgcagaatt TTA <u>AGT ACT ATC AAG ACC TAG TAG TGG ATT</u></b> <b><u>TGG AAT TGG TTT ACC</u></b> GAG CTC GCT GCT TCT AGA GC

Tabelle 4: Fortsetzung

3'-MDH-V5-Stopp-pYD1	<b>gatatctgcagaatt TTA <u>AGT ACT ATC AAG ACC TAG TAG TGG ATT</u> <u>TGG AAT TGG TTT ACC</u> GAG CTC GCT GCT TCT AGA AA</b>
3'-SDH-V5-Stopp-pYD1	<b>gatatctgcagaatt TTA <u>AGT ACT ATC AAG ACC TAG TAG TGG ATT</u> <u>TGG AAT TGG TTT ACC</u> TCT AGA AAG CTT GCT CAT CCA GT</b>
<b>In-Fusion® HD Cloning in pYX242</b>	
5'-Kre1-SS	<i>XhoI</i> <b>cttaecgctgacc CTC GAG <u>ATG</u> CGT CGC ACG</b>
5'-pYX-Kre1SS	<i>XhoI</i> <b>cttaecgctgacc CTC GAG <u>ATG ATG</u> CGT CGC ACG</b>
5'-Kre1-BirA	<i>XhoI EcoRI SacI</i> <b>cttaecgctgacc CTC GAG GAA TTC GAG CTC GT</b>
3'-CWP-pYX	<i>BglII</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT <u>TTA</u> TAA CAA CAT AGC GGC A</b>
3'-EstA-Avi	<i>BglII BamHI</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> CTC GTG CC</b>
3'-EstA-Dock	<i>BglII BamHI</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> TGA TGG GA</b>
3'-EstA-Dock (kodonopt.)	<i>BglII BamHI</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> AGA TGG GAA G</b>
3'-EstA-Fc-IgG1-pYX	<i>BglII BamHI</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT GGA TCC <u>TCA</u> CTT ACC TGG G</b>
3'-Kre1-BirA	<i>BglII BamHI HindIII</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT GGA TCC AAG CTT <u>TTA</u> TTT T</b>
3'-SED-pYX	<i>BglII BamHI</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> TAA GAA TAA C</b>
3'-Strep-EstA	<i>BglII BamHI</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> CTT GGT GAC G</b>
3'-Strep-G6PDH	<i>BglII BamHI</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> TTC GAA CTC A</b>
3'-Strep-MDH	<i>BglII BamHI</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> GGC AGC</b>
3'-Strep-RjFDH	<i>BglII BamHI</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> GCC CTT</b>
3'-Strep-SDH	<i>BglII BamHI</i> <b>atcatacggatacc AGA TCT GGA TCC <u>TTA</u> GCT CAT CC</b>

Tabelle 4: Fortsetzung

SOE-PCR der Linker-Konstrukte	
5'-SOE-GS-CWP	GCT AGT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT TCC GCT GCC GCC ATT TCT
5'-SOE-L2-CWP	GAA GGT AAG AGT TCT GGT TCA GGT TCT GAA TCT AAG TCT ACC TCC GCT GCC GCC ATT TCT
5'-SOE-L2-SED	GAA GGT AAG AGT TCT GGT TCA GGT TCT GAA TCT AAG TCT ACC GCT CTT CCA ACT AAC GGT AC
5'-SOE-GS-SED	GCT AGT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GCT CTT CCA ACT AAC GGT AC
3'-SOE-EstA-GS	AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC ACT AGC GAG CTC GCT GCT TCT AGA GC
3'-SOE-MDH-GS	AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC ACT AGC TCT AGA AAG CTT GGC AGC T
3'-SOE-SDH-GS	AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC ACT AGC GAG CTC GCT GCT TCT AGA GC
3'-SOE-EstA-L2	GGT AGA CTT AGA TTC AGA ACC TGA ACC AGA ACT CTT ACC TTC GAG CTC GCT GCT TCT AGA GC
3'-SOE-MDH-L2	GGT AGA CTT AGA TTC AGA ACC TGA ACC AGA ACT CTT ACC TTC TCT AGA AAG CTT GGC AGC T
3'-SOE-SDH-L2	GGT AGA CTT AGA TTC AGA ACC TGA ACC AGA ACT CTT ACC TTC GAG CTC GCT GCT TCT AGA GC
pET24a(+)-Klonierung	
5' EstA-pET24a(+)	<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI <i>Sac</i> I GGA TCC GAA TTC GAG CTC <u>ATG</u> GTC CAG C
3' EstA-pET24a(+)	<i>Xho</i> I <i>Hind</i> III CTC GAG AAG CTT <u>TTA</u> CTT GGT GAC GCC GGC CGC CGC GAT CTG CTG CTC

---

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Anzucht elektrokompetenter *E. coli*

Zur Anzucht elektrokompetenter *E. coli* der Stämme Top10 und BL21 (DE3) wurde LB-Medium mit einer Übernachtskultur (1 %) angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7-0,9 im Schüttler bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Die Kultur wurde nach Erreichen der gewünschten OD<sub>600</sub> in Falcons aufgeteilt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 8.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Pellet zweimal mit gekühltem, sterilem Glycerin (10 %) gewaschen und im Rückfluss aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 8.000 rpm und 4 °C wurde das Pellet im gleichen Volumen sterilem Glycerin resuspendiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden in Aliquots (à 40 µl) bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.4.2 Elektroporation von *E. coli*

Eine zur Transformation von *E. coli* eingesetzte Methode ist die Elektroporation, mit welcher Plasmid-DNA in elektrokompetente Bakterienzellen transferiert werden kann. Die Aufnahme der DNA ins Zellinnere wird durch transiente Poren in den Zellmembranen der Bakterien ermöglicht, welche durch das Anlegen eines elektrischen Feldes generiert werden (Calvin & Hanawalt, 1988; Dower *et al.*, 1988).

Zur Transformation von DNA in Bakterien wurde ein Aliquot der elektrokompetenten *E. coli* mit der jeweiligen DNA gemischt und anschließend in Elektroporationsküvetten (Bio-Rad) überführt. Für die Transformation von Ligationsansätzen wurde diese zuvor 1 h gegen 10 % Glycerin dialysiert. Der elektrische Impuls wurde im „GenePulser Xcell<sup>TM</sup>“ (Bio-Rad) unter folgenden Einstellungen angelegt: Widerstand 200 Ω, Elektrische Feldstärke 2,5 kV/cm, Elektrische Kapazität 25 µF. Im Anschluss wurden 500 µl SOC-Medium zur Stabilisation der Bakterienzellen zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden danach auf LB-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.



SOC-Medium

Pepton	2,0	%
Hefeextrakt	0,5	%
NaCl	10,0	mM
Glukose	20,0	mM
KCl	10,0	mM
MgCl <sub>2</sub>	10,0	mM
MgSO <sub>4</sub>	2,5	mM

Das Medium wurde autoklaviert.

**2.4.3 DNA-Klonierung****2.4.3.1 Anfügen von A-Überhängen**

Eine Methode zur Klonierung von PCR-Produkten in Vektoren basiert auf den Eigenschaften der Taq-Polymerase, die an die 3'-Enden von doppelsträngigen PCR-Produkten Desoxyadenosin-Überhänge anfügt, wodurch eine schnelle und effiziente Klonierung in mit Thymidin-Überhängen modifizierten Vektoren erreicht werden kann (Clark, 1988; Holton & Graham, 1991).

Zur Addition von Adenin-Überhängen an cDNA-Strings (GeneArt) wurden die Ansätze für 15 min bei 72 °C im PCR-Cycler (MasterCycler Nexus, Eppendorf) inkubiert. Im Anschluss wurden 10 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 v/v), 2 µl 3 M Natriumacetat und 40 µl 99 % Ethanol zur DNA-Fällung zugegeben und es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur 5 min getrocknet. Die DNA wurde in 10 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert und konnte für das „TOPO-Cloning“ eingesetzt werden.

Zusammensetzung eines Ansatzes

cDNA-String (Geneart)	8,0	µl
Polymerasepuffer	1,0	µl
Taq-Polymerase	1,0	µl
dATP	0,1	µl

### 2.4.3.2 „TOPO TA-Cloning“

Das „TOPO TA-Cloning“ beruht auf den Eigenschaften der Topoisomerase I des Vaccinia Virus, welche DNA an der Konsensus-Sequenz (C/T)CCTT schneiden und eine kovalente 3'-Phosphotyrosyl-Bindung mit DNA-Strängen ausbilden kann. Die Topoisomerase I ist hierbei an einen linearisierten und an den Enden mit Thymidin-Überhängen versehenen Vektor gekoppelt, wodurch eine effiziente Ligation von mit Adenin-Überhängen modifizierten PCR-Produkten ermöglicht wird (Cheng & Shuman, 2000; Shuman, 1994).

Für das „TOPO TA-Cloning“ wurde das „pYES2.1 TOPO™ TA Yeast Expression Kit“ von Thermo Fisher Scientific anhand des vom Hersteller vorgegebenen Protokolls verwendet. Hierbei wurden die mit Adenin-Überhängen versehenen DNA-Fragmente in den linearisierten pYES2.1/V5-His-TOPO®-Vektor inseriert und in TOP 10 F' One Shot®-Zellen transformiert. Die anschließende Selektion erfolgte auf LB<sub>Amp</sub>-Platten. Zur Kontrolle der korrekten Insertion des Inserts wurde die Plasmid-DNA bestimmter Klone mittels MiniPrep isoliert, in einem Restriktionsverdau anhand der im pYES2.1/V5-His-TOPO®-Vektor vorhandenen Schnittstelle für *Eco91I* (*BstEII*) sowie einer für das jeweilige Insert geeigneten Schnittstelle verdaut und mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese untersucht. Außerdem wurde die DNA-Sequenz von Klonen mit korrekter Insertgröße durch Sequenzierung (Eurofins Genomics) auf Mutationen überprüft.

#### Zusammensetzung eines Ansatzes

PCR-Produkt	4	µl
Salzlösung	1	µl
pYES2.1/V5-His-TOPO®	1	µl

### 2.4.3.3 Ligation

DNA-Ligasen gehören zu einer Enzymklasse, die Phosphodiesterbrücken zwischen den 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen der DNA ausbilden können. Aufgrund dieser Eigenschaft werden DNA-Ligasen in der Molekularbiologie zur Klonierung von rekombinanten DNA-Molekülen *in vitro* eingesetzt (Armstrong *et al.*, 1983; Engler & Richardson, 1982; Lehman, 1974).

Mithilfe eines präparativen Restriktionsverdaus über 3 h bei 37 °C wurden das Insert-tragende Plasmid und der Zielvektor für die Ligation geschnitten. Im Folgenden wurden die Ansätze mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA mit korrekter Größe aus dem Gel reisoliert. Die Ligation wurde hierbei bei 16 °C über Nacht durchgeführt. Nach der jeweiligen

Inkubation wurden die Ansätze 1 h gegen 10 % Glycerin dialysiert und über Elektroporation in die entsprechenden *E. coli*-Stämme transformiert.

#### Zusammensetzung eines Ligationsansatzes

DNA (Insert + Vektor)	17	µl
10 x Ligationspuffer	2	µl
T4 DNA-Ligase	1	µl
ad. 20 µl mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		

#### **2.4.3.4 „In-Fusion® HD Cloning“**

Zur Ligation wurde das sogenannte „In-Fusion® HD Cloning“ als zusätzliche Methode eingesetzt. Diese Art der Klonierung basiert darauf, dass das zu klonierende Insert in einer PCR mit 15 bp-langen Überhängen versehen wird, die komplementär zum Zielvektor sind. Die Ligation mit dem zuvor linearisierten Vektor erfolgt hierbei durch das im „In-Fusion® HD Cloning Kit“ der Firma Takara Bio USA enthaltene In-Fusion-Enzym, wonach die Ansätze mittels Elektroporation in Bakterien transformiert werden können (Zhu *et al.*, 2007). Das Kit wurde nach Herstellerangaben genutzt. Als Vektor wurden der pYX242- und pYD1-Vektor genutzt, welche mittels *Sma*I (pYX242) bzw. *Eco*RI (pYD1) linearisiert wurden, was zur Erzeugung von „blunt ends“ führte. Die zur PCR eingesetzten spezifischen Primer sind in Tab. 4 aufgeführt und es wurden als Annealing-Temperaturen 63 °C (pYX242) bzw. 57 °C (pYD1) genutzt.

#### **2.4.3.5 „Modular Cloning“ mittels „MoClo-YTK Plasmid Kit“**

Zur Herstellung von Expressionsplasmiden für *S. cerevisiae* mittels „Modular Cloning“ („MoClo“) wurde das „MoClo-YTK Plasmid Kit“ (Addgene Kit #1000000061) verwendet. Dieses Kit umfasst 96 unterschiedliche Vektorkomponenten, die als sogenannte „Parts“ bezeichnet werden und neben diversen Promotoren und Terminatoren auch Replikationsursprünge und Selektionsmarker für Hefen und Bakterien zur gerichteten Klonierung beinhalten. Diese Art der Klonierung beruht auf den Eigenschaften von Typ II-Restriktionsenzymen (hier: *Bsm*BI und *Bsa*I), die DNA außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden und einzigartige, kohäsive Enden erzeugen. Diese erlauben durch das entsprechende Design der Überhänge der einzelnen „Part-Typen“ eine gerichtete Assemblierung zu vollständigen Vektoren, was über mehrere Zyklen an Verdau- und Ligationsreaktionen mit einer T7-DNA-

Ligase im sogenannten „Golden Gate-Assembly“ erreicht wird (Engler *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2011). Mithilfe des Kits werden in einem ersten Schritt DNA-Fragmente, die mittels PCR amplifiziert oder künstlich synthetisiert wurden, über eine „Golden Gate-Assembly“-Reaktion mit *BsmBI* in den sogenannten „entry vector“ pYTK001 kloniert. Zur Generierung von „Kassetten-Plasmiden“, welche komplette transkriptionelle Einheiten mit einer kodierenden Sequenz darstellen, werden in einer weiteren Assembly-Reaktion mit *BsaI* jeweils ein „Part-Plasmid“ jedes „Part-Typs“ eingesetzt, die anhand ihrer spezifischen Überhänge in gerichteter Abfolge zu einem vollständigen Plasmid zusammengefügt werden und untereinander komplett austauschbar sind. In einer weiteren *BsmBI*-Reaktion können dann auch mehrere „Kassetten-Plasmide“ zur gleichzeitigen Expression mehrerer Gene in einem „Multigen-Plasmid“ vereinigt werden (Lee *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2011).

Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet, wobei die Parameter der „Golden Gate-Assembly“-Reaktionen nach einem Protokoll von Mark Lommel (AG Römisch) modifiziert wurden.

Zusammensetzung eines Ansatzes des *BsmBI*-Assemblys:

T4-Ligasepuffer	2	μl
T7-Ligase	1	μl
<i>BsmBI</i>	1	μl
pYTK001 „entry vector“	1	μl
DNA-String/PCR-Produkt	1	μl
ad. 20 μl mit H <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>		

Der „Golden Gate-Assembly“ mit *BsmBI* erfolgte im Thermocycler „Mastercycler Nexus“ (Eppendorf) nach folgendem Programm:

42 °C	5	min	} 25 Zyklen
16 °C	5	min	
55 °C	10	min	
80 °C	10	min	
10 °C	∞	min	

Zugabe 1 µl *BsmBI*

55 °C	60	min
80 °C	10	min
10 °C	∞	min

Zusammensetzung eines Ansatzes des *BsaI*-Assemblys:

T4-Ligasepuffer	2	µl
T7-Ligase	2	µl
<i>BsaI</i>	2	µl
pYTK (Part 1)	1	µl
pYTK (Part 2)	1	µl
Part-Vektor aus <i>BsmBI</i> -Assembly	1	µl
pYTK (Part 4)	1	µl
pYTK (Part 5)	1	µl
pYTK (Part 6)	1	µl
pYTK (Part 7)	1	µl
pYTK083 (Part 8)	1	µl
ad. 20 µl mit H <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>		

Der „Golden Gate-Assembly“ mit *BsaI* erfolgte im Thermocycler „Mastercycler Nexus“ (Eppendorf) nach folgendem Programm:

37 °C	5	min	} 25 Zyklen
16 °C	5	min	
37 °C	10	min	
80 °C	10	min	
10 °C	∞	min	

Zugabe 1 µl *BsaI*

37 °C	60	min
80 °C	10	min
10 °C	∞	min

Anschließend wurden die Reaktionsansätze 1 h gegen 10 % Glycerin dialysiert und mittels Elektroporation in *E. coli* transformiert. Die Selektion der Klone erfolgte hierbei anhand des GFP- (*BsmBI*-Assembly) oder mRFP1-Dropouts (*BsaI*-Assembly), wobei die Klone, die keine Fluoreszenz zeigten, im Anschluss mittels Restriktionsverdau auf das Vorhandensein des korrekten Inserts überprüft wurden.

## 2.4.4 DNA-Isolation aus Bakterien

### 2.4.4.1 Alkalische Lyse

Eine zur DNA-Isolation aus Bakterien eingesetzte Methode ist die alkalische Lyse, die im Jahre 1979 zum ersten Mal von Birnboim und Doly beschrieben wurde. Bei diesem Verfahren wird Plasmid-DNA durch eine selektive, alkalische Denaturierung der chromosomalen DNA separiert und bleibt in seiner doppelsträngigen, zirkulären Form erhalten (Birnboim & Doly, 1979).

---

GTE-Puffer

Glukose	50	mM
Tris	25	mM
EDTA	10	mM

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8 eingestellt und autoklaviert.

NaOH/SDS-Lösung

Natriumhydroxid	200	mM
SDS	1	% (w/v)

Die Lösung wurde autoklaviert.

KAc-Lösung

Eisessig (98 %)	29,5	ml
mit KOH-Plätzchen auf pH 4,8		
H <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>	ad. 100	ml

Die KAc-Lösung wurde autoklaviert.

Für die alkalische Lyse wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur 20 s bei 13.000 rpm abzentrifugiert, das Pellet wurde in 100 µl GTE resuspendiert und mit 200 µl NaOH/SDS-Lösung versetzt. Nach einer dreiminütigen Inkubation bei RT wurden dem Ansatz 150 µl Kaliumacetat-Lösung zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C, der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und 800 µl Ethanol (99 %) hinzugefügt. Der Überstand wurde nach einer weiteren Zentrifugation für 3 min bei 13.000 rpm und RT verworfen. Das Pellet wurde 5 min getrocknet, in 30 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

#### 2.4.4.2 „MiniPrep“

Die „MiniPrep“ stellt eine auf der alkalischen Lyse basierende Methode zur DNA-Isolation aus Bakterien dar, bei der Plasmid-DNA über ein Säulensystem mit Silikamembranen aufgereinigt und anschließend eluiert wird. Zur DNA-Isolation aus *E. coli* mittels „MiniPrep“ wurde das „innuPREP Plasmid Mini Kit“ der Firma Analytik Jena nach Herstellerangaben genutzt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

#### 2.4.5 Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA

Zur Kontrolle von Plasmiden auf das Vorhandensein eines Inserts nach Klonierung wurde ein Restriktionsverdau mit den jeweiligen Restriktionsenzymen von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubation eines Kontrollverdaus erfolgte bei 37 °C über 1 h, wohingegen ein präparativer Verdau 3 h inkubiert wurde. Die Ansätze wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und gegebenenfalls aus dem Gel reisoliert (s. 2.4.8 und 2.4.9).

##### Restriktionsverdau

DNA	1,0	µl
10 x Puffer	2,0	µl
Restriktionsendonuklease I	0,4	µl
Restriktionsendonuklease II	0,4	µl
RNase A	0,1	µl

ad. 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

#### 2.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Im Jahr 1983 wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) erstmalig von Mullis beschrieben. Sie wurde zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Sequenzen eingesetzt, was in einer dreiphasigen Reaktion von einer DNA-Polymerase katalysiert wird (Gibbs, 1990; Mullis, 1990). Oftmals wird eine Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eingesetzt, welche eine hohe Hitzestabilität aufweist, was eine höhere Spezifität und Ausbeute der PCR ermöglicht (Saiki *et al.*, 1988). In einer PCR-Reaktion werden zusätzlich zur zu amplifizierenden Template-DNA eine DNA-Polymerase, Oligonukleotidprimer sowie die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) eingesetzt. In der ersten Phase der PCR wird die doppelsträngige Template-DNA denaturiert. Anschließend erfolgt in der zweiten Phase das



sogenannte „Annealing“ der Primer, welche durch ihre Komplementarität zum Template sowie die Wahl einer spezifischen „Annealing-Temperatur“ an die Ziel-DNA binden können und als Startpunkt für die darauffolgende Elongation der Doppelstränge durch die DNA-Polymerase dienen (dritte Phase). Durch die Wiederholung dieser Phasen in mehreren Zyklen kann die Template-DNA in großer Anzahl amplifiziert werden (Garibyan & Avashia, 2013; Gibbs, 1990; Mullis, 1990; Saiki *et al.*, 1988).

#### Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

PCR-Puffer mit Magnesiumchlorid	2,50	µl
3'-Primer (100 mM)	0,25	µl
5'-Primer (100 mM)	0,25	µl
dNTPs	0,50	µl
Template	1,00	µl
Polymerase	0,25	µl
ad. 25 µl H <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>		

Die PCR erfolgte im Thermocycler „Mastercycler Nexus“ (Eppendorf) nach folgendem Standard-Programm, bei welchem die Annealing-Temperaturen entsprechend der Primer und Templates variiert wurden:

95 °C	2	min	} 30 Zyklen
95 °C	20	s	
50-64 °C	20	s	
72 °C	90	s	
72 °C	7	min	

Im Anschluss wurde der PCR-Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und das PCR-Produkt reisoliert.

### 2.4.7 SOE-PCR

Die SOE-PCR („splicing by overlapping extension PCR“) stellt eine abgewandelte Form der PCR dar, die zur Insertion von Mutationen an spezifischen Positionen der DNA eingesetzt wird. Sie ermöglicht zusätzlich auch die Herstellung von Fusionskonstrukten ohne auf die Verwendung von Restriktionsenzymen oder Ligasen angewiesen zu sein (Ho *et al.*, 1989; Vallejo *et al.*, 2008; Zarghampoor *et al.*, 2020). Hierzu werden in einer ersten PCR-Reaktion die zu fusionierenden DNA-Fragmente mit Primern amplifiziert, die zueinander komplementäre Überhänge an den 3‘-Enden anfügen. In einer gemeinsamen PCR dienen diese Überhänge als Primer füreinander, wodurch die komplementären DNA-Stränge durch die DNA-Polymerase vervollständigt und lückenlos fusioniert werden (Ho *et al.*, 1989; Horton *et al.*, 1989, 1993). In der Dissertation wurde die SOE-PCR zur Insertion von GS- und L2-Linkern in den zellwandverankerten Fusionskonstrukten genutzt, die zwischen Enzym und Zellwandanker eingefügt wurden.

Die SOE-PCR erfolgte im Thermocycler „Mastercycler Nexus“ (Eppendorf) nach folgendem Programm, bei welchem die Annealing-Temperaturen entsprechend der Primer und Templates variiert wurden:

95 °C	2	min	} 30 Zyklen
95 °C	20	s	
54-60 °C	20	s	
72 °C	90	s	
72 °C	7	min	

### 2.4.8 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird in der Molekularbiologie zur Separation von DNA anhand ihrer Größe und elektrischen Ladung in einem Agarosegel eingesetzt. Die DNA-Moleküle weisen ein negativ geladenes Phosphatrückgrat auf, welches ein Wandern von der Kathode zur Anode in einem elektrischen Feld bedingt. Hierbei steht die Strecke, die von der DNA im Gel zurückgelegt wird, in direktem Zusammenhang mit der Größe der DNA und der Porengröße des Agarosegels. Größere DNA-Fragmente wandern weniger weit im Gel, wohingegen kleinere DNA-Moleküle größere Strecken im Gel zurücklegen können (Helling *et al.*, 1974; Lee *et al.*, 2012; Sambrook *et al.*, 1989; Voytas, 1992). Die Detektion

der DNA im Agarosegel erfolgt durch eine Inkubation in Ethidiumbromid, welches nach Interkalation in die DNA-Doppelstränge durch eine UV-Bestrahlung visualisiert werden kann (Hudson & Jacobs, 1975; Waring, 1965).

Die Proben des Restriktionsverdau der Plasmid-DNA wurden zur Überprüfung mit 5 µl GLB-Puffer versetzt und in einem 1 %-igen Agarosegel in 1 x TBE bei 150 V 0,8 h aufgetrennt. Hierbei wurde der „HyperLadder“-Marker von Bioline als DNA-Standard genutzt. Nach einer 10- bis 15-minütigen Färbung in Ethidiumbromid erfolgte die Detektion der Banden mithilfe des Programms „ChemiDoc XRS“. Im Anschluss wurde die DNA - falls notwendig - aus dem Gel reisoliert (s. 2.4.9).

#### 10 x TBE-Puffer

Tris	890	mM
Borsäure	890	mM
EDTA	20	mM

#### GLB-Puffer

Glyzerin	50	%
SDS	1	%
EDTA	125	mM
Bromphenolblau	0,05	%
Xylencyanol	0,05	%

### **2.4.9 DNA-Reisolation**

Die Reisolation von PCR-Produkten und restringierter DNA aus einem Agarosegel wurde mithilfe des „E.Z.N.A. Gel Extraction Kit“ der Firma Omega durchgeführt und erfolgte nach Angaben des Herstellers.

## 2.4.10 Hefe-Transformation

### 2.4.10.1 Lithiumacetat-Transformation von *S. cerevisiae*

Die Lithiumacetat-Transformation ist eine Methode, die im Jahre 1983 von Ito *et al.* entwickelt wurde und zum Transfer von exogener DNA in *S. cerevisiae* eingesetzt wird (Ito *et al.*, 1983; Schiestl & Gietz, 1989). Der Einsatz monovalenter Kationen, wie beispielsweise  $\text{Li}^+$ , steigert die Transformationseffizienz, indem die Durchlässigkeit der Zellwand erhöht und dadurch die Aufnahme der DNA in die Hefezellen erleichtert wird. Zusätzlich steigert die Addition von Polyethylenglykol (PEG) und denaturiertem Heringssperma (Carrier-DNA) sowie ein kurzzeitiger Hitzeschock die Effizienz der Transformation (Ito *et al.*, 1983; Kawai *et al.*, 2010; Schiestl & Gietz, 1989).

Für die Lithiumacetat-Transformation wurde 1 ml einer Übernachtskultur von *S. cerevisiae* 20 s bei 13.000 rpm pelletiert. Nach einmaligem Waschen in 500  $\mu\text{l}$  LiAc/TE-Gebrauchslösung wurde das Zellpellet in 100  $\mu\text{l}$  LiAc/TE-Lösung resuspendiert. Parallel dazu wurde ein Ansatz aus 10  $\mu\text{l}$  der Carrier-DNA (Heringssperma), 3  $\mu\text{l}$  10 x LiAc und 1  $\mu\text{g}$  der Plasmid-DNA erstellt, der zu den resuspendierten Hefezellen gegeben wurde. Für Kotransformationen wurden jeweils 1  $\mu\text{g}$  beider Plasmide eingesetzt. Im Anschluss wurden 600  $\mu\text{l}$  50 % PEG-Lösung hinzugefügt und es folgte eine Inkubation für 30-60 min bei 30 °C im Schüttler. Danach folgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42 °C im Wasserbad und die Ansätze wurden nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 s zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  1 x TE gewaschen. Nach Resuspension in 500  $\mu\text{l}$  1 x TE wurden die Hefezellen auf den entsprechenden d/o-Platten ausplattiert und bei 30 °C 2-3 d inkubiert.

#### 10 x Lithiumacetat

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

#### 10 x TE

Tris/HCl	100	mM
----------	-----	----

EDTA	10	mM
------	----	----

Die Lösung wurde mit HCl auf pH-Wert 7,5 eingestellt und nach der Herstellung autoklaviert.

50 % PEG-Lösung

PEG-4000	50	% w/v
----------	----	-------

Die Lösung wurde nach der Herstellung autoklaviert.

1 x LiAc/TE-Gebrauchslösung

10 x LiAc	10	%
10 x TE	10	%
H <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>	80	%

PEG-Gebrauchslösung

10 x LiAc	10	%
10 x TE	10	%
50 % PEG-Lösung	80	%

1 x TE-Gebrauchslösung

10 x TE	10	%
H <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>	90	%

**2.4.10.2 Transformation von *P. pastoris* mittels Elektroporation**

Zur Transformation von *P. pastoris*-Zellen wurde ein Protokoll von Cereghino *et al.* (2005) genutzt, welches die Herstellung kompetenter Zellen sowie die Elektroporation aus zwei früheren Protokollen bei gleichzeitiger Zeitersparnis kombiniert (Cregg & Russell, 1998; Dohmen *et al.*, 1991). Zusätzlich soll die Inkubation der Zellen mit Dithiothreitol die Effizienz der Transformation erhöhen (Cereghino *et al.*, 2005; Wu & Letchworth, 2004).

Für die Herstellung elektrokompeter Hefezellen wurde die OD<sub>600</sub> einer frischen Übernachtskultur in 50 ml YPD auf 0,2 eingestellt und die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bei 30 °C und 220 rpm kultiviert. Die Hefezellen wurden anschließend bei 500 x g 5 min pelletiert und in 9 ml eiskalter BEDS-Lösung sowie 1 ml DTT-Lösung (1 M) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 30 °C und 100 rpm wurden die Zellen bei 500 x g 5 min zentrifugiert und einmal mit BEDS-Lösung gewaschen. Abschließend wurden die Zellen als Aliquots (à 55 µl) bei -80 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot mit 5 µl des zuvor linearisierten Plasmids (pPIC9 mit *StuI* linearisiert) in einer Elektroporationsküvette vermischt und 2 min auf Eis inkubiert. Der elektrische Impuls wurde im „GenePulser Xcell™“ (Bio-Rad) unter folgenden

---

Einstellungen angelegt: Widerstand 200  $\Omega$ , Elektrische Feldstärke 1,5 kV/cm, Elektrische Kapazität 25  $\mu$ F. Im Anschluss wurden die Zellen sofort in 1 ml kaltem 1 M Sorbitol und 0,5 ml YPD stabilisiert und 3 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Die Hefezellen wurden auf zwei His-d/o-Platten ausplattiert und 3-5 d bei 30 °C inkubiert.

#### 10 x Bicin-NaOH

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

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

#### BEDS

10 x Bicin-NaOH pH 8,3	10	%
Ethylenglykol	3	%
DMSO	3	%
Sorbitol	1	M

#### DTT

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

Die Lösung wurde nach Sterilfiltration bei -20 °C gelagert.

#### Sorbitol

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

Die Lösung wurde nach Sterilfiltration bei 4 °C gelagert.

## 2.5 Assays zur Messung der enzymatischen Aktivität

### 2.5.1 Assay zur Messung der EstA-Aktivität

Esterasen gehören der Gruppe der Hydrolasen an, welche ein breites Substratspektrum besitzen und die Spaltung von Estern in eine Säure sowie einen Alkohol katalysieren (Bornscheuer, 2002). Zum Nachweis der EstA-Aktivität wurde ein Assay nach Schlacher *et al.* (1998) bzw. Breinig *et al.* (2006) durchgeführt, bei dem der enzymatische Umsatz des farblosen Substrats *p*-Nitrophenylacetat zum gelblichen *p*-Nitrophenol fotometrisch analysiert wurde.

Für diesen Assay wurden Hefen in d/o-Glukose-Medium über Nacht bei 30 °C und 220 rpm kultiviert. Die Hefen wurden am folgenden Tag auf eine  $OD_{600} = 10$  in 1 x PBS (pH 8,0) eingestellt, wovon wiederum 32 µl mit 878 µl 0,1 M Tris/HCl (pH 7,0) in einer Küvette gemischt wurden. Nach Zugabe von 90 µl 50 mM *p*-Nitrophenylacetat und Mischen des Ansatzes wurde die Absorptionzunahme im Fotometer „Ultrospec 2100 pro“ der Firma Amersham Biosciences gemessen. Die Kinetik wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min in Zeitintervallen von 5 s in Tripletten aufgezeichnet.

#### 10 x PBS

KCl	27	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18	mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100	mM
NaCl	1,37	M

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8,0 eingestellt.

#### Tris/HCl

Tris	0,1	M
------	-----	---

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

#### *p*-Nitrophenylacetat-Lösung

Essigsäure-4-Nitrophenylester	50	mM
-------------------------------	----	----

Der Essigsäure-4-Nitrophenylester wurde in Isopropanol (99 %) gelöst.

### 2.5.2 Assay zur Messung der LDH-Aktivität

Zur Kontrolle des NAD<sup>+</sup>-Umsatzes und der Funktionalität in den im Folgenden betrachteten Aktivitätsassays der unterschiedlichen Dehydrogenasen wurde ein auf einer Veröffentlichung von Tarmy und Kaplan (1968) basiertes Protokoll mit einer aus Rinderherzen aufgereinigten L-Laktatdehydrogenase (L-LDH, EC 1.1.1.27) der Firma Sigma genutzt. Hierbei wurden neben 1 U L-LDH, 0,24 M Natrium-L-Laktat (Sigma) als Substrat, 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) und 0,7 mM NAD<sup>+</sup> (AppliChem) im LDH-Assay eingesetzt. Die Umwandlung von NAD<sup>+</sup> zu NADH und die damit verbundene Enzymaktivität wurden bei einer Wellenlänge von 340 nm fotometrisch bestimmt.

### 2.5.3 Assay zur Messung der SDH- und MDH-Aktivität

Die Sorbitol- und Mannitoldehydrogenase (SDH/MDH) aus *R. sphaeroides* gehören der Gruppe der Polyoldehydrogenasen an, die Alkohole unter Reduktion des Kofaktors NAD<sup>+</sup> oxidieren (Jose & von Schwichow, 2004; Schauder *et al.*, 1995; Schneider & Giffhorn, 1989). Zur Bestimmung der Enzymaktivität der SDH und MDH wurden unterschiedliche Variationen an Assays durchgeführt, wobei sich an den Protokollen von Schneider & Giffhorn (1989) und Rau (2004) orientiert wurde.

Für einen Aktivitätsassay wurden Hefezellen über Nacht in d/o-Medium bei 30 °C und 220 rpm kultiviert und am folgenden Tag auf eine OD<sub>600</sub> = 10 in 0,2 M Tris/HCl-Puffer (pH 9,0) eingestellt. Die Ansätze wurde in einem Volumen von 1 ml erstellt und setzten sich aus 100 µl der eingestellten Zellsuspension, 800 µl 0,13 M Tris/HCl-Puffer (pH 9,0) und 2,25 mM NAD<sup>+</sup> zusammen. Der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe von 1,5 M D-Sorbitol- bzw. D-Mannitol-Lösung und die Bildung von NADH wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge  $\lambda = 340$  nm oder 365 nm mitverfolgt. Des Weiteren wurden auch die Pufferkonzentrationen (0,2 M Tris/HCl, pH 9,0) und die Substratkonzentrationen (0,15-1,5 M D-Sorbitol bzw. D-Mannitol) variiert.

#### Tris/HCl-Puffer

Tris	0,13/0,2	M
------	----------	---

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 9,0 eingestellt.



---

NAD<sup>+</sup>-StammlösungNAD<sup>+</sup>-Dinatriumsalz                    2,25 mM

Die NAD<sup>+</sup>-Stammlösung wurde in Tris/HCl-Puffer angesetzt.

D-Sorbitol-/D-Mannitol-Lösung

D-Sorbitol/D-Mannitol                1,50 M

**2.5.4 Assay zur Messung der RjFDH-Aktivität**

Die Formiatdehydrogenase aus *R. jostii* (RjFDH) gehört der Gruppe der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Formiatdehydrogenasen an, welche Formiat bei gleichzeitiger Reduktion des Kofaktors NAD<sup>+</sup> zu Kohlenstoffdioxid oxidieren (Boldt & Ansorge-Schumacher, 2020).

Die Messung der Aktivität der RjFDH wurde anhand eines Protokolls von Boldt & Ansorge-Schumacher (2020) durchgeführt und auf die vorliegenden Gegebenheiten angepasst.

Zur Aktivitätsbestimmung wurden Hefen über Nacht in d/o-Medium bei 30 °C und 220 rpm kultiviert und am folgenden Tag auf eine OD<sub>600</sub> = 10 in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) eingestellt. Ein Messansatz wurde in einem Volumen von 1 ml erstellt und bestand aus 32 µl der Hefezellen und 868 µl 2,5 mM NAD<sup>+</sup> (in Phosphatpuffer gelöst). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 100 mM Natriumformiat-Lösung gestartet und die Bildung von NADH wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge  $\lambda = 340$  nm mitverfolgt.

Phosphatpuffer

Natriumphosphat                        100 mM

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

NAD<sup>+</sup>-StammlösungNAD<sup>+</sup>-Dinatriumsalz                    2,5 mM

Die NAD<sup>+</sup>-Stammlösung wurde in Phosphatpuffer angesetzt.

Natriumformiat-Lösung

Natriumformiat                         100 mM



Die Messung der Proteinkonzentration wurde mithilfe des „Pierce™ BCA Protein Assay Kits“ der Firma Thermo Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Absorption wurde in einer 96-Well-Platte im Plattenreader „Synergy H1“ der Firma BioTek bestimmt.

### 2.6.2 Affinitätsreinigung T7-getaggtter Proteine

Proteine, die mithilfe des pET24a(+)-Expressionssystems in *E. coli* produziert wurden, verfügen in der vorliegenden Dissertation über ein N-terminales T7-Tag, wodurch eine Aufreinigung des Zellysats nach Ultraschallaufschluss ermöglicht wurde. Die markierten Proteine wurden über eine Säulenmatrix separiert, die aus mit T7-Antikörper gekoppelten Agarosebeads als Trägermaterial bestand. Hierzu wurde das „T7•Tag® Affinity Purification Kit“ der Firma Merck nach Herstellerangaben genutzt. Der Durchfluss und die eluierten Fraktionen konnten dann direkt zur SDS-PAGE eingesetzt oder bei 4 °C gelagert werden. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der gepoolten Elutionsfraktionen im BCA-Assay wurden sie in den Zentrifugationseinheiten Vivaspin™ 6 mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa (VS0621, Sartorius) nach Herstellerangaben aufkonzentriert und in 1 x PBS (pH 7,4) umgepuffert.

### 2.6.3 SDS-PAGE

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren, welches der Proteinauftrennung nur aufgrund des Molekulargewichts der denaturierten Polypeptidketten dient. Zentral für die Funktionsweise dieser Methode ist die Bindung der Proteine an das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), was die Bildung von negativ geladenen Komplexen bedingt und eine Separation der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts unabhängig von weiteren Eigenschaften der Proteine (wie z. B. isoelektrischer Punkt oder Aminosäurezusammensetzung) in einem elektrischen Feld ermöglicht (Shapiro & Maizel, 1969; Smith, 1984; Weber & Osborn, 1969).

#### Tris/HCl-SDS

Tris	3,0	M
SDS	0,3	% w/v

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8,45 eingestellt und die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

5 x Anodenpuffer

Tris	1,0	M
------	-----	---

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8,9 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

5 x Kathodenpuffer

Tris	0,5	M
Tricin	0,5	M
SDS	0,5	% w/v

Die Lösung wurde nach der Herstellung autoklaviert.

Zusammensetzung der Tris/Tricin-Gele (ausreichend für 2 Gele; 12,5 %):Trenngel

Rotiphorese Gel 30	5,9	ml
Tris/HCl (pH 8,45)	5,0	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	2,3	ml
Glyzerin (87 %)	1,6	ml
APS (10 %)	80,0	µl
TEMED	25,0	µl

Sammelgel

Rotiphorese Gel 30	1,6	ml
Tris/HCl (pH 8,45)	3,1	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	7,8	ml
APS (10 %)	80,0	µl
TEMED	25,0	µl

Zu Beginn wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten (Dicke 1,5 mm) gegossen und bis zur vollständigen Polymerisation mit 2-Propanol überschichtet. Im Anschluss wurde nach Entfernen des 2-Propanols das Sammel- über das Trenngel gegossen und der Probenkamm (1,5 mm) in das Sammelgel gesteckt. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels konnten die Proben und 7 µl des Markers („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ der Firma Thermo Scientific) in die Geltaschen geladen werden. Die SDS-PAGE wurde im „Mini-Protean II“-System von Bio-Rad durchgeführt. Die Präfokussierung der Proben erfolgte bei 80 V für

15-20 min, wobei die Spannung nach dem Übergang der Proben vom Sammel- ins Trenngel auf 120 V erhöht und dann die Gelelektrophorese 1,5-2 h durchgeführt wurde.

#### 2.6.4 Coomassie-Färbung

Eine Visualisierung von in SDS-Gelen aufgetrennten Proteinen kann durch deren Anfärbung erfolgen, die erstmals von Fazekas De St. Groth *et al.* (1963) mit dem Triphenylmethan-Farbstoff „Coomassie Blue R250“ demonstriert wurde. Proteine werden durch die Komplexbildung des Farbstoffanions im leicht sauren Milieu mit der  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe des Proteins angefärbt, wobei die Bindung reversibel und die Sensitivität pH-abhängig ist (Chial & Splittgerber, 1993; Fazekas De St. Groth *et al.*, 1963).

Für die Proteinfärbung wurde die Coomassie-basierte Färbelösung „InstantBlue™“ von Expedeon nach Herstellerangaben genutzt, in welcher die SDS-Gele über Nacht auf dem Taumler inkubiert und anschließend im „Amersham Imager 600“ dokumentiert wurden.

#### 2.6.5 Semi-Dry Western Blot

Der Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen mittels Western Blot wurde erstmalig von Towbin *et al.* (1979) und Burnette (1981) beschrieben. Proteingemische werden anhand ihres Molekulargewichts in einer SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Membranen (Nitrocellulose oder PVDF) übertragen (Burnette, 1981; Mahmood & Yang, 2012; Towbin *et al.*, 1979). Zunächst müssen die Membranen mit einem „Blocking-Puffer“ geblockt werden, was unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membranen verhindert. Der Nachweis der Proteine erfolgt hierbei über eine Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern, wobei der primäre Antikörper gegen das nachzuweisende Protein und der sekundäre Antikörper gegen den primären Antikörper gerichtet ist (Kurien & Hal Scofield, 2015; Mahmood & Yang, 2012; Towbin *et al.*, 1979). Der sekundäre Antikörper ist zur Signaldetektion mit einer Meerrettichperoxidase („HRP“) gekoppelt, welche die Oxidation des Substrats Luminol zu Luminoloxid katalysiert und die Bildung eines angeregten 3-Amidogen-Dimethyl-Phthalat-Ions bedingt, das bei der Rückkehr in seinen Grundzustand ein detektierbares Licht einer Wellenlänge von maximal 425 nm emittiert (Mahmood & Yang, 2012; Yang *et al.*, 2015).

Transferpuffer

Tris	3,03	g/l
Glycin	14,4	g/l
SDS	0,10	% w/v
Methanol	20,0	% v/v

Der Transferpuffer wurde bei 4 °C aufbewahrt.

10 x TBS

Tris	1	M
NaCl	1	M

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,5 eingestellt und die Lösung wurde autoklaviert.

Waschpuffer

10 x TBS	10,0	% v/v
Tween20	0,05	%

Der Blocking-Puffer zum Blocken der PVDF-Membranen bestand aus 5 % Magermilchpulver, welches im Waschpuffer gelöst wurde.

Für den Western Blot wurde die PVDF-Membran („PVDF Western Blotting Membranes“, Roche) zuerst 1 min in Methanol äquilibriert, um die Aufnahme des Transferpuffers durch die Membran zu ermöglichen. Zur Vorbereitung für den Western Blot wurden die Membran, das SDS-Gel und die Blotting-Papiere („Extra thick blot paper“, Bio-Rad) 5 min bei 220 rpm mit Transferpuffer auf dem Taumler gewaschen. Der Transfer erfolgte im „Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“ von Bio-Rad bei einer konstanten Stromstärke von 55 mA pro Gel für 1,5 h. Nach Blocken der Membran für 1 h bei 20 °C in Blocking-Puffer folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 1 h mit dem sekundären Antikörper bei 20 °C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurde die Membran mit der Entwicklerlösung („SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate“, Thermo Scientific) vollständig bedeckt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte im „Amersham Imager 600“. Die in der Dissertation genutzten primären und sekundären Antikörper sind in Tab. 5 angegeben.

**Tabelle 5:** In der Dissertation für den Western Blot verwendete Antikörper mit Angaben zu deren Herkunft und Verdünnung in Blocking-Puffer.

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung
<b>Primäre Antikörper</b>		
Anti-V5 (Maus)	Bio-Rad	1:1.000
Anti-GFP (Maus)	Roche	1:1.000
Anti-PGK (Maus)	Novex	1:1.000
Anti-T7-Tag (Maus)	Novagen	1:10.000
<b>Sekundäre Antikörper</b>		
Anti-Maus (Peroxidase-gekoppelt)	Sigma	1:10.000

## 2.7 Weitere Methoden

### 2.7.1 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl der Hefe- und Bakterienkulturen erfolgte mithilfe der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ). Zur Messung wurde das Spektralfotometer „Ultraspec 2100 pro“ von Amersham Biosciences genutzt.

### 2.7.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde mithilfe des „NanoDrop 2000c“ der Firma Thermo Scientific durchgeführt.

### 2.7.3 Zellaufschluss

#### 2.7.3.1 Bakterien

Zur Analyse der Proteinexpression in *E. coli* wurde ein Zellaufschluss mittels Ultraschall durchgeführt. Hierbei wurden die geernteten Bakterienpellets in 6 ml 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) gelöst, mit 20 µl/ml 25x Proteaseinhibitor-Stammlösung („cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail“, Roche) versetzt und in Glasröhrchen überführt. Der Aufschluss wurde unter ständiger Eiskühlung im „Sonifier 250“ der Firma Branson bei folgenden Einstellungen durchgeführt: Timer 2-6 min, Duty Cycle 65–70 %, Output Control 4-5. Hierbei wurden die Zellysate bis zum Verschwinden der Trübung des Überstands aufgeschlossen; eine Erhitzung und ein Aufschäumen der Proben wurden vermieden. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm und 4 °C wurden die Überstände

entweder mit 3 x SDS-Probenpuffer versetzt und zur SDS-PAGE eingesetzt oder für eine weitere Aufreinigung durch das „T7•Tag<sup>®</sup> Affinity Purification Kit“ von Novagen mithilfe eines 0,45 µm Zelluloseacetat-Spritzenvorsatzfilters filtriert (s. 2.6.2).

#### 3 x SDS-Probenpuffer

H <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>	4,0	ml
0,5 M Tris/HCl-Lösung (pH 6,8)	2,0	ml
Glyzerin 96 %	2,4	ml
SDS	1,0	ml
Coomassie Brilliant Blue (0,05 % (w/v))	0,4	ml

Zur Herstellung von reduzierendem 3 x SDS-Probenpuffer wurden 10 % β-Mercaptoethanol zugesetzt.

#### **2.7.3.2 Hefen**

Die Proteinexpression in Hefezellen wurde mithilfe eines mechanischen Zellaufschlusses analysiert. Die Hefen wurden zu Beginn 5 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert und einmal mit sterilem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl SUMEB-Puffer und 10 µl der 25x Proteaseinhibitor-Stammlösung resuspendiert. Nach Überführen in mit Glasperlen (Durchmesser: 1,0 mm) gefüllte Aufschlussröhrchen erfolgte der Zellaufschluss im „Precellys Evolution“ der Firma Bertin bei folgenden Einstellungen: Speed 5.800 rpm, Cycle 3 x 30 s, Pause 30 s. Im Anschluss wurden die Proben 20 s bei 14.000 rpm abzentrifugiert und 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Die Ansätze konnten dann direkt zur SDS-PAGE eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden. Für die Zellwandisolation aufgeschlossene Proben wurden in Isolierungspuffer eingesetzt. Die Zugabe des SUMEB-Puffers und der 25x Proteaseinhibitor-Stammlösung sowie das Erhitzen im Heizblock entfällt bei diesen Proben (s. 2.7.5).

#### SUMEB-Puffer

SDS	1,00	%
Harnstoff	8,00	M
MOPS (pH 6,8)	10,00	mM
EDTA	10,00	mM
Bromphenolblau	0,01	% (w/v)
(Na <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,30	M



### 2.7.4 TCA-Fällung

Zur Untersuchung des Proteingehalts in Zellüberständen wird eine Fällung mit Trichloroessigsäure (TCA) genutzt, wodurch Proteine konzentriert werden und direkt zur SDS-PAGE eingesetzt werden können (Koontz, 2014).

Nach der Zentrifugation der zu untersuchenden Hefen wurden deren Überstände mit 50 % TCA (Endkonzentration: 10 %) versetzt und 30-60 min oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Proteine wurden im Anschluss 15 min bei 4.500 rpm und 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Nachdem das Pellet getrocknet wurde, konnte der Ansatz mit nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und zur SDS-PAGE eingesetzt werden.

### 2.7.5 Isolation von Hefezellwänden

In der vorliegenden Dissertation wurden neben ganzen Hefezellen auch isolierte Zellwände betrachtet, wodurch eine Verankerung der untersuchten Fusionskonstrukte in der Zellwand nachgewiesen werden sollte. Die Zellwandisolation wurde nach einem Protokoll von Schreuder *et al.* (1993) bzw. Breinig *et al.* (2006) durchgeführt.

Zu analysierende Überstandkulturen mit einer  $OD_{600} = 1$  wurden 3 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert und dreimal mit Isolierungspuffer gewaschen. Nach Resuspension des Zellpellets in Isolierungspuffer folgte ein Zellaufschluss mit Glasperlen im „Precellys Evolution“ der Firma Bertin (s. 2.7.3.2), wonach die Proben für die folgenden Schritte auf Eis überführt wurden. Die erhaltenen Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Glasperlen mit Waschpuffer gewaschen bis keine Trübung mehr festzustellen war. Die gepoolten Überstände wurden 5 min bei 2.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und die resultierenden Pellets dreimal mit 1 mM PMSF gewaschen. Für den Einsatz der isolierten Zellwände in den Aktivitätsassays wurden diese zuvor zweimal in dem entsprechenden Puffer gewaschen (1 min, 13.000 rpm).

#### Isolierungspuffer

Tris/HCl (pH 7,8)	10	mM
PMSF	1	mM

#### PMSF-Stammlösung

PMSF	10	mM
------	----	----

Das PMSF wurde in Isopropanol gelöst.

Waschpuffer

NaCl	1	mM
PMSF	1	mM

**2.7.6 Zellwandanker-Extraktion mittels Glukanase-Verdau**

Zellwandproteine, die über einen GPI-Anker in der Zellwand verankert sind, können durch eine Behandlung mittels  $\beta$ -1,3-Glukanasen aus der Zellwand herausgelöst werden, indem die  $\beta$ -1,3-glykosidischen Bindungen gespalten werden (Cappellaro *et al.*, 1998; Kollár *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1995; Montijn *et al.*, 1994; Valentin *et al.*, 1984). Als  $\beta$ -1,3-Glukanase wurde in den vorliegenden Experimenten eine Laminarinase aus *Trichoderma* sp. (EC 3.2.1.39) verwendet und für den Glukanase-Verdau wurde ein modifiziertes Protokoll nach Schreuder *et al.* (1993) genutzt.

Die Glukanase-Extraktion wurde direkt im Anschluss an eine Zellwandisolation durchgeführt. Die Zellwände wurden zu Beginn zweimal in 100 mM Natriumacetat-Lösung gewaschen. Danach wurden 0,15 U der Laminarinase-Stammlösung zugegeben und die Ansätze 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze erneut 0,15 U der Laminarinase-Stammlösung versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 12.000 rpm wurden die behandelten Proben zweimal mit 1 x PBS (pH 8,0) gewaschen und zum jeweiligen Aktivitätsassay eingesetzt (s. 2.5.1).

Natriumacetat-Lösung

Natriumacetat	100	mM
PMSF	1	mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 5,0 eingestellt.

Laminarinase-Stammlösung

Laminarinase	0,15	U
--------------	------	---

Die Laminarinase wurde in Natriumacetat-Lösung gelöst.

### 2.7.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Der Nachweis der indirekten Immunfluoreszenz von transformierten EBY100-Hefezellen wurde nach entsprechender Kultivierung durchgeführt. Es wurde hierbei ein anhand des „pYD1 Yeast Display Vector Kits“ von Invitrogen modifiziertes Protokoll zur Färbung der Hefezellen genutzt. Hierzu wurden 200 µl der Kulturen 5 min bei 9.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und mit 1 x PBS (pH 8,0) gewaschen. Nach Resuspension des Zellpellets in 100 µl 1 x PBS (pH 8,0) wurde 1 µl des primären Antikörpers zugegeben und 1,5 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgten zwei Waschschrte mit 1 x PBS (pH 8,0), eine Resuspension in 1 x PBS (pH 8,0) sowie die Inkubation mit 1 µl des sekundären Antikörpers 1,5 h auf Eis im Dunkeln. Daraufhin erfolgten zwei weitere Waschschrte mit 1 x PBS (pH 8,0) und das Pellet wurde in 40 µl 1 x PBS (pH 8,0) aufgenommen. Die Hefezellen konnten dann zur Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie (s. 2.7.8) eingesetzt werden. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden hierbei mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Biozero BZ-8000 (Keyence) unter Verwendung des Ölimmersionsobjektivs (PlanApo; VC; 100x; NA: 1,40; Nikon) dokumentiert. Die in der Dissertation zur indirekten Immunfluoreszenz eingesetzten Antikörper sind in Tab. 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** In der Dissertation zur indirekten Immunfluoreszenz verwendete Antikörper mit Angaben zu deren Herkunft und Verdünnung.

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung
<b>Primärer Antikörper</b>		
Anti-V5 (Maus)	Bio-Rad	1:100
Anti-HA (Hase)	Rockland	1:100
<b>Sekundärer Antikörper</b>		
Anti-Maus-IgG (FITC-konjugiert)	Sigma	1:100
Anti-Hase-IgG (FITC-konjugiert)	Sigma	1:100

### 2.7.8 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS („fluorescence activated cell sorting“) ist ein Verfahren, welches zur schnellen Analyse von Zellen oder Partikeln anhand verschiedener Parameter mittels Lichtstreuung dient. Durchflusszytometer bestehen hierbei aus hauptsächlich drei Komponenten, die Fluidik-, Optik- und Elektroniksysteme umfassen. Das Fluidiksystem besteht aus einer sogenannten Mantelflüssigkeit, in welcher die Probe unter starkem Überdruck fokussiert und zur Analyse zum Laser geleitet wird, der fluoreszierende

Zellen mit einer bestimmten Wellenlänge anregt. Die emittierten Fluoreszenzsignale werden dann von entsprechenden Detektoren registriert und können mithilfe eines elektronischen Systems analysiert werden. Neben den Fluoreszenzsignalen können die Zellen auch durch das sogenannte Vorwärtsstreulicht (FSC; „forward scatter“) anhand ihrer Größe differenziert werden. Zusätzlich ermöglicht die Detektion des Seitwärtsstreulichts (SSC; „side scatter“) eine Unterscheidung der Zellen anhand ihrer Granularität und internen Komplexität (McKinnon, 2018; Picot *et al.*, 2012).

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurde das BD LSRFortessa™ genutzt und die Daten wurden mit der Software BD FACSDiva™ der Firma BD Life Sciences ausgewertet. Hierfür wurden die über indirekte Immunfluoreszenz angefärbten Hefezellen nach zweimaligem Waschen in 1 x PBS (pH 8,0) resuspendiert und in ein Rundbodenglas überführt. Es wurden von jeder Probe 10.000 Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse gemessen.

## 2.8 Berechnungen

### 2.8.1 Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon$

Die Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von *p*-Nitrophenol anhand einer Eichgerade erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes:

$$E = c \times d \times \epsilon$$

E = Extinktion

d = Schichtdicke der Küvette

c = Konzentration

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient

### 2.8.2 Berechnung der Esterase-Volumenaktivität

Zur Berechnung der Volumenaktivität der Esterase A nach Substratumsetzung über einen Zeitraum von 1 min wurde die unten angegebene Formel benutzt. Die berechnete Steigung wurde durch das Fotometer als Absorptionsänderung pro Sekunde angegeben, weshalb dieser Wert zur Berechnung der finalen Volumenaktivität mit dem Faktor 60 multipliziert wurde. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  wurde mithilfe einer Kalibrationsgeraden bestimmt und betrug 6,89 ml/( $\mu$ mol x cm). Die Werte OD(Kultur) und OD(Küvette) betragen 10 bzw. 0,32.

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\text{Steigung } \left[\frac{A}{\text{min}}\right]}{\text{molarer Extinktionskoeffizient } \epsilon} \times \frac{\text{OD(Kultur)}}{\text{OD(Küvette)}}$$

### 3. Ergebnisse

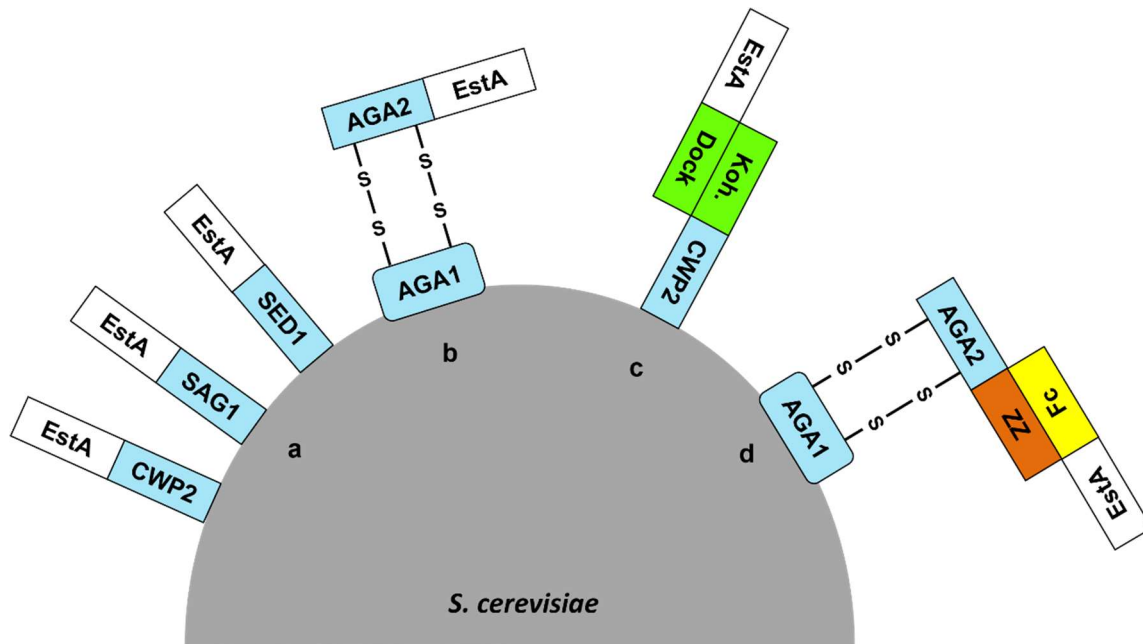
Das „Yeast Surface Display“ wurde zur Expression eines breiten Spektrums an Proteinen auf der Zelloberfläche unterschiedlicher Hefegattungen eingesetzt und es konnten Systeme zur Katalyse von enzymatischen Reaktionsketten generiert werden. Zentraler Bestandteil dieser Systeme sind hefeeigene Ankerproteine, welche unterschiedliche Arten der Verankerung ermöglichen und sich aufgrund ihrer Eigenschaften in den Verankerungseffizienzen von Protein zu Protein unterscheiden (Andreu & L  del Olmo, 2018; Van der Vaart *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit sollte ein zuvor etabliertes Zellwandverankerungssystem, das auf der Immobilisierung eines Fusionskonstrukts aus einer Esterase A aus *B. gladioli* mit dem Zellwandankerprotein Cwp2p basiert, erweitert und optimiert werden (Breinig *et al.*, 2006). Hierzu wurden Unterschiede in den Immobilisierungseffizienzen durch die Verwendung weiterer, hefeeigener Zellwandanker in unterschiedlichen Hefestämmen analysiert. Mithilfe unterschiedlicher Versuchsansätze aus dem Feld der synthetischen Biologie sollten neue Erkenntnisse über die Effekte verschiedener Zellwandkomponenten und Linkersequenzen, einer durch unterschiedliche Promotoren und Terminatoren regulierten Genexpression sowie einer erhöhten Proteinbiosynthese im sekretorischen Weg auf die Zellwandverankerung der EstA gewonnen werden. Als weitere Möglichkeit zur Verankerung der EstA sollten zudem zwei Verankerungssysteme etabliert werden, bei welchen die Enzymimmobilisierung auf unterschiedlichen Protein-Protein-Interaktionen beruhte. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten zur Verankerung von vier Kofaktor-abhängigen Dehydrogenasen auf der Zelloberfläche von Hefen genutzt werden, wodurch NADH-/NADPH-Regenerationssysteme in Hefen hergestellt werden könnten.

#### 3.1 Zelloberflächenexpression der bakteriellen Esterase A in *S. cerevisiae*

Zur Oberflächenexpression der EstA aus *B. gladioli* in *S. cerevisiae* wurden mehrere Arten der Zellwandverankerung untersucht, die entweder die direkte Verankerung über hefeeigene Zellwandankerproteine oder zwei Systeme, die auf unterschiedlichen Protein-Protein-Interaktionen basieren, umfassen. Die Grundlage der Fusionskonstrukte zur N-terminalen Zellwandverankerung bildete ein von Breinig *et al.* (2006) etabliertes Konstrukt, das aus der *KRE1*-Signalsequenz (28 AS), der EstA aus *B. gladioli* und dem C-Terminus des Zellwandankers Cwp2p mit GPI-Ankersignal (71 AS) zusammengesetzt war. Zum Vergleich wurden die N-terminalen Zellwandanker Sag1p und Sed1p nach der Veröffentlichung von Van der Vaart *et al.* (1997) ausgewählt, von welchen 320 AS (Sag1p) bzw. 230 AS (Sed1p) des C-Terminus verwendet wurden (s. Abb. 2, a). Das Aga1p-Aga2p-System wurde zur

---

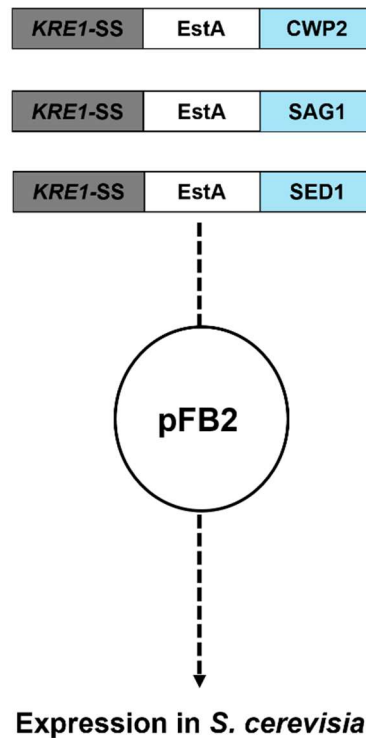
C-terminalen Verankerung der EstA eingesetzt. Die Verankerungskomponente Aga1p (725 AS) wird über einen GPI-Anker in der Zellwand verankert und besitzt Disulfidbrücken, welche zur Verbindung mit der Adhäsionskomponente Aga2p (69 AS) notwendig sind (Cappellaro *et al.*, 1991, 1994; Roy *et al.*, 1991). Das Fusionskonstrukt aus Aga2p und EstA verfügte über die N-terminale *AGA2*-Signalsequenz (18 AS) und wurde mithilfe des pYD1-Vektors im EBY100-Stamm exprimiert (Boder & Wittrup, 1997; Cappellaro *et al.*, 1991) (s. Abb. 2, b). Zusätzlich zur N- und C-terminalen Verankerung sollte die EstA über ein Verankerungssystem immobilisiert werden, das auf der Interaktion zwischen einer Kohäsin 1- und Dockerin Typ 1-Domäne aus *C. cellulovorans* beruhte. Die Kohäsin 1-Domäne wurde N-terminal über Cwp2p in der Hefezellwand verankert und das Fusionskonstrukt aus EstA und Dockerin-Domäne sollte über die Interaktion beider Domänen immobilisiert werden (s. Abb. 2, c). Darüber hinaus wurde ein weiteres System untersucht, was nach einem System von Ito *et al.* (2009) entworfen wurde und auf der Interaktion einer synthetischen ZZ-Domäne aus *S. aureus* mit der Fc-Region von IgG-Antikörpern basierte. Die Verankerung der ZZ-Domäne erfolgte über das Aga1p-Aga2p-System, wohingegen die EstA durch die Fusion mit einer humanen Fc-Region und deren Interaktion mit der ZZ-Domäne immobilisiert werden sollte (s. Abb. 2, d).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der zur Immobilisierung der Esterase A aus *B. gladioli* verwendeten Verankerungssysteme in *S. cerevisiae*. (a) Die EstA wurde über direkte N-terminale Fusionen mit den GPI-verankerten Ankerproteinen Cwp2p (71 AS), Sag1p (320 AS) und Sed1p (230 AS) auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* verankert. (b) Zusätzlich wurde ein C-terminales Fusionskonstrukt aus EstA und Aga2p analysiert, bei welchem die Verankerung über die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen dem GPI-verankerten Aga1p (725 AS) und dem Adhäsionsprotein Aga2p (69 AS) ausgebildet wurde. (c) Als mehrstufiges Verankerungssystem wurde ein Kohäsin-Dockerin-basiertes System untersucht, bei dem eine Kohäsin 1-Domäne aus *C. cellulovorans* („Koh.“) über Cwp2p N-terminal auf der Zelloberfläche verankert wurde und die Interaktion über ein Fusionskonstrukt aus EstA und einer Dockerin Typ 1-Domäne („Dock“) aus *C. cellulovorans* erreicht werden sollte. (d) Außerdem wurde ein weiteres System betrachtet, bei dem die Interaktion zwischen einer synthetischen ZZ-Domäne aus *S. aureus* und der Fc-Domäne von IgG-Antikörpern hergestellt werden sollte. Die ZZ-Domäne wurde über das Aga1p-Aga2p-System durch eine C-terminale Fusion in der Zellwand verankert, wodurch die EstA über die fusionierte Fc-Domäne und die ZZ-Fc-Interaktion immobilisiert werden sollte.

### 3.1.1 Zelloberflächenexpression N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in *S. cerevisiae*

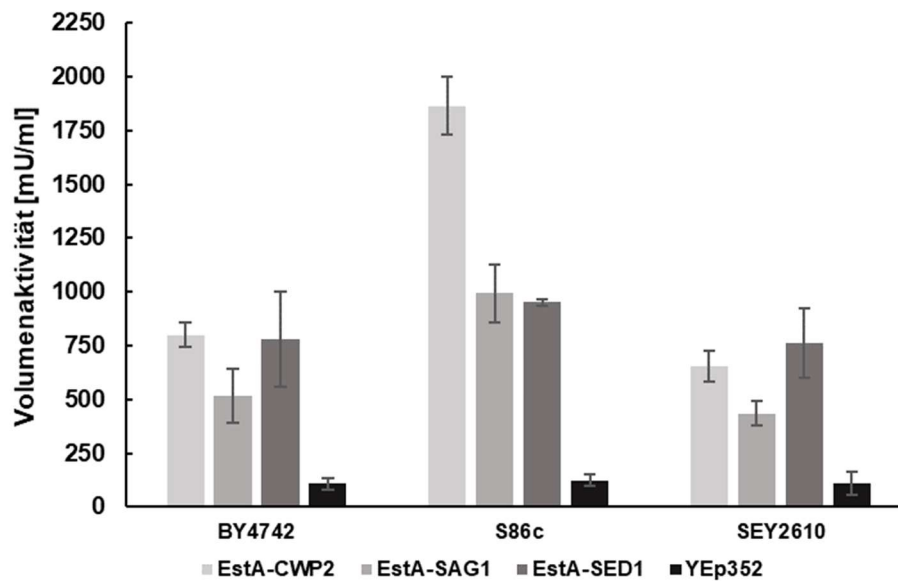
Die Expression der EstA wurde in Abhängigkeit von unterschiedlichen Zellwandankerproteinen als N-terminale Fusionsproteine analysiert. Neben dem von Breinig *et al.* (2006) beschriebenen Fusionskonstrukt aus *KRE1*-Signalsequenz, EstA aus *B. gladioli* und Cwp2p („EstA-CWP2“) wurden zwei analog aufgebaute Konstrukte entworfen, welche statt Cwp2p die C-Termini der Zellwandanker Sag1p („EstA-SAG1“) und Sed1p („EstA-SED1“) enthalten. Die Konstrukte wurden als *XhoI/BglIII*-Fragment in den pFB2-Vektor kloniert, wo sie unter der transkriptionellen Kontrolle eines *PGK1*-Promotors und -Terminators standen und in *S. cerevisiae* zur Oberflächenexpression transformiert wurden (s. Abb. 3).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der zur N-terminalen Immobilisierung der Esterase A verwendeten Fusionskonstrukte in *S. cerevisiae*.** Die Fusionskonstrukte bestehen aus einer *KRE1*-Signalsequenz („*KRE1-SS*“), der EstA aus *B. gladioli* und den Ankerproteinen Sag1p, Sed1p und Cwp2p (Breinig *et al.*, 2006). Die direkten Fusionskonstrukte wurden in den pFB2-Vektor kloniert und zur Zelloberflächenexpression in *S. cerevisiae* transformiert.

Die enzymatische Aktivität der EstA wurde mithilfe eines fotometrischen Assays bestimmt, bei dem der Umsatz des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol anhand der Absorptionzunahme bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min in Intervallen von 5 s gemessen wurde. Für jedes biologische Replikate wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Zur Bestimmung der Volumenaktivität wurde die unter 2.8.2 angegebene Berechnungsformel verwendet und 1 Unit [U] Esterase-Aktivität wurde als die Menge an Enzym definiert, die 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  *p*-Nitrophenol aus dem Substrat unter den eingesetzten Reaktionsbedingungen freisetzt (Breinig *et al.*, 2006). Hierzu wurde der molekulare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  anhand einer Kalibrationsgerade einer *p*-Nitrophenol-Verdünnungsreihe im Bereich von 0-0,25 mM ermittelt und betrug 6,89 ml/( $\mu\text{mol} \times \text{cm}$ ) (Daten nicht gezeigt). Die EstA-Aktivität sollte zuerst in Abhängigkeit der Ankerproteine Sag1p und Sed1p mit Cwp2p als N-terminale Fusionen in den *S. cerevisiae*-Stämmen BY4742, S86c und SEY6210 verglichen werden. Die Fusionskonstrukte wurden im pFB2-Vektor in die Hefestämme transformiert und es wurden jeweils drei biologische Replikate ( $n = 3$ ) analysiert. Als Negativkontrolle diente der Grundvektor YEp352 (s. Abb. 4).





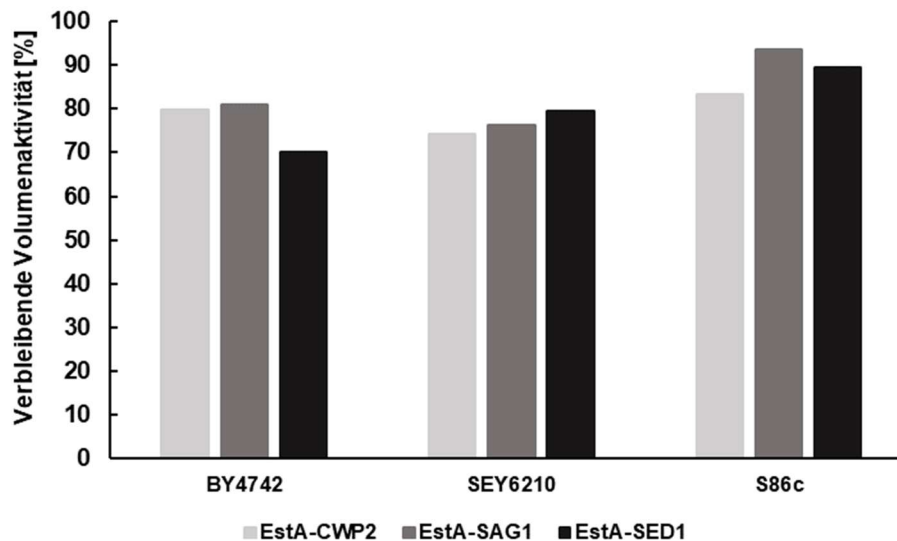
**Abb. 4: Volumenaktivitäten N-terminal verankerter EstA-Fusionskonstrukte in unterschiedlichen *S. cerevisiae*-Stämmen.** Die N-terminalen Fusionskonstrukte der EstA aus *B. gladioli* mit den Ankerproteinen Cwp2p, Sag1p und Sed1p wurden im pFB2-Vektor in die Stämme BY4742, S86c und SEY6210 transformiert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor YEp352 genutzt. Die Bestimmung der Volumenaktivität [mU/ml] erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten ( $n = 3$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden.

Im BY4742-Stamm zeigten die Fusionskonstrukte der EstA mit Cwp2p (798,3 mU/ml) und Sed1p (780,2 mU/ml) die höchsten Volumenaktivitäten, wobei für Sag1p lediglich eine Volumenaktivität von 517,0 mU/ml festgestellt werden konnte. Für „EstA-CWP2“ konnte in S86c mit 1.864,2 mU/ml die höchste Volumenaktivität gemessen werden. Bei den Ankerproteinen Sag1p (993,3 mU/ml) und Sed1p (952,2 mU/ml) traten zueinander ähnliche Volumenaktivitäten auf. Der Hefestamm SEY6210 zeigte im Vergleich zu den weiteren Hefestämmen die niedrigsten EstA-Volumenaktivitäten. Für das Zellwandprotein Sed1p wurde die höchste Aktivität mit 762,0 mU/ml bestimmt, wobei die weiteren Fusionsproteine Volumenaktivitäten von 653,1 mU/ml (Cwp2p) und 435,4 mU/ml (Sag1p) aufwiesen. Die YEp352-Negativkontrolle zeigte in allen Hefestämmen vergleichbar niedrige Volumenaktivitäten mit 108,8 mU/ml für BY4742, 122,4 mU/ml für S86c und 108,8 mU/ml für SEY6210. Die höchste Volumenaktivität der EstA konnte für den Zellwandanker Cwp2p im Hefestamm S86c beobachtet werden, wobei in diesem Stamm auch für alle betrachteten Ankerproteine höhere Volumenaktivitäten festgestellt wurden. Die Verankerung der EstA über Cwp2p stellte sich – abgesehen vom SEY6210-Stamm – am effizientesten dar,

---

wohingegen die Volumenaktivitäten der Sag1p-Konstrukte außer in S86c im Vergleich zu Cwp2p und Sed1p deutlich niedriger waren (s. Abb. 4).

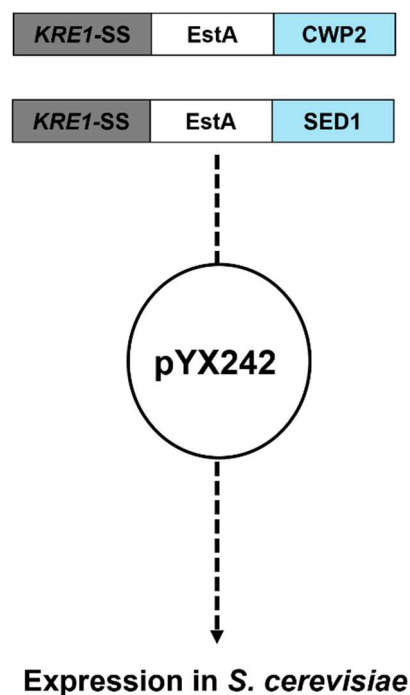
Zum Nachweis der Verankerung der EstA-Fusionskonstrukte über Cwp2p, Sag1p und Sed1p in der Zellwand von *S. cerevisiae* wurde eine Zellwandisolation mit darauffolgender Glukanase-Behandlung in den Hefestämmen BY4742, SEY6210 und S86c durchgeführt. Hierzu wurden die transformierten Hefezellen mithilfe eines mechanischen Zellaufschlusses mit Glasperlen aufgeschlossen und die Zellwände nach mehreren Waschschritten isoliert. Anschließend wurden die Zellwände mit einer Laminarinase aus *Trichoderma* sp. inkubiert, welche die  $\beta$ -1,3-glykosidischen Bindungen der Zellwandproteine spalten und somit zu einer verringerten EstA-Aktivität im EstA-Assay führen sollte. In Abb. 5 sind die verbleibenden Volumenaktivitäten der isolierten Zellwände der Hefestämme BY4742, SEY6210 und S86c nach Laminarinase-Behandlung dargestellt, welche die Fusionskonstrukte „EstA-CWP2“, „EstA-SAG1“ und „EstA-SED1“ im pFB2-Vektor exprimieren. Zur Vergleichbarkeit wurden die Volumenaktivitäten nach und vor Glukanase-Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Für jedes Fusionskonstrukt wurden drei biologische Replikate ( $n = 3$ ) betrachtet und es wurde der Leervektor YEp352 als Kontrolle mitgeführt, deren Volumenaktivitäten in Abb. 33-35 im Anhang aufgeführt sind.



**Abb. 5: Verbleibende Volumenaktivitäten N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in isolierten Zellwänden unterschiedlicher *S. cerevisiae*-Stämme nach Glukanase-Behandlung.** Die N-terminalen Fusionskonstrukte der EstA aus *B. gladioli* mit den Ankerproteinen Cwp2p, Sag1p und Sed1p wurden im pFB2-Vektor in die Stämme BY4742, SEY6210 und S86c transformiert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor YEp352 genutzt. Die Zellwände wurden mithilfe eines mechanischen Zellaufschlusses mit Glasperlen und PMSF isoliert. Zum Verdau der  $\beta$ -glykosidischen Bindungen wurde als  $\beta$ -1,3-Glukanase eine Laminarinase aus *Trichoderma* sp. (0,15 U) eingesetzt. Die Bestimmung der Volumenaktivität [mU/ml] vor und nach Glukanase-Behandlung erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min (s. Abb. 33-35 im Anhang). Dargestellt sind die verbleibenden Volumenaktivitäten der EstA-Fusionsproteine als Verhältnis der Volumenaktivitäten nach und vor Glukanase-Verdau [%] von drei biologischen Replikaten ( $n = 3$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden. Aufgrund der prozentualen Angabe der verbleibenden Volumenaktivitäten wurde hier auf eine Darstellung der Standardabweichungen verzichtet, die jedoch für die jeweiligen Hefestämme in Abb. 33-35 im Anhang aufgeführt sind.

Nach Laminarinase-Behandlung konnten für den Hefestamm BY4742 verbleibende Volumenaktivitäten von 79,7 % für „EstA-CWP2“, 81,1 % für „EstA-SAG1“ und 70,1 % für „EstA-SED1“ festgestellt werden. In SEY6210 wies die über Cwp2p verankerte EstA eine verbleibende Volumenaktivität von 74,1 % auf, wohingegen die Glukanase-Behandlung zu verbleibenden Volumenaktivitäten von 76,3 % für Sag1p und 79,6 % für Sed1p führte. Im S86c-Stamm traten im Vergleich zu den beiden anderen Hefestämmen die höchsten verbleibenden Volumenaktivitäten mit 83,2 % für Cwp2p, 93,6 % für Sag1p und 89,6 % für Sed1p auf. Durch die Verringerung der EstA-Aktivität nach Laminarinase-Behandlung konnte in allen Hefestämmen auf eine Verankerung des Enzyms über die drei Zellwandankerproteine Cwp2p, Sag1p und Sed1p in der Zellwand geschlossen werden (s. Abb. 5).

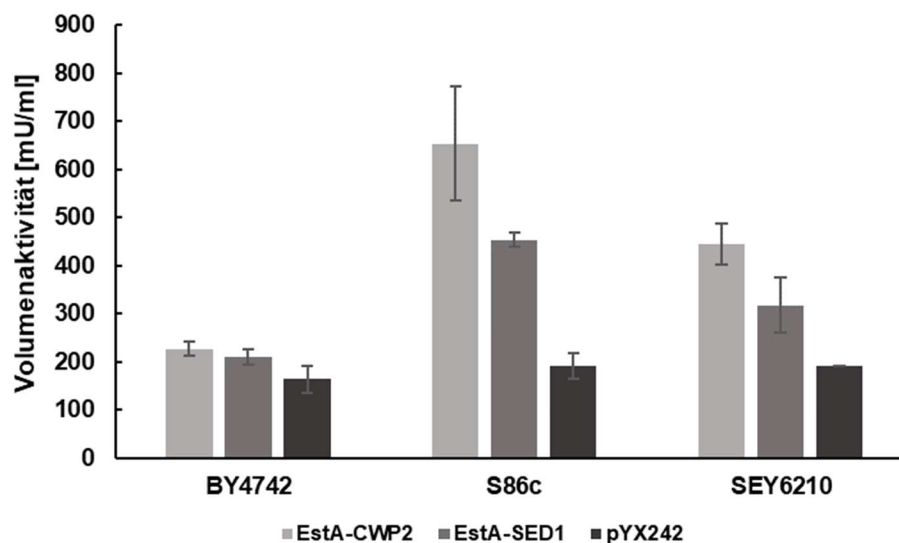
Zusätzlich zur Expression der N-terminalen EstA-Fusionskonstrukte im pFB2 wurden die zwei Konstrukte mit der höchsten Volumenaktivität („EstA-CWP2“ und „EstA-SED1“) mittels „In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning“ in den pYX242-Vektor kloniert, der einen konstitutiven *TPI*-Promotor besitzt. Dieser Vektor wurde aufgrund des enthaltenen *LEU2*-Selektionsmarkers genutzt, um im späteren Verlauf der Experimente Koexpressionen mit unterschiedlichen ER-Chaperonen zu ermöglichen. Die Einflüsse des Vektors auf die Zellwandverankerung sollten nach Transformation in *S. cerevisiae* im EstA-Assay bestimmt werden (s. Abb. 6).



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der zur N-terminalen Immobilisierung der Esterase A verwendeten Fusionskonstrukte im pYX242-Vektor. Die Fusionskonstrukte bestehen aus einer *KRE1*-Signalsequenz („*KRE1-SS*“), der EstA aus *B. gladioli* und den Ankerproteinen Cwp2p und Sed1p. Die direkten Fusionskonstrukte wurden mittels „In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning“ in den pYX242-Vektor kloniert und zur Zelloberflächenexpression in *S. cerevisiae* transformiert.

Die Fusionskonstrukte aus der Esterase A und den Zellwandproteinen Cwp2p und Sed1p sowie der pYX242-Leervektor wurden in die *S. cerevisiae*-Stämme BY4742, S86c und SEY6210 transformiert. Zur Bestimmung der Volumenaktivität wurden jeweils drei biologische Replikate ( $n = 3$ ) betrachtet und die entsprechenden Mittelwerte mit Standardabweichungen sind in Abb. 7 dargestellt. Der BY4742-Stamm zeigte für die Fusionskonstrukte mit den Ankerproteinen Cwp2p (226,8 mU/ml) und Sed1p (208,6 mU/ml) im Vergleich zum Leervektor nur leicht erhöhte Volumenaktivitäten (pYX242;

163,3 mU/ml). Die höchsten Volumenaktivitäten traten im S86c-Stamm für die EstA-Fusion mit Cwp2p mit 653,1 mU/ml und Sed1p mit 453,6 mU/ml auf, wohingegen die Volumenaktivität der mit dem Leervektor transformierten Hefezellen bei 190,5 mU/ml lag. Für „EstA-CWP2“ konnte eine Volumenaktivität von 444,5 mU/ml und für „EstA-SED1“ von 317,5 mU/ml im SEY6210-Stamm gemessen werden. Die pYX242-Negativkontrolle zeigte eine niedrigere Volumenaktivität von 190,5 mU/ml (s. Abb. 7). Im Vergleich mit den Ergebnissen der Oberflächenexpression im pFB2-Vektor fiel auf, dass die Volumenaktivitäten der Fusionskonstrukte in den betrachteten Hefestämmen für die Expression im pYX242-Vektor unter Kontrolle des *TPI*-Promotors niedriger waren (vgl. Abb. 4).

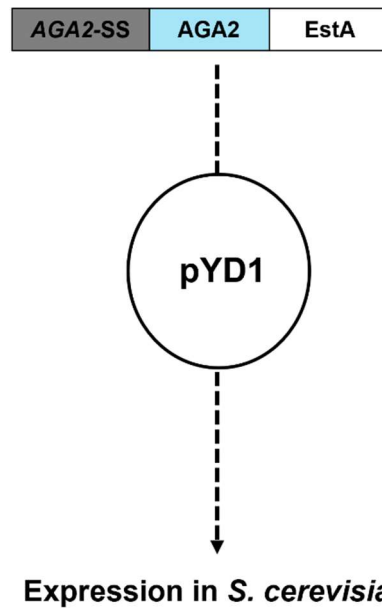


**Abb. 7: Volumenaktivitäten N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in unterschiedlichen *S. cerevisiae*-Stämmen nach Expression im pYX242-Vektor.** Die N-terminalen Fusionskonstrukte der EstA aus *B. gladioli* mit den Ankerproteinen Cwp2p und Sed1p wurden im pYX242-Vektor in die Stämme BY4742, S86c und SEY6210 transformiert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pYX242 genutzt. Die Bestimmung der Volumenaktivität [mU/ml] erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten ( $n = 3$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden.

### 3.1.2 Zelloberflächenexpression C-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in *S. cerevisiae*

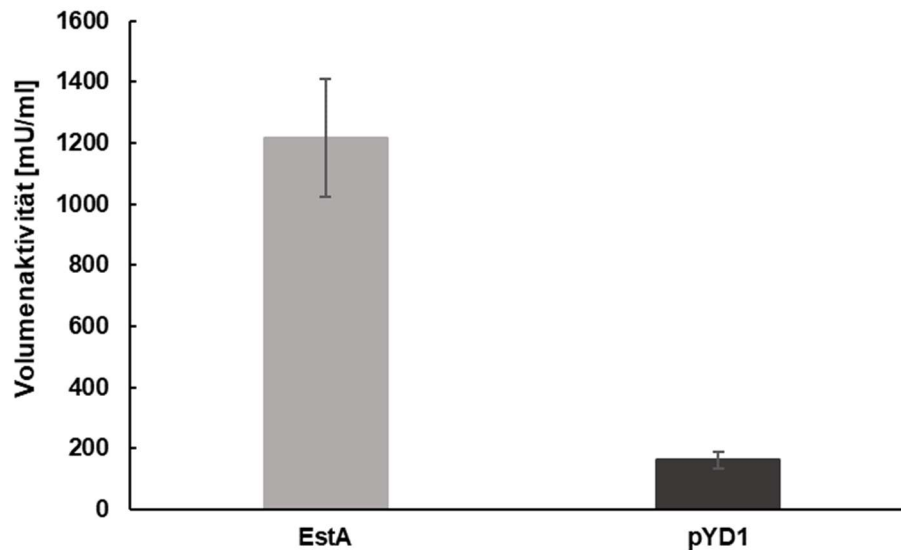
Neben der N-terminalen Verankerung der EstA aus *B. gladioli* wurde eine C-terminale Verankerung über das Aga1p-Aga2p-System in *S. cerevisiae* untersucht. Hierzu wurde ein Fusionskonstrukt im pYD1-Vektor mittels „In-Fusion® HD Cloning“ generiert, welches aus der *AGA2*-Signalsequenz, Aga2p und der EstA bestand. Durch die Expression im EBY100-Stamm, welcher das *AGA1*-Gen unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors

exprimiert, sollte das Fusionskonstrukt über die Ausbildung zweier Disulfidbrücken zwischen Aga1p und Aga2p auf der Zelloberfläche verankert werden (s. Abb. 2 und 8).



**Abb. 8: Schematische Darstellung des zur C-terminalen Immobilisierung der Esterase A verwendeten Fusionskonstrukts in *S. cerevisiae*.** Das Fusionskonstrukt besteht aus einer *AGA2*-Signalsequenz („*AGA2-SS*“), dem Ankerprotein Aga2p („*AGA2*“) und der EstA aus *B. gladioli*. Die EstA wurde mittels „In-Fusion® HD Cloning“ in den pYD1-Vektor kloniert und als Fusionskonstrukt zur Zelloberflächenexpression im *S. cerevisiae*-Stamm EBY100 exprimiert, in welchem die Expression des *AGA1*-Gens unter der Kontrolle eines induzierbaren *GALI*-Promotors steht und die indirekte Immobilisierung des Fusionskonstrukts aus Aga2p und EstA ermöglicht (s. Abb. 2).

Zur Analyse der Volumenaktivität der über Aga1p-Aga2p-verankerten EstA wurden die Hefezellen über Nacht in Glukose-haltigem Trp d/o-Medium bei 30 °C kultiviert, in Galaktose-haltiges Medium geschiftet und 6 d bei 20 °C unter Schütteln induziert. Als Kontrolle dienten mit dem pYD1-Leervektor transformierte Hefezellen. Es wurden jeweils drei biologische Replikate (n = 3) in Dreifachbestimmungen analysiert. Die Mittelwerte der Volumenaktivitäten mit Standardabweichungen sind in Abb. 9 dargestellt. Für die EstA-exprimierenden Hefezellen konnte eine Volumenaktivität von 1.215,5 mU/ml festgestellt werden. Die mit der pYD1-Negativkontrolle transformierten Hefen zeigten eine Volumenaktivität von 193,1 mU/ml (s. Abb. 9). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte neben einer N-terminalen auch eine erfolgreiche C-terminale Verankerung der EstA im EBY100-Stamm erstmalig demonstriert werden, was sich als weitere effiziente Art der EstA-Verankerung erwies.

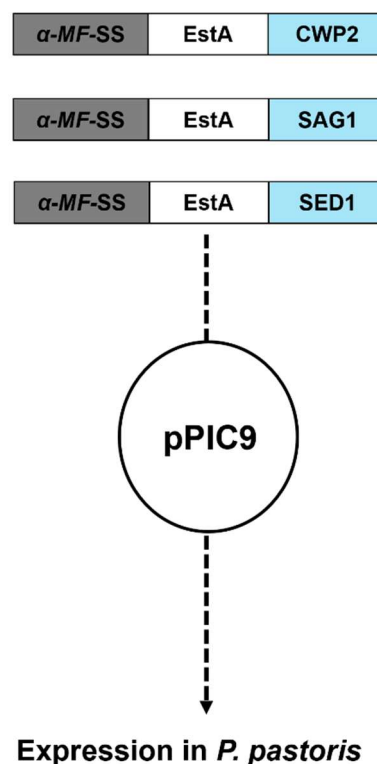


**Abb. 9: Volumenaktivität der über das Aga1p-Aga2p-System verankerten EstA in *S. cerevisiae*.** Das C-terminale Fusionskonstrukt der EstA aus *B. gladioli* mit dem Ankerprotein Aga2p wurde im pYD1-Vektor in den EBY100-Stamm transformiert. Die Transformanten wurden in Trp d/o-Glukose-Medium über Nacht bei 30 °C kultiviert, in Galaktose-haltiges Medium geshiftet und für 6 d bei 20 °C unter Schütteln induziert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pYD1 genutzt. Die Bestimmung der Volumenaktivität [mU/ml] erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten ( $n = 3$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden.

### 3.1.3 Zelloberflächenexpression N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in *P. pastoris*

Die neben *S. cerevisiae* am meisten zum Zelloberflächendisplay eingesetzte Hefegattung stellt *P. pastoris* dar, welche einen methylotrophen Stoffwechsel besitzt und in hohen Zelldichten wachsen kann (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Cereghino & Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Juturu & Wu, 2018). In *P. pastoris* konnte bereits eine Vielzahl an Proteinen produziert und auch immobilisiert werden (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Baghban *et al.*, 2019). Neben den aus *P. pastoris* stammenden Zellwandankerproteinen wurden in den Expressionssystemen vor allem die bereits in *S. cerevisiae* erfolgreich eingesetzten Zellwandankerproteine genutzt, welche auch in der vorliegenden Dissertation in Form von Cwp2p, Sag1p und Sed1p betrachtet wurden (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Zhang *et al.*, 2013). Die Einflüsse der Expression in der methylotrophen Hefegattung *P. pastoris* auf die N-terminale Zellwandverankerung der EstA sollten im Folgenden analysiert werden, wobei die Expression mithilfe des im „*Pichia* Expression Kit“ (Invitrogen) erhältlichen pPIC9-Vektors durchgeführt wurde. Eine Untersuchung der C-terminalen Verankerung der EstA mittels Aga1p-Aga2p war nicht möglich, da kein kommerziell erhältlicher Hefestamm mit induzierbarer Aga1p-Expression

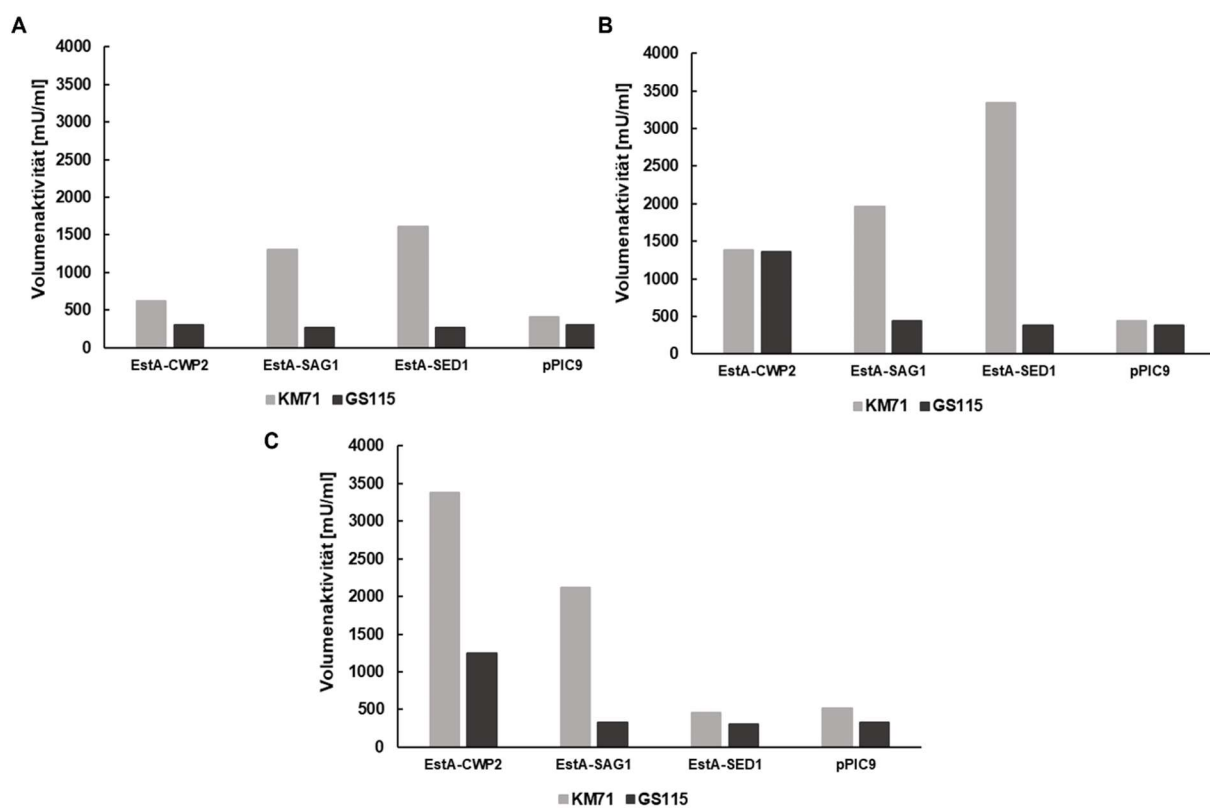
verfügbar war. Zur Bestimmung der Volumenaktivität der zellwandverankerten EstA wurden die N-terminalen Fusionskonstrukte mit den Zellwandankerproteinen im pPIC9-Vektor in den *P. pastoris*-Stämmen KM71 und GS115 exprimiert. Es wurde ein von Müller (2008) generiertes Konstrukt aus EstA und Cwp2p genutzt. Zusätzlich wurden die bereits im pFB2 vorliegenden Fusionskonstrukte aus EstA und Sag1p bzw. Sed1p mittels PCR ohne *KRE1*-Signalsequenz amplifiziert und als *EcoRI*/*AvrII*-Fragment in den pPIC9-Vektor kloniert, welcher über die Signalsequenz des  $\alpha$ -Mating-Faktors („ $\alpha$ -MF-SS“; 89 AS) verfügt. Für die Transformation über Elektroporation wurden die Expressionsvektoren anhand des „*Pichia* Expression Kits“ (Invitrogen) mit *StuI* im funktionellen *HIS4*-Gen des pPIC9-Vektors linearisiert, was zur Plasmidintegration über ein Crossover-Ereignis zwischen dem *HIS4*-Gen und dem defekten *his4*-Lokus ins *Pichia*-Chromosom führt. Die wildtypische Genkopie liegt somit in einem funktionellen Zustand vor und ermöglicht die Selektion als *HIS4*-Prototrophie-marker. Diese Art der Integration besitzt keinen Einfluss auf den *AOX1*-Lokus, weshalb die Hefestämme KM71 und GS115 keine Veränderungen in den Phänotypen der Methanolverwertung zeigen (KM71: His<sup>+</sup> Mut<sup>S</sup>; GS115: His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup>) (Diehl, 2008) (s. Abb. 10).



**Abb. 10:** Schematische Darstellung der zur N-terminalen Immobilisierung der Esterase A verwendeten Fusionskonstrukte in *P. pastoris*. Die Fusionskonstrukte bestehen aus der Signalsequenz des  $\alpha$ -Mating-Faktors („ $\alpha$ -MF-SS“; 89 AS), der EstA aus *B. gladioli* und den Ankerproteinen Sag1p, Sed1p und Cwp2p (Müller, 2008). Die direkten Fusionskonstrukte wurden in den pPIC9-Vektor kloniert und zur Zelloberflächenexpression in *P. pastoris* exprimiert.



Die Analyse der Zelloberflächenexpression der N-terminalen Fusionskonstrukte aus EstA und Cwp2p, Sag1p und Sed1p erfolgte in den *P. pastoris*-Stämmen KM71 und GS115 in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte. Nach erfolgreicher Selektion der Transformanten auf His d/o-Platten folgte eine Inkubation der Kolonien in Flüssigmedium über 24 h bei 30 °C. Hauptkulturen wurden in unterschiedlich gepuffertem BMG-Medium angeimpft (4 %) und über Nacht bei 26 bzw. 28 °C kultiviert. Die Induktion der Kulturen erfolgte nach Shiften der Zellpellets in gepuffertes BMM-Medium über 4-5 d bei 26 bzw. 28 °C bei täglicher Zugabe von 0,5 % Methanol. Zur Pufferung der Medien wurden 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) (A) und 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0) (B und C) eingesetzt (s. Abb. 11).



**Abb. 11: pH-Wert-Abhängigkeit der Volumenaktivitäten N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in *P. pastoris*.** Die N-terminalen Fusionskonstrukte der EstA aus *B. gladioli* mit den Ankerproteinen Cwp2p, Sag1p und Sed1p wurden im pPIC9-Vektor in die Stämme KM71 und GS115 transformiert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pPIC9 genutzt. Die selektierten Hefezellen wurden zuerst für 24 h in BMG-Medium mit 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) (A) oder 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0) (B und C) kultiviert. Die Induktion in analog gepuffertem BMM-Medium erfolgte für 4 d bei 28 °C und 165 rpm (A und B) oder 5 d bei 26 °C und 165 rpm (C) mit 0,5 % Methanol. Die Bestimmung der Volumenaktivität [mU/ml] erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Volumenaktivitäten einzelner biologischer Replikate ( $n = 1$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden.

In Abb. 11 sind die Volumenaktivitäten der *P. pastoris*-Stämme KM71 und GS115 dargestellt, welche die N-terminalen Fusionskonstrukte der EstA mit den Zellwandankerproteinen Cwp2p, Sag1p und Sed1p sowie den pPIC9-Leervektor exprimierten. Zur Ermittlung der Volumenaktivitäten wurden einzelne Kolonien ( $n = 1$ ) analysiert, die in Dreifachbestimmungen gemessen wurden. Die „EstA-CWP2“-Transformanten zeigten bei einer Inkubation über 4 d in 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) bei 28 °C Volumenaktivitäten von 625,9 mU/ml für KM71 und 299,3 mU/ml für GS115. Die höchsten EstA-Volumenaktivitäten für dieses Puffersystem traten im KM71-Stamm für die Verankerung über Sed1p mit 1.606,6 mU/ml und Sag1p mit 1.306,2 mU/ml auf, während für die pPIC9-Negativkontrolle eine Volumenaktivität von 408,2 mU/ml festgestellt werden konnte. In GS115 lag für die Ankerproteine Sag1p und Sed1p eine deutlich niedrigere Volumenaktivität mit jeweils 272,1 mU/ml vor, die niedriger als die Volumenaktivität der pPIC9-Kontrolle (299,3 mU/ml) war (s. Abb. 11, A). Bei einer Pufferung mittels Kaliumphosphatpuffer (100 mM; pH 6,0) über 4 d bei 28 °C zeigte das „EstA-SED1“-Konstrukt im KM71-Stamm mit 3.347,2 mU/ml die höchste Volumenaktivität. Im Gegensatz dazu trat für die Sed1p-Verankerung in GS115 die niedrigste Volumenaktivität mit 381,0 mU/ml bei einem pH-Wert von 7,0 auf. Für das Fusionskonstrukt aus EstA und Cwp2p konnten in beiden Stämmen ähnliche Volumenaktivitäten festgestellt werden (KM71: 1.387,9 mU/ml bzw. GS115: 1.360,7 mU/ml). Die über Sag1p verankerte EstA zeigte eine Volumenaktivität in KM71 von 1.959,4 mU/ml und 435,4 mU/ml in GS115, während für die Negativkontrolle in KM71 eine Volumenaktivität von 435,4 mU/ml und 381,0 mU/ml in GS115 bestimmt werden konnte (s. Abb. 11, B). In Abhängigkeit des pH-Werts konnte die höchste Volumenaktivität für die über Sed1p verankerte EstA bei beiden Pufferlösungen und pH-Werten festgestellt werden. Zudem erwies sich die Zellwandverankerung im KM71-Stamm effektiver als im GS115-Stamm, während in KM71 für die Pufferung über den Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0) für alle Fusionskonstrukte höhere Volumenaktivitäten im Vergleich zur Pufferung über den Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 11, A und B).

Aufgrund der höheren Volumenaktivitäten der EstA für die Pufferung mittels Kaliumphosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6,0 wurde zusätzlich eine Induktion der Expression über 5 d bei 26 °C untersucht. Hier fiel auf, dass die höchste EstA-Volumenaktivität für die Cwp2p-Verankerung im KM71-Stamm vorlag (3.374,5 mU/ml), während im GS115-Stamm eine Volumenaktivität von 1.251,8 mU/ml für Cwp2p auftrat. Die weiteren Volumenaktivitäten im KM71-Stamm lagen bei 2.122,6 mU/ml für Sag1p, 462,6 mU/ml für Sed1p und 517,1 mU/ml für die pPIC9-Kontrolle. Im GS115-Stamm war

auffällig, dass sich für die Verankerung über Sag1p (326,6 mU/ml) und Sed1p (299,3 mU/ml) zum Leervektor (326,6 mU/ml) ähnliche Volumenaktivitäten zeigten (s. Abb. 11, C). Durch die Erhöhung der Induktionsdauer auf 5 d bei gleichzeitiger Verringerung der Temperatur auf 26 °C ergab sich im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen eine deutliche Erhöhung der Volumenaktivität des „EstA-CWP2“-Konstrukts im KM71-Stamm. Die Volumenaktivität des „EstA-SED1“-Konstrukts, welches bei einer Induktionstemperatur von 28 °C die höchste Volumenaktivität aufwies, sank hingegen auf das Niveau der Leervektor-Kontrolle. Für die Verankerung der EstA über Sag1p traten unabhängig von den Induktionsbedingungen ähnliche Volumenaktivitäten in KM71 auf. Die veränderten Expressionsbedingungen hatten auf die Zelloberflächenexpression der Fusionskonstrukte im GS115-Stamm keinen merklichen Einfluss (s. Abb. 11, B und C). Somit konnte für die N-terminale EstA-Expression in *P. pastoris* festgestellt werden, dass die Immobilisierung mit den drei Ankerproteinen Cwp2p, Sag1p und Sed1p erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Die Verankerungseffizienzen der Ankerproteine waren jedoch stark vom Stammhintergrund, von der Pufferung des Mediums, der Induktionstemperatur und -dauer abhängig, was zum Teil deutliche Unterschiede in den EstA-Aktivitäten bedingte.

### **3.2 Optimierung der Zelloberflächenimmobilisierung in *S. cerevisiae* mithilfe von synthetischer Biologie**

Im weiteren Verlauf bestand das Ziel darin, die N-terminale Oberflächenexpression der EstA in *S. cerevisiae* durch unterschiedliche Ansätze der synthetischen Biologie zu optimieren. Hierzu wurde die EstA-Expression in acht unterschiedlichen Deletionsmutanten von Komponenten der Hefezellwand untersucht, um mögliche Einflüsse der veränderten Zellwandstruktur auf die EstA-Aktivität zu analysieren. Zusätzlich wurden Fusionskonstrukte erstellt, welche zwei unterschiedliche Linkersequenzen zwischen Enzym und Ankerprotein besaßen, was mögliche sterische Einflüsse in der Zellwand verringern und die extrazelluläre Substratzugänglichkeit erhöhen sollte. Auswirkungen auf die EstA-Aktivität durch eine erhöhte Proteinfaltung wurden durch die Koexpression eines UPR-Regulatorproteins und drei unterschiedlichen ER-Chaperonen betrachtet. In den vorangegangenen Experimenten stand die Expression der Fusionskonstrukte entweder unter der Kontrolle eines *PGK1*- bzw. *TPI*-Promotors, weshalb die Effekte von 19 unterschiedlichen Promotoren und sechs Terminatoren auf die EstA-Verankerung untersucht wurden. Im Folgenden wurden ausschließlich die Fusionskonstrukte aus EstA und Cwp2p bzw. Sed1p in den Enzym-Assays

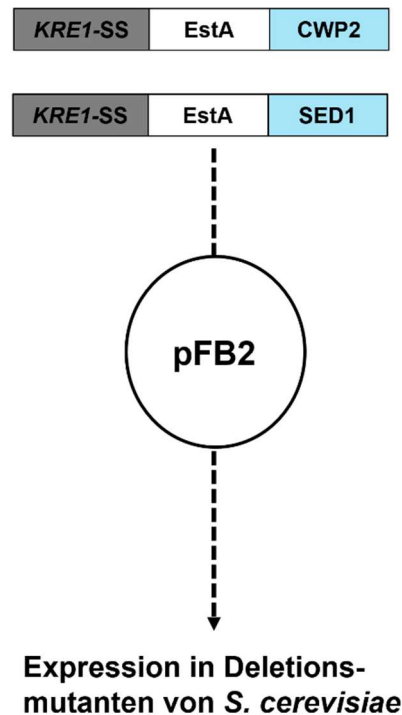
---

betrachtet, weil das „EstA-SAG1“-Konstrukt in den vorangegangenen Experimenten die niedrigste Volumenaktivität der drei betrachteten N-terminalen Fusionskonstrukte zeigte.

### 3.2.1 Zelloberflächenimmobilisierung der EstA in Deletionsmutanten der Zellwand

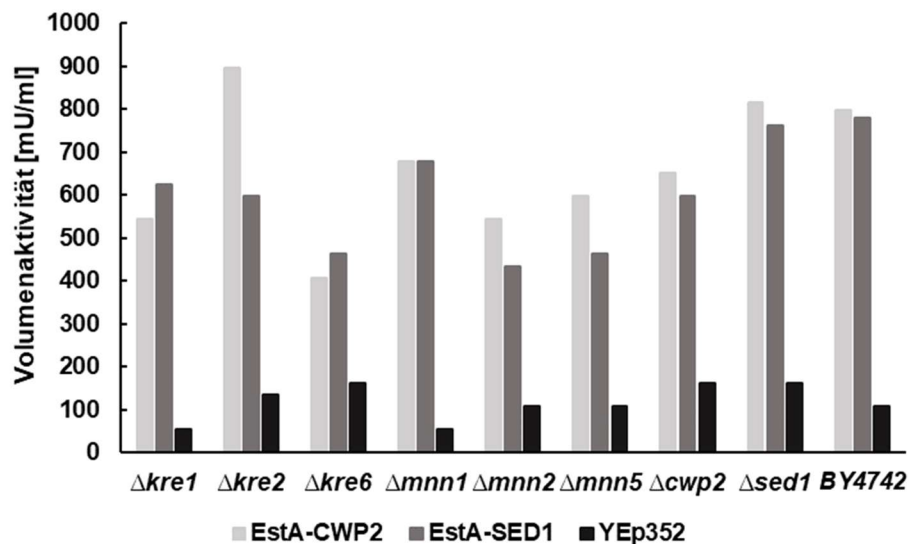
Die Effizienz der Zellwandimmobilisierung der EstA wurde in Abhängigkeit der Deletion verschiedener Gene, deren Genprodukte zentrale Zellwandkomponenten darstellen bzw. für deren Synthese verantwortlich sind, analysiert. Von den Vertretern der *KRE*-Familie („Killertoxin resistent“) wurden *Kre1p*, *Kre2p* und *Kre6p* deletiert, die maßgeblich an der Zellwandzusammensetzung und Resistenz gegenüber dem K1-Killertoxin beteiligt sind (Boone *et al.*, 1990; Hill *et al.*, 1992; Hutchins & Bussey, 1983). Neben den Vertretern der *KRE*-Familie wurden die Effekte der Deletionen von *Mnn1p*, *Mnn2p* und *Mnn5p* der *MNN*-Familie untersucht, die für im Golgi-Apparat lokalisierte Mannosyltransferasen kodieren, welche  $\alpha$ -1,2- bzw.  $\alpha$ -1,3-Mannosylierungen von N- und O-Glykoproteinen durchführen (Graham *et al.*, 1994; Lussier *et al.*, 1999; Raschke *et al.*, 1973; Rayner & Munro, 1998; Yip *et al.*, 1994). Zusätzlich wurden Deletionsmutanten der Zellwandproteine *Cwp2p* und *Sed1p* betrachtet, um durch die Deletion weiterer Zellwandproteine mehr Freiraum für die Zelloberflächenexpression der Fusionskonstrukte zu generieren, da diese einen Großteil der GPI-CWPs der Hefezellwand ausmachen (Van der Vaart *et al.*, 1995, 1997).

Wie zuvor erwähnt wurden die N-terminalen Fusionskonstrukte aus EstA und *Cwp2p* bzw. *Sed1p* im pFB2-Vektor in die acht Deletionsmutanten  $\Delta kre1$ ,  $\Delta kre2$ ,  $\Delta kre6$ ,  $\Delta mnn1$ ,  $\Delta mnn2$ ,  $\Delta mnn5$ ,  $\Delta cwp2$  und  $\Delta sed1$  des *S. cerevisiae*-Stamms BY4742 transformiert. Aufgrund der ausschließlichen Verfügbarkeit der Deletionsmutanten im BY4742-Stammhintergrund konnten die folgenden Untersuchungen nur in Abhängigkeit dieses Stamms durchgeführt werden. Die Effekte der Deletion der unterschiedlichen Zellwandkomponenten auf die EstA-Aktivität wurden fotometrisch bestimmt (s. Abb. 12).



**Abb. 12:** Schematische Darstellung der zur N-terminalen Immobilisierung der Esterase A verwendeten Fusionskonstrukte in Zellwand-Deletionsmutanten. Die Fusionskonstrukte bestehen aus einer *KRE1*-Signalsequenz („*KRE1*-SS“), der EstA aus *B. gladioli* sowie den Ankerproteinen Cwp2p und Sed1p. Sie wurden im pFB2 zur Zelloberflächenexpression in acht unterschiedliche Zellwand-Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* transformiert.

Die Volumenaktivitäten der in den Deletionsmutanten  $\Delta kre1$ ,  $\Delta kre2$ ,  $\Delta kre6$ ,  $\Delta mnn1$ ,  $\Delta mnn2$ ,  $\Delta mnn5$ ,  $\Delta cwp2$  und  $\Delta sed1$  exprimierten Fusionskonstrukte aus EstA und den Zellwandankern Cwp2p bzw. Sed1p sowie des YEp352-Leervektors sind in Abb. 13 dargestellt. Für jede Kombination aus Fusionskonstrukt und Deletionsmutante wurde ein biologisches Replikat ( $n = 1$ ) analysiert, wobei die Messung der Volumenaktivität in Dreifachbestimmungen durchgeführt wurde. Zum Vergleich sind auch die entsprechenden Volumenaktivitäten im Wildtyp-Stamm BY4742 aus Abb. 4 dargestellt.



**Abb. 13: Volumenaktivitäten N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in unterschiedlichen Zellwand-Deletionsmutanten von *S. cerevisiae*.** Die N-terminalen Fusionskonstrukte der EstA aus *B. gladioli* mit den Ankerproteinen Cwp2p und Sed1p wurden im pFB2-Vektor in den Wildtyp und die Zellwand-Deletionsmutanten  $\Delta kre1$ ,  $\Delta kre2$ ,  $\Delta kre6$ ,  $\Delta mnn1$ ,  $\Delta mnn2$ ,  $\Delta mnn5$ ,  $\Delta cwp2$  und  $\Delta sed1$  des *S. cerevisiae*-Stamms BY4742 transformiert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor YEp352 genutzt. Die Bestimmung der Volumenaktivität [mU/ml] erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Volumenaktivitäten einzelner biologischer Replikate ( $n = 1$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden. Zusätzlich sind zum Vergleich die entsprechenden Volumenaktivitäten des transformierten Wildtyp-Stamms BY4742 aus Abb. 4 aufgeführt.

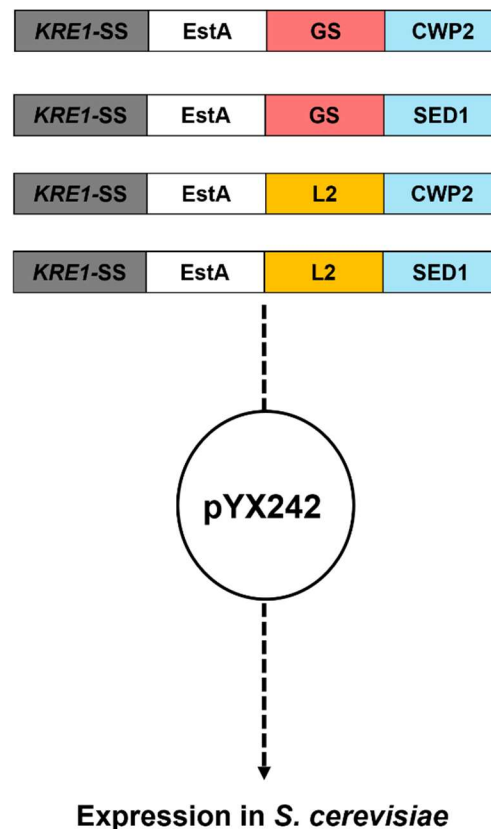
In der  $\Delta kre1$ -Deletionsmutante konnte für die Cwp2p-verankerte EstA eine Volumenaktivität von 544,3 mU/ml und 625,9 mU/ml für die Sed1p-Verankerung nachgewiesen werden, während bei der YEp352-Kontrolle eine Volumenaktivität von 54,4 mU/ml vorlag. In der  $\Delta kre2$ -Deletionsmutante trat die hier höchste Volumenaktivität von 898,0 mU/ml für das „EstA-CWP2“-Konstrukt auf. Das „EstA-SED1“-Konstrukt wies eine Volumenaktivität von 598,7 mU/ml auf und die Negativkontrolle zeigte eine niedrigere Volumenaktivität von 136,1 mU/ml. Die  $\Delta kre6$ -Deletionsmutante erwies sich im vorliegenden Experiment als der Stamm mit der geringsten Effizienz in der Zellwandverankerung, da hier Volumenaktivitäten von 408,2 mU/ml für „EstA-CWP2“, 462,6 mU/ml für „EstA-SED1“ und 163,3 mU/ml für „YEp352“ auftraten. In den  $\Delta mnn$ -Deletionsmutanten traten die höchsten Volumenaktivitäten mit 680,3 mU/ml für „EstA-CWP2“ und „EstA-SED1“ sowie 54,4 mU/ml für die Negativkontrolle in  $\Delta mnn1$  auf, während in  $\Delta mnn2$  („EstA-CWP2“: 544,3 mU/ml; „EstA-SED1“: 435,4 mU/ml; „YEp352“: 108,9 mU/ml) und  $\Delta mnn5$  („EstA-CWP2“: 598,7 mU/ml; „EstA-SED1“: 462,6 mU/ml; „YEp352“: 108,9 mU/ml) ähnliche Volumenaktivitäten

gemessen wurden. Für den  $\Delta cwp2$ -Deletionsstamm konnten für die über Cwp2p verankerte EstA eine Volumenaktivität von 653,1 mU/ml und für die über Sed1p verankerte EstA von 598,7 mU/ml festgestellt werden. Die  $\Delta sed1$ -Deletionsmutante zeigte Volumenaktivitäten von 816,4 mU/ml für „EstA-CWP2“ und 762,0 mU/ml für „EstA-SED1“. Die Volumenaktivität der Negativkontrolle lag in den  $\Delta cwp2$ - und  $\Delta sed1$ -Deletionsmutanten bei 163,3 mU/ml. Im Vergleich zu den Volumenaktivitäten im BY4742-Wildtypstamm lagen die Volumenaktivitäten für die Sed1p verankerte EstA in allen Deletionsstämmen unter dem Wildtyp. Für das Fusionskonstrukt aus EstA und Cwp2p konnte nur im  $\Delta kre2$ -Stamm eine leicht erhöhte Volumenaktivität gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden (s. Abb. 13). Es konnte demnach keine durchgängige Aktivitätssteigerung der EstA beobachtet werden, weshalb sich die Expression in den BY4742-Deletionsstämmen der Zellwandkomponenten nicht als vorteilhaft auf die Immobilisierungseffizienz der EstA erwies.

### 3.2.2 Zelloberflächenimmobilisierung von EstA-Fusionskonstrukten mit inserierten Linkersequenzen

Neben der Untersuchung der EstA-Expression in Abhängigkeit von Deletionen unterschiedlicher Zellwandkomponenten wurden die Einflüsse der Addition von Linkersequenzen zwischen Enzym und Ankersequenz analysiert. Die Linker sollen in den Fusionskonstrukten einen vergrößerten Abstand zwischen EstA und Zellwandanker herstellen, um die extrazelluläre Zugänglichkeit des Enzyms zum Substrat zu verbessern und eine mögliche sterische Hinderung der Domänen durch eine Erhöhung der Flexibilität zu verringern, um potenzielle Verluste der Enzymaktivität zu minimieren (Chen *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wurden zwei flexible Linker betrachtet, die aus kleinen, polaren (Glycin) und nicht-polaren Aminosäuren (Serin oder Threonin) bestehen. Einen dieser Linker stellt der „GS-Linker“ dar, welcher zu den am meisten genutzten Linkern gehört und sich durch ein  $(GGGGS)_n$ -Motiv mit einer anpassbaren Wiederholungszahl auszeichnet. Für die Analyse der EstA-Aktivität wurde ein „GS-Linker“ mit einer Größe von 17 AS und einem  $(GGGGS)_3$ -Motiv (ASGGGGSGGGGSGGGGS) gewählt, welcher einen Alanin-Rest zur Erhöhung der Flexibilität besaß (Argos, 1990; Chen *et al.*, 2013). Der zweite betrachtete Linker (hier als „L2“ bezeichnet) besitzt eine Sequenzlänge von 14 AS (EGKSSGSGSESKST) und wurde erstmalig zur Konstruktion von Antigen-Bindeproteinen genutzt. Dieser Linker besteht einerseits aus Glycin- und Serin-Resten zur Steigerung der Flexibilität und andererseits aus Glutamat- und Lysin-Resten, welche die Löslichkeit erhöhen sollen (Bird *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 2013).

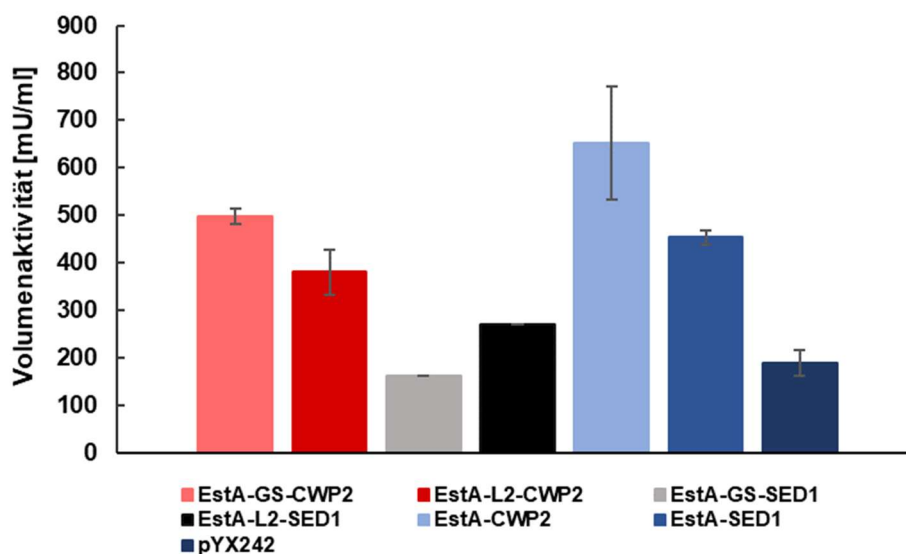
Zur Klonierung der Fusionskonstrukte mit inserierten Linkersequenzen wurden die ursprünglichen N-terminalen Fusionskonstrukte aus *KRE1*-Signalsequenz, EstA und Cwp2p bzw. Sed1p im pFB2-Vektor als Template für eine dreiteilige SOE-PCR eingesetzt, bei der entweder die Sequenz des „GS“- oder des „L2“-Linkers zwischen Enzym und Zellwandankerprotein eingefügt wurden. Die Fusionskonstrukte wurden mittels „In-Fusion® HD Cloning“ in den pYX242-Vektor kloniert und in *S. cerevisiae* transformiert. Für diese Fusionskonstrukte wurde der pYX242-Vektor gewählt, um im weiteren Verlauf der Experimente eine Koexpression mit den drei betrachteten ER-Chaperonen zu untersuchen, falls die Insertion von Linkersequenzen zwischen Enzym und Ankerprotein zu einer Steigerung der Volumenaktivität führen würde (s. Abb. 14).



**Abb. 14:** Schematische Darstellung der zur N-terminalen Immobilisierung der Esterase A verwendeten Fusionskonstrukte nach Modifikation mit Linkersequenzen. Die Fusionskonstrukte aus *KRE1*-Signalsequenz („*KRE1*-SS“), der EstA aus *B. gladioli* sowie den Ankerproteinen Cwp2p und Sed1p wurden mittels SOE-PCR mit einem Glycin-Serin-Linker (17 AS, „GS“) oder dem „L2“-Linker (14 AS) modifiziert. Die Fusionskonstrukte wurden mittels „In-Fusion® HD Cloning“ in den pYX242-Vektor kloniert und zur Zelloberflächenexpression in *S. cerevisiae* transformiert.



Die Zelloberflächenexpression der Fusionskonstrukte mit inserierten Linkersequenzen wurde anhand der EstA-Aktivität im *S. cerevisiae*-Stamm S86c untersucht, da sich dieser in den vorangegangenen Experimenten am effizientesten für die EstA-Verankerung erwies. Es wurden die Fusionskonstrukte aus EstA und Cwp2p bzw. Sed1p analysiert, die als Modifikationen entweder über den „GS“-Linker („EstA-GS-CWP2“ bzw. „EstA-GS-SED1“) oder den „L2“-Linker („EstA-L2-CWP2“ bzw. „EstA-L2-SED1“) verfügten. Zum Vergleich wurden die Volumenaktivitäten der entsprechenden Fusionskonstrukte ohne Linkersequenzen („EstA-CWP2“ und „EstA-SED1“) sowie des pYX242-Leervektors aus Abb. 7 betrachtet. Für jedes Konstrukt wurden drei biologische Replikate ( $n = 3$ ) analysiert, die in Dreifachbestimmungen gemessen wurden (s. Abb. 15).



**Abb. 15: Vergleich der Volumenaktivitäten N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte nach Modifikation mit Linkersequenzen.** Die Fusionskonstrukte der EstA aus *B. gladioli* mit den Ankerproteinen Cwp2p und Sed1p wurden mittels SOE-PCR mit den Linkersequenzen „GS“ und „L2“ zwischen Enzym und Ankerprotein modifiziert („EstA-GS-CWP2/-SED1“ und „EstA-L2-CWP2/-SED1“) und im pYX242-Vektor in den *S. cerevisiae*-Stamm S86c transformiert. Als Vergleich sind die Volumenaktivitäten der ursprünglichen Konstrukte („EstA-CWP2/-SED1“) und des Leervektors pYX242 aus Abb. 7 aufgeführt. Die Bestimmung der Volumenaktivität [mU/ml] erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten ( $n = 3$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden.

Bei der Zelloberflächenexpression der mit Linkersequenzen modifizierten Fusionskonstrukte konnten im S86c-Stamm für den Zellwandanker Cwp2p EstA-Volumenaktivitäten von 498,9 mU/ml für den „GS“-Linker und 381,0 mU/ml für den „L2“-Linker gemessen werden. Im Fall der Zellwandverankerung über Sed1p wurden Volumenaktivitäten von 163,3 mU/ml

für den „GS“-Linker und 272,1 mU/ml für den „L2“-Linker festgestellt. Der pYX242-Leervektor zeigte eine Volumenaktivität von 190,5 mU/ml. Beim Vergleich mit den Ergebnissen der Fusionskonstrukte ohne Linkersequenzen fiel auf, dass die Volumenaktivitäten für beide Zellwandanker („EstA-CWP2“: 653,1 mU/ml; „EstA-SED1“: 453,6 mU/ml) höher waren als bei den mit den „GS“- und „L2“-Linkern modifizierten Konstrukten (s. Abb. 15). Neben dem S86c-Stamm wurden die Fusionskonstrukte auch im BY4742-Stamm exprimiert. Auch hier zeigte keines der mit Linkersequenzen modifizierten Fusionskonstrukte eine Erhöhung der Volumenaktivitäten im Vergleich zu den Grundkonstrukten (Daten nicht gezeigt). Es konnte demnach für keinen der beiden Linker ein förderlicher Effekt auf die EstA-Immobilisierung festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde im Folgenden auch auf eine Koexpression mit den unter 3.2.3 untersuchten ER-Chaperonen zur gleichzeitigen Steigerung der Proteinbiosynthese verzichtet.

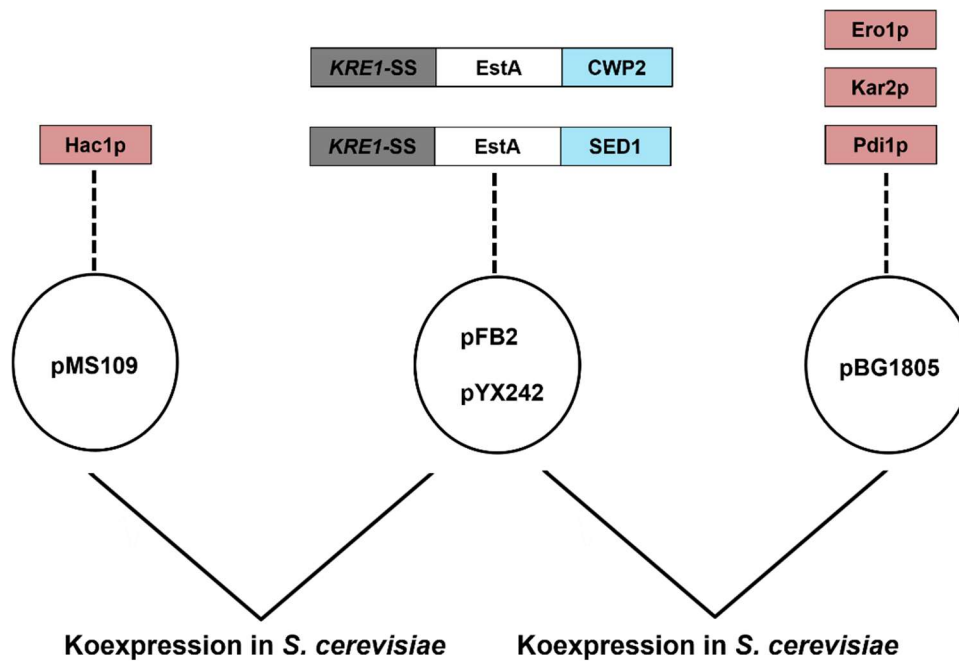
### **3.2.3 Effekte einer UPR-Aktivierung und gesteigerten Proteinbiosynthese auf die Zelloberflächenimmobilisierung der EstA**

Zur weiteren Untersuchung der N-terminalen Zelloberflächenimmobilisierung der EstA sollten die Effekte einer gesteigerten Proteinbiosynthese bzw. -faltung im ER durch die Koexpression des UPR-Regulatorproteins Hac1p sowie der drei ER-Chaperone Ero1p, Kar2p und Pdi1p untersucht werden. Hac1p ist ein Vertreter der bZIP-Familie („basic leucine zipper“) und fungiert als Transkriptionsfaktor für Gene, welche durch die UPR reguliert werden, indem er an die UPR-Elemente der jeweiligen Promotoren bindet und die Gentranskription von UPR-Komponenten induziert (Cox & Walter, 1996; Mori *et al.*, 1996; Nojima *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Expression von Hac1p in *S. cerevisiae* zu einer erhöhten Sekretion von heterolog exprimierten Proteinen aufgrund einer verstärkten Chaperonexpression führte, was anhand des Chaperons Kar2p nachgewiesen werden konnte (Cox *et al.*, 1993; Valkonen *et al.*, 2003). Die Einflüsse der Hac1p-Expression auf die Zelloberflächenexpression der EstA über Cwp2p und Sed1p wurden nach Breinig *et al.*, (2006) im *S. cerevisiae*-Stamm SEY6210 mithilfe des pMS109-Vektors untersucht, welcher zur Selektion einen *LEU2*-Marker besaß und dadurch die Koexpression des pFB2-Vektors mit *URA3*-Selektionsmarker ermöglichte. Hierzu wurden die bereits zuvor genutzten EstA-Fusionskonstrukte im pFB2-Vektor mit dem Hac1p-exprimierenden single-copy-Vektor pMS109 koexprimiert und anhand der Volumenaktivität im EstA-Assay fotometrisch analysiert (s. Abb. 16).

Des Weiteren wurden Auswirkungen der Koexpression der ER-Chaperone Ero1p, Kar2p und

---

Pdi1p auf die EstA-Immobilisierung betrachtet. Die Thioloxidase Ero1p ist als ER-residentes Enzym für die oxidative Proteinfaltung zuständig und an der Generierung von Disulfidbrücken beteiligt (Frand & Kaiser, 1998; Kim *et al.*, 2012; Pollard *et al.*, 1998). Als Vertreter der Hsp70-Familie ist die ATPase Kar2p in den Proteinimport ins ER involviert und hält ungefaltete Proteine in einem faltungskompetenten Zustand (Okamura *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 1989; Tokunaga *et al.*, 1992). Die Proteindisulfidisomerase Pdi1p katalysiert als multifunktionelle Oxidoreduktase die Ausbildung von Disulfidbrücken in sekretorischen Proteinen und Zelloberflächenproteinen sowie die Prozessierung fehlgefalteter Glykoproteine und ist zudem an der Aktivierung von Ero1p beteiligt (Farquhar *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2012; Laboissière *et al.*, 1995; Noiva & Lennarz, 1992; Pfeiffer *et al.*, 2016). Durch die Koexpression der drei Chaperone Ero1p, Kar2p und Pdi1p mit den Fusionskonstrukten aus *KRE1*-Signalsequenz, EstA und Cwp2p bzw. Sed1p sollte eine Steigerung der Enzymaktivität im EstA-Assay ausgelöst werden. Hierzu wurden die Chaperone im Gateway-Expressionsvektor pBG1805 exprimiert, der zur Selektion einen *URA3*-Marker besaß, weshalb die zuvor generierten EstA-Fusionskonstrukte im pYX242-Vektor mit *LEU2*-Marker zur Kotransformation in den *S. cerevisiae*-Stämmen BY4742, S86c und SEY6210 eingesetzt wurden (s. Abb. 16).



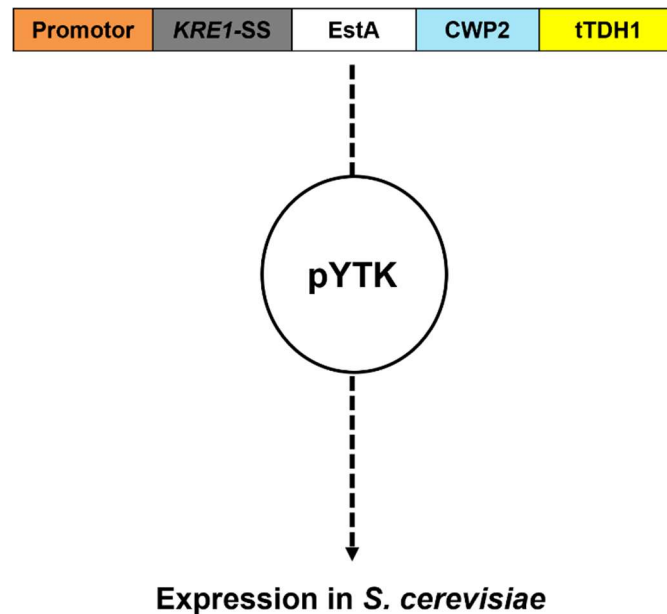
**Abb. 16:** Schematische Darstellung zur Untersuchung der Effekte des UPR-Regulatorproteins Hac1p und von ER-Chaperonen auf die Zellwandimmobilisierung der Esterase A. Die Fusionskonstrukte „EstA-CWP2“ und „EstA-SED1“ wurden einerseits im pFB2-Vektor mit dem Vektor pMS109 koexprimiert, welcher zur Expression des UPR-Regulatorproteins Hac1p in *S. cerevisiae* eingesetzt wird (Valkonen *et al.*, 2003). Andererseits wurden die Effekte der Koexpression der ER-Chaperone Ero1p, Kar2p und Pdi1p im pBG1805-Vektor auf die im pYX242 exprimierten „EstA-CWP2“- und „EstA-SED1“-Konstrukte in *S. cerevisiae* betrachtet.

Für die Kotransformationen der EstA-Fusionskonstrukte sowie des YEp352-Leervektors mit dem UPR-Regulatorprotein Hac1p wurden jeweils drei biologische Replikate ( $n = 3$ ) in Dreifachbestimmungen im EstA-Assay in SEY6210 analysiert. Bei allen betrachteten Kombinationen konnten nur Volumenaktivitäten bestimmt werden, die ähnlich zur Leervektor-Kontrolle waren und deutlich unter den Volumenaktivitäten der Einzel-Transformationen der EstA-Fusionskonstrukte lagen (Daten nicht gezeigt). Zur Analyse der Oberflächenimmobilisierung der EstA-Fusionskonstrukte in Abhängigkeit der Chaperone Ero1p, Kar2p und Pdi1p in den Hefestämmen BY4742, S86c und SEY6210 wurden aufgrund des induzierbaren *GALI*-Promotors im pBG1805-Vektor Volumenaktivitäten vor und nach Galaktose-Induktion bei drei biologischen Replikaten ( $n = 3$ ) in Dreifachbestimmungen gemessen. Als Kontrollen wurden Transformationen aller Einzel-Vektoren sowie Kotransformationen der Chaperon-tragenden pBG1805-Plasmide mit dem pYX242-Leervektor und Kotransformationen des pBG1805-Leervektors mit den Fusionskonstrukt-tragenden pYX242-Plasmiden und dem pYX242-Leervektor betrachtet. Auch hier konnte in keiner der Transformanten eine Steigerung der EstA-Volumenaktivitäten

festgestellt werden, da diese im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollen ebenfalls ähnliche Volumenaktivitäten aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Eine gesteigerte Proteinbiosynthese bzw. -faltung durch die Koexpression des UPR-Regulators Hac1p sowie der Chaperone Ero1p, Kar2p und Pdi1p hatte in keinem der getesteten Hefestämme einen positiven Effekt auf die Verankerungseffizienz der EstA-Fusionskonstrukte.

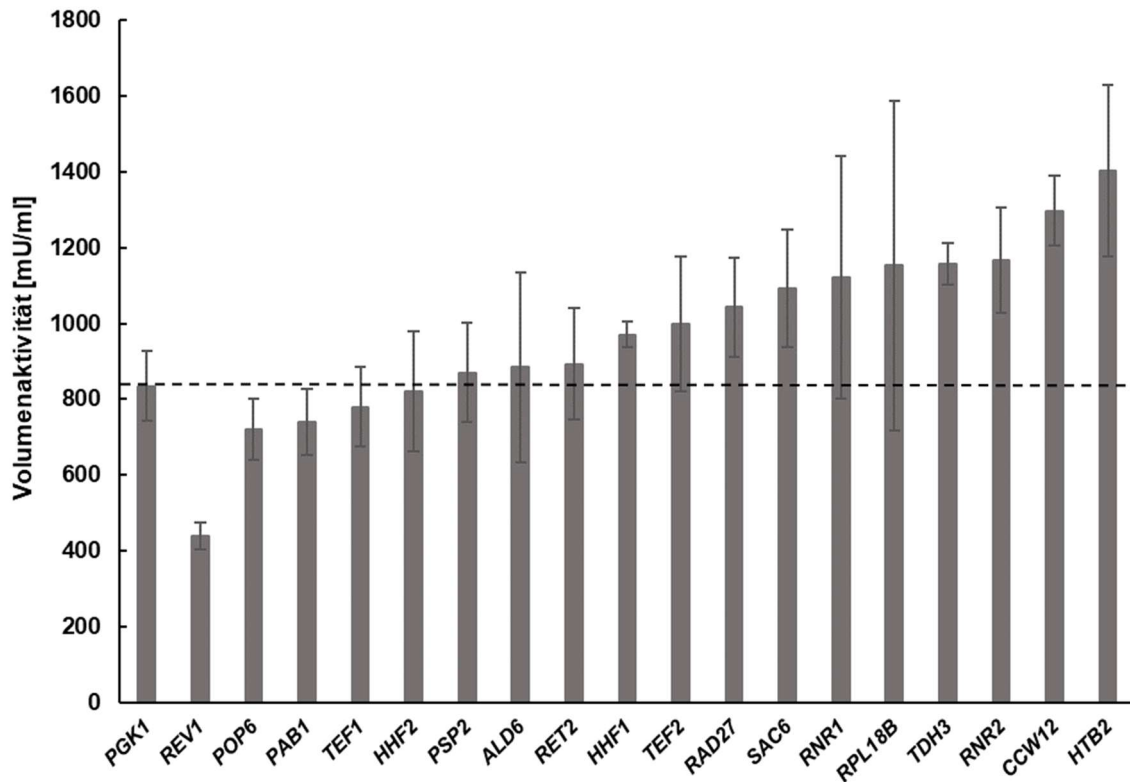
### **3.2.4 Effekte unterschiedlicher Promotoren und Terminatoren auf die Zelloberflächenimmobilisierung der EstA**

Als weitere Optimierungsstrategie zur Zelloberflächenimmobilisierung der EstA wurden die Effekte von 19 unterschiedlichen, konstitutiven Promotoren und sechs Terminatoren auf die N-terminale Zellwandverankerung der EstA aus *B. gladioli* untersucht. Im Folgenden wurde nur das Fusionskonstrukt aus *KRE1*-Signalsequenz, EstA und Cwp2p betrachtet, welches im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Fusionskonstrukten für die Expression in *S. cerevisiae* kodonoptimiert wurde, um eine weitere Steigerung der Enzymaktivität zu erzielen. Zur Generierung der Konstrukte wurde das „MoClo-YTK Plasmid Kit“ genutzt, welches eine modulare Klonierung in zwei aufeinander folgenden „Golden Gate-Assembly“-Reaktionen erlaubt, was die Herstellung der Fusionskonstrukte in Abhängigkeit der Promotoren und Terminatoren in den pYTK083-Vektor ermöglichte. Zu Beginn wurden Plasmide zur Expression in *S. cerevisiae* erstellt, in welchen das Fusionskonstrukt zunächst unter der Kontrolle der Promotoren *PGK1*, *REV1*, *POP6*, *PAB1*, *TEF1*, *HHF2*, *PSP2*, *ALD6*, *RET2*, *HHF1*, *TEF2*, *RAD27*, *SAC6*, *RNR1*, *RPL18B*, *TDH3*, *RNR2*, *CCW12* und *HTB2* in Kombination mit dem *TDH1*-Terminator stand (Lee *et al.*, 2015) (s. Abb. 17).



**Abb. 17: Schematische Darstellung des zur N-terminalen Immobilisierung der Esterase A verwendeten Fusionskonstrukts in Abhängigkeit von konstitutiven Promotoren.** Das Fusionskonstrukt aus *KRE1*-Signalsequenz („*KRE1-SS*“), *EstA* aus *B. gladioli* und dem Ankerprotein *Cwp2p* wurde mithilfe des „MoClo-YTK Plasmid Kits“ über zwei aufeinander folgende „Golden Gate-Assembly“-Reaktionen in den pYTK083-Vektor kloniert, um die Einflüsse von 19 konstitutiven Promotoren auf die Zelloberflächenimmobilisierung der *EstA* in *S. cerevisiae* zu analysieren. Als Terminator wurde der stärkste Terminator des Kits („tTDH1“) verwendet.

Die *EstA*-Expressionsanalyse in Abhängigkeit der 19 konstitutiven Promotoren und des *TDH1*-Terminators wurde im BY4742-Stamm durchgeführt. Im genutzten Kit war kein Leervektor enthalten, weshalb aufgrund der Nutzung des *PGKI*-Promotors für die Expression des ursprünglichen Fusionskonstrukts im pFB2-Vektor das Ergebnis des *PGKI*-Promotors im pYTK083-Vektor in Abb. 18 als Anhaltspunkt für einen Vergleich mit den weiteren Volumenaktivitäten herangezogen wurde (gestrichelte Linie) (vgl. Abb. 4). Dies war möglich, da ähnliche Volumenaktivitäten von 798,3 mU/ml (pFB2) und 834,5 mU/ml (pYTK083) auftraten, was trotz des unterschiedlichen Vektorrückgrats und der Kodonoptimierung der *EstA*-Sequenz keinen direkten Effekt auf die Enzymaktivität besaß (s. Abb. 4 und 18). Für jedes Expressionsplasmid mit den unterschiedlichen Promotoren wurden sechs biologische Replikate ( $n = 6$ ) in Dreifachbestimmungen analysiert, da im Vergleich zu den zuvor genutzten Fusionskonstrukten zum Teil größere Unterschiede in den Volumenaktivitäten zwischen den Replikaten auftraten. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Promotoren sind in Abb. 18 anhand der Mittelwerte der Volumenaktivitäten in aufsteigender Reihenfolge dargestellt.

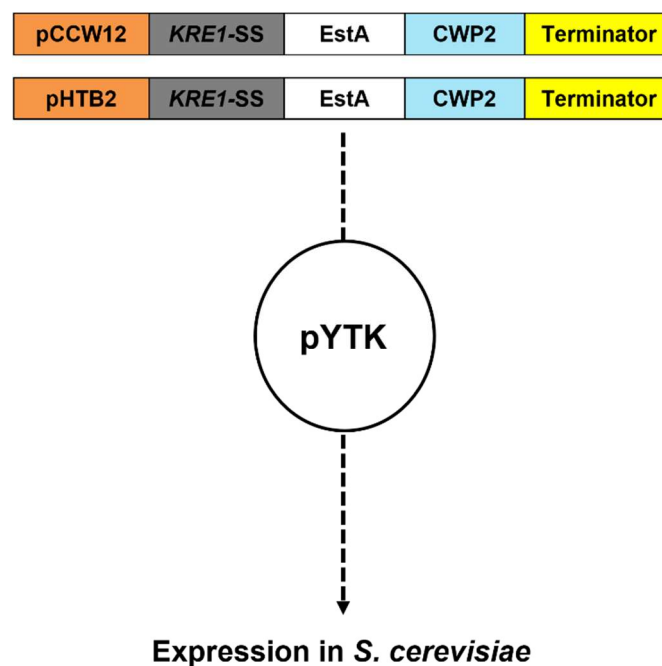


**Abb. 18: Vergleich der Volumenaktivitäten eines N-terminalen EstA-Fusionskonstrukts in Abhängigkeit von konstitutiven Promotoren.** Mithilfe des „MoClo-YTK Plasmid Kits“ wurden Expressionsvektoren mit einem N-terminalen Fusionskonstrukt der EstA aus *B. gladioli* mit dem Ankerprotein Cwp2p generiert, welche die 19 konstitutiven Promotoren *PGK1*, *REV1*, *POP6*, *PAB1*, *TEF1*, *HHF2*, *PSP2*, *ALD6*, *RET2*, *HHF1*, *TEF2*, *RAD27*, *SAC6*, *RNR1*, *RPL18B*, *TDH3*, *RNR2*, *CCW12* und *HTB2* in Kombination mit dem *TDH1*-Terminator beinhalten. Die Konstrukte wurden im pYTK083-Vektor in den *S. cerevisiae*-Stamm BY4742 transformiert. Die Volumenaktivität des pYTK083-Expressionsplasmids mit *PGK1*-Promotor diente als Vergleich mit dem im pFB2-Vektor exprimierten Fusionskonstrukt, da der identische Promotor verwendet wurde und vergleichbare Volumenaktivitäten vorlagen (gestrichelte Linie) (s. Abb. 4). Die Bestimmung der Volumenaktivität [mU/ml] erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen von sechs biologischen Replikaten ( $n = 6$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden.

Die zur Zelloberflächenexpression der über Cwp2p verankerten EstA analysierten Kombinationen der Promotoren *REV1* (440,0 mU/ml), *POP6* (721,2 mU/ml), *PAB1* (739,3 mU/ml), *TEF1* (780,1 mU/ml) und *HHF2* (820,9 mU/ml) mit dem *TDH1*-Terminator wiesen niedrigere Volumenaktivitäten als das unter der Kontrolle des *PGK1*-Promotors stehende Fusionskonstrukt (834,5 mU/ml) auf. Eine Erhöhung der Volumenaktivität konnte für die restlichen Promotoren beobachtet werden. Die Promotoren *PSP2* (870,8 mU/ml), *ALD6* (884,4 mU/ml), *RET2* (893,5 mU/ml), *HHF1* (970,6 mU/ml) und

*TEF2* (997,8 mU/ml) zeigten eine Steigerung der Volumenaktivität im Vergleich mit dem *PGK1*-Promotor um den Faktor 1,0-1,2. Für die weiteren Promotoren *RAD27* (1.043,2 mU/ml), *SAC6* (1.093,1 mU/ml), *RNR1* (1.120,3 mU/ml), *RPL18B* (1.152,0 mU/ml), *TDH3* (1.156,6 mU/ml), *RNR2* (1.165,6 mU/ml), *CCW12* (1.297,2 mU/ml) und *HTB2* (1.401,5 mU/ml) konnte eine um einen Faktor von 1,25-1,68 erhöhte Volumenaktivität in BY4742 festgestellt werden (s. Abb. 18).

Im Folgenden sollten die Einflüsse von fünf weiteren Terminatoren *ADH1*, *ENO2*, *SSA1*, *PGK1* und *ENO1* des „MoClo-YTK Plasmid Kits“ auf die Oberflächenimmobilisierung der Cwp2p-verankerten EstA analysiert werden (Lee *et al.*, 2015). Hierzu wurden pYTK083-Expressionsplasmide erstellt, die neben dem EstA-Fusionskonstrukt und den fünf Terminatoren die beiden Promotoren mit den zuvor ermittelten, höchsten Volumenaktivitäten (*CCW12* und *HTB2*) beinhalteten. Nach Transformation in BY4742 wurden die EstA-Volumenaktivitäten im EstA-Assay bestimmt (s. Abb. 18 und 19).

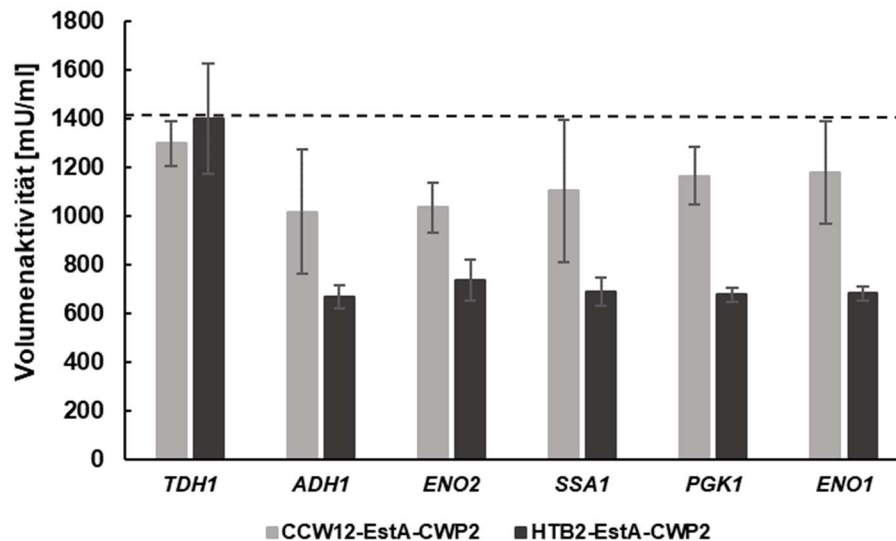


**Abb. 19: Schematische Darstellung des zur N-terminalen Immobilisierung der Esterase A verwendeten Fusionskonstrukts in Abhängigkeit von Terminatoren.** Das Fusionskonstrukt aus *KRE1*-Signalsequenz („*KRE1-SS*“), EstA aus *B. gladioli* und dem Ankerprotein Cwp2p wurde mithilfe des „MoClo-YTK Plasmid Kits“ über zwei aufeinanderfolgende „Golden Gate-Assembly“-Reaktionen in den pYTK083-Vektor kloniert, um die Einflüsse von fünf weiteren Terminatoren auf die Zelloberflächenimmobilisierung der EstA in *S. cerevisiae* zu analysieren. Als Promotoren wurden die beiden stärksten Promotoren („pCCW12“ und „pHTB2“) aus Abb. 18 verwendet.



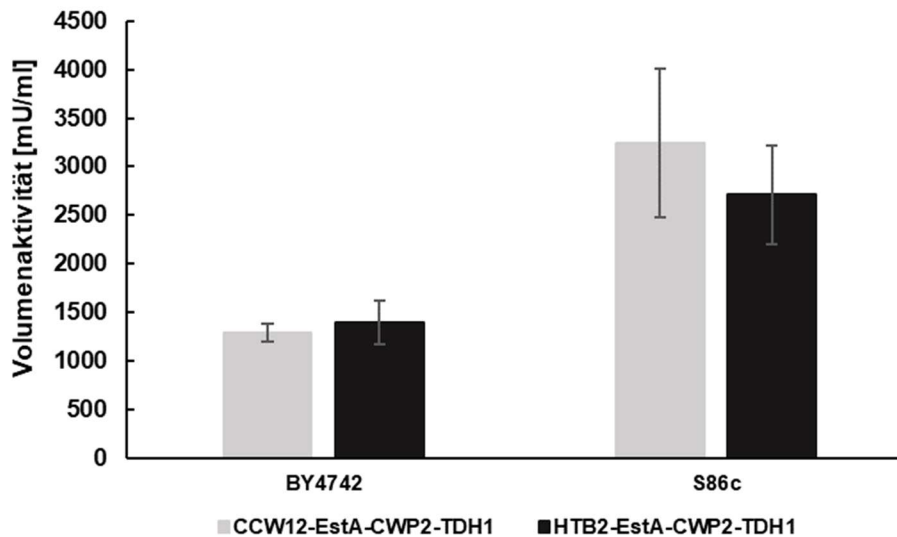
---

Zur Expressionsanalyse der EstA-Zelloberflächenimmobilisierung in Abhängigkeit von fünf weiteren Terminatoren wurden sechs biologische Replikate ( $n = 6$ ) in Dreifachbestimmungen im *S. cerevisiae*-Stamm BY4742 untersucht. Die EstA-Volumenaktivitäten der Expressionsplasmide mit *TDHI*-Terminator aus Abb. 18 sind zum Vergleich dargestellt (gestrichelte Linie). Bei Nutzung des *CCW12*-Promotors konnten Volumenaktivitäten von 1.016,0 mU/ml für *ADHI*, 1.034,1 mU/ml für *ENO2*, 1.102,1 mU/ml für *SSAI*, 1.164,8 mU/ml für *PGKI* und 1.179,2 mU/ml für *ENO1* bestimmt werden. Im Fall des *HTB2*-Promotors konnten Volumenaktivitäten von 666,7 mU/ml für *ADHI*, 734,8 mU/ml für *ENO2*, 689,4 mU/ml für *SSAI*, 675,8 mU/ml für *PGKI* und 680,3 mU/ml für *ENO1* berechnet werden. Für die fünf betrachteten Terminatoren konnte in Kombination mit den beiden Promotoren *CCW12* und *HTB2* in keinem Fall eine Steigerung der Volumenaktivität der Cwp2p-verankerten EstA im Vergleich zum *TDHI*-Terminator („*CCW12*-EstA-CWP2“: 1.297,2 mU/ml; „*HTB2*-EstA-CWP2“: 1.401,5 mU/ml) erreicht werden. Hierbei fiel auf, dass ähnliche Volumenaktivitäten für die Kombination aus dem *CCW12*-Promotor und den fünf weiteren Terminatoren ermittelt werden konnten, welche um 10-20 % niedriger als die Volumenaktivität des Fusionskonstrukts mit *TDHI*-Terminator waren. Für die Kombination des *HTB2*-Promotors mit den fünf Terminatoren *ADHI*, *ENO2*, *SSAI*, *PGKI* und *ENO1* fiel die Reduktion der Volumenaktivität um ca. 50 % noch deutlicher aus. Im BY4742-Stamm erwiesen sich somit die Kombinationen aus den *CCW12*- und *HTB2*-Promotoren mit dem *TDHI*-Terminator weiterhin am effizientesten für die Zellwandimmobilisierung der EstA (s. Abb. 20).



**Abb. 20: Vergleich der Volumenaktivitäten eines N-terminalen EstA-Fusionskonstrukts in Abhängigkeit von Terminatoren.** Mithilfe des „MoClo-YTK Plasmid Kits“ wurden Expressionsvektoren mit einem N-terminalen Fusionskonstrukt der EstA aus *B. gladioli* mit dem Ankerprotein Cwp2p generiert, welche die konstitutiven Promotoren *CCW12* („CCW12-EstA-CWP2“) und *HTB2* („HTB2-EstA-CWP2“) in Kombination mit den Terminatoren *ADH1*, *ENO2*, *SSA1*, *PGK1* und *ENO1* beinhalten. Die Volumenaktivitäten der Konstrukte mit *TDH1*-Terminator aus Abb. 18 dienten als Vergleich (gestrichelte Linie). Die Konstrukte wurden im pYTK083-Vektor in den *S. cerevisiae*-Stamm BY4742 transformiert. Die Bestimmung der Volumenaktivität [mU/ml] erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen von sechs biologischen Replikaten ( $n = 6$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden.

Basierend auf den zuvor erhaltenen Ergebnissen sollte die EstA-Volumenaktivität der Expressionsplasmide, welche im Hefestamm BY4742 die höchsten Volumenaktivitäten zeigten, im *S. cerevisiae*-Stamm S86c analysiert werden, da sich dieser Stammhintergrund für die vorherigen Expressionssysteme am effizientesten für die N-terminale Zellwandverankerung der EstA erwies (s. Abb. 4). Hierzu wurden die pYTK083-Expressionsplasmide, die aus den Promotoren *CCW12* bzw. *HTB2*, dem kodonoptimierten „EstA-CWP2“-Fusionskonstrukt und dem *TDH1*-Terminator bestehen, in S86c transformiert und die Volumenaktivitäten von jeweils sechs biologischen Replikaten ( $n = 6$ ) in Dreifachbestimmungen im EstA-Assay bestimmt (s. Abb. 21).



**Abb. 21: Einflüsse von Promotoren und Terminatoren auf die Volumenaktivität eines N-terminalen EstA-Fusionskonstrukts in unterschiedlichen *S. cerevisiae*-Stämmen.** Mithilfe des „MoClo-YTK Plasmid Kits“ wurden Expressionsvektoren mit einem N-terminalen Fusionskonstrukt der EstA aus *B. gladioli* mit dem Ankerprotein Cwp2p generiert, welche die konstitutiven Promotoren *CCW12* und *HTB2* in Kombination mit dem Terminator *TDH1* („*CCW12*-EstA-CWP2-TDH1“ bzw. „*HTB2*-EstA-CWP2-TDH1“) beinhalten. Die Konstrukte wurden im pYTK083-Vektor in die *S. cerevisiae*-Stämme BY4742 und S86c transformiert. Die Bestimmung der Volumenaktivität [mU/ml] erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen von sechs biologischen Replikaten ( $n = 6$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden.

Im *S. cerevisiae*-Stamm S86c konnte eine EstA-Volumenaktivität von 3.247,5 mU/ml für das unter der Kontrolle des *CCW12*-Promotors und *TDH1*-Terminators stehende „EstA-CWP2“-Fusionskonstrukt bestimmt werden, was im Vergleich zum BY4742-Stamm einer Steigerung um den Faktor 2,5 darstellte. Für die Kombination aus *HTB2*-Promotor und *TDH1*-Terminator wurde eine Volumenaktivität von 2.712,3 mU/ml festgestellt. Dies entsprach einer Steigerung um den Faktor 1,94 (s. Abb. 21).

Somit erwies sich in den Untersuchungen zum Einfluss der Promotoren und Terminatoren auf die N-terminale Zelloberflächenimmobilisierung der EstA über Cwp2p die Kombination aus *CCW12*- bzw. *HTB2*-Promotor mit dem *TDH1*-Terminator am effizientesten. Für den BY4742-Stamm zeigte der *HTB2*-Promotor die höchste EstA-Volumenaktivität mit 1.401,5 mU/ml. Durch die Expression dieser Vektoren im S86c-Stamm konnte die EstA-Volumenaktivität und somit die Effizienz der EstA-Verankerung an der Zelloberfläche deutlich gesteigert werden, was sich anhand der höchsten Volumenaktivität aller Fusionskonstrukte für die transkriptionelle Kontrolle durch den *CCW12*-Promotor in

Kombination mit dem *TDHI*-Terminator (3.247,5 mU/ml) nachweisen ließ. Auch im Vergleich zu den zuvor untersuchten EstA-Fusionskonstrukten in den pFB2-, pYX242- und pYD1-Vektoren ergaben sich für die beiden pYTK083-Konstrukte in *S. cerevisiae* deutlich höhere Volumenaktivitäten (vgl. Abb. 4, 7 und 9).

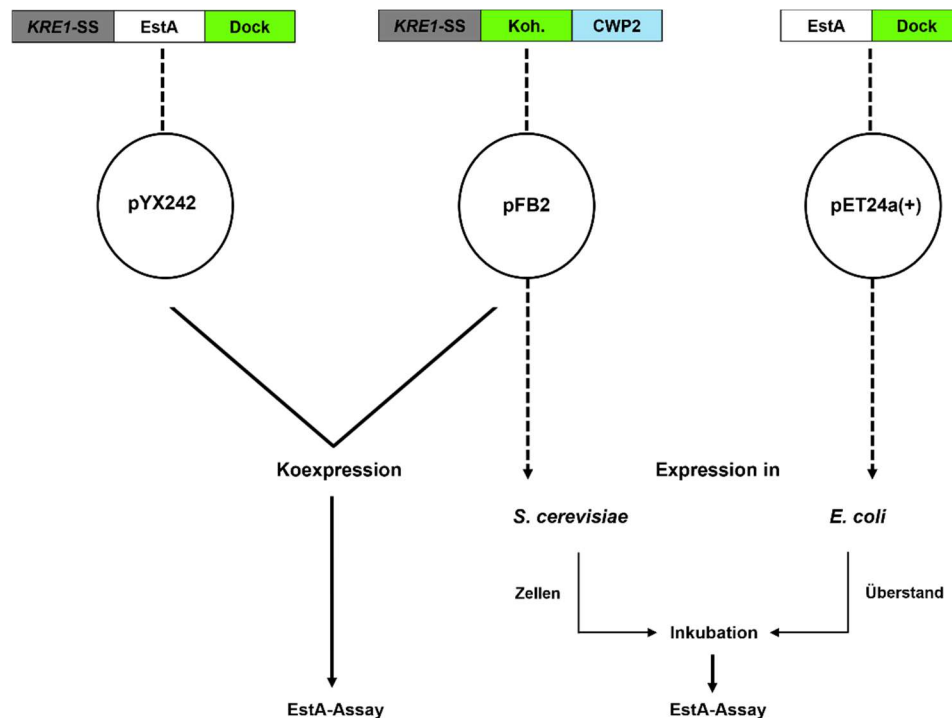
### 3.3 Zellwandverankerung der EstA über Protein-Protein-Interaktion basierte Verankerungssysteme

#### 3.3.1 Zellwandverankerung der EstA durch Kohäsin-Dockerin-Interaktion

Das Zellulosom mesophiler Bakterien ist ein Multienzym-Komplex, welcher zur Hydrolyse pflanzlicher Zellulose über eine Reihe an Zellulasen dient. Es besteht aus Gerüstproteinen mit Kohäsin-Modulen, die eine Bindung zellulolytischer Enzyme über komplementäre Dockerin-Module und somit den Zelluloseabbau ermöglichen (Bayer *et al.*, 2004; Doi & Kosugi, 2004). Diese Interaktion konnte bereits zum „Display“ von Enzymen auf der Zelloberfläche von Hefen eingesetzt werden, bei welchen die Kohäsin-Domänen meist über hefeeigene Zellwandproteine verankert wurden (Anandharaj *et al.*, 2020; Ito *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2010). Dieses Verankerungssystem wurde betrachtet, da nach erfolgreicher Etablierung durch den direkten Austausch der Enzymsequenzen eine Klonierung weiterer Fusionskonstrukte möglich wäre, wodurch eine schnelle und einfache Generierung von Verankerungssystemen mit anderen Peptiden oder Enzymklassen erreicht werden könnte.

Die EstA sollte über die Interaktion der Kohäsin 1- und Dockerin Typ 1-Domänen aus *C. cellulovorans* durch Koexpression auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* immobilisiert werden. Aufgrund der für eine Koexpression miteinander kompatiblen Selektionsmarker wurden Fusionskonstrukte aus *KRE1*-Signalsequenz („*KRE1*-SS“), EstA aus *B. gladioli* und Dockerin Typ 1-Domäne („Dock“) mittels „In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning“ in den pYX242-Vektor bzw. aus Kohäsin 1 („Koh.“) und dem Zellwandanker Cwp2p als *XhoI/BglII*-Fragment in den pFB2-Vektor kloniert. Nach Kotransformation beider Vektoren in *S. cerevisiae* sollte die „EstA-Dock“-Fusion über die Cwp2p-verankerte Kohäsin 1-Domäne in der Zellwand immobilisiert und anhand der Enzymaktivität im EstA-Assay nachgewiesen werden. Zusätzlich sollte das Fusionskonstrukt aus EstA und Dockerin Typ 1-Domäne in *E. coli* exprimiert werden, um das Fusionsprotein in größeren Mengen zu produzieren und mögliche Probleme bei der Expression und Sezernierung des Fusionsproteins in *S. cerevisiae* zu umgehen. Das „EstA-Dock“-Konstrukt wurde ohne *KRE1*-Signalsequenz als *BamHI/XhoI*-Fragment in den pET24a(+)-Vektor kloniert und im BL21 (DE3)-Stamm exprimiert. Nach

Isolation durch Zellaufschluss sollte das Fusionsprotein mit Hefezellen inkubiert werden, die das Fusionskonstrukt aus Kohäsin 1-Domäne und Cwp2p exprimierten. Die erwartete Interaktion der Domänen sollte anschließend anhand der EstA-Aktivität fotometrisch nachgewiesen werden (s. Abb. 22).



**Abb. 22: Schematische Darstellung des Systems zur Zelloberflächenimmobilisierung der Esterase A durch Kohäsin-Dockerin-Interaktion.** Die EstA sollte über die Interaktion zwischen dem Kohäsin 1 („Koh.“) und der Dockerin-Typ 1-Domäne („Dock“) aus *C. cellulovorans* auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* verankert werden. Es wurden zwei Fusionskonstrukte generiert, die aus einer *KRE1*-Signalsequenz („*KRE1*-SS“), der EstA aus *B. gladioli* und der Dockerin-Typ 1-Domäne („EstA-Dock“) bzw. dem Kohäsin 1 und dem Ankerprotein Cwp2p („Koh.-CWP2“) bestehen. Zur Koexpression wurden die Konstrukte im pYX242- bzw. pFB2-Vektor in *S. cerevisiae* kotransformiert und die Aktivitäten im EstA-Assay fotometrisch bestimmt. Alternativ wurde das „EstA-Dock“-Konstrukt ohne *KRE1*-Signalsequenz in den pET24a(+)-Vektor kloniert, in *E. coli* exprimiert und das Protein mittels Zellaufschluss isoliert. Durch eine Inkubation mit Hefezellen, die das über Cwp2p verankerte Kohäsin 1 exprimierten, sollte die Kohäsin-Dockerin-Interaktion hergestellt und die EstA-Aktivität im EstA-Assay nachgewiesen werden.

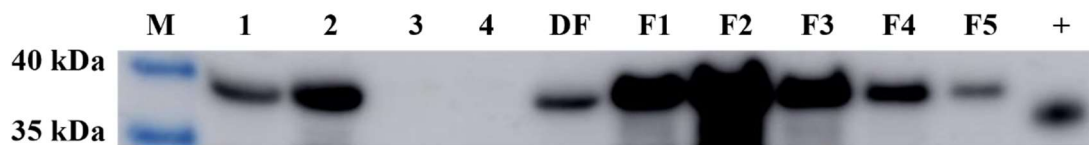
Die EstA-Zelloberflächenimmobilisierung via Kohäsin-Dockerin-Interaktion sollte zu Beginn durch die Koexpression der beiden Fusionskonstrukte aus Kohäsin 1-Domäne und Cwp2p im pFB2-Vektor und aus EstA mit der Dockerin Typ 1-Domäne im pYX242-Vektor in den *S. cerevisiae*-Stämmen BY4742 und SEY6210 untersucht werden. Es konnte für keine der untersuchten Übernachtskulturen eine EstA-Aktivität im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollen aus YE352 und pYX242 sowie den mit den Einzel-Konstrukten transformierten

Hefezellen beobachtet werden. Auch eine Verlängerung der Kultivierungsdauer (1-3 d) und die Nutzung eines Fusionskonstrukts mit für *S. cerevisiae* kodonoptimierter Dockerin-Sequenz führten zu keiner detektierbaren Aktivität im fotometrischen Assay. Zusätzlich wurde auch der Zellüberstand der „EstA-Dock“-exprimierenden Hefen direkt zum fotometrischen Assay eingesetzt, wobei dieser ebenfalls keine Enzymaktivität zeigte (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden die Konstrukte zur Expression in *P. pastoris* als *EcoRI/AvrII*-Fragment in den bereits zuvor genutzten pPIC9-Vektor umkloniert und zur Expression in den Stämmen KM71 und GS115 eingesetzt. Die Induktion der Expression wurde in BMM-Medium mit 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) über 1 d, 4 d oder 5 d bei 26-28 °C bei täglicher Methanol-Zugabe (0,5 %) durchgeführt. Eine Koexpression beider Fusionskonstrukte war aufgrund der Nutzung des pPIC9-Vektors nicht möglich, weshalb Hefezellen, welche die über *Cwp2p* verankerte Kohäsin 1-Domäne exprimierten, mit den Zellüberständen der „EstA-Dock“-exprimierenden Hefen 1-4 d bei 30 °C auf dem Drehrad inkubiert und zum EstA-Assay eingesetzt wurden. Für keine der getesteten Bedingungen konnte in *P. pastoris* eine Volumenaktivität im Vergleich zu den Transformanten, die den Leervektor und die Einzel-Konstrukte exprimierten, festgestellt werden. Auch in *P. pastoris* zeigte der Überstand der „EstA-Dock“-exprimierenden Hefen keine Absorptionzunahme (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion zwischen Kohäsin- und Dockerin-Domänen ist aufgrund des Vorhandenseins von Calcium-bindenden Domänen in den Dockerinen Calcium-abhängig, weshalb auch die Zugabe unterschiedlicher Calciumchlorid-Konzentrationen zum Kultivierungsmedium untersucht wurde, was jedoch auch zu keiner Detektion einer EstA-Aktivität führte (Craig *et al.*, 2006; Doi *et al.*, 1998; Kosugi *et al.*, 2002; Pagès *et al.*, 1997) (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der ausgebliebenen Aktivität der EstA durch die vermutlich nicht ausgebildete Kohäsin-Dockerin-Interaktion sollte die Expression des sezernierten Dockerin-Konstrukts im *S. cerevisiae*-Stamm BY4742 überprüft werden. Hierzu wurde ein Fusionskonstrukt aus *KRE1*-Signalsequenz, EstA und Dockerin Typ 1-Domäne im pFB2-Vektor generiert, welches zum Nachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western Blot über ein V5-Tag am N-Terminus des Dockerins verfügte. Zusätzlich wurde ein Fusionskonstrukt im pFB2-Vektor erstellt, welches zur Untersuchung der Expression des Dockerins unabhängig von der EstA hergestellt wurde und aus der Fusion aus *KRE1*-Signalsequenz, yeGFP („yeast-enhanced green fluorescent protein“) und Dockerin Typ 1-Domäne bestand. Beide Fusionskonstrukte wurden im pFB2-Vektor erstellt, um einen möglichen Einfluss des pYX242-Vektors auf die Expression des „EstA-Dock“-Konstrukts auszuschließen, da dieser in den vorangegangenen

Experimenten zur N-terminalen Verankerung der EstA im Vergleich zum pFB2-Vektor zu einer verringerten Expression der Fusionskonstrukte führte. Die Analyse der indirekten Immunfluoreszenz des V5-getaggten „EstA-Dock“-Konstrukts sollte mithilfe eines primären Anti-V5-Antikörpers durchgeführt werden, der über einen sekundären FITC-gekoppelten Antikörper nachgewiesen wurde. Es konnten weder Fluoreszenzen für ein sezerniertes Fusionsprotein im Zellüberstand noch ein intrazellulär akkumuliertes Protein festgestellt werden, was mit dem Ergebnis der YEp352-Kontrolle übereinstimmte. Für Transformanten, die das Fusionskonstrukt aus yeGFP und Dockerin exprimieren sollten, konnten ebenfalls keine GFP-Signale im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Im Western Blot sollten Signale der beiden Fusionsproteine durch die primären Anti-V5- und Anti-GFP-Antikörper mit einem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper nachgewiesen werden. Es wurden jeweils der Zellaufschluss sowie der TCA-gefällte Kulturüberstand betrachtet und mit einer YEp352-Leervektorkontrolle verglichen. Für die Fusionsproteine aus EstA bzw. yeGFP und Dockerin Typ 1-Domäne konnten keine Chemilumineszenzsignale mit einem entsprechenden Molekulargewicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der nicht nachweisbaren Expression des Dockerin-Fusionskonstrukts in *S. cerevisiae* sollte im Folgenden ein nur aus der EstA bestehendes Konstrukt und das „EstA-Dock“-Konstrukt in *E. coli* produziert, isoliert und aufgereinigt werden. Das „EstA-Dock“-Fusionskonstrukt wurde zur Immobilisierung mit Hefezellen, die das über Cwp2p verankerte Kohäsin 1 exprimieren, inkubiert. Die Konstrukte wurden als *Bam*HI/*Xho*I-Fragmente in den *E. coli*-Expressionsvektor pET24a(+) kloniert und im BL21 (DE3)-Stamm exprimiert, wodurch die Proteine N-terminal mit einem T7-Tag modifiziert wurden. Die Expression der Konstrukte wurde nach Zellaufschluss mittels Ultraschall vor Aufreinigung und nach Aufreinigung anhand des T7-Tags mithilfe des „T7•Tag<sup>®</sup> Affinity Purification Kits“ über eine Säulenmatrix untersucht. Zu Beginn sollte die Expression der EstA im BL21 (DE3)-Stamm nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Bakterienzellen bis zu einer  $OD_{600} = 1,0$  kultiviert und mit 100 mM IPTG 3 h bei 28 °C induziert. Der Ultraschallaufschluss wurde entweder direkt oder nach Aufreinigung mithilfe des „T7•Tag<sup>®</sup> Affinity Purification Kits“ zur SDS-PAGE eingesetzt und mittels Western Blot analysiert. Als Kontrolle diente der pET24a(+)-Leervektor (s. Abb. 23).



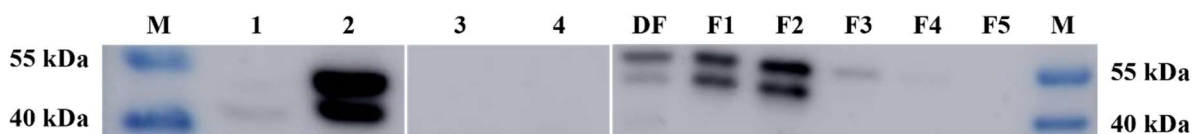
**Abb. 23: Western Blot zum Nachweis der EstA-Expression in *E. coli*.** Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) wurde mit dem „EstA“-Konstrukt im pET24a(+) transformiert, welches ein N-terminales T7-Tag besaß. Die Bakterienzellen wurden bis zu einer  $OD_{600} = 1,0$  kultiviert, mit 100 mM IPTG 3 h bei 28 °C induziert und das Zellpellet mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde zur SDS-PAGE eingesetzt und mithilfe des „T7•Tag® Affinity Purification Kits“ aufgereinigt. Dargestellt sind die Überstände der EstA ohne Aufreinigung vor („1“) und nach IPTG-Induktion („2“). Zusätzlich wurde der pET24a(+)-Leervektor ohne Aufreinigung vor („3“) und nach IPTG-Induktion („4“) betrachtet. Außerdem wurde der Zellaufschluss der EstA-exprimierenden Kulturen anhand des T7-Tags über eine Säulenmatrix aufgereinigt. Neben dem Durchfluss („DF“) wurden fünf Elutionsfraktionen („F1-F5“) analysiert. Zum Nachweis für die Funktionalität des Antikörpers wurde eine Positivkontrolle des monoklonalen Anti-T7-Tag-Antikörpers („+“) eingesetzt. Als Marker wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ der Firma Thermo Scientific („M“) verwendet.

Die Expression der EstA in *E. coli* wurde vor und nach Induktion sowie vor und nach Affinitätsaufreinigung mittels Western Blot untersucht (s. Abb. 23). Für die unaufgereinigten Proben konnte vor IPTG-Induktion ein Signal bei knapp 40 kDa detektiert werden („1“), welches nach Induktion stärker war („2“). Im Vergleich zur pET24a(+)-Leervektorkontrolle konnten vor und nach Induktion keine Signale mit entsprechendem Molekulargewicht detektiert werden („3“ und „4“). Der Zellaufschluss der EstA-exprimierenden Bakterienzellen nach IPTG-Induktion wurde dann zur Aufreinigung anhand des N-terminalen T7-Tags über eine Säulenmatrix eingesetzt, welche aus Agarose-Beads besteht, die mit einem monoklonalen T7-Tag-Antikörper gekoppelt sind. Die aufgereinigten Proteine wurden mithilfe eines Elutionspuffers (1 M Zitronensäure, pH 2,2) in fünf Elutionsfraktionen („F1-F5“) eluiert, dessen saurer pH-Wert durch Zugabe eines Neutralisationspuffers auf einen pH-Wert von ca. 6,9 neutralisiert wurde. Neben den fünf Fraktionen wurde zudem der Durchfluss („DF“) nach Beladen der Säule mit dem Zellaufschluss analysiert. In der Durchfluss- und den fünf Elutionsfraktionen konnten Signale bei ca. 40 kDa detektiert werden, wobei die stärksten Signale in den ersten drei Elutionsfraktionen auftraten. Die Funktionalität des monoklonalen Anti-T7-Tag-Antikörpers wurde anhand einer entsprechenden Antikörperkontrolle („+“) erfolgreich nachgewiesen (s. Abb. 23). Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität der EstA wurde ein Assay durchgeführt, bei dem die aufgereinigte Elutionsfraktion mit dem stärksten Signal im Western Blot („F2“) eingesetzt wurde. Im Vergleich zum pET24a(+)-Leervektor konnte ein starker Substratumsatz fotometrisch bestimmt und somit eine EstA-Aktivität nachgewiesen werden, welche auch bereits ohne IPTG-Induktion detektierbar



war (s. Abb. 36 im Anhang). Eine Bestimmung der EstA-Konzentration mithilfe eines BCA-Assays war nicht möglich, da das im Elutionspuffer enthaltene Citrat die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen der Reaktionslösung chelatierte und die Protein-induzierte Färbereaktion verhinderte. Alternativ wurden die gepoolten Elutionsfraktionen mithilfe der Zentrifugationseinheit „Vivaspin™ 6“ aufkonzentriert und in 1 x PBS (pH 7,4) umgepuffert, wonach im BCA-Assay keine Proteinkonzentration messbar war (Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden wurde die Expression des T7-getaggen Fusionskonstrukts aus EstA und Dockerin Typ 1-Domäne im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) überprüft, für welches ein Molekulargewicht von ca. 48 kDa erwartet wurde. Die Bakterienzellen wurden bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 1,0$  kultiviert, mit 100 mM IPTG 3 h bei 28 °C induziert und nach der Zellernte mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde direkt oder nach Aufreinigung mithilfe des „T7•Tag® Affinity Purification Kits“ zur SDS-PAGE eingesetzt und mittels Western Blot analysiert. Als Kontrolle diente der pET24a(+)-Leervektor (s. Abb. 24).



**Abb. 24: Western Blot zum Nachweis der „EstA-Dock“-Expression in *E. coli*.** Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) wurde mit dem „EstA-Dock“-Konstrukt im pET24a(+) transformiert, welches ein N-terminales T7-Tag besaß. Die Bakterienzellen wurden bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 1,0$  kultiviert, mit 100 mM IPTG 3 h bei 28 °C induziert und das Zellpellet mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde zur SDS-PAGE eingesetzt und mithilfe des „T7•Tag® Affinity Purification Kits“ aufgereinigt. Dargestellt sind die Überstände des „EstA-Dock“-Konstrukts ohne Aufreinigung vor („1“) und nach IPTG-Induktion („2“). Zusätzlich wurde der pET24a(+)-Leervektor ohne Aufreinigung vor („3“) und nach IPTG-Induktion („4“) betrachtet. Außerdem wurde der Zellaufschluss der „EstA-Dock“-exprimierenden Kulturen anhand des T7-Tags über eine Säulenmatrix aufgereinigt. Neben dem Durchfluss („DF“) wurden fünf Elutionsfraktionen („F1-F5“) analysiert. Als Marker wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ der Firma Thermo Scientific („M“) verwendet.

In den Zelllysaten der „EstA-Dock“-exprimierenden Bakterien konnten vor IPTG-Induktion („1“) zwei schwache Signale bei ca. 43 kDa und ca. 48 kDa detektiert werden, die nach Induktion („2“) deutlich stärker waren und in der Leervektorkontrolle nicht auftraten („3“ und „4“). Für den Säulendurchfluss („DF“) und die ersten beiden Elutionsfraktionen („F1“ und „F2“) nach T7-Tag-Aufreinigung konnte das gleiche Bandenmuster festgestellt werden, wobei die Signalstärke in der zweiten Elutionsfraktion am höchsten war. In den darauffolgenden Elutionsfraktionen („F3-F5“) wurden nur noch geringe Proteinmengen eluiert (s. Abb. 24).

---

Aufgrund des erfolgreichen Expressionsnachweises des Fusionskonstrukts aus EstA und Dockerin Typ 1-Domäne in *E. coli* sollte die Aktivität des Konstrukts überprüft werden. Zum EstA-Assay wurde das Eluat der zweiten Elutionsfraktion eingesetzt und im Vergleich zur pET24a(+)-Kontrolle konnte ein deutlicher Substratumsatz nachgewiesen werden, der auch für den uninduzierten Zellüberstand auftrat (s. Abb. 37 im Anhang).

Um einen Einfluss des sauren Elutionspuffers auf die EstA-Aktivität auszuschließen, wurden EstA-Assays mit Hefezellen des BY4742-Stamms durchgeführt, welche die über Cwp2p, Sag1p und Sed1p immobilisierte EstA im pFB2-Vektor sowie die YEp352-Leervektor-kontrolle exprimierten. Die Hefezellen wurden vor dem Assay für die ungefähre Dauer eines Elutionsschritts des „T7•Tag® Affinity Purification Kits“ von 5 min mit dem Elutionspuffer unter Schütteln inkubiert und nach Waschen in 1 x PBS (pH 8,0) zur fotometrischen Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Im Vergleich mit den Volumenaktivitäten unter Ausgangskonditionen konnten in BY4742 für alle Fusionskonstrukte ähnliche EstA-Volumenaktivitäten festgestellt werden, weshalb direkte Einflüsse der Behandlung mit dem Elutionspuffer auf die EstA-Volumenaktivität ausgeschlossen wurden (Daten nicht gezeigt).

Zur Immobilisierung des in *E. coli* produzierten „EstA-Dock“-Fusionskonstrukts auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* wurden BY4742-Hefezellen, welche das über Cwp2p verankerte Kohäsin 1 aus *C. cellulovorans* exprimierten, mit der zweiten Elutionsfraktion des aufgereinigten „EstA-Dock“-Fusionskonstrukts, dem uninduzierten und unaufgereinigten Überstand der „EstA-Dock“-exprimierenden Bakterienzellen sowie dem induzierten Überstand der pET24a(+)-exprimierenden Bakterienzellen über Nacht bei 20 °C auf dem Drehrad inkubiert. Nach Waschschritten wurden die entsprechenden Hefezellen zum EstA-Assay eingesetzt, wo für keine der getesteten Kombinationen Enzymaktivitäten detektiert werden konnten. Neben dem Fusionskonstrukt aus Kohäsin 1-Domäne und Cwp2p wurden EBY100-Hefezellen, die ein Konstrukt aus den Kohäsin-Domänen 1 und 2 sowie einer synthetischen ZZ-Domäne im pYD1-Vektor exprimierten (s. 3.3.2), nach Galaktose-Induktion mit den zuvor beschriebenen Kombinationen der bakteriellen Zellüberstände unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Im EstA-Assay konnte auch bei Nutzung dieses Fusionskonstrukts mit den beiden Kohäsin-Domänen für keine Kombination eine Kohäsin-Dockerin-Interaktion durch eine EstA-Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Zelloberflächenimmobilisierung der EstA durch die Interaktion zwischen Kohäsin- und Dockerin-Domänen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden. Die Koexpression der Fusionskonstrukte führte zu keiner detektierbaren Enzymaktivität und ein Expressionsnachweis des Dockerin-Fusionskonstrukts mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie

Western Blot war in *S. cerevisiae* nicht möglich, weshalb das Fusionskonstrukt aus EstA und Dockerin Typ 1-Domäne als Alternative in *E. coli* exprimiert wurde. Die Expression und die Aktivität dieses Fusionskonstrukts konnten im Western Blot bzw. im fotometrischen Assay nachgewiesen werden, jedoch blieb auch nach Inkubation mit den Hefezellen eine Interaktion zwischen beiden Domänen aus und somit konnte keine Aktivität der immobilisierten EstA detektiert werden.

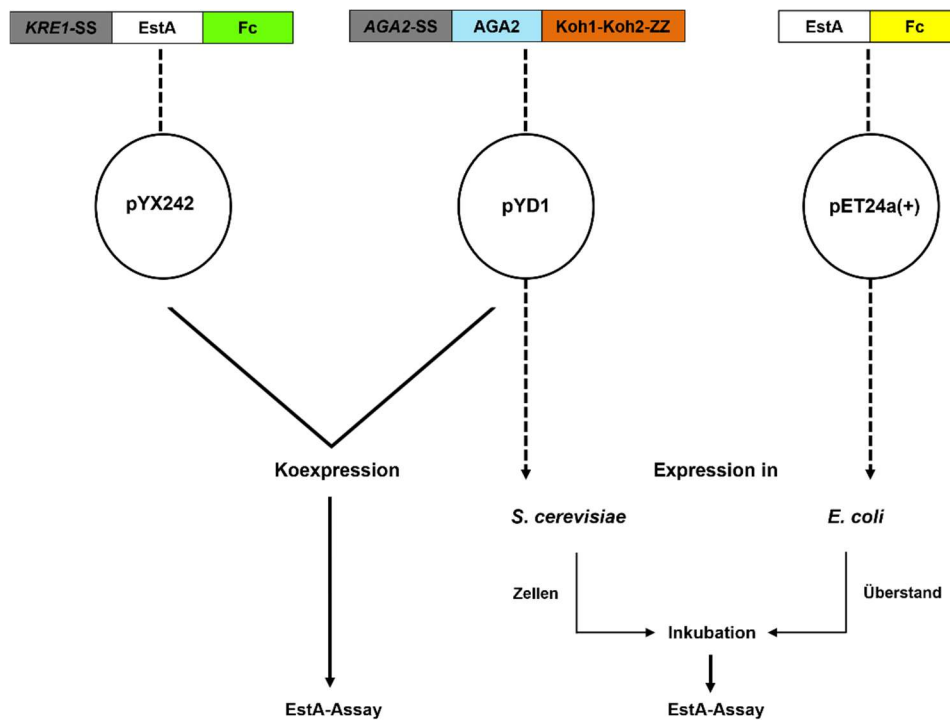
### 3.3.2 Zellwandverankerung der EstA durch ZZ-Fc-Interaktion

Neben der Verankerung über die Kohäsin-Dockerin-Interaktion sollte die EstA durch eine Interaktion der ZZ-Domäne aus *S. aureus* mit der Fc-Region des IgG1-Antikörpers aus *H. sapiens* auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* immobilisiert werden. Die Interaktion zwischen der synthetischen ZZ-Domäne, die zur Konstruktion von Fusionsproteinen dem Protein A aus *S. aureus* nachempfunden wurde, und einem breiten Spektrum an IgG-Antikörpern aus verschiedenen Spezies konnte bereits erfolgreich zur Immobilisierung über Hefeankerproteine eingesetzt werden (Ito *et al.*, 2009; Kronvall & Williams, 1969; Nakamura *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 1987; Tashiro *et al.*, 1997). Die ZZ-Domäne konnte bisher jedoch nur über N-terminale Fusionen mit Sag1p und Flo1p auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* verankert werden (Ito *et al.*, 2009; Katsurada *et al.*, 2021; Shibasaki *et al.*, 2007; Shimoyjo *et al.*, 2003). Auch dieses Verankerungssystem zeichnet sich – analog zur Immobilisierung über die Kohäsin-Dockerin-Interaktion – aufgrund des gezielten Austauschs der Enzymsequenzen durch eine schnelle Generierung von weiteren Expressionssystemen aus. Zusätzlich bietet es durch die Eigenschaften der ZZ-Domäne eine Möglichkeit zum Nachweis der Funktionalität einer der beiden Domänen über unterschiedliche Antikörperaffinitäten.

In der vorliegenden Arbeit sollte das von Ito *et al.* (2009) eingesetzte Fusionskonstrukt, welches aus den Kohäsin-Domänen 1 und 2 aus *C. cellulovorans* sowie der ZZ-Domäne aus *S. aureus* („Koh1-Koh2-ZZ“) bestand, erstmalig als C-terminale Fusion über das Aga1p-Aga2p-System in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Die beiden Kohäsin-Domänen waren für die Interaktion zwischen der ZZ-Domäne und Fc-Region nicht notwendig, jedoch sollten mögliche Einflüsse einer Veränderung des Konstruktaufbaus auf die ZZ-Expression minimiert und eine zukünftige Nutzung beider Interaktionsmodelle zur gleichzeitigen Expression mehrerer Enzyme ermöglicht werden. Hierzu wurde das für *S. cerevisiae* kodonoptimierte Konstrukt zusammen mit der AGA2-Signalsequenz („AGA2-SS“) und dem Ankerprotein Aga2p als *Bam*HI/*Not*I-Fragment in den pYD1-Vektor kloniert. Außerdem

---

wurde ein Fusionskonstrukt aus *KRE1*-Signalsequenz („*KRE1*-SS“), EstA aus *B. gladioli* und Fc-Region („Fc“) mittels „In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning“ im pYX242-Vektor generiert. Die Sequenz der Fc-Region des humanen IgG1 wurde hierzu so gewählt, dass sie aus den CH2- und CH3-Domänen inklusive „hinge“-Region bestand und für die Expression der hier betrachteten Konstrukte in *S. cerevisiae* oder *E. coli* kodonoptimiert wurde (Ito *et al.*, 2009; Shibasaki *et al.*, 2006, 2007). Zur Expression wurde der pYX242-Vektor mit *LEU2*-Marker genutzt, da eine Selektion über den pFB2-Vektor im EBY100-Stamm aufgrund der Genomintegration des pIU211-Vektors mit *URA3*-Marker zur Galaktose-induzierbaren Aga1p-Expression nicht möglich war (Boder & Wittrup, 1997). Durch die Koexpression beider Expressionsvektoren im *S. cerevisiae*-Stamm EBY100 sollte die mittels Aga1p-Aga2p-Interaktion verankerte ZZ-Domäne eine Interaktion zum Fusionskonstrukt aus EstA und Fc-Region ermöglichen, was über den fotometrischen Assay zur Bestimmung der EstA-Aktivität nachgewiesen werden sollte. Zusätzlich wurde ein Fusionskonstrukt aus EstA und für *E. coli* kodonoptimierter Fc-Region hergestellt, welches als *Bam*HI/*Xho*I-Fragment zur Expression in *E. coli* in den pET24a(+)-Vektor kloniert wurde, um das Fusionsprotein in größeren Mengen zu produzieren und mögliche Probleme bei der Expression bzw. Sezernierung des Fusionsproteins in *S. cerevisiae* zu umgehen. Das isolierte Fusionsprotein wurde dann zusammen mit Hefezellen inkubiert, welche die über Aga1p-Aga2p verankerte ZZ-Domäne exprimierten. Der Nachweis der Immobilisierung erfolgte anhand der fotometrischen Bestimmung der EstA-Aktivität (s. Abb. 25).



**Abb. 25: Schematische Darstellung des Systems zur Zelloberflächenimmobilisierung der Esterase A durch ZZ-Fc-Interaktion.** Es wurde ein Fusionskonstrukt aus den Kohäsın 1- und Kohäsın 2-Domänen aus *C. cellulovorans* und der ZZ-Domäne aus *S. aureus* nach Ito *et al.* (2009) hergestellt, welches im pYD1-Vektor über die Aga1p-Aga2p-Interaktion im EBY100-Stamm immobilisiert wurde („AGA2-SS-AGA2-Koh1-Koh2-ZZ“). Durch die Koexpression mit einem aus der KRE1-Signalsequenz („KRE1-SS“), der EstA aus *B. gladioli* und der Fc-Domäne des humanen IgG1-Antikörpers („KRE1-SS-EstA-Fc“) bestehenden Fusionskonstrukts im pYX242 sollte eine EstA-Immobilisierung durch die ZZ-Fc-Interaktion über die EstA-Aktivität in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Alternativ wurde das „EstA-Fc“-Konstrukt ohne KRE1-Signalsequenz in den pET24a(+)-Vektor kloniert, in *E. coli* exprimiert und das Protein mittels Zellaufschluss isoliert. Durch eine Inkubation mit Hefezellen, welche die über Aga2p verankerte ZZ-Domäne exprimierten, sollte die ZZ-Fc-Interaktion hergestellt und die Enzymaktivität im EstA-Assay nachgewiesen werden.

Die EstA-Zelloberflächenimmobilisierung über ZZ-Fc-Interaktion sollte durch die Koexpression des Fusionskonstrukts aus den Kohäsın 1- und Kohäsın 2-Domänen aus *C. cellulovorans* und der ZZ-Domäne aus *S. aureus* im pYD1-Vektor sowie dem Fusionskonstrukt aus EstA und Fc-Domäne des humanen IgG1-Antikörpers im pYX242-Vektor im EBY100-Stamm erreicht werden. Neben den Kotransformanten wurden auch alle einzelnen Konstrukte im EstA-Assay untersucht und mit den Kontrollen der Leervektoren pYD1 und pYX242 vor und nach Galaktose-Induktion verglichen. Hierzu wurden die Transformanten über unterschiedliche Zeiträume bei 30 °C induziert (1 d, 2 d und 7 d) und im EstA-Assay auf Aktivität untersucht. Für keine der Bedingungen und keinen der eingesetzten Kulturüberstände konnten EstA-Aktivitäten festgestellt werden. Auch eine zusätzliche Supplementation von 2 % Glukose zum Induktionsmedium, um eine potenzielle Expressions-

reduktion des konstitutiven pYX242-Vektors durch die im Medium enthaltene Galaktose zu verringern, führte zu keiner detektierbaren EstA-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurde – analog zur Expression des Dockerin-Fusionskonstrukts in 3.3.1 – ein Fusionskonstrukt aus EstA und der Fc-Domäne mit N-terminalem T7-Tag im pET24a(+)-Vektor zur Expression im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) untersucht, wobei die Fc-Domäne für *E. coli* kodonoptimiert wurde. Die Expression des Fusionskonstrukts wurde zu Beginn im Western Blot überprüft und mit dem pET24a(+)-Leervektor im uninduzierten und induzierten Zustand verglichen. Die Bakterienzellen wurden bis zu einer  $OD_{600} = 1,0$  kultiviert und mit 100 mM IPTG 3 h bei 20 °C induziert. Nach Ultraschallaufschluss wurden die Überstände entweder direkt zur SDS-PAGE eingesetzt oder mithilfe des „T7•Tag<sup>®</sup> Affinity Purification Kits“ anhand des T7-Tags aufgereinigt und im Western Blot analysiert (s. Abb. 26).

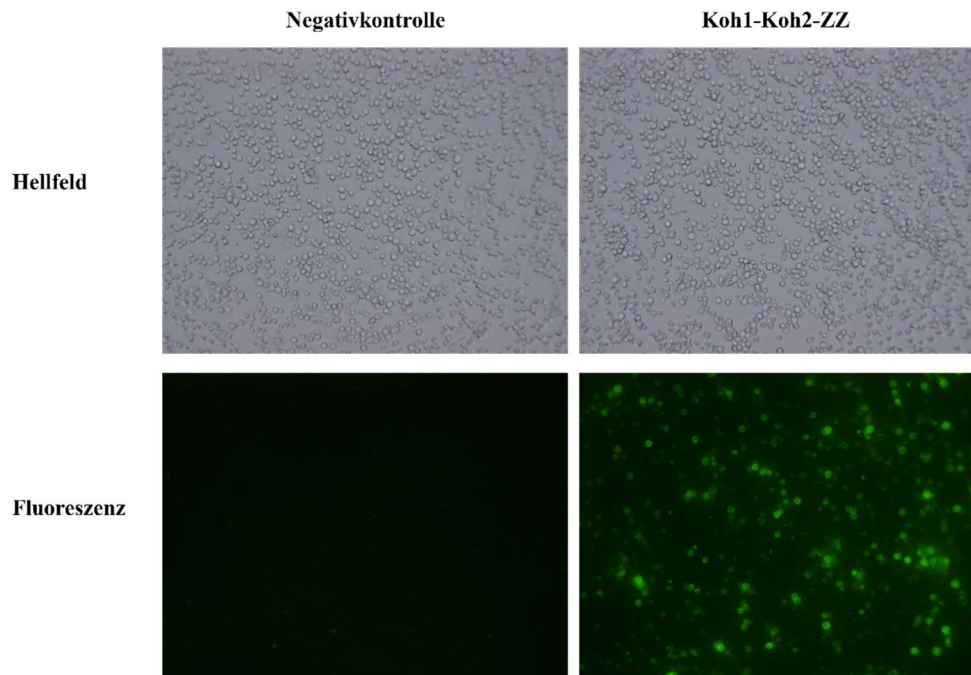


**Abb. 26: Western Blot zum Nachweis der „EstA-Fc“-Expression in *E. coli*.** Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) wurde mit dem „EstA-Fc“-Konstrukt im pET24a(+) transformiert, welches ein N-terminales T7-Tag besaß. Die Bakterienzellen wurden bis zu einer  $OD_{600} = 1,0$  kultiviert, mit 100 mM IPTG 3 h bei 20 °C induziert und das Zellpellet mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde zur SDS-PAGE eingesetzt und mithilfe des „T7•Tag<sup>®</sup> Affinity Purification Kits“ aufgereinigt. Dargestellt sind die Überstände des „EstA-Fc“-Konstrukts ohne Aufreinigung vor („1“) und nach IPTG-Induktion („2“). Zusätzlich wurde der pET24a(+)-Leervektor ohne Aufreinigung vor („3“) und nach IPTG-Induktion („4“) betrachtet. Außerdem wurde der Zellaufschluss der „EstA-Fc“-exprimierenden Kulturen anhand des T7-Tags über eine Säulenmatrix aufgereinigt. Neben dem Durchfluss („DF“) wurden fünf Elutionsfraktionen („F1-F5“) analysiert. Als Marker wurde der „PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder“ der Firma Thermo Scientific („M“) verwendet.

Die Expression des „EstA-Fc“-Konstrukts wurde in unaufgereinigten und aufgereinigten Kulturüberständen untersucht. Für die unaufgereinigten Überstände konnten vor („1“) und nach IPTG-Induktion („2“) ein Signal des Fusionsproteins bei ca. 66 kDa detektiert werden, das nach Induktion stärker war. In der zugehörigen pET24a(+)-Kontrolle konnten vor („3“) und nach Induktion („4“) keine Signale nachgewiesen werden. Zur Aufreinigung des „EstA-Fc“-Fusionsproteins anhand des N-terminalen T7-Tags wurde der Zellaufschluss der induzierten Kulturen eingesetzt. In der Durchfluss-Fraktion („DF“) konnte nach Beladen der Säule ein schwaches Signal bei ca. 66 kDa detektiert werden. Die Proteinelution erfolgte wie zuvor in fünf Elutionsfraktionen („F1-F5“), wobei aufgrund der stärksten Signale in „F1“ und

„F2“ die größten Proteinmengen in den ersten beiden Fraktionen eluiert wurden (s. Abb. 26). Im EstA-Assay konnte für den aufgereinigten Überstand der zweiten Elutionsfraktion im Vergleich zum uninduzierten Überstand und zur Leervektorkontrolle keine EstA-Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden sollte die Immobilisierung der ZZ-Domäne mithilfe des Aga1p-Aga2p-Systems im EBY100-Stamm über Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (s. Abb. 27).



**Abb. 27: Interaktion der zellwandverankerten ZZ-Domäne mit IgG-Antikörpern in *S. cerevisiae*.** Das C-terminale Fusionskonstrukt der Kohäsin 1- und Kohäsin 2-Domänen aus *C. cellulovorans* und der ZZ-Domäne aus *S. aureus* mit dem Ankerprotein Aga2p wurde im pYD1-Vektor in den EBY100-Stamm transformiert. Die Transformanten wurden in Trp d/o-Glukose-Medium über Nacht bei 30 °C kultiviert, in Galaktose-haltiges Medium geschiftet und 2 d bei 30 °C unter Schütteln induziert. Als Negativkontrolle wurde ein Fusionskonstrukt der EstA mit Aga2p ohne ZZ-Komponenten im pYD1 genutzt. Die Zellen wurden mit einem Anti-HA-Antikörper (Hase) 1,5 h auf Eis inkubiert, in 1 x PBS (pH 8,0) gewaschen und mit einem FITC-konjugierten Anti-Hase-IgG-Antikörper 1,5 h auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen und Resuspension in 1 x PBS (pH 8,0) wurden die Hefezellen zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Dargestellt sind die Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen der Hefezellen, die mit der Negativkontrolle und dem Koh1-Koh2-ZZ-Konstrukt transformiert wurden.

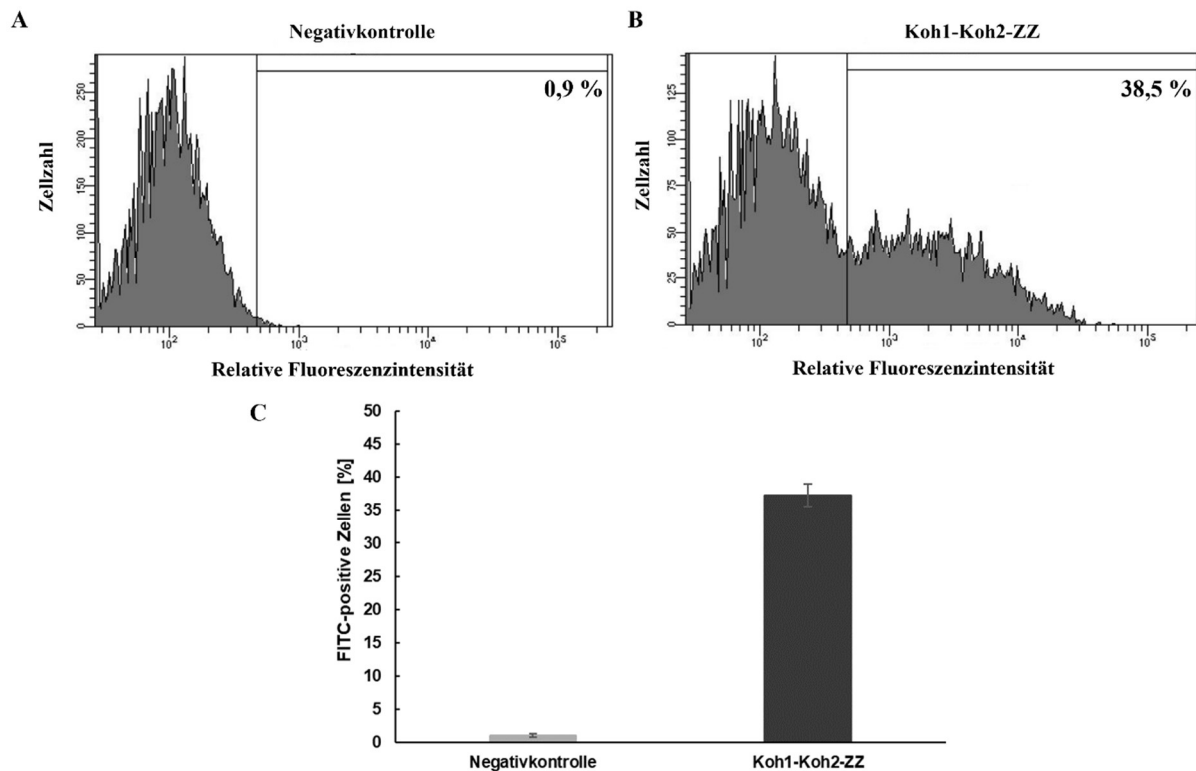
Die C-terminale Zellwandverankerung der ZZ-Domäne über die Aga1p-Aga2p-Interaktion sollte nach einer Galaktose-Induktion über 2 d bei 30 °C im EBY100-Stamm mittels Immunfluoreszenz überprüft werden. Als Negativkontrolle diente ein Fusionskonstrukt aus der EstA mit Aga2p, welches über keine ZZ-Komponenten verfügte. Der Nachweis der

---

verankerten ZZ-Domäne beruhte auf dessen Affinität zu verschiedenen IgG-Klassen unterschiedlichen Ursprungs, wobei sie Affinitäten zu den humanen IgG1-, IgG2- und IgG4-Antikörpern sowie zu allen IgG-Klassen aus Hasen zeigt (Kronvall & Williams, 1969; Lind & Mansa, 1968; Nakamura *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde ein in der Arbeitsgruppe vorhandener primärer Anti-HA-Antikörper gewählt, der in Hasen produziert wurde und über einen sekundären FITC-gekoppelten Anti-Hase-Antikörper nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich waren im Vektor und den Konstrukten keine HA-Tags enthalten, wodurch keine fehlerhaften Fluoreszenznachweise auftreten sollten. Die induzierten Hefezellen wurden zu Beginn 1,5 h mit dem primären Antikörper auf Eis und nach Waschen in 1 x PBS (pH 8,0) mit dem sekundären Antikörper bei gleichen Konditionen inkubiert. Die gewaschenen Zellpellets wurden in 1 x PBS (pH 8,0) resuspendiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Bei Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte festgestellt werden, dass die Hefezellen mit verankerter ZZ-Domäne eine deutliche Fluoreszenz zeigten und die C-terminale Zellwandverankerung über das Aga1p-Aga2p-System somit erfolgreich war. Im Gegensatz dazu konnte für die Hefezellen, die keine ZZ-Domäne exprimierten, keine Fluoreszenz detektiert werden (s. Abb. 27).

Neben dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der ZZ-Immobilisierung wurden die zuvor eingesetzten Transformanten auch durchflusszytometrisch auf Fluoreszenz überprüft und mit der Kontrolle verglichen (s. Abb. 28).





**Abb. 28: Durchflusszytometrischer Nachweis der Interaktion der zellwandverankerten ZZ-Domäne mit IgG-Antikörpern in *S. cerevisiae*.** Das C-terminale Fusionskonstrukt der Kohäsin 1- und Kohäsin 2-Domänen aus *C. cellulovorans* und der ZZ-Domäne aus *S. aureus* mit dem Ankerprotein Aga2p wurde im pYD1-Vektor in den EBY100-Stamm transformiert. Die Transformanten wurden in Trp d/o-Glukose-Medium über Nacht bei 30 °C kultiviert, in Galaktose-haltiges Medium geschiftet und 2 d bei 30 °C unter Schütteln induziert. Als Negativkontrolle wurde ein Fusionskonstrukt der EstA mit Aga2p ohne ZZ-Komponenten im pYD1 genutzt. Die Zellen wurden mit einem Anti-HA-Antikörper (Hase) 1,5 h auf Eis inkubiert, in 1 x PBS (pH 8,0) gewaschen und mit einem FITC-konjugierten Anti-Hase-IgG-Antikörper 1,5 h auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen und Resuspension in 1 x PBS (pH 8,0) wurden die Hefezellen zur FACS-Analyse eingesetzt. Dargestellt sind die repräsentativen Histogramme der Hefezellen, die mit der Negativkontrolle (A) und dem Koh1-Koh2-ZZ-Konstrukt (B) transformiert wurden. Für jedes Konstrukt wurden zwei biologische Replikate ( $n = 2$ ) mit jeweils 10.000 Zellen gemessen und der prozentuale Anteil der FITC-positiven Zellen ist rechts oben dargestellt. Die zugehörigen Mittelwerte des prozentualen Anteils an FITC-positiven Zellen [%] der zwei biologischen Replikate der Negativkontrolle und des Koh1-Koh2-ZZ-Konstrukts mit Standardabweichungen sind als Balkendiagramm dargestellt (C).

Die Hefezellen des EBY100-Stamms, welche das „Koh1-Koh2-ZZ“-Fusionskonstrukt und die Negativkontrolle ohne ZZ-Komponenten exprimierten, wurden wie zuvor bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse mit den gleichen Antikörpern behandelt und anschließend mittels FACS untersucht. In Abb. 28 ist jeweils ein exemplarisches Histogramm der Negativkontrolle („A“) und des Transformanten, der das ZZ-Fusionskonstrukt exprimierte („B“), dargestellt. Es wurden jeweils zwei biologische Replikate ( $n = 2$ ) mit jeweils 10.000 Zellen analysiert und

der Mittelwert des prozentualen Anteils an FITC-positiven Zellen („C“) bestimmt. Der Anteil an FITC-positiven Hefen der Negativkontrolle betrug 1,1 %, wohingegen für die über Aga2p verankerte ZZ-Domäne 37,3 % aller Hefezellen ein Fluoreszenzsignal zeigten, was die C-terminale Zellwandverankerung der ZZ-Domäne über das Aga1p-Aga2p-Verankerungssystem ebenfalls bewies (s. Abb. 28).

Aufgrund des erfolgreichen Nachweises der beiden einzelnen Komponenten mittels Western Blot bzw. Immunfluoreszenz und FACS sollte die Interaktion zwischen ZZ-Domäne und EstA mit fusionierter Fc-Region überprüft werden. Hierzu wurden Hefezellen, welche die über Aga2p verankerte ZZ-Domäne exprimierten, mit den in *E. coli* produzierten und anhand des T7-Tags aufgereinigten Proteinüberständen inkubiert. Die Expression der ZZ-Domäne im EBY100-Stamm wurde über Nacht in Galaktose-haltigem Medium induziert und die Inkubation mit den „EstA-Fc“-Überständen erfolgte über variable Zeiträume (3 h, 1-3 d) bei 20 °C auf dem Drehrad. Nach Waschen in 1 x PBS (pH 8,0) wurden die Hefen im EstA-Assay auf Aktivität überprüft und mit Hefezellen verglichen, welche ebenfalls die ZZ-Domäne exprimierten und mit dem induzierten Überstand der pET24a(+)-Leervektor exprimierenden *E. coli* inkubiert wurde. Für keine der untersuchten Konditionen konnte eine EstA-Aktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Interaktion zwischen der synthetischen ZZ-Domäne aus *S. aureus* und der Fc-Region des humanen IgG-Antikörpers sollte zur Verankerung der EstA auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* genutzt werden. In den Experimenten konnte eine Expression des in *E. coli* produzierten Fusionskonstrukts aus EstA und kodonoptimierter Fc-Region im Western Blot detektiert werden, wobei jedoch keine EstA-Aktivität fotometrisch bestimmt werden konnte. Die C-terminale Zellwandverankerung der über das Aga1p-Aga2p-System verankerten ZZ-Domäne konnte in *S. cerevisiae* fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch erfolgreich bewiesen werden. Eine Immobilisierung der EstA durch die Interaktion zwischen ZZ-Domäne und Fc-Region konnte aufgrund der ausgebliebenen Aktivität der EstA fotometrisch nicht nachgewiesen werden.

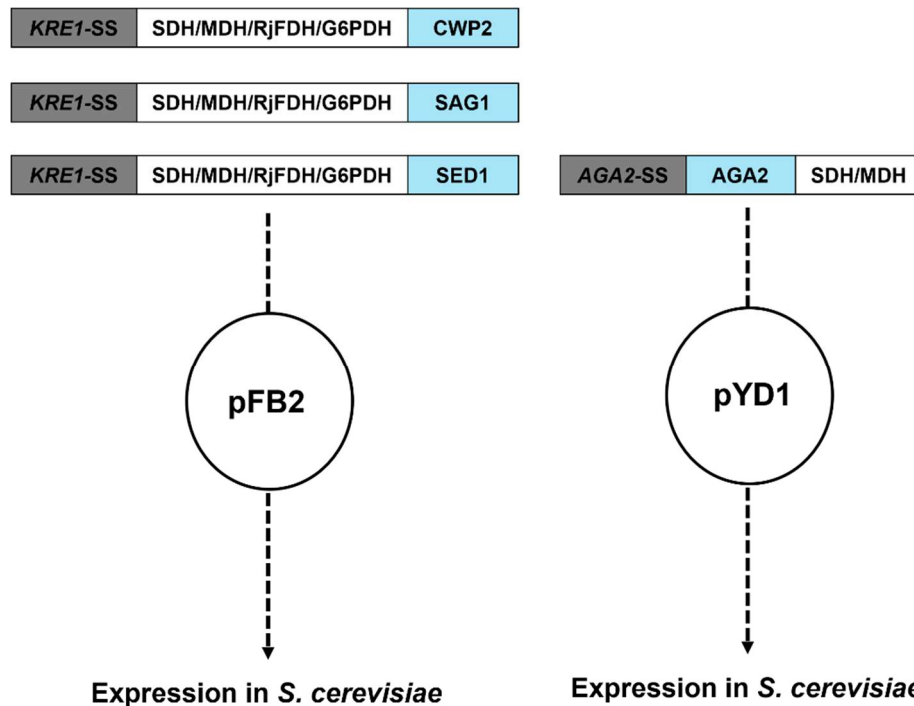
### 3.4 Zelloberflächenexpression bakterieller Dehydrogenasen

Zusätzlich zur bakteriellen Esterase A sollten über die zuvor untersuchten Zelloberflächenexpressionssysteme vier Kofaktor-abhängige Dehydrogenasen auf der Oberfläche von Hefen immobilisiert und durch die Etablierung von enzymatischen Aktivitätsassays nachgewiesen werden. Die Enzymklasse der Dehydrogenasen wurde gewählt, da einzelne Vertreter bisher nur in *E. coli* mithilfe des Autodisplays immobilisiert werden konnten, wohingegen ein

---

Zelloberflächenverankerungssystem für die hier untersuchten Enzyme in Hefen noch nicht beschrieben wurde (Jose & von Schwichow, 2004; Schüürmann *et al.*, 2017). Neben der Sorbitol- (SDH) und Mannitoldehydrogenase (MDH) aus *R. sphaeroides* wurden eine aus *Rhodococcus jostii* stammende Formiatdehydrogenase (RjFDH) und die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) aus *E. coli* betrachtet. Darüber hinaus sollte durch die Expression der Dehydrogenasen untersucht werden, ob eine Zelloberflächenimmobilisierung dieser dimeren Dehydrogenasen funktionell ist, um als übergeordnetes Ziel NADH-/NADPH-Regenerationssysteme in *S. cerevisiae* zu generieren. Hierzu wurden neben der monomeren SDH die dimeren Enzyme MDH, RjFDH und G6PDH analysiert, die zusätzlich zur Katalyse des Umsatzes ihrer jeweiligen Substrate auf die Kofaktoren NAD<sup>+</sup> (bei SDH, MDH und RjFDH) bzw. NADP<sup>+</sup> (bei G6PDH) angewiesen sind. Aufgrund der erstmaligen Nutzung der Dehydrogenasen für die Zellwandverankerung in Hefen wurden Enzymsequenzen der MDH, RjFDH und G6PDH eingesetzt, die für *S. cerevisiae* kodonoptimiert wurden.

Analog zur N-terminalen Verankerung der EstA wurden Fusionskonstrukte aus der *KRE1*-Signalsequenz, der jeweiligen Dehydrogenasesequenz und der Sequenz der Zellwandanker Cwp2p, Sag1p oder Sed1p als *XhoI/BglIII*-Fragment in den pFB2-Vektor kloniert und in *S. cerevisiae* exprimiert. Bei der Fusion aus SDH und Cwp2p konnte auf ein bereits zuvor generiertes Konstrukt im pFB2 zurückgegriffen werden, welches keine Kodonoptimierung für *S. cerevisiae* aufwies (Rau, 2004). Für die C-terminale Verankerung über das Aga1p-Aga2p-System wurden pYD1-Expressionsvektoren mit einem Fusionskonstrukt aus *AGA2*-Signalsequenz, Aga2p und den Dehydrogenasen SDH oder MDH mittels „In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning“ generiert und im EBY100-Stamm exprimiert. Der Nachweis einer erfolgreichen Zelloberflächenimmobilisierung sollte über den Substratumsatz der Dehydrogenasen unter gleichzeitiger Reduktion des jeweiligen Kofaktors in einem fotometrischen Assay erfolgen (s. Abb. 29).



**Abb. 29:** Schematische Darstellung der zur Zellwandimmobilisierung der bakteriellen Dehydrogenasen verwendeten Fusionskonstrukte in *S. cerevisiae*. Die N-terminalen Fusionskonstrukte bestanden aus einer *KRE1*-Signalsequenz („*KRE1*-SS“), vier unterschiedlichen bakteriellen Dehydrogenasen und den Ankerproteinen Cwp2p, Sag1p und Sed1p. Als Enzyme wurden die Sorbitol- (SDH) und Mannitoldehydrogenase (MDH) aus *R. sphaeroides* sowie die Formiatdehydrogenase aus *R. jostii* (RjFDH) und die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *E. coli* (G6PDH) betrachtet, die für den Substratumsatz auf einen Kofaktor angewiesen sind. Die Fusionskonstrukte wurden in den pFB2-Vektor kloniert und zur Zelloberflächenexpression in *S. cerevisiae* exprimiert. Für die Fusion aus SDH und Cwp2p wurde ein bereits zuvor generiertes Konstrukt im pFB2 genutzt (Rau, 2004). Die C-terminalen Fusionskonstrukte bestanden aus einer *AGA2*-Signalsequenz („*AGA2*-SS“), dem Ankerprotein Aga2p sowie der SDH bzw. MDH und wurden mittels „In-Fusion® HD Cloning“ in den pYD1-Vektor kloniert. Die Zelloberflächenexpression erfolgte im *S. cerevisiae*-Stamm EBY100, welcher das *AGA1*-Gen unter Kontrolle eines induzierbaren *GALI*-Promotors exprimiert und dadurch die indirekte Immobilisierung des Fusionskonstrukts aus Aga2p und SDH bzw. MDH ermöglichen sollte (s. Abb. 2). Zum Nachweis der Zelloberflächenexpression wurden für jedes Enzym fotometrische Assays durchgeführt, die auf dem jeweiligen Substratumsatz und der Reduktion des Kofaktors beruhten.

### 3.4.1 Zelloberflächenexpression der SDH und MDH in *S. cerevisiae*

Für den Nachweis der Zelloberflächenimmobilisierung der SDH und MDH aus *R. sphaeroides* als N- bzw. C-terminale Fusionskonstrukte mit den Zellwandankern Cwp2p, Sag1p, Sed1p bzw. Aga2p wurden enzymatische Assays nach Schneider & Giffhorn (1989) und Rau (2004) durchgeführt, bei welchen Variationen in den Puffer- und Substratkonzentrationen getestet wurden. Die Detektion eines  $\text{NAD}^+$ -Umsatzes im fotometrischen Assay, welcher für den Nachweis der Dehydrogenasenaktivität notwendig war, wurde

---

mithilfe eines Referenz-Assays überprüft, der auf einer aus Rinderherzen aufgereinigten L-Laktatdehydrogenase (L-LDH, EC 1.1.1.27) beruhte. Die L-LDH katalysiert den Umsatz des Substrats L-Laktat zu Pyruvat unter Reduktion des Kofaktors  $\text{NAD}^+$  zu NADH. Bei einer Wellenlänge von 340 nm konnte eine Absorptionssteigerung und somit eine NADH-Zunahme nachgewiesen werden, weshalb im Folgenden fotometrische Assays zur Bestimmung des Kofaktor-Umsatzes für den Nachweis der Dehydrogenasen-Aktivität eingesetzt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

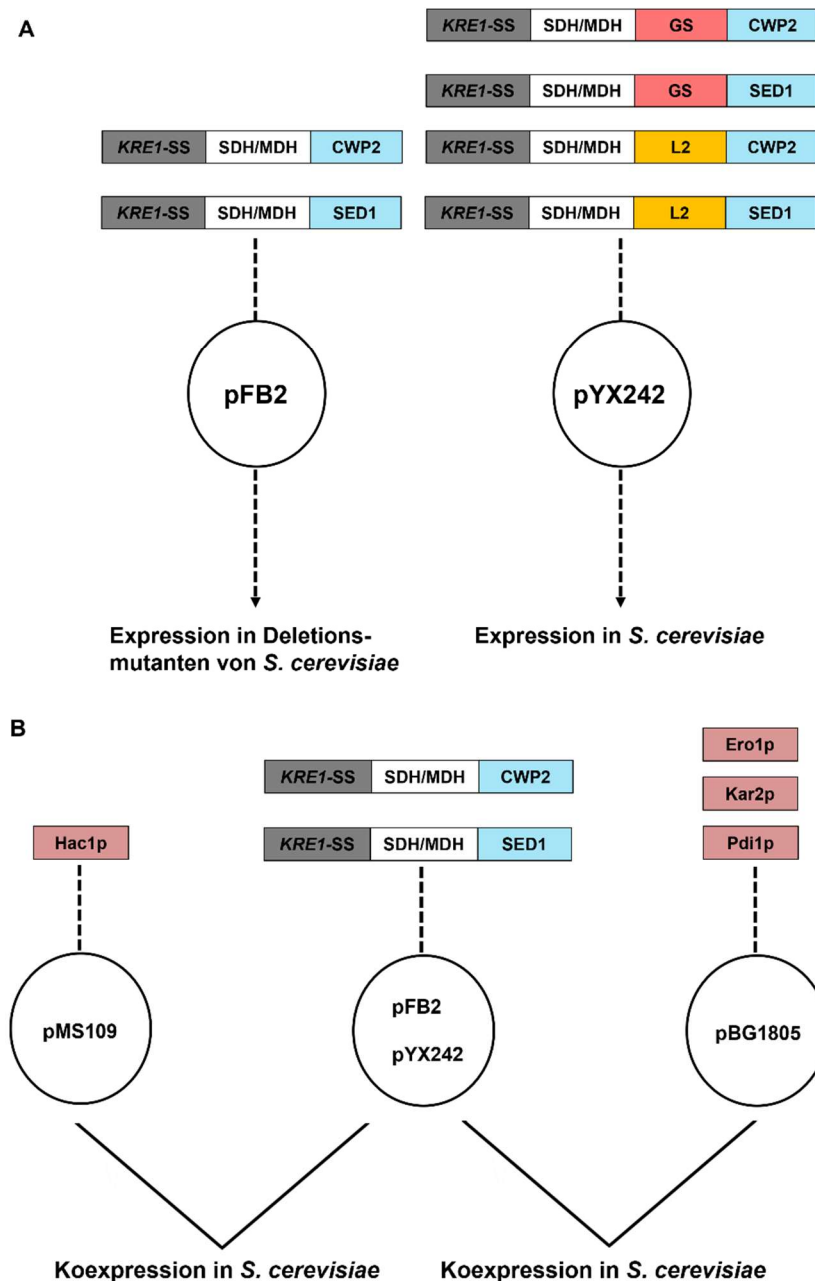
Die N-terminalen Fusionskonstrukte der SDH und MDH wurden zur Expression im pFB2-Vektor in die *S. cerevisiae*-Stämme BY4742 und SEY6210 transformiert. Der Nachweis der Immobilisierung der SDH beruhte auf einer von der SDH katalysierten Reaktion, bei welcher das Substrat D-Sorbitol zu D-Fruktose umgesetzt wird. Für die MDH erfolgte der Nachweis durch den Umsatz von D-Mannitol zu D-Fruktose. Die Reaktionen beider Dehydrogenasen wurden anhand der  $\text{NAD}^+$ -Reduktion zu NADH fotometrisch bei einer Wellenlänge von 365 nm anhand des Protokolls nach Schneider & Giffhorn (1989) und zusätzlich bei 340 nm mitverfolgt, da der Kofaktor NADH bei der Wellenlänge von 340 nm ein Absorptionsmaximum besitzt (McComb *et al.*, 1976).

Für keine der Kombinationen aus SDH und MDH mit den drei Zellwandankerproteinen Cwp2p, Sag1p und Sed1p konnte eine Absorptionszunahme im Fotometer im Vergleich zur YEp352-Leervektor-Kontrolle beobachtet werden. Auch eine Erhöhung der Konzentration der Substrate D-Sorbitol und D-Mannitol in einem Bereich von 0,15-1,5 M, eine Änderung der Molarität des Tris/HCl-Puffers (0,13 M oder 0,2 M) sowie eine Variation der eingesetzten  $\text{NAD}^+$ -Konzentration (0,7 mM; 1,8 mM; 2,25 mM oder 2,5 mM) führten zu keiner Absorptionszunahme. Zusätzlich erwiesen sich unterschiedliche Temperaturen (20-30 °C) und Kultivierungszeiträume (1-5 d) sowie längere Messzeiträume als nicht förderlich auf die Zelloberflächenimmobilisierung der SDH und MDH. Eine Zellwandisolation der MDH-Fusionskonstrukte in SEY6210 wurde zum Ausschluss eines intrazellulären Substratumsatzes und zur Untersuchung einer Lokalisation des Enzyms auf der Hefezelloberfläche durchgeführt, wobei auch hier keine MDH-Aktivität detektiert werden konnte. Darüber hinaus zeigten C-terminale Fusionskonstrukte aus SDH und MDH mit Aga2p ebenfalls keine Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der ausgebliebenen Aktivitäten der SDH und MDH als N-terminal verankerte Fusionsproteine über Cwp2p, Sag1p oder Sed1p bzw. als C-terminal verankerte Fusionsproteine über Aga1p-Aga2p in *S. cerevisiae* sollten Teile der bereits zuvor bei der EstA-Zelloberflächenimmobilisierung untersuchten Optimierungsstrategien der synthetischen

---

Biologie auch zur Erhöhung der N-terminalen SDH- und MDH-Expression über die Zellwandanker Cwp2p und Sed1p eingesetzt werden. Dadurch sollte eine mögliche sterische Behinderung der präsentierten Dehydrogenasen auf der Zelloberfläche verringert und eine funktionelle Konformation durch eine verstärkte, Chaperon-induzierte Proteinfaltung erreicht werden. Hierzu wurden die beiden Fusionskonstrukte im pFB2-Vektor in den Zellwand-Deletionsmutanten  $\Delta kre1$ ,  $\Delta kre2$ ,  $\Delta kre6$ ,  $\Delta mnn1$ ,  $\Delta mnn2$ ,  $\Delta mnn5$ ,  $\Delta cwp2$  und  $\Delta sed1$  exprimiert und auf Aktivitäten in enzymatischen Assays untersucht. Zusätzlich wurden für jede Kombination aus Dehydrogenase und Zellwandanker Linker-Konstrukte hergestellt, welche die zuvor genutzten Linker („GS“ und „L2“) zwischen Enzym und Ankerprotein enthielten. Durch „In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning“ wurden die Konstrukte in den pYX242-Vektor kloniert und in *S. cerevisiae* exprimiert (s. Abb. 30, A). Um die Expression der SDH und MDH in Abhängigkeit einer erhöhten Proteinfaltung im ER zu steigern, wurden analog zur EstA das UPR-Regulatorprotein Hac1p im pMS109-Vektor mit den beiden SDH- und MDH-Fusionskonstrukten im pFB2-Vektor in *S. cerevisiae* kotransformiert. Zur Koexpression mit den ER-Chaperonen Ero1p, Kar2p und Pdi1p im pBG1805-Vektor wurden die Fusionskonstrukte mittels „In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning“ in den pYX242-Vektor umklont und die Aktivitäten in enzymatischen Assays bestimmt (s. Abb. 30, B).



**Abb. 30: Schematische Darstellung der zur Erhöhung der Zelloberflächenimmobilisierung der Sorbitol- und Mannitoldehydrogenase genutzten Optimierungsstrategien.** (A) Die Fusionskonstrukte aus *KRE1*-Signalsequenz („*KRE1*-SS“), der Sorbitol- (SDH) bzw. Mannitoldehydrogenase (MDH) aus *R. sphaeroides* sowie den Ankerproteinen Cwp2p und Sed1p wurden im pFB2-Vektor zur Zelloberflächenexpression in unterschiedlichen Zellwand-Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* exprimiert. Außerdem wurden die Konstrukte mittels SOE-PCR mit einem Glycin-Serin-Linker (17 AS, „GS“) oder dem „L2“-Linker (14 AS) modifiziert. Die Fusionskonstrukte wurden mittels „In-Fusion® HD Cloning“ in den pYX242-Vektor kloniert und zur Zelloberflächenexpression in *S. cerevisiae* transformiert. (B) Die Fusionskonstrukte „SDH/MDH-CWP2“ und „SDH/MDH-SED1“ wurden einerseits im pFB2-Vektor mit dem Vektor pMS109 koexprimiert, welcher zur Expression des UPR-Regulatorproteins Hac1p in *S. cerevisiae* eingesetzt wurde (Valkonen *et al.*, 2003). Andererseits wurden die Effekte der Koexpression der ER-Chaperone Ero1p, Kar2p und Pdi1p im pBG1805-Vektor auf die im pYX242-Vektor exprimierten „SDH/MDH-CWP2“- und „SDH/MDH-SED1“-Konstrukte in *S. cerevisiae* betrachtet.

Für die Expression der Fusionskonstrukte aus SDH bzw. MDH mit den Zellwandankerproteinen Cwp2p und Sed1p in den acht Zellwand-Deletionsmutanten  $\Delta kre1$ ,  $\Delta kre2$ ,  $\Delta kre6$ ,  $\Delta mnn1$ ,  $\Delta mnn2$ ,  $\Delta mnn5$ ,  $\Delta cwp2$  und  $\Delta sed1$  konnte im Vergleich zum YEp352-Leervektor keine Absorptionszunahme beobachtet und somit keine Enzymaktivität festgestellt werden. Auch für die mit den „GS“- und „L2“-Linkersequenzen modifizierten Fusionskonstrukte wurde keine enzymatische Aktivität im wildtypischen BY4742-Stamm anhand einer NADH-Zunahme fotometrisch detektiert. Der Einfluss des UPR-Regulatorproteins Hac1p im pMS109-Vektor auf die Zelloberflächenverankerung der Fusionskonstrukte aus SDH bzw. MDH mit den Zellwandankern Cwp2p und Sed1p sollte durch die Koexpression im SEY6210-Stamm untersucht werden. Es konnte auch hier für keine der Transformanten eine Absorptionszunahme im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt werden. Eine Erhöhung der Zelloberflächenimmobilisierungseffizienz der über Cwp2p bzw. Sed1p verankerten SDH und MDH durch die Koexpression der ER-Chaperone Ero1p, Kar2p und Pdi1p im pBG1805-Vektor wurde im *S. cerevisiae*-Stamm BY4742 betrachtet. Für keine der Kombinationen aus Fusionskonstrukt und ER-Chaperon war eine Absorptionszunahme in den Assays messbar und somit konnte auch keine zugehörige Volumenaktivität berechnet werden (Daten nicht gezeigt).

Um einen gestörten Transport der Fusionsproteine aus SDH und MDH mit den Zellwandankerproteinen Cwp2p, Sag1p und Sed1p zur Zelloberfläche aufgrund einer Fehlfaltung auszuschließen, sollte der Nachweis einer intrazellulären Akkumulierung von fehlgefalteten Fusionsproteinen nach Zellaufschluss der Transformanten durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung erfolgen. Ein immunologischer Nachweis der Proteinexpression mittels Western Blot war nicht möglich, da keine kommerziellen Antikörper für die beiden Dehydrogenasen aus *R. sphaeroides* verfügbar waren und bei der Konstruktion der Fusionskonstrukte keine Antikörper-Tags genutzt wurden, um Einflüsse auf die Enzymaktivität und -konformation bzw. die Verankerung zu vermeiden. Die *S. cerevisiae*-Stämme BY4742 und SEY6210 wurden mit den Fusionskonstrukten im pFB2-Vektor transformiert und die Transformanten mittels Glasperlen aufgeschlossen. Die Überstände der abzentrifugierten Hefekulturen wurden zusätzlich über Nacht zur TCA-Fällung eingesetzt und zusammen mit den aufgeschlossenen Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung konnten in keinem der mit den SDH- und MDH-Fusionskonstrukten transformierten Hefestämmen Unterschiede in den angefärbten Proteinen im Vergleich zur Kontrolle des YEp352-Leervektors festgestellt werden. Somit konnten die Dehydrogenasen weder sezerniert nach TCA-Fällung noch intrazellulär nach Zellaufschluss nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



Neben der Expression der Dehydrogenasen in *S. cerevisiae* wurden testweise auch die Fusionskonstrukte der MDH mit den Zellwandankern Cwp2p, Sag1p und Sed1p als *EcoRI/AvrII*-Fragment in den pPIC9-Vektor kloniert und in den *P. pastoris*-Stämmen KM71 und GS115 exprimiert, um eine Zellwandverankerung der MDH durch die Expression in einer anderen Hefegattung zu erreichen. Die Hefen wurden – wie unter 3.1.3 beschrieben – in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0) kultiviert, über 4 d bei 28 °C mit 0,5 % Methanol induziert und auf MDH-Aktivität bei einer Wellenlänge von 340 nm getestet. Auch für die Zelloberflächenexpression der MDH in *P. pastoris* konnte in keinem Stamm für keines der Fusionskonstrukte eine Absorptionszunahme durch die Reduktion des Kofaktors NAD<sup>+</sup> im Vergleich zur pPIC9-Negativkontrolle detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte festgehalten werden, dass in den durchgeführten Experimenten keine Aktivitäten der Polyoldehydrogenasen SDH und MDH aus *R. sphaeroides* über die Zellwandimmobilisierung mithilfe der Zellwandanker Cwp2p, Sag1p und Sed1p in *S. cerevisiae* sowie *P. pastoris* fotometrisch bestimmt werden konnten. Auch eine Steigerung der Proteinbiosynthese durch die Koexpression mit dem UPR-Regulatorprotein Hac1p und den ER-Chaperonen Ero1p, Kar2p und Pdi1p sowie die Expression der Fusionskonstrukte in Deletionsmutanten der Zellwand und die Modifikation mit Linkern zwischen Enzym und Ankerprotein führte zu keiner nachweisbaren Enzymaktivität. Aus diesem Grund konnten auch keine enzymatischen Assays zum Nachweis der zellwandverankerten SDH- und MDH-Aktivität in Hefen etabliert werden.

### 3.4.2 Zelloberflächenexpression der RjFDH und G6PDH in *S. cerevisiae*

Als Alternative zu den beiden Dehydrogenasen aus *R. sphaeroides*, die in den jeweiligen enzymatischen Assays keine Aktivität zeigten, wurden zwei dimere Dehydrogenasen aus anderen Bakteriengattungen untersucht, die andere Substrate umsetzen und auch auf die Kofaktoren NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup> angewiesen sind. Zum einen wurde eine Formiatdehydrogenase aus *R. jostii* (RjFDH) analysiert, welche das Substrat Formiat zu Kohlenstoffdioxid oxidiert und den Kofaktor NAD<sup>+</sup> zu NADH reduziert. Zur fotometrischen Analyse wurde ein bereits etabliertes Protokoll, welches das aufgereinigte Enzym zur Aktivitätsbestimmung nutzte, auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefe-Assays angepasst, weshalb Hefezellen mit einer OD<sub>600</sub> = 10 zum Assay eingesetzt wurden (Boldt & Ansorge-Schumacher, 2020). Zum anderen wurde die NADP<sup>+</sup>-abhängige Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) aus *E. coli* untersucht, die den Umsatz von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglukonolaktone unter NADP<sup>+</sup>-Reduktion zu NADPH katalysiert. Der hier genutzte

---

enzymatische Assay wurde nach einem von Schüürmann *et al.* (2017) beschriebenen Protokoll, bei welchem *E. coli*-Zellen mit über Autodisplay immobilisierter G6PDH eingesetzt wurden, ebenfalls auf eine Nutzung mit Hefezellen angepasst. Zur Verankerung wurden N-terminale Fusionskonstrukte aus der *KRE1*-Signal-sequenz, den für *S. cerevisiae* kodonoptimierten Enzymsequenzen sowie den Ankersequenzen von *CWP2*, *SAG1* und *SED1* als *XhoI/BglIII*-Fragment in den pFB2-Vektor kloniert und zur Expression in die *S. cerevisiae*-Stämme BY4742 und SEY6210 transformiert. Die Enzymaktivität beider Dehydrogenasen sollte in Abhängigkeit der NADH- bzw. NADPH-Zunahme bei einer Wellenlänge von 340 nm über einen Zeitraum von 1 min fotometrisch bestimmt werden. Für alle Kombinationen aus Dehydrogenasen und Zellwandankerproteinen konnte in keinem der beiden Hefestämme eine Absorptionzunahme im Vergleich zur YEp352-Leervektorkontrolle festgestellt werden. Eine Verlängerung der Kultivierungsdauer und eine Veränderung der Reaktionstemperatur mit vorgewärmten Versuchsansätzen ermöglichte keine Detektion einer Enzymaktivität (Daten nicht gezeigt).

Somit konnten in der vorliegenden Dissertation die Zelloberflächenimmobilisierung der vier betrachteten Dehydrogenasen aus unterschiedlichen Bakteriengattungen mithilfe der hefe-eigenen Zellwandankerproteine nicht nachgewiesen und entsprechende Assays zur Detektion der Enzymaktivität in Hefen nicht etabliert werden. Unterschiede in den Immobilisierungseffizienzen zwischen monomeren und dimeren Dehydrogenasen auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* konnten aufgrund der ausgebliebenen Enzymaktivitäten nicht festgestellt werden.

---

## 4. Diskussion

Die Immobilisierung von Proteinen auf der Zelloberfläche von Mikroorganismen wird durch den Einsatz einer Vielzahl unterschiedlicher „Surface Display“-Systeme ermöglicht. Verschiedenste Plattformen, deren Grundlage Bakteriophagen, Bakterien, Hefen, Insekten- oder auch Säugerzellen bilden können, wurden in der Vergangenheit erfolgreich zur Zelloberflächenimmobilisierung von Proteinen etabliert. Das jeweilige Expressionssystem wird anhand der Eigenschaften des Zielproteins gewählt, um bestmögliche Immobilisierungseffizienzen zu erzielen (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Teymennet-Ramírez *et al.*, 2022). Das „Surface Display“ konnte bereits zur Generierung von Biokatalysatoren, Biosensoren, Impfstoffen oder auch enzymatischen Reaktionsketten genutzt werden, weshalb es in der biotechnologischen oder pharmazeutischen Forschung vermehrt Anwendung findet (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Lozančić *et al.*, 2019; Park, 2020). Hefen eignen sich als eukaryotischer Organismus insbesondere für die Nutzung im YSD, da sie neben ihrer einfachen Kultivierung und genetischen Manipulierbarkeit auch in der Lage sind posttranslationale Modifikationen an Proteinen durchzuführen (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Demain & Vaishnav, 2009; Kondo & Ueda, 2004; Teymennet-Ramírez *et al.*, 2022). Die Basis der Systeme bilden hefeeigene Zellwandproteine, die mit Ausnahme der Pir-Proteine über einen am C-Terminus lokalisierten GPI-Anker kovalent mit dem  $\beta$ -Glukan-Rückgrat der Hefezellwand verbunden sind, wodurch sie unterschiedliche Arten der Fusion mit dem zu immobilisierenden Protein ermöglichen. Die Effizienz der Immobilisierung ist hierbei stark von den Eigenschaften der Proteine und Hefegattungen sowie der zur Expression genutzten Promotoren, Terminatoren und Signalsequenzen abhängig (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Inokuma *et al.*, 2016; Kapteyn *et al.*, 1999; Tanaka & Kondo, 2015; Teymennet-Ramírez *et al.*, 2022). In früheren Experimenten wurden Systeme zur Zelloberflächenimmobilisierung der bakteriellen Esterase A aus *B. gladioli* mit hefeeigenen Zellwandproteinen etabliert (Breinig *et al.*, 2006). Die Immobilisierung der EstA sollte in dieser Arbeit durch die Nutzung weiterer Zellwandanker in unterschiedlichen Hefestämmen optimiert werden. Mithilfe synthetischer Biologie wurden Einflüsse einer veränderten Zellwandstruktur, einer erhöhten extrazellulären Zugänglichkeit des Enzyms sowie einer gesteigerten Proteinbiosynthese auf die Immobilisierungseffizienz untersucht. Durch die Analyse unterschiedlicher Kombinationen aus Promotoren und Terminatoren sollte eine Expressionssteigerung auf transkriptioneller Ebene erreicht werden. Zusätzlich wurde die Immobilisierung der EstA erstmalig mithilfe zweier Verankerungssysteme betrachtet, die auf unterschiedlichen Protein-Protein-Interaktionen beruhen. Basierend auf diesen Untersuchungen sollten vier bakterielle Dehydrogenasen mithilfe der

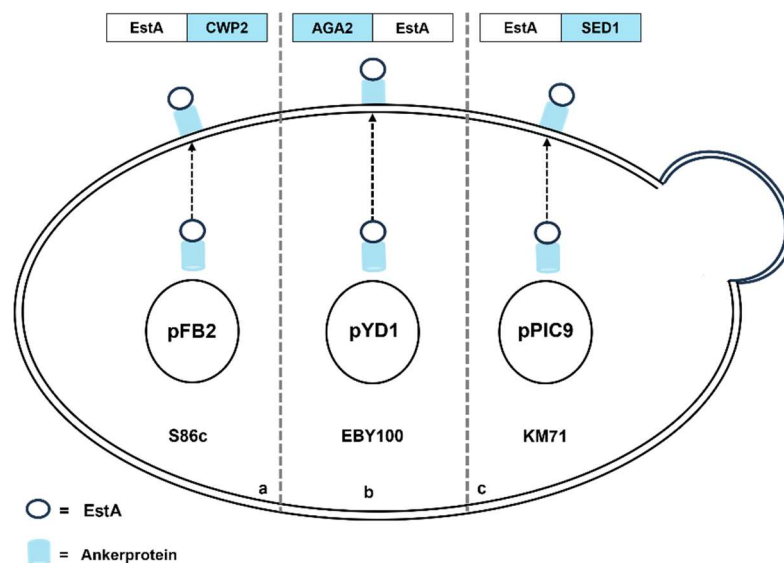
genutzten Verankerungssysteme erstmalig in Hefen immobilisiert und durch Aktivitätsassays nachgewiesen werden. Die verwendeten Kofaktor-abhängigen Dehydrogenasen zeichnen sich durch verschiedene strukturelle Konformationen aus, wodurch Unterschiede in der Zellwandverankerung mono- und dimerer Enzyme in Hefen näher beleuchtet werden sollten. Eine funktionelle Verankerung dieser Dehydrogenasen auf der Hefezelloberfläche könnte durch die Nutzung als Ganzzell-Biokatalysatoren eine zukünftige Generierung von Kofaktor-Regenerationssystemen ermöglichen, was bisher nur für die verwendete G6PDH in *E. coli* erreicht werden konnte (Schüürmann *et al.*, 2017).

### **Expressionsanalyse der bakteriellen Esterase A auf der Zelloberfläche von Hefen**

In *S. cerevisiae* konnten über 20 unterschiedliche Zellwandproteine in genomischen Analysen identifiziert werden, die über einen GPI-Anker mit dem  $\beta$ -1,3-Glukan-Rückgrat der Hefezellwand verbunden sind (Andreu & Lí del Olmo, 2018; De Groot *et al.*, 2003; Klis *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2005). Zur Immobilisierung von Fremdproteinen auf der Hefezelloberfläche wurden von der Klasse der GPI-verankerten Zellwandankerproteine Sag1p, Cwp2p und Sed1p sowie die  $\alpha$ -Agglutinine Aga1p und Aga2p am meisten in der Forschung genutzt. Sag1p, Cwp2p und Sed1p erlauben aufgrund ihres am C-Terminus lokalisierten GPI-Ankers nur eine N-terminale Fusion mit dem Zielprotein. Im Gegensatz dazu besitzt das Aga1p-Aga2p-System die Möglichkeit N- und C-terminale Proteinfusionen mit dem Adhäsionsprotein Aga2p zu untersuchen, da es über Disulfidbrücken mit der GPI-verankerten Aga1p-Untereinheit verbunden ist (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Cappellaro *et al.*, 1994; Lozančić *et al.*, 2019; Roy *et al.*, 1991). Mithilfe dieser Zellwandproteine konnten bereits viele verschiedene Enzymklassen aus unterschiedlichen Spezies, wie z. B. Galaktosidasen, Endoglukanasen oder auch Lipasen, erfolgreich immobilisiert werden (Inokuma *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2010a; Schreuder *et al.*, 1993; Van der Vaart *et al.*, 1997).

Aufbauend auf einem von Breinig & Schmitt (2002) entworfenen Zellwandverankerungssystem, welches auf der N-terminalen Zellwandverankerung eines HA-Peptids über die Ankerproteine Cwp2p und Flo1p beruhte, konnte in darauffolgenden Studien die bakterielle Esterase A auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* erfolgreich immobilisiert werden (Breinig *et al.*, 2006). Die direkte Zellwandverankerung der EstA sollte in dieser Arbeit durch die Nutzung weiterer Zellwandproteine in unterschiedlichen Hefestämmen optimiert und die enzymatische Aktivität erhöht werden. Hierzu wurden in den vorliegenden Versuchen N-terminale Fusionskonstrukte im pFB2-Vektor generiert, die einen analogen Aufbau zu den bei Breinig *et al.* (2006) genutzten Fusionskonstrukten besaßen und unter der

transkriptionellen Kontrolle eines konstitutiven *PGKI*-Promotors und -Terminators standen. Sie setzten sich aus der *KRE1*-Signalsequenz zum ER-Import, der EstA-Sequenz und dem C-Terminus der jeweiligen Zellwandankerproteine mit GPI-Anker zusammen. Zusätzlich zum von Breinig *et al.* (2006) hergestellten Cwp2p-Fusionskonstrukt wurden in dieser Arbeit zur N-terminalen Verankerung die Zellwandproteine Sag1p und Sed1p betrachtet. Sie wurden aufgrund einer komparativen Studie von Van der Vaart *et al.* (1997) ausgewählt, da sie dort neben Cwp2p die höchsten Effizienzen in der Immobilisierung einer  $\alpha$ -Galaktosidase zeigten. Zusätzlich wurden Stamm-spezifische Unterschiede der EstA-Aktivitäten zwischen unterschiedlichen *S. cerevisiae*-Stämmen in Kombination mit zwei verschiedenen Expressionsvektoren für die betrachteten EstA-Fusionskonstrukte analysiert. Ein zusammenfassender Überblick über die Kombinationen aus Hefestamm, Expressionsvektor und Fusionskonstrukt, welche die höchsten Volumenaktivitäten in den einzelnen Expressionssystemen zeigten, ist in Abb. 31 dargestellt.



**Abb. 31: Schematischer Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Verankerungssysteme zur EstA-Immobilisierung in Hefen.** Die EstA aus *B. gladioli* wurde über direkte Fusionen mit hefeeigenen Zellwandankerproteinen auf der Zelloberfläche immobilisiert und mithilfe von Aktivitätsassays nachgewiesen. Dargestellt sind die Kombinationen aus Hefestamm, Vektor und Fusionsprotein, für welche in den Experimenten die höchsten Volumenaktivitäten festgestellt werden konnten. Für die N-terminale Verankerung wies das „EstA-CWP2“-Konstrukt nach Expression im pFB2-Vektor im *S. cerevisiae*-Stamm S86c die höchste Volumenaktivität auf (a). Eine C-terminale Verankerung wurde im EBY100-Stamm durch die Expression im pYD1-Vektor über das Aga1p-Aga2p-System erreicht (b). In der Hefegattung *P. pastoris* zeigte das N-terminale Fusionskonstrukt aus EstA und Sed1p nach Expression im pPIC9-Vektor im KM71-Stamm die höchste Volumenaktivität (c).

Für alle Fusionskonstrukte aus EstA und den drei Zellwandankern Cwp2p, Sag1p und Sed1p konnten in den *S. cerevisiae*-Stämmen BY4742, S86c und SEY6210 erfolgreich Volumenaktivitäten detektiert werden, die eine erstmalige Verankerung der EstA über Sag1p und Sed1p in *S. cerevisiae* demonstrierten und je nach Zellwandankerprotein sowie Expressionsstamm variierten. Im BY4742-Stamm zeigten sich Cwp2p und Sed1p als effizienteste Verankerungsproteine, wohingegen im S86c-Stamm die höchsten Volumenaktivitäten aller Hefestämme festgestellt wurden und Cwp2p als effizientestes Ankerprotein für die EstA-Immobilisierung identifiziert werden konnte (s. Abb. 31, a). Der SEY6210-Stamm erwies sich aufgrund der insgesamt gesehen niedrigsten Volumenaktivitäten der EstA-Fusionskonstrukte als weniger geeignet für die Zellwandimmobilisierung der EstA. Die drei verwendeten C-Termini der Zellwandanker unterschieden sich in ihren Größen, indem von Cwp2p 71 AS, von Sed1p 230 AS und von Sag1p 320 AS zur Zellwandverankerung verwendet wurden, was eine potenzielle Untersuchung einer Korrelation der Ankerlänge mit der EstA-Aktivität zuließ (Van der Vaart *et al.*, 1997). Es zeigte sich, dass sich für die Verankerung der EstA anscheinend eher kürzere Zellwandanker, wie Cwp2p, eigneten. Längere Ankerproteine, wie Sag1p, führten zu reduzierten Volumenaktivitäten, was möglicherweise auf eine verringerte Immobilisierungseffizienz in der Zellwand zurückzuführen war. Beim Vergleich der EstA-Immobilisierung über Cwp2p mit einer verkürzten Version des C-Terminus von Flo1p (104 AS) fiel hingegen auf, dass die Verankerung über Flo1p wiederum zu niedrigeren Volumenaktivitäten der EstA führte. Es wurde vermutet, dass Cwp2p im Gegensatz zur genutzten Flo1p-Version bereits als optimiertes Ankerprotein vorlag und die drastische Verkürzung von Flo1p zur Reduktion der Enzymaktivität führte (Breinig *et al.*, 2006; Rau, 2004). Für die Zellwandimmobilisierung einer Glukoamylase aus *R. oryzae* über Flo1p traten hingegen die höchsten Enzymaktivitäten für längere Ankerversionen des C-Terminus auf (Sato *et al.*, 2002). Bei der Zellwandverankerung einer  $\alpha$ -Galaktosidase über Ankerproteine unterschiedlicher Längen stellten sich Cwp2p, Sed1p und Sag1p als die effizientesten Kandidaten heraus, jedoch konnte auch dort kein Bezug zwischen den Ankerlängen und der Effizienz der Immobilisierung hergestellt werden (Van der Vaart *et al.*, 1997). Demnach scheinen die Zellwandankerproteine variable Verankerungseffizienzen für unterschiedliche Enzyme zu zeigen. In dieser Arbeit konnte somit keine allgemeine Beziehung zwischen EstA-Immobilisierungseffizienz und Ankerlänge in Kombination mit den hier dargestellten Ankerproteinen abgeleitet werden. Zur Analyse des Einflusses der Ankerlänge auf die EstA-Immobilisierungseffizienz könnten deshalb Studien mit weiteren Ankerproteinen

---

unterschiedlicher Längen durchgeführt werden, um eine potenzielle Korrelation zwischen EstA-Verankerung und Ankerlänge näher zu analysieren.

In früheren Studien zur Etablierung des Cwp2p-vermittelten EstA-Verankerungssystems im SEY6210-Stamm erfolgte die Kultivierung der Transformanten in einem pH-regulierten Bioreaktor, was zur Detektion einer Volumenaktivität von 572 mU/ml führte (Breinig *et al.*, 2006; Diehl, 2008; Rau, 2004). Einen direkten Vergleich mit den erhaltenen Ergebnissen lässt dies nur bedingt zu, da hier keine permanente pH-Regulation des Wachstumsmediums betrachtet wurde. Jedoch zeigte sich, dass auch ohne die Kultivierung in einem Bioreaktor höhere Volumenaktivitäten und Anker- sowie Stamm-spezifische Unterschiede für die EstA-Immobilisierung beobachtet werden konnten, was möglicherweise in zukünftigen Experimenten auch mit der Kultivierung in einem pH-regulierten Fermenter kombiniert werden könnte. Aufgrund der Verwendung dreier unabhängiger biologischer und technischer Replikate sowie der Nutzung von Zellsuspensionen mit gleichen optischen Dichten ( $OD_{600} = 10$ ) in den enzymatischen Assays wurde in dieser Arbeit auf die Bestimmung spezifischer Aktivitäten verzichtet, da auch die Volumenaktivitäten einen relativen Vergleich zueinander ermöglichten und Unterschiede infolge von Optimierungen der Fusionskonstrukte detektierbar waren. Ein Vergleich zu den spezifischen Aktivitäten aus den oben genannten Veröffentlichungen wurde deshalb nicht gezogen.

Zum Nachweis der Lokalisation der Fusionsproteine in der Zellwand der drei untersuchten Hefestämme wurden die Zellwände der Transformanten isoliert, mit einer Laminarinase zur Spaltung der  $\beta$ -1,3-glykosydischen Bindungen behandelt und die verbliebenen Volumenaktivitäten nach Glukanase-Behandlung miteinander verglichen. Durch die Abnahme der Volumenaktivitäten nach Laminarinase-Verdau konnte die Zellwandverankerung aller Fusionskonstrukte aus EstA und den Zellwandproteinen Cwp2p, Sag1p und Sed1p erfolgreich nachgewiesen werden. Auch hier zeigten sich geringere Abnahmen in den Volumenaktivitäten im S86c-Stamm, was für eine effizientere bzw. stabilere Verankerung in der Zellwand dieses Hefestamms sprach und ein Grund für die zuvor detektierten Unterschiede der Volumenaktivitäten im Vergleich zu den anderen Stämmen sein könnte. Diese Beobachtung könnte darauf basieren, dass unterschiedliche Hefestämme und -gattungen voneinander abweichende Zellwandzusammensetzungen besitzen können. Infolge einer Chitin-Färbung des S86c-Stamms konnte ein höherer Chitingehalt im Vergleich zum BY4742-Stamm festgestellt werden. Hierbei zeigten beide Stämme zwar ähnliche prozentuale Anteile an positiven Zellen für den Mannan- und  $\beta$ -Glukangehalt, jedoch wies der S86c- (72 % positive Zellen) gegenüber dem BY4742-Stamm (37 % positive Zellen) deutlich

---

höhere Mengen an Chitin auf (Bazan, 2011; Bazan *et al.*, 2014; Kiefer *et al.*, 2020). GPI-CWPs werden über die Interaktion mit  $\beta$ -1,6-Glukanen an das  $\beta$ -1,3-Rückgrat der Zellwand gebunden, welches wiederum mit dem Chitin der Zellwand verbunden ist (Hartland *et al.*, 1994; Klis *et al.*, 2002; Kollár *et al.*, 1995, 1997; Orlean, 2012). Der in der Zellwand erhöhte Chitingehalt im S86c-Stamm könnte dazu führen, dass eine gesteigerte Verankerungskapazität in der Zellwand für GPI-verankerte CWPs und somit auch für EstA-Fusionsproteine vorliegt, weshalb sich dieser Stamm insbesondere im direkten Vergleich zum BY4742-Stamm als der effizientere Hefestamm zur Verankerung der EstA erwies. Für den SEY6210-Stamm ist keine entsprechende Analyse des Gehalts der drei Komponenten verfügbar. Ein eindeutiger Schluss über den Grund der verringerten EstA-Immobilisierung im Vergleich zum BY4742- und S86c-Stamm kann nicht gezogen werden, da neben der Variation in der Chitinmenge möglicherweise auch Unterschiede im Mannan- und  $\beta$ -Glukangehalt vorliegen könnten. Falls die Mengen an Mannan und  $\beta$ -Glukan im SEY6210-Stamm vergleichbar zu den der BY4742- und S86c-Stämme wären, könnten Stamm-spezifische Unterschiede im Chitingehalt als ein maßgeblicher Faktor für die Immobilisierungseffizienz von GPI-verankerten Fusionsproteinen angesehen werden. Durch ein Screening auf Unterschiede in den Mengen an Mannan,  $\beta$ -Glukan und Chitin könnten weitere Stämme mit vermehrten Anteilen an Chitin (z. B. W303) zum YSD identifiziert und näher untersucht werden (Bazan, 2011).

Für den weiteren Verlauf der Experimente war es für eine Koexpression mit Komponenten des sekretorischen Pathways notwendig die Fusionskonstrukte mithilfe eines anderen Vektors in *S. cerevisiae* zu exprimieren. Der Fokus der Analyse wurde aufgrund der zuvor detektierten, höheren Volumenaktivitäten der Fusionskonstrukte aus EstA und Cwp2p bzw. Sed1p nur noch auf diese beiden Konstrukte gelegt. Die Expression der Fusionskonstrukte mithilfe des pYX242-Vektors führte in den Hefestämmen BY4742, S86c und SEY6210 zu einer Reduktion der Volumenaktivitäten im Vergleich zur Expression über den pFB2-Vektor. Auch hier stellte sich der S86c-Stamm weiterhin als die effizienteste Option heraus, was dessen zuvor beschriebene verbesserte Eignung zur EstA-Immobilisierung weiter stützte. Der Hauptunterschied der beiden Vektoren lag in der unterschiedlichen transkriptionellen Kontrolle über verschiedene Promotor-Terminator-Kombinationen. Während die Expression über den *PGK1*-Promotor und -Terminator des pFB2-Vektors im Vergleich höhere Volumenaktivitäten bedingte, führte die Expressionsregulation über den *TPI*-Promotor- und -Terminator im pYX242 zu einer Verringerung. Neben den zuvor beschriebenen Variationen in den Ankerproteinen und Expressionsstämmen ließ dies auf einen Einfluss der



---

transkriptionellen Regulation auf die EstA-Immobilisierungseffizienz schließen und identifizierte eine zusätzliche Stellschraube des YSD. Zusätzlich können auch Unterschiede in der Stabilität und Kopienzahl der Plasmide Auswirkungen auf die Genexpression und die Immobilisierungseffizienz bedingen, da diese von der Stärke des eingesetzten Promotors abhängig sind (Da Silva & Srikrishnan, 2012; Fang *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2012). Aufgrund der Veränderungen der Enzymaktivitäten in Abhängigkeit der Promotor-Terminator-Paarung wurde im Verlauf dieser Arbeit eine vergleichende Analyse weiterer Kombinationen aus konstitutiven Promotoren und Terminatoren untersucht, um eine bestmögliche Steigerung der EstA-Immobilisierungseffizienz durch den Tausch unterschiedlicher transkriptioneller Kontrollelemente zu erzielen.

Neben der Immobilisierung der EstA über N-terminale Verankerungssysteme konnte die Immobilisierung eines C-terminalen EstA-Fusionskonstrukts erstmalig in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden (s. Abb. 31, b). Mithilfe des kommerziell erhältlichen Aga1p-Aga2p-Systems wurde ein Fusionskonstrukt aus dem Zellwandanker Aga2p inklusive der eigenen Signalsequenz, einem „GS“-Linker und der EstA im pYD1-Vektor generiert, welcher einen induzierbaren *GALI*-Promotor besaß. Die Expression erfolgte hierbei nur im EBY100-Stamm, welcher die Verankerungskomponente Aga1p nach Galaktose-Induktion exprimierte (Boder & Wittrup, 1997). Die Aga2p-vermittelte Verankerung der EstA erwies sich neben der N-terminalen Immobilisierung als weitere effiziente Verankerungsoption. Mehrere Veröffentlichungen konnten Einschränkungen in den Enzymaktivitäten unterschiedlicher Lipasen in Abhängigkeit der Verankerungsart (N- oder C-terminal) nachweisen (Liu *et al.*, 2010a; Liu *et al.*, 2010b; Matsumoto *et al.*, 2002; Washida *et al.*, 2001). Die Verankerungseffizienz der beiden Fusionsarten schien für die EstA jedoch unabhängig von der Lage des aktiven Zentrums zu sein. Möglicherweise besaß der im Expressionsvektor enthaltene Linker auch einen Einfluss auf die EstA-Volumenaktivität, was jedoch in zukünftigen Studien für Konstrukte ohne entsprechende Linkersequenz näher untersucht werden müsste. Die erfolgreiche C-terminale Verankerung der EstA in *S. cerevisiae* ermöglicht die Anwendung von weiteren Optimierungsstrategien zur zusätzlichen Erhöhung der Immobilisierungseffizienz, wie z. B. die Steigerung der Proteinbiosynthese oder auch die Analyse weiterer Linkersequenzen. Aufgrund des erfolgreichen Einsatzes des *GALI*-Promotors würde sich zukünftig auch die Analyse einer N-terminalen EstA-Verankerung unter der Kontrolle von induzierbaren Promotoren anbieten.

Unterschiede in der Oberflächenimmobilisierung der EstA wurden außerdem in Abhängigkeit der als Expressionswirt genutzten Hefegattung untersucht. Neben *S. cerevisiae* wurde die Hefegattung *P. pastoris* betrachtet, die erfolgreich zur Produktion rekombinanter Proteine sowie zum „Surface Display“ einer Vielzahl von Proteinen eingesetzt wurde. Sie besitzt im Vergleich zu *S. cerevisiae* einen methylotrophen Stoffwechsel und die Eigenschaft in hohen Zelldichten zu wachsen, was zu Unterschieden in der Proteinexpression führen kann (Baghban *et al.*, 2019; Cregg *et al.*, 2000; Juturu & Wu, 2018). Als Alternative zu den von *P. pastoris* exprimierten nativen GPI-CWPs können auch aus *S. cerevisiae* stammende CWPs zum Oberflächendisplay eingesetzt werden (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Zhang *et al.*, 2013). Die zuvor in *S. cerevisiae* getesteten N-terminalen EstA-Fusionskonstrukte wurden in zwei *P. pastoris*-Stämmen in Abhängigkeit der pH-Pufferung des Wachstumsmediums und der Induktionstemperatur analysiert. Hierzu wurden die Fusionskonstrukte mit den Zellwandankern Cwp2p, Sag1p und Sed1p im pPIC9-Vektor mit der Signalsequenz des  $\alpha$ -Mating-Faktors in zwei Hefestämmen exprimiert, wobei die Genexpression unter der Kontrolle des Methanol-induzierbaren *AOX1*-Promotors und -Terminators stand. Zur Zellwandverankerung der EstA in *P. pastoris* wurden zuvor bereits Untersuchungen mit den Ankerproteinen Cwp2p, Sed1p und Pir1p durchgeführt. Das dort verwendete Fusionskonstrukt aus EstA und Cwp2p wurde auch in dieser Arbeit genutzt, jedoch unterschied sich die Länge des verwendeten Sed1p-Ankers (320 AS) in beiden Experimenten (Diehl, 2008; Müller, 2008). Aufgrund der Nutzung des nach Van der Vaart *et al.* (1997) ausgewählten, verkürzten C-Terminus von Sed1p (230 AS) in den vorangegangenen Konstrukten konnten zusätzlich auch Effekte einer Verkürzung dieses Ankerproteins auf die Immobilisierungseffizienz der EstA untersucht und mit der Sag1p-vermittelten Verankerung erstmals verglichen werden. Für die Zellwandverankerung der EstA erwies sich der KM71-Stamm gegenüber dem analysierten GS115-Stamm als effektiver, was unabhängig von den betrachteten pH-Werten (6,0 bzw. 7,0) und dem Ankerprotein war. Hierbei stellte sich Sed1p im Vergleich zu Cwp2p und Sag1p als Ankerprotein mit der höchsten Verankerungseffizienz heraus, was im Einklang mit den von Diehl (2008) generierten Daten stand, jedoch nur im KM71-Stamm nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 31, c). Die Volumenaktivitäten der Fusionskonstrukte schienen hier jedoch stark zwischen den untersuchten pH-Werten zu variieren, wobei sich ein pH-Wert von 6,0 als geeigneter für die EstA-Immobilisierung in beiden Hefestämmen erwies. Die beiden verwendeten Hefestämme unterscheiden sich vor allem in der Art der Methanolverwertung (KM71: Mut<sup>S</sup>; GS115: Mut<sup>+</sup>), was Unterschiede in der Effektivität der Proteinproduktion zwischen den Stämmen erklären kann und eine Analyse

beider Stämme nötig macht (Cregg *et al.*, 2000; Juturu & Wu, 2018). Eine Endochitinase aus *Limonium bicolor* konnte beispielsweise sowohl im GS115- als auch im KM71-Stamm exprimiert werden, jedoch zeigte das in GS115 produzierte Enzym höhere Aktivitäten (Liu *et al.*, 2010c). Dagegen war die Expression einer Chalkon-3-Hydroxylase im KM71H-Stamm gegenüber GS115 deutlich erhöht (Hausjell *et al.*, 2020). Für die Expression einer Laccase aus *Trametes versicolor* erwiesen sich hingegen sowohl der KM71- als auch der GS115-Stamm als ähnlich effektiv (O’Callaghan *et al.*, 2002). Mithilfe von Genom- und Transkriptomanalysen verschiedener *P. pastoris*-Stämme konnten darüber hinaus Unterschiede in der Zellwandintegrität und -permeabilität als mögliche Auslöser für die Variationen in der rekombinanten Proteinproduktion identifiziert werden (Brady *et al.*, 2020; Zha *et al.*, 2023). Die Zellwandzusammensetzung der beiden hier verwendeten Stämme unterschied sich in Bezug auf den Gehalt an  $\beta$ -Glukan und Chitin nach Angaben von Bazan (2011) nicht. Für den KM71-Stamm konnten hingegen 10 % weniger positive Zellen infolge einer Mannan-Färbung identifiziert werden, weshalb eventuell auch der Mannangehalt für die unterschiedliche Eignung der Hefestämme zur EstA-Verankerung verantwortlich sein könnte, was aber zur genaueren Analyse weiteren Experimenten bedarf (Bazan, 2011).

Diehl (2008) konnte eine exponentielle Korrelation zwischen der Ankerlänge und Volumenaktivität der EstA feststellen, nach welcher der Einsatz längerer Zellwandanker zu erhöhten EstA-Aktivitäten in *P. pastoris* führt. Dieser Zusammenhang konnte hier nicht reproduziert werden, da sich die verkürzte Version des Sed1p-Ankers mit 230 AS im Vergleich zum Sag1p-Anker mit 320 AS weiterhin als effektiver erwies, was auf eine generelle verbesserte Eignung des Sed1p-Ankerproteins zur EstA-Verankerung in *P. pastoris* hindeutete. Zur direkten Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse und um genauere Erkenntnisse zu erzielen, müssten die Enzym-Assays mit den gleichen Sed1p-Versionen durchgeführt werden. Zudem konnten die Experimente in der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen nur ein einziges Mal wiederholt werden, was potenzielle Unterschiede ebenfalls erklären könnte und weitere Wiederholungen der Experimente nötig macht. Aufgrund der bei einem pH-Wert von 6,0 erhöhten Volumenaktivitäten wurde außerdem auch der Einfluss einer Verringerung der Kultivierungs- und Induktionstemperatur von 28 °C auf 26 °C auf die EstA-Immobilisierungseffizienz in *P. pastoris* untersucht. Für den GS115-Stamm konnten keine drastischen Veränderungen in den Volumenaktivitäten der Fusionskonstrukte beobachtet werden. Jedoch erwies sich in KM71 die Cwp2p-vermittelte EstA-Verankerung nun am effizientesten, wohingegen sich der Sed1p-Anker bei einer Temperatur von 26 °C nicht mehr als effizienteste Option zur EstA-Verankerung darstellte. Die Temperaturabhängigkeit der

---

Proteinexpression in *P. pastoris* konnte in früheren Studien zur rekombinanten Expression von Antikörperfragmenten, einer Laccase aus *T. versicolor* oder einer Galaktose-Oxidase aus *Fusarium graminearum* nachgewiesen werden. Hierbei wurde durch die Verringerung der Kultivierungstemperaturen eine Erhöhung der produzierten Proteinmengen bzw. Enzymaktivitäten erzielt. Dies beruht möglicherweise auf einer veränderten Regulation zellulärer Prozesse, die zu erhöhten Proteinstabilitäten und einer veränderten Proteinfaltung führt (Anasontzis *et al.*, 2014; Dragosits *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2002). Somit scheint die Immobilisierungseffizienz unterschiedlicher EstA-Fusionsproteine zur Zellwandverankerung in *P. pastoris* neben dem pH-Wert auch deutlich von der genutzten Kultivierungstemperatur abzuhängen, was eine proteinspezifische Untersuchung der Expression mit unterschiedlichen Kultivierungsparametern nötig macht. Zur Identifikation genauerer, Fusionsprotein-abhängiger Tendenzen sollten die Experimente zukünftig wiederholt und auch durch die Analyse weiterer Parameter (z. B. variable Methanolkonzentrationen zur Expressionsinduktion, weitere Induktionszeiträume oder zusätzliche Ankerproteine) ergänzt werden, um das System zur EstA-Expression in *P. pastoris* zu optimieren.

Die bereits bestehenden Verankerungssysteme zur Immobilisierung der EstA in Hefen wurden in dieser Arbeit durch die Verwendung zusätzlicher GPI-Ankerproteine erfolgreich erweitert und optimiert. In *S. cerevisiae* erwiesen sich sowohl Cwp2p und Sed1p am effizientesten zur Verankerung der EstA, wohingegen in *P. pastoris* Sed1p als effizienteste Ankeroption identifiziert werden konnte. Hierbei stellte sich heraus, dass sich für die EstA-Verankerung kein kausaler Zusammenhang zwischen Ankerlänge und Immobilisierungseffizienz ableiten lässt. Dies deutet auf variable Eignungen der Ankerproteine zur EstA-Verankerung hin und bedarf einer individuellen Analyse für die Immobilisierung weiterer Enzyme. Zudem werden die Immobilisierungseffizienzen der Fusionskonstrukte durch die Eigenschaften des zur Expression eingesetzten Hefestamms maßgeblich mitbestimmt. Hierbei empfahl sich in *S. cerevisiae* vor allem der S86c-Stamm, was möglicherweise auf einen erhöhten Chitingehalt in der Zellwand zurückzuführen ist und eine weiterführende Charakterisierung von Hefestämmen anhand unterschiedlicher Zellwandzusammensetzungen mit anschließender Expression der EstA-Fusionskonstrukte interessant machen könnte. In *P. pastoris* war die Effizienz der EstA-Immobilisierung hingegen stark von den Expressionsbedingungen abhängig, wobei sich hier der KM71-Stamm als effizientester Expressionsstamm herausstellte. Zusätzlich konnte die EstA in *S. cerevisiae* erstmalig mithilfe einer C-terminalen Fusion über das Aga1p-Aga2p-System auf der Oberfläche

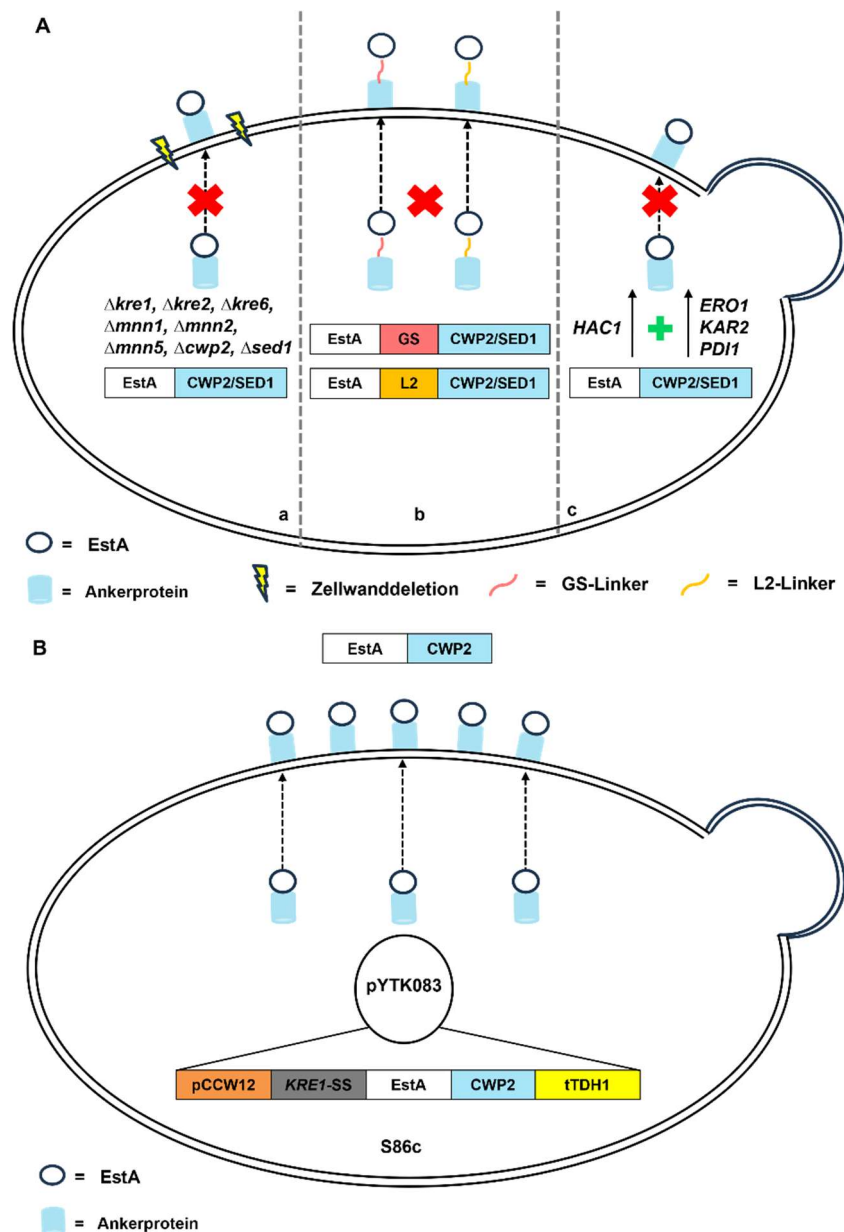
---

effizient immobilisiert werden, was die Grundlage zukünftiger Analysen zur Optimierung der C-terminalen EstA-Immobilisierung bildet. Aufbauend auf den im ersten Teil dieser Arbeit erlangten Erkenntnissen der N-terminalen EstA-Verankerung in *S. cerevisiae* wurde die Oberflächenimmobilisierung mithilfe weiterer Optimierungsansätze untersucht.

### **Optimierung der Zelloberflächenimmobilisierung in *S. cerevisiae* mithilfe synthetischer Biologie**

Zur weiteren Steigerung der EstA-Immobilisierung in *S. cerevisiae* wurden unterschiedliche Optimierungsstrategien aus dem Bereich der synthetischen Biologie untersucht. Diese beschreibt die gezielte Veränderung biologischer Organismen, was beispielsweise die Modulierung oder Umprogrammierung zellulärer Prozesse umfasst, um mithilfe von künstlichen Zellsystemen biotechnologische oder pharmazeutische Prozesse optimieren zu können. Hierzu können die Veränderungen z. B. auf transkriptioneller, translationaler oder posttranslationaler Ebene erfolgen, was ein breites Spektrum an Modifikationsmöglichkeiten bietet (Benner, 2003; Benner & Sismour, 2005; Hirschi *et al.*, 2022; Khalil & Collins, 2010; Roberts *et al.*, 2013). Für die Generierung von Zellfabriken in Hefen zur Produktion rekombinanter Proteine bieten sich diverse Ansätze der synthetischen Biologie an, welche z. B. auf der Herstellung von Expressionsstämmen mit spezifischen Gendeletionen, der Optimierung der Gensequenzen für die Kodonnutzung von Hefen, der Erhöhung der Proteinbiosynthese oder auch der Veränderung der Glykosylierungseigenschaften beruhen können (Kim *et al.*, 2015; Tanaka & Kondo, 2015).

In dieser Arbeit wurden vier unterschiedliche Herangehensweisen zur weiteren Optimierung der EstA-Immobilisierung in *S. cerevisiae* aus dem Feld der synthetischen Biologie betrachtet, deren Ergebnisse in Abb. 32 dargestellt sind.



**Abb. 32: Schematischer Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Optimierungsstrategien zur EstA-Immobilisierung in Hefen.** Zur weiteren Optimierung der EstA-Immobilisierung wurden Methoden aus dem Feld der synthetischen Biologie untersucht. (A) Hierzu wurden die N-terminalen Fusionskonstrukte aus EstA und Cwp2p bzw. Sed1p in acht Deletionsmutanten von Zellwand-assoziierten Komponenten exprimiert (a). Sterische Einflüsse auf die Zelloberflächenexpression der EstA wurden durch die Modifikation der Konstrukte mithilfe der Linkersequenzen „GS“ und „L2“ zwischen Enzym und Ankerprotein analysiert (b). Außerdem wurden die Effekte der Koexpression der Fusionskonstrukte mit dem UPR-Regulatorprotein Hac1p sowie den drei ER-Chaperonen Ero1p, Kar2p und Pdi1p untersucht (c). Für keine dieser drei Optimierungsstrategien konnte eine Steigerung der EstA-Aktivität nachgewiesen werden (rotes Kreuz). (B) Durch die Generierung unterschiedlicher Expressionsplasmide konnten die Einflüsse von 19 konstitutiven Promotoren und sechs Terminatoren auf die Zelloberflächenimmobilisierung der EstA untersucht werden. Die Expression des Fusionskonstrukts aus EstA und Zellwandanker Cwp2p im pYTK083-Vektor zeigte für die Kombination aus CCW12-Promotor („pCCW12“) und TDH1-Terminator („tTDH1“) im *S. cerevisiae*-Stamm S86c die höchste Volumenaktivität aller untersuchten Kombinationen.

### Expressionsanalyse der EstA in *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten der Zellwand

Zur Untersuchung der Effekte von Deletionen unterschiedlicher Zellwand-assoziiierter Gene auf die Immobilisierungseffizienz der EstA wurden die Fusionskonstrukte mit Cwp2p bzw. Sed1p in den acht Deletionsmutanten  $\Delta kre1$ ,  $\Delta kre2$ ,  $\Delta kre6$ ,  $\Delta mnn1$ ,  $\Delta mnn2$ ,  $\Delta mnn5$ ,  $\Delta cwp2$  und  $\Delta sed1$  des *S. cerevisiae*-Stamms BY4742 exprimiert. Es wurde erwartet, dass die Zellwand durch die Deletion spezifischer Gene, die für Zellwandkomponenten kodieren, eine erhöhte Kapazität bzw. mehr Freiraum zur Immobilisierung von GPI-verankerten Proteinen aufweist, weniger sterische Hinderungen auftreten und sich die Substratzugänglichkeit erhöht, was sich in gesteigerten Enzymaktivitäten äußern sollte (Inokuma *et al.*, 2021; Tanaka & Kondo, 2015). Eine Modifikation der Zellwandstruktur durch die entsprechenden Gendeletionen erbrachte in den Experimenten keine Steigerung der Immobilisierungseffizienz, was durch die Detektion niedrigerer bzw. ähnlicher EstA-Volumenaktivitäten im Vergleich zum wildtypischen BY4742-Stamm festgestellt wurde (s. Abb. 32 A, a).

Kre1p, Kre2p und Kre6p sind als Mitglieder der *KRE*-Familie für die Zellwandzusammensetzung und Resistenz gegenüber dem K1-Killertoxin verantwortlich. Kre1p stellt als Zellwandglykoprotein den Sekundärrezeptor des K1-Toxins dar und eine Deletion führt zur Reduktion des  $\beta$ -1,6-Glukangehalts um 40 % bei gleichzeitiger Strukturveränderung sowie Verringerung der Polymergröße (Boone *et al.*, 1990; Breinig *et al.*, 2002, 2004; Hill *et al.*, 1992; Hutchins & Bussey, 1983). Kre2p ist als  $\alpha$ -1,2-Mannosyltransferase an der O-Mannosylierung verschiedener Proteine beteiligt. In  $\Delta kre2$ -Deletionsmutanten konnte im Gegensatz zu  $\Delta kre1$ -Mutanten ein zum Wildtyp vergleichbarer Gehalt an  $\beta$ -1,6-Glukanen festgestellt werden, jedoch zeigten diese Mutanten Veränderungen in der N-Glykosylierung von Glykoproteinen (Häusler *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 1992; Lussier *et al.*, 1997, 1999). Der dritte Vertreter, Kre6p, stellt eine Glykosylhydrolase dar, die für die Proteinbiosynthese der  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glukane sowie für den Einbau des Verankerungsproteins Sed1p in die Zellwand verantwortlich ist, weshalb Mutationen zu einem stark reduzierten Glukanlevel führen (Bowen & Wheals, 2004; Montijn *et al.*, 1999; Roemer *et al.*, 1993; Roemer & Bussey, 1991). In den Deletionsstämmen der Vertreter der *KRE*-Familie konnten zwar Volumenaktivitäten der EstA-Fusionsproteine in Kombination mit den Ankerproteinen Cwp2p und Sed1p detektiert werden, die – abgesehen von der Expression des „EstA-CWP2“-Fusionskonstrukts im  $\Delta kre2$ -Stamm – keine Steigerung im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, was nur bedingt Verbindungen zwischen den deletierten Proteinen und der EstA-Verankerung erkennen lässt. Für Kre6p konnte bereits gezeigt werden, dass das Protein direkt in die Zellwandverankerung von Sed1p involviert ist, da durch einen *KRE6*-Knockout Sed1p nur

intrazellulär nachgewiesen und nicht mehr in die Zellwand eingebaut werden konnte (Bowen & Wheals, 2004). Für die Verankerung der EstA im  $\Delta kre6$ -Deletionsstamm konnte eine Volumenaktivität detektiert werden, die im Vergleich zum Wildtyp um 40 % niedriger war, was auf eine entsprechende Beteiligung von Kre6p an der Verankerung des „EstA-SED1“-Fusionskonstrukts hinwies. In Studien zur Untersuchung der Einflüsse von Gendeletionen unterschiedlicher Zellwandkomponenten auf die Sekretion und Zellwandverankerung von Polysaccharid degradierenden Enzymen in *S. cerevisiae* konnte demonstriert werden, dass sich unterschiedliche Deletionen in verschiedenem Maße auf die Enzymsekretion und -immobilisierung auswirken können (Chen *et al.*, 2023). Ein *KRE1*-Knockout erwies sich beispielsweise förderlich auf das „Surface Display“ einer  $\beta$ -Glukosidase aus *Saccharomyces fibuligera* über Sed1p, wohingegen ein *KRE6*-Knockout nur die Enzymsekretion positiv beeinflusste. Dies wurde auf strukturelle Unterschiede zwischen sekretierten und zellwandverankerten Proteinen zurückgeführt und ließ auf einen direkten Einfluss von Genen der Zellwandbiosynthese auf die Proteinexpression schließen, was möglicherweise auch Auswirkungen auf die EstA-Immobilisierung besitzen könnte (Chen *et al.*, 2023).

Zusätzlich zu den Effekten der Vertreter der *KRE*-Familie wurden die Deletionen der drei *MNN*-Gene *MNN1*, *MNN2* und *MNN5* betrachtet, die für Mannosyltransferasen kodieren. Mnn1p stellt eine im Golgi-Apparat lokalisierte  $\alpha$ -1,3-Mannosyltransferase dar, die die  $\alpha$ -1,3-Mannosylierung von N- und O-Glykoproteinen durchführt, was durch eine Gendeletion verhindert wird (Graham *et al.*, 1994; Lussier *et al.*, 1999; Raschke *et al.*, 1973; Wiggins & Munro, 1998; Yip *et al.*, 1994). Für die Katalyse von  $\alpha$ -1,2-Mannosylierungen konnten die Vertreter Mnn2p und Mnn5p identifiziert werden, die im *cis*-Golgi lokalisiert sind und Homologien zu Mnn1p zeigen.  $\alpha$ -1,2-Mannosereste treten ebenfalls bei GPI-verankerten Proteinen auf, für deren Addition Mnn2p und Mnn5p nicht essentiell sind (Rayner & Munro, 1998; Sipos *et al.*, 1995). Deletionen von Mnn2p und Mnn5p führen zu verkürzten  $\alpha$ -1,2-Mannosylierungen, was die darauffolgende Addition von Mannosylphosphatresten verhindert (Bai *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 1980; Olivero *et al.*, 2000). In keinem der drei *MNN*-Deletionsstämme konnte eine Stamm-abhängige Zunahme der EstA-Volumenaktivität beobachtet werden. Für die Zellwandverankerung einer  $\beta$ -Glukosidase aus *A. aculeatus* und der Endoglukanase II aus *T. reesei* über Sag1p konnte in einem  $\Delta mnn2$ -Deletionsstamm eine Steigerung der Enzymaktivitäten festgestellt werden. Auch durch die Deletion des *MNN5*-Gens konnte eine Erhöhung der Aktivität der Endoglukanase II beobachtet werden (Matsuoka *et al.*, 2014). Für die Golgi-Mannosyltransferasen Och1p, Mnn1p und Mnn9p



wurde im Rahmen von Studien zur Sekretion dreier prokaryotischer Enzyme, die in *S. cerevisiae* N-hyperglykosyliert werden, festgestellt, dass zwar eine Aktivitätssteigerung für die Enzyme auftrat, diese aber nicht durch eine tatsächliche Änderung in der spezifischen Aktivität begründet war. Die Deletionen von Och1p und Mnn9p führten demnach zu einer gesteigerten Proteinmenge, die nicht durch das Ausbleiben der Hyperglykosylierung, sondern durch eine verstärkte Expression von Chaperonen und ERAD-Komponenten zustande kam, die jedoch UPR-unabhängig war (Tang *et al.*, 2016). Die förderlichen Effekte auf die Zellwandimmobilisierung durch die Deletion der Vertreter der *MNN*-Familie konnten in der vorliegenden Arbeit für die EstA nicht bestätigt werden und scheinen somit von dem zu verankernden Protein sowie den Eigenschaften des Fusionsproteins abhängig zu sein. Die in den EstA-Fusionskonstrukten genutzten Zellwandankerproteine Cwp2p und Sed1p gelten als stark O- bzw. N- und O-mannosyliert, weshalb ein Einfluss durch den Knockout entsprechender Mannosyltransferasen, wie z. B. Kre2p oder Mnn1p, auf die Prozessierung sowie Zellwandverankerung der entsprechenden Fusionsproteine nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann und als ein möglicher Erklärungsgrund für die ausgebliebene Steigerung der EstA-Volumenaktivität gelten könnte (Lesage & Bussey, 2006; Shimoï *et al.*, 1998; Van der Vaart *et al.*, 1995). Für die Addition von  $\alpha$ -1,2-Mannoseresten an GPI-verankerte CWPs sollen Mnn2p und Mnn5p nicht essentiell sein, jedoch führte auch die Deletion der beiden Mannosyltransferasen zu einer Verringerung der EstA-Volumenaktivitäten, weshalb auch ein indirekter Effekt auf die Zellwandverankerung möglich wäre (Rayner & Munro, 1998; Sipos *et al.*, 1995).

Darüber hinaus wurde durch die Deletion der Zellwandproteine Cwp2p und Sed1p untersucht, ob mehr Freiraum an der Zelloberfläche zur Verankerung der EstA-Fusionskonstrukte generiert werden kann, da Cwp2p und Sed1p einen Großteil der GPI-CWPs der Hefezellwand ausmachen (Van der Vaart *et al.*, 1995, 1997). Anhand der Deletion des *CWP2*-Gens konnte eine Steigerung der Sekretion einer Zellulase mit erhöhter extrazellulärer Aktivität nachgewiesen werden, was UPR-unabhängig war und gleichzeitig zu einer beeinträchtigten Zellwandintegrität führte, indem der *CWP2*-Knockout die Expressionsregulation unterschiedlicher Zellwand-assoziiierter Gene veränderte (Li *et al.*, 2020). Eine Erhöhung des YSD einer  $\beta$ -Glukosidase konnte infolge einer *CWP2*-Deletion in *S. cerevisiae* ebenfalls nachgewiesen werden, die jedoch im Vergleich zur sekretierten Zellulase geringer ausfiel und zwischen den analysierten Deletionsstämmen variierte (Arnthong *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2020). Auch für die Expression in  $\Delta$ *sed1*-Stämmen konnten verbesserte Immobilisierungseffizienzen des Fluoreszenzreporterproteins dsRed und unterschiedlicher Glukosidasen festgestellt werden

(Bamba *et al.*, 2018; Kotaka *et al.*, 2010; Kuroda *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass ein entsprechender Knockout des *CWP2*-Gens nicht zwingend zur Verbesserung der Display-Effizienz führen muss, da die Immobilisierungseffizienz einer  $\alpha$ -Galaktosidase über die Zellwandankerproteine Cwp2p, Sag1p und Sed1p nicht weiter erhöht werden konnte (Van der Vaart *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit zeigten die beiden EstA-Fusionskonstrukte nur im  $\Delta$ *sed1*-Stamm im Vergleich zum Wildtyp ähnliche Volumenaktivitäten. Durch die Analyse weiterer Transformanten könnten genauere Schlüsse über eine Eignung der Deletionsstämme (wie z. B.  $\Delta$ *kre2* und  $\Delta$ *sed1*) zur Verbesserung der Expression der zellwandverankerten EstA in *S. cerevisiae* gezogen werden, da die Experimente aus Zeitgründen nur ein einziges Mal durchgeführt werden konnten. Außerdem wurden zuvor Stamm-spezifische Unterschiede in den Immobilisierungseffizienzen der EstA-Fusionskonstrukte nachgewiesen, weshalb durch die Generierung der entsprechenden Deletionsmutanten in einem anderen Stammhintergrund (z. B. S86c) mit anschließender Expressionsanalyse der Fusionskonstrukte auch verbesserte Volumenaktivitäten auftreten könnten. Tendenziell konnte anhand der erhaltenen Ergebnisse für alle untersuchten Deletionen im BY4742-Stammhintergrund kein förderlicher Effekt auf die Immobilisierungseffizienz der EstA festgestellt werden, was möglicherweise auch durch eine Degradation der Fusionsproteine infolge einer durch die Deletionen bedingten Stresssituation für die Hefezellen erklärt werden könnte. Die gegenseitige Regulation zwischen den Signalwegen zur UPR-Aktivierung infolge von ER- und Zellwandstress und dem „Cell Wall Integrity“-Pathway (CWI) konnte beschrieben werden, was die Zellen durch eine enge Kontrolle vor Stress-induzierten Schäden schützen soll (Krysan, 2009; Levin, 2005; Scrimale *et al.*, 2009). Eine Aktivierung des CWI-Pathways infolge einer *MNN2*-Deletion konnte bereits nachgewiesen werden (Nakamura *et al.*, 1997; Rayner & Munro, 1998). Die erhöhte Aktivität von ER-Komponenten infolge des Knockouts von Zellwandkomponenten (s. Och1p, Mnn9p und Cwp2p) konnte jedoch bei gleichzeitiger Veränderung der Zellwandintegrität als UPR-unabhängig beschrieben werden, was weiterführende Untersuchungen der Effekte einer Deletion von Zellwandkomponenten auf die Regulation des sekretorischen Pathways benötigt (Li *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2016). In Bezug auf die Zelloberflächenexpression der EstA erschwert die Beteiligung weiterer, teils noch unbekannter Signalwege die Identifikation einer eindeutigen Korrelation zwischen den deletierten Zellwand-assoziierten Genen und der Zellwandverankerung, da noch weitere zelluläre Komponenten (z. B. Proteine des sekretorischen Pathways) einen Einfluss auf die Immobilisierung nehmen könnten. Zur weiterführenden Analyse könnten zukünftig Deletionen anderer GPI-CWPs, wie z. B.

Ccw12p oder Ccw14p, getestet werden, die für die Zellwandintegrität bzw. -stabilität zuständig sind und bereits als Deletionsstämme zum YSD eingesetzt wurden (Inokuma *et al.*, 2021; Lesage & Bussey, 2006; Ragni *et al.*, 2007). Bei der Zelloberflächenexpression einer  $\beta$ -Glukosidase aus *A. aculeatus* über Sed1p und Sag1p konnte zwar für die Expression in den beiden zuvor erwähnten Deletionsstämmen keine Erhöhung der Enzymaktivität detektiert werden. Die Expression in einer Doppelmutante ( $\Delta ccw12\Delta ccw14$ ) führte jedoch zu einer deutlichen Steigerung der Enzymaktivität, was auf eine erhöhte Verankerungskapazität der Zellwand durch den Knockout der Gene zurückgeführt wurde. Dieser Effekt des Deletionsstamms schien hingegen Enzym-abhängig zu sein, da für die Verankerung einer Endoglukanase keine signifikante Aktivitätssteigerung beobachtet werden konnte (Inokuma *et al.*, 2021). Zusätzlich konnten für weitere Doppelmutanten beim „Surface Display“ einer  $\beta$ -Glukosidase aus *S. fibuligera* ebenfalls Variationen in den Immobilisierungseffizienzen abhängig von den untersuchten Deletionen festgestellt werden, die sich durch eine Koexpression von an der Translation beteiligten Proteinen teilweise noch weiter steigern ließ (Chen *et al.*, 2023).

### **Expressionsanalyse von EstA-Fusionskonstrukten mit inserierten Linkersequenzen**

Neben der Expression der Fusionskonstrukte in Deletionsmutanten der Hefezellwand wurden die Effekte einer Modifikation der Fusionskonstrukte aus EstA und Cwp2p bzw. Sed1p mittels flexibler Linkersequenzen untersucht. Die Addition dieser Sequenzen sollte dazu führen, dass die extrazelluläre Zugänglichkeit des Enzyms für das Substrat auf der Zelloberfläche erhöht wird, indem potenzielle sterische Behinderungen zwischen Enzym und Ankerprotein in der Zellwand verhindert werden, was ansonsten zu verminderten Enzymaktivitäten führen könnte. Flexible Linker bestehen in der Regel hauptsächlich aus kleinen, polaren (Glycin) und nicht-polaren Aminosäuren (Serin/Threonin) mit variablen Wiederholungszahlen, welche eine erhöhte Flexibilität und Mobilität der Domänen begünstigen sollen (Argos, 1990; Chen *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurden zwei flexible Linkersequenzen („GS“ und „L2“) zwischen EstA und Ankerprotein inseriert und über den pYX242-Vektor in *S. cerevisiae* exprimiert. Der „GS“-Linker (ASGGGGSGGGGSGGGGS) besaß eine Größe von 17 AS und setzte sich zur Erhöhung der Flexibilität aus einem (GGGGS)<sub>3</sub>-Motiv mit einem zusätzlichen Alanin- und Serin-Rest zusammen (Argos, 1990; Chen *et al.*, 2013). Der „L2“-Linker (EGKSSGSGSESKST) umfasste 14 AS, welche neben Glycin- und Serin-Resten zur Steigerung der Löslichkeit auch Glutamat- und Lysin-Reste beinhaltete. Er konnte dadurch erfolgreich zur Herstellung von Antigen-Bindeproteinen

eingesetzt werden (Bird *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 2013). Im Vergleich zu den Fusionskonstrukten ohne Linker-Modifikationen im pYX242-Vektor konnte keine Erhöhung der EstA-Immobilisierungseffizienz über Cwp2p und Sed1p festgestellt werden, was unabhängig von den Ankerproteinen und Linkersequenzen war (s. Abb. 32 A, b).

Die Addition zusätzlicher Linkersequenzen zwischen Zielprotein und Zellwandanker konnte mehrfach erfolgreich zur Verbesserung der Enzymverankerung im YSD eingesetzt werden. In Studien zur Zellwandimmobilisierung einer Lipase aus *R. oryzae* mittels Sag1p wurden in *S. cerevisiae* „GS“-Linker zur Steigerung der Enzymaktivität gegenüber unterschiedlichen Substraten genutzt, was auf eine verbesserte Separation der beiden Fusionspartner und gesteigerte Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für die Substrate durch die Linker zurückgeführt wurde. Die Aktivität des Enzyms gegenüber unterschiedlichen Substraten war hierbei von den Längen der Linkersequenzen abhängig (Ueda & Tanaka, 2000; Washida *et al.*, 2001). Außerdem konnte die Aktivität einer über Cwp2p immobilisierten Lipase 2 aus *Y. lipolytica* mithilfe eines (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-Linkers maßgeblich gesteigert werden. Dieser Linker erwies sich im Vergleich zu einer als Linker untersuchten Serin/Threonin-reichen Region des Ankerproteins Flo1p mit einer Größe von 350 AS, welche zuvor erfolgreich zur Verbesserung der extrazellulären Zugänglichkeit eines über Cwp2p und Flo1p immobilisierten HA-Tags in *S. cerevisiae* genutzt wurde, als geeigneter für die Verankerung dieser Lipase (Breinig & Schmitt, 2002; Liu *et al.*, 2010b). Für Fusionen einer  $\alpha$ -Galaktosidase mit unterschiedlichen N-terminalen Zellwandankerproteinen konnte die Enzymaktivität durch die Modifikation mit einem „GS“-Linker in Abhängigkeit des Ankerproteins gesteigert werden. Während die größte Zunahme der Aktivität für Sed1p festgestellt wurde, zeigten andere Zellwandanker, wie z. B. Sag1p und Cwp2p, keine bzw. nur geringe Aktivitätszunahmen. Die höchste Enzymaktivität in den Versuchen zeigte hingegen die Fusion mit dem Zellwandanker Dan4p ohne zusätzliche Linkersequenz, deren Addition zu keiner weiteren Erhöhung führte (Lozančić *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019).

Somit scheint die Eignung sowie die Wahl bestimmter Linker mit unterschiedlichen Zusammensetzungen und Längen sehr spezifisch für die untersuchte Fusion aus Ziel- und Ankerprotein zu sein. Eine allgemeine Korrelation zwischen den Bestandteilen oder den Längen der Linker und den Fusionsproteinen ist demnach nur schwierig abzuleiten und muss auf das jeweilige Protein abgestimmt werden (Yu *et al.*, 2015). Einflüsse des hier zur Expression genutzten pYX242-Vektors können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da sich dieser Vektor auch zur Expression der N-terminalen EstA-Fusionskonstrukte ohne Linkersequenz als weniger effektiv erwies, was möglicherweise auf die transkriptionelle

Kontrolle durch den *TPI*-Promotor und -Terminator zurückzuführen war. Für die C-terminale Verankerung der EstA mithilfe des Aga1p-Aga2p-Systems, welche kein Bestandteil dieser Linker-abhängigen Expressionsanalyse war, konnte eine Enzymaktivität trotz der Nutzung eines Linkers beobachtet werden. Im kommerziellen pYD1-Expressionsvektor war der gleiche „GS“-Linker zwischen Aga2p und EstA enthalten, der jedoch am N-Terminus anstatt am C-Terminus der EstA lokalisiert war (Boder & Wittrup, 1997). Aufgrund fehlender Analysen der C-terminalen Oberflächenexpression der EstA ohne bzw. mit weiteren Linkersequenzen lassen sich hier nur bedingt Rückschlüsse ziehen. Es kann jedoch vermutet werden, dass eine Linker-bedingte Steigerung der EstA-Aktivität zusätzlich auch von der Art der Fusion (N- oder C-terminal) abhängig ist, was aber weitere Untersuchungen erfordert. Die hier verwendeten Linker eigneten sich in den Experimenten nicht zur Erhöhung der Volumenaktivität der N-terminal verankerten EstA über Cwp2p bzw. Sed1p und wirkten sich sogar nachteilig aus. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Proteinprozessierung durch die Insertion der Linkersequenzen zwischen Enzym und Ankerprotein nachteilig verändert wurde, was zu einer verringerten Immobilisierungseffizienz in der Zellwand führte. Möglicherweise wurde die optimale Länge der Linker für die N-terminale Zellwandverankerung der EstA durch die Untersuchung von nur zwei Linkersequenzen mit definierten Längen noch nicht gefunden, was durch ein Screening von Linkern mit variablen Längen und Aminosäurezusammensetzungen künftig näher analysiert werden könnte. Außerdem wäre es auch denkbar, dass sich eine Nutzung von rigiden Linkern als geeigneter für die EstA-Oberflächenexpression erweisen könnte, da die Verwendung von flexiblen Linkern bei der Expression mancher Fusionsproteine zu Problemen führte (Amet *et al.*, 2009; Bai & Shen, 2006; Chen *et al.*, 2013; Maeda *et al.*, 1997).

### **Expressionsanalyse der EstA in Abhängigkeit einer UPR-Aktivierung und gesteigerten Proteinbiosynthese**

Als weitere Strategie zur Erhöhung der EstA-Immobilisierungseffizienz wurde der Einfluss einer gesteigerten Proteinbiosynthese durch die Koexpression des UPR-Regulatorproteins Hac1p sowie der drei Chaperone Ero1p, Kar2p und Pdi1p in *S. cerevisiae* untersucht. Fehl- und ungefaltete Proteine, die im ER-Lumen akkumulieren, lösen in *S. cerevisiae* eine UPR-induzierte Degradation aus, bei welcher das bZIP-Protein Hac1p eine zentrale Rolle im Signalweg einnimmt (Cox & Walter, 1996; Guerfal *et al.*, 2010; Mori *et al.*, 1996; Travers *et al.*, 2000). Die *HAC1*-mRNA wird in der Zelle konstitutiv exprimiert und besitzt eine Intron-Sequenz, die die Translation blockiert. Infolge von ER-Stress wird das Transmembran-

protein Ire1p durch die Dissoziation von Kar2p aktiviert, welches ein unkonventionelles Splicing der Intron-Sequenz der *HAC1*-mRNA durchführt, wodurch die Translation sowie Translokation des Transkriptionsfaktors Hac1p in den Nukleus erfolgt und die Transkription diverser ER-Stress-Gene, wie z. B. ER-residenter Chaperone oder Foldasen, zur Wiederherstellung der ER-Homöostase induziert wird (Cox *et al.*, 1993; Guerfal *et al.*, 2010; Kimata *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2000; Rügsegger *et al.*, 2001). In *S. cerevisiae* und *P. pastoris* konnte durch die Koexpression von Hac1p die Expression von Membranproteinen, sekretierten oder auch zellwandverankerten Proteinen gesteigert werden (Breinig *et al.*, 2006; Gasser *et al.*, 2006; Guerfal *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2020; Valkonen *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der Koexpression des UPR-Regulatorproteins Hac1p auf die Oberflächenimmobilisierung der über Cwp2p bzw. Sed1p verankerten EstA untersucht. Hierzu wurde der von Valkonen *et al.* (2003) etablierte single-copy-Centromer-Vektor pMS109 eingesetzt, welcher die bereits aktivierte Form von Hac1p nach Intron-Splicing konstitutiv exprimiert und aufgrund passender Selektionsmarker mit den im pFB2-Vektor exprimierten EstA-Fusionskonstrukten koexprimiert werden konnte. Weder für die Immobilisierung über Cwp2p noch für Sed1p konnte in Kombination mit der Hac1p-Koexpression eine Steigerung der EstA-Volumenaktivitäten beobachtet werden (s. Abb. 32 A, c). Die Volumenaktivitäten wurden durch die Koexpression sogar auf das Level des Leervektors reduziert. Im Gegensatz zu den erhaltenen Ergebnissen konnte Valkonen *et al.* (2003) mithilfe der Hac1p-Koexpression eine Expressionssteigerung einer sekretierten  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* in *S. cerevisiae* beobachten, wobei die Sekretion einer Endoglukanase aus *T. reesei* unverändert blieb. In Studien von Breinig *et al.* (2006) wurde ebenfalls die EstA-Immobilisierungseffizienz in Abhängigkeit der UPR-Aktivierung durch die Hac1p-Expression über den single-copy-Vektor pMS109 untersucht. Neben dem Fusionskonstrukt aus EstA und Cwp2p, welches auch in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, wurde die Verankerung mithilfe von Flo1p betrachtet. Dort konnte für Cwp2p ebenfalls keine Erhöhung der EstA-Volumenaktivität beobachtet werden, wohingegen für Flo1p eine Aktivitätssteigerung um ca. 25 % festgestellt werden konnte. Als möglicher Grund für die Unterschiede zwischen Cwp2p und Flo1p wurde angeführt, dass die genutzte Cwp2p-Sequenz ohne ihre Signalsequenz 71 AS umfasst und daher bereits für die zelluläre Verankerungsmaschinerie optimiert ist, weshalb eine Steigerung der Immobilisierungseffizienz durch die UPR-Aktivierung nicht erreicht werden konnte. Im Gegensatz dazu wurden von Flo1p 104 AS zur Verankerung eingesetzt, was eine drastische Verkürzung des nativen Proteins (1.536 AS) darstellte (Breinig *et al.*, 2006; Teunissen *et al.*, 1993). Durch

diese deutliche Modifikation der Sequenz könnte das Ankerprotein eventuell noch nicht für die Immobilisierung in *S. cerevisiae* optimiert gewesen sein, weshalb in den wildtypischen Stämmen möglicherweise deutlich niedrigere Enzymaktivitäten für die Flo1p-Verankerung im Vergleich zu Cwp2p auftraten und sich eine UPR-Aktivierung förderlich auswirken konnte (Breinig *et al.*, 2006). Auch Van der Vaart *et al.* (1997) wiesen nach, dass verkürzte Versionen von Flo1p zur Reduktion der Immobilisierungseffizienz und Aktivität einer  $\alpha$ -Galaktosidase führten. Bei der Nutzung des Zellwandankerproteins Sed1p in dieser Arbeit, welches 230 AS umfasste und somit größer als Cwp2p und die von Breinig *et al.* (2006) genutzte Flo1p-Version war, ließ sich trotz der im wildtypischen SEY6210-Hefestamm aufgetretenen höchsten Volumenaktivität keine Steigerung durch die konstitutive UPR-Aktivierung über Hac1p feststellen, weshalb kein direkter Zusammenhang zwischen der Ankerlänge von Cwp2p, Sed1p und Flo1p und der Hac1p-Koexpression abgeleitet werden kann. In den Experimenten führte die Hac1p-Koexpression sogar zur Reduktion der Volumenaktivitäten auf das Niveau der Leervektorkontrolle, was dafür sprechen könnte, dass aufgrund der UPR-induzierten ERAD-Aktivierung Fusionsproteine, die keine gesteigerte Faltung über ER-Chaperone erfuhren, von der Degradationsmaschinerie abgebaut wurden. Dadurch konnten deutlich weniger Fusionsproteine an der Zelloberfläche immobilisiert werden, was die reduzierten Enzymaktivitäten erklären könnte (Guerfal *et al.*, 2010). Die konstitutive Expression des UPR-Aktivators Hac1p führte in manchen Studien zu Beeinträchtigungen des Wachstums der *S. cerevisiae*-Zellen, was auch bei der Hac1p-Koexpression über einen 2 $\mu$ -multicopy-Vektor zur EstA-Immobilisierung beobachtet werden konnte und eventuell eine zusätzliche Einschränkung für die Proteinproduktion darstellen kann (Breinig *et al.*, 2006; Ishiwata-Kimata & Kimata, 2023; Nguyen *et al.*, 2022). Durch die Induktion von mildem ER-Stress mithilfe entsprechender Stressstimuli (z. B. Tunicamycin) konnte die Wachstumsrate der Hefen mit Wachstumsdefekten infolge einer konstitutiven Hac1p-Expression erhöht werden, was sich möglicherweise auch auf die EstA-Zelloberflächenexpression positiv auswirken könnte (Ishiwata-Kimata & Kimata, 2023; Nguyen *et al.*, 2022). Studien zur Hac1p-Koexpression in *P. pastoris* mit verschiedenen Proteinklassen zeigten, dass sich die Hac1p-induzierte UPR-Aktivierung auf die Expression mancher Proteine zwar förderlich auswirken kann, die Effekte sich aber von Protein zu Protein unterscheiden und immer von Neuem evaluiert werden müssen. Beispielsweise wurden vier heterologe Proteine über das Aga1p-Aga2p-System in *P. pastoris* mit Hac1p koexprimiert, welches zudem unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors stand. Eine konstitutive Hac1p-Koexpression führte hierbei entweder zu keinen

oder nur geringfügigen Verbesserungen der Immobilisierungseffizienzen, wogegen die induzierbare Koexpression von Hac1p für ein Protein zu einer Steigerung und für die drei weiteren Proteine zu einer Verringerung in der Zellwandverankerung führte (Guerfal *et al.*, 2010; Jacobs *et al.*, 2008). Anhand weiterer Analysen mit sekretierten Proteinen bzw. Membranproteinen zeigte sich, dass eine konstitutive Hac1p-Expression meist nur geringe bzw. keine Effekte auf die Expressionslevel hatte und die induzierbare Hac1p-Expression entweder zu Erhöhungen oder Verringerungen der Expressionslevel der Proteine führte (Guerfal *et al.*, 2010). Demnach könnte sich eine über einen induzierbaren Promotor regulierte Hac1p-Expression möglicherweise förderlich auf die EstA-Immobilisierung auswirken, was jedoch weiterer Untersuchungen bedarf. Neben dem eigentlichen Enzym, welches zu unterschiedlichen Ergebnissen bei einer Hac1p-Koexpression führen kann, scheint zudem auch das Ankerprotein eine maßgebliche Variable für die Hac1p-induzierte Steigerung der Oberflächenimmobilisierung zu sein.

Aufgrund der ausgebliebenen Aktivitätssteigerung der EstA in *S. cerevisiae* durch die Aktivierung der gesamten UPR über die konstitutive Hac1p-Expression, die möglicherweise zu Beeinträchtigungen der ER-Homöostase führte, sollten die Effekte einzelner ER-Chaperone auf die Immobilisierungseffizienz untersucht werden, welche infolge einer UPR-Aktivierung hochreguliert werden (Chapman *et al.*, 1998; Travers *et al.*, 2000). Eines der getesteten Chaperone stellt Ero1p dar, das als ER-residente Thioloxygenase an der oxidativen Proteinfaltung beteiligt und im Zusammenspiel mit der Proteindisulfidisomerase Pdi1p für die Ausbildung von Disulfidbrücken zuständig ist (Frand & Kaiser, 1998; Kim *et al.*, 2012; Pollard *et al.*, 1998; Sevier & Kaiser, 2008). Eine zentrale Rolle bei der Regulation der UPR spielt das Hsp70-Chaperon BiP/Kar2p, welches fehlgefaltete Proteine in einem faltungskompetenten Zustand hält. Bei ER-Stress dissoziiert es von seinem Interaktionspartner Ire1p, was die Hac1p-induzierte UPR-Aktivierung ermöglicht, die wiederum eine verstärkte *KAR2*-Expression auslöst (Kimata *et al.*, 2007; Nikawa *et al.*, 1996; Okamura *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 1989). Die Pdi1p-Expression wird ebenfalls infolge von ER-Stress hochreguliert, da dieses Enzym den Transfer von durch Ero1p generierten Disulfidbrücken auf Zielproteine katalysiert. Hierbei ist Pdi1p für die Feedback-Regulation von Ero1p über Redoxreaktionen verantwortlich, wodurch die ER-Homöostase aufrechterhalten wird (Cox *et al.*, 1993; Frand & Kaiser, 2000; Kim *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 1998; Travers *et al.*, 2000).

Die Effekte der Koexpression der drei ER-Chaperone Ero1p, Kar2p und Pdi1p auf die Zelloberflächenimmobilisierung der Fusionsproteine aus EstA und Cwp2p bzw. Sed1p



wurden in den *S. cerevisiae*-Stämmen BY4742, S86c und SEY6210 untersucht. Aufgrund der ausschließlichen Verfügbarkeit der Chaperone im Gateway-Expressionsvektor pBG1805, welcher über einen *URA3*-Selektionsmarker und einen induzierbaren *GALI*-Promotor verfügte, wurden die EstA-Fusionskonstrukte mithilfe des pYX242-Vektors koexprimiert. Eine erwartete Erhöhung der EstA-Volumenaktivität durch eine Chaperon-induzierte Steigerung der Proteinbiosynthese konnte in keinem der Hefestämme beobachtet werden, wobei die Volumenaktivitäten sogar auf das Niveau der Leervektorkontrolle sanken (s. Abb. 32 A, c). In verschiedenen Studien konnte dagegen eine Erhöhung der Produktion von heterologen Proteinen in *S. cerevisiae* und *P. pastoris* durch die Koexpression von ER-Chaperonen nachgewiesen werden. Insbesondere die Chaperone Kar2p und Pdi1p konnten erfolgreich zur Verbesserung der Expression von Antikörper-Fragmenten beitragen (Gasser *et al.*, 2006, 2007; Gasser & Mattanovich, 2007; Shusta *et al.*, 1998, 2000). Aber auch die Sekretion anderer Enzyme, wie z. B. einer  $\beta$ -Glukosidase, Endoglukanase und  $\alpha$ -Amylase konnte verbessert werden. Hierbei wurde demonstriert, dass die Pdi1p auch die Sekretion der Endoglukanase CelA aus *C. thermocellum* und einer  $\beta$ -Glukosidase aus *Pyrococcus furiosus*, welche keine Disulfidbrücken besitzen, erhöhen konnte (Alzari *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2015). Durch die Koexpression von Kar2p und Pdi1p konnte außerdem auch die Immobilisierungseffizienz unterschiedlicher Antikörper-Fragmente über das Aga1p-Aga2p-System gesteigert werden (Mei *et al.*, 2019; Rakestraw & Wittrup, 2006). Im Gegensatz dazu konnten Wentz & Shusta (2007) für das „Surface Display“ von scFv-Antikörperfragmenten („single chain fragment variable“) feststellen, dass die Koexpression der ER-Chaperone Kar2p und Pdi1p zwar zu einer gesteigerten Sekretion des Antikörper-Fragments ohne fusionierten Zellwandanker führte, jedoch wurde die Sekretion und Oberflächenimmobilisierung der Fusionskonstrukte mit Aga2p nicht verstärkt. Dementsprechend wurde vermutet, dass eine über die Koexpression der ER-Chaperone Kar2p und Pdi1p erhöhte Sekretion des unfusionierten Proteins nicht zwingend zur Erhöhung der Displayeffizienz des Fusionsproteins führt. Die sekretorische Prozessierung könnte durch die Fusion mit dem Zellwandankerprotein Aga2p verändert worden sein, was die Effekte der Überexpression von ER-Chaperonen maskieren bzw. unterbinden könnte (Wentz & Shusta, 2007). Für Ero1p konnte demonstriert werden, dass die Koexpression zu einer Verbesserung der Immobilisierungseffizienz eines „single-chain T-Zellrezeptors“ („scTCR“) führte (Wentz & Shusta, 2007). Auch bei der Verankerung verschiedener Zellulasen über Aga2p konnten Veränderungen in der Proteinprozessierung durch das Zellwandankerprotein im Vergleich zu den sekretierten Enzymen festgestellt werden. Somit können unterschiedliche Kombinationen

---

aus ER-Chaperon, zu immobilisierendem Protein und Zellwandanker unterschiedliche Auswirkungen auf die Displayeffizienzen besitzen (Tang *et al.*, 2017; Wentz & Shusta, 2007). Weitere Studien zeigten für die Proteinproduktion heterologer Proteine, dass sich eine Koexpression von ER-Chaperonen nicht unbedingt förderlich auf die Expression auswirken muss und die Effekte von den Eigenschaften der Proteine, wie z. B. dem Vorhandensein von Disulfidbrücken oder Glykosylierungsstellen, abhängen (Butz *et al.*, 2003; Harmsen *et al.*, 1996; Hou *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2015). Dies spricht dafür, dass sich die Effekte der Koexpression von ER-Chaperonen auch nachteilig auf die Proteinsekretion bzw. Zelloberflächenimmobilisierung auswirken können und von Fall zu Fall neu bewertet werden müssen (Guerfal *et al.*, 2010). Die Chaperon-induzierte Steigerung der Proteinbiosynthese mithilfe von Ero1p, Kar2p und Pdi1p schien sich – ebenso wie die Hac1p-induzierte UPR-Aktivierung – nicht zur Optimierung der EstA-Zellwandverankerung über Cwp2p und Sed1p zu eignen, was auch auf den Eigenschaften des Enzyms beruhen könnte. Wie zuvor beschrieben, sind die Eigenschaften der Fusionspartner des Fusionsproteins maßgeblich für den Erfolg der Chaperone verantwortlich. Die genaue Struktur der EstA aus *B. gladioli* wurde bisher noch nicht kristallografisch aufgeklärt, wodurch strukturelle Besonderheiten, wie beispielsweise Disulfidbrücken innerhalb des Proteins, identifiziert werden könnten. Dies könnte sich zukünftig als hilfreich für die Auswahl weiterer Chaperone zur Koexpression erweisen. Außerdem könnte die Koexpression von ER-Chaperonen mit der EstA, welche über keinen fusionierten Zellwandanker verfügt, untersucht werden, um Effekte auf die Expression des Enzyms ohne Fusionspartner näher zu beleuchten und Schlüsse über die Eignung des Enzyms zur Koexpression mit weiteren ER-Komponenten zur Steigerung der Expression ziehen zu können. Eine Koexpression des über Aga1p-Aga2p verankerten EstA-Fusionskonstrukts mit ER-Chaperonen könnte zukünftig ebenfalls analysiert werden, da entsprechende Systeme teilweise zur erfolgreichen Erhöhung der Immobilisierungseffizienz von Antikörper-Fragmenten eingesetzt werden konnten, was aber für die EstA nochmals neu betrachtet werden müsste und sich dementsprechend unterscheiden könnte (Mei *et al.*, 2019; Rakestraw & Wittrup, 2006; Wentz & Shusta, 2007).

Neben den Eigenschaften des Enzyms als Auslöser für die ausgebliebene Steigerung der Immobilisierungseffizienz könnte die Koexpression der Chaperone zu verstärktem Stress im ER geführt haben, wodurch die ER-Faltungskapazität überstiegen, die Produktivität der Zellen reduziert und die Degradation von akkumulierten EstA-Fusionsproteinen initiiert wurde, was sich in den verringerten Volumenaktivitäten im EstA-Assay äußerte (Hou *et al.*, 2012). Möglicherweise konnten die Fusionsproteine zwar weiterhin produziert werden, jedoch

könnten auch Beeinträchtigungen des Transports zur Zellwand aufgetreten sein. Zusätzlich könnten infolge des ER-Stresses fehlprozessierte Fusionsproteine in die Zellwand eingebaut worden sein, was auch zur Verringerung der Enzymaktivitäten auf der Zelloberfläche führen könnte (Krysan, 2009). Veränderungen der Zellwandzusammensetzung konnten auch auf die Beteiligung von ER-Stress zurückgeführt werden, was sich in der Veränderung der Biosynthese von Zellwandkomponenten und somit auch in variablen Anteilen verschiedener CWP in der Zellwand äußern kann (Scrimale *et al.*, 2009). Dies könnte zusätzlich dazu beitragen, dass in den vorliegenden Experimenten nur noch eine reduzierte EstA-Aktivität bei gleichzeitiger Chaperon- oder Hac1p-Koexpression beobachtet werden konnte. Weiterführend könnte ein gestörter Proteintransport durch die Koexpression von Proteinen aus *S. cerevisiae* untersucht werden, welche in nachfolgende Prozesse, wie z. B. den Golgi-Vesikeltransport involviert sind. Für die Koexpression der Vertreter Cog6p, Coy1p und Imh1p zeigte sich eine Erhöhung der Produktion von heterologen Antikörperfragmenten in *P. pastoris*, was weitere potenzielle Versuchsansätze eröffnen könnte (Gasser *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2012). Auch für das „Surface Display“ von Zellulasen über das Aga1p-Aga2p-System konnte eine Erhöhung der Verankerungseffizienz durch die Koexpression verschiedener Komponenten des ER-Golgi- und Golgi-Plasmamembran-Vesikeltransports erzielt werden (Tang *et al.*, 2017). Ein weiterer Faktor, welcher möglicherweise bei der Durchführung der jeweiligen Experimente zu Einschränkungen geführt hat, war die Wahl des Vektors für die Expression der Fusionskonstrukte. Aufgrund der ausschließlichen Verfügbarkeit der ER-Chaperone im pBG1805-Vektor, welcher den *URA3*-Selektionsmarker besaß, wurden die EstA-Fusionskonstrukte im pYX242-Vektor über einen *TPI*-Promotor koexprimiert. Bereits in den vorangegangenen Experimenten konnten in diesem Vektor niedrigere Volumenaktivitäten im Vergleich zum pFB2-Ausgangsvektor mit *PGKI*-Promotor nachgewiesen werden, was wahrscheinlich auf eine niedrigere Expression durch die veränderte Kombination aus Promotor und Terminator im Expressionsvektor zurückzuführen war und verringerte Aktivitäten bedingte.

### **Analyse der EstA-Expression durch Variationen der transkriptionellen Regulation**

Aufgrund der teilweise drastischen Unterschiede in den Immobilisierungseffizienzen der N-terminalen Fusionskonstrukte mithilfe der Expressionsvektoren pFB2 und pYX242 wurden die Einflüsse verschiedener Kombinationen aus konstitutiven Promotoren und Terminatoren auf die Zellwandverankerung untersucht, um eine bestmögliche Steigerung der EstA-Immobilisierungseffizienz zu erzielen. Die Wahl des Promotors spielt im YSD eine

ausschlaggebende Rolle für die effiziente Genexpression eines Fusionskonstrukts. Meistens werden starke, konstitutive Promotoren mit stabilen Transkriptionsstärken, wie z. B. *PGK1*, *TDHI-3* oder *TEF1* eingesetzt, da die Promotoren der Zellwandankerproteine oft niedrigere Transkriptionsstärken zeigen bzw. wachstumsphasenabhängig aktiv sein können (Andreu & Lí del Olmo, 2018; Gagnol *et al.*, 1990; He *et al.*, 2023; Holland & Holland, 1980; Kim *et al.*, 2015; Ogden *et al.*, 1986; Peng *et al.*, 2015). Mithilfe komparativer Studien zur Untersuchung der Transkriptionsstärken verschiedener Promotoren konnten bereits Biosynthese-Pathways in *S. cerevisiae* optimiert werden (Gao *et al.*, 2020; He *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2012). Ebenso beeinflussen Terminatoren die Genexpression in Hefen, wobei ihr Effekt auf die Transkriptionseffizienz in der synthetischen Biologie bisher deutlich seltener im Fokus von Untersuchungen lag. Sie sind in die Prozessierung, Stabilität und Translations-effizienz der mRNA involviert und können die Proteinproduktion maßgeblich beeinflussen (Curran *et al.*, 2013; Yamanishi *et al.*, 2013). Meist werden für die Genexpression zu den Promotoren korrespondierende Terminatoren ausgewählt, jedoch konnten in einer genomweiten Analyse von über 5000 Terminator-Regionen in *S. cerevisiae* mehrere Terminatoren identifiziert werden, die im Vergleich zum oft genutzten *PGK1*-Terminator zu einer Detektion erhöhter Fluoreszenzintensitäten eines GFP-Reporterproteins führten (Matsuyama, 2019; Yamanishi *et al.*, 2013). Außerdem konnte festgestellt werden, dass eine Nutzung von starken Terminatoren mit starken Promotoren nicht zwingend zu einer drastischen Erhöhung der Proteinproduktion führen muss und dass durch eine Paarung eines starken Terminators mit schwächeren Promotoren deutlichere Änderungen in der Expression von Fluoreszenzproteinen beobachtet werden konnten (Curran *et al.*, 2013; Matsuyama, 2019; Wei *et al.*, 2017). Bisher wurde keine Veröffentlichung zum Vergleich der Effekte unterschiedlicher Paarungen aus konstitutiven Promotoren und Terminatoren auf die Zellwandimmobilisierung publiziert, die eine größere Anzahl an Promotoren und Terminatoren umfasst. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Expressionsanalyse der Zellwandverankerung der über Cwp2p immobilisierten EstA in Abhängigkeit von 19 konstitutiven Promotoren und sechs Terminatoren durchgeführt. Zu Beginn wurden die Effekte der konstitutiven Promotoren in Kombination mit dem *TDHI*-Terminator auf die EstA-Immobilisierung im BY4742-Stamm untersucht. Für die beiden Promotoren *CCW12* und *HTB2* konnten in Kombination mit dem *TDHI*-Terminator im 2 $\mu$ -multicopy-Plasmid pYTK083 die höchsten Volumenaktivitäten festgestellt werden, weshalb diese Promotoren zur Analyse mit fünf weiteren Terminatoren eingesetzt wurden, was aber zu keiner zusätzlichen Erhöhung der Enzymaktivitäten führte. Durch die Expression der Fusions-

konstrukte im S86c-Stamm, in welchem bereits bei der Untersuchung der N-terminalen Zellwandverankerung über den pFB2-Vektor höhere Volumenaktivitäten auftraten, konnte die Zelloberflächenimmobilisierung der EstA weiter gesteigert werden. Die höchste Volumenaktivität des „EstA-CWP2“-Fusionskonstrukts von 3.247,5 mU/ml konnte für die Paarung aus dem *CCW12*-Promotor und *TDHI*-Terminator erzielt werden, was sich in dieser Arbeit als die effizienteste Kombination aus Expressionsstamm und -konstrukt für die Cwp2p-verankerte EstA erwies (s. Abb. 32 B).

Die Expressionsanalyse wurde mithilfe eines für *S. cerevisiae* kodonoptimierten „EstA-CWP2“-Konstrukts durchgeführt, um zusätzlich eine weitere Erhöhung der Immobilisierungseffizienz durch die Kodonoptimierung der bakteriellen EstA-Sequenz zu erreichen, was sich bereits als hilfreich für die heterologe Produktion und das YSD von Fremdproteinen erwiesen hat (Bucarey *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Gustafsson *et al.*, 2004; He *et al.*, 2015; Lanza *et al.*, 2014; Tuller *et al.*, 2010). Aufgrund des Fehlens einer Leervektorkontrolle im Kit wurde als Referenz die Volumenaktivität des im pFB2-Vektor unter der Kontrolle des *PGKI*-Promotors und -Terminators exprimierten Fusionskonstrukts herangezogen, welches nicht kodonoptimiert war. Sowohl der Austausch des *PGKI*-Terminators durch einen *TDHI*-Terminator als auch die Kodonoptimierung und das unterschiedliche Vektorrückgrat führten zu keiner deutlichen Veränderung der Volumenaktivität, weshalb diese als Anhaltspunkt für den Vergleich der unterschiedlichen Volumenaktivitäten genutzt wurde. Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen, die zuvor über die Expression mithilfe des pYX242-Vektors erhalten wurden, war nicht möglich, da der entsprechende *TPI*-Promotor und -Terminator des pYX242-Vektors nicht im Klonierungskit enthalten war. Fünf der 19 getesteten Promotoren führten im BY4742-Stamm in Kombination mit dem *TDHI*-Terminator zu EstA-Volumenaktivitäten, die um einen Faktor von ca. 1,0-1,9 niedriger waren als die des *PGKI*-Promotors. Durch die Nutzung der restlichen Promotoren konnte die EstA-Volumenaktivität bis zu einem Faktor von 1,68 gesteigert werden. In Studien zur Nutzung unterschiedlicher Signalsequenzen zur Zelloberflächenimmobilisierung einer  $\beta$ -Glukosidase aus *A. aculeatus* über Sed1p wurden ebenfalls drei konstitutive Promotoren und ein *SAG1*-Terminator getestet, wobei die Genkassetten dort ins Genom von *S. cerevisiae* integriert wurden. Hierbei zeigten sich je nach Signalsequenz und Promotor deutliche Unterschiede in den Enzymaktivitäten. Die Kombination aus *SEDI*-Signalsequenz und -Promotor zeigte die höchste Aktivität. Für die dort untersuchten *TDH3*- und *PGKI*-Promotoren konnten deutlich niedrigere Aktivitäten bestimmt werden, wohingegen nur für eine der untersuchten Signalsequenzen in Kombination mit dem *TDH3*-Promotor eine zum

---

*SEDI*-Promotor ähnliche Enzymaktivität detektiert wurde (Inokuma *et al.*, 2014, 2016). Für eine  $\beta$ -Glukosidase aus *A. niger* konnte hingegen eine höhere Sed1p-Immobilisierungseffizienz für den *TDH3*-Promotor im Vergleich zum *SEDI*-Promotor detektiert werden, wobei sich der Aufbau der Expressionskonstrukte zusätzlich in Signal- und Terminatorsequenzen unterschied (Inokuma *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Einen direkten Vergleich mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen für die Zellwandverankerung der EstA mithilfe unterschiedlicher Promotoren lässt dies nicht zu, da neben der Variation des Signalpeptids, des Enzyms, des Ankerproteins sowie des Terminators auch die Genomintegration der Genkassetten zu Unterschieden in den Immobilisierungseffizienzen führen können. Daraus kann gefolgert werden, dass sich Promotoren in Kombination mit verschiedenen Signalsequenzen und Terminatoren für die Oberflächenexpression von Fremdproteinen unterschiedlich eignen können und die Kombinationen von Fall zu Fall neu evaluiert werden sollten, um hohe Expressionslevel zu garantieren (Inokuma *et al.*, 2016; Kajiwara *et al.*, 2020; Mori *et al.*, 2015). Die hier genutzten Promotoren entstammten einem Klonierungskit, mit welchem zur Charakterisierung der Promotorstärken eine Analyse mit drei Fluoreszenzreporterproteinen durchgeführt wurde. Die Transkriptionsstärke des einzelnen Promotors war dort für alle Reporterproteine gleich, weshalb sie unabhängig von der zu kodierenden Sequenz sein sollte und eine relative Einstufung der Promotoren nach Transkriptionsstärke ermöglichte (Lee *et al.*, 2013, 2015). Zum Teil konnten für die EstA-Zelloberflächenimmobilisierung mittels Cwp2p ähnliche Einstufungen der Promotoren anhand der Transkriptionsstärken beobachtet werden, jedoch traten Abweichungen für viele Promotoren auf, die teilweise durch die biologische Varianz zwischen den analysierten Transformanten erklärt werden können. Dennoch konnten im Vergleich zu vorangegangenen Experimenten mithilfe der Promotoren *PGK1* und *TEF1*, die im Kit zu den Promotoren mit den höchsten Transkriptionsstärken zählen, keine Erhöhungen der EstA-Volumenaktivitäten nachgewiesen werden. Infolge einer Expressionsanalyse des LacZ-Reporterproteins mithilfe mehrerer Promotoren traten ebenfalls abweichende Einstufungen für die Promotoren *TEF1*, *PGK1* und *TDH3* auf. In dieser Studie wurden die Genkassetten als Unterschied ins Genom integriert, um eine konstante Kopienzahl zu erhalten, was im Vergleich zur Expression über multicopy-Plasmide zu weiteren Abweichungen führen kann (Da Silva & Srikrishnan, 2012; Partow *et al.*, 2010). Auch in Studien zur Klassifizierung der Transkriptionsstärke unterschiedlicher Promotoren mit ihren zugehörigen Terminatoren in einem 2 $\mu$ -Plasmid mithilfe eines GFP-Reporterproteins traten wiederum abweichende Einstufungen der Transkriptionsstärken auf, die sich für die Expression des LacZ-Reporters auch reproduzieren ließen (Sun *et al.*, 2012). Zusätzlich

konnte festgestellt werden, dass sich Transkriptionsstärken in Abhängigkeit der Wachstumsphasen der Hefen, der Kohlenstoffquelle und von Stresssituationen variabel verändern können (Peng *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2018). Die Transkriptionsstärken der Promotoren können sich zwischen verschiedenen experimentellen Bedingungen und Wachstumskonditionen unterscheiden, was möglicherweise zu individuellen Variationen in den Expressionstärken von Genen führt und direkte Vergleiche nur bedingt zulässt (Apel *et al.*, 2017; Partow *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2020). Demnach kann anhand der Transkriptionsstärke eines Promotors nicht zwingend auf eine entsprechende Steigerung der Immobilisierungseffizienz im „Surface Display“ geschlossen werden, weshalb sich Promotoren insbesondere in Kombination mit verschiedenen Terminatoren unterschiedlich für jedes zu immobilisierende Fusionsprotein eignen können. Eine Einstufung von Promotoren nach ihrer Transkriptionsstärke hängt damit stark von den Versuchsbedingungen ab. Weitere Faktoren, wie z. B. die Länge des Transkripts bzw. des translatierten Polypeptids sowie der Faltungszustand könnten die Proteinmenge beeinflussen, was die Unterschiede zwischen den oftmals zur Klassifizierung der Promotoren eingesetzten Fluoreszenzreporterproteinen und zellwandverankerten Fusionsproteinen erklären könnte (Lee *et al.*, 2013, 2015).

Zusätzlich zu den durch die Promotoren bedingten Unterschiede in den Immobilisierungseffizienzen des „EstA-CWP2“-Fusionskonstrukts in Kombination mit dem *TDHI*-Terminator konnte durch den Austausch mit fünf weiteren Terminatoren (*ADHI*, *ENO2*, *SSAI*, *PGKI* und *ENO1*) eine Verringerung der entsprechenden Volumenaktivitäten im BY4742-Stamm beobachtet werden. Für den *CCW12*-Promotor traten um 10-20 % niedrigere Volumenaktivitäten auf, wohingegen die Verringerung für den *HTB2*-Promotor mit ca. 50 % deutlich stärker ausfiel. Somit scheint die Expression über den *CCW12*-Promotor trotz des Wechsels der Terminatoren deutlich weniger schwankend zu sein als für den *HTB2*-Promotor, was auf eine stabilere Transkriptionsstärke des *CCW12*-Promotors über ein breiteres Spektrum an Terminatoren hindeutet. Die Paarung mit dem *TDHI*-Terminator zeigte sich hingegen für den *HTB2*-Promotor als optimale Kombination und die Variation der Terminatoren führte zu keiner weiteren Erhöhung der N-terminalen EstA-Immobilisierungseffizienz. Auch hier wurden im Vergleich zu den Terminatoren des verwendeten Klonierungskits Abweichungen in der Einstufung der Terminatorstärke festgestellt. Da die dort untersuchten Fluoreszenzproteine nicht unter der Kontrolle der *CCW12*- und *HTB2*-Promotoren standen und nicht in einer zellwandverankerten Form in *S. cerevisiae* exprimiert wurden, ließ dies ebenfalls keinen direkten Vergleich zwischen den Terminatorstärken zu (Lee *et al.*, 2013). Bei der Untersuchung verschiedener Terminatoren zur Modulierung der Expression von fluoreszenten

Reportergeneten konnten ebenfalls Unterschiede zwischen den Transkriptionsstärken in Kombination mit mehreren Promotoren festgestellt werden. Hierbei wurden die Unterschiede durch Modifikationen der Terminatoren in ihren Sequenzen sowie durch abweichende Sequenzlängen erklärt, was einer der möglichen Faktoren für die Variation in den Mengen an produziertem Protein sein konnte (Curran *et al.*, 2013; Yamanishi *et al.*, 2013). Zusätzlich wurde auch die Verwendung anderer Fluoreszenzproteine und Promotoren als Auslöser angeführt, wohingegen in anderen Studien eine Unabhängigkeit der Terminatorstärke von Promotoren und der zu kodierenden Sequenz postuliert wurde (Curran *et al.*, 2013; Ito *et al.*, 2013; Matsuyama, 2019; Wei *et al.*, 2017; Yamanishi *et al.*, 2013). Für das Zusammenspiel zwischen Promotoren und Terminatoren zur Regulation der Genexpression konnte ein nicht-lineares Verhalten beobachtet werden, bei dem die Kombination aus einem starken Promotor und Terminator nicht unbedingt zu einer verstärkten Erhöhung der Genexpression führte. Die Kombination aus einem Promotor mit niedrigerer Transkriptionsstärke und einem Terminator mit hoher Terminationsstärke brachte hingegen im Verhältnis eine deutlichere Steigerung der Fluoreszenzintensitäten des Reporterproteins mit sich (Curran *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2017). Ein entsprechendes Verhalten konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden, da nur die zwei Promotoren, die sich zuvor zusammen mit dem *TDHI*-Terminator am effizientesten für die Zelloberflächenimmobilisierung der EstA über Cwp2p erwiesen haben, mit fünf weiteren Terminatoren getestet wurden. Außerdem trat dieser Effekt auch nicht für die Kombination aus dem *REVI*-Promotor mit der niedrigsten Transkriptionsstärke und dem hier als am effizientesten eingestuften *TDHI*-Terminator auf, da für diese Paarung statt einem steigernden Effekt auf die EstA-Volumenaktivität eine Reduktion um ca. 50 % detektiert wurde. Für die Klassifizierung von Promotoren nach Transkriptionsstärken, die wie bereits zuvor erwähnt je nach Veröffentlichung variieren können, scheinen Terminatoren maßgeblich für die jeweiligen Transkriptionsstärken mitverantwortlich zu sein. Dies könnte die zuvor beschriebenen Expressionsunterschiede zwischen den genutzten Promotor-Terminator-Kombinationen innerhalb dieser Arbeit (pFB2- und pYX242-Vektor) sowie im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen erklären und macht eine individuelle, versuchsabhängige Untersuchung dieser Paarungen für die Zelloberflächenexpression nötig (Curran *et al.*, 2013; Da Silva & Srikrishnan, 2012). Zusätzlich zeigte sich auch hier, dass durch die Expression des Fusionskonstrukts unter der transkriptionellen Kontrolle des *CCW12*-Promotors und des *TDHI*-Terminators im S86c-Stamm die EstA-Volumenaktivität weiter erhöht werden konnte. Dies lässt sich möglicherweise auf die zuvor erwähnte stabilere Verankerung der EstA über Cwp2p in der Hefezellwand dieses Stamms zurückführen und deutet auf eine vom



Expressionskonstrukt unabhängige, verbesserte Eignung des S86c-Stamms für die Oberflächenexpression von zellwandverankerten Fusionsproteinen hin. Weiterführende Untersuchungen könnten aufgrund der aufgetretenen Variationen andere Kombinationen aus Promotoren und Terminatoren in weiteren Hefestämmen analysieren, die nicht im genutzten Klonierungskit enthalten sind und potenziell zu einer Erhöhung der EstA-Immobilisierungseffizienz auch in Kombination mit weiteren Zellwandankerproteinen (Sed1p, Sag1p) führen könnten. Hierzu würden sich neben induzierbaren auch weitere konstitutive Promotoren anbieten. Beispielsweise könnten auch Ankerprotein-spezifische Promotoren untersucht werden, die in Kombination mit dem zugehörigen Zellwandanker bereits zu einer effizienten Zellwandimmobilisierung führten (Inokuma *et al.*, 2014, 2016). Zusätzlich könnten auch künstlich hergestellte Promotoren verwendet werden, die im Vergleich zum oft eingesetzten *TDH3*-Promotor durch die Addition von Intronsequenzen höhere Expressionsstärken einer Luciferase bedingten (Hoshida *et al.*, 2017). Synthetisch hergestellte Terminatorsequenzen, die deutlich kürzere Sequenzlängen als die herkömmlich eingesetzten Terminatoren aufweisen, konnten erfolgreich zur Steigerung der heterologen Proteinproduktion eingesetzt werden, womit sie sich ebenfalls zur weiteren Analyse der Oberflächenexpression eignen würden (Curran *et al.*, 2015). Die Nutzung verschiedener Terminatoren erwies sich in dieser Arbeit neben der Wahl des Promotors als weitere Stellschraube zur Optimierung der Expression von Fusionskonstrukten im „Surface Display“ und zeigt ebenfalls die große Varianz auf, die durch die Modifikation einzelner Komponenten in Expressionssystemen erreicht werden kann. Eine vergleichende Studie, die die Einflüsse von Elementen der Genexpression auf das „Surface Display“ von unterschiedlichen Proteinen in *S. cerevisiae* näher beleuchtet, ist bisher nicht verfügbar, weshalb durch die Analyse der Oberflächenimmobilisierung der EstA über den Zellwandanker Cwp2p die Auswirkungen von Promotoren und Terminatoren erstmalig auf die EstA-Verankerungseffizienz aufgezeigt und eine Verbesserung der Zellwandverankerung erzielt werden konnte. Die Verfügbarkeit entsprechender Studien könnte zukünftig deutlich zunehmen, da das hier genutzte modulare Klonierungskit inzwischen um neue Komponenten, wie z. B. mehrere Signalsequenzen und Zellwandankerproteine, erweitert und erfolgreich eingesetzt werden konnte (O’Riordan *et al.*, 2024).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit eine Vielzahl an neuen Erkenntnissen über die Zellwandimmobilisierung der bakteriellen EstA aus *B. gladioli* in Hefen gewonnen werden. Neben der Erweiterung der N-terminalen Verankerung über die beiden GPI-verankerten Zellwandproteine Sag1p und Sed1p konnte außerdem erstmalig eine C-terminale

Immobilisierung der EstA mithilfe des Aga1p-Aga2p-Systems in *S. cerevisiae* erreicht werden. Hierbei zeigte sich, dass jede Komponente des gesamten Expressionssystems essenziell für die Immobilisierungseffizienz der EstA ist und bereits kleinste Veränderungen zu drastischen Unterschieden in der Zellwandverankerung führen können. Neben den Signalsequenzen zum ER-Import und den Zellwandankerproteinen stellt die Wahl des Expressionsvektors sowie des -stamms in unterschiedlichen Hefegattungen eine wichtige Komponente dar, die den Erfolg der Zellwandimmobilisierung maßgeblich beeinflussen kann. Die Wahl der zur Expression der Fusionskonstrukte genutzten Promotoren und Terminatoren führt darüber hinaus zu starken Variationen in den Immobilisierungseffizienzen, die durch individuelle Testungen für jedes zu immobilisierende Protein weiter gesteigert werden können. Weitere Optimierungsstrategien, wie die Expression in Hefestämmen mit Zellwandmutationen, die Modifikation mit Linkersequenzen oder die Koexpression von Komponenten der UPR bzw. ER-Faltungsmaschinerie erbrachten für die Zellwandverankerung der EstA keine Erhöhung der Immobilisierungseffizienz. Diese Ansätze können sich jedoch situativ für die Immobilisierung anderer Proteine eignen und müssen von Fall zu Fall neu evaluiert werden. Im Verlauf dieser Arbeit konnte für die N-terminale Zellwandverankerung der EstA über den Zellwandanker Cwp2p in *S. cerevisiae* durch unterschiedliche Optimierungsansätze eine Steigerung der Volumenaktivität um einen Faktor von ca. 4,1 im Vergleich zum Cwp2p-verankerten Ausgangskonstrukt erzielt werden. Dies konnte durch die Expression des Fusionskonstrukts im pYTK083-Vektor unter der Kontrolle des *CCW12*-Promotors und *TDHI*-Terminators im S86c-Stamm erreicht werden. Durch die Analyse weiterer Hefestämme und Promotor-Terminator-Paarungen könnten zukünftig auch andere Zellwandankerproteine untersucht werden, um die Immobilisierungseffizienz noch weiter zu erhöhen und auch die Verankerung von bisher noch nicht auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* immobilisierten Enzymen näher zu beleuchten.

### **Zellwandimmobilisierung der EstA über Protein-Protein-Interaktion basierte Verankerungssysteme**

Als Alternative zur Verankerung der EstA aus *B. gladioli* über eine direkte Fusion mit einem Zellwandankerprotein wurden in dieser Arbeit zwei Systeme untersucht, die eine Enzymimmobilisierung über Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen sollten. Eine Komponente wurde hierbei über ein Zellwandankerprotein in der Hefezellwand verankert, wohingegen der Interaktionspartner N-terminal mit der EstA fusioniert wurde. Durch eine Koexpression in Hefen sollte die Immobilisierung der EstA auf der Zelloberfläche erreicht

---

werden, indem die Interaktion zwischen den Domänen ausgebildet wird. Ein Austausch der zu analysierenden Enzymsequenz im Fusionskonstrukt würde eine schnelle und einfache Herstellung weiterer Verankerungssysteme ermöglichen.

### **Zelloberflächenimmobilisierung durch Kohäsin-Dockerin-Interaktion**

Eines der beiden untersuchten Systeme beruhte auf der spezifischen Interaktion von Kohäsin mit Dockerin-Modulen, welche natürlicherweise im Zellulosom von mesophilen Bakterien vorkommen und für die Bindung von Zellulasen zum Zelluloseabbau notwendig sind. Kohäsine stellen Bestandteile von nicht-enzymatischen Gerüstproteinen dar, welche die Integration von Zellulasen mit komplementären Dockerin-Domänen in den Multienzym-Komplex ermöglichen (Bayer *et al.*, 2004; Doi & Kosugi, 2004). Diese Art der Interaktion konnte bereits mehrfach zum „Surface Display“ einzelner Zellulasen oder von Mini-zellulosomen zur Ethanolproduktion mithilfe von Sag1p oder dem Aga1p-Aga2p-System in *S. cerevisiae* eingesetzt werden (Fan *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2010).

Zur Etablierung dieses Verankerungssystems zur Immobilisierung der EstA in *S. cerevisiae* wurden nach der Veröffentlichung von Ito *et al.* (2009) die Sequenzen des Kohäsins 1 und der Dockerin Typ 1-Domäne aus *C. cellulovorans* gewählt. In den Fusionskonstrukten wurden initial jeweils nur einzelne statt den dort eingesetzten zwei Kohäsin- und Dockerin-Domänen verwendet, weil hier kein duales Display zweier Enzyme untersucht werden sollte. Für die Fusion der Kohäsin-Domäne mit dem Zellwandankerprotein wurde zudem anstatt Sag1p der C-Terminus von Cwp2p verwendet, da die Immobilisierungseffizienz im pFB2-Vektor in den vorangegangenen Experimenten für Cwp2p deutlich höher war. Das N-terminale Fusionsprotein aus EstA und Dockerin Typ 1-Domäne wurde im pYX242-Vektor exprimiert, verfügte über keine inserierte Linkersequenz und sollte in den Extrazellularraum sekretiert werden. Durch die Koexpression der Fusionskonstrukte sollte die Interaktion der beiden Domänen auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* erfolgen und die EstA immobilisiert werden, was mithilfe des fotometrischen EstA-Assays nachgewiesen werden sollte. Weder für die untersuchten Hefestämme noch die zugehörigen Kulturüberstände konnte eine Aktivität in Form eines Substratumsatzes detektiert werden. Auch für die Expression des Systems in *P. pastoris* war keine enzymatische Aktivität nachweisbar. Dies ließ darauf schließen, dass die EstA nicht erfolgreich immobilisiert werden konnte, was vermutlich auf einer nicht ausgebildeten Interaktion der Kohäsin- mit der Dockerin-Domäne beruhte. Für die Interaktion zwischen Kohäsinen und Dockerinen konnte eine Spezies-Spezifität nachgewiesen werden,

für die vier spezifische Aminosäurereste innerhalb eines Calcium-bindenden Motivs der Dockerin-Domäne maßgeblich verantwortlich sind (Mechaly *et al.*, 2000, 2001; Pagès *et al.*, 1997). Einflüsse dieser Spezifität können in der vorliegenden Arbeit jedoch als Auslöser für die ausgebliebene Interaktion der Domänen ausgeschlossen werden, da beide Module *C. cellulovorans* entstammten und keine Spezies-spezifischen Probleme in der Interaktion bestehen dürften. Neben der Spezies-Spezifität ist die Kohäsin-Dockerin-Interaktion auch von der Anwesenheit von Calcium abhängig. Bestimmte Aminosäurereste innerhalb duplizierter Sequenzen der Dockerine weisen Ähnlichkeiten zum Calcium-bindenden Loop von EF-Hand-Motiven auf und sind für die Calcium-Bindung verantwortlich, welche für die Interaktion beider Domänen miteinander notwendig ist (Bayer *et al.*, 2004; Chauvaux *et al.*, 1990; Craig *et al.*, 2006; Pagès *et al.*, 1997). Die Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators EDTA führt hingegen zur Dissoziation der Domänen voneinander (Beattie *et al.*, 1994; Craig *et al.*, 2006; Demain & Vaishnav, 2009). Die Addition von Calcium zum Kultivierungsmedium führte in den Experimenten ebenfalls zu keiner Detektion einer EstA-Volumenaktivität. In den verwendeten Medien und Pufferlösungen wurde ebenfalls kein EDTA verwendet, welches die Interaktion der Domänen durch das Chelatieren des Calciums verhindert hätte. Dies ließ darauf schließen, dass möglicherweise nicht die eigentliche Interaktion zwischen der Kohäsin- und Dockerin-Domäne ausblieb, sondern dass eine der beiden Interaktionskomponenten nicht oder in einer nicht funktionellen Form produziert wurde. Wegen der zuvor erfolgreich nachgewiesenen Zellwandverankerung der EstA über Cwp2p im pFB2-Vektor erschien es eher unwahrscheinlich, dass die Verankerung des Kohäsins über Cwp2p nicht funktionell war. Auch in anderen Studien konnte eine Immobilisierung einer Kohäsin-Domäne aus *C. thermocellum* mit Cwp2p ohne Beeinflussung der Proteinfaltung erfolgreich erzielt werden (Lilly *et al.*, 2009). Dies konnte jedoch nicht genauer überprüft werden, da kein spezifischer Antikörper gegen das verwendete Kohäsin erhältlich war und das Fusionskonstrukt über keine Tags verfügte, um potenzielle Einflüsse auf die Konformation und Prozessierung des verankerten Proteins zu vermeiden. Aufgrund der nicht nachweisbaren Enzymaktivität des Fusionsproteins aus EstA und Dockerin im Zellüberstand war es denkbar, dass dieses möglicherweise nicht sezerniert wurde und intrazellulär akkumulierte. Ein immunologischer Nachweis der Expression war nicht möglich, da keine kommerziell erhältlichen Antikörper gegen die EstA und Dockerin-Domäne verfügbar waren, was die Markierung einer der beiden Komponenten des Fusionskonstrukts mit einem Epitop-Tag erforderlich machte. Die Expressionsanalyse einer V5-getaggten „EstA-Dock“-Version sowie eines Fusionskonstrukts aus dem Reporterprotein yeGFP und der Dockerin Typ 1-Domäne mittels indirekter

Immunfluoreszenz und Western Blot erbrachte den Nachweis, dass die Konstrukte weder intra- noch extrazellulär detektierbar waren. Das Fusionskonstrukt aus yeGFP und Dockerin wurde außerdem im pFB2-Vektor exprimiert, um potenzielle Einschränkungen in der Expression des zuvor genutzten pYX242-Vektors auszuschließen. Demnach schien die ausgebliebene Expression des Fusionskonstrukts auf der Fusion mit der Dockerin-Domäne begründet zu sein. Ähnliche Erkenntnisse konnten ebenfalls während der Immobilisierung synthetischer Zellulosomen gemacht werden, bei welcher die Fusion der Dockerin-Domäne mit einer  $\beta$ -Glukosidase aus *S. fibuligera* zu signifikanten Verringerungen der Enzymaktivität führte. Es wurde vermutet, dass sich die Enzymstruktur durch die Fusion mit der Dockerin-Domäne aus *C. thermocellum* veränderte, was möglicherweise die Proteinfaltung und Zugänglichkeit des katalytischen Zentrums negativ beeinflussen konnte. Die Insertion natürlicher Linkersequenzen und die Steigerung der Proteinbiosynthese durch die Überexpression spezifischer Komponenten des sekretorischen Pathways führten wiederum zu einer Erhöhung der Sekretion und extrazellulären Enzymaktivität (Tang *et al.*, 2018). In Studien zur Immobilisierung eines aus mehreren Kohäsin-Domänen bestehenden chimären Gerüstproteins in *S. cerevisiae* konnte die Verankerung durch die Interaktion mit einem Fusionsprotein aus einer GFP-Variante und einer Dockerin-Domäne aus *C. thermocellum* nicht fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die verwendeten Hefen das Dockerin-Fusionsprotein nicht sekretierten, was die Interaktion mit der Kohäsin-Domäne des Gerüstproteins verhinderte. Der Interaktionsnachweis der Kohäsin-Domänen konnte dagegen erst nach Inkubation der entsprechenden Hefezellen mit einem in *E. coli* produzierten Dockerin-Fusionsprotein erfolgen (Huang *et al.*, 2014; Lilly *et al.*, 2009). Die Fusion der EstA mit der Dockerin-Domäne könnte somit zu einer veränderten Proteinprozessierung in *S. cerevisiae* geführt haben, die eine Degradation des Fusionsproteins bedingte und sowohl die Sekretion als auch die nachfolgende Interaktion mit der Kohäsin-Domäne in *S. cerevisiae* verhinderte.

Aus diesem Grund wurde das Fusionskonstrukt aus EstA und Dockerin-Domäne aufgrund des ausgebliebenen Nachweises in *S. cerevisiae* zur Expression in *E. coli* eingesetzt. Nach einer Affinitätsaufreinigung wurde das Fusionsprotein zu Interaktionsstudien mit *S. cerevisiae*-Zellen verwendet, welche die über Cwp2p verankerte Kohäsin-Domäne exprimierten und dadurch eine Immobilisierung der EstA ermöglichen sollten. Hierzu wurde das Fusionskonstrukt mithilfe des pET24a(+)-Vektors im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) exprimiert, wodurch es N-terminal mit einem T7-Tag modifiziert wurde. Dies machte die Aufreinigung über eine mit einem monoklonalen T7-Antikörper gekoppelte Säulenmatrix sowie den

immunologischen Nachweis mittels Western Blot möglich. Zusätzlich wurde die Expression und Aktivität der in *E. coli* produzierten EstA untersucht, um die Funktionalität des Enzyms unabhängig von Fusionspartnern nachzuweisen. Für beide Proteine konnten sowohl Signale im Western Blot als auch Absorptionzunahmen einer aufgereinigten Elutionsfraktion im fotometrischen Assay nach IPTG-Induktion detektiert werden, was auf eine erfolgreiche Produktion der EstA und des Fusionsproteins aus EstA und Dockerin-Domäne in einer funktionellen Form schließen ließ. Im Western Blot waren bereits schwächere Signale der EstA-Konstrukte für Bakterienzellen vor IPTG-Induktion ersichtlich, was mit einer basalen Leckexpression der T7-RNA-Polymerase über den im BL21 (DE3)-Expressionsstamm enthaltenen *lacUV5*-Promotor erklärt werden kann (Du *et al.*, 2021; Rosano & Ceccarelli, 2014; Studier & Moffatt, 1986). Für das Fusionskonstrukt aus EstA und Dockerin-Domäne war neben dem Signal des Fusionskonstrukts eine Bande mit niedrigerem Molekulargewicht detektierbar, die möglicherweise proteolytische Abbauprodukte darstellte. Die affinitätschromatografische Aufreinigung beider Konstrukte anhand des enthaltenen T7-Tags war ebenfalls erfolgreich und zeigte, dass in der zweiten Elutionsfraktion die größte Proteinmenge eluiert werden konnte, weshalb diese Fraktion auch zur weiteren Verwendung (Nachweis des Substratumsatzes und Interaktionsstudien mit Kohäsin exprimierenden Hefezellen) genutzt wurde. Die Elution mithilfe eines sauren Elutionspuffers (pH 2,2), dessen pH-Wert mithilfe eines Neutralisationspuffers auf ca. 6,9 neutralisiert wurde, besaß keinen nachteiligen Einfluss auf die Volumenaktivität der zellwandverankerten EstA in BY4742. Aus diesem Grund wurden keine pH-bedingten Auswirkungen auf die Aktivität der in *E. coli* produzierten EstA erwartet und die Proteinüberstände wurden zum Aktivitätsnachweis eingesetzt. Auch hier konnten analog zum Nachweis mittels Western Blot starke Substratumsätze für beide Proteinüberstände vor und nach IPTG-Induktion nachgewiesen werden, was die Funktionalität der EstA und des „EstA-Dock“-Fusionsproteins erfolgreich demonstrierte. Eine genaue Berechnung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay sowie spezifischer Enzymaktivitäten war nicht möglich, da das Citrat im Elutionspuffer als Chelator für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen fungierte und den proteinbasierten Farbnachweis verhinderte, was auch nicht durch den Wechsel des Puffermediums mithilfe von Zentrifugationseinheiten erreicht werden konnte. Zur Immobilisierung der EstA durch die Interaktion der Kohäsin- mit der Dockerin-Domäne wurde die Inkubation der Kohäsin exprimierenden Hefezellen mit dem aufgereinigten Fusionsprotein aus EstA und Dockerin durchgeführt. Für keine der untersuchten Konditionen konnte ein Substratumsatz fotometrisch detektiert werden. Um einen möglichen Einfluss des Kohäsin enthaltenden Fusionskonstrukts auszuschließen, wurde

---

ein zu Ito *et al.* (2009) identisches Fusionskonstrukt aus zwei Kohäsin-Domänen und einer ZZ-Domäne über das Aga1p-Aga2p-System in *S. cerevisiae* verankert und mit dem „EstA-Dock“-Fusionsprotein inkubiert, was jedoch auch zu keinem detektierbaren Substratumsatz führte. Der Unterschied zwischen den Fusionskonstrukten bestand lediglich im Zellwandankerprotein und in der Promotor-Terminator-Paarung, da bei Ito *et al.* (2009) Sag1p und der UPR-ICL-Promotor mit dem *SAG1*-Terminator verwendet wurden. Eine fehlende Expression des Fusionskonstrukts mittels Aga1p-Aga2p konnte hier jedoch ausgeschlossen werden, da die Expression anhand der enthaltenen ZZ-Domäne im weiteren Verlauf der Arbeit bestätigt werden konnte. Während der Aufreinigung des in *E. coli* hergestellten Fusionsproteins sowie der Inkubation mit den die Kohäsin-Modulen exprimierenden Hefezellen wurde zu keinem Zeitpunkt EDTA eingesetzt, welches mit der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Interaktion der beiden Domänen interferiert hätte. Somit schien die Expression des Fusionsproteins in *E. coli* zwar zu einer detektierbaren Aktivität der EstA zu führen, jedoch bestanden weiterhin Einschränkungen der Dockerin-Domäne in ihrer Funktionalität, was die Interaktion mit der Kohäsin-Domäne auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* verhinderte und deshalb weitere Optimierungen erforderlich macht. Dementsprechend konnte in dieser Arbeit eine Immobilisierung der EstA über die Kohäsin-Dockerin-Interaktion durch eine Koexpression der Komponenten in *S. cerevisiae* nicht nachgewiesen werden, was möglicherweise auf einer Degradation des „EstA-Dock“-Fusionsproteins beruhen könnte. Durch den Wechsel des Expressionswirts konnte zumindest die Expression und Aktivität des Fusionsproteins aus EstA und Dockerin in *E. coli* erreicht werden, jedoch wurde die Interaktion zwischen der Kohäsin- und Dockerin-Domäne weiterhin nicht ausgebildet.

Die Verankerung verschiedener Enzyme, die in die Reaktion des Zelluloseabbaus involviert sind, konnte über das Display von Minizellulosomen erfolgreich auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Dies wurde durch die Koexpression der Komponenten in *S. cerevisiae*, die Inkubation mit aufgereinigten Fusionsproteinen aus *E. coli* und die Kokultivierung mehrerer Hefestämme, die die notwendigen Komponenten exprimierten, erreicht (Fan *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2010). Zukünftige Experimente könnten als Alternative eine Expression der einzelnen Komponenten in unterschiedlichen Hefestämmen näher untersuchen, welche kokultiviert werden, um mögliche Einschränkungen einer gleichzeitigen Koexpression mehrerer Komponenten auf die einzelnen Fusionsproteine zu minimieren. Hierzu müsste jedoch zuerst eine Sekretion des Fusionsproteins aus EstA und Dockerin erreicht werden, was z. B. durch die Insertion von Linker-

sequenzen oder die Koexpression von ER-Komponenten möglich wäre, wodurch Effekte einer Fusion mit der Dockerin-Domäne auf die Prozessierung des Fusionsproteins näher beleuchtet werden könnten.

### **Zelloberflächenimmobilisierung durch ZZ-Fc-Interaktion**

Als zweites Verankerungssystem wurde ein auf der Interaktion zwischen einer ZZ-Domäne aus *S. aureus* und der Fc-Region von IgG-Antikörpern aus *H. sapiens* beruhendes System betrachtet. Es nutzt die Eigenschaften der synthetischen Z-Domäne, die einer IgG-Bindedomäne des Proteins A aus *S. aureus* nachempfunden wurde und eine Bindungsaffinität gegenüber den Fc-Regionen von IgG-Antikörpern aus variablen Spezies zeigt (Cedergren *et al.*, 1993; Nilsson *et al.*, 1987; Shibasaki *et al.*, 2007; Tashiro *et al.*, 1997). Die Wiederholung zweier identischer Z-Domänen („ZZ“) konnte bereits erfolgreich zur Immobilisierung von IgG-Antikörpern aus Serumproben, eGFP oder auch Enzymen, wie z. B. einer Lipase aus *R. oryzae* oder einer Endoglukanase aus *T. reesei*, über die Zellwandankerproteine Sag1p oder Flo1p eingesetzt werden (Fukuda *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2009; Katsurada *et al.*, 2021; Nakamura *et al.*, 2001; Shibasaki *et al.*, 2007; Shimojyo *et al.*, 2003).

Die Immobilisierung der EstA auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* sollte in dieser Arbeit durch die Koexpression zweier Fusionskonstrukte, welche entweder die ZZ-Domäne oder die Fc-Region des humanen IgG1-Antikörpers enthielten, erreicht werden. Hierzu wurde das bereits zum Nachweis der Kohäsin-Dockerin-Interaktion untersuchte Fusionskonstrukt nach Ito *et al.* (2009), welches aus den Kohäsin-Domänen 1 und 2 aus *C. cellulovorans* sowie der ZZ-Domäne aus *S. aureus* bestand und für *S. cerevisiae* kodonoptimiert wurde, mithilfe des Aga1p-Aga2p-Systems verankert. Die EstA wurde als Fusion mit der nach Shibasaki *et al.* (2006) und Ito *et al.* (2009) ausgewählten Fc-Region des humanen IgG1 eingesetzt, die aus den CH2- und CH3-Domänen inklusive „hinge“-Region bestand und für *S. cerevisiae* kodonoptimiert wurde. In den fotometrischen EstA-Assays konnten keine Enzymaktivitäten für die Kotransformanten und Kulturüberstände nachgewiesen werden, weshalb davon ausgegangen wurde, dass entweder die Interaktion der beiden Domänen ausblieb oder die beiden Fusionskonstrukte nicht bzw. nicht funktionell hergestellt wurden. Die Verankerung des Fusionskonstrukts mit ZZ-Domänen über das Aga1p-Aga2p-System konnte hingegen in *S. cerevisiae* erstmalig fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Die Detektion basierte auf den Eigenschaften der ZZ-Domäne, da das ursprüngliche Protein A Affinitäten gegenüber mehreren humanen



IgG-Klassen (IgG1, IgG2 und IgG4) sowie allen IgG-Klassen aus Hasen zeigt (Kronvall & Williams, 1969; Lind & Mansa, 1968; Nakamura *et al.*, 2001). Zur Detektion wurde entsprechend der Veröffentlichung von Ito *et al.* (2009) ein aus Hasen stammender primärer IgG-Antikörper eingesetzt, welcher mithilfe eines FITC-gekoppelten sekundären Antikörpers nachgewiesen wurde und eine funktionelle IgG-Bindung sowie die Zellwandverankerung der ZZ-Domäne bewies. Aufgrund des nicht nachweisbaren Substratumsatzes des sekretierten „EstA-Fc“-Fusionsproteins im Zellüberstand von *S. cerevisiae* wurde analog zur Expression des Dockerin-Domänen tragenden Fusionskonstrukts eine Expression in *E. coli* inklusive affinitätschromatografischer Aufreinigung anhand des T7-Tags durchgeführt. Hierbei konnte die Expression des Fusionsproteins im Western Blot erfolgreich nachgewiesen werden, jedoch war keine EstA-Aktivität im fotometrischen Assay detektierbar. Dies verhinderte auch den Nachweis einer Interaktion zwischen den Domänen nach Inkubation der Hefetransformanten mit den Proteinüberständen und ließ keine Aussage darüber zu, ob eine Interaktion der Domänen stattfinden konnte. Einen Einfluss des verwendeten Elutionspuffers auf die Enzymaktivität konnte bereits zuvor bei den Untersuchungen zur Kohäsin-Dockerin vermittelten Immobilisierung ausgeschlossen werden, weshalb die ausgebliebene Enzymaktivität möglicherweise durch die direkte Fusion der EstA mit der Fc-Region ohne dazwischen inserierte Linkersequenz negativ beeinflusst wurde. Hierzu könnten zukünftig entsprechende Experimente mit unterschiedlichen Linkersequenzen durchgeführt werden, um die Effekte einer direkten Fusion des Enzyms mit der Fc-Region ausschließen zu können. Zusätzlich wäre neben einer N-terminalen auch eine C-terminale Fusion der EstA mit der Fc-Region denkbar, da ein entsprechendes Fusionskonstrukt mit einer Lipase aus *R. oryzae* auch zu einer erfolgreichen Immobilisierung über die ZZ-Domäne führte und in den vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit für die C-terminale Fusion der EstA mit Aga2p eine Enzymaktivität detektierbar war (Shibasaki *et al.*, 2007). Außerdem konnte festgestellt werden, dass der sich während der Kultivierung ändernde pH-Wert einen Einfluss auf die Bindung zwischen der ZZ-Domäne und Fc-Region von IgG-Antikörpern besitzen kann (Shibasaki *et al.*, 2007). Dies könnte in Zukunft durch die Kultivierung der Hefezellen in einem pH-regulierten Bioreaktor näher untersucht werden, jedoch müsste zuvor erst eine Sekretion des Fusionsproteins aus EstA und Fc-Region in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Es kann festgehalten werden, dass eine Immobilisierung der EstA über Verankerungssysteme, die auf Protein-Protein-Interaktionen basieren, zwar nicht erreicht werden konnte, jedoch war der Nachweis der einzelnen Komponenten erfolgreich. Hierbei erwiesen sich sowohl das auf der Kohäsin-Dockerin- als auch ZZ-Fc-Interaktion basierende Verankerungssystem als

potenzielle Kandidaten für weitere Untersuchungen zur Enzymimmobilisierung. Nach zusätzlichen Optimierungsstudien zur Ausbildung der Interaktion der Domänen miteinander würde sich die Möglichkeit zur Verankerung weiterer Enzyme, wie z. B. Dehydrogenasen, eröffnen. Eine Strategie, bei welcher das Fusionsprotein aus EstA und Dockerin bzw. Fc-Region in *E. coli* produziert und nachträglich mit Hefezellen inkubiert wird, welche die Kohäsin- bzw. ZZ-Domäne exprimieren, erschien in den Experimenten vielsprechender als eine Koexpression der Komponenten in *S. cerevisiae* zu sein, da beide Fusionsproteine erfolgreich nachweisbar waren. Dennoch könnte sich die Koexpression der Interaktionspartner in Hefen ebenfalls als effizient und einfacher in der Handhabung erweisen, was jedoch von der erfolgreichen Sekretion des entsprechenden Fusionsproteins abhängt und möglicherweise durch eine Analyse von Linkersequenzen oder der Steigerung der Proteinbiosynthese erreicht werden könnte.

### **Expressionsanalyse bakterieller Dehydrogenasen auf der Zelloberfläche von Hefen**

Aufbauend auf den Erkenntnissen zur Oberflächenimmobilisierung der EstA aus *B. gladioli* in Hefezellen sollten Verankerungssysteme zur Immobilisierung bakterieller Dehydrogenasen etabliert und mittels spezifischer Aktivitätsassays nachgewiesen werden. Die verwendeten Dehydrogenasen unterscheiden sich im Vergleich zur EstA darin, dass sie zum Teil andere Konformationen besitzen und für den Substratumsatz auf die Nutzung von Kofaktoren angewiesen sind. Hierzu wurden die zwei NAD<sup>+</sup>-abhängigen Polyoldehydrogenasen SDH und MDH aus *R. sphaeroides* betrachtet, welche den Umsatz von D-Sorbitol (SDH) bzw. D-Mannitol zu D-Fruktose (MDH) katalysieren. Die Besonderheit der beiden Enzyme besteht darin, dass die MDH ein Monomer und die SDH ein Dimer darstellen, was die Untersuchung der Immobilisierung von Dehydrogenasen in Abhängigkeit ihrer Konformation ermöglicht hat (Schauder *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1993; Schneider & Giffhorn, 1989; Stein *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurden eine dimere Formiatdehydrogenase aus *R. jostii* (RjFDH) und eine dimere Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) aus *E. coli* untersucht, welche für den NAD<sup>+</sup>-abhängigen Umsatz von Formiat zu Kohlenstoffdioxid (RjFDH) bzw. den NADP<sup>+</sup>-abhängigen Umsatz von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phospho-D-Glukono-1,5-Lakton (G6PDH) verantwortlich sind (Boldt & Ansorge-Schumacher, 2020; Castillo *et al.*, 2008; Olavarría *et al.*, 2012; Schüürmann *et al.*, 2017). Eine funktionelle Immobilisierung der SDH und G6PDH konnte bisher nur mithilfe des Autodisplay-Systems in *E. coli* erreicht werden (Jose & von Schwichow, 2004; Schüürmann *et al.*, 2017). Die Analyse der Zelloberflächenimmobilisierung Kofaktor-abhängiger Dehydrogenasen sollte somit zum Verständnis der

---

Zellwandverankerung mono- und dimerer Dehydrogenasen in Hefezellen sowie zur weiterführenden Generierung von NADH-/NADPH-Regenerationssystemen beitragen, um eine kostengünstige Alternative zur Katalyse Kofaktor-abhängiger Reaktionen in industriellen Prozessen zu bieten. Ein entsprechendes Regenerationssystem konnte in der Vergangenheit nur für die hier untersuchte G6PDH mithilfe des Autodisplay-Systems in *E. coli* generiert werden, jedoch konnten bisher keine entsprechenden Systeme mit diesen Dehydrogenasen durch die Immobilisierung über Zellwandankerproteine in Hefen etabliert werden (Schüürmann *et al.*, 2017; Weckbecker *et al.*, 2010).

Die Expressionsanalyse der vier Dehydrogenasen wurde analog zur EstA-Expression durchgeführt und zu Beginn sollte die Immobilisierung der Enzyme durch N-terminale Fusionen mit den Zellwandankerproteinen Cwp2p, Sag1p und Sed1p erreicht werden. Jedoch konnte in keinem Fall ein entsprechender Substratumsatz fotometrisch detektiert werden, was auch nicht durch mehrfache Veränderungen der Expressionsbedingungen (Substrat-/Kofaktor-konzentration, Kultivierungstemperatur/-dauer oder Molarität des Reaktionspuffers) erreicht werden konnte. Ebenso blieben eine Expression der Fusionskonstrukte der SDH und MDH in *P. pastoris* sowie eine C-terminale Verankerung über Aga1p-Aga2p erfolglos. Die enzymatischen Assays wurden in der vorliegenden Arbeit anhand der Protokolle der entsprechenden Veröffentlichungen auf die Nutzung von Hefezellen angepasst. Ein Einfluss des pH-Werts auf die Enzymaktivität konnte nahezu ausgeschlossen werden, weil die Assays im Bereich des jeweiligen Aktivitätsoptimums des Enzyms (SDH und MDH bei pH 8-9; RjFDH bei pH 6-9; G6PDH bei pH 7-9) durchgeführt wurden (Banerjee & Fraenkel, 1972; Boldt & Ansorge-Schumacher, 2020; Schauder *et al.*, 1995; Schneider & Giffhorn, 1989; Schüürmann *et al.*, 2017). In den Publikationen wurde entweder das aufgereinigte Enzym aus dem zugehörigen Wirtsorganismus oder bakterielle Ganzzellbiokatalysatoren eingesetzt, weshalb die adaptierten Assays möglicherweise noch nicht für die Nutzung mit ganzen Hefezellen optimal gewesen sind, was die ausbleibenden Enzymaktivitäten erklären könnte. Jedoch konnte die Funktionalität des fotometrischen Nachweises in dieser Arbeit anhand der Reduktion des Kofaktors  $\text{NAD}^+$  zu NADH mithilfe einer aufgereinigten L-Laktatdehydrogenase bestätigt werden, weshalb die eigentliche Detektion des Kofaktorumsatzes korrekt erfolgen sollte. Möglich wäre auch, dass zwar Enzymaktivitäten auftraten, diese aber zu niedrig für eine fotometrische Detektion mithilfe des hier verwendeten Nachweises waren, weshalb zukünftig auch sensitivere Detektionsmethoden, wie z. B. die Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC), genutzt werden könnten. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Immobilisierung der Dehydrogenasen auf der Hefezelloberfläche nicht funktionell

war und Probleme in der Proteinprozessierung bestehen könnten, die zur Degradation bzw. Verankerung von fehlgefalteten Fusionsproteinen führten oder die Zugänglichkeit der Substrat- bzw. Kofaktorbindestellen einschränkten. Zudem war es denkbar, dass die Fusion der Enzyme mit einem Zellwandankerprotein auch zu sterischen Einschränkungen führte, was die Immobilisierung in der Zellwand erschweren bzw. behindern könnte. Eine intrazelluläre Akkumulation und ein dadurch gestörter Transport zur Zelloberfläche konnte hingegen mittels Coomassie-Färbung weitestgehend ausgeschlossen werden. Ein immunologischer Expressionsnachweis war nicht möglich, da keine spezifischen Antikörper für die untersuchten Dehydrogenasen verfügbar waren und die Konstrukte keine Epitop-Tags enthielten, um ungewünschte Effekte auf die Faltung, Konformation und Aktivität des Enzyms zu vermeiden. Zur genaueren Untersuchung wurden deshalb drei der vier zuvor für die EstA getesteten Ansätze der synthetischen Biologie zur Optimierung der Fusionsproteinexpression für die N-terminalen Fusionskonstrukte aus SDH bzw. MDH und den Zellwandankerproteinen Cwp2p bzw. Sed1p eingesetzt. Sowohl die Expression der Fusionskonstrukte in Deletionsmutanten Zellwand-assoziiierter Komponenten als auch die Insertion zweier Linkersequenzen zur Verringerung fusionsbedingter Einflüsse auf die Enzymkonformation ermöglichten keine Detektion einer Enzymaktivität. Dies bedeutet, dass die ausgebliebene Immobilisierung der Dehydrogenasen in der Zellwand wahrscheinlich nicht durch eine Behinderung durch andere Komponenten der Zellwand ausgelöst wurde und potenzielle sterische Einschränkungen zwischen Enzym und Ankerprotein durch die verwendeten Linkersequenzen nicht gelöst werden konnten. Ebenso führte die Erhöhung der Proteinbiosynthese durch die Koexpression des UPR-Aktivators Hac1p und der ER-Chaperone Ero1p, Kar2p und Pdi1p zu keiner nachweisbaren Enzymaktivität. Denkbar wäre, dass durch die UPR-Aktivierung eine verstärkte Degradation der fehlgefalteten Fusionsproteine ausgelöst wurde, was die Immobilisierung der Dehydrogenasen verhinderte. Im Vergleich mit der zuvor analysierten EstA könnten die Auslöser für die ausgebliebene Zellwandverankerung der vier Dehydrogenasen in den Unterschieden zwischen den Größen, Konformationen und der Komplexität der katalysierten Reaktionen begründet sein. Aufgrund der erstmaligen Nutzung der MDH, RjFDH und G6PDH zur Expression in Hefen wurden die bakteriellen Enzymsequenzen zur Erhöhung der Translationseffizienz auch auf die spezifische Kodonnutzung von *S. cerevisiae* angepasst, was jedoch keine funktionelle Expression ermöglichte. Während die MDH als Monomer vorliegt, stellen die weiteren Dehydrogenasen Homodimere dar. Außerdem weisen die SDH mit 256 AS, die RjFDH mit 400 AS, die MDH mit 476 AS und die G6PDH mit 491 AS auch deutliche Unterschiede in ihren Sequenzlängen

auf (Boldt & Ansorge-Schumacher, 2020; Rowley & Wolf, 1991; Schauder *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1993; Schüürmann *et al.*, 2017; Stein *et al.*, 1997). Im Vergleich mit der monomeren EstA aus *B. gladioli*, welche 351 AS umfasst und erfolgreich mithilfe der untersuchten Verankerungssysteme immobilisiert werden konnte, lässt sich keine direkte Korrelation zwischen den unterschiedlichen Enzymgrößen, der Konformation und dem Ausbleiben der Immobilisierung der Dehydrogenasen erkennen (Breinig *et al.*, 2006; Schlacher *et al.*, 1998). Auch eine Verankerung größerer Fusionsproteine, wie z. B. der extrazellulären Domäne eines Invasins aus *Yersinia pseudotuberculosis* (497 AS) oder einer Cholesteroxidase (540 AS), auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* war bereits über das Aga1p-Aga2p-System möglich (Doukyu *et al.*, 2009; Kenngott *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2020). Beim Vergleich der EstA und MDH fällt außerdem auf, dass beide zwar monomere Enzyme sind, aber Unterschiede in ihren Größen und im katalysierten Substratumsatz bestehen. Dies deutet darauf hin, dass neben der Größe und Konformation des Enzyms auch die Nutzung von Kofaktoren sowie die enzymatische Reaktion einen maßgeblichen Einfluss auf den Erfolg der Immobilisierung besitzen. Es konnten in der Vergangenheit zwei Cellobiosedehydrogenasen und eine Pyranosedehydrogenase, die monomere, FAD-abhängige Enzyme darstellen, mithilfe des Aga1p-Aga2p-Systems erfolgreich auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* immobilisiert werden (Blažić *et al.*, 2019; Gal *et al.*, 2016). Hierbei konnte für eine der beiden Cellobiosedehydrogenasen in ihrer wildtypischen Form keine Aktivität nach Immobilisierung festgestellt werden. Erst nach direkter Evolution des Proteins durch mehrfache Mutationen sowie einer Anpassung der Kultivierungsbedingungen war eine Enzymaktivität detektierbar (Blažić *et al.*, 2019). Darüber hinaus konnten weitere auf den Kofaktor FAD angewiesene Enzyme, wie z. B. eine Glukosedehydrogenase aus *Aspergillus oryzae* und eine Cholesteroxidase aus *Chromobacterium* sp. DS-1 mittels Aga1p-Aga2p immobilisiert werden, für die ebenfalls eine monomere Struktur angenommen wird (Adachi *et al.*, 2020; Komori *et al.*, 2015; Sygmund *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2020). Die Immobilisierungseffizienz der kodonoptimierten Enzymsequenzen konnte dort mithilfe von Linkersequenzen unterschiedlicher Längen und Zusammensetzungen weiter gesteigert werden (Zhao *et al.*, 2020). Es wird dadurch deutlich, dass eine Immobilisierung Kofaktor-abhängiger Enzyme auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* funktionell möglich ist, jedoch beeinflussen viele Faktoren den Erfolg der Enzymimmobilisierung maßgeblich, weshalb die optimalen Kombinationen der Komponenten (z. B. Vektoren, Signalsequenzen, Ankerproteine) zur Verankerung der hier betrachteten Dehydrogenasen eventuell noch nicht getestet wurden und weitere Untersuchungen erforderlich sind. Während die zuvor

beschriebenen Enzyme monomere Strukturen besaßen, konnte bisher nur die dimere, FAD-abhängige Glukoseoxidase (GOx) aus *A. niger* mithilfe des Aga1p-Aga2p- und eines Kohäsin-Dockerin-basierten Systems auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* verankert werden (Bahartan *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2020; Fishilevich *et al.*, 2009; Frederick *et al.*, 1990; Lopez-Morales *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2013). Ein direkter Vergleich mit den in dieser Arbeit betrachteten dimeren Dehydrogenasen ist nur bedingt möglich, da die GOx eine andere enzymatische Reaktion katalysiert und auf die Nutzung des Kofaktors FAD<sup>+</sup> statt NAD<sup>+</sup> angewiesen ist. Sie katalysiert eine zweistufige Reaktion, bei der Glukose oxidiert und FAD<sup>+</sup> zu einem FADH<sub>2</sub>-Intermediat reduziert wird, welches den direkten Elektronentransfer auf O<sub>2</sub> zur Generierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert. Dies ermöglicht eine Anwendung als Glukose-Biosensor, während eine Regeneration des Kofaktors jedoch erschwert wird (Bauer *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2013). Die hier betrachteten NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>-abhängigen Dehydrogenasen katalysieren dagegen eine einstufige Reaktion, nach der eine Regeneration der Kofaktoren NADH/NADPH potenziell möglich wäre, was jedoch durch die ausgebliebene Oberflächenimmobilisierung in *S. cerevisiae* und *P. pastoris* nicht erreicht werden konnte. Bei Betrachtung der zuvor erwähnten Veröffentlichungen fällt auf, dass eine Etablierung von Verankerungssystemen für FAD-abhängige Enzyme bisher erfolgreicher zu sein scheint. Denkbar wäre demnach, dass die unterschiedliche Kofaktornutzung und -bindung über die jeweiligen Bindestellen Auswirkungen auf die Immobilisierungseffizienzen zwischen den Enzymen besitzen könnten oder die Proteinprozessierung sowie Verankerung eines FAD-abhängigen Enzyms für Hefen leichter durchzuführen ist. Die Interaktion mit den Kofaktoren NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> über die entsprechenden Bindestellen könnte zudem bei den hier untersuchten Dehydrogenasen durch die Fusion mit den Ankerproteinen beeinträchtigt sein, was zu Problemen in der Proteinprozessierung oder funktionellen Assemblierung der Untereinheiten der dimeren Enzyme führen könnte, und eine frühzeitige Degradation der Fusionsproteine bedingt. Außerdem kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die N- und C-terminalen Ankerfusionen sterische Effekte auf die Kofaktorbindestelle und das aktive Zentrum der Enzyme besitzen, was die essenzielle Interaktion mit dem Kofaktor und/oder Substrat beeinflussen könnte. Es wäre denkbar, dass der Abstand zwischen Enzym und Ankerprotein trotz der Untersuchung unterschiedlicher Linkersequenzen nicht ausreicht und somit die Bindestellen nicht frei zugänglich sind, weshalb eine Immobilisierung erst durch die Nutzung größerer oder auch rigider Linker ermöglicht werden könnte.

Während der Durchführung dieser Arbeit konnte erstmalig ein Verankerungssystem zur Regeneration des Kofaktors NADH in Hefen beschrieben werden, das auf einer kodon-

optimierten Proteinfusion aus einer Glukosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*, einer Leucindehydrogenase aus *Exiguobacterium sibiricum* und Aga2p beruht (Deng *et al.*, 2024). Die Besonderheit dieses Systems besteht darin, dass die tetramere Glukosedehydrogenase auch einzeln erfolgreich in der Zellwand verankert werden konnte und einen Substratumsatz unter gleichzeitiger Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  katalysierte (Deng *et al.*, 2024; Yamamoto *et al.*, 2001). Durch die gleichzeitige Fusion mit der  $\text{NADH}$ -abhängigen Leucindehydrogenase wurden die Aktivitäten beider Enzyme gesteigert und ein duales System zur Produktion chiraler Aminosäuren und zur  $\text{NADH}$ -Regeneration konnte generiert werden (Deng *et al.*, 2024). Somit scheint eine Expression und Verankerung komplexerer,  $\text{NAD}^+$ -abhängiger Enzyme mithilfe des YSD in Hefen möglich zu sein. Jedoch sind die Unterschiede der betrachteten Enzyme untereinander sowie die vielfältigen Einflüsse durch die voneinander abweichenden Komponenten der einzelnen Expressionssysteme die wahrscheinlichen Auslöser des variablen Erfolgs der Immobilisierung unterschiedlicher Kofaktor-abhängiger Oxidoreduktasen in *S. cerevisiae*. Aufgrund der Komplexität des Aufbaus und der katalysierten Reaktion der Dehydrogenasen im Vergleich zu Kofaktor-unabhängigen Enzymen, wie der EstA aus *B. gladioli*, können erzielte Erkenntnisse über die verschiedenen Immobilisierungskomponenten nicht verallgemeinert angewendet werden, weshalb eine individuelle Analyse zur Zellwandverankerung unterschiedlicher Enzyme in Hefen durchgeführt werden muss. Außerdem können Effekte einer Ankerfusion auf die Struktur eines Enzyms mit mehreren Bindestellen nicht sicher vorhergesagt werden, was die Funktionalität eines immobilisierten Enzyms maßgeblich einschränken kann.

In dieser Arbeit konnte eine Verankerung der  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ -abhängigen Dehydrogenasen SDH, MDH, RjFDH und G6PDH mithilfe der analysierten Verankerungssysteme in Hefen nicht erreicht werden, was durch eine Vielzahl an Variablen begründet sein konnte, welche neben den Stellschrauben des YSD, wie z. B. der Promotor-Terminator-Kombination zur Genexpression, den Signalsequenzen oder Ankerproteinen, auch die strukturellen Eigenschaften der zu immobilisierenden Enzyme (Konformation, Komplexität und Kofaktor-/Substratbindestelle) umfassen. Zukünftig könnten mithilfe eines Northern Blots bzw. einer RT-PCR auch die mRNA-Level der untersuchten Fusionskonstrukte überprüft werden, um genauere Erkenntnisse darüber zu erhalten, ab welcher Stufe der Genexpression eine Beeinträchtigung der Fusionskonstrukte vorliegt. Alternativ könnte eine Verankerung der Dehydrogenasen über in *E. coli* exprimierte Fusionsproteine mit einer Dockerin- bzw. Fc-Domäne untersucht werden, die dann durch die Interaktion mit dem jeweiligen Interaktionspartner auf der Zelloberfläche von Hefen immobilisiert werden. Eine funktionelle

---

Immobilisierung der drei  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Alkohol-, Formaldehyd- und Formiatdehydrogenasen zur Methanoloxidation über Dockerin-Domänen konnte durch die anschließende Inkubation der bakteriellen Zellysate mit Hefezellen, die mehrere Kohäsin-Domänen über das Aga1p-Aga2p-System exprimierten, erreicht werden (Liu *et al.*, 2013). Die verwendeten Enzyme stellen Dimere und Tetramere dar, weshalb diese Strategie auch für eine Expression der hier untersuchten dimeren Dehydrogenasen vielversprechend erscheint (Ito *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Serov *et al.*, 2002; Sheehan *et al.*, 1988).



---

## 5. Ausblick

Die Immobilisierungseffizienz der bakteriellen EstA aus *B. gladioli* konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse unterschiedlicher Komponenten des YSD in *S. cerevisiae* erfolgreich gesteigert werden. Diese Optimierungen umfassten die Nutzung unterschiedlicher Zellwandankerproteine, Expressionsstämme oder auch Promotor-Terminator-Kombinationen zur Transkriptionsregulation. Durch die teils drastische Variabilität in den Auswirkungen der einzelnen Bestandteile auf die Immobilisierungseffizienz der EstA ergeben sich hier viele Möglichkeiten zur Untersuchung weiterer Komponenten. Neben der Analyse weiterer GPI-verankerter Zellwandankerproteine (z. B. Ccw12p, Ccw14p) wäre auch eine erstmalige Nutzung von GPI-unabhängigen Pir-Proteinen vorstellbar. Darüber hinaus wäre eine vergleichende Analyse verschiedener Signalsequenzen zum ER-Import ein weiterer Ansatzpunkt zur Steigerung der EstA-Immobilisierung. Aufgrund der hier detektierten Unterschiede zwischen verschiedenen Promotor-Terminator-Kombinationen zur Expression der Fusionskonstrukte würde sich zukünftig auch die Erweiterung dieser Erkenntnisse durch die Nutzung zusätzlicher Paarungen mit konstitutiven und induzierbaren Promotoren anbieten. Zudem wäre eine Kombination mit Centromer- oder Integrationsvektoren denkbar, was auch eine Untersuchung von Effekten der vektorialen Kopienzahl auf die Immobilisierungseffizienz der EstA ermöglichen würde. Die Zellwandzusammensetzung des zur Expression genutzten *S. cerevisiae*-Stamms war ebenfalls ein maßgeblicher Faktor für den Erfolg des YSD, weshalb ein Fokus auf die Einflüsse unterschiedlicher Mengen an Zellwandbestandteilen auf die Immobilisierung in entsprechenden Stämmen gelegt werden könnte, um gegebenenfalls Verbindungen zwischen der Verankerungskapazität von Hefezellwänden und dem Chitingehalt zu identifizieren. Teile der in dieser Arbeit genutzten Optimierungsstrategien aus dem Bereich der synthetischen Biologie könnten durch die Nutzung zusätzlicher Ansätze erweitert werden und wären zukünftig auch für eine Expression der Fusionskonstrukte in *P. pastoris* und die C-terminale EstA-Immobilisierung anwendbar. Beispielsweise könnten die Einflüsse weiterer deletierter Zellwandkomponenten auf die Verankerungseffizienz durch den gezielten Knockout mehrerer Zellwand-assoziiierter Gene (z. B. Ccw12p, Ccw14p) näher beleuchtet werden. Außerdem könnte eine über die Koexpression weiterer ER-Chaperone oder Komponenten des vesikulären Golgi-Transports gesteigerte Proteinbiosynthese zu einer Erhöhung der Immobilisierungseffizienz der EstA beitragen. Nach einer neueren Studie könnte eine Überexpression von Genen, die in die Polarisation der Hefezellen involviert sind, auch zur Erhöhung der EstA-Immobilisierung genutzt werden (Yang *et al.*, 2022).

---

Für die Immobilisierung der EstA mithilfe von Verankerungssystemen, die auf der Protein-Protein-Interaktion zwischen Kohäsin- und Dockerin-Domänen bzw. der ZZ-Domäne und der Fc-Region von IgG-Antikörpern beruhen, konnte die Expression der einzelnen Komponenten in *S. cerevisiae* und *E. coli* zwar nachgewiesen werden, jedoch blieb die Interaktion der Domänen zur Verankerung aus. Zum Nachweis der Expression der Fusionskonstrukte aus Enzym und Dockerin bzw. Fc-Region in *S. cerevisiae* sollten zukünftig verschiedene Linkersequenzen inseriert werden, um fusionsbedingte Einschränkungen in der Sekretion und Aktivität zu minimieren. Außerdem würde das Einbringen von Tags in die Fusionskonstrukte eine Möglichkeit zum Expressionsnachweis der Fusionsproteine bieten. Eine Analyse unterschiedlicher Expressionsbedingungen könnte zur Ausbildung der Bindung zwischen den Interaktionspartnern beitragen und damit die EstA-Immobilisierung ermöglichen.

Zur Etablierung von Systemen für die Immobilisierung NAD<sup>+</sup>-/NADP<sup>+</sup>-abhängiger Dehydrogenasen auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* sollte zukünftig untersucht werden, weshalb die Expression der Fusionsproteine ausblieb. Hierzu würden sich eine genauere Analyse des mRNA-Gehalts in den Hefezellen mithilfe von Northern Blots und die Markierung der Fusionsproteine mit Tags zum immunologischen Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot anbieten, um genauere Informationen über die beeinträchtigten Schritte der Expression bzw. die Lokalisation der fehlgefalteten Proteine zu erhalten. Zur Herstellung von NADH-/NADPH-Regenerationssystemen in *S. cerevisiae* könnte die Verankerung der Dehydrogenasen zukünftig auch über die Interaktion von Kohäsin- mit Dockerin-Domänen bzw. der ZZ-Domäne mit der Fc-Region erfolgen, wozu das Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und anschließend mit Hefezellen zur Herstellung der Interaktion inkubiert wird.

Weiterführend könnten mithilfe des YSD auch auf komplexeren Interaktionen aufbauende Verankerungssysteme zur EstA-Immobilisierung entworfen werden. Beispielsweise würde sich eine durch Biotinylierung vermittelte Interaktion anbieten, bei der das Streptavidin und Avi-Tag entweder in der Zellwand verankert oder mit der EstA fusioniert werden. Die Biotinylierung des Avi-Tags könnte durch eine koexprimierte Biotinligase katalysiert werden und eine Enzymimmobilisierung ermöglichen. Darüber hinaus wurden bereits Systeme zur Verankerung von Nanopartikeln entworfen, die weitere Anwendungsmöglichkeiten, wie z. B. das „Delivery“ von biologisch aktiven Wirkstoffen, bieten könnten (Kajiwara *et al.*, 2020, 2021; Kiefer *et al.*, 2020).

## 6. Zusammenfassung

Das „Yeast Surface Display“ bietet die Möglichkeit verschiedenste Proteinklassen mit unterschiedlichen Eigenschaften auf der Oberfläche von Hefen mithilfe von Zellwandankerproteinen zu immobilisieren. Aufgrund ihrer eukaryotischen Eigenschaften besitzen hefebasierte Ganzzellbiokatalysatoren breitgefächerte Anwendungsoptionen als aussichtsreiche Expressionssysteme in biotechnologischen oder pharmazeutischen Forschungsgebieten.

Zur Optimierung der Zelloberflächenimmobilisierung einer bakteriellen EstA aus *Burkholderia gladioli* in *Saccharomyces cerevisiae* wurden in dieser Arbeit verschiedene Parameter der eingesetzten Verankerungssysteme variiert und mit mehreren Optimierungsansätzen aus dem Bereich der synthetischen Biologie kombiniert. Für die N-terminale Verankerung der EstA erwiesen sich die Zellwandanker Cwp2p und Sed1p am effektivsten, während eine C-terminale Immobilisierung erstmalig mithilfe des Aga1p-Aga2p-Systems erreicht werden konnte. Durch die Expression der N-terminalen Fusionskonstrukte in mehreren *S. cerevisiae*-Stämmen konnte eine Stamm-abhängige Erhöhung der Volumenaktivitäten im S86c-Stamm identifiziert werden, welche wahrscheinlich auf einer variablen Verankerungskapazität der Stämme aufgrund ihrer unterschiedlichen Zellwandzusammensetzung beruhte. Darüber hinaus konnten auch Abweichungen in den Verankerungseffizienzen der Ankerproteine im Vergleich mit anderen Hefegattungen, wie z. B. *Pichia pastoris*, beobachtet werden, welche stark von den Expressionsbedingungen abhingen. Mithilfe der Expression der Fusionskonstrukte in *S. cerevisiae*-Stämmen, welche Deletionen in Zellwand-assoziierten Genen besaßen, sollte die Verankerungskapazität der Zellwand erhöht und die Immobilisierungseffizienz der EstA gesteigert werden. Durch die Insertion von flexiblen Linkersequenzen zwischen EstA und Ankerprotein wurde der Abstand der Fusionspartner erhöht, um potenzielle sterische Einschränkungen zu verringern und die Substratzugänglichkeit des Enzyms zu verbessern. Beeinträchtigungen der Prozessierung und Faltung der Fusionsproteine wurden durch eine Koexpression des UPR-Regulatorproteins Hac1p sowie der Chaperone Ero1p, Kar2p und Pdi1p untersucht. Hierbei konnte durch den Einsatz dieser Optimierungsstrategien keine Erhöhung der EstA-Immobilisierung erzielt werden, jedoch können sich die Ansätze als nützlich für eine Steigerung der Zellwandverankerung anderer Enzyme erweisen. Die EstA-Immobilisierungseffizienz konnte hingegen durch die Analyse einer über unterschiedliche Kombinationen aus Promotoren und Terminatoren regulierten Genexpression maßgeblich erhöht werden, was für die Expression der über Cwp2p verankerten EstA im S86c-Stamm unter der transkriptionellen Kontrolle des

*CCW12*-Promotors und *TDH1*-Terminators erreicht werden konnte. Die deutlichen Unterschiede zwischen verschiedenen Kombinationen aus Promotoren und Terminatoren stellten somit einen weiteren essenziellen Faktor für die Zellwandverankerung von Enzymen dar, welcher zu Variationen in den Immobilisierungseffizienzen verschiedener Enzyme führen kann.

Neben der Verankerung der EstA über die direkte Fusion mit einem Ankerprotein wurde auch die Immobilisierung mithilfe von zwei Systemen, die auf spezifischen Protein-Protein-Interaktionen basieren, näher untersucht. Das sekretierte Fusionsprotein, bestehend aus EstA und einer Dockerin-Domäne aus *Clostridium cellulovorans* bzw. einer Fc-Region aus *Homo sapiens*, konnte nach Koexpression der Komponenten über die Interaktion mit der zellwandverankerten Kohäsin- aus *C. cellulovorans* bzw. ZZ-Domäne aus *Staphylococcus aureus* nicht erfolgreich auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* immobilisiert werden. Die Detektion der Expression der zellwandverankerten Domänen war erfolgreich, jedoch konnten die sekretierten Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie, Western Blot und Aktivitätsassays in *S. cerevisiae* nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden die Fusionskonstrukte zur Expression in *Escherichia coli* eingesetzt, die Fusionsproteine erfolgreich affinitätschromatografisch aufgereinigt und anschließend mit Hefezellen inkubiert. Eine Interaktion konnte jedoch anhand einer enzymatischen Aktivität nicht bestätigt werden. Somit war der Expressionsnachweis der einzelnen Komponenten zwar erfolgreich, eine Immobilisierung der EstA auf der Hefezelloberfläche wurde mit den beiden betrachteten Systemen nicht final erreicht.

Basierend auf den für die EstA erzielten Erkenntnissen sollten Immobilisierungssysteme für die Verankerung von vier Kofaktor-abhängigen Dehydrogenasen etabliert werden, welche zusätzlich eine Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Enzymkonformationen auf die Immobilisierungseffizienzen ermöglichen sollten. Die monomere Mannitol- (MDH) und dimere Sorbitoldehydrogenase (SDH) aus *Rhodobacter sphaeroides*, sowie die dimere Formiatdehydrogenase RjFDH aus *Rhodococcus jostii* und die dimere Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) aus *E. coli* konnten mithilfe der Zellwandanker Cwp2p, Sed1p und Sag1p nicht erfolgreich auf der Hefezelloberfläche verankert werden. Die Expression der Fusionskonstrukte aus SDH bzw. MDH und den Zellwandankerproteinen konnte darüber hinaus auch nicht durch die Expression der Fusionskonstrukte in Deletionsmutanten Zellwand-assoziiertes Gene, durch die Insertion von Linkersequenzen oder die Koexpression von Komponenten des sekretorischen Wegs ermöglicht werden. Rückschlüsse auf unterschiedliche Immobilisierungseffizienzen von mono- und dimeren Enzymen konnten

---

somit nicht gezogen werden und auch die Etablierung von Systemen zur Regeneration der Kofaktoren NADH/NADPH war nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit konnten somit neue Erkenntnisse über die Zellwandverankerung unterschiedlicher Enzyme in Hefen gewonnen, bestehende Verankerungssysteme erweitert und die Immobilisierungseffizienz von EstA-Fusionsproteinen erfolgreich gesteigert werden. Die Verankerungseffizienz war hierbei von einer Vielzahl an Komponenten des jeweiligen Expressionssystems abhängig, deren Einflüsse zwischen verschiedenen Enzymen variieren können, was demzufolge eine individuelle Analyse für jedes Zielprotein erforderlich macht.

---

## 7. Literaturverzeichnis

- Abe H., Shimma Y. I., & Jigami Y. (2003).** *In vitro* oligosaccharide synthesis using intact yeast cells that display glycosyltransferases at the cell surface through cell wall-anchored protein Pir. *Glycobiology*, 13(2), 87–95.
- Adachi T., Fujii T., Honda M., Kitazumi Y., Shirai O., & Kano K. (2020).** Direct electron transfer-type bioelectrocatalysis of FAD-dependent glucose dehydrogenase using porous gold electrodes and enzymatically implanted platinum nanoclusters. *Bioelectrochemistry*, 133, 107457.
- Adams J. J., Pal G., Jia Z., & Smith S. P. (2006).** Mechanism of bacterial cell-surface attachment revealed by the structure of cellulosomal type II cohesin-dockerin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), 305.
- Alzari P. M., Souchon H., & Dominguez R. (1996).** The crystal structure of endoglucanase CelA, a family 8 glycosyl hydrolase from *Clostridium thermocellum*. *Structure*, 4(3), 265–275.
- Amet N., Lee H. F., & Shen W. C. (2009).** Insertion of the designed helical linker led to increased expression of tf-based fusion proteins. *Pharmaceutical Research*, 26(3), 523–528.
- Anandharaj M., Lin Y. J., Rani R. P., Nadendla E. K., Ho M. C., Huang C. C., et al. (2020).** Constructing a yeast to express the largest cellulosome complex on the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(5), 2385–2394.
- Anasontzis G. E., Penã M. S., Spadiut O., Brumer H., & Olsson L. (2014).** Effects of temperature and glycerol and methanol-feeding profiles on the production of recombinant galactose oxidase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 30(3), 728–735.
- Andrés I., Gallardo O., Parascandola P., Pastor F. I. J., & Zueco J. (2005).** Use of the cell wall protein Pir4 as a fusion partner for the expression of *Bacillus* sp. BP-7 xylanase A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(6), 690–697.
- Andrés I., Rodríguez-Díaz J., Buesa J., & Zueco J. (2006).** Yeast expression of the VP8\* fragment of the rotavirus spike protein and its use as immunogen in mice. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(1), 89–98.

- 
- Andreu C., & Lí del Olmo M. (2018).** Yeast arming systems: pros and cons of different protein anchors and other elements required for display. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2543–2561.
- Anwar M. I., Muhammad F., Awais M. M., & Akhtar M. (2017).** A review of  $\beta$ -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 73(3), 651–661.
- Apel A. R., D'Espaux L., Wehrs M., Sachs D., Li R. A., Tong G. J., et al. (2017).** A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 45(1), 496–508.
- Argos P. (1990).** An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *Journal of Molecular Biology*, 211(4), 943–958.
- Armstrong J., Brown R. S., & Tsugita A. (1983).** Primary structure and genetic organization of phage T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Research*, 11(20), 7145–56.
- Arnthong J., Ponjarat J., Bussadee P., Deenarn P., Prommana P., Phienluphon A., et al. (2022).** Enhanced surface display efficiency of  $\beta$ -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of cell wall protein-encoding genes *YGP1* and *CWP2*. *Biochemical Engineering Journal*, 179, 108305.
- Bachmann M. F., & Jennings G. T. (2010).** Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology* 2010 10:11, 10(11), 787–796.
- Baghban R., Farajnia S., Rajabibazl M., Ghasemi Y., Mafi A. A., Hoseinpoor R., et al. (2019).** Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Molecular Biotechnology*, 61(5), 365–384.
- Bahartan K., Amir L., Israel A., Lichtenstein R. G., & Alfonta L. (2012).** *In Situ* fuel processing in a microbial fuel cell. *ChemSusChem*, 5(9), 1820–1825.
- Bai C., Xu X. L., Chan F. Y., Lee R. T. H., & Wang Y. (2006).** *MNN5* Encodes an Iron-Regulated  $\alpha$ -1,2-Mannosyltransferase Important for Protein Glycosylation, Cell Wall Integrity, Morphogenesis, and Virulence in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 5(2), 238.
- Bai Y., & Shen W. C. (2006).** Improving the oral efficacy of recombinant granulocyte colony-stimulating factor and transferrin fusion protein by spacer optimization. *Pharmaceutical Research*, 23(9), 2116–2121.

- Bamba T., Inokuma K., Hasunuma T., & Kondo A. (2018).** Enhanced cell-surface display of a heterologous protein using *SEDI* anchoring system in *SEDI*-disrupted *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(3), 306–310.
- Banerjee S., & Fraenkel D. G. (1972).** Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* and from a “high-level” mutant. *Journal of Bacteriology*, 110(1), 155–160.
- Barbas C. F., Kang A. S., Lerner R. A., & Benkovic S. J. (1991).** Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 7978–7982.
- Barber R. D., & Donohue T. J. (1998).** Function of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides* formaldehyde oxidation and assimilation. *Biochemistry*, 37(2), 530–537.
- Bass S., Greene R., & Wells J. A. (1990).** Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins*, 8(4), 309–314.
- Bauer J. A., Zámocká M., Majtán J., & Bauerová-Hlinková V. (2022).** Glucose Oxidase, an Enzyme “Ferrari”: Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications. *Biomolecules*, 12(3), 1–25.
- Bayer E. A., Bélaïch J. P., Shoham Y., & Lamed R. (2004).** The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, 58, 521–554.
- Bazan S. B. (2011).** Comparative Study of Using Different Yeast Genera as Vehicles for Protein Delivery to Antigen-Presenting Cells. *Dissertation*, Universität des Saarlandes.
- Bazan S. B., Breinig T., Schmitt M. J., & Breinig F. (2014).** Heat treatment improves antigen-specific T cell activation after protein delivery by several but not all yeast genera. *Vaccine*, 32(22), 2591–2598.
- Beattie L., Mahalingeswara Bhat K., & Wood T. M. (1994).** The effect of cations on reassociation of the components of the cellulosome cellulase complex synthesized by the bacterium *Clostridium thermocellum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(5), 740–744.
- Benner S. A. (2003).** Synthetic biology: Act natural. *Nature*, 421(6919), 118.
- Benner S. A., & Sismour A. M. (2005).** Synthetic biology. *Nature Reviews Genetics*, 6(7), 533–543.



- Bernardy G. (2006).** Herstellung von Polyepitopkassetten zur Etablierung einer Hefe-basierten Impfstrategie. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes.
- Bielen A., Teparić R., Vujaklija D., & Mrša V. (2014).** Microbial Anchoring Systems for Cell-Surface Display of Lipolytic Enzymes. *Food Technology and Biotechnology*, 52(1), 16–34.
- Bird R. E., Hardman K. D., Jacobson J. W., Johnson S., Kaufman B. M., Lee S. M., et al. (1988).** Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242(4877), 423–426.
- Birnboim H. C., & Doly J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
- Blažić M., Balaž A. M., Prodanović O., Popović N., Ostafe R., Fischer R., et al. (2019).** Directed Evolution of Cellobiose Dehydrogenase on the Surface of Yeast Cells Using Resazurin-Based Fluorescent Assay. *Applied Sciences*, 9(7), 1413.
- Boder E. T., & Wittrup K. D. (1997).** Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology*, 15(6), 553–557.
- Boldt A., & Ansorge-Schumacher M. B. (2020).** Formate Dehydrogenase from *Rhodococcus jostii* (RjFDH) – A High-Performance Tool for NADH Regeneration. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 362(19), 4109–4118.
- Bony M., Thines-Sempoux D., Barre P., & Blondin B. (1997).** Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *Journal of Bacteriology*, 179(15), 4929.
- Boone C., Sommer S. S., Hensel A., & Bussey H. (1990).** Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall  $\beta$ -glucan assembly. *Journal of Cell Biology*, 110(5), 1833–1843.
- Bordes F., Barbe S., Escalier P., Mourey L., André I., Marty A., et al. (2010).** Exploring the Conformational States and Rearrangements of *Yarrowia lipolytica* Lipase. *Biophysical Journal*, 99(7), 2225–2234.
- Bornscheuer U. T. (2002).** Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), 73–81.
- Bowen S., & Wheals A. E. (2004).** Incorporation of Sed1p into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* involves *KRE6*. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 731–735.
- Brady J. R., Whittaker C. A., Tan M. C., Kristensen D. L., Ma D., Dalvie N. C., et al. (2020).** Comparative genome-scale analysis of *Pichia pastoris* variants informs selection of an optimal base strain. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(2), 543–555.

- Breinig F., Diehl B., Rau S., Zimmer C., Schwab H., & Schmitt M. J. (2006).** Cell Surface Expression of Bacterial Esterase A by *Saccharomyces cerevisiae* and Its Enhancement by Constitutive Activation of the Cellular Unfolded Protein Response. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7140.
- Breinig F., Schleinkofer K., & Schmitt M. J. (2004).** Yeast Kre1p is GPI-anchored and involved in both cell wall assembly and architecture. *Microbiology*, 150(10), 3209–3218.
- Breinig F., & Schmitt M. J. (2002).** Spacer-elongated cell wall fusion proteins improve cell surface expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), 637–644.
- Breinig F., Tipper D. J., & Schmitt M. J. (2002).** Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell*, 108(3), 395–405.
- Brown R. E., Jarvis K. L., & Hyland K. J. (1989).** Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry*, 180(1), 136–139.
- Brune K. D., Leneghan D. B., Brian I. J., Ishizuka A. S., Bachmann M. F., Draper S. J., et al. (2016).** Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Scientific Reports*, 6.
- Bucarey S. A., Noriega J., Reyes P., Tapia C., Sáenz L., Zuñiga A., et al. (2009).** The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine*, 27(42), 5781–5790.
- Burnette W. N. (1981).** “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203.
- Butz J. A., Niebauer R. T., & Robinson A. S. (2003).** Co-expression of molecular chaperones does not improve the heterologous expression of mammalian G-protein coupled receptor expression in yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(3), 292–304.
- Calvin N. M., & Hanawalt P. C. (1988).** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *Journal of Bacteriology*, 170(6), 2796–2801.
- Cappellaro C., Baldermann C., Rachel R., & Tanner W. (1994).** Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of  $\alpha$ - and  $\alpha$ -agglutinin. *The EMBO Journal*, 13(20), 4737.

- Cappellaro C., Hauser K., Mrsa V., Watzele M., Watzele G., Gruber C., et al. (1991).** *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ - and  $\alpha$ -agglutinin: characterization of their molecular interaction. *The EMBO Journal*, 10(13), 4081–4088.
- Cappellaro C., Mrsa V., & Tanner W. (1998).** New Potential Cell Wall Glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Involvement in Mating. *Journal of Bacteriology*, 180(19), 5030.
- Caras I. W., Weddell G. N., Davitz M. A., Nussenzweig V., & Martin D. W. (1987).** Signal for attachment of a phospholipid membrane anchor in decay accelerating factor. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4831), 1280–1283.
- Caro L. H. P., Smits G. J., Egmond P., Chapman J. W., & Klis F. M. (1998).** Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. *FEMS Microbiology Letters*, 161(2), 345–349.
- Carvalho A. L., Dias F. M. V., Prates J. A. M., Nagy T., Gilbert H. J., Davies G. J., et al. (2003).** Cellulosome assembly revealed by the crystal structure of the cohesin-dockerin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 13809–13814.
- Castillo L., Martinez A. I., Garcerá A., Elorza M. V., Valentín E., & Sentandreu R. (2003).** Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall  $\beta$ -1,3-glucan. *Yeast*, 20, 973–983.
- Castillo R., Oliva M., Martí S., & Moliner V. (2008).** A theoretical study of the catalytic mechanism of formate dehydrogenase. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(32), 10013–10022.
- Castillon G. A., Watanabe R., Taylor M., Schwabe T. M. E., & Riezman H. (2009).** Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic*, 10(2), 186–200.
- Cedergren L., Andersson R., Jansson B., Uhlén M., & Nilsson B. (1993).** Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. *Protein Engineering*, 6(4), 441–448.
- Cereghino J. L., & Cregg J. M. (2000).** Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66.
- Cereghino J. L., Wong W. W., Xiong S., Giang W., Luong L. T., Vu J., et al. (2005).** Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BioTechniques*, 38(1), 44.

- Chapman R., Sidrauski C., & Walter P. (1998).** Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, 459–485.
- Charbit A., Boulain J. C., Ryter A., & Hofnung M. (1986).** Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface. *The EMBO Journal*, 5(11), 3029–3037.
- Chauvaux S., Beguin P., Aubert J. P., Bhat K. M., Gow L. A., Wood T. M., et al. (1990).** Calcium-binding affinity and calcium-enhanced activity of *Clostridium thermocellum* endoglucanase D. *The Biochemical Journal*, 265(1), 261–265.
- Chen J., Zhou J., Sanders C. K., Nolan J. P., & Cai H. (2009).** A surface display yeast two-hybrid screening system for high-throughput protein interactome mapping. *Analytical Biochemistry*, 390(1), 29–37.
- Chen M.-H., Shen Z.-M., Bobin S., Kahn P. C., & Lipke P. N. (1995).** Structure of *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -Agglutinin. *Journal of Biological Chemistry*, 270(44), 26168–26177.
- Chen M. L., Guo Q., Wang R. Z., Xu J., Zhou C. W., Ruan H., et al. (2011).** Construction of the yeast whole-cell *Rhizopus oryzae* lipase biocatalyst with high activity. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 12(7), 545–551.
- Chen N., Yang S., You D., Shen J., Ruan B., Wu M., et al. (2023).** Systematic genetic modifications of cell wall biosynthesis enhanced the secretion and surface-display of polysaccharide degrading enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 77, 273–282.
- Chen X., Zaro J. L., & Shen W. C. (2013).** Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(10), 1357–1369.
- Cheng C., & Shuman S. (2000).** DNA strand transfer catalyzed by vaccinia topoisomerase: ligation of DNAs containing a 3' mononucleotide overhang. *Nucleic Acids Research*, 28(9), 1893–8.
- Chial H. J., & Splittgerber A. G. (1993).** A Comparison of the Binding of Coomassie Brilliant Blue to Proteins at Low and Neutral pH. *Analytical Biochemistry*, 213(2), 362–369.
- Choi S. K., & Ljungdahl L. G. (1996).** Structural role of calcium for the organization of the cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Biochemistry*, 35(15), 4906–4910.

- Clark J. M. (1988).** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 16(20), 9677–9686.
- Cohen R. E., Ballou L., & Ballou C. E. (1980).** *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein mutants. Isolation of the *mnn5* mutant and comparison with the *mnn3* strain. *Journal of Biological Chemistry*, 255(16), 7700–7707.
- Cooper A., & Bussey H. (1989).** Characterization of the yeast *KEX1* gene product: a carboxypeptidase involved in processing secreted precursor proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 9(6), 2706–2714.
- Cox J. S., Shamu C. E., & Walter P. (1993).** Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, 73(6), 1197–1206.
- Cox J. S., & Walter P. (1996).** A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, 87(3), 391–404.
- Craig S. J., Foong F. C., & Nordon R. (2006).** Engineered proteins containing the cohesin and dockerin domains from *Clostridium thermocellum* provides a reversible, high affinity interaction for biotechnology applications. *Journal of Biotechnology*, 121(2), 165–173.
- Cregg J. M., Cereghino J. L., Shi J., & Higgins D. R. (2000).** Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16(1), 23–52.
- Cregg J. M., Madden K. R., Barringer K. J., Thill G. P., & Stillman C. A. (1989).** Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 9(3), 1316–1323.
- Cregg J. M., & Russell K. A. (1998).** Transformation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 103, 27–39.
- Curran K. A., Karim A. S., Gupta A., & Alper H. S. (2013).** Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications. *Metabolic Engineering*, 19, 88–97.
- Curran K. A., Morse N. J., Markham K. A., Wagman A. M., Gupta A., & Alper H. S. (2015).** Short Synthetic Terminators for Improved Heterologous Gene Expression in Yeast. *ACS Synthetic Biology*, 4(7), 824–832.

- Da Silva N. A., & Srikrishnan S. (2012).** Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 12(2), 197–214.
- Daegelen P., Studier F. W., Lenski R. E., Cure S., & Kim J. F. (2009).** Tracing Ancestors and Relatives of *Escherichia coli* B, and the Derivation of B Strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 634–643.
- De Gregorio E., & Rappuoli R. (2014).** From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nature Reviews Immunology* 2014 14:7, 14(7), 505–514.
- De Groot P. W. J., Hellingwerf K. J., & Klis F. M. (2003).** Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast (Chichester, England)*, 20(9), 781–796.
- De Nobel H., Pike J., Lipke P. N., & Kurjan J. (1995).** Genetics of a-agglutinin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics*, 247(4), 409–415.
- De Nobel J. G., Klis F. M., Priem J., Munnik T., & Van Den Ende H. (1990).** The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 6(6), 491–499.
- Deisenhofer J. (1981).** Crystallographic Refinement and Atomic Models of a Human Fc Fragment and Its Complex with Fragment B of Protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å Resolution. *Biochemistry*, 20(9), 2361–2370.
- Demain A. L., & Vaishnav P. (2009).** Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306.
- Deng J., Yu Z., Huang X., Xiong W., & Jing K. (2024).** Construction novel yeast surface-displaying glucose-leucine dehydrogenase fusions for cofactor recycling and chiral amino acid biosynthesis. *Biochemical Engineering Journal*, 203, 109193.
- Devlin J. J., Panganiban L. C., & Devlin P. E. (1990).** Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4967), 404–406.
- Diehl B. (2008).** MMPACE – ein hefezellbasierter Bioassay zur Hochdurchsatz-Testung spezifischer Inhibitoren gegen humane Matrix-Metalloproteasen. *Dissertation*, Universität des Saarlandes.
- Dietvorst J., Blicke L., Brandt R., Van Dijck P., & Steensma H. Y. (2007).** Attachment of *MAL32*-encoded maltase on the outside of yeast cells improves maltotriose utilization. *Yeast*, 24(1), 27–38.
- Dieye Y., Usai S., Clier F., Gruss A., & Piard J. C. (2001).** Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 183(14), 4157–4166.

- Dohmen R. J., Strasser A. W. M., Höner C. B., & Hollenberg C. P. (1991).** An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast (Chichester, England)*, 7(7), 691–692.
- Doi R. H., & Kosugi A. (2004).** Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(7), 541–551.
- Doi R. H., Park J. S., Liu C. C., Malburg L. M., Tamaru Y., Ichiishi A., et al. (1998).** Cellulosome and noncellulosomal cellulases of *Clostridium cellulovorans*. *Extremophiles : Life under Extreme Conditions*, 2(2), 53–60.
- Doukyu N., Shibata K., Ogino H., & Sagermann M. (2009).** Cloning, sequence analysis, and expression of a gene encoding *Chromobacterium* sp. DS-1 cholesterol oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 479–490.
- Dower W. J., Miller J. F., & Ragsdale C. W. (1988).** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(13), 6127–45.
- Dragosits M., Stadlmann J., Albiol J., Baumann K., Maurer M., Gasser B., et al. (2009).** The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of Proteome Research*, 8(3), 1380–1392.
- Du F., Liu Y. Q., Xu Y. S., Li Z. J., Wang Y. Z., Zhang Z. X., et al. (2021).** Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1–10.
- Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mrsa V., & Tanner W. (2006).** Pir Proteins of *Saccharomyces cerevisiae* Are Attached to  $\beta$ -1,3-Glucan by a New Protein-Carbohydrate Linkage. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17), 11523–11529.
- Endemann H., & Model P. (1995).** Location of filamentous phage minor coat proteins in phage and in infected cells. *Journal of Molecular Biology*, 250(4), 496–506.
- Engler C., Kandzia R., & Marillonnet S. (2008).** A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS One*, 3(11).
- Engler M. J., & Richardson C. C. (1982).** DNA Ligases. *Enzymes*, 15(C), 3–29.
- Fan L. H., Zhang Z. J., Yu X. Y., Xue Y. X., & Tan T. W. (2012).** Self-surface assembly of cellulosomes with two miniscaffoldins on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), 13260–13265.

- Fan S., Liang B., Xiao X., Bai L., Tang X., Lojou E., et al. (2020).** Controllable Display of Sequential Enzymes on Yeast Surface with Enhanced Biocatalytic Activity toward Efficient Enzymatic Biofuel Cells. *Journal of the American Chemical Society*, 142(6), 3222–3230.
- Fan Y., Lu Y., Zhang L., Chen X., & Shen Y. (2017).** Enhancing NADPH regeneration and increasing hydroxylation efficiency with P450 monooxygenase through strengthening expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in industrial filamentous fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 307–311.
- Fang F., Salmon K., Shen M. W. Y., Aeling K. A., Ito E., Irwin B., et al. (2011).** A vector set for systematic metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 28(2), 123–136.
- Farquhar R., Honey N., Murrant S. J., Bossier P., Schultz L., Montgomery D., et al. (1991).** Protein disulfide isomerase is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 108(1), 81–89.
- Fazekas De St. Groth S., Webster R. G., & Datyner A. (1963).** Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et Biophysica Acta*, 71, 377–391.
- Fierobe H. P., Pagès S., Bélaïch A., Champ S., Lexa D., & Bélaïch J. P. (1999).** Cellulosome from *Clostridium cellulolyticum*: molecular study of the Dockerin/Cohesin interaction. *Biochemistry*, 38(39), 12822–12832.
- Fishilevich S., Amir L., Fridman Y., Aharoni A., & Alfonta L. (2009).** Surface display of redox enzymes in microbial fuel cells. *Journal of the American Chemical Society*, 131(34), 12052–12053.
- Fraenkel D. G. (1968).** Selection of *Escherichia coli* mutants lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase or gluconate-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 95(4), 1267–1271.
- Frand A. R., & Kaiser C. A. (1998).** The *ERO1* gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 1(2), 161–170.
- Frand A. R., & Kaiser C. A. (2000).** Two Pairs of Conserved Cysteines Are Required for the Oxidative Activity of Ero1p in Protein Disulfide Bond Formation in the Endoplasmic Reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, 11(9), 2833.



- Frederick K. R., Tung J., Emerick R. S., Masiarz F. R., Chamberlain S. H., Vasavada A., et al. (1990).** Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 265(7), 3793–3802.
- Freudl R., MacIntyre S., Degen M., & Henning U. (1986).** Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Molecular Biology*, 188(3), 491–494.
- Fried D. I., Tropp K., & Fröba M. (2013).** On the Way to Cofactor Regeneration in Nanopores: Tailoring Porous Materials for Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Immobilization. *ChemCatChem*, 5(4), 931–938.
- Fuentealba M., Muñoz R., Maturana P., Krapp A., & Cabrera R. (2016).** Determinants of Cofactor Specificity for the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Escherichia coli*: Simulation, Kinetics and Evolutionary Studies. *PLOS ONE*, 11(3), e0152403.
- Fukuda N., Ishii J., Shibasaki S., Ueda M., Fukuda H., & Kondo A. (2007).** High-efficiency recovery of target cells using improved yeast display system for detection of protein-protein interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 151–158.
- Gal I., Schlesinger O., Amir L., & Alfonta L. (2016).** Yeast surface display of dehydrogenases in microbial fuel-cells. *Bioelectrochemistry*, 112, 53–60.
- Gao S., Zhou H., Zhou J., & Chen J. (2020).** Promoter-Library-Based Pathway Optimization for Efficient (2S)-Naringenin Production from *p*-Coumaric Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(25), 6884–6891.
- Garibyan L., & Avashia N. (2013).** Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4.
- Gasser B., & Mattanovich D. (2007).** Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale? *Biotechnology Letters*, 29(2), 201–212.
- Gasser B., Maurer M., Gach J., Kunert R., & Mattanovich D. (2006).** Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(2), 353–361.
- Gasser B., Sauer M., Maurer M., Stadlmayr G., & Mattanovich D. (2007).** Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6499–6507.
- Gatignol A., Dassain M., & Tiraby G. (1990).** Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* promoters using a probe vector based on phleomycin resistance. *Gene*, 91(1), 35–41.

- Gibbs R. A. (1990).** DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 62(13), 1202–1214.
- Gonzalez M., Goddard N., Hicks C., Ovalle R., Rauceo J. M., Jue C. K., et al. (2010).** A screen for deficiencies in GPI-anchorage of wall glycoproteins in yeast. *Yeast*, 27(8), 583–596.
- Goossens K. V. Y., Stassen C., Stals I., Donohue D. S., Devreese B., de Greve H., et al. (2011).** The N-Terminal Domain of the Flo1 Flocculation Protein from *Saccharomyces cerevisiae* Binds Specifically to Mannose Carbohydrates. *Eukaryotic Cell*, 10(1), 110.
- Govender P., Domingo J. L., Bester M. C., Pretorius I. S., & Bauer F. F. (2008).** Controlled Expression of the Dominant Flocculation Genes *FLO1*, *FLO5*, and *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 6041.
- Graham T. R., Seeger M., Payne G. S., MacKay V. L., & Emr S. D. (1994).** Clathrin-dependent localization of alpha 1,3 mannosyltransferase to the Golgi complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 127(3), 667.
- Guerfal M., Ryckaert S., Jacobs P. P., Ameloot P., Van Craenenbroeck K., Derycke R., et al. (2010).** The *HAC1* gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microbial Cell Factories*, 9.
- Guo B., Styles C. A., Feng Q., & Fink G. R. (2000).** A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12158–12163.
- Guo Z. P., Qiu C. Y., Zhang L., Ding Z. Y., Wang Z. X., & Shi G. Y. (2011).** Expression of aspartic protease from *Neurospora crassa* in industrial ethanol-producing yeast and its application in ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(2), 148–154.
- Gustafsson C., Govindarajan S., & Minshull J. (2004).** Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22(7), 346–353.
- Halter R., Pohlner J., & Meyer T. F. (1984).** IgA protease of *Neisseria gonorrhoeae*: isolation and characterization of the gene and its extracellular product. *The EMBO Journal*, 3(7), 1595–1601.
- Han M., Wang W., Zhou J., Gong X., Xu C., Li Y., et al. (2020).** Activation of the Unfolded Protein Response via Co-expression of the *HAC1*<sup>i</sup> Gene Enhances Expression of Recombinant Elastase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 25(2), 302–307.

- Han S. Y., Pan Z. Y., Huang D. F., Ueda M., Wang X. N., & Lin Y. (2009).** Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole-cells in non-aqueous phase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1–3), 168–172.
- Harmsen M. M., Bruyne M. I., Raué H. A., & Maat J. (1996).** Overexpression of binding protein and disruption of the *PMRI* gene synergistically stimulate secretion of bovine prochymosin but not plant thaumatin in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(4), 365–370.
- Hartland R. P., Vermeulen C. A., Sietsma J. H., Wessels J. G. H., & Klis F. M. (1994).** The linkage of (1-3)-beta-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 10(12), 1591–1599.
- Hauser K., & Tanner W. (1989).** Purification of the inducible alpha-agglutinin of *S. cerevisiae* and molecular cloning of the gene. *FEBS Letters*, 255(2), 290–294.
- Hausjell J., Schendl D., Weissensteiner J., Molitor C., Halbwirth H., & Spadiut O. (2020).** Recombinant production of a hard-to-express membrane-bound cytochrome P450 in different yeasts-Comparison of physiology and productivity. *Yeast (Chichester)*, 37(2), 217–226.
- Häusler A., Ballou L., Ballou C. E., & Robbins P. W. (1992).** Yeast glycoprotein biosynthesis: *MNT1* encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), 6846–6850.
- He S., Zhang Z., & Lu W. (2023).** Natural promoters and promoter engineering strategies for metabolic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 50(1), 29.
- He X., Shang J., Li F., & Liu H. (2015).** Yeast cell surface display of linoleic acid isomerase from *Propionibacterium acnes* and its application for the production of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62(1), 1–8.
- Helling R. B., Goodman H. M., & Boyer H. W. (1974).** Analysis of endonuclease R-*EcoRI* fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *Journal of Virology*, 14(5), 1235–1244.
- Hill J. E., Myers A. M., Koerner T. J., & Tzagoloff A. (1986).** Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, 2(3), 163–167.

- Hill K., Boone C., Goebel M., Puccia R., Sdicu A. M., & Bussey H. (1992).** Yeast *KRE2* defines a new gene family encoding probable secretory proteins, and is required for the correct N-glycosylation of proteins. *Genetics*, *130*(2), 273–283.
- Hirschi S., Ward T. R., Meier W. P., Muller D. J., & Fotiadis D. (2022).** Synthetic Biology: Bottom-Up Assembly of Molecular Systems. *Chemical Reviews*, *122*(21), 16294–16328.
- Ho S. N., Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K., & Pease L. R. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, *77*(1), 51–59.
- Holland J. P., & Holland M. J. (1980).** Structural comparison of two nontandemly repeated yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Journal of Biological Chemistry*, *255*(6), 2596–2605.
- Holton T. A., & Graham M. W. (1991).** A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Research*, *19*(5), 1156.
- Hong F., Meinander N. Q., & Jönsson L. J. (2002).** Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, *79*(4), 438–449.
- Hoogenboom H. R., Griffiths A. D., Johnson K. S., Chiswell D. J., Hudson P., & Winter G. (1991).** Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research*, *19*(15), 4133–4137.
- Horton R. M., Ho S. N., Pullen J. K., Hunt H. D., Cai Z., & Pease L. R. (1993).** Gene splicing by overlap extension. *Methods in Enzymology*, *217*(C), 270–279.
- Horton R. M., Hunt H. D., Ho S. N., Pullen J. K., & Pease L. R. (1989).** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, *77*(1), 61–68.
- Hoshida H., Kondo M., Kobayashi T., Yarimizu T., & Akada R. (2017).** 5′-UTR introns enhance protein expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(1), 241–251.
- Hou J., Tyo K. E. J., Liu Z., Petranovic D., & Nielsen J. (2012).** Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *12*(5), 491–510.
- Huang G. L., Anderson T. D., & Clubb R. T. (2014).** Engineering microbial surfaces to degrade lignocellulosic biomass. *Bioengineered*, *5*(2), 96.

- Hudson B., & Jacobs R. (1975).** The ultraviolet transitions of the ethidium cation. *Biopolymers*, 14(6), 1309–1312.
- Hutchins K., & Bussey H. (1983).** Cell Wall Receptor for Yeast Killer Toxin: Involvement of (1 → 6)- $\beta$ -d-Glucan. *Journal of Bacteriology*, 154(1), 161.
- Inokuma K., Bamba T., Ishii J., Ito Y., Hasunuma T., & Kondo A. (2016).** Enhanced cell-surface display and secretory production of cellulolytic enzymes with *Saccharomyces cerevisiae* Sed1 signal peptide. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(11), 2358–2366.
- Inokuma K., Hasunuma T., & Kondo A. (2014).** Efficient yeast cell-surface display of exo- and endo-cellulase using the *SEDI* anchoring region and its original promoter. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1).
- Inokuma K., Kitada Y., Bamba T., Kobayashi Y., Yukawa T., den Haan R., et al. (2021).** Improving the functionality of surface-engineered yeast cells by altering the cell wall morphology of the host strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(14–15), 5895–5904.
- Ishiwata-Kimata Y., & Kimata Y. (2023).** Fundamental and Applicative Aspects of the Unfolded Protein Response in Yeasts. *Journal of Fungi*, 9(10).
- Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., et al. (1977).** Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science (New York, N.Y.)*, 198(4321), 1056–1063.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K., & Kimura A. (1983).** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 163–168.
- Ito J., Kosugi A., Tanaka T., Kuroda K., Shibasaki S., Ogino C., et al. (2009).** Regulation of the Display Ratio of Enzymes on the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Surface by the Immunoglobulin G and Cellulosomal Enzyme Binding Domains. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4149–4154.
- Ito K., Takahashi M., Yoshimoto T., & Tsuru D. (1994).** Cloning and high-level expression of the glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase gene from *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 176(9), 2483–2491.
- Ito Y., Yamanishi M., Ikeuchi A., Imamura C., Tokuhiko K., Kitagawa T., et al. (2013).** Characterization of five terminator regions that increase the protein yield of a transgene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 486–492.
- Jacobs P. P., Ryckaert S., Geysens S., De Vusser K., Callewaert N., & Contreras R. (2008).** *Pichia* surface display: Display of proteins on the surface of glycoengineered *Pichia pastoris* strains. *Biotechnology Letters*, 30(12), 2173–2181.

- Jaeger K. E., & Reetz M. T. (1998).** Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, *16*(9), 396–403.
- Jiang W., & Boder E. T. (2010).** High-throughput engineering and analysis of peptide binding to class II MHC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(30), 13258–13263.
- Jose J. (2006).** Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *69*(6), 607–614.
- Jose J., Bernhardt R., & Hannemann F. (2001).** Functional Display of Active Bovine Adrenodoxin on the Surface of *E. coli* by Chemical Incorporation of the [2Fe - 2S] Cluster. *ChemBioChem*, *2*, 695–701.
- Jose J., Betscheider D., & Zangen D. (2005).** Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. *Analytical Biochemistry*, *346*(2), 258–267.
- Jose J., Jähnig F., & Meyer T. F. (1995).** Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Molecular Microbiology*, *18*(2), 378–380.
- Jose J., & Meyer T. F. (2007).** The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *71*(4), 600–619.
- Jose J., & von Schwichow S. (2004).** Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, *5*(4), 491–499.
- Juturu V., & Wu J. C. (2018).** Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *ChemBioChem*, *19*(1), 7–21.
- Kahle C., Schneider K. H., & Giffhorn F. (1992).** Pentitol metabolism of *Rhodobacter sphaeroides* Si4: purification and characterization of a ribitol dehydrogenase. *Journal of General Microbiology*, *138*(6), 1277–1281.
- Kajiwara K., Aoki W., Koike N., & Ueda M. (2021).** Development of a yeast cell surface display method using the SpyTag/SpyCatcher system. *Scientific Reports*, *11*(11059), 1–10.
- Kajiwara K., Aoki W., & Ueda M. (2020).** Evaluation of the yeast surface display system for screening of functional nanobodies. *AMB Express*, *10*(1), 1–10.

- Kang Y.-S., Kane J., Kurjan J., Stadel J. M., & Tipper D. J. (1990).** Effects of expression of mammalian G alpha and hybrid mammalian-yeast G alpha proteins on the yeast pheromone response signal transduction pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 10(6), 2582.
- Kapteyn J. C., Van Den Ende H., & Klis F. M. (1999).** The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426(2), 373–383.
- Kato M., Fuchimoto J., Tanino T., Kondo A., Fukuda H., & Ueda M. (2007).** Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by a yeast molecular display system and its practical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(3), 549–555.
- Katsurada K., Tominaga M., Kaishima M., Kato H., Matsuno T., Ogino C., et al. (2021).** Constitutive cell surface expression of ZZ domain for the easy preparation of yeast-based immunosorbents. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 67(6), 265–268.
- Kawai S., Hashimoto W., & Murata K. (2010).** Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered Bugs*, 1(6), 395–403.
- Kenngott E. E., Kiefer R., Schneider-Daum N., Hamann A., Schneider M., Schmitt M. J., et al. (2016).** Surface-modified yeast cells: A novel eukaryotic carrier for oral application. *Journal of Controlled Release*, 224, 1–7.
- Khalil A. S., & Collins J. J. (2010).** Synthetic biology: applications come of age. *Nature Reviews. Genetics*, 11(5), 367–379.
- Kiefer R., Jurisic M., Dahlem C., Koch M., Schmitt M. J., Kiemer A. K., et al. (2020).** Targeted delivery of functionalized PLGA nanoparticles to macrophages by complexation with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(3), 776–788.
- Kieke M. C., Cho B. K., Boder E. T., Kranz D. M., & Wittrup K. D. (1997).** Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Engineering, Design and Selection*, 10(11), 1303–1310.
- Kim H., Yoo S. J., & Kang H. A. (2015).** Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research*, 15(1), 1–16.
- Kim S., Sideris D. P., Sevier C. S., & Kaiser C. A. (2012).** Balanced Ero1 activation and inactivation establishes ER redox homeostasis. *The Journal of Cell Biology*, 196(6), 713–725.

- Kim S. Y., Sohn J. H., Pyun Y. R., & Choi E. S. (2002).** A cell surface display system using novel GPI-anchored proteins in *Hansenula polymorpha*. *Yeast (Chichester, England)*, 19(13), 1153–1163.
- Kim Y. H., Campbell E., Yu J., Minter S. D., & Banta S. (2013).** Complete oxidation of methanol in biobattery devices using a hydrogel created from three modified dehydrogenases. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 52(5), 1437–1440.
- Kimata Y., Ishiwata-Kimata Y., Ito T., Hirata A., Suzuki T., Oikawa D., et al. (2007).** Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *The Journal of Cell Biology*, 179(1), 75–86.
- Klauser T., Krämer J., Otzelberger K., Pohlner J., & Meyer T. F. (1993).** Characterization of the *Neisseria* Iga beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *Journal of Molecular Biology*, 234(3), 579–593.
- Klauser T., Pohlner J., & Meyer T. F. (1990).** Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *The EMBO Journal*, 9(6), 1991–1999.
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., & Brul S. (2002).** Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 239–256.
- Kobayashi O., Hayashi N., Kuroki R., & Sone H. (1998).** Region of Flo1 Proteins Responsible for Sugar Recognition. *Journal of Bacteriology*, 180(24), 6503.
- Kollár R., Petráková E., Ashwell G., Robbins P. W., & Cabib E. (1995).** Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-->3)-glucan. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1170–1178.
- Kollár R., Reinhold B. B., Petráková E., Yeh H. J. C., Ashwell G., Drgonová J., et al. (1997).** Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17762–17775.
- Komori H., Inaka K., Furubayashi N., Honda M., & Higuchi Y. (2015).** Crystallographic analysis of FAD-dependent glucose dehydrogenase. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 71(8), 1017–1019.
- Kondo A., & Ueda M. (2004).** Yeast cell-surface display--applications of molecular display. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(1), 28–40.



- Konieczny M. P. J., Suhr M., Noll A., Autenrieth I. B., & Alexander Schmidt M. (2000).** Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 27(4), 321–332.
- Koontz L. (2014).** TCA precipitation. *Methods in Enzymology*, 541, 3–10.
- Kosugi A., Murashima K., Tamaru Y., & Doi R. H. (2002).** Cell-Surface-Anchoring Role of N-Terminal Surface Layer Homology Domains of *Clostridium cellulovorans* EngE. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 884.
- Kotaka A., Sahara H., Kuroda K., Kondo A., Ueda M., & Hata Y. (2010).** Enhancement of beta-glucosidase activity on the cell-surface of sake yeast by disruption of *SEDI*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(5), 442–446.
- Krix G., Bommarius A. S., Drauz K., Kottenhahn M., Schwarm M., & Kula M. R. (1997).** Enzymatic reduction of  $\alpha$ -keto acids leading to l-amino acids, d- or l-hydroxy acids. *Journal of Biotechnology*, 53(1), 29–39.
- Kronvall G., & Williams R. C. (1969).** Differences in Anti-Protein a Activity among IgG Subgroups. *The Journal of Immunology*, 103(4), 828–833.
- Krysan D. J. (2009).** The cell wall and endoplasmic reticulum stress responses are coordinately regulated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Communicative & Integrative Biology*, 2(3), 233.
- Kurien B. T., & Hal Scofield R. (2015).** Western Blotting: An Introduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1312, 17.
- Kuroda K., Matsui K., Higuchi S., Kotaka A., Sahara H., Hata Y., et al. (2009).** Enhancement of display efficiency in yeast display system by vector engineering and gene disruption. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(4), 713–719.
- Laboissière M. C. A., Sturley S. L., & Raines R. T. (1995).** The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(47), 28006–28009.
- Lamed R., Setter E., & Bayer E. A. (1983).** Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*, 156(2), 828.
- Lanza A. M., Curran K. A., Rey L. G., & Alper H. S. (2014).** A condition-specific codon optimization approach for improved heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Systems Biology*, 8(1).

- Lattemann C. T., Maurer J., Gerland E., & Meyer T. F. (2000).** Autodisplay: Functional Display of Active  $\beta$ -Lactamase on the Surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I Autotransporter. *Journal of Bacteriology*, 182(13), 3726.
- Lee M. E., Aswani A., Han A. S., Tomlin C. J., & Dueber J. E. (2013).** Expression-level optimization of a multi-enzyme pathway in the absence of a high-throughput assay. *Nucleic Acids Research*, 41(22), 10668–10678.
- Lee M. E., DeLoache W. C., Cervantes B., & Dueber J. E. (2015).** A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synthetic Biology*, 4(9), 975–986.
- Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y., & Kim Y. H. (2012).** Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (62), e3923.
- Lee S. Y. (1996).** High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 14(3), 98–105.
- Lehman I. R. (1974).** DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science (New York)*, 186(4166), 790–7.
- Lesage G., & Bussey H. (2006).** Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 317.
- Levin D. E. (2005).** Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 69(2), 262–291.
- Li J., Zhang M. M., Wan C., Den Haan R., Bai F. W., & Zhao X. Q. (2020).** Improved cellulase production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by disrupting the cell wall protein-encoding gene *CWP2*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(2), 165–171.
- Lilly M., Fierobe H. P., Van Zyl W. H., & Volschenk H. (2009).** Heterologous expression of a *Clostridium* minicellulosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 9(8), 1236–1249.
- Lim S., Glasgow J. E., Filsinger Interrante M., Storm E. M., & Cochran J. R. (2017).** Dual display of proteins on the yeast cell surface simplifies quantification of binding interactions and enzymatic bioconjugation reactions. *Biotechnology Journal*, 12(5), 1600696.
- Lind I., & Mansa B. (1968).** Further investigation of specific and non-specific adsorption of serum globulins to *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 73(4), 637–645.

- Lipke P. N., & Ovalle R. (1998).** Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *Journal of Bacteriology*, 180(15), 3735.
- Liu F., Banta S., & Chen W. (2013).** Functional assembly of a multi-enzyme methanol oxidation cascade on a surface-displayed trifunctional scaffold for enhanced NADH production. *Chemical Communications (Cambridge)*, 49(36), 3766–3768.
- Liu W. S., Pan X. X., Jia B., Zhao H. Y., Xu L., Liu Y., et al. (2010a).** Surface display of active lipases Lip7 and Lip8 from *Yarrowia lipolytica* on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(4), 885–891.
- Liu W., Zhao H., Jia B., Xu L., & Yan Y. (2010b).** Surface display of active lipase in *Saccharomyces cerevisiae* using Cwp2 as an anchor protein. *Biotechnology Letters*, 32(2), 255–260.
- Liu Y., Zhang R., Lian Z., Wang S., & Wright A. T. (2014).** Yeast cell surface display for lipase whole cell catalyst and its applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 106, 17–25.
- Liu Z. H., Yang C. P., Qi X. T., Xiu L. L., & Wang Y. C. (2010c).** Cloning, heterologous expression, and functional characterization of a chitinase gene, Lbchi32, from *Limonium bicolor*. *Biochemical Genetics*, 48(7–8), 669–679.
- Lopez-Morales J., Vanella R., Kovacevic G., Santos M. S., & Nash M. A. (2023).** Titrating Avidity of Yeast-Displayed Proteins Using a Transcriptional Regulator. *ACS Synthetic Biology*, 12(2), 419–431.
- Lozančić M., Hossain A. S., Mrša V., & Teparić R. (2019).** Surface Display—An Alternative to Classic Enzyme Immobilization. *Catalysts*, 9(9), 728.
- Lu C. F., Montijn R. C., Brown J. L., Klis F., Kurjan J., Bussey H., et al. (1995).** Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *The Journal of Cell Biology*, 128(3), 333–340.
- Lussier M., Sdicu A. M., Bussereau F., Jacquet M., & Bussey H. (1997).** The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15527–15531.
- Lussier M., Sdicu A. M., & Bussey H. (1999).** The *KTR* and *MNN1* mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426(2), 323–334.

- Lytle B. L., Volkman B. F., Westler W. M., Heckman M. P., & Wu J. H. D. (2001).** Solution structure of a type I dockerin domain, a novel prokaryotic, extracellular calcium-binding domain. *Journal of Molecular Biology*, 307(3), 745–753.
- Lytle B. L., & Wu J. H. D. (1998).** Involvement of both dockerin subdomains in assembly of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Journal of Bacteriology*, 180(24), 6581–6585.
- Mackenzie C., Choudhary M., Larimer F. W., Predki P. F., Stilwagen S., Armitage J. P., et al. (2001).** The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynthesis Research*, 70(1), 19–41.
- Maeda Y., Ueda H., Kazami J., Kawano G., Suzuki E., & Nagamune T. (1997).** Engineering of Functional Chimeric Protein G–*Vargula* Luciferase. *Analytical Biochemistry*, 249(2), 147–152.
- Mahmood T., & Yang P. C. (2012).** Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.
- Mannazzu I., Simonetti E., Marinangeli P., Guerra E., Budroni M., Thangavelu M., et al. (2002).** *SEDI* Gene Length and Sequence Polymorphisms in Feral Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5437.
- Martinić Cezar T., Lozančić M., Novačić A., Matičević A., Matijević D., Vallée B., et al. (2023).** Streamlining N-terminally anchored yeast surface display via structural insights into *S. cerevisiae* Pir proteins. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 1–17.
- Mathews M. B., & Vennesland B. (1950).** Enzymic Oxidation of Formic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, 186(2), 667–682.
- Matsumoto T., Fukuda H., Ueda M., Tanaka A., & Kondo A. (2002).** Construction of Yeast Strains with High Cell Surface Lipase Activity by Using Novel Display Systems Based on the Flo1p Flocculation Functional Domain. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4517.
- Matsuoka H., Hashimoto K., Saijo A., Takada Y., Kondo A., Ueda M., et al. (2014).** Cell wall structure suitable for surface display of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 31(2), 67–76.
- Matsuyama T. (2019).** Recent developments in terminator technology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(6), 655–661.
- Maurer J., Jose J., & Meyer T. F. (1997).** Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(3), 794–804.

- McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., & Chiswell D. J. (1990).** Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301), 552–554.
- McComb R. B., Bond L. W., Burnett R. W., Keech R. C., & Bowers G. N. (1976).** Determination of the molar absorptivity of NADH. *Clinical Chemistry*, 22(2), 141–150.
- McKinnon K. M. (2018).** Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, 120, 5.1.1.
- Mechaly A., Fierobe H. P., Bélaïch A., Bélaïch J. P., Lamed R., Shoham Y., et al. (2001).** Cohesin-dockerin interaction in cellulosome assembly: a single hydroxyl group of a dockerin domain distinguishes between nonrecognition and high affinity recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 9883–9888.
- Mechaly A., Yaron S., Lamed R., Fierobe H.-P., Belaich A., Belaich J.-P., et al. (2000).** Cohesin-Dockerin Recognition in Cellulosome Assembly: Experiment Versus Hypothesis. *Proteins*, 39(2), 170–177.
- Mei M., Li J., Wang S., Lee K. B., Iverson B. L., Zhang G., et al. (2019).** Prompting Fab Yeast Surface Display Efficiency by ER Retention and Molecular Chaperon Co-expression. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 362.
- Mei M., Zhou Y., Peng W., Yu C., Ma L., Zhang G., et al. (2017).** Application of modified yeast surface display technologies for non-Antibody protein engineering. *Microbiological Research*, 196, 118–128.
- Mijailovic N., Nesler A., Perazzolli M., Aït Barka E., & Aziz A. (2021).** Rare Sugars: Recent Advances and Their Potential Role in Sustainable Crop Protection. *Molecules*, 26(6).
- Montijn R. C., Van Rinsum J., Van Schagen F. A., & Klis F. M. (1994).** Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *Journal of Biological Chemistry*, 269(30), 19338–19342.
- Montijn R. C., Vink E., Müller W. H., Verkleij A. J., Van Den Ende H., Henrissat B., et al. (1999).** Localization of Synthesis of  $\beta$ -1,6-Glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 181(24), 7414.
- Mori A., Hara S., Sugahara T., Kojima T., Iwasaki Y., Kawarasaki Y., et al. (2015).** Signal peptide optimization tool for the secretion of recombinant protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(5), 518–525.

- Mori K., Kawahara T., Yoshida H., Yanagi H., & Yura T. (1996).** Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 1(9), 803–817.
- Mori K., Ogawa N., Kawahara T., Yanagi H., & Yura T. (1998).** Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the cis-acting Unfolded Protein Response Element in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9912–9920.
- Mormeneo M., Andrés I., Bofill C., Díaz P., & Zueco J. (2008).** Efficient secretion of *Bacillus subtilis* lipase A in *Saccharomyces cerevisiae* by translational fusion to the Pir4 cell wall protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(3), 437–445.
- Mrsá V., Seidl T., Gentsch M., & Tanner W. (1997).** Specific Labelling of Cell Wall Proteins by Biotinylation. Identification of Four Covalently Linked O-mannosylated Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13, 1145–1154.
- Müller N. (2008).** Analyse und Optimierung der Zellwandverankerung heterologer Proteine in der Hefe *Pichia pastoris*. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes.
- Mullis K. B. (1990).** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65.
- Nakamura T., Ohmoto T., Hirata D., Tsuchiya E., & Miyakawa T. (1997).** Yeast Crv4/Ttp1, a predicted type II membrane protein, is involved in an event important for growth, functionally overlapping with the event regulated by calcineurin- and Mpk1-mediated pathways. *Molecular Genetics and Genomics*, 256(5), 481–487.
- Nakamura Y., Shibasaki S., Ueda M., Tanaka A., Fukuda H., & Kondo A. (2001).** Development of novel whole-cell immunoadsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(4), 500–505.
- Nanba H., Takaoka Y., & Hasegawa J. (2003).** Purification and characterization of an alpha-haloketone-resistant formate dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. strain KNK65MA, and cloning of the gene. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(10), 2145–2153.
- Navarre W. W., & Schneewind O. (1999).** Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 63(1), 174–229.
- Nguyen P. T. M., Ishiwata-Kimata Y., & Kimata Y. (2022).** Fast-Growing *Saccharomyces cerevisiae* Cells with a Constitutive Unfolded Protein Response and Their Potential for Lipidic Molecule Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(21).

- Nikawa J. I., Akiyoshi M., Hirata S., & Fukuda T. (1996).** *Saccharomyces cerevisiae IRE2/HAC1* is involved in *IRE1*-mediated *KAR2* expression. *Nucleic Acids Research*, 24(21), 4222.
- Nilsson B., Moks T., Jansson B., Abrahmsén L., Elmlad A., Holmgren E., et al. (1987).** A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Engineering*, 1(2), 107–113.
- Noiva R., & Lennarz W. J. (1992).** Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 267(6), 3553–3556.
- Nojima H., Leem S. hee, Araki H., Sakai A., Nakashima N., Kanaoka Y., et al. (1994).** Hac1: a novel yeast bZIP protein binding to the CRE motif is a multicopy suppressor for *cdc10* mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research*, 22(24), 5279–5288.
- Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z. S., Katalani C., Hajizade A., Easton A. J., et al. (2021).** Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology 2021 19:1*, 19(1), 1–27.
- O’Callaghan J., O’Brien M. M., McClean K., & Dobson A. D. W. (2002).** Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29(2), 55–59.
- O’Riordan N. M., Jurić V., O’Neill S. K., Roche A. P., & Young P. W. (2024).** A Yeast Modular Cloning (MoClo) Toolkit Expansion for Optimization of Heterologous Protein Secretion and Surface Display in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 13(4), 1246–1258.
- Ogden J. E., Stanway C., Kim S., Mellor J., Kingsman A. J., & Kingsman S. M. (1986).** Efficient expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *PGK* gene depends on an upstream activation sequence but does not require TATA sequences. *Molecular and Cellular Biology*, 6(12), 4335–4343.
- Okamura K., Kimata Y., Higashio H., Tsuru A., & Kohno K. (2000).** Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), 445–450.
- Olavarría K., Valdés D., & Cabrera R. (2012).** The cofactor preference of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*— modeling the physiological production of reduced cofactors. *The FEBS Journal*, 279(13), 2296–2309.

- Olivero I., Mañas P., & M. Hernández L. (2000).** The *mnn2* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is affected in phosphorylation of N-linked oligosaccharides. *FEBS Letters*, 475(2), 111–116.
- Olson B. J. S. C. (2016).** Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Pharmacology*, 73(1), A.3A.1-A.3A.32.
- Orlean P. (2012).** Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, 192(3), 775–818.
- Pagès S., Bélaïch A., Bélaïch J.-P., Morag E., Lamed R., Shoham Y., et al. (1997).** Species-Specificity of the Cohesin-Dockerin Interaction Between *Clostridium thermocellum* and *Clostridium cellulolyticum*: Prediction of Specificity Determinants of the Dockerin Domain. *Proteins*, 29(4), 517–527.
- Park M. (2020).** Surface Display Technology for Biosensor Applications: A Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 20(10).
- Partow S., Siewers V., Bjørn S., Nielsen J., & Maury J. (2010).** Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 27(11), 955–964.
- Paschke M. (2006).** Phage display systems and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 2–11.
- Peng B., Williams T. C., Henry M., Nielsen L. K., & Vickers C. E. (2015).** Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: A comparison of yeast promoter activities. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–11.
- Persson B., Jeffery J., & Jörnvall H. (1991a).** Different segment similarities in long-chain dehydrogenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177(1), 218–223.
- Persson B., Krook M., & Jörnvall H. (1991b).** Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *European Journal of Biochemistry*, 200(2), 537–543.
- Pfeiffer A., Stephanowitz H., Krause E., Volkwein C., Hirsch C., Jarosch E., et al. (2016).** A Complex of Htm1 and the Oxidoreductase Pdi1 Accelerates Degradation of Misfolded Glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(23), 12195–12207.
- Picot J., Guerin C. L., Le Van Kim C., & Boulanger C. M. (2012).** Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*, 64(2), 109.



- 
- Pittet M., & Conzelmann A. (2007).** Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771(3), 405–420.
- Pohlner J., Halter R., Beyreuther K., & Meyer T. F. (1987).** Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*, 325(6103), 458–462.
- Pollard M. G., Travers K. J., & Weissman J. S. (1998).** Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 1(2), 171–182.
- Pope B., & Kent H. M. (1996).** High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 24(3), 536–537.
- Ragni E., Sipiczki M., & Strahl S. (2007).** Characterization of Ccw12p, a major key player in cell wall stability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 24(4), 309–319.
- Rakestraw A., & Wittrup K. D. (2006).** Contrasting secretory processing of simultaneously expressed heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(5), 896–905.
- Raschke W. C., Kern K. A., Antalis C., & Ballou C. E. (1973).** Genetic Control of Yeast Mannan Structure: Isolation and Characterization of Mannan Mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 248(13), 4660–4666.
- Rau S. (2004).** Expression biotechnologisch relevanter Enzyme auf der Zelloberfläche der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes.
- Rayner J. C., & Munro S. (1998).** Identification of the *MNN2* and *MNN5* mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26836–26843.
- Reiter B., Glieder A., Talker D., & Schwab H. (2000).** Cloning and characterization of EstC from *Burkholderia gladioli*, a novel-type esterase related to plant enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), 778–785.
- Roberts M. A. J., Cranenburgh R. M., Stevens M. P., & Oyston P. C. F. (2013).** Synthetic biology: biology by design. *Microbiology*, 159(Pt 7), 1219–1220.
- Robinson J. S., Klionsky D. J., Banta L. M., & Emr S. D. (1988).** Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Molecular and Cellular Biology*, 8(11), 4936–4948.

- Roemer T., & Bussey H. (1991).** Yeast beta-glucan synthesis: *KRE6* encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis *in vivo* and for glucan synthase activity *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11295–11299.
- Roemer T., Delaney S., & Bussey H. (1993).** *SKN1* and *KRE6* define a pair of functional homologs encoding putative membrane proteins involved in beta-glucan synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, 13(7), 4039.
- Rosano G. L., & Ceccarelli E. A. (2014).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(172), 1–17.
- Rose M. D., Misra L. M., & Vogel J. P. (1989).** *KAR2*, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell*, 57(7), 1211–1221.
- Rothstein R. J. (1983).** One-step gene disruption in yeast. *Methods in Enzymology*, 101, 202–211.
- Rowland P., Basak A. K., Gover S., Levy H. R., & Adams M. J. (1994).** The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure*, 2(11), 1073–1087.
- Rowley D. L., & Wolf R. E. (1991).** Molecular characterization of the *Escherichia coli* K-12 *zwf* gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 173(3), 968–977.
- Roy A., Lu C. F., Marykwas D. L., Lipke P. N., & Kurjanlt J. (1991).** The *AGA1* product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Molecular and Cellular Biology*, 11(8), 4196.
- Rüegsegger U., Leber J. H., & Walter P. (2001).** Block of *HAC1* mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell*, 107(1), 103–114.
- Sahdev S., Khattar S. K., & Saini K. S. (2008).** Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1–2), 249–264.
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., et al. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491.

- Salamitou S., Tokatlidis K., Béguin P., & Aubert J. P. (1992).** Involvement of separate domains of the cellulosomal protein S1 of *Clostridium thermocellum* in binding to cellulose and in anchoring of catalytic subunits to the cellulosome. *FEBS Letters*, 304(1), 89–92.
- Sambrook J., Fritsch E. F., & Maniatis T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sato N., Matsumoto T., Ueda M., Tanaka A., Fukuda H., & Kondo A. (2002).** Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(4), 469–474.
- Schäfer A., Stein M. A., Schneider K. H., & Giffhorn F. (1997).** Mannitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* Si4: subcloning, overexpression in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(1), 47–52.
- Schauder S., Schneider K. H., & Giffhorn F. (1995).** Polyol metabolism of *Rhodobacter sphaeroides*: biochemical characterization of a short-chain sorbitol dehydrogenase. *Microbiology (Reading, England)*, 141(8), 1857–1863.
- Schiestl R. H., & Gietz R. D. (1989).** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics*, 16(5–6), 339–346.
- Schlacher A., Stanzer T., Osprian I., Mischitz M., Klingsbichel E., Faber K., et al. (1998).** Detection of a new enzyme for stereoselective hydrolysis of linalyl acetate using simple plate assays for the characterization of cloned esterases from *Burkholderia gladioli*. *Journal of Biotechnology*, 62(1), 47–54.
- Schmid R. D., & Verger R. (1998).** Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37(12), 1608–1633.
- Schneider K. H. (1994).** Overproduction of mannitol dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(5), 578–583.
- Schneider K. H., & Giffhorn F. (1989).** Purification and properties of a polyol dehydrogenase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *European Journal of Biochemistry*, 184(1), 15–19.
- Schneider K. H., Giffhorn F., & Kaplan S. (1993).** Cloning, nucleotide sequence and characterization of the mannitol dehydrogenase gene from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of General Microbiology*, 139(10), 2475–2484.

- Schneider K. H., Jakel G., Hoffmann R., & Giffhorn F. (1995).** Enzyme evolution in *Rhodobacter sphaeroides*: selection of a mutant expressing a new galactitol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology (Reading, England)*, 141(8), 1865–1873.
- Schreuder M. P., Brekelmans S., Van Den Ende H., & Klis F. M. (1993).** Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9(4), 399–409.
- Schreuder M. P., Mooren A. T. A., Toschka H. Y., Verrips C. T., & Klis F. M. (1996).** Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends in Biotechnology*, 14(4), 115–120.
- Schultheiss E., Paar C., Schwab H., & Jose J. (2002).** Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 18(1–3), 89–97.
- Schüürmann J., Quehl P., Lindhorst F., Lang K., & Jose J. (2017).** Autodisplay of glucose-6-phosphate dehydrogenase for redox cofactor regeneration at the cell surface. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(8), 1658–1669.
- Schwartz D., Stein M., Schneider K. H., & Giffhorn F. (1994).** Synthesis of d-xylulose from d-arabitol by enzymatic conversion with immobilized mannitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Biotechnology*, 33(1), 95–101.
- Scott D. B., & Cohen S. S. (1953).** The oxidative pathway of carbohydrate metabolism in *Escherichia coli*. 1. The isolation and properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase. *The Biochemical Journal*, 55(1), 23–33.
- Scrimale T., Didone L., De Mesy Bentley K. L., & Krysan D. J. (2009).** The Unfolded Protein Response Is Induced by the Cell Wall Integrity Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Cascade and Is Required for Cell Wall Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 20(1), 164.
- Serov A. E., Popova A. S., Fedorchuk V. V., & Tishkov V. I. (2002).** Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical Journal*, 367(3), 841–847.
- Sevier C. S., & Kaiser C. A. (2008).** Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(4), 549–556.
- Sezonov G., Joseleau-Petit D., & D’Ari R. (2007).** *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749.

- Shabalin I. G., Filippova E. V., Polyakov K. M., Sadykhov E. G., Safonova T. N., Tikhonova T. V., et al. (2009).** Structures of the apo and holo forms of formate dehydrogenase from the bacterium *Moraxella* sp. C-1: towards understanding the mechanism of the closure of the interdomain cleft. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 65(12), 1315–1325.
- Shapiro A. L., & Maizel J. V. (1969).** Molecular weight estimation of polypeptides by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: further data concerning resolving power and general considerations. *Analytical Biochemistry*, 29(3), 505–514.
- Sheehan M. C., Bailey C. J., Dowds B. C. A., & McConnell D. J. (1988).** A new alcohol dehydrogenase, reactive towards methanol, from *Bacillus stearothermophilus*. *The Biochemical Journal*, 252(3), 661–666.
- Shibasaki S., Kawabata A., Ishii J., Yagi S., Kadonosono T., Kato M., et al. (2007).** Construction of a novel synergistic system for production and recovery of secreted recombinant proteins by the cell surface engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(4), 821–828.
- Shibasaki S., Kuroda K., Hoang D. N., Mori T., Zou W., & Ueda M. (2006).** Detection of protein-protein interactions by a combination of a novel cytoplasmic membrane targeting system of recombinant proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(4), 451–457.
- Shigechi H., Koh J., Fujita Y., Matsumoto T., Bito Y., Ueda M., et al. (2004).** Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and alpha-amylase. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 5037–5040.
- Shiloach J., & Fass R. (2005).** Growing *E. coli* to high cell density--a historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 23(5), 345–357.
- Shimma Y. I., & Jigami Y. (2004).** Expression of human glycosyltransferase genes in yeast as a tool for enzymatic synthesis of sugar chain. *Glycoconjugate Journal*, 21(1–2), 75–78.
- Shimma Y. I., Saito F., Oosawa F., & Jigami Y. (2006).** Construction of a library of human glycosyltransferases immobilized in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7003–7012.
- Shimoi H., Kitagaki H., Ohmori H., Iimura Y., & Ito K. (1998).** Sed1p Is a Major Cell Wall Protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the Stationary Phase and Is Involved in Lytic Enzyme Resistance. *Journal of Bacteriology*, 180(13), 3381.

- Shimojyo R., Furukawa H., Fukuda H., & Kondo A. (2003).** Preparation of yeast strains displaying IgG binding domain ZZ and enhanced green fluorescent protein for novel antigen detection systems. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(5), 493–495.
- Shiraga S., Kawakami M., Ishiguro M., & Ueda M. (2005).** Enhanced reactivity of *Rhizopus oryzae* lipase displayed on yeast cell surfaces in organic solvents: Potential as a whole-cell biocatalyst in organic solvents. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4335–4338.
- Shuman S. (1994).** Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(51), 32678–32684.
- Shusta E. V., Holler P. D., Kieke M. C., Kranz D. M., & Wittrup K. D. (2000).** Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering. *Nature Biotechnology* 2000 18:7, 18(7), 754–759.
- Shusta E. V., Raines R. T., Plückthun A., & Wittrup K. D. (1998).** Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nature Biotechnology*, 16(8), 773–777.
- Sidhu S. S. (2001).** Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering*, 18, 57–63.
- Sidhu S. S., Fairbrother W. J., & Deshayes K. (2003).** Exploring protein-protein interactions with phage display. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 4(1), 14–25.
- Singh R., Gupta N., Goswami V. K., & Gupta R. (2006).** A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(6), 679–682.
- Sipos G., Puoti A., & Conzelmann A. (1995).** Biosynthesis of the side chain of yeast glycosylphosphatidylinositol anchors is operated by novel mannosyltransferases located in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Journal of Biological Chemistry*, 270(34), 19709–19715.
- Slusarczyk H., Felber S., Kula M. R., & Pohl M. (2000).** Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *European Journal of Biochemistry*, 267(5), 1280–1289.
- Smith B. J. (1984).** SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1, 41–55.
- Smith G. P. (1985).** Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York)*, 228(4705), 1315–1317.

- Smith J. D., Tang B. C., & Robinson A. S. (2004).** Protein disulfide isomerase, but not binding protein, overexpression enhances secretion of a non-disulfide-bonded protein in yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(3), 340–350.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., et al. (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.
- Stein M. A., Schäfer A., & Giffhorn F. (1997).** Cloning, nucleotide sequence, and overexpression of *smoS*, a component of a novel operon encoding an ABC transporter and polyol dehydrogenases of *Rhodobacter sphaeroides* Si4. *Journal of Bacteriology*, 179(20), 6335–6340.
- Strauss A., & Götz F. (1996).** *In vivo* immobilization of enzymatically active polypeptides on the cell surface of *Staphylococcus carnosus*. *Molecular Microbiology*, 21(3), 491–500.
- Studier F. W., & Moffatt B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130.
- Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., & Dubendorff J. W. (1990).** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, 185, 60–89.
- Sumita T., Yoko-o T., Shimma Y. I., & Jigami Y. (2005).** Comparison of Cell Wall Localization among Pir Family Proteins and Functional Dissection of the Region Required for Cell Wall Binding and Bud Scar Recruitment of Pir1p. *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1872.
- Sun J., Shao Z., Zhao H., Nair N., Wen F., Xu J. H., et al. (2012).** Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(8), 2082–2092.
- Sygmund C., Klausberger M., Felice A. K., & Ludwig R. (2011).** Reduction of quinones and phenoxy radicals by extracellular glucose dehydrogenase from *Glomerella cingulata* suggests a role in plant pathogenicity. *Microbiology (Reading)*, 157(11), 3203–3212.
- Tanaka T., & Kondo A. (2015).** Cell-surface display of enzymes by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for synthetic biology. *FEMS Yeast Research*, 15(1).
- Tanaka T., Yamada R., Ogino C., & Kondo A. (2012).** Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012 95:3, 95(3), 577–591.

- Tang H., Bao X., Shen Y., Song M., Wang S., Wang C., et al. (2015).** Engineering protein folding and translocation improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(9), 1872–1882.
- Tang H., Song M., He Y., Wang J., Wang S., Shen Y., et al. (2017).** Engineering vesicle trafficking improves the extracellular activity and surface display efficiency of cellulases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1).
- Tang H., Wang J., Wang S., Shen Y., Petranovic D., Hou J., et al. (2018).** Efficient yeast surface-display of novel complex synthetic cellulosomes. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–13.
- Tang H., Wang S., Wang J., Song M., Xu M., Zhang M., et al. (2016).** N-hypermannose glycosylation disruption enhances recombinant protein production by regulating secretory pathway and cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 6(1), 1–13.
- Tang H., Wu Y., Deng J., Chen N., Zheng Z., Wei Y., et al. (2020).** Promoter Architecture and Promoter Engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolites*, 10(8), 1–20.
- Tarmy E. M., & Kaplan N. O. (1968).** Kinetics of *Escherichia coli* B D-Lactate Dehydrogenase and Evidence for Pyruvate-controlled Change in Conformation. *Journal of Biological Chemistry*, 243(10), 2587–2596.
- Tashiro M., Tejero R., Zimmerman D. E., Celda B., Nilsson B., & Montelione G. T. (1997).** High-resolution solution NMR structure of the Z domain of staphylococcal protein A. *Journal of Molecular Biology*, 272(4), 573–590.
- Teunissen A. W. R. H., Holub E., Van Der Hucht J., Van Den Berg J. A., & Steensma H. Y. (1993).** Sequence of the open reading frame of the *FLO1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9(4), 423–427.
- Teymennet-Ramírez K. V., Martínez-Morales F., & Trejo-Hernández M. R. (2022).** Yeast Surface Display System: Strategies for Improvement and Biotechnological Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(794742), 1–10.
- Tishkov V. I., & Popov V. O. (2006).** Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomolecular Engineering*, 23(2–3), 89–110.
- Toh-E A., Oguchi T., Matsui Y., Yasunaga S., Nisogi H., & Tanaka K. (1993).** Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock. *Yeast*, 9(5), 481–494.



- Tokatlidis K., Salamiou S., Béguin P., Dhurjati P., & Aubert J. P. (1991).** Interaction of the duplicated segment carried by *Clostridium thermocellum* cellulases with cellulosome components. *FEBS Letters*, 291(2), 185–188.
- Tokunaga M., Kawamura A., & Kohno K. (1992).** Purification and characterization of BiP/Kar2 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 267(25), 17553–17559.
- Ton-That H., Mazmanian S. K., Faull K. F., & Schneewind O. (2000).** Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Sortase catalyzed *in vitro* transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH(2)-Gly(3) substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9876–9881.
- Towbin H., Staehelin T., & Gordon J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350–4354.
- Travers K. J., Patil C. K., Wodicka L., Lockhart D. J., Weissman J. S., & Walter P. (2000).** Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 101(3), 249–258.
- Tsai S. L., Goyal G., & Chen W. (2010).** Surface display of a functional minicellulosome by intracellular complementation using a synthetic yeast consortium and its application to cellulose hydrolysis and ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), 7514–7520.
- Tsai S. L., Oh J., Singh S., Chen R., & Chen W. (2009).** Functional assembly of minicellulosomes on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface for cellulose hydrolysis and ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6087–6093.
- Tuller T., Waldman Y. Y., Kupiec M., & Ruppin E. (2010).** Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3645–3650.
- Ueda M., & Tanaka A. (2000).** Cell surface engineering of yeast: Construction of arming yeast with biocatalyst. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(2), 125–136.
- Uhlén M., Guss B., & Nilsson B. (1984).** Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *Journal of Biological Chemistry*, 259(3), 1695–1702.
- Valentin E., Herrero E., Javier Pastor F. I., & Sentandreu R. (1984).** Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 130(6), 1419–1428.

- Valkonen M., Penttilä M., & Saloheimo M. (2003).** Effects of Inactivation and Constitutive Expression of the Unfolded- Protein Response Pathway on Protein Production in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2065.
- Vallejo A. N., Pogulis R. J., & Pease L. R. (2008).** PCR mutagenesis by overlap extension and gene SOE. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(2).
- Van der Vaart J. M., Caro L. H. P., Chapman J. W., Klis F. M., & Verrips C. T. (1995).** Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 177(11), 3104–3110.
- Van der Vaart J. M., Te Biesebeke R., Chapman J. W., Toschka H. Y., Klis F. M., & Verrips C. T. (1997).** Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 615.
- Van Mulders S. E., Christianen E., Saerens S. M. G., Daenen L., Verbelen P. J., Willaert R., et al. (2009).** Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 9(2), 178–190.
- Voytas D. (1992).** Agarose Gel Electrophoresis. *Current Protocols in Immunology*, 2(1), 10.4.1-10.4.8.
- Wagner U. G., Petersen E. I., Schwab H., & Kratky C. (2002).** EstB from *Burkholderia gladioli*: A novel esterase with a  $\beta$ -lactamase fold reveals steric factors to discriminate between esterolytic and  $\beta$ -lactam cleaving activity. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 11(3), 467.
- Walker J. M. (1994).** The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 32, 5–8.
- Wang H., Lang Q., Li L., Liang B., Tang X., Kong L., et al. (2013).** Yeast surface displaying glucose oxidase as whole-cell biocatalyst: construction, characterization, and its electrochemical glucose sensing application. *Analytical Chemistry*, 85(12), 6107–6112.
- Wang Q., Li L., Chen M., Qi Q., & Wang P. G. (2008).** Construction of a novel *Pichia pastoris* cell-surface display system based on the cell wall protein Pir1. *Current Microbiology*, 56(4), 352–357.
- Wang T., Sun H., Zhang J., Liu Q., Wang L., Chen P., et al. (2014).** The establishment of *Saccharomyces boulardii* surface display system using a single expression vector. *Fungal Genetics and Biology*, 64, 1–10.

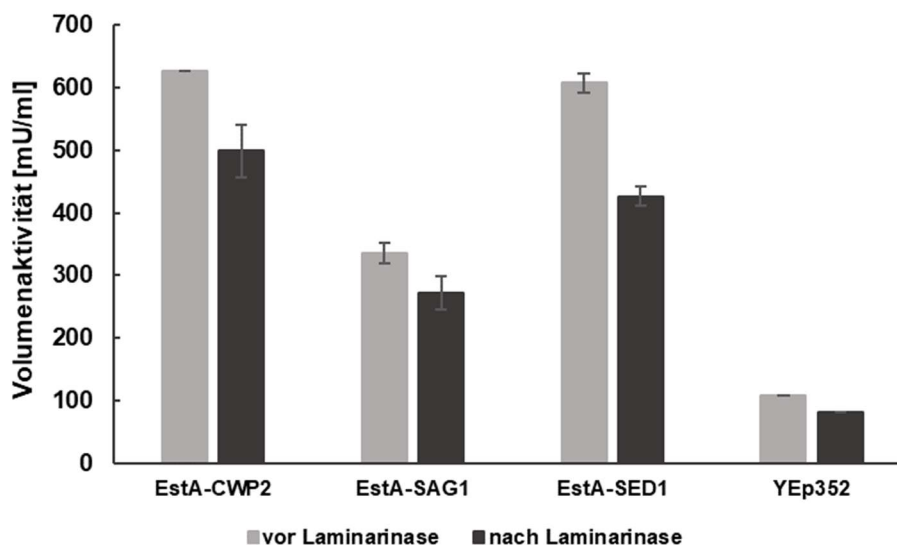
- Wang Z., Mathias A., Stavrou S., & Neville D. M. (2005).** A new yeast display vector permitting free scFv amino termini can augment ligand binding affinities. *Protein Engineering, Design & Selection*, 18(7), 337–343.
- Waring M. J. (1965).** Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 269–282.
- Washida M., Takahashi S., Ueda M., & Tanaka A. (2001).** Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5–6), 681–686.
- Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., & Marillonnet S. (2011).** A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *PLOS ONE*, 6(2), e16765.
- Weber K., & Osborn M. (1969).** The Reliability of Molecular Weight Determinations Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406–4412.
- Weckbecker A., Gröger H., & Hummel W. (2010).** Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 120, 195–242.
- Wei L., Wang Z., Zhang G., & Ye B. (2017).** Characterization of Terminators in *Saccharomyces cerevisiae* and an Exploration of Factors Affecting Their Strength. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 18(24), 2422–2427.
- Wen F., Sun J., & Zhao H. (2010).** Yeast Surface Display of Trifunctional Minicellulosomes for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1251.
- Wentz A. E., & Shusta E. V. (2007).** A novel high-throughput screen reveals yeast genes that increase secretion of heterologous proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1189–1198.
- Wernérus H., & Ståhl S. (2004).** Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40, 209.
- Wiggins C. A. R., & Munro S. (1998).** Activity of the yeast *MNN1* alpha-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), 7945–7950.

- Winston F., Dollard C., & Ricupero-Hovasse S. L. (1995).** Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast*, *11*(1), 53–55.
- Wojciechowicz D., Lu C.-F., Kurjan J., & Lipke P. N. (1993).** Cell surface anchorage and ligand-binding domains of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion protein alpha-agglutinin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(4), 2554–2563.
- Wu S., & Letchworth G. J. (2004).** High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*, *36*(1), 152–154.
- Xiong L., Zeng Y., Tang R. Q., Alper H. S., Bai F. W., & Zhao X. Q. (2018).** Condition-specific promoter activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, *17*(1), 1–15.
- Yamamoto K., Kurisu G., Kusunoki M., Tabata S., Urabe I., & Osaki S. (2001).** Crystal structure of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3 at 1.7 Å resolution. *Journal of Biochemistry*, *129*(2), 303–312.
- Yamanishi M., Ito Y., Kintaka R., Imamura C., Katahira S., Ikeuchi A., et al. (2013).** A genome-wide activity assessment of terminator regions in *Saccharomyces cerevisiae* provides a “terminatome” toolbox. *ACS Synthetic Biology*, *2*(6), 337–347.
- Yanase S., Hasunuma T., Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., et al. (2010).** Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *88*(1), 381–388.
- Yang L., Jin M., Du P., Chen G., Zhang C., Wang J., et al. (2015).** Study on enhancement principle and stabilization for the luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HRP chemiluminescence system. *PLoS ONE*, *10*(7).
- Yang N., Yu Z., Jia D., Xie Z., Zhang K., Xia Z., et al. (2014).** The contribution of Pir protein family to yeast cell surface display. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(7), 2897–2905.
- Yang S., Shen J., Deng J., Li H., Zhao J., Tang H., et al. (2022).** Engineering Cell Polarization Improves Protein Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*, *10*(10), 1–12.

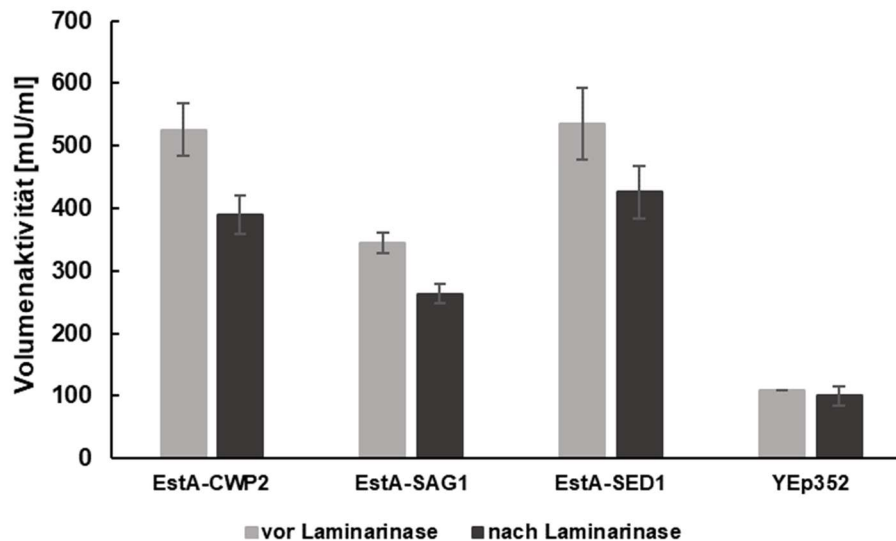
- Yang X., Tang H., Song M., Shen Y., Hou J., & Bao X. (2019).** Development of novel surface display platforms for anchoring heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–10.
- Yaron S., Morag E., Bayer E. A., Lamed R., & Shoham Y. (1995).** Expression, purification and subunit-binding properties of cohesins 2 and 3 of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *FEBS Letters*, 360(2), 121–124.
- Yin J., Li G., Ren X., & Herrler G. (2007).** Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 335–347.
- Yin Q. Y., De Groot P. W. J., Dekker H. L., De Jong L., Klis F. M., & De Koster C. G. (2005).** Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20894–20901.
- Yip C. L., Welch S. K., Klebl F., Gilbert T., Seidel P., Grant F. J., et al. (1994).** Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *MNN9* and *MNN1* genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(7), 2723–2727.
- Yu K., Liu C., Kim B. G., & Lee D. Y. (2015).** Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnology Advances*, 33(1), 155–164.
- Yue Q. K., Kass I. J., Sampson N. S., & Vrielink A. (1999).** Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants. *Biochemistry*, 38(14), 4277–4286.
- Yuzbasheva E. Y., Yuzbashev T. V., Laptev I. A., Konstantinova T. K., & Sineoky S. P. (2011).** Efficient cell surface display of Lip2 lipase using C-domains of glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(3), 645–654.
- Zabel F., Mohanan D., Bessa J., Link A., Fettelschoss A., Saudan P., et al. (2014).** Viral Particles Drive Rapid Differentiation of Memory B Cells into Secondary Plasma Cells Producing Increased Levels of Antibodies. *The Journal of Immunology*, 192(12), 5499–5508.

- Zarghampoor F., Behzad-Behbahani A., Azarpira N., Khatami S. R., Fanian M., Aghdaie M. H., et al. (2020).** A Single Tube Overlap Extension PCR Method for Splicing of Multiple DNA Fragments. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 12(1), 37.
- Zha J., Liu D., Ren J., Liu Z., & Wu X. (2023).** Advances in Metabolic Engineering of *Pichia pastoris* Strains as Powerful Cell Factories. *Journal of Fungi*, 9(10), 1–19.
- Zhang L., Liang S., Zhou X., Jin Z., Jiang F., Han S., et al. (2013).** Screening for glycosylphosphatidylinositol-modified cell wall proteins in *Pichia pastoris* and their recombinant expression on the cell surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5519–5526.
- Zhang Y., Min Z., Qin Y., Ye D. Q., Song Y. Y., & Liu Y. L. (2019).** Efficient Display of *Aspergillus niger*  $\beta$ -Glucosidase on *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall for Aroma Enhancement in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(18), 5169–5176.
- Zhao H., Shen Z. M., Kahn P. C., & Lipke P. N. (2001).** Interaction of  $\alpha$ -Agglutinin and  $\alpha$ -Agglutinin, *Saccharomyces cerevisiae* Sexual Cell Adhesion Molecules. *Journal of Bacteriology*, 183(9), 2874.
- Zhao S., Guo D., Zhu Q., Dou W., & Guan W. (2020).** Display of Microbial Glucose Dehydrogenase and Cholesterol Oxidase on the Yeast Cell Surface for the Detection of Blood Biochemical Parameters. *Biosensors*, 11(1), 1–12.
- Zhu B., Cai G., Hall E. O., & Freeman G. J. (2007).** In-Fusion™ assembly: Seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *BioTechniques*, 43(3), 354–359.
- Zlotnik H., Pilar Fernandez M., Bowers B., & Cabib E. (1984).** *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *Journal of Bacteriology*, 159(3), 1018.

## 8. Anhang

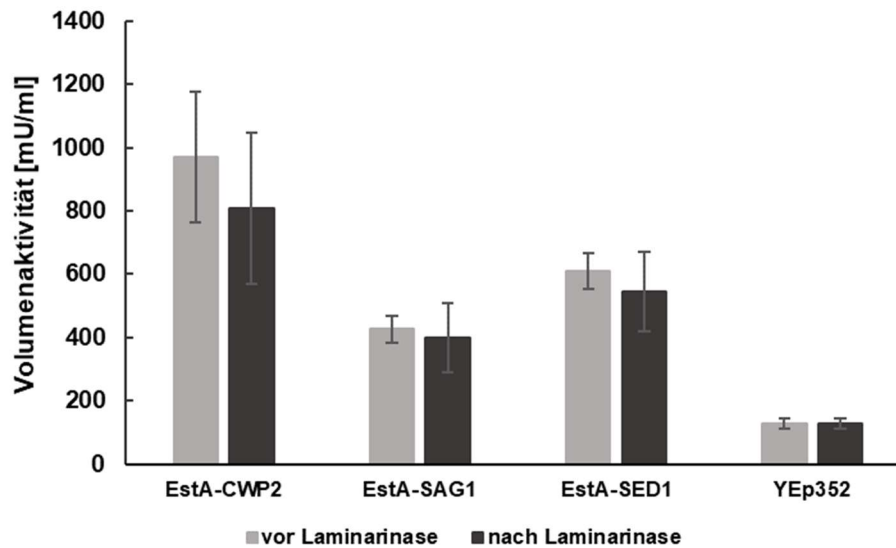


**Abb. 33: Volumenaktivitäten N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in isolierten Zellwänden des *S. cerevisiae*-Stamms BY4742 vor und nach Laminarinase-Behandlung.** Die N-terminalen Fusionskonstrukte der EstA aus *B. gladioli* mit den Ankerproteinen Sag1p, Sed1p und Cwp2p wurden im pFB2-Vektor in den BY4742-Stamm transformiert (Breinig *et al.*, 2006). Als Negativkontrolle wurde der Leervektor YEp352 genutzt. Die Zellwände wurden mithilfe eines mechanischen Zellaufschlusses mit Glasperlen und PMSF isoliert. Zum Verdau der  $\beta$ -glykosidischen Bindungen wurde als  $\beta$ -1,3-Glukanase eine Laminarinase aus *Trichoderma sp.* (0,15 U) eingesetzt. Die Bestimmung der Volumenaktivität vor und nach Glukanase-Behandlung erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Volumenaktivitäten der EstA-Fusionsproteine als Mittelwerte der Volumenaktivitäten [mU/ml] mit den zugehörigen Standardabweichungen vor und nach Glukanase-Verdau von drei biologischen Replikaten ( $n = 3$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden.

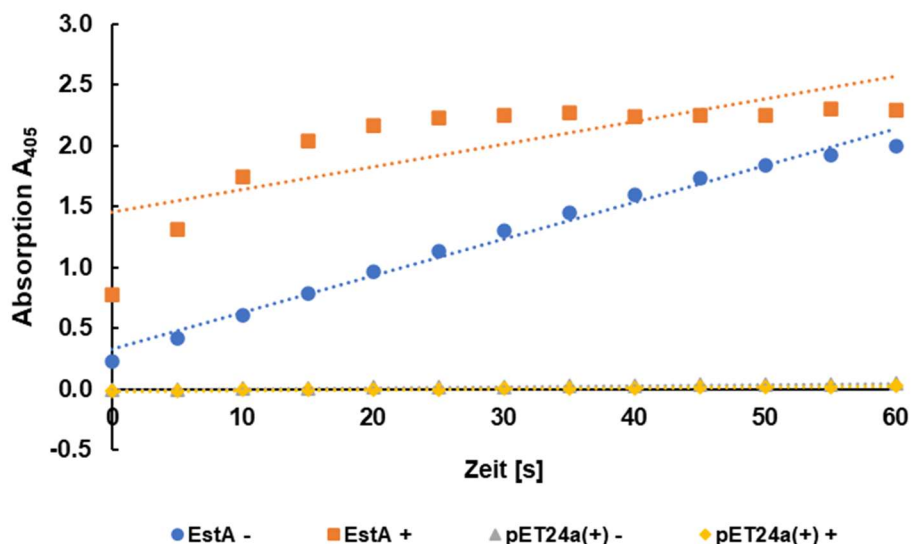


**Abb. 34: Volumenaktivitäten N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in isolierten Zellwänden des *S. cerevisiae*-Stamms SEY6210 vor und nach Laminarinase-Behandlung.** Die N-terminalen Fusionskonstrukte der EstA aus *B. gladioli* mit den Ankerproteinen Sag1p, Sed1p und Cwp2p wurden im pFB2-Vektor in den SEY6210-Stamm transformiert (Breinig *et al.*, 2006). Als Negativkontrolle wurde der Leervektor YEp352 genutzt. Die Zellwände wurden mithilfe eines mechanischen Zellaufschlusses mit Glasperlen und PMSF isoliert. Zum Verdau der  $\beta$ -glykosidischen Bindungen wurde als  $\beta$ -1,3-Glukanase eine Laminarinase aus *Trichoderma sp.* (0,15 U) eingesetzt. Die Bestimmung der Volumenaktivität vor und nach Glukanase-Behandlung erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Volumenaktivitäten der EstA-Fusionsproteine als Mittelwerte der Volumenaktivitäten [mU/ml] mit den zugehörigen Standardabweichungen vor und nach Glukanase-Verdau von drei biologischen Replikaten ( $n = 3$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden.

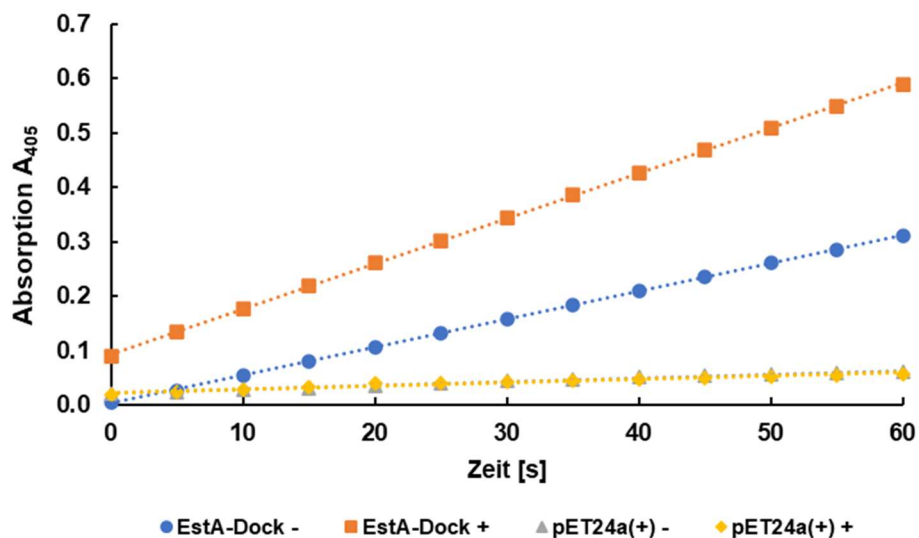




**Abb. 35: Volumenaktivitäten N-terminaler EstA-Fusionskonstrukte in isolierten Zellwänden des *S. cerevisiae*-Stamms S86c vor und nach Laminarinase-Behandlung.** Die N-terminalen Fusionskonstrukte der EstA aus *B. gladioli* mit den Ankerproteinen Sag1p, Sed1p und Cwp2p wurden im pFB2-Vektor in den S86c-Stamm transformiert (Breinig *et al.*, 2006). Als Negativkontrolle wurde der Leervektor YEp352 genutzt. Die Zellwände wurden mithilfe eines mechanischen Zellaufschlusses mit Glasperlen und PMSF isoliert. Zum Verdau der  $\beta$ -glykosidischen Bindungen wurde als  $\beta$ -1,3-Glukanase eine Laminarinase aus *Trichoderma* sp. (0,15 U) eingesetzt. Die Bestimmung der Volumenaktivität vor und nach Glukanase-Behandlung erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Volumenaktivitäten der EstA-Fusionsproteine als Mittelwerte der Volumenaktivitäten [mU/ml] mit den zugehörigen Standardabweichungen vor und nach Glukanase-Verdau von drei biologischen Replikaten ( $n = 3$ ), die jeweils in Tripletten gemessen wurden.



**Abb. 36: Aktivitätsnachweis der in *E. coli* produzierten EstA.** Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) wurde mit dem EstA-Konstrukt im pET24a(+) transformiert, welches ein N-terminales T7-Tag besaß. Die Bakterienzellen wurden bis zu einer  $OD_{600} = 1,0$  kultiviert, mit 100 mM IPTG 3 h bei 28 °C induziert und das Zellpellet wurde mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Zellaufschluss der induzierten EstA-exprimierenden Bakterienkulturen wurde mittels des „T7•Tag® Affinity Purification Kits“ anhand des T7-Tags über eine Säulenmatrix aufgereinigt und 20 µl des aufgereinigten Proteins wurden zum EstA-Assay eingesetzt. Der Nachweis der Aktivität erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Absorptionzunahmen der Überstände der EstA ohne Aufreinigung vor IPTG-Induktion („EstA -“) sowie der induzierten und aufgereinigten Elutionsfraktion F2 („EstA +“). Zusätzlich wurde der pET24a(+)-Leervektor ohne Aufreinigung vor („pET24a(+)-“) und nach IPTG-Induktion („pET24a(+)+“) betrachtet. Es wurden jeweils die Überstände eines biologischen Replikats ( $n = 1$ ) untersucht, welche in Tripletten gemessen wurden. Als Referenzen wurden Ansätze genutzt, die aus 890 µl Tris/HCl (pH 8,0) sowie 20 µl des Gemischs aus Elutions- und Neutralisationspuffer (für „EstA +“) bzw. 20 µl 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) (für „EstA -“; „pET24a(+)-“; „pET24a(+)+“) und 90 µl 50 mM *p*-Nitrophenylacetat zusammengesetzt waren.



**Abb. 37: Aktivitätsnachweis des in *E. coli* produzierten „EstA-Dock“-Fusionsproteins.** Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) wurde mit dem „EstA-Dock“-Konstrukt im pET24a(+) transformiert, welches ein N-terminales T7-Tag besaß. Die Bakterienzellen wurden bis zu einer  $OD_{600} = 1,0$  kultiviert, mit 100 mM IPTG 3 h bei 28 °C induziert und das Zelloppel wurde mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Zellaufschluss der induzierten, „EstA-Dock“-exprimierenden Bakterienkulturen wurde mittels des „T7•Tag® Affinity Purification Kits“ anhand des T7-Tags über eine Säulenmatrix aufgereinigt und 20 µl des aufgereinigten Proteins wurden zum EstA-Assay eingesetzt. Der Nachweis der Aktivität erfolgte anhand des Umsatzes des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm über einen Zeitraum von 1 min. Dargestellt sind die Absorptionzunahmen der „EstA-Dock“-Überstände ohne Aufreinigung vor IPTG-Induktion („EstA-Dock -“) sowie der induzierten und aufgereinigten Elutionsfraktion F2 („EstA-Dock +“). Zusätzlich wurde der pET24a(+)-Leervektor ohne Aufreinigung vor („pET24a(+)-“) und nach IPTG-Induktion („pET24a(+)+“) betrachtet. Es wurden jeweils die Überstände eines biologischen Replikats ( $n = 1$ ) untersucht, welche in Tripletten gemessen wurden. Als Referenzen wurden Ansätze genutzt, die aus 890 µl Tris/HCl (pH 8,0) sowie 20 µl des Gemischs aus Elutions- und Neutralisationspuffer (für „EstA-Dock +“) bzw. 20 µl 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) (für „EstA-Dock -“, „pET24a(+)-“, „pET24a(+)+“) und 90 µl 50 mM *p*-Nitrophenylacetat zusammengesetzt waren.

---

## Danksagung

Vorrangig möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Frank Breinig dafür danken, dass er mir die Möglichkeit zur Promotion mit einem sehr interessanten und vielseitigen Thema in seiner Arbeitsgruppe gegeben hat, wobei er stets ein offenes Ohr und unermüdliche Geduld bei Fragen aller Art hatte. Insbesondere möchte ich mich bei ihm dafür bedanken, dass er mich in jeder Lage bedingungslos unterstützt und mir auch während meiner Erkrankung jedmögliche Freiheiten eingeräumt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Marc Schneider für die Übernahme der wissenschaftlichen Begleitung und des Zweitgutachtens bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Mark Lommel, welcher mir vor allem in der Endphase meiner Promotion mithilfe seiner technischen Tüfteleien die Auswertung der enzymatischen Assays nicht nur stark erleichterte, sondern auch in Kombination mit den zugehörigen Diskussionen viel Spaß bereitete.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekular- und Zellbiologie für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner Promotion und die ständige Unterstützung auch während meines Ausfalls bedanken. Ein großer Dank geht hierbei insbesondere an Nicole Jundel, die mich nicht nur durch das Übernehmen von bürokratischen Aufgaben unterstützte, sondern auch stets ein offenes Ohr hatte und aufbauende Worte fand. Außerdem möchte ich mich sehr bei Ruth Kiefer, Stefanie Gier und Achim Bauer bedanken, die mir nicht nur den Alltag im Labor durch ihre produktiven Ideen erleichterten, sondern auch immer für alle möglichen Späße zu haben waren und für die damit verbundene Abwechslung sorgten. Zusätzlich bedanke ich mich herzlich bei meinen beiden Bachelor- und Masterstudentinnen Laura Höwing und Julia Mees für ihren Beitrag an dieser Doktorarbeit.

Der größte Dank geht jedoch an meine Eltern, welche mich während des kompletten Studiums und der Promotion bedingungslos unterstützt, mir in allen Lagen den Rücken freigehalten und somit das Gelingen dieser Doktorarbeit ermöglicht haben.