

# **Blaulicht-aktivierbares Proteinexpressionssystem in *Saccharomyces cerevisiae***



---

von Paul Demin

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“  
(Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin Synthetische Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Institut für Biochemie und Biologie  
Nachwuchsgruppe Cell2Fab  
der Universität Potsdam

Datum des Disputation: 19.08.2022

1. Gutachter: Prof. Dr. Katja Arndt (Universität Potsdam)
2. Gutachter: Dr. Katrin Messerschmidt (ehemals Cell2Fab Leiterin; Drägerwerk, Lübeck)
3. Gutachter: Prof. Dr. Peter Neubauer (Technische Universität Berlin)

Unless otherwise indicated, this work is licensed under a Creative Commons License Attribution 4.0 International.

This does not apply to quoted content and works based on other permissions.

To view a copy of this licence visit:

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Published online on the

Publication Server of the University of Potsdam:

<https://doi.org/10.25932/publishup-55969>

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-559696>

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>II</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Synthetische Biologie</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Zellfabrik</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Basale Transkriptionsmaschinerie</b> .....	<b>4</b>
1.3.1 Bindspezifische Transkriptionsfaktoren.....	4
1.3.2 Synthetische Transkriptionsfaktoren und Induktion .....	6
1.3.3 Optogenetik und Photorezeptoren.....	8
1.3.4 Cryptochrom ein Blaulichtrezeptor .....	8
<b>1.4 Zielsetzung</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>14</b>
2.1.1 Medium .....	14
2.1.2 Zellstämme .....	15
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.2.1 Herstellung Nullvektor Reporterplasmid .....	18
2.2.2 Herstellung Reporterplasmid.....	25
2.2.3 Herstellung Nullvektor Expressionsplasmid.....	29
2.2.4 Herstellung Expressionsplasmid .....	31
2.2.5 Genomische Integration der Reporter-kassette .....	34
2.2.6 Genomische Integration der Expressionskassette.....	36
2.2.7 Flirt System .....	38
2.2.8 Lichtexposition und Kultivierung .....	40
2.2.9 Durchflusszytometrische Methode für die Detektion von yEGFP .....	44
2.2.10 Protein- und Biochemische Methoden für die Detektion von VP1 .....	45
2.2.11 Softwareanalyse.....	49
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1 Generierte Reporterplasmide</b> .....	<b>50</b>
<b>3.2 Generierte Expressionsplasmide</b> .....	<b>52</b>
<b>3.3 Hintergrundbestimmung der Reporter-kassette</b> .....	<b>53</b>
3.3.1 Hintergrundsignal von GAL1 <i>core</i> Promotor mit und ohne Abstandshalter.....	54
3.3.2 Hintergrundsignal von ENO1 <i>core</i> Promotor mit und ohne Abstandshalter .....	56
<b>3.4 Flirt, zielgerichtete Transkription des Reportergens</b> .....	<b>58</b>
3.4.1 LexA und TarA ohne Abstandshalter .....	58
3.4.2 LexA Flirt System mit unterschiedlichen Aktivierungsdomänen.....	61
3.4.3 ENO1 <i>core</i> Promotor mit Abstandshalter und Expressionskassette .....	62
3.4.4 GAL1 <i>core</i> Promotor mit Abstandshalter und Expressionskassette .....	64
<b>3.5 Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Blaulichtexposition</b> .....	<b>67</b>
3.5.1 Flirt System LexA und PhiF im synthetischen- und Vollmedium.....	67
<b>3.6 Doppelte Lichtintensität</b> .....	<b>68</b>
<b>3.7 Dosierbarkeit der Transkription mit dem Flirt System</b> .....	<b>69</b>
3.7.1 Zeitpunkt-basierte Transkription .....	69
3.7.2 Tageslichtempfindlichkeit des Flirt Systems und Impuls-dosierte Transkription .....	70
3.7.3 Tageslicht und Blaulicht-Impulse der Flirt Systeme LexA, Bm3R1, TetR und PhiF .....	70
3.7.4 Blaulicht-Impulse der Flirt Systeme SrpR und TarA (2 und 4x Bindestelle) .....	71
<b>3.8 Stammübertragung. Das Flirt System im industriell verwendetem CEN.PK Stamm</b> .....	<b>72</b>
<b>3.9 Langzeitmessung unter Blaulichtexposition</b> .....	<b>74</b>
3.9.1 Durchflusszytometrische Auswertung der PhiF Reporter-kassette und des PhiF Flirt Systems.....	74
3.9.2 Optische Dichte, Auswertung der PhiF Reporter-kassette und des PhiF Flirt Systems.....	75
3.9.3 Po-Pro-1 Auswertung der PhiF Reporter-kassette und des PhiF Flirt Systems .....	76

<b>3.10</b>	<b>Upscaling vom Flirt System im Photobioreaktor .....</b>	<b>76</b>
3.10.1	Upscaling LexA Flirt System, Kultivierung bei 30 °C.....	77
3.10.2	Upscaling PhiF Flirt System, Kultivierung bei 23 °C.....	78
<b>3.11</b>	<b>Rotlichtsystem Phi-LexA und Flirt System .....</b>	<b>80</b>
3.11.1	Phi-LexA, unterschiedliche PCB-Konzentrationen und Lichtmodi.....	80
3.11.2	Flirt System unter verschiedenen Lichtmodi .....	82
<b>3.12</b>	<b>Flirt mit VP1.....</b>	<b>83</b>
3.12.1	Silberfärbung und Western Blot .....	83
<b>3.13</b>	<b>Mischkultur .....</b>	<b>85</b>
3.13.1	Coomassie Färbung und Western Blot der Bioreaktor-Proben.....	86
3.13.2	Coomassie Färbung und Western Blot der <i>Deepwell</i> -Proben.....	88
3.13.3	Durchflusszytometrische Auswertung der Vorkulturen.....	89
3.13.4	Durchflusszytometrische Auswertung der Mischkultur im Bioreaktor.....	90
3.13.5	Durchflusszytometrische Auswertung der Mischkultur in <i>Deepwells</i> .....	93
3.13.6	Mischkultur unter Tageslichtbedingung .....	94
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>98</b>
4.1	Geringe basale Transkription und starke Aktivierung.....	98
4.2	Zeitpunktbasierte und Feinregulierung der Proteinexpression .....	100
4.3	Kein Einfluss von Blaulicht auf die Zellteilung .....	102
4.4	Industrielle Nutzung .....	103
4.5	Lichtkombination.....	105
4.6	Zusammenfassung und Ausblick .....	107
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
5.1	Danksagung.....	114
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>115</b>
<b>6.1</b>	<b>Sequenzen.....</b>	<b>115</b>
6.1.1	Nullvektoren Reporterplasmid .....	115
6.1.2	Nullvektor Expressionsplasmid .....	118
6.1.3	Bindestellen .....	121
6.1.4	<i>Core</i> Promotor .....	122
6.1.5	DNA-Bindedomänen .....	122
6.1.6	Sonstige .....	124
<b>6.2</b>	<b>Phi-LexA System ohne PCB Zugabe .....</b>	<b>124</b>
<b>6.3</b>	<b>Bioreaktor .....</b>	<b>125</b>
	<b>Eigenständigkeitserklärung .....</b>	<b>127</b>

### Zusammenfassung

Synthetische Transkriptionsfaktoren bestehen wie natürliche Transkriptionsfaktoren aus einer DNA-Bindedomäne, die sich spezifisch an die Bindestellensequenz vor dem Ziel-Gen anlagert, und einer Aktivierungsdomäne, die die Transkriptionsmaschinerie rekrutiert, sodass das Zielgen exprimiert wird. Der Unterschied zu den natürlichen Transkriptionsfaktoren ist, sowohl dass die DNA-Bindedomäne als auch die Aktivierungsdomäne wirtsfremd sein können und dadurch künstliche Stoffwechselwege im Wirt, größtenteils chemisch, induziert werden können. In dieser Arbeit wurden neue optogenetische synthetische Transkriptionsfaktoren entwickelt, sodass die chemische Induktion obsolet wird. Dabei ist die DNA-Bindedomäne nicht mehr an die Aktivierungsdomäne, sondern mit dem Blaulicht-Photorezeptor CRY2 gekoppelt. Die Aktivierungsdomäne wurde mit dem Interaktionspartner CIB1 fusioniert. Unter Blaulichtbestrahlung dimerisieren CRY2 und CIB1 und damit einhergehend die beiden Domänen, sodass ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor entsteht. Es wurden sechs verschiedene prokaryotischen DNA-Bindedomänen und insgesamt zwei verschiedene Aktivierungsdomänen, viral und fungal, mit CRY2 bzw. CIB1 rekombiniert und in die eukaryotische Zellfabrik *Saccharomyces cerevisiae* genomisch integriert. Da die Blaulicht - Dimerisierung auf dem Chromophor FAD basiert, welches die Hefe selbst synthetisieren kann, musste für die Induktion nur das Blaulicht angeschaltet werden. Verifiziert wurde das konstruierte System mit Hilfe des Reporters yEGFP, welcher durchflusszytometrisch detektiert werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass die yEGFP Expression variabel gestaltet werden konnte, indem unterschiedlich lange Blaulichtimpulse ausgesendet wurden, die DNA-Bindedomäne, die Aktivierungsdomäne oder die Anzahl der Bindestellen, an dem sich die DNA-Bindedomäne anlagert, verändert wurden.

Um das System für industrielle Anwendungen attraktiv zu gestalten, wurde das System vom *Deepwell*-Maßstab auf Photobioreaktor-Maßstab hochskaliert. Außerdem erwies sich das Blaulichtsystem sowohl im Laborstamm YPH500 als auch im industriell oft verwendeten Hefestamm CEN.PK als funktional. Des Weiteren konnte das industrierelevante Protein VP1 ebenso mit Hilfe des verifizierten Systems exprimiert werden.

Aufgrund der großen Flexibilität wurde das hier etablierte Blaulichtsystem **Flirt** (Flexible Blaulicht induzierte Transkription) getauft.

Schlussendlich konnte in dieser Arbeit das etablierte Flirt System erfolgreich mit einem Rotlichtsystem kombiniert werden, was zuvor noch nicht beschrieben wurde.

## Abkürzungen

### Abkürzungen

AU	Willkürliche Einheit ( <i>Arbitrary unit</i> )
CIB1	Cry-Interaktion <i>basic helix loop helix</i> 1
CRY	Cryptochrome
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
Flirt	<b>F</b> lexible <b>B</b> laulich <b>t</b> induzierte <b>T</b> ranskription
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid	IPTG
LB	<i>Lysogeny broth</i>
NLS	Kernlokalisationsignal ( <i>Nuclear localization signal</i> )
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ori	<i>origin of replication</i>
PCB	Phycocyanobilin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PhyB	Phytochrome B
PhyBNT	PhyB N-Terminaler Abschnitt
PIF3	<i>Phytochrome-interacting factor 3</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Synthetisch definiertes (Medium)
TFII	TATA-box-bindendes-Protein assoziierten Faktoren zur Rekrutierung der Polymerase II
<i>yEGFP</i>	<i>yeast Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
YPDA	Hefeextrakt Pepton Dextrose Adenin ( <i>Yeast Peptone Dextrose Adenin</i> )

# 1 Einleitung

## 1.1 Synthetische Biologie

Laut Cameron (2014) hatte die synthetische Biologie ihre Geburtsstunde in den 1960er Jahre mit der Entdeckung des Lac Operons. Die eigentliche synthetische Biologie, im heutigen Sinne der modernen Wissenschaft, steckte zu dieser Zeit noch in den Anfängen. Die Entwicklung wichtiger labortechnischer Methoden, wie die Klonierungstechnik und die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) in den 1970er und 80er Jahren, sowie die Einbeziehung der Informationstechnik in die DNA-Sequenzierung ab den 1990ern, trugen wesentlich zur Etablierung der synthetischen Biologie bei (Cameron et al. 2014). Eine eindeutige internationale Definition der synthetischen Biologie gibt es nicht (Pühler et al. 2011; Grunwald et al. 2016). Als interdisziplinäre Wissenschaft wird sie verschieden interpretiert. Eine gängige Definition ist, dass die synthetische Biologie neue oder verbesserte biologische Systeme mit Hilfe von angewandten technischen Methoden designt, konstruiert und charakterisiert. So soll die angewandte Ingenieurbiologie zuverlässig, sicher als auch planbar gestaltet werden (Zhao 2013). Synthetische Biologie bietet heutzutage Anwendungen in verschiedenen Bereichen. Dazu zählt die Herstellung von Biokraftstoffen, die Sanierung von Böden und Gewässern als auch die Herstellung von Bioplastik, welches biologisch abgebaut werden soll. Wichtige Teildisziplinen der synthetischen Biologie sind die Synthese künstlicher Chromosomen, ganzer Genome, *Bottom-up*, *Top-Down* und die Xenobiologie (Pühler et al. 2011; Schmidt 2012).

Mit Hilfe der synthetischen Biologie sollen unter anderem programmierbare und steuerbare Zellfabriken erschaffen werden (Kavscek et al. 2015). Diese steuerbaren Zellfabriken, die neue Stoffwechselwege in dem Wirt erlauben, sollen sowohl robust und flexibel als auch einfach zu kontrollieren sein (Kavscek et al. 2015; Andres et al. 2019). Eine dieser Zellfabriken ist *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Die moderne synthetische Biologie erlaubt es das Genom der Hefe spezifisch nach den Wünschen der Anwender zu ändern. Die DNA der Hefe ist besser annotiert als andere eukaryotische Zellen und somit besser verstanden (Hittinger 2013). Die synthetische Biologie öffnet dabei neue Möglichkeiten für die Hefe als Zellfabrik (Huang et al. 2014).

### 1.2 *Saccharomyces cerevisiae* als Zellfabrik

*Saccharomyces cerevisiae*, aus dem Latein *saccharum* für Zucker und griechisch *mykes* für Pilz, also der Zuckerpilz, gehört zu den Eukaryoten. Die Hefe ist ein einzelliger Organismus und besitzt, im Gegensatz zu den Prokaryoten, einen Zellkern, in dem die Erbinformation von 12 Mega-Basenpaare auf 16 Chromosomen gespeichert ist (Goffeau et al. 1996; Hittinger 2013). Das erste eukaryotische Genom, das vollständig sequenziert und publiziert wurde, war das der Hefe im Jahr 1996. Dabei wurden knapp 6000 Gene annotiert (Goffeau et al. 1996). Die Hefe ist eine der ältesten Mikroorganismen, die der Mensch bewusst und nicht-bewusst für sich domestiziert hat. (Tramper and Zhu 2011).

Die Hefe ist ein Modellorganismus. Für ihre Wahl als Modellorganismus spricht, sowohl dass sie eine robuste als auch effiziente und kosteneffiziente Zellfabrik ist und dass posttranslationale Modifikationen realisierbar sind. Sie ist im Vergleich zu Insekten- oder Säugerzellen weniger anspruchsvoll gegenüber dem Medium. Diese Zellfabrik besitzt eine gute Teilungsrate und lässt sich gentechnisch einfach modifizieren. Zudem lässt sie sich in einem definierten Medium, welches einfach skalierbar ist, gut kultivieren (Ferrer-Miralles et al. 2009; Mattanovich et al. 2012; Vieira Gomes et al. 2018; Thak et al. 2020). Rekombinante Proteine lassen sich intrazellulär als auch über den Sekretionsweg herstellen. Die Sekretion von Proteinen findet in der *Saccharomyces* ähnlich wie in höher entwickelten Eukaryoten statt. Diese Sekretion rekombinanter Proteine in das Medium bietet der Industrie, in der Proteine mit hohem Durchsatz hergestellt werden, viele Vorteile. Die sogenannten *downstream* Prozesse werden dadurch effizient und vereinfacht. Beispielsweise entfällt das Aufbrechen der Zellwand und Zellmembran mit Detergenzien, die Proteine denaturieren können. Somit werden nachgeschaltete und kostspielige Renaturierungsschritte gespart (Thak et al. 2020). Damit ist die Hefe eine der populärsten Zellfabriken, vor allem auch für die Industrie (Mattanovich et al. 2012; Baghban et al. 2019)

Die Hefe wird in vielen Bereichen als Zellfabrik eingesetzt. Dazu gehören die Kosmetik-, Lebens- und Pharmaindustrie sowie die Herstellung von Biokraftstoffen (Nielsen 2015). In der Lebensmittelherstellung sind es beispielsweise Bernsteinsäure, Resveratrol und der mikrobielle Labersatz Chymosin. Zu den pharmazeutischen Proteinen gehören Insulin, das Humanalbumin als auch Virus-ähnliche Partikel. (Tramper and Zhu 2011; Nielsen 2015; Vieira Gomes et al. 2018). Dabei sind Virus-ähnliche Partikel, wie das VP1, essenziell für die Herstellung von Impfstoffen der nächsten Generation (Norkiene et al. 2015; Kim and Kim 2017). Insgesamt

## Einleitung

werden 20% der biopharmazeutischen Produkte in *S. cerevisiae* hergestellt (Ferrer-Miralles et al. 2009).

Eine plasmidbasierte Expression ist der gängige Standard, da er recht einfach ist. Jedoch hat diese Methode gravierende Nachteile. Beispielsweise können Tochterzellen jeweils unterschiedliche Kopien-Anzahl an Plasmiden tragen, was wiederum in unterschiedlichen Produktionsrate pro Zelle resultieren kann. Auch können falsch replizierte Plasmide das richtige Plasmid verdrängen und somit die Expression des Zielgens völlig zum Erliegen bringen (Tyo et al. 2009). Der genomische Einbau bietet hingegen eine stabile Weitergabe der gewünschten Geninformation. Dies ist besonders wichtig für industrielle Zwecke, bei denen im großen Maßstab und über längere Dauer kultiviert wird (Li et al. 2019; Thak et al. 2020).

Generell gibt es nicht „den einen idealen“ *S. cerevisiae* Stamm, der je nach Labor und Zielvorgabe universal verwendet werden kann. CEN.PK ist ein sehr ausführlich beschriebener Stamm, der vollständig sequenziert ist und sich deshalb gut als Modellstamm eignet. Außerdem wird CEN.PK in der Industrie für die Expression heterologener Proteine verwendet (van Dijken et al. 2000; Baghban et al. 2019). YPH500 ist ebenso ein weitverbreiteter *S. cerevisiae* Stamm. Dieser Stamm wurde 1989 aus dem Urstamm YNN216 erzeugt und ist kongen mit dem S288C Stamm. Zu dieser Zeit waren molekularbiologische Werkzeuge begrenzt verfügbar, sodass YPH500 durch Rückkreuzungen entstanden ist. Dadurch wurden mehr auxotrophe Marker erzeugt als YNN216 aufweist (Sikorski and Hieter 1989; Louis 2016). Ein auxotropher Marker ist eine molekularbiologisch erzeugte Deletion in einem Genabschnitt, der ein Enzym für die Synthese einer Aminosäure kodiert. Kann die Aminosäure selbst nicht mehr synthetisiert werden und wird essenziell, muss sie entweder dem Medium zugegeben oder die Gensequenz für das entsprechende Enzym muss in die Hefe eingebracht werden. Auxotrophe Marker sind somit Selektionsmarker gleichzusetzen. Gleichzeitig erzeugen auxotrophe Marker neue Genloci für eine zielgerichtete Genomintegration von Plasmiden (Sikorski and Hieter 1989).

Für die Produktion diverser Chemikalien und Proteine in *S. cerevisiae* kann man verschiedene Kultivierungsverfahren wählen. Das technisch einfachste stellt dabei das sogenannte Batch-Verfahren dar. Es ist ein geschlossenes Verfahren, in der pro Kultivierung nur eine Charge produziert wird (Chmiel 2011). Ist dieses Verfahren einmal etabliert, lässt es sich um ein Fed-Batch Verfahren erweitern. Das Fed-Batch Verfahren ist ein teiloffenes System, bei dem Medium bzw. Chemikalien wie Glukose mit der Zeit nachdosiert werden können (Chmiel 2011). In der Industrie wird vor allem im Fed-Batch Verfahren kultiviert, da es sich als sehr effizient in der Gewinnung heterologer Proteine erwiesen hat (Mattanovich et al. 2014).

Für die erfolgreiche Nutzung von *S. cerevisiae* als Zellfabrik ist es jedoch notwendig, die relevanten Transkriptions- und Expressionsvorgänge genau zu kennen und zu verstehen. Dieses soll in dem folgenden Kapitel näher beschrieben werden.

### 1.3 Basale Transkriptionsmaschinerie

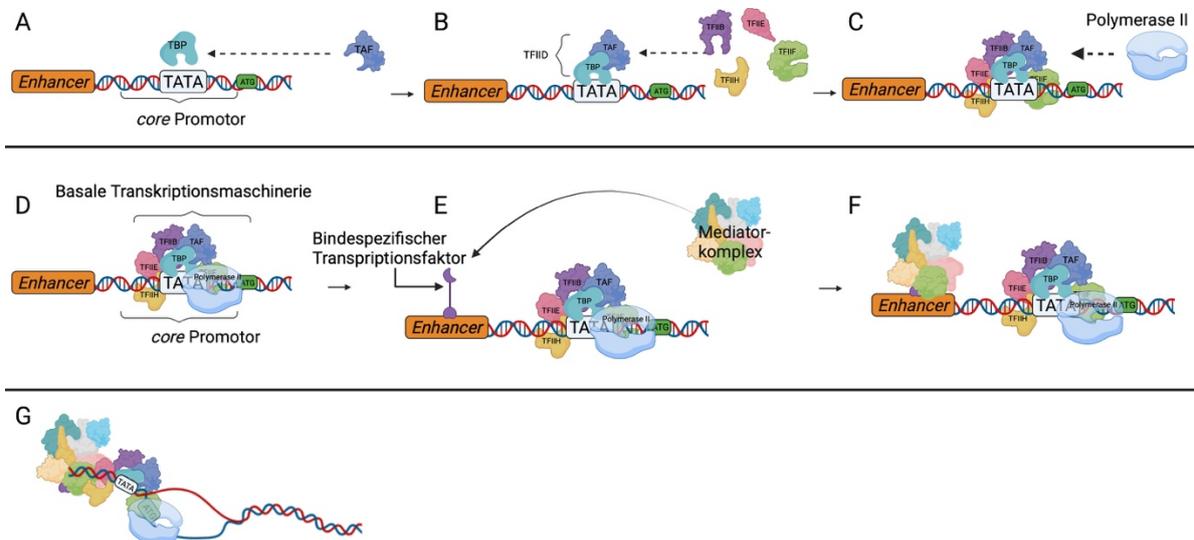
Ob und wie stark ein gewünschtes Gen exprimiert wird, hängt von vielen Faktoren ab und ist sehr komplex. Die Transkription-Start-Seite, auch als *core* Promotor bekannt, ist ein wesentlicher Bestandteil. In dem *core* Promotor befindet sich die TATA Box, die eine Bindestelle für den basalen Transkriptionsfaktor TATA-box-bindendes-Protein darstellt. Wenn das TATA-box-bindende-Protein erfolgreich binden kann, bewirkt es eine Anlagerung von weiteren basalen Transkriptionsfaktoren, den sogenannten TATA-box-bindendes-Protein assoziierten Faktoren. Es bilden sich Komplexe und die Polymerase II wird rekrutiert. Aus letzterem Grund, werden diese assoziierten Faktoren mit TFII abgekürzt (Byrne et al. 2014; Carlberg and Molnar 2020). Der erste riesige Komplex aus TATA-box-bindendes-Protein und TFII ist das sogenannte TFIID (Carlberg and Molnar 2020). Dieser Komplex hat ähnliche Eigenschaften wie Nukleosome, da sich die DNA stabilisierend um das TFIID windet. Weitere Komplexe wie TFIIB, TFIIF, TFIIE und TFIIH lagern sich an (Carlberg and Molnar 2020). Diese Stabilität ermöglicht es der Polymerase II, die mit dem Komplex ebenfalls interagiert, sich räumlich korrekt zu positionieren. Der vollständige Komplex, aus den oben genannten Proteinen, wird als basale Transkriptionsmaschinerie bezeichnet (Abbildung 1A-D) (Carlberg and Molnar 2020). Vor der Transkription wird die doppelsträngige DNA durch die DNA Helikase ERCC3, eine Untereinheit des Komplexes TFIIH, entwunden. Damit nun die Polymerase II erfolgreich das Gen transkribieren kann, muss diese von dem Komplex gelöst werden. Dieses wird bewirkt, indem eine weitere Untereinheit von TFIIH die Polymerase phosphoryliert und folglich entlässt (Carlberg and Molnar 2020).

#### 1.3.1 Bindespezifische Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind das Herzstück einer Genexpression. Sie sind Proteine, die spezifisch an DNA-Abschnitte binden. Um dieses zu bewerkstelligen, besitzen sie eine DNA-Bindedomäne (Zhao and Zeng 2018). Neben der DNA-Bindedomäne besitzen sie eine Aktivierungsdomäne. Beide Domänen können in der Regel gut voneinander unterschieden werden (Carlberg and Molnar 2020). Basale Transkriptionsfaktoren (Kapitel 1.3) sind essenziell für die Positionierung der Polymerase II, bewirken jedoch nur eine geringe

## Einleitung

Expression des Gens. Die Transkriptionsstärke, und damit die Expression des Gens, wird erst durch bindespezifischen Transkriptionsfaktoren, die sich spezifisch an die *Enhancer*-Sequenz anlagern, (Abbildung 1E) deutlich verstärkt (Byrne et al. 2014; Carlberg and Molnar 2020). *Enhancer* sind Verstärker und können bis zu 1000 Basenpaare vor dem eigentlichen Gen entfernt liegen oder auch in unmittelbarer Umgebung des *core* Promotors. Der daran bindende bindespezifische Transkriptionsfaktor modifiziert das Chromatin (Chen and Dent 2014). Dabei sind zwei Faktoren entscheidend. Zum einen ist die spezifische Bindung der DNA-Bindedomäne an den *Enhancer* wichtig. Diese Bindung wird vor allem durch Wasserstoffbrücken aufgebaut, meist bestehend aus sechs Basen (Carlberg and Molnar 2020). Zum anderen rekrutiert die Aktivierungsdomäne des bindespezifischen Transkriptionsfaktors Ko-Aktivatoren, sogenannte Mediatoren, die einen Mediator-komplex bilden. (Boija et al. 2018; Carlberg and Molnar 2020). Dieser Mediator-komplex stimuliert die basale Transkriptionsmaschinerie mit der Folge, dass das Gen verstärkt transkribiert wird (Abbildung 1F&G) (Allen and Taatjes 2015; Carlberg and Molnar 2020). Die genauen Abläufe der Interaktion sind bis heute nur unvollständig geklärt (Allen and Taatjes 2015).

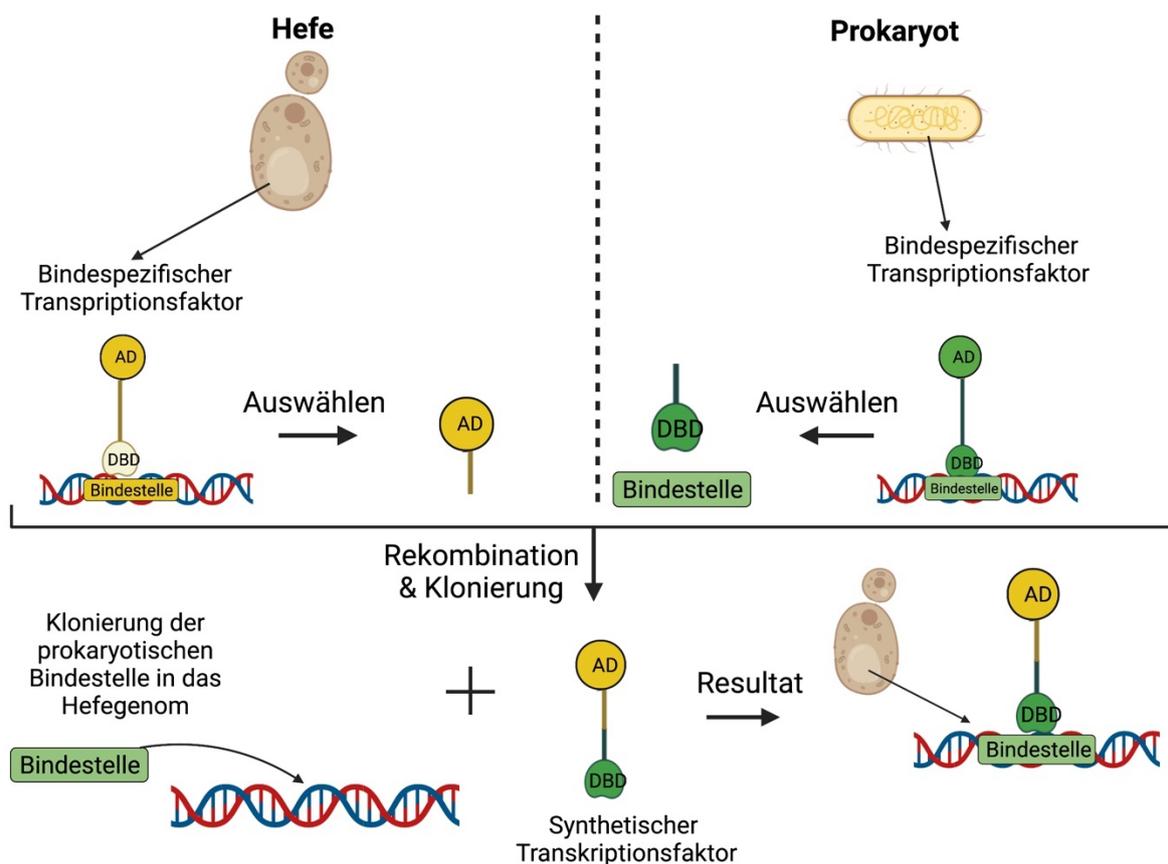


**Abbildung 1 Basale Transkriptionsmaschinerie und bindespezifische Transkriptionsfaktoren.**

Das TATA-box-bindendes-Protein (TBP) bindet an die TATA Sequenz, die sich im *core* Promotor und unmittelbar vor dem Start-Codon ATG befindet (A). Folgend lagert sich der TBP-assoziierte-Faktor, TFIID, an, wodurch der TFIID Komplex entsteht und weitere Faktoren sich anlagern (B). Diese Komplexe rekrutieren die Polymerase II (C) und es entsteht die basale Transkriptionsmaschinerie (D). Bindspezifische Transkriptionsfaktoren binden an ihre spezifische DNA-Sequenz (*Enhancer*) (E) und rekrutieren Mediatorproteine, die zusammen ein Mediator-komplex bilden (D). Dieser Mediator-komplex stimuliert die basalen Transkriptionsmaschinerie am *core* Promotor, sodass die Expression des Gens erheblich gesteigert wird (G). Abbildung modifiziert nach (Carlberg and Molnar 2020). Created with BioRender.com

### 1.3.2 Synthetische Transkriptionsfaktoren und Induktion

Mit Hilfe der synthetischen Biologie lassen sich völlig neue Transkriptionsfaktoren, sogenannte synthetische Transkriptionsfaktoren zusammenstellen. Synthetische Transkriptionsfaktoren bestehen aus orthogonalen Bausteinen, die im Zielorganismus möglichst autark eine Genexpression auslösen und somit *off target* Effekte vermieden werden sollen (Machens et al. 2017; Rantasalo et al. 2018). Da Transkriptionsfaktoren vereinfacht betrachtet aus einer DNA-Bindedomäne und einer Aktivierungsdomäne bestehen, können diese zwei Domänen frei rekombiniert werden (Abbildung 2). Beispielsweise wurden pflanzlich basierte als auch prokaryotische DNA-Bindedomänen mit fungalen und viralen Aktivierungsdomänen rekombiniert und als orthogonales Transkriptionssystem in *S. cerevisiae* erfolgreich implementiert (Brent and Ptashne 1985; McIsaac et al. 2013; Naseri et al. 2017; Rantasalo et al. 2018).



**Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung der Herstellung von synthetischen Transkriptionsfaktoren.**

Eine fungale Aktivierungsdomäne wird mit einer prokaryotischen DNA-Bindedomäne rekombiniert und in die Hefe eingebaut. Damit dieser rekombinierter synthetischer Transkriptionsfaktor binden kann, muss die Bindestelle, an dem sich die DNA-Bindedomäne spezifisch anlagert, ebenfalls in die Hefe eingebracht werden.  
 Created with BioRender.com

## Einleitung

Ein Vorteil bei der Nutzung von prokaryotischen DNA-Bindedomänen ist, dass diese evolutionär weit entfernt von der eukaryotischen Hefe sind und damit ein orthogonales System geschaffen wird (Rantasalo et al. 2018). In dieser Arbeit wurden nur prokaryotische DNA-Bindedomänen verwendet. Dazu zählt die LexA, PhiF, Bm3R1, SrpR, TetR, und TarA. Alle der eben genannten sind bakterielle Repressorproteine und gehören, bis auf LexA, der TetR Familie an (Ramos et al. 2005; Butala et al. 2009).

Viele solcher Systeme basieren auf der Zugabe von chemischen Induktoren für die Aktivierung der synthetischen Transkriptionsfaktoren und damit der Expression oder Inhibition des Zielgens (Lee et al. 2007; Lu et al. 2009; Machens et al. 2017; Rantasalo et al. 2018). Gängige chemische Induktoren sind Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG), Arabinose, Tetracyclin, Galaktose und das Hormon  $\beta$ -Estradiol (Guzman et al. 1995; Lee et al. 2007; McIsaac et al. 2013; Ikushima and Boeke 2017). Die chemische Induktion hat viele Nachteile. Zum einen verändern zugesetzte Chemikalien die Mediumzusammensetzung, gleichzeitig werden die Produktionskosten erhöht, wenn in größeren Maßstäben, wie in Bioreaktoren, gearbeitet wird (Choi et al. 1994; Hughes et al. 2012a). Ein Beispiel dafür ist die Induktion des Lac Operon durch Laktose oder IPTG. Dabei ist IPTG die kostspieligste Substanz im Medium. Außerdem stellt IPTG eine Verunreinigung des Mediums dar. Diese müsste bei der Herstellung vom Biopharmazeutika im Rahmen der GMP Richtlinien im letzten Schritt aufwendig entfernt werden (Cardoso et al. 2020). Denn im Gegensatz zu Laktose wird IPTG von den Zellen nicht verstoffwechselt (Kroemer 2021). Weitere Nachteile sind eine unpräzise Dosierung und die Möglichkeit die Genexpression wieder auszuschalten (Choi et al. 1994; Hughes et al. 2012a). Zudem sind Kreuzaktivierungen und damit *off-target* Effekte nahezu unvermeidbar, wenn in einer Zelle mehrere Signalwege chemisch induziert werden sollen (Lee et al. 2007). Weitere Nachteile finden sich in der Kultivierung von Zellen. Beispielweise werden Galaktose induzierte Promotoren durch Glukose gehemmt. In glukosereichem Medium wachsen Hefezellen jedoch deutlich besser. Für die Induktion müssten die Zellen umständlich aus dem Glukosemedium geerntet werden und schließlich im frischen galaktosereichen Medium weiter kultiviert werden (Choi et al. 1994; Hughes et al. 2012a). Eine einfachere Methode, im Vergleich zu der chemischen Induktion, bieten sogenannte synthetische Transkriptionsfaktoren, die auf Photorezeptoren basieren.

### 1.3.3 Optogenetik und Photorezeptoren

Pflanzen sind ortsgebunden und haben dadurch Eigenschaften adaptiert, effizient auf externe Stimuli aus ihrer Umwelt zu reagieren. Zu diesen adaptiven Anpassungen zählen unter anderem Photorezeptoren (Braguy and Zurbriggen 2016).

Die Optogenetik verwendet lichtsensitive Proteine, die auf spezifische Wellenlänge reagieren. Licht wird verwendet, um die Repression oder Transkription von Zielgenen hervorzurufen (Banerjee and Mitra 2020). Zudem basiert die Konformationsänderung der Photorezeptoren auf sogenannten Chromophoren. Dabei agieren Chromophore als Bindeglied, welche physikalische Reize, in diesem Fall Licht, in biochemische Aktivität umwandeln, beispielsweise die Konformationsänderung des Photorezeptors (Fraikin et al. 2013; Banerjee and Mitra 2020). Es wird versucht die Struktur der Photorezeptoren besser zu verstehen, weitere zu finden und optogenetische synthetische Photorezeptoren zu entwickeln (Banerjee and Mitra 2020). Die Bandbreite von Photorezeptoren geht von UVB bis zum nahen Infrarot (Banerjee and Mitra 2020). Darunter fallen beispielsweise UV-B Rezeptoren, die zwischen 290 nm bis 320 nm arbeiten, Blaulicht- und Ultraviolett-rezeptoren, die im Wellenlängenbereich 320 nm bis 500 nm aktiviert werden und Rotlichtrezeptoren, die im Wellenlängenbereich 600 nm bis 750 nm agieren (Fraikin et al. 2013; Banerjee and Mitra 2020). Dabei können Photorezeptoren entweder autark mit sich selbst oder mit einem sogenannten Interaktionspartner dimerisieren, beispielsweise Cryptochrome 2 (CRY2) mit dem Partner Cry-Interaktion *basic helix loop helix* 1, kurz CIB1 (Kennedy et al. 2010; Kawano et al. 2015; Banerjee and Mitra 2020).

Der Einsatz von Photorezeptoren bzw. Licht gegenüber chemisch induzierten Systemen bietet viele Vorteile. Zu diesen zählt die einfache Verfügbarkeit von Licht, eine Reversibilität der Reaktion durch An- und Ausschalten des Lichts und die Minimierung von *off-target* Effekten (Banerjee and Mitra 2020). Zudem wird das Kulturmedium nicht verändert und Chemikalien müssen nicht von der Zelle aufgenommen werden. Licht bzw. Lichtphotonen sind adhoc in den Zellen verfügbar und Licht kann über eine Zeit dosierend eingesetzt werden (Hughes et al. 2012a).

### 1.3.4 Cryptochrom ein Blaulichtrezeptor

Es existieren drei Hauptklassen von Flavin-Photorezeptoren. Dazu zählen *Light Oxygene Voltage*, kurz LOV, *Blue Light sensors Using FAD*, verkürzt BLUF und Cryptochrome (CRY) (Fraikin et al. 2013; Conrad et al. 2014). Cryptochrome sind für den circadianen Rhythmus von Tieren und Pflanzen verantwortlich, da sie auf die Umwelteinflüsse direkt reagieren (Thompson

## Einleitung

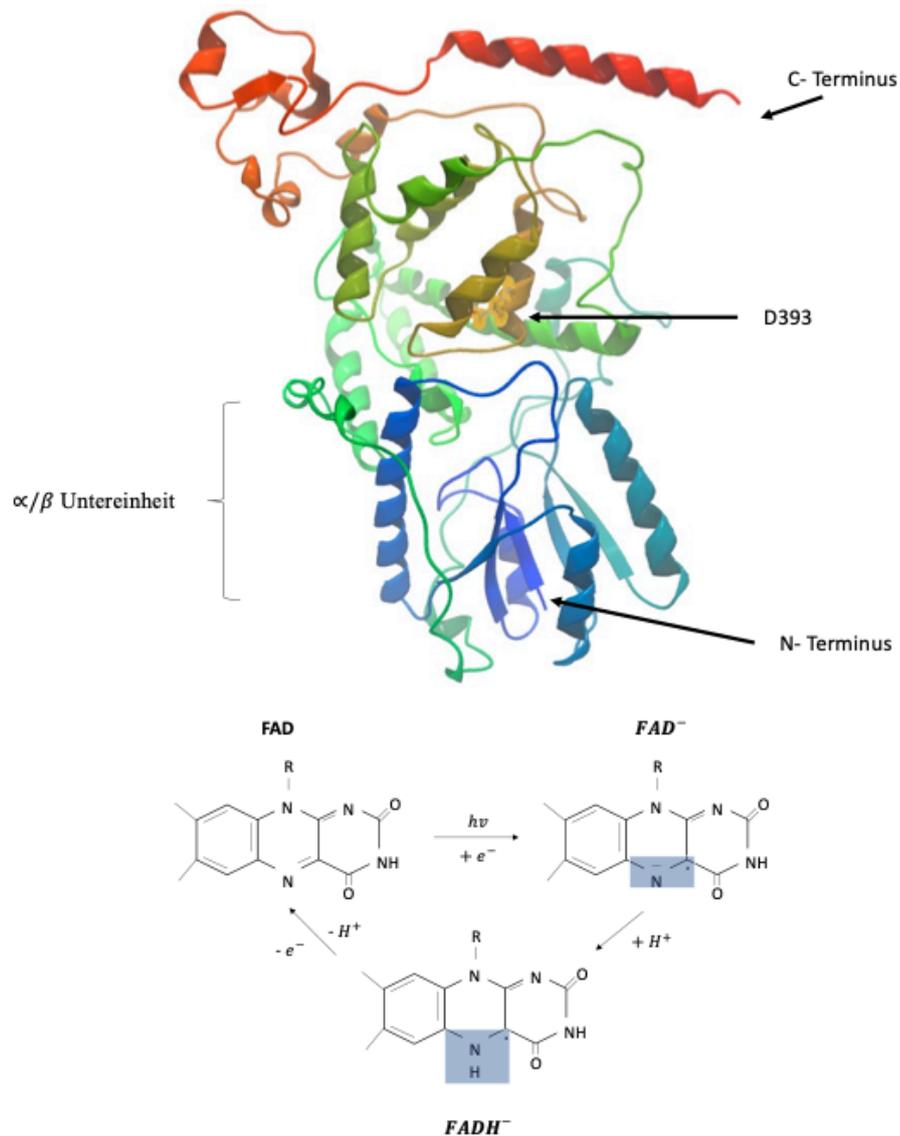
and Sancar 2002). Das erste Cryptochrom, das CRY1 wurde in der *Arabidopsis thaliana* entdeckt mit der Annahme, dass es sich um einen Blaulichtrezeptor handeln könnte. (Ahmad and Cashmore 1993; Fraikin et al. 2013). Es folgte das CRY2 und weist eine Sequenzhomologie von circa 50% zu CRY1 auf (Hoffman et al. 1996; Lin et al. 1998). CRY1 reguliert die Vergeilung in der Pflanze, CRY2 ist für das Blühen verantwortlich (Ahmad and Cashmore 1993; Guo et al. 1998; Lin et al. 1998; Liu et al. 2018).

Cryptochrome besitzen N-terminal eine sogenannte photolytische homologe Region (PHR) und sind damit eng verwandt mit Photolyasen, die mit Hilfe von Licht UV Schäden an der DNA reparieren können (Conrad et al. 2014). CRYs selbst haben diese photolytische Eigenschaften verloren, da sie an der konservierten Stelle ein Leucin statt ein Tryptophan besitzen, das nötig für die DNA-Anlagerung und enzymatische Reaktion ist (Kim et al. 1992; Lin et al. 1998; Thompson and Sancar 2002; Fraikin et al. 2013). Jedoch ist die Eigenschaft erhalten geblieben, dass Cryptochrome an der PHR den Chromophor Flavin Adenin Dinukleotid (FAD) nicht-kovalent binden können (Fraikin et al. 2013; Conrad et al. 2014; Yamada et al. 2020).

Cryptochrome werden durch ihren variablen C-Terminus unterschieden. Dieser ist in der Dunkelphase inaktiv. Die aktive Form wird erreicht indem das FAD, welches sich im Dunkeln an den N-Terminus anlagern kann, mit Blaulicht bestrahlt wird und den C-Terminus aktiviert (Yang et al. 2000; Sang et al. 2005; Fraikin et al. 2013). Dabei ist es essenziell, dass CRYs mit Hilfe der PHR lichtunabhängig Homodimere oder Oligodimere bilden (Sang et al. 2005). Diese Dimere sind die Voraussetzung für eine Blaulicht induzierte Aktivierung des C-Terminus (Sang et al. 2005; Goett-Zink et al. 2021).

Ein oxidiertes FAD lagert sich lichtunabhängig an das CRY an. Blaulicht reduziert FAD zum Anionradikal  $FAD^{\cdot-}$  (Abbildung 3). Als Elektronendonator fungiert dabei ein konserviertes Tryptophan. Die Asparaginsäure an Position 393 dient als Protonendonator, sodass ein neutrales  $FADH^{\cdot}$  Radikal, auch Semiquinon genannt, gebildet wird. Diese semiquinone Form erzeugt eine Konformationsänderung im N-Terminus, der  $\alpha/\beta$  Untereinheit (Abbildung 3) von CRY2 (Losi and Gartner 2012; Fraikin et al. 2013; Conrad et al. 2014; Schroeder et al. 2018; Goett-Zink et al. 2021). Ein Adenosintriphosphat, das sich ebenfalls in dieser Region anlagert, stabilisiert das neutrale Radikal und damit die Konformationsänderung für Minuten statt Millisekunden (Immeln et al. 2007; Schroeder et al. 2018; Goett-Zink et al. 2021).

## Einleitung



**Abbildung 3** Dreidimensionale Proteinstruktur von CRY2 und die Radikalbildung vom Chromophor FAD.

Unter Blaulicht wird FAD zu einem Anionradikal reduziert. Das geschieht über ein konserviertes Tryptophan in CRY2, das als Elektronendonator fungiert. Gleichzeitig gibt die Asparaginsäure D393 ein Proton an das Anionradikal, sodass das neutrale Radikal FADH $^{\cdot}$  entsteht und die Konformationsänderung in CRY2 ausgelöst wird. CRY2 3D erstellt mit Phyre<sup>2</sup> (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). Unteres Bild: *Created with BioRender.com*

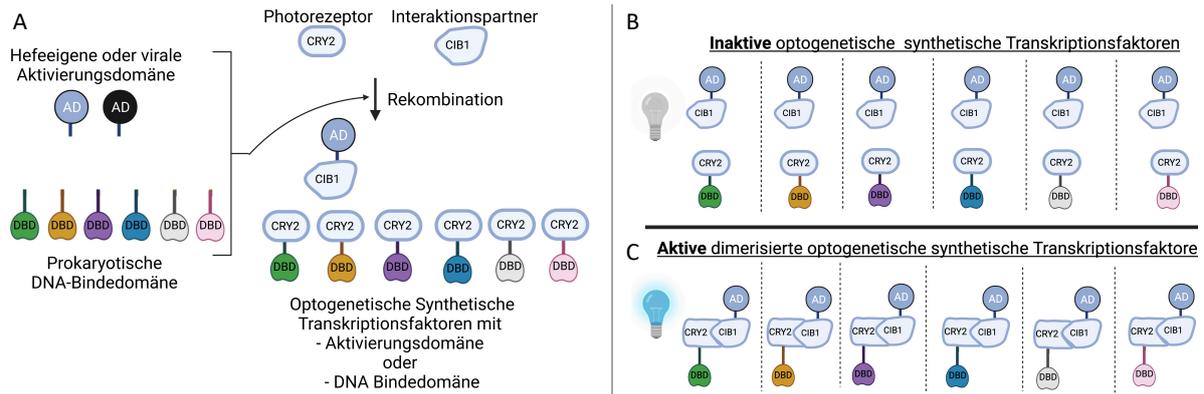
Es wurden keine Cryptochrome in *S. cerevisiae* annotiert, sodass sie eine ideale Wahl für die Konstruktion eines orthogonalen Transkriptionssystem in der Hefe sind (Thompson and Sancar 2002; Robertson et al. 2013). Außerdem kann *S. cerevisiae* das Chromophor FAD selbst synthetisieren. Dieser Chromophor wird unter anderem für Protolyasen gebraucht, die, im Gegensatz zu den Cryptochromen, in der Hefe annotiert sind (Thompson and Sancar 2002; Bafunno et al. 2004; Liu et al. 2008; Robertson et al. 2013).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass CRY2 mit CIB1 nur unter Blaulicht, aber nicht unter Rotlicht oder im Dunkeln, interagiert (Liu et al. 2008). Zudem bedarf es einer hohen Lichtintensität. Beispielweise interagieren beide Proteine stärker bei der Lichtintensität von  $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$  als bei  $15 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$  (Liu et al. 2008). CRY2 und sein Interaktionspartner CIB1 dimerisieren sehr schnell und effektiv. So konnte bestätigt werden, dass diese innerhalb von 10 Sekunden zu 90% dimerisieren und dass gedimmtes Licht diese Reaktion nicht auslöst. Gleichzeitig dissoziieren beide Proteine innerhalb weniger Minuten im Dunkeln (Kennedy et al. 2010). Diese lichtabhängige Heterodimerisierung von CRY2 und CIB1 kann genutzt werden, um optogenetische synthetische Transkriptionsfaktoren zu konstruieren und somit ein lichtabhängiges Transkriptionsverfahren zu etablieren (Kennedy et al. 2010; Conrad et al. 2014; Yamada et al. 2020).

### 1.4 Zielsetzung

Synthetische Transkriptionsfaktoren sind rekombinante Proteine. Dabei ist entweder die DNA-Bindedomäne, die Aktivierungsdomäne oder beide Domänen sind aus wirtsfremden Organismen (Machens et al. 2017; Naseri et al. 2017; Rantasalo et al. 2018). Diese synthetischen Transkriptionsfaktoren können das Zielgen entweder nur inhibieren oder aktivieren (Rantasalo et al. 2018). Außerdem sind diese synthetischen Transkriptionsfaktoren konstitutiv aktiv oder werden chemisch, meist durch IPTG, induziert (Machens et al. 2017; Naseri et al. 2017; Rantasalo et al. 2018). In dieser Arbeit sollten neue **optogenetische** synthetische Transkriptionsfaktoren etabliert werden. Dabei sollte der Blaulichtrezeptor CRY2 (siehe Kapitel 1.3.4) mit sechs unterschiedlichen prokaryotischen DNA-Bindedomänen (LexA, PhiF, Bm3R1, SrpR, TetR, oder TarA, (siehe Kapitel 1.3.2) fusioniert werden. CIB1, der Interaktionspartner von CRY2, sollte mit zwei unterschiedlichen Aktivierungsdomänen rekombiniert werden (Abbildung 4). Dieses Systems sollte eine chemische Induktion obsolet machen, da nur Blaulicht genutzt werden sollte, um die Transkription zu einem gewählten Zeitpunkt zu induzieren. Der Blaulichtrezeptor CRY2 verwendet FAD als Chromophor, der die Konformationsänderung unter Blaulicht induziert. Da *S. cerevisiae* FAD selbst synthetisieren kann, wird eine Blaulicht-induzierte Gen-Transkription ermöglicht, die im Gegensatz zu einem Rotlicht basierten Transkriptionssystem, keine additive Zugabe von wirtsfremden gebildeten Chromophoren, wie beispielsweise Bilin, notwendig macht (Bafunno et al. 2004; Kennedy et al. 2010).

## Einleitung



**Abbildung 4 Schematische Darstellung optogenetischer synthetischer Transkriptionsfaktoren.**

Eine fungale oder virale Aktivierungsdomäne wird dem CRY2 Interaktionspartner CIB1 rekombiniert. Prokaryotische DNA-Bindedomänen werden mit dem Photorezeptor CRY2 rekombiniert (A). Rechts sind sechs Pärchen von optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktoren gezeigt. Unter Dunkelbedingungen sind diese in der inaktiven Form (B). Unter Blaulichtbestrahlung dimerisieren die Pärchen und bilden aktive dimerisierte optogenetische synthetische Transkriptionsfaktoren (C). *Created with BioRender.com*

Solche auf visuellem Licht basierende Systeme sind bisher in der synthetischen Biologie selten und vor allem in der Zellfabrik Hefe weitestgehend unbeschrieben. Es existieren nur auf einzelne synthetische Transkriptionsfaktoren reduzierte und primär in Säugerzellen implementierte Systeme (Hochrein et al. 2017; Salinas et al. 2017; de Mena et al. 2018; Banerjee and Mitra 2020; Naseri and Koffas 2020). Hefezellen bieten die Vorteile eukaryotischer Expressionssysteme, beispielweise eine posttranslationale Modifikation, weisen im Vergleich zu Säugerzellen jedoch eine wesentlich höhere Zellteilungsrate auf und sind als Zellfabrik etabliert für die Produktion diverser biopharmazeutischer Proteine. Säugerzellen sind in der Kultivierung im Vergleich zu Hefezellen deutlich anspruchsvoller und kostenintensiver (Wang et al. 2017; Vieira Gomes et al. 2018; Gunduz Ergun et al. 2019).

Dieses Blaulichtsystem sollte in die Hefe Zellfabrik YPH500 genomisch integriert werden. Die Verifizierung dieses Systems sollte mittels des Reporters *yeast enhanced green fluorescent protein* (yEGFP) erfolgen, der durchflusszytometrisch gemessen werden sollte. Der Reporter yEGFP ist ein durch Mutationen konstruiertes GFP, das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde. Da yEGFP effizientere Reportereigenschaften im Vergleich zu GFP in *S. cerevisiae* aufweist, wurde es für diese vorliegende Arbeit verwendet (Cormack et al. 1997).

Eine Bestrahlung mit Blaulicht hat gegenüber chemischen Induktoren oder konstitutiv exprimierten aktiven synthetischen Transkriptionsfaktoren den Vorteil, dass es zeitlich und in definierter Intensität eingesetzt und vor allem ausgeschaltet werden kann. Außerdem sollte erforscht werden, wie sensitive das System auf Tageslicht reagiert, inwieweit die Zusammensetzung des Mediums einen Einfluss auf die Funktionalität des Systems ausübt und

## Einleitung

ob *core* Promotoren sowie die Anzahl der Bindestellen, an denen sich die DNA-Bindedomäne anlagert, einen Einfluss auf die yEGFP Expression haben und inwieweit sich das Blaulicht auf die Teilungsrate der Zellfabrik auswirkt.

Im Fall einer erfolgreichen Etablierung, sollte das System im Hinblick auf seine industrielle Nutzung auf Funktionalität, wie *Upscaling* und den Einsatz anderer Hefestämme, getestet werden. Dazu sollte das Blaulichtsystem, neben dem im Labor verwendeten YPH500 Hefestamm, vorzugsweise in den von der Industrie genutzten CEN.PK (siehe Kapitel 1.2) Hefestamm genomisch integriert werden. Die Nutzung optogenetischer Werkzeuge in industrierelevanten Hefestämmen wurde bisher unzureichend getestet und ihr potenzieller Gewinn für die Produktion bestimmter Zielproteine unterschätzt (Salinas et al. 2017).

Für das *Upscaling* sollte das Blaulichtsystem vom *Deepwell*- auf Bioreaktor-Maßstab hochskaliert werden, um industrienaher Kulturbedingungen zu schaffen und zu überprüfen. Zudem sollte die Expression eines weiteren industrierelevanten Proteins unter Einfluss des Blaulichtsystems erforscht werden, um die alternierenden Anwendungsmöglichkeiten zu validieren und die Vielfältigkeit des Systems damit zu belegen.

Final sollte nach erfolgreicher Konstruktion des Blaulichtsystems die Funktionsweise mit einem auf alternierender Wellenlänge basierendem Lichtsystem kombiniert werden. Diese Kombination zweier Lichtsysteme ist bisher nicht in der Hefe beschrieben worden und könnte einen vielversprechenden Ansatz sowohl für die Erforschung Photorezeptor-basierter Expressionssysteme als auch für die industrielle Anwendung derer darstellen (Naseri and Koffas 2020).

## 2 Material und Methoden

Gängige Chemikalien, Enzyme und gängiges Verbrauchsmaterial wurden von Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe), Clontech (Takara Bio Company), Merck (Darmstadt), New England BioLabs® (NEB) (Frankfurt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Medium

Die Medien, die in der dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien**

Medium	Zusammensetzung
<b>Lysogeny Broth (LB)</b> (optional Agarplatten) in ddH <sub>2</sub> O pH 7,2; Lagerung bei 5 °C	Pepton (10 g/ L), Hefeextrakt (5 g/ L), Natriumchlorid (10 g/ L), (optional Agar (15 g/ L))
<b>Hefeextrakt-Pepton-D-Glukose-Adenin (YPDA)</b> (optional Agar-Platten) in ddH <sub>2</sub> O pH 6,5; Lagerung bei 5 °C	Pepton (20 g/ L), Hefeextrakt (10 g/ L), Adenin-Hemisulfat (60 mg/ L), Glucose 2 g/ L, (Agar (20 g/ L))
<b>Synthetisch definiert (SD)</b> (optional Agarplatten) in ddH <sub>2</sub> O pH 5,8; Lagerung bei 5 °C	Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren, Folsäure und Riboflavin (Formedium, UK) (6,9 g/ L), Glukose (2 g/ L), (Agar (20 g/ L))

Um die geeigneten SD-Medien für die auxotrophen Hefestämme herzustellen, wurden entsprechende Aminosäuren in Form von *Drop-out* (Takara Bio Company, F) Supplemente hinzugefügt.

Für das SD-Medium wurde das „*Yeast Nitrogen Base without Amino Acids, Folic Acid & Riboflavine*“ der Firma Formedium, mit der Bestellnummer CYN6502, verwendet.

Die Medien wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 15-20 min autoklaviert. Glukosehaltige Medien wurden ohne Glukose autoklaviert. Glukose wurde sterilfiltriert und dem Medium vor Verwendung zugesetzt.

Es wurden Carbenicillin oder Kanamycin (50 µg/ mL, Endkonzentration) für die selektive Vermehrung in *E. coli* verwendet.

### 2.1.2 Zellstämme

In Tabelle 2 werden die prokaryotischen und eukaryotischen Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, aufgelistet.

**Tabelle 2: *S. cerevisiae* und *E.coli* Stämme**

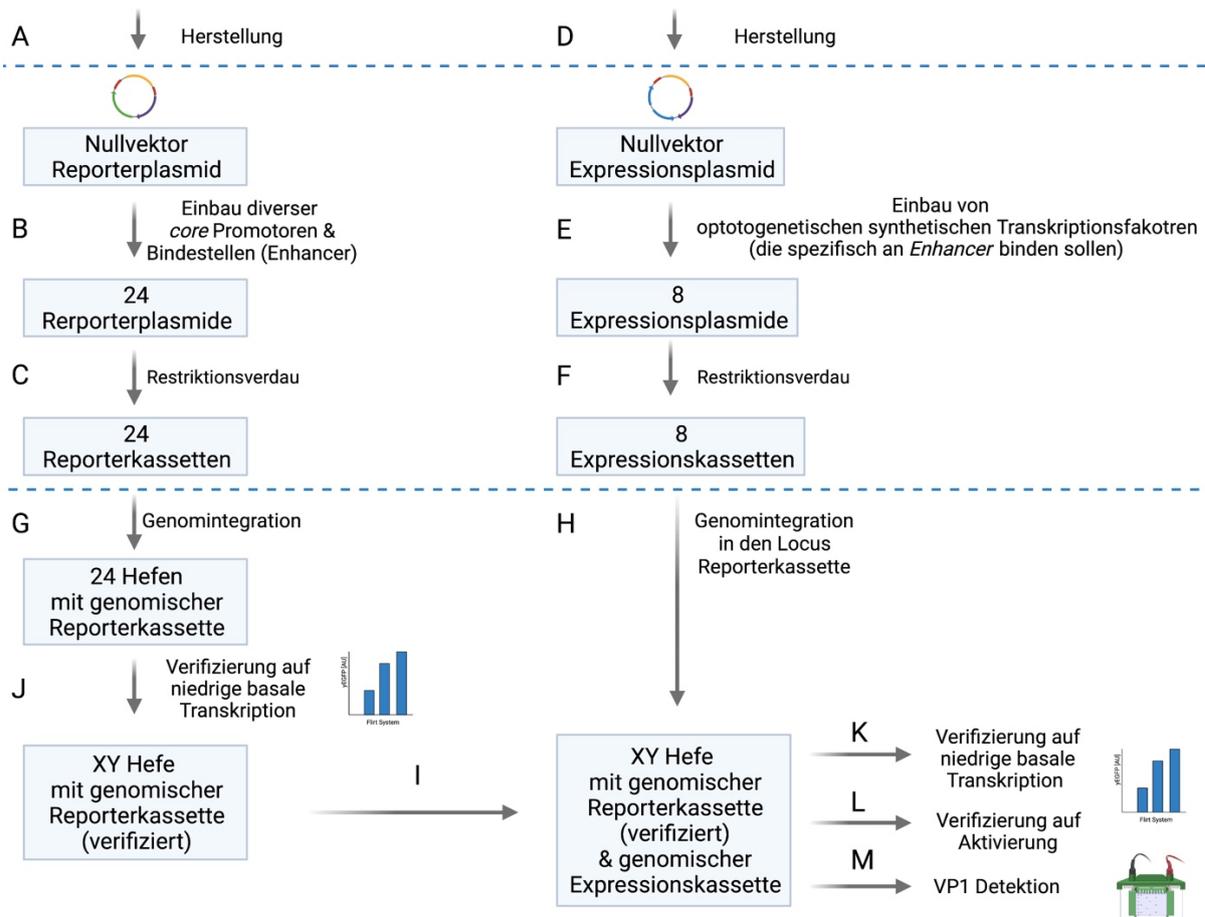
<b>Organismus</b>	<b>Stamm</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Referenz</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YPH500	<i>MATα ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>	ATCC 76626
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CEN.PK2-1C	<i>MATα; his3-Δ1; leu2-3; ura3-52; trp1-289; MAL2-8c; SUC2</i>	Euroscarf 30000A
<i>Escherichia coli</i>	NEB 5-alpha	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	NEB, Frankfurt am Main, DE
<i>Escherichia coli</i>	NEB 10-beta	<i>Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	NEB, Frankfurt am Main, DE

### 2.2 Methoden

Im Rahmen der Arbeit wurden Licht-aktivierbare Transkriptionsfaktoren generiert und anschließend charakterisiert. Es wurden dabei eine Vielzahl von genetischen Konstrukten hergestellt, welche für die unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren kodieren. Dabei wurde zu Beginn der Arbeit ein Vektorsystem entwickelt, welches die einfache und schnelle Klonierung der Transkriptionsfaktoren und deren anschließenden Einbau in das Hefegenom ermöglicht. Dieses Vektorsystem besteht aus zwei sogenannten Nullvektoren. Diese trennen alle geplanten Konstrukte in ein Reporterplasmid und ein Expressionsplasmid auf. Dabei trägt das Reporterplasmid das Reportergen und einen künstlichen Promotor, welcher die DNA-Bindestelle für den synthetischen Transkriptionsfaktor beinhaltet. Im Expressionsplasmid wird der synthetische Transkriptionsfaktor an sich, besteht aus DNA-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne, kodiert. Dabei werden diese beiden Domänen jeweils mit einem Baustein des Licht-reaktiven Proteinpaars kombiniert.

Im Folgenden wird zuerst auf die Planung und Herstellung des Nullvektors Reporterplasmid eingegangen, anschließend auf die Klonierung der Reporterplasmide (Einbau der DNA-Bindestelle und des *core* Promotors in den Nullvektor Reporterplasmid). Darauf folgen wird die Planung und Herstellung des Nullvektors Expressionsplasmid und damit einhergehend der Konstruktion der Expressionsplasmide (Einbau der synthetischen Transkriptionsfaktoren in Nullvektor Expressionsplasmid) beschrieben. Im weiteren Verlauf wird dann die Integration der Reporter- und Expressionskassetten in das Hefegenom dargestellt. Abschließend wird die Charakterisierung der generierten Blaulicht-Induzierbaren Proteinexpressionssysteme beschrieben (siehe Methodenablauf in Abbildung 5).

## Material und Methoden



**Abbildung 5 Schematischer Ablauf der Methoden.**

Der Ablauf der Methoden erfolgt alphabetisch, von A bis L. Begonnen wird mit der Herstellung des Nullvektors Reporterplasmid (A), gefolgt mit der Konstruktion der Reporterplasmide (B) und die daraus resultierenden Reporter-kassetten (C). Analog folgt die Herstellung des Nullvektors Expressionplasmid bis zu den resultierenden Expressions-kassetten (D-E). Sind diese Methoden abgeschlossen, wird auf die genomische Insertion dieser Kassetten eingegangen (G und H). Es folgt die Beschreibung des konstruierten Blaulichtsystems (I). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde sowohl die basale Transkription der Hefen mit integrierter Reporter-kassette (J) als auch der Hefenmutanten, die die Reporter- und Expression-kassette genomisch integriert hatten, detektiert (K). Außerdem wurde bei den zuletzt genannten Hefenmutanten durchflusszytometrisch ermittelt, ob diese durch Blaulichtbestrahlung den yEGFP Reporter exprimierten (L). Wurde VP1 als Reporter gewählt, so wurde es durch protein- und biochemische Methoden detektiert (M). *Created with BioRender.com*

## 2.2.1 Herstellung Nullvektor Reporterplasmid

Der Nullvektor Reporterplasmid sollte so konturiert werden, dass er zwei getrennt voneinander Parteien beinhaltet, eine bakterielle und eine fungale. Die bakterielle Partie sollte für die Vervielfältigung in *E. coli* dienen, die fungale für die genomische Integration in Hefe. Außerdem sollte der Nullvektor einen Reporter tragen, jedoch ohne *core* Promotor und *Enhancer* (Bindestellen). Hier sollten Restriktionsschnittstellen berücksichtigt werden, sowohl dass ein flexibles Einsetzen gewünschter Promotoren und Bindestellen ermöglicht wird als auch dass der Reporter bei Bedarf getauscht werden kann. Final sollte berücksichtigt werden, dass, nach Fertigkonstruktion und genomischen Einbau, die entsprechenden Gensequenzen für den optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktor, die sich auf einem anderen Plasmid (Expressionsplasmid) befinden, sich zielgerichtet in den ersten Part genomisch einbauen lassen.

### 2.2.1.1 Genmaterial für Nullvektor

Für die Konstruktion des Nullvektor Reporterplasmid wurden folgende Sequenzbausteine benötigt (Tabelle 3).

**Tabelle 3** Gensequenzen für den Nullvektor Reporterplasmid

Name	Funktion	Quelle/ Template
<i>origin of replication (ori)</i> (pBR322)	Bakterielle Amplifikation	pGN005B
Carbenicillin-Resistenzgen (inklusive Promotor und Terminator)	Bakterieller Selektionsmarker	pGN005B
Imidazoleglycerin-Phosphat-Dehydratase (HIS3) (inklusive Promotor und Terminator)	Auxotropher Marker für die Hefe	pGN005B
yEGFP (inklusive CYC1 Terminator)	Reporter	pGN005B
Box A	Gerichtete genomische Integration in den Locus <i>ura3-52</i> von Hefe	pGN005B
Box BC	Gerichtete genomische Integration in den Locus <i>ura3-52</i> von Hefe, ermöglicht zudem den Einbau der Expressionskassette	pGN005B

pGN005B aus der Publikation (Naseri et al. 2017).

Die Herstellung des Nullvektors Reporterplasmid wurde mittels Homologie-basierter Methoden durchgeführt. Dafür wurden die benötigten Gensequenzen mittels PCR amplifiziert und damit gleichzeitig homologe Überhänge zur jeweils im finalen Plasmid benachbarten Sequenz eingebracht. Alle Primer wurden im sequenzspezifischen Teil auf 58-62°C Schmelztemperatur mit dem Tm Calculator von NEB (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>) designt. Die homologen Überhänge waren sequenzidentisch zur jeweils benachbarten Sequenz und waren unabhängig von der Sequenz immer 25-35 basenpaare lang. Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomic synthetisiert. Alle Plasmide wurden mittels Sequenzierung überprüft.

### 2.2.1.2 Amplifikation der benötigten Gensequenzen

Die Amplifikation der benötigten Gensequenzen wurde mittels PCR durchgeführt. Dafür wurde die Phusion DNA-Polymerase (ThermoFisher, Bestellnummer F-530L) verwendet. Die Polymerase wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden, wenn nötig, mit bis zu 3% DMSO versetzt. Die PCRs wurden in 20µl oder 50µl Ansätzen durchgeführt (Tabelle 4).

**Tabelle 4 PCR Ansatz für die Amplifikation gewünschter Gensequenzen**

Komponente	20 µL Ansatz	50 µL Ansatz
5X Phusion GC Puffer	4 µL	10 µL
10 mM dNTPs	0,4 µL	1 µL
10 µM <i>forward</i> Primer	1 µL	2,5 µL
10 µM <i>reverse</i> Primer	1 µL	2,5 µL
DNA- <i>Template</i>	< 250 ng	< 250 ng
DMSO	0,6 µL	1,5 µL
Phusion DNA-Polymerase	0,2 µL	0,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µL auffüllen	auf 50 µL auffüllen

dNTP (Desoxynukleosidtriphosphat), (ThermoFisher, Bestellnummer R0192)  
 5X Phusion GC Puffer, DMSO (ThermoFisher, Bestellnummer F-530L)

Die PCR wurde mit dem folgenden Programm durchgeführt (Tabelle 5).

**Tabelle 5 PCR Programm für die Amplifikation gewünschter Gensequenzen**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initialdenaturierung	98 °C	30 s
Denaturierung*	98 °C	10 s
Primerhybridisierung*	58 °C	20 s
Elongation*	72 °C	15 s pro Kilobase
Finale Extension	72 °C	10 min
Halten	4 °C	bis Verwendung

\*35 Zyklen der Schritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation.

Konnte eine gewünschte Gensequenz nicht mit der Methode aus Tabelle 5 amplifiziert werden, wurde eine Gradient-PCR durchgeführt. Diese war identisch zur vorherigen PCR. Abweichend wurde die Temperatur für die Primerhybridisierung zwischen 52 °C und 72 °C variiert.

Im Anschluss an die PCR wurde eine Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 2.2.1.3) durchgeführt. Diese diente sowohl zur Kontrolle der Amplifikatgröße als auch zur Reinigung der Amplifikate.

### 2.2.1.3 Agarosegel Elektrophorese

Benötigte Materialien für diese Methode sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6 Material für die Agarosegel-Elektrophorese**

Material	Zusammensetzung/ Bestellnummer
10 x TBE in ddH <sub>2</sub> O (keine pH Bestimmung), Lagerung bei Raumtemperatur	Tris (108 g/ L), Borsäure (55 g/ L, 40 mL), Na <sub>2</sub> EDTA 0,5 M (löst sich bei pH 8)
1 % oder 2 % Agarose	1 x TBE, Agarose (10 g/ L bzw. 20 g/ L), Ethidiumbromid (2 µg/ mL)
Bioline Hyperladder 1 kB oder 25 bp	Bestellnummer BIO-33053 oder BIO-33057

Das PCR-Produkt wurde mittels Elektrophorese in einem 1%igen oder 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Es wurde der 1 x TBE als Laufpuffer verwendet. Ein Größenstandard diente zur Orientierung der gewünschten Größe. Die Voltzahl wurde entsprechend der Größe des Agarosegels angepasst und der Gellauf gestoppt, sobald die maximale elektrophoretisch Auftrennung im Zielbereich erreicht wurde.

#### 2.2.1.4 Isolation und Reinigung aus Agarosegel

Benötigtes Kit:

- *NucleoSpin Gel and PCR Clean Kits* (Macherey Nagel)

Die entsprechende Bande wurde ausgeschnitten und mit Hilfe des *NucleoSpin Gel and PCR Clean Kits* nach Herstellerangaben isoliert und gereinigt. Die Elution erfolgte mit 15 – 20 µL ddH<sub>2</sub>O und wurde anschließend photometrisch bei 260 nm, zur Konzentrationsbestimmung, vermessen.

#### 2.2.1.5 Assemblierung

Nachdem alle benötigten Gensequenzen amplifiziert und gereinigt waren, wurden diese mittels Homologie-basierter Methoden assembliert. Es wurden folgende Methoden verwendet.

- NEBuilder Hifi DNA Assembly (NEB)
- SLiCE (Messerschmidt et al. 2016)
- AQUA Cloning (Beyer et al. 2015).

Es wurde bei allen drei Methoden laut Herstellerangaben gearbeitet. Dazu wurden alle für den Nullvektor Reporterplasmid notwendigen Gensequenzen in ddH<sub>2</sub>O gemischt und nach Zusatz von Puffer und Enzym-Mix (wenn nötig) inkubiert.

Folgende Formel wurde für die Konzentrationsbestimmung der Amplikons verwendet:

$$\text{Amplikon [ng]} = \frac{\text{Länge des Amplikons [b]} \times \text{Klonierungs-Effizienz [ng]} \times \text{Ratio}}{\text{Länge des Backbones bzw. Länge des größten Amplikons [b]}}$$

(Klonierungs-Effizienz bzw. eingesetzte *Backbone*-Konzentration, optimal zwischen 50 - 100 ng)

Folgend wurde jeweils, bei der jeweiligen Methode, der Ansatz vorbereitet.

**Tabelle 7 Ansatz NEBuilder**

<b>NEBuilder</b>	<b>2-3 Fragmente</b>	<b>4-6 Fragmente</b>
Ratio	<i>Backbone:Amplikon</i> = 1:2	<i>Backbone:Amplikon</i> = 1:1
Amplikon	X $\mu$ L (siehe Formel)	X $\mu$ L (siehe Formel)
NEBuilder	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen auf	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L

**Inkubation:** Bei 2-3 Fragmenten 50 °C für 15 min; bei 4-6 Fragmenten 50 °C für 1 h.

Der SLiCE Ansatz wurde folgend angesetzt (Tabelle 8).

**Tabelle 8 Ansatz SLiCE**

<b>SLiCE Ansatz:</b>	<b>Volumina [<math>\mu</math>L]</b>
Amplikon	X $\mu$ L (50 ng)
SLiCE-Puffer	1 $\mu$ L
SLiCE-Lysat	1 $\mu$ L
mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen auf	10 $\mu$ L

**Inkubation:** 37 °C für 1 h

Der AQUA *Cloning* Ansatz wurde folgend angesetzt (Tabelle 9).

**Tabelle 9 Ansatz AQUA *Cloning***

<b>AQUA <i>Cloning</i> Ansatz</b>	<b>Volumina [<math>\mu</math>L]</b>
Amplikon	X $\mu$ L (siehe Formel, Ratio ( <i>Backbone:Amplikon</i> = 1:3))
<i>Backbone</i> (längstes Fragment)	X $\mu$ L (12 ng <i>per</i> 1 kb)
mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen auf	10 $\mu$ L

**Inkubation:** Eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.

Nach der Inkubation wurden 2 bis 4  $\mu$ L des Assemblierungsansatzes zu 25  $\mu$ L chemisch kompetenten Zellen hinzugefügt (NEB5alpha oder NEB10beta), für 30 s bei 42 °C ein Hitzeschock vollzogen und 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde 425  $\mu$ L SOC Medium (NEB) hinzugegeben und bei 37 °C für 60 min bei 600 rpm inkubiert. Hiernach wurde der ganze Ansatz auf eine bis zwei LB Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum verteilt und

über Nacht bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden mittels Kolonie PCR (Kapitel 2.2.1.6) auf Richtigkeit überprüft.

### 2.2.1.6 Kolonie-PCR

Benötigtes Material:

- DreamTaq™ Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Fisher, Bestellnummer K9021)

Zu Beginn wurde die Kolonie mit einer Pipettenspitze auf eine Agarplatte, mit entsprechendem Antibiotikum, übertragen. Diese Agarplatten dienen der Kultivierung der positiv getesteten Kolonien. Mit derselben Pipettenspitze wurde die Reaktionsmischung (Tabelle 10) angeimpft.

**Tabelle 10 Kolonie-PCR Mastermix**

Komponente	10 µL Ansatz
DreamTaq <i>Hot Start Green</i>	5 µL
PCR Master Mix	
10 µM <i>Forward</i> Primer	0,6 µL
10 µM <i>reverse</i> Primer	0,6 µL
ddH <sub>2</sub> O	3,8 µL
Kolonie	Pipettenspitze mit der Kolonie

Die PCR Methode ist in Tabelle 11 zu finden.

**Tabelle 11 PCR Methode für die Kolonie PCR**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initial Denaturierung	95 °C	<b>5 min</b>
Denaturierung*	95 °C	30 s
Primerhybridisierung*	58 °C	20 s
Elongation*	72 °C	<b>1 min pro Kilobase</b>
Finale Extension	72 °C	5 min
Halten	4 °C	bis Verwendung

\*35 Zyklen der Schritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation.

Nach dem PCR-Lauf wurde das Kolonie-PCR-Produkt mittels Elektrophorese im Agarosegel der Größe nach aufgetrennt (Kapitel 2.2.1.3). Hatten Banden die erwartete Größe, wurden die entsprechenden Kolonien bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde LB-Medium (Kapitel 2.1.1), das das entsprechende Antibiotikum enthielt, mit dem positiven Klon

innokuliert und über Nacht bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmid-Isolierung (Kapitel 2.2.1.7)

### **2.2.1.7 Plasmid-Isolierung aus *E. coli***

Benötigtes Kit für die Methode:

- NucleoSpin Plasmid *EasyPure* Kits (Macherey Nagel)

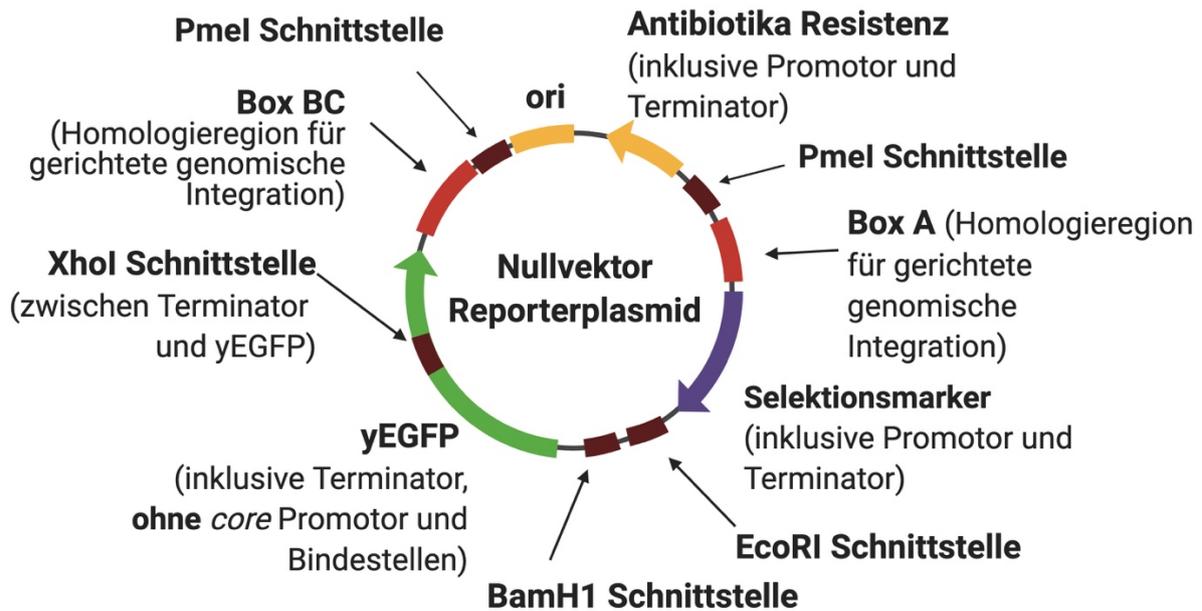
Die bakterielle Übernachtskultur wurde bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid *EasyPure* Kits nach Herstellerangaben behandelt und damit das Plasmid aus den Zellen isoliert als auch gereinigt. Der Elutionsschritt erfolgte mit 20 µL – 50 µL ddH<sub>2</sub>O und wurde anschließend photometrisch bei 260 nm, zur Konzentrationsbestimmung, vermessen. Das gereinigte Plasmid wurde von der Firma LGC Genomics GmbH sequenziert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Sequenzverifizierte Plasmide wurden in *E. coli* Glycerol-*Stocks* dauergelagert (Kapitel 2.2.1.8).

### **2.2.1.8 Stammerhaltung Bakterien**

Das entsprechende Selektionsmedium (Antibiotikum-haltig) wurde mit dem Klon innokuliert und bei 37 °C und 230 rpm über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde 500 µL der Kultur mit sterilem Glycerol, Endkonzentration 30% (v/v), verdünnt. Die Glycerol-*Stocks* wurden bei -80 °C aufbewahrt.

### **2.2.1.9 Nullvektor Reporterplasmid**

Der somit hergestellte Nullvektor Reporterplasmid (pPD079) besitzt neben den nötigen Sequenzen für die selektive bakterielle Vervielfältigung (*ori* und Antibiotika-Resistenzgen) auch die Schnittstellensequenzen BamHI und EcoRI für den Einbau des *core* Promotors, die jeweiligen Bindestellen und optional für einen Abstandshalter. Außerdem kann mit der Schnittstelle für XhoI und BamHI der Reporter yEGFP herausgeschnitten und durch einen anderen Reporter getauscht werden. Der Reporterterminator CYC1 bleibt dabei konserviert (Abbildung 6).



**Abbildung 6** Vektorkarte „Nullvektor Reporterplasmid“.

Das Nullvektor Reporterplasmid trägt eine bakterielle als auch eine fungale Partie. Dargestellt sind Resistenz- und Vermehrungskassetten für *E. coli* in Gelb. Der Reporter (grün), der Selektionsmarker (lila) und die Boxen (rot) sind die fungalen Partien. War die fungale Partie fertig konstruiert, wurde die Reporterbox zielgerichtet in das Hefegenom integriert. *Created with BioRender.com*

Die Gensequenz für diesen Nullvektor befindet sich im Anhang (Kapitel 6.1.1).

Für die Charakterisierung verschiedener künstlicher Transkriptionsfaktoren wurde der Nullvektor Reporterplasmid mit dem jeweils passenden Promotor, bestehend aus *core*-Promoter und Bindestellen versehen (Kapitel 2.2.2).

## 2.2.2 Herstellung Reporterplasmid

Der Nullvektor Reporterplasmid wird genutzt, um die verschiedenen *core* Promotoren, Bindestellen und einen anderen Reporter einzubringen, die nötig für alle zu untersuchenden künstlichen Transkriptionsfaktoren sind. Dafür wurde der Nullvektor restriktionsverdaut und alle Bausteine mit Homologie-basierten Klonierungsmethoden eingebracht.

### 2.2.2.1 Genmaterial für Reporterplasmid

Für die Konstruktion der Reporterplasmide wurden folgende *Templates* benötigt (Tabelle 12).

Tabelle 12 Gensequenzen für den Reporterplasmid

Name	Funktion	Quelle/ Template
ENO1 <i>core</i> Promotor	Anlagerung der basalen Transkriptionsmaschinerie	(Rantasalo et al. 2018)
GAL1 <i>core</i> Promotor	Anlagerung der basalen Transkriptionsmaschinerie	Simona Gramazio, siehe unten
Bindestellen für PhiF, Bm3R1, SrpR, TetR und TarA	Fungieren als <i>Enhancer</i> . Bindestelle für die zugehörige DNA-Bindedomäne	(Rantasalo et al. 2018)
Bindestellen für LexA	Fungieren als <i>Enhancer</i> . Bindestelle für die zugehörige DNA-Bindedomäne	Simona Gramazio, siehe unten
Abstandshalter	Optional zwischen dem Terminator des auxotrophen Markes und dem <i>core</i> Promotor	Addgene #28245
VP1 mit His-Tag	Reporteralternative zu yEGFP	(Messerschmidt et al. 2012)

### **GAL1 *core* Promotor; spezifische Bindestelle für LexA**

Das Genmaterial als auch die Gensequenzen mit freundlicher Genehmigung von Simona Gramazio, Jonathan Trauth, Filipp Bezold, Lars-Oliver Essen, Christof Taxis, und Roberta Spadaccini. *Large scale expression of a sweet-protein derivatives with optogenetic tools. Submitted.* Die Erfragung der Gensequenz erfolgt über die Arbeitsgruppe.

### **ENO1 *core* Promoter; spezifischer Bindestelle für PhiF, Bm3R1, SrpR, TetR und TarA**

Der Ursprung der Gensequenzen sind in der Veröffentlichung der Arbeit (Rantasalo et al. 2018) zu finden. Das Genmaterial für die Amplifikation der jeweiligen Sequenz wurde mit freundlicher Genehmigung ebenfalls von Dr. Anssi Rantasalo, VVT Technical Research Centre of Finland Ltd, zur Verfügung gestellt. Die erzeugten Gensequenzen für die Bindestellen finden sich im Anhang, siehe Kapitel 6.1.3, die für den *core* Promotor in Kapitel 6.1.4.

### **VP1 mit His-Tag**

Die Ursprung der Gensequenz ist in der Publikation (Messerschmidt et al. 2012) zu finden. Das Genmaterial für die Amplifikation wurde mit freundlicher Genehmigung von der Gruppe

Immuntechnologie Leitung Prof. Dr. Katja Hanack, Universität Potsdam, zur Verfügung gestellt. Die Erfragung der Gensequenz erfolgt über die Arbeitsgruppe.

### Abstandshalter

Der Ursprung der Gensequenzen sind aus dem Addgene Plasmid#28245:

„pGal4AD-CIB1 was a gift from Chandra Tucker (Addgene plasmid # 28245 ; <http://n2t.net/addgene:28245> ; RRID:Addgene\_28245)“

(Abstandshalter-Gensequenz, siehe Kapitel 6.1.1)

### 2.2.2.2 Restriktionsverdau von Plasmiden

Die Reporterplasmide wurde mit dem jeweiligen Enzym nach Herstellerangaben linearisiert. Somit konnten die nötigen Gensequenzen für den *core* Promotor, Bindestellen, Abstandshalter und das VP1 an die gewünschte Stelle eingebaut werden. Es wurden mit dem *Cut-Smart* Puffer und nach dem Protokoll „*Optimizing Restriction Endonuclease Reactions*“ von NEB gearbeitet. Inkubiert wurde für mindestens 2 h.

Tabelle 13 zeigt die Methode für den Restriktionsverdau.

**Tabelle 13 Methode für den Plasmidverdau**

Komponente	Ansatz
Plasmid DNA	500 ng – 1 µg
<i>Cut Smart</i> (10x)	2 µL
Restriktionsenzym	10 <i>units</i>
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 20 µL

**Inkubation:** Variabel je nach Restriktionsenzym (2 h bis über Nacht)

Restriktionsverdaute Nullvektoren wurden bei -20 °C gelagert. Parallel wurden die nötigen Gensequenzen (Kapitel 2.2.2.1) amplifiziert.

### 2.2.2.3 Herstellung der Reporterplasmide

Die gewählten Gensequenzen (Kapitel 2.2.2.1) wurden mittels PCR generiert (Kapitel 2.2.1.2) und mittels Gel-Elektrophorese überprüft (Kapitel 2.2.1.3) Amplifikate der erwarteten Größe wurden isoliert und gereinigt (Kapitel 2.2.1.4). Es folgte die Assemblierung (Kapitel 2.2.1.5) dieser Amplikons mit dem entsprechendem restriktionsverdautem Nullvektor Reporterplasmid aus dem vorherigen Kapitel 2.2.2.2. Darauf folgte die Kolonie-PCR (Kapitel 2.2.1.6) und von positiven Kolonien wurden Übernachtskulturen angesetzt. Das Plasmid wurde am Folgetag

## Material und Methoden

isoliert und zur Sequenzierung eingeschickt (Kapitel 2.2.1.7). Waren die Sequenzierungsergebnisse positiv, wurde eine Stammerhaltung durchgeführt (Kapitel 2.2.1.8).

Waren alle 24 konstruierte Reporterplasmide (Ergebnisse, Kapitel 3.1) fertiggestellt, wurden diese Reporterplasmide mit PmeI restriktionsverdaut (Kapitel 2.2.2.2), sodass die Reporter-kassetten genomisch in die Hefen integriert wurden (Kapitel 2.2.5).

Bevor der genomische Einbau besprochen wird, erfolgt die Planung und Herstellung des Nullvektors Expressionsplasmid.

### 2.2.3 Herstellung Nullvektor Expressionsplasmid

Der Nullvektor Expressionsplasmid sollte so konstruiert werden, dass er ebenfalls aus zwei Parteien besteht (siehe Nullvektor Reporterplasmid, Kapitel 2.2.1). Die bakterielle Partie sollte die Vervielfältigung in *E. coli* sicherstellen, die fungale Partie sollte so konstruiert werden, dass nur dieser Teil genomisch integriert wird. Außerdem sollte der fungale Part zwei konstitutive Promotoren mit zugehörigen Terminatoren beinhalten. Restriktionsschnittstellen zwischen konstitutiven Promotor und Terminator sollten es ermöglichen den jeweiligen erforderlichen Baustein des optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktors einzubauen. Final sollte berücksichtigt werden, dass, nach Fertigstellung des Nullvektors zum Expressionsplasmid, dieses zielgerichtet in die genomisch integrierte Reporterkassette eingebaut wird.

#### 2.2.3.1 Genmaterial für Nullvektor

Das benötigte Genmaterial ist in der Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 14** Gensequenzen für Nullvektor Expressionsplasmid

<b>Name</b>	<b>Funktion</b>	<b>Quelle/ Template</b>
<i>ori</i> (pBR322)	Bakterielle Amplifikation	pGN005B
Carbenicillin-Resistenzgen (inklusive Promoter und Terminator)	Bakterieller Selektionsmarker	pGN005B
Phosphoribosylanthranilat Isomerase (TRP1) (inklusive Promotor und Terminator)	Auxotropher Marker	pPD028(intern)
TEF2 Terminator	Terminator für den optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktor (Photorezeptor mit DNA-Bindedomäne)	pPD028
TEF2 Promotor	Konstitutiver Promotor für den optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktor (Photorezeptor mit DNA-Bindedomäne)	pPD028
Abstandshalter Expressionsplasmid	Abstandshalter zwischen den beiden entgegengerichteten konstitutiven Promotoren)	Addgene #28245

PGK1 Promotor	Konstitutiver Promotor für den optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktor (Interaktionspartner mit Aktivierungsdomäne)	pPD028
CYC1 Terminator	Terminator für den optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktor (Interaktionspartner mit Aktivierungsdomäne)	pPD028
Box B	Gerichtete genomische Integration in Hefe bzw. in den Locus der Reporter-kassette	pGN005B
Box C	Gerichtete genomische Integration in Hefe bzw. in den Locus der Reporter-kassette	pGN005B

### 2.2.3.2 Methoden zur Herstellung des Nullvektors Expressionsplasmid

Analog zur Herstellung des Nullvektors Reporterplasmid wurde auch der Nullvektor Expressionsplasmid über die Assemblierung der notwendigen Gensequenzen hergestellt. Dazu wurden die benötigten Gensequenzen (Kapitel 2.2.3.1) mittels PCR amplifiziert (Kapitel 2.2.1.2) und mittels Gel-Elektrophorese überprüft (Kapitel 2.2.1.3). Amplifikate der erwarteten Größe wurden isoliert und gereinigt (Kapitel 2.2.1.4). Es folgte die Assemblierung dieser Amplikons (Kapitel 2.2.1.5) und die darauffolgende Kolonie-PCR (Kapitel 2.2.1.6). Von positiven Kolonien wurden Übernachtskulturen angesetzt und das Plasmid am Folgetag isoliert und sequenziert (Kapitel 2.2.1.7). Zusätzlich wurde eine Stammerhaltung durchgeführt (Kapitel 2.2.1.8).

### 2.2.3.3 Nullvektor Expressionsplasmid

Das „Nullvektor Expressionsplasmid“ besitzt neben den nötigen Sequenzen für die selektive bakterielle Vervielfältigung (*ori* und Antibiotika-Resistenzgen) auch die Schnittstellensequenzen für den Einbau der Gensequenzen der optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktoren. Zwischen der Gensequenz für den TEF2 Promotor und den TEF2 Terminator befinden sich die Schnittstellensequenzen für die Restriktionsenzyme NdeI und SbfI. Hier wurden die Gensequenzen für das Fusionsprotein aus Blaulichtphotorezeptor CRY2 und eine der sechs prokaryotischen DNA-Bindedomäne eingebaut. Zwischen der Gensequenz für den PGK1 Promotor und CYC1 Terminator befinden sich die Schnittstellensequenzen für



### 2.2.4.1 Genmaterial für Expressionsplasmid

Die benötigten Gensequenzen für die Konstruktion sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

**Tabelle 15 Gensequenzen für Expressionsplasmid**

<b>Name</b>	<b>Funktion</b>	<b>Quelle/ Template</b>
DNA-Bindedomäne für PhiF, Bm3R1, SrpR, TetR und TarA	Anlagerung an spezifische Bindestelle	(Rantasalo et al. 2018)
DNA-Bindedomäne für LexA	Anlagerung an spezifische Bindestelle	Simona Gramazio (siehe unten)
CRY2	Blaulichphotorezeptor (wurde an DNA-Bindedomäne fusioniert)	Addgene Plasmid #28243
CIB1 (inklusive SV40-NLS und GAL4-Aktivierungsdomäne)	Interaktionspartner von CRY2 (hat im Addgene Plasmid die NLS und Aktivierungsdomäne inbegriffen)	Addgene Plasmid#28245
PhyBNT	Rotlichtphotorezeptor (wurde an LexA DNA-Bindedomäne fusioniert)	(Hochrein et al. 2017)
PIF3	Interaktionspartner von PhyBNT (wurde an NLS und GAL4 Aktivierungsdomäne fusioniert)	(Hochrein et al. 2017)
VP16 Aktivierungsdomäne	Alternative für die GAL4 Aktivierungsdomäne	Intern

#### **DNA-Bindedomäne für PhiF, Bm3R1, SrpR, TetR und TarA**

Der Ursprung der Gensequenzen sind in der Veröffentlichung der Arbeit (Rantasalo et al. 2018) zu finden. Das Genmaterial für die Amplifikation der jeweiligen Sequenz wurde mit freundlicher Genehmigung ebenfalls von Dr. Anssi Rantasalo, VVT Technical Research Centre of Finland Ltd, zur Verfügung gestellt. Die erzeugten Sequenzen finden sich im Anhang, siehe Kapitel 6.1.5.

#### **CIB1 (inbegriffen SV40-NLS und GAL4 Aktivierungsdomäne)**

Der Ursprung der Gensequenzen sind aus dem Addgene Plasmid#28245:

„pGal4AD-CIB1 was a gift from Chandra Tucker (Addgene plasmid # 28245 ; <http://n2t.net/addgene:28245> ; RRID:Addgene\_28245)“

### **CRY2**

Der Ursprung der Gensequenz für CRY2 ist aus dem Addgene Plasmid #28243:

„pGal4BD-CRY2 was a gift from Chandra Tucker (Addgene plasmid # 28243 ; <http://n2t.net/addgene:28243> ; RRID:Addgene\_28243)“

### **PhyBNT und PIF3**

Der Ursprung der Gensequenzen sind der Publikation (Hochrein et al. 2017) zu finden.

Für das Rotlichtsystem wurde der Chromophor Phycocyanobilin (PCB) (Frontier Specialty Chemicals, Bestellnummer: P14137) verwendet.

### **DNA-Bindedomäne für LexA**

Das Genmaterial als auch die Gensequenzen mit freundlicher Genehmigung von Simona Gramazio, Jonathan Trauth, Filipp Bezold, Lars-Oliver Essen, Christof Taxis, und Roberta Spadaccini. *Large scale expression of a sweet-protein derivatives with optogenetic tools. Submitted.* Die Erfragung der Gensequenz erfolgt über die Arbeitsgruppe.

### **VP16 Aktivierungsdomäne**

Die Gensequenz befindet sich im Anhang (Kapitel 6.1.6)

#### **2.2.4.2 Methoden für die Herstellung**

Analog zur Herstellung der Reporterplasmide (Kapitel 2.2.2) wurde der Nullvektor Expressionsplasmid mit gewählten Enzymen restriktionsverdaut (Kapitel 2.2.2.2). Parallel wurden die gewählten Gensequenzen (Kapitel 2.2.4.1) mittels PCR amplifiziert (Kapitel 2.2.1.2) und mittels Gel-Elektrophorese überprüft (Kapitel 2.2.1.3) Amplifikate mit der entsprechenden Größe wurden isoliert und gereinigt (Kapitel 2.2.1.4). Es folgte die Assemblierung (Kapitel 2.2.1.5) dieser Amplikons mit dem entsprechend restriktionsverdauten Plasmid. Anschließend erfolgte die Kolonie-PCR (Kapitel 2.2.1.6) und das Ansetzen der Übernachtskulturen von positiven Kolonien. Am Folgetag wurden die Plasmide isoliert und sequenziert (Kapitel 2.2.1.7). Zusätzlich wurde eine Stammerhaltung durchgeführt (Kapitel 2.2.1.8).

Alle acht fertig konstruierten Expressionsplasmide werden im Ergebnis (Kapitel 3.2) präsentiert. Expressionsplasmide wurden mit AvrII restriktionsverdaut (Kapitel 2.2.2.2), sodass die Expressionskassette in den Locus der Reporterassette genomisch integriert werden konnte (Kapitel 2.2.6).

## 2.2.5 Genomische Integration der Reporter-kassette

Für die genomische Integration der Reporter-kassette (Kapitel 2.2.2.3) in die Hefe, wurden unter anderem chemisch kompetente Hefe hergestellt und in diese die Reporter-kassette eingebaut.

### 2.2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter Hefe

Benötigtes Material (Tabelle 16).

**Tabelle 16 Puffer für die Lagerung chemisch kompetenter Hefe**

<b>Material</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<i>Frozen competent cell solution</i> (FCC)	5% Glycerol (v/ v);
in ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert, Lagerung bei Raumtemperatur	10% DMSO (v/ v)

Für die Herstellung chemisch kompetenter Hefe wurden die Stämme YPH500 und CEN.PK ohne jegliche Modifikation verwendet (Kapitel 2.1.2). In diese kompetenten Zellen erfolgte die erste gerichtete Transformation der Reporter-kassette und damit deren gerichtete Integration in die Hefe (Kapitel 2.2.5.2). Der jeweilige Hefestamm wurde auf YPDA Agarplatten ausgestrichen und für zwei bis drei Tage bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurden nach der Methode „*Yeast cells without a plasmid*“ von (Gietz and Schiestl 2007a) entsprechend die Hefezellen chemisch kompetent gemacht mit der Ausnahme, dass immer 1xYPDA Medium statt 2xYPDA verwendet wurde. Nach dem letzten Schritt wurden die Zellen entsprechen in der FCC Lösung gelagert und bei -80 °C eingefroren.

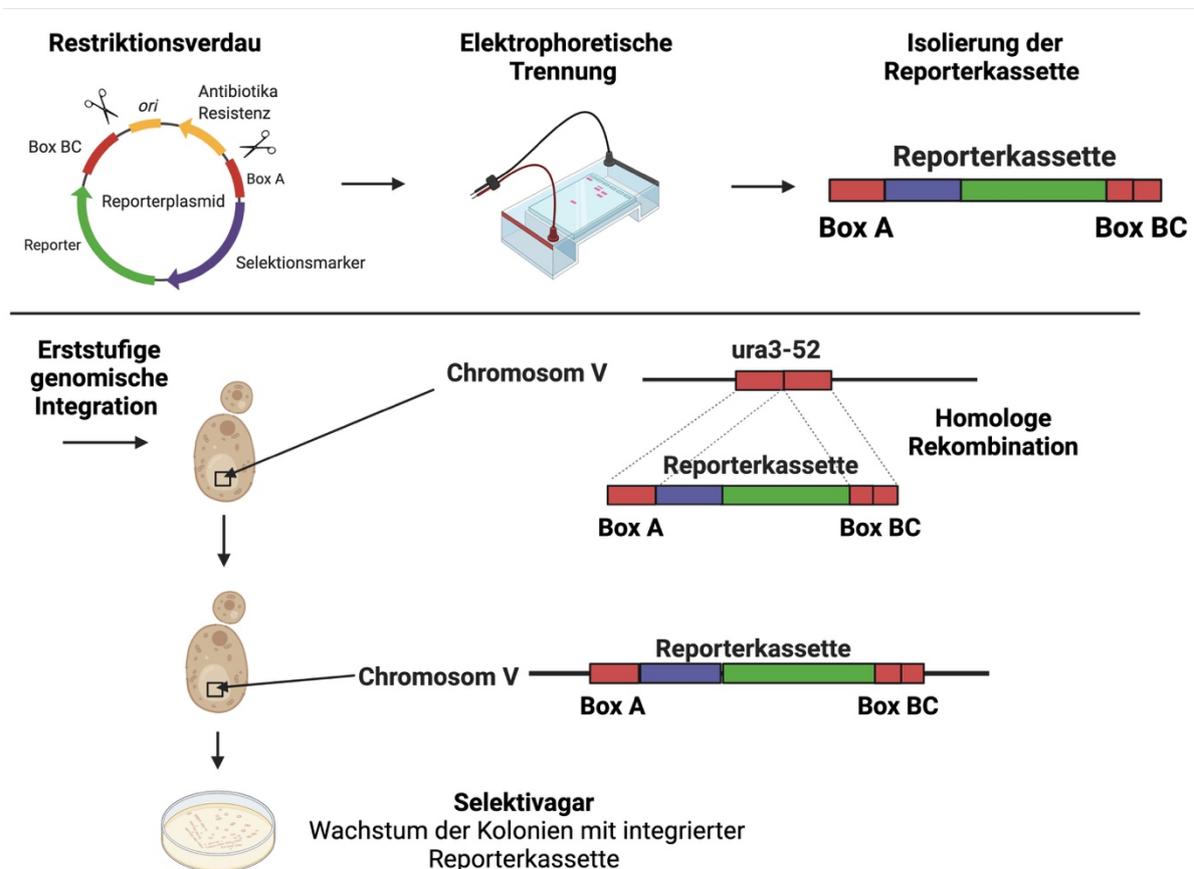
### 2.2.5.2 Erststufige genomische Integration in Hefe

Die Reporter-plasmide (Kapitel 2.2.2.3) wurden einem Restriktionsverdau (Kapitel 2.2.2.2) mit dem Enzym PmeI unterzogen. Durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (Kapitel 2.2.1.3) konnte der bakterielle von dem fungalen Part getrennt werden. Im Agarosegel wurde nur die größere Bande gereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.4). Diese Bande enthielt nur noch den fungalen Part, die Reporter-kassette, flankiert mit den Boxen A und BC. Diese Boxen weisen entsprechende homologe Sequenzen mit dem Genlocus URA 3-52 auf, der sich in der Hefe auf dem Chromosom V befindet (Abbildung 8).

Mit Hilfe der homologen Rekombination wurde die Reporter-kassette somit ortsgerichtet in das Hefegenom integriert. Die Reporter-kassette wurde nach der Methode von Gietz (Gietz and Schiestl 2007b) oder mit dem *Yeast* Transformation KIT, (Sigma Aldrich) in YPH500 oder CEN.PK Stamm, ohne jeglichen Modifikationen (siehe Kapitel 2.1.2, Tabelle 2) transformiert.

Bei der Methode nach (Gietz and Schiestl 2007b) wurden chemisch kompetente Hefe verwendeter (Kapitel 2.2.5.1). Wenn das Yeast Transformation KIT als Methode gewählt wurde, so war der Gebrauch kompetenter Hefe nicht erforderlich. Dafür wurde der entsprechende Stamm zwei Tage zu auf YPDA-Agarplatten kultiviert und die Zellen von der Agarplatte verwendet.

Der Transformationsansatz wurde auf SD-His Agarplatten (ohne der Aminosäure Histidin) ausplattiert und zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert. Sowohl YPH500 als auch CEN.PK waren auxotroph für Histidin (siehe Kapitel 2.1.2, Tabelle 2).



**Abbildung 8** Schematische Darstellung der ersten genomischen Insertion der Reporter-kassette.

Gezeigt ist der schematische der Ablauf für die erste gerichtete Genomintegration. Das restriktionsverdaute Reporterplasmid wurde elektrophoretisch im Agarose aufgetrennt. Die isolierte Reporter-kassette wurde mit der Methode der Homologen-Rekombiantion in den Genlocus *ura3-52* der Hefe transformiert. Mit dem befindlichen Selektionsmarker, *HIS3*, wuchsen nur die Hefemutanten, die die Reporter-kassette erfolgreich genomisch integriert hatten. *Created with BioRender.com*

Mittels dem sich auf der Reporter-kassette befindlichen auxotrophen Marker konnten nur die Hefemutanten auf dem Selektivagar wachsen, die die Reporter-kassette erfolgreich integriert hatten. Zudem wurden die Kolonien, die auf den Selektivagar wuchsen, mittels Kolonie PCR (Kapitel 2.2.1.6) überprüft. Es wurde ein *reverse* Primer verwendet, der sich außerhalb der Genominsertion anlagern, und ein *forward* Primer, der sich innerhalb der Genominsertion

anlagern sollte. Proben, die die gewünschte Bandengröße im Agarosegel (Kapitel 2.2.1.3) aufwiesen, wurden ausgeschnitten, gereinigt (Kapitel 2.2.1.4) und zur Sequenzierung (LGC Genomics) geschickt. Nur wenn die sequenzierte Gensequenz übereinstimmte, wurde eine Stammerhaltung (Kapitel 2.2.5.3) durchgeführt

### 2.2.5.3 Stammerhaltung Hefe

Das entsprechende Selektionsmedium wurde mit dem positiven Hefe-Klon aseptisch inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 230 rpb inkubiert. Am Folgetag wurden 500 µL der Übernachtskultur mit sterilem Glycerol, Endkonzentration 25% (v/v), verdünnt. Die Glycerol *Stocks* wurden bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.2.6 Genomische Integration der Expressionskassette

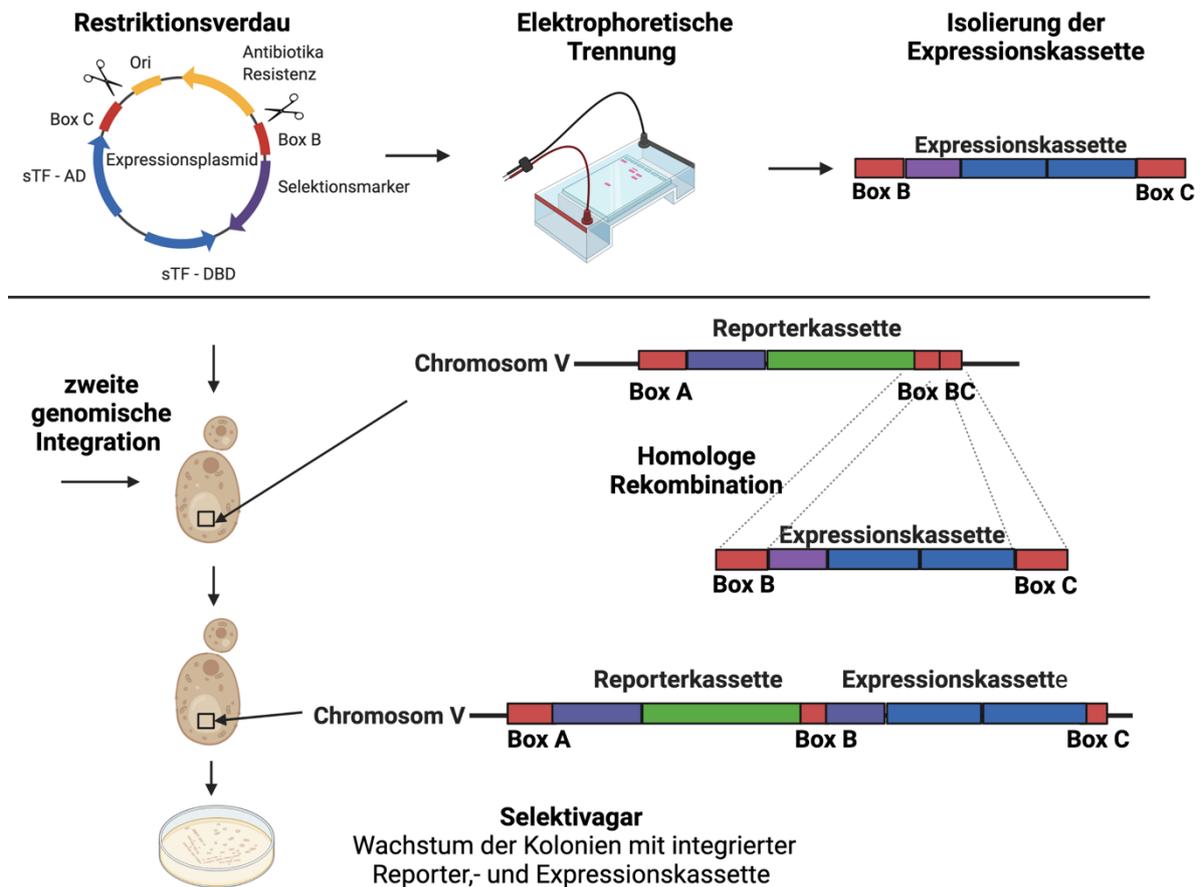
Die Integration der Expressionskassette erfolgte in einem Sequenzbereich, der bereits in die Hefe eingebrachten Reporterkasstetten (Box BC). Daher wurden diese Hefen chemisch kompetent gemacht. Die jeweilige Hefemutante wurde auf SD-His Agarplatten ausgestrichen und für zwei bis drei Tage bei 30 °C kultiviert und im Anschluss chemisch kompetent gemacht (Kapitel 2.2.5.1).

Die Methode der Transformation der Expressionskassette ist gleich der in Kapitel 2.2.5 beschriebenen. Die wesentlichen Unterschiede lagen darin, dass der Restriktionsverdau des Expressionsplasmids mit dem Enzym AvrII erfolgte. Die isolierte und gereinigte (Kapitel 2.2.4.2) Expressionskassette wurde anschließend in die YPH500 oder CEN.PK Mutanten transformiert, die erfolgreich die Reporterkassette (Kapitel 2.2.5.2) genomisch integriert hatten. Der schematische Ablauf dieser genomischen Integration ist in Abbildung 9 dargestellt. Entweder wurden chemisch kompetente Hefe verwendet mit der Methode nach (Gietz and Schiestl 2007b) oder der entsprechend Stamm auf eine SD-His Agarplatte ausgestrichen und zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend konnten diese Zellen für das *Yeast* Transformation KIT verwendet werden.

Dadurch, dass die Expressionskassette einen anderen auxotrophen Marker als die Reporterkassette trägt, TRP1 statt HIS3, konnten nur die Hefemutanten auf dem Selektivagar SD-His-Trp (ohne Histidin und Tryptophan) wachsen, die beide Kasstetten erfolgreich genomisch integriert hatten.

Zudem wurden die Kolonien, die auf dem Selektivagar wuchsen, mittels Kolonie PCR (Kapitel 2.2.1.6) überprüft. Es wurde ein *reverse* Primer verwendet, der sich außerhalb der

Genominsertion anlagern und ein *forward* Primer, der sich innerhalb der zweiten Genominsertion anlagern sollte. Proben, die die gewünschte Bandengröße im Agarosegel aufwiesen, wurden ausgeschnitten, gereinigt und zur Sequenzierung (LGC Genomics) geschickt (2.2.1.4). Nur wenn die sequenzierte Gensequenz übereinstimmte, wurde eine Stammerhaltung (Kapitel 2.2.5.3) durchgeführt.



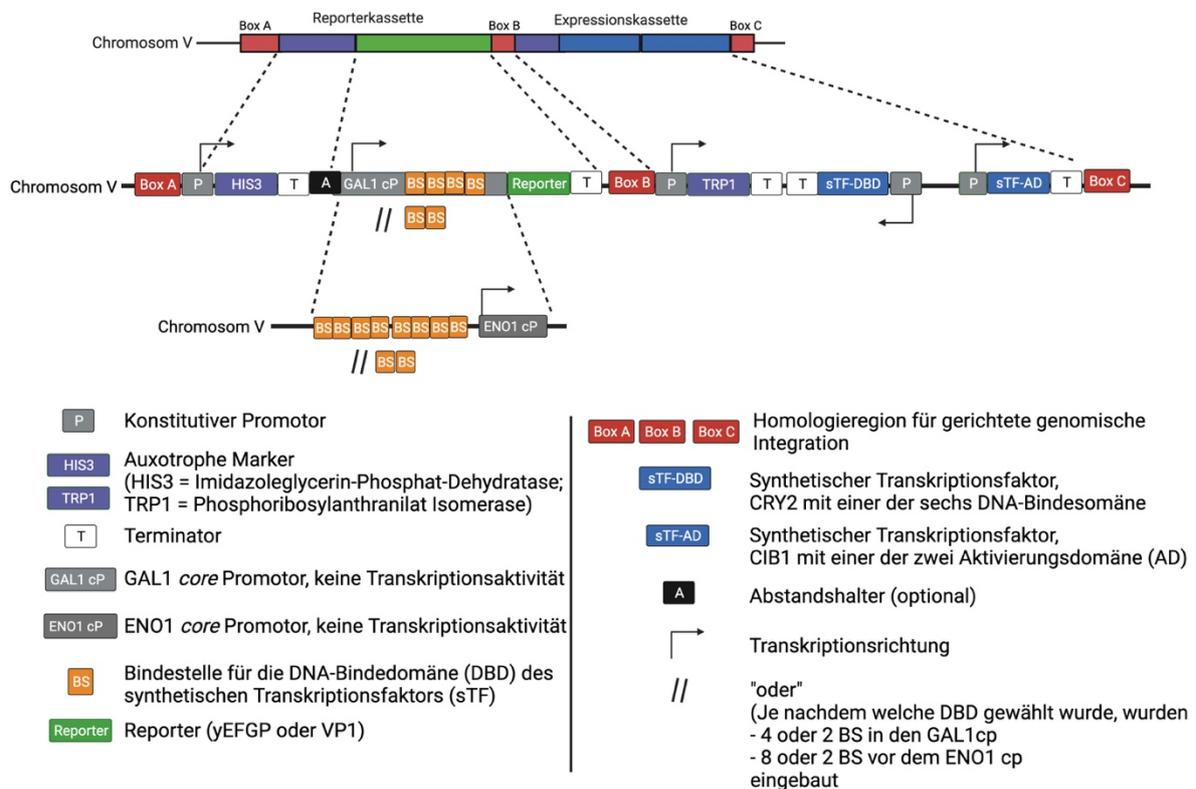
**Abbildung 9 Schematische Darstellung der zweiten genomischen Insertion der Expressionskassette.**

Gezeigt ist der schematische der Ablauf für die zweite gerichtete Genomintegration. Das restriktionsverdaute Expressionsplasmid wurde elektrophoretisch im Agarose aufgetrennt. Die isolierte Expressionskassette wurde mit der Methode der Homologen-Rekombiantion in den Genlocus der Hefe transformiert, indem sich die Reporter-kassette befand. Mit dem beiden befindlichen unterschiedlichen Selektionsmarker wuchsen nur die Hefemutanten, die sowohl die Reporter- als auch die Expressionskassette erfolgreich genomisch integriert hatten. *Created with BioRender.com*

Die Integration der Reporter- als auch der Expressionskassette bildete das Flirt System (siehe Kapitel 2.2.7).

## 2.2.7 Flirt System

Der Einbau beider Kassetten, Reporter- und Expressionskassetten (Abbildung 10), bildete das hier neu etablierte Blaublichtsystem mit dem Akronym **Flirt** ab. Flirt steht für „Flexible Blaublicht induzierte Transkription“.



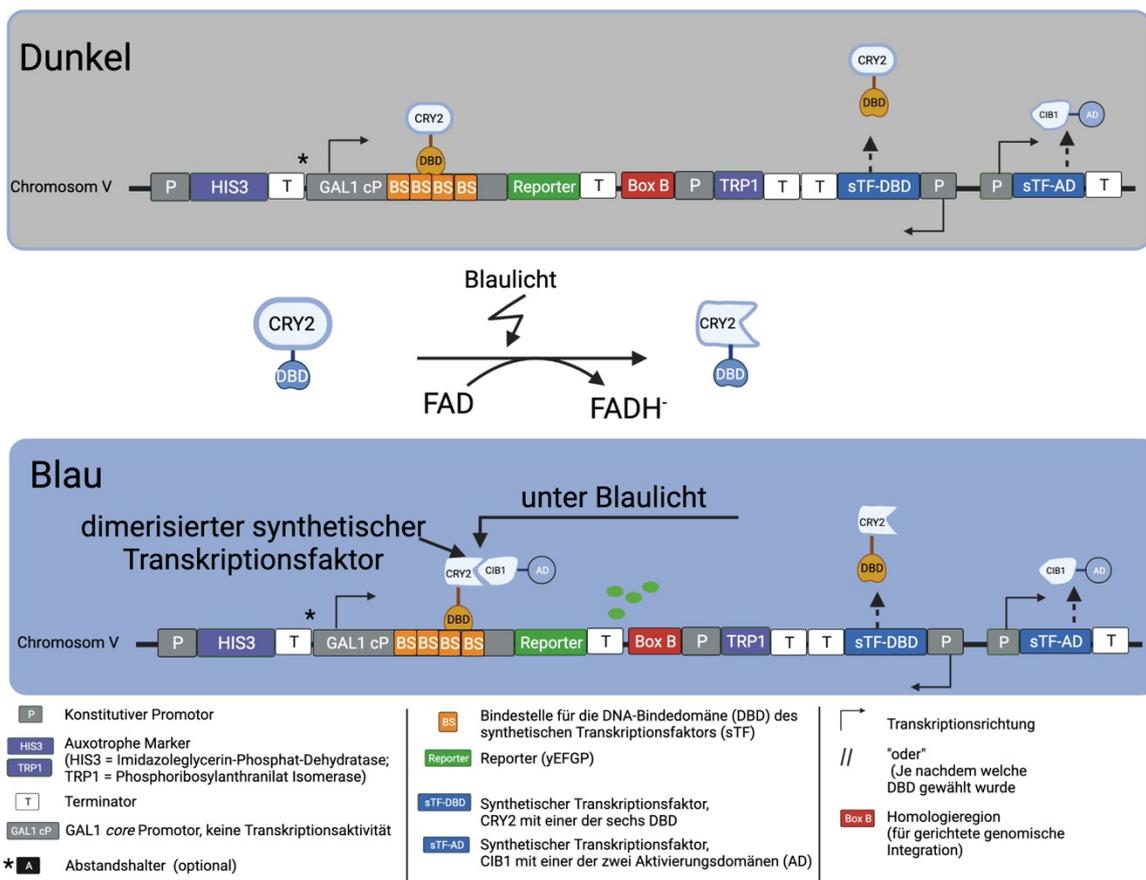
**Abbildung 10** Eingebaute Kassetten, das Flirt System.

Die Darstellung zeigt detailliert die beiden eingebauten Reporter- und Expressionskassetten. Die Reporter-kassette beinhaltet den auxotrophen Marker für HIS3 inklusive des zugehörigen Promotors und Terminators. Optional war ein Abstandshalter nach dem Terminator des auxotrophen Markers vorhanden. Ebenfalls enthielt die Reporter-kassette den Reporter yEGFP mit dem jeweiligen Promotor und den Bindestellen für den zugehörigen optogenetischen sTF. Die eingebaute Expressionskassette trug die beiden Bausteine des sTF. Dabei befand sich der Baustein mit dem Photorezeptor und der DNA-Bindedomäne auf dem Gegenstrang. Der Interaktionspartner war mit der Aktivierungsdomäne fusioniert. Beide Bausteine des sTF hatten einen konstitutiven Promotor vorgeschaltet. Für den sTF-DBD war es der TEF2 Promotor für den sTF-AD der PGK1 Promotor. Am Ende der jeweiligen Gene für die sTF befand sich der zugehörige Terminator, TEF2 bzw. CYC1 Terminator. Schlussendlich befand sich auf der Expressionskassette der auxotrophe Marker für TRP1 mit dem jeweiligen Promotor und Terminator. *Created with BioRender.com*

### 2.2.7.1 Funktionsweise des Flirt Systems

Das Flirt System, welches zielgerichtet in das trunkierte *ura3-52* Gen der Hefe eingebaut wurde, sollte unter Blaublichtbestrahlung die Expression des Reportergens induzieren. Die eingebaute Expressionskassette exprimiert konstitutiv die zwei Bausteine für den optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktor. Der eine war ein Fusionsprotein aus dem Photorezeptor CRY2 und einer der sechs prokaryotischen DNA-Bindedomänen. Der zweite Baustein war ein

Fusionsprotein aus CIB1 und einer Aktivierungsdomäne samt NLS. Sowohl im Dunkeln als auch unter Blaulichtbestrahlung (siehe Kapitel 2.2.8) konnte das Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne an seine spezifische Bindestelle binden. Nur unter Blaulichtbestrahlung änderte der Photorezeptor CRY2 seine Konformation, sodass CIB1 mit der fusionierten Aktivierungsdomäne sich anlagern konnte und dadurch ein funktionsfähiger dimerisierter optogenetischer synthetischer Transkriptionsfaktor entstand. Nur unter dieser Voraussetzung sollte das Reportergen transkribiert werden (Abbildung 11).



**Abbildung 11 Dimerisierung des optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktors.**

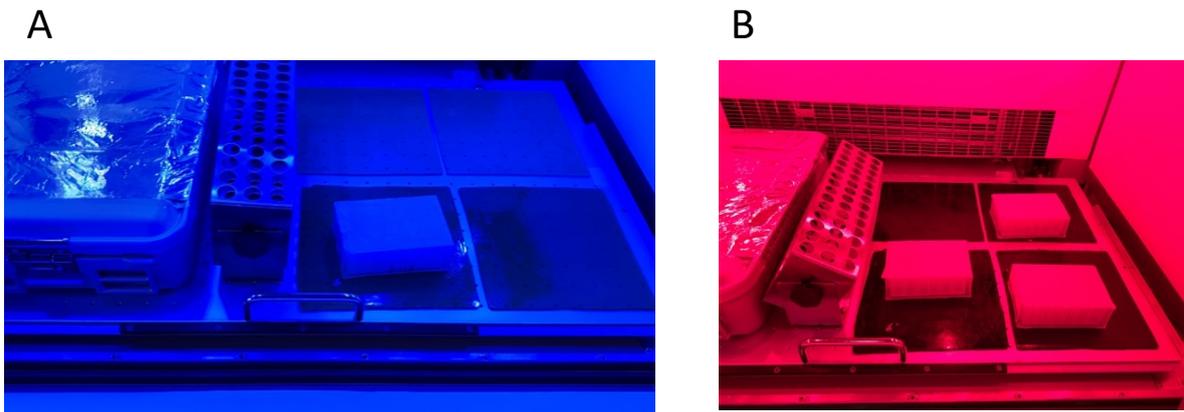
Sowohl der sTF-DBD als auch der sTF-AD werden konstitutiv und lichtunabhängig auf dem Chromosom V der Hefe transkribiert. Der sTF-DBD kann sich zwar an seine Bindestelle anlagern, jedoch fehlt diesem die Aktivierungsdomäne, damit der Reporter exprimiert werden kann. Unter Blaulicht wird der Chromophor FAD reduziert und bewirkt dadurch eine Konformationsänderung beim CRY2. Diese Konformationsänderung ermöglicht es nun, dass sich CIB1 an CRY2 anlagern kann. Somit dimerisieren der sTF-DBD und der sTF - AD und ergeben einen funktionsfähigen dimerisierten optogenetischen sTF. Dieser funktionsfähige sTF bindet an die Bindestelle und bewirkt mit der nun vorhandenen Aktivierungsdomäne die Expression des Reporters. *Created with BioRender.com*

## 2.2.8 Lichtexposition und Kultivierung

Die Lichtbestrahlung fand im Schüttelinkubatoren und Bioreaktoren statt.

### 2.2.8.1 Deepwells im Lichtschüttler

Die Lichtbestrahlung fand im Schüttelinkubator Infors HT Multitron Pro (Infors, CH) statt (Abbildung 12). Die Inkubatordecke war mit 40 fest installierten LEDs bekleidet, die von der Firma COMPLED Solutions GmbH (Dresden) angebracht wurde.



**Abbildung 12** Einblick in den Lichtschüttler.

Dargestellt sind die *Deepwells* auf den Klebepads unter Blaulicht- (A) und Rotlichtkulturbedingungen (B). Auf der jeweiligen linken Seite ist die *Blackbox* zu erkennen, in dem sich die Dunkelkontrolle befand.

Die maximale Intensität für Blaulicht betrug  $98 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ . Die genutzte, wenn nicht anders erwähnt, und gleichzeitig auch die niedrigste Lichtintensität war  $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  bei 463 nm. Das Rotlicht wurde bei 661 nm verwendet und bei einer maximalen Lichtintensität von  $132 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ . Das Dunkelrotlicht wurde bei einer Wellenlänge von 740 nm verwendet. Die Lichtintensität von dem Dunkelrotlicht konnte mit dem verwendeten Lichtmessgerät nicht ermittelt werden, da es nur Wellenlängen im Bereich 400 bis 700 nm messen konnte.

Alle Dunkelkontrollen wurden, sofern möglich, in einer *Blackbox* (*box for microtiter plate*; INFORS, CH), inkubiert. Falls Proben zu groß waren, beispielsweise Kulturen in Schikanenkolben, wurden diese in Aluminiumfolie gewickelt und in einen separaten Schüttelinkubator platziert, dessen Sichtfenster ebenfalls mit Aluminiumfolie verkleidet war, um kontinuierliche Dunkelheit zu gewährleisten.

### 2.2.8.2 Kultivierung im Schüttelinkubator

*S. cerevisiae* wurde bei 30 °C und 230 rpm, wenn nicht anders erwähnt, im SD-Medium über Nacht in *Deepwells* oder Schikanenkolben vorkultiviert. Am Folgetag wurde photometrisch die optische Dichte bestimmt und die Hauptkultur inokuliert, sodass zu Beginn eine Zelldichte von  $10^6$  Zellen pro Milliliter vorhanden war. Die Hauptkultur wurde im Dunkeln (*Blackbox*) oder unter der gewünschten Lichtwellenlänge, wenn nicht anders erwähnt, für 22 bis 24 Stunden bei 30 °C und 230 rpm inkubiert.

### 2.2.8.3 Photobioreaktor

Für den *Scale-up*, als auch um festzustellen inwieweit der Versuchsaufbau industriellen Bedingungen standhält, wurden die Photobioreaktoren Labfors 5 Lux der Firma Infors HT verwendet (Abbildung 13). Es standen drei dieser Reaktoren zur Verfügung, die exakt gleich aufgebaut und steuerbar gewesen waren.

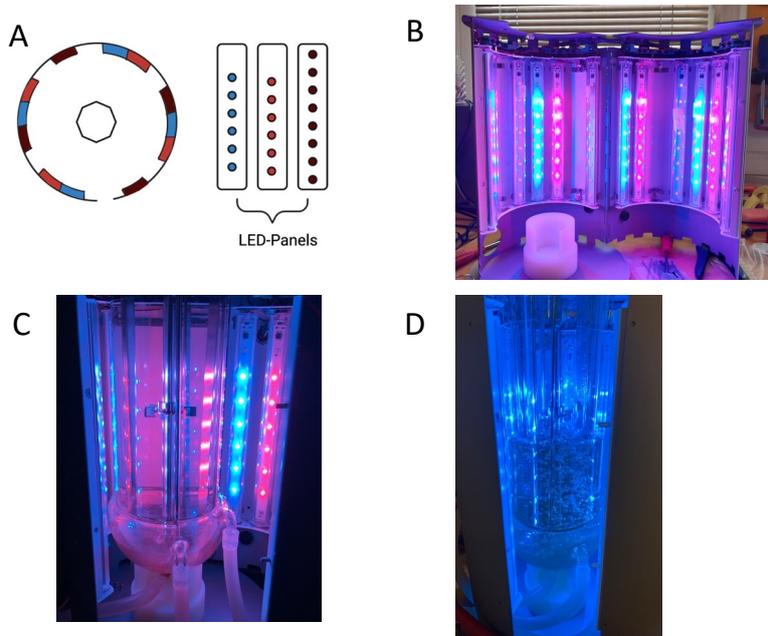


**Abbildung 13 Photobioreaktoren.**

Dargestellt sind die drei Photobioreaktoren Labfors 5 Lux der Firma Infors HT. Die Glasreaktoren befinden sich im Inneren und wurden von einer Aluminium-Ummantelung umschlossen, in der sich die Lichteinheiten befanden. Zu Steuerung der Photobioreaktoren wurde die EVE Core Software verwendet.

Pro Bioreaktor-Terminal waren insgesamt 12 Panels kreisförmig aufgestellt (Abbildung 14). Von den 12 Panels waren je vier Panels einer der drei möglichen Wellenlänge zugeordnet. Das Blaulichtpanel emittierte Licht bei 470 nm mit sechs LEDs. Die verwendete Lichtintensität bei 100%, gemessen im Glasbioreaktor, betrug  $395 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$ . Das Rotlichtpanel emittierte mit sechs LEDs Licht bei 660 nm. Die verwendete Lichtintensität bei 100% betrug

205  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , gemessen im Glasbioreaktor. Das Dunkelrotpanel emittierte mit acht LEDs Licht mit einer Wellenlänge von 735 nm und wurde ebenfalls mit einer maximaler Lichtintensität von 100% verwendet. Die Lichtintensität von Dunkelrotlicht konnte mit dem verwendeten Lichtmessgerät nicht ermittelt werden, da es nur Wellenlängen im Bereich 400 bis 700 nm messen konnte.



**Abbildung 14 Lichteinheit der Bioreaktoren.**

Schematische Darstellung der 12 LED-Panels im Photobioreaktoren. Dabei emittierte jeder LED-Panel eine spezifische Wellenlänge, Blau-, Rot- oder Dunkelrotlicht und diese waren, pro Wellenlänge, immer versetzt angeordnet (A). Abbildung B stellt das aufgeklappte Gehäuse dar, worin die LED-Panels erkennbar sind. Abbildung C zeigt den Glasbioreaktor im Gehäuse mit allen eingeschalteten LED-Panels. Abbildung D zeigt die Kultivierung unter Blaulichtbedingungen. Abbildung A *created with BioRender.com*

### 2.2.8.4 Kultivierung im Bioreaktor

Die eingesetzten Sonden für die pH-, Optische Dichte (OD) und Gelöstsauerstoffkonzentration ( $\text{pO}_2$ ) Wertbestimmung wurden nach Herstellerangaben kalibriert. Die Kalibrierung der pH-Sonde erfolgte vor dem Autoklavieren der Hauptkultur im Bioreaktor, die der  $\text{pO}_2$ - und OD-Sonde vor der Innokulation der Hauptkultur.

Die maximale Gelöstsauerstoffkonzentration wurde bei 600 rpm und einer Luft-Begasungsrate von 1,5 L/ min festgesetzt.

Vor jeder Batchkultivierung wurde 1,5 L Medium, inklusive Glukose, in den Bioreaktor gefüllt und dieser anschließend mit den entsprechenden Sonden für pH, OD und  $\text{pO}_2$  im Autoklaven

## Material und Methoden

bei 121 °C und 1 Bar Überdruck für 15-20 min autoklaviert. Anschließend wurde das Medium mit Hilfe des Kühlsystems der Bioreaktoreinheit auf die entsprechende Temperatur gekühlt.

Das entsprechende Volumina der Vorkultur wurde mit einer sterilen Spritze aufgezogen und die Hauptkultur durch ein steriles Septum mit einer abgeflamnten Nadel inokuliert. Die Zelldichte der Hauptkultur sollte zu Beginn immer  $10^6$  Zellen pro Milliliter betragen. Gerührt wurde mit Hilfe von zwei 6-Blatt-Scheibenrührer, Obenantrieb, wobei bei dem gewählten Arbeitsvolumen nur der untere 6-Blatt-Scheibenrührer Kontakt zum Medium hatte.

Es wurde, wenn nicht anders erwähnt, mit einer Rührgeschwindigkeit von 600 Umdrehungen/ min, der maximalen Gelöstsauerstoffkonzentration, einer maximalen Luft-Begasungsrate von 1,5 L/ min (gekoppelt mit der gemessenen Gelöstsauerstoffkonzentration) und bei pH 5,8 kultiviert. Der pH-Wert, die Temperatur der Kultur, eventuelle Schaumbildung und die Begasungsrate wurde automatisch korrigiert. Mit Hilfe der Software EVE waren alle Daten während der Batchkultivierung durch einen Remotezugriff verfolgbar, um bei Bedarf zu konnte interagiert werden.

### 2.2.9 Durchflusszytometrische Methode für die Detektion von yEGFP

#### Benötigtes Material

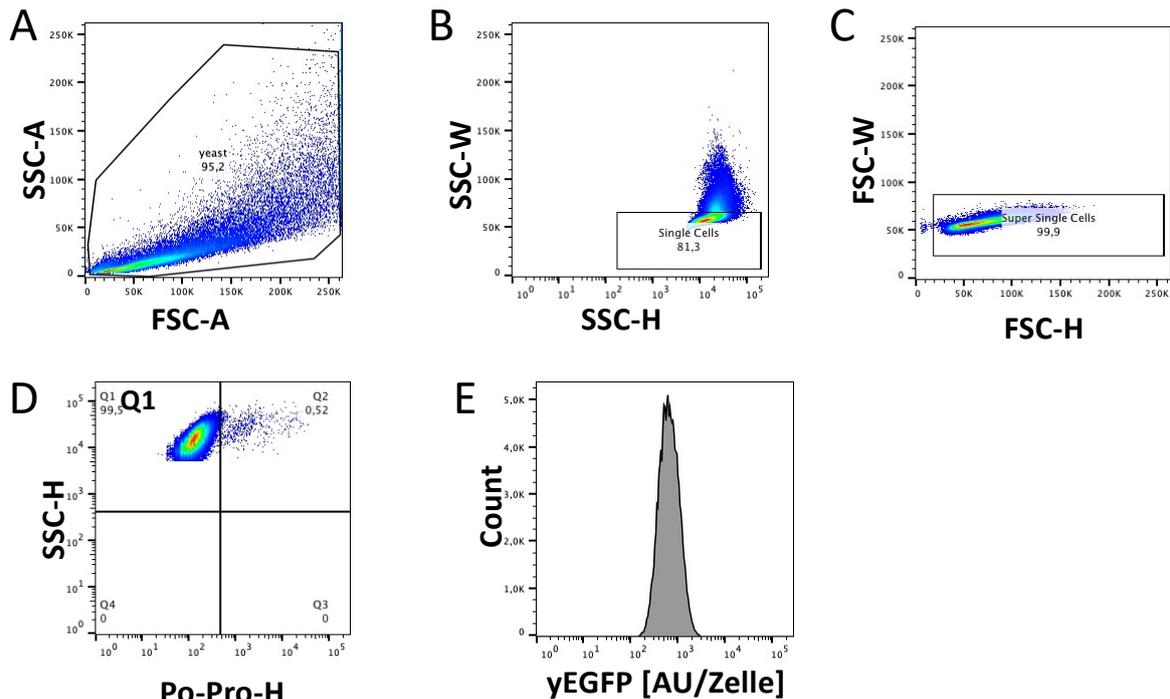
- Po-Pro-1 (Thermofisher, Katalognummer P3581)

Das Reporterprotein yEGFP wurde mit Hilfe des FACS Melody (BD) mit dem blauen Laser (Tabelle 17) detektiert. Zu Beginn jeder Messung wurde der Lebend-Tot Marker Po-Pro-1 1:2000 in ddH<sub>2</sub>O vorverdünnt. Anschließend wurde die Hefeprobe mit dem gleichen Volumen Po-Pro-1 verdünnt, kurz bei Raumtemperatur inkubiert und die Suspension durchflusszytometrisch untersucht. Hierzu wurde die Hefepopulation im SSC-A gegen FSC-A Kanal eingegrenzt (Abbildung 15A). Anschließend wurden die Einzelzellen im SSC-W gegen SSC-H bestimmt und eingegrenzt (Abbildung 15B). Diese Einzelzellen wurden nochmal im FSC-W gegen FSC-H dargestellt (Abbildung 15C). Es wurden 100.000 Events im Bereich der Einzelzellen aufgenommen. Die Einzelzellen wurden anschließend anhand der Laserbestrahlung weiter sortiert und eingegrenzt.

**Tabelle 17** Verwendete Laser für die Durchflusszytometrie

<b>Laser (nm)</b>	<b>Filter</b>	<b>Detektion</b>
Violett (405 nm)	BP 448/ 45	Po-Pro-1
Blau (488 nm)	BP 527/ 32; LP 507/ 5	yEGFP
Gelb-Grün (561 nm)	BP 582/ 15	(Kontrolle)

Um die Einzelzellen nach Lebend-Tot zu unterscheiden, wurden diese im SSC-H gegen Po-Pro-1-H Kanal aufgetragen (Abbildung 15D). Dabei wurden die linke Population im Q1 Quadranten als lebend definiert. Von den Lebend-Einzelzellen wurde dann der mediane yEGFP-Signalwert ermittelt (Abbildung 15E).



**Abbildung 15 Gating-Strategie zur Bestimmung des median yEGFP Wertes der lebenden Einzelzellen.**

Gezeigt ist die Eingrenzung der jeweiligen Populationen. Zu Beginn wurde die Elternpopulation im SSC-A und FSC-A Kanal erfasst (A). Aus dieser Population wurden die Einzelzellen im SSC-W gegen SSC-H ausgewählt (B). Es wurden immer 100.000 Einzelzellen erfasst Diese Einzelzellen wurden nochmals in FSC-W gegen FSC- H dargestellt und eingegrenzt (C). Nachfolgend wurde im SSC-H gegen Po-Pro-1-H Kanal die lebenden Einzelzellen bestimmt (D), die sich im Q1 Quadranten befanden. Aus diesem Quadranten wurde der Median des yEGFP-Signals ermittelt (E), der für die Auswertung benötigt wurde.

## 2.2.10 Protein- und Biochemische Methoden für die Detektion von VP1

Wurde anstelle von yEGFP das VP1 (versehen mit einem His-Tag) als Reporterprotein verwendet, so wurden protein- und biochemischer Methoden eingesetzt, um VP1 zu detektiert. Hierfür wurden die Hefezellen zu Beginn aufgeschlossen (Kapitel 2.2.10.1).

### 2.2.10.1 Zellaufschluss mit Detergenzien

Benötigte Materialien für den Zellaufschluss sind in der Tabelle 18 zusammengefasst.

**Tabelle 18 Zellaufschluss Detergenzien**

Material	Zusammensetzung/ Bestellnummer
Lysepuffer A	NaOH (0,1 M), EDTA (0,05 M), 2% SDS 2% $\beta$ -Mercaptoethanol
4 x Laemmli Puffer	BioRad, Bestellnummer 1610747)

Nach dem Ende der Kultivierung oder bei Zwischenproben wurde die optische Dichte der Suspension bei 600 nm gemessen ( $OD_{600}$ ). Dabei wurde angenommen, dass eine unverdünnte  $OD_{600}$  bei 0,1 in etwa  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter entsprachen (Gietz and Schiestl 2007b). Es wurden, wenn nicht anders erwähnt,  $10^8$  Zellen geerntet und mit 200  $\mu$ L Lysepuffer A für 10 min bei 90 °C inkubiert. Anschließend wurden 5  $\mu$ L einer 5 M Essigsäure hinzugefügt und für 30 s geschüttelt. Die Probe wurde dann mit 50  $\mu$ L 4 x Laemmli Puffer versetzt und für weitere 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 13.000 x g für 10 min zentrifugiert und 10  $\mu$ L bzw. 20  $\mu$ L vom Überstand in die Taschen des Polyacrylamid-Gels pipettiert und der SDS-Lauf gestartet (Kapitel 2.2.10.2).

### 2.2.10.2 SDS Lauf

Die benötigten Materialien für die SDS-Methode sind in der Tabelle 19 zusammengestellt.

**Tabelle 19 Material für SDS-Gel**

<b>Material</b>	<b>Zusammensetzung/ Bestellnummer</b>
10 x Laufpuffer auf 1 L mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen, pH 7,5, Lagerung bei 5 °C (1:10 mit ddH <sub>2</sub> O verdünnt bei Verwendung),	Tris (30,29 g; 0,25 M), Glycin (114,13 g; 1,92 M), SDS 10 g SDS (0,035 M)
Mini-PROTEAN TGX Stain-free Gels mit 4- 15% Polyacrylamid	BioRad (Bestellnummer 4568083 und 4568086)
Precision Plus Protein Dual Color Standards	BioRad (Bestellnummer: 1610374)

Die Elektrophorese wurde bei 100 V für circa 15 min gestartet, bis die Wanderung der Proben durch das Sammelgel erfolgte. Anschließend wurde auf 180 V erhöht. Nachdem die Lauffront das untere Ende des Polyacrylamid-Gels erreicht hatte, wurden die Gele aus der Halterung präpariert und weiterverarbeitet.

### 2.2.10.3 Silberfärbung nach Ansorge

Um aufgeschlossene Proteine sichtbar zu machen, wurde das SDS-Gel einer Silberfärbung oder einer Coomassie-Färbung (Kapitel 2.2.10.4) unterzogen. Das nötige Material für die Silberfärbung sind in der Tabelle 20 zusammengefasst.

**Tabelle 20 Material für die Silberfärbung**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Fixierlösung	50% Methanol (v/ v), 12% Trichloressigsäure (w/ v), 2% Kupferchlorid (w/v)
Lösung W	10% Ethanol, vergällt (v/ v), 5% Essigsäure (v/ v)
Entwicklerlösung	2% Kaliumcarbonat, 0,01% Formaldehyd (v/ v)
Silbernitratlösung	0,2% Silbernitrat (w/ v) aufgefüllt mit VE Wasser

Die Silberfärbung wurde nach der Methode von (Ansorge 1985) durchgeführt. Dazu wurde das SDS-Gel (Kapitel 2.2.10.2) über Nacht in der Fixierlösung auf einem Tischschüttler bei 15 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gel in Lösung W für 10 min und anschließend für weitere 10 min in einer 0,01% Kaliumpermanganatlösung geschüttelt. Es folgte zweimaliges Schütteln für 5 min in der Lösung W, ferner 10 min in 10% Ethanol und folgend 10 min in VE-Wasser. Danach wurde das Gel für 10 min in der Silbernitratlösung inkubiert und für 20 sek in VE-Wasser gewaschen. Das gewässerte Gel wurde hiernach für 1 min in einer 10%igen Kaliumcarbonatlösung geschwenkt und so lange in der Entwicklerlösung inkubiert, bis Banden sichtbar wurden. Das Gel wurde zur Farbaufhellung 10 min in der Lösung W inkubiert und in VE-Wasser bei 4 °C gelagert, bis es im Imager aufgenommen wurde.

#### **2.2.10.4 Coomassie Färbung**

Für die Coomassie Färbung wurde 1ROTI® Blue (Roth, Bestellnummer A152.1) verwendet. Dabei wurde das SDS-Gel (Kapitel 2.2.10.2) über Nacht bei 10 rpm sanft bei Raumtemperatur eingefärbt. Am nächsten Tag wurde für 4-6 h mit ddH<sub>2</sub>O, mit mehrmaligem Wechsel, entfärbt und das Gel im Imager aufgenommen.

#### **2.2.10.5 Western Blot**

Für die Detektion von VP1 wurde ein Western Blot durchgeführt. Die dafür benötigten Materialien sind in der Tabelle 21 zusammengefasst.

**Tabelle 21 Material für den Western Blot**

<b>Material</b>	<b>Zusammensetzung/ Bestellnummer</b>
Transfer Puffer (pH 8, Lagerung bei 5 °C)	200 mL 5xTransferpuffer (BioRad) 600 mL ddH <sub>2</sub> O 200 mL Ethanol (99,5%)
Trans-Blot Turbo RTA Mini 0,2 µm Nitrocellulose Transfer Kit	BioRad (Bestellnummer 1704270)

Das Polyacrylamid-Gel (Kapitel 2.2.10.2) wurde nach dem Lauf aus den Plastikplatten herausgenommen und in Transferpuffer zwischengelagert. In dieser Zeit wurde Filterpapier mit dem Transferpuffer äquilibriert. Die erste Schicht Filterpapier wurde auf die Anodenplatte gelegt, gefolgt von der 0.2 µm Nitrocellulose Membran, dann das Gel und anschließend die zweite Schicht Filterpapier. Mit einem Roller wurde glattgestrichen, um Blasen zu entfernen. Die Kathodenplatte wurde platziert und der Transfer im Trans-Blot Turbo (BioRad) mit dem Protokoll für Mixed MW 2,5 A, 25 V und 7 M gestartet.

### **2.2.10.6 Blockierung und Detektion von VP1 mit ein His-tag**

Benötigtes Material:

- Monoclonal Anti-polyHistidine-Peroxidase clone HIS-1 (Sigma-Aldrich, Bestellnummer A7058)

Die Nitrocellulose-Membran aus dem Schritt 2.2.10.5 wurde mit 5%iger Milchpulver eine Stunde blockiert, um unspezifische Wechselwirkungen im nächsten Schritt zu minimieren. Nachdem die Blockierlösung entfernt wurde, wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS, das 0,05% Tween 20 enthielt, gewaschen. In der Zwischenzeit wurde der Antikörper, monoklonale Anti-Polyhistidin-Peroxidase Antikörper, 1:4000 in PBS-Puffer (1 % BSA und 0,05% Tween 20) verdünnt.

Nach den Waschsritten wurde der Antikörper auf die Nitrocellulose Membran gebracht und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die die Membran dreimal für 5 min mit PBS (0,05% Tween20) gewaschen.

Final wurde die Membran mit dem TMB Peroxidase Kit behandelt und im Imager die Chemilumineszenz detektiert.

### 2.2.11 Softwareanalyse

#### 2.2.11.1 Plasmid Design

Das Designen der Plasmide und Primer wurde mit Hilfe der Software CLC Main Workbench (V7.5.3) bewerkstelligt.

#### 2.2.11.2 Durchflusszytometrie

Die Rohdaten der durchflusszytometrischen Messung wurden mit Hilfe der FlowJo (V10.6) Software analysiert. Mit dieser Software wurde der mediane Wert der detektierten Signalstärke von yEGFP oder Po-Pro-1 ermittelt und weiter mit der Software GraphPad Prism ausgewertet.

#### 2.2.11.3 Statistische Auswertung

Die Daten werden präsentiert als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (standard deviation; SD). Mit n werden die Anzahl der Einzelproben bezeichnet. Statistische Testungen wurden per *Student t-Test* für ungepaarte Messungen durchgeführt oder bei mehr als zwei Versuchsgruppen per *One-Way-ANOVA* durchgeführt. Letzterem schloss sich der *Dunnnett's-Test* an, bei Vergleichen ausschließlich zur Kontrollgruppe. In den Abbildungen wird das Signifikanzniveau in Form von Sternchen (\*p < 0.0332, \*\*p < 0.0021, \*\*\*p < 0.0002, \*\*\*\*p < 0.0001) oder mit \*ns (nicht signifikant) angezeigt. Die Analysen wurden mit der GraphPad Prism 8 Software durchgeführt.

#### 2.2.11.4 Molekularbiologische Auswertung

Grafische Auswertung, Bestimmung des molekularen Gewichts von VP1 und die Nachbehandlung der silbergefärbten, Coomassie- und Chemilumineszenz-Bilder wurden mit der Software Image Lag (BioRad) erstellt.

#### 2.2.11.5 Bioreaktor

Mit der EVE Core Software, konnten sämtliche Voreinstellung für die Kultivierung im Bioreaktor implementiert, verfolgt und bei Bedarf während der Fermentierung korrigiert werden.

### 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Reporter- und Expressionsplasmide konstruiert und anschließend als Kassetten (Kapitel 2.2.5 und 2.2.6) genomisch in die Hefe integriert. Im Kapitel 3.1 werden die hergestellten Reporterplasmide, in Kapitel 3.2 die hergestellten Expressionsplasmide aufgelistet, als auch graphisch dargestellt. Anschließend folgt die Bestimmung der basalen Transkriptionsbestimmung der Hefemutanten, die die Reporter-kassette mit dem yEGFP Reporter trugen, anschließend der Hefemutanten, die sowohl die Reporter- als auch Expressionskassette (Flirt System) genomisch integriert hatten.

#### 3.1 Generierte Reporterplasmide

Die folgende Tabelle (Tabelle 22) listet die hergestellten Reporterplasmide auf. Es wird der interne Name, die Anzahl der Bindestellen für den jeweiligen optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktor, der *core* Promotor, der Reporter und weitere Informationen angeben.

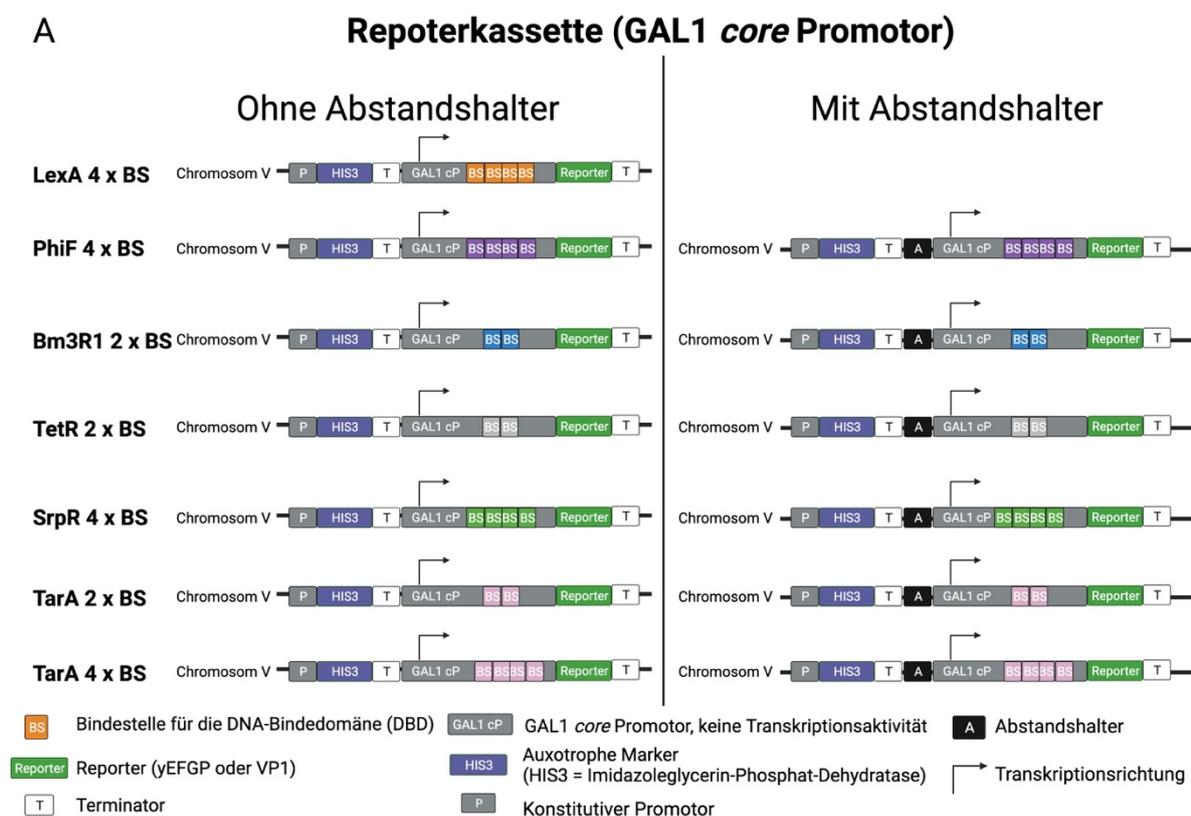
**Tabelle 22: Hergestellte Reporterplasmide**

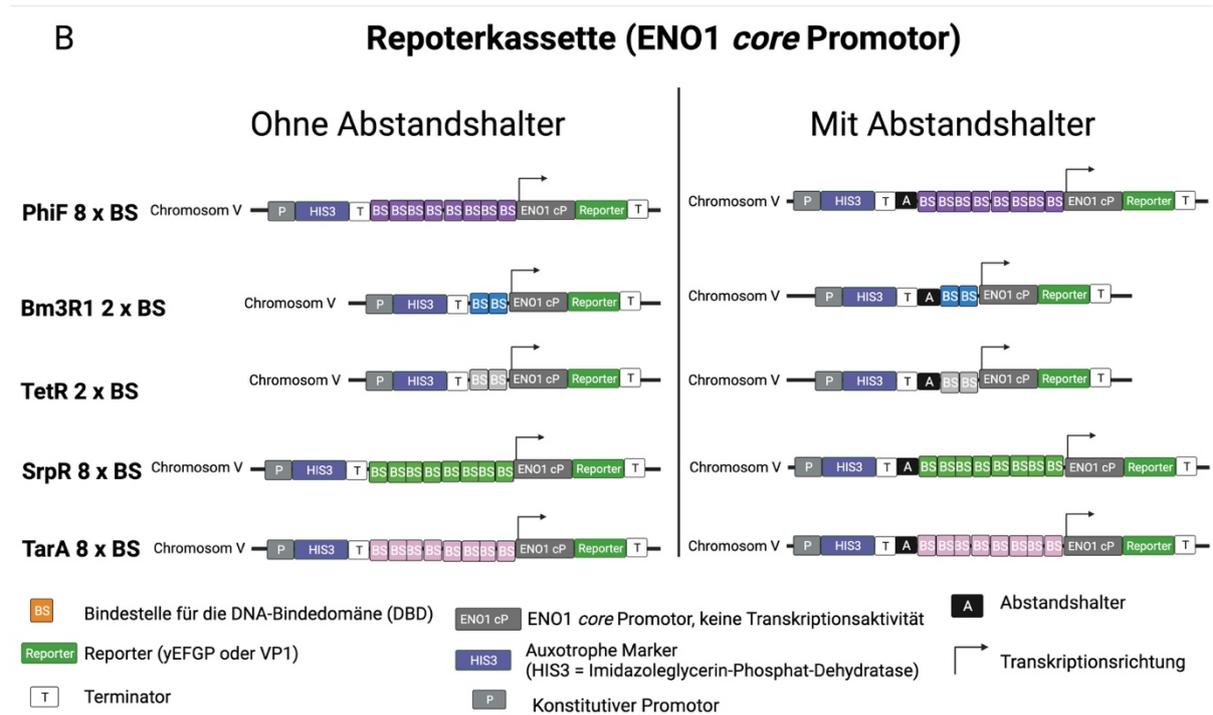
Name	Kopien der Bindestelle	<i>core</i> Promotor	Reporter-protein	Zusatzinformation
pPD105	4 x LexA	GAL1	yEGFP	
pPD158	4 x PhiF	GAL1	yEGFP	
pPD158_S	4 x PhiF	GAL1	yEGFP	Mit Abstandshalter
pPD126	8 x PhiF	ENO1	yEGFP	
pPD126_S	8 x PhiF	ENO1	yEGFP	Mit Abstandshalter
pPD154	2 x Bm3R1	GAL1	yEGFP	
pPD154_S	2 x Bm3R1	GAL1	yEGFP	Mit Abstandshalter
pPD127	2 x Bm3R1	ENO1	yEGFP	
pPD127_S	2 x Bm3R1	ENO1	yEGFP	Mit Abstandshalter
pPD157	2 x TetR	GAL1	yEGFP	
pPD157_S	2 x TetR	GAL1	yEGFP	Mit Abstandshalter
pPD128	2 x TetR	ENO1	yEGFP	
pPD128_S	2 x TetR	ENO1	yEGFP	Mit Abstandshalter
pPD159	4 x SrpR	GAL1	yEGFP	
pPD159_S	4 x SrpR	GAL1	yEGFP	Mit Abstandshalter
pPD129	8 x SrpR	ENO1	yEGFP	
pPD129_S	8 x SrpR	ENO1	yEGFP	Mit Abstandshalter

## Ergebnisse

pPD155	4 x TarA	GAL1	yEGFP	
pPD155_S	4 x TarA	GAL1	yEGFP	Mit Abstandshalter
pPD156	2 x TarA	GAL1	yEGFP	
pPD156_S	2 x TarA	GAL1	yEGFP	Mit Abstandshalter
pPD130	8 x TarA	ENO1	yEGFP	
pPD130_S	8 x TarA	ENO1	yEGFP	Mit Abstandshalter
pPD189	4x PhiF	GAL1	VP1	Mit Abstandshalter

Die grafische Darstellung aller Reporter-kassetten ist in der folgenden Abbildung zusammengefasst (Abbildung 16).





**Abbildung 16** Schematische Darstellung aller generierten Reporter-kassetten mit dem GAL1 core Promotor (A) und ENO1 core Promotor (B).

Created with BioRender.com

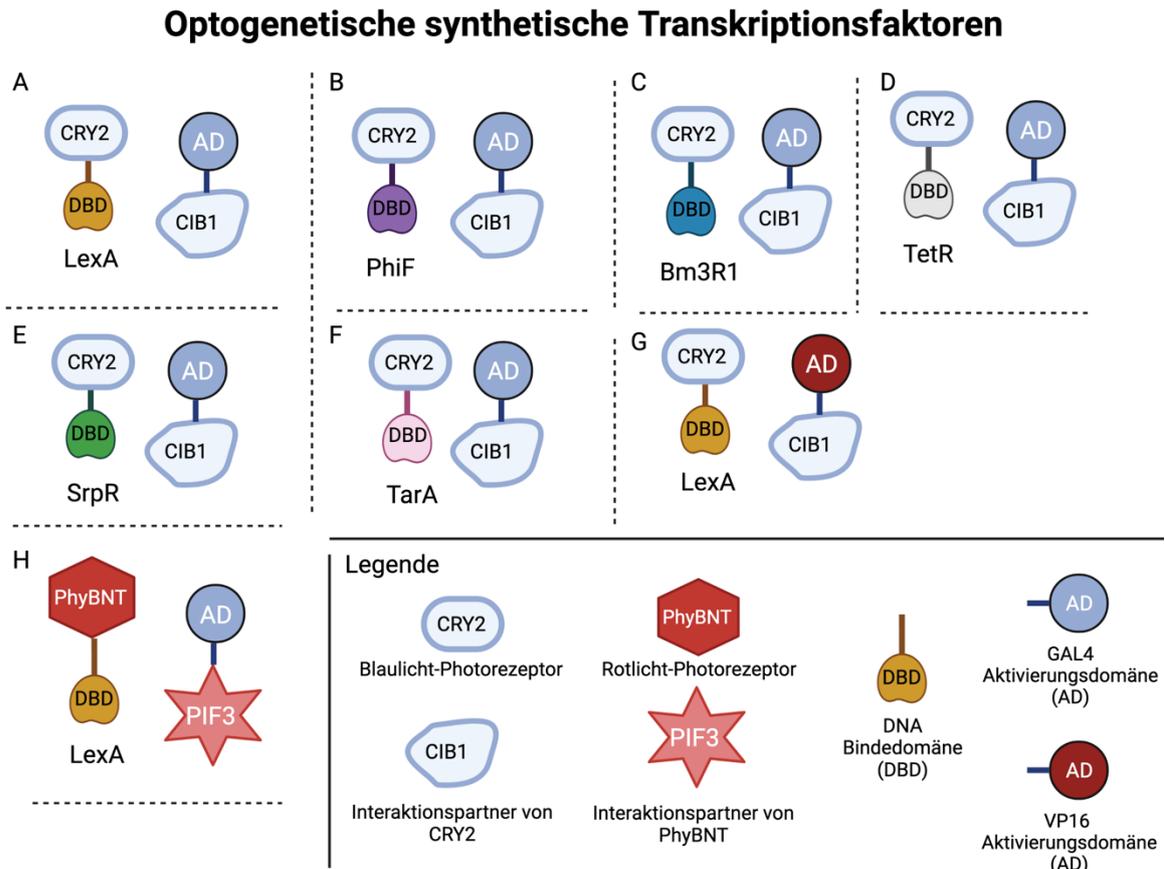
### 3.2 Generierte Expressionsplasmide

Tabelle 23 listet die Expressionsplasmide auf, die die nötigen zwei Bausteine für den optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktor tragen. Die prokaryotische DNA-Bindedomäne war immer N-terminal an CRY2 bzw. PhyBNT, die Aktivierungsdomäne war ebenfalls N-terminal am Interaktionspartner CIB1 bzw. PIF3 fusioniert.

**Tabelle 23: Hergestellte Expressionsplasmide**

Name	Photorezeptor-Paar	DNA-Bindedomäne	Aktivierungsdomäne
pPD107	CRY2 & CIB1	LexA	VP16
pPD108	CRY2 & CIB1	LexA	GAL4
pPD110	PhyBNT & PIF3	LexA	GAL4
pPD131	CRY2 & CIB1	PhiF	GAL4
pPD132	CRY2 & CIB1	Bm3R1	GAL4
pPD133	CRY2 & CIB1	TetR	GAL4
pPD134	CRY2 & CIB1	SrpR	GAL4
pPD135	CRY2 & CIB1	TarA	GAL4

Folgend werden die Bausteine, also die optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktoren grafisch dargestellt (Abbildung 17).



**Abbildung 17** Optogenetische synthetische Transkriptionsfaktoren der Expressionskassette.

Gezeigt sind die Pärchen, die eine Expressionskassette konstitutiv exprimierte. Diese waren das Fusionsprotein aus dem Photorezeptor und der einer prokaryotischen DNA-Bindedomäne, sowie dem Interaktionspartner und einer Aktivierungsdomäne. Der Blaulichtphotorezeptor CRY2 war mit der LexA (A,G), PhiF (B), Bm3R1 (C), TetR (D), SrpR (E) oder der TarA (F) DNA-Bindedomäne fusioniert. Der Interaktionspartner CIB1 an der fungalen GAL4- Aktivierungsdomäne (A-F) oder an der viralen VP16- Aktivierungsdomäne (G) fusioniert. Der Rotlicht-Photorezeptor PhyBNT war mit der LexA DNA-Bindedomäne fusioniert und der Interaktionspartner PIF3 an der fungalen GAL4- Aktivierungsdomäne (H). *Created with BioRender.com*

### 3.3 Hintergrundbestimmung der Reporter-kassette

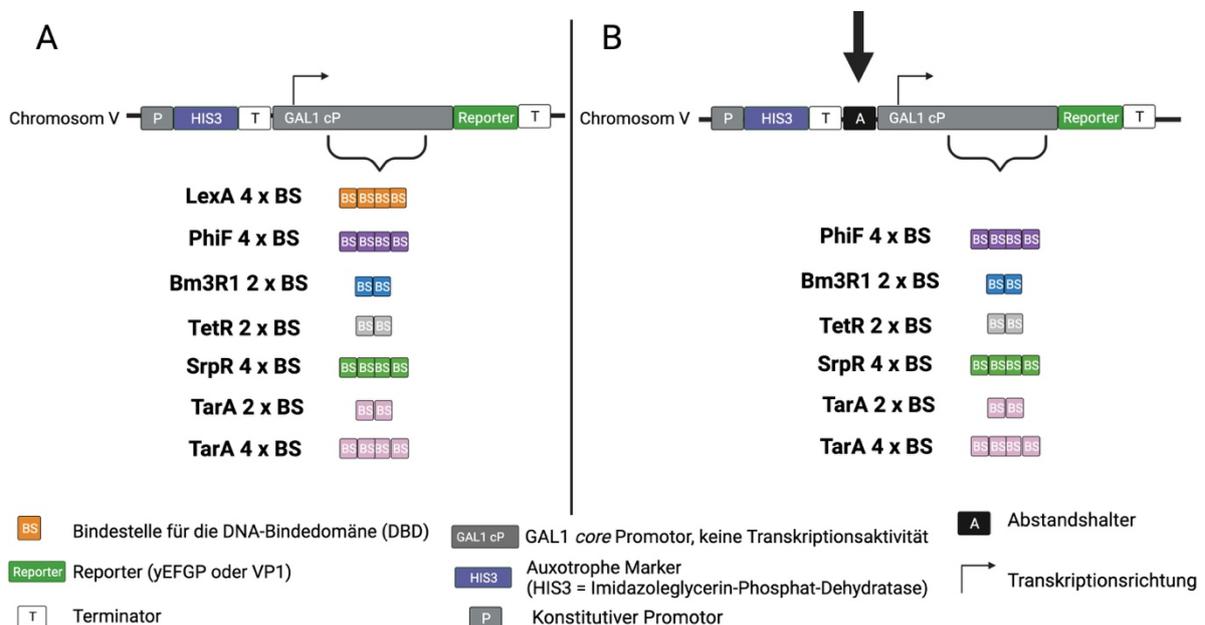
Zu Beginn dieser Arbeit war es essenziell zu verifizieren, ob die genomisch eingebaute Reporter-kassette (siehe Kapitel 2.2.5) ohne der Expressionskassette als Vorstufe des ganzen Systems, ein orthogonales System bildet. Die basale Transkription und damit verbundene Expression des Reporters sollten hierbei nur minimal nachzuweisen sein. Dieses beinhaltet, dass die Reporter-kassette allein keine Genexpression des Reportes weder im Dunkeln noch unter Blaulichtbestrahlung hervorrufen sollte.

## Ergebnisse

Um diese Orthogonalität experimentell zu verifizieren, wurden durchflusszytometrische Messungen unternommen. Es wurden insgesamt 23 verschiedene Reporter-kassetten konstruiert (Kapitel 3.1, Abbildung 16), jeweils genomisch in YPH500 eingebaut und hinsichtlich ihrer basalen Transkription für den Reporter yEGFP vermessen. Zuerst werden die Ergebnisse für den GAL1 und im Anschluss für den ENO1 *core* Promoter gezeigt.

### 3.3.1 Hintergrundsignal von GAL1 *core* Promotor mit und ohne Abstandshalter

Abbildung 18 zeigt schematisch die verschieden genomisch integrierten Reporter-kassetten mit dem GAL1 *core* Promotor, optional mit einem Abstandshalter und den jeweiligen Bindestellen.

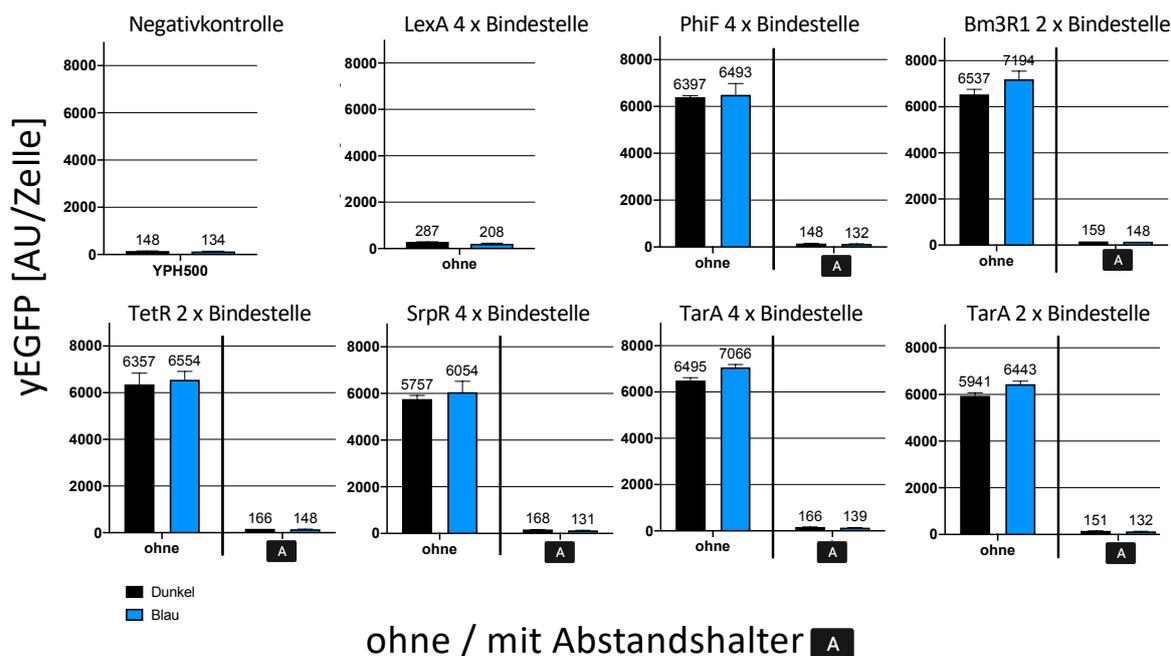


**Abbildung 18 Schematischer Aufbau der genomisch integrierten Reporter-kassette mit GAL1 *core* Promotor.**

Gezeigt ist der schematische Aufbau der genomisch eingebauten Reporter-kassette mit dem GAL1 *core* Promotor, ohne (A) und mit (B) Abstandshalter. Zudem sind die jeweiligen Bindestellen mit ihrer entsprechenden Anzahl dargestellt, die sich im GAL1 *core* Promoter befanden. Insgesamt wurden sieben verschiedener Hefemutanten mit der Reporter-kasse ohne einem Abstandshalter und sechs mit einem Abstandshalter hergestellt. *Created with BioRender.com*

Nachfolgenden werden die durchflusszytometrischen Ergebnisse für die YPH500 Mutanten mit der Reporter-kassette mit GAL1 *core* Promotor sowohl mit als auch ohne Abstandshalter gezeigt (Abbildung 19). Es wurden insgesamt 13 verschiedene Konstrukte, davon sieben ohne Abstandshalter, auf ihre basale Transkriptionsaktivität von yEGFP untersucht. Als Negativkontrolle wurde der YPH500 Stamm ohne genetische Modifikationen mitgeführt. Die Negativkontrolle wurde im SD-Medium mit allen Aminosäuren kultiviert. Die Hefemutanten wurden entweder 22 Stunden im Dunkeln oder respektive unter Blaulichtbestrahlung kultiviert (siehe Kapitel 2.2.8.2).

## Ergebnisse



**Abbildung 19** Auswirkung des Abstandshalters in der Reporter-kassette mit GAL1 core Promotor auf die yEGFP Produktion.

Gezeigt sind die Auswertungen der durchflusszytometrischen Messungen von der Negativkontrolle und der 13 getesteten YPH500 Mutanten mit genomisch integrierter Reporter-kassette. Über jedem Diagramm wird angegeben welche Bindestelle sich im GAL1 core Promotor befand sowie deren Kopiezahl. Auf der Abszisse wird angegeben, ob sich vor dem core Promoter entweder kein (ohne) oder ein Abstandshalter (A im schwarzem Kästchen) befand. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Jeder der 14 Hefemutanten wurden im Dunkeln oder unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung kultiviert und im Anschluss das yEGFP Signal durchflusszytometrisch detektiert. n= 6 (für Negativkontrolle), sonst n = 3

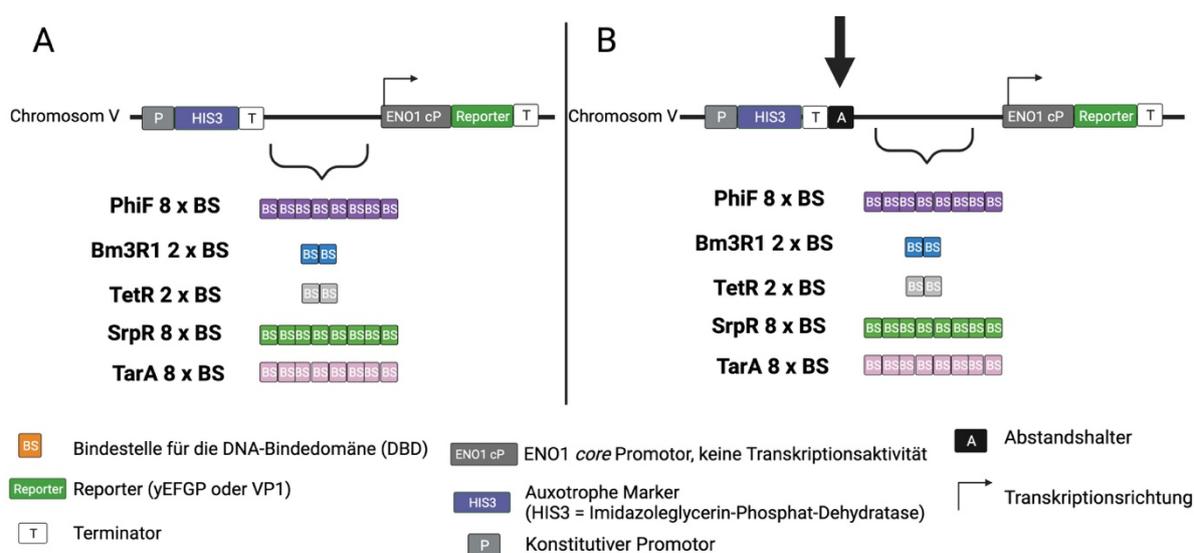
Die Ergebnisse aus Abbildung 19 zeigen, dass die YPH500 Mutante LexA 4 x Bindestelle ohne Abstandshalter kein erhöhtes yEGFP AU Signal im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte. Alle weiteren Mutanten ohne Abstandshalter wiesen eine deutlich erhöhte basale Transkriptionsaktivität von yEGFP im Dunkeln als auch unter Blaulichtbestrahlung auf. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass sämtliche YPH500 Mutanten mit einem Abstandshalter ähnlich niedrige yEGFP Hintergrundsignale wie die Negativkontrolle lieferten.

Demzufolge wurden für die zweite zielgerichtete Genomintegration der Expressionskassette (siehe Kapitel 2.2.6) folgende sieben YPH500 Mutanten ausgewählt: LexA **ohne** Abstandshalter sowie für die anderen Konstrukte PhiF, Bm3R1, SrpR, und TarA (4 x Bindestelle und 2 x Bindestelle) **mit** Abstandshalter in der Reporter-kassette.

### 3.3.2 Hintergrundsignal von ENO1 *core* Promotor mit und ohne Abstandshalter

Analog zu Kapitel 3.3.1, wurden verschiedene YPH500 Mutanten mit zwei unterschiedlichen Varianten der Reporter-kassette, mit und ohne Abstandshalter, auf die basale Transkriptionsaktivität bei Dunkelheit und bei Blaulichtbestrahlung untersucht und verglichen.

Abbildung 20 zeigt schematisch die 10 verschiedenen genomisch integrierten Reporter-kassetten mit dem ENO1 *core* Promotor, den jeweiligen Bindestellen und optional mit einem Abstandshalter.

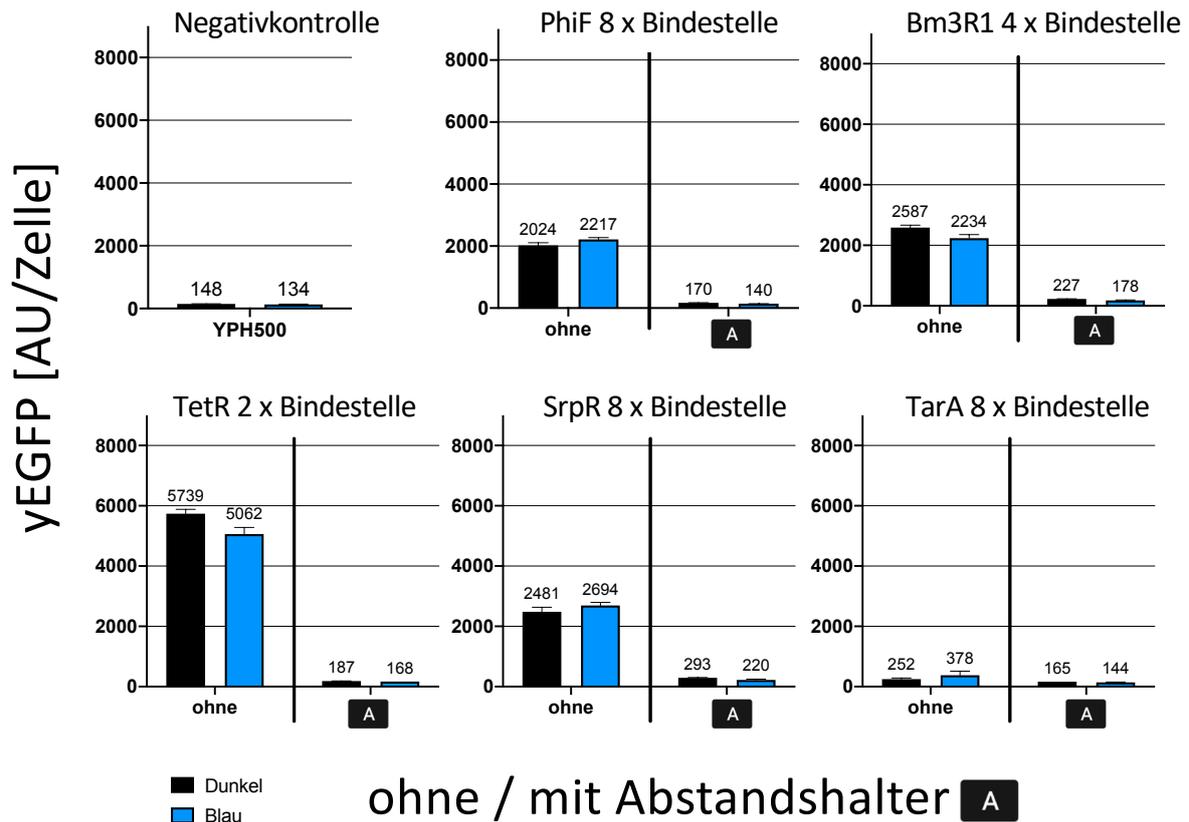


**Abbildung 20 Schematischer Aufbau der genomisch integrierten Reporter-kassette mit ENO1 *core* Promotor.**

Gezeigt ist der schematische Aufbau der genomisch eingebauten Reporter-kassette mit dem ENO1 *core* Promotor, ohne (A) und mit (B) Abstandshalter. Zudem sind die jeweiligen Bindestellen mit ihrer entsprechenden Anzahl dargestellt, die sich vor dem ENO1 *core* Promoter befanden. Insgesamt wurden fünf verschiedene Hefemutanten mit der Reporter-kasse ohne einem Abstandshalter und analog fünf mit einem Abstandshalter hergestellt. *Created with BioRender.com*

Nachfolgend werden die durchflusszytometrischen Ergebnisse für die YPH500 Mutanten mit der Reporter-kassette mit ENO1 *core* Promotor mit und ohne Abstandshalter gezeigt. Es wurden insgesamt 10 verschiedene Konstrukte auf ihre basale Transkriptionsaktivität von yEGFP untersucht. Als Negativkontrolle wurde der YPH500 Stamm ohne jegliche Modifikationen mitgeführt. Die Negativkontrolle wurde im SD-Medium mit allen Aminosäuren kultiviert. Die Kultivierung aller Mutanten erfolgte 22 Stunden im Dunkeln oder unter Blaulichtbestrahlung (siehe Kapitel 2.2.8.2).

## Ergebnisse



**Abbildung 21** Auswirkung des Abstandshalters in der Reporter-kassette mit ENO1 core Promotor auf die yEGFP Produktion.

Gezeigt sind Auswertungen der durchflusszytometrischen Messungen von der Negativkontrolle und der 10 getesteten YPH500 Mutanten mit genomisch integrierter Reporter-kassette. Über jedem Diagramm ist angegeben welche Bindestelle sich vor dem ENO1 core Promotor befand sowie deren Kopiezahl. Auf der Abszisse wird angegeben, ob sich vor dem core Promoter entweder kein (ohne) oder ein Abstandshalter befand (A im schwarzem Kästchen). Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Alle 11 Mutanten wurden im Dunkeln oder unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung für 22 Stunden kultiviert und im Anschluss das yEGFP Signal durchflusszytometrisch detektiert. n = 3

Die Ergebnisse aus Abbildung 21 zeigen, dass die YPH500 Mutante mit der Reporter-kassette TarA 8 x Bindestelle ohne und mit Abstandshalter keine erhöhten yEGFP Signale im Vergleich zur Negativkontrolle aufwies. Alle weiteren Mutanten ohne Abstandshalter wiesen eine deutlich erhöhte basale Transkriptionsaktivität von yEGFP im Dunkeln auf. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass sämtliche YPH500 Mutanten mit einem Abstandshalter ein ähnliches Grundsignal der Transkriptionsaktivität wie die Negativkontrolle aufwiesen.

Für die zweite genomische Integration der Expressionskassette wurden nur die Mutanten mit ähnlich basaler Transkriptionsaktivität wie die Negativkontrolle ausgewählt. Diese waren **ohne** Abstandshalter die TarA 8 x Bindestelle und die **mit** Abstandshalter PhiF, Bm3R1, TetR, SrpR und TarA 8 x Bindestelle in der Reporter-kassette.

### 3.4 Flirt, zielgerichtete Transkription des Reportergens

Nachdem die Reporter-kassetten genomisch eingebaut und daraufhin getestet wurden, welche Mutanten lichtunabhängig eine niedrige basale Transkriptionsstärke ähnlich der Negativkontrolle aufwiesen, folgte im zweiten Schritt der genomische Einbau der Expressionskassette. Diese wurde zielgerichtet am Ende der Reporter-kassette eingebaut, da hier die Homologieregionen, Box BC, lagen (siehe Kapitel 2.2.6).

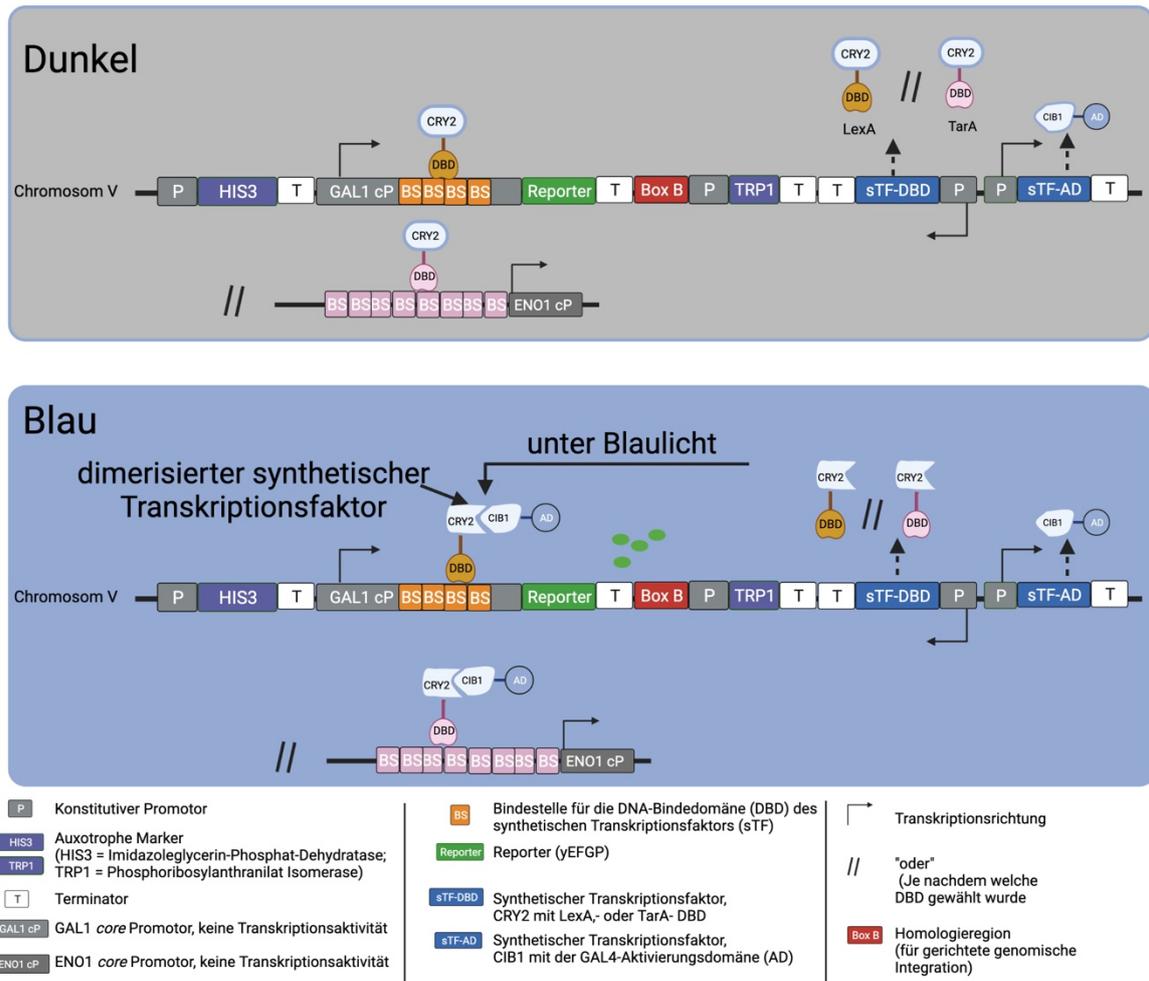
Die Expressionskassette enthielt die fehlenden Bausteine für den optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktor und damit essenziell für die lichtinduzierte Gentranskription des Reporters. Diese Bausteine wurden unabhängig vom Licht konstitutiv exprimiert. Erst unter Bestrahlung mit Blaulicht sollte ein funktionsfähiger dimerisierter optogenetischer synthetischer Transkriptionsfaktor gebildet werden, der spezifisch die Genexpression des Reportergens startet (siehe Kapitel 2.2.7, Abbildung 10). Dieses komplette System wird als Flirt System bezeichnet. Aufgrund dessen, dass unterschiedliche Reporter-kassetten (Kapitel 3.1) mit der zugehörigen Expressionskassette (Kapitel 3.2) integriert wurden, entstanden Hefemutanten mit unterschiedlichen Bindestellen und zugehörigen prokaryotischen DNA-Bindedomänen. Diese werden folgen als LexA, PhiF, Bm3R1, SrpR, TetR oder TarA Flirt System bezeichnet.

Die Mutanten mit genomisch komplett integriertem komplette Flirt System wurden wie im Abschnitt 2.2.8.2 kultiviert. Als Negativkontrolle wurde der YPH500 Stamm ohne jegliche Modifikation mitgeführt und im SD-Medium mit allen Aminosäuren kultiviert.

#### 3.4.1 LexA und TarA ohne Abstandshalter

In diesem Abschnitt sollte die Funktionsweise des vollständigen Flirt Systems überprüft werden. Dazu wurden in die Mutanten **ohne** Abstandshalter und mit einer nachweislich geringen basalen yEGFP Transkription (LexA 4x Bindestelle und GAL1 *core* Promotor, siehe Kapitel 3.3.1, sowie TarA8x Bindestelle mit dem Eno1 *core* Promotor, siehe Kapitel 3.3.2) die Expressionskassette genomisch integriert. Die schematische Darstellung wird in Abbildung 22 dargestellt.

## Ergebnisse

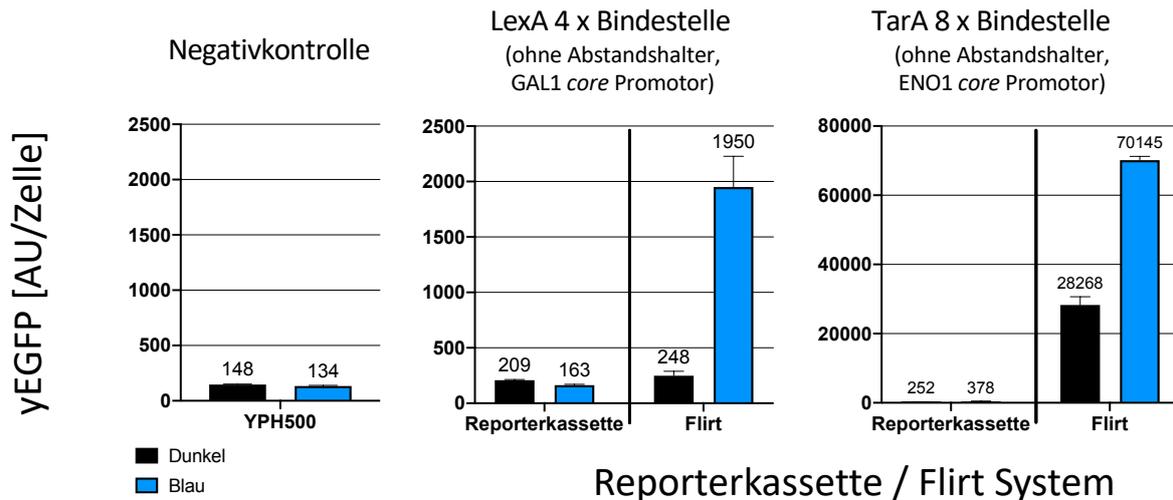


**Abbildung 22 LexA und TarA ohne Abstandshalter im kompletten Flirt System.**

Schematische Darstellung des Flirt Systems für LexA (orange) und TarA (pink) unter Dunkel- und Blaulichtbedingungen. Nur unter Blaulichtbestrahlung sollten die produzierten optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktor-Bausteine dimerisieren und einen funktionsfähigen dimerisierten synthetischen Transkriptionsfaktor bilden, sodass der Reporter transkribiert wird. *Created with BioRender.com*

Folgende Abbildung zeigt die Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse aus der Hauptkultur.

## Ergebnisse



**Abbildung 23** Durchflusszytometrische Ergebnisse des Flirt Systems LexA und TarA.

Zu sehen ist die Auswertung der durchflusszytometrische Ergebnisse. Auf der Abszisse werden die die Negativkontrolle YPH500 ohne jegliche Modifikationen, die YPH500 Mutanten mit integrierten LexA oder TarA Reporter-kassette sowie mit kompletten Flirt System dargestellt. Über jedem Diagramm ist angegeben, welche Bindestelle mit welchem *core* Promotor in die YP500 Mutante integriert wurden. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Es wurde unter Dunkel- und Blaulichtbedingungen, 22 Stunden kultiviert  $n = 3$  (für Reporter-kassette TarA 8 x Bindestelle), sonst  $n = 6$

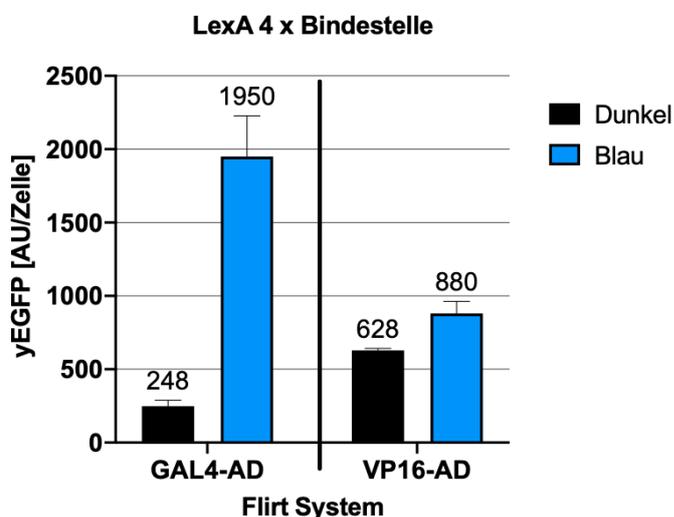
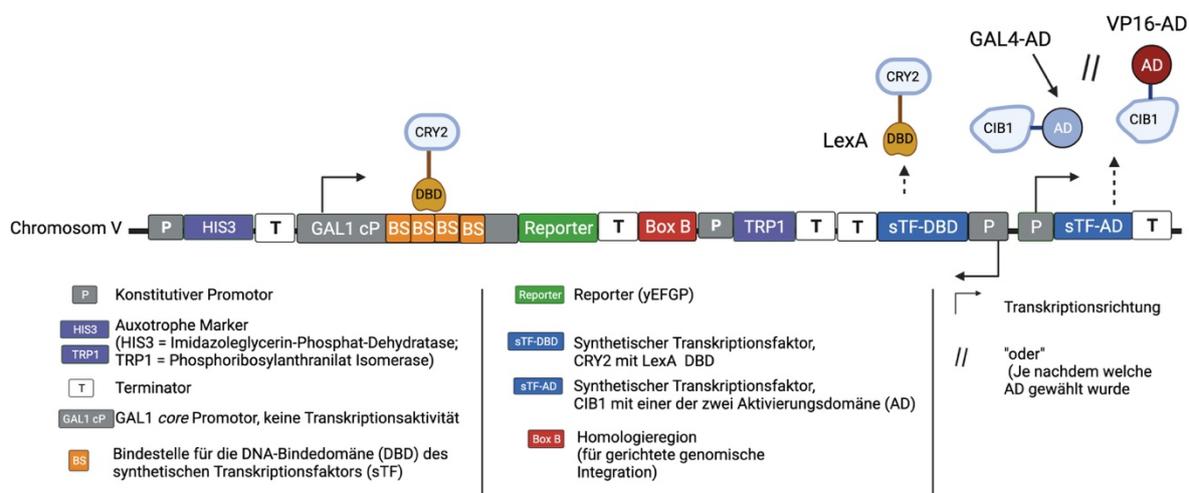
Die Ergebnisse in Abbildung 23 zeigen, dass eine kontinuierliche Blaulichtexposition beide Flirt Systeme aktivierte. Als Referenz wurde das yEGFP Signal der Negativkontrolle YPH500 ohne jegliche Modifikationen genommen. Vergleicht man das yEGFP Signal der Negativkontrolle mit den Reporter-kassetten-Mutanten unter beiden Lichtbedingungen, so konnte keine erhöhte basale yEGFP Expression in den Reporter-kassetten-Mutanten festgestellt werden. Ebenso gering war das yEGFP Signal des LexA Flirt Systems unter Dunkelbedingen. Eine Blaulichtexposition erzeugte im LexA Flirt System ein um achtfach höheres Signal im Vergleich zur Dunkelkontrolle.

Auffällig war, dass das Flirt System mit TarA unter beiden Lichtbedingungen aktiviert wurde. Das yEGFP Signal des Flirt Systems war unter Dunkelkontrollbedingung mehr als 100-fach so stark im Vergleich zu dem der Negativkontrolle. Da hier die basale Transkription unter Dunkelbedingungen deutlich höher als die der YPH500 Negativkontrolle ausfiel, wurde dieses Flirt System nicht weiterverfolgt.

Für weitere Untersuchungen wurde das LexA Flirt System, mit dem GAL1 *core* ohne Abstandshalter, weiterverfolgt.

### 3.4.2 LexA Flirt System mit unterschiedlichen Aktivierungsdomänen

In diesem Versuchsteil wurde untersucht, welche Auswirkung eine wirtsfremde Aktivierungsdomäne auf das Flirt System hat. Dazu wurde im LexA Flirt System (Kapitel 3.4.1) die fungale GAL4 durch die virale VP16-Aktivierungsdomäne in der Expressionskassette ausgetauscht (Abbildung 24, obere Darstellung). Die Reporter-kassette war in beiden LexA Systemen die gleiche und beinhaltete den GAL1 *core* Promotor, ohne Abstandshalter und die LexA 4x Bindestelle.



**Abbildung 24 Flirt System LexA mit zwei unterschiedlichen Aktivierungsdomäne im Vergleich.**

Oben ist das Flirt System schematisch dargestellt, welches unten durchflusszytometrisch gemessen wurde. Dabei wurde CIB1 entweder mit der fungalen GAL4- oder der virale VP16-Aktivierungsdomäne rekombiniert. Die Reporter-kassette war in beiden Flirt Systemen identisch. Das untere Diagramm zeigt die durchflusszytometrischen ausgewerteten Ergebnisse der jeweiligen LexA Flirt Systeme. Auf der Abszisse ist angegeben welche Aktivierungsdomäne an den synthetischen Transkriptionsfaktor mit CIB1 fusioniert wurde. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Beide Mutanten wurden für 22 Stunden entweder im Dunkeln oder unter Blaulichtbestrahlung kultiviert. n = 6 für das Flirt System mit Gal4-AD; n = 3 für das Flirt System mit VP16-AD. Oberes Schema: *Created with BioRender.com*

## Ergebnisse

Abbildung 24 belegt, dass eine Änderung der Aktivierungsdomäne im Flirt System LexA Einfluss auf das detektiert yEGFP Signal hatte. Das Flirt System mit der viralen VP16 Aktivierungsdomäne hatte ohne Lichtexposition eine etwa zweieinhalb höhere yEGFP Signalstärke als das Flirt System mit der fungalen Aktivierungsdomäne. Gleichzeitig fiel die Aktivierung unter Blaulichtbestrahlung im Vergleich zu LexA mit Gal4 deutlich schwächer aus.

Somit wurden für die folgenden Versuche ausschließlich Expressionskassetten genomisch integriert, die die Geninformation für das Fusionsprotein aus der GAL4 Aktivierungsdomäne mit dem CIB1 trugen.

### **3.4.3 ENO1 core Promotor mit Abstandhalter und Expressionskassette**

In diesem Ergebnisteil werden die Ergebnisse gezeigt, nachdem die basale Transkriptionsaktivität der Hefemutanten mit Hilfe des Abstandhalter im Reporterplasmid auf das Niveau der Negativkontrolle gesenkt werden konnte (siehe Kapitel 3.3.2). Im zweiten Schritt wurde die passende Expressionskassette, die die Geninformation für die Bausteine des optogenetischen synthetischen Transkriptionsfaktor trug, in die Reporter-kassette genomisch integriert (Kapitel 2.2.6). Das Ziel hierbei war es eine niedrige basale Transkriptionsaktivität auch nach genomischer Integration der Expressionskassette im Flirt System zu erhalten, sowie eine Aktivierung der Transkription unter Blaulichtexposition zu detektieren.

Zu Beginn werden die Flirt Systeme mit dem ENO1 core Promotor (mit Abstandhalter) behandelt. Hierzu werden die entsprechende Flirt Systeme schematisch und im Anschluss die durchflusszytometrischen Ergebnisse dieser YPH500 Mutanten besprochen.



Die Abbildung 26 zeigt, dass alle Flirt Systeme durch kontinuierliche Blaulichtbestrahlung aktiviert wurden.

Auffällig war, dass die basale Transkription von yEGFP, Kultivierung im Dunkeln, in allen untersuchten Hefemutanten mit dem Flirt System deutlich erhöht war. Diese war mindestens zehnfache erhöht (Signalstärke über 2.000 AU/ Zelle) als die Negativkontrolle YPH500 ohne jegliche Modifikationen (Negativkontrolle 150 AU/ Zelle, siehe Kapitel 3.3.2). Somit wurden alle Flirt Systeme mit dem ENO1 *core* Promoter ohne Abstandshalter nicht weiterverfolgt.

### **3.4.4 GAL1 *core* Promotor mit Abstandshalter und Expressionskassette**

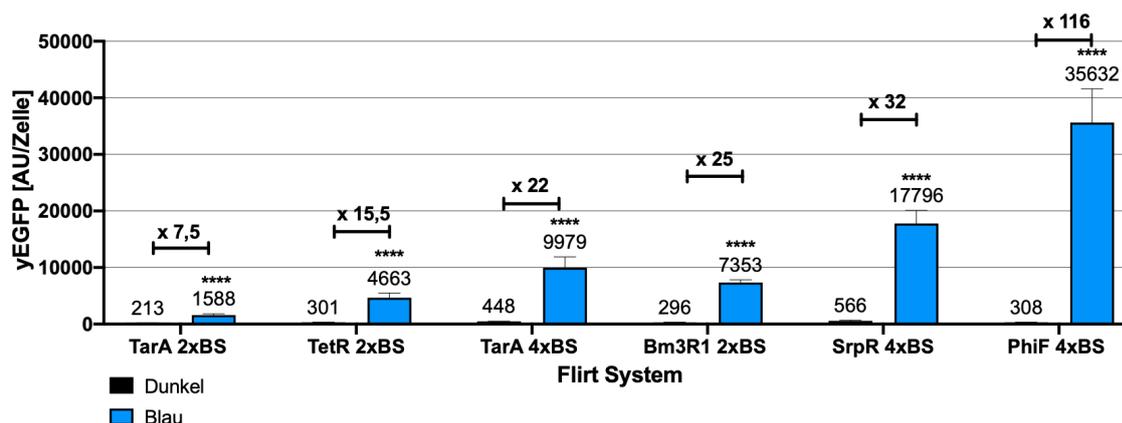
Hier werden die Hefemutanten betrachtet, nachdem ein Abstandshalter vor dem GAL1 *core* Promotor die basale Transkription auf das Niveau der YPH500 Negativkontrolle, ohne jegliche Modifikationen, erfolgreich senken konnte (Kapitel 3.3.1).

Im zweiten Schritt wurde die jeweilige Expressionskassette genomisch in die Reporter-kassette eingebaut (Kapitel 2.2.6), sodass das Flirt System komplettiert wurde. Hier sollte untersucht werden, ob die Orthogonalität und damit verbundene basale Transkription von yEGFP, durch den Einbau des Expressionskassette erhalten bleibt, sowie eine Aktivierung der Transkription unter Blaulichtexposition zu detektieren.

Es wird zuerst schematisch das Flirt System der jeweiligen Konstrukte gezeigt und im Anschluss die durchflusszytometrischen Ergebnisse dieser YPH500 Mutanten.



## Ergebnisse



**Abbildung 28** Durchflusszytometrische Ergebnisse der Flirt Systeme mit GAL1 core Promotor und Abstandshalter unter Dunkel- und Blaulichtbedingungen.

Auf der Abszisse sind die einzelnen Flirt Systeme mit der Anzahl der jeweiligen Bindestellen, TarA 2xBS, TetR 2xBS, TarA 4xBS, Bm3R1 2xBS, SrpR 4xBS und PhiF 4xBS. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Über jedem blauen Balken ist das Signifikanzniveau bezogen zur jeweiligen Dunkelkontrolle gezeigt. Zusätzlich ist der Faktor mit angegeben, um wieviel sich das Signal unter Blaulichtbedingungen im Vergleich zur Dunkelkontrolle verändert hat. *Student t- Test* für ungepaarte Messungen, Dunkel gegen Blau innerhalb der jeweiligen Flirt Systeme.  $n = 6$

In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass alle Flirt Systeme signifikant unter Blaulichtexposition aktiviert wurden. Die basale Transkription von yEGFP zeigte in allen hier untersuchten Hefemutanten mit dem Flirt System nach Kultivierung im Dunkeln eine ähnlich niedrige Signalstärke wie die Negativkontrolle YPH500 ohne jegliche Modifikationen (Negativkontrolle 150 AU/ Zelle, siehe Kapitel 3.3.1). Einzig die Dunkelkontrolle des SrpR Flirt Systems zeigte eine leicht erhöhte basale Transkriptionsaktivität.

Auffällig war, dass der Faktor der Aktivierung unter Blaulichtbedingung im jeden Flirt System unterschiedlich war. Die Flirt Systeme unterschieden sich in der DNA-Bindedomäne. Das Flirt System mit der PhiF DNA-Bindedomäne und der zugehörigen PhiF-Bindestelle konnte die höchste Aktivierung verzeichnen. Zudem unterschieden sich die Flirt Systeme TarA. Hier war die DNA-Bindedomäne identisch, aber die Bindestellenanzahl unterschieden sich. Eine Bindestellenanzahl von vier statt zwei konnte das TarA Flirt System stärker aktivieren.

Zusammenfassen konnten hier sechs unterschiedliche Flirt Systeme etabliert werden, die nur unter Blaulichtexposition aktiviert wurden. Diese Flirt Systeme unterschieden sich in der prokaryotische DNA-Bindedomäne, die an dem Photorezeptor CRY fusioniert wurde und damit einhergehend in der spezifischen Bindestellensequenz (Abbildung 27). Zudem hatte die Anzahl der spezifischen Bindestellensequenz Auswirkung auf die Expressionsstärke des Flirt Systems. Die folgende sechs Flirt Systeme, PhiF, SrpR, Bm3R1, TetR, TarA (4x und 2x Bindestellen) und das LexA (siehe Kapitel 3.4.1) wurden weiter untersucht.

### 3.5 Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Blaulichtexposition

Selektionsmedien sind Medien mit definierter Zusammensetzung und erlauben replizierbare Ergebnisse (Perli et al. 2020). Gleichzeitig ist deren Gebrauch essenziell, wenn Plasmide nicht genomisch eingebaut werden. Wird ein Komplexmedium, wie YPDA, verwendet herrscht kein Selektionsdruck auf das Wachstum der Zellen. Die Plasmide liefern der Zelle keinen Vorteil mehr und können deshalb verloren gehen bzw. werden nicht mehr repliziert (Tyo et al. 2009). In dieser Arbeit wurden die Plasmide genomisch integriert, sodass die Nutzung des teuren synthetischen Mediums nicht erforderlich erscheint. Im folgenden Versuchsteil wurde untersucht welche Auswirkung sich ergaben, wenn statt einem synthetischen ein komplexes Medium verwendet wurde. (Kultivierbedingungen siehe Kapitel 2.2.8.2.)

#### 3.5.1 Flirt System LexA und PhiF im synthetischen- und Vollmedium

Folgend werden die ausgewerteten durchflusszytometrischen Ergebnisse des Flirt Systems mit LexA und PhiF grafisch dargestellt.

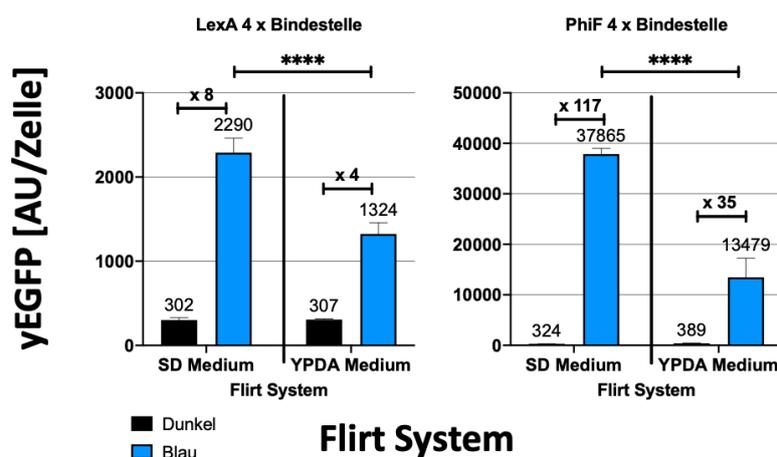


Abbildung 29 Flirt System in verschiedenen Medien.

Gezeigt werden die statistischen ausgewerteten durchflusszytometrischen Ergebnisse. Die Abszisse beschreibt im welchen Medium das jeweilige Flirt System kultiviert wurde. Entweder wurde im synthetischen Medium (SD) oder im komplexen Medium (YPDA) kultiviert. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Beide Systeme wurden im Dunkeln oder unter kontinuierlicher Blaulichtexposition für etwa 22 Stunden kultiviert. *Student-t Test* für ungepaarte Messungen, Blau SD-Medium gegen Blau YPDA-Medium,  $n = 6$

Die Ergebnisse aus Abbildung 29 zeigen, dass die Zusammensetzung des Mediums einen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Flirt Systeme hatte, wenn die Zellen kontinuierlich dem Blaulicht ausgesetzt wurden. Bei einer Kultivierung unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung fiel das yEGFP Signal beim LexA Flirt System um knapp 60%, wenn ein Komplexmedium anstelle von einem synthetischen Medium eingesetzt wurde. Beim Flirt System mit PhiF war unter vergleichbaren Bedingungen das detektierte Signal etwa 70%

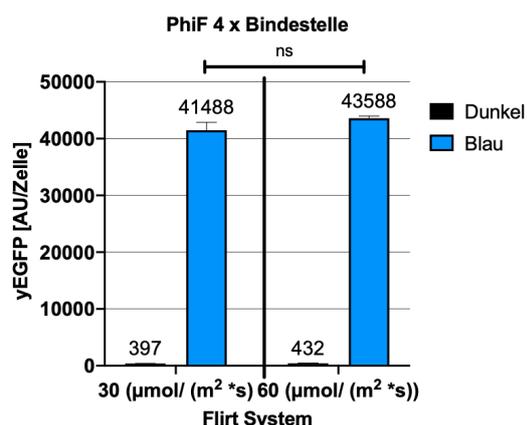
## Ergebnisse

niedriger, wenn ein komplexes Medium gewählt wurde. Die im Dunkeln kultivierten Hefemutanten mit dem LexA und PhiF System zeigten keine Unterschiede auf, unabhängig in welchem Medium kultiviert wurde.

Demzufolge hatte die Wahl des Mediums einen Einfluss auf die Expression des Reportergens in den zu untersuchenden Flirt Systeme unter Blaulichtbestrahlung ausgeübt. Somit wurden alle weiteren Versuche im synthetischen Medium, ohne Riboflavin und Folsäure, durchgeführt.

### 3.6 Doppelte Lichtintensität

Bisher wurden alle Versuche bei einer Blaulichtintensität von  $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$  durchgeführt. Folgende Ergebnisse zeigen, ob eine kontinuierliche Bestrahlung mit doppelter Blaulichtintensität,  $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$ , sich auf die yEGFP Expression des Flirt System mit PhiF auswirkte. Kultiviert wurde für 22 Stunden, wie in Kapitle 2.2.8.2 beschrieben.



**Abbildung 30 PhiF Flirt-System mit einfacher und doppelter Blaulichtintensität.**

Gezeigt sind die statistisch ausgewerteten durchflusszytometrischen Ergebnisse. Die Abszisse beschreibt, mit welcher Blaulichtintensität die Kultur kontinuierlich bestrahlt wurde. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Zudem wurde eine Dunkelkontrolle je Versuchsreihe mitgeführt. *Student t-Test* für ungepaarte Messungen, Blau gegen Blau,  $n=3$

Die Ergebnisse aus Abbildung 30 zeigen, dass eine Verdopplung der Blaulichtintensität auf  $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$  keinen signifikanten Einfluss auf die detektierte Signalstärke des PhiF Flirt Systems ausübte. Dementsprechend wurde weiterhin mit einer Blaulichtintensität von  $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$  gearbeitet.

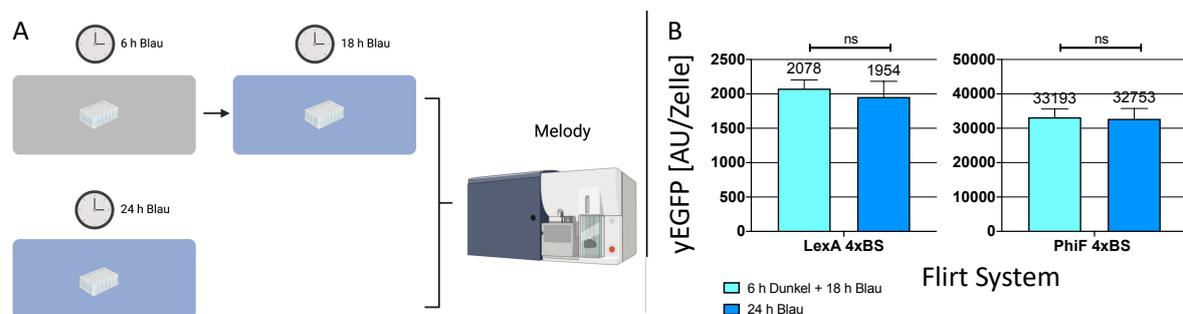
### 3.7 Dosierbarkeit der Transkription mit dem Flirt System

Der Vorteile einer lichtinduzierten Transkription sind, dass Lichtphotonen adhoc in der Zelle vorhanden sind und das Medium nicht, wie bei einer chemischen Induktion, mit Substanzen kontaminiert wird. Zudem kann Licht über eine Zeitdauer präzise dosiert werden, da die Möglichkeit des Ausschaltens besteht (Wang et al. 2012). Vorherige Versuche wurden unter kontinuierliche Blaulichtbestrahlung durchgeführt. In diesem Kapitel sollte untersucht werden, wie dynamisch und flexibel sich das Flirt System verhält, wenn das Blaulicht dosiert eingesetzt wurde.

#### 3.7.1 Zeitpunktbasierter Transkription

In diesem Unterkapitel wurde untersucht, welche Auswirkungen sich auf die yEGFP Signalstärke ergaben, wenn die Bestrahlung mit Blaulicht zu einem gesetzten Zeitpunkt stattfand anstelle von Beginn auf.

Folgend wurden Hauptkulturen der Flirt Systeme mit LexA und PhiF angesetzt. Die 24 h- Blaulichtkontrollen wurde, wie zuvor üblich, sofort mit Blaulicht bestrahlt. Parallel wurden Hauptkulturen sechs Stunden in der *Blackbox* (Kapitel 2.2.8.1) und anschließend 18 weitere Stunden zusammen mit den Blaulichtkontrollen kultiviert. Folgend werden die durchflusszytometrischen Ergebnisse grafisch dargestellt.



**Abbildung 31 LexA und PhiF Flirt-System mit und ohne 6 stündiger Dunkelanzuchtphase.**

Abbildung A stellt schematisch den Versuchsaufbau dar. Die Haultkultur wurde entweder 24 h unter Blaulichtbestrahlung kultiviert, oder sechs Stunden in der *Blackbox* im Dunklen und im Anschluss für 18 Stunden kontinuierlich mit Blaulicht bestrahlt. Created with BioRender.com. In Abbildung B werden die durchflusszytometrischen Ergebnisse beider Gruppen statistisch ausgewertet dargestellt. Auf der Abszisse werden die Flirt Systeme LexA und PhiF dargestellt. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Student t-Test für ungepaarte Messungen. n = 9.

Abbildung 31B zeigt, dass eine zeitpunktbasierte Expression mit dem Flirt System realisierbar ist. Auffällig war, dass sich die yEGFP Signalstärke zwischen den Kulturbedingungen innerhalb des Flirt Systeme nicht unterschieden. So führte die nach sechs Stunden blaulichtinduzierte Transkription zu keinem signifikanten Unterschied zu der Kultur, die sofort

mit Blaulicht induziert wurde. Hier wurde yEGFP als Reporter benutzt, das eine errechnete Halbwertszeit von über 20 Stunden (<https://web.expasy.org/>) in der Hefe hat.

### **3.7.2 Tageslichtempfindlichkeit des Flirt Systems und Impuls-dosierte Transkription**

Die Überexpression von heterologen Proteinen können sich toxisch und damit negativ auf das Wachstumsverhalten der Zellfabrik auswirken (Vieira Gomes et al. 2018; Payen and Thompson 2019). Die lichtinduzierte Expression bietet die Vorteile, dass Licht zu definierten Zeitpunkten ein als auch ausgeschaltet werden kann, sodass eine Dosierbarkeit bzw. Feinregulierung der heterologen Proteinexpression ermöglicht werden kann (Taslimi et al. 2016).

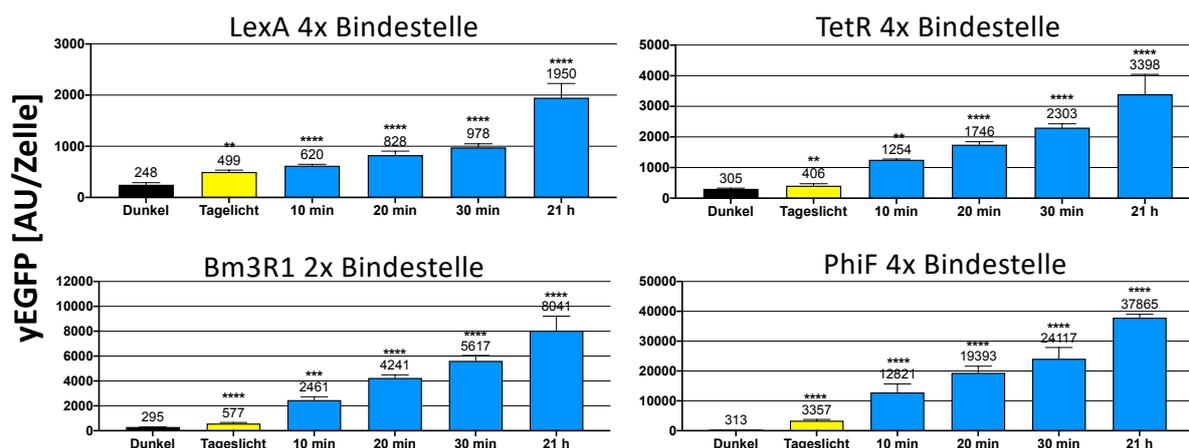
Diese Feinregulierung sollte hier anhand von Blaulichtimpulsen verschied definierter Länge realisiert und untersucht werden. Es wurden Blaulichtimpulse in Form von 10-, 20- bzw. 30- minütiger Blaulichtexposition gefolgt von einer 50-, 40- bzw. 20- minütiger Dunkelzeit getestet. Es wurden immer 21 Impulse gegeben und nach der letzten zugehörigen Dunkelzeit das yEGFP Signal im Melody durchflusszytometrisch detektiert.

Um ebenfalls die Empfindlichkeit des Flirt Systems gegenüber Tageslicht zu testen, wurden Hauptkulturen in einem Schüttler inkubiert, der nahe an am Fenster stand und eine Plexiglasverkleidung hatte, sodass die Kulturen dem Tages- und Laborlicht 21 Stunden kontinuierlich ausgesetzt wurden. Die Empfindlichkeit gegenüber Tageslicht wurde bei den Flirt Systemen mit LexA, TetR, Bm3R1 und PhiF getestet. Es wurde sowohl eine Dunkelkontrolle mitgeführt als auch eine Positivkontrolle, die 21 Stunden kontinuierlich dem Blaulicht ausgesetzt wurde. (Kultiviert wurde wie in Kapitel 2.2.8.2 beschrieben.)

### **3.7.3 Tageslicht und Blaulicht-Impulse der Flirt Systeme LexA, Bm3R1, TetR und PhiF**

Nachfolgend werden die Ergebnisse zusammengefasst, in dem das Flirt System mit dem LexA, Bm3R1, TetR und PhiF verschiedenen Impulslängen von Blaulicht und dem Tageslicht ausgesetzt wurde.

## Ergebnisse



### Lichtbedingung

**Abbildung 32** Auswirkung von Tagelicht und Blaulichtimpulsen auf das LexA, Bm3R1, TetR und PhiF Flirt-System.

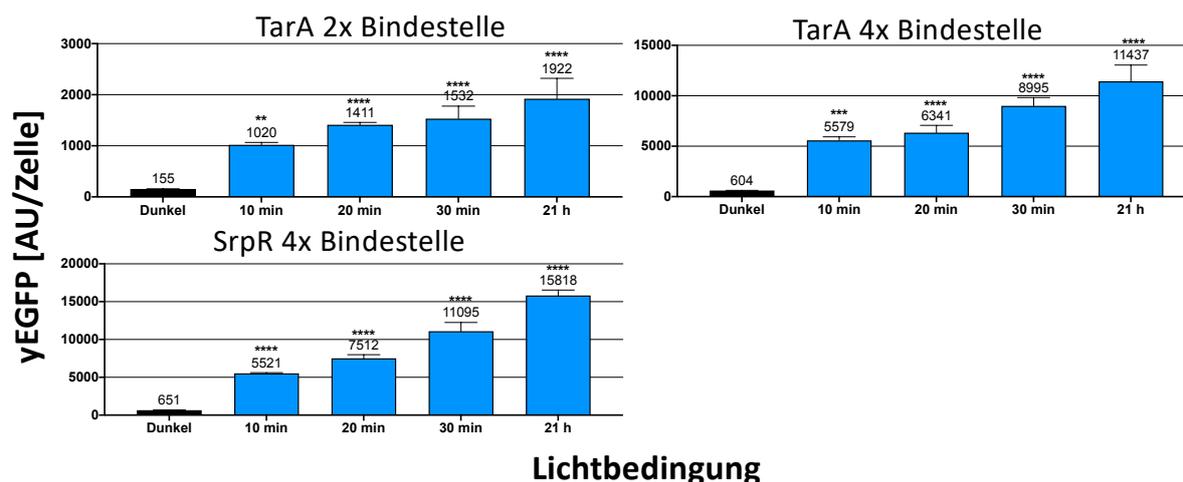
Gezeigt sind die statistisch ausgewerteten durchflusszytometrischen Ergebnisse der vier Flirt Systems. Die Abszisse zeigt die Kulturbedingungen. Dabei wurden die Hefezellen entweder 21 Stunden im Dunkeln, unter Tageslicht oder unter Blaulichtbestrahlung kultiviert. Zusätzlich wurden verschiedene Blaulichtimpulslänge untersucht, entweder 10, 20 oder 30 min je Stunde über eine Dauer von 21 Stunden. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Über jedem Balkendiagramm wird die Bindestellenanzahl im jeweiligen Flirt System gezeigt. *One-Way-ANOVA*, Dunkelkontrolle gegen alle.  $n = 6$  (für LexA und PhiF: alle Bedingungen; für TetR und Bm3R1: Dunkel, 21h Blaulicht und Tageslicht), sonst  $n = 3$

Abbildung 32 zeigt, dass die Blaulicht-Impulslänge einen signifikanten Einfluss auf die yEGFP Produktion hatte. Es konnte eine stufenweise Erhöhung des detektierten yEGFP Signals in jedem Flirt System festgestellt werden. Je länger der Blaulichtimpuls pro Stunde war, desto höher war das zum Ende hin detektierte Signal. Das detektierte Signal erreichte bei einem 10-minütigen Impuls etwa 30-35%, bei einem 20-minütigen Impuls etwa 50% (LexA circa 40%) und bei einem 30-minütigen Blaulichtimpuls 65-70% (LexA 50%) der Signalstärke verglichen zu der Positivkontrolle, die 21 kontinuierlich mit Blaulicht bestrahlt wurde. Außerdem hatte das Tageslicht einen signifikanten Einfluss auf alle Flirt Systeme. Dieser war geringer als der niedrigste getestete Impuls jedoch höher als die Dunkelkontrolle. Beim PhiF Flirt System war der Einfluss von Tageslicht am stärksten.

### 3.7.4 Blaulicht-Impulse der Flirt Systeme SrpR und TarA (2 und 4x Bindestelle)

Gezeigt werden die zusammengefassten Ergebnisse vom Flirt System mit SrpR und TarA. Bei diesen Flirt Systemen fand keine Tageslichtbedingung statt.

## Ergebnisse



**Abbildung 33** Auswirkung von Blaulichtimpulsen auf das SrpR und TarA Flirt-System.

Gezeigt sind die statistisch ausgewerteten durchflusszytometrischen Ergebnisse der Flirt Systeme TarA und SrpR. Die Abszisse zeigt die Kulturbedingungen. Dabei wurden die Hefezellen entweder 21 Stunden im Dunkeln oder unter Blaulichtbestrahlung kultiviert. Zusätzlich wurden verschiedene Blaulichtimpulslänge untersucht, entweder 10, 20 oder 30 min je Stunde über eine Dauer von 21 Stunden. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Über jedem Balkendiagramm wird die Bindestellenanzahl im jeweiligen Flirt System gezeigt. *One-Way-ANOVA*, Dunkelkontrolle gegen alle.  $n = 3$

Die Ergebnisse in der Abbildung 33 zeigen, dass mit einer Erhöhung der Blaulicht-Impulslänge das detektierte yEGFP Signal im jeden Flirt System ebenfalls signifikant zunahm. Somit konnte auch in diesen Flirt Systemen eine Regulierung der Transkription mit Hilfe von definierten Blaulichtimpulsen realisiert werden (vergleiche Flirt Systeme im Kapitel 3.7.3). Wurde die maximal erreichte Signalstärke der Positivkontrolle, 21 h Blaulichtexposition, mit 100% angesetzt, so erreichte ein 10-minütiger Impuls circa 50% (SrpR 35%), ein 20-minütiger Impuls etwa 55% (TarA 2x Bindestelle knapp 75%) und der 30-minütiger Impuls 80% (SrpR 70%) der maximal detektierten Signalstärke.

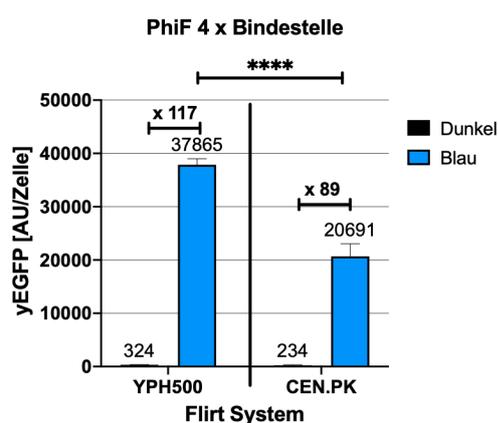
Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel bei allen hier untersuchten Flirt Systemen eine Dosierung der yEGFP Produktion mit Hilfe von unterschiedlich langen Blaulichtimpulsen realisiert werden.

### 3.8 Stammübertragung. Das Flirt System im industriell verwendetem CEN.PK Stamm

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit dem *S. cerevisiae* Stamm YPH500 gearbeitet. Dennoch war es wichtig zu erfahren, ob auch andere Hefestämme in Frage kommen und wie sich das Flirt System verhält. CEN.PK ist ein Hefestamm, der für die heterologe Proteinexpression industriell eingesetzt wird (van Dijken et al. 2000; Baghban et al. 2019).

## Ergebnisse

Dementsprechend wurde das PhiF Flirt System (Reporter-kassette mit dem GAL1 *core* Promotor mit Abstandshalter, der vierfache Bindestelle und dem yEGFP als Reporter, Kapitel 3.1 als auch die zugehörige Expressionskassette, Kapitel 3.2) in CEN.PK (Kapitel 2.1.2) genomisch integriert. Anschließend wurde das PhiF Flirt System in CEN.PK experimentell untersucht. Für die experimentelle Versuchung wurde das PhiF Flirt System in YPH500 und CEN.PK 24 Stunden einer kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung unterzogen. Gleichzeitig wurden Dunkelkontrollen mitgeführt. Kultiviert wurde wie in Kapitel 2.2.8.2 beschrieben.



**Abbildung 34** Aufwirkung des PhiF Flirt Systems in unterschiedlichen Hefestämmen.

Gezeigt sind die statistisch ausgewerteten durchflusszytometrischen Ergebnisse des Flirt Systems PhiF. Auf der Abszisse wird der jeweilige Hefestamm angegeben, entweder YPH500 oder CEN.PK. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Kultivierungsdauer immer 22 Stunden unter Blaulichtbestrahlung oder im Dunklen. *Student t-Test* für ungepaarte Messungen, Blau YPH500 gegen Blau CEN.PK.  $n = 6$

Abbildung 34 zeigt, dass das PhiF Flirt System in beiden Hefestämmen aktiviert wurde. Die Expression des Reporters yEGFP war in CEN.PK unter kontinuierlicher Blaulichtexposition im Vergleich zur Dunkelkontrolle etwa 90-fach so hoch war. Vergleicht man die Expressionsstärke beider Stämme miteinander, so war die YPH500 Variante etwa 1,3-fach stärker als die CEN.PK Mutante.

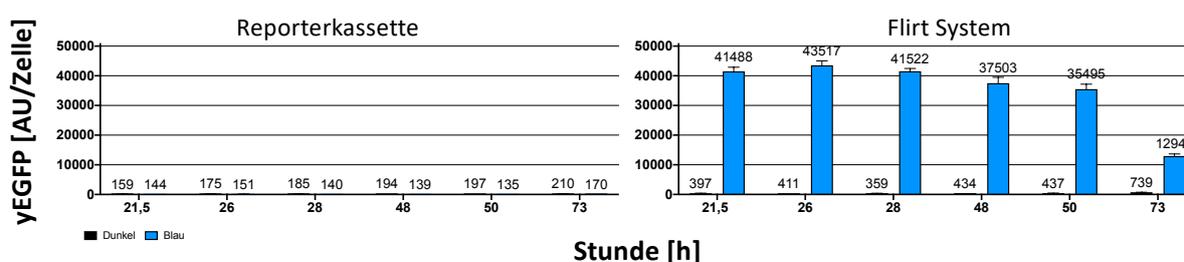
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das Flirt System auf einen anderen Stamm innerhalb der Klasse übertragbar war, ohne dass irgendwelche Veränderungen in den Reporter- oder Expressionskassetten vorgenommen wurden. Jedoch war die Expression unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung signifikant unterschiedlich von Stamm zu Stamm.

### 3.9 Langzeitmessung unter Blaulichtexposition

Blaulichtbestrahlung kann in der Hefe metabolischen Stress induzieren (Robertson et al. 2013). Hier sollte untersucht werden, inwiefern sich kontinuierliche Blaulichtbestrahlung auf die Mutanten auswirkt, die entweder die Vorstufe des Flirts Systems (Reporter-kassette) oder das Flirt System genomisch integriert tragen. Verwendet wurde die YPH500 Mutante mit der PhiF Reporter-kassette (GAL1 *core* Promotor, mit Abstandshalter und vierfacher Bindestelle) und die YPH500 mit dem PhiF Flirt System. Die Hauptkultur wurde 73 Stunden entweder unter kontinuierlicher Blaulichtexposition oder im Dunklen kultiviert. Zwischendurch wurden Proben entnommen, die durchflusszytometrisch als auch photometrisch gemessen wurden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde einerseits das yEGFP Signal gemessen, andererseits das Po-Pro-1 Signal, welches Rückschlüsse auf die Lebend-Tot-Anzahl ziehen ließen. Photometrisch wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) gemessen, um die Zellzahl pro Milliliter beider Bedingungen bestimmen und vergleichen zu können. Die Hauptkulturen wurden wie in Kapitel 2.2.8.2 beschrieben angesetzt.

#### 3.9.1 Durchflusszytometrische Auswertung der PhiF Reporter-kassette und des PhiF Flirt Systems

Gezeigt werden die durchflusszytometrischen Ergebnisse der yEGFP Detektion in den YPH500 Mutanten, mit genomisch integrierter PhiF Reporter-kassette und dem PhiF Flirt System.



**Abbildung 35** Gemessenes yEGFP Signal von der YPH500 Mutante mit der PhiF Reporter-kassette und PhiF Flirt System über eine Zeitreihe von 73 Stunden.

Gezeigt sind die durchflusszytometrischen ausgewerteten Ergebnisse. Kultiviert wurde kontinuierlich unter Blaulichtbestrahlung oder im Dunklen. Auf der Abszisse ist die Stunde angegeben, zu der die Proben gemessen wurden. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. n = 3

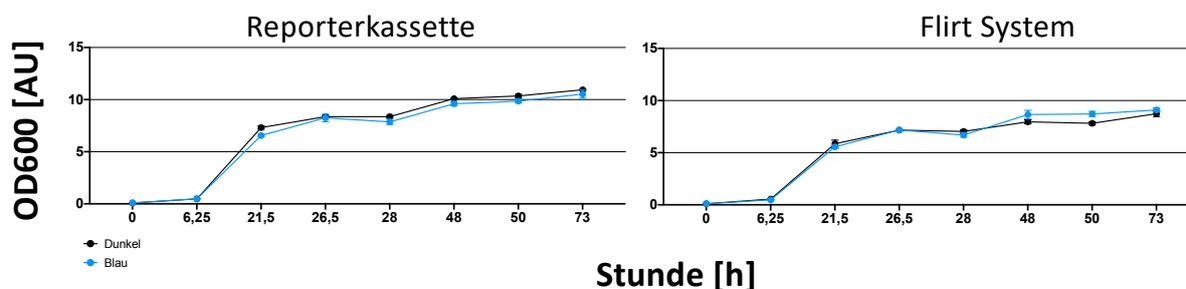
Die Ergebnisse in Abbildung 35 zeigen, dass die basale Transkription über eine Zeitdauer von 73 Stunden, unter beiden Lichtbedingungen bei der YPH500 mit der integrierten PhiF Reporter-kassette stabil niedrig blieb, sodass kein durchflusszytometrisch erhöhtes yEGFP Signal gemessen wurde. Die Werte waren ähnlich verglichen zu der Negativkontrolle YPH500,

## Ergebnisse

in der keine Modifikationen erfolgten (Negativkontrolle YPH500 ohne jegliche Modifikationen 150 AU/ Zelle, siehe Kapitel 3.3.2). Bei dem PhiF Flirt System blieben die Werte unter Blaulichtkultivierung bis 28 Stunden stabi. Hiernach war eine stufenweise Abnahme des Signals zu verzeichnen, sodass das Signal zum Zeitpunkt der letzten Probenahme auf etwa 2/3 im Vergleich zum maximalen detektierten Signal gefallen war. Die detektierte Signalstärke blieb bei allen Dunkelkontroll-Proben konstant niedrig bei etwa 400 AU pro Zelle. Nur bei der letzten Probe stieg der Wert auf knapp 740 AU pro Zelle.

### 3.9.2 Optische Dichte, Auswertung der PhiF Reporter-kassette und des PhiF Flirt Systems

Die folgende Abbildung stellt die OD<sub>600</sub> Werte für die jeweiligen Zeitpunkten grafisch dar. Dabei wurde zum Zeitpunkt Null die inokulierte Hauptkultur gemessen. Für die Auswertung wurde der Verdünnungsfaktor berücksichtigt.



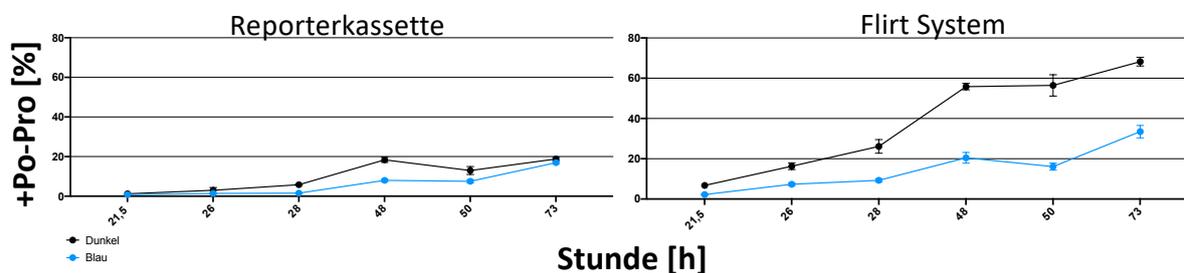
**Abbildung 36** Gemessene optische Dichte von der Hefemutante mit der PhiF Reporter-kassette und PhiF Flirt System über eine Zeitdauer von 73 Stunden.

Gezeigt sind die photometrischen gemessenen Werte der YPH500 Mutante mit der PhiF Reporter-kassette und PhiF Flirt System über eine Dauer von 73 Stunden. Auf der Abszisse wird der Zeitpunkt der Probenahme bzw. Probemessung angegeben. Auf der Ordinate wird die gemessene optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) in der willkürlichen Einheit AU angegeben. Über jedem Liniendiagramm wird angegeben, ob es sich um die Vorstufe (Reporter-kassette) oder um das PhiF Flirt System handelt. Als Referenzwert zum Trieren, wurde das synthetische Medium genommen. n = 1 (Zeitpunkt 0 h), sonst n = 3

Die Ergebnisse aus der photometrischen Messung in der Abbildung 36 zeigen, dass kontinuierliche Blaulichtexposition keinen Einfluss auf die Zellteilung weder auf die Vorstufe (Reporter-kassette) noch auf das PhiF Flirt Systems hatte. Die Zellen teilten sich unter beiden Bedingungen, also unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung als auch unter Abwesenheit von Licht (Dunkeln), gleich schnell und erreichten eine stationäre Phase nach etwa 28 Stunden Kultivierung. Es war zu erkennen, dass die optische Dichte der Mutante mit der Reporter-kassette unter beiden Lichtbedingungen insgesamt etwas höher lag als die optische Dichte der YPH500 Mutante mit dem Flirt System.

### 3.9.3 Po-Pro-1 Auswertung der PhiF Reporter-kassette und des PhiF Flirt Systems

Gezeigt werden folgend die durchflusszytometrischen ausgewerteten Po-Pro-1 gefärbten Hefezellen.



**Abbildung 37** Ermittelte tote Zellen der YPH500 Mutante mit der PhiF Reporter-kassette und dem PhiF Flirt System über eine Zeitdauer von 73 Stunden.

Gezeigt werden die durchflusszytometrisch ermittelten und prozentual ausgewerteten Po-Pro1 gefärbten Zellen. Kultiviert wurde kontinuierlich unter Blaulichtbestrahlung oder im Dunklen. Auf der Abszisse ist die Stunde angegeben, zu der die Proben entnommen und gemessen wurden. Auf der Ordinate wird die berechnete Anzahl der toten Zellen im Verhältnis den lebenden Zellen in Prozent angegeben. Über jedem Liniendiagramm wird angegeben, ob es sich um die Vorstufe (Reporter-kassette) oder um das Flirt System handelt.  $n = 3$

Abbildung 37 zeigt, dass kontinuierliche Blaulichtexposition keinen negativen Einfluss auf die YPH500 Mutanten, mit genomisch integrierter PhiF Reporter-kassette oder genomisch integriertem PhiF Flirt System, hatte. Generell lag die Quote der mit Po-Pro-1 angefärbten, und damit errechneten toten Zellen, bei der Kulturbedingung mit Abwesenheit von Licht (Dunkel) höher als die der Hauptkultur, die kontinuierlich mit Blaulicht bestrahlt wurde. Zudem war generell die prozentuale Anzahl der toten Zellen im Flirt System höher als bei der Vorstufe (Reporter-kassette). Nach 73 Stunden Kultivierung verzeichnete das Flirt System bei der Dunkelkontrolle 68%, bei der Lichtkontrolle etwa 35% tote Hefezellen. Bei den Reporter-kassette-Mutanten betrug die Anzahl der toten Zellen zu diesem Zeitpunkt, unter beiden Lichtbedingungen, hingegen 20%.

Zusammenfassend kann hier gesagt werden, dass kontinuierliche Blaulichtbestrahlung, mit der hier verwendeten Lichtintensität, weder einen negativen Einfluss auf die Zellteilung noch auf die Apoptose der Hefezellen ausübte.

### 3.10 Upscaling vom Flirt System im Photobioreaktor

Ein wichtiger Baustein dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob das System hoch skalierbar ist. Bisher wurden alle Kulturen in *Deepwell*-Maßstab kultiviert, wo das Volumen der Hauptkultur auf 1,5 mL beschränkt gewesen war. Das Hochskalieren, *Upscaling*, sollte mit Hilfe von Photobioreaktoren der Firma Infors HT realisiert werden, wo das Arbeitsvolumen um das

Tausendfache auf 1,5 L hochskaliert wurde (Kapitel 2.2.8.3). Damit sollten relative industriennahe Kulturbedingungen nachgestellt werden, um das Flirt System attraktiv für diesen Bereich zu gestalten. Hier wurde im Batch-Verfahren gearbeitet, also nur eine Charge pro Fermentation gefahren. Die Korrektur des pH-Werts wurde automatisch unternommen als auch die Begasung mit Luftsauerstoff, dieses war im *Deepwell*-Maßstab nicht möglich gewesen. Inokuliert wurde die Hauptkultur äquivalent wie im *Deepwell*-Maßstab (Kapitel 2.2.8.4), mit der Ausnahme, dass die Vorkultur in Schikanenkolben angesetzt wurde, da mehr Volumina für die Inokulation der 1,5 L Hauptkultur nötig waren.

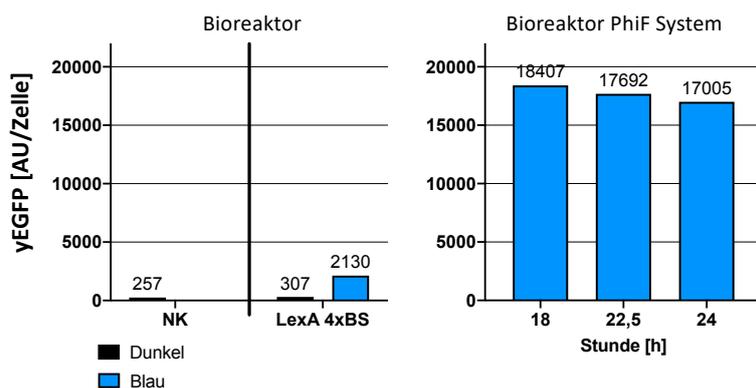
Die Kultivierung im Bioreaktor fand für das Flirt LexA System, sowohl für die Licht- als auch Dunkelkontrolle, bei 30 °C statt (Kapitel 3.10.1). Aufgrund dessen, dass das Heizelement nachfolgend nicht mehr funktionstüchtig gewesen war, konnte bei nachfolgenden Versuchen nur eine Kultivierungstemperatur von 23 °C statt 30 °C erreicht werden. Ausnahme: Die Bestrahlung mit Blaulicht im Bioreaktorsystem setzte Wärme frei, sodass eine Kultivierungstemperatur von 30 °C, nur unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung, erreicht werden konnte. Diese wurde nur für das PhiF Flirt System im Kapitel 3.10.1 durchgeführt. Eine Dunkelkontrolle konnte bei dieser Temperatur nicht mitgeführt werden. Alle weiteren Kultivierungen, unter Blaulichtbestrahlungen und im Dunklen, fanden bei 23 °C statt. Hier fand die Abkühlung des Mediums durch das funktionierende Kühlsystem statt (Kapitel 3.10.2).

Bei der Probenahme im Bioreaktor wurden 6 mL verworfen, da die Probenahme mit Hilfe eines Tauchrohrs stattfand und in diesem Totvolumen sich Zellen befanden, die nicht beleuchtet wurden.

### **3.10.1 *Upscaling* LexA Flirt System, Kultivierung bei 30 °C**

Gezeigt werden die grafischen Auswertungen aus der durchflusszytometrischen Messung der Proben aus dem Bioreaktor nach 24 Stunden Kultivierung. Dabei wurden die Zellen entweder kontinuierlich mit Blaulicht bestrahlt oder im Dunkeln kultiviert (siehe weitere Kulturbedingung in Kapitel 2.2.8.4).

## Ergebnisse



**Abbildung 38 LexA und PhiF Flirt System im Bioreaktor bei 30 °C.**

Gezeigt sind die durchflusszytometrischen ausgewerteten Ergebnisse. Es wurde entweder im Dunkeln oder unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung kultiviert. Aus der Ordinate werden die Mutanten oder die Zeitpunkte der Probenziehung angegeben. Die Negativkontrolle YPH500 war ohne jegliche Modifikationen (NK). Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben.  $n = 1$

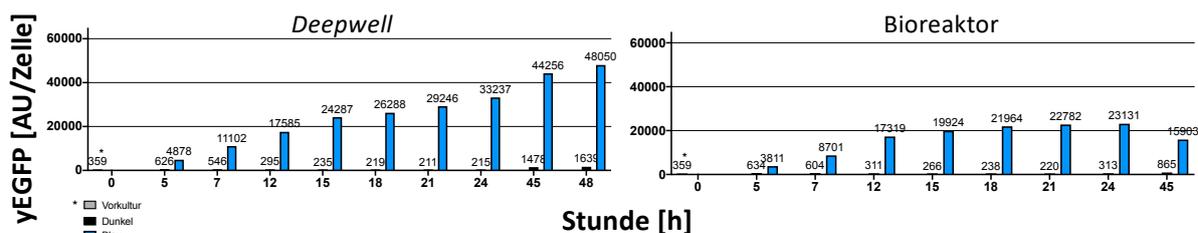
Die Ergebnisse aus der Abbildung 38 zeigen, dass das LexA und PhiF Flirt System auf Bioreaktor-Maßstab hochskaliert werden konnte und unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung aktiviert wurden. Die detektierte Signalstärke im LexA System war etwa sechsfach so hoch verglichen zur Dunkelkontrolle, welches bei circa 307 AU/ Zelle lag. Ebenfalls war zu erkennen, dass die basale Transkription der Dunkelkontrolle der der Negativkontrolle (NK) entsprach, dem YPH500 Stamm ohne jegliche Modifikationen.

Das PhiF Flirt System wurde im Vergleich zum LexA stärker aktiviert. Das Signal fiel leicht um 1.000 AU/ Zelle auf 17.000 AU/ Zelle, vergleicht man die Probe bei 18 Stunden Kultivierzeit mit der nach 24 Stunden.

### 3.10.2 Upscaling PhiF Flirt System, Kultivierung bei 23 °C

Im diesen Unterkapitel sollten beide Maßstäbe, *Deepwell* und Bioreaktor, parallel miteinander verglichen werden. Dazu wurde die gleiche Vorkultur für die Innokulation der Hauptkultur verwendet. Die Gegenüberstellung beider Maßstäbe war nötig gewesen, da eine Kultivierung bei 30 °C im Bioreaktor nicht mehr möglich gewesen war, wenn eine Dunkelkontrolle mitgeführt wurde (siehe Begründung in Kapitel 3.10). Hier wurde die Hauptkultur 45 bzw. 48 Stunden entweder kontinuierlich mit Blaulicht bestrahlt oder im Dunkeln kultiviert. Die Kultivierungstemperatur wurde auf mögliche 23 °C gewählt. Es wurden zu gewissen Zeitpunkten Proben entnommen. Eine *Deepwell*-Platte beinhaltete je 48 *Wells*. Pro Kulturbedingung wurde eine *Deepwell*-Platte mit geeigneter Anzahl von *Wells* inokuliert, damit genug Proben gezogen werden konnten.

## Ergebnisse



**Abbildung 39** Zeitreihe über 48 und 45 Stunden des PhiF Flirt Systems in Deepwells und im Bioreaktor bei 23 °C.

Gezeigt sind die durchflusszytometrischen ausgewerteten Messungen von der Kultivierung der YPH500 Mutante mit dem Flirt System PhiF in *Deepwells* und im Bioreaktor. Die Kultur wurde entweder kontinuierlich mit Blaulicht bestrahlt oder im Dunklen kultiviert. Auf der Abszisse wird die Stunde der Probenahme angegeben. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. n = 1

Die Ergebnisse in Abbildung 39 zeigen, dass das yEGFP Signal der Hauptkulturen, die kontinuierlich bestrahlt wurden, bis zum Ende zunahm. Auffällig bei der Kultivierung bei 23 °C in *Deepwells* war, dass die Signalstärke zum Zeitpunkt 48 Stunden bei circa 48.000 AU/ Zelle lag und damit im Vergleich zu der Kulturtemperatur bei 30 °C höher gewesen war (vergleiche 48 h unter 30 °C mit 37.503 AU/ Zelle in Kapitel 3.9.1). Außerdem sank das Signal der Dunkelkontrolle von 600 AU/ Zell bei fünf Stunden Kultivierung auf knapp 200 AU/ Zelle zum Zeitpunkt 24 Stunden. Der Wert erhöhte sich jedoch auf 1.600 AU/ Zelle in der letzten Messung. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass das PhiF Flirt System im Bioreaktor aktiviert wurden. Es konnte eine kontinuierliche Zunahme des yEGFP Signals mit der Zeit festgestellt werden, wenn die Zellen kontinuierlich mit Blaulicht bestrahlt wurden. Jedoch fiel zum Zeitpunkt der letzten Probe das Signal von circa 23.000 AU/ Zelle auf knapp 16.000 AU/ Zelle. Bei der Dunkelkontrolle fiel der Messwert von 600 AU/ Zelle zum Zeitpunkt 5 Stunden auf 300 AU/ Zelle zum Zeitpunkt 24 Stunden. Dieser stieg jedoch zum Schluss auf knapp 900 AU/ Zelle.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Flirt System hochskaliert werden konnte. Die blaulichtinduzierte yEGFP Transkription konnte sowohl bei einer Kultivierungstemperatur von 23 °C als auch bei 30°C im *Deepwell*- und Bioreaktormaßstab erfolgreich bestätigt werden. Die Signalstärke war im Bioreaktor tendenziell schwächer im Vergleich zu den *Deepwells*.

### 3.11 Rotlichtsystem Phi-LexA und Flirt System

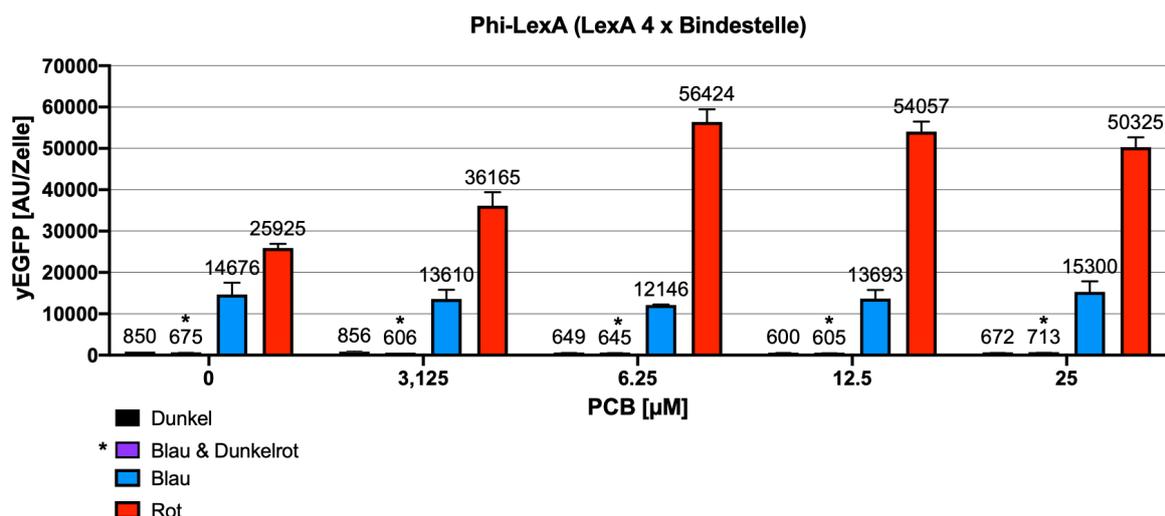
Hier wurde ein Blaulicht System mit dem Namen Flirt erfolgreich im *Deepwell*- als auch Bioreaktor-Maßstab etabliert. Wissenschaftlich interessant ab diesem Zeitpunkt war, ob es sich mit einem weiterem Lichtsystem, das auf einer anderen Lichtwellenlänge basiert, kombinieren ließ. Eine solche Kombination zweier Lichtsysteme wurde bisher nicht in der Hefe beschrieben und könnte für die Industrie vielversprechende Ansätze bieten (Naseri and Koffas 2020). Bei der Induktion mittels Chemikalien mehrerer Signalwege ist das Auftreten von *off-target* Effekten nahezu unmöglich (Lee et al. 2007).

Die Idee das hier verifizierte Blaulichtsystem Flirt mit dem etablierten Rotlichtsystem zu kombinieren war ein interessanter Ansatz dieser Arbeit. Dazu wurde jedoch nicht das PhiRex System (Hochrein et al. 2017) verwendet, sondern eine abgewandelte Form in dieser Arbeit konstruiert. Statt der ursprünglichen TALES, die als Bindedomäne fungierten, wurden LexA Bindestellen verwendet. Somit konnte das LexA Reporterplasmid pPD105 (siehe Kapitel 3.1) als Vorstufe verwendet werden, da dieser die nötigen LexA Bindestellen trägt. Bei dem entsprechenden Expressionsplasmid ist der Rotlichtphotorezeptor PhyBNT mit der LexA DNA-Bindedomäne fusioniert. Gleichzeitig ist der Interaktionspartner PIF3 mit der GAL4 Aktivierungsdomäne und dem Kernlokalisierungssignal fusioniert. Der Expressionsplasmid bekam die interne Bezeichnung pPD110 (Kapitel 3.2). Das System wird nachfolgen in Anlehnung an den originalen Namen, jedoch mit modifizierter DNA-Bindedomäne, als Phi-LexA bezeichnet.

#### 3.11.1 Phi-LexA, unterschiedliche PCB-Konzentrationen und Lichtmodi

Anders als beim Blaulichtsystem ist laut Literaturangaben die Zugabe des Chromophors PCB essenziell, der die Konformationsänderung des Photorezeptors PhyBNT hervorruft (Hochrein et al. 2017). In diesem Abschnitt wurde eine geeignete Konzentration untersucht. Dazu wurde die Hauptkultur in *Deepwells* kontinuierlich mit Rotlicht bestrahlt und die PCB Konzentration von null bis 25  $\mu\text{M}$  getestet. Ebenfalls wurde eine Dunkelkontrolle mit der gleichen PCB - Konzentration mitgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Kulturen durchflusszytometrisch ausgewertet. Damit beide Lichtsysteme symbiotisch genutzt werden konnten, musste zusätzlich untersucht werden, ob das Phi-LexA System durch das Blaulicht, der Wellenlänge 470 nm, aktiviert wird. Dazu wurde die Mutante 24 Stunden in der Hauptkultur in *Deepwells* unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung oder unter gleichzeitiger Bestrahlung mit Blau- und Dunkelrotlicht kultiviert.

## Ergebnisse



**Abbildung 40 Phi-LexA unter kontinuierlicher Rot- oder Blaulichtbestrahlung oder kontinuierlicher gleichzeitiger Bestrahlung mit Blau- und Dunkelrotlicht mit unterschiedlicher PCB Konzentration.**

Gezeigt sind die durchflusszytometrischen ausgewerteten Ergebnisse für das Phi-LexA System unter verschiedenen PCB Konzentrationen, unter verschiedenen Lichtmodi. Auf der Abszisse wird die jeweilige PCB Konzentration in Mikromol angegeben. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Der Lichtmodus „Blau & Dunkelrot“ ist mit einem Sternchen versehen, damit die Ergebnisse von der Dunkelkontrolle unterschieden werden können. n = 4 (für Rot, Blau & Dunkelrot bei 0 und 3,125 µM PCB; Dunkel, Blau bei 3,125 µM PCB), sonst n = 2

In Abbildung 40 ist zu erkennen, dass das Phi-LexA System durch kontinuierliche Rotlichtbestrahlung aktiviert wurde. Eine Konzentration von 6,25 µM PCB schien hier optimal, da es die höchste, 66-fache, Aktivierung im Vergleich zur Dunkelkontrolle auslöste. Die Dunkelkontrollen waren im Vergleich zum Blaulichtsystem stärker aktiv und lagen bei allen PCB Konzentrationen durchschnittlich bei 700 AU/ Zelle, ungefähr drei Mal so hoch verglichen zu der Dunkelkontrolle des Flirt Systems (vergleiche Kapitel 3.4.4).

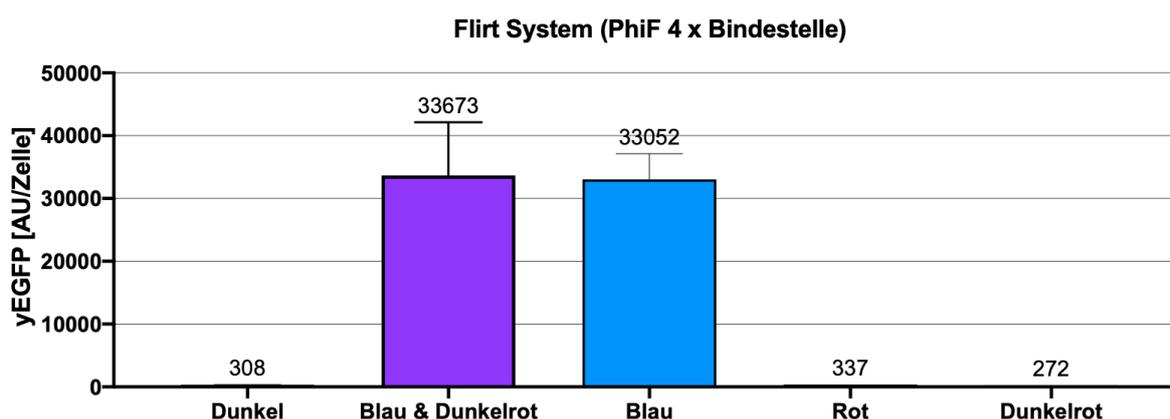
Generell ließ sich erkennen, dass kontinuierliche Blaulichtbestrahlung das Phi-LexA System, unabhängig von der PCB Konzentration, gleich stark aktivierte, nicht wie unter Rotlicht. Die Werte lagen hier zwischen 15.000 AU/ Zelle und 12.000 AU/ Zelle. Bei Rotlicht dagegen zwischen 26.000 AU/ Zelle und 56.000 AU/ Zelle.

Lagen die Werte unter der Blaulichtbestrahlung bei über 13.000 AU/ Zelle, so bewirkte eine zusätzliche Bestrahlung mit Dunkelrotlicht ein Signal auf etwa 600 AU/ Zelle und damit eine Deaktivierung des Systems. Die Deaktivierung konnte bei allen getesteten PCB Konzentration festgestellt werden. Ebenfalls konnte diese Deaktivierung festgestellt werden, wenn kein PCB zum Medium addiert wurde.

Auffällig war, dass das Phi-LexA System auch ohne PCB-Zugabe durch kontinuierliche Rotlicht- bzw. Blaulichtexposition aktiviert wurde. Die Signalstärke war 30-fach (Rotlicht) bzw. 17-fach (Blaulicht) stärker im Vergleich zu der Dunkelkontrolle.

### 3.11.2 Flirt System unter verschiedenen Lichtmodi

Auch sollte bei einer Mischkultur beider Systeme berücksichtigt werden, dass das Flirt System weder auf das Rotlicht noch auf das Dunkelrotlicht reagiert. Zudem sollte es seine Aktivität unter Blaulicht und gleichzeitiger Bestrahlung von Dunkelrotlicht nicht verlieren. Hierzu wurden Hauptkultur in *Deepwells* je 24 Stunden kultiviert und vier verschiedene Lichtmodi untersucht. Es wurde entweder unter Blau-, Rot-, Dunkelrotlicht oder unter gleichzeitiger Bestrahlung von Blau- und Dunkelrotlicht kultiviert. Die Ergebnisse aus den verschiedenen Hauptkulturbedingungen werden hier zusammengefasst. Eine Dunkelkontrolle wurde ebenfalls mitgeführt.



**Abbildung 41 PhiF Flirt System mit Bestrahlung verschiedener Wellenlängen.**

Gezeigt sind die durchflusszytometrischen Ergebnisse des Flirt Systems PhiF unter kontinuierlicher Bestrahlung verschiedener Wellenlängen. Auf der Abszisse wird angegeben, ob gleichzeitig mit Blau- und Dunkelrotlicht, nur mit Blau-, Rot- oder Dunkelrotlicht bestrahlt wurde. Ebenfalls wurde eine Dunkelkontrolle mitgeführt. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben.  $n = 5$  (für Dunkel, Blau, Rot); sonst  $n = 2$

Die Ergebnisse aus der Abbildung 41 zeigen, dass weder die kontinuierliche Bestrahlung mit Rot- noch das Dunkelrotlicht die Genexpression von yEGFP im Flirt System hervorriefen. Die Werte lagen bei knapp 300 AU/ Zelle und damit auf dem Niveau der Dunkelkontrolle. Gleichzeitig war die Aktivierung der Expression unter Blaulichtexposition in etwa so hoch, wie bei gleichzeitiger Bestrahlung mit Blau- und Dunkelrotlicht. Hier betrug das Signal bei beiden circa 33.000 AU/ Zelle.

Zusammenfassend wurde das Rotlichtsystem Phi-LexA konstruiert, dass bei  $6,25 \mu\text{M}$  PCB und unter Rotlicht am besten aktiviert wurde. Blaulichtexposition aktivierte es ebenfalls, konnte

aber mit gleichzeitiger Bestrahlung mit Dunkelrot- und Blaulicht umgangen werden. Das Flirt System wurde weder unter Rot- noch Dunkelrotlichtbestrahlung aktiviert. Außerdem führte die gleichzeitige Bestrahlung mit Dunkelrot- und Blaulicht zu keiner Abnahme der yEGFP Signalstärke, sodass es eine Lichtkombination beider Systeme machbar erschien.

### **3.12 Flirt mit VP1**

Um beide Systeme parallel zu testen, musste bei einem der beiden Licht-Systemen der Reporter geändert werden. Dazu wurde ein Flirt System mit VP1 als Reporter konstruiert (Reporter-kassette pPD189 siehe Kapitel 3.1). Da VP1 nicht durchflusszytometrisch erfasst werden kann, wurde die Detektion mit Hilfe der protein-biochemischen Methode (Kapitel 2.2.10) durchgeführt.

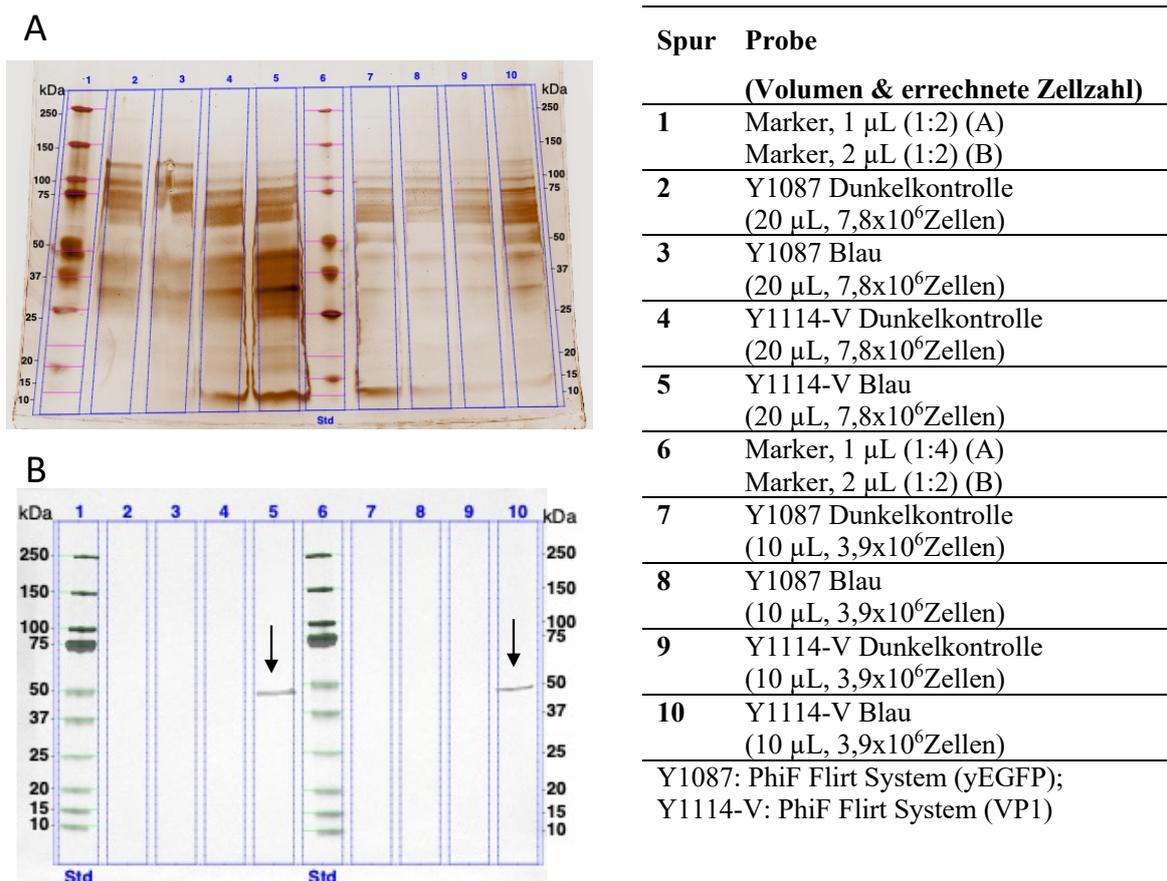
Das PhiF Flirt System mit dem VP1 wurde in den YPH500 Stamm eingebaut, die entsprechende interne Bezeichnung der Mutante war Y1114-V. Um zu testen, ob unspezifische Banden im Bereich der molekularen Größe von VP1 im Western Blot auftraten, wurde das PhiF Flirt System mit dem yEGFP als Reporter (interne Bezeichnung Y1087) als Negativkontrolle mitgeführt.

#### **3.12.1 Silberfärbung und Western Blot**

Um das Flirt System mit VP1 als Reporter (Mutante Y1114-V) zu verifizieren, wurden die zwei YPH500 Mutanten, Y1114-V (VP1) und Y1087 (yEGFP), 22 h in der Hauptkultur Blaulicht bestrahlt oder im Dunkeln kultiviert. Anschließend wurden  $10^8$  Zellen aufgeschlossen (Kapitel 2.2.10.1) ein SDS-Lauf (Kapitel 2.2.10.2) durchgeführt und folgend das Gel einer Silberfärbung (Kapitel 2.2.10.3) unterzogen.

Die Probenbezeichnung, das silbergefärbte Gel und der zugehörige Western Blot ist in Abbildung 42 angeführt. Bei allen Proben wurde, für die errechnete Zellzahl in der Probe, der Verdünnungsfaktor, der sich aus dem Aufschluss- und Probenvolumen ergab, berücksichtigt.

## Ergebnisse



**Abbildung 42 Silberfärbung und Western Blot Analyse mit Anti-VP1 Antikörper für die Flirt Systeme mit yEGFP oder VP1 als Reportergen.**

Gezeigt ist ein silbergefärbtes Acrylamidgel (A) und die zugehörige Chemilumineszenz-behandelte Nitrocellulose-Membran (B), die mit dem Imager aufgenommen und mit der Software nachbearbeitet wurden. Die Membranen zeigen neun Spuren. Der Pfeil zeigt eine Bande in der fünften und zehnten Spur auf einer Höhe von circa 50 kDa, das dem VP1 zugeordnet werden kann (B). Die Tabelle daneben zeigt, welche Proben aufgetragen wurden. Für B: *Exposure Time*: 27.983 s (*Optimal Auto-exposure*)

Das silbergefärbte Gel in Abbildung 42A zeigt, dass in allen Spuren ein ähnliches Muster vorherrschte. Es ist zu erkennen, dass die 10  $\mu$ L Proben, zweite bis fünfte Spur, weniger intensiv waren als die aufgetragenen 20  $\mu$ L Proben, Spur sieben bis 10. Es zeigte sich, dass die Y1087 Proben, also jene mit dem yEGFP als Reporter sich jeden der Y1114-V (VP1) stark ähnelten. Es konnten keine Rückschlüsse geschlossen werden im welchen Aufschluss VP1 vorhanden war, dazu wurde die Western Blot Analyse herangezogen (Abbildung 42B). In der fünften (Software-errechnetes Molekulargewicht der Bande: 46,9 kDa) und zehnten Spur (Software-errechnetes Molekulargewicht der Bande: 48 kDa) sah man eine einzige Bande. Diese Bande passte zu dem Protein VP1 (46 kDa). Damit konnte gezeigt werden, dass das VP1 mit dem PhiF Flirt System (Y1114-V) unter Blaulicht exprimiert wurde. Die etwas schwächere Bande in der zehnten Spur ist darauf zurückzuführen, dass statt 20  $\mu$ L nur 10  $\mu$ L der aufgeschlossenen Proben in die Tasche 10 aufgetragen wurde. Außerdem war zu erkennen, dass bei der Dunkelkontrolle von Y1114-V, Spur vier und neun, keine Bande zu sehen war und somit

keine Expression von VP1 stattgefunden hat. Auch in den Aufschlüssen von Y1087, die als zusätzliche *Housekeeping*-Kontrolle mitgeführt wurde, zeigten, dass im Bereich 50 kDa keine Expression stattgefunden hat, das dem VP1 zugeordnet werden konnte und somit keine unspezifische Färbung in diesem Bereich stattgefunden hat.

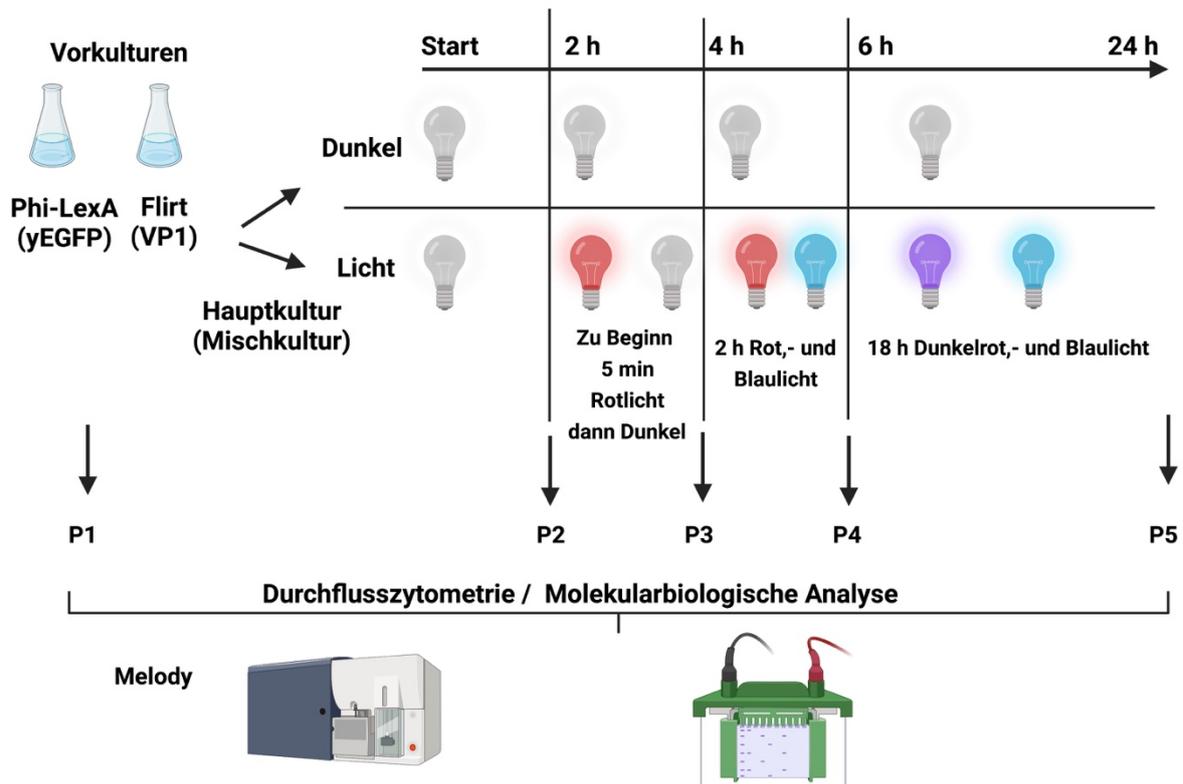
Zusammenfassend wurde ein Flirt System konstruiert, dass erfolgreich VP1 nur unter Blaulichtbestrahlung exprimiert und es sich im Western Blot nachweisen ließ.

### 3.13 Mischkultur

Nach dem erfolgreich der VP1 Nachweis mit dem PhiF Flirt System gelungen war (siehe Kapitel 3.12), konnte eine Mischkultur beider Hefemutanten erfolgen. Dabei wurden das Blaulicht Flirt System mit VP1 (Y1114-V) und das Rotlicht Phi-Lex System mit yEGFP als Reporter (interne YPH500 Mutanten-Bezeichnung Y1009-G), verwendet. Kultiviert wurde sowohl in *Deepwells* als auch im Bioreaktor bei 23°C. Proben wurden sowohl vor Inokulation (Vorkulturen) als auch während der Kultivierung der Mischkultur genommen und durchflusszytometrisch als auch biochemisch analysiert. Die Mischkultur wurde so innokuliert, dass  $1 \times 10^6$  Zellen/ mL von jeder Mutante vorhanden waren.

Für die Detektion von VP1 wurden jeweils  $10^8$  Zellen der Vorkultur geerntet und aufgeschlossen. Bei allen weiteren Proben der Mischkultur wurden jeweils 3 mL Probe aufgeschlossen und 20  $\mu$ L des Aufschlusses in die Taschen des SDS-Gels pipettiert. Bei der Probennahme im Bioreaktor wurde 6 mL verworfen und anschließend 3 mL für die Analyse verwendet. Bei den *Deepswells* wurden drei Mal je 1,5 mL pro Probe angesetzt und aus diesen drei technischen Replikaten wurden 3 mL für die molekularbiologischen Analyse verwendet. Außerdem wurde der OD<sub>600</sub> Wert jeder Probe ermittelt, sodass näherungsweise die Zellzahl im Auftragevolumen errechnet werden konnte.

Der Versuchsaufbau ist in der folgenden Abbildung grafisch dargestellt.



**Abbildung 43 Aufbau der Probenahme von der Mischkultur.**

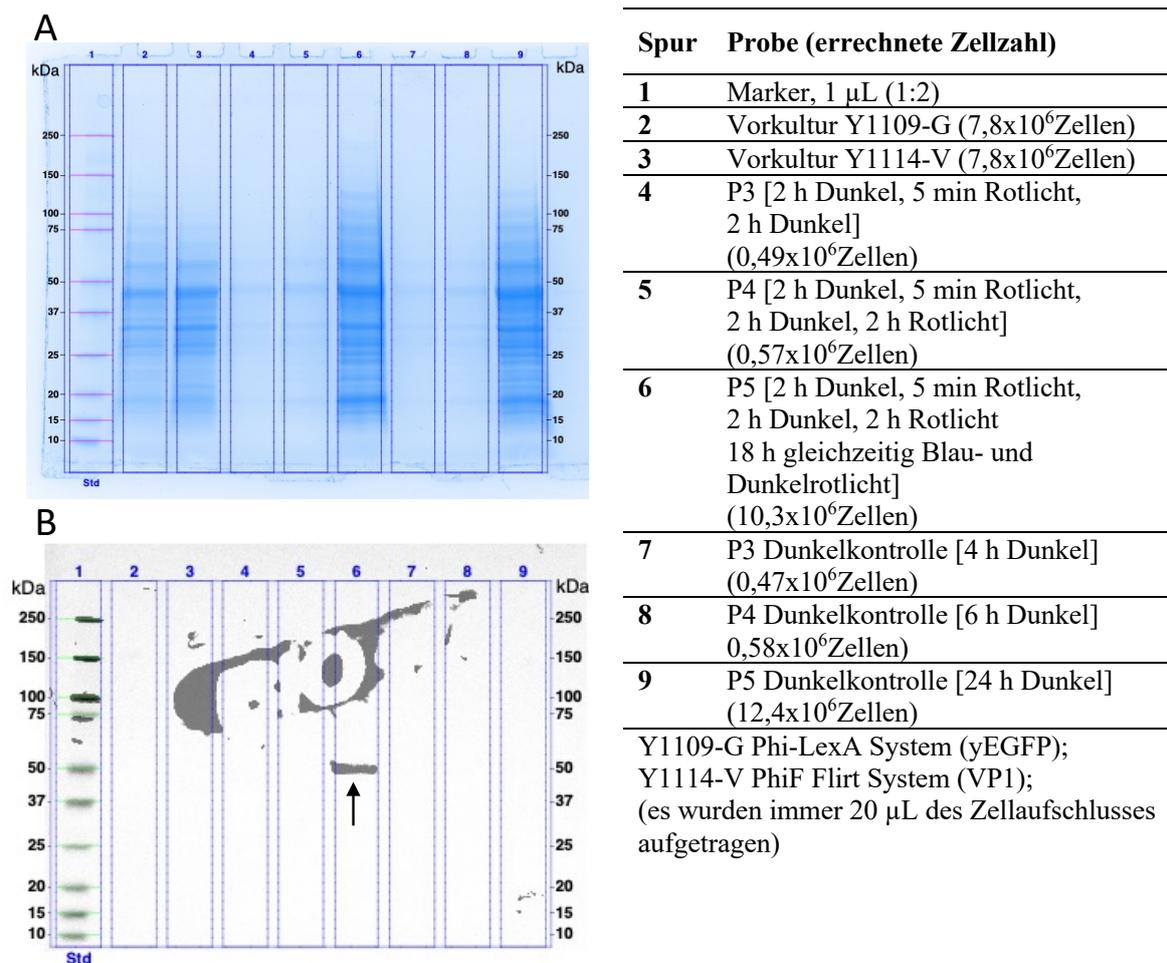
Beide Mutanten, Y1114-V (Flirt VP1) und Y1109-G (Phi-LexA yEGFP) wurden im Schüttelkolben vorkultiviert (P1). Im Anschluss wurde die Hauptkultur mit beiden Mutanten innokuliert, sodass eine Mischkultur entstand. Die Dunkelkontrolle wurde 24 im Dunklen kultiviert. Bei der Lichtkontrolle wurde nach zwei Stunden Dunkel-Inkubation für 5 min das Rotlicht eingeschaltet und nach 4 Stunden gleichzeitig mit Rot- und Blaulicht bestrahlt. Nach sechs Stunden wurde die Lichtkontrolle gleichzeitig mit Dunkelrot- und Blaulicht bestrahlt. Proben wurden bei beiden Bedingungen nach 2 (P2), 4 (P3), 6 (P4) und nach 24 (P5) Stunden Kultivierung entnommen. *Created with BioRender.com*

Die Proben P1 (Vorkultur) und P3 bis P5 wurden für die VP1 Detektion verwendet. Für die Durchflusszytometrie wurden alle Proben verwendet.

### 3.13.1 Coomassie Färbung und Western Blot der Bioreaktor-Proben

Gezeigt wird die Coomassie Färbung des SDS-Gels und der zugehörige Western Blot für die Proben im Bioreaktor. Dabei ist die zweite Spur die der Vorkultur Y1109-G und die dritte Spur die der Y1114-V Vorkultur. In der Abbildung 44 ist hinter der Probenbezeichnung die errechnete Zellzahl pro Probenvolumen gezeigt.

## Ergebnisse



**Abbildung 44 Coomassie Färbung und Western Blot der Bioreaktor-Proben.**

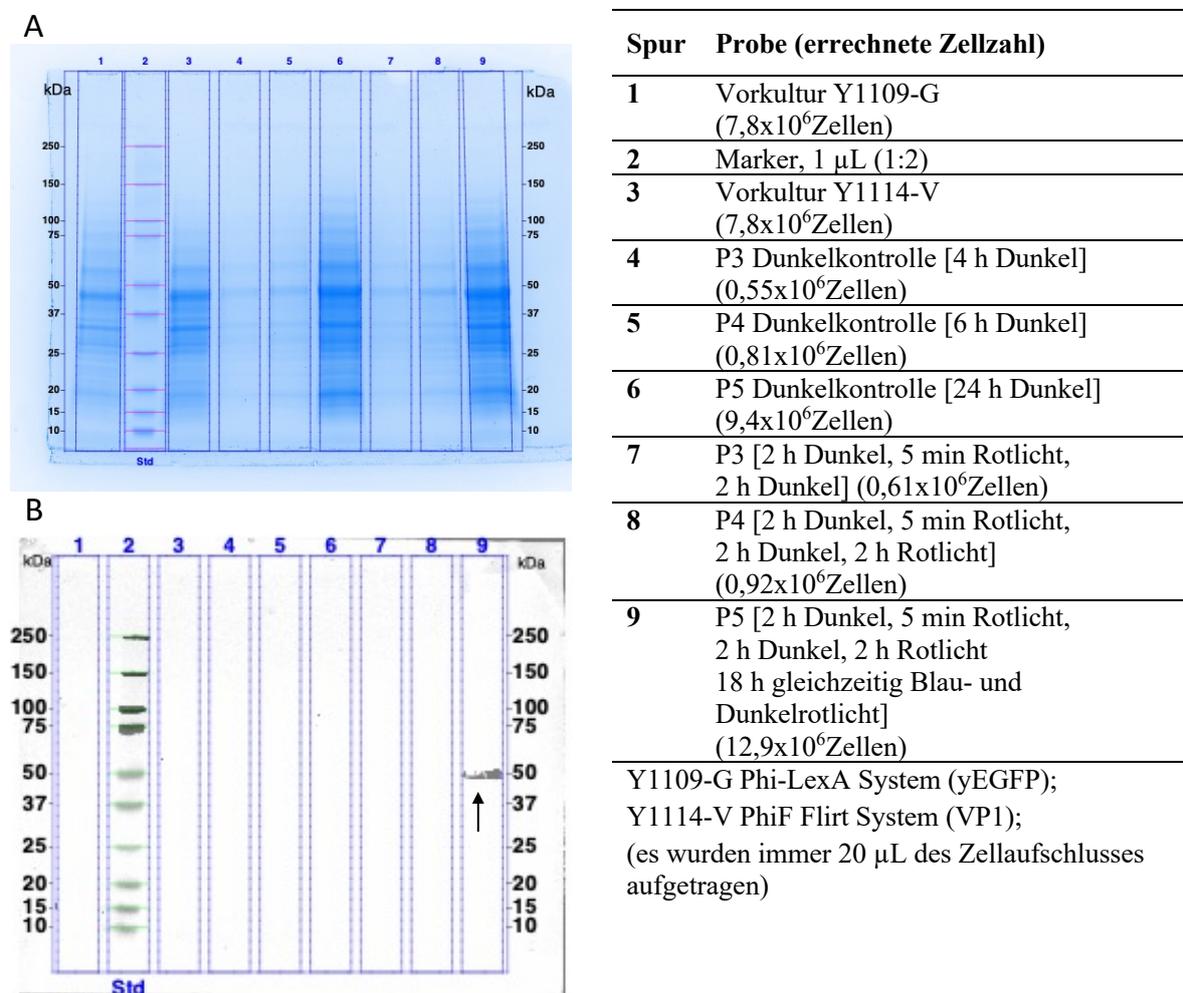
Gezeigt ist das Coomassie Gel (A) und die zugehörige Chemilumineszenz-behandelte Nitrocellulose-Membran (B), mit dem Imager aufgenommen und mit der Software nachbearbeitet. Die Membranen zeigen neun Spuren. Die Tabelle neben dem Bild zeigt die Proben in den jeweiligen Spuren. Der Pfeil in B zeigt eine Bande in der sechsten Spur auf einer Höhe von circa 50 kDa, das dem VP1 zugeordnet werden kann. Für B: *Exposure Time: 11.438 s (Optimal Auto-exposure)*. Das BioRad Logo ist zu vernachlässigen.

Abbildung 44A zeigt in der zweiten und vierten Spur die Vorkulturen der jeweiligen Mutante, die ein ähnliches Muster aufwiesen. Da zu jedem Zeitpunkt in der Mischkultur immer 3 mL Probe entnommen wurden, erklärte es die immer stärkere werdende Intensität von den zusammenhängenden Proben Spuren vier bis sechs und sieben bis neun. Die vierte bis sechste Spur ist der Zellaufschluss, der unter Licht kultivierten Mischkultur zum Zeitpunkt vier Stunden, sechs Stunden und schlussendlich 24 Stunden Kultivierungsdauer. Die siebte bis neunte Spur ist die dazugehörige Mischkultur, die im Dunkeln kultiviert wurde.

Abbildung 44B zeigt (das BioRad Logo ist zu vernachlässigen), dass in der sechsten Spur, Probe P5, allein eine spezifische Bande bei etwa 50,1 kDa (Software-errechnet) zu erkennen war. Diese war mit dem molekularischen Gewicht von VP1 (46 kDa) näherungsweise im Einklang. Somit konnte gezeigt werden, dass nach 18 Y1114- V In der Spur neun, P5 Dunkelkontrolle der Mischkultur, war diese Bande nicht zu erkennen.

### 3.13.2 Coomassie Färbung und Western Blot der *Deepwell*-Proben

Gezeigt wird die Coomassie Färbung und das zugehörige Western Blot Bild des SDS Gels für die *Deepwell*-Reihe mit der errechneten Zellzahl im Auftragevolumen.



**Abbildung 45 Coomassie Färbung und Western Blot der *Deepwell*-Proben.**

Gezeigt ist das Coomassie Gel (A) und die zugehörige Chemilumineszenz-behandelte Nitrocellulose-Membran (B), mit dem Imager aufgenommenen und mit der Software nachbearbeitet. Die Membran zeigt neun Spuren. Die Tabelle neben dem Bild zeigt die Proben in den jeweiligen Spuren. Der Pfeil zeigt eine Bande in der neunten Spur auf einer Höhe von circa 50 kDa, das dem VP1 zugeordnet werden kann. Für B: *Exposure Time*: 89.085 s (*Optimal Auto-exposure*)

Abbildung 45A zeigt in der ersten Spur den Aufschluss der Vorkultur Y1114- V, in der dritten den der Vorkultur Y1109-G. Die Spuren vier bis sechs waren die Proben P3 bis P5 der Dunkelkontrolle der Mischkultur, die Spuren sieben bis neun die Proben P3 bis P5 der Lichtproben. Auch hier zeigte sich die Zunahme der Stärke von P3 bis P5, dass mehr Zellen und dadurch mehr aufgeschlossene Proteine im Verlauf der Zeit vorhanden waren. Dieses ist damit zu erklären, dass immer 3 mL Probenvolumen aufgeschlossen wurden. Die Mischkultur war zum Zeitpunkt P3 vier Stunden kultiviert worden, P4 sechs Stunden und P5 24 Stunden.

## Ergebnisse

Das Coomassie Gel zeigt, dass die Proben P3 bis P5 der Dunkelkontrolle vom Ladevolumen im Vergleich zu der Lichtbedingung in etwa gleich waren, sodass das Signal im Western Blot, der folgenden Abbildung, gut bewertet werden konnte.

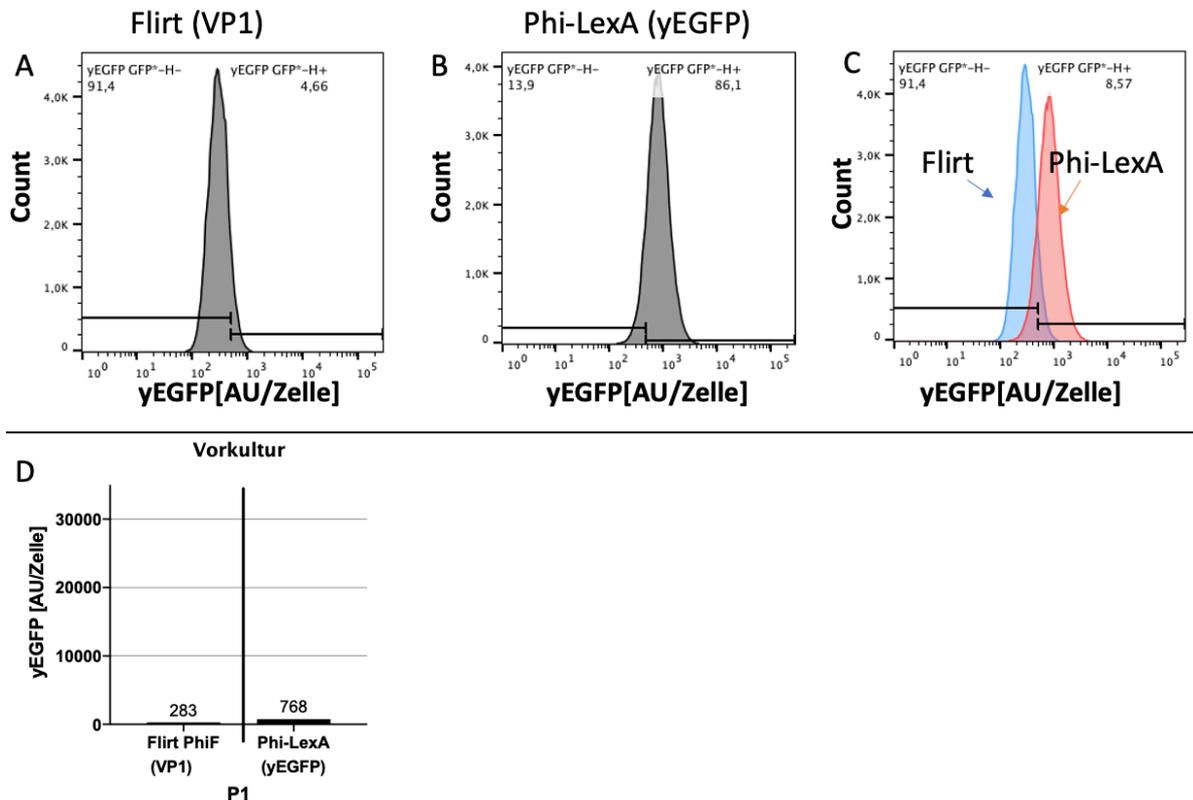
Abbildung 45B zeigt, dass nur in der neunten Spur eine klare Bande (Software-errechnet: 49 kDa) detektiert wurde. Die neunte Spur (P5) ist die Lichtkontrolle, nachdem die Zellen 18 Stunden gleichzeitig einer Blaulicht- und Dunkelrotlichtbestrahlung ausgesetzt waren. Da in der Mischkultur die Mutante Y1114- V (PhiF Flirt System mit dem VP1) unter Blaulichtbestrahlung VP1 exprimieren sollte, kann darauf geschlossen werden, dass VP1(46 kDa) in dieser Zeit erfolgreich exprimiert wurde. Die sechste Spur ist die zugehörige Dunkelkontrolle (P5). Dort war keine Band zu erkennen.

### **3.13.3 Durchflusszytometrische Auswertung der Vorkulturen**

Zuvor konnte gezeigt werden, dass in der Mischkultur VP1 mit dem PhiF Flirt System unter gleichzeitiger Blau- und Dunkelrotlichtbestrahlung in *Deepwells* und im Bioreaktor exprimiert wurde. In diesem Unterkapitel werden die durchflusszytometrischen Ergebnisse für die Detektion von yEGFP behandelt. Es wurde überprüft, ob die Y1109-G (Phi-LexA mit yEGFP) Mutante in der Mischkultur unter Rotlichtbestrahlung den Reporter exprimiert.

Gezeigt werden zuerst die Ergebnisse der Vorkulturen, die sowohl für die Inokulation für die *Deepwells* als auch für die Bioreaktoren verwendet wurden.

## Ergebnisse



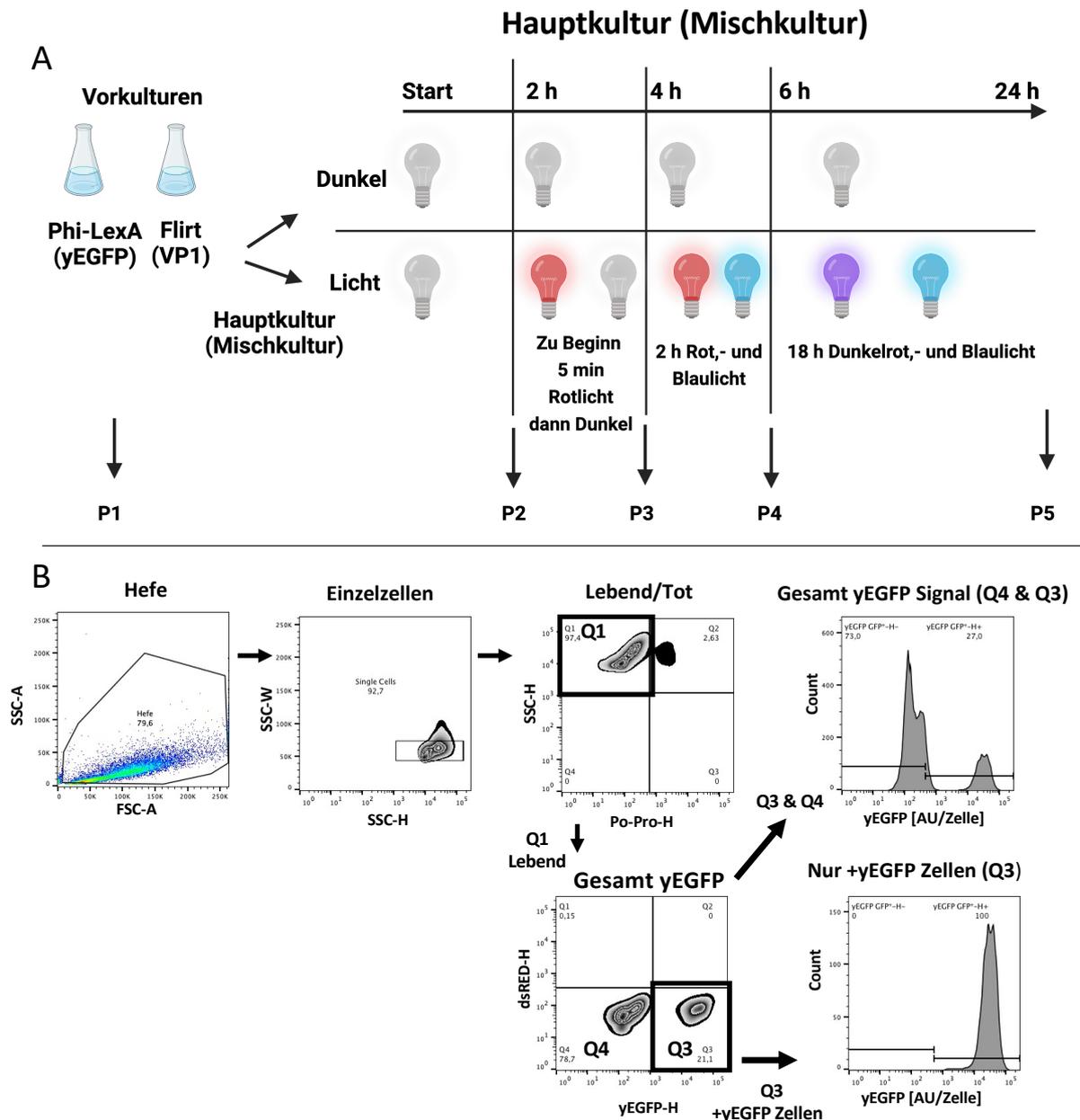
**Abbildung 46 Durchflusssytometrische Auswertung der Vorkulturen.**

Abbildung A zeigt das Histogramm der Vorkultur mit der Y1114-V (VP1) Mutante, Abbildung B das Histogramm der Vorkultur Y1109-G Mutante (yEGFP). In der Abbildung C werden A&B in einem gemeinsamen Histogramm dargestellt. Abbildung D stellt die durchflusssytometrischen ausgewerteten Ergebnisse dar. Auf der Abszisse wird die jeweilige Hefemutante angegeben. Da die Vorkultur die erste Probe gewesen war, wurde diese als P1 bezeichnet. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben.  $n = 1$

Die Vorkulturen wurden einzeln durchflusssytometrisch analysiert. In der Abbildung 46D ist zu erkennen, dass die Y1114-V Mutante, welcher das VP1 Gen trägt, eine geringe yEGFP-Signalstärke von 258 AU/ Zelle hatte. Die Y1109-G Mutante, Phi-Lex mit yEGFP als Reporter, hatte im Vergleich eine Signalstärke von 703 AU/ Zelle.

### 3.13.4 Durchflusssytometrische Auswertung der Mischkultur im Bioreaktor

Folgende Abbildung zeigt den Versuchsaufbau und die zugehörige *Gating*-Strategie, die bei der durchflusssytometrischen Auswertung angewandt wurde.



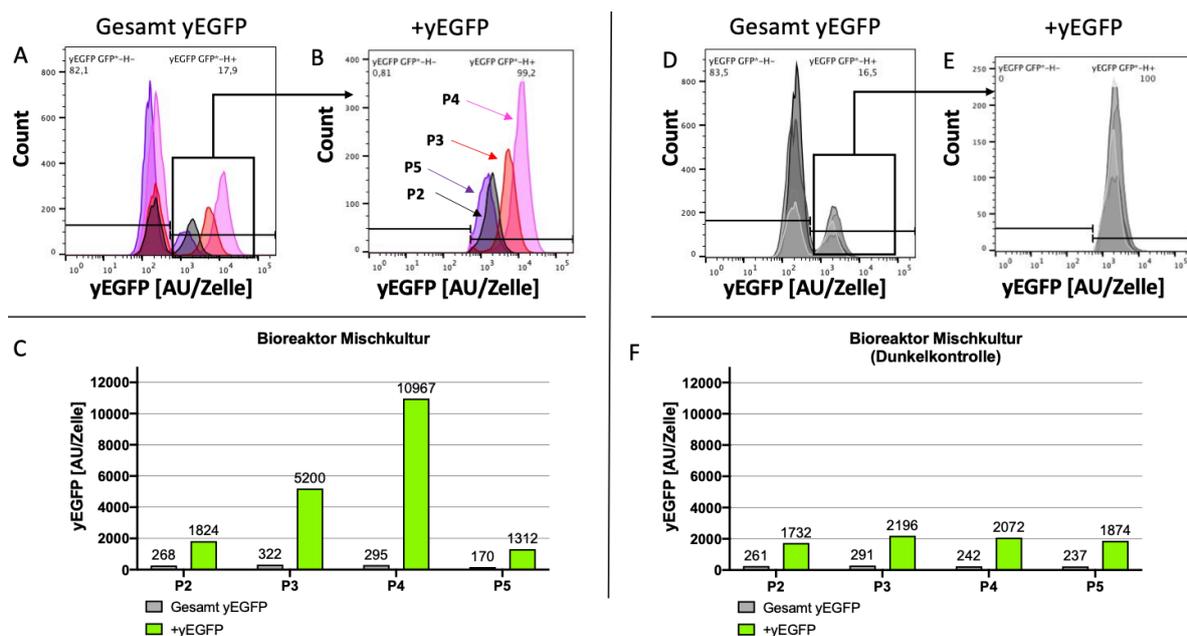
**Abbildung 47 Schematischer Ablauf der Versuchsreihe der Mischkultur und Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Auswertung.**

**Oben (A):** Es wird der schematische Ablauf der Versuchsreihe graphisch dargestellt. Aus den zwei Vorkulturen wurde vor der Innokulation eine Probe (P1). Anschließend wurden die *Deepwells* oder der Bioreaktor mit den beiden Hefemutanten innokuliert und die Hauptkultur (Mischkultur) über 24 Stunden kultiviert. Zwischendurch wurden weitere Proben gezogen. *Created with BioRender.com*

**Unten (B):** Es wird die *Gating*-Strategie für die Auswertung der Proben graphisch dargestellt. Die Hefezellen der Hauptkultur, Mischkultur aus zwei Mutanten, wurden zu Beginn eingegrenzt, die Einzelzellen und folgend die Lebend/ Tot-Zellen bestimmt. Nach der Lebend- Tot-Bestimmung wurde in einem weiteren Schritt, im dsRed gegen yEGFP-Kanal, die yEGFP positiven Zellen von den negativen differenziert. Wurden die Quadranten Q4 und Q3 zusammen ausgewertet, so wurde das gesamte yEGFP Signal ausgewertet. Wurde hingegen nur der Quadrant Q3 bei der Auswertung berücksichtigt, so wurden nur die positiven yEGFP Zellen der Mischkultur ausgewertet.

In der folgenden Abbildung (Abbildung 48) werden die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Mischkultur im Bioreaktor gezeigt.

## Ergebnisse



**Abbildung 48** Histogramme und durchflusszytometrische Ergebnisse der Mischkultur unter Lichtexposition und Dunkel Kultivierungsbedingung im Bioreaktor.

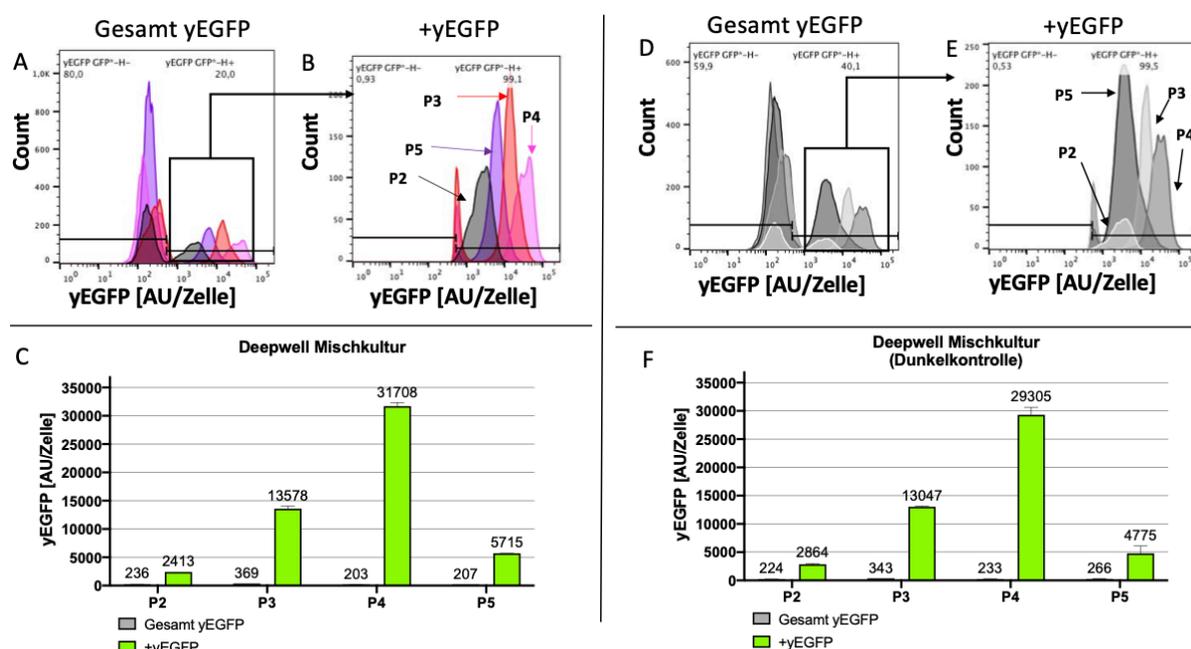
Gezeigt ist die Gesamt-Signalstärke der vier Proben (P) vom detektierten yEGFP der Mischkultur aus dem Phi-LexA System (Reporter yEGFP) und dem Flirt PhiF (Reporter VP1) in einem Histogramm unter Lichtexposition-Bedingung (A) und der Dunkel-Kultivierung (D). Abbildung B und E zeigen die positiven yEGFP Zellen (+yEGFP) von A bzw. D in einem Histogramm. Abbildung C (Lichtkontrolle) und F (Dunkelkontrolle) zeigen die durchflusszytometrischen ausgewerteten Ergebnisse der Mischkultur. Auf der Abszisse wird die Probennummer angegeben. Pro Probe werden zwei Balken gezeigt. Der graue Balken stellt das gesamte, der grüne nur das von den positiven yEGFP-Zellen detektierte Signal dar. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben.  $n=1$

Abbildung 48 fasst graphisch die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Licht- und Dunkelkontrolle im Bioreaktor zusammen. In Abbildung 48A und D ist das Gesamt-yEGFP-Signal der jeweiligen Proben in einem Histogramm zusammengefasst. Zu erkennen war, dass immer zwei Populationen pro Probe (Farbe) vorhanden waren, diese aber versetzt in der Stärke ihres yEGFP-Signals waren. Dies kann damit begründet werden, da es sich um eine Mischkultur handelte und sich in jeder Probe beide YPH500 Mutanten, Y1114-V und Y1009-G, befanden. Abbildung 48B und E fasst die linken Populationen aus A bzw. D, die Y1009-G Mutante, in einem Histogramm zusammen. In der Lichtkontrolle war zu erkennen, dass das yEGFP-Signal mit jeder Folgeprobe stieg und bei Probe 5 wieder das Niveau der Probe 2 erreichte wurde. Bei der Dunkelkontrolle (Abbildung 48E) waren alle Proben auf der gleichen Höhe. In Abbildung 48C sind die Ergebnisse aus A und B zusammengefasst. Dabei ist zu erkennen, dass wenn das Gesamtsignal betrachtet wurde, dieses konstant niedrig gewesen war. Wurden hingegen nur die positiv yEGFP-Zellen betrachtet, so war zu erkennen, dass P3 (5 min Rotlicht und 1 h 55 min Dunkel) bzw. P4 (2 h mit Rotlicht) eine Zunahme des yEGFP-Signals verzeichneten. Somit konnte hier gezeigt werden, dass die Y1009-G Mutante (Phi-LexA mit yEGFP) in der Mischkultur erfolgreich unter Rotlichtbestrahlung den yEGFP-Reporter

exprimierte. Das Signal fiel wieder auf etwa das Niveau von P2, nachdem die Kultur 18 Stunden gleichzeitig mit Blau- und Dunkelrotlicht bestrahlt wurde. Folglich wurde die yEGFP Expression in der Y1009-G Mutante deaktiviert. In Abbildung 48F sind die Ergebnisse der Dunkelkontrolle zusammengefasst. Dabei war zu erkennen, dass sowohl das Gesamtsignal als auch das Signal der +yEGFP-Zellen konstant niedrig war. Dennoch war das Signal der +yEGFP-Zellen etwa 10-fach stärker. Daraus kann geschlossen werden, dass die Y1009-G Mutante nicht im Dunkeln aktiviert wurde, jedoch eine hohe basale Transkription aufwies.

### 3.13.5 Durchflusszytometrische Auswertung der Mischkultur in Deepwells

Gezeigt werden die Ergebnisse der Proben aus den *Deepwell*-Platten. Proben wurden zu gleichen Zeitpunkten entnommen wie bei dem Bioreaktor. Der entscheidende Unterschied zu der Entnahme im Vergleich zu dem Bioreaktor war, dass sich alle Proben für die jeweiligen Bedingungen auf je einer *Deepwell*-Platte befanden. Das heißt, dass zu jedem Zeitpunkt bei der eine Probe pro Bedingung entnommen wurde, die ganze Platte genommen wurde, in der sich auch die folgenden Proben befanden. Dementsprechend waren die Dunkelkontrollen als auch die Lichtproben zwischenzeitlich dem Tageslicht ausgesetzt.



**Abbildung 49** Histogramme und durchflusszytometrische Auswertung der Mischkultur unter Lichtexposition und Dunkel Kultivierungsbedingung *Deepwells*.

Gezeigt ist die Gesamt-Signalstärke der vier Proben (P) vom detektierten yEGFP der Mischkultur aus dem Phi-LexA System (Reporter yEGFP) und dem Flirt PhiF (Reporter VP1) in einem Histogramm unter Lichtexposition-Bedingung (A) und der Dunkel-Kultivierung (D). Abbildung B und E zeigen die positiven yEGFP Zellen (+yEGFP) von A bzw. D in einem Histogramm. Abbildung C (Lichtkontrolle) und F (Dunkelkontrolle) zeigen die durchfluss-zytometrischen ausgewerteten Ergebnisse der Mischkultur. Auf der Abszisse wird die Probennummer angegeben. Pro Probe werden zwei Balken gezeigt. Der graue Balken stellt das gesamte, der grüne nur das von den positiven yEGFP-Zellen detektierte Signal dar. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. n=2

Abbildung 49 fasst graphisch die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Lichtbedingung der *Deepwell*-Versuchsreihe zusammen. In Abbildung 49A und D ist das Gesamt-yEGFP-Signal der jeweiligen Proben in einem Histogramm zusammengefasst. Zu erkennen ist, dass immer zwei Populationen pro Farbe vorhanden waren, diese aber versetzt in der Stärke ihres yEGFP-Signals. Die linke Population ist wahrscheinlich die Y1114-V (VP1) Population, die rechte wahrscheinlich die Y1009-G (yEGFP) Population. Abbildung 49B bzw. E fasst die linken (Y1009-G) Populationen aus A bzw. D in einem Histogramm zusammen. Zu erkennen war, dass das yEGFP-Signal mit jeder Folgeprobe stieg und bei Probe 5 wieder das Niveau der Probe 2 erreicht wurde. In Abbildung 49C bzw. F sind die Ergebnisse aus A und B bzw. D und E zusammengefasst. Wurde das yEGFP-Gesamtsignal betrachtet, so war dieses konstant niedrig. Wurde hingegen nur die positiv yEGFP-Zellen betrachtet (grün), so konnte kein Unterschied zwischen der Dunkel- und Lichtkontrolle gemacht werden. Dieses kann darauf zurückgeführt werden, dass das Phi-LexA System stark durch das Tageslicht aktiviert wurde und der gebildete dimerisierter optogenetischer synthetischer Transkriptionsfaktor lange aktiv blieb. Alle Dunkelkontrollproben befanden sich alle auf **einer** *Deepwell*-Platte. Bei jeder Messung der Proben P2, P3, P4 und P5 wurde dieselbe Platte herausgeholt, die OD600 der jeweiligen *Wells* gemessen, die Proben für das die durchflusszytometrische und protein-biochemische Auswertung gesammelt und dieselbe Platte wieder zurück in den Dunkelinkubator getan. Diese Störgröße im Versuchsaufbau kann herangezogen werden, dass das Signal der Dunkelkontrolle stieg. Um diese These zu überprüfen, wurde die Mischkultur mit dem Flirt System und dem Phi-Lex System weiteren Versuchen unterzogen.

### 3.13.6 Mischkultur unter Tageslichtbedingung

Diese Versuchsreihen fanden in *Deepwell*-Platten statt und wurden bei 30 °C kultiviert.

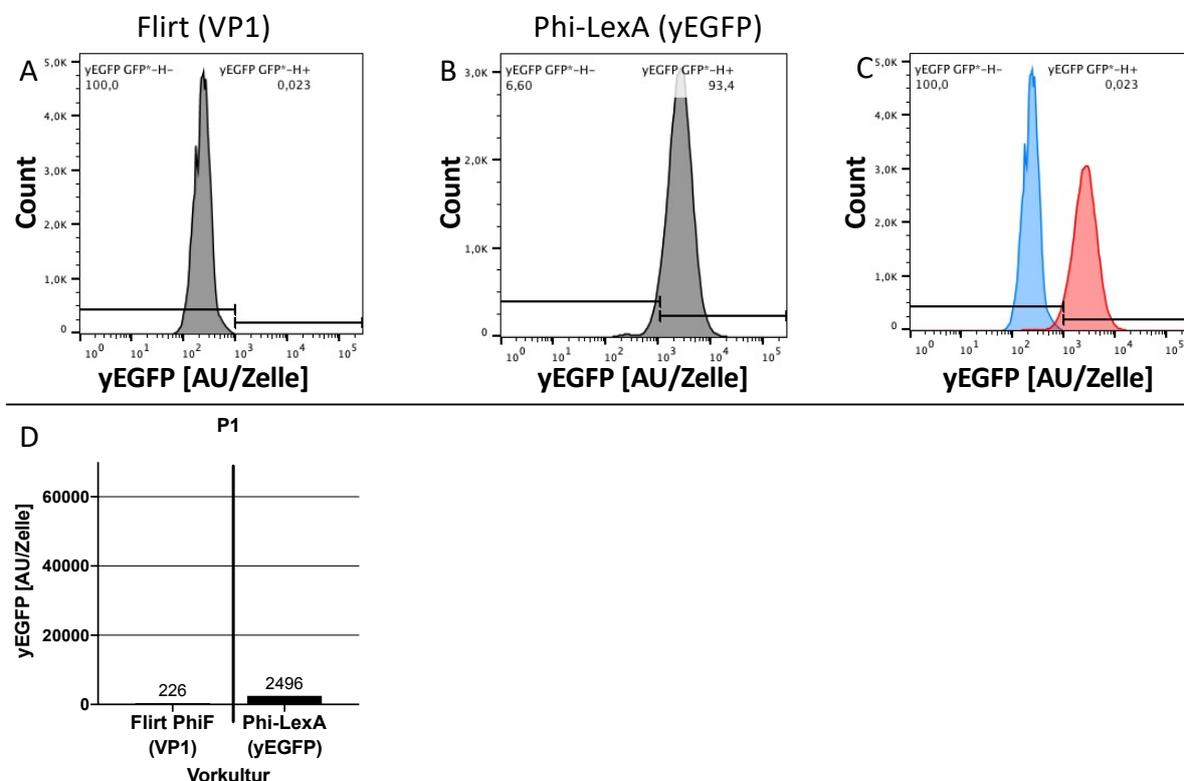
Zum einen wurde der *Deepwell*-Versuch in ähnlicher Form wiederholt und diesmal weniger Proben, nämlich nur zwei statt vier, gezogen, damit die Dunkelkontrolle weniger dem Tageslicht ausgesetzt wurden. Gleichzeitig wurde auch eine Tageslichtbedingung mitgeführt, ähnlich wie beim Flirt-System (siehe Kapitel 3.7.2).

Um zu testen, wie sensitiv das Phi-LexA System gegenüber Tageslicht ist, wurde eine Mischkultur 24 Stunden unter Tageslicht kultiviert. Dazu wurde der gleiche Tageslichtinkubator verwendet wie in Kapitel 3.7.2. Dabei wurde eine Mischkultur aus zwei Vorkulturen der beiden Mutanten Y1114-V und Y1109-G inokuliert, sodass die Zelldichte in

## Ergebnisse

der Mischkultur je  $10^6$  Zellen/ mL pro Mutante betragen sollte. Die Vorkulturen (P1) wurden einzeln durchflusszytometrisch gemessen und sind in der Abbildung 50 dargestellt.

Gezeigt werden die durchflusszytometrischen Ergebnisse, der Vorkultur.

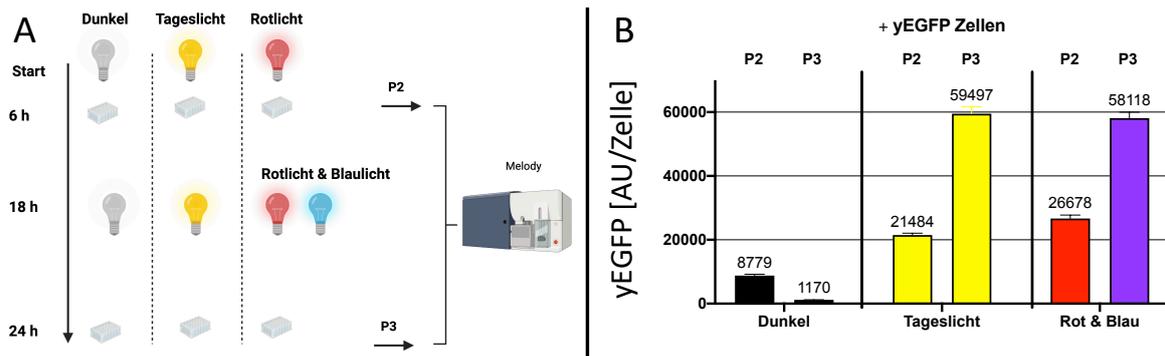


**Abbildung 50** Durchflusszytometrische Auswertung der Vorkulturen vom Tageslichtversuch.

Abbildung A zeigt das Histogramm der Vorkultur mit der Y1114- V (VP1) Mutante, Abbildung B das Histogramm der Vorkultur Y1109-G Mutante (yEGFP). In der Abbildung C werden A&B in einem gemeinsamen Histogramm dargestellt. Abbildung D stellt die durchflusszytometrischen ausgewerteten Ergebnisse dar. Auf der Abszisse wird die jeweilige Hefemutante angegeben. Da die Vorkultur die erste Probe gewesen war, wurde diese als P1 bezeichnet. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. n =1

In Abbildung 50 ist zu erkennen, dass beide YPH500 Mutanten ein unterschiedliches yEGFP Signal auswiesen. Das Flirt System mit dem VP1 hatte ein yEGFP-Signal von etwa 226 AU/ Zelle, das Phi-LexA hatte ein etwa zehnfach höheres Signal. Anschließend wurde drei Gruppen erstellt. Alle Gruppen wurden über eine Dauer von 24 Stunden bei 30 °C, 230 rpm und 6,25  $\mu$ M PCB kultiviert. Nach sechs Stunden wurde bei jeder Gruppe eine Probe (P2) gezogen. Nach 24 h Kultivierung wurde die letzte Probe (P3) genommen. Gruppe eins wurde im Dunkeln, Gruppe zwei unter Tageslicht kultiviert und Gruppe drei wurde sechs Stunden unter Rotlicht und anschließend gleichzeitig unter Rot- und Blaulicht kultiviert. Siehe dazu den Versuchsaufbau in der Abbildung 51. Es wurde die *Gating*-Strategie aus Abbildung 47B für die Auswertung der +yEGFP-Zellen verwendet.

## Ergebnisse



**Abbildung 51 Ausgewerteten durchflusszytometrischen Ergebnisse der Mischkultur unter Tageslicht.**

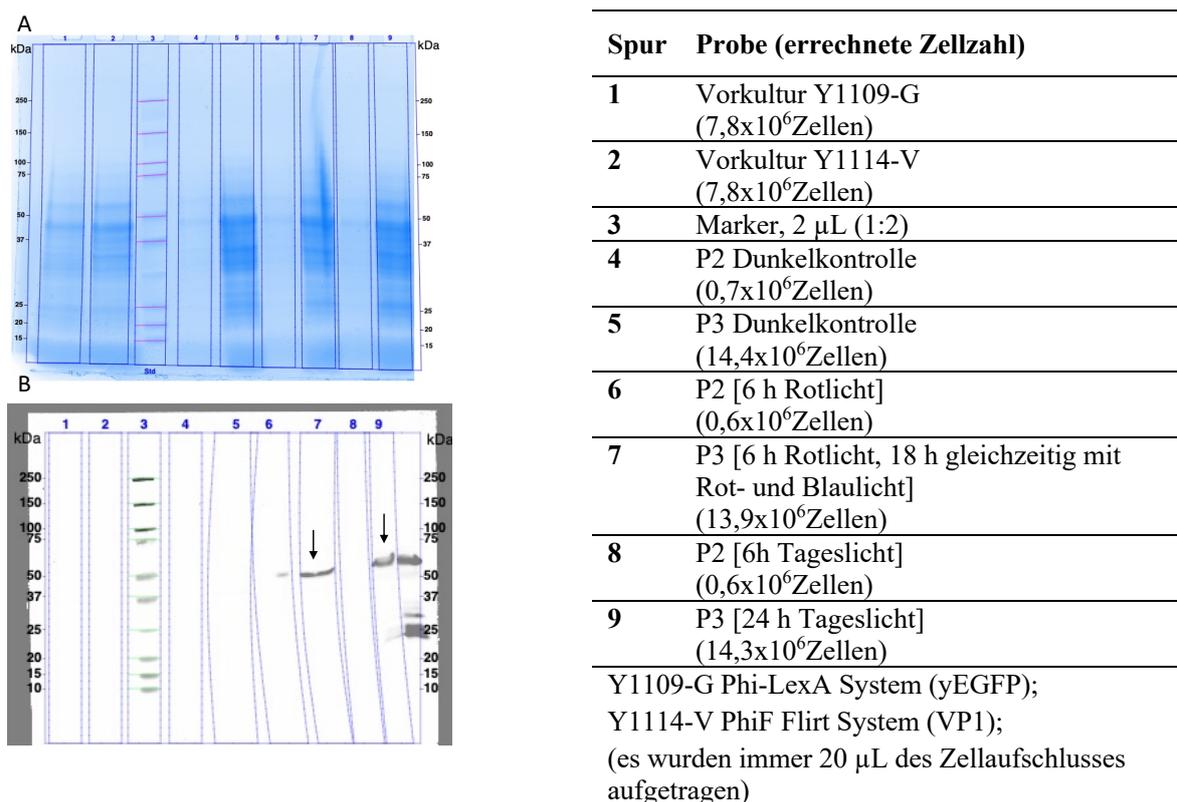
In Abbildung A wird der Ablauf der Versuchsreihe graphisch dargestellt. Die Hauptkultur (Mischkultur) wird für 24 Stunden kultiviert unter drei Versuchsbedingungen, im Dunklen, unter Tageslicht oder zeitweise Anschalten von Licht jeweiliger Wellenlänge. Es wird nach sechs (P2) und nach 24 Stunden die Probe 3 (P3) gezogen und durchflusszytometrisch vermessen.

Abbildung B zeigt die durchflusszytometrischen Ergebnisse aus der Versuchsreihe in einem Balkendiagramm dar. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Auf der Abszisse wird die Kulturbedingung gezeigt. Zusätzlich ist über jedem Balken die Probennummer (P2 oder P3) angegeben. Die Ergebnisse repräsentieren nur die Werte der positiven yEGFP Zellen, vergleiche Abbildung 47 Q3.  $n = 3$ , Abbildung A: *Created with BioRender.com*

Die Abbildung 51B zeigt, dass die Dunkelkontrolle nach sechs Stunden Inkubation eine recht sehr hohe yEGFP Signalstärke von etwa 9.000 AU/ Zelle aufwies. Wurde diese aber ohne weiteres Heraushohlen für weitere 18 Stunden kultiviert, so fiel der Wert auf etwa 1.200 AU/ Zelle. Auffällig war, dass die Tageskontrolle ein etwa so hohes Signal wie die Lichtkontrolle hatte. Dieses war bei dem Flirt-System nicht der Fall. Dort lag der Wert des Tageslichtkontrolle 10-mal niedriger (siehe Kapitel 3.7.2).

Folgend wird die Coomassie und der zugehörige Western Blot für dies Versuchsreihe gezeigt. Bei allen Proben wird die errechnete Zellzahl, aus der  $OD_{600}$  Bestimmung, mitangegeben.

## Ergebnisse



**Abbildung 52** Coomassie und Western Blot der Mischkultur bei Kultivierung unter Dunkelheit, Rot- bzw. Blaulicht und Tageslicht.

Gezeigt ist das Coomassie (A) und die zugehörige Chemilumineszenz-behandelte Nitrocellulose-Membran (B), mit dem Imager aufgenommen und mit der Software nachbearbeitet. Beide Bilder zeigen neun Spuren. Die Tabelle neben den Bildern zeigt die Proben in den jeweiligen Spuren. Der Pfeil in B zeigt eine Bande in der siebten und neunten Spur auf einer Höhe von circa 50 kDa, das dem VP1 zugeordnet werden kann. Für B: *Exposure Time: 59.936 s (Optimal Auto-exposure)*

Im Coomassie Bild (Abbildung 52A) war zu erkennen, dass die vierte, sechste und achte Spur wenig Proteine einhielt. Dieses ist darauf zurückzuschließen, dass die Proben zum Zeitpunkt der Entnahme wenig Zellen enthielten. Nichtsdestotrotz war zu erkennen, dass die Muster der jeweiligen Proben zum gleichen Zeitpunkt, aber unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen, sich ähnelten. Im Western Blot (Abbildung 52B) war zu erkennen, dass in der siebten (Software-errechnet: 51,8 kDa) und neunten Spur (Software-errechnet: 58,9 kDa) je eine spezifische Bande zu erkennen war, die näherungsweise dem VP1 (46 kDa) zugeordnet werden konnte. Die siebte Spur war die P3 Lichtkontrolle, bei der die Tageslichtprobe (P3), bei der die Mischkultur insgesamt 24 h dem Tageslicht ausgesetzt worden war. Die achte Spur, bei der die Mischkultur sechs Stunden dem Tageslicht ausgesetzt war, war keine Bande zu erkennen. Auch bei den Vorkulturen (Spur eins und zwei), sowie als bei den Dunkelkontrollen (Spur vier und fünf), war keine Bande zu erkennen, die auf eine VP1 Expression hinwies.

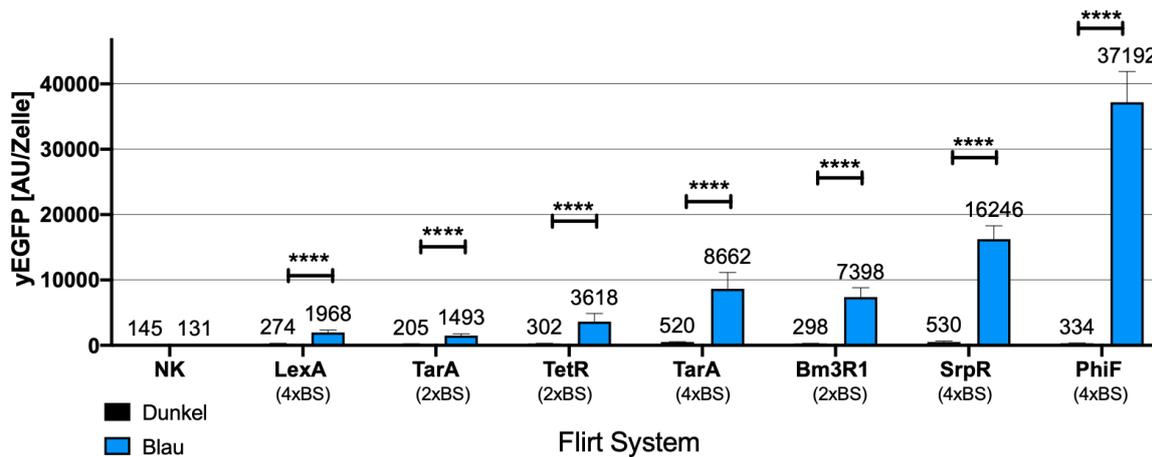
Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass das Rotlichtsystem Phi-LexA stark und langanhaltend durch das Tageslicht aktiviert wurde.

## 4 Diskussion

Lichtsysteme bieten den Vorteil, dass eine Genexpression gezielt gestartet und gestoppt werden kann. Dabei ist es wichtig für welches Lichtsystem sich entschieden wird, da die Konformationsänderung und damit einhergehende Aktivierung der Genexpression auf Chromophoren basiert, die Licht bestimmter Wellenlänge absorbieren. Beachtet werden sollte zudem die Bioverfügbarkeit dieser Chromophore in der Zelle (Banerjee and Mitra 2020). Auch die Wahl der Wellenlänge ist zu bedenken, beispielweise schädigt UV-Licht die Zelle, Blau- und Rotlicht hingegen nicht. Zudem besitzt Rotlicht eine höhere Wellenlänge und penetriert folglich stärker durch die Zellwand, sodass mehr Lichtphotonen in der Zelle ankommen (Banerjee and Mitra 2020). Ideal ist es zudem keine kostspieligen oder toxischen Induktoren zu benötigen und eine Möglichkeit der Kontrolle über die heterologe Genexpression zu schaffen mit der Prämisse, dass die basale Transkription niedrig bleibt, wenn das System ausgeschaltet ist (Braguy and Zurbriggen 2016).

### 4.1 Geringe basale Transkription und starke Aktivierung

Hier wurde ein Blaulichtsystem etabliert, das auf dem Chromophor FAD basiert, welches die Hefe selbst synthetisieren kann, sodass eine exogene Zugabe von Chemikalien entfällt (Bafunno et al. 2004). Zudem wurde sichergestellt, dass die basale Transkription stets niedrig ist. Zu Beginn wurde nur die Reporter-kassette eingebaut und sichergestellt, dass die Orthogonalität konserviert bleibt (Abbildung 19 und Abbildung 21). Auch nach dem Einbau der Expressionskassette, und damit dem Einbringen der Bausteine für den optogenetischen Transkriptionsfaktor, wurde gewährleistet, dass beim Blaulichtsystem die basale Transkription im Inaktivierungszustand (Dunkel) sich auf dem Niveau der YPH500 Mutante befindet, die kein yEGFP produziert (Abbildung 28). Mit diesen Kriterien wurden sieben Blaulichtsysteme verifiziert, die eine 7- bis 116-fache Aktivierung unter Blaulichtexposition auswiesen (Abbildung 28 und Abbildung 53). Diese Flirt Systeme unterscheiden sich hauptsächlich durch die an dem CRY2 Photorezeptor rekombinierte prokaryotische DNA-Bindedomäne. Eine Ausnahme bildet das TarA Flirt System. Hier sind zwei TarA Flirt Systeme etabliert worden, die sich in der Bindestellenanzahl vor dem GAL1 *core* Promotor unterscheiden.



**Abbildung 53** Verifizierte Flirt Systeme im YPH500 Hefestamm.

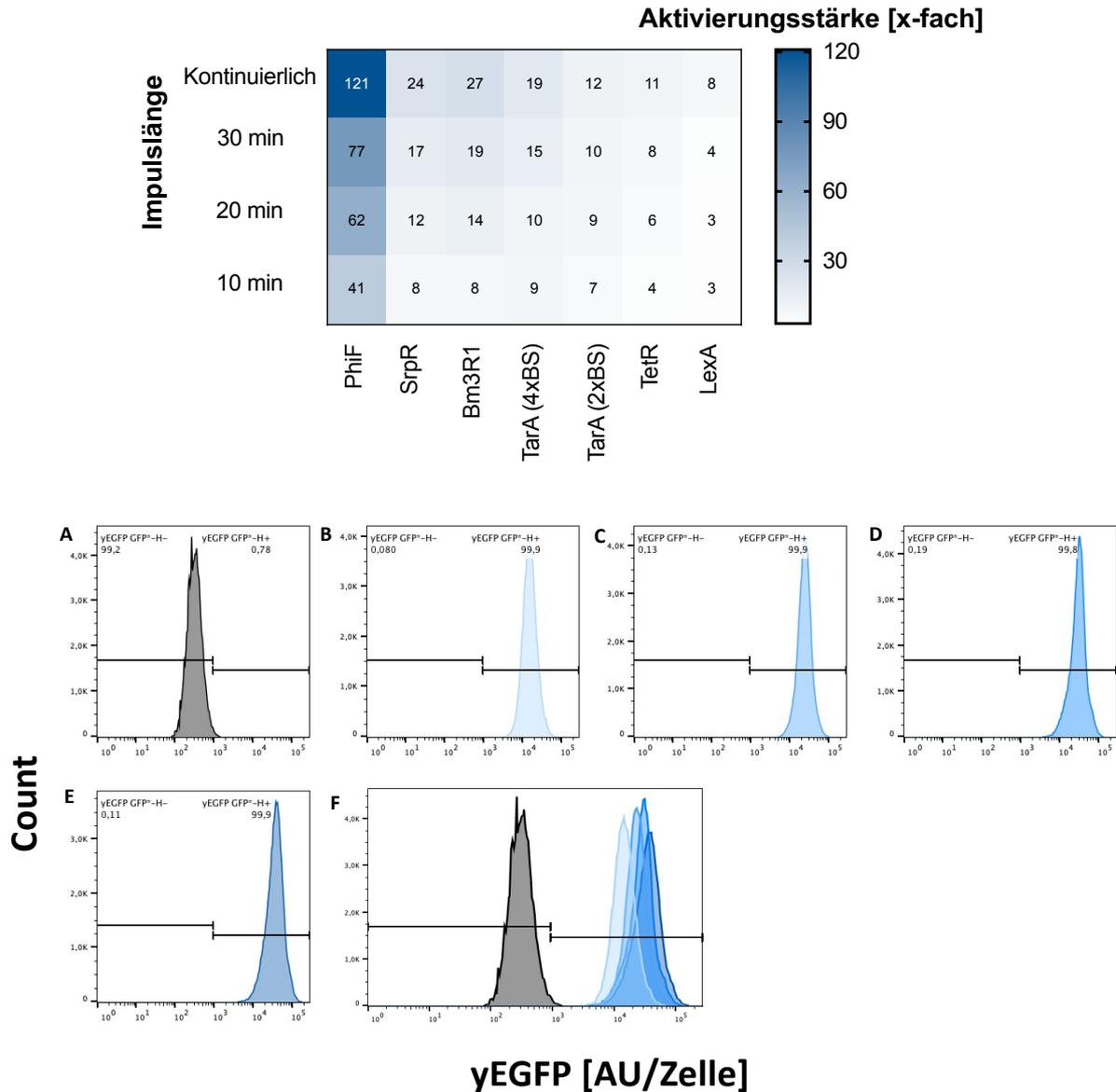
Gezeigt sind die durchflusszytometrischen statistisch ausgewerteten Ergebnisse der sieben etablierten Flirt Systeme im YPH500 Stamm und der Negativkontrolle YPH500 ohne jegliche Modifikationen (NK). Es wurde für 22 – 24 Stunden bei kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung oder im Dunklen im SD-Medium kultiviert. *Student t-Test* für ungepaarte Messungen, Dunkel gegen Blau. n = 36 für PhiF; n = 21 für LexA; n = 18 für NK; n = 15 für SrpR, TetR; n = 12 für Bm3R1; n = 9 für TarA 2xBS und TarA 4xBS.

Auffällig war, dass die Affinität zwischen der DNA-Bindedomäne und zugehörigen Bindestelle einen Einfluss auf die Reporterexpressionen hat. Beispielweise stieg die detektierte Reportersignalstärke, wenn die Bindestellenanzahl erhöht wurde (siehe TarA Flirt System 2x und 4x-fach Bindestelle in Abbildung 53). In der Arbeit von Rantasalo (2018) konnten ähnliche Ergebnisse bei konstitutiv aktiven synthetischen Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Außerdem hatte die Wahl der DNA-Bindedomäne in dieser Arbeit ebenfalls einen Einfluss auf die Reporterstärke, wenn unter gleichen Bedingungen kultiviert wurde. Je nachdem welche DNA-Bindedomänen an CRY2 fusioniert war, wurde der Reporter unterschiedlich stark exprimiert. Wissenschaftlich publizierte Arbeiten, die sich mit konstitutiv aktiven synthetischen Transkriptionsfaktoren befassen, bestätigen dieses (Naseri et al. 2017; Rantasalo et al. 2018). Interessant war zudem, dass der ENO1 *core* Promotor mit den jeweiligen Bindestellen eine hohe basale Transkriptionsaktivität aufwies (Abbildung 21). Zwar konnte durch den Einbau des Abstandshalter die basale Transkription auf das Niveau der Negativkontrolle gedrückt werden, jedoch stieg die basale Transkription, nach dem Einbau der Expressionskassette, erneut auf das 16- bis 50-fache (Abbildung 26). Blaulichtbestrahlung aktivierte diese Flirt Systeme zusätzlich um das 10- bis 17-fache (Abbildung 26). Dieses war hier zwar nicht wünschenswert gewesen, jedoch kann dieser Zustand mit einem synthetischen Transkriptionsfaktor verglichen werden, der immer aktiv ist und zusätzlich bei Bedarf mit Blaulichtexposition stärker aktiviert werden kann.

## 4.2 Zeitpunktbasierte und Feinregulierung der Proteinexpression

Lichtbasierte Transkriptionsfaktoren bringen die Vorteile von schaltbaren Systemen. So ist die Möglichkeit des Ein- und Ausschaltens gegeben sowie eine temporale Belichtung und damit einhergehend eine Dosierung einfach zu realisieren. (Wang et al. 2012; Pathak et al. 2014; Taslimi et al. 2016; Figueroa et al. 2021). Doch damit die Feinregulierung eines Gens mit einem Lichtsystem bewerkstelligt werden kann, sind verschiedene Voraussetzungen zu beachten. So muss bekannt sein, wie oft das Gen in der Zelle vorhanden ist und dass die Weitergabe der Geninformation an die Tochterzelle gewährleistet ist. Bei einer plasmidbasierten Expression könnte es zu Schwankungen des Reporters führen, da nicht bekannt wäre, wie viele Reporter- oder Expressionsplasmide sich in einer Hefezelle befänden. Ein genomischer Einbau war hier die optimale Wahl, da die Geninformation nur einmal in der Zelle vorhanden war. Um nun die Feindosierung zu untersuchen, wurden Blaulichtimpulse verschiedener Länge eingesetzt (Kapitel 3.7). Es musste gewährleistet werden, dass der schaltbare Transkriptionsfaktor nach der Blaulichtbestrahlung im Dunkeln dissoziiert. Die Heterodimerisation von CRY2 und CIB1 ist empirisch untersucht und es konnte gezeigt werden, dass diese innerhalb von 20 s erfolgt und sich innerhalb von 12 min im Dunkeln dissoziieren (Kennedy et al. 2010). Die errechnete Halbwertszeit von dem hier eingesetzten Reporter yEGFP liegt bei über 20 Stunden in der Hefe (<https://web.expasy.org/>). Die lange Halbwertszeit konnte hier als Vorteil angesehen werden, da die Messung der yEGFP Signalstärke stets zum Schluss erfolgte, also nach 21 h Kultivierung erfolgte. Somit war die Wahrscheinlichkeit gering, dass das am Anfang gebildete yEGFP zum Ende hin ubiquitiniert und damit abgebaut wurde. Bei jedem dieser sieben etablierten Flirt Systemen (Abbildung 53) konnte gezeigt werden, dass mit einem längeren Blaulichtimpuls pro Stunde eine stufenweise Erhöhung des Signals verknüpft war. Damit einhergehend kann darauf zurückgeschlossen werden, dass die optogenetischen synthetischen Konstrukte in den Dunkelpausen, zwischen zwei Blaulichtimpulsen, genug Zeit hatten sich zu entkoppeln, sodass der Baustein CRY2 mit der DNA-Bindedomäne und CIB1 mit der Aktivierungsdomäne dissoziierten und die folglich die Genexpression von dem Reporter gestoppt wurde. Die minimale Dunkelphase zwischen den Blaulicht-Impulsen lag bei 30 min, die maximale bei 50 min und damit über der empirischen Dissoziationszeit von 12 min. Werden die Werte aus dem Impulskapitel (Kapitel 3.7.3 und 3.7.4) in eine *Heatmap* (Abbildung 54 oben) zusammengefasst, so wird die Dimension und Variabilität aller hier konstruierten Flirt Systeme deutlich.

## Diskussion



**Abbildung 54 Stabile Feinregulierung mit Hilfe von Blaulichtimpulsen.**

**Oben:** Gezeigt sind die Ergebnisse aus dem Impulskapitel (Kapitel 3.7) in Form einer *Heatmap*. Dabei wird auf der Abszisse dargestellt, ob kontinuierlich mit Blaulicht bestrahlt wurde oder ob es sich um einen Impuls definierter Länge handelt. Auf der Ordinate werden die verschiedenen Flirt Systeme aufgelistet. Die Messwerte werden in Form von Farbstärken ausgedrückt und sind errechnet aus den medianen Mittelwerten im Verhältnis zur jeweiligen Dunkelkontrolle. Die korrespondierenden Werte und Anzahl der Replikate sind in den Kapiteln 3.7.3 bis 3.7.4 zu finden. **Unten:** Gezeigt sind die lebend Einzelzellen im Histogramm aus der Versuchsreihe „Impulslänge“ für das Flirt System PhiF (Kapitel 3.7.3). Auf der Abszisse sind die gezählten Zellen (*Count*) dargestellt. Auf der Ordinate wird die detektierte yEGFP Signalstärke in der willkürlichen Einheit AU je Zelle angegeben. Histogramm (A) ist die Dunkelkontrolle aus der Versuchsreihe, (B) zeigt den 10 minütigen, (C) 20 minütigen und (D) 30 minütigen Impulslänge je Stunde über einer Kultivierungsdauer von 21 Stunden. (E) zeigt das Histogramm der Lichtkontrolle, die 21 Stunden kontinuierlich mit Blaulicht bestrahlt worden war. (F) zeigt alle Abbildungen nochmal graphisch zusammen.

Die Aktivierungsstärken waren in diesem Impulskapitel durch drei definierte Blaulichtimpulse pro Stunde erreicht worden. Überzeugend waren die Rohdaten der durchflusszytometrischen Messungen, da es im Histogramm nur eine Population gab (Abbildung 54 unten). Demzufolge

haben alle Hefezellen in etwa die jeweilige Menge produziert und nicht etwa einige Zellen gar nicht, dafür die andere überaus viel. Somit war die genomische Integration hier die richtige Wahl, da die Zellen sich ähnlich verhielten, weil dass die Gensequenz nur einmal im Genom vorhanden war. Um bei einem Flirt System noch mehr Variabilität zu erzeugen, sind auch potenziell andere Impulse realisierbar, beispielsweise alle zwei oder drei Stunden, sodass eine geringere Aktivierung bei Bedarf erzeugt werden könnte. Außerdem könnte bei Bedarf innerhalb des Versuches erst ab einem gewissen Zeitpunkt mit den Impulsen gestartet werden, anstelle von Beginn an. Hier wurde lediglich untersucht, ob eine Zeitpunkt-basierte Expression machbar ist, indem nach sechsstündiger Dunkelphase 18 h kontinuierlich mit Blaulicht bestrahlt wurde (Kapitel 3.7.1). Zwar betrug die gemessene yEGFP Signalstärke mit der sechsstündiger Dunkelphase gleich der wie bei 24-stündiger Blaulichtbestrahlung, dieses könnte darauf zurückgeführt werden, dass nach einer gewissen langen Bestrahlungszeit sich ein Plateau ergab, da die Halbwertszeit von yEGFP in diesem Fall zu lang gewesen ist.

### **4.3 Kein Einfluss von Blaulicht auf die Zellteilung**

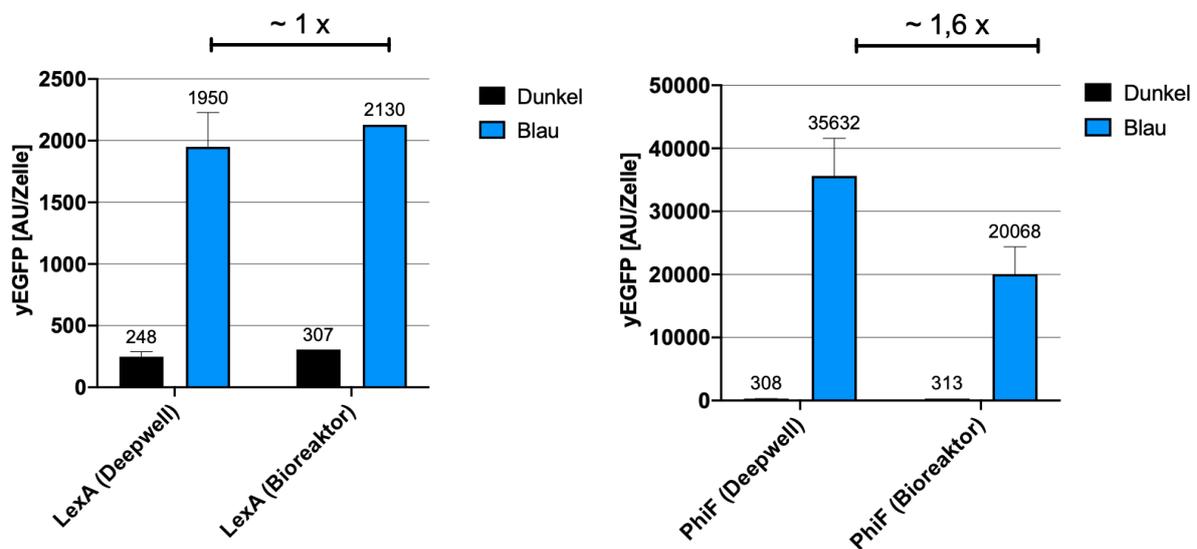
Die Hefe besitzt die Eigenschaft einer respiratorischen Oszillation, wenn ein Nährstoffmangel vorherrscht. Diese Eigenschaft beschreibt eine periodische Aufnahme von Sauerstoff in der Hefe, verbunden mit der Produktion von Metaboliten und Proteinen und der Zellteilung. Damit wird in der Hefe sichergestellt, dass unter Nährstoffmangel und unter oxidativen Stress die DNA-Replikation inhibiert wird und die reaktiven Sauerstoffspezies sich somit nicht mutagenetisch auf die Zellteilung auswirken (Chen et al. 2007; Robertson et al. 2013; Gottstein 2014; JS et al. 2020). Licht mit einer Intensität zwischen  $90 - 300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$  vermag die Oszillation negativ zu beeinflussen, sodass diese in kürzeren Abschnitten erfolgt, die Zelle „aus dem Takt kommt“ und die DNA-Replikationszyklus negativ beeinflusst wird (Robertson et al. 2013). Dabei ist diese Beeinflussung durch Rotlicht mit einer Lichtintensität von  $80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$  nicht signifikant, Blaulicht mit einer Lichtintensität von  $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$  und Grünlicht mit einer Lichtintensität von  $180 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$  hingegen schon (Robertson et al. 2013). Vor allem Cytochrome, Bestandteil der Zellatmung, sollen durch blaues Licht inhibiert werden (Epel and Butler 1969; Robertson et al. 2013; Gottstein 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendete Blaulichtintensität von  $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$  in dem Lichtschüttler in der Hefe keinen Stress in Form von Inhibition der Zellteilung oder Apoptose einlöst. Werden die Daten für die optische Dichte aus Abbildung 36 für die PhiF Reporter-kassette und für das PhiF Flirt System betrachtet, so konnten dort keine Unterschiede

hinsichtlich der Zellteilung bei einer Kultivierungsdauer von 73 h ausgemacht werden, gleich ob die Hefe im Dunkeln oder unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung kultiviert wurde. Etwas anderes konnte in der Po-Pro-1 Färbung festgestellt werden. Po-Pro1 ist ein Tot-Marker, der unter anderem auch für *S. cerevisiae* eingesetzt wird und durchflusszytometrisch detektiert werden kann (Kramer et al. 2016). Abbildung 37 zeigte, dass die errechnete Anzahl der toten Zellen der Dunkelkontrolle tendenziell höher lag als der unter kontinuierlicher Blaulichtbestrahlung-Bedingung. Beim PhiF Flirt System lag der prozentuale Wert der toten Zellen nach 73 h Kultivierung und unter Blaulichtbedingung sogar um die Hälfte niedriger als der der Dunkelkontrolle. In Abbildung 35, in dem das yEGFP Signal gezeigt wird, war hingegen zu erkennen, dass zum Schluss, nach 73 h Kultivierung, das detektierte yEGFP Signal um 2/3 gefallen ist. Hier wurde im Batch-Verfahren kultiviert, sodass angenommen werden kann, dass irgendwann ein Nährstoffmangel vorherrschte. Dieser war wahrscheinlich zwischen der Kultivierungsdauer von 50 h bis 73 h der Fall. Somit kann gesagt werden, dass die hier eingesetzte Blaulichtintensität, trotz kontinuierlicher Bestrahlung, keinen schädlichen Einfluss auf die Zellteilungsrate hatte.

#### 4.4 Industrielle Nutzung

Die Nutzung lichtbasierter Transkription-Systeme in Industrie-relevanten Hefestämmen ist immer noch sehr unterschätzt (Salinas et al. 2017; Figueroa et al. 2021). Diese Arbeit beschreibt und bestätigt das Potential des Flirt Systems. So konnte das Flirt System ohne weitere Veränderung in dem industriell genutzten CEN.PK Hefestamm etabliert und dessen Funktionalität bestätigt werden (Kapitel 3.8). Auch konnte das Industrie-relevante Protein VP1 mit dem Flirt System im *Deepwell*- (Kapitel 3.12 und 3.13.2) als auch im Bioreaktormaßstab (Kapitel 3.13.1) erfolgreich exprimiert werden, sodass weitere heterologe Proteine vorstellbar sind. Bei einer Hochskalierung von Kulturbedingungen gibt es maßstabsabhängige Faktoren zu beachten, die wiederum in biologische, chemische und physikalische Faktoren unterschieden werden. Beispiele sind die Mutationswahrscheinlichkeit und der Selektionsdruck (biologisch), Wasserqualität (chemisch), Scherkräfte, Belüftungsrate und Wärmeaustausch (physikalisch) (Chmiel 2011). Es muss angemerkt werden, dass es hier um einen *bench scale* handelte von 1,5 mL auf 1,5 L. Der *Bench scale* beläuft sich je nach Quelle auf ein Arbeitsvolumen von bis zu 10 L, der *Pilot scale* auf bis zu 100 L und der industrielle Maßstab beginnt ab 300 L (Chmiel 2011; Crater and Lievense 2018; Infors AG 2021a; Infors AG 2021b; Laval Lab 2021). In dieser Arbeit wurden die komplexen maßstabsabhängigen Faktoren nicht untersucht, weshalb hier weitere Forschungsarbeiten nötig sind. Nichtsdestotrotz konnten hier Anreize gesetzt werden,

da das Flirt System erfolgreich von 0,0015 L auf 1,5 L hoch skaliert werden konnte. Inwieweit komplexer eine Skalierung von 1,5 L auf 10 L und mehr oder inwieweit einfacher die Skalierung einer mit Licht-induzierten gegenüber einer mit Chemikalien-induzierte Expression wird, kann hier nicht gesagt werden. Inhomogenität in der Belüftung und des Sauerstoffgehalt treten mit einer Hochskalierung auf und müssten unter anderem beachtet werden (Chmiel 2011). So konnte in dieser Arbeit beispielsweise gezeigt werden, dass bei der Hochskalierung des LexA Flirt Systems die yEGFP Signalstärke fast 1:1, beim PhiF Flirt System aber 2:1 erfolgte, obwohl bei beiden Bioreaktor-Läufen unter gleichen Bedingungen kultiviert wurde (siehe Abbildung 55).



**Abbildung 55 Skalierbarkeit der Flirt Systeme.**

Gezeigt werden die zusammengefassten Ergebnisse: LexA und PhiF *Deepwell*-Werte aus Kapitel 3.4.1 und 3.4.4. LexA und PhiF (Zeitpunkt 24 h) Bioreaktor-Werte aus Kapitel 3.10.1. Zusätzliche PhiF Bioreaktor-Werte (Zeitpunkt 24 h) für Dunkel und Blau bei 23°C Kultivierung aus Kapitel 3.10.2.

Hier wurde mit einem Batch Verfahren gearbeitet, das heißt Medium wurde im Bioreaktor vorgelegt, innokuliert und so lange kultiviert bis der Prozess beendet wurde. Frisches Medium oder weitere Substanzen, bis auf pH-Korrekturmedien, Anti-Schaummittel und Luft wurden im Verlauf der Kultivierung nicht zugegeben. So wurde nur eine Charge pro Batch erzeugt und stellt somit ein diskontinuierliches Verfahren dar. Die Zellen durchlaufen dabei chronologisch die lag-, log-, stationäre, und Absterbephase. Dem gegenüber existieren semikontinuierliche, auch Fed-Batch genannt, und kontinuierliche Verfahren, das auch als Chemostat Kultivierung bezeichnet wird (Chandel et al. 2007; Chmiel 2011). Der Begriff Chemostat ist ein Kunstwort aus Chemikalien und pseudostationärer Zustand (Chmiel 2011). Das bedeutet, dass durch die Fluss- bzw. Verdünnungsrate des limitierenden Substrates (Chemikalie), beispielsweise einer Aminosäure oder Glukose, ein Zustand geschaffen wird, bei dem alle Konzentrationen gleich

bleiben, also pseudostationär, englisch *steady state* (Chmiel 2011). Fed-Batch Prozesse bieten gegenüber Batch-Verfahren die Möglichkeit, das Medium im Laufe der Fermentation zu verändern. So kann dieses erwünscht sein, wenn Startkonzentrationen von Chemikalien inhibierend oder sich toxisch auf die Zellen auswirken (Chmiel 2011). Zudem kann dem Glukose-Effekt entgegengewirkt werden, das heißt dass zu Beginn mit einer niedrigen Glukosekonzentration gestartet werden kann und diese die limitierende Substanz darstellt. So kann, im Vergleich zum Batch Prozess, mehr Biomasse oder primär das gewünschte Produkt produziert werden, in dem die Nebenproduktion der Zellfabrik unterdrückt wird (Chandel et al. 2007; Chmiel 2011). Der Fed-Batch hat sich aufgrund seiner Einfachheit und schnellen Implantation im Labor bei der Herstellung rekombinanter Proteine durchgesetzt (Chmiel 2011). In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen zwei Lichtsysteme zu kombinieren, das Flirt und Phi-LexA System. In einem Fed-Batch Verfahren ließe sich nicht nur das limitierende Substrat steuern, und damit die Bildung von Nebenprodukten minimiert werden (Chmiel 2011), es könnte mit Hilfe von Licht die heterologe Proteinexpression gezielt zum gewünschten Zeitpunkt ein- und ausschaltet bzw. dosiert werden. Erste erfolgreiche Ansätze mit Hilfe der Optogenetik konnten gute Ergebnisse zeigen. So konnte mit dem Blaulichtrezeptor EL222 in einem 0,5 L Bioreaktor im Fed-Batch Verfahren circa 8 g/L Isobutanol (knapp 54 mg/ (1 g Glukose) produziert werden (Zhao et al. 2018).

### 4.5 Lichtkombination

Der Gebrauch optogentischer-schaltbarer (englisch *optogenetic switch*) Transkriptionssysteme in Hefe gewinnt mehr an Bedeutung in den biotechnologischen Verfahren (Figueroa et al. 2021). Dennoch bewegt sich das Anwendungsspektrum begrenzt auf eine Wellenlänge, sodass Kombinationen in Hefe bisher nicht beschrieben wurden (Naseri and Koffas 2020). Bei der Verwendung von zwei Lichtsystemen ist zu beachten, dass diese nicht zeitgleich aktiviert werden. Beispielsweise regulieren Rotlichtphotorezeptoren auf UV- und Blaulicht (Losi and Gartner 2012). Dieses konnte hier umgangen werden, indem gleichzeitig mit Blau- und Dunkelrotlicht bestrahlt und die Blaulicht-Aktivierung dadurch inhibiert wurde (Abbildung 40). Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass das Flirt System weder durch Rot- noch Dunkelrotlicht aktiviert wurde (Abbildung 41). Zudem ist laut Literatur beim Rotlichtsystem eine exogene Zugabe vom dem Chromophor nötig (Losi and Gartner 2012; Fraikin et al. 2013; Pathak et al. 2013; Hochrein et al. 2017). Dennoch gibt es die Option, dass dieser Chromophor in der Hefe hergestellt werden kann (Hochrein et al. 2017). Zeitgleich zeigten einige Messungen, dass auch ohne Chromophor- Zugabe das Rotlicht-System mit Rot- oder Blaulicht

(Abbildung 40) aktiviert und dass mit Dunkelrot (bzw. gleichzeitiger Bestrahlung mit Dunkelrot- und Blaulicht) deaktiviert werden kann. Die Rotlichtaktivierung im PCB-freien Medium war zwar halb so stark als die im PCB-zugesetzten Medium, dennoch fast 20-fach im Vergleich zur Dunkelkontrolle. Eine andere Publikation bestätigt die Aktivierung der Rotlichtrezeptoren in der Hefe ohne PCB-Zugabe und vermutet, dass die Hefe einen, noch nicht entdeckten, Chromophor synthetisiert, der die Konformationsänderung beim Rotlichtrezeptor auslöst (Sorokina et al. 2009). Schlussendlich konnte die PCB-unabhängige-Aktivierung des Rotlichtsystem hier bestätigt werden und das in mehreren Messungen (siehe Anhang 6.2). Diese Möglichkeit erlaubt gänzlich ohne Chemikalien bzw. Chromophor-Zugabe auszukommen und nur mit Licht zu induzieren.

Entscheidend war hier die parallele Nutzung zweier unterschiedlicher Lichtsysteme in der Hefe. In dieser Arbeit konnten zwei optogenetische Lichtsysteme erfolgreich kombiniert und deren Einsatz nicht nur im kleinen, sondern auch im Bioreaktor-Maßstab bestätigt werden. Es konnten zwei Proteine unabhängig voneinander in einer Mischkultur lichtinduziert und nachgewiesen werden (Kapitel 3.13). Zu beachten ist, dass das Rotlichtsystem im Gegensatz zum Flirt System stark und lange durch das Tageslicht aktiviert wurde (Abbildung 49 und Abbildung 51). Hier sollte entweder Dunkelrotlicht für die Deaktivierung erfolgen oder unter Grünlicht gearbeitet werden (Hochrein et al. 2017). Gedimmtes Licht mit einer Lichtintensität von  $5,5 \mu\text{W}$  ( $13 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 * \text{s})$ ) aktiviert die Dimerisation von CRY2 und CIB1 nicht (Kennedy et al. 2010). Hier war das Flirt System im Vergleich zum Rotlichtsystem unempfindlicher. Rotlicht penetriert zudem die Zelle stärker als Blaulicht (Banerjee and Mitra 2020). Wichtig erscheint auch der Faktor, dass hier die Nutzung beider Systeme in zwei unterschiedlichen Hefezellen in Form einer Mischkultur stattfand. Wissenschaftliche Arbeiten bestätigen einen *cross-talk* zwischen dem Blaulichtphotorezeptor CRY1 und dem Rotlichtrezeptor PhyB in Hefezellen. CRY1 und PhyB scheinen zu dimerisieren, aber nur wenn beide in der inaktiven Form sind, also im Dunkeln bzw. wenn mit Dunkelrotlicht bestrahlt wird und nur unter Zugabe von PCB. Sobald einer der beiden Photorezeptoren durch Rot- bzw. Blaulicht (auch bei abwechselnde Bestrahlung mit Blau- und Dunkelrotlicht) aktiviert wird oder wenn kein PCB-Zugabe erfolgt, dissoziieren beide (Hughes et al. 2012b). Es scheint die PHR Region von CRY1 für die Dimerisierung verantwortlich zu sein (Hughes et al. 2012b). Da CRY1 und CRY2 eine etwa 50% homologe Aminosäuresequenz aufweisen (Lin et al. 1998), wäre eine Interaktion zwischen den inaktiven Formen von CRY2 und PhyB nicht auszuschließen. Aufgrund dessen sollte beim Nutzen beider Systeme in einer Zelle darauf geachtet werden, ob dieser *cross-talk* die basale Transkription der heterologen Proteine beeinflusst. Wichtig wäre bei gleichzeitiger

Nutzung beider Photorezeptoren als optogenetische synthetische Transkriptionsfaktoren, dass beide Photorezeptoren entweder an eine Aktivierungsdomäne oder, wie hier, an die DNA-Bindedomäne fusioniert sind. Damit könnte ausgeschlossen werden, dass diese durch Kreuz-Dimerisierung im Dunkeln einen funktionsfähigen dimerisierten Transkriptionsfaktor bilden.

### 4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ziele der synthetischen Biologie sind neue und verbesserte Systeme zu konstruieren als auch zu charakterisieren, sodass die Ingenieurbiologie zuverlässig, sicher und planbar gestaltet werden kann (Zhao 2013). In dieser Arbeit wurde ein flexibles Blaulichtsystem mit dem Akronym Flirt etabliert, charakterisiert und verifiziert. Das Flirt System wurde mit Hilfe eines einfachen Vektorsystems, ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit etabliert, zielgerichtet in das Genom der Zellfabrik Hefe integriert. Das Flirt System hat eine validiert niedrige basale Transkription im inaktiven Zustand. Die Aktivierung wird durch Blaulichtbestrahlung ermöglicht. Mit Hilfe von verschiedenen definierten Blaulichtimpulsen kann eine planbare und stufenweise Dosierung des Zielproteins in der Zellfabrik ermöglicht werden. Die sechs unterschiedlichen prokaryotischen DNA-Bindedomänen und zwei verwendeten Aktivierungsdomänen zeigten zudem weitere Variation in der Gestaltung der Transkriptionsstärke. Eine zuverlässige Übertragung des Flirt Systems in einen Industrie-relevanten Hefestamm, die Hochskalierung von 0,0015 L auf 1,5 L Bioreaktor-Maßstab, die Expression des VP1 Proteins und die Kombination mit einem Rotlichtsystem (ebenfalls im Bioreaktor-Maßstab), zeigen wie dynamisch und zugleich robust das „Flexible Blaulicht induzierte Transkription“ System ist.

Wichtig ist es, das Flirt System im nächsten Schritt in einem Fed-Batch Verfahren zu verifizieren, beide Lichtsysteme genomisch in eine Hefezelle zu integrieren und die Expression von weiteren heterologen Proteinen zu testen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Ahmad M, Cashmore AR. 1993. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**: 162-166.
- Allen BL, Taatjes DJ. 2015. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 155-166.
- Andres J, Blomeier T, Zurbriggen MD. 2019. Synthetic Switches and Regulatory Circuits in Plants. *Plant Physiol* **179**: 862-884.
- Ansorge W. 1985. Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *J Biochem Biophys Methods* **11**: 13-20.
- Bafunno V, Giancaspero TA, Brizio C, Bufano D, Passarella S, Boles E, Barile M. 2004. Riboflavin uptake and FAD synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: involvement of the Flx1p carrier in FAD export. *J Biol Chem* **279**: 95-102.
- Baghban R, Farajnia S, Rajabibazl M, Ghasemi Y, Mafi A, Hoseinpoor R, Rahbarnia L, Aria M. 2019. Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Mol Biotechnol* **61**: 365-384.
- Banerjee S, Mitra D. 2020. Structural Basis of Design and Engineering for Advanced Plant Optogenetics. *Trends Plant Sci* **25**: 35-65.
- Beyer HM, Gonschorek P, Samodelov SL, Meier M, Weber W, Zurbriggen MD. 2015. AQUA Cloning: A Versatile and Simple Enzyme-Free Cloning Approach. *PLoS One* **10**: e0137652.
- Boija A, Klein IA, Sabari BR, Dall'Agnese A, Coffey EL, Zamudio AV, Li CH, Shrinivas K, Manteiga JC, Hannett NM et al. 2018. Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell* **175**: 1842-1855 e1816.
- Braguy J, Zurbriggen MD. 2016. Synthetic strategies for plant signalling studies: molecular toolbox and orthogonal platforms. *Plant J* **87**: 118-138.
- Brent R, Ptashne M. 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**: 729-736.
- Butala M, Zgur-Bertok D, Busby SJ. 2009. The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol Life Sci* **66**: 82-93.
- Byrne JH, Heidelberger R, Waxham MN. 2014. *From Molecules to Networks*. Elsevier.
- Cameron DE, Bashor CJ, Collins JJ. 2014. A brief history of synthetic biology. *Nat Rev Microbiol* **12**: 381-390.
- Cardoso VM, Campani G, Santos MP, Silva GG, Pires MC, Goncalves VM, de CGR, Sargo CR, Horta ACL, Zangirolami TC. 2020. Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: Production of a soluble recombinant protein using *Escherichia coli* BL21(DE3). *Biotechnol Rep (Amst)* **26**: e00441.
- Carlberg C, Molnar F. 2020. *Mechanisms of Gene Regulation: How Science Works*. Springer, Cham, Switzerland.
- Chandel AK, ES C, Rudravaram R, Narasu LM, Rao VL, Ravindra P. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnol Mol Biol Rev* **2**.

- Chen T, Dent SY. 2014. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet* **15**: 93-106.
- Chen Z, Odstreil EA, Tu BP, McKnight SL. 2007. Restriction of DNA replication to the reductive phase of the metabolic cycle protects genome integrity. *Science* **316**: 1916-1919.
- Chmiel H. 2011. *Bioprozesstechnik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Choi ES, Sohn JH, Rhee SK. 1994. Optimization of the expression system using galactose-inducible promoter for the production of anticoagulant hirudin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**: 587-594.
- Conrad KS, Manahan CC, Crane BR. 2014. Photochemistry of flavoprotein light sensors. *Nat Chem Biol* **10**: 801-809.
- Cormack BP, Bertram G, Egerton M, Gow NAR, Falkow S, Brown AJP. 1997. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)* **143 ( Pt 2)**: 303-311.
- Crater JS, Lievens JC. 2018. Scale-up of industrial microbial processes. *FEMS Microbiol Lett* **365**.
- de Mena L, Rizk P, Rincon-Limas DE. 2018. Bringing Light to Transcription: The Optogenetics Repertoire. *Front Genet* **9**: 518.
- Epel B, Butler WL. 1969. Cytochrome a3: destruction by light. *Science* **166**: 621-622.
- Ferrer-Miralles N, Domingo-Espin J, Corchero JL, Vazquez E, Villaverde A. 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact* **8**: 17.
- Figueroa D, Rojas V, Romero A, Larrondo LF, Salinas F. 2021. The rise and shine of yeast optogenetics. *Yeast* **38**: 131-146.
- Fraikin GY, Strakhovskaya MG, Rubin AB. 2013. Biological photoreceptors of light-dependent regulatory processes. *Biochemistry (Mosc)* **78**: 1238-1253.
- Gietz RD, Schiestl RH. 2007a. Frozen competent yeast cells that can be transformed with high efficiency using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* **2**: 1-4.
- . 2007b. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* **2**: 31-34.
- Goett-Zink L, Toschke AL, Petersen J, Mittag M, Kottke T. 2021. C-Terminal Extension of a Plant Cryptochrome Dissociates from the beta-Sheet of the Flavin-Binding Domain. *J Phys Chem Lett* **12**: 5558-5563.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M et al. 1996. Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-547.
- Gottstein W. 2014. Metabolische Oszillationen in Hefe. in *Biophysik*. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Grunwald A, Heil R, Coenen C. 2016. *Synthetic Biology*. Springer VS.
- Gunduz Ergun B, Huccetogullari D, Ozturk S, Celik E, Calik P. 2019. Established and Upcoming Yeast Expression Systems. *Methods Mol Biol* **1923**: 1-74.
- Guo H, Yang H, Mockler TC, Lin C. 1998. Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science* **279**: 1360-1363.

- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-4130.
- Hittinger CT. 2013. Saccharomyces diversity and evolution: a budding model genus. *Trends Genet* **29**: 309-317.
- Hochrein L, Machens F, Messerschmidt K, Mueller-Roeber B. 2017. PhiReX: a programmable and red light-regulated protein expression switch for yeast. *Nucleic Acids Res* **45**: 9193-9205.
- Hoffman PD, Batschauer A, Hays JB. 1996. PHH1, a novel gene from Arabidopsis thaliana that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol Gen Genet* **253**: 259-265.
- Huang M, Bao J, Nielsen J. 2014. Biopharmaceutical protein production by Saccharomyces cerevisiae: current state and future prospects. *Pharm Bioprocess* **2**.
- Hughes RM, Bolger S, Tapadia H, Tucker CL. 2012a. Light-mediated control of DNA transcription in yeast. *Methods* **58**: 385-391.
- Hughes RM, Vrana JD, Song J, Tucker CL. 2012b. Light-dependent, dark-promoted interaction between Arabidopsis cryptochrome 1 and phytochrome B proteins. *J Biol Chem* **287**: 22165-22172.
- Ikushima S, Boeke JD. 2017. New Orthogonal Transcriptional Switches Derived from Tet Repressor Homologues for Saccharomyces cerevisiae Regulated by 2,4-Diacetylphloroglucinol and Other Ligands. *ACS Synth Biol* **6**: 497-506.
- Immeln D, Schlesinger R, Heberle J, Kottke T. 2007. Blue light induces radical formation and autophosphorylation in the light-sensitive domain of Chlamydomonas cryptochrome. *J Biol Chem* **282**: 21720-21728.
- Infors AG. 2021a. High-end bioreactor for microbial applications. Aufgerufen am 26.11.2021, Onilne: <https://www.infors-ht.com/en/bioreaktor-mikroorganismen/>.
- . 2021b. Pilot bioreactor for sophisticated bioprocesses. Aufgerufen am 26.11.2021, Onilne: <https://www.infors-ht.com/en/bioreactors/pilot-bioreactors/techfors/>.
- JS ON, Hoyle NP, Robertson JB, Edgar RS, Beale AD, Peak-Chew SY, Day J, Costa ASH, Frezza C, Causton HC. 2020. Eukaryotic cell biology is temporally coordinated to support the energetic demands of protein homeostasis. *Nat Commun* **11**: 4706.
- Kavscek M, Strazar M, Curk T, Natter K, Petrovic U. 2015. Yeast as a cell factory: current state and perspectives. *Microb Cell Fact* **14**: 94.
- Kawano F, Suzuki H, Furuya A, Sato M. 2015. Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. *Nat Commun* **6**.
- Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA, Schwartz JW, Ehlers MD, Tucker CL. 2010. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat Methods* **7**: 973-U948.
- Kim HJ, Kim HJ. 2017. Yeast as an expression system for producing virus-like particles: what factors do we need to consider? *Lett Appl Microbiol* **64**: 111-123.
- Kim ST, Li YF, Sancar A. 1992. The third chromophore of DNA photolyase: Trp-277 of Escherichia coli DNA photolyase repairs thymine dimers by direct electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 900-904.

- Kramer CE, Wiechert W, Kohlheyer D. 2016. Time-resolved, single-cell analysis of induced and programmed cell death via non-invasive propidium iodide and counterstain perfusion. *Sci Rep* **6**: 32104.
- Kroemer T. 2021. How Does IPTG Induction Work? Goldbio.com, Aufgerufen am 29.07.2021, Onilne: [https://www.goldbio.com/articles/article/how-does-iptg-induction-work#\\_Toc56514558](https://www.goldbio.com/articles/article/how-does-iptg-induction-work#_Toc56514558).
- Laval Lab. 2021. See our selection of Fermentors and Bioreactors. Aufgerufen am 26.11.2021, Onilne: <https://lavallab.com/all-products/fermentor-bioreactor/>.
- Lee SK, Chou HH, Pflieger BF, Newman JD, Yoshikuni Y, Keasling JD. 2007. Directed evolution of AraC for improved compatibility of arabinose- and lactose-inducible promoters. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5711-5715.
- Li L, Liu X, Wei K, Lu Y, Jiang W. 2019. Synthetic biology approaches for chromosomal integration of genes and pathways in industrial microbial systems. *Biotechnol Adv* **37**: 730-745.
- Lin C, Yang H, Guo H, Mockler T, Chen J, Cashmore AR. 1998. Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2686-2690.
- Liu HT, Yu XH, Li KW, Klejnot J, Yang HY, Lisiero D, Lin CT. 2008. Photoexcited CRY2 Interacts with CIB1 to Regulate Transcription and Floral Initiation in Arabidopsis. *Science* **322**: 1535-1539.
- Liu Y, Li X, Ma D, Chen Z, Wang JW, Liu H. 2018. CIB1 and CO interact to mediate CRY2-dependent regulation of flowering. *EMBO Rep* **19**.
- Losi A, Gartner W. 2012. The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 49-72.
- Louis EJ. 2016. Historical Evolution of Laboratory Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Protoc* **2016**.
- Lu TK, Khalil AS, Collins JJ. 2009. Next-generation synthetic gene networks. *Nat Biotechnol* **27**: 1139-1150.
- Machens F, Balazadeh S, Mueller-Roeber B, Messerschmidt K. 2017. Synthetic Promoters and Transcription Factors for Heterologous Protein Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Bioeng Biotechnol* **5**: 63.
- Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D. 2012. Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol* **824**: 329-358.
- Mattanovich D, Sauer M, Gasser B. 2014. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. *Microb Cell Fact* **13**: 34.
- McIsaac RS, Oakes BL, Wang X, Dummit KA, Botstein D, Noyes MB. 2013. Synthetic gene expression perturbation systems with rapid, tunable, single-gene specificity in yeast. *Nucleic Acids Res* **41**: e57.
- Messerschmidt K, Hempel S, Holzlohner P, Ulrich RG, Wagner D, Heilmann K. 2012. IgA antibody production by intrarectal immunization of mice using recombinant major capsid protein of hamster polyomavirus. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* **2**: 231-238.
- Messerschmidt K, Hochrein L, Dehm D, Schulz K, Mueller-Roeber B. 2016. Characterizing seamless ligation cloning extract for synthetic biological applications. *Anal Biochem* **509**: 24-32.

- Nasari G, Balazadeh S, Machens F, Kamranfar I, Messerschmidt K, Mueller-Roeber B. 2017. Plant-Derived Transcription Factors for Orthologous Regulation of Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*.
- Nasari G, Koffas MAG. 2020. Application of combinatorial optimization strategies in synthetic biology. *Nat Commun* **11**: 2446.
- Nielsen J. 2015. BIOENGINEERING. Yeast cell factories on the horizon. *Science* **349**: 1050-1051.
- Norkiene M, Stonyte J, Ziogiene D, Mazeike E, Sasnauskas K, Gedvilaite A. 2015. Production of recombinant VP1-derived virus-like particles from novel human polyomaviruses in yeast. *BMC Biotechnol* **15**: 68.
- Pathak GP, Strickland D, Vrana JD, Tucker CL. 2014. Benchmarking of optical dimerizer systems. *ACS Synth Biol* **3**: 832-838.
- Pathak GP, Vrana JD, Tucker CL. 2013. Optogenetic control of cell function using engineered photoreceptors. *Biol Cell* **105**: 59-72.
- Payen C, Thompson D. 2019. The renaissance of yeasts as microbial factories in the modern age of biomanufacturing. *Yeast*.
- Perli T, Wronska AK, Ortiz-Merino RA, Pronk JT, Daran JM. 2020. Vitamin requirements and biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **37**: 283-304.
- Pühler A, Müller-Röber B, Weitze MD. 2011. *Synthetische Biologie - Die Geburt einer neuen Technikwissenschaft*. Springer.
- Ramos JL, Martinez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Teran W, Watanabe K, Zhang X, Gallegos MT, Brennan R, Tobes R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 326-356.
- Rantasalo A, Kuivanen J, Penttila M, Jantti J, Mojzita D. 2018. Synthetic Toolkit for Complex Genetic Circuit Engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol* **7**: 1573-1587.
- Robertson JB, Davis CR, Johnson CH. 2013. Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 21130-21135.
- Salinas F, Rojas V, Delgado V, Agosin E, Larrondo LF. 2017. Optogenetic switches for light-controlled gene expression in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 2629-2640.
- Sang Y, Li QH, Rubio V, Zhang YC, Mao J, Deng XW, Yang HQ. 2005. N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1. *Plant Cell* **17**: 1569-1584.
- Schmidt M. 2012. *Synthetic Biology, Industrial and Environment Applications*. Wiley-Blackwell, Weinheim, Deutschland.
- Schroeder L, Oldemeyer S, Kottke T. 2018. Time-Resolved Infrared Spectroscopy on Plant Cryptochrome-Relevance of Proton Transfer and ATP Binding for Signaling. *J Phys Chem A* **122**: 140-147.
- Sikorski RS, Hieter P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27.
- Sorokina O, Kapus A, Terecskei K, Dixon LE, Kozma-Bognar L, Nagy F, Millar AJ. 2009. A switchable light-input, light-output system modelled and constructed in yeast. *J Biol Eng* **3**: 15.

- Taslimi A, Zoltowski B, Miranda JG, Pathak GP, Hughes RM, Tucker CL. 2016. Optimized second-generation CRY2-CIB dimerizers and photoactivatable Cre recombinase. *Nat Chem Biol* **12**: 425-430.
- Thak EJ, Yoo SJ, Moon HY, Kang HA. 2020. Yeast synthetic biology for designed cell factories producing secretory recombinant proteins. *FEMS Yeast Res* **20**.
- Thompson CL, Sancar A. 2002. Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene* **21**: 9043-9056.
- Tramper J, Zhu Y. 2011. Modern biotechnology.
- Tyo KE, Ajikumar PK, Stephanopoulos G. 2009. Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. *Nat Biotechnol* **27**: 760-765.
- van Dijken JP, Bauer J, Brambilla L, Duboc P, Francois JM, Gancedo C, Giuseppin ML, Heijnen JJ, Hoare M, Lange HC et al. 2000. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme Microb Technol* **26**: 706-714.
- Vieira Gomes AM, Souza Carmo T, Silva Carvalho L, Mendonca Bahia F, Parachin NS. 2018. Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms* **6**.
- Wang G, Huang M, Nielsen J. 2017. Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. *Curr Opin Biotechnol* **48**: 77-84.
- Wang X, Chen XJ, Yang Y. 2012. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat Methods* **9**: 266-U264.
- Yamada M, Nagasaki SC, Ozawa T, Imayoshi I. 2020. Light-mediated control of Gene expression in mammalian cells. *Neurosci Res*.
- Yang HQ, Wu YJ, Tang RH, Liu D, Liu Y, Cashmore AR. 2000. The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* **103**: 815-827.
- Zhao EM, Zhang Y, Mehl J, Park H, Lalwani MA, Toettcher JE, Avalos JL. 2018. Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production. *Nature* **555**: 683-687.
- Zhao H. 2013. *Synthetic Biology - Tools and Applications*. Elsevier.
- Zhao HL, Zeng A. 2018. *Synthetic Biology – Metabolic Engineering*. Springer, Cham, Switzerland.

## 5.1 Danksagung

Mein aller größter Dank gebührt meiner Doktormutter **Katrin Messerschmidt**, die immer an mich geglaubt hat. Mich mit neuen Ideen inspiriert und meine selbstständige Arbeit im Labor bestärkt hat. Du bist immer da gewesen, auch wenn du nicht immer vor Ort sein konntest. Ich bin so stolz dich als Chefin gehabt zu haben!

**Katja Arndt**, deren Tür immer offenstand, wenn ich etwas vorzutragen hatte. Mir immer gutes Feedback gegeben hat und mich positiv bestärkt hat.

**Anja Schlör**, die mir molekularbiologisch, besonders auch mit Antikörperfärbung zu Hilfe stand und sonst auch immer ein offenes Ohr und Motivationspaket gewesen ist. Eine Freundin mehr in meinem engen Kreis.

**Ulrike Weicht**, bekannt als Uli, die mir das Western Blot 1x1 wieder eingebrant hat und mit mir zusammen gelitten, aber auch viel gelacht hat. Ohne dich wäre meine Welt nicht so schön Blau.

**Steven Sievers**, ein kluger Mann, der mir zur Hilfe stand bei der Silberfärbung. Auch sonst sträng, auf seine Art witzig und mich immer wieder vorangetrieben hat.

**Katja Hanack**, die mir die Erlaubnis gegeben hat, das VP1 zu testen, als auch die Möglichkeit ihre Geräte mitzubেনutzen.

**Markus Göthel**, war immer in schweren aber auch in guten Zeiten da gewesen ist. Wir haben uns beide immer vorangetrieben.

**Martin Listek**, zu dem ich auch immer gehen konnte, wenn ich Hilfe gebraucht habe.

**Anja Hönow**, die immer da war, wenn das Melody nicht mehr singen wollte.

**Goshi**, die mich ebenfalls motiviert hat und mit aufgebaut.

Matze, der sauer sein kann aber es nie bei mir gewesen ist.

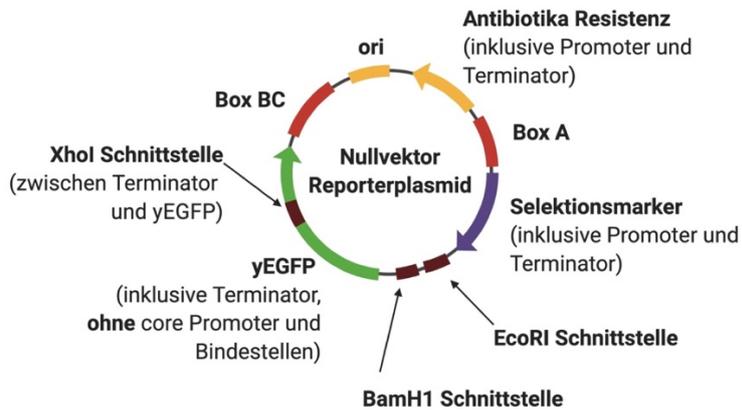
**Lisa Gottsche**, unsere TA, zu früh unsere Gruppe verlassen, aber du hast mich gut unterstützt, wie die schweren Bioreaktor aus den Autoklaven zu holen. Seitdem du nicht mehr da warst, habe ich echt gemerkt, wie krass viel Unterstützung du im Labor geleiste hast, Abwasch, Trockung, Pipetten stecken, autoklavieren und und und. Und wir haben viel gelacht.

Es ist unglaublich, wie kurz die Zeit gewesen ist und wie viele tolle Menschen ich in der Zeit getroffen habe! Ich danke euch allen vom Herzen. Auch meiner **Mutter**, meinem **Vater** und meiner **Schwester** sowie meinen **Freunden**, unter anderem **Qais**! So hart ich manchmal gestolpert bin, so weich bin ich gelandet, dank euch allen!

## 6 Anhang

### 6.1 Sequenzen

#### 6.1.1 Nullvektoren Reporterplasmid



Die Sequenzen für das Nullvektor Reporterplasmid (pPD079) sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

ori (pBR322) (3'-5', gelb): 656 – 39

CanR (3'-5', gelb):

- Promotor: 1801 – 1672
- Gen: 1671 – 811
- Terminator: 810 – 665

Box A (rot): 1840 – 2100

HIS3 (5'-3', lila):

- Promotor: 2131 – 2447
- Gen: 2448 – 3110
- Terminator: 3111- 3311

yEGFP (5'-3', grün):

- Gen: 3361 – 4077
- CYC1 Terminator: 4110 – 4301

Box BC (rot): 4332 - 4874

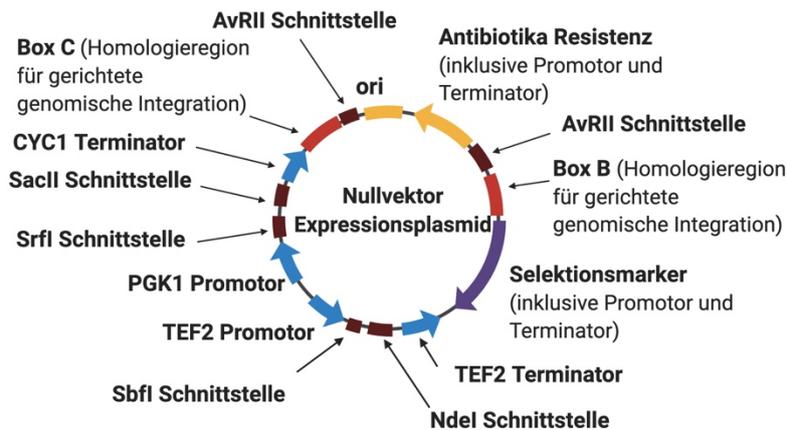
# Anhang

1	GTTTAAACAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGT	50
51	TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCA	100
101	AGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCC	150
151	CCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCG	200
201	GATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGC	250
251	TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGG	300
301	CTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTA	350
351	ACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA	400
401	GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTAC	450
451	AGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT	500
501	TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGT	550
551	AGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGT	600
601	TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTT	650
651	TGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAA	700
701	GGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTT	750
751	AAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTT	800
801	GGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATC	850
851	TGTCTATTTCTGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAAC	900
901	TACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGC	950
951	GAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCC	1000
1001	GGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCA	1050
1051	GTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATA	1100
1101	GTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCG	1150
1151	TCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGT	1200
1201	TACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTC	1250
1251	CGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTATG	1300
1301	GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC	1350
1351	TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGC	1400
1401	GACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACAT	1450
1451	AGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAA	1500
1501	ACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTC	1550
1551	GTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGG	1600
1601	TGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGAC	1650
1651	ACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCA	1700
1701	TTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAG	1750
1751	AAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACC	1800
1801	TGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACAGTTTAAACATGTCGAAAGC	1850
1851	TACATATAAGGAACGTGCTGCTACTCATCCTAGTCTGTTGCTGCCAAGC	1900
1901	TATTTAATATCATGCACGAAAAGCAAACTTGTGTGCTTCATTTGGAT	1950
1951	GTTTCGTACCACCAAGGAATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTCCCAA	2000
2001	AATTTGTTTACTAAAAACACATGTGGATATCTTGACTGATTTTTCCATGG	2050
2051	AGGGCACAGTTAAGCCGCTAAAGGCATTATCCGCCAAGTACAATTTTTTA	2100
2101	CAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATAAATTCCTGTTTTAAGAGCTT	2150
2151	GGTGAGCGCTAGGAGTCACTGCCAGGTATCGTTTTGAACACGGCATTAGTC	2200
2201	AGGGAAGTCATAACACAGTCCTTTCCCGCAATTTTCTTTTTCTATTACTC	2250
2251	TTGGCCTCCTCTAGTACACTCTATATTTTTTTATGCCTCGGTAATGATTT	2300
2301	TCATTTTTTTTTTTTCCCTAGCGGATGACTCTTTTTTTTTCTTAGCGATT	2350
2351	GGCATTATCACATAATGAATTATACATTATATAAAGTAATGTGATTTCTT	2400
2401	CGAAGAATATACTAAAAAATGAGCAGGCAAGATAAACGAAGGCAAAGATG	2450
2451	ACAGAGCAGAAAGCCCTAGTAAAGCGTATTACAAATGAAACCAAGATTCA	2500
2501	GATTGCGATCTCTTTAAAGGGTGGTCCCCTAGCGATAGAGCACTCGATCT	2550
2551	TCCCAGAAAAAGAGGCAGAAGCAGTAGCAGAACAGGCCACACAATCGCAA	2600
2601	GTGATTAACGTCCACACAGGTATAGGGTTTCTGGACCATATGATACATGC	2650
2651	TCTGGCCAAGCATTCCGGCTGGTCGCTAATCGTTGAGTGCATTGGTGACT	2700
2701	TACACATAGACGACCATCACACCACTGAAGACTGCGGGATTGCTCTCGGT	2750
2751	CAAGCTTTTTAAGAGGGCCCTAGGGGCGGTGCGTGAGTAAAAAGGTTTGG	2800

# Anhang

2801	ATCAGGATTTGCGCCTTTGGATGAGGCACTTTCCAGAGCGGTGGTAGATC	2850
2851	TTTCGAACAGGCCGTACGCAGTTGTGCAACTTGGTTGCAAAGGGAGAAA	2900
2901	GTAGGAGATCTCTCTTGCGAGATGATCCCGCATTTTCTTGAAAGCTTTGC	2950
2951	AGAGGCTAGCAGAATTACCCTCCACGTTGATTGTCTGCGAGGCAAGAATG	3000
3001	ATCATCACCGTAGTGAGAGTGC GTTCAAGGCTCTTGCGGTTGCCATAAGA	3050
3051	GAAGCCACCTCGCCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAAAGGTGT	3100
3101	TCTTATGTAGTGACACCGATTATTTAAAGCTGCAGCATAACGATATATATA	3150
3151	CATGTGTATATATGTATACCTATGAATGTCAGTAAGTATGTATACGAACA	3200
3201	GTATGATACTGAAGATGACAAGGTAATGCATCATTCTATACGTGTCATTC	3250
3251	TGAACGAGGCGCGCTTTCCTTTTTTCTTTTTTGCTTTTTTCTTTTTTTTTCT	3300
3301	CTTGAACTCGACGGATCTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGGAATTCGGA	3350
3351	TCCTATTAAAATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCACTGGTGTGTGCCAA	3400
3401	TTTTGGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGTCACAAATTTTCTGTCTCC	3450
3451	GGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACTTACGGTAAATTGACCTTAAATTTAT	3500
3501	TTGTACTACTGGTAAATTGCCAGTTCATGGCCAACCTTAGTCACTACTT	3550
3551	TCGTTATGGTGTTC AATGTTTTGCTAGATACCCAGATCATATGAAACAA	3600
3601	CATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAAC	3650
3651	TATTTTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGT	3700
3701	TTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTA AAAGGTATTGATTTT	3750
3751	AAAGAAGATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGAATACA ACTATAACTC	3800
3801	TCACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTTA	3850
3851	ACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGTTCTGTTCAATTAGCTGAC	3900
3901	CATTATCAACAAAATACTCCAATTGGTGATGGTCCAGTCTTGTTACCAGA	3950
3951	CAACCATTACTTATCCACTCAATCTGCCTTATCCAAAGATCCAAACGAAA	4000
4001	AGAGAGACCACATGGTCTTGTTAGAATTTGTTACTGCTGCTGGTATTACC	4050
4051	CATGGTATGGATGAATTGTACAAATAACTCGAGTAAGCTTGGTACCGCGG	4100
4101	CTAGCTAAGATCCGCTCTAACC GAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAG	4150
4151	TCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTA	4200
4201	TTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATG	4250
4251	TAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGA	4300
4301	TCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCTCTTCGAAGACAGAAAAT	4350
4351	TTGCTGACATTGGTAATACAGTCAAATGTCAGTACTCTGCGGGTGTATAC	4400
4401	AGAATAGCAGAATGGGCAGACATTACGAATGCACACGGTGTGGTGGGCC	4450
4451	AGGTATTGTTAGCGGTTTGAAGCAGGCGGCAGAAGAAGTAACAAAGGAAC	4500
4501	CTAGAGGCCTTTTGATGTTAGCAGAATTGTCATGCAAGGGCTCCCTATCT	4550
4551	ACTGGAGAATATACTAAGGGTACTGTTGACATTGCGAAGAGCGACAAAGA	4600
4601	TTTTGTTATCGGCTTTATTGCTCAAAGAGACATGGGTGGAAGAGATGAAG	4650
4651	GTTACGATTGGTTGATTATGACACCCGGTGTGGGTTTAGATGACAAGGGA	4700
4701	GACGCATTGGGTCAACAGTATAGAACCGTGGATGATGTGGTCTCTACAGG	4750
4751	ATCTGACATTATTATTGTTGGAAGAGGACTATTTGCAAAGGGAAGGGATG	4800
4801	CTAAGGTAGAGGGTGAACGTTACAGAAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTTG	4850
4851	AGAAGATGCGGCCAGCAAAACTAA	4874

### 6.1.2 Nullvektor Expressionsplasmid



Die Sequenzen für das Nullvektor Expressionsplasmid (pPD111) sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

ori (pBR322) (3'-5', gelb): 654 – 37

CarbR (3'-5', gelb):

- Promotor: 1799 - 1670
- Gen: 1669 - 809
- Terminator: 808 - 663

BOX B (rot): 1836 – 2097

TRP1 (5'-3', lila):

- Promotor: 2128 - 2455
- Gen: 2456 - 3130
- Terminator: 3131 - 3245

TEF2 Terminator (3'-5', blau): 3775 - 3276

TEF2 Promotor (3'-5', blau): 4403 - 3844

Abstandshalter Expressionsplasmid (grau): 4417 - 5062

PGK1 (5'-3', blau): 5076 - 5825

CYC1 Terminator (5'-3', blau): 5897 - 6088

Box C (rot): 6119 - 6399

# Anhang

1	CCTAGGAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTT	50
51	TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAG	100
101	TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTCCCC	150
151	CTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGA	200
201	TACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTC	250
251	ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCT	300
301	GTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAC	350
351	TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC	400
401	AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG	450
451	AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTT	500
501	GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAG	550
551	CTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTT	600
601	GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTG	650
651	ATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGG	700
701	GATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAA	750
751	ATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGG	800
801	TCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG	850
851	TCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTA	900
901	CGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGA	950
951	GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGG	1000
1001	AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGT	1050
1051	CTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGT	1100
1101	TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTC	1150
1151	GTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA	1200
1201	CATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCG	1250
1251	ATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGC	1300
1301	AGCACTGCATAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTG	1350
1351	TGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGA	1400
1401	CCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAATACCGCGCCACATAG	1450
1451	CAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC	1500
1501	TCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGT	1550
1551	GCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTG	1600
1601	AGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC	1650
1651	GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATT	1700
1701	TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA	1750
1751	AAATAAACAAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTG	1800
1801	ACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACACCTAGGCTCTTCGAAGACAGA	1850
1851	AAATTTGCTGACATTGGTAATACAGTCAAATTGCAGTACTCTGCGGGTGT	1900
1901	ATACAGAATAGCAGAATGGGCAGACATTACGAATGCACACGGTGTGGTGG	1950
1951	GCCCAGGTATTGTTAGCGGTTTGAAGCAGGCGGCAGAAGAAGTAACAAAG	2000
2001	GAACCTAGAGGCCTTTTGATGTTAGCAGAATTGTCATGCAAGGGCTCCCT	2050
2051	ATCTACTGGAGAATATACTAAGGGTACTGTTGACATTGCGAAGAGCGGTC	2100
2101	AGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCTGCTTAACTATGCGGCATCAGAGC	2150
2151	AGATTGTAAGTACTGAGAGTGCACCATAAACGACATTACTATATATAATATA	2200
2201	GGAAAGCATTTAATAGACAGCATCGTAATATATGTGTACTTTGCAGTTATG	2250
2251	ACGCCAGATGGCAGTAGTGAAGATATTCTTTATTGAAAAATAGCTTGTG	2300
2301	ACCTTACGTACAATCTTGATCCGGAGCTTTTCTTTTTTTGCCGATTAAGA	2350
2351	ATTAATTCGGTCGAAAAAAGAAAAGGAGAGGGCCAAGAGGGAGGGCATTG	2400
2401	GTGACTATTGAGCACGTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTT	2450
2451	GGAGTATGTCTGTTATTAATTTACAGGTAGTTCTGGTCCATTGGTGAAA	2500
2501	GTTTGGCGCTTGCAGAGCACAGAGGCCGAGAATGTGCTCTAGATTCCGA	2550
2551	TGCTGACTTGCTGGGTATTATATGTGTGCCAATAGAAAGAGAACAATTG	2600
2601	ACCCGGTTATTGCAAGGAAAATTTCAAGTCTTGTAAGCATATAAAAAT	2650
2651	AGTTCAGGCACTCCGAAATACTTGGTTGGCGTGTTCGTAATCAACCTAA	2700
2701	GGAGGATGTTTTGGCTCTGGTCAATGATTACGGCATTGATATCGTCCAAC	2750
2751	TGCATGGAGATGAGTCGTGGCAAGAATACCAAGAGTTCCTCGGTTTGCCA	2800

# Anhang

2801	GTTATTAAAAGACTCGTATTTCCAAAAGACTGCAACATACTACTCAGTGC	2850
2851	AGCTTCACAGAAACCTCATTCGTTTATTCCTTGTTGATTGAGAAGCAG	2900
2901	GTGGGACAGGTGAACTTTTGGATTGGAACCTGATTTCTGACTGGGTGGA	2950
2951	AGGCAAGAGAGCCCCGAAAGCTTACATTTTATGTTAGCTGGTGGACTGAC	3000
3001	GCCAGAAAATGTTGGTGATGCGCTTAGATTAAATGGCGTTATTGGTGTTG	3050
3051	ATGTAAGCGGAGGTGTGGAGACAAATGGTGTAAAAGACTCTAACAAAATA	3100
3101	GCAAATTTTCGTCAAAAATGCTAAGAAAATAGGTTATTACTGAGTAGTATTT	3150
3151	ATTTAAGTATTGTTTGTGCACTTGCCTATGCGGTGTGAAATACCGCACAG	3200
3201	ATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGAAATTGTAAACGTTAATATTTT	3250
3251	GTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTGGGGTAGCGACGGATTAATGGCATA	3300
3301	CTTGTTGTTGGGATTAATGTGTTTCAGAAGTAATCTGGTATAATTTTCTT	3350
3351	TATTTGCTGGCCTACTGGGTAAATTTTGAAAGTACAGTCTGTTTTTATTG	3400
3401	GTCATAGAGTATAGAATAATGAAAACGTTAGTAGAAAAGAAGATTTAAGGA	3450
3451	AACGTAAATTACAAGGTATATACATACGCTGACATGGTTTCTTTAGGTTT	3500
3501	GATGAGGCCGTCCTTTTGTGATAGCAGCTTTTTCCATTTTTTTTTTTTTT	3550
3551	GTTTCGAGTAACGTATGGTTTAGTATCTGTCTTCTCCTTCTCTTACAAA	3600
3601	AAACCCTTTGTAAAATAGTGCCGAGTTGGAGGACATCAATCTGATGGGCA	3650
3651	AGAAAACACCAACCCCCCTATATGAAAAGAAAATGATAAGCAGATAGAT	3700
3701	AAAAATACTTAATTAATAACATAAAAATAAGAGGTATATAAAAATAT	3750
3751	TATATGGAAGCAATAATTATTACTCCATATGGGAACCTCCACCAGAGCCA	3800
3801	CCTGACCCACCCTGCCACCAGATCCTCCGCTACCCCTGCAGGGTTTAGT	3850
3851	TAATTATAGTTCGTTGACCGTATATTCTAAAACAAGTACTCCTTAAAAA	3900
3901	AAAACCTTGAAGGAATAACAAGTAGAATAGATAGAGAGAAAAATAGAA	3950
3951	AATGCAAGAGAATTTATATATTAGAAAAGAGAGAAAAGAAAATGGAAAAA	4000
4001	AAAAATAGGAAAAGCCAGAAATAGCACTAGAAGGAGCGACACCAGAAAAG	4050
4051	AAGGTGATGGAACCAATTTAGCTATATATAGTTAACTACCGGCTCGATCA	4100
4101	TCTCTGCCTCCAGCATAAGTCAAGAAGAATTTTTTTTTTCTTGAGGCTTC	4150
4151	TGTCAGCAACTCGTATTTTTTCTTTCTTTTTTGGTGAGCCTAAAAAGTTC	4200
4201	CCACGTTCTCTTGTACGACGCCGTCACAAACAACCTTATGGGTAATTTGT	4250
4251	CGCGGTCTGGGTGTATAAATGTGTGGGTGCAACATGAATGTACGGAGGTA	4300
4301	GTTTGCTGATTGGCGGTCTATAGATACCTTGGTTATGGCGCCCTCACAGC	4350
4351	CGGCAGGGGAAGCGCCTACGCTTGACATCTACTATATGTAAGTATACGGC	4400
4401	CCCGGCCTAGCTGGCCTCCGGGATCGAAGAAAATGATGGTAAATGAAATAG	4450
4451	GAAATCAAGGAGCATGAAGGCAAAAGACAAATATAAGGGTCAACGAAAA	4500
4501	ATAAAGTGAAAAGTGTTGATATGATGATTTTGGCTTTGCGGCGCCGAAAA	4550
4551	AACGAGTTTACGCAATTGCACAATCATGCTGACTCTGTGGCGGACCCGCG	4600
4601	CTCTTGCCGGCCCCGGCGATAACGCTGGGCGTGAGGCTGTGCCCGGCGGAG	4650
4651	TTTTTTGCGCCTGCATTTTCCAAGGTTTACCCTGCGCTAAGGGGCGAGAT	4700
4701	TGGAGAAGCAATAAGAATGCCGTTGGGTTGCGATGATGACGACCACGA	4750
4751	CAACTGGTGTCAATTATTTAAGTTGCCGAAAGAACCTGAGTGCATTTGCAA	4800
4801	CATGAGTATACTAGAAGAATGAGCCAAGACTTGCAGACGCGAGTTTGCC	4850
4851	GGTGGTGCGAACAATAGAGCGACCATGACCTTGAAGGTGAGACGCGCATA	4900
4901	ACCGCTAGAGTACTTTGAAGAGGAAACAGCAATAGGGTTGCTACCAGTAT	4950
4951	AAATAGACAGGTACATAACAACACTGGAAAATGGTTGTCTGTTTGAGTACGC	5000
5001	TTTCAATTCATTTGGGTGTGCACTTTATTATGTTACAATATGGAAGGGAA	5050
5051	CTTTACACTTCTGGCCTAGCTGGCCAACGCACAGATATTATAACATCTGCA	5100
5101	TAATAGGCATTTGCAAGAATTACTCGTGAGTAAGGAAAGAGTGAGGAACT	5150
5151	ATCGCATACCTGCATTTAAAGATGCCGATTTGGGCGCGAATCCTTTATTT	5200
5201	TGGCTTACCCTCATACTATTATCAGGGCCAGAAAAAGGAAGTGTTCCTCC	5250
5251	TCCTTCTTGAATTGATGTTACCCTCATAAAGCACGTGGCCTCTTATCGAG	5300
5301	AAAGAAATTACCGTCGCTCGTGATTTGTTTGCAAAAAGAACAACACTGAA	5350
5351	AAAACCCAGACACGCTCGACTTCTGTCTTCTTATTGATTGCAGCTTCCA	5400
5401	ATTTTCGTACACAACAAGGTCCTAGCGACGGCTCACAGGTTTTGTAACAA	5450
5451	GCAATCGAAGGTTCTGGAATGGCGGGAAAGGTTTAGTACCACATGCTAT	5500
5501	GATGCCCACTGTGATCTCCAGAGCAAAGTTCGTTTCGATCGTACTGTTACT	5550
5551	CTCTCTTTTCAAACAGAATTGTCCGAATCGTGTGACAACAACAGCCTGT	5600
5601	TCTCACACACTCTTTTCTTCTAACCAAGGGGTGGTTTAGTTTAGTAGAA	5650

## Anhang

5651	CCTCGTGAAACTTACATTTACATATATATAAACTTGCATAAATTGGTCAA	5700
5701	TGCAAGAAATACATATTTGGTCTTTTCTAATTCGTAGTTTTTCAAGTTCT	5750
5751	TAGATGCTTTCTTTTTCTCTTTTTTACAGATCATCAAGGAAGTAATTATC	5800
5801	TACTTTTTACAACAAATATAAAACA	5850
5851	CGGTGGGTGAGGTGGCAGTGGAGGAGGATCCCCGCGGCTAGCTAAGATCC	5900
5901	GCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTAT	5950
5951	TTATTTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAA	6000
6001	TTTTTCTTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTG	6050
6051	AAAACCTTGCTTGAGAAGTTTTTGGGACGCTCGAAGATCCAGCTGCATTA	6100
6101	ATGAATCGGCCAACGCGCA	6150
6151	AGAGACATGGGTGGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTTGATTATGACACC	6200
6201	CGGTGTGGGTTTAGATGACAAGGGAGACGCATTGGGTCAACAGTATAGAA	6250
6251	CCGTGGATGATGTGGTCTCTACAGGATCTGACATTATTATTGTTGGAAGA	6300
6301	GGACTATTTGCAAAGGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTGAACGTTACAG	6350
6351	AAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAAACTAA	6399

### 6.1.3 Bindestellen

#### Bindestellen

Name	Sequenz 5'-3'
PhiF 8xBS	<u>CACCTTAACGATACGGTACGTTTCGTATCATATTGACAAGCTTCAGAC</u> <u>CTTAACGATACGGTACGTTTCGTATCATGGCTTATCTAGAGTCACCTT</u> <u>AACGATACGGTACGTTTCGTATCATTCACATCCTAGGTCTACCTAAC</u> <u>GATACGGTACGTTTCGTATCATACTAGCACCTTAACGATACGGTACGT</u> <u>TTTCGTATCATATTGACAAGCTTCAGACCTTAACGATACGGTACGTTTC</u> <u>GTATCATGGCTTATCTAGAGTCACCTTAACGATACGGTACGTTTCGTA</u> <u>TCATTACATCCTAGGTCTACCTTAACGATACGGTACGTTTCGTATCA</u> <u>TT</u>
PhiF 4xBS	<u>CGGCTAGCACCTTAACGATACGGTACGTTTCGTATCATATTGACAAGC</u> <u>TTCAGACCTTAACGATACGGTACGTTTCGTATCATGGCTTATCTAGAG</u> <u>TCACCTTAACGATACGGTACGTTTCGTATCATTCACATCCTAGGTCTA</u> <u>CCTTAACGATACGGTACGTTTCGTATCAT</u>
Bm3R1 2xBS	<u>CGGCTAGTCGGAATGAACATTCATTCCGAGACCTAGAGCTTGTCATC</u> <u>GGAATGAAGGTTTCATTCCG</u>
TetR 2xBS	<u>CGGCTAGCTCTCTATCACTGATAGGGAGTATTGACAAGCTCTAGGTCT</u> <u>CTATCACTGATAGGGAGT</u>
SrpR 8xBS	<u>CGTTTACAAACAACAAGCATGTATGTATATATTGACAAGCTTCAGGT</u> <u>TTACAAACAACAAGCATGTATGTATATGGCTTATCTAGAGTCGTTTA</u> <u>CAAACAACAAGCATGTATGTATATTCACATCCTAGGTCTGTTTACAA</u> <u>ACAACAAGCATGTATGTATATACTAGCGTTTACAAACAACAAGCAT</u> <u>GTATGTATATATTGACAAGCTTCAGGTTTACAAACAACAAGCATGTA</u> <u>TGTATATGGCTTATCTAGAGTCGTTTACAAACAACAAGCATGTATGT</u> <u>ATATTCACATCCTAGGTCTGTTTACAAACAACAAGCATGTATGTATA</u> <u>T</u>

## Anhang

SrpR 4xBS	CGGCTAGCGTTTACAAACAAACAAGCATGTATGTATATATTGACAAGC TTCAGGTTTACAAACAAACAAGCATGTATGTATATGGCTTATCTAGAG TCGTTTACAAACAAACAAGCATGTATGTATATTCACATCCTAGGTCTG TTTACAAACAAACAAGCATGTATGTATATACTAGTTCTCCCCGGAAA
TarA 8xBS	AAACATACCGTGTGGTATGTTTCAGACCTAGGATGTGACAACATACCGA GTGGTATGTTGACTCTAGATAAGCAAACATACCGTGTGGTATGTTTC CTGAAGCTTGTCAATGAACATAACCGTGAGGTATGTTTGCTAGTAAACA TACCGTGTGGTATGTTTCAGACCTAGGATGTGACAACATACCGAGTGGT ATGTTGACTCTAGATAAGCAAACATACCGTGTGGTATGTTTCCTGAA GCTTGTCAATGAACATAACCGTGAGGTATGTTTGCTAGT
TarA 4xBS	CGGCTAGTAAACATACCGTGTGGTATGTTTCAGACCTAGGATGTGACAA CATAACCGAGTGGTATGTTGACTCTAGATAAGCAAACATACCGTGTG GTATGTTCTGAAAGCTTGTCAATGAACATAACCGTGAGGTATGTTT
TarA 2xBS	AAAACATACCGTGTGGTATGTTTCCTGAAGCTTGTCAATGAACATAACCG TGAGGTATGTTT

### 6.1.4 Core Promotor

Name	Sequenz 5'-3'
ENO1 <i>core</i> Promotor	TCTCCCCGGAAACTGTGGCCTTTTCTGGCACACATGATCTCCACGATT TCAACATATAAATAGCTTTTGATAATGGCAATATTAATCAAATTTATT TTACTTCTTTCTTGTAAACATCTCTTGTAAATCCCTTATTCCTTCTAG CTATTTTTTCATAAAAAACCAAGCAACTGCTTATCAACACACAAACAC

### 6.1.5 DNA-Bindedomänen

Name	Sequenz 3'-5' (N-Terminal an Photorezeptor)
PhiF	ATGGCCAGGACCCCTTCAAGGTCCAGTATTGGTTCATTACGTAGTCCG CATACCCATAAGGCAATTTTGACATCAACCATTGAGATTTTAAAAGAA TGCGGATACTCTGGTTTATCAATTGAATCTGTTGCCCGTAGAGCTGGT GCATCAAACCCACAATTTATAGGTGGTGGACAAACAAAGCAGCCTTG ATTGCCGAGGTTTACGAAAACGAATCCGAGCAAGTTAGGAAATTTCCC GATTTGGGTTCTTTCAAGGCTGATTTAGACTTTTTGCTGAGAAATCTG TGAAAGTTTGGAGGAAACTATTTGCGGTGAAGCGTTCAGATGCGTT ATCGCTGAAGCTCAGTTGGACCCTGCTACACTAACGCAATTAAGGAT CAATTTATGGAGAGAAGGCGTGAAATGCCTAAGAAGTTAGTGGAGAAC GCTATTTCAAACGGCGAATTACCTAAAGACACAAATAGAGAATTACTG TTAGATATGATATTCGGTTTCTGCTGGTACAGGTTGTTGACAGAACAA CTAACTGTGGAGCAAGACATTTGAGGAATTTACCTTTCTTTTGATTAAT GGTGTATGCCAGGGACACAAAGA

## Anhang

Bm3R1	<p>ATGGAATCTACTCCTACTAAGCAAAAAGCCATCTTCTCTGCCTCCTTG  TTGTTGTTTCGCTGAGAGAGGTTTCGACGCTACCACTATGCCAATGATT  GCCGAAAACGCTAAGGTTGGTGTGTTACTATCTACAGATACTTCAAG  AACAAAGAATCCTTAGTTAATGAGTTGTTTCAACAACACGTCAATGAA  TTTTTGCAATGTATCGAATCTGGTTCGCTAACGAAAGAGATGGTTAC  AGAGACGGTTTCCACCACATCTTCGAAGGTATGGTCACCTTCACCAAG  AACCATCCTAGAGCCTTAGGTTTCATCAAGACCCACTCTCAAGGTA  TTTTTGACCGAAGAATCCAGATTGGCTTATCAAAAAGTTGGTCGAATTT  GTCTGTACTTTCTTCAGAGAAGGTCAAAAAGCAAGGTGTCATCAGAAAT  TTGCCAGAAAACGCTTTGATTGCTATCTTGTTCGGTTCTTTTCATGGAA  GTCTACGAAATGATTGAAAACGATTATTTGTCTTTGACTGATGAATTA  TTAACCGGTGTTGAGGAATCCTTGTGGGCTGCCTTGTCTCGTCAATCT</p>
TetR	<p>ATGAGTAGATTAGACAAATCAAAAAGTGATAAATTCTGCATTAGAATTG  TTGAATGAAGTAGGCATTGAAGGTTTGACTACCCGTAAGTTAGCTCAG  AACTAGGTGTTGAACAACCTACATTATACTGGCACGTTAAAAATAAA  AGGGCATTGTTGGATGCGCTTGCCATTGAGATGTTGGATAGGCATCAT  ACCCACTTTTGCCCATTTAGAAGGAGAGTCTTGGCAGGACTTTTTGAGG  AATAATGCCAAGTCATTTAGATGTGCATTGTTGTCTCATAGAGATGGG  GCCAAGTTCATCTAGGTACCCGTCCTACGGAAAAACAATATGAGACG  TTGGAAAATCAGTTAGCGTTCTTATGCCAACAAGGCTTTAGCTTGAA  AATGCTTTATATGCTCTATCAGCTGTCGGTCATTTTACATTGGGATGC  GTTTTAGAAGACCAGGAGCACCAGGTGGCAAAGGAAGAAAGAGAAACA  CCAACAACCTGATTCAATGCCACCCCTACTGAGACAAGCTATCGAATTA  TTTGATCATCAAGGTGCGGAACCTGCCTTCTTGTTTGGCCTAGAATTG  ATCATTTGTGGTTTAGAAAAGCAGTTAAAATGTGAGAGTGGCTCA</p>
SrpR	<p>ATGGCAAGAAAAACAGCAGCGGAAGCCGAAGAAACACGTCAAAGAATT  ATTGATGCTGCACTAGAAGTGTTTCGTAGCTCAAGGAGTGTGAGATGCA  ACATTAGACCAAATCGCAAGAAAAGCAGGTGTTACCAGAGGTGCTGTT  TACTGGCACTTCAACGGGAAATTAGAAGTATTACAAGCTGTGCTGGCG  TCAAGACAACATCCTTTAGAATTGGACTTTACACCAGATTTGGGTATA  GAAAGATCTTGGGAAGCTGTGGTAGTTGCAATGTTAGACGCAGTTCAT  TCACCCCAAAGTAAACAGTTCAGTGAAATACTGATTTACCAAGGTTTA  GACGAATCTGGATTGATACACAACAGAATGGTTCAGGCATCCGATAGA  TTTCTACAATACATACATCAAGTACTAAGGCACGCGGTACCCCAAGGT  GAGTTACCGATTAATTTGGACTTGCAAACCTAGCATTGGTGTTCGAA  GGATTGATTACAGGATTGCTTTACGAAGGTCTTAGAAGCAAAGATCAA  CAAGCTCAAATTATCAAAGTAGCATTGGGGTCTTCTGGGCTTTGTTG  AGGGAACCCCGCGTTTTTTACTATGTGAAGAGGCTCAGATTAACAA  GTCAAGAGTTTTGAA</p>
TarA	<p>ATGGCCCAACAAGATAGAGCCGTCAGAACCAGAAGAGCCGTTTTGCGT  GCTGCTGCCGCTGCTTTCGCCGAAAGAGGTTACGCTGCCGCTACTATC  TCCGAAATTTGAAGAGAGCTGGTGTACCAAGGGTGTCTTATACTTC  CACTTTGATTCCAAAGCTGCTTTGGCCCAAGGTGTTTTGCAAGAACAA  TTGACTCCTGAATACCACTTGCCAAGAGAGTTGAAGTTGCAAGAATGG  GTTGACGCTGGTATGACCTTGCTAGAAAGATTGCCAAGAGAGCCATTC  TTGTTGGCTGGTGTAGAAATCTCTGCCGATAGACCAGGTAGAGAAGTC  TTGGGTTCTGCTTGCCAGCTTGGTCTCGTTTTGACTTCCCATGTTTTG  ACCGAAGCTAAGAAGAGAGGTGAAGTTTTGCCACATGTCGTTCCAGAG  GAACTGCTCAAGTTTTCTTGGGTGCTTGGGTTGGTGCCCAATTCGTT  TCCCAAACCTTGCTGGTGGGAAGACTTGGATGACAGAACTGCTGCT  TTATACTCTCACTTGTAGGTGCTATCGCTGCCCCACCAGTTTTGACT</p>

## Anhang

	AGATTGGACACCGCCCCAGACAGAGGTGCCAGAGTTATTGCTGAAGCT AGACGTAGATCCGGTGATTTGTCCGGTATTGCTTGT
--	--

### 6.1.6 Sonstige

Name	Sequenz 5'-3' Richtung
<b>VP16 Aktivierungs- domäne</b>	GCCCCCGACCGATGTCAGCCTGGGGGACGAGCTCCACTTAGACGGC GAGGACGTGGCGATGGCGCATGCCGACGCGCTAGACGATTTGATCTG GACATGTTGGGGGACGGGGATTCCCCGGGTCCGGGATTTACCCCCAC GACTCCGCCCCCTACGGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAG CAGATGTTTACCGATGCCCTTGAATTGACGAGTACGGTGGG

### 6.2 Phi-LexA System ohne PCB Zugabe

Das das Rotlichtsystem auch **ohne** der Chromophorzugabe des Phycocyanobilins unter kontinuierlichem Rotlicht aktiviert wurde, wurde in dieser Arbeit am Rande des Kapitels 3.11.1 erwähnt. Folgend wird die Abbildung verkürzt dargestellt.

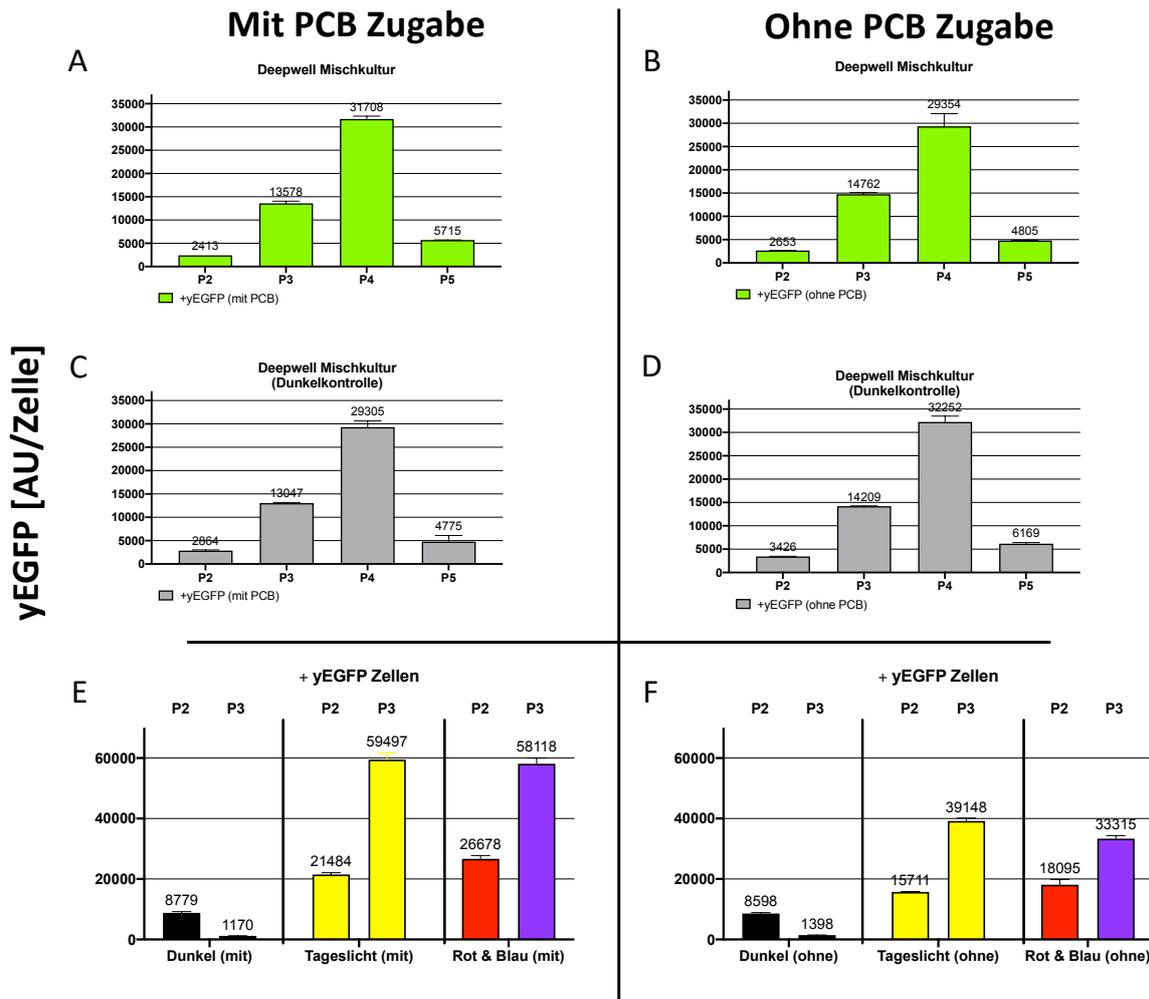


Abbildung 56 Phi-LexA System mit und ohne PCB Zugabe unter kontinuierlicher Rotlichtbestrahlung

Ergänzende Daten zu dem Kapiteln 3.13.5 für A bis D und dem Kapitel 3.13.6 für E und F. Es werden nur die +yEGFP Zellen betrachtet. n = 2 für A-D, sonst n = 3

Aus der Abbildung 56 ist zu erkennen, dass wenn keine Chromophorzugabe erfolgte, eine Aktivierung des Phi-LexA Systems stattgefunden hat, wenn die Hauptkultur 24 Stunden dem Rotlicht, Rot- und Blaulicht oder dem Tageslicht ausgesetzt wurde.

### 6.3 Bioreaktor

Bioreaktor: Labfors 5 LED mit Rührkessel 3,6 L TV wassertemperiert (Arbeitsvolumen 0,5 L bis 2,6 L)

Tabelle 24 Bioreaktor Zubehör

<b>Zubehör</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
OD Messung	ASD12-N – NIR-Absorption Probe	Optek
pH-Elektrode	Easyferm Plus ARC	Hamilton
pO <sub>2</sub> -Elektrode	Visiferm Plus ARC	Hamilton
Abgasanalysator BlueInOne O <sub>2</sub> / CO <sub>2</sub>	BlueInOne Ferm	BlueSens
Antischaum- mittel	Antischaum 204	Sigma Aldrich

## Eigenständigkeitserklärung

### **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und eigenständig sowie ohne unerlaubte fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift