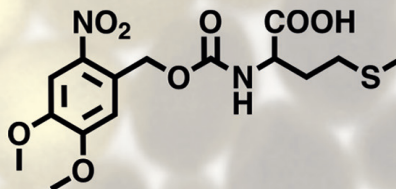
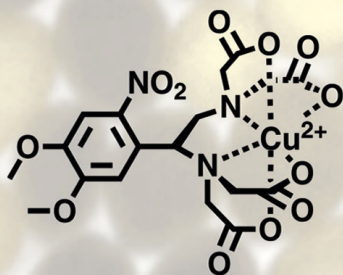
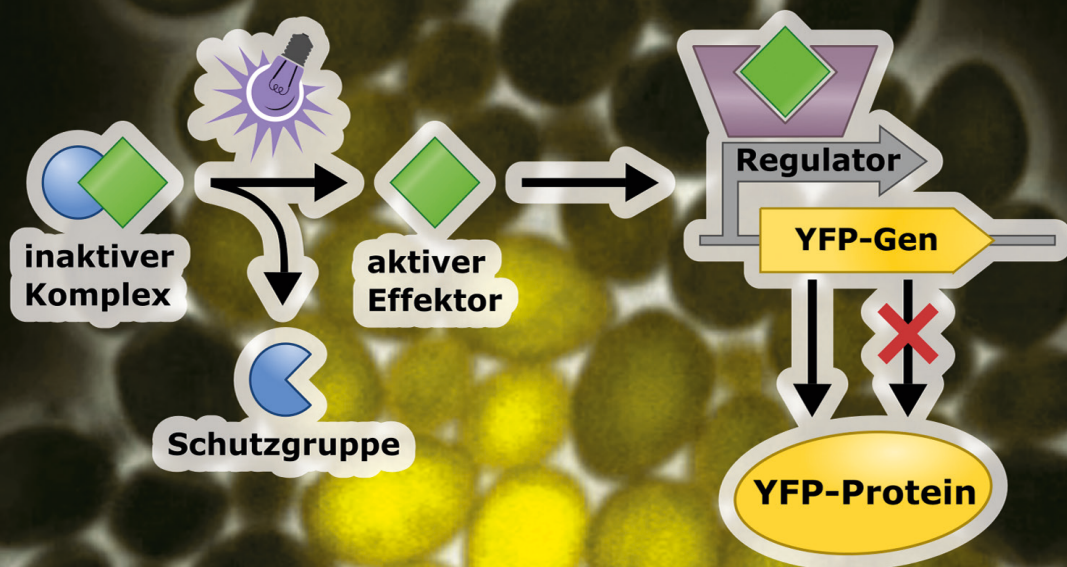


Lichtregulierte Genexpression mittels photolabil geschützter Effektormoleküle in *Saccharomyces cerevisiae*

Peter Martin Kusen



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC – Bioorganische Chemie

Lichtregulierte Genexpression mittels photolabil geschützter Effektormoleküle in *Saccharomyces cerevisiae*

Peter Martin Kusen

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 32

ISBN 978-3-95806-322-8

Publikationen / Konferenzbeiträge	7
Zusammenfassung	8
Abstract	9
1 Einleitung / Kenntnisstand	10
1.1 Zellen als Fabriken der Zukunft	10
1.2 Biotechnologische Relevanz von <i>S. cerevisiae</i>	14
1.3 Potential optisch-regulierter Expressionssysteme	19
1.4 <i>Caged compounds</i>	21
1.5 Genregulation mittels <i>caged compounds</i>	25
1.6 Ziele dieser Arbeit	35
2 Ergebnisse und Diskussion	37
2.1 Lichtregulation mittels <i>caged</i> -Galaktose	37
2.1.1 <i>Das pGAL1</i> -basierte Expressionssystem	37
2.1.2 Charakterisierung von <i>S. cerevisiae</i> - Δ <i>GAL1</i> - <i>pGAL1</i> -YFP	38
2.1.3 Charakterisierung und Anwendung von NPip-Gal (<i>caged</i> -Gal)	43
2.2 Lichtregulation (Induktion) mittels <i>caged</i> -Cu ²⁺	51
2.2.1 <i>Das pCUP1</i> -basierte Expressionssystem	53
2.2.2 Charakterisierung von <i>S.c.</i> - <i>pCUP1</i> -YFP	55
2.2.3 Charakterisierung von DMNP-EDTA-Cu ²⁺ (<i>caged</i> -Cu ²⁺)	58
2.2.4 Optische Expressionsregulation mittels DMNP-EDTA-Cu ²⁺ (<i>caged</i> -Cu ²⁺)	65
2.2.5 <i>Screening</i> des Induktionszeitpunkts mittels optischer Regulation	70
2.2.6 Alternatives <i>caged</i> -Cu ²⁺ (3Gcage-Cu ²⁺)	72
2.3 Zwei-Wellenlängen-Regulation mittels <i>caged</i> -EDTA	79
2.3.1 Reversible Regulation mittels EDTA	81
2.3.2 Synthese und Charakterisierung von DEACM-EDTA (<i>caged</i> -EDTA)	82
2.3.3 Einsatz von DEACM-EDTA in biologischen Systemen	88
2.4 Lichtregulation (Repression) mittels <i>caged</i> -Methionin	93
2.4.1 <i>Das pMET17</i> -basierte Expressionssystem	94
2.4.2 Charakterisierung von <i>S.c.</i> - <i>pMET17</i> -YFP	96
2.4.3 Synthese und Charakterisierung von NVOC-Met (<i>caged</i> -Met)	103
2.4.4 Untersuchungen zu möglichen Toxizitäten	108
2.4.5 Optische Repression der <i>pMET17</i> -regulierten Genexpression	109
3 Zusammenfassung	121
3.1 Lichtregulation mittels <i>caged</i> -Galaktose	125
3.2 Lichtregulation mittels <i>caged</i> -Cu ²⁺	127
3.3 Lichtregulation mittels <i>caged</i> -EDTA	130
3.4 Lichtregulation mittels <i>caged</i> -Met	133
4 Ausblick	138

5 Material und Methoden	148
5.1 Verwendete Materialien	148
5.1.1 Geräte und Software	148
5.1.2 Chemikalien, Enzyme und Lösungen	149
5.2 Molekularbiologische Methoden	151
5.2.1 Isolation von Plasmid-DNA	151
5.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	151
5.2.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	152
5.2.4 <i>In vitro</i> Rekombination und Sequenzierung von Nukleinsäuren	152
5.2.5 Verwendete Plasmide und Nukleinsäuren	153
5.2.6 Sequenzen der Expressionskassetten	154
5.2.7 Konstruktion der Reporterstämme	156
5.3 Mikrobiologische Methoden	157
5.3.1 Verwendete Mikroorganismen	157
5.3.2 Kultivierung von Mikroorganismen	158
5.3.3 Mikrofluidische Kultivierung	158
5.3.4 Kultivierung und Belichtung im BioLector <i>Setup</i>	159
5.3.5 Lagerung von Mikroorganismen	160
5.3.6 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	160
5.4 Spektroskopische Methoden	162
5.4.1 Absorptionsmessungen	162
5.4.2 Fluoreszenzmessungen	162
5.5 Photolyse von <i>caged compounds</i>	163
5.5.1 Bestimmung der Photolyse-Quantenausbeuten	165
5.5.2 Bestimmung der Zeit für die halbmaximale photolytische Spaltung	167
5.6 Synthesen der <i>caged compounds</i>	169
5.6.1 Erste Strategie zur Synthese von 3Gcage (41)	169
5.6.2 Zweite Strategie zur Synthese von 3Gcage (41)	170
5.6.3 Dritte Strategie zur Synthese von 3Gcage (41)	171
5.6.4 Synthese von DEACM-EDTA (<i>caged</i> -EDTA, 58)	175
5.6.5 Synthesen von NVOC-Met (<i>caged</i> -Met, 61)	177
Abkürzungsverzeichnis	179
Literaturverzeichnis	182
Danksagung	200
Anhang	201
Anteil am Manuskript eigener Publikationen	213
Erklärung	215

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Im Verlauf dieser Arbeit wurden optische Expressionssysteme in *S. cerevisiae* entwickelt, die eine nichtinvasive Regulation der Genexpression mittels Belichtung ermöglichen. Dabei wurden sogenannte *caged compounds* eingesetzt. Diese photolabilen Verbindungen zerfallen bei Belichtung und setzen ein spezifisches Effektormolekül zur Regulation des jeweiligen Expressionssystems frei. Dabei wurde ein Gen des *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) als Zielgen verwendet, um den Verlauf der Expression anhand von Fluoreszenzmessungen verfolgen zu können.

Die lichtabhängige Freisetzung von Effektormolekülen bietet interessante Eigenschaften, wie eine genaue Dosierbarkeit, eine Verringerung des mechanischen Aufwandes und eine minimal-invasive Applikation, wodurch eine sterile Arbeitsweise und konstante atmosphärische Bedingungen ermöglicht werden können. Trotz dieser Vorteile hat die *caged compound* Strategie zur lichtregulierten Genexpression in der (industriellen) Biotechnologie noch keine breite Anwendung gefunden. Ein Grund dafür könnte der Mangel an bereits etablierten *caged compound* basierten Expressionssystemen sein. Einige Beispiele für *E. coli*, bei denen weit verbreitete genetische Expressionssysteme erfolgreiche mittels *caged compounds* reguliert werden konnten, zeigen bereits das Potential dieser Technologie. Sie wurden aber erst während der Forschungsarbeiten zu dieser Dissertation oder in der letzten Dekade veröffentlicht und decken nur ein kleines Spektrum der bekannten Expressionssysteme ab.

Für *S. cerevisiae* gibt es bisher keine Anwendungsbeispiele von *caged compound* basierten genetischen Expressionssystemen. Aufgrund dessen lag der Fokus dieser Dissertation auf der Entwicklung von *caged compound* basierten Expressionssystemen in *S. cerevisiae*. Als Grundlage dienten bio(techno)logisch relevante Promotoren und kommerziell oder synthetisch leicht zugängliche *caged compounds*, um die Verbreitung und Anwendbarkeit dieser Technologie zu fördern.

Band 32
ISBN 978-3-95806-322-8