

Einleitung

Zur Produktion von Proteinen, welche eine zunehmende Bedeutung z.B. als pharmazeutische Wirkstoffe besitzen, stehen verschieden bakterielle Expressionssysteme zur Verfügung. Geringe Proteinausbeuten, eine unvollständige oder inkorrekte Faltung und Instabilität der Proteine stellen dabei eine große Herausforderung im Herstellungsprozess dar. Die heterologe Expression von Proteinen z.B. im gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* führt in der Regel zur Bildung von Einschlusskörpern, in denen sie in inaktiver und unlöslicher Form vorliegen (s.u.a. Schmidt F. R., 2004).

Das grampositive Bakterium *Bacillus subtilis* hat sich in der biotechnologischen Industrie u.a. zur Produktion von Enzymen und Vitaminen etabliert. Mit *B. subtilis* gelingt es, größere Mengen von Proteinen zu produzieren, welche in das Kulturmedium sekretiert und einfach aufgereinigt werden können (Westers et al., 2004).

Das Ziel meiner Bachelorarbeit im Labor für Mikrobiologie der HSZG war, ein geeignetes Expressionssystem zur zytoplasmatischen und sekretorischen Überproduktion verschiedener Pharmaproteine mit *B. subtilis* zu konstruieren. Eine große Hürde in der Verwendung von *B. subtilis* ist dessen hohe proteolytische Aktivität. *B. subtilis* WB800N ist ein oft empfohlener und in kommerziellen Kits verfügbarer Stamm zur Expression sekretorischer Proteine (MoBiTec GmbH, Göttingen). Die Konstruktion des Stammes, der sich durch eine Inaktivierung acht verschiedener extrazytoplasmatischer Proteasen auszeichnet, ist in der Literatur nur unvollständig beschrieben, und die genaue Position der Mutationen in den Proteasegenen ist nicht dokumentiert (Wu et al., 2002). Daneben besitzt dieser Stamm ein Neomycin-Resistenzgen (*neoR*), welches durch homologe Rekombination zur Inaktivierung eines Chloramphenicol-Resistenzgens (*camR*) in das bakterielle Chromosom eingeführt wurde. (Nguyen et al., 2011). Dieses *neoR::camR* Konstrukt, dessen Position im Genom unbekannt ist, schränkt die Verwendung üblicher *B. subtilis* Vektoren stark ein und kann zur Instabilität der Plasmide beitragen. Zur näheren Charakterisierung von *B. subtilis* WB800N stellte dessen Genomsequenzierung mittels der Ion Torrent™-Sequenzierungstechnologie einen Teilaspekt meiner Arbeit dar, welcher hier dargestellt ist.

Material und Methoden

Bei der DNA-Sequenzierung wird die Abfolge der Nucleotide in einem DNA-Molekül bestimmt. Zur Sequenzierung des WB800N wurde die Ion Torrent™ Sequenzierungstechnologie (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt) genutzt, die zum Next Generation Sequencing (NGS) zählt und sich aus folgenden Arbeitsschritten zusammensetzt:

1. Im Vorfeld: Isolierung der chromosomalen DNA des WB800N
2. DNA-Fragmentierung und Anlegen einer DNA-Bibliothek unter Verwendung des Ion Plus Fragment Library Kit
3. Emulsion PCR (Beladung von Ion Sphere™ Particle (ISP's) mit amplifizierter DNA-Bibliothek) und Anreicherung der Proben (Template Prep via Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit am Ion OneTouch 2 System)
4. Beladung eines Semikonduktor-Chips mit template-positiven angereicherten ISPs
5. Sequenzierung am Ion Torrent Ion PGM™ Sequencer
6. Bioinformatische Analyse der Sequenz-Rohdaten („reads“)

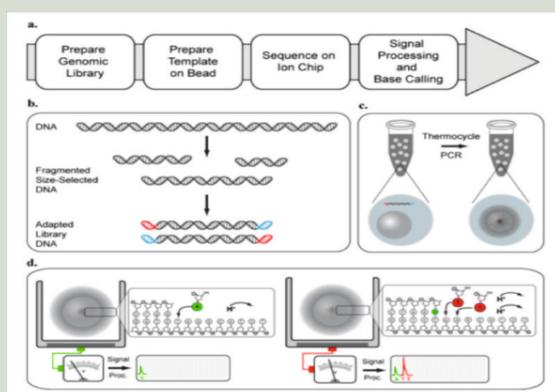


Abb. 1: a) Workflow der Sequenzierung mittels Ion Torrent™ Sequenzierungstechnologie; b) Anlegen einer DNA-Bibliothek durch Fragmentierung der DNA, Selektion der Fragmente nach Größe und Adapterligation an die DNA-Fragmente; c) Emulsions-PCR: Amplifikation der DNA-Fragmente und Bindung an Ion Sphere™ Particles; d) Halbleiterverfahren: Beim Einbau von dNTPs in die DNA werden freierwerdende Protonen mittels eines Halbleiters detektiert. Anhand der Intensität des gemessenen Signals können Wiederholungen desselben Nucleotids identifiziert werden (Quelle: http://www.genomics.cn/en/navigation/show_navigation?nid=2640 (abgerufen am 20.09.2017))

Ergebnisse

Bei der Sequenzierung des Genoms von *B. subtilis* WB800N konnten die genauen Positionen der acht Protease-Knockouts, sowie ein zusätzlicher Knockout der Protease *IspA* detektiert werden (Abb.2). Zudem konnte ein DNA-Abschnitt identifiziert werden, der fast ausschließlich aus Plasmid-DNA besteht (Abb.3). Es liegt die Vermutung nahe, dass im Zusammenhang mit dem zusätzlichen Knockout der Protease *IspA*, der Rest des verwendeten Plasmids ins Chromosom integriert wurde.

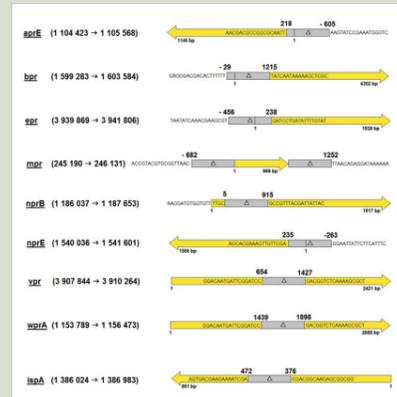


Abb. 2: Protease-Knockouts in WB800N; Darstellung der in WB800N deletierten Protease-Gene *aprE*, *bpr*, *epr*, *mpr*, *nprB*, *nprE*, *vpr*, *wprA* und *ispA* mit offiziellen Koordinaten, Orientierung im Genom, Position der Deletion im Gen (grauer Bereich) mit flankierenden Sequenzen und Größe des Gens

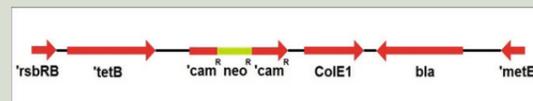


Abb. 3: Insertion in WB800N; Darstellung der Plasmid-Insertion im Chromosom des WB800N mit einem Rest des *rsbRB*-Gens, einem Rest des Tetracyclin-Resistenzgens (*tetB*), flankierenden Bereichen eines Chloramphenicol-Resistenzgens (*camR*), einem Neomycin-Resistenzgen (*neoR*), einem *ColE1*-Origin aus *E. coli*, einem Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) und einem Rest des *metE*-Gens

Schlussfolgerung

Durch eine Plasmidinsertion enthält der *B. subtilis* Produktionsstamm WB800N neben einem neunfachen Protease-Knockout und einer Neomycin-Resistenz zusätzlich eine Ampicillin-Resistenz, einen *ColE1*-Replikationsursprung aus *E. coli*, Reste eines Tetracyclin-Resistenzgens sowie flankierende Bereiche eines Chloramphenicol-Resistenzgens.

Bei Verwendung von Vektoren die eine Chloramphenicol-Resistenz (z.B. pHT-Plasmide), eine Ampicillin-Resistenz oder eine Tetracyclin-Resistenz als Selektionsmarker tragen, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass diese durch homologe Rekombination in das Chromosom integrieren, anstatt als stabiles Plasmid zu propagieren. Als Folge würde nur wenig rekombinantes Protein exprimiert werden, da das Gen für das rekombinante Protein nur einmal auf dem Chromosom vorliegt. Demzufolge ist der *Bacillus*-Stamm WB800N, unter der Verwendung von Vektoren mit Ampicillin-, Chloramphenicol- und Tetracyclin-Resistenzgenen als Selektionsmarker, nicht für die Produktion sekretorischer Pharmaproteine geeignet. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit stellen damit eine wichtige Grundlage zur Konstruktion eines neuartigen *B. subtilis* Expressionssystems dar (Heinrich et al., 2019)



B.Sc. **Antje Drechsel**
Studiengang Molekulare Biotechnologie

Betreuer/Gutachter:

Harald Kellner
Internationales Hochschulinstitut Zittau der TU-Dresden

Janine Heinrich
Prof. Dr. **Thomas Wiegert**

Labor Mikrobiologie, Hochschule Zittau/Görlitz