

Bachelor-Abschlussarbeit

Thema: ***In-vivo*-Biotinylierung rekombinanter Proteine in Hefeexpressionssystemen**

Zusammenfassung:

Die Allergiediagnostik beinhaltet den Nachweis spezifischer Antikörper der Immunglobulinklasse E (IgE). Die Zielantigene werden aus natürlichen Quellen extrahiert und gereinigt oder rekombinant hergestellt. Rekombinante Proteine werden einfach und kostengünstig mit hohen Syntheseraten in Bakterien und in Hefezellen produziert. Hefe ist fähig, Proteine posttranslational zu modifizieren und dreidimensionale Proteinstrukturen zu bilden, wobei oft Allergene mit höherer Authentizität entstehen.

Die *In-vivo*-Modifikation rekombinanter Proteine mit inseriertem Biotin ist bei der Herstellung von Antigenen, die in der Labordiagnostik Verwendung finden, von besonderem Interesse: Das Biotin wird während der Proteinsynthese mittels einer Biotin-Ligase eingebaut. Im Gegensatz zur chemischen *In-vitro*-Kopplung von Biotin an das fertige Protein wird *in vivo* an definierter Position biotinyliert und mögliche IgE-Epitope werden nicht durch die Biotinylierung funktioneller Aminosäurereste blockiert. Diese Methode wurde bei EUROIMMUN bereits in bakteriellen und Säugerzell-Expressionssystemen etabliert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die *In-vivo*-Biotinylierung in Hefezellen exemplarisch am Allergen Mal d 3 des Apfels (*Malus domestica*) etabliert werden. Dafür wurden zwei verschiedene Hefestämme mit vier Plasmidkonstrukten transformiert. Eines dieser Plasmidkonstrukte ermöglichte die Synthese von biotinyliertem Mal d 3 in beiden Hefestämmen. Die Expressions- und Synthesebedingungen wurden hinsichtlich Zusammensetzung des Mediums und der Expressionstemperatur optimiert, sodass die Ausbeute um Faktor 11 gesteigert wurde.

Die Ausweitung dieses experimentellen Ansatzes wird die Produktion biotinylierter Allergene in Hefezellen im industriellen Maßstab ermöglichen. Die Produkte werden an Streptavidinbeschichtete magnetische Beads gebunden und dienen als Festphase in Testsystemen für Hochdurchsatz-Laborautomaten.

Verfasser: Niklas Gero Luck
Betreuerinnen:
Erstkorrektur: Prof. Dagmar Willkomm
Zweitkorrektur: Dr. Maxi Cöster
Datum der Abgabe: 08.02.2019