

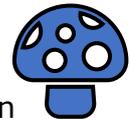
Menschenbilder

Aus dem Leben einer Hefe

Sommersemester 2024, Graz

Zum Thema der Sommerakademie „Menschenbilder“ wird ein biotechnologischer Blick auf den Menschen gerichtet als Züchter und Halter. „Aus dem Leben einer Hefe“ zeigt, wie Mensch und Hefe zusammenarbeiten, um das alltägliche Leben für unsere Mitmenschen zu verbessern.

Entdeckung und Geschichte der Hefe



Die Hefe „*Pichia pastoris*“ wurde 1956 in der Yosemite Region in Kalifornien aus Proben vom Gummifluss der Schwarzeiche isoliert. In ersten biotechnologischen Experimenten wurde ein Hefestamm damit entwickelt, der auf Methanol wachsen konnte, ein Alkohol der im Überfluss bei der Erdölraffinerie anfällt. Philips Petroleum kaufte diesen Stamm und entwickelte ihn weiter (*P. pastoris* CBS7435).

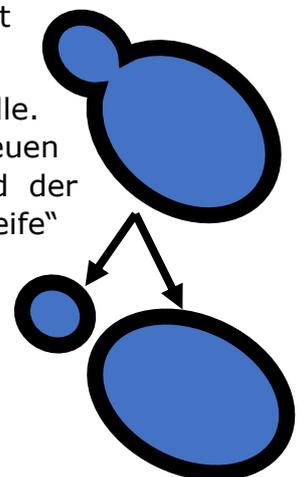
Aufgrund von großem Zellwachstum und hoher Proteinproduktion hielt *P. pastoris* internationalen Einzug in akademische Labore. Nach den ersten Genomsequenzierungen 1995 wurde sie von *P. pastoris* re-klassifiziert zu *Komagataella phaffii*.

Die Hefe *K. phaffii* gehört zu den Schlauchpilzen, genauer zur Familie der Saccharomycetaceae wo zum Beispiel auch die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) - bekannt von den Hefewürfeln aus dem Supermarkt - oder auch Bierhefe genannt, dazugehört (1, 2).

Die Hefezelle

Die Hefe *K. phaffii* kann verschiedene Kohlenstoffquellen nutzen um zu wachsen, zum Beispiel Glucose, Glycerin, Xylose, Ethanol, Methanol oder CO₂. Sie besitzt 4 Chromosomen; eine Hefezelle verdoppelt sich unter günstigen Umständen alle zwei Stunden. Dabei vermehrt sie sich über Sprossung/Knospung. *K. phaffii* ist also ein Sprosspilz/Knospenpilz.

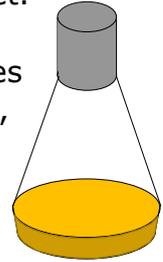
Die „Knospung“ beginnt mit einer kleinen Knospenbildung an der Mutterzelle. Die Mutterzelle vervielfacht ihre Zellorganellen und verteilt sie zur neuen Knospe. Nach einer erfolgreichen Zellkernteilung der Mutterzelle wird der zweite neue Zellkern ebenfalls auf die neue Knospe verteilt. Die nun „reife“ Knospe - oder auch Spross genannt - schnürt sich ab, es liegen zwei Zellen vor: eine Tochter- und eine Mutterzelle. Die Hefe hat sich verdoppelt (1).



Kultivierung

In Laboratorien wächst die Hefe in Voll- oder Minimalmedien, die alle wichtigen Nährstoffe enthalten, die die Hefe braucht um gut zu wachsen. Zur Steuerung des Hefemetabolismus gibt es Promotoren – dies sind Genelemente vor DNA-Abschnitten die zum Beispiel Protein-kodierende-Sequenzen regulieren. Das Protein wird also erst abgelesen, wenn der Promotor davor aktiv wird. Bei *K. phaffii* gibt es Promotoren die aktiv werden, sobald der Hefekultur Methanol zugesetzt wird. Diese Methanol-Pulse der Hefekultur werden als „Induktion“ oder im Laborjargon auch als „Füttern“ der Hefe bezeichnet.

In molekularbiologischen Laboren wird *K. phaffii* in 96-deep-well-plates kultiviert (Finalvolumen ungefähr 500 µL), in 50 mL Zentrifugenröhrchen, in 50 – 500 mL großen Schüttelkolben oder in kleinen Bioreaktoren bis zu 2 L. Im industriellen Maßstab wird die Hefe auch in großen Bioreaktoren bis zu 5'000 L gezüchtet (1).



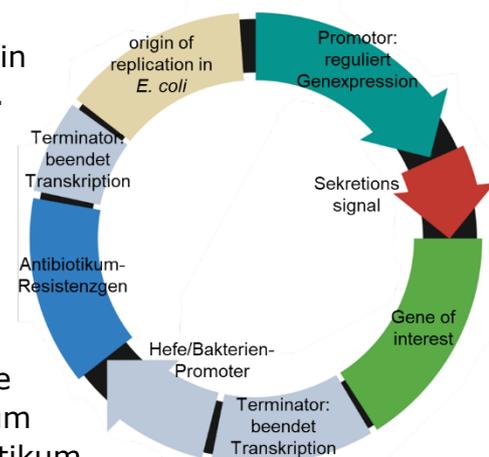
Genetische Modifizierung zur Proteinproduktion

Als Beispiel für den Alltag im Labor wird die genetische Modifizierung der Hefe dargestellt. Dazu wird zuerst eine einzelne Hefezelle benötigt, die aus einer Zellmasse isoliert werden muss um zufällige Mutationen und -kombinationen innerhalb der Zellkultur später zu vermeiden. Dafür gibt es den „Verdünnungsausstrich“, der mit einer Impföse auf einer Agarplatte durchgeführt wird. Nach zwei Tagen Wachstum der Hefe bei 28°C kann man mit einem bloßen Auge sichtbaren einzelnen Hefekolonie - die nur aus der Mutter- und ihren Töchterzellen besteht - weiterarbeiten.

Über die Behandlung mit einer Waschlösung entfernt man die Zellwand der Hefe, was sie sehr empfindlich macht aber auch empfänglich für die einzubringende DNA.

Das „Gene of interest“ welches für das gewünschte Protein kodiert, wird in Form eines Plasmids in die Hefezelle eingeführt. Dafür muss von dem Plasmid eine große Menge (bis zu 1 µg) in reiner Qualität vorhanden sein. Das Plasmid wird für eine große Ausbeute in Bakterienzellen vervielfältigt, daraus isoliert und über Filter aufgereinigt.

Bei einer Transformation, also einem Stromschlag von 2 kV, werden die Hefezellen geschockt, wobei Löcher in der Zellmembran entstehen. Durch diese kann das Plasmid in die Zelle gelangen. Nach einer Regenerationsphase in Zuckermedium werden die Hefezellen auf einem Vollmedium mit Antibiotikum ausgestrichen. Das Antibiotikum-Resistenzgen auf dem Plasmid hilft bei der Selektion von Hefezellen, die erfolgreich das Plasmid über ihre Zellmembran aufgenommen haben. Erfolgreich transformierte Hefezellen mit integriertem Plasmid können auf dem Antibiotikum wachsen, jene ohne dem Plasmid nicht. Wir haben einen Organismus genetisch modifiziert (1, 3, 5).



Proteinproduktion

Was nützt dieser Prozess? Interessante Proteine können in *K. phaffii* in großen Mengen produziert werden zu günstigen und energiesparenden Bedingungen. Die Kultivierung von genetisch modifizierten Pilzen ist eine sehr gängige Methode um z.B. Zitronensäure für die Lebensmittelindustrie zu gewinnen. Beispielsweise kommt mehr als 90% der Zitronensäure in Lebensmitteln nicht aus Zitronen sondern aus Pilzkultivierungen. Auch Proteine für Tierfutter, Milchproteine (zur Käseproduktion ohne Kuhmilch) und Antikörper können in Hefen produziert werden (3, 4).



Die genetische Modifizierung von Organismen ist also ein alltäglicher Prozess, ermöglicht den Erhalt und Weiterentwicklung unserer Lebensmittelindustrie, der Versorgung unserer Nutztiere und der Herstellung wichtiger Impfungen.

Quellen

Bilder: Kreiert mit Windows PowerPoint von Andrea Hönikl, MSc.

Literatur:

1. Pichia Protocols; Humana Press. James M. Cregg, 2007, Band 389.
2. pichiagenome-ext.boku.ac.at
3. Max B, Salgado JM, Rodríguez N, Cortés S, Converti A, Domínguez JM. Biotechnological production of citric acid. Braz J Microbiol. 2010 Oct;41(4):862-75. doi: 10.1590/S1517-83822010000400005. Epub 2010 Dec 1. PMID: 24031566; PMCID: PMC3769771.
4. Nylen A, Chen MT. Production of Full-Length Antibody by Pichia pastoris. Methods Mol Biol. 2018;1674:37-48. doi: 10.1007/978-1-4939-7312-5_3. PMID: 28921426.
5. Spohner SC, Müller H, Quitmann H, Czermak P. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with Pichia pastoris. J Biotechnol. 2015 May 20;202:118-34. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.01.027. Epub 2015 Feb 14. PMID: 25687104.
6. Hartner FS, Glieder A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. Microb Cell Fact. 2006 Dec 14;5:39. doi: 10.1186/1475-2859-5-39. PMID: 17169150; PMCID: PMC1781073.