

**Koproduktion pharmazeutischer Proteine und  
Hilfsfaktoren zur Optimierung mikrobieller  
Expressionssysteme bei Beschränkung auf ein  
einziges integratives Vektorsystem**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

vorgelegt durch Jens Klabunde  
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2003

**Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Referent: Prof. Dr. Cornelis P. Hollenberg  
Koreferent: Prof. Dr. Gerd Gellissen  
Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2003

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Transport sekretorischer Proteine in eukaryontischen Zellen</b>	<b>7</b>
1.1.1 Endoplasmatische Retikulum (ER)	9
1.1.2 Unfolded protein response (UPR)	9
1.1.3 Entfernung falsch gefalteter Proteine aus dem ER	9
1.1.4 Modifikationen sekretorischer Proteine im ER	10
1.1.5 Der Golgi-Apparat (Golgi)	11
1.1.6 Vesikulärer Transport vom Golgi zum Zielorganell	11
<b>1.2 Rekombinante Produktion in Hefen</b>	<b>12</b>
1.2.1 Lösungsansätze zur Optimierung der Sekretionseffizienz	12
<b>1.3 Biotechnologisch relevante Proteine</b>	<b>13</b>
1.3.1 Lactoferrin	13
1.3.2 Zytokine	14
1.3.2.1 IFN- $\beta$	14
1.3.2.2 IFN- $\gamma$	15
<b>1.4 Ribosomale DNA (rDNA)</b>	<b>15</b>
1.4.1 Integration in die rDNA zur heterologen Genexpression	15
1.4.2 Organisation der rDNA in Mikroorganismen	16
1.4.3 Nukleolus und nukleolarer Komplex	17
1.4.4 Rekombinationsprozesse am rDNA-Locus	18
1.4.5 Entstehung von extrachromosomalen Ringen (ERCs)	19
<b>1.5 <i>Hansenula polymorpha</i></b>	<b>20</b>
<b>1.6 <i>Arxula adenivorans</i></b>	<b>21</b>
<b>1.7 Ziele der Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN (M &amp; M)</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Stämme und Medien</b>	<b>23</b>
2.1.1 <i>E. coli</i> -Stämme	23
2.1.2 Medien und Anzucht von <i>E. coli</i>	23
2.1.3 <i>H. polymorpha</i> -Stämme	23
2.1.4 <i>A. adenivorans</i> -Stämme	24
2.1.5 <i>P. stipitis</i> -Stämme	24
2.1.6 <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	24
2.1.7 Medien und Anzucht von Hefestämmen	25
<b>2.2 Verwendete Plasmide</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Synthetische Oligonukleotide</b>	<b>27</b>
<b>2.4 Chemikalien und Enzyme</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Verwendete Antikörper</b>	<b>29</b>
<b>2.6 Transformationen</b>	<b>29</b>
2.6.1 Transformation von <i>E. coli</i>	29
2.6.2 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	29
2.6.3 Transformation von <i>A. adenivorans</i>	29
2.6.4 Transformation von <i>H. polymorpha</i>	29
2.6.5 Transformation von <i>P. stipitis</i>	29
2.6.6 Stamm-Stabilisierung	30

<b>2.7 Präparation und Behandlung von Nukleinsäuren</b>	<b>30</b>
2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30
2.7.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefen	30
2.7.3 DNA-Modifikationen	31
2.7.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
2.7.3.2 DNA-Restriktion	31
2.7.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	31
2.7.3.4 Ligation	31
2.7.3.5 Auffüllen oder Entfernen überstehender Enden	31
2.7.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.7.3.7 Sequenzierung von DNA	31
2.7.3.8 DNA- und Aminosäure-Sequenzvergleiche	31
2.7.3.9 Primer-Dimer Assoziation	32
2.7.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	32
2.7.5 Southern-Blot Analyse	32
2.7.6 PCR-Amplifizierung	33
2.7.6.1 PCR-Amplifizierung von genomischer oder Plasmid-DNA	33
2.7.6.2 PCR-Strategie zur Isolierung von Genen aus <i>H. polymorpha</i>	33
2.7.6.3 Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden	33
<b>2.8 Gewinnung und Behandlung von Proteinen für Western-Analysen</b>	<b>34</b>
2.8.1 Herstellung von Proteinextrakten aus <i>H. polymorpha</i>	34
2.8.2 Herstellung von Proteinextrakten aus <i>A. adeninivorans</i>	34
2.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.8.4 Elektrophoretische Trennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	34
2.8.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot Analyse	34
<b>2.9 Detektion der Reportergenprodukte</b>	<b>35</b>
2.9.1 GFP	35
2.9.2 Nachweis der Phytase-Aktivität	35
2.9.3 X-Gal-Overlay-Assay ( <i>lacZ</i> )	35
<b>2.10 Tetradenanalyse</b>	<b>36</b>
<b>2.11 Tropftest zur Auswertung von Wachstumsphänotypen</b>	<b>36</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Aufbau einer Spezies übergreifende Expressions-Plattform</b>	<b>37</b>
3.1.1 Sequenzierung der <i>H. polymorpha</i> rDNA	37
3.1.2 Konstruktion eines multifunktionalen Vektor-Systems	38
3.1.3 Funktionstest von pMr in <i>H. polymorpha</i> und <i>A. adeninivorans</i>	39
3.1.4 Auswirkungen einer modifizierten Integrationskassette	40
3.1.5 Phytase-Expression in mehreren Hefen	41
3.1.6 Kointegration von Reporter-Plasmiden in die rDNA von <i>A. adeninivorans</i>	42
3.1.7 Stabilität eines <i>A. adeninivorans</i> -Stammes mit kointegrierten Plasmiden	44
<b>3.2 Isolation von Genen aus dem sekretorischen Weg von <i>H. polymorpha</i></b>	<b>45</b>
3.2.1 Isolation eines <i>CNE1</i> (Calnexin) Homologen aus <i>H. polymorpha</i>	46
3.2.1.1 Vergleich von <i>S. cerevisiae</i> <i>CNE1</i> mit putativen <i>H. polymorpha</i> <i>CNE1</i>	46
3.2.1.2 Integration von <i>HpCNE1<sub>c-myc</sub></i> in einen <i>S. cerevisiae</i> <i>cne1</i> -Deletionsstamm	47
3.2.1.3 Funktionsanalyse von <i>HpCNE1<sub>c-myc</sub></i>	48
3.2.2 Isolation eines <i>KAR2</i> (BiP) Homologen aus <i>H. polymorpha</i>	49
3.2.2.1 Vergleich von <i>S. cerevisiae</i> <i>KAR2</i> mit putativen <i>H. polymorpha</i> <i>KAR2</i> ( <i>HpKAR2</i> )	49
3.2.2.2 Integration von <i>HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> in <i>S. cerevisiae</i> <i>kar2</i>	50
3.2.2.3 Funktionsanalyse von <i>HpKAR2<sub>c-myc</sub></i>	51

3.2.3 Isolation eines <i>PDI1</i> Homologen aus <i>H. polymorpha</i>	51
3.2.3.1 Vergleich von <i>S. cerevisiae PDI1</i> mit putativen <i>H. polymorpha PDI1</i>	51
3.2.3.2 Integration von <i>HpPDI1<sub>c-myc</sub></i> in <i>S. cerevisiae pdi1</i>	53
3.2.3.3 Funktionsanalyse von <i>HpPDI1<sub>c-myc</sub></i>	53
3.2.4 Isolation von SSO2 (Syntaxin) Homologen aus <i>H. polymorpha</i>	54
<b>3.3 IFN-<math>\gamma</math> Produktion in <i>H. polymorpha</i> und <i>A. adenivorans</i></b>	<b>55</b>
3.3.1 Expression von IFN- $\gamma$ in <i>H. polymorpha</i>	55
3.3.1.1 Integration eines Expressionsvektors für IFN- $\gamma$ in die rDNA von <i>H. polymorpha</i>	55
3.3.1.2 Bestimmung von IFN- $\gamma$ produziert in <i>H. polymorpha</i>	57
3.3.1.3 Kointegration von IFN- $\gamma$ mit drei <i>H. polymorpha</i> -Genen für Hilfsproteine	57
3.3.1.4 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN- $\gamma$ und <i>HpCNE1<sub>c-myc</sub></i>	59
3.3.1.5 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN- $\gamma$ und <i>HpKAR2<sub>c-myc</sub></i>	60
3.3.1.6 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN- $\gamma$ und <i>HpPDI1<sub>c-myc</sub></i>	60
3.3.1.7 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN- $\gamma$ und <i>HpSSO2<sub>c-myc</sub></i>	61
3.3.1.8 Bestimmung der Kopienzahlen kointegrierter Plasmidsequenzen	62
3.3.1.9 Expression von <i>HpCNE1<sub>c-myc</sub></i> , <i>HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> , <i>HpPDI1<sub>c-myc</sub></i> und <i>HpSSO2<sub>c-myc</sub></i>	66
3.3.1.10 IFN- $\gamma$ -Produktion bei koexprimierten Hilfsfaktoren	68
3.3.2 Produktion von IFN- $\gamma$ in <i>A. adenivorans</i>	70
3.3.2.1 Integration von Expressionsvektoren für IFN- $\gamma$ in die rDNA von <i>A. adenivorans</i>	70
3.3.2.2 Bestimmung von IFN- $\gamma$ produziert in <i>A. adenivorans</i>	72
3.3.3 Zusammenfassung der Resultate zur rekombinanten IFN- $\gamma$ Produktion	73
<b>3.4 IFN-<math>\beta</math> Produktion in <i>H. polymorpha</i> und <i>A. adenivorans</i></b>	<b>74</b>
3.4.1 Expression von IFN- $\beta$ in <i>H. polymorpha</i>	74
3.4.1.1 Integration von Expressionsvektoren für IFN- $\beta$ in die rDNA von <i>H. polymorpha</i>	74
3.4.1.2 Bestimmung von IFN- $\beta$ produziert in <i>H. polymorpha</i>	75
3.4.1.3 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN- $\beta$ und <i>HpCNE1<sub>c-myc</sub></i>	76
3.4.1.4 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN- $\beta$ und <i>HpKAR2<sub>c-myc</sub></i>	77
3.4.1.5 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN- $\beta$ und <i>HpPDI1<sub>c-myc</sub></i>	78
3.4.1.6 Bestimmung der Kopienzahlen kointegrierter Plasmidsequenzen	79
3.4.1.7 Expression von <i>HpCNE1<sub>c-myc</sub></i> , <i>HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> , und <i>HpPDI1<sub>c-myc</sub></i>	81
3.4.1.8 IFN- $\beta$ Produktion bei koexprimierten <i>HpCNE1<sub>c-myc</sub></i> und <i>HpKAR2<sub>c-myc</sub></i>	82
3.4.2 Expression von IFN- $\beta$ in <i>A. adenivorans</i>	82
3.4.2.1 Integration von Expressionsvektoren für IFN- $\beta$ in die rDNA von <i>A. adenivorans</i>	82
3.4.2.2 Bestimmung von IFN- $\beta$ produziert in <i>A. adenivorans</i>	84
3.4.3 Zusammenfassung der Resultate zur rekombinanten IFN- $\beta$ Produktion	84
<b>3.5 Produktion von Lactoferrin in <i>H. polymorpha</i> und <i>A. adenivorans</i></b>	<b>85</b>
3.5.1 Expression von Lactoferrin in <i>H. polymorpha</i>	85
3.5.1.1 Kointegration von Expressionsvektoren für Lactoferrin und <i>HpCNE1<sub>c-myc</sub></i>	85
3.5.1.2 Kointegration von Expressionsvektoren für Lactoferrin und <i>HpKAR2<sub>c-myc</sub></i>	86
3.5.1.3 Kointegration von Expressionsvektoren für Lactoferrin und <i>HpPDI1<sub>c-myc</sub></i>	87
3.5.1.4 Kointegration von Expressionsvektoren für Lactoferrin und <i>HpSSO2<sub>c-myc</sub></i>	87
3.5.1.5 Bestimmung der Kopienzahl kointegrierter Plasmidsequenzen	88
3.5.1.6 Expression von <i>HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> , und <i>HpPDI1<sub>c-myc</sub></i>	90
3.5.1.7 Lactoferrin Produktion bei koexprimierten <i>HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> , und <i>HpPDI1<sub>c-myc</sub></i>	90
3.5.2 Expression von Lactoferrin in <i>A. adenivorans</i>	91
3.5.2.1 Integration eines Lactoferrin-Vektors in die rDNA von <i>A. adenivorans</i>	91
3.5.2.2 Bestimmung von Lactoferrin produziert in <i>A. adenivorans</i>	92
3.5.3 Zusammenfassung der Resultate zur Lactoferrin-Produktion	93

<b>4 DISKUSSION</b>	<b>95</b>
<b>4.1 Untersuchungen zur rDNA-Integration</b>	<b>95</b>
4.1.1 Regulative Elemente in der rDNA	95
4.1.2 Einfluss der rDNA-Sequenz auf die Effizienz integrativer Vektoren	96
4.1.3 Die rDNA verschiedener Hefearten als konservierter Integrationslocus für Kointegration unterschiedlicher heterologer Sequenzen	96
4.1.4 Transkriptionales Silencing in der rDNA	97
<b>4.2 IFN-g Produktion in <i>H. polymorpha</i> und <i>A. adenivorans</i></b>	<b>97</b>
<b>4.3 Auswirkungen der Koproduktion von Hilfsfaktoren auf die IFN-g Sekretion</b>	<b>98</b>
4.3.1 <i>CNE1</i> -Überexpression in IFN- $\gamma$ -exprimierenden <i>H. polymorpha</i> -Stämmen	99
4.3.2 Überexpression von <i>HpKAR2</i> <sub>c-myc</sub> , <i>HpPDI1</i> <sub>c-myc</sub> oder <i>HpSSO2</i> <sub>c-myc</sub> in IFN- $\gamma$ -exprimierenden <i>H. polymorpha</i> -Stämmen	100
<b>4.4 Produktion von IFN-<math>\beta</math> in <i>H. polymorpha</i> und <i>A. adenivorans</i></b>	<b>100</b>
<b>4.5 Produktion von Lactoferrin in <i>H. polymorpha</i> und <i>A. adenivorans</i></b>	<b>101</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>103</b>
<b>6 ABKÜRZUNGEN</b>	<b>104</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>105</b>
<b>8 PUBLIKATIONEN</b>	<b>113</b>
<b>9 DANKSAGUNGEN</b>	<b>114</b>

# 1. Einleitung

Eine Vielzahl pharmazeutischer Produkte wie Hormone, Enzyme, Gerinnungsmodulatoren, Zytokine und Impfstoffe werden rekombinant mit Hilfe von Mikroorganismen hergestellt [Schmid, 2002]. In der gentechnischen Herstellung werden nach einer anfänglichen Beschränkung auf das Enterobakterium *Escherichia coli* [Hockney, 1994] in zunehmendem Maße eukaryontische Expressionssysteme genutzt. Die Nachteile des Bakteriums wie eine fehlende Sekretion und Glykosylierung sowie die Akkumulation biologisch inaktiver heterologer Substanzen in sog. "inclusion bodies" werden durch Nutzung eukaryontischer Expressionssysteme wie Hefen, filamentöser Pilze und Zellkulturen vermieden [Bennett, 1998; Gellissen, 2000]. Gentechnische Produktionsverfahren sind inzwischen als sichere und effiziente Alternativen zur chemischen Synthese oder Gewinnung aus Geweben, Blut oder anderen Sekreten etabliert [Gellissen und Melber, 1996]. Unterschiedliche Faktoren können hierbei die Produktquantität und -qualität beeinträchtigen. In spezifischen Verfahrensentwicklungen können jedoch Limitierungen durch eine Inkompatibilität von heterologem Produkt und dem Wirtsorganismus auftreten. Im Rahmen dieser Arbeit wird das Potenzial verschiedener Hefearten als Expressionssystem analysiert und weiterentwickelt. Insbesondere wird die Fähigkeit dieser Organismen überprüft Pharmaproteine zu sezernieren und der Versuch unternommen, auftretende Limitierungen durch Koexpression geeigneter Gene aufzuheben. Der Schwerpunkt der Arbeit besteht in der Evaluierung der methylotrophen Hefe *Hansenula polymorpha* und der dimorphen Hefe *Arxula adenivorans* [Hollenberg und Gellissen, 1997; Wartmann und Kunze, 2000]. Die Integration in die rDNA soll als Werkzeug zur Generierung von rekombinanten Stämmen genutzt werden. Der Einfluss der dabei eingesetzten rDNA-Sequenzen wird in Hinblick auf Expressionsraten, Kopienzahl und mitotische Stabilität der eingebrachten Fremdgene untersucht. Die Möglichkeit der Koexpression wird am Beispiel pharmazeutisch relevanter Proteine, kombiniert mit Hilfsfaktoren aus dem sekretorischen Weg, validiert. Als Vergleichsorganismus wurde die xylytische Hefe *Pichia stipitis* [Piontek *et al*, 1998] und als Modell-Organismus die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* in die Untersuchungen eingeschlossen [Gellissen und Hollenberg, 1997].

## 1.1 Transport sekretorischer Proteine in eukaryontischen Zellen

Ein wichtiges Merkmal eukaryontischer Zellen ist die Aufteilung in Membransumgeschlossene Kompartimente. Sortierungssignale dirigieren die zytosolischen Translationsprodukte zu ihren Bestimmungsorten in den verschiedenen Organellen. Es gibt mehrere Hauptrouten im endo- und exozytischen Proteintransport. Eine komplexe Maschinerie identifiziert die Sortierungssignale und dirigiert die Proteine an ihren Bestimmungsort. Für den Transport z.B. in Peroxisomen [Subramani, 1993], Mitochondrien [Bedwell *et al*, 1989], ER [Blobel und Sabatini, 1971] und Nukleus [Dingwall und Laskey, 1991] sind spezifische Aminosäuresequenzen bekannt. Neben dem durch derartige Signalsequenzen vermittelten Import von Proteinen in ihr Zielorganell gibt es den vesikulären Transport, bei dem die Hüllproteine eines Vesikels den Bestimmungsort festlegen. Ein Hauptweg im innerzellularen, Vesikel-vermittelten Transport ist der sekretorische Weg vom ER über den Golgi zur Plasmamembran (Abb. 1). Der exozytische Transportweg der Hefe *S. cerevisiae* zeigt große Ähnlichkeit mit dem sekretorischen Weg in Säugerzellen. In *S. cerevisiae* konnten über 100 Gene identifiziert werden, die in endo- oder exozytische Prozesse involviert sind.

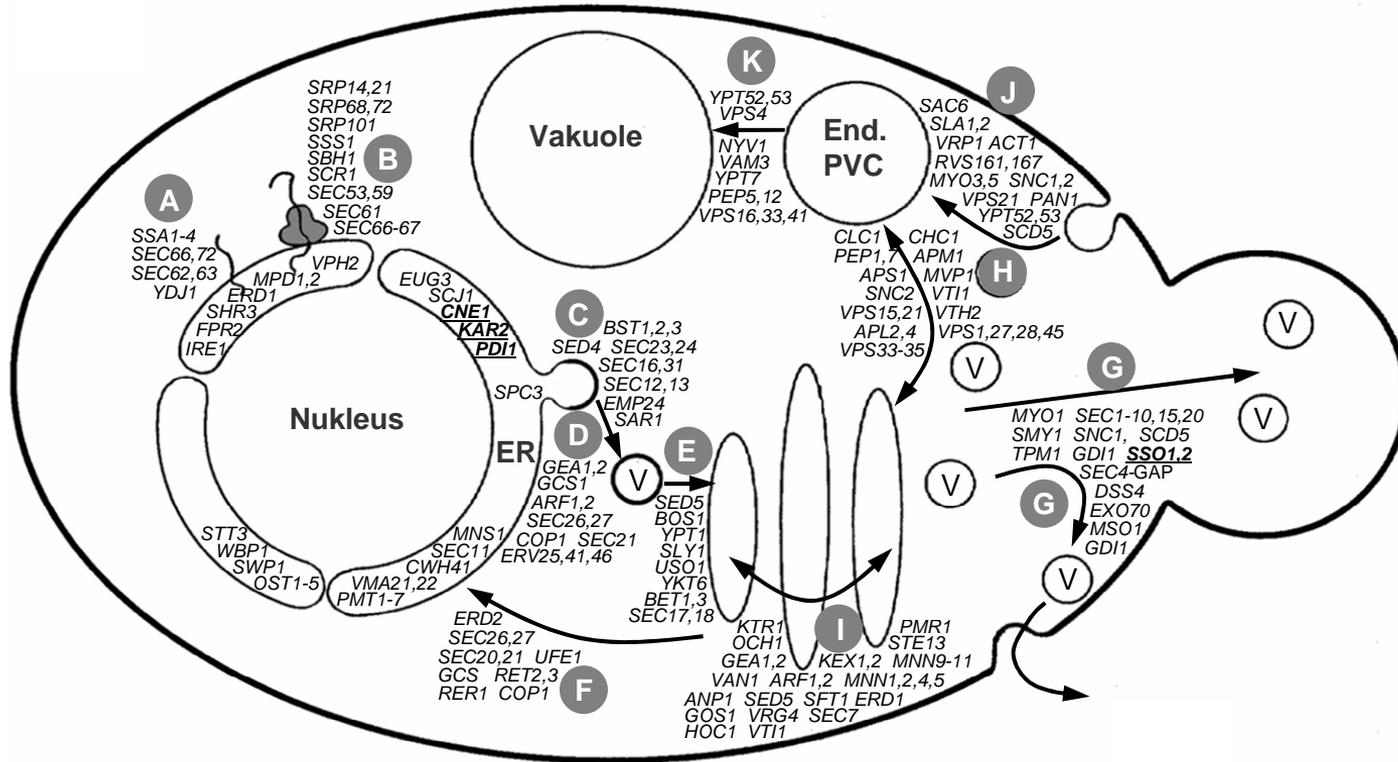


Abbildung 1: Modell einer Hefezelle mit Genen aus dem sekretorischen Weg von *S. cerevisiae*

Das Modell gibt einen Überblick der Transportwege innerhalb einer eukaryontischen Zelle und kennzeichnet die beteiligten Gene aus *S. cerevisiae*. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die endozytischen Transportwege. End.: Endosom; PVC: "pre-vacuolar compartment"; V: Vesikel; A: posttranslationale Translokation; B: kotranslationale Translokation; C: Vesikelknospung (COP II); D: anterograde Transport zum Golgi; E: Vesikel Fusion mit cis-Golgi; F: retrograde Transport zum ER (COP I); G: Sekretion und Fusion mit der Plasmamembran; H: vesikulärer Transport zwischen trans-Golgi und PVC/Endosom; I: vesikulärer Transport im Golgi; J: Endozytose; K: vesikulärer Transport in die Vakuole. Die fett gedruckten, unterstrichenen Gene kennzeichnen die in dieser Arbeit betrachteten Gene aus *H. polymorpha*. Aktualisiert nach: [Kaiser *et al*, 1997].

### 1.1.1 Endoplasmatische Retikulum (ER)

Um den exozytischen Transportweg einschlagen zu können, müssen die neu synthetisierten Proteine in das ER-Lumen importiert werden. Man unterscheidet zwei unterschiedliche Importformen, die sich gegenseitig ausschließen und von der Hydrophobizität der Signalsequenz abhängen [Ng *et al*, 1996]: Beim kotranslationalen Import bindet das SRP (signal recognition particle) an die aus dem Ribosom naszierende aminoterminalen Signalsequenz und bewirkt eine Verlangsamung oder Unterbrechung der Translation. Der SRP-Ribosom-Komplex diffundiert an die ER-Membran, wo SRP an den SRP-Rezeptor bindet. Durch Rezeptorvermittelte Hydrolyse von GTP dissoziiert SRP vom Signalpeptid ab, welches nun mit der Translokationsmaschienerie interagieren kann [Miller *et al*, 1993]. Darauf folgend kann das naszierende sekretorische Protein durch die Translokationspore (SEC61-Komplex) ins ER translatiert werden. Der zweite Weg, der posttranslationale Import in das ER-Lumen, erfolgt über den SEC62-/ SEC63-Komplex zur Translokationspore [Hanein *et al*, 1996]. Hierbei ist die treibende Kraft für den Import nach dem "pulling-model" die Hydrolyse von ATP, vermittelt durch Bindeprotein (BiP) [Glick, 1995]. Das BiP-Homolog Kar2p aus *S. cerevisiae* ist eine 74 kDa große ER-ständige Adenosintri-phosphatase und Calmodulin-abhängige (CMK2) Proteinkinase (HSP70-Familie) [Rose *et al*, 1989]. Das Protein übernimmt eine zentrale Rolle als Chaperon und Hitzeschock -Protein, wobei KAR2 in der UPR (unfolded protein response) reguliert wird. Kar2p erkennt falsch gefaltete Proteine und führt sie durch die Translokationspore (SEC61-Komplex) aus dem ER ( $\Rightarrow$ ERAD) [Mori, 2000]. Dabei dient das Chaperon bei ATP-Bindung als Verschluss des Translokationskanals [Matlack *et al*, 1997]. Durch Interaktion mit hydrophoben Bereichen unvollständig prozessierter Proteine oder Proteinkomplexe verhindert Kar2p deren Aggregation [Zimmermann, 1998].

### 1.1.2 Unfolded protein response (UPR)

Eine wichtige Funktion des ER liegt in der Qualitätskontrolle der translozierten Proteine [Ellgaard *et al*, 1999]. Bei der UPR erkennt in *S. cerevisiae* das Transmembranprotein Ire1p die Akkumulation unvollständig gefalteter Proteine und initiiert indirekt eine verstärkte Transkription ER-residenter Chaperone (z.B. *PDI1*, *KAR2*, *EUG1* und *FPR2*) [Hampton, 2003]. Dieses wird posttranskriptional (durch Spleißen von *HAC1*-mRNA) über eine erhöhte Verfügbarkeit des Transkriptionsfaktors Hac1p vermittelt [Mori, 2000]. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an die Promotoren der UPR-Gene mittels Interaktion mit einem sog. UPRE (UPR-element). Zusätzlich wird noch die Syntheserate von Membranlipiden durch Hac1p reguliert, um die Volumina der verschiedenen Zellkompartimente an die veränderten Bedingungen während der UPR anzupassen.

### 1.1.3 Entfernung falsch gefalteter Proteine aus dem ER

Um eine Akkumulation falsch gefalteter Proteine zu vermeiden, müssen diese effektiv aus dem ER entfernt werden. Der SEC61-Komplex hat eine duale Funktion im Import von Proteinen und als Translokationspore für den Export falsch gefalteter Proteine aus dem ER. Darauf folgend werden die Proteine durch den ERAD-Prozess (ER-associated protein degradation) abgebaut [Hampton, 2002]. Dabei werden falsch gefaltete Proteine von einer Glykosyltransferase erkannt, mit einem Glukoserest markiert und dem ERAD zugeführt. Der durch den SEC61-Komplex

vermittelte Import und Export von Proteinen unterscheidet sich mechanistisch. Für den Proteinimport werden Ssa1p, Kar2p und Hsp70p benötigt [Brodsky *et al*, 1999], wohingegen beim Export falsch gefalteter Proteine Kar2p, Erp57p und Cne1p (Calnexin in Säugern) mit der Translokationspore interagieren [Parlati *et al*, 1995].

#### 1.1.4 Modifikationen sekretorischer Proteine im ER

Sekretorische Proteine enthalten oft Disulfidbrücken, deren korrekte Assemblierung für die exakte räumliche Struktur des fertig gefalteten Proteins unerlässlich ist. Die Knüpfung und Lösung der Disulfidbrücken zwischen zwei Thiolresten der Substratproteine wird von der PDI (protein disulfid isomerase) im oxidativen Milieu des ER-Lumens katalysiert [Kaiser *et al*, 1997]. Die von der PDI vermittelte stetige Bildung und Lösung von Disulfidbrücken resultiert in der Ausformung des thermostabilsten Substrat-Konformers. Pdi1p aus *S. cerevisiae* [Noiva und Lennarz, 1992] ist ein 57 kDa großes Protein ( $\beta$ -Untereinheit der Prolyl-Hydroxylase mit  $\alpha_2\beta_2$  Quartärstruktur) [Pihlajaniemi *et al*, 1987]. Pdi1p wird von Ero1p in den oxidierten Zustand überführt um dann seinerseits das Zielprotein zu oxidieren. Das Protein spielt eine wichtige Rolle im Transport missgefalteter Proteine aus dem ER [Frard *et al*, 2000]. Dabei erkennt Pdi1p im Gegensatz zu Kar2p nicht große Aggregate, sondern einzelne missgefaltete Proteine und führt sie via SEC61-Komplex aus dem ER. *EUG1* und *MPD1* wurden als weitere ER-ständige Oxidoreduktasen in Hefen identifiziert [Norgaard *et al*, 2001].

Für CHO-Zellen wurden zwei parallel arbeitende Chaperonsysteme im ER gefunden, die für die Faltung und Glykosylierung neu synthetisierter Proteine verantwortlich sind: Glucane nahe dem Aminoterminus des naszierenden Proteins mobilisieren das Calnexin-/Erp57p-Chaperonsystem, während Proteine ohne diese Glucanmodifikation vom BiP-/PDI-Chaperonsystem prozessiert werden [High *et al*, 2000; Molinari und Helenius, 2000].

Die ersten Schritte der Glykosylierung finden kotranslational im ER statt. Auch erste sog. Trimm-Modifikationen der inneren "core"-Glykosylierung durch Glykosidase I/II werden im ER begonnen. Eine zentrale Rolle spielt hierbei der Calnexin-Zyklus [Ellgaard *et al*, 1999]. Calnexin (*CNX*) interagiert mit den Trimm-Intermediaten von N-glykosylierten Glykoproteinen [Hammond *et al*, 1994]. Aus einem Kreislaufprozess mit GT (Glykoprotein-Glykosyltransferase) und Glykosidase II werden die Glykoproteine erst freigesetzt, wenn das resultierende native Konformer von der GT nicht weiter reglykosyliert wird [Cannon und Helenius, 1999; Parker *et al*, 1995]. GT erkennt als Faltungssensor hydrophobe Bereiche in den unvollständig prozessierten Glykoproteinen analog zu anderen Chaperonen [Sousa und Parodi, 1995]. Fertig assemblierte und prozessierte Proteine verlassen das ER in 60 nm Vesikeln die mit dem cis-Golgi verschmelzen und so ihre Fracht weiterreichen.

Im Gegensatz zu höheren Eukaryonten konnte für *S. cerevisiae* kein Calnexin-Zyklus im ER lokalisiert werden [Fernandez *et al*, 1994; Jakob *et al*, 1998]. Das Calnexin Homolog in *S. cerevisiae*, (*CNE1*) ist ein N-glykosyliertes Transmembranprotein [de Virgilio *et al*, 1993]. Trotz der exklusiven Lokalisation im ER besitzt Cne1p kein bekanntes ER-Retentionssignal [Parlati *et al*, 1995]. Für *S. pombe* wurde ein Zusammenwirken des Calnexin-Homologs in einem Komplex mit BiP postuliert, der auch Protein-Protein Interaktionen mit unglykosylierten Proteinen zeigt [Jannatipour *et al*, 1998]. Im Hefe-Modell scheint die Funktion von Cne1p also weniger spezifisch zu sein als in Säugern.

### 1.1.5 Der Golgi-Apparat (Golgi)

Im Golgi werden weitere Modifikationen an den reifenden Proteinen durchgeführt. Die äußeren Oligosaccharide werden auf die "core"-Glucane übertragen. Im *S. cerevisiae* cis-Golgi katalysieren  $\alpha$ -1,6-Mannosyltransferasen (*OCH1*) initiale Kettenverlängerungen am core-Oligosaccharid. Im medialen Golgi kommt es zu  $\alpha$ -1,6 Kettenverlängerungen und  $\alpha$ -1,2 und  $\alpha$ -1,3 Verzweigungen in den äußeren Ketten, katalysiert durch verschiedene Mannosyltransferasen (*MNN*-Gene in *S. cerevisiae*) [Jungmann und Munro, 1998; Jungmann *et al*, 1999; Orlean, 1997]. Im TNG (trans Golgi network) wird entschieden, welches Ziel die Fracht aus dem Golgi nimmt. Es können zumindest drei Wege eingeschlagen werden: Weitertransport zur Plasmamembran, in die Vakuole oder Verbleib im Golgi. Aus dem TNG werden 80-100 nm Vesikel abgeschnürt um mit den Zielorganellen zu verschmelzen oder um als Zwischenlager der eingeschlossenen Fracht zu dienen.

### 1.1.6 Vesikulärer Transport vom Golgi zum Zielorganell

Der Transport zwischen den verschiedenen Organellen geschieht über vesikuläre Intermediate, die vom Ursprungsorganell abgeschnürt werden und mit dem Zielorganell fusionieren [Palade, 1975]. Die Hüllen dieser Transportvesikel tragen entscheidende Informationen für die Zielerkennung der Fracht [Bryant und Stevens, 1998]. Drei Klassen von Hüllen wurden identifiziert: COPI, COPII und Clathrin [Barlowe *et al*, 1994; Cosson und Letourneur, 1997; Pishvaei und Payne, 1998]. Durch Interaktion mit den eingeschlossenen Proteinen erkennen die Hüllproteine das Ziel ihrer Fracht [Sollner, 1995; Woodman, 1997]. Membrangebundene tSNARE und vSNARE (target/vesiculäre SNAP-receptor protein) bilden zusammen mit anderen Proteinen einen ternären Komplex [Ferro-Novick und Jahn, 1994], der die Verschmelzung der Membranen ermöglicht. Die beiden integralen Membranproteine Sso1p und Sso2p (Syntaxin-Homolog in *S. cerevisiae*) sind Vertreter der post-Golgi tSNARE's [Grote *et al*, 2000]. Die Proteine haben hohe Homologien zueinander und können sich wechselseitig funktionell ersetzen.

Bei der Sekretion löslicher Proteine scheint das Fehlen eines Sortiersignals die Vesikel vom trans-Golgi zur Plasmamembran zu leiten. Membrangebundene Proteine benötigen dagegen spezifische Signalsequenzen, um in die Plasmamembran gelangen zu können. Ein solches Sortierungsmerkmal kann die Länge der Transmembrandomänen darstellen: Transmembranproteine können nur in eine Membran inseriert werden, deren Abmessung zu der Länge der Transmembrandomänen passt. Dabei ist die Dicke der Membranen von Vakuole, Golgi und Plasmamembran unterschiedlich [Bretscher und Munro, 1993].

## 1.2 Rekombinante Produktion in Hefen

In einem biotechnologischen Verfahren ist die Sekretion des Produktes von erheblichem Vorteil. Wird das heterologe Protein in das umgebene Kulturmedium sezerniert, kann es aufgrund der Trennung von Zellmasse und Produktprotein besser aufgereinigt werden. Im Verlauf der Passage durch den sekretorischen Apparat werden posttranslationale Strukturen wie Glykosylierungen und Disulfidbrücken ausgebildet, welche für die Funktionsfähigkeit des Produkts mitentscheidend sind. Die Passage des sekretorischen Apparates hat sich oftmals als besondere Hürde in der Sekretion heterologer Proteine herausgestellt [Faber und Veenhuis, 2002]. In vielen Fällen verbleibt das Produkt nicht korrekt prozessiert im Zellinneren des Wirtsstammes [Agaphonov *et al*, 2002]. Für eine effiziente Sekretion müssen derartige Limitierungen umgangen werden (Tab. 1) oder das verwendete Expressions-System durch genetische Manipulationen an die Erfordernisse angepasst werden. Ein weiteres Problem resultiert aus der abweichenden Glykosylierung heterologer Proteine in Hefeexpressions-systemen. Die in *S. cerevisiae* beobachtete "high-mannose" Überglykosylierung [Nakayama *et al*, 1997] rekombinanter Glykoproteine führt zu abweichenden antigenen Eigenschaften [Ballou, 1990]. Bei einem eventuellen therapeutischen Einsatz würden derartige rekombinante Proteine mit Hefe-typischen Glykosylierung als Immunogene ein erhebliches Risiko darstellen. Verschiedene Ansätze wurden verfolgt, den sekretorischen Apparat von Hefen zu "humanisieren" [Chiba *et al*, 1998; Choi *et al*, 2003; Hamilton *et al*, 2003]. Dabei galt es unter anderem eine  $(\text{Man})_5 - (\text{GlcNAc})_2$  core-Glykosylierung zu erreichen, die im Golgi von Säugerzellen als Trimm-Intermediate vorliegen [Hubbard und Ivatt, 1981]. Diese core-Glykosylierung fungiert als Substrat der komplexen Glykosylierung höherer Eukaryonten.

### 1.2.1 Lösungsansätze zur Optimierung der Sekretionseffizienz

Durch Ersatz der ursprünglichen mikrobiellen Signalsequenzen wurde versucht die Sekretion zu steigern und eine intrazelluläre Retention des Produkts zu minimieren. Dabei wurden z.B.  $\alpha$ -Faktor- [Brake, 1989; Kjeldsen, 2000] oder Invertase-Signalpeptide [Harmsen *et al*, 1993] mit verschiedenen rekombinanten Proteinen fusioniert.

Ein anderer Weg zur Steigerung der Produktausbeute bei sezernierten Proteinen ist die Aktivierung oder Stilllegung bestimmter Faktoren im Produktionsorganismus, um einen potenziellen Flaschenhals im sekretorischen Weg zu erweitern. Es gibt verschiedene Beispiele, bei denen die Überexpression spezieller Gene die Sekretionseffizienz steigern konnten. Die Genprodukte dieser im Folgenden als Hilfsfaktoren bezeichneten Gene übernehmen im sekretorischen Apparat zentrale Funktionen. Tab. 1 gibt eine Übersicht aktueller Beispiele für die Koexpression von Hilfsfaktoren zusammen mit heterologen Genen. In der vorliegenden Arbeit soll dieser Ansatz auf das *H. polymorpha*-Expressionsystem übertragen werden. Gene aus dem sekretorischen Weg wurden gezielt isoliert und zusammen mit Genen für pharmazeutisch interessante Proteine überexprimiert.

Organismus	Donor	Produkt	Gen-/ Produkt	Faktor	Referen z
<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Killer-Toxin, $\alpha$ -Faktor, saure Phosphatase	<i>PSE1</i>	4	[Chow <i>et al</i> , 1992]
<i>S. cerevisiae</i>	Mensch/ <i>S. pombe</i>	Saure Phosphatase, platelet derived growth factor	<i>PDI1</i>	4/10	[Robinson <i>et al</i> , 1994]
<i>S. cerevisiae</i>	Mensch	Elafin (leukozyt elastase inhibitor)	Polyubiquitin	7	[Chen <i>et al</i> , 1994]
<i>S. cerevisiae</i>	Mensch	Prochymosin	<i>KAR2</i>	10-20	[Harmsen <i>et al</i> , 1996]
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Bacillus</i>	$\alpha$ -Amylase	<i>SSO1/2</i>	4-6	[Ruohonen <i>et al</i> , 1997]
<i>S. cerevisiae</i>	Mensch	ScFv (single chain antibody fragments)	<i>PDI1/KAR2</i>	2-8	[Shusta <i>et al</i> , 1998]
<i>S. cerevisiae</i>	Mensch	PTH (human parathyroid hormone)	<i>SSO2</i>	n.a.	[Vad <i>et al</i> , 1998]
<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. occidentalis</i>	Glukoamylase	<i>CDC33/CMK2</i>	8/ 7	[Farwick, 1998]
Insektenzellen	Mensch	SERT (Serotonintransporter)	Calreticulin ( <i>CNR</i> ) <i>CNX</i> , <i>PDI1</i>	3	[Tate <i>et al</i> , 1999]
<i>K. lactis</i>	Mensch	HSA (human serum albumin)	<i>PDI1/</i> Polyubiquitin	n.a.	[Bao und Fukuhara, 2001]
<i>A. niger</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Manganperoxidase	<i>CNX (A. niger)</i>	4-5	[Conesa <i>et al</i> , 2002]
Insektenzellen	<i>Drosophila</i>	H4-Kaliumkanäle	<i>CNX</i>	n.a.	[Higgins <i>et al</i> , 2003]

Tabelle 1: Beispiele für die Koexpression heterologer Gene und Hilfsfaktoren zur Produktionssteigerung

Die Tabelle gibt eine aktuelle Übersicht an Beispielen für die Überexpression spezifischer Gene aus dem sekretorischen Weg zur verbesserten Produktion rekombinanter Proteine. Die Faktoren kennzeichnen das Ausmaß der Produktionssteigerung. Die meisten Beispiele beziehen sich auf menschliche Proteine, produziert in *S. cerevisiae*.

## 1.3 Biotechnologisch relevante Proteine

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl pro- und eukaryontischer Expressionssysteme etabliert, um neue oder modifizierte Pharmaprodukte in Mikroorganismen oder Zellkulturen herzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurden drei kommerziell interessante menschliche Proteine betrachtet, bei deren Produktion und Sekretion in *H. polymorpha* erhebliche Limitierungen auftraten.

### 1.3.1 Lactoferrin

Das 78 kDa große glykosylierte Protein ist ein ubiquitärer Bestandteil menschlicher Sekrete. In hohen Konzentrationen findet es sich im Colostrum (frühe Muttermilch). Klinisch eingesetzt wird das aus Muttermilch aufgereinigte Lactoferrin hauptsächlich als Supplement der Frühgeborenen-Nahrung [Schmid, 2002]. Analog dazu wird bovines Lactoferrin in der Tierzucht als Futter-Zusatz eingesetzt. Verschiedene bakterizide und allgemein immunstimulierende Wirkungen sind für Lactoferrin bekannt, die genauen Wirkungsmechanismen wurden für einige Beispiele untersucht:

- Möglichkeit der Komplexbildung von  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , wodurch pathogenen Organismen das vielfach essentielle Eisen entzogen wird.
- Eindämmende Wirkung von Lactoferrin auf die Etablierung von Biofilmen z.B. des Lungeninfekt-Erregers *Pseudomonas aeruginosa* [Singh *et al*, 2002; Whitchurch *et al*, 2002].
- Depolarisierende Wirkungsweise von bovinem Lactoferrin auf Zellwände von *E. coli* [Ulvatne *et al*, 2001].
- Aktivierung des CD4-Oberflächenantigen in T4-Zellen über eine MAP-Kinase abhängige Signaltransduktion in menschlichen Zellen [Dhennin-Duthille *et al*, 2000].
- Adhäsions-Verhinderung enteropathogener *E. coli*-Stämme an HeLa-Zellen [de Araujo und Giugliano, 2001].

Dem hohen Bedarf an menschlichem Lactoferrin steht die sehr kostenaufwändige Gewinnung aus dem nur im geringen Umfang verfügbaren Colostrum entgegen. Dabei besteht ein hohes Risiko eventueller Kontaminationen mit Viren oder Prionen. Diese Gegebenheit führte zu verschiedenen Ansätzen der rekombinanten Produktion von Lactoferrin in transgenen Tieren [Kim *et al*, 1999; van Berkel *et al*, 2002], Zellkulturen [Salmon *et al*, 1997], Mikroorganismen [Ward *et al*, 1992] und Pflanzen [Suzuki *et al*, 2003].

### 1.3.2 Zytokine

Zytokine sind regulative Peptide mit pleiotropischen Effekten auf hämatopoetische Zellen [Fitzgerald *et al*, 2001]. In diese große Gruppe fallen die Lymphokine, Monokine, hämatopoetische Faktoren, chemotaktische Chemokine, Bindegewebs-Wachstumsfaktoren und Interferone [Thomson, 1998]. Interferone (IFN's) können in zwei Klassen aufgeteilt werden. Typ I Interferone werden von Leukozyten und Fibroblasten sezerniert (z.B. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ), wohingegen Typ II Interferone (z.B. IFN- $\gamma$ ) von T-Lymphozyten gebildet werden. Beide Typen binden an den gleichen Rezeptor, unterscheiden sich aber in den Auswirkungen auf die stimulierten Zellen [Aufdembrinke *et al*, 2001]. Die meisten Zytokine wirken zytokrin oder autokrin über sehr kurze Distanzen. Zytokine werden in speziellen Ausnahmesituationen ausgeschüttet, um das Immunsystem zu aktivieren oder Reparaturmechanismen auszulösen. Eine Vielzahl von Anwendungen der verschiedenen Zytokine in der Trauma- und Krebstherapie werden erforscht oder sind schon etabliert [Arnaud, 2002]. Bei der rekombinanten Produktion von Zytokinen [Schmid, 2002] treten verschiedene Probleme auf. Bei der heterologen Expression in Bakterien kommt es z.B. zu Fehlern in der Faltung, zu fehlender Glykosylierung und zum Verbleib des Produktes in sog. "inclusion bodies" in den Zellen [Langer und Pestka, 1984]. Die fehlende Glykosylierung verringert die Löslichkeit, was in höheren Dosierungen von Pharmazeutika resultiert und somit die Nebenwirkungen erheblich steigert. Die Kultivierung von Säugetierzellen zur rekombinanten Produktion von Zytokinen ist kostenintensiv und birgt die Gefahr potenzieller viraler Kontaminationen [Walsh, 2000].

#### 1.3.2.1 IFN- $\beta$

Menschliches IFN- $\beta$  inhibiert als Zytokin die Zell-Proliferation und moduliert die Expression der MHC-Komplexe (class I). Das Protein ist in seiner reifen Form 166 Aminosäuren lang und einfach N-glykosyliert, wobei das 20 kDa große Proteine eine Disulfidbrücke ausbildet [Pestka *et al*, 1987]. Rekombinantes IFN- $\beta$  wird in der Behandlung der schubförmig verlaufenden multiplen Sklerose (seit 1999 auch für die sekundär progrediente multiplen Sklerose) eingesetzt. IFN- $\beta$  wirkt immunstimulierend, wobei die Synthese von IFN- $\gamma$  unterdrückt wird, welches bei der Multiplen Sklerose pathogenetisch eine wichtige Rolle spielt [Weinstock-

Guttman und Jacobs, 2000]. Betaferon<sup>®</sup> (IFN- $\beta_{1b}$ ) wird in *E. coli* produziert, wobei die Aminosäure Cystein<sub>17</sub> durch Serin<sub>17</sub> ausgetauscht wurde. Des Weiteren werden zwei glykosylierte IFN- $\beta_{1a}$ -Varianten in CHO-Zellen produziert (Avonex<sup>®</sup> und Rebif<sup>®</sup>). Diese glykosylierten Varianten zeigen gesteigerte pharmakologische Aktivität, welche auf eine erhöhte Resistenz des Peptids gegen proteolytische Degradation zurückzuführen ist. Dieses beruht auf der Glykosylierungs-abhängigen strukturellen Stabilität des Peptids [Karpusas *et al*, 1998; Runkel *et al*, 1998].

### 1.3.2.2 IFN-g

Menschliches IFN- $\gamma$  wird primär von aktivierten T-Zellen gebildet und zusammen mit Interleukin-2 freigesetzt. Als Zytokin wirkt IFN- $\gamma$  auf benachbarte Makrophagen und Monozyten. Das Peptid ist weniger antiviral als die Typ I-Interferone, besitzt jedoch eine sehr viel stärkere antiproliferative und immunmodulierende Aktivität [Billiau, 1996]. IFN- $\gamma$  ist ein zweifach glykosyliertes, 146 Aminosäure langes homodimeres Protein. IFN- $\gamma_{1b}$  wird in *E. coli* rekombinant produziert (Actimmune<sup>®</sup>) [Nishi *et al*, 1985]. Bei diesem nicht glykosylierten Produkt fehlen insgesamt 6 Aminosäuren. Es ist für die Behandlung chronische Granulomatose zugelassen und wird in der Langzeitbehandlung von Osteoporose eingesetzt [Key *et al*, 1995]. Der Einfluss der fehlenden Glykosylierung auf die biologische Aktivität und Stabilität von rekombinanten IFN- $\gamma$  wird diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine fehlende N-Glykosylierung die Sensitivität von IFN- $\gamma$  gegen proteolytische Degradation erhöht [Sareneva *et al*, 1995].

## 1.4 Ribosomale DNA (rDNA)

In Eukaryonten sind die Gene für die ribosomalen RNA's (rRNA) als Cluster von 40 bis 200 identischen repetitiven Transkriptionseinheiten organisiert [Philippsen *et al*, 1991] und werden im Folgenden als rDNA-Einheiten bezeichnet. Die sehr hohe Kopienzahl für die rRNA-Gene steht im Zusammenhang mit dem hohen Bedarf an Ribosomen, die bis zu 15% der Zellmasse ausmachen können. Die rDNA-Kopienzahl korreliert dabei in vielen Fällen mit der Genomgröße und ist ein spezifisches Merkmal eines jeden Organismus [Long und Dawid, 1980].

### 1.4.1 Integration in die rDNA zur heterologen Genexpression

Vor einigen Jahren wurde die Integration heterologer Gensequenzen in die rDNA als Methode für verschiedene Mikroorganismen etabliert. Dabei wurden unterschiedliche Abschnitte der jeweiligen rDNA-Sequenzen als Integrationselemente zur homologen Rekombination eingesetzt. Es konnten in vielen Fällen mitotisch stabile rekombinante Stämme mit hoher Produktivität für verschiedenste heterologe Proteine generiert werden (Tab. 2). Als Selektionsmarker wurden sowohl Gene zur Komplementation einer Auxotrophie als auch dominante Selektionsverfahren eingesetzt.

Genus	Gen (Genprodukt)	Marker	rDNA	Kopien	Referenz
<i>S. cerevisiae</i>	$\alpha$ -Amylase	<i>TRP1</i> -d	NTS2	50-100	[Nieto <i>et al.</i> , 1999]
<i>S. cerevisiae</i>	–	<i>LEU2</i> -d	versch.	>300	[Lopes <i>et al.</i> , 1996; Lopes <i>et al.</i> , 1991; Lopes <i>et al.</i> , 1989]
<i>K. lactis</i>	humanes Lysozym	<i>HIS3</i>	25S	4-40	[Rossolini <i>et al.</i> , 1992]
<i>K. lactis</i>	$\alpha$ -Galactosidase	<i>TRP1</i>	25S	60	[Bergkamp <i>et al.</i> , 1992]
<i>Candida utilis</i>	–	Cyloheximid <sup>R</sup>	n.d	6-10	[Kondo <i>et al.</i> , 1995]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>lacZ</i> , extrazelluläre Protease	<i>URA3</i> -d4	ETS/18S	3-40	[Juretzek <i>et al.</i> , 2001; Le Dall <i>et al.</i> , 1994]
<i>Pichia ciferrii</i>	endogenes tetraacetyl Phytosphingosine	Cyloheximid <sup>R</sup>	NTS2	5-7	[Bae <i>et al.</i> , 2003]
<i>Phaffia rhodozyma</i>	–	Geneticin <sup>R</sup>	ETS/18S	60	[Wery <i>et al.</i> , 1997]
<i>A. adenivorans</i>	<i>lacZ</i>	Hygromycin B <sup>R</sup>	25S	2-10	[Rösel und Kunze, 1998; Wartmann und Kunze, 2000]
<i>H. polymorpha</i>	GFP, <i>lacZ</i> , Phytase, humanes Insulin	<i>URA3</i>	25S/ NTS	5-50	[Klabunde <i>et al.</i> , 2002]

Tabelle 2: Aktuelle Übersicht zur heterologen Genexpression in Hefen mittels rDNA-Integration

### 1.4.2 Organisation der rDNA in Mikroorganismen

Für Hefen wurden rDNA-Kopienzahlen zwischen 50 und 200 pro Genom gefunden [Maleszka und Clark-Walker, 1993]. In unterschiedlichen Stämmen einer Spezies schwankt die Kopienzahl der rDNA-Einheiten teilweise bis um den Faktor zwei [Warner, 1989]. Für *H. polymorpha* wurde eine rDNA-Kopienzahl von ca. 50 ermittelt [Klabunde *et al.*, 2002], wobei alle Kopien auf Chromosom II liegen [Waschk *et al.*, 2002]. In *S. cerevisiae* sind bis zu 150 Kopien der rDNA-Einheiten auf Chromosom XII lokalisiert [Petes, 1979; Warner, 1989]. Gene für eine 18S, 5.8S oder 25S rRNA-Spezies sind zu Transkriptionseinheiten zusammengefasst, die durch nicht-kodierende Sequenzen (ETS/ ITS) unterbrochen werden (Abb. 2 B). RNA-Polymerase I (im Folgenden als Pol. I bezeichnet) transkribiert eine Vorläufer-rRNA (prä-rRNA bzw. Precursor). Dieser Precursor wird durch Spleißen in die reifen rRNA's überführt. Der kodierende Bereich für die 5S Untereinheit liegt in einigen Fällen innerhalb der rDNA-Einheit wie z.B. in *H. polymorpha* [Klabunde *et al.*, 2002], *S. cerevisiae* [Johnston *et al.*, 1997] und *Ashbya gossypii* [Wendland *et al.*, 1999]. In anderen Mikroorganismen und Hefen, z.B. bei *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger* und *Schizosaccharomyces pombe* [Garber *et al.*, 1988; Maleszka und Clark-Walker, 1993], ist die Organisation vergleichbar derjenigen in höheren Eukaryonten und Säugern. Hier liegen die 5S rDNA-Sequenzen außerhalb der rDNA-Einheiten als Cluster von tandemförmig angeordneten Strukturen vor [Srivastava und Schlessinger, 1991]. Die 5S rDNA wird in Eukaryonten von der RNA-Polymerase III (Pol. III) transkribiert. In Säugern sind, im Unterschied zu den Hefen, die rDNA-Einheiten zu mehreren Clustern zusammengefasst, die auf verschiedene Chromosomen verteilt sind (Abb. 2 C). Im Menschen gibt es insgesamt 200 Kopien, verteilt auf 5 Cluster über 5 verschiedenen Chromosomen [Long und Dawid, 1980]. Die nicht kodierenden Sequenzabschnitte zwischen den rRNA-Genen (ETS, NTS und ITS) spielen eine wichtige Rolle in der Regulation und der Prozessierung des großen prä-rRNA Transkripts (30S, 35S oder 45S Precursor), welches zu den reifen rRNA-Untereinheiten prozessiert wird.

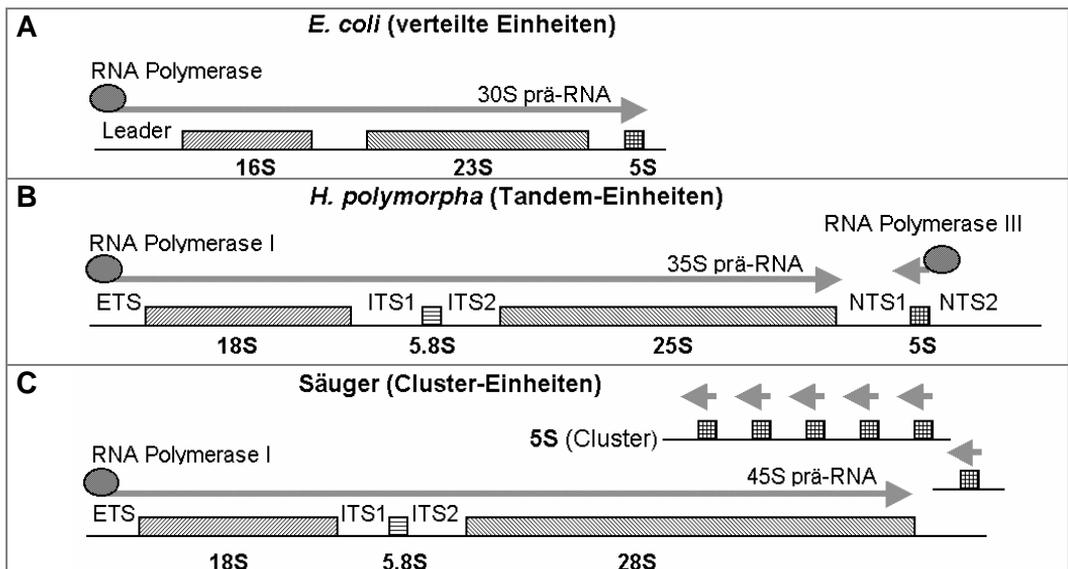


Abbildung 2: Organisation der rRNA-Gene von Prokaryonten, Hefen und Säugern.

Die Transkriptionseinheiten für den rRNA Precursor variieren je nach Organismus in Länge, Anordnung und Verteilung auf das Genom. **A:** Bei *E. coli* verteilen sich die Transkriptionseinheiten über das gesamte Genom [Schaferkordt und Wagner, 2001]. Eine Transkriptionseinheit umfasst drei Gene für die 16S, 23S und 5S rRNAs. In Hefen liegen die 18S, 5.8S und 25S rRNA-Gene ebenfalls gekoppelt als Transkriptionseinheit vor. Das 5S rRNA-Gen wird unabhängig vom 35S Precursor in entgegengesetzter Richtung von Pol. III transkribiert. **C:** In Säugern, einigen Hefen und vielen Eukaryonten befindet sich die 5S rDNA außerhalb der Transkriptionseinheit. Die DNA-Sequenzen sowohl für den 45S Precursor als auch für die 5S rDNA liegen in mehreren Clustern über das Genom verteilt vor.

### 1.4.3 Nukleolus und nukleolarer Komplex

Während der Transkription kondensieren zu Schleifen geformte rDNA-Einheiten zu einer sichtbaren Struktur, dem Nukleolus [Melese und Xue, 1995; Scheer und Weisenberger, 1994]. Der Nukleolus enthält darüber hinaus dicht gepackte rRNAs, Proteine des Pol. I-Komplexes, Transkriptions-Faktoren, nukleolare Proteine und verschiedene kleine nukleolare RNAs (snoRNA). In *S. cerevisiae* ist die RNA Polymerase I (Pol I) von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Nukleolus-Struktur [Oakes *et al*, 1998; Oakes *et al*, 1993]. In *S. cerevisiae* hat der Nukleolus direkten Kontakt zur Nukleus-Hülle und bildet eine halbmondförmige, weniger kompakte Struktur als bei höheren Eukaryonten. Hier ist der Nukleolus nicht mit der Kernmembran assoziiert [Bourgeois und Hubert, 1988]. Bei der Adhäsion des Nukleolus an die Kernmembran spielen sowohl flankierende Bereiche der rDNA als auch die den Transkriptionskomplex bindende Chromatinstruktur eine entscheidende Rolle [Oakes *et al*, 1998]. Durch die tandemförmige Anordnung der rDNA-Einheiten in viele gleichgerichtete Kopien kommt es zu einer weiten Ausdehnung des Nukleolus über die Kernmembran (Abb. 3). Unterstützt wird dieses Modell durch die Beobachtung, dass in *S. cerevisiae* die Nukleolus-Struktur erheblich verändert wird, wenn der 35S Precursor episomal transkribiert wird. In diesen Stämmen wurden verstreute granuläre Nukleolus-Strukturen mit Kernhüllen-Kontakt beobachtet [Trumtel *et al*, 2000]. Die Prozessierung des 35S Precursors zu reifen RNAs erfolgt in großen Protein-RNA Komplexen, den sog. nukleolaren Komplexen (Abb. 3). Die zu "hairpin"-Strukturen kondensierten Introns (ETS/ ITS) des 35S Precursors vermitteln den Kontakt zu einem

mindestens 20 Proteine großen RAC-Komplex (ribosomes assembly chaperone) [Lalev *et al*, 2000]. Dabei bindet RAC simultan alle vier nicht-kodierenden Sequenzen des 35S Precursors [Lalev und Nazar, 2001]. Nukleasen spleißen das große Primär-Transkript in die reifen rRNAs [Spasov *et al*, 2002]. Die snoRNA-Moleküle übernehmen hierbei eine Art der Qualitätskontrolle der ribosomalen Biogenese durch Methylierung und Pseudouridin-Konversion des naszierenden 35S Precursors [Lane und Tamaoki, 1967; Song und Nazar, 2002].

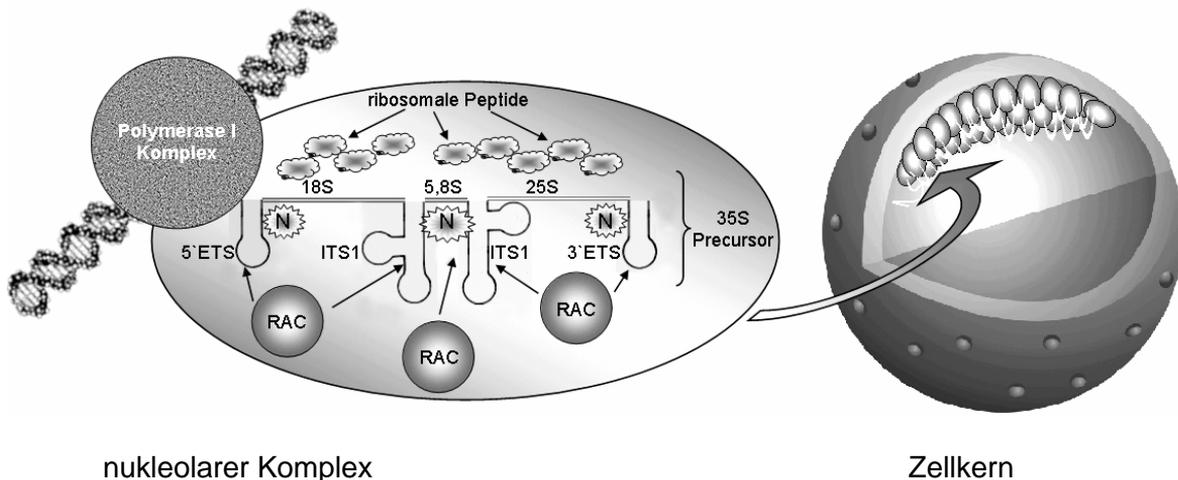


Abbildung 3: Modell des nukleolaren Komplexes und der Ausbildung des Nukleolus in Hefen

Tranktionsbegleitend wird der 35S Precursor von verschiedenen Proteinen und snoRNAs prozessiert. RAC-Proteinkomplexe binden an die Haarnadel-Strukturen der nicht kodierenden Sequenzen (ETS/ ITS), dabei spleißen Nukleasen (N) das Primär-Transkript zu reifen rRNAs. Parallel dazu werden die ribosomalen Polypeptide an die entsprechenden rRNA-Strukturen geföhrt, um die Assemblierung der reifen ribosomalen Untereinheiten zu vervollständigen. Während der Transkription bilden die repetitiven rDNA-Sequenzen Schleifen, die mit dem nukleolaren Komplex assoziiert sind. Die Gesamtheit aus Transkriptionskomplex, Transkriptionsfaktoren, rDNA-Sequenzen und nukleolaren Komplexen bildet den Nukleolus. Dieser ist im Fall von *S. cerevisiae* sichelförmig an die innere Kernmembran assoziiert.

#### 1.4.4 Rekombinationsprozesse am rDNA-Locus

Als erste Elemente, die für die rekombinogenen Eigenschaften der rDNA verantwortlich zu sein schienen, wurden zwei sog. *HOT1* (hot spot of recombination) Sequenzen in den NTS (non transcribed spacer) Bereichen beschrieben. Die beiden nur zusammen funktionalen *HOT1* I- und E-Elemente vermitteln rekombinatorische Prozesse außerhalb der rDNA [Elion und Warner, 1986; Keil und Roeder, 1984]. Innerhalb des *HOT1* E-Elements liegt der RFB (replication fork block). Der RFB ist eine spezifische Nukleotidsequenz von ca. 70 bp und liegt 330 bp stromabwärts des 35S Transkriptionsendes [Kobayashi und Horiuchi, 1996; Wai *et al*, 2000]. Das Protein Fob1p interagiert mit RFB und verursacht einen Halt in der Vorwärtsbewegung der DNA-Polymerase I, wenn diese entgegengesetzt zur Transkriptionsrichtung des 35S Precursors voranschreitet. Auf diese Weise gewährleistet an RFB gebundenes Fob1p die unidirektionale Replikation der rDNA in Transkriptionsrichtung des 35S Precursors [Brewer *et al*, 1992; Kobayashi und Horiuchi, 1996]. Durch die Unterbrechung der Replikation am RFB kommt es verstärkt zu DNA-Doppelstrangbrüchen, die wiederum Rekombinationsprozesse einleiten (Abb. 4). Sequenz- und Strukturhomologien zwischen Fob1p und retroviralen Integrasen legen die Vermutung nahe, dass Fob1p am RFB als Endonuklease fungiert [Dlagic,

2002]. Die gehäuften Rekombinationsereignisse am rDNA-Locus erklären die beobachteten Kopienzahlvariationen der rDNA-Einheiten. Abb. 4 verdeutlicht den Mechanismus der Kopienzahlexpansion von rDNA-Einheiten [Szostak *et al*, 1983]. In jeder rDNA-Einheit von *S. cerevisiae* und *S. pombe* wurden eine ARS (autonomously replicating sequence) mit je drei GTT TAT GTT TT-Konsensus-Sequenzen identifiziert. Die hohe Dichte an ARS-Sequenzen am rDNA-Locus zusammen mit der RFB-Aktivität ist der Hauptgrund für die gefundene hohe Rekombinationshäufigkeit [Brewer und Fangman, 1988; Linskens und Huberman, 1988].

Abbildung 4: RFB abhängige rDNA-Expansion

Das Modell [Kobayashi *et al*, 1998] zeigt drei repetitive rDNA-Einheiten mit den Replikations-Ursprüngen (ori 1-3). 35S-1/ -2/ -3 kennzeichnet den 35S Precursors einer jeden rDNA-Einheit.

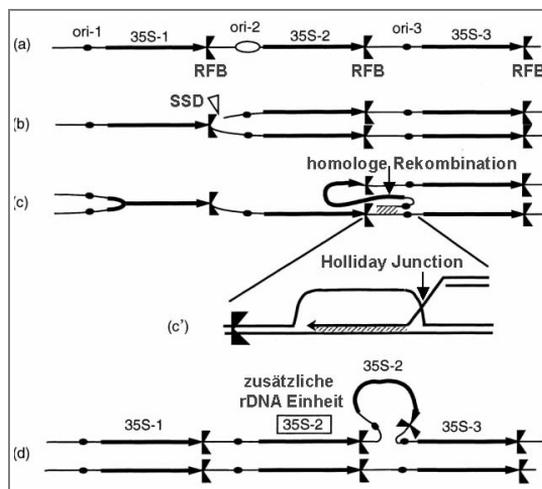
**a:** An ori2 startet die Replikationsgabel in beide Richtungen und stoppt am RFB. Nur jede dritte ARS-Sequenz in der rDNA wird als "origin" in einer gegebenen S-Phase genutzt.

**b:** Beim Stillstehen der DNA-Polymerase I am RFB wird durch Endonuklease-Aktivität der exponierte DNA-Einzelstrang (SSD) gespalten.

**c:** Das resultierende Doppelstrang-Ende rekombiniert mit der homologen Sequenz eines Schwesterchromatids.

**c':** Nach Auflösen der "Holliday Junction" bildet sich eine neue Replikationsgabel, die sich mit der stromaufwärts startenden Replikationsgabel vereinigt.

**d:** Die obere der resultierenden Schwesterchromatiden trägt eine zusätzliche rDNA-Einheit.



### 1.4.5 Entstehung von extrachromosomalen Ringen (ERCs)

Im Gegensatz zu prokaryontischen Mikroorganismen ist die Teilungsfähigkeit von Hefezellen limitiert. Eine Hefezelle kann im Normalfall nicht mehr als 20-30 Knospen bilden, danach verlieren die Mutterzellen ihre Teilungsfähigkeit [Hekimi und Guarente, 2003]. Entgegen der Situation im Menschen scheint die Verkürzung der Telomere kein entscheidender Faktor im Alterungsprozess von Hefen darzustellen. Vielmehr sind rekombinatorische Prozesse an den rDNA-Loci direkt mit Hefe-typischen Alterungsprozessen verknüpft. Die Expansion und Reduktion der Kopienzahl an rDNA-Einheiten wird durch die in Kapitel 1.4.4 beschriebenen Mechanismen am RFB ermöglicht [Defossez *et al*, 1999; Kobayashi *et al*, 1998]. Überträgt man das gezeigte Modell (Abb. 4) auf intra-chromosomale Rekombinationen, so kann die Bildung von rDNA-haltigen extrachromosomalen Ringen (ERCs), die aus dem Tandem-Arrangement der rDNA herausgenommen werden, erklärt werden. Das Vorhandensein von bis zu 1000 ERCs in alternden Hefezellen, die durch Exzision aus der rDNA mehr und mehr akkumulieren, ist ein wichtiger Alterungsindikator und -Auslöser [Sinclair und Guarente, 1997]. ERCs verteilen sich asymmetrisch auf die Mutterzellen. Tochterzellen von jungen Mutterzellen sind absolut ERC-frei. Ein sichtbarer Hinweis auf sich anhäufende zirkuläre DNA ist die Fragmentierung des Nukleolus in alternden Hefezellen, vergleichbar mit Zellen, in die viele Kopien rDNA tragender Plasmide eingebracht wurden [Nierras *et al*, 1997]. Da ERCs eine oder mehrere Kopien einer rDNA-Einheit tragen, können sie sich aufgrund der in jeder NTS-Sequenz vorhandenen ARS-

Sequenz (Abb. 4) selbsttätig vermehren. Unabhängig von der ERC-Bildung wurden Faktoren bestimmt, die über verstärkt auftretende Rekombinationsereignisse zu einer verkürzten Lebenspanne von Hefen führt: *S. cerevisiae*-Stämme mit defekten *HPR1* (RNA-Pol. II-Untereinheit) zeigten diese Form der frühzeitigen Alterung bei stark erhöhten rekombinatorischer Aktivität außerhalb der rDNA [Merker und Klein, 2002].

## 1.5 *Hansenula polymorpha*

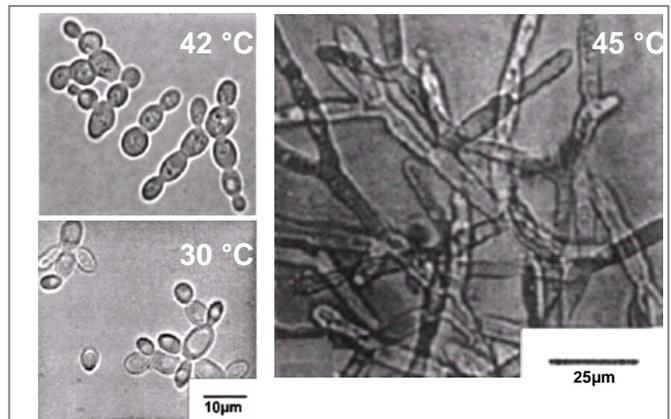
Die methylotrophe Hefe *H. polymorpha* erlangt eine wachsende Bedeutung als Modellorganismus in der Grundlagenforschung und als Produktionsorganismus für heterologe Proteine [Gellissen, 2000]. Die Bedeutung für die Grundlagenforschung erwächst u.a. aus ihrer Nutzung für das Studium der Peroxysomenfunktion [Veenhuis *et al*, 1992], des Nitratstoffwechsels [Siverio, 2002] und des Methanolmetabolismus [van der Klei *et al*, 1991]. In zunehmendem Maße wird diese Hefe als Produktionsorganismus für biotechnologisch relevante Produkte im industriellen Maßstab genutzt [Degelmann *et al*, 2002; Gellissen, 2002; Mayer *et al*, 1999; Papendieck *et al*, 2002; Schaefer *et al*, 2002]. *H. polymorpha* wurde erstmalig 1951 von Wickerham beschrieben, Anfang der 70er Jahre als methylotrophe Hefe klassifiziert und dem Genus *Hansenula* zugeordnet [Wickerham, 1970]. *H. polymorpha* gehört im Reich der Pilze zu der Familie der Saccharomycetaceae und der Unterfamilie der Saccharomycetoideae. Aufgrund der physiologischen Nähe zum Genus *Pichia* haben einige Taxonomen vorgeschlagen, *Hansenula* und *Pichia* zusammenzufassen. In diesem Kontext wurde *H. polymorpha* in *Pichia angusta* umbenannt. In der Natur kommt die obligat aerobe homothallische und thermotolerante Hefe im Enddarm von Insekten, im Boden oder auf verrottenden Früchten vor. *H. polymorpha* gehört zu der kleinen Gruppe fakultativ methylotropher Hefen, zu der auch Vertreter der Gattungen *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* und *Torulopsis* gehören [Harder und Brooke, 1990]. Dabei ist Wachstum auf Glycerin, Äthanol und Methanol neben Kohlenstoffquellen wie Glukose und Trehalose möglich [Levine und Cooney, 1973]. *H. polymorpha* vermehrt sich vegetativ durch Knospung und bildet keine Hyphen oder Myzelien. Der für physiologische Studien auf breiter Basis eingesetzter Stamm CBS<sub>4732</sub> (synonym: CCY<sub>38222</sub>, ATCC<sub>34438</sub>, NRRL-Y<sub>5445</sub>) wurde 1959 von Morais und Moia aus Böden isoliert, die mit Destillierabwässern verunreinigt waren. Erste Uracil-auxotrophe Mutanten wurden mittels UV-Mutagenese generiert [Merckelbach *et al*, 1993; Roggenkamp *et al*, 1986]. Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte *H. polymorpha*-Stamm RB11 ist eine für die heterologe Expression optimierte Variante dieses Stamms. Einige Merkmale zeichnen *H. polymorpha* als Modellorganismus und als Produktionsorganismus für rekombinante Proteine aus:

- Verfügbarkeit von verschiedenen auxotrophen Stämmen [Fellinger *et al*, 1991; Gleeson, 1986; Merckelbach *et al*, 1993].
- Ungerichtete Integrationen hoher Kopienzahlen von heterologen Genen in das Genom [Roggenkamp *et al*, 1986] (Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass einige der vermeintlich ungerichtet eingebrachten Fremdgene in spezifische Loci im Genom dirigiert wurden).
- Zielgerichtete Integration fremder Gen-Sequenzen in die rDNA resultiert in mitotisch stabilen Stämmen [Cox *et al*, 2000; Klabunde *et al*, 2002].
- Überglykosylierung heterologer sezernierter Proteine tritt bei *H. polymorpha* in weitaus geringerem Maße auf als bei *S. cerevisiae* [Gellissen *et al*, 1992].
- Die hohe Thermotoleranz ermöglicht Fermentationen bis zu 48 °C. Dadurch kann der Kühlaufwand im großtechnischen Maßstab erheblich reduziert werden [Reinders *et al*, 1999].
- Erfahrung mit industrieller Produktion pharmazeutischer Produkte wie dem Hepatitis B Impfstoff [Roggenkamp *et al*, 1986; Schaefer *et al*, 2001; Schaefer *et al*, 2002] und dem Enzym Phytase als Futter-Additiv [Mayer *et al*, 1999; Papendieck *et al*, 2002].

## 1.6 *Arxula adenivorans*

*A. adenivorans* (Abb. 5) ist ein haploider, nicht pathogener, dimorpher Ascomycet [Middelhoven *et al*, 1984; van der Walt *et al*, 1990] der sich durch besondere physiologische und morphologische Eigenschaften auszeichnet [Kunze und Kunze, 1994]. *A. adenivorans* toleriert NaCl-Konzentrationen von bis zu 20% und kann wie *H. polymorpha* bei Temperaturen bis 48 °C wachsen [Bötcher *et al*, 1988]. Verschiedene Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, darunter Phenole oder n-Alkane, können von *A. adenivorans* verstoffwechselt werden [Middelhoven *et al*, 1991]. Wird *A. adenivorans* bei Temperaturen über 42 °C kultiviert entstehen Zellketten, die sich zu Hyphen verlängern und ein Myzel ausbilden. Dieser Dimorphismus ist reversibel. Sinkt die Temperatur unter 42 °C, so wird das einzellige Wachstum wiederhergestellt.

Abbildung 5: Dimorphismus von *A. adenivorans*



Wachstumsverhalten des *A. adenivorans* Wildtyp-Stamms LS3 bei verschiedenen Temperaturen. Die Zellen wurden 18 h in Vollmedium kultiviert. Bilder mit freundlicher Genehmigung durch G. Kunze [Wartmann und Kunze, 2000].

Der morphologische Status von *A. adenivorans* beeinflusst die Proteinbiosynthese: Myzel-Kulturen weisen eine erhöhte Sekretion endogener Proteine und fehlende O-Glykosylierung von Glykoproteinen auf [Wartmann *et al*, 2002]. Besonders diese Eigenschaften zeichnen *A. adenivorans* als potenziellen Produktionsorganismus für rekombinante Produkte aus. Die Expression heterologer Gene konnte in *A. adenivorans* an mehreren Beispielen demonstriert werden [Wartmann *et al*, 2002]. Hierbei wurden unter anderem rDNA-Sequenzen zur gerichteten Integration mehrerer Kopien der Vektor-Sequenzen eingesetzt [Rösel und Kunze, 1998]. Nachteilig für einen Einsatz als Wirtsorganismus zur heterologen Gen-Expression ist die geringe Kenntnis über die Genetik von *A. adenivorans*, die Anzahl der charakterisierten Gene ist dementsprechend niedrig (Tab. 3).

Gen	Genprodukt	Referenz
25S	Gen für 25S rRNA	[Rösel und Kunze, 1996]
<i>LYS2</i>	Aminoacidipat-Reduktase	[Kunze und Kunze, 1996]
<i>GAA</i>	Glucosylase	[Bui <i>et al</i> , 1996]
<i>EFG1</i>	mitochondrialer Elongationsfaktor G	[Wartmann <i>et al</i> , 2001]
<i>RFC3</i>	Replikationsfaktor Untereinheit C	[Stoltenburg <i>et al</i> , 1999]
<i>HSB4</i>	Histon H 4	[Yang <i>et al</i> , 2000]
<i>FET3</i>	Eisen II Transporter	[Wartmann <i>et al</i> , 2002]
<i>HSB4</i>	Histon H4	[Wartmann <i>et al</i> , 2003a]
<i>LEU2</i>	$\beta$ -Isopropylmalat Dehydrogenase	[Wartmann <i>et al</i> , 2003b]
<i>TEF1</i>	Transkriptions-Elongationsfaktor 1 $\alpha$	[Rösel und Kunze, 1995]
<i>ILV1</i>	Threonin-desaminase	[Wartmann <i>et al</i> , 1998]

Tabelle 3: Charakterisierte Gene von *A. adenivorans*-Stamm LS3 (Stand: 2003)

## 1.7 Ziele der Arbeit

In früheren Untersuchungen [Cox *et al*, 2000; Klabunde *et al*, 2002] wurde die Integration in die rDNA und die Koexpression von bis zu drei gleichzeitig eingebrachten Vektoren in *H. polymorpha* erfolgreich demonstriert. Dabei wurde eine rein zufällige Verteilung verschiedener Kombinationen der integrierten Expressionskassetten beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit sollen diese Erfahrungen auf die Produktion von Proteinen mit biotechnologischer Relevanz übertragen werden. Menschliches Interferon- $\beta$ , Interferon- $\gamma$  und Lactoferrin sollen in *H. polymorpha* und *A. adenivorans* exprimiert werden, wobei die Integration in die rDNA zur Generierung mitotisch stabiler Stämme genutzt wird. Diesem Zweck dient die Entwicklung eines universell einsetzbaren Vektorsystems, das die Einbringung und Expression heterologer Gene in eine Auswahl möglichst vieler Mikroorganismen ermöglicht. Um die universelle Nutzbarkeit der Methodik zu überprüfen werden *S. cerevisiae* und *P. stipitis* als Modell- und Vergleichsorganismen mitbetrachtet und in einer ersten Versuchsreihe verschiedener Integrationskassetten und Reportergene getestet. Näher untersucht werden ferner der Einfluss verschiedener Integrationskassetten und das Verteilungsmuster von integrierten heterologen Sequenzen am rDNA-Locus. Um dies zu ermöglichen wird eine komplette rDNA-Einheit des *H. polymorpha*-Stamms RB11 sequenziert und mit bekannten rDNA-Sequenzen verglichen. Homologe Sequenzen zu den *S. cerevisiae*-Genen *KAR2*, *PDI1*, *SSO2* und *CNE1* sollen aus *H. polymorpha* isoliert, und einer Funktionsanalyse unterzogen werden. Der Einfluss einer Koexpression dieser Gene auf die Sekretion der heterolog exprimierten Pharmaproteine durch *H. polymorpha* wird eingehend betrachtet.

## 2 Material und Methoden (M & M)

### 2.1 Stämme und Medien

#### 2.1.1 *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/ Referenz
DH5 $\alpha$ F'	F', $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ), U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	GibcoBRL, Gaithersburg/MD, USA
DH10 $\beta$	F', <i>mcrA</i> $\Delta$ -( <i>mrr hsdRMS-mcrBC</i> ), $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>ara</i> $\Delta$ 139, $\Delta$ ( <i>ara</i> , <i>leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , I <sup>-</sup> , <i>rpsL</i> , <i>end A1</i> , <i>nupG</i>	GibcoBRL, Gaithersburg/MD, USA

#### 2.1.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

Vollmedium (LB): 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5. Feste Nährmedien wurden durch Zusatz von 1,6% Agar hergestellt, die Anzucht erfolgte bei 37 °C. Für die Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 200 mg l<sup>-1</sup> Ampicillin zugesetzt.

#### 2.1.3 *H. polymorpha*-Stämme

Der Uracil auxotrophe *H. polymorpha*-Stamm RB11 ist eine optimierte Variante eines durch UV-Mutagenese von ATCC<sub>34438</sub> generierten Stamms [Roggenkamp *et al*, 1986].

Stamm	Genotyp	Referenz
RB11	<i>ura3</i>	Rhein-Biotech
JKHrG (No. 1-12)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-GFP</i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIb (No. 1-6)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\beta</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIbC (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\beta</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpCNE1<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIbK (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\beta</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIbKPS (No. 1-50)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\beta</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpPDI1<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpSSO2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIbP (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\beta</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpPDI1<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIbS (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\beta</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpSSO2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIg (No. 1-6)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\gamma</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIgC (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\gamma</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpCNE1<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIgK (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\gamma</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIgKPS (No. 1-50)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\gamma</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpPDI1<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpSSO2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIgP (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\gamma</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpPDI1<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrIgS (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\gamma</math></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpSSO2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrL (No. 1-6)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hLf</i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrLC (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hLf</i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpCNE1<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrLK (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hLf</i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrLKP (No. 1-50)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hLf</i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpPDI1<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpSSO2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrLP (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hLf</i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpPDI1<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrLS (No. 1-30)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-hLf</i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-HpSSO2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrM (No. 1-6)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH</i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit
JKHrPh (No. 1-8)	<i>ura3</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-Phytase</i> ) $\Delta$ 18S <sub>n</sub>	diese Arbeit

## 2.1.4 *A. adenivorans*-Stämme

Der *A. adenivorans*-Wildtypstamm LS3 wurde bei der Gewinnung von "single cell protein" aus Holz-Hydrolysat in Sibirien isoliert [Kunze und Kunze, 1994].

Stamm	Genotyp	Referenz
LS3	Wildtyp	G. Kunze
JKArGpAL(No.1-11)	( <i>TEF1-HPH TEF1-GFP</i> ) $\Delta 25S_n$	G. Kunze
JKArG (No. 1-11)	( <i>TEF1-HPH TEF1-GFP</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKArGL (No. 1, 2)	( <i>TEF1-HPH TEF1-GFP</i> ) $\Delta 18S_n$ ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-lacZ</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKArGP	( <i>TEF1-HPH TEF1-GFP</i> ) $\Delta 18S_n$ ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-Phytase</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKArIb (No. 1-6)	( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\beta</math></i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKArIg (No. 1-6)	( <i>TEF1-HPH TEF1-hIFN-<math>\gamma</math></i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKArL (No. 1-6)	( <i>TEF1-HPH TEF1-hLf</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKArM (No. 1-4)	( <i>TEF1-HPH</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKArPh (No. 1-8)	( <i>TEF1-HPH TEF1-Phytase</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit

## 2.1.5 *P. stipitis*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
CBS5774	Wildtyp	Centrallbureau voor Schimmelculturen, Delft NL
JKPrPh (No. 1-8)	( <i>TEF1-HPH TEF1-Phytase</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKPrM (No. 1, 2)	( <i>TEF1-HPH</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit

## 2.1.6 *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BY4741	<i>MAT a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>cne1</i>	<i>Mat a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; YAL058w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>pdi1</i>	<i>Mat a/a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i> ; YCL043c:: <i>kanMX4/YCL043c</i>	EUROSCARF
BY4743	<i>Mat a/a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i>	EUROSCARF
BY4743 <i>kar2</i>	<i>Mat a/a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i> ; YJL034w:: <i>kanMX4/YJL034w</i>	EUROSCARF
BY4743 <i>sso2</i>	<i>Mat a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; YMR183c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
JKrKH <i>pCNE</i> (No. 1-6)	<i>Mat a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; YAL058w:: <i>kanMX4</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1- HpCNE1<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKrKH <i>pKAR2</i> (No. 1-4)	<i>Mat a/a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i> ; YJL034w:: <i>kanMX4/YJL034w</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF- HpKAR2<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKrKH <i>pPDI1</i> (No. 1-4)	<i>Mat a/a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i> ; YCL043c:: <i>kanMX4/YCL043c</i> ; ( <i>TEF1-HPH HPH-HpPDI1<sub>c-myc</sub></i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKrM	<i>MAT a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; ( <i>TEF1-HPH</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKrM <i>Sccne1</i> (No. 1, 2)	<i>MAT a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; YAL058w:: <i>kanMX4</i> ; ( <i>TEF1-HPH</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKrM <i>Sckar2</i> (No. 1, 2)	<i>Mat a/a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i> ; YJL034w:: <i>kanMX4/YJL034w</i> ; ( <i>TEF1-HPH</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKrM <i>Scpdi1</i> (No. 1, 2)	<i>Mat a/a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i> ; YCL043c:: <i>kanMX4/YCL043c</i> ; ( <i>TEF1-HPH</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit
JKrP (No. 1-8)	<i>MAT a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; ( <i>TEF1-HPH TEF1-Phytase</i> ) $\Delta 18S_n$	diese Arbeit

## 2.1.7 Medien und Anzucht von Hefestämmen

Vollmedium (YEP): 1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration. Synthetisches Minimalmedium (YNB): 0,67% Yeast Nitrogen Base „w/o aminoacids“, pH 6,3, Aminosäure-/ Nukleobase-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration. Konzentration der Aminosäuren und Nukleobasen im Minimalmedium: Adenin (0,08 mM), Arginin (0,22 mM), Histidin (0,25 mM), Isoleucin (0,44 mM), Leucin (0,44 mM), Lysin (0,35 mM), Methionin (0,26 mM), Phenylalanin (0,29 mM), Tryptophan (0,19 mM), Threonin (0,48 mM), Tyrosin (0,34 mM), Uracil (0,44 mM), Valin (0,49 mM).

Als Kohlenstoffquelle wurden Glukose und Glycerin verwendet, die mit dem Medium autoklaviert wurden. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 1,6% Agar. Die Selektion auf Hygromycin B-Resistenz wurde auf Vollmediumplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Hygromycin B durchgeführt. Folgende optimale Konzentrationen wurden ermittelt: *S. cerevisiae* 150 µg ml<sup>-1</sup>, *P. stipitis* 250 µg ml<sup>-1</sup>, *A. adenivorans* 300 µg ml<sup>-1</sup> und *H. polymorpha* 400 µg ml<sup>-1</sup>. Die Anzuchtbedingungen variieren für die untersuchten Hefen: *A. adenivorans* (30 °C Hefe/ 45 °C Myzel), *P. stipitis* (30 °C), *S. cerevisiae* (30 °C) und *H. polymorpha* (37 °C).

## 2.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pAL-HPH1	Integrationsvektor mit <i>TEF1</i> Promotor aus <i>A. adenivorans</i> , Hygromycin B Resistenz-Gen ( <i>hph</i> <sup>R</sup> ) aus <i>E. coli</i> [Gritz und Davies, 1983], <i>PHO5</i> Terminator aus <i>S. cerevisiae</i> [Arima <i>et al</i> , 1983] und 3.2 kb Fragment der <i>A. adenivorans</i> 25S rDNA.	[Rösel und Kunze, 1998]
pAL-HPH1-GFP	Integrationsvektor mit <i>TEF1</i> -Promotor aus <i>A. adenivorans</i> , Hygromycin B Resistenz-Gen ( <i>hph</i> <sup>R</sup> ) aus <i>E. coli</i> [Gritz und Davies, 1983], den <i>PHO5</i> Terminator aus <i>S. cerevisiae</i> [Arima <i>et al</i> , 1983], GFP-Gen unter Kontrolle des <i>TEF1</i> -Promotors und ein 3.2 kb Fragment der <i>A. adenivorans</i> 25S rDNA.	[Rösel und Kunze, 1998]
pB14	<i>H. polymorpha</i> / <i>E. coli</i> "shuttle-vector" mit <i>H. polymorpha</i> <i>ARS</i> Sequenz und Phytase-Gen (synthetische conPhytase) unter Kontrolle des <i>FMD</i> -Promotors aus <i>H. polymorpha</i> .	Rhein Biotech
pC11	<i>H. polymorpha</i> / <i>E. coli</i> "shuttle-vector" mit <i>H. polymorpha</i> <i>ARS</i> Sequenz und <i>cos8-lacZ</i> Fusion unter Kontrolle des <i>TPS1</i> -Promotors aus <i>H. polymorpha</i> .	[Amuel <i>et al</i> , 2000]
pFPMT-MFIFNG	<i>E. coli</i> / <i>H. polymorpha</i> "shuttle-vector", <i>H. polymorpha</i> <i>ARS</i> Sequenz, human IFN-γ mit α-Faktor Signalsequenz, <i>URA3</i> aus <i>S. cerevisiae</i>	Rhein Biotech
pHpH18Hp	Ein 2.4 kb <i>HindIII</i> - <i>SacI</i> Fragment aus pUG6 [Guldener <i>et al</i> , 1996], ein 2.1 kb <i>HindIII</i> - <i>SacI</i> Fragment aus prHp, ein <i>HindIII</i> Fragment aus pAL-HPH1 [Rösel und Kunze, 1998] wurden in einer drei-Fragment-Ligation miteinander verknüpft.	diese Arbeit
pHSD	Bluescript-Vektor mit putativen <i>H. polymorpha</i> <i>KAR2</i> -Gen	Andrè Diesel
prHp	<i>E. coli</i> - <i>H. polymorpha</i> "shuttle-vector" mit einem 7,8 kb langen rDNA-Fragment aus <i>H. polymorpha</i> , <i>Sau3A</i> -restringierte genomische <i>H. polymorpha</i> DNA (RB11) kloniert in YRp7 [Struhl <i>et al</i> , 1979] und <i>H. polymorpha</i> <i>ARS</i> Sequenz.	Rhein Biotech
pMr	pHpH18Hp mit <i>SmaI</i> inserierten <i>TEF1</i> / <i>PHO5</i> Kasette aus PCR-Amplifikat von pAL-HPH1 (Oligonukleotide: Photefher/ Photefhin). Zwischen Promotor und Terminator wurde mit einer Primer-Dimer-Strategie eine MCS (Restriktionsstellen: <i>MfeI</i> , <i>BamHI</i> , <i>SnaBI</i> , <i>Asp718</i> , <i>BglII</i> und <i>KpnI</i> ) in das <i>BamHI</i> -/ <i>Clal</i> -restringierte 18SHPHI-Fragment eingefügt (Oligonukleotide: Mfehin/Mfeher). Die zweite <i>MfeI</i> Restriktionsstelle in der 18S rDNA wurde durch Linearisieren und "klenow-fill-in" entfernt.	diese Arbeit
pMr-GFP	Integrationsvektor abgeleitet von pMr. Integration eines <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> GFP (γEGFP3) Fragments aus pAL-HPH1-GFP [Rösel und Kunze, 1998] in MCS.	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pMr-LacZ	Integrationsvektor, abgeleitet von pMr. Integration eines <i>EcoRI-EcoRI lacZ</i> Fragments ( <i>cos8-lacZ</i> ) aus pC11 [Amuel <i>et al</i> , 2000] in <i>EcoRI- EcoRI</i> -restringierten pMrL.	diese Arbeit
pMr-Phyt	Integration eines <i>EcoRI-EcoRI</i> Phytase Fragments aus pB14 [Klabunde <i>et al</i> , 2002] in <i>EcoRI- EcoRI</i> -restringiertes pMr.	diese Arbeit
pMrL (Multivektor)	Integrationsvektor mit <i>TEF1</i> -Promotor aus <i>A. adenivorans</i> vor Expressionskassette und Hygromycin B Resistenz-Gen ( <i>hph<sup>R</sup></i> ) aus <i>E. coli</i> [Gritz und Davies, 1983]; 3,1 kb Bereich der <i>H. polymorpha</i> rDNA( NTS2-ETS-18S). Um den rDNA-Promotor von pMr zu verlängern, wurde der <i>Stul</i> - und <i>SpeI</i> -restringierte Vektor, mit einem 3.0 kb <i>SnaBI- NheI</i> -Fragment aus prHp ligiert. Die zweite <i>MfeI</i> -Restriktionsstelle in der 18S rDNA wurde durch Linearisieren und "klenow-fill-in" entfernt.	diese Arbeit
pMrL-CNE	Integrationsvektor, abgeleitet von pMrL. Integration des <i>H. polymorpha CNE1</i> -PCR Amplifikats (Oligonukleotide: Cne1Hin/ Cne1Her) in <i>MfeI- SnaBI</i> -restringierten pMrL.	diese Arbeit
pMrL-CNE+	Integrationsvektor, abgeleitet von pMrL. Integration des <i>H. polymorpha CNE1<sub>c-myc</sub></i> PCR-Amplifikats (Oligonukleotide: Cne1Hin/ Cne1Her-c-myc) in MCS.	diese Arbeit
pMrL-GFP	Integrationsvektor, abgeleitet von pMrL. Integration eines <i>EcoRI-BamHI</i> GFP ( $\gamma$ EGFP3) Fragments aus pAL-HPH1-GFP [Rösel und Kunze, 1998] in MCS.	diese Arbeit
pMrL-gKIFNb	Integrationsvektor, abgeleitet von pMrL. Integration eines <i>EcoRI-BamHI</i> IFN $\beta$ Fragments (mit Glucoamylase Signalsequenz) aus pTWx1gkifb in MCS.	diese Arbeit
pMrL-IFNB	Integrationsvektor, abgeleitet von pMrL. Integration eines <i>EcoRI-BamHI</i> IFN $\beta$ Fragments aus pTWx1ifb in MCS.	diese Arbeit
pMrL-IFNG	Integrationsvektor, abgeleitet von pMrL. Integration eines <i>EcoRI-BamHI</i> human IFN- $\gamma$ mit $\alpha$ -Faktor Signalsequenz aus pFPMT-MFIFNG in MCS.	diese Arbeit
pMrL-KAR	Integrationsvektor, abgeleitet von pMrL. Integration des <i>H. polymorpha KAR2</i> PCR-Amplifikats (Oligonukleotide: kar2mychin/ kar2her) in MCS.	diese Arbeit
pMrL-KAR+	Integrationsvektor, abgeleitet von pMrL. Integration des <i>H. polymorpha KAR2<sub>c-myc</sub></i> PCR-Amplifikats (Oligonukleotide: kar2mychin/ kar2mycher) in MCS.	diese Arbeit
pMrL-Lf	Integrationsvektor abgeleitet von pMrL. Integration eines <i>EcoRI-BamHI</i> human Lactoferrin-Fragments aus Ptwalf in MCS.	diese Arbeit
pMrL-LacZ	Integrationsvektor abgeleitet von pMrL. Integration <i>EcoRI-EcoRI lacZ</i> -Fragments ( <i>cos8lacZ</i> ) aus pC11 [Amuel <i>et al</i> , 2000] in <i>EcoRI- EcoRI</i> -restringierten pMrL.	diese Arbeit
pMrL-PDI	Integrationsvektor abgeleitet von pMrL. Integration des <i>H. polymorpha PDI1</i> -PCR Amplifikats (Oligonukleotide: PDIhin/ PDIherh) in MCS.	diese Arbeit
pMrL-PDI+	Integrationsvektor abgeleitet von pMrL. Integration des <i>H. polymorpha PDI1<sub>c-myc</sub></i> PCR-Amplifikats (Oligo: PDIhin/ PDImycherh) in MCS.	diese Arbeit
pMrL-Phyt	Integrationsvektor abgeleitet von pMrL. Integration <i>EcoRI-EcoRI</i> Phytase Fragments aus pB14 [Klabunde <i>et al</i> , 2002] MCS.	diese Arbeit
pMrL-SSO	Integrationsvektor, abgeleitet von pMrL. Integration des <i>H. polymorpha SSO2</i> PCR Amplifikats (Oligonukleotide: Sso2H.p.hin/ Sso2H.p.her) in MCS.	diese Arbeit
pMrL-SSO+	Integrationsvektor, abgeleitet von pMrL. Integration des <i>H. polymorpha SSO2<sub>c-myc</sub></i> PCR-Amplifikats (Oligonukleotide: Sso2H.p.hin/ Sso2H.p.mycher) in MCS.	diese Arbeit
Ptwalf	<i>E. coli / Pichia stipitis</i> "shuttle-vector" mit <i>S. occidentalis</i> ARS-Sequenz, humanes Lactoferrin mit $\alpha$ -Faktor Signalsequenz, <i>HIS3</i> aus <i>P. stipitis</i> .	Thomas Weierstall
pTWx1gkifb	<i>E. coli-Pichia stipitis</i> "shuttle-vector" mit <i>S. occidentalis</i> ARS Sequenz, humanes IFN- $\beta$ mit Glucoamylase Signalsequenz, <i>HIS3</i> aus <i>P. stipitis</i> .	Thomas Weierstall
pTWx1ifb	<i>E. coli-Pichia stipitis</i> "shuttle-vector" mit <i>S. occidentalis</i> ARS-Sequenz, human IFN- $\beta$ ohne Signalsequenz, <i>HIS3</i> aus <i>P. stipitis</i> .	Thomas Weierstall
pUG6	DNA-Vorlage für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Deletion von Genen mit dem <i>loxP::kanMX::loxP</i> -Selektionsmarker.	[Guldener <i>et al</i> , 1996]

## 2.3 Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
Cne1Hin	CCG GAA TTC CAC TTA TGA AAG TCA GCC GTC C	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung des <i>H. polymorpha</i> CNE1- Gens (stromabwärts) <i>EcoRI</i>
Cne1Herc- myc	CTC GCG ATA CGT ACT Aca aat ctt ctt cag aaa tca att ttt gtt cTC CTC TCT TGA CAG CTT CTG TC	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung des <i>H. polymorpha</i> CNE1 <i>c- myc</i> -Gens (stromaufwärts) <i>SnaBI</i> (klein: <i>c-myc</i> Epitop)
Dieselhin	GAT CAA ACA TTT GCC ATA CAA GG	Sequenzierungsoligonukleotid pHSD Plasmid
Dieselneu	GCT GCT GTT CAG GGA GGT GTG C	Sequenzierungsoligonukleotid pHSD Plasmid
ETS-H.p.hin:	GCT GTT TAG CGG GAA GCG	Analytische PCR zur rDNA-Integration; ETS <i>H. polymorpha</i> (stromabwärts)
ITS-S.c.her	CCA TCT CTT GTC TTC TTG	Analytische PCR zur rDNA-Integration; ITS <i>S. cerevisiae</i> (stromaufwärts)
kar2mychin	CCG GAA TTC ATG TTA ACT TTC AAT AAG TCG G	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>H. polymorpha</i> KAR2- Gen (stromabwärts) <i>EcoRI</i>
kar2her	CGC GGA TCC TCA CAG TTC GTC GTG ATC CCA ATC	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>H. polymorpha</i> KAR2- Gen (stromaufwärts) <i>BamHI</i>
kar2mycher	CGC GGA TCC TCA CAG TTC GTC GTG caa atc ttc ttc aga aatc aat ttt tgt tcA TCC CAA TCA TCC TCA TCT TCT TCG	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>H. polymorpha</i> KAR2 <i>c-myc</i> -Gen (stromaufwärts) <i>BamHI</i> (kleine Buchstaben: <i>c-myc</i> - Epitop)
Mfehin	GAT CGC AAT TGG GAT CCT ACG TAG GTA CCA GAT CTA T	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von MCS mit einer Primer- Dimer Strategie. Annealing mit dem komplementären Strang zu
Mfeher	CGA TAG ATC TGG TAC CTA CGT AGG ATC CCA ATT GC	Oliukleotid mit folgenden Restriktionsstellen: <i>BamHI-MfeI-BamHI- SnaBI-Asp718-BglII-Clal</i>
nMultihin1	GCC GCC AGC TGA AGC TTG ATA T	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrL stromabwärts
nMultihin2	GAC CGC AAG GAA TCG GTC AAT A	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrL stromabwärts
nMultihin3	CCT GAA CTC ACC GCG ACG TCT GTC G	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrL stromabwärts
nMultihin4	GCA CTC GTC CGA GGG CAA AGG AA	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrL stromabwärts
nMultihin5	GGC ACC TTA CGA GAA ATC AAA G	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrL stromabwärts
nMultiher1	GCC AGT GAT ACA CAT GGG GAT CAG C	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrL stromaufwärts
nMultiher2	GAT AGG GCA GAA ATT TGA ATG AAC C	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrL stromaufwärts
nMultiher3	GAT TGA AGT CGA CGG TAT CGA TAA GC	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrL stromaufwärts
PDIhin	CCG GAA TTC ATG AAG TTT TCT GCT GGT GCC	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>S. cerevisiae</i> PDI1- Gen (stromabwärts) <i>EcoRI</i>
PDIher	CCG GAA TTC ATG AAG TTT TCT GCT GG TGC C	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>S. cerevisiae</i> PDI1- Gen (stromaufwärts) <i>BamHI</i>
PDIhinh	CGC GGA TCC ATG AAG TTG TTT AAT GTC TCG	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>H. polymorpha</i> PDI1- Gen (stromabwärts) <i>EcoRI</i>
PDImycherh	CTC GCG ATA CGT ATT ACA ACT CAT CAT GAG Tca aat ctt ctt cag aaa tca att ttg ttc ACT GTC CTT AGT GTC GGA C	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>H. polymorpha</i> PDI1 <i>c-myc</i> -Gen (stromaufwärts) <i>SnaBI</i> (kleine Buchstaben: <i>c-myc</i> - Epitop)
Photefhin	TCC CCC GGG AAT TCT AGT GGA TCC TAG AGT CGA GGG GAA CAC TAC TC	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>PHO5-TEF1</i> aus pALHpH (stromabwärts) <i>SmaI EcoRI BamHI</i>
Photefher	TCC CCC GGG TGT TGA TTA TGT TTT TAA GAA C	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>PHO5-TEF1</i> aus pALHpH (stromaufwärts) <i>SmaI</i>
SeqCne1h- cmychin	CGC GGA TCC GCT TCT TTC AAA AAT TGG CTC TGC	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrL-CNE+ stromabwärts
SeqCne1h- cmycher	CTA TCA ACT AGA GGC TGT TAA CCT TGG	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrL-CNE+ stromaufwärts
Seqhin1	CCA GAT TCC CAC TGT CCC TAT C	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid prHp stromabwärts
Seqher1	GCT GAA GTT CGT ATC AAA ACT C	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid prHp stromaufwärts
Seqher2	CTG AAC CAA TCC TGA AGC CTC AC	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid prHp stromaufwärts
Seqher3	CTG AAC CAA TCC TGA AGC CTC AC	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid prHp stromaufwärts
Seqher4	GCA TGG CTT AAT CTT TGA GAC	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid prHp stromaufwärts
SeqKar2h- cmychin	CCA CAT ATT CAT GTG TTG GTG	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrL-KAR+ stromabwärts

Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
SeqKar2h-cmycher	CCA TTC TCA TCA TTG GCT TGA T	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrl-KAR+stromaufwärts
SeqPDIhhin	CTC TTG CCG ATC TGA GCG AAC	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrl-PDI+stromabwärts
SeqSso2hcmychin	CCA CGG GAA CCC TTA CGC CG	Sequenzierungsoligonukleotid für Plasmid pMrl-SSO+stromabwärts
Sir2S.c.hin	CCG GAA TTC ATG ACC ATC CCA CAT ATG AAA TAC G	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>S. cerevisiae</i> SIR2-Gen (stromabwärts) <i>EcoRI</i>
Sir2S.c.her	GCC GGC TTA GAG GGT TTT GGG ATG TTC ATC TG	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>S. cerevisiae</i> SIR2-Gen (stromaufwärts) <i>NaeI</i>
Sir2S.c.myc her	GCC GGC TTA caa atc ttc ttc aga aat caa ttt ttg ttc GAG GGT TTT GGG ATG TTC ATC TG	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>S. cerevisiae</i> SIR2 <sub>c-myc</sub> -Gen (stromaufwärts) <i>NaeI</i> (kleine Buchstaben: <i>c-myc</i> -Epitop)
Sso1hin	CCG GAA TTC ATG AGT TAT AAT AAT CCG TAC C	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>S. cerevisiae</i> SSO1-Gen (stromabwärts) <i>EcoRI</i>
Sso1her	CGC GGA TCC TTAA CGC GTT TTG ACA ACG GC	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>S. cerevisiae</i> SSO1-Gen (stromaufwärts) <i>BamHI</i>
Sso2hin	CCG GAA TTC ATG AGC AAC GCT AAT CCT TAT GAG	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>S. cerevisiae</i> SSO2-Gen (stromabwärts) <i>EcoRI</i>
Sso2her	CGC GGA TCC TTA CTT TCT TGT TTC CAC AAC GG	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>S. cerevisiae</i> SSO2-Gen (stromaufwärts) <i>BamHI</i>
Sso2H.p.hin	CCG GAA TTC ATG TGG GCG CTA ACG TTT GAA ATT G	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>H. polymorpha</i> SSO2-Gen (stromabwärts) <i>EcoRI</i>
Sso2H.p.her	CGC GGA TCC CTA GTG TTT GGC AGC TCC AAC AAC ACC	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>H. polymorpha</i> SSO2-Gen (stromaufwärts) <i>BamHI</i>
Sso2H.p.-mycher	CGC GGA TCC CTA caa atc ttc ttc aga aat caa ttt ttg ttc GTG TTT GGC AGC TCC AAC AAC ACC	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>H. polymorpha</i> SSO2 <sub>c-myc</sub> -Gen (stromaufwärts) <i>BamHI</i> (kleine Buchstaben: <i>c-myc</i> -Epitop)
Ura3hin	ACA TGC ATG CCG CCC TAT ACC TTG TCT GCC TCC CCG	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>S. cerevisiae</i> URA3-Gen (stromabwärts) von Plasmid pB14 <i>SphI</i>
Ura3her	ACA TGC ATG CCT TTT CTT TCC AAT TTT TTT TTT TTC G	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>S. cerevisiae</i> URA3-Gen (stromaufwärts) von Plasmid pB14 <i>SphI</i>

## 2.4 Chemikalien und Enzyme

Acros Organics	Lysin, Natriumacetat
Amersham	Hybond Nylonmembran
Blomol	menschliches IFN-γ
Braun-Melsungen	Gasperlen 0,45 mm Ø
Chemicon	menschliches IFN-β
Difco	Bacto Agar, Pepton, Trypton, Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base
GibcoBRL	Agarose, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, DNA-Größenstandard
ICN	menschliches Lactoferrin
Interaktiva	Synthetische Oligonukleotidnukleotide
Janssen Chimica	Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO)
J.T. Baker	Ethanol, Kaliumacetat (KAc), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , KOH, MgCl <sub>2</sub> , NaCl, NaOH, PEG4000
Macherey & Nagel	PCR purification Kit, Gel extraction Kit
Merck	Adenin, Ammoniumperoxidsulfat (APS), Chloroform, DMF, EDTA, HCl, Isopropanol, Leucin, Methanol, MgSO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaOH, Nonadecan, Pyrogallol, TEMED, Twenn20, Uracil
NewEnglandBiolabs	Restriktionsendonukleasen, BSA
Oxoid	Agar, Pepton
Qiagen	PCR-Purification-Kit, Plasmid Midi/ Mini Kit, QIAEX II Gel-Extraction-Kit QiaAmp Tissue Kit
Riedel-de-Haen	Essigsäure, Äthanol, Methanol, MnCl <sub>2</sub> , Natriumazid
Roche	Alkalische Phosphatase, Expand High Fidelity PCR System, Protease-Inhibitoren, T4-DNALigase
Roth	Ampicillin, β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Dithiothreitol (DTT), Gel30 Acrylamid, Glycerin, Glycin, Isopropanol, KCl, Saccharose, PEG1000, PEG3350
Schleicher & Schuell	Nitrozellulosemembran
Seikagaku KogyoCo	Zymolyase
Serva	Ammoniumperoxidsulfat (APS), Albumin Bovine Fraction (BSA), CaCl <sub>2</sub> , Glycerin, Maltose, Natriumdodecylsulfat (SDS), Tween20, X-Gal
Sigma	Antimycin A, Ampicillin, Ethidiumbromid, 2-Desoxy-D-Glukose, Lithiumacetat, ONPG, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), PonceauS, Molekulargewichtsstandard, Tris-Puffer
Sigma ARK	Synthetische Oligonukleotidnukleotide
Whatman	3 mm Papier

## 2.5 Verwendete Antikörper

anti human IFN- $\beta$ (monoclonal, mouse)	Chemikon
anti human IFN- $\gamma$ (monoclonal, goat)	RD Systems
anti human IFN- $\gamma$ (monoclonal, mouse)	Sigma-Aldrich
anti human Lactoferrin (monoclonal, rabbit)	ICN
anti <i>c-myc</i> (9E10) (monoclonal, rabbit)	BAbCO (Berkley Antibodies Co.)
anti-goat IgG, alk. Phosphatase Konjugat	Molecular Probes
anti-rabbit IgG, alk. Phosphatase Konjugat	Dianova
anti-mouse IgG, alk. Phosphatase Konjugat	Roche

## 2.6 Transformationen

### 2.6.1 Transformation von *E. coli*

Zellen einer logarithmisch gewachsenen *E. coli*-Kultur wurden bei 4 °C abzentrifugiert, 3 x mit eiskaltem Wasser und anschließend 2 x mit 10% Glycerin gewaschen. Die Zellen wurden in 10% Glycerin resuspendiert und zu 60 ml Aliquots bei -80 °C eingefroren. Zur Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und zusammen mit der zu transformierenden DNA in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Zur Transformation wurde ein "Genepulser" der Firma BIORAD (München) eingesetzt. Es wurde in 2 mm Küvetten mit 2,5 KV, 25  $\mu$ F und 200 Ohm elektroporiert. Nach Erholung in LB-Medium wurden die Zellen auf Agarplatten mit 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> Ampicillin ausplattiert.

### 2.6.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte mit der Elektroporationsmethode (Kapitel 2.6.1) mittels eines "Genepulser" der Firma BIORAD (München). Kompetente Zellen wurden in 2 mm Küvetten bei 2,0 KV, 25  $\mu$ F und 200 Ohm elektroporiert. Nach Erholung in YPD-Medium wurden die Zellen auf Agarplatten mit 150  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> Hygromycin B ausgestrichen.

### 2.6.3 Transformation von *A. adenivorans*

Die Herstellung kompetenter *A. adenivorans* Zellen erfordert höhere Drehzahlen in den Zentrifugationsschritten (8000 rpm statt 3000). Die Transformation von *A. adenivorans*-Zellen erfolgte mit der Elektroporationsmethode (Kapitel 2.6.1) mittels eines "Genepulser" der Firma BIORAD (München). Kompetente Zellen wurden in 2 mm Küvetten bei 1,8 KV, 25  $\mu$ F und 200 Ohm elektroporiert. Nach Erholung in YPD-Medium wurden die Zellen auf Agarplatten mit 300  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> Hygromycin B ausplattiert.

### 2.6.4 Transformation von *H. polymorpha*

Die Transformation von *H. polymorpha* Zellen erfolgte mit der Elektroporationsmethode (Kapitel 2.6.1) mittels eines "Genepulser" der Firma BIORAD (München). Kompetente Zellen wurden in 2 mm Küvetten bei 2,5 KV, 25  $\mu$ F und 200 Ohm elektroporiert. Nach Erholung in YPD-Medium wurden die Zellen auf Agarplatten mit 400  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> Hygromycin B ausplattiert.

### 2.6.5 Transformation von *P. stipitis*

Die Transformation von *P. stipitis*-Zellen erfolgte mit der Elektroporationsmethode (Kapitel 2.6.1) mittels eines "Genepulser" der Firma BIORAD (München). Kompetente Zellen wurden in

2 mm Küvetten bei 2 KV, 25  $\mu$ F und 200 Ohm elektroporiert. Nach Erholung in YPD-Medium wurden die Zellen auf Agarplatten mit 250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> Hygromycin B ausplattiert.

### 2.6.6 Stamm-Stabilisierung

Rekombinante *A. adenivorans*-, *P. stipitis*-, *S. cerevisiae*- und *H. polymorpha*-Stämme wurden nach der Transformation abwechselnd auf Medium mit und ohne Hygromycin B ausgestrichen. Bei diesem sog. Passagieren sollte die Integration der heterologen DNA-Sequenzen im Wirts-Genom gefördert werden und zusätzlich die Kopienzahl erhöht werden. Einzelne Kolonien wurden als Striche zweimal auf Selektionsmedium, zweimal auf Vollmedium und erneut zweimal auf Selektionsmedium ausgestrichen. Im letzten Schritt wurden die Zellen vereinzelt und einzelne Kolonien für die folgenden Untersuchungen eingesetzt. Alle Schritte wurden auf für die individuellen Hefen optimalen Konzentrationen an Hygromycin B im Selektionsmedium durchgeführt.

## 2.7 Präparation und Behandlung von Nukleinsäuren

### 2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte aus 1,5 ml stationärer Kultur nach der modifizierten Methode [Maniatis *et al*, 1982] der alkalischen Lyse [Birnboim und Doly, 1979]. Zur Restriktionsanalyse wurden 200 ng der isolierten Plasmid-DNA in 20  $\mu$ l Gesamtvolumen enzymatisch geschnitten. Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen und Klonierungen wurde mit dem Qiagen Plasmid-Mini-Kit nach Angaben des Herstellers präpariert.

### 2.7.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefen

Für die untersuchten Hefen *A. adenivorans*, *P. stipitis*, *S. cerevisiae* und *H. polymorpha* konnte ein Protokoll zur Gewinnung chromosomaler DNA eingesetzt werden. Alleine die Anzuchtbedingungen differierten je nach Hefe: *A. adenivorans* (30 °C Hefe/ 45 °C Myzel), *P. stipitis* (30 °C), *S. cerevisiae* (30 °C) und *H. polymorpha* (37 °C). Aus einer 3 ml Übernachtskultur (ÜK) wurden Zellen bei 13000 rpm geerntet und in 0,5 ml STEHp-Puffer (0,5 M Sorbitol; 0,1 M Tris/ HCl; pH 8; 0,1 M EDTA) resuspendiert. Die Zellwand wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ l Zymolyase (2,5 mg ml<sup>-1</sup>) (*A. adenivorans*: 20  $\mu$ l Zymolyase) und 1  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol und Inkubation für 4 h (*A. adenivorans* 12 h) bei 37 °C entfernt. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, ob die Zellen als Protoplasten vorlagen. Danach wurden die Protoplasten vorsichtig abzentrifugiert (5 min bei 3000 rpm), in TEHp-Puffer (50 mM Tris/ HCl, pH 8, 20 mM EDTA) resuspendiert und mit 25 ml SDS (20%) versetzt. Die Lyse erfolgte durch Inkubation für 20 min bei 65 °C. Durch Zugabe von 200  $\mu$ l 5 M KOAc und Inkubation auf Eis (30 min) wurden Proteine und Zelltrümmer präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min wurde der Überstand durch Watte filtriert und die im Filtrat gelöste DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Nach Waschen mit 70% Äthanol wurde das getrocknete DNA-Pellet in 20-30  $\mu$ l Wasser aufgenommen. Durch vorsichtigen Umgang mit der präzipitierten DNA in allen Schritten wurde die unspezifische Degradation der chromosomalen DNA durch Scheerkräfte eingeschränkt. Für spezielle Anwendungen (Southern-Blot Analyse) wurde das Qiagen Tissue-Kit zur Gewinnung hochreiner chromosomaler DNA eingesetzt (Im Unterschied zum Protokoll wurden Zellen einer stationären Kultur verwendet).

## **2.7.3 DNA-Modifikationen**

### **2.7.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von DNA mit niedrigem Molekulargewicht (Oligonukleotide) erfolgte durch Absorptionsbestimmung bei 240/ 260 nm. Die Konzentration hochmolekularer DNA wurde durch Vergleich mit einem kalibrierten Mengenstandard (KBL, GibcoBRL) im Agarosegel abgeschätzt oder durch Absorptionsbestimmung ermittelt.

### **2.7.3.2 DNA-Restriktion**

Sequenzspezifische Spaltungen der DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen über 2-12 h mit 2-5 U Enzym pro µg DNA durchgeführt. Es kamen Restriktionsendonukleasen und Puffer der Firmen Roche, New England Biolabs und GibcoBRL zum Einsatz.

### **2.7.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden erfolgte durch Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase (CIP) zum Restriktionsansatz und 30 min Inkubation bei 37 °C. Im Anschluss wurden die dephosphorylierten Fragmente durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel aufgereinigt.

### **2.7.3.4 Ligation**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 20 µl-Ansatz aus Vektor-DNA, 2 bis 5-fachem molaren Überschuss Fragment-DNA und 1 U T4-Ligase. Der Ligationsansatz wurde für 24 h bei 4 °C (überstehende Enden) oder für 12 h bei 16 °C (glatte Enden) inkubiert. Die Enzyme und zugehörigen Puffer wurden von den Firmen Roche oder GibcoBRL bezogen.

### **2.7.3.5 Auffüllen oder Entfernen überstehender Enden**

5'-überstehende Fragment-Enden wurden mit 1 U Klenow-Polymerase 30 min bei Raumtemperatur in Gegenwart von 200 µM dNTPs aufgefüllt [Maniatis *et al*, 1982]. 3'-überstehende Enden wurden zur Entfernung mit 2 U T-4 DNA-Polymerase in Gegenwart von 200 µM dNTPs bei Raumtemperatur 30 min inkubiert.

### **2.7.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus einem TAE-Agarosegel unter UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und die DNA mittels des "QIAEX II Gel Extraction Kit" (Qiagen) oder des "NucleoSpin-Extract" (Macherey & Nagel) nach den Angaben der Herstellers isoliert.

### **2.7.3.7 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen wurde von dem Unternehmen SeqLab in Göttingen durchgeführt.

### **2.7.3.8 DNA- und Aminosäure-Sequenzvergleiche**

Sequenzvergleiche von DNA- oder Aminosäuresequenzen wurden mit folgender Software vorgenommen: ClustalX, Version 1.64 b in den Standardeinstellungen und GeneDoc in den

Standardeinstellungen. Zur Definition ähnlicher Aminosäure wurden deren chemische Grundeigenschaften herangezogen. Fünf Gruppen wurden erstellt: aliphatische, negativ geladene, positiv geladene, polare und aromatische Aminosäuren.

### **2.7.3.9 Primer-Dimer Assoziation**

Zum Einfügen neuer Schnittstellen in einen Vektor wurde die sog. Primer-Dimer Strategie eingesetzt. Zwei synthetische Oligonukleotide mit komplementären Sequenzen wurden so entworfen, dass nach Assoziation überhängende Enden entstehen. Diese sind zu Restriktions-Schnittstellen im Vektor kompatibel und können durch Ligation integriert werden. Die Oligonukleotide wurden zusammengegeben und 1 h bei 60 °C hybridisiert, damit sich doppelsträngige DNA bilden konnte. Diese wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt und weiter verwendet.

### **2.7.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Größen zwischen 0,2 bis 20 kb erfolgte in Agarosegelen (0,6–1,5%) mit 0,5 µg ml<sup>-1</sup> Ethidiumbromid [Maniatis *et al*, 1982]. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x TAE Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Blaumarker (0,2% Bromphenolblau, 25% Glycerin) versetzt und die Nukleinsäuren nach der Auftrennung durch UV-Bestrahlung (254 nm) sichtbar gemacht. Als Größen- und Konzentrations-Standard diente KBL (GibcoBRL).

### **2.7.5 Southern-Blot Analyse**

5-10 µg chromosomaler DNA oder 0,5 µg Plasmid DNA wurden über Nacht mit 1 U µg<sup>-1</sup> der entsprechenden Restriktionsendonuklease behandelt. Die Auftrennung der DNA erfolgte in 0,6-1,5% Agarosegelen. Durch lange Trennzeiten (2-12 h bei 200 mA) konnten auch relativ große (5 - 12 kb) DNA-Fragmente unterschieden werden. Der DNA-Transfer auf eine Nylonmembran (Hybound M, Amersham) erfolgte in einer Vakuum-Blot Apparatur (LKB 2016 Vacugene, Pharmacia). Aufeinander folgend wurden verschiedene Puffer für den Transfer eingesetzt: 15 min Depurinierungslösung (0,25 M HCl), 30 min Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH), 30 min Neutralisierungspuffer (3 M NaAc, pH 5,5) und 30 min 20 x SSC Transferpuffer (3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7). Durch eine Bestrahlung der Membran mit UV-Licht (254 nm, 2 min) und anschließender Inkubation (30 min) bei 80 °C wurde die DNA an die Nylonmembran fixiert. Die Herstellung der Sonde, die Hybridisierung und der Nachweis des Hybrides erfolgten nach dem Protokoll des Dioxygenin-Labeling-Kit der Firma Roche (Mannheim). In allen Fällen wurde die Umsetzung von BCiP und NBT als Detektionsverfahren eingesetzt. In einigen Fällen wurden die Southern-Blots mit einer zweiten Sonde hybridisiert und entwickelt. Dazu wurde der Farbstoff und die erste Sonde durch eine Abfolge von Waschschritten von der Membran entfernt: 1 h in Dimethylformamid bei 60 °C, dann Waschen in 0,2 M NaOH, 0,1% SDS und 0,3 M NaCl, 0,03 M Citrat für jeweils 10 min

## 2.7.6 PCR-Amplifizierung

### 2.7.6.1 PCR-Amplifizierung von genomischer oder Plasmid-DNA

Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit dem "Expand-High-Fidelity PCR-System" (Roche) oder Taq-Polymerase durchgeführt. Jeder Ansatz bestand aus 1 - 10 ng Plasmid-DNA oder genomischer DNA als Synthesevorlage, 200 µM dNTP-Mix, 4 - 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,7 U Polymerase und je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotide. Alle Reaktionen wurden in einem "Primus 25 U1 Thermocycler" der Firma MWG Biotech durchgeführt. Die Bedingungen der PCR-Schritte (Denaturierung, Annealing und DNA-Synthese) wurden wie folgt gewählt:

1. Denaturierung (hot start)	2 min 95 °C	
2. Denaturierung	30-45 s, 95 °C	} 25–37 X
3. Annealing	30-45 s, 50 - 57 °C	
4. Synthese (Elongation)	1-4 min 68 - 72 °C	
5. Synthese (Finalisierung)	7 min 72 °C	

Die Anzahl der Syntheseschritte, die Annealing- und Elongationstemperatur und -Dauer wurden der Produktgröße, dem Template und der Oligonukleotide entsprechend angepasst. Die Reaktionsprodukte wurden in einem Agarosegel durch Verwendung des "QIAquick-PCR-Purification-Kit" der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Für eine PCR-Reaktion mit ganzen Zellen wurde anstelle von DNA als Synthesevorlage eine geringe Menge an Zellen in ein Reaktionsgefäß gegeben und durch 2 min Erhitzen in der Mikrowelle aufgeschlossen. Im Anschluss wurden die übrigen Komponenten des Ansatzes zugegeben.

### 2.7.6.2 PCR-Strategie zur Isolierung von Genen aus *H. polymorpha*

Im Jahr 2002 konnte das *H. polymorpha*-Genom nahezu vollständig sequenziert werden. Die DNA-Sequenzen sind nicht frei zugänglich, innerhalb einer Kooperation mit dem Unternehmen Rhein-Biotech GmbH in Düsseldorf war der Zugang zu den Daten eingeschränkt möglich. Homologe Sequenzen zu identifizierten *S. cerevisiae*-Genen wurden als Vorlage zur Gestaltung von Oligonukleotiden genutzt. Von genomischer DNA als Vorlage wurden mit PCR die DNA-Fragmente der putativen Gene gewonnen. Die Produkte wurden nach erfolgter Klonierung in Expressionsvektoren sequenziert, um eventuell aufgetretene PCR-Fehler aufzudecken.

### 2.7.6.3 Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden

Mehrere Sonden für die Southern-Blot Analyse wurden mit Hilfe des sog. "DIG-PCR-Labeling Kits" von Roche synthetisiert. Oligonukleotide stromaufwärts und stromabwärts der zu markierenden Sequenz werden in einer PCR-Amplifikation mit chemisch markierten Digoxigenin-Nukleotiden eingesetzt und das resultierende Produkt elektrophoretisch analysiert und aufgereinigt. Die Bedingungen wurden nach Herstellerangaben gewählt.

## **2.8 Gewinnung und Behandlung von Proteinen für Western-Analysen**

### **2.8.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *H. polymorpha***

Die Zellen einer in 5% Glycerin gewachsenen stationären 50 ml *H. polymorpha*-Kultur ( $OD_{600} = 10-15$ ) wurden in einem Falcon-Tube für 8 min bei 2500 rpm zentrifugiert und das Zellsediment zweimal mit  $NaN_3$  (10 mM) -haltigen Wasser gewaschen und insgesamt 200 OD Einheiten in 1 ml Lysis-Puffer (0,3 M Sorbitol, 50 mM HEPES, 10 mM  $NaN_3$ ) resuspendiert. Vorher wurden die Überstände für weitere Analysen gesammelt. Nach Zugabe von Proteaseinhibitoren (0,2 mM PMSF; Protease-Inhibitor Complete Roche) wurden die Proben in ein Reagenzglas überführt und mit Glasperlen ( $\varnothing$  0,45 mm) auf einem Vibrax aufgeschlossen. Durch Zugabe von 1 ml Sample-Puffer (4% SDS, 20% Glycerin, 125 mM Tris, Spatelspitze Bromphenolblau, pH 6,8) und Aufkochen (2 min) wurden die Proteine aufgeschlossen und in Lösung gebracht. Die Proben wurden bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert und vor der Verwendung durch Aufkochen neu solubilisiert (20 mM DDT frisch hinzugeben). Nach Abzentrifugation wurden hiervon 50  $\mu\text{l}$  auf das Gel aufgetragen.

### **2.8.2 Herstellung von Proteinextrakten aus *A. adenivorans***

Abweichend von 2.8.1 wurden *A. adenivorans*-Kulturen wie folgt behandelt: 50 ml Hefekultur wurde bei  $30\text{ }^\circ\text{C}$  in YPD 2% Glucose herangezogen, bis eine  $OD_{600}$  von 10 erreichte war. Die Zellen wurden bei 4000 rpm geerntet. Wurde die Myzelbildung durch Temperaturerhöhung auf  $45\text{ }^\circ\text{C}$  induziert, so mussten die Myzelien bei 8000 rpm abzentrifugiert werden.

### **2.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde mit der Mikrobiuret-Methode [Zamenhoff, 1957] bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin in Konzentrationen von 0 bis  $200\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ . 0,5 ml Mikrobiuret-Reagenz (8 M NaOH; 0,2% Kupfersulfat) wurde zu 1 ml wässriger, proteinhaltiger Lösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proben in Quarzküvetten bei einer Extinktion von 290 nm im Photometer bestimmt.

### **2.8.4 Elektrophoretische Trennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen**

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen [Laemmli, 1970]. Zur Auftrennung der Proteine wurden ein 5% Sammelgel (125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 5% Acrylamid) und ein 7,5-15% Trenngel (375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 7,5-15% Acrylamid) verwendet. Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS. Die Proben wurden mit 2 x Probenpuffer (4% SDS; 20% Glycerin; 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 20 mM DTT; 0,02% Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei  $95\text{ }^\circ\text{C}$  denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 40-50 V über Nacht oder bei maximal 250 V und 35 mA. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurden verschiedene "prestained" Molekulargewichtsstandards von Sigma eingesetzt.

### **2.8.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot Analyse**

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Die Übertragung erfolgte in Transfer-

Puffer (25 mM Tris; 0,192 M Glycin; 20% Methanol) für 4 h bei 55 V (250 mA). Der Proteintransfer wurde durch reversible Färbung des Filters mit Ponceau S überprüft. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Membran für 1 h in PBS/ Tween (10 mM Natriumphosphat, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,1% Tween20; „PBSTB“) mit 15 g l<sup>-1</sup> BSA blockiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper (spezifische Verdünnung in 6 ml PBSTB) erfolgte je nach Antikörper bei Raumtemperatur (Dauer: 1 h bis über Nacht). Anschließend wurde der Filter 2 x mit PBS/ Tween-Puffer gewaschen und darauf für 60 min mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Verschiedene Sekundärantikörper (gekoppelt an alkalische Phosphatase) wurden in spezifischen Verdünnungen eingesetzt. Die Membran wurde anschließend dreimal mit PBS/ Tween-Puffer und zweimal mit Substratpuffer (0,1 M Tris/ HCl, 0,1 M NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,8) gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine Phosphatase-katalysierte Farb-Reaktion der Substrate NBT (1 mg ml<sup>-1</sup>) und BCiP (0,1 mg ml<sup>-1</sup>) in Substratpuffer. Nach abgeschlossener Farbreaktion (5-60 min) wurde der Filter mehrfach in Wasser gewaschen und dokumentiert.

## 2.9 Detektion der Reportergerenprodukte

### 2.9.1 GFP

In dieser Arbeit wurde eine speziell für die Translation in der Hefe *S. cerevisiae* optimierte Form des wt-GFP verwendet, das yEGFP3 (yeast enhanced green fluorescent protein3). Dieses Protein zeigt in *S. cerevisiae* eine stärkere Fluoreszenz als wt-GFP [Cormack *et al*, 1996]. Stationäre 3 ml Kulturen von *A. adenivorans* wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop auf grüne Fluoreszenz untersucht [Niedenthal *et al*, 1996].

### 2.9.2 Nachweis der Phytase-Aktivität

Das Protokoll gilt für alle getesteten Hefen. Alleine die Anzuchtbedingungen differieren: *A. adenivorans* (37 °C Hefe/ 45 °C Myzel), *P. stipitis* (30 °C), *S. cerevisiae* (30 °C) und *H. polymorpha* (37 °C). Aus 3 ml stationären Kulturen wurden die Hefezellen geerntet und der Überstand weiterverwertet. 25-200 µl des Überstandes wurden eingesetzt. Bezogen auf ein 25 µl Aliquot wurden 25 µl 5 M NaAc und 50 µl 4-Nitrophenylphosphat hinzugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Umsetzung des Substrates wurde durch Zugabe von 100 µl 15% Trichloressigsäure eingestellt. Nach Zugabe von 100 µl 1 M NaOH erscheinen die positiven Kulturüberstände intensiv gelb gefärbt. Die Gelbfärbung wurde durch OD<sub>405</sub>-Messung im Photometer quantifiziert und auf die gemessene OD<sub>600</sub> der Ausgangskultur bezogen.

### 2.9.3 X-Gal-Overlay-Assay (*lacZ*)

Der Nachweis der β-Galactosidase-Aktivität wurde mit einem Überschichtungs-Test auf Tropfkulturen von *A. adenivorans* durchgeführt [Suckow und Hollenberg, 1998]. Übernachtskulturen der zu testenden Stämme wurden auf eine vergleichbare OD<sub>600</sub> verdünnt, 4 µl auf Vollmediumsplatten getropft und 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Überschichten mit Substrat-/ Agar-Gemisch (0,5% Agarose, 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7)); 0,2% SDS; 2 mg ml<sup>-1</sup> X-Gal (o-Nitrophenyl-β-D-Galacto-pyranoside) bei 70 °C wurde bei β-Galactosidase-Aktivität in den Zellen eine Blaufärbung der Kolonien erkennbar.

## 2.10 Tetradenanalyse

Diploide *S. cerevisiae*-Stämme wurden zur Sporulation über Nacht in 3 ml YPD-Medium herangezogen, dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und in 3 ml Sporulationsmedium (1% KOAc mit essentiellen Aminosäuren) aufgenommen. Nach dreitägiger Inkubation bei 30°C wurde 1 ml des Ansatzes abzentrifugiert und die Zellen in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen. Zur Entfernung der Ascuswand wurden 20 µl der Suspension mit 20 µl Zymolyaselösung ( $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Sporen mit einem Mikro-manipulator auf einer YPD-Platte abgelegt und zum Auskeimen für 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

## 2.11 Tropftest zur Auswertung von Wachstumsphänotypen

Zur Phänotyp-Analyse von *cne1*-Deletions- und Komplementations-Stämmen wurden Zellen über Nacht in 3 ml YPD-Medium herangezogen, abzentrifugiert und in soviel sterilem Wasser aufgenommen, bis die  $OD_{600}$  in allen Kulturen 1 betrug. Die Zellen wurden soweit mit sterilem Wasser verdünnt, bis je 4 Verdünnungen in folgenden Konzentrationen verfügbar waren:  $2 \times 10^6 \text{ Zellen ml}^{-1}$ ,  $2 \times 10^5 \text{ Zellen ml}^{-1}$ ,  $2 \times 10^4 \text{ Zellen ml}^{-1}$  und  $2 \times 10^3 \text{ Zellen ml}^{-1}$ . Von jeder Verdünnungsstufe wurden 5 ml auf YPD-Platten getropft und 2 Tage bei 30 °C herangezogen. In den jeweiligen Tropfen der Verdünnungsreihe befanden sich 10000, 1000, 100 und 10 Zellen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Aufbau einer Spezies übergreifende Expressions-Plattform

In früheren Arbeiten wurde erfolgreich die Integration heterologer DNA in die rDNA von *H. polymorpha* demonstriert [Cox *et al*, 2000; Klabunde *et al*, 2002]. Das Hauptinteresse der vorgelegten Arbeit fokussierte sich auf die Kointegration von mehreren heterologen Expressionsvektoren in einem einzigen Transformationsansatz. Auf diese Weise konnten bis zu drei Plasmide in verschiedenen Kombinationen in die rDNA integriert werden [Klabunde *et al*, 2002]. Ebenso wurde die gleichzeitige Expression der eingebrachten Reportergene erfolgreich demonstriert. Die Stöchiometrie der Kopienzahl an verschiedenen gleichzeitig integrierten Plasmidsequenzen erwies sich als rein zufällig. Dadurch eröffnete sich die Möglichkeit einer Gendosis-abhängigen Koproduktion verschiedener Proteine in erwünschten stöchiometrischen Verhältnissen. Eine nahe liegende Anwendung dieser Möglichkeit zur Kointegration, bestand in der Identifizierung von Hilfsfaktoren zur Produktionssteigerung biotechnologisch relevanter Proteine und deren Koproduktion mit dem Produkt der Wahl. Da die kodierenden Bereiche der rDNA verschiedener Mikroorganismen sehr hohe Homologien aufweisen [Naehring *et al*, 1995], sollte es möglich sein, mit einer rDNA-Sequenz einer bestimmten Spezies heterologe Sequenzen auch in das Genom anderer Organismen zu dirigieren. Unter der Voraussetzung, dass der zur Fremdgen-Expression genutzte Promotor in allen Zielorganismen funktionsfähig ist, könnten so mit einem einzigen Expressionsvektor unterschiedliche Organismen transformiert und gleichzeitig auf eine optimale Eignung für die Produktion des erwünschten Proteins getestet werden. Dazu ist die Festlegung geeigneter rDNA-Integrationssequenzen von entscheidender Bedeutung. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine rDNA-Einheit (repetitive rDNA-Transkriptionseinheit) aus *H. polymorpha* isoliert und nach erfolgter Sequenzierung im Vergleich zu bekannten rDNA-Sequenzen charakterisiert.

#### 3.1.1 Sequenzierung der *H. polymorpha* rDNA

Der in M & M beschriebene Vektor prHp beinhaltet ein 7,8 kb großes Fragment chromosomaler DNA isoliert aus dem *H. polymorpha* Stamm RB11. Die DNA wurde in mehreren Schritten vollständig sequenziert. Nach Sequenzabgleich mit den bekannten rDNA-Sequenzen von *S. cerevisiae* [Johnston *et al*, 1997] und *Ashbya gossypii* [Wendland *et al*, 1999] wurde offenkundig, dass es sich hierbei um eine nahezu vollständige rDNA-Einheit handelte, bei der lediglich 0,3 kb aus der 25S rDNA fehlen. Diese Lücke konnte durch Abgleich mit bereits veröffentlichten Teilsequenzen der *H. polymorpha* rDNA geschlossen werden [Kurtzman und Robnett, 1998]. Die Anordnung und Länge der rRNA-Gene entspricht der Organisation, die für *S. cerevisiae* beschrieben ist. Lediglich in den nicht-kodierenden Bereichen (NTS, ETS und ITS) zeigte die rDNA-Sequenz eine nur geringe Homologie zu *S. cerevisiae*. Darüber hinaus wiesen diese Bereiche teilweise erheblichen Längendifferenzen auf (Tab. 4). Die Gesamtlänge einer jeden *H. polymorpha* rDNA-Einheit von 8,1 kb ist im Vergleich zu *S. cerevisiae* mit 9,1 kb oder *S. pombe* mit 10,7 kb relativ gering [Johnston *et al*, 1997; Uzawa und Yanagida, 1992]. Alle rDNA-Einheiten des *H. polymorpha* Stamms RB11 liegen auf Chromosom II der insgesamt sechs Chromosomen [Waschk *et al*, 2002]. Der genaue Transkriptionsstartpunkt des 35S

Precursor wurde 619 bp stromaufwärts des 18S rRNA-Gens lokalisiert (Abb. 6). Die genaue Lage der Introns (ITS1 und ITS2) zwischen den rRNA-Genen und der NTS Sequenzen, die zwischen den Sequenzen für die 35S Precursor liegen, konnten im Vergleich der *H. polymorpha*-Sequenz mit der rDNA von *S. cerevisiae* und *A. gossypii* bestimmt werden:

	5S	18S	5.8S	25S	NTS	ITS	ETS	rDNA
Sequenz-Gleichheit	<b>97.5%</b>	<b>94.3%</b>	<b>94.8%</b>	<b>92.3%</b>	37,4%	43%	50%	71%
Länge: <i>H. polymorpha</i>	120 bp	1799 bp	155 bp	3353 bp	1931 bp	652 bp	619 bp	8,1 kb
Länge: <i>S. cerevisiae</i>	120 bp	1797 bp	153 bp	3389 bp	2511 bp	766 bp	703 bp	9,1 kb

Tabelle 4: Sequenzvergleich von *S. cerevisiae* und *H. polymorpha* rDNA-Teilsequenzen

Die Tabelle zeigt Sequenzübereinstimmungen in den kodierenden und nicht-kodierenden Abschnitten der rDNA-Einheiten von *S. cerevisiae* und *H. polymorpha*. Auch die absoluten Längen der 4 einzelnen Sequenzen wurden miteinander verglichen. Die Längenangaben für NTS und ITS beinhalten die 5S respektive 5.8S rRNA.

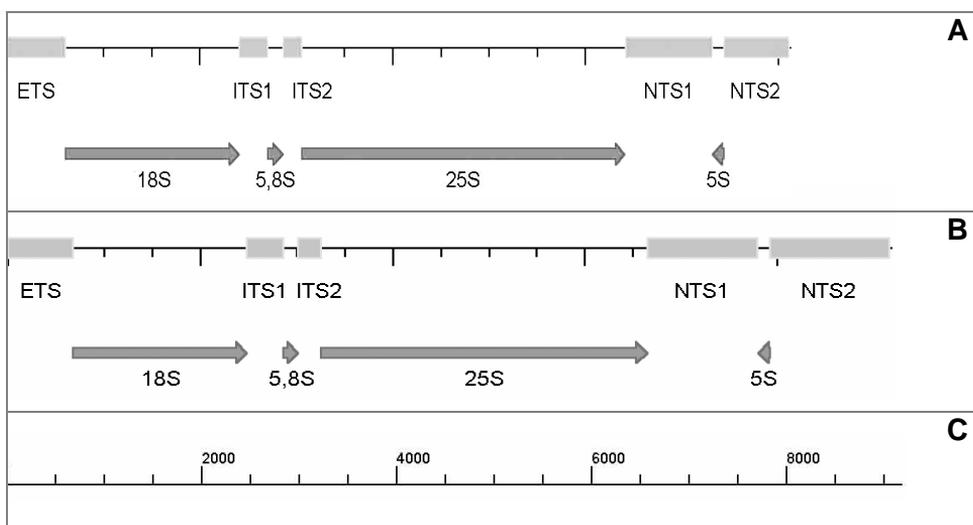


Abbildung 6: Vergleich der rDNA-Organisation von *H. polymorpha* und *S. cerevisiae*

Die Abbildung verdeutlicht die maßstabsgetreue Anordnung der einzelnen kodierenden und nicht-kodierenden rDNA-Sequenzen von *H. polymorpha* (A) verglichen mit *S. cerevisiae* (B). Die Dimensionen und die Anordnung der einzelnen rRNA-Gene und nicht-kodierenden Sequenzen erscheinen nahezu identisch. Nur beim NTS2 und ITS1 wird ein erheblicher Längenunterschied erkennbar. C: Maßstab in bp.

### 3.1.2 Konstruktion eines multifunktionalen Vektor-Systems

Die in der früheren Studie [Klabunde *et al*, 2002] zur rDNA-Integration in *H. polymorpha* genutzte NTS-Sequenz (Abb. 7 B, Balken C) eignete sich aufgrund der oben beschriebenen geringen Homologien der rDNA nicht als Rekombinationssequenz für heterologe Wirtsorganismen. Kodierenden Sequenzen, etwa die 18S rDNA sollten aufgrund der hohen Konservierung eine bessere Tauglichkeit für eine rDNA-Integration besitzen. Es sollte daher die Möglichkeit ihres Einsatzes in integrativen Vektoren zur Transformation verschiedener Hefen getestet werden. Um eine möglichst breite Anwendung in Mikroorganismen zu gewährleisten, wurden folgende Vektorelemente festgelegt (Abb. 7 A).

- Das bakterielle *hph*<sup>R</sup>-Gen aus *E. coli* als dominanter Resistenzmarker zur Selektion gegen Hygromycin B um auch solche Organismen untersuchen zu können, für die noch keine oder wenige auxotrophe Mutanten zur Verfügung stehen.
- Ein ausreichend langer Teilabschnitt der 18S rDNA-Sequenz aus *H. polymorpha* mit verschiedenen singulären Restriktionsschnittstellen für gezieltes Dirigieren der Vektorsequenzen in das Wirtsgenom.
- Der *TEF1*-Promotor aus *A. adeninivorans* als universelles Steuerelement für eine konstitutive Expression von Resistenz- und Zielgenen.
- pUC18 Vektoranteile für eine effiziente Propagation in *E. coli*.
- Eine MCS (multi cloning site) für die Insertion der Expressionskassetten.
- Diverse singuläre Restriktionsschnittstellen innerhalb der 18S für eine Linearisierung mit ausreichend langen flankierenden rDNA-Sequenzen für die homologe Rekombination.
- Als erster Vektor mit den beschriebenen Elementen wurde pMr (M & M) konstruiert. Die grauen Balken in Abb. 7 B verdeutlichen die Lage der verschiedenen eingesetzten Integrationskassetten innerhalb einer rDNA-Einheit und deren Zuordnung zu den Vektoren.

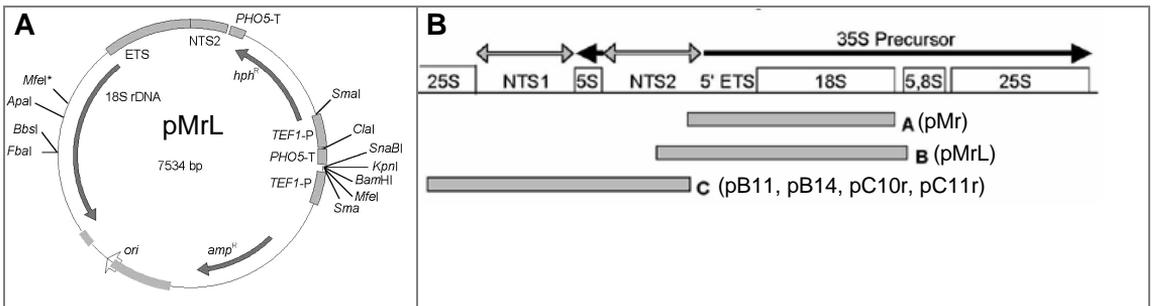


Abbildung 7: Physikalische Karte von pMrL und der getesteten *H. polymorpha* rDNA-Kassetten

**A:** Plasmid pMrL mit folgenden Elementen: *ori* und Ampicillin-Resistenzgen (*amp*<sup>R</sup>) für Propagation in *E. coli*; das Hygromycin B-Resistenzgen aus *E. coli* (*hph*<sup>R</sup>) unter Kontrolle des starken konstitutiven *TEF1*-Promotors aus *A. adeninivorans* für die Selektion in verschiedenen Hefen; rDNA-Integrationskassette aus *H. polymorpha* (Balken B in Abb. 7 B). Singuläre Restriktionsstellen innerhalb der Integrationskassette (*ApaI*, *BbsI* and *FbaI*); Die verschiedenen Expressionskassetten werden zwischen *TEF1*-Promotor und *PHO5*-Terminator in die MCS mit den Restriktionsschnittstellen *MfeI*, *BamHI*, *SnaBI* und *KpnI* inseriert.

**B:** Schematische Darstellung einer *H. polymorpha* rDNA-Einheit mit den 18S, 25S, 5.8S und 5S rRNA-Genen und nicht kodierenden Sequenzen (NTS und ETS). Die grauen Balken (A, B und C) überdecken diejenigen Abschnitte der rDNA-Sequenz, welche in früheren Untersuchungen (C) [Klabunde *et al*, 2002] und in der vorliegenden Arbeit (A + B) als Integrationskassette eingesetzt wurden.

### 3.1.3 Funktionstest von pMr in *H. polymorpha* und *A. adeninivorans*

Um die Funktionstüchtigkeit von pMr in verschiedenen Hefen zu untersuchen, kamen Reportergene (inseriert in die MCS) zum Einsatz, deren Genprodukte einfach nachweisbar sind. Gene für das bakterielle *lacZ*, eine Hefe-"codon usage" optimierte Variante für GFP und ein Gen für eine Phytase-Variante (sekretorisches Protein) wurden in einer ersten Testreihe in den Expressionskassetten verwendet. *H. polymorpha* und *A. adeninivorans* wurden mit den resultierenden Vektoren pMr-GFP, pMr-Phyt und pMr-lacZ transformiert. Für beide Hefen konnten rekombinante Stämme generiert werden, wobei jedoch nur die Expression der Phytase gezeigt werden konnte. Die gemessenen Phytase-Aktivitäten der analysierten *H. polymorpha*-Stämme lagen dabei weit unter den Werten, die in früheren Studien mit NTS rDNA-Integrationskassetten erreicht wurden (Daten nicht gezeigt). Die Koexpression von zwei oder sogar drei Reportergenen bei Kotransformation mehrerer unterschiedlichen Expressionskassetten konnte in keinem der 102 getesteten rekombinanten *H. polymorpha*- und

*A. adenivorans*-Stämmen nachgewiesen werden. Auch die Kointegration in der rDNA konnte in Southern-Blot Analysen nicht gezeigt werden. Die beobachteten Transformationseffizienzen waren sowohl für *A. adenivorans* als auch für *H. polymorpha* sehr gering. Weniger als 50 positive Klone pro µg transformierter DNA konnten in allen betrachteten Fällen erreicht werden. Bei der Passagierung der Transformanden verloren mehr als die Hälfte der betrachteten Stämme ihre Wachstumsfähigkeit auf Hygromycin B-haltigen Medium. In einer Langzeitkultur eines Phytase-sezernierenden *H. polymorpha*-Stamms in nicht selektivem Medium sank die Enzymaktivität im Kulturüberstand schon nach drei Tagen. Nach 7 Tagen konnte keinerlei Aktivität mehr nachgewiesen werden. Der gleiche Verlust an Phytase-Aktivität wurde auch in mehreren *A. adenivorans*-Stämmen nach mehrtägiger Kultivierung in nicht selektivem Medium beobachtet. Mitotische Stabilität, Transformationseffizienz und mögliche Kointegrationen, die in früheren Studien mit einer rDNA-Integrationskassette mit NTS Elementen (Abb. 7 B, Balken C) und *URA3*-Selektion in *H. polymorpha* erreicht wurden [Klabunde *et al*, 2002], konnten mit den von pMr abgeleiteten Vektoren nicht reproduziert werden. Unter Annahme einer ähnlichen Organisation wie sie für *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Abb. 2), konnte nach Abschluss der Sequenzierung der *H. polymorpha* rDNA-Einheit der Transkriptionsstart des 35S Precursors und putative Promotorelemente genauer zugeordnet werden. Folglich fehlten in der genutzten Integrationskassette sämtliche Promotorelemente, die stromaufwärts des Transkriptionsstart am 5'-ETS liegen. Daher wurden in einer neuen Serie erweiterte Integrationssequenzen evaluiert. Aufgrund der fehlenden Homologien in den nicht kodierenden Bereichen wurde an der Nutzung der 18S rDNA als Integrationskassette festgehalten und diese Sequenz um 250 bp des vermutlichen Promotorbereich verlängert (Abb. 7 B, Balken B). Der resultierende Vektor pMrL diente als Basis aller weiteren Expressionsvektoren in der vorliegenden Arbeit.

### **3.1.4 Auswirkungen einer modifizierten Integrationskassette**

Die Funktionstüchtigkeit des oben beschriebenen Vektors mit der verlängerten Integrationskassette wurde in vier Hefen untersucht. Neben *A. adenivorans* und *H. polymorpha* die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen, wurden *S. cerevisiae* und *P. stipitis* betrachtet um ein breiteres Spektrum an Hefen zu untersuchen. Die vier Hefen wurden mit einer definierten Menge linearisierten pMrL transformiert und die jeweilig optimale Hygromycin B-Konzentrationen für die Selektion bestimmt (Tab. 5). Nach erfolgter Transformation wurden die positiven Klone zur Stabilisierung der Integrationsprozesse und Erhöhung der Kopienzahl passagiert (M & M). Für *H. polymorpha* und *S. cerevisiae* konnte die rDNA-Integration mittels analytischer PCR verifiziert werden (siehe Kapitel 3.2.1.2). Für die anderen beiden Hefen liegen keine vollständigen Sequenzdaten für die rDNA vor, demnach konnte auch kein PCR-Nachweis geführt werden. Nach Wachstum mehrerer rekombinanter Stämme aller untersuchten Hefen in nicht selektivem Medium für 15 Tage wurde kein Verlust an Hygromycin B-Resistenz der betrachteten Transformanden beobachtet.

Hefe \ Hygromycin B	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	[mg l <sup>-1</sup> ]
<i>S. cerevisiae</i>			<b>98</b>	23	9	0	0	0	0	0	Transformanden [µg <sup>-1</sup> ]
<i>A. adeninivorans</i>						<b>443</b>	32	20	1	0	
<i>H. polymorpha</i>								<b>870</b>	132	5	
<i>P. stipitis</i>					<b>278</b>	72	2	0	0	0	

Tabelle 5: Transformationseffizienz bei verschiedenen Hygromycin B Konzentrationen

Mehrere Ansätze aller vier getesteter Hefen wurden mit der gleichen Menge an linearisierten Plasmid pMrL unter vergleichbaren Bedingungen transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf verschiedenen Platten mit variierenden Hygromycin B-Konzentrationen ausplattiert. Die positiven Klone wurden ausgezählt und der Durchschnittswert für alle Ansätze in Relation zur eingesetzten Menge an linearisiertem Plasmid gesetzt. Die fettgedruckten Ziffern kennzeichnen die Anzahl positiver Klone bei der jeweilig optimalen Hygromycin B-Konzentration. Untransformierte Kontrollstämme zeigten kein spontanes Wachstum auf Hygromycin B-haltigen Medien. War die zur Selektion eingesetzte Hygromycin B-Konzentration zu gering, überdeckte das Hintergrundwachstum die positiven Klone.

### 3.1.5 Phytase-Expression in mehreren Hefen

Um die Funktionstüchtigkeit des *TEF1*-Promotors zu prüfen, wurde Phytase als sekretorisches Modellgen gewählt. *S. cerevisiae*, *H. polymorpha*, *A. adeninivorans* und *P. stipitis* wurden mit dem linearisierten Vektor pMrL-Phyt und pMrL (Vektorkontrolle) transformiert und jeweils 9 resultierende rekombinante Stämme passagiert. Nach Anzucht einer jeden Hefeart in 3 ml Selektionsmedium, wurde die Phytase-Aktivität im Kulturüberstand bestimmt (Abb. 8). Rekombinante *H. polymorpha*-Stämme zeigten die höchsten Phytase-Aktivitäten von bis zu 25 U ml<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup>. *A. adeninivorans* und *P. stipitis* sezernierten Phytase mit einer Aktivität zwischen 10 und 15 U ml<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup>. Für *S. cerevisiae* konnte in keinem der 8 getesteten Stämme Phytase nachgewiesen werden. Im Fall von *H. polymorpha* sezernierten zwei der 8 rekombinanten Stämme keine Phytase und für *A. adeninivorans* und *P. stipitis* wurde je ein Stamm ohne signifikante Phytase-Expression bestimmt. Der Effekt, dass 10 bis 20% aller rekombinanten Stämme mit integrierten Plasmidsequenzen keinerlei Expression von Reportergenen zeigten, wurde auch in der früheren Studie in *H. polymorpha* bei der Expression von Modellgenen aus der rDNA beobachtet [Klabunde *et al*, 2002]. Die detektierte Phytase-Aktivität im Überstand war im Mittel vergleichbar mit früheren Ergebnisse mit rDNA-Integrationsvektoren (NTS-Integrationskassette, *URA3*-Selektion).

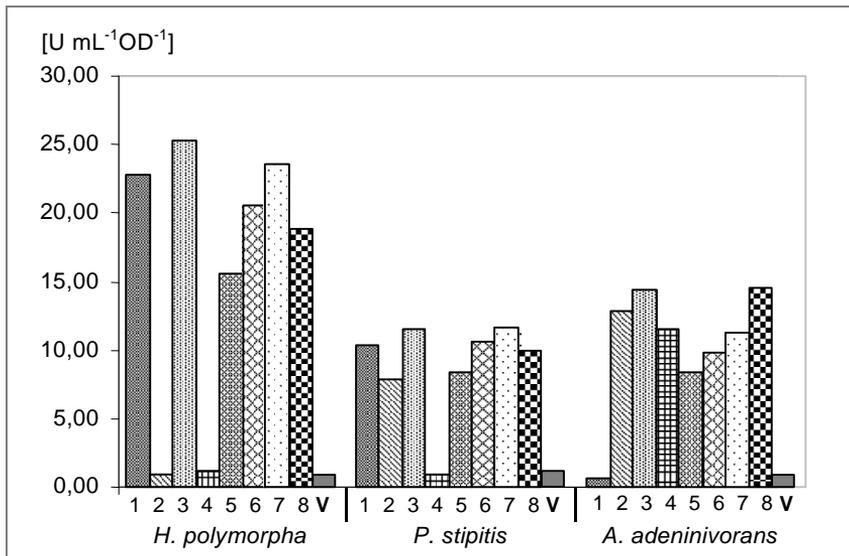


Abbildung 8: Phytase Produktion verschiedener Hefe-Stämme

Phytase-Aktivitäten von je 8 rekombinanten Stämmen der Hefen *H. polymorpha*, *P. stipitis* und *A. adenivorans*. Alle drei Hefen wurden mit dem Vektor pMrL-Phyt transformiert, V kennzeichnet die Vektorkontrollen mit einer geringen Hintergrund Phytase-Aktivität (Hefen transformiert mit pMrL). Je ein Stamm für *A. adenivorans* und *P. stipitis* und zwei *H. polymorpha*-Stämme zeigten keine Phytase-Aktivität. Die Höhe der gemessenen Phytase-Aktivitäten reichte von 8 bis zu 25 U ml<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup>.

### 3.1.6 Kointegration von Reporter-Plasmiden in die rDNA von *A. adenivorans*

Die Möglichkeit der gleichzeitigen Integration von mehreren Expressionsvektoren in einem Transformationsansatz, die für *H. polymorpha* gezeigt wurde, sollte auch für andere Organismen nachvollzogen werden. Auf diese Weise könnte demonstriert werden, dass es sich dabei nicht um einen für *H. polymorpha* spezifischen Effekt handelte. *A. adenivorans* LS3 wurde mit äquimolaren Mengen pMrL-GFP, pMrL-Phyt und pMrL-lacZ (*Bbs*I-linearisiert) transformiert. Die resultierenden rekombinanten Stämme wurden stabilisiert und aus vereinzelt Kolonien chromosomale DNA isoliert. In einer Southern-Hybridisierung (Abb. 9) wurde die Integration der Expressionsvektoren in die rDNA von *A. adenivorans* untersucht. Genomische DNA der rekombinanten Stämme wurde mit *Pvu*II restringiert und auf einem Agarosegel (0,8%) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach erfolgtem Transfer auf eine Nylonmembran wurde mit einer Sonde gegen *hph*<sup>R</sup> hybridisiert. Liegen tandemförmig integrierte Plasmidsequenzen vor, so entstehen nach *Pvu*II-Restriktion folgende von der Sonde erfassten Fragmente: pMrL-Phyt **6,3** kb, pMrL-GFP **4,7** kb und pMrL-lacZ **10,2** kb.

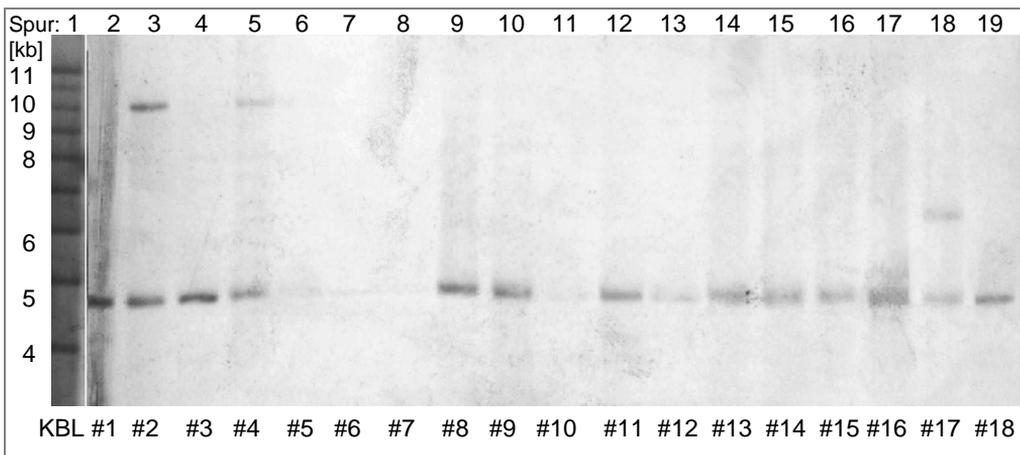


Abbildung 9: Southern-Blot Analyse *A. adenivorans* Stämme mit kointegrierten Reporter-Plasmiden

Analyse von 18 kotransformierten Stämmen auf die Anwesenheit integrierter Plasmidsequenzen. Spur 1: DNA-Größenstandard (KBL); Spur 2-19: rekombinante *A. adenivorans*-Stämme. Die Stämme No. 1, 3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 und 18. zeigten Signale für integrierte pMrL-GFP Plasmidsequenzen. Vier Stämme zeigten keine Signale aufgrund degradierter DNA. Drei Stämme (No. 2, 4 und 17) zeigten Signale für kointegrierte Plasmidsequenzen. In den Stämmen No. 2 und 4 liegen Kombinationen von GFP- und *lacZ*-Expressionsvektoren, in Stamm No. 17 eine Kombination von GFP- und Phytase-Expressionsvektoren vor.

In drei Stämmen konnte das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Plasmid-Sequenzen gezeigt werden. Die Expression jeweils beider Reportergene wurde für alle drei Stämme (No. 2, 4 und 17) durch X-Gal-Overlay, photometrische Bestimmung der Phytase-Aktivität und GFP-Fluoreszenz bestätigt (Abb. 10). Hierfür wurden von allen 18 untersuchten Stämmen 3 ml Kulturen in nicht selektivem Medium herangezogen und auf die Zellen auf grüne Fluoreszenz untersucht. Abgesehen von der Vektorkontrolle und des untransformierten Stamms LS3 leuchteten die Zellen aller 18 Proben (Daten nicht gezeigt). Die gleichen Kulturen wurden auf  $\beta$ -Galactosidase- (Abb. 10 A) und Phytase-Aktivität (Abb. 10 B) getestet.

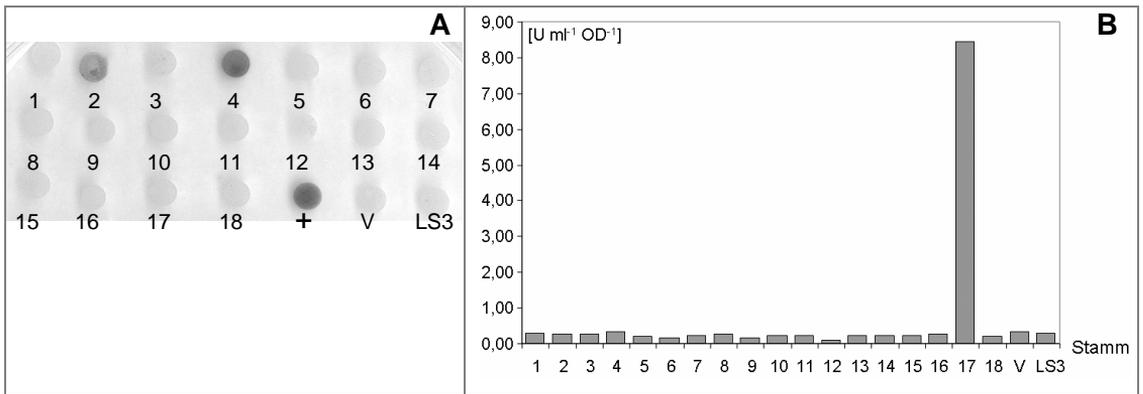


Abbildung 10: X-Gal-Overlay und Phytase-Bestimmung von kotransformierten *A. adeninivorans*-Stämmen

**A.** Die Abbildung zeigt das X-Gal-Overlay von Kolonien der 18 untersuchten *A. adeninivorans*-Stämme No. 1 bis 18, eines Stamms transformiert mit pMrL-lacZ (+: Positivkontrolle), eines Stamms transformiert mit pMrL (V: Vektorkontrolle) und dem untransformierten Stamm (LS3). Die Kolonien der Stämme No. 2, 4 und der Positivkontrolle zeigten eine intensive Blaufärbung.

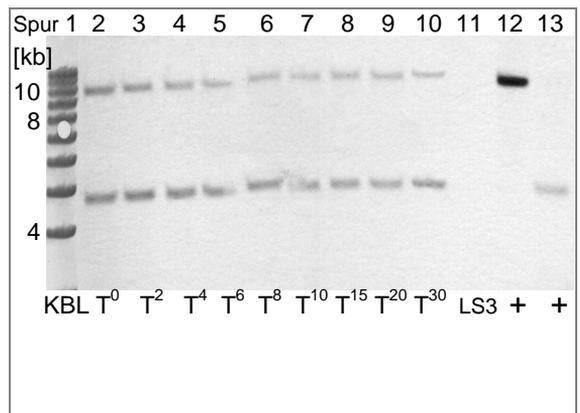
**B.** Phytase-Aktivitäten aller 18 kotransformierter Stämme, der Vektorkontrolle V (LS3 transformiert mit pMrL-Phyt) und dem untransformierten Stamm (LS3). Nur die Kultur von Stamm No. 17 zeigte 8,5 U ml<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> Phytase-Aktivität im Überstand. Die Überstände aller anderen Stämme, die Kontrollen eingeschlossen, zeigten ausschließlich Hintergrundaktivität (0,17 bis 0,31 U ml<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup>).

### 3.1.7 Stabilität eines *A. adeninivorans*-Stammes mit kointegrierten Plasmiden

Um die mitotische Stabilität der in 3.1.6 generierten rekombinanten *A. adeninivorans*-Stämme zu demonstrieren, wurde Stamm No. 2 über eine Zeit von 30 Tagen in nicht-selektivem Medium kultiviert. Hierfür wurde aus einer 50 ml Kultur alle 48 h in frisches Medium überimpft und Proben entnommen. Aus den gesammelten Proben wurde genomische DNA isoliert und diese in einer Southern-Blot Analyse auf integrierte Vektorsequenzen überprüft (Abb. 11).

Abbildung 11: Dauertest eines *A. adeninivorans* Stammes mit kointegrierten Reportergenen

Southern-Blot Analyse der Langzeitkultur von *A. adeninivorans* Stamm No. 2. Chronologisch isolierte genomische DNA wurde mit *PvuII* restringiert, auf einem Agarosegel (0,8%) elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Sonde gegen *hph*<sup>R</sup> hybridisiert. Nach *PvuII*-Restriktion entstehen Fragmente von 10,2 kb (integrierte *lacZ*-) und 4,7 kb (integrierte GFP-Expressionsvektoren). Spur 1: DNA-Größenstandard (KBL); Spur 2-10: Stamm No. 2 nach 0 Tagen (T<sup>0</sup>) bis 30 Tagen (T<sup>30</sup>); Spur 11: untransformierter *A. adeninivorans* Stamm LS3; Spur 12/ 13: *PvuII*-restringierte pMrL-lacZ und pMrL-GFP. Leichte Schwankungen in der Signalintensität korrelierten mit der absoluten Menge an chromosomaler DNA, die auf dem EtBr-gefärbten Agarosegel erkennbar waren.



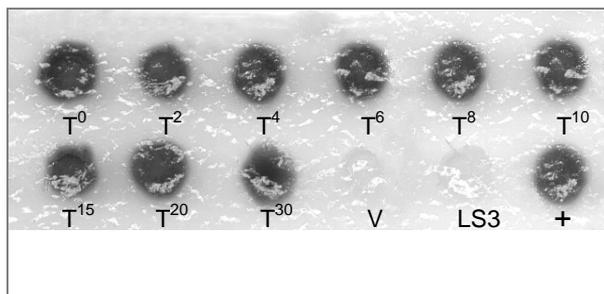
Die Auswertung des Blots zeigt keine wesentlichen Veränderungen in der Signalintensität beider Plasmidsequenzen über den gesamten betrachteten Zeitraum (unter Berücksichtigung der Korrelation von Schwankungen in den Signalintensitäten zu der abgeschätzten DNA-Menge im Gel). Auch gibt es keine Variation in den Signalintensität der beiden Expressions-

plasmide relativ zueinander. Dieses Experiment demonstriert dass die mitotische Stabilität der kointegrierten Plasmidsequenzen, die schon für *H. polymorpha*-Stämme gefunden wurde, auch in *A. adeninivorans* erreicht werden kann.

In einer weiteren Untersuchung konnte zusätzlich die dauerhafte Expression beider Reportergene über den betrachteten Zeitraum gezeigt werden (Abb. 12: X-Gal-Overlay). Hierfür wurden die chronologisch gesammelten Proben in 3 ml nicht-selektiven Medium kultiviert und die Zellen auf grüne Fluoreszenz (GFP-Expression) untersucht. Zellen jeder Kultur die aus der Langzeitkultur über 30 Tage entnommen wurde zeigten grünes Leuchten (Daten nicht gezeigt). Für die gleichen Kulturen konnte über den gesamten Zeitraum eine gleich bleibende  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Abbildung 12 X-Gal-Overlay von Proben einer Dauerkultur

Die Abbildung zeigt die Blaufärbung von Kolonien der chronologisch gesammelten Proben einer Dauerkultur des *A. adeninivorans*-Stamms No. 2 (Kapitel 3.1.6/ Abb. 9). T<sup>0</sup> bis T<sup>30</sup> bedeutet: Probe am Tag 0 der Dauerkultur bis Probe am Tag 30; V: LS3 transformiert mit pMrL (Vektorkontrolle); LS3: untransformierter Stamm LS3; +: LS3 transformiert mit pMrL-lacZ als Positivkontrolle. Die Kolonien aller untersuchten Zeitpunkte zeigten vergleichbar intensive Blaufärbungen im X-Gal-Overlay.



Zusammenfassend betrachtet konnten die für *H. polymorpha* demonstrierten Möglichkeiten der Kointegration und Koexpression von Reportergenen am rDNA-Locus auf *A. adeninivorans* übertragen werden. Auch die für *H. polymorpha* gezeigte hohe mitotische Stabilität der erzeugten rekombinanten Stämme konnte für das *A. adeninivorans*-Expressionsystem bestätigt werden. Mit Hilfe des sekretorischen Modellproteins Phytase wurde für drei von vier getesteten Hefen die Funktionalität eines Vektorsystems bestätigt. Mit diesem Vektorsystem ist es möglich verschiedene Hefearten gleichzeitig auf die Kompatibilität von heterologen Produkt und Wirtsorganismus zu testen. Führt diese Vorauswahl zum Erfolg können für die jeweilige Expressionsplattform optimale Elemente festgelegt werden (z.B. spezifische Promotorsequenzen, Signalsequenzen, Selektionsmarker etc.).

### 3.2 Isolation von Genen aus dem sekretorischen Weg von *H. polymorpha*

Als konkrete Anwendung für die oben geschilderte Kointegration von zwei oder mehreren Expressionsvektoren kommen viele Anwendungen in Betracht. Eine davon ist die Koexpression von Genen endogener Faktoren, die einen steigernden Einfluss auf die Produktivität und Sekretion von rekombinanten Expressionssystemen ausüben. Insbesondere die Kointegration von Plasmidsequenzen im variablen Verhältnis zueinander ist in diesem Zusammenhang von erheblichem Vorteil. Verschiedene Kopienzahlen an integrierten Expressionskassetten können in differenzierten Expressionsraten der eingebrachten Gene resultieren. In Tab. 1 werden einige Beispiele aufgelistet, in denen erfolgreich eine Produktionssteigerung rekombinant hergestellter Proteine durch Überexpression spezifischer Gene aus dem sekretorischen Weg erreicht wurde. Bei der Passage großer Mengen heterologer Proteine durch den sekretorischen Apparat kommt es zu verschiedenen Engpässen die zum Teil durch Überproduktion der

limitierenden Faktoren behoben werden konnten. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit in der *H. polymorpha*-Expressionsplattform mit Hilfe des multifunktionalen Vektorsystems verfolgt. Als erstes galt es Gene aus *H. polymorpha* zu isolieren, die zum Beispiel in *S. cerevisiae* Sekretions- oder Expressions-unterstützende Wirkungen auf rekombinant erzeugte Proteine gezeigt hatten.

### **3.2.1 Isolation eines *CNE1* (Calnexin) Homologen aus *H. polymorpha***

#### **3.2.1.1 Vergleich von *S. cerevisiae CNE1* mit putativen *H. polymorpha CNE1***

Mittels Datenbank-Analyse wurde eine Sequenz im *H. polymorpha*-Genom identifiziert, die hohe Homologien zu der *S. cerevisiae CNE1*-Sequenz (*ScCNE1*) aufwies. Mit Hilfe einer PCR-Strategie (M & M) wurde ein 1673 bp langes Fragment aus chromosomaler DNA des *H. polymorpha*-Stamms RB11 isoliert. Nach anschließender Klonierung in pMrL wurde das Fragment sequenziert und die Aminosäuresequenz mit bekannten Sequenzen für *ScCNE1* und menschlichen Calnexin verglichen. Abb. 13 verdeutlicht die Homologien von putativen *H. polymorpha CNE1* (*HpCNE1*) zu *ScCNE1* und der sog. Hhn1-Box (Ratten-Calreticulin P-Domäne [Ellgaard *et al*, 2001]). In der statistischen Auswertung des *ScCNE1*-/*HpCNE1*-Sequenzvergleichs wurden 30% Identität und 46% Ähnlichkeit (Definition siehe M & M) in der Aminosäuresequenz ermittelt. Die *HpCNE1*-Sequenz zeigt eine Gleichheit von 36% und Ähnlichkeit von 49% zu humanen Calnexin. Die ersten 19 Aminosäuren des *S. cerevisiae Cne1p* bilden eine ER-Signalsequenz auf die ein hydrophober Bereich folgt, der für das Stoppen der kotranslationalen Translokation in der ER-Membran verantwortlich ist. Am carboxyterminalen Ende beider Sequenzen befindet sich kein Hefe-typisches HDEL ER-Retentionssignal [Parlati *et al*, 1995]. Zu der Calreticulin P-Domäne (1hhn) wurde 47% Gleichheit und 57% Ähnlichkeit im Vergleich zur *HpCNE1*-Aminosäuresequenz ermittelt. Dem Motiv 2 in Säuger-Calnexin wird die Lectin-Aktivität zugesprochen [Vassilakos *et al*, 1998]. Auch dieses Motiv findet sich in *ScCNE1* und *HpCNE1*.

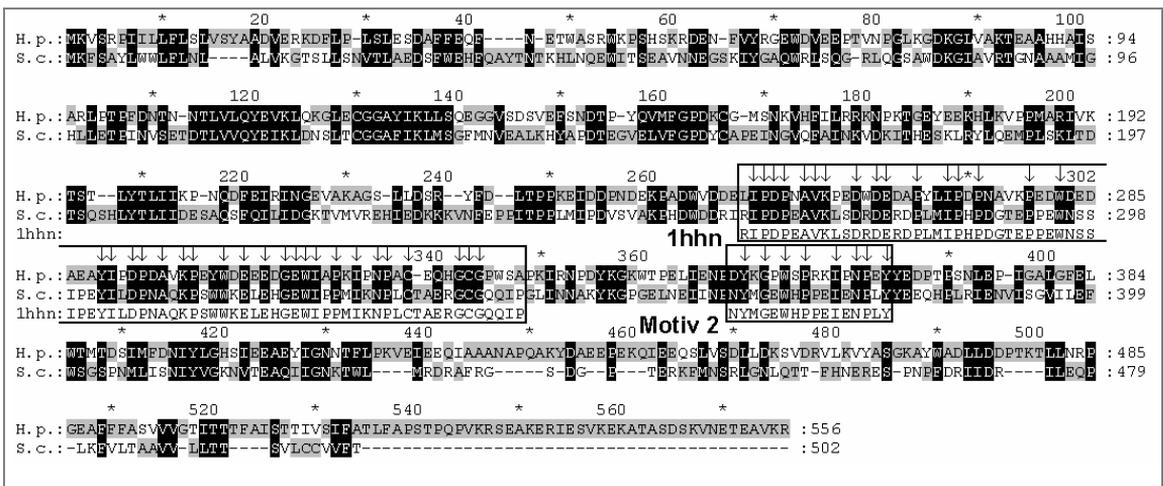


Abbildung 13: Vergleich der Aminosäuresequenz von *HpCNE1* und *ScCNE1*

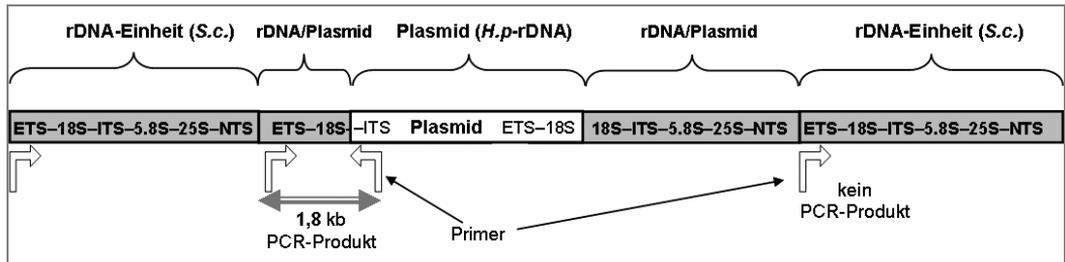
Die abgeleitete Aminosäuresequenz des aus *H. polymorpha* RB11 (H.p.) isolierten Gens wurde mit der veröffentlichten *S. cerevisiae* (S.c.) Cne1p-Sequenz verglichen. Die schwarz schattierten Bereiche kennzeichnen Sequenzübereinstimmungen oder Aminosäuren mit vergleichbaren biochemischen Merkmalen. Graue Bereiche markieren Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften (Definition in M & M). Zusätzlich wurde noch in den Kästen zwischen Position 270 und 385 die Calreticulin P-Domäne 1hhn und das Lectin-Motiv 2 zu dem Sequenzvergleich hinzugezogen. Die senkrechten Pfeile markieren die Positionen, an denen alle drei Sequenzen übereinstimmen.

Die Auswertung der Sequenzvergleiche zeigte ein hohes Maß an Homologie der isolierten Sequenz von *HpCNE1* mit *ScCNE1* und Calnexin. Insbesondere die Homologien in den funktionalen Domänen (1hhn und Calreticulin P) deuten auf eine funktionale Verwandtschaft hin. Für weiterführende Untersuchungen wurde das isolierte *HpCNE1* mit einem *c-myc*-Epitop am C-terminalen Ende markiert (*HpCNE1<sub>c-myc</sub>*) und einer Funktionsanalyse unterzogen. Das in einer PCR-Strategie erzeugte Produkt wurde nach der Klonierung in pMrL sequenziert, um PCR-Fehler auszuschließen. In dem resultierende Plasmid pMrL-CNE+ steht *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* unter Kontrolle des *A. adenivorans* *TEF1*-Promotors.

### 3.2.1.2 Integration von *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* in einen *S. cerevisiae* *cne1*-Deletionsstamm

*S. cerevisiae* *cne1*-Deletionsstämme sind lebensfähig, wobei es zu einer Verringerung des  $\beta$ -1,6 Glucan-Gehaltes in der Zellwand auf 60% des Wildtyps kommt. Als Phänotyp für diesen Defekt ist einzig eine erhöhte Resistenz gegen K1-Killertoxin in der Literatur beschrieben [Shahinian *et al*, 1998]. Um die Funktionalität von *HpCNE1* mit dem eingefügten *c-myc*-Epitop zu überprüfen, würde im Idealfall ein *H. polymorpha* *cne1*-Deletionsstamm mit pMrL-CNE+ transformiert, um auftretende Phänotypen zu komplementieren. Es stellte sich als äußerst schwierig heraus, in den *H. polymorpha* Stamm RB11 Deletionen einzufügen. Somit war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich einen *H. polymorpha* *cne1*-Stamm zu generieren. Alternativ wurde die Komplementations-Analyse des isolierten *H. polymorpha* Gens in *S. cerevisiae* durchgeführt. Hierfür wurde BY4741 *cne1* (*S. cerevisiae* *cne1*) mit linearisierten pMrL-CNE+ und pMrL transformiert. Mehrere rekombinante Stämme wurden passagiert und einer analytischen PCR unterzogen, um die Integration in den rDNA-Locus zu überprüfen. In dieser PCR wurden Oligonukleotide aus dem *S. cerevisiae* ETS (ETS-H.p.hin) mit Oligo-

nukleotiden aus dem *H. polymorpha* ITS (ITS-S.c.her) kombiniert. Es wurden nicht-kodierende rDNA-Sequenzen gewählt, da in diesen rDNA-Bereichen der betrachteten Hefen auch nicht-homologe rDNA-Sequenzen vorliegen.



14: Schematische Darstellung der rDNA-Integration und deren Nachweis mittels PCR

Das Modell zeigt eine in die rDNA von *S. cerevisiae* (graue Kästen) integrierte Plasmidsequenz (weißer Kasten). Die geknickten Pfeile kennzeichnen die Positionen, an denen die eingesetzten Oligonukleotide (Primer) mit den Zielsequenzen hybridisieren. Da die integrierte Plasmidsequenz rDNA-Anteile aus *H. polymorpha* trägt, können nur stromaufwärts des Integrationsortes beide Oligonukleotide hybridisieren. Das PCR-Produkt von 1,8 kb Länge entsteht also nur wenn die Plasmidsequenz am rDNA-Locus integriert vorliegt.

Durch die Auswahl der Oligonukleotide wurde gewährleistet, dass nur ein PCR-Produkt von 1874 bp Länge entstehen konnte, wenn die pMrL-CNE1+ Plasmidsequenzen (oder pMrL) in die rDNA von *S. cerevisiae* integriert vorliegen (Abb. 14). Abb. 15 zeigt für fünf der sechs JKrKH*pCNE1*-Stämme (BY4741*cne1* transformiert mit pMrL-CNE+) ein PCR-Produkt der korrekten Größe. Somit konnte der Nachweis für die Integration in die rDNA für diese fünf Stämme (No. 1, 2, 3, 5, und 6) erbracht werden. Beide JKrM*Scne1*-Kontrollstämme (BY4741*cne1* mit pMrL) zeigten ebenfalls das korrekte PCR-Fragment.

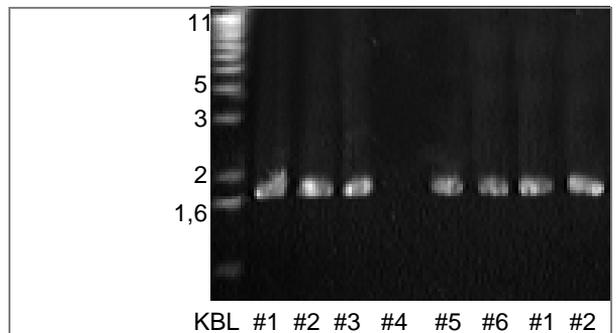


Abbildung 15: Analytische PCR

Das EtBr-gefärbte Agarosegel zeigt die PCR-Produkte (1,8 kb) des Integrations-Nachweises. Spur 1: DNA-Größenstandard; Spur 2-7: Produkte mit DNA von JKrKH*pCNE1* 1-6 als PCR-Vorlage; Spur 8 bis 9: Produkte mit DNA von JKrM*Scne1* No. 1 und 2 als PCR-Vorlage.

### 3.2.1.3 Funktionsanalyse von *HpCNE1*<sub>c-myc</sub>

Die für *S. cerevisiae* *cne1*-Stämme gezeigten Veränderungen der Zellwandintegrität [Shahinian *et al*, 1998] sollten für eine Funktionsanalyse des isolierten Homolog aus *H. polymorpha* genutzt werden. Die Sensitivität gegen verschiedene Koffein und Calcofluor-white Konzentrationen im Medium wurde für den *S. cerevisiae* Wildtyp und den Deletionsstamm bestimmt (Abb. 16). Dabei zeigte sich die erhöhte Sensitivität des *S. cerevisiae* *cne1*-Stamms gegen die beiden Zellwand-destabilisierenden Agenzien. Daraufhin wurde das Wachstumsverhalten der Stämme BY4741 (Wildtyp), BY4741*cne1* (Deletionsstamm), JKrKH*pCNE1* (Komplementationsstamm) und JKrM*Scne1* (Vektorkontrolle) auf Medien, versetzt mit verschiedenen Konzentrationen von Koffein und Calcofluor-white, miteinander verglichen.

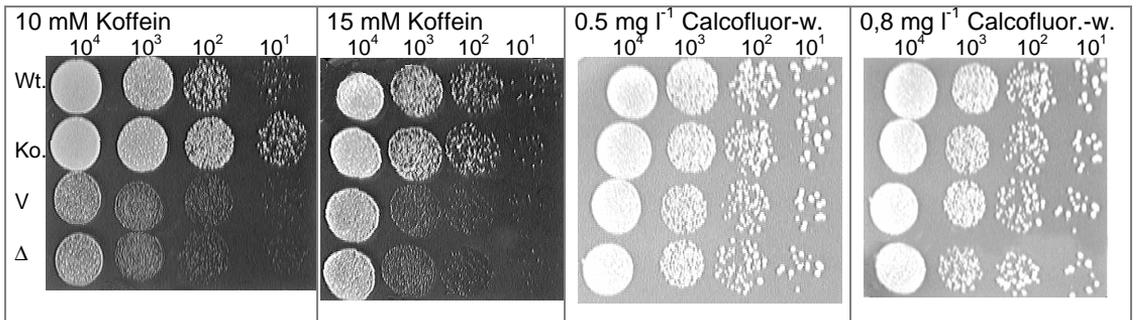


Abbildung 16: Wachstum auf Koffein und Calcofluor-white zur Funktionsanalyse von *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*

Aus einer Verdünnungsreihe wurden  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  und  $10^1$  Zellen auf YPD-Platten mit der angegebenen Menge an Zellwand-destabilisierenden Supplement getropft. Wt.: BY4741 (Wildtyp), Ko.: *JKrKHpCNE1* (Komplementation); V: *JKrMScne1* (Vektorkontrolle); Δ: *BY4741Δcne1* (*S. cerevisiae cne1*-Deletionsstamm).

Für beide getesteten Koffeinkonzentrationen zeigte der komplementierte Stamm (Ko.) das gleiche Wachstum wie der Wildtyp (Wt.). Der Deletionsstamm (Δ) und die Kontrolle (V) zeigten vermindertes Wachstum auf 10 und 15 mM Koffein im Medium. Bei der Untersuchung der Stämme auf Sensitivität gegen Calcofluor-white wurden nur bei einer Konzentration von  $0,8 \text{ mg l}^{-1}$  leichte Unterschiede im Wachstumsverhalten erkennbar. Auch hier wuchsen der Deletionsstamm und der Kontrollstamm geringfügig schlechter als der Wildtyp. Der Stamm komplementiert mit *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* zeigte Wachstum vergleichbar mit dem Wildtyp. Beide Experimente zeigten in den Stämmen mit integrierten *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* einen Ausgleich der Sensitivität gegen die getesteten Agenzien des *S. cerevisiae cne1*-Deletionsstamms. Auf dem Plasmid pMrL-CNE+ steht *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* unter Kontrolle des starken konstitutiven *TEF1*-Promotors und liegt in die rDNA integriert vor. Da bei solchen rDNA-Integrationen bis zu 150 Kopien der Plasmidsequenzen integriert werden können, musste davon ausgegangen werden, dass *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* überexprimiert wird. Die Komplementation des *cne1*-Phänotyp in *S. cerevisiae* zusammen mit den Daten des Sequenzvergleiches demonstrieren, dass es sich bei dem isolierten Gen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um das *H. polymorpha* Homolog zu *S. cerevisiae CNE1* handelt.

### 3.2.2 Isolation eines *KAR2* (BiP) Homologen aus *H. polymorpha*

#### 3.2.2.1 Vergleich von *S. cerevisiae KAR2* mit putativen *H. polymorpha KAR2* (*HpKAR2*)

In einer früheren Arbeit wurde auf der Suche nach Hitzeschock-Genen eine partielle Genbank von *H. polymorpha* RB11 erstellt und mehrere Gene (*HSA*, *HSB*, *HSC* und *HSD*) isoliert [André Diesel, persönliche Mitteilung]. Nach Ansequenzierung von *HSD* wurde vermutet, dass es hierbei um das BiP-Homolog aus *H. polymorpha* handelte. In der vorliegenden Arbeit wurde das 1998 bp lange *HSD*-ORF (open reading frame) vollständig sequenziert und mit der bekannten *S. cerevisiae KAR2*-Sequenz (*ScKAR2*) verglichen (Abb. 17). Die Aminosäuresequenz des putativen *KAR2* aus *H. polymorpha* (*HpKAR2*) ist zu 73% identisch und zu 85% ähnlich zu *ScKAR2*. Zusammen mit dem vorhandenen Hefe-typischen HDEL ER-Retentions-signal ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich hierbei um das zu *ScKAR2* homologe Gen aus *H. polymorpha* handelt.

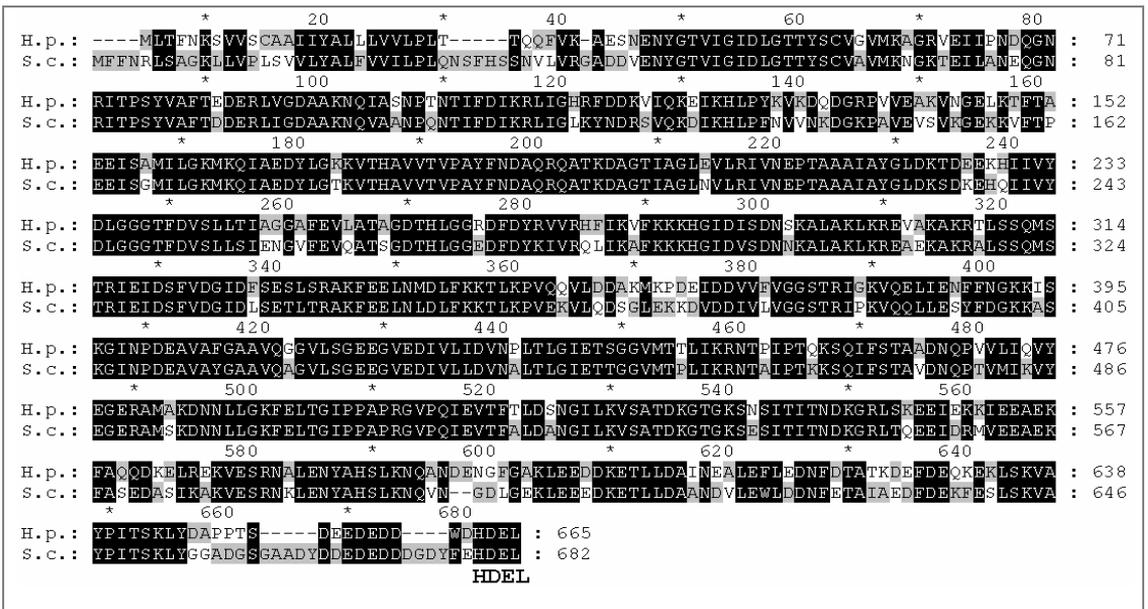


Abbildung 17: Vergleich der Aminosäuresequenz von *HpKAR2* und *ScKAR2*

Die Abbildung zeigt die hohe Sequenzhomologie zwischen *S. cerevisiae* (S.c.) *Kar2p* und *H. polymorpha* (H.p.) *Kar2p*. Die schwarzen Schattierungen kennzeichnen Sequenzübereinstimmungen oder Aminosäuren mit vergleichbaren biochemischen Merkmalen. Graue Bereiche markieren Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften. Über die gesamte Sequenz ist eine sehr hohe Homologie erkennbar. Einzig am Aminoterminal und am carboxyterminalen Ende gibt es größere Differenzen.

Für die weiteren Untersuchungen wurde das isolierte *HpKAR2* mit einem *c-myc*-Epitop markiert (*HpKAR2<sub>c-myc</sub>*) und einer Funktionsanalyse unterzogen (Abb. 19). Die Markierung wurde am carboxyterminalen Ende vor dem HDEL-Retentionssignal eingefügt. Das in einer PCR-Strategie gewonnene Produkt wurde nach erfolgter Klonierung in pMrL sequenziert um PCR-Fehler auszuschließen. In dem resultierenden Plasmid pMrL-KAR+ steht *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* unter Kontrolle des *TEF1*-Promotors aus

### 3.2.2.2 Integration von *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* in *S. cerevisiae kar2*

Der *S. cerevisiae* *KAR2*-Deletionsstamm (BY4743*kar2*) wurde mit den Plasmiden pMrL-KAR+ (*HpKAR2<sub>c-myc</sub>*) und pMrL (Vektorkontrolle) transformiert. Die resultierenden Stämme JKr*KHpKAR2* (Komplementation) und JKr*MSckar2* (Vektorkontrolle) wurden dem in Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen PCR-Nachweis unterzogen. Abb. 18 zeigt die PCR-Produkte der erwarteten Größe von 1,8 kb für alle vier JKr*KHpKAR2* Stämme und die beiden Vektorkontrollen (JKr*MSckar2*). Somit konnte der Nachweis der Integration in die rDNA für alle vier getesteten JKr*KHpKAR2*-Stämme und beide Vektorkontrollen erbracht werden.

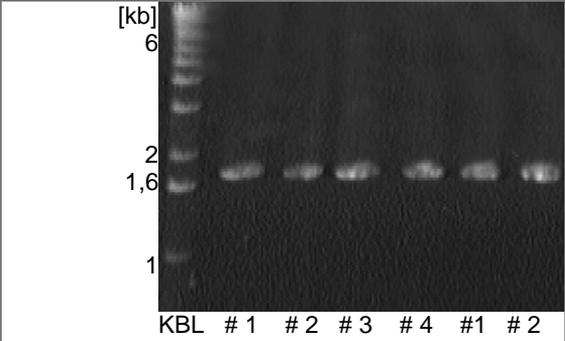


Abbildung 18: Analytische PCR  
Das EtBr-gefärbte Agarosegel zeigt die PCR-Produkte (1,8 kb) des Integrations-Nachweises. Spur 1: DNA-Größenstandard; Spur 2-5: Produkte mit DNA von JKr*KHpKAR2* No. 1-4 als PCR-Vorlage; Spur 6-7: Produkte mit DNA von JKr*MSckar2* No. 1/2 als PCR-Vorlage.

### 3.2.2.3 Funktionsanalyse von *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*

Aus den in Kapitel 3.2.1.2 erwähnten Gründen wurde die Funktionsanalyse von *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* in *S. cerevisiae* durchgeführt. Die Deletion von *KAR2* ist für haploide *S. cerevisiae* letal [Giaever *et al*, 2002]. Somit wurde die Funktionsanalyse in einem diploiden *S. cerevisiae* *kar2*-Deletionsstamm (BY4743-*kar2*) durchgeführt, welcher ein funktionales *KAR2*-Allel trägt. Vorausgesetzt, das Gen ist in *S. cerevisiae* funktional, sollte BY4743*kar2* transformiert mit *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* nach erfolgter Sporulation mehr als zwei lebensfähige Ascosporen bilden. Je ein Stamm von BY4743 (Wildtyp), JKrK*HpKAR2* (Komplementation), JKrMS*ckar2* (Vektorkontrolle) und BY4743*kar2* (*S. cerevisiae*-Deletionsstamm) wurden nach erfolgter Sporulation einer Tetradenanalyse unterzogen.

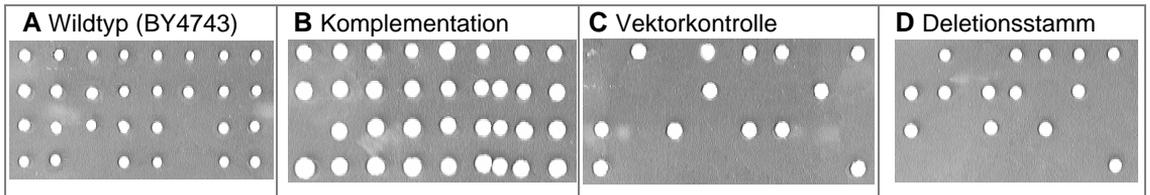


Abbildung 19: Tetradenanalyse zur Komplementation eines *S. cerevisiae* *kar2*-Stammes

Die Abbildung zeigt die ausgekeimten Sporen nach Wachstum von 48 h auf Vollmedium bei 30 °C. Für jeden Stamm wurden 8-9 Tetraden ausgewählt und die Sporen senkrecht abgelegt. **A:** Der Wildtyp bildete aus 6 von 8 getesteten Tetraden vier lebensfähige Sporen, die auskeimen konnten. **B:** Der Komplementationsstamm zeigte in 7 von 9 Fällen vier lebensfähige Sporen. **C:** Die Vektorkontrolle bildete aus 5 von 8 getesteten Tetraden zwei lebensfähige Sporen. In drei Fällen keimte nur eine Spore aus. **D:** BY4743*kar2* bildete in allen 7 Fällen zwei lebensfähige Sporen.

Die Auswertung der Tetradenanalyse ergab folgendes Bild: Durch die Transformation des in einem Allel deletierten *S. cerevisiae*-Stammes BY4743*kar2* mit *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* konnte in den meisten Fällen alle vier Ascosporen auskeimen. Darunter tragen mindestens zwei Sporen das eingebrachte *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* und die anderen zwei Sporen das *S. cerevisiae* *KAR2* Wildtyp-Allel. Um dieses Ergebnis weiter zu überprüfen, wurden alle ausgekeimten Sporen aus Abb. 19 B auf ihr Wachstumsvermögen auf Hygromycin B-haltigen Medium hin untersucht (3 ml YPD, 150 mg l<sup>-1</sup> Hygromycin B). In 15 von 16 getesteten Fällen konnten die Stämme auf Hygromycin B -supplementierten Flüssigmedium wachsen. Dies bedeutet, dass nach der Transformation und Stabilisierung des heterozygoten *S. cerevisiae*-Stammes Plasmidsequenzen mit der darauf vorhandenen Hygromycin B-Resistenz in beide Allele in die rDNA integriert waren. Das *c-myc*-markierte *HpKAR2* konnte die Deletion eines *KAR2*-Allels in einem diploiden *S. cerevisiae* Stamm komplementieren.

### 3.2.3 Isolation eines *PDI1* Homologen aus *H. polymorpha*

#### 3.2.3.1 Vergleich von *S. cerevisiae* *PDI1* mit putativen *H. polymorpha* *PDI1*

Analog zu der in Kapitel 3.2.1.1 beschriebenen Prozedur wurden das putative *H. polymorpha* Homolog (*HpPDI1*) zu *S. cerevisiae* *PDI1* (*ScPDI1*) aus genomischer DNA isoliert, überprüft, sequenziert und mit bekannten Sequenzen für *S. cerevisiae* *Pdi1p* verglichen [Scherens *et al*, 1991]. Dem Sequenzvergleich (Abb. 20) wurde eine funktionale Domäne der menschlichen PDI hinzugefügt (MEK). Diese Thioredoxin-ähnlichen Domäne beinhaltet die Aminosäureabfolge

C-G-H-C bei der beide Cysteine, je nach Oxidationszustand des Gesamtmoleküls, zwischen der Thiol- und der Disulfid-Form wechseln [Darby und Creighton, 1995]. In der statistischen Auswertung des *PDI1*-Sequenzvergleichs von *S. cerevisiae* mit *H. polymorpha* wurden 42% Identität und 60% Ähnlichkeit in den Aminosäuresequenzen ermittelt. Am carboxyterminalen Ende beider Proteine findet sich das für Hefen typische HDEL ER-Retentionssignal.

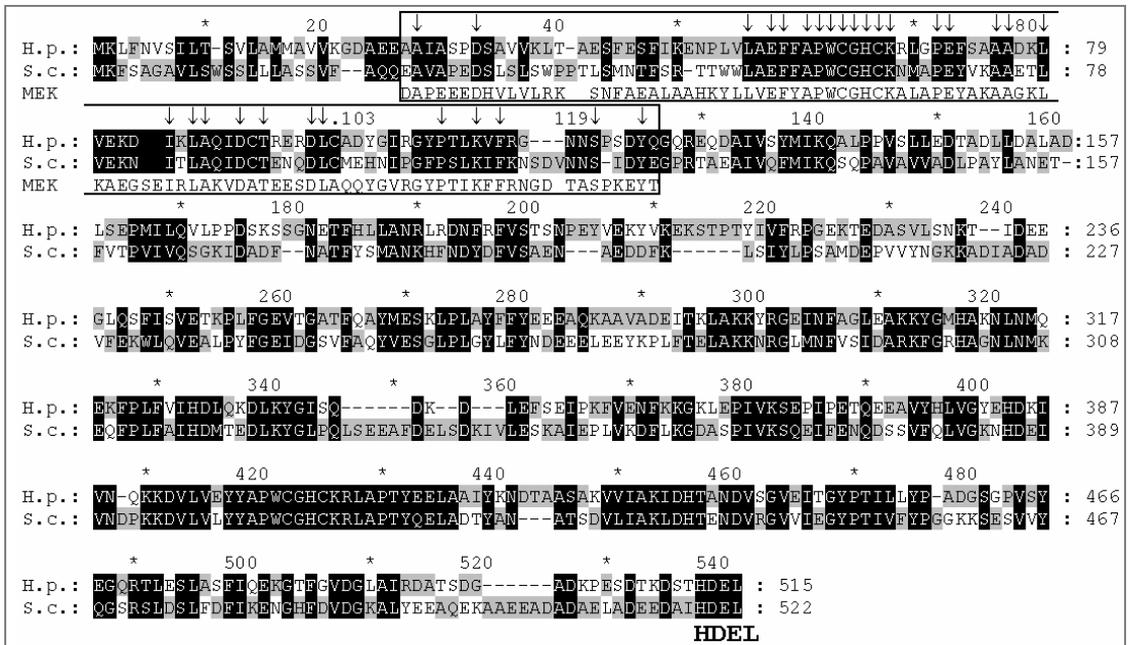


Abbildung 20: Vergleich der Aminosäuresequenz von *HpPDI1* und *ScPDI1*

Die Aminosäuresequenz des aus *H. polymorpha* RB11 (H.p.) isolierten Gens wurde mit der *S. cerevisiae* (S.c.) Pdi1p-Sequenz verglichen. Die schwarzen Schattierungen kennzeichnen Sequenzübereinstimmungen oder Aminosäuren mit vergleichbaren biochemischen Merkmalen. Graue Bereiche markieren Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften. Es gibt mehrere Sequenzabschnitte mit hoher Homologie insbesondere im vorderen und hinteren Drittel der Aminosäuresequenz. Die MEK-Domäne aus menschlicher PDI wurde zu dem Sequenzvergleich mit hinzugezogen. Die Pfeile kennzeichnen Übereinstimmung in allen drei Sequenzen.

Aus dem Sequenzvergleich wird eine hohe Homologie für die beiden verglichenen Proteine klar erkennbar. Das Vorhandensein des ER-Retentionssignals zusammen mit der gefundenen hohen Homologie in der MEK-Domäne bestärkt die Vermutung, dass es sich bei dem isolierten Gen um das *H. polymorpha* *PDI1* Homolog handelt. Für eine weiterführende Funktionsanalyse wurde *HpPDI1* mit einem *c-myc*-Epitop markiert (*HpPDI1<sub>c-myc</sub>*). Die Markierung wurde am carboxyterminalen Ende vor dem HDEL-Retentionssignal eingefügt. Das in einer PCR-Strategie gewonnene Produkt wurde nach der Klonierung in pMrL sequenziert, um PCR-Fehler auszuschließen. In dem resultierende Plasmid pMrL-PDI+ steht *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* unter Kontrolle des *TEF1*-Promotors aus *A. adenivorans*.

### 3.2.3.2 Integration von *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* in *S. cerevisiae pdi1*

Der *S. cerevisiae pdi1*-Deletionsstamm (BY4743*pdi1*) wurde mit den Plasmiden pMrL-PDI+ (*HpPDI1<sub>c-myc</sub>*) und pMrL (Vektorkontrolle) transformiert. Die resultierenden Stämme JKrK*HpPDI1* (Komplementation) und JKrM-*Scpdi1* (Vektorkontrolle) wurden dem in Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen PCR-Nachweis unterzogen. Abb. 21 zeigt die PCR-Produkte der erwarteten Größe von 1,8 kb für alle vier JKrK*HpPDI1*-Stämme und die beiden Vektorkontrollen (JKrM*Scpdi1*). Somit konnte der Nachweis der Integration in die rDNA für alle vier getesteten JKrK*HpPDI1*-Stämme und die beiden Vektorkontrollen erbracht werden.

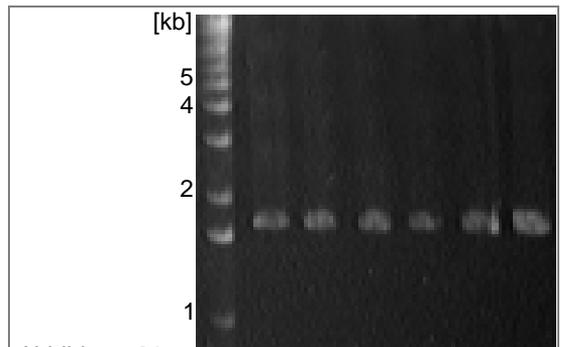


Abbildung 21: Analytische PCR

Das EtBr-gefärbte Agarosegel zeigt den PCR-Integrationsnachweis. Spur 1: DNA-Größenstandard (KBL); Spur 2-5: Produkte mit DNA der Stämme JKrK*HpPDI1* No. 1-4 als PCR-Vorlage; Spur 6-7: Produkte mit DNA der Stämme JKrM*Scpdi1* No. 1 und 2 als PCR-Vorlage.

### 3.2.3.3 Funktionsanalyse von *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*

Die Deletion von *PDI1* ist für haploide *S. cerevisiae* letal [Giaever *et al*, 2002]. Somit wurde die Funktionsanalyse in einem diploiden *S. cerevisiae*-Stamm (BY4743*pdi1*) durchgeführt, welcher nur ein Allel mit funktionalem *PDI1* trägt. Vorausgesetzt, das isolierte *H. polymorpha* Gen ist in *S. cerevisiae* funktional, sollte ein *S. cerevisiae pdi1*-Stamm, transformiert mit *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*, nach erfolgter Sporulation vier lebensfähige Ascosporen bilden. Je ein Stamm von BY4743 (Wildtyp), JKrK*HpPDI1* (Komplementation), JKrM*Scpdi1* (Vektorkontrolle) und BY4743*pdi1* (*S. cerevisiae pdi1*-Deletionsstamm) wurden nach erfolgter Sporulation einer Tetradenanalyse unterzogen.

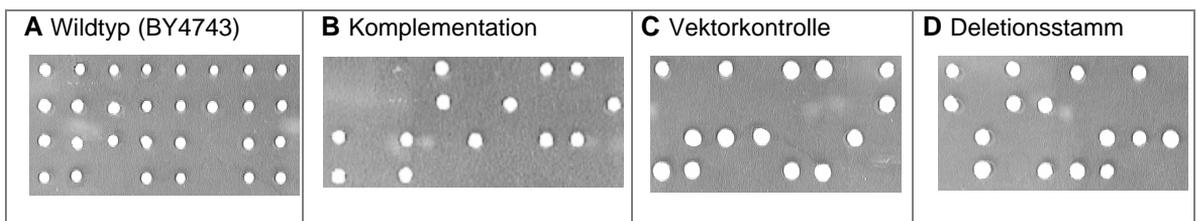


Abbildung 22: Tetradenanalyse zur Komplementation eines *S. cerevisiae PDI1*-Deletionsstamms

Die Abbildung zeigt die ausgekeimten Sporen nach Wachstum von 48 h auf Vollmedium bei 30 °C. **A:** Wildtyp aus 3.2.2.3; **B:** JKrK*HpPDI1* bildete in 5 von 8 Fällen zwei lebensfähige Sporen und dreimal je eine ausgekeimte Spore; **C:** JKrM*Scpdi1* bildete aus 6 von 8 getesteten Tetraden zwei lebensfähige Sporen. In zwei Fällen keimte nur eine Spore aus. **D:** *S. cerevisiae pdi1* bildete in 7 Fällen zwei Sporen und in einem Fall nur eine ausgekeimte Spore.

Das *c-myc*-markierte putative *H. polymorpha PDI1*-Gen konnte die heterozygote *pdi1*-Deletion in einem *S. cerevisiae* Stamm nicht komplementieren. Abb. 22 B zeigt den Komplementationsstamm JKrK*HpPDI1* für den höchsten zwei Sporen aus den Tetraden gebildet wurden. Bei einer erfolgreichen Komplementation des heterozygoten Deletionsstamms wären mindestens zwei bis höchstens vier Sporen ausgekeimt. Die Funktionalität des *c-myc*-markierten *HpPDI1*

konnte in der gezeigten Tetradenanalyse in BY4743 *pdi1* nicht bestimmt werden. Ob das aus *H. polymorpha* isolierte Gen in *S. cerevisiae* nicht funktional ist, oder ob durch die Insertion des *c-myc*-Epitops die Funktionalität oder korrekte Prozessierung des Proteins eingeschränkt wurde, bleibt unklar. Um das Ergebnis näher zu überprüfen, wurden alle ausgekeimten Sporen aus Abb. 22 B auf ihr Wachstumsvermögen in Hygromycin B-haltigen (150 mg l<sup>-1</sup>) Medium hin untersucht. In 14 von 16 getesteten Fällen konnten die haploiden *S. cerevisiae*-Stämme aus der Tetradenanalyse in dem mit Hygromycin B supplementierten Flüssigmedium wachsen. Dies bedeutet, dass die Plasmidsequenzen in der Mehrzahl der Fälle in beide Allele des diploiden *S. cerevisiae* Stammes integriert waren und das Hygromycin B-Resistenzgen exprimiert wurde.

### 3.2.4 Isolation von SSO2 (Syntxin) Homologen aus *H. polymorpha*

Wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben wurde das *H. polymorpha* Homolog zu *S. cerevisiae* SSO2 (ScSSO2) aus genomischer DNA isoliert, überprüft, sequenziert und mit der bekannten Sequenzen von für *S. cerevisiae* Sso2p verglichen (Abb. 23). In der statistischen Auswertung des Sso2p-Sequenzvergleichs von *S. cerevisiae* mit *H. polymorpha* wurden 35% Identität und 53% Ähnlichkeit in den Aminosäuresequenzen bestimmt. Eine auffällig hohe Homologie zwischen beiden Sequenzen ist im Bereich zwischen Position 187 und 238 erkennbar.

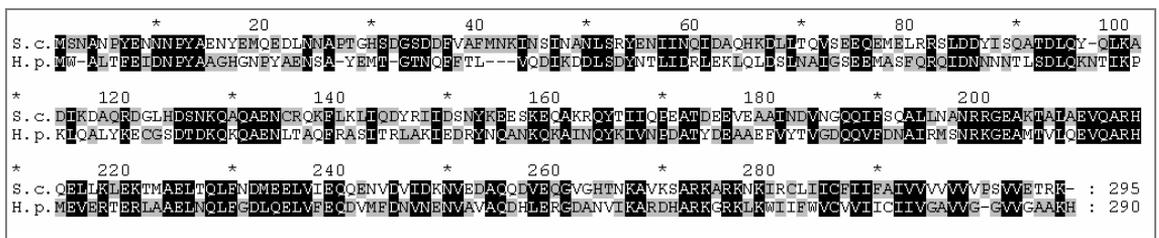


Abbildung 23: Vergleich der Aminosäuresequenz von *HpSSO2* und *ScSSO2*

Die Aminosäuresequenz des aus *H. polymorpha* RB11 (H.p.) isolierten Gens wurde mit der Sso2p-Sequenz aus *S. cerevisiae* (S.c.) verglichen. Die schwarzen Schattierungen kennzeichnen Sequenz-Übereinstimmungen oder Aminosäuren mit vergleichbaren biochemischen Merkmalen. Graue Bereiche markieren Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften. Im letzten Drittel der Aminosäuresequenz gibt es viele kleine Blöcke hoher Homologie. Weder Import- noch Retentions-Signalsequenzen konnten identifiziert werden.

Für den weiteren Einsatz wurde das isolierte *HpSSO2* in einer PCR mit einem *c-myc*-Epitop markiert (*HpSSO2<sub>c-myc</sub>*). Das Epitop wurde an das carboxyterminale Ende fusioniert um den posttranslationalen Import von Sso2p in die Plasmamembran nicht zu beeinflussen. Das PCR-Produkt wurde in pMrL kloniert und der resultierende Vektor pMrL-SSO+ sequenziert, um eventuelle PCR-Fehler auszuschließen. Eine Funktionsanalyse des putativen Gens konnte nicht vorgenommen werden, weil die Deletion beider SSO-Gene in *S. cerevisiae* einem letalen Phänotyp zeigt [Giaever *et al*, 2002]. Ein solcher heterozygoter Deletionsstamm beider SSO-Gene stand im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung. Für *S. cerevisiae* *sso1*-Deletionsstäme wurde ein Verlust der Sporulations-Fähigkeit festgestellt [Jantti *et al*, 2002].

### 3.3 IFN- $\gamma$ Produktion in *H. polymorpha* und *A. adenivorans*

In einer früheren Studie konnte die Expression von humanen IFN- $\gamma$  in *H. polymorpha* erfolgreich demonstriert werden. Mit den induzierbaren *TPS1*- und *MOX1*-Promotoren konnten ein überglykosyliertes Produkt im Überstand nachgewiesen werden [Degelmann *et al*, 2002]. Das Plasmid pMrL-IFNG (M & M) beinhaltet ein analoges IFN- $\gamma$ -Gen unter der Kontrolle des *TEF1*- Promoters aus *A. adenivorans*. Hierbei ist das Gen für menschliches IFN- $\gamma$  mit einer MF- $\alpha$ 1-SS (mating factor  $\alpha$ 1 signalsequence) aus *S. cerevisiae* fusioniert. Mit diesem integrativen Plasmid auf Basis des multifunktionellen Vektorsystems wurden sowohl der *H. polymorpha*-Stamm RB11, als auch der *A. adenivorans*-Stamm LS3 transformiert und die Integration in die rDNA überprüft. Für *H. polymorpha* wurden die Auswirkungen von zusätzlich eingebrachten Hilfsfaktoren auf die IFN- $\gamma$  Expression untersucht. In Kapitel 3.2 wurden die Isolation und Funktionsanalyse von *H. polymorpha*-Genen aus dem sekretorischen Weg beschrieben, die im Folgenden auf ihrem Einfluss auf das Sekretionsverhalten der IFN- $\gamma$ -produzierenden *H. polymorpha*-Stämme getestet wurden. Dafür wurde *H. polymorpha* RB11 mit einer Mischung aus IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren zusammen mit den Plasmiden für die entsprechenden Hilfsfaktoren in einem Ansatz kotransformiert. Nach der Identifizierung von Stämmen mit kointegrierten Plasmidsequenzen wurde die Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen bestimmt und die Synthese der *c-myc*-markierten Hilfsfaktoren verifiziert. Abschließend wurde der Einfluss der kointegrierten Gene für die verschiedenen Hilfsfaktoren auf die IFN- $\gamma$ -Produktion und -Sekretion in rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen untersucht.

#### 3.3.1 Expression von IFN- $\gamma$ in *H. polymorpha*

##### 3.3.1.1 Integration eines Expressionsvektors für IFN- $\gamma$ in die rDNA von *H. polymorpha*

*H. polymorpha* RB11 wurde mit den *FbaI* linearisierten Plasmiden pMrL-IFNG (IFN- $\gamma$ ) und pMrL (Vektorkontrolle) transformiert. Die resultierenden rekombinanten Stämme wurden stabilisiert und chromosomale DNA aus vereinzelt Kolonien isoliert. DNA von 7 dieser *H. polymorpha*-Stämme (6 transformiert mit dem IFN- $\gamma$ -Expressionsvektor und eine Vektorkontrolle) wurden nach erfolgter Restriktion mit *KpnI* elektrophoretisch in einem Agarosegel (1%) aufgetrennt. Zuvor wurde in mehreren Testgelen die DNA-Konzentration abgeschätzt. Durch entsprechende Verdünnungen wurde der DNA-Gehalt in den verschiedenen Proben aneinander angeglichen. Mit Southern-Hybridisierung (Abb. 24 A) wurden die durch die Restriktion entstandenen Fragmente detektiert. Für die Sondenmarkierung diente ein 400 bp langes Teilstück des Hygromycin B Resistenz-Gens zusammen mit einer 250 bp langen nicht-kodierenden Sequenz aus dem Plasmid pMrL-IFNG (nach *AatII*-/ *NdeI*-Restriktion) als Vorlage. Abb. 24 B verdeutlicht die Herkunft der Fragmente, die nach *KpnI*-Restriktion entstehen und von den eingesetzten Sonden erfasst werden.

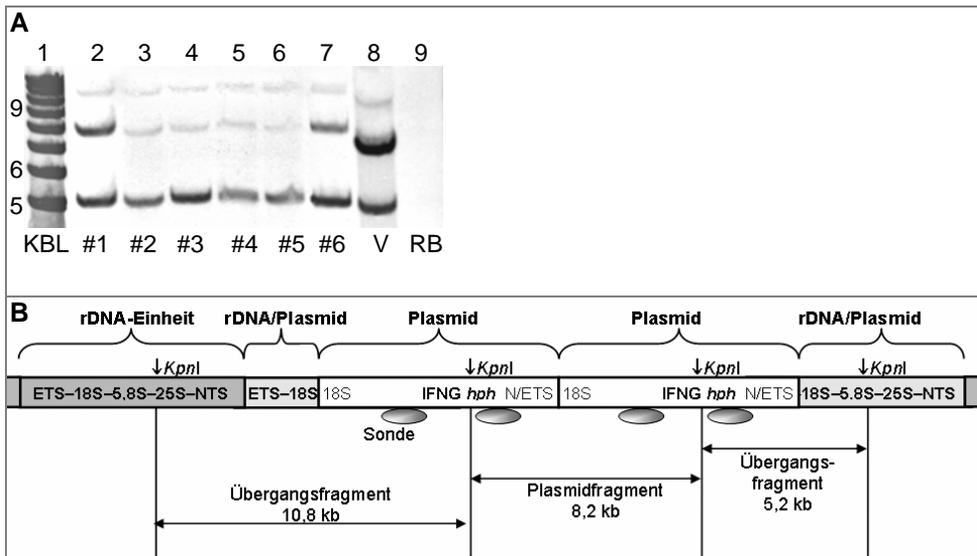


Abbildung 24: Southern-Blot und Modell zur rDNA-Integration von IFN- $\lambda$ -Expressionsvektoren in *H. polymorpha*

**A:** Southern-Blot von 6 Stämmen, transformiert mit dem IFN- $\gamma$ -Expressionsvektor (pMrL-IFNG). Der DNA-Größenstandard (KBL) wurde nach dem Transfer auf die Nylonmembran abgetrennt und mit einer spezifischen Sonde hybridisiert. Spur 1: KBL; Spur 2-7 :Stämme No. 1 bis 6; Spur 8: Vektorkontrolle (V); Spur 9: untransformierter RB11 (RB). Für alle 6 mit pMrL-IFNG transformierten Stämme sind drei Signale bei 5, 8 und 11 kb klar erkennbar. Die Signalstärke des 5 kb Fragments ist weitaus stärker als die der großen Fragmente. Die Signale für die großen Übergangsfragmente bei 11 kb sind sehr schwach. Die Vektorkontrolle zeigt die erwarteten Fragmente (5, 7,5 und 10,3 kb).

**B:** Das Modell gibt eine Übersicht für die Fragmente, die nach Restriktion mit *KpnI* entstehen, wenn Plasmidsequenzen tandemförmig in die rDNA integriert vorliegen. Stromauf und stromabwärts der Integrationsstellen entstehen zwei Übergangsfragmente unterschiedlicher Größe (11 bzw. 5,2 kb). Beide Übergangsfragmente hybridisieren mit den Sonden (graue Ellipsen). Die Sonden erfassen zwei Sequenzabschnitte eines jeden Plasmidfragments, was deren Signalintensität verglichen zu den Übergangsfragmenten verdoppelt. Wird eine einzelne Plasmidsequenz in die rDNA integriert, so entstehen nach Restriktion mit *KpnI* nur die Übergangsfragmente (5,2 bzw. 11 kb) und kein Plasmidfragment (8,2 kb).

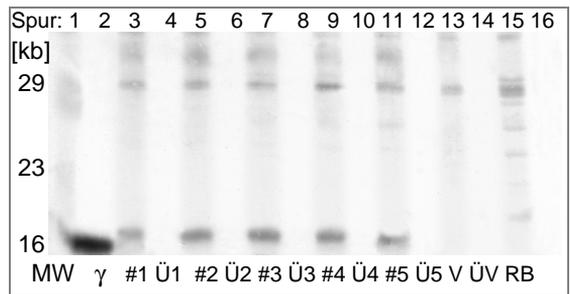
Für alle 6 in der Southern-Analyse getesteten Stämme konnte mit dem Nachweis der spezifischen Übergangsfragmente die Integration der Vektorsequenzen am rDNA-Locus eindeutig bewiesen werden. Ein Grund für die schwachen Signale der großen Übergangsfragmente könnte ursächlich mit der DNA-Präparationsmethode zusammenhängen. Hierbei können große DNA-Fragmente über 9 kb durch Scheerkräfte zerrissen werden. Die eingesetzten Sonden hybridisierten mit zwei Abschnitten der Plasmidfragmente (Abb. 24 B), was in einem doppelt starken Signal für dieses Fragment resultierte. Für die Stämme No. 1 und 6 ist die Signalstärke für das kleine Übergangsfragment und das Plasmidfragment ungefähr gleich. In diesen beiden Fällen lagen doppelt so viele Einzelintegrationen gegenüber tandemförmig integrierten Plasmidsequenzen vor (bei verdoppelter Signalintensität der Plasmidfragmente). Die Stämme No. 2 bis 5 zeigten wesentlich stärkere Signale für das kleine Übergangsfragment verglichen mit dem Plasmidfragment. In diesen Stämmen liegt die Mehrzahl der Vektorsequenzen als über den rDNA-Cluster verteilte Einzelintegrationen vor.

### 3.3.1.2 Bestimmung von IFN- $\gamma$ produziert in *H. polymorpha*

Fünf der in Kapitel 3.3.1.1 beschriebenen Stämme wurde in 50 ml Schüttelkulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 10 in Minimalmedium (5% Glycerin als Kohlenstoffquelle) bei 37 °C herangezogen. Der gesamte Überstand wurde gefällt und in 200  $\mu$ l Endvolumen aufgenommen. Von den Kulturen wurde eine Gesamtmenge an Zellen zu Zellextrakten verarbeitet und in 1 ml Probenpuffer aufgenommen, die einer Gesamtmenge von 200 OD<sub>600</sub>-Einheiten entsprach. Von den Überständen und Zellextrakten wurden je 50  $\mu$ l pro Stamm in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf das Gel (12,5%) aufgetragenen Mengen entsprachen 12 ml Überstand und einer Zellmenge entsprechend 10 OD<sub>600</sub>-Einheiten. Als Positivkontrolle diente aus Medium präzipitiertes, rekombinantes IFN- $\gamma$  (*E. coli*). Durch reversibles Färben mit Ponceau S wurden die Proteinmengen im Gel abgeschätzt und, wenn nötig, soweit aneinander angeglichen bis die Proteinkonzentration im Gel für alle Proben vergleichbar war. Im Western-Blot (Abb. 25) wurde mit Antikörpern gegen humanes IFN- $\gamma$  das Vorhandensein des Produktes in den Zellextrakten und Überständen überprüft.

Abbildung 25: IFN- $\gamma$  Expression in *H. polymorpha*

In der abgebildeten Western-Blot Analyse sind Zellextrakte und präzipitierte Kulturüberstände von 5 rekombinanten Stämmen mit integrierten IFN- $\gamma$ -Expressionsplasmiden untersucht worden. Zellextrakte und Überstände (Ü) der Stämme wurden jeweilig nebeneinander aufgetragen. Spur 1: Molekulargewichtsstandard (MW in kDa); Spur 2: IFN- $\gamma$  Standard; Spur 3-12: Stämme No. 1 bis 5; Spur 13/14: Vektorkontrolle (V); Spur 15/16 untransformierter *H. polymorpha* RB11 (RB).



Für alle fünf getesteten rekombinanten *H. polymorpha*-Stämme konnte IFN- $\gamma$  in den Zellextrakten nachgewiesen werden. Das Signal für das Produkt lief bei einer geringfügig höheren relativen Molekularmasse ( $M_r$ ) als das für den IFN- $\gamma$ -Standard (17 kDa) aus *E. coli*. Ein weiteres Signal wurde für alle fünf Stämme bei 35 kDa registriert. Hierbei könnte es sich entweder um überglykosyliertes oder um unvollständig prozessiertes Produkt handeln. In den präzipitierten Überständen konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Weder als Schmier für überglykosyliertes IFN- $\gamma$ , noch als klare Bande für ein spezifisch modifiziertes Protein. Die Größe des von den rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen exprimierten IFN- $\gamma$  von 18 kDa spricht für ein Zurückhalten des Produktes im sekretorischen Weg, in nicht vollständig glykosylierter Form. Die reife Form von glykosylierten IFN- $\gamma$  hat eine  $M_r$  von 22-25 kDa [Sareneva *et al*, 1995].

### 3.3.1.3 Kointegration von IFN- $\gamma$ mit drei *H. polymorpha*-Genen für Hilfsproteine

Der *H. polymorpha*-Stamm RB11 wurde mit einer Mischung von vier Expressionsvektoren in einem Ansatz transformiert. Folgende Plasmide wurden mit *Apal* linearisiert und in äquimolaren Mengen eingesetzt: pMrL-IFNG (IFN- $\gamma$ ), pMrL-KAR+ (*HpKAR2<sub>c-myc</sub>*), pMrL-PDI+ (*HpPDI1<sub>c-myc</sub>*), pMrL-SSO+ (*HpSSO2<sub>c-myc</sub>*) und pMrL (Vektorkontrolle). 50 resultierende rekombinante Stämme wurden stabilisiert und chromosomale DNA aus vereinzelt Kolonien gewonnen. *PvuII*-restringierte DNA wurde in einem Agarosegel (1,5%) elektrophoretisch aufgetrennt. Zuvor

wurde in mehreren Testgelen die DNA-Konzentration abgeschätzt und der DNA-Gehalt der Proben durch entsprechende Verdünnungen aneinander angeglichen. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde mit einer PCR-generierten Sonde gegen das *hph*<sup>R</sup>-Gen hybridisiert. Um bei vier integrierten Plasmidsequenzen die Übersichtlichkeit zu gewährleisten, wurde eine Sonde gewählt, die nur die Plasmidfragmente und nicht die Übergangsfragmente erfasste. Der DNA-Größenstandard wurde nach dem Transfer auf die Nylonmembran abgetrennt und mit einer spezifischen Sonde hybridisiert. Nach *Pvu*II-Restriktion der isolierten chromosomalen DNA entstanden folgende von der Sonde erfasste Fragmente: pMrL-IFNG **3,6 kb**, pMrL-KAR+ **4,9 kb**, pMrL-PDI+ **2,7 kb**, pMrL-SSO+ **3,3 kb** und pMrL **2,9 kb**.

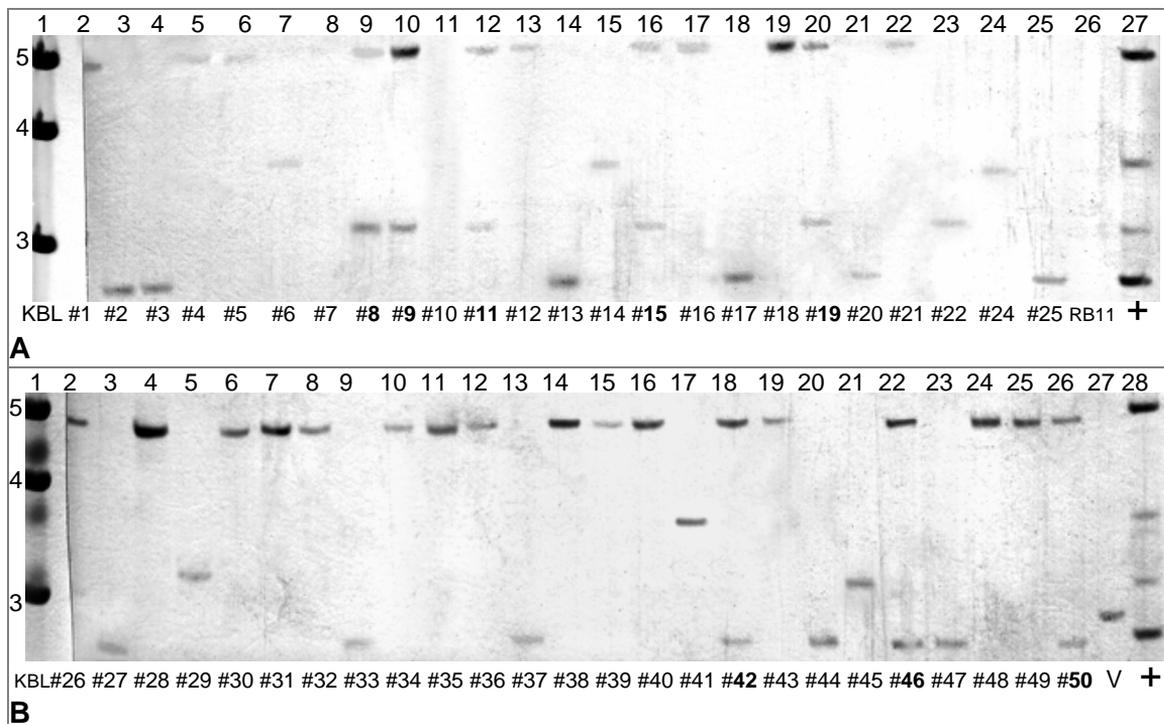


Abbildung 26: Kointegration von Expressionsvektoren mit Genen für Helferproteine kombiniert mit IFN- $\gamma$

Southern-Blot Analyse von 49 rekombinanten *H. polymorpha* Stämmen. Je 10 ng der *Pvu*II-restringierten Plasmide wurden als Positivkontrollen aufgetragen. Die fett gedruckten Ziffern kennzeichnen Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen. Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf verschiedene Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

**A:** Spur 1: DNA-Größenstandard (KBL); Spur 2-25: Stämme No. 1 bis 25 (No. 23 fehlt); Spur 26: untransformierter RB11; Spur 27: restringierte Plasmide. Die Stämme No. 8, 9, 11, 15 und 19 zeigten zwei Signale für die Kointegration von pMrL-KAR+ kombiniert mit pMrL-SSO+ bei 4,9 und 3,3 kb. Aufgrund von Degradation der DNA konnten die Proben No. 7 und 10 nicht ausgewertet werden.

**B:** Spur 1: KBL; Spur 2-26: Stämme No. 26 bis 50; Spur 27: Vektorkontrolle (RB11 transformiert mit pMrL); Spur 28: Je 10 ng *Pvu*II-restringierte Plasmide. Die Stämme No. 42, 46, und 50 zeigten zwei Signale für die Kointegration von pMrL-KAR+ kombiniert mit pMrL-PDI+ bei 4,9 kb und 2,7 kb. Die Vektorkontrolle zeigte erwartungsgemäß ein Signal bei 2,9 kb.

Unter den 47 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, fand sich kein Vertreter mit der gewünschten Kombination aus integrierten Plasmidsequenzen für IFN- $\gamma$ - und einen der vier kotransformierten Hilfsfaktoren. Es war zwar

möglich Stämme mit zwei gleichzeitig integrierten Plasmidsequenzen zu generieren, hierbei wurden aber entweder Plasmidsequenzen für *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* mit *HpSSO2<sub>c-myc</sub>* (No. 8, 9, 11, 15, 19) kombiniert oder *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* mit *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* (No. 42, 46, 50) kombiniert. Die Anzahl von Stämmen mit integrierten *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Vektorsequenzen war stark überrepräsentiert. Durch den Einsatz äquimolarer Mengen eines jeden linearisierten Plasmids bei der Transformation wurde ein Dosis-Effekt durch eine höhere Menge an verfügbaren integrativen Plasmidsequenzen ausgeschlossen. Die beobachtete Verteilung musste also auf Effekte zurückzuführen sein, die durch spezifische Eigenschaften der verschiedenen Expressionskassetten ausgelöst wurden. Eine Erklärung für die beobachteten Verteilungen könnte in einem Selektionsprozess auf die Kombination an Expressionskassetten liegen, deren Integration am wenigsten schädlich für die Stämme war. Die Integration und Expression der endogenen Hilfsfaktoren wurde dementsprechend bevorzugt. Um diese Problematik zu umgehen wurden die weiteren Kotransformationen nur noch mit einer Kombination von pMrL-IFNG (IFN- $\gamma$ ) zusammen mit einem Expressionsvektor für einen der vier Hilfsfaktoren ausgeführt.

### 3.3.1.4 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN-g und *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*

Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Dabei wurden *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*- und IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren kotransformiert. Die eingesetzte Sonde erfasste folgende Plasmidfragmente: pMrL-IFNG **3,6 kb** (IFN- $\gamma$ ), pMrL-CNE+ **4,6 kb** (*HpCNE1<sub>c-myc</sub>*), und pMrL (Vektorkontrolle) **2,9 kb**. 25 DNA-Proben der insgesamt 30 rekombinanten Stämme konnten in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden.

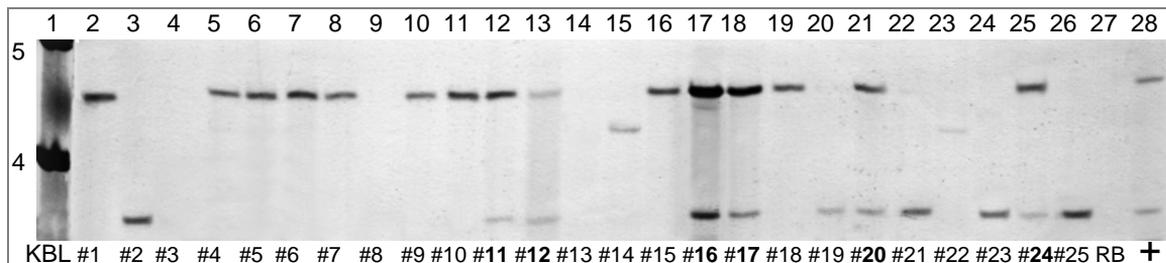


Abbildung 27: Kointegration von IFN- $\gamma$ - und *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren

Southern-Blot Analyse von 25 rekombinanten *H. polymorpha* Stämmen. Spur 1: DNA-Größenstandard (KBL); Spur 2-26: Stämme No. 1 bis 25. Spur 27: untransformierter RB11 (RB); Spur 28: Je 10 ng *PvuII*-restringierte DNA der Plasmide pMrL-CNE+ (*HpCNE1<sub>c-myc</sub>*) und pMrL-IFNG (IFN- $\gamma$ ). Die fett gedruckten Ziffern kennzeichnen Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen. Die DNA der Stämme No. 3, 8, 13, 14 und 22 war degradiert und konnte nicht ausgewertet werden. Für die Stämme No. 16 und 17 war eine signifikant höhere DNA-Menge auf dem EtBr-gefärbten Gel erkennbar. Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf verschiedene Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

Unter den 20 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, befanden sich sechs Stämme (No. 11, 12, 16, 17, 20 und 24) mit kointegrierten *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*- und IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren. Stamm No. 12 zeigte vergleichbar intensive Signale für die beiden kointegrierten Plasmidsequenzen. Für die Stämme No. 11, 16, 17, 20 und 24 war die Signalintensität für integrierte *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren stärker verglichen mit dem Signal für integrierte IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren. Eine genaue Kopien-

zählbestimmung der Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen erfolgt in Kapitel 3.3.1.8. Die Häufigkeit von Stämmen mit integrierten *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*-Expressionskassetten war ca. doppelt so hoch wie integrierte IFN- $\gamma$ - Expressionskassetten. 30% der ausgewerteten Stämme zeigten die erwünschte Doppelintegration von IFN- $\gamma$ - mit *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*-Expressions-vektoren.

### 3.3.1.5 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN-g und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*

Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Dabei wurden *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*- und IFN- $\gamma$ -Vektoren kotransformiert. Die eingesetzte Sonde erfasste folgende Plasmidsequenzen: pMrL-IFNG (IFN- $\gamma$ ) **3,6 kb**, pMrL-KAR+ (*HpKAR2<sub>c-myc</sub>*) **4,9 kb**, und pMrL (Vektorkontrolle) **2,9 kb**. Es wurden 25 der insgesamt 30 rekombinanten Stämme in der Southern-Blot Analyse getestet.

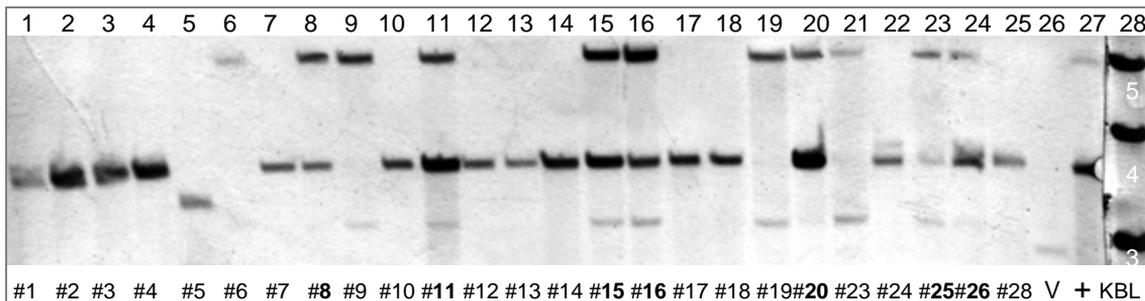


Abbildung 28: Kointegration von IFN- $\gamma$ - und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren

Southern-Blot Analyse von 25 rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen. Spur 1-25: Stämme No. 1 bis 28 (No. 20, 21 und 22 fehlten); Spur 26: Vektorkontrolle (V); Spur 27: Je 10 ng *PvuII*-restringierte pMrL-KAR+ (*HpKAR2<sub>c-myc</sub>*) und pMrL-IFNG (IFN- $\gamma$ ) als Positivkontrolle; Spur 28: DNA-Größenstandard (KBL), Größenangabe [kb] in weißer Schrift. Die fett gedruckten Ziffern kennzeichnen Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen. Die DNA der Probe No. 5 war degradiert und konnte nicht ausgewertet werden. Die bei 3,1 kb detektierten Fragmente resultierten aus einer unspezifischen Aktivität von *PvuII*. Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf verschiedene Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

Unter den 24 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, fanden sich 7 Stämme (No. 8, 11, 15, 16, 20, 25 und 26) mit kointegrierten *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*- und IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren. Die Stämme No. 8 und 15 zeigten vergleichbar intensive Signale für die beide kointegrierten Plasmidsequenzen. Für die Stämme No. 16 und 25 war die Signalintensität für integrierte *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren stärker verglichen mit dem Signal für integrierte IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren. In den Stämmen No. 11, 20 und 26 fand sich die umgekehrte Situation von stärkeren Signalen für integrierte IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren. Eine genaue Kopienzahlbestimmung der Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen erfolgt in Kapitel 3.3.1.8. Die Häufigkeit von Stämmen mit integrierten von IFN- $\gamma$ - überwiegt solche mit integrierten *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren im Verhältnis 2: 1. Ca. 30% der ausgewerteten Stämme zeigten die erwünschte Doppelintegration von IFN- $\gamma$ - mit *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Plasmidsequenzen.

### 3.3.1.6 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN-g und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*

Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Dabei wurden IFN- $\gamma$ - und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren

kotransformiert. Die eingesetzte Sonde erfasste folgende Plasmidfragmente: pMrL-IFNG (IFN- $\gamma$ ) **3,6 kb**, pMrL-PDI+ (*HpPDI1<sub>c-myc</sub>*) **2,7 kb**, und pMrL (Vektorkontrolle) **2,9 kb**. Es wurden 25 Proben der insgesamt 30 rekombinanten Stämme in der Southern-Hybridisierung getestet.

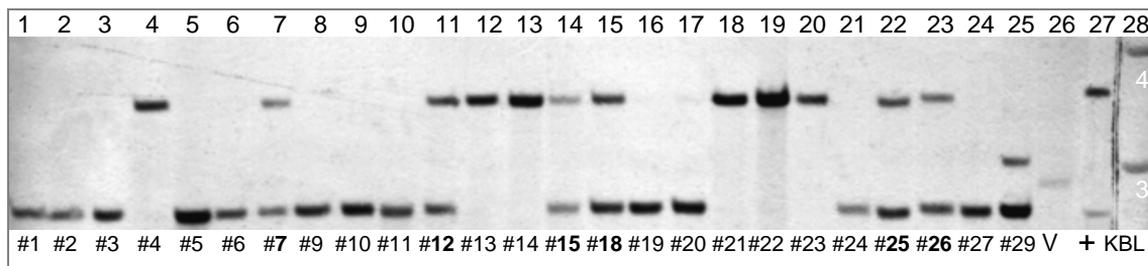


Abbildung 29: Kointegration von IFN- $\gamma$ - und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren

Southern-Blot Analyse von 25 rekombinanten *H. polymorpha* Stämmen. Spur 1-25: Stämme No. 1 bis 29 (No. 8, 16, 17 und 28 fehlten); Spur 26: Vektorkontrolle (V); Spur 27: Je 10 ng mit *PvuII*-restringierte pMrL-PDI+ (*HpPDI1<sub>c-myc</sub>*) und pMrL-IFNG (IFN- $\gamma$ ); Spur 28: DNA-Größenstandard (KBL), Größenangabe [kb] in weißer Schrift. Die fett gedruckten Ziffern kennzeichnen Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen. Das für Stamm No. 29 bei 3,1 kb detektierte Fragment resultierte aus einer unspezifischen Aktivität von *PvuII*. Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf verschiedene Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

Unter den 25 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, fanden sich 6 Stämme (No. 7, 12, 15, 18, 25 und 26) mit kointegrierten IFN- $\gamma$ - und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren. Die Stämme No. 7, 12 und 15 zeigten vergleichbar intensive Signale für beide kointegrierten Plasmidsequenzen. Für die Stämme No. 18, 25 und 26 war die Signalintensität für integriertes *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* stärker verglichen mit dem Signal für integrierte IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren. 6 Stämme zeigten Signale für integrierte Sequenzen des IFN- $\gamma$  und 13 Stämme für integrierte *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren. Eine genaue Kopienzahlbestimmung der Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen erfolgt in Kapitel 3.3.1.8. In der betrachteten Auswahl an Stämmen wurden die *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren ungefähr doppelt so häufig integriert wie die IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren. Mehr als 20% der untersuchten rekombinanten Stämme trug die gewünschte Kombination an integrierten *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*- und IFN- $\gamma$ -Plasmidsequenzen.

### 3.3.1.7 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN-g und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*

Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Dabei wurden IFN- $\gamma$ - und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren kotransformiert. Die eingesetzte Sonde erfasste folgende Plasmidsequenzen: pMrL-IFNG (IFN- $\gamma$ ) **3,6 kb**, pMrL-SSO+ (*HpSSO2<sub>c-myc</sub>*) **3,3 kb**, und pMrL (Vektorkontrolle) **2,9 kb**. Es konnten 22 DNA-Proben der insgesamt 30 rekombinanten Stämme im Southern-Blot getestet werden.

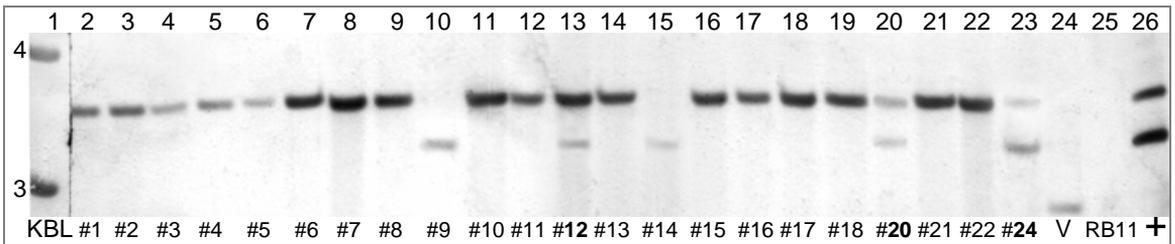


Abbildung 30: Kointegration von IFN- $\gamma$ - und HpSSO<sub>2c-myc</sub>-Expressionsvektoren

Southern-Blot Analyse von 22 rekombinanten *H. polymorpha* Stämmen. Spur 1: DNA-Größenstandard (KBL); Spur 2-23: Stämme No. 1 bis 24 (No. 19 und 24 fehlten). Spur 24: Vektorkontrolle (V); Spur 25: untransformierter RB11; Spur 26: Je 10 ng *Pvu*II-restringierte pMrL-SSO+ (HpSSO<sub>2c-myc</sub>) und pMrL-IFNG (IFN- $\gamma$ ). Die fett gedruckten Ziffern kennzeichnen Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen. Für die Stämme No. 7, 10, 12 und 22 war eine höhere DNA-Menge auf dem EtBr-gefärbten Gel erkennbar. Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf verschiedene Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

Unter den 22 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, fanden sich 3 Stämme (No. 12, 20 und 24) mit kointegrierten IFN- $\gamma$ - und HpSSO<sub>2c-myc</sub>-Expressionsvektoren. Für den Stamm No. 20 war die Signalintensität beider Sequenzen vergleichbar. Stamm No. 12 zeigte ein intensiveres Signal für die IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren. Stamm No. 24 zeigt den gegensätzlichen Fall von einer größeren Signalintensität der integrierten HpSSO<sub>2c-myc</sub>-Expressionsvektoren. Eine genaue Kopienzahlbestimmung der Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen erfolgt in Kapitel 3.3.1.8. In der betrachteten Auswahl an Stämmen wurde IFN- $\gamma$  ungefähr dreimal so häufig integriert wie HpSSO<sub>2c-myc</sub>. Weniger als 15% der rekombinanten Stämme hatte die gewünschte Kombination von beiden eingesetzten Expressionsvektoren integriert.

### 3.3.1.8 Bestimmung der Kopienzahlen kointegrierter Plasmidsequenzen

In den vier vorangegangenen Kapiteln wurden verschiedene *H. polymorpha* Stämme in Southern-Blot Analysen identifiziert, die neben INF- $\gamma$  noch Expressionsvektoren für einen der vier Hilfsfaktoren genomisch integriert trugen. Als nächstes galt es die relativen Kopienzahlen der integrierten Sequenzen zu bestimmen. Hierzu wurde eine Southern-Blot Strategie entwickelt, welche die Kopienzahl der rDNA-Einheiten als Vergleichsmaßstab betrachtet. Da auf den eingesetzten Plasmiden außer der rDNA-Integrationskassette keine weiteren *H. polymorpha*-Sequenzen lagen, konnte keine endogenen Kontrollen als Bezugsgröße für die Kopienzahlen genutzt werden. Die absolute rDNA-Kopienzahl wurde in einer früheren Arbeit [Klabunde *et al*, 2002] zu ca. 50 pro *H. polymorpha* RB11 Genom determiniert. Eine durch PCR-Amplifikation gewonnene Sonde war derart ausgelegt, dass nach Restriktion genomischer DNA unterschiedlich lange *Sna*BI-Fragmente für die verschiedenen integrierten Plasmidsequenzen entstanden. Die Sonde hybridisiert mit einer ca. 500 bp langen Teilsequenz am 3'-Terminus der 18S rDNA von *H. polymorpha*. Abb. 31 gibt eine Übersicht der verschiedenen Hybridisations-Fragmente, die nach *Sna*BI-Restriktion entstehen und den Southern-Blots in Abb. 32 zugeordnet werden können.

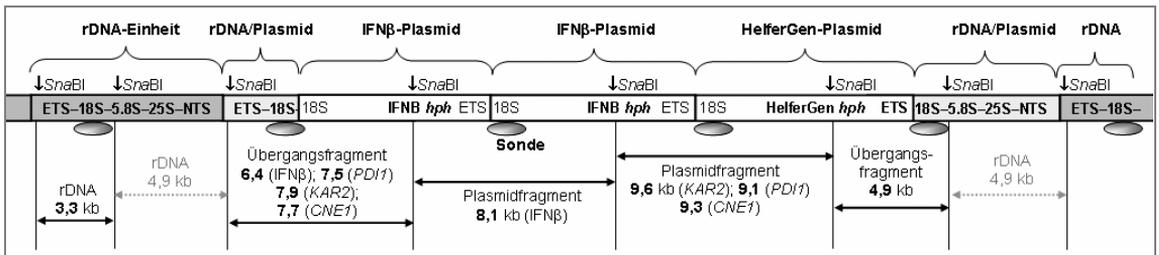


Abbildung 31: *Sna*BI-Restriktionsfragmente am Integrationsort der kointegrierten Expressionsvektoren

Die Abbildung zeigt tandemförmig in den rDNA-Locus integrierte Plasmidsequenzen und die Fragmente die aus einer *Sna*BI-Restriktion hervorgehen. Stromaufwärts und stromabwärts des Integrationsortes entstehen spezifische Übergangsfragmente, die in Abhängigkeit von der Vektorsequenz in der Größe variieren (Das kleine Übergangsfragment ist immer 4,9 kb groß). Tandemförmig integrierte Plasmidsequenzen resultieren in Fragmentgrößen entsprechend der Plasmidgröße (Plasmidfragmente). Jede rDNA-Einheit zerfällt nach *Sna*BI-Restriktion in zwei Fragmente, von denen das kleinere (3,3 kb) von der Sonde erfasst wird. Wird eine einzelne Plasmidsequenz in die rDNA integriert, so entstehen nach Restriktion mit *Sna*BI nur die Übergangsfragmente und kein Plasmidfragment. Die fett gedruckten Ziffern kennzeichnen alle Fragmente, die in den folgenden Southern-Blot Analysen Signale erzeugten. Die grauen Ellipsen symbolisieren die Positionen an denen die Sonde hybridisiert.

Die DNA der in den Kapiteln 3.3.1.4 bis 3.3.1.7 identifizierten Stämme mit kointegrierten Vektoren wurde in einer weiteren Southern-Blot Analyse auf die Kopienzahlen der Plasmidsequenzen untersucht (Abb. 32). Für die Southern-Blot Hybridisierung wurde die chromosomale DNA mit *Sna*BI restringiert und drei Verdünnungen (1/ 1, 1/ 5 und 1/ 20) einer jeden Probe in einem Agarosegel (0,8%) aufgetrennt. Zuvor wurden die Mengen an restringierter DNA nach Abschätzung in Testgelen durch entsprechende Verdünnungen normiert. Vier Stämme mit kointegrierten *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Sequenzen (K#8, K#11, K#15 und K#20), drei Stämme mit kointegrierten *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* (P#7, P#12, P#15), drei Stämme mit kointegrierten *HpSSO2<sub>c-myc</sub>* (S#12, S#20, S#24) und sechs Stämme mit kointegrierten *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* (C#11, C#12, C#16, C#17 und C#24) konnten ausgewertet werden.

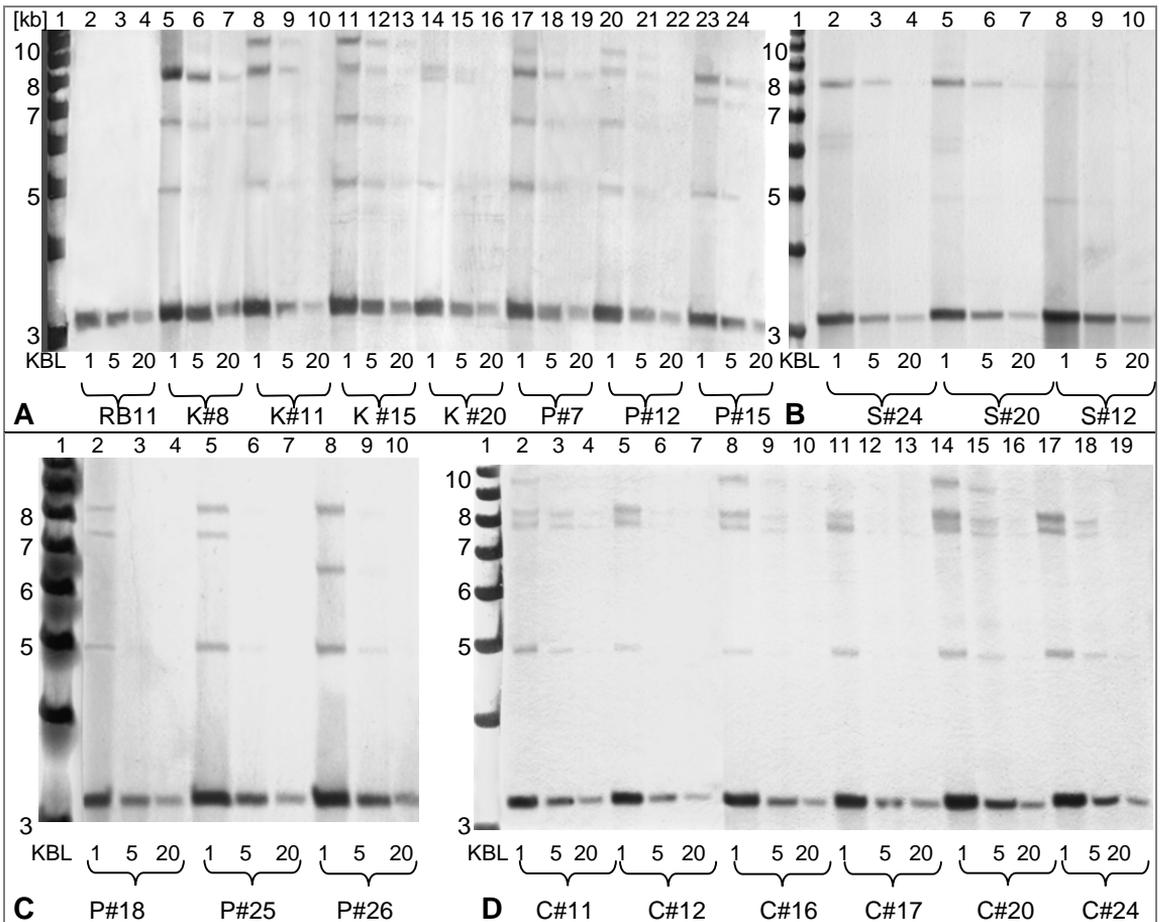


Abbildung 32: Southern-Blot Analyse zur Kopienzahlbestimmung von kointegrierten Plasmidsequenzen

Southern-Blot Analyse von 19 rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen mit kointegrierten Sequenzen für IFN- $\gamma$  kombiniert mit je einem der vier betrachteten Hilfsfaktoren. Die eingesetzte Sonde hybridisierte mit einem ~500 bp langen Abschnitt der 18S rDNA von *H. polymorpha*. Der DNA-Größenstandard (KBL) wurde nach dem Transfer auf die Nylonmembran abgetrennt und mit einer spezifischen Sonde behandelt.

**A** Spur 1: KBL; Spur 2-4: untransformierter RB11; Spur 5-16: RB11 mit kointegrierten INF- $\gamma$  und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren; Spur 17-25: RB11 mit kointegrierten INF- $\gamma$  und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*. **B** Spur 1: KBL; Spur 2-10: RB11 mit kointegrierten INF- $\gamma$  und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*. **C** Spur 1: KBL; Spur 2-10: RB11 mit kointegrierten INF- $\gamma$  und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*. **D** Spur 1: KBL; Spur 2-19: RB11 mit kointegrierten INF- $\gamma$  und *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*.

Durch visuelle Abschätzung der Signalintensitäten, bezogen auf das Signal des 3,3 kb rDNA-Fragments, wurden die relativen Kopienzahlen der kointegrierten Plasmidsequenzen bestimmt. Unter der Annahme von 50 rDNA-Einheiten pro *H. polymorpha*-Genom, entsprechen die Signalstärken der 1: 5 Verdünnung 10 Kopien und in der 1: 20 Verdünnung 2-3 Kopien. Die absolute rDNA-Kopienzahl, in den Stämmen mit kointegrierten Plasmidsequenzen, verringerte sich nicht, verglichen zu dem untransformierten Stamm RB11 (**A** Spur 2-4: vergleichbare Signalintensitäten des 3,3 kb-Fragments von RB11 zu den rekombinanten Stämmen). Für jede der vier getesteten Kombinationen von integrierten Plasmidsequenzen wurden die Signale aus dem Southern-Blot zu den Kopienzahlen der verschiedenen Fragmente zugeordnet. Daraus

ergeben sich die absolute Kopienzahl und die Anordnung in Clustern von tandemförmig arrangierten Plasmidsequenzen oder Einzelintegrationen (Tab. 6). An einem Beispiel wird die genaue Vorgehensweise erläutert:

Als Beispiel für die Kopienzahlbestimmung von kointegrierten IFN- $\gamma$ - und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren dient der Stamm K#11. Die visuell abgeschätzten Signalintensitäten des Übergangsfragments (ÜF: 4,9 kb) und des IFN- $\gamma$ -Übergangsfragments (6,5 kb) sind vergleichbar mit dem rDNA-Fragment in der 1:20 verdünnten Probe und wurden zu je zwei Kopien festgelegt (Abb. 32 A). Da keine *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Übergangsfragmente (ÜF) registriert werden konnten, wurden die unspezifischen Übergangsfragmente (ÜF) den IFN- $\gamma$ -Übergangsfragmenten zugeordnet (Tab. 6 A). Die Signale für das IFN- $\gamma$  (PF: 8,2 kb) und das *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Plasmidfragment (PF: 9,6 kb) entsprechen dem des rDNA-Fragment in der 1:5 verdünnten Probe, welches 10 Kopien repräsentiert. Da diese detektierten Fragmente die volle Plasmidlänge der Expressionsvektoren vorwiesen, wurden sie als tandemförmig integrierte Sequenzen eingestuft (Spalte: Tandem). Es liegen also zwei sehr große Cluster mit tandemförmig aneinander gereihten Plasmidsequenzen vor, die von IFN- $\gamma$ -Übergangsfragmenten umrahmt werden. Möglich wäre auch eine Einzelintegration zusammen mit einem großen Cluster mit allen tandemförmig angeordneten Plasmidsequenzen als vorstellbares Muster. Eine Einzelintegration liegt vor, wenn ein großes und kleines Übergangsfragment zusammen eine integrierte Plasmidsequenz ergeben (Spalte: Einzel). Die fettgedruckten Ziffern zeigen die Summe aller Kopien integrierter Expressionsvektoren. Tab. 6 gibt einen Überblick der Kopienzahlen und Zuordnungen der Fragmente aus der Southern-Blot Analyse aus Abb. 3

<b>K#8</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	2	6	1	6	<b>7</b>
KAR2	0	0	0	0	<b>0</b>

<b>K#15</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	4	2	2	2	<b>4</b>
KAR2	0	2	0	2	<b>2</b>

<b>S#12</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	2	1	1	1	<b>2</b>
SSO2	0	0	0	0	<b>0</b>

<b>P#7</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	4	3	2	3	<b>5</b>
PDI1	0	1	0	1	<b>1</b>

<b>P#15</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	0	3	0	3	<b>3</b>
PDI1	2	0	1	0	<b>1</b>

<b>P#25</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	0	3	0	3	<b>3</b>
PDI1	4	0	2	0	<b>2</b>

<b>C#11</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	0	1	0	1	<b>1</b>
CNE1	4	1	2	1	<b>3</b>

<b>C#16</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	0	3	0	3	<b>3</b>
CNE1	4	2	2	2	<b>4</b>

<b>C#20</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	0	5	0	5	<b>5</b>
CNE1	6	4	3	4	<b>7</b>

<b>K#11</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	4	10	2	10	<b>12</b>
KAR2	0	10	0	10	<b>10</b>

<b>K#20</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	0	1	0	1	<b>1</b>
KAR2	2	0	1	0	<b>1</b>

<b>S#20/21</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	1	10	1	10	<b>11</b>
SSO2	1	0	1	0	<b>1</b>

<b>P#12</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	2	1	1	1	<b>2</b>
PDI1	0	1	0	1	<b>1</b>

<b>P#18</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	0	1	0	1	<b>1</b>
PDI1	2	0	1	0	<b>1</b>

<b>P#26</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	4	2	2	2	<b>4</b>
PDI1	0	0	1	0	<b>0</b>

<b>C#12</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	0	4	0	4	<b>4</b>
CNE1	6	0	3	0	<b>3</b>

<b>C#17</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	0	2	0	2	<b>2</b>
CNE1	6	1	3	1	<b>4</b>

<b>C#24</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
IFN- $\gamma$	0	5	0	5	<b>5</b>
CNE1	8	0	4	0	<b>4</b>

Tabelle 6: Kopienzahlbestimmung kointegrierter und Helfergen- und IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren

Die Tabelle vereinigt die Kopienzahlbestimmung (Abb. 32) und die Zuordnung der detektierten Fragmente (Abb. 31). Eine Einzelintegration liegt vor, wenn ein großes und kleines Übergangsfragment zusammen eine integrierte Plasmidsequenz ergeben (Spalte: Einzel). Tandemförmige Integrationen (Spalte: Tandem) ergaben sich aus der relativen Kopienzahlen der jeweiligen Plasmidfragmente. ÜF: Übergangsfragment; PF: Plasmidfragment. Die fettgedruckten Ziffern repräsentieren die Summe aller Kopien von Expressionsvektoren für Hilfsfaktoren und Pharmaproteine.

### 3.3.1.9 Expression von *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*, *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*, *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*

Von den in 3.3.1.8 charakterisierten Stämmen mit kointegrierten Expressionsvektoren wurden 50 ml Schüttelkulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 10 herangezogen (Synthetisches Medium, 5% Glycerin bei 37 °C). Der gesamte Überstand einer jeden Kultur wurde präzipitiert und in 200  $\mu$ l Endvolumen aufgenommen. Insgesamt wurde Zellmaterial entsprechen 200 OD<sub>600</sub>-Einheiten zu Zellextrakten verarbeitet und in 1 ml Probenpuffer aufgenommen. Jeweils 50  $\mu$ l der Zellextrakte

wurden elektro-phoretisch mit SDS-PAGE (Gel: 7,5%) aufgetrennt. In einer Western-Blot Analyse (Abb. 33) wurde mit Antikörpern gegen das an alle Hilfsfaktoren fusionierte *c-myc*-Epitop die Expression der *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*<sup>-</sup>, *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*<sup>-</sup>, *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*<sup>-</sup> und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*-Gene überprüft.

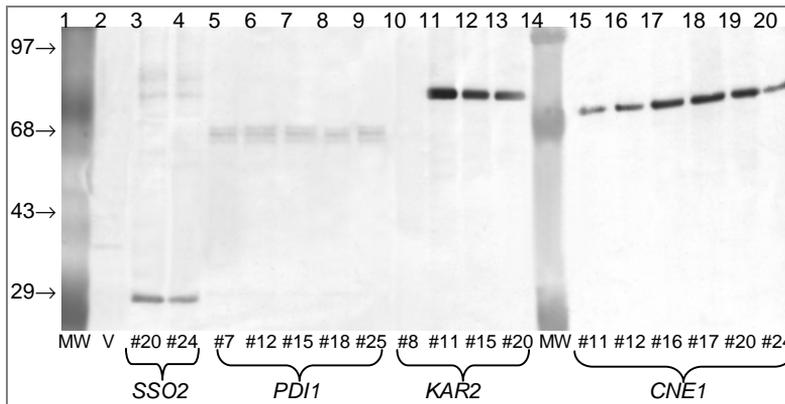


Abbildung 33: Nachweis von *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*, *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*, *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*

Der Western-Blot wurde mit Antikörpern gegen das *c-myc*-Epitop der markierten Hilfsproteine behandelt. Spur 1: Molekulargewichtsstandard (MW) in kDa; Spur 2: Vektorkontrolle V (pMrL integriert in RB11); Spur 3/4: Stämme No. 20 und 24 mit kointegrierten IFN- $\gamma$ - und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren; Spur 5-9: Stämme No. 7 bis 25 mit kointegrierten IFN- $\gamma$  und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*; Spur 10-13: Stämme No. 8 bis 20 mit kointegrierten IFN- $\gamma$  und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*; Spur 14: Molekulargewichtsstandard (MW, kDa); Spur 15-20: Stämme No. 11-24 mit kointegrierten IFN- $\gamma$  und *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*.

Aus der Auswertung des Blots aus Abb. 33 ergaben sich folgenden Schlussfolgerungen: Beide Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen für IFN- $\gamma$  und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>* exprimieren ein Proteine, das in der SDS-PAGE auf einer Höhe von 29 kDa läuft. *S. cerevisiae* Sso2p hat eine  $M_r$  von 27 kDa. das detektierte Protein ist mit hoher Wahrscheinlichkeit das markierte *H. polymorpha* Homolog zu ScSso2p. Das in die rDNA integrierte Gen wird in beiden Stämmen exprimiert.

Das Pdi1p aus *S. cerevisiae* weist eine  $M_r$  von 57 kDa auf. In allen fünf untersuchten rekombinanten Stämmen resultierte der immunologische Nachweis in drei Proteinen von ca. 60 kDa. Das eingebrachte *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* wird demzufolge exprimiert, aber das Auftreten von drei Signalen gibt einen Hinweis auf mögliche Degradation oder Modifikationen des Proteins. Der letale Phänotyp von einem *S. cerevisiae* *pdi1*-Deletionsstamms konnte in der in Kapitel 3.2.3.3 gezeigten Funktionsanalyse nicht mit *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* komplementiert werden. Dieser Befund gibt zusammen mit den oben gezeigten Ergebnissen einen Hinweis auf ein Problem in der Expression des eingesetzten *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*.

Drei der vier untersuchten Stämme mit integrierten Sequenzen für *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* wiesen in der Western-Blot Analyse ein Protein mit einer  $M_r$  von 75 kDa auf. Die für *S. cerevisiae*-Kar2p in der SDS-PAGE erwartete  $M_r$  liegt bei 74 kDa. Der immunologische Nachweis des *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* bestätigt die erfolgreiche Komplementations-Analyse des *S. cerevisiae* *kar2*-Stamms mit diesem Gen (Kapitel 3.2.2.3). Stamm No. 8 zeigt keine Expression von *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*, und bestätigt damit den Befund der Southern-Blot Analyse in Kapitel 3.3.1.8.

Alle sechs analysierten Stämme mit kointegrierten *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren wiesen in der SDS-PAGE ein *c-myc*-markiertes Protein mit einer  $M_r$  von 70 kDa auf. Das glykosylierte

*S. cerevisiae*-Cne1p hat demgegenüber eine  $M_r$  von 76 kDa in der SDS-PAGE [Parlati *et al*, 1995]. Die Größendifferenz könnte auf unterschiedliche Glykosylierungen der beiden Homologe zurückzuführen sein, zudem die Aminosäuresequenz von *HpCne1p* ca. 50 Aminosäuren länger ist als die von *ScCne1p* und somit eher ein größeres  $M_r$  zu erwarten wäre. Alle sechs getesteten Stämme exprimierten das in die rDNA integrierte, *c-myc*-Epitop markierte *HpCNE1*. Dieses Ergebnis bestätigt die erfolgreiche Komplementation eines *S. cerevisiae cne1*-Deletionsstamms in Kapitel 3.2.1.3.

### 3.3.1.10 IFN- $\gamma$ -Produktion bei koexprimierten Hilfsfaktoren

Die in Kapitel 3.3.1.9 beschriebenen Zellextrakte und Kulturüberstände sollten in einer weiteren Western-Blot Analyse auf die Anwesenheit von IFN- $\gamma$  untersucht werden. Je 50  $\mu$ l der Zellextrakte und der präzipitierten Überstände wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE (Gel: 12,5%) aufgetrennt und mit Antikörpern gegen menschliches IFN- $\gamma$  behandelt. Als Positivkontrolle diente rekombinantes IFN- $\gamma$  aus *E. coli*, welches nach Zugabe zum Medium in gleicher Weise wie die untersuchten Proben präzipitiert wurde. Abb. 34 zeigt drei Western-Blot Analysen für IFN- $\gamma$  produzierende *H. polymorpha*-Stämme mit überexprimierten *HpCNE1*<sub>*c-myc*</sub>, *HpKAR2*<sub>*c-myc*</sub>, *HpPDI1*<sub>*c-myc*</sub> und *HpSSO2*<sub>*c-myc*</sub>.

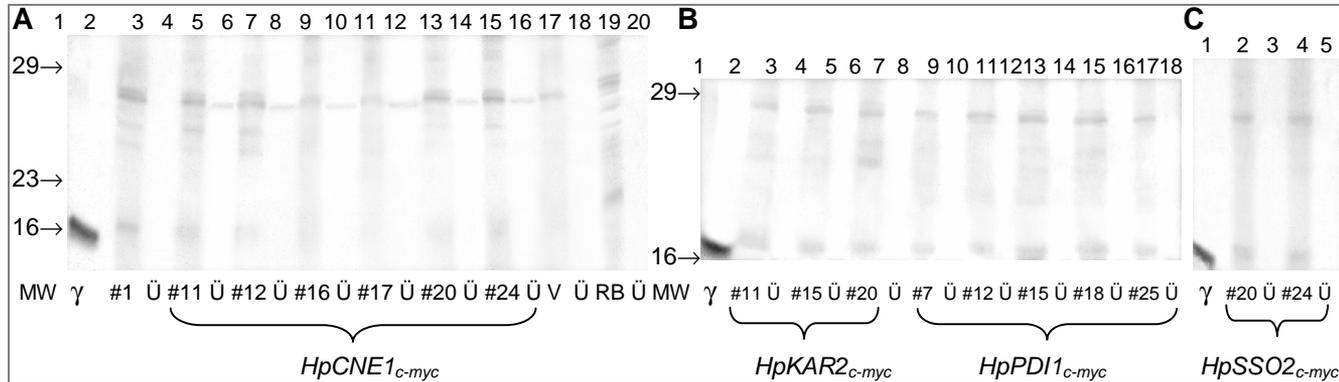


Abbildung 34: IFN- $\gamma$ -Expression bei parallel überproduzierten Hilfsfaktoren

Die drei Western-Blot Analysen zeigen die Produktion von IFN- $\gamma$  in Stämmen bei gleichzeitiger Überexpression der festgelegten Gene für endogene Hilfsfaktoren. Es wurden jeweilig die Zellextrakte und präzipitierten Kulturüberstände (Ü) nebeneinander aufgetragen. Der eingesetzte Antikörper zeigte starke Kreuzreaktionen mit verschiedenen Hefeproteinen. Der Molekulargewichtsstandard in der ersten Spur ist nicht gezeigt und wird durch die Ziffern repräsentiert (in kDa).

**A:** Spur 2: IFN- $\gamma$  Standard; Spur 3/ 4: Stämme mit integrierten IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren; Spur 5-16: Stämme No. 11 bis 24 mit kointegrierten IFN- $\gamma$  und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*; Spur 17/ 18: Vektorkontrolle V (pMrL integriert in *H. polymorpha* RB11); Spur 19/ 20: untransformierter RB11 (RB).

**B:** Spur 2: IFN- $\gamma$  Standard; Spur 3-8: Stämme No. 11, 15 und 20 mit kointegrierten IFN- $\gamma$  und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*; Spur 9-18: Stämme No. 7 bis 25 mit kointegrierten IFN- $\gamma$  und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*.

**C:** Spur 1: IFN- $\gamma$  Standard; Spur 2-5: Stämme No. 20 und 24 mit kointegrierten IFN- $\gamma$  und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*.

Die Auswertung der Western-Blots aus Abb. 34 erbrachte folgenden Befund in Bezug auf die IFN- $\gamma$ -Synthese: In Stamm No. 1 mit integrierten IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren wurde das in Kapitel 3.3.1.2 beschriebene Ergebnis bestätigt: Das Signal bei ca. 18 kDa entspricht dem nicht vollständig glykosylierten Produkt, das im Zellinneren der Wirtshefen zurückgehalten wird. Auch in mit *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren kotransformierten Stämmen war dieses Protein in geringeren Konzentrationen ausschließlich im Zellextrakt nachweisbar. Zusätzlich zu dem intrazellularen IFN- $\gamma$  findet sich aber in allen sechs Stämmen mit überproduzierten endogenen Cne1p ein Protein im präzipitierten Kulturüberstand, welches eine Größe von ungefähr 26 kDa aufweist. In der Vektorkontrolle und im untransformierten RB11 wurden keine entsprechenden Signale in den präzipitierten Kulturüberständen detektiert. Das identifizierte relative Molekulargewicht von 26 kDa entspricht ungefähr der Größe, die für zweifach glykosyliertes IFN- $\gamma$  (Asn<sub>25</sub> und Asn<sub>97</sub>), sezerniert von CHO Zellen, determiniert wurde [Hooker und James, 1998]. Bei dem detektierten Protein im Überstand der sechs Stämme mit koexprimierten *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* handelte es sich demzufolge mit großer Wahrscheinlichkeit um ein ähnlich glykosyliertes IFN- $\gamma$ . Die mit *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*, *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>* kotransformierten IFN- $\gamma$ -Produktionsstämme zeigten keine Sekretion des Produkts.

### 3.3.2 Produktion von IFN-g in *A. adenivorans*

#### 3.3.2.1 Integration von Expressionsvektoren für IFN-g in die rDNA von *A. adenivorans*

Die Sequenz der rDNA von *A. adenivorans* ist nur für Teilabschnitte bekannt, und somit ist der Integrationsnachweis mittels analytischer PCR oder Southern-Blot Hybridisierung erheblich erschwert. Trotzdem konnte eine Restriktionsschnittstelle im sequenzierten Teilstück der 25S rDNA identifiziert werden, die einen Integrations-Nachweis mittels Southern-Blot Analyse ermöglichte. *A. adenivorans* LS3 wurde mit *FbaI* linearisierten pMrL-IFNG (IFN- $\gamma$ ) und pMrL (Vektorkontrolle) transformiert. Die resultierenden rekombinanten Stämme wurden stabilisiert und chromosomale DNA aus vereinzelt Kolonien isoliert. DNA von 7 dieser rekombinanten Stämme (6 transformiert mit dem IFN- $\gamma$ -Expressionsvektor und eine Vektorkontrolle) wurden nach erfolgter Restriktion mit *PvuI* elektrophoretisch in einem Agarosegel (1%) aufgetrennt. Zuvor wurde in mehreren Testgelen die DNA-Konzentration der Proben abgeschätzt und durch entsprechende Verdünnungen aneinander angeglichen. Für die Southern-Hybridisierung (Abb. 35) wurden zwei Fragmente aus dem Plasmid pMrL-IFNG (*PvuI*-/*BglI*-Restriktion) nach dem Standardprotokoll von Roche markiert. Die resultierenden Sonden hybridisierten mit Teilabschnitten der *amp<sup>R</sup>*- und *hph<sup>R</sup>*-Gene auf den integrierten Plasmidsequenzen.

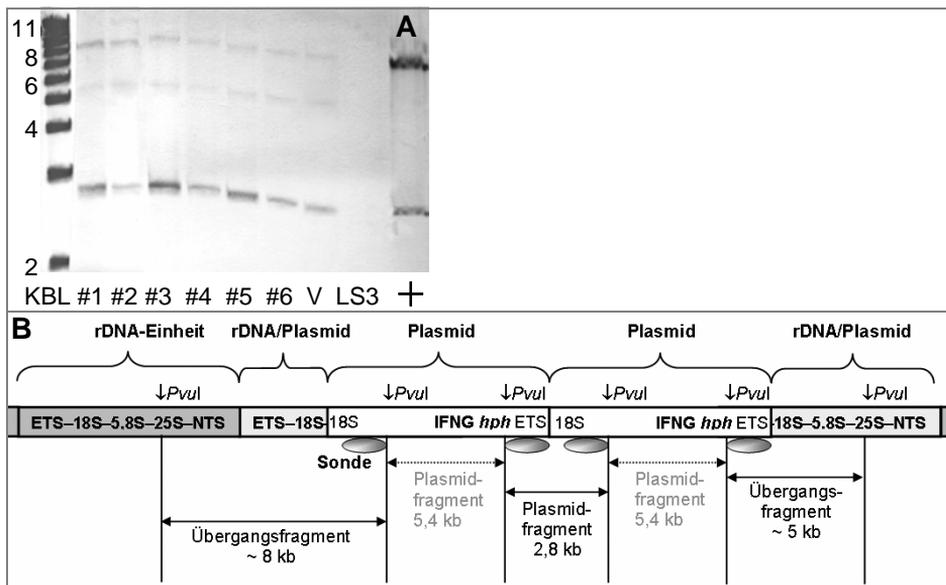


Abbildung 35: Southern-Blot und Modell zu Integration von IFN- $\gamma$ -Vektoren in *A. adenivorans*-rDNA

**A:** Southern-Blot Analyse von 6 rekombinanten *A. adenivorans*-Stämmen. Der DNA-Größenstandard (KBL) wurde nach dem Transfer auf die Nylonmembran abgetrennt und mit einer spezifischen Sonde hybridisiert. Spur 1: DNA-Größenstandard (KBL); Spur 2-7: Stämme No. 1 bis 6 (IFN- $\gamma$ ); Spur 8: Vektorkontrolle; Spur 9: untransformierten LS3; Spur 10: Je 10 ng restringierte Plasmid-DNA ( $Apal=8,2$  kb/  $PvuI=2,8$  kb). Für alle 7 betrachteten Stämme sind drei Signale bei 2,8, 5,5 und 8 kb erkennbar. Die Signalstärke der 2,8 Kb-Fragmente ist weitaus stärker als die der großen Fragmente. Insbesondere die Signale für die großen Übergangsfragmente bei 11 kb sind sehr schwach. Integration der Vektorkontrolle resultierte nach *PvuI*-Restriktion in gleich großen Fragmenten wie bei integrierten pMrL-IFNG Sequenzen.

**B:** Das Modell gibt eine Zuordnung zu den Fragmenten, die nach Restriktion mit *PvuI* entstehen, wenn Plasmidsequenzen tandemförmig in die rDNA integriert vorliegen. Stromauf und stromabwärts der Integrationsstellen entstehen zwei Übergangsfragmente unterschiedlicher Größe. Die eingesetzten Sonden (graue Ellipsen) hybridisieren mit beiden Übergangsfragmenten (~8 bzw. ~5 kb) und dem Plasmidfragment (2,8 kb). Wird eine einzelne Plasmidsequenz in die rDNA integriert, so entstehen nach Restriktion mit *PvuI* nur die Übergangsfragmente und ein Plasmidfragment von 5,4 kb, welches aber nicht von der Sonde detektiert wird. Die Sonden erfassen zwei Teilsequenzen des Plasmidfragments. Dadurch wird die Signalintensität in Relation zu den Übergangsfragmenten verdoppelt. Die Größe der Übergangsfragmente konnte nur abgeschätzt werden, da keine vollständigen Sequenzdaten der rDNA-Einheit von *A. adenivorans* vorlagen.

In allen getesteten Stämmen konnte durch Detektion der spezifischen Übergangsfragmente die Integration von Plasmidsequenzen in die rDNA nachgewiesen werden. Wie in Kapitel 3.3.1.1 beobachtet wurde, waren die Signalintensitäten größerer DNA Fragmente im Allgemeinen schwächer ausgeprägt. Um die Problematik mit der DNA-Präparation zu beseitigen, wurde ein modifiziertes Protokoll zur Isolation chromosomaler DNA aus Hefen in den folgenden Versuchen eingesetzt (M & M). Für die Stämme No. 1, 3 und 5 ist die Signalstärke für das Plasmidfragment erheblich intensiver als die für die Übergangsfragmente. In diesen drei Fällen lagen mehr Plasmidsequenzen tandemförmig integriert vor als Einzelintegrationen. Die Stämme No. 2, 4, 6 und die Vektorkontrolle zeigten ungefähr doppelt so intensive Signale für das Plasmidfragment. Unter Berücksichtigung der doppelten Hybridisierung mit der Sonde ist das Verhältnis der Kopienzahlen von Übergangsfragmenten zu Plasmidfragmenten aus-

geglichen. Die bedeutet das sowohl Einzelintegrationen als auch kleine Cluster an tandemförmig integrierten Vektorsequenzen vorlagen. Wie schon bei *H. polymorpha* beobachtet, kommt es auch in *A. adeninivorans* zu einer eher zufälligen Verteilung in Einzelintegrationen oder Clustern bei der rDNA-Integration.

### 3.3.2.2 Bestimmung von IFN- $\gamma$ produziert in *A. adeninivorans*

Von den in 3.3.2.1 beschriebenen Stämmen mit integrierten IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren wurden 50 ml Schüttelkulturen zu einer OD<sub>600</sub> von 1 in YPD-Medium bei 30 °C herangezogen. Der gesamte Kulturüberstand wurde gefällt und in 200  $\mu$ l Endvolumen aufgenommen. Aus den Kulturen wurde eine Zellmenge, die 40 OD<sub>600</sub>-Einheiten entspricht, abgetrennt und zu Zellextrakten verarbeitet (Aufnahme in 200  $\mu$ l Probenpuffer). Parallel wurden die gleichen Stämme bei 44 °C kultiviert (ebenfalls bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1) und die Kulturüberstände präzipitiert. Bei Temperaturen oberhalb von 42 °C wächst *A. adeninivorans* als lockeres Myzel. Von den Überständen und Zellextrakten wurden je 50  $\mu$ l pro Stamm in einer SDS-PAGE (Gel: 15%) aufgetrennt. Als Positivkontrolle diente rekombinantes IFN- $\gamma$  aus *E. coli*, welches nach Zugabe zum Medium in gleicher Weise wie die Proben präzipitiert wurde. Durch reversibles Färben mit Ponceau S wurden die Proteinmengen im Gel abgeschätzt und wenn nötig soweit aneinander angeglichen bis in allen Spuren gleichviel Protein vorlag. In der Western-Blot Analyse (Abb. 36) wurde mit Antikörpern gegen humanes IFN- $\gamma$  das Vorhandensein des Produktes in den Zellextrakten und Überständen überprüft.

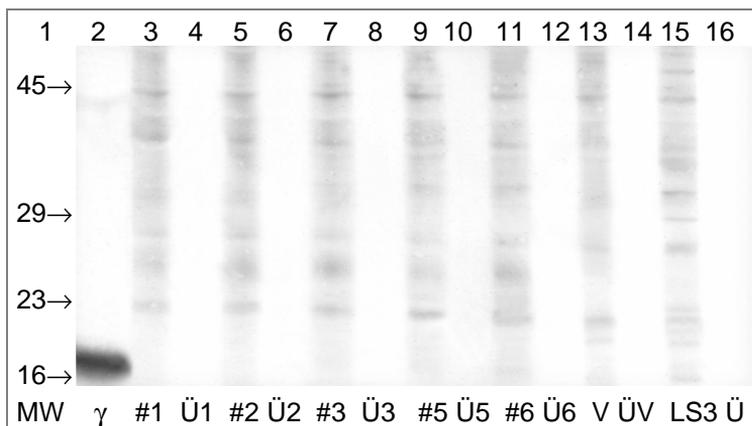


Abbildung 36: *A. adeninivorans*-Stämme mit integrierten IFN- $\gamma$ -Expressionsplasmiden

Die Western-Blot Analyse zeigt Zellextrakte und Mediumsüberstände von Stämmen, die auf IFN- $\gamma$ -Expression untersucht wurden. Der Molekulargewichtsstandard in der ersten Spur ist nicht gezeigt und wird durch die Ziffern repräsentiert (in kDa). Zellextrakte und Überstände (Ü) wurden jeweilig nebeneinander aufgetragen. Spur 2: IFN- $\gamma$  Standard; Spur 3-12: Stämme No.1 bis 6 (Stamm No. 4 war nicht angewachsen); Spur 13/14: LS3 transformiert mit pMrL (Vektorkontrolle); Spur 15/16 untransformierter Stamms LS3. Der eingesetzte Antikörper gegen IFN- $\gamma$  erzeugte starke Kreuzhybridisierungen mit den Hefe-Proteinen in den Zellextrakten.

In keinem der fünf analysierten *A. adeninivorans*-Stämme konnte nach Kultivierung bei 30 °C in Vollmedium (YPD, 2% Glukose) in den präzipitierten Überständen IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden. In den Zellextrakten ist ein diffuses Signal bei 25 kDa nachweisbar, welches in den Kontrollen fehlt. Seine Identität als degradiertes IFN- $\gamma$  konnte in weiteren Untersuchungen mit höheren Mengen an Zellextrakt nicht eindeutig bestätigt werden. Auch in den Kulturüber-

ständen von Stämmen, herangezogen bei 45 °C, konnte kein IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da für die IFN- $\gamma$ -Expression in *A. adenivorans* der gleiche Vektor wie für IFN- $\gamma$ -produzierende *H. polymorpha*-Stämme eingesetzt wurde, muss die fehlende IFN- $\gamma$ -Expression auf Effekte zurückzuführen sein, die für die *A. adenivorans*-Expressionsplattform spezifisch sind. Die Funktionsfähigkeit des Vektorsystems wurde anhand von Modellproteinen hinreichend für *A. adenivorans* demonstriert.

### 3.3.3 Zusammenfassung der Resultate zur rekombinanten IFN-g Produktion

Mit Hilfe der Kotransformation verschiedener Hilfsfaktoren zusammen mit IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren konnte eine Vielzahl von rekombinanten *H. polymorpha*-Stämme generiert werden, die eine gewünschte Kombination von Zielgenen und Genen für Hilfsfaktoren in die rDNA integriert trugen. Die Kopienzahlen der eingebrachten Plasmidsequenzen waren für jeden Stamm charakteristisch und lagen im Bereich zwischen insgesamt 1 bis 22, je nach betrachteter Kombination an kointegrierten Sequenzen. Am rDNA-Locus wurden sowohl Einzelintegrationen als auch große Cluster an tandemförmig integrierten Plasmidsequenzen beobachtet. Ein Zusammenhang zwischen den integrierten Vektorsequenzen und dem beobachteten Muster konnte dabei nicht festgestellt werden. Tab. 7 gibt eine Übersicht über die gefunden Kombinationen, die Kopienzahlen und die beobachteten Effekte auf die Expression und Sekretion von IFN- $\gamma$  in *H. polymorpha*.

	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ & <i>HpCNE1</i>		IFN- $\gamma$ & <i>HpKAR2</i>		IFN- $\gamma$ & <i>HpPDI1</i>		IFN- $\gamma$ & <i>HpSSO2</i>	
? Stämme	6	6		7		6		3	
Kopienzahl	nicht bestimmt	1–5	3–7	7–12	0–10	1–5	0–2	2–11	0–1
IFN- $\gamma$ im Zellextrakt (~18 kDa)	++	+		++		++		++	
IFN- $\gamma$ im Überstand (~26 kDa)		++							

Tabelle 7: Übersicht zur IFN- $\gamma$  Expression in rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen

Die Tabelle zeigt sehr eindeutig, dass im Falle der Koexpression von *CNE1* und *KAR2* sowohl die Kopienzahl integrierter IFN- $\gamma$ - als auch Hilfsfaktor-Sequenzen am höchsten war. Die Zellen tolerierten in die rDNA integrierte Vektorsequenzen besonders in dieser Kombination in hohen Kopienzahlen. Stämme mit integrierten IFN- $\gamma$ -Plasmidsequenzen exprimierten IFN- $\gamma$ . Das Zytokin verblieb aber in unvollständig glykosylierter Form in inneren Strukturen der rekombinanten Stämme. In den Kulturüberständen konnte keinerlei Produkt nachgewiesen werden. Auch die Sekretion überglykosylierter IFN- $\gamma$ , die für *H. polymorpha* gezeigt wurde [Degelmann *et al*, 2002], konnte in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Ein Grund dafür könnte in dem geringen Expressionslevel liegen, da durch Verwendung des multifunktionalen Vektorsystems keine für *H. polymorpha* optimierten Promotorsequenzen verwendet wurden. Die Koexpression von endogenen Hilfsfaktoren führte in einer der vier untersuchten Kombinationen zum Erfolg. Die gleichzeitige Expression von *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* zusammen mit IFN- $\gamma$

fürte zu einem geänderten Expressionsverhalten der betrachteten *H. polymorpha*-Stämme. In den Kulturüberständen aller sechs Stämme mit kointegrierten Expressionsvektoren für IFN- $\gamma$  und *HpCNE1*<sub>c-myc</sub> wurden nachweisbare Mengen IFN- $\gamma$  gefunden. Das Produkt wies dabei eine  $M_r$  von 26 kDa auf, was in etwa der Größe von reifen, glykosylierten IFN- $\gamma$  entspricht. Der ursächliche Zusammenhang von Überexpression von endogenen *CNE1* und Veränderung des Sekretionsverhaltens konnte für sechs untersuchte Stämme eindeutig demonstriert werden. Ein Effekt von koexprimierten *HpKAR2*<sub>c-myc</sub>, *HpPDI1*<sub>c-myc</sub> oder *HpSSO2*<sub>c-myc</sub> auf das Expressionsverhalten für IFN- $\gamma$  wurde dagegen nicht beobachtet.

Für *A. adenivorans* konnte in keinem von fünf analysierten Stämmen Expression von IFN- $\gamma$  gezeigt werden. Auch die Kultivierung der Zellen als Myzel bei 45 °C führte nicht zum erwünschten Ergebnis. Weder in den Zellen, noch in den Kulturüberständen war IFN- $\gamma$  detektierbar.

### **3.4 IFN- $\beta$ Produktion in *H. polymorpha* und *A. adenivorans***

Die rekombinante Produktion menschlichen IFN- $\beta$  in verschiedenen Hefen (*S. cerevisiae*, *P. stipitis* und *H. polymorpha*) führt zur Retention des Produkts in inneren Strukturen oder zu toxischen Auswirkungen auf die Zellen [Piggott *et al*, 1987]; A. Degelmann und T. Weierstall, persönliche Mitteilung]. In verschiedene Testreihen wurden unterschiedliche Signalsequenzen und Promotoren getestet, um die Sekretion des Produktes in den Kulturüberstand zu forcieren. In *P. stipitis* führte diese Strategie nicht zum Erfolg, wohingegen in *H. polymorpha* geringe Mengen IFN- $\beta$  im Kulturüberstand nachweisbar waren, soweit die IFN- $\beta$  -eigene Signalsequenz zum Einsatz kam [Chang *et al*, 1986]. Das Plasmid pMrL-IFNB beinhaltet dieses in *H. polymorpha* und *P. stipitis* funktionale Gen für menschliches IFN- $\beta$  unter Kontrolle des *TEF1*-Promotors aus *A. adenivorans*. Mit diesem integrativen Plasmid wurden sowohl der *H. polymorpha*-Stamm RB11, als auch der *A. adenivorans*-Stamm LS3 transformiert. Um die für *H. polymorpha* beschriebenen Limitierungen aufzuheben wurden zusätzlich die Auswirkungen von koexprimierten Genen für Hilfsfaktoren auf die IFN- $\beta$ -Expression betrachtet.

#### **3.4.1 Expression von IFN- $\beta$ in *H. polymorpha***

##### **3.4.1.1 Integration von Expressionsvektoren für IFN- $\beta$ in die rDNA von *H. polymorpha***

Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben. Abweichend davon wurden sechs Stämme mit integrierten IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren und ein Stamm mit integrierten pMrL (Vektorkontrolle) generiert. Abb. 37 B verdeutlicht die Herkunft der Fragmente, die nach *KpnI*-Restriktion entstehen und von der eingesetzten Sonde erfasst wurden.

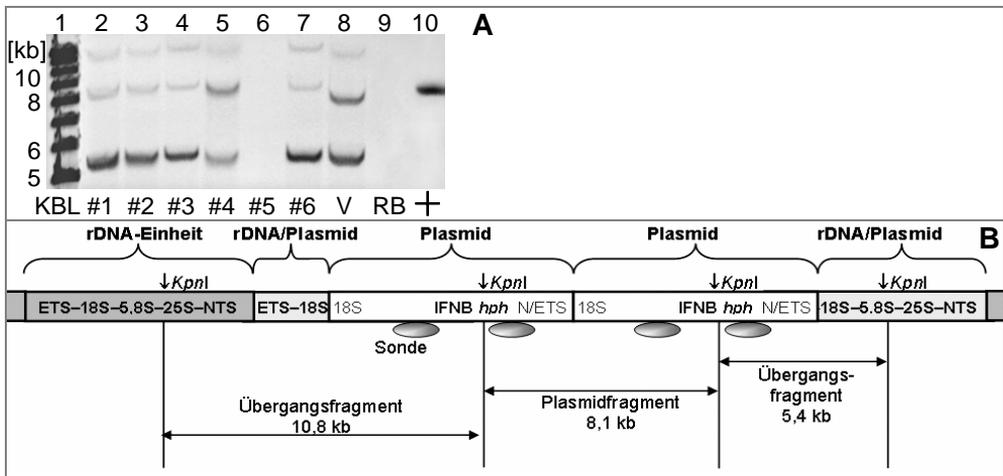


Abbildung 37: Southern-Blot und Modell zur Integration von IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren in *H. polymorpha*

**A:** Southern-Blot Analyse von 6 Stämmen transformiert mit pMrL-IFNB (IFN- $\beta$ ) und einem Stamm transformiert mit pMrL (Vektorkontrolle V). Der DNA-Größenstandard (KBL) wurde nach dem Transfer auf die Nylonmembran abgetrennt und mit einer spezifischen Sonde hybridisiert. Spur 1: KBL; Spur 2-7: Stämme No. 1 bis 6; Spur 8: Vektorkontrolle (V); Spur 9: untransformierter RB11; Spur 10: 10 ng *KpnI*-restringiertes pMrL-IFNB. Für 5 der 6 mit pMrL-IFNB transformierten Stämme sind drei Signale bei 5,4, 8,1 und 10,8 kb klar erkennbar. Die DNA von Stamm No. 5 war degradiert und konnte nicht ausgewertet werden. Die Vektorkontrolle zeigte die erwarteten Fragmente von 5,4, 7,5 und 10,2 kb.

**B:** Das Modell gibt eine Zuordnung zu den Fragmenten, die nach Restriktion mit *KpnI* entstehen, wenn Plasmidsequenzen tandemförmig integriert vorliegen. Stromauf und stromabwärts der Integrationsstellen entstehen zwei Übergangsfragmente unterschiedlicher Größe (10,8 bzw. 5,4 kb). Beide Übergangsfragmente hybridisieren mit den Sonden (graue Ellipsen). Wird eine einzelne Plasmidsequenz in die rDNA integriert, so entstehen nach Restriktion mit *KpnI* nur die Übergangsfragmente (5,4 kb und 11 kb) und kein Plasmidfragment (8,2 kb).

In fünf von sechs getesteten Proben konnte die Integration von Plasmidsequenzen in die rDNA nachgewiesen werden. Die Stämme mit integrierten IFN- $\beta$ -Expressionsplasmiden zeigten Signale für alle drei erwarteten Fragmente. Für die Stämme No. 1, 2, 3 und 6 sind die Signalstärken für die kleinen Übergangsfragmente erheblich intensiver als die der Plasmidfragmente und großen Übergangsfragmente. In diesen Fällen sind Einzelintegrationen verglichen zu tandemförmig integrierten Plasmidsequenzen überrepräsentiert. Stamm No. 4 und die Vektorkontrolle zeigten ungefähr gleich starke Signale für das Plasmidfragment und das kleine Übergangsfragment. Unter Berücksichtigung der doppelten Hybridisierung der Sonden mit den Plasmidsequenzen, überwiegen auch in diesem Fall Einzelintegrationen zu tandemförmig integrierten Expressionsvektoren.

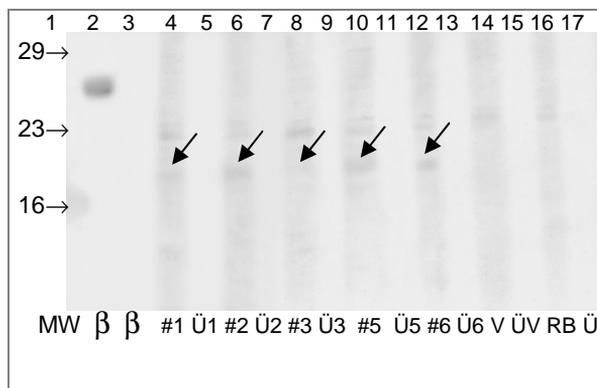
### 3.4.1.2 Bestimmung von IFN- $\beta$ produziert in *H. polymorpha*

Fünf der 6 in Kapitel 3.4.1.1 analysierten Stämme mit integrierten IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren wurden wie in Kapitel 3.3.1.2 beschrieben kultiviert und für die Western-Blot Analyse vorbereitet. Von den Überständen und Zellextrakten wurden je 50  $\mu$ l pro Stamm in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf das Gel (15%) aufgetragenen Mengen entsprachen 12 ml Überstand und einer Zellmenge entsprechend 10 OD<sub>600</sub>-Einheiten. Als Positivkontrolle diente

aus Medium präzipitiertes, rekombinantes IFN- $\beta$  (*E. coli*). Durch reversibles Färben mit Ponceau S wurden die Proteinmengen im Gel abgeschätzt und wenn nötig, soweit aneinander angeglichen bis die Protein-Konzentration im Gel für alle Proben vergleichbar war. Im Western-Blot (Abb. 38) wurde mit Antikörpern gegen humanes IFN- $\beta$  das Vorhandensein des Produktes in den Zellextrakten und Überständen überprüft. Bei der Kultivierung der Stämme zeigte sich erheblich verlängerte Verdopplungszeiten von bis zu 5 h verglichen mit der Vektorkontrolle, die sich mit RB11-typischen 1,5 h bei 37 °C verdoppelte.

Abbildung 38: IFN- $\beta$  Expression in *H. polymorpha*

In der abgebildeten Western-Blot Analyse sind Zellextrakte und präzipitierte Kulturüberstände von 5 rekombinanten Stämmen mit integrierten IFN- $\beta$ -Expressionsplasmiden untersucht worden. Die jeweiligen Zellextrakte und Kulturüberstände (Ü) wurden nebeneinander aufgetragen. Der Molekulargewichtsstandard in der ersten Spur ist nicht gezeigt und wird durch die Ziffern repräsentiert (in kDa); Spur 2/ 3: IFN- $\beta$  Standard; Spur 4-13: Stämme No. 1, 2, 3, 5 und No. 6; Spur 14/ 15: Vektorkontrolle (pMrL integriert in RB11); Spur 16/ 17: untransformierter RB11. Die Positivkontrolle zeigte für rekombinantes IFN- $\beta$  erwartete Signale bei 17 (unglykosyliertes Produkt) und 27 kDa (aggregierte Form).



In der Western-Blot Analyse waren für die Proben der fünf analysierten rekombinanten Stämme sehr schwache Signale erkennbar, die in den Kontrollen fehlten. Das Produkt befindet sich dabei ausschließlich innerhalb der Zellen und zeigt ein  $M_r$  von 20 kDa, welche geringfügig größer ist als die des unglykosylierten Standards aus *E. coli*. Das Ergebnis deutet auf eine intrazelluläre Retention des unvollständig glykosylierten Produkts bei einem sehr geringen Expressionslevel. Die Abwesenheit von IFN- $\beta$  in den Kulturüberständen und das langsame Wachstum der Kulturen bestätigen die oben erwähnten Komplikationen in der Expression von menschlichem IFN- $\beta$  in *H. polymorpha*.

### 3.4.1.3 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN- $\beta$ und *HpCNE1*<sub>c-myc</sub>

Die in Kapitel 3.3.1.3 beschriebene Kotransformation von *H. polymorpha* RB11 mit einer Mischung aus insgesamt vier verschiedenen Expressionsplasmiden (für IFN- $\gamma$  und drei weiteren Hilfsfaktoren) wurde auch für die Kombination von IFN- $\beta$  zusammen mit Genen für *HpCNE1*<sub>c-myc</sub>, *HpKAR2*<sub>c-myc</sub> und *HpPDI1*<sub>c-myc</sub> durchgeführt. Auch in diesem Fall kam es nicht zu einer Kointegration der gewünschten Kombinationen von Hilfsfaktoren mit dem IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren. Aus 48 Stämmen, die in einer Southern-Hybridisierung getestet wurden konnten 16 Stämme identifiziert werden, in denen kointegrierte Plasmidsequenzen nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Dabei handelte es sich aber in allen Fällen um Kombinationen zweier Hilfsfaktoren untereinander (5 Stämme *HpPDI1*<sub>c-myc</sub> kombiniert mit *HpKAR2*<sub>c-myc</sub>; 14 Stämme *HpPDI1*<sub>c-myc</sub> kombiniert mit *HpCNE1*<sub>c-myc</sub> und 4 Stämme *HpCNE1*<sub>c-myc</sub> kombiniert mit *HpKAR2*<sub>c-myc</sub>). Somit wurde auch in diesem Fall die Kotransformation auf IFN- $\beta$ -Plasmidsequenzen zusammen mit jeweils einem von drei Expressionsvektoren für Hilfsproteine beschränkt.

Zuerst wurde der IFN- $\beta$ -Expressionsvektor (pMrL-IFNB) zusammen mit dem Plasmid für *HpPDI1*<sub>c-myc</sub> (pMrL-PDI+) kotransformiert. Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Die eingesetzte Sonde erfasste folgende Plasmidsequenzen: pMrL-IFNB 3 kb und pMrL-CNE+ 4,6 kb. Es konnten 25 Proben der insgesamt 30 rekombinanten Stämme in einer Southern-Hybridisierung getestet werden.

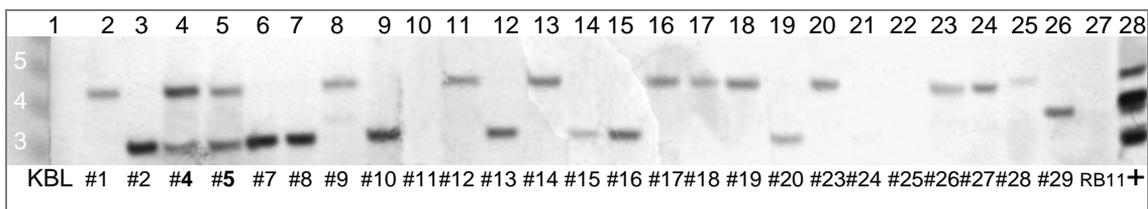


Abbildung 39: Kointegration von IFN- $\beta$ - und *HpCNE1*<sub>c-myc</sub>-Expressionsvektoren

Southern-Blot Analyse von 25 rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen. Spur 1: DNA-Größenstandard (KBL); Spur 2-26: Stämme No. 1 bis 29 (No. 3, 6, 21, und 22 fehlen); Spur 27: untransformierter *H. polymorpha* RB11; Spur 28: Je 10 ng *PvuII*-restringierte pMrL-CNE+ (*HpCNE1*<sub>c-myc</sub>) und pMrL-IFNB (IFN- $\beta$ , +). Die fett gedruckten Ziffern kennzeichnen Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen. Die DNA der Stämme No. 11, 24, 25 und 29 war degradiert und konnte nicht ausgewertet werden. Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf verschiedene Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

Unter den 21 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, fanden sich zwei Stämme (No. 4 und 5) mit kointegrierten *HpCNE1*<sub>c-myc</sub>- und IFN- $\beta$ -Plasmidsequenzen. Für Stamm No. 4 ist das Signal für integriertes *HpCNE1*<sub>c-myc</sub> intensiver wohingegen bei Stamm No. 5 die umgekehrte Situation vorliegt. 8 Stämme hatten IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren integriert und 11 Stämme zeigten Signale für integrierte Sequenzen für das *c-myc*-markierte *HpCNE1*. Eine genaue Kopienzahlbestimmung der Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen erfolgt in Kapitel 3.4.1.6. Bei den Einzelintegrationen werden IFN- $\beta$ - und *HpCNE1*<sub>c-myc</sub>-Expressionsvektoren ungefähr gleich häufig integriert. Die Rate an Doppelintegranten ist für diesen Fall mit 10% sehr gering und repräsentiert die bis dahin niedrigste erreichte Ausbeute an Kointegrationen in die rDNA, bei der Kotransformation von *H. polymorpha* mit äquimolaren Mengen zweier unterschiedlicher Plasmide.

#### 3.4.1.4 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN- $\beta$ und *HpKAR2*<sub>c-myc</sub>

Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Hybridisierung (Abb. 40) erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Dabei wurde der IFN- $\beta$ -Expressionsvektor (pMrL-IFNB) zusammen mit dem Plasmid pMrL-KAR+ (*HpKAR2*<sub>c-myc</sub>) kotransformiert. Die eingesetzte Sonde erfasste folgende Plasmidsequenzen: pMrL-IFNB 3 kb, pMrL-KAR+ 4,9 kb, und pMrL (Vektorkontrolle) 2,9 kb. Es konnten 24 Proben der insgesamt 30 rekombinanten Stämme in einer Southern-Hybridisierung analysiert werden.

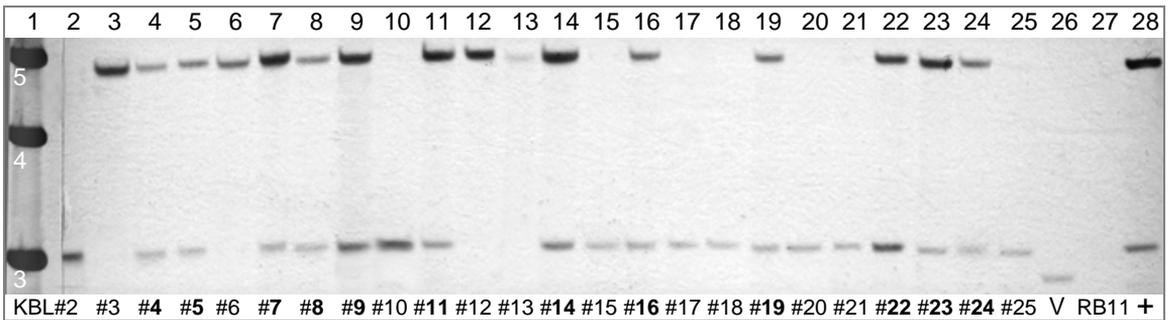


Abbildung 40: Kointegration von IFN- $\beta$ - und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren

Southern-Blot Analyse von 24 rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen. Spur 1: DNA-Größenstandard (KBL), Größenangabe [kb] in weißer Schrift. Spur 2-25: Stämme No. 2 bis 25 (No. 1 fehlt); Spur 26: Vektorkontrolle (RB11 transformiert mit pMrL); Spur 27: untransformierter *H. polymorpha* RB11; Spur 28 (+): Je 10 ng *PvuII*-restringierte pMrL-KAR+ (*HpKAR2<sub>c-myc</sub>*) und pMrL-IFNB (IFN- $\beta$ ). Die fett gedruckten Ziffern kennzeichnen Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen. Für Stamm No. 9 war eine signifikant höhere Menge an rDNA auf dem EtBr-gefärbten Gel erkennbar. Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf verschiedene Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

Unter den 24 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, fanden sich 12 Stämme (No. 4, 5, 7, 8, 9, 11, 14, 16, 19, 22, 23 und 24) mit kointegrierten *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*- und IFN- $\beta$ -Plasmidsequenzen. Für diese Stämme war in fast allen Fällen das Signal für integriertes *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* intensiver als das Signal für integriertes IFN- $\beta$ . Nur die Stämme No. 4 und 22 zeigten nahezu identische Signalintensitäten, was auf eine gleiche Kopienzahl schließen lässt. Die genaue Kopienzahlbestimmung einiger Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen erfolgt in Kapitel 3.4.1.6. Für die betrachtete Kombination von IFN- $\beta$  mit *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* konnten in 50% der getesteten Stämme die erwünschte Doppelintegration beider Expressionsvektoren in die rDNA von *H. polymorpha* erzielt werden. Dieses Beispiel repräsentiert die höchste in dieser Arbeit beobachtete Ausbeute an Kointegrationen in die rDNA bei Kotransformation unterschiedlicher integrativer Plasmide.

#### 3.4.1.5 Kointegration von Expressionsvektoren für IFN- $\beta$ und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*

Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Hybridisierung erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Dabei wurde der IFN- $\beta$ -Expressionsvektor (pMrL-IFNB) zusammen mit dem Plasmid für *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* (pMrL-PDI+) kotransformiert. Bei der Southern-Hybridisierung (Abb. 41) erfasste die eingesetzte Sonde folgende Plasmidsequenzen: pMrL-IFNB 3 kb, pMrL-PDI+ 2,7 kb. Es konnten 26 Proben der insgesamt 30 rekombinanten Stämme getestet werden.

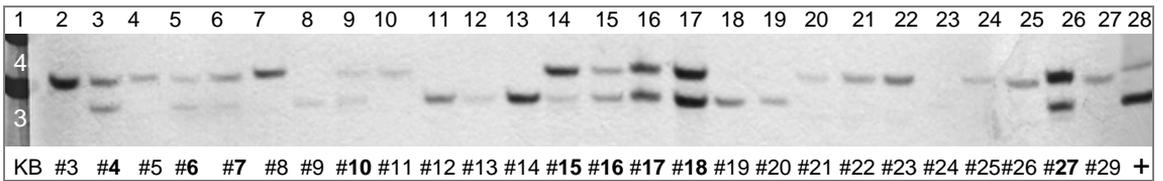


Abbildung 41: Kointegration von IFN- $\beta$ - und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren

Southern-Blot Analyse von 26 rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen. Spur 1: DNA-Größenstandard (KB), Größenangabe [kb] in weißer Schrift. Spur 2-27: Stämme No. 3 bis 29 (No. 1, 2 und 28 fehlen); Spur 28 (+): Je 10 ng *PvuII*-restringierte pMrL-PDI+ (*HpPDI1<sub>c-myc</sub>*) und pMrL-IFNB (IFN- $\beta$ ); Die fett gedruckten Ziffern kennzeichnen Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen. Für die Stämme No. 18 und 27 war eine signifikant höhere DNA-Menge auf dem EtBr-gefärbten Gel erkennbar. Die DNA von Stamm No. 24 war degradiert und konnte nicht ausgewertet werden. Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf verschiedene Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

Unter den 26 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, fanden sich 9 Stämme (No. 4, 6, 7, 10, 15, 16, 17, 18, und 27) mit kointegrierten *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*- und IFN- $\beta$ -Plasmidsequenzen. Die Stämme No. 4, 10, 16, 17 und 18 zeigten dabei vergleichbar intensive Signale für die beide kointegrierten Expressionsvektoren. Für die Stämme No. 6, 7, 15 und 27 war die Signalintensität für integrierte IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren stärker verglichen mit dem Signal für integrierte *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren. Eine genaue Kopienzahlbestimmung der Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen erfolgt in Kapitel 3.4.1.6. In der betrachteten Auswahl an Stämmen kam es in doppelt so vielen Fällen zu einer einmaligen Integration von IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren verglichen zu der Häufigkeit der singulären Integration von *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Plasmidsequenzen. Wie schon in Kapitel 3.4.1.5 beobachtet wurde kam es auch in diesem Fall zu einer sehr hohen Rate an Doppelintegrationen von über 35%.

### 3.4.1.6 Bestimmung der Kopienzahlen kointegrierter Plasmidsequenzen

Die Kopienzahlbestimmung erfolgte nach den gleichen Kriterien, die in Kapitel 3.3.1.8 beschrieben wurden. Abb. 42 gibt eine Übersicht der verschiedenen Hybridisations-Fragmente, die nach *Sna*BI-Restriktion entstehen, wenn *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*- und IFN- $\beta$ -Plasmidsequenzen tandemförmig in die Wirts-rDNA integriert vorliegen. Die Fragmente werden dem Southern-Blot in Abb. 43 zugeordnet.

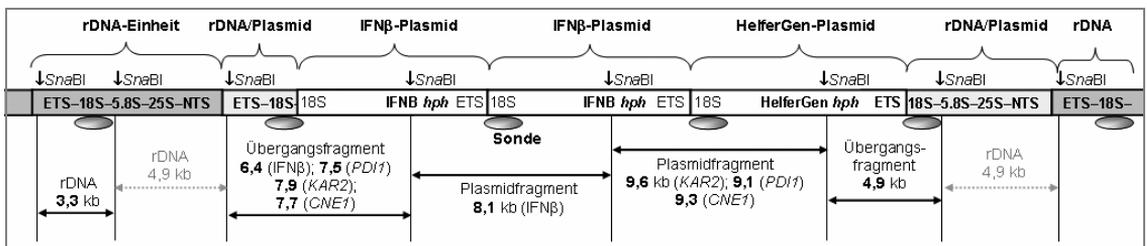


Abbildung 42: *Sna*BI Restriktions-Fragmente am Integrationsort der kointegrierten Expressionsvektoren

Schematische Darstellung der Fragmente, die nach *Sna*BI-Restriktion am rDNA-Locus entstehen und von der eingesetzten Sonde erfasst werden. Das Modell entspricht Abb. 31 mit dem Unterschied einer abweichenden Plasmid- und Übergangsfragmentlänge von 8,1 und 6,4 kb für die integrierten IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren.

Die DNA der in den Kapiteln 3.4.1.4 bis 3.4.1.5 identifizierten Stämme mit kointegrierten Vektorsequenzen wurde in einer weiteren Southern-Blot Analyse auf die Kopienzahlen integrierten Plasmidsequenzen untersucht (Abb. 43 A/ B). Die Probenbehandlung und Southern-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.8 beschrieben. Drei Stämme mit kointegrierten *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*- (K#4, K#9, und K#11), drei Stämmen mit kointegrierten *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*- (P#15, P#17 und P#27) und vier Stämme mit kointegrierten *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*- Sequenzen (C#4, C#5, C#11, und C#24) wurden analysiert

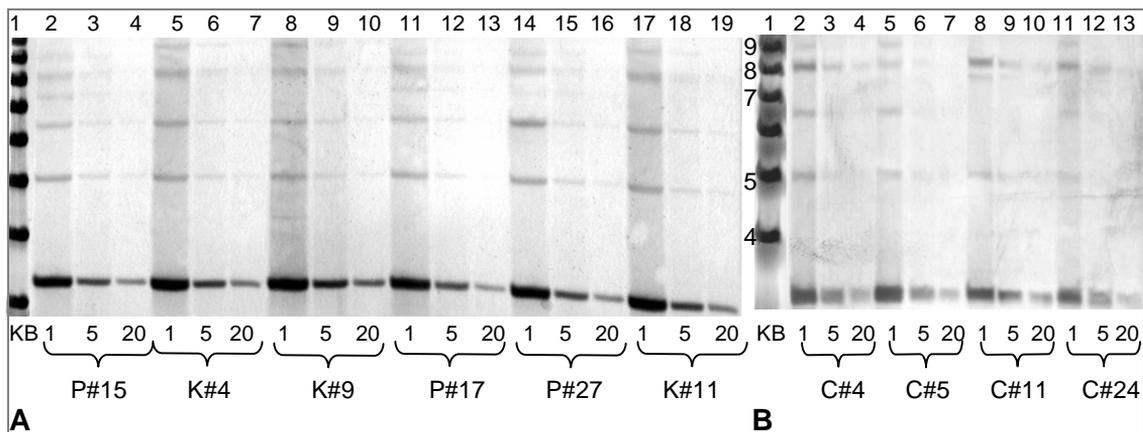


Abbildung 43: Kopienzahlbestimmung von kointegrierten Plasmidsequenzen

Southern-Blot Analyse von 10 rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen mit kointegrierten Sequenzen für IFN-β kombiniert mit drei der betrachteten Hilfsfaktoren. Die Sonde hybridisierte mit einem ca. 500 bp langen Abschnitt der 18S rDNA von *H. polymorpha*. Der DNA-Größenstandard (KB) wurde nach dem Transfer auf die Nylonmembran abgetrennt und mit einer spezifischen Sonde behandelt. Die Signalintensitäten für integrierte Plasmidsequenzen wurden in Relation zu der Wirts-rDNA Kopienzahl (Signal bei 3,3 kb) betrachtet. Jede Probe wurde unverdünnt (=50 Kopien), 1/5 verdünnt (=10 Kopien) und 1/20 verdünnt (= 2-3 Kopien) aufgetragen.

**A** Spur 1: KBL; Spur 2-4/ 11-16: Stämme mit kointegrierten IFN-β- und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren (P#15 bis P#27); Spur 5-10/ 17-19: Stämme mit kointegrierten IFN-β und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* (K#4, K#9 und K#11).

**B** Spur 1: KBL; Spur 2-13: Stämme mit kointegrierten IFN-β und *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* (C#4, C#5, C#11 und C#24).

Die Abschätzungen der Signalintensitäten und Zuordnung der Fragmente wurde, wie in Kapitel 3.3.1.8 beschrieben für die 10 betrachteten Stämme durchgeführt. Tab. 8 gibt eine Übersicht über die ermittelten Kopienzahlen und Anordnung der integrierten Plasmidsequenzen am rDNA-Locus der Wirtsstämme.

<b>C#4</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	S
IFN-β	4	4	2	4	<b>6</b>
CNE1	0	1	0	1	<b>1</b>

<b>C#11</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	S
IFN-β	0	6	0	6	<b>6</b>
CNE1	2	0	1	0	<b>1</b>

<b>K#4</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	S
IFN-β	2	1	1	1	<b>2</b>
KAR2	0	1	0	1	<b>1</b>

<b>K#11</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	S
IFN-β	4	2	2	2	<b>4</b>
KAR2	0	1	0	1	<b>1</b>

<b>P#17</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	S
IFN-β	4	2	2	2	<b>4</b>
PDI1	2	1	1	1	<b>2</b>

<b>C#5</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	S
IFN-β	2	1	1	1	<b>2</b>
CNE1	0	1	0	1	<b>1</b>

<b>C#24</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	S
IFN-β	2	1	1	1	<b>2</b>
CNE1	0	1	0	1	<b>1</b>

<b>K#9</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	S
IFN-β	2	1	1	1	<b>2</b>
KAR2	0	1	0	1	<b>1</b>

<b>P#15</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	S
IFN-β	4	1	2	1	<b>3</b>
PDI1	2	1	1	1	<b>2</b>

<b>P#27</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	S
IFN-β	6	1	3	1	<b>4</b>
PDI1	0	1	0	1	<b>1</b>

Tabelle 8: Kopienzahlbestimmung kointegrierter und Helfer- und IFN-β-Expressionsvektoren

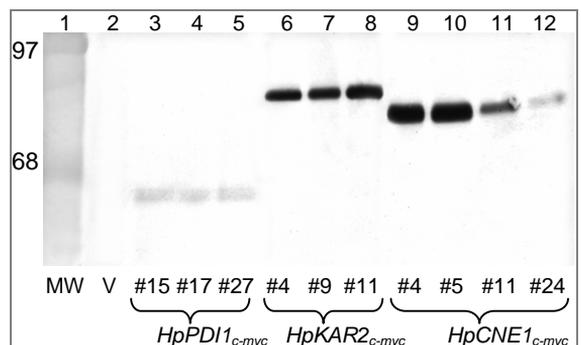
Die Tabelle vereinigt die Kopienzahlbestimmung (Abb. 43) und die Zuordnung der detektierten Fragmente (Methodik siehe Kapitel 3.3.1.8). Eine Einzelintegration liegt vor, wenn ein großes und kleines Übergangsfragment zusammen eine integrierte Plasmidsequenz ergeben (Spalte: Einzel). Tandemförmige Integrationen (Spalte: Tandem) ergaben sich aus der relativen Kopienzahlen der jeweiligen Plasmidfragmente. ÜF: Übergangsfragment; PF: Plasmidfragment. Die fettgedruckten Ziffern repräsentieren die Summe aller Kopien von Expressionsvektoren für Hilfsfaktoren und Pharmaproteine.

### 3.4.1.7 Expression von *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*, *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*

Die in Kapitel 3.4.1.6 charakterisierten Stämme wurden in 50 ml Schüttelkolben (YPD, 5% Glycerin) kultiviert um Zellmaterial und Kulturüberstände für weitere Untersuchungen zu gewinnen. Die Kultivierung, Probenverarbeitung und Western-Blot Analyse (Abb. 44) wurde wie in Kapitel 3.3.1.9 beschrieben mit *c-myc*-Antikörpern gegen die markierten Hilfsfaktoren durchgeführt. Wie schon in Kapitel 3.4.1.2 beschrieben, wuchsen alle Kulturen mit integrierten IFN-β-Expressionsvektoren mit einer verlängerten Verdopplungszeit von bis zu fünf Stunden bei 37 °C.

Abbildung 44: Nachweis markierter Hilfgene

Western-Blot Analyse von Zellextrakten rekombinanter Stämmen mit kointegrierten IFN-β- und *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*, *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* oder *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* Plasmidsequenzen. Spur 1: Molekulargewichtsstandard (MW) in kDa; Spur 2: Vektorkontrolle V (pMrL integriert in RB11); Spur 3-5: Stämme No. 15 bis 27 mit kointegrierten IFN-β und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*; Spur 6-8: Stämme No. 4 bis 11 mit kointegrierten IFN-β und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*; Spur 9-12: Stämme No. 4 bis 24 mit kointegrierten IFN-β und *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*;



Die Auswertung des Blots bestätigten die schon in Kapitel 3.3.1.9 gezogenen Schlussfolgerungen, betreffend der Expression der untersuchten Proteine: Die drei koexprimierten *c-myc*-markierten Proteine konnten in allen betrachteten Stämmen nachgewiesen werden, wobei das Auftreten von mehreren Signalen für *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* wiederholt auftrat.

### 3.4.1.8 IFN- $\beta$ Produktion bei koexprimierten *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*

Die in Kapitel 3.4.1.7 analysierten Proben wurden in einer weiteren Western-Blot Analyse auf IFN- $\beta$  im Zellextrakt und den Kulturüberständen untersucht. Die Kultivierung, Probenverarbeitung und Western-Blot Analyse wurde wie in Kapitel 3.4.1.2 beschrieben durchgeführt. Dabei beschränkte sich die Analyse auf die Stämme mit koexprimierten *HpCNE1<sub>c-myc</sub>* und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*.

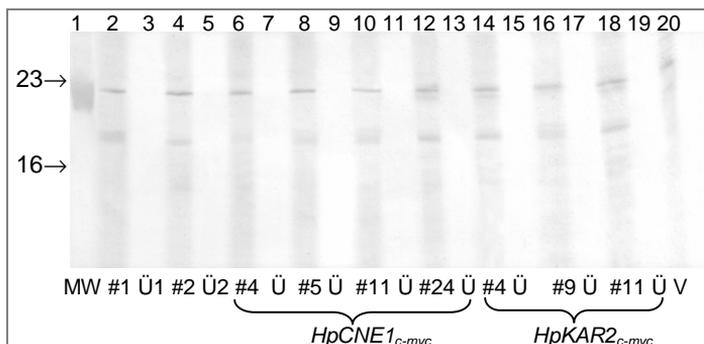


Abbildung 45: IFN- $\beta$  Expression von Stämmen bei parallel überproduzierten Hilfsfaktoren

Der Western-Blot wurde mit Antikörpern gegen menschliches IFN- $\beta$  behandelt. Zellextrakte und Überstände (Ü) wurden jeweilig nebeneinander aufgetragen. Spur 1: Molekulargewichtsstandard (MW) in kDa; Spur 2-5: Stämme No. 1 und 2 mit nachgewiesener IFN- $\beta$ -Expression (Kapitel: 3.4. 1.2); Spur 6-13 Stämme No. 4 bis 24 mit kointegrierten IFN- $\beta$ - und *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren; Spur 14-19: Stämme No. 4-11 mit kointegrierten IFN- $\beta$  und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*; Spur 20: Vektorkontrolle V (pMrL integriert in RB11).

Wie schon in Kapitel 3.4.1.2 gezeigt wurde, exprimierten alle Stämme ein Protein mit einer  $M_r$  von ca. 20 kDa. Dabei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um unvollständig glykosyliertes IFN- $\beta$ , welches im Zellinneren zurückgehalten wird. In den Kulturüberständen war kein Produkt nachweisbar. Die Koexpression beider betrachteter Hilfsproteine führte nicht zu einem veränderten Sekretionsverhalten der betrachteten Stämme.

## 3.4.2 Expression von IFN- $\beta$ in *A. adenivorans*

Aufgrund der oben diskutierten Probleme in der heterologen Expression von IFN- $\beta$  in *H. polymorpha* sollte die Möglichkeit der rekombinanten Produktion von menschlichen IFN- $\beta$  in *A. adenivorans* LS3 getestet werden.

### 3.4.2.1 Integration von Expressionsvektoren für IFN- $\beta$ in die rDNA von *A. adenivorans*

Wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben wurde konnte auch für IFN- $\beta$  die Bestätigung der rDNA-Integration mittels *PvuI*-Restriktion genomischer DNA von rekombinanten Stämmen geführt werden. *A. adenivorans* LS3 wurde mit *FbaI* linearisierten pMrL-IFNB (IFN- $\beta$ ) transformiert. Die stabilisierten Stämme wurden einer Southern-Blot Analyse (Abb. 46 A) unterzogen um die

Integration der IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren nachzuweisen. Die Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Hybridisierung wurde analog zu der in Kapitel 3.3.2.1 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt.

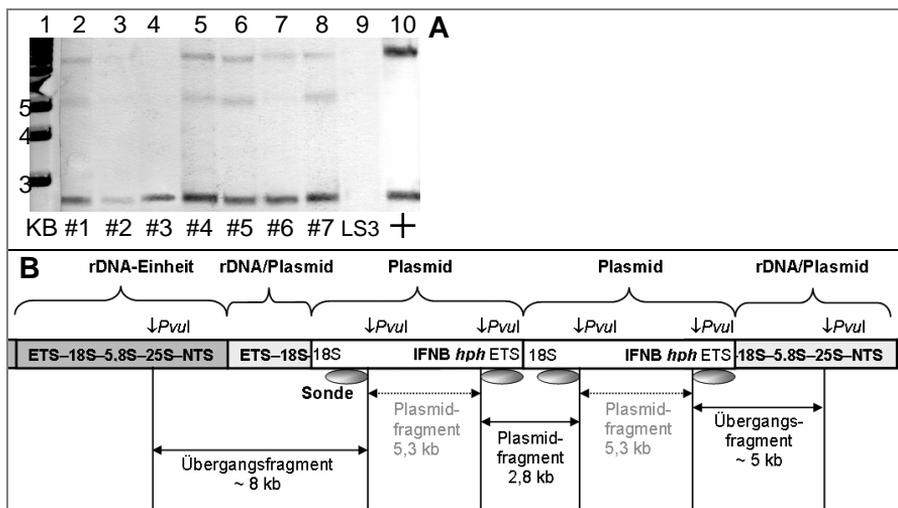


Abbildung 46: Southern-Blot/ Modell zur Integration von IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren in *A. adenivorans*

**A:** Southern-Blot von 6 rekombinanten *A. adenivorans* LS3-Stämmen. Der DNA-Größenstandard (KBL) wurde nach dem Transfer auf die Nylonmembran abgetrennt und mit einer spezifischen Sonde hybridisiert. Spur 1: DNA-Größenstandard (KB); Spur 2-8: Stämme No. 1 bis 7; Spur 9: untransformierten LS3; Spur 10: restringierte Plasmid-DNA als Positivkontrolle (*Apal*/*PvuI* = 8,2/ 2,8 kb). Für fünf der 7 betrachteten Stämme sind drei Signale bei 2,8, 5,2 und 8 kb erkennbar. Proben der Stämme No. 2 und No. 3 zeigten signifikant geringere DNA-Mengen auf dem EtBr-gefärbten Gel und konnten nur eingeschränkt ausgewertet werden.

**B:** Das Modell gibt eine Zuordnung zu den Fragmenten, die nach Restriktion mit *PvuI* entstehen, wenn Plasmidsequenzen tandemförmig in die rDNA integriert vorliegen. Stromauf und stromabwärts der Integrationsstellen entstehen zwei Übergangsfragmente unterschiedlicher Größe. Die eingesetzte Sonde (graue Ellipsen) hybridisiert mit beiden Übergangsfragmenten und dem kleinerem der beiden Plasmidfragmente. Wird eine einzelne Plasmidsequenz in die rDNA integriert, so entstehen nach Restriktion mit *PvuI* nur die Übergangsfragmente (~8 kb und ~5 kb) und ein Plasmidfragment von 5,3 kb, welches aber nicht von den Sonden detektiert wird. Die Sonden hybridisieren mit zwei Teilsequenzen des Plasmidfragments (2,8 kb). Daraus resultiert eine doppelte so hohe Signalintensität in Relation zu den Übergangsfragmenten. Aufgrund fehlender rDNA-Sequenzdaten für *A. adenivorans* kann die Größe der Übergangsfragmente nur abgeschätzt werden.

In fünf von 7 getesteten Fällen konnte die Integration von Plasmidsequenzen in die rDNA eindeutig nachgewiesen werden. Die in der Southern-Hybridisierung verwendeten Sonden hybridisierten mit zwei Abschnitten der Plasmidfragmente (Abb. 46 B), was in einer doppelt so starken Signalstärke, bei gleicher Fragment-Kopienzahl resultiert. Für die Stämmen No. 1, 4, 6 und 7 ist die Signalstärke für das Plasmidfragment erheblich intensiver als das der Übergangsfragmente. In diesen drei Fällen sind tandemförmig integrierten Plasmidsequenzen im Verhältnis zu Einzelintegrationen überrepräsentiert. Die Stämme No. 4 und No. 5 zeigten ungefähr zwei- bis dreifach intensivere Signale für das Plasmidfragment verglichen mit den beiden Übergangsfragmenten. Unter Berücksichtigung der doppelten Hybridisierung mit der Sonde ist das Verhältnis von Einzelintegrationen zu tandemförmigen Integrationen in diesen Fällen nahezu ausgeglichen.

### 3.4.2.2 Bestimmung von IFN- $\beta$ produziert in *A. adeninivorans*

Sechs der in Kapitel 3.4.2.1 beschriebenen *A. adeninivorans*-Stämme mit integrierten IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren sollten auf die Anwesenheit des Produktes in den Zellextrakten und Kulturüberstand untersucht werden. Um den Einfluss des Myzelstadiums auf die IFN- $\beta$ -Sekretion zu bestimmen, wurden Überstände aus Kulturen gewonnen, die bei 45 °C herangezogen worden waren. Die Kultivierung, Probenbereitung und Western-Blot Analyse (Abb. 47) erfolgte wie in Kapitel 3.3.2.2 für den IFN- $\gamma$ -Nachweis beschrieben wurde. Dabei zeigten die Kulturen erhöhte Verdopplungszeiten von bis zu 3 h verglichen mit der Vektorkontrolle mit 2 h (Wachstumskurven nicht gezeigt). Der Western-Blot wurde mit Antikörpern gegen menschliches IFN- $\beta$  entwickelt.

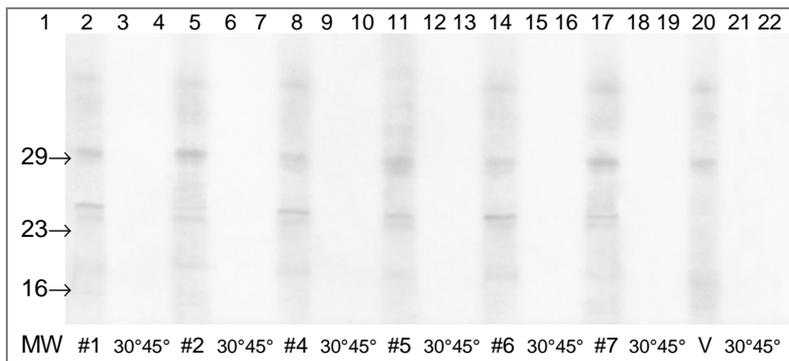


Abbildung 47: IFN- $\beta$ -Expression in *A. adeninivorans*

Der Western-Blot zeigt Zellextrakte und Mediumsüberstände von Stämmen mit IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren. Die Zellextrakte und Kulturüberstände (30°/ 45°= Überstände einer 30 °C- bzw. 45 °C-Kultur) sind nebeneinander aufgetragen. Der Molekulargewichtsstandard in der ersten Spur ist nicht gezeigt und wird durch die Ziffern repräsentiert (in kDa). Spur 2-19: Stämme No.1 bis 7 (No. 3 fehlt); Spur 20-22: Stamm mit integrierten pMrL (Vektorkontrolle V).

Alle sechs analysierten Stämme zeigten in der Western-Blot Analyse zwei schwache Signale in den Zellextrakten mit einer  $M_r$  von 20 und 25 kDa welche in der Kontrolle fehlten. In den Überständen sowohl der 30 °C-Kulturen als auch der 45 °C -Myzelkulturen konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Ob es sich bei den detektierten Produkten um aggregiertes, glykosyliertes oder degradiertes IFN- $\beta$  handelte wurde nicht weiter untersucht. Die schwache Expression und die intrazelluläre Lokalisation zeugen von ähnlichen Problemen in der IFN- $\beta$ -Produktion in *A. adeninivorans*, die schon in der *H. polymorpha*-Expressionsplattform gezeigt wurden.

### 3.4.3 Zusammenfassung der Resultate zur rekombinanten IFN- $\beta$ Produktion

Der Versuch, die bekannten Komplikationen in der Expression von menschlichen IFN- $\beta$  in *H. polymorpha* durch Überproduktion von Hilfsfaktoren zu umgehen, führte zu keinem Resultat. Keines der beiden überproduzierten *H. polymorpha*-Gene (*HpCNE1<sub>c-myc</sub>* und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*) führte zu einer Veränderung in der intrazellulären Zurückhaltung des Produkts. Unglykosyliertes IFN- $\beta$  hat eine  $M_r$  von 16 kDa wohingegen biologisch aktives, glykosyliertes IFN- $\beta$  eine  $M_r$  von 22 kDa aufweist [Otto, 1985; Runkel *et al*, 1998]. Das von rekombinanten *Hansenula polymorpha*-Stämmen exprimierte Produkt zeigte eine  $M_r$  von ca. 20, was für eine partielle

Glykosylierung spricht. Ebenso ist aber auch eine Akkumulation von degradierten Aggregaten denkbar.

Die untersuchten *A. adenivorans*-Stämme mit integrierten IFN- $\beta$ -Expressionsvektoren exprimierten Produkte mit einer  $M_r$  von ca. 20 und 25 kDa. Auch hier befanden sich die Produkte ausschließlich in den Zellextrakten. Die bei 45 °C kultivierte Myzelform zeigte das gleiche Expressionsverhalten, in den Kulturüberständen konnte kein Produkt nachgewiesen werden. In beiden Hefen führte die Expression von menschlichen IFN- $\beta$  zu einer erheblichen Verlangsamung des Kulturwachstums.

### 3.5 Produktion von Lactoferrin in *H. polymorpha* und *A. adenivorans*

#### 3.5.1 Expression von Lactoferrin in *H. polymorpha*

Die rekombinante Produktion von menschlichen Lactoferrin in *H. polymorpha* ist äußerst problematisch. Das 78 kDa große Glykoprotein wird zwar exprimiert, verbleibt aber in inneren Strukturen der Zellen, zum größten Teil in der unlöslichen Fraktion [A. Degelmann, persönliche Mitteilung]. Dabei wurde die MF- $\alpha$ 1-SS aminoterminal an Lactoferrin fusioniert um das Protein in den sekretorischen Weg zu dirigieren. Sekretion des reifen Proteins wurde weder für *H. polymorpha* noch für *P. stipitis* beobachtet [T. Weierstall, persönliche Mitteilung]. Um diese Limitierungen aufzuheben wurden rekombinante *H. polymorpha*-Stämme generiert, die neben den Lactoferrin Expressionsvektoren Plasmidsequenzen für je eines der ausgewählten Hilfsfaktoren in die rDNA integriert trugen.

##### 3.5.1.1 Kointegration von Expressionsvektoren für Lactoferrin und *HpcNE1<sub>c-myc</sub>*

*H. polymorpha* RB11 wurde mit Lactoferrin- und *HpcNE1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren kotransformiert. Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Die eingesetzte Sonde hybridisierte mit folgende Plasmidsequenzen: pMrL-Lf (Lactoferrin) 4,2 kb und pMrL-CNE+ (*HpcNE1<sub>c-myc</sub>*) 4,6 kb. Es konnte 24 Proben der insgesamt 30 rekombinanten Stämme in einer Southern-Hybridisierung analysiert werden.

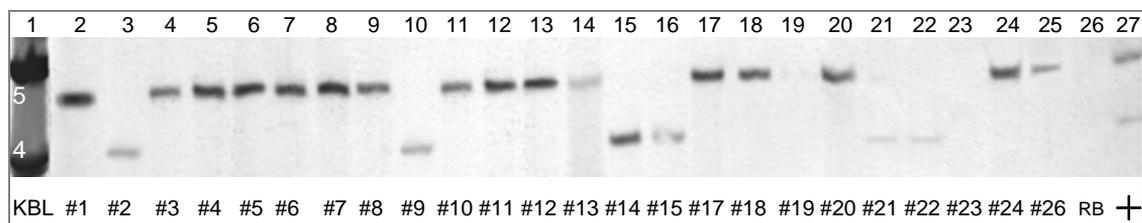


Abbildung 48: Kointegration von Lactoferrin- und *HpcNE1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren

Southern-Blot Analyse von 24 rekombinanten *H. polymorpha* Stämmen. Spur 1: DNA-Größenstandard (KBL) in weißen Ziffern [kb]; Spur 2-25: Stämme No. 1 bis 26 (No.16 und 25 fehlen); Spur 26: untransformierter RB11; Spur 27: Je 10 ng *PvuII*-restringierte pMrL-CNE+ (*HpcNE1<sub>c-myc</sub>*) und pMrL-Lf (Lactoferrin). Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf verschiedene Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

Unter den 22 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, fand sich kein Stamm mit kointegrierten *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*- und Lactoferrin-Plasmidsequenzen. Auch bei der Untersuchung weiterer 18 rekombinanter Stämme mit der oben beschriebenen Kombination an integrierten Plasmiden (Daten nicht gezeigt), fanden sich keine Stämme mit kointegrierten Sequenzen.

### 3.5.1.2 Kointegration von Expressionsvektoren für Lactoferrin und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*

Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Blot Analyse (Abb. 49) erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Dabei wurde der Lactoferrin-Expressionsvektor (pMrL-Lf) zusammen mit dem Plasmid pMrL-KAR+ (*HpKAR2<sub>c-myc</sub>*) kotransformiert. Die eingesetzte Sonde erfasste folgende Plasmidsequenzen: pMrL-Lf **4,2 kb**, pMrL-KAR+ **4,9 kb** und pMrL (Vektorkontrolle) **2,9 kb**. Es konnten 24 Proben der insgesamt 30 rekombinanten Stämme in einer Southern-Hybridisierung getestet werden.

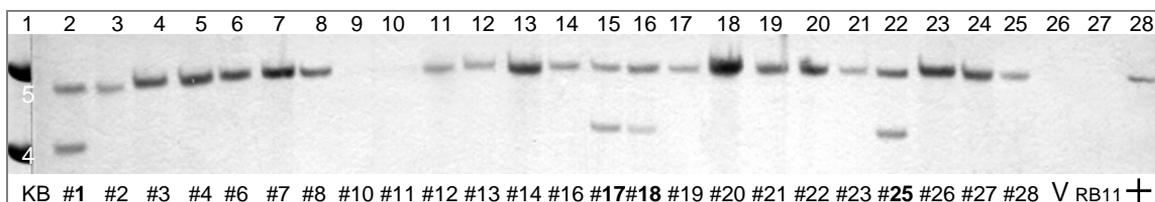


Abbildung 49: Kointegration von Lactoferrin- und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren

Southern-Blot Analyse von 24 der rekombinanten *H. polymorpha* Stämmen. Spur 1: DNA-Größenstandard (KB), in weißen Ziffern [kb]. Spur 2-25: Stämme No. 1 bis 28 (No. 5, 9, 15 und 24 fehlen); Spur 26: Vektorkontrolle (RB11 transformiert mit pMrL); Spur 27: untransformierter RB11; Spur 28: Je 10 ng *PvuII*-restringierte pMrL-KAR+ (*HpKAR2<sub>c-myc</sub>*) und pMrL-Lf (Lactoferrin). Die fett gedruckten Ziffern kennzeichnen Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen. Die DNA der Stämme 10 und 11 war degradiert und konnte nicht ausgewertet werden. Für Stamm No. 20 war eine signifikant höhere Menge an chromosomaler DNA auf dem EtBr-gefärbten Gel erkennbar. Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf verschiedene Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

Unter den 22 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, fanden sich vier Stämme (No. 1, 17, 18 und 25) mit kointegrierten *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*- und Lactoferrin-Plasmidsequenzen. Stamm No. 1 und 17 zeigten Signale vergleichbarer Intensität für beide integrierten Expressionsvektoren, was auf eine vergleichbare Kopienzahl schließen lässt. Die Stämme No. 18 und 25 zeigten leicht höhere Signalintensitäten für die integrierte *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Plasmidsequenzen. Eine genaue Kopienzahlbestimmung der Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen erfolgt in Kapitel 3.5.1.5. Die Integration der Lactoferrin-Expressionsvektoren konnte nur in Kombination mit integrierten endogenen *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Plasmidsequenzen beobachtet werden. Das Fehlen von Stämmen mit einzeln integrierten Lactoferrin-Expressionsvektoren in der betrachteten Auswahl kennzeichnet eine Besonderheit bei der bis dahin betrachteten Kotransformation. Die Bevorzugung der Kointegration von *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*- zusammen mit Lactoferrin-Plasmidsequenzen gibt einen Hinweis auf einen Selektionsvorteil dieser Stämme gegenüber Stämmen mit einzeln integrierten Lactoferrin-Expressionsvektoren.

### 3.5.1.3 Kointegration von Expressionsvektoren für Lactoferrin und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*

Lactoferrin-Expressionsvektoren (pMrL-Lf) wurden zusammen mit pMrL-PDI+ (*HpPDI1<sub>c-myc</sub>*) kotransformiert. Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Die eingesetzte Sonde hybridisierte mit folgende Plasmid-sequenzen: pMrL-Lf **4,2 kb**, pMrL-PDI+ **2,7 kb** und pMrL (Vektorkontrolle) **2,9 kb**. Es konnten 24 Proben der insgesamt 30 rekombinanten Stämme in einer Southern-Hybridisierung getestet werden.

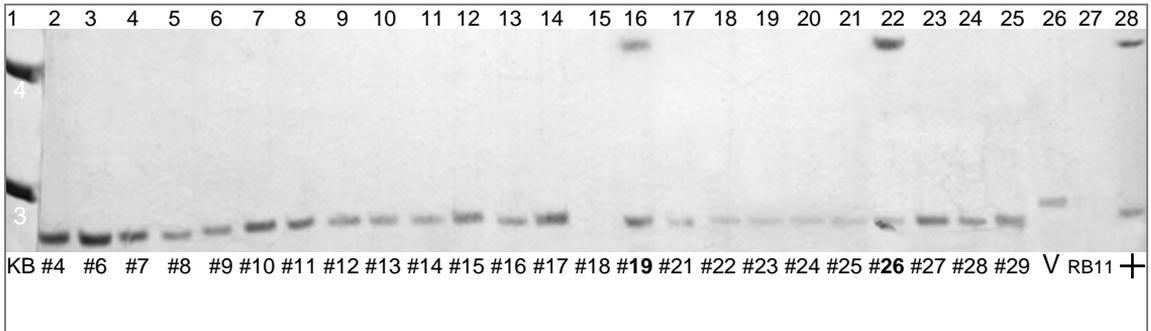


Abbildung 50: Kointegration von Lactoferrin und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren

Southern-Blot Analyse von 24 rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen. Spur 1: DNA-Größenstandard (KBL), in weißen Ziffern [kb]. Spur 2-25: Stämme No. 4 bis 29 (No. 5 und 20 fehlen); Spur 26: Vektorkontrolle (RB11 transformiert mit pMrL); Spur 27: untransformierter *H. polymorpha* RB11; Spur 28: Je 10 ng *PvuII*-restringierte pMrL-PDI+ (*HpPDI1<sub>c-myc</sub>*) und pMrL-Lf (Lactoferrin). Die DNA von Stamm No. 18 war degradiert und konnte nicht ausgewertet werden. Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf unterschiedliche Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

Unter den 23 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, fanden sich zwei Stämme (No. 19 und 20) mit kointegrierten *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*- und Lactoferrin-Plasmidsequenzen. Der Stamm No. 19 zeigte dabei vergleichbar intensive Signale für die beiden kointegrierten Expressionsvektoren. Für No. 26, war die Signalintensität für integrierte Lactoferrin-Expressionsvektoren stärker verglichen mit dem Signal für *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Plasmidsequenzen. Eine genaue Kopienzahlbestimmung der Stämme mit kointegrierten Vektorsequenzen erfolgt in Kapitel 3.5.1.5. Auffällig ist, wie schon im vorangegangenen Kapitel beobachtet, das Fehlen von Stämmen mit einzeln integrierten Lactoferrin-Expressionsvektoren. Auch dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die exklusive Integration von Lactoferrin-Plasmidsequenzen ohne kointegriertes Helfergen einen Selektionsnachteil für die betroffenen Stämme darstellt.

### 3.5.1.4 Kointegration von Expressionsvektoren für Lactoferrin und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*

Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Blot Analyse (Abb. 51) erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Dabei wurde der Lactoferrin-Expressionsvektor (pMrL-Lf) zusammen mit dem Plasmid pMrL-SSO+ (*HpSSO2<sub>c-myc</sub>*) kotransformiert. Die eingesetzte Sonde erfasste folgende Plasmidsequenzen: pMrL-Lf **4,2 kb**, pMrL-SSO+ **3,3 kb**, und pMrL (Vektorkontrolle) **2,9 kb**. Es konnten 24 Proben der insgesamt 30 rekombinanten Stämme in einer Southern-Hybridisierung getestet werden.

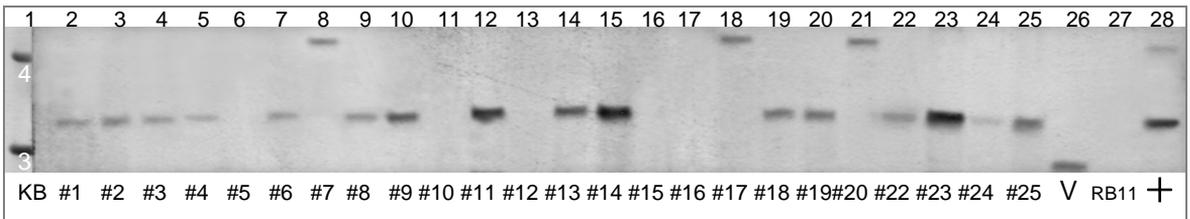


Abbildung 51: Kointegration von Lactoferrin- und *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren

Southern-Blot Analyse von 24 rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen. Spur 1: DNA-Größenstandard (KB) in weißen Ziffern [kb]; Spur 2-25: Stämme No. 1 bis 25 (No. 21 fehlt); Spur 26: Vektorkontrolle V (RB11 transformiert mit pMrL); Spur 27: untransformierter RB11; Spur 28: Je 10 ng PvuII-restringierte pMrL-SSO+ (*HpSSO2<sub>c-myc</sub>*) und pMrL-Lf (Lactoferrin). Die fett gedruckten Ziffern kennzeichnen Stämme mit kointegrierten Plasmidsequenzen. Die variierende Signalintensität zwischen den analysierten Proben gibt einen Hinweis auf verschiedene Kopienzahlen der integrierten Plasmidsequenzen.

Unter den 19 rekombinanten Stämmen, die in der Southern-Blot Analyse ausgewertet werden konnten, fand sich kein Stamm mit kointegrierten pMrL-SSO+ (*HpSSO2<sub>c-myc</sub>*) und Lactoferrin- (pMrL-Lf) Plasmidsequenzen. Wie schon bei der Kombination von kointegrierten Lactoferrin- und *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren festgestellt wurde, kommt es zur exklusiven Integration einer der beiden gleichzeitig eingebrachten Vektoren in die Wirts-rDNA. Dabei kam es in der überwiegenden Anzahl von rekombinanten Stämmen zu einer Integration von Plasmidsequenzen für endogenes *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*.

### 3.5.1.5 Bestimmung der Kopienzahl kointegrierten Plasmidsequenzen

Die Kopienzahlbestimmung erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.8 beschrieben. Abb. 52 gibt eine Übersicht der verschiedenen Hybridisations-Fragmente, die nach *Sna*BI-Restriktion entstehen und der Southern-Blot Analyse in Abb. 53 zugeordnet werden können.

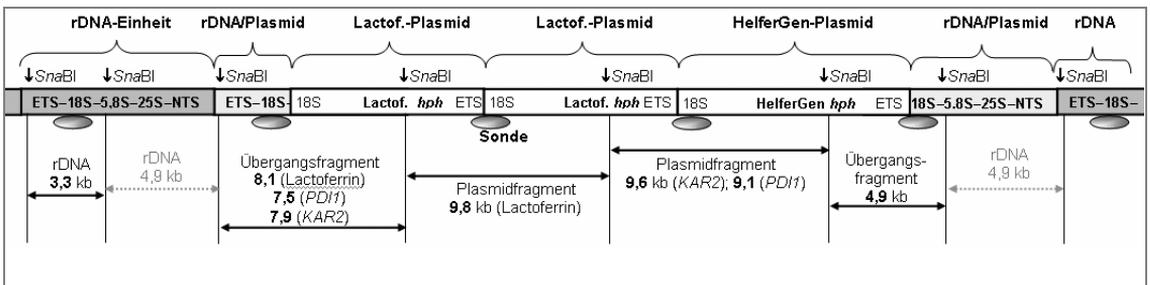


Abbildung 52: *Sna*BI Restriktions-Fragmente am Integrationsort der kointegrierten Expressionsvektoren

Schematische Darstellung der Fragmente, die nach *Sna*BI-Restriktion am rDNA-Locus entstehen und von der eingesetzten Sonde erfasst werden. Das Modell entspricht dem der Abb. 31 mit dem Unterschied einer abweichenden Plasmid- und Übergangsfragmentlänge von 8,1 bzw. 9,8 kb für die integrierten Lactoferrin-Expressionsvektoren.

Chromosomale DNA der in den Kapiteln 3.5.1.2 und 3.5.1.3 identifizierten Stämme mit kointegrierten Vektorsequenzen wurde in einer weiteren Southern-Hybridisierung untersucht. Dabei wurde die Kopienzahl der in die rDNA eingebrachten Plasmidsequenzen determiniert (Abb. 53). Die Probenbehandlung und Southern-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.8 beschrieben. Vier Stämme mit kointegrierten Lactoferrin- und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Sequenzen (K#1, K#17, K#18 und K#25) und zwei Stämme mit kointegrierten Lactoferrin und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* (P#19 und P#26) wurden analysiert.

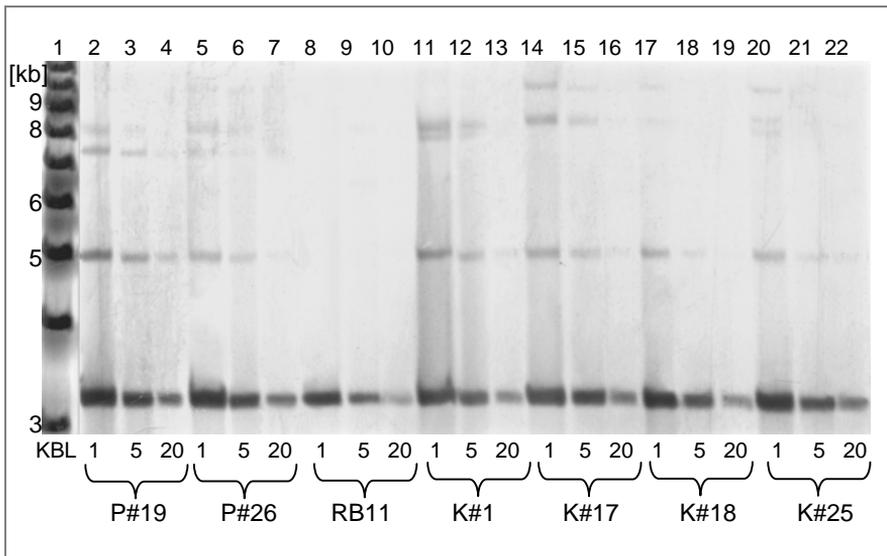


Abbildung 53 Southern-Blot Analyse zur Kopienzahlbestimmung von kointegrierten Plasmidsequenzen

Southern-Blot Analyse von 6 rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen mit kointegrierten Sequenzen für Lactoferrin kombiniert mit zwei der betrachteten Hilfsfaktoren. Die eingesetzte Sonde hybridisierte mit einem ~500 bp langen Abschnitt der 18S rDNA von *H. polymorpha*. Die Signalintensitäten für integrierte Plasmidsequenzen wurden mit den Intensitäten der Signale des endogenen rDNA-Standards (3,3 kb) verglichen. Jede Probe wurde unverdünnt, 1/5 verdünnt und 1/20 verdünnt nebeneinander aufgetragen. Spur 1: KBL; Spur 2-7: Stämme mit kointegrierten Lactoferrin- und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Vektoren (P#19 und P#26); Spur 8-10: untransformierter RB11; Spur 11-22: Stämme mit kointegrierten Lactoferrin- und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren (K#1, K#17, K#18 und K#25).

Die Abschätzungen der Signalintensitäten und Fragment-Zuordnung wurde wie in Kapitel 3.3.1.8 beschrieben für die 6 betrachteten Stämme durchgeführt. Auch in diesem Fall war die Kopienzahl der rDNA-Einheiten des untransformierten *H. polymorpha* Stammes (RB11) vergleichbar mit den der analysierten rekombinanten Stämme. Tab. 12 gibt eine Übersicht über die ermittelten Kopienzahlen und Anordnung der integrierten Plasmidsequenzen am rDNA-Locus der Wirtsstämme.

<b>K#1</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
Lactof.	2	0	1	0	<b>1</b>
KAR2	2	0	1	0	<b>1</b>

<b>K#18</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
Lactof.	2	0	1	0	<b>1</b>
KAR2	0	1	0	1	<b>1</b>

<b>P#19</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
Lactof.	4	0	2	0	<b>2</b>
PDI1	4	0	2	0	<b>2</b>

<b>K#17</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
Lactof.	4	0	2	0	<b>2</b>
KAR2	0	1	0	1	<b>1</b>

<b>K#25</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
Lactof.	2	0	1	0	<b>1</b>
KAR2	2	1	1	1	<b>2</b>

<b>P#26</b>	ÜF	PF	Einzel	Tandem	<b>S</b>
Lactof.	2	0	1	0	<b>1</b>
PDI1	2	0	1	0	<b>1</b>

Tabelle 9: Kopienzahlbestimmung kointegrierter Lactoferrin- und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*- bzw. *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*-Vektoren  
 Die Tabelle vereint die Kopienzahlbestimmung (Abb. 53) und die Zuordnung der detektierten Fragmente (Methodik siehe Kapitel 3.3.1.8). Eine Einzelintegration liegt vor, wenn ein großes und kleines Übergangsfragment zusammen eine integrierte Plasmidsequenz ergeben (Spalte: Einzel). Tandemförmige Integrationen (Spalte: Tandem) ergaben sich aus der relativen Kopienzahlen der jeweiligen Plasmidfragmente. PF: Plasmidfragment; ÜF: Übergangsfragment. Die fettgedruckten Ziffern repräsentieren die Summe aller Kopien von Expressionsvektoren.

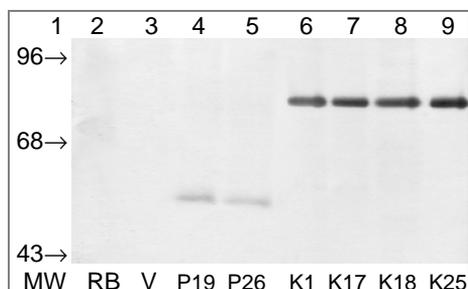
Auffällig sind die in allen Fällen geringe Kopienzahl und die überwiegende Anordnung in Einzelintegrationen. Zusammengenommen bestätigen beide oben gezeigten Kopienzahlbestimmungen den Gendosis-abhängigen wachstumshemmenden Einfluss von Lactoferrin auf die Wirtshefen. Somit wird durch das Genprodukt gegen hohen Kopienzahlen an integrierten Plasmidsequenzen (für Lactoferrin) selektioniert.

### 3.5.1.6 Expression von *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*, und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*

Die in Kapitel 3.5.1.5 charakterisierten Stämme wurden in 50 ml Schüttelkolben kultiviert um Zellmaterial und Kulturüberstände für weitere Untersuchungen zu gewinnen. Die Kultivierung, Probenverarbeitung und Western-Blot Analyse (Abb. 54) wurde wie in Kapitel 3.3.1.9 beschrieben durchgeführt. Alle Kulturen mit integrierten Lactoferrin-Expressionsvektoren zeigten leicht verlängerte Verdopplungszeiten von zwei bis drei Stunden bei 37 °C (Vektorkontrolle: 1,5 h).

Abbildung 54 Nachweis von *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*

Der Western-Blot wurde mit Antikörpern gegen das *c-myc*-Epitop der markierten Hilfsproteine behandelt. Spur 1: Der Molekulargewichts-standard in der ersten Spur ist nicht gezeigt und wird durch die Ziffern repräsentiert (in kDa); Spur 2: untransformierter RB11 (RB); Spur 3: Vektorkontrolle V (pMrL integriert in RB11); Spur 4/ 5: Stämme No. 19 und 26 mit kointegrierten Lactoferrin und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*; Spur 6-9: Stämme No. 1 bis 25 mit kointegrierten Lactoferrin und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*.



Auch in der gezeigten Kombination mit Lactoferrin-Expressionsvektoren konnten die Expression beider koexprimierter Hilfsfaktoren nachgewiesen werden. Die beobachteten Mehrfach-Signale für *c-myc*-markiertes Pdi1p aus *H. polymorpha* (Kapitel 3.3.1.9 und 3.4.1.7) konnte in dieser Western-Blot Analyse nicht bestätigt werden. Es wurde ein Signal bei einer  $M_r$  von ca. 60 kDa detektiert.

### 3.5.1.7 Lactoferrin Produktion bei koexprimierten *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*, und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*

Die in Kapitel 3.5.1.5 charakterisierten Stämme wurden in einer weiteren Western-Blot Analyse (Abb. 55) auf Lactoferrin im Zellextrakt und den Kulturüberständen untersucht. Die Kultivierung, Probenverarbeitung und Western-Blot Analyse wurde wie in Kapitel 3.3.1.10 beschrieben durchgeführt. Dabei beschränkte sich die Analyse auf die Stämme mit koexprimierten *HpPDI1<sub>c-myc</sub>* und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>* und der Western-Blot wurde mit Antikörpern gegen menschliches Lactoferrin behandelt. Als Positivkontrollen dienten 100 bzw. 10 ng menschliches Lactoferrin, welches denaturiert in der SDS-PAGE mit aufgetrennt wurde.

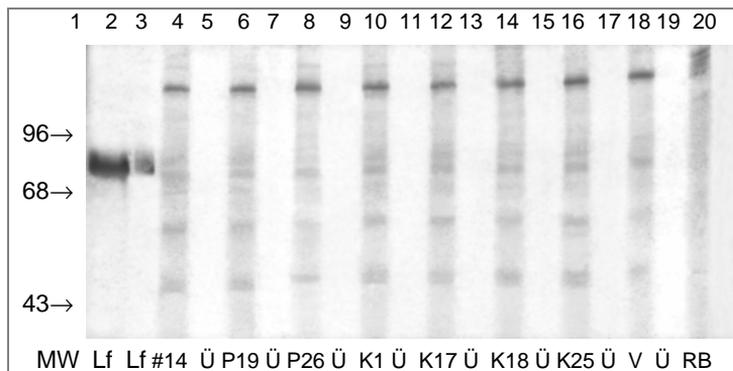


Abbildung 55: Lactoferrin-Expression in Stämmen mit parallel überexprimierten Hilfsfaktoren

Western-Blot Analyse zur Bestimmung von Lactoferrin in Zellextrakten und Überstände (Ü) von rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen. Spur 1: Der Molekulargewichtsstandard in der ersten Spur ist nicht gezeigt und wird durch die Ziffern repräsentiert (in kDa); Spur 2/3: Lactoferrin Standard Lf (100/ 10 ng); Spur 4/ 5: Stamm No. 14 mit integrierten Lactoferrin-Expressionsvektoren (Kapitel 3.5.1.1); Spur 6-9 Stämme No. 19 und 26 mit kointegrierten Lactoferrin und *HpPDI1<sub>c-myc</sub>*; Spur 10-17: Stämme No. 1 bis 25 mit kointegrierten Lactoferrin und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*; Spur 18/ 19: Vektorkontrolle V (pMrL integriert in RB11); Spur 20: untransformierter RB11 (RB).

Keiner der untersuchten Stämme exprimierte das in die rDNA integrierte menschliche Lactoferrin. Weder in den Kulturüberständen noch in den Stämmen mit koexprimierten Hilfsproteinen konnte das Produkt nachgewiesen werden. Die Positivkontrollen zeigten ein Signal bei der für menschliches Lactoferrin erwarteten  $M_r$  von 78 kDa.

### 3.5.2 Expression von Lactoferrin in *A. adenivorans*

Die Expression von menschlichen Lactoferrin in *A. adenivorans* wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig getestet. Insbesondere die erhöhte Sekretion der Myzelform dieser dimorphen Hefe sollte in der vorliegenden Arbeit genutzt werden um Lactoferrin-Sekretion in rekombinanten *A. adenivorans*-Stämmen zu evaluieren.

#### 3.5.2.1 Integration eines Lactoferrin-Vektors in die rDNA von *A. adenivorans*

Der in Kapitel 3.3.2.1 für IFN- $\gamma$  beschriebene Integrationsnachweis mittels *PvuI*-Restriktion konnte nicht auf *A. adenivorans*-Stämme mit integrierten pMrL (Lactoferrin) angewendet werden. Als Alternative wurde chromosomale DNA von rekombinanten *A. adenivorans*-Stämmen mit *NotI* restringiert und das resultierenden Fragmentmuster analysiert (Abb. 56). Ein Rückschluss auf die ungefähre Position der Restriktionsschnittstellen in der rDNA von *A. adenivorans* ermöglichte auch in diesem Fall den eindeutigen Nachweis der rDNA-Integration. *A. adenivorans* LS3 wurde mit *FbaI*-linearisierten pMrL-Lf (Lactoferrin) und pMrL (Vektorkontrolle) transformiert. Die Stamm-Generierung, Probenvorbereitung, Restriktion und Southern-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben.

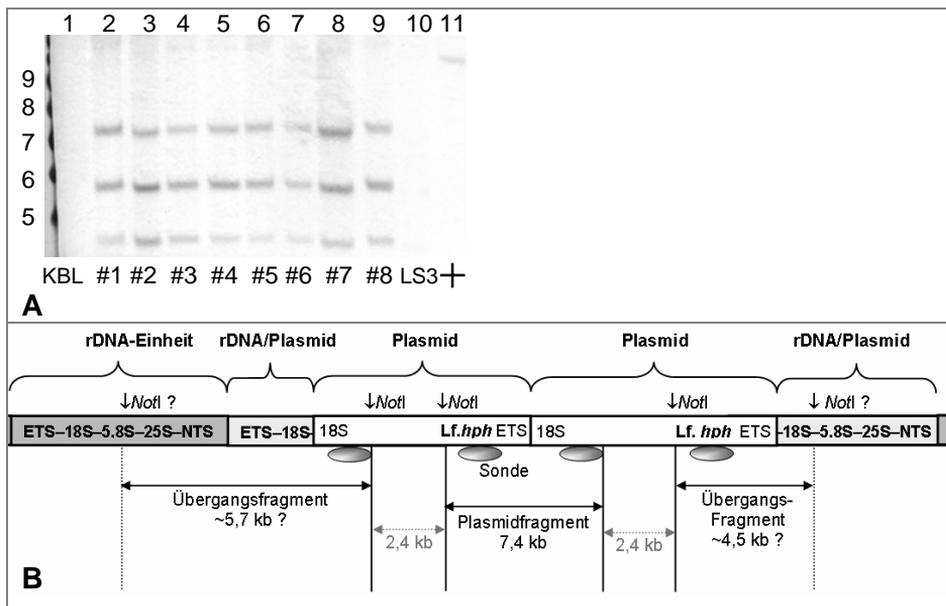


Abbildung 56: Southern-Blot und Modell zu Integration von Lactoferrin-Vektoren in *A. adenivorans*

**A:** Southern-Blot Analyse von 8 rekombinanten Stämmen mit integrierten pMrL-Lf (Lactoferrin). Der DNA-Größenstandard (KBL) wurde nach dem Transfer auf die Nylonmembran abgetrennt und mit einer spezifischen Sonde hybridisiert. Spur 1: KBL; Spur 2-9: Stämme No. 1 bis 8; Spur 10: untransformierter LS3; Spur 11: 10 ng linearisierte Plasmid-DNA (*Apal*-Restriktion von pMrL = 9,8 kb). Für alle acht betrachteten Stämme sind drei Signale bei 4,5, 5,7 und 7,4 kb erkennbar die alle eine vergleichbare Intensität aufwiesen. Das EtBr-gefärbte Gel zeigte vergleichbare DNA-Mengen für alle Proben.

**B:** Das Modell gibt eine Zuordnung zu den Fragmenten, die nach Restriktion mit *NotI* entstehen, falls Plasmidsequenzen tandemförmig in die rDNA integriert vorliegen. Stromauf und stromabwärts der Integrationsstellen entstehen zwei Übergangsfragmente unterschiedlicher Länge. Die eingesetzten Sonden (graue Ellipsen) hybridisiert mit beiden Übergangsfragmenten und dem großen Plasmidfragment. Wird eine einzelne Plasmidsequenz in die rDNA integriert, so entstehen nach Restriktion mit *PvuI* nur die Übergangsfragmente (~5,7 kb und ~4,5 kb) und ein Plasmidfragment von 2,4 kb, welches aber nicht von der Sonde detektiert wird. Die Sonde erfasst zwei Sequenzabschnitte des Plasmidfragments was die Signalintensität in Relation zu den Übergangsfragmenten verdoppelt. Die Position der Schnittstellen und die Größe der Übergangsfragmente kann nur abgeschätzt werden, da keine vollständigen Sequenzdaten der *A. adenivorans* rDNA-Einheit vorliegen.

Alle 8 getesteten Stämme zeigten vergleichbare Signalintensitäten jedes der betrachteten Fragmente. Die Sonde erfasst zwei Sequenzabschnitte des Plasmidfragments was die Signalintensität verglichen mit den Übergangsfragmenten verdoppelt. Demnach liegen bei vergleichbaren Signalstärken halb so viele Plasmidfragmente wie Übergangsfragmente vor. Einzelintegrationen der Lactoferrin-Expressionsvektoren überwiegen demnach der Anzahl von tandemförmig integrierten Plasmidsequenzen.

### 3.5.2.2 Bestimmung von Lactoferrin produziert in *A. adenivorans*

Sechs der 8 in Kapitel 3.5.2.1 beschriebenen *A. adenivorans*-Stämme mit integrierten Lactoferrin-Expressionsvektoren sollten auf die Anwesenheit des Produktes in den Zellextrakten und den Kulturüberständen untersucht werden. Die Kultivierung, Probenbereitung und Western-Blot Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.3.2.2 beschrieben. Um Auswirkungen in der Kultivierung als Myzel zu evaluieren, wurden zusätzlich Überstände aus Kulturen gewonnen,

die bei 45 °C herangezogen worden waren. Der Western-Blot wurde mit Antikörpern gegen menschliches Lactoferrin behandelt.

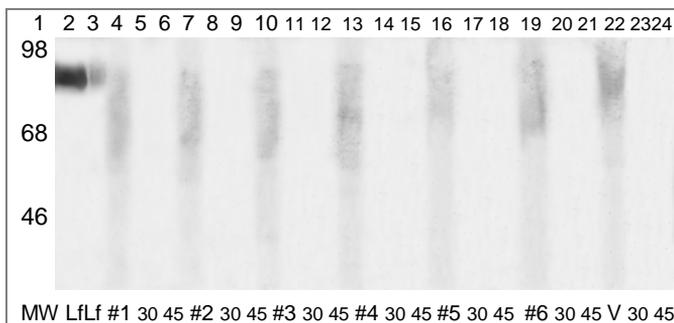


Abbildung 57: Lactoferrin Expression in *A. adenivorans*

Western-Blot Analyse von rekombinanten *Arxula adenivorans*-Stämmen mit integrierten Lactoferrin-Expressionsvektoren. Die Zellextrakte und Kulturüberstände (30 / 45 = Überstände einer 30 °C- bzw. 45 °C-Kultur) sind nebeneinander aufgetragen. Spur 1: Der Molekulargewichtsstandard in der ersten Spur ist nicht gezeigt und wird durch die Ziffern repräsentiert (in kDa); Spur 2/ 3: Lactoferrinstandard Lf (100 bzw. 10 ng); Spur 4-21: Stämme No.1 bis 6; Spur 22-24: Stamm mit integrierten pMRL (Vektorkontrolle V).

In keinem der sechs untersuchten Stämme konnte das Produkt in den Zellextrakten oder Kulturüberständen nachgewiesen werden. Starke Kreuzhybridisierungen des Antikörpers mit Hefeproteinen erschwerten zusätzlich die Auswertung des Blots.

### 3.5.3 Zusammenfassung der Resultate zur Lactoferrin-Produktion

Der Versuch, die bekannten Limitierungen in der Expression von menschlichen Lactoferrin in *H. polymorpha* durch Überproduktion von Hilfsfaktoren aufzuheben führte zu keinem Resultat. Keines der beiden überproduzierten *H. polymorpha*-Gene (*HpPDI1<sub>c-myc</sub>* und *HpKAR2<sub>c-myc</sub>*) führte zu einer nachweisbaren Expression von Lactoferrin. Da es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gelang *H. polymorpha*-Stämme mit kointegrierten *HpSSO2<sub>c-myc</sub>*- oder *HpCNE1<sub>c-myc</sub>*-Expressionsvektoren zu generieren, konnte deren eventueller Einfluss auf die Lactoferrin-Expression nicht überprüft werden. Die untersuchten *A. adenivorans*-Stämme mit integrierten Lactoferrin-Expressionsvektoren exprimierten ebenfalls kein Produkt. Die bei 45 °C kultivierte Myzelform zeigte keine Lactoferrin-Sekretion in das umgebende Medium.



# 4 Diskussion

## 4.1 Untersuchungen zur rDNA-Integration

### 4.1.1 Regulative Elemente in der rDNA

Nach der vollständigen Sequenzierung der rDNA von *H. polymorpha* konnten durch Vergleich zu den bekannten rDNA-Elementen aus *S. cerevisiae* [Johnston *et al*, 1997] und *A. gossypii* [Johnston *et al*, 1997; Wendland *et al*, 1999] die exakten Positionen der regulatorischen Elemente in der rDNA von *H. polymorpha* vorhergesagt werden:

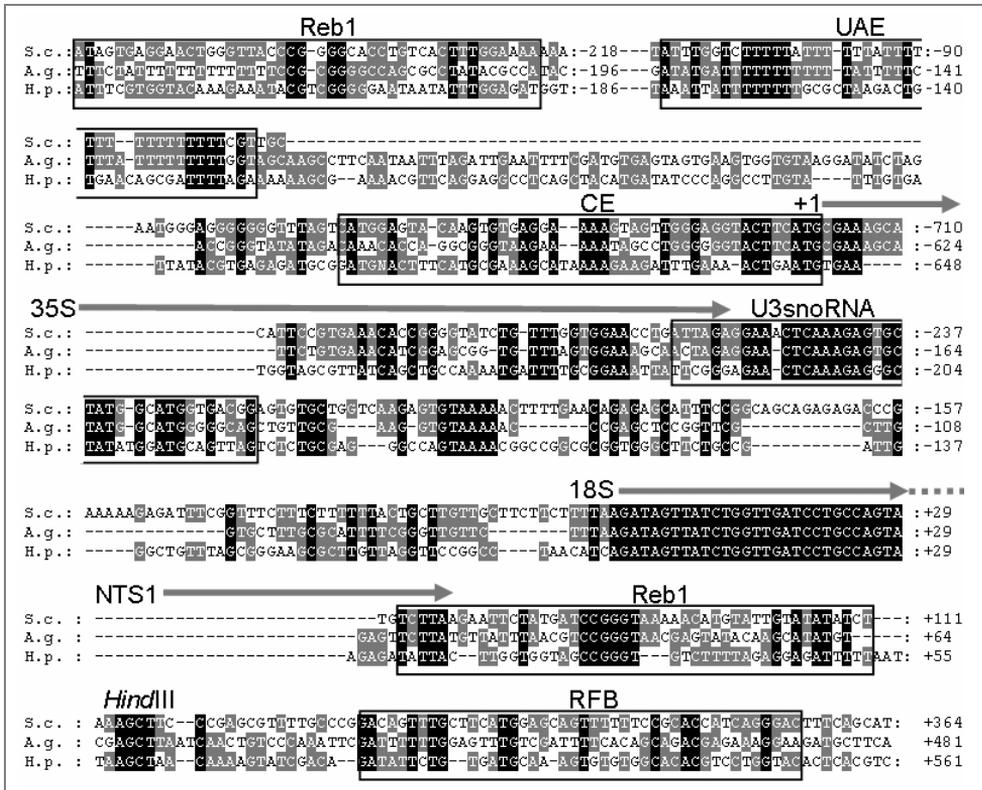


Abbildung 58: Sequenzvergleich von rDNA-Bereichen mit regulativen Elementen

Vergleich von Teilbereichen der nicht-kodierenden rDNA-Sequenzen von *S. cerevisiae* (S.c.), *A. gossypii* (A.g.) und *H. polymorpha* (H.p.). Schwarze Schattierungen kennzeichnen Sequenzabschnitte mit gleichen Nukleotiden für alle drei betrachteten Sequenzen. Graue Bereiche kennzeichnen Übereinstimmung in zwei Sequenzen. Reb1: Reb1p-bindendes Element mit der Konsensus-Sequenz CGG GTA RNN R (R= A oder G); UAE: UAF-bindendes Element; CE: CF-bindendes Element; U3snoRNA: snoRNA-bindendes Element; 18S: Beginn der kodierenden Sequenz der 18S rRNA nach erfolgter Prozessierung des 35S rRNA-Precursors; RFB: Sequenz im NTS1, die Fob1p-vermittelte unidirektionale Replikation ermöglicht.

Ca. 250 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts befindet sich eine Konsensus-Sequenz für das Reb1p-Element [Remacle und Holmberg, 1992] gefolgt von dem konservierten UAE-Element (upstream activating element) [Banditt *et al*, 1999]. Der Pol. I-Transkriptionsstart wird von einer ca. 40 bp langen hoch konservierten Sequenz flankiert, dem sog. CE (core element) [Bordi *et al*, 2001; Verbeet *et al*, 1984]. Eine ebenfalls hoch konservierte Sequenz kurz vor dem Transkriptionsstart des 35S Precursors, bildet die U3snoRNA-Bindungsstelle [Beltrame *et al*,

1994]. Im NTS1 stromabwärts des 35S Precursors liegen Reb1p- und RFB-Konsensussequenzen, wobei an dieser Position Reb1p-Bindung für die Transkriptions-Termination verantwortlich ist [Reeder *et al*, 1999].

Durch Analyse der rDNA-Organisation von *H. polymorpha* konnten die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über verschiedene integrative Sequenzen besser interpretiert werden. Zudem ist es möglich, die Ergebnisse aus anderen Expressionssystemen mit rDNA-Integrationsvektoren im Vergleich zu den gewonnenen Daten für *H. polymorpha* zu betrachten. Die Auswahl von rDNA-Sequenzen für integrative Vektorsysteme kann aufgrund der gewonnenen Daten weiter optimiert werden.

#### **4.1.2 Einfluss der rDNA-Sequenz auf die Effizienz integrativer Vektoren**

Der Vergleich verschiedener rDNA-Abschnitte aus *H. polymorpha* zeigte erhebliche sequenz-spezifische Unterschiede für ihre Nutzung als Elemente in Integrationskassetten. Die zunächst verwendeten Vektoren (pMr) enthielten als Integrationselemente 18S rDNA-Sequenzen mit dem vorgeschalteten ETS-Bereich (siehe Abb. 7 B: Balken A). Die Promotorelemente im NTS2 stromaufwärts des Transkriptionsstart des 35S Precursors fehlten (Abb. 58). Bei Nutzung dieser Vektoren wurde in allen vier getesteten Hefen eine geringe mitotische Stabilität und eine niedrige heterologe Genexpression beobachtet. Eine Kointegration unterschiedlicher Plasmide konnte nicht beobachtet werden. Erklärt werden können diese Ergebnisse mit dem Umstand, dass bei Integration in kodierende Bereiche der Wirts-rDNA die betroffenen rDNA-Einheit durch die heterologen Sequenzen disruptiert wird. Die Integration von hohen Kopienzahlen der Vektorsequenzen führte somit zu einer verringerten Kopienzahl intakter rDNA-Einheiten. In der früheren Studie [Klabunde *et al*, 2002] wurde dies durch Verwendung nicht-kodierender NTS-Sequenzen zur Integration vermieden. Eine Bestätigung dieser Annahme findet sich in den Ergebnissen bei Nutzung einer durch Promotorelemente verlängerten Integrationskassette (pMrL). Bei einer relativ geringen Verlängerung der Integrationskassette um 250 bp mit den in Abb. 58 beschriebenen Promotorelemente (Reb1, UAE und CE) konnten in allen vier getesteten Hefen rekombinante Stämme mit hohen Transformations-Effizienzen erzeugt werden. Die Stämme zeigten einen minimalen Plasmidverlust und drei von vier getesteten Hefen erreichten eine hohe Produktivität für das Modellprotein Phytase. Der schon in früheren Arbeiten in *S. cerevisiae* nachgewiesene Einfluss [Lopes *et al*, 1996 ] des eingesetzten rDNA-Integrationselements auf die Expression, mitotische Stabilität und Kopienzahl der integrierten heterologen Sequenzen konnte mit den vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden. Die eingesetzte integrative Sequenz verbindet hohe Effizienz in der Erzeugung rekombinanter Stämme mit der Möglichkeit des Spezies-übergreifenden Einsatzes von Expressionsvektoren.

#### **4.1.3 Die rDNA verschiedener Hefearten als konservierter Integrationslocus für Kointegration unterschiedlicher heterologer Sequenzen**

Die Möglichkeit der gleichzeitigen Integration und Expression mehrerer Plasmide mit unterschiedlichen Expressionskassetten unter Verwendung eines Selektionsmarkers konnte für *A. adenivorans* mit Genen für verschiedene Modellproteine (*lacZ*, GFP und Phytase) bestätigt werden. Diese Möglichkeit der Kotransformation beschreibt also keinen für *H. polymorpha*

spezifischen Mechanismus sondern einen möglicherweise generellen Effekt bei der Integration heterologer Sequenzen in die rDNA von Mikroorganismen.

Unter Einsatz der hoch konservierten 18S rDNA-Sequenz zur Rekombination wurde ein multifunktionales Vektorsystem entwickelt, das geeignet ist eine Vielzahl von Hefen und vermutlich weitere Mikroorganismen zu transformieren. Dies eröffnet die Möglichkeit in der frühen Phase einer Stammes- oder Prozessentwicklung unterschiedliche Mikroorganismen mit geringem experimentellen Aufwand auf die Kompatibilität von Wirt und Produkt zu überprüfen. Ist ein optimaler Wirtsorganismus identifiziert, können in einem zweiten Entwicklungsschritt Vektoren mit spezifischen Elementen eingesetzt werden, die für den jeweiligen Organismus optimal sind.

#### **4.1.4 Transkriptionales Silencing in der rDNA**

Die fehlende Produktion von Phytase in 10 bis 20% der betrachteten *H. polymorpha*-, *A. adenivorans*- und *P. stipitis*-Stämmen ist im Kontext fehlender Expression anderer heterologer Sequenzen innerhalb der rDNA zu betrachten [Bryk *et al*, 1997; Klabunde *et al*, 2002; Smith und Boeke, 1997]. Transkriptionales Silencing am rDNA-Locus könnte eine mögliche Erklärung für die fehlende Expression trotz erfolgter rDNA-Integration (PCR- bzw. Southern-Integrationsnachweis) liefern. Diese spezielle Form des Silencing [Bryk *et al*, 1997; Fritze *et al*, 1997] wird durch Umwelteinflüsse reguliert und sorgt dafür, dass nur die Hälfte aller rDNA-Einheiten zu einem Zeitpunkt transkriptionell aktiv sind [Dammann *et al*, 1993]. Dabei wird die Histon-Deacetylase Sir2p von Net1p an den rDNA-Locus rekrutiert [Straight *et al*, 1999] und bewirkt eine Modifikation der Chromatinstruktur am rDNA-Locus. In den Stämmen, die keine Phytase-Aktivitäten zeigten, könnten die Expressionsvektoren in eine vom Silencing betroffenen Region des rDNA-Locus integriert vorliegen. Dabei würde durch eine minimale Transkription des Resistenzmarkers ein Überleben unter Selektionsdruck ermöglicht, wohingegen die Expression des Modellgens unterhalb der Nachweisgrenze bliebe. Nach dieser Interpretation würde Sir2p bei Integrationen an den rDNA-Loci eine ambivalente Rolle einnehmen: Zum einen wird durch die Modulation des Zugangs der rekombinatorischen Maschinerie am RFB die Integration fremder Sequenzen gefördert [Benguria *et al*, 2003] und zum anderen wird durch transkriptionales Silencing in bestimmten Fällen die Expression von Modellproteinen unterbunden. Dieser mutmaßliche Zusammenhang könnte einen Regulationsmechanismus beschreiben, der zu einer Stilllegung von heterologen Sequenzen in der rDNA führt. Somit würden schädliche Auswirkungen für die Wirtshefe vermieden, aber gleichzeitig eine ausreichende Expression des eingesetzten Resistenzgens gewährleistet.

#### **4.2 IFN- $\gamma$ Produktion in *H. polymorpha* und *A. adenivorans***

Menschliches IFN- $\gamma$  wird in *E. coli* [Nishi *et al*, 1985] und in eukaryontischen Expressionssystemen erfolgreich produziert [Hooker und James, 1998; Riske *et al*, 1991]. Die Glykosylierung von rekombinanten IFN- $\gamma$  ist sehr gut untersucht, darauf basierend dient IFN- $\gamma$  als sekretorisches Modellprotein zum Studium der Glykosylierungsschritte von unterschiedlichen eukaryontischen Expressionssystemen. Bei der rekombinante Produktion von IFN- $\gamma$  in CHO-Zellen wurde eine heterogene Glykosylierung der beiden Glykosylierungs-

positionen (Asn<sub>25</sub> bzw. Asn<sub>97</sub>) beobachtet [Hooker und James, 1998]. Proteine mit allen drei möglichen Glucan-Modifikationen wurden im Kulturüberstand nachgewiesen.

In einer früheren Studie [Degelmann *et al*, 2002] konnte gezeigt werden, dass rekombinante *H. polymorpha*-Stämme in der Lage sind IFN- $\gamma$  zu sezernieren. Das Produkt wurde dabei in überglykosylierter Form in den Kulturüberstände nachgewiesen. Dabei kamen Expressionsvektoren zum Einsatz, in denen die IFN- $\gamma$ -Sequenz unter Kontrolle der starken induzierbaren *TPS1*- und *FMD*-Promotoren stand [Amuel *et al*, 2000; Gellissen, 2000]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine vergleichbare Expressionskassette mit Hilfe des neu entwickelten Vektorsystems in *H. polymorpha* und *A. adenivorans* getestet. Hierbei war die MF- $\alpha$ 1-PrePro-Signalsequenz (MF- $\alpha$ 1-SS) aus *S. cerevisiae* [Kurjan und Herskowitz, 1982] aminoterminal an menschliches IFN- $\gamma$  fusioniert. Der 19 Aminosäuren lange Pre-Anteil der Signalsequenz wird von einer Signalpeptidase (ER-Lumen) und der Pro-Anteil von der *KEX2*-Endopeptidase (trans-Golgi) entfernt [Bohni *et al*, 1988; Julius *et al*, 1984; YaDeau *et al*, 1991]. Drei N-Glykosylierungsstellen in der Pro-Sequenz garantieren die Sekretions-Kompetenz des Fusionsprodukts vom ER in den cis-Golgi [Caplan *et al*, 1991]. In der vorliegenden Arbeit wurde von rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen unglykosyliertes IFN- $\gamma$  (17,1 kDa) im Zellinneren zurückgehalten. Im präzipitierten Kulturüberstand konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Die Größe des Produkts spricht für ein erfolgtes Abspalten der PrePro-Sequenz. Eine Akkumulation des rekombinanten IFN- $\gamma$  im TGN (trans Golgi network) oder in sekretorischen Vesikeln könnte ein möglicher Grund für die beobachtete fehlende Sekretion sein. Ebenso könnte die Zurücksortierung in das ER zur Vervollständigung der fehlenden Glykosylierung für die beobachtete intrazelluläre Lokalisation verantwortlich sein.

In *A. adenivorans* konnte weder im Zellextrakt noch in den Kulturüberständen IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden. Auch die Kultivierung als Myzel bei 45 °C führte nicht zu nachweisbaren Produktmengen. Die Funktionalität des eingesetzten *TEF1*-Promotors wurde anhand von alternativen Modellproteinen demonstriert und die Integration mehrerer Kopien der Expressionsvektoren konnte eindeutig gezeigt werden. Daher scheint es sich beim Unvermögen von *A. adenivorans* IFN- $\gamma$  zu produzieren eher um eine produktspezifische Unverträglichkeit zu handeln. Ob dabei das Produkt von den Zellen degradiert wird, oder etwa die Verwendung der PrePro-Sequenz aus *S. cerevisiae* zu Komplikationen geführt hat konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden.

### **4.3 Auswirkungen der Koproduktion von Hilfsfaktoren auf die IFN-g Sekretion**

Vier verschiedene Gene aus dem sekretorischen Weg wurden in der vorliegenden Arbeit aus *H. polymorpha* isoliert, einer Funktionsanalyse unterzogen und zusammen mit intrazellulär zurückgehaltenen IFN- $\gamma$  in *H. polymorpha* überexprimiert. Diese Vorgehensweise sollte helfen, eventuelle Limitierungen in den Wirtstämmen bei der Sekretion des heterologen Produktes aufzuheben.

### 4.3.1 CNE1-Überexpression in IFN- $\gamma$ -exprimierenden *H. polymorpha*-Stämmen

Eine Epitop-markierte Variante von *H. polymorpha* CNE1 wurde zusammen mit dem Gen für menschliches IFN- $\gamma$  in die rDNA von *H. polymorpha* dirigiert und koexprimiert. Als Ziel sollte dabei zunächst keine Produktivitätssteigerung, sondern die Sekretion des bisher nur unzureichend sezernierten Proteins erreicht werden. In allen sechs getesteten Stämmen konnte das Protein extrazellulär nachgewiesen werden. Die Größe des sezernierten Produktes von ca. 26 kDa entspricht der erwarteten Größe für glykosyliertes IFN- $\gamma$  [Hooker und James, 1998]. Dabei konnte ein eindeutig homogenes modifiziertes Produkt nachgewiesen werden, welches in allen sechs untersuchten Fällen eine klare Bande in der Western-Blot Analyse zeigte. Dies Ergebnis steht im klaren Widerspruch zu den Ergebnissen einer früheren Studie, in der eine stark überglykosyliertes IFN- $\gamma$  von *H. polymorpha* sezerniert wurde [Degelmann *et al*, 2002]. Ob es sich bei dem aus dem präzipitierten Überstand identifizierten Protein um authentisch glykosyliertes IFN- $\gamma$  handelt, müsste in weiteren Untersuchungen genau determiniert werden. Die vorgefundene Größe des Produkts entspricht jedoch genau der von nativem menschlichen IFN- $\gamma$ . Das veränderte Sekretionsverhalten bei *HpcNE1<sub>c-myc</sub>*-Überexpression gibt einen Hinweis auf die Rolle von Cne1p in der Prozessierung von IFN- $\gamma$  und möglicherweise anderer glykosylierter Proteine. Unter Berücksichtigung der eingesetzten *S. cerevisiae*-MF- $\alpha$ 1-SS und darin vorhandenen potenziellen N-Glykosylierungsstellen sind verschiedene Mechanismen denkbar: IFN- $\gamma$  bildet direkt nach der Translation Dimere, die im weiteren Durchlaufen des sekretorischen Apparates glykosyliert werden. Die N-Glykosylierung der eingesetzten Signalsequenz könnte einen Einfluss auf die Glykosylierung des eigentlichen Produktes ausüben, wodurch unvollständig prozessiertes IFN- $\gamma$  aus dem ER gelangen würde. Nach Abspaltung der Pre-Sequenz im trans-Golgi würde das unvollständig glykosyliertes IFN- $\gamma$  im TGN zurückgehalten oder in das ER zurücksortiert werden.

Die Zugänglichkeit von potenziellen Glykosylierungsstellen wird durch Chaperon-vermittelte Protein-Faltung beeinflusst [Allen *et al*, 1995; Holst *et al*, 1996]. Cne1p interagiert im Hefemodell als Lectin mit neu synthetisierten Glykoproteinen und assistiert als Chaperon bei deren korrekter Faltung. Eine erhöhte Verfügbarkeit an Cne1p im ER könnte die Faltung von IFN- $\gamma$  derart beeinflussen, dass Variationen in der Häufigkeit von core-Glykosylierungen auftreten. Auch ein direkter Einfluss von Cne1p auf die Assemblierung von IFN- $\gamma$ -Dimeren ist denkbar, welcher wiederum in differenzierten N-Glykosylierungen resultieren würden.

Eine weitere mögliche Wirkungsweise einer erhöhten Verfügbarkeit an Cne1p könnte in einer verlängerten Verweildauer von unreifen IFN- $\gamma$  im ER liegen. In kontinuierlichen CHO-Zellkulturen wurde ein Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit an aktivierten Zuckern (UDP-GNAc) und der Glykosylierung von rekombinanten IFN- $\gamma$  gefunden [Nyberg *et al*, 1999]. Da den IFN- $\gamma$ -produzierenden *H. polymorpha*-Kulturen Glycerin als einzige C-Quellen zur Verfügung stand, könnte die Verfügbarkeit von UDP-GNAc Glykosylierungs-limitierend sein. Durch eine längere Exposition der potentiellen Glykosylierungsstellen im ER könnte die Anzahl der durch Oligosaccharyltransferase übertragenen core-Glucane somit gesteigert werden.

Das in früheren Veröffentlichungen demonstrierte Potenzial von koproduzierten Calnexin im Einfluss auf sezernierte Glykoproteine [Conesa *et al*, 2002; Tate *et al*, 1999] konnte im *H. polymorpha*-Expressionsystem nachvollzogen werden. Die Überexpression des *Hansenula polymorpha*-Homologen zu *S. cerevisiae*-CNE1 und menschlichen Calnexin zeigte einen

eindeutig positiven Effekt auf die IFN- $\gamma$ -Sekretion rekombinanter *H. polymorpha*-Stämme. Dabei zeigte das Produkt homogene Glykosylierung und eine relative Molekülmasse die der von menschlichen IFN- $\gamma$  entspricht. Die in früheren Arbeiten [Degelmann *et al*, 2002] beobachtete heterogene Glykosylierung des sezernierten Produktes wurde nicht beobachtet.

#### **4.3.2 Überexpression von *HpKAR2*<sub>c-myc</sub>, *HpPDI1*<sub>c-myc</sub> oder *HpSSO2*<sub>c-myc</sub> in IFN-g-exprimierenden *H. polymorpha*-Stämmen**

Die Überexpression von *H. polymorpha*-Homologen zu *S. cerevisiae* *PDI1*, *KAR2* und *SSO2* führte zu keiner erkennbaren Veränderung der IFN- $\gamma$ -Sekretion in *H. polymorpha*. Obgleich die Expression aller drei markierten *H. polymorpha*-Gene mittels Immunoblotting nachgewiesen wurde, konnte keine gesteigerte Sekretion des Produktes aus den Zellen in den Kulturüberstand gezeigt werden. Es wurden vergleichbare Mengen an unglykosylierten IFN- $\gamma$  innerhalb der Zellen gefunden wie in *H. polymorpha*-Stämmen, die alleine mit IFN- $\gamma$ -Expressionsvektoren transformiert wurden. Da nur für *HpKAR2*<sub>c-myc</sub> die Funktionstüchtigkeit eindeutig nachgewiesen wurde, konnten für *PDI1* und *SSO2* keine abschließenden Aussagen über potenzielle Effekte auf die Expression von menschlichen IFN- $\gamma$  getätigt werden.

Bei der Sekretion von IFN- $\gamma$  spielt die Glykosylierung des Produkts eine entscheidende Rolle und somit scheint es wahrscheinlich, dass Chaperone mit Lectin-Eigenschaften einen weitaus größeren Einfluss ausüben, als Chaperone wie *KAR2* und *PDI1*, deren Wirkweise bei der Assistierung der Faltung von sekretorischen Proteinen in anderen Zusammenhängen steht.

#### **4.4 Produktion von IFN- $\beta$ in *H. polymorpha* und *A. adenivorans***

Wie schon in früheren Untersuchungen festgestellt wurde, ist die rekombinante Produktion von menschlichen IFN- $\beta$  in *H. polymorpha* mit erheblichen Komplikationen verknüpft. Das Produkt wird innerhalb der Zellen vollständig zurückgehalten oder in nur sehr geringem Maße sezerniert [T. Weierstall, persönliche Mitteilung]. In der vorliegenden Arbeit fanden sich sowohl in rekombinanten *H. polymorpha*- als auch in *A. adenivorans*-Stämmen geringe Mengen an IFN- $\beta$  im Zellextrakt. Die Größe des Proteins entspricht dabei dem eines unvollständig glykosylierten Produkts. Die Anzucht von *A. adenivorans* als Myzel bei 45 °C hatte keinen Einfluss auf die fehlende Sekretion. Auch führte die Überproduktion von Hilfsfaktoren zu keiner Änderung im Sekretionsverhalten von IFN- $\beta$  durch *H. polymorpha*. Alle IFN- $\beta$ -produzierenden Stämme wuchsen wesentlich langsamer als die Kontrollen. Dieser Umstand spricht für eine toxische Wirkung des Produkts auf die Wirtsstämme. Durch die Verwendung des konstitutiven *TEF1*-Promotors in der Expressionskassette des multifunktionalen Vektorsystems könnte diese Problematik weiter verstärkt werden. Die Gründe für die beobachtete schwache Expression scheinen demnach produktabhängig zu sein, denn die genomische Integration der Expressionsvektoren mit bis zu 10 Kopien und die Funktionstüchtigkeit des Vektorsystems konnten eindeutig nachgewiesen werden.

## 4.5 Produktion von Lactoferrin in *H. polymorpha* und *A. adenivorans*

Die Expression von humanem Lactoferrin führt zu erheblichen Problemen in verschiedensten mikrobiellen Expressionssystemen. Das Protein wird mit nur geringer Produktivität synthetisiert und intrazellulär deponiert. Diese Limitierungen sollten mit der Koproduktion von Hilfsfaktoren in *H. polymorpha* und durch Expression in *A. adenivorans* aufgehoben werden.

Nach Analyse einer Vielzahl von *H. polymorpha*- und *A. adenivorans*-Stämmen mit in die rDNA integrierten Lactoferrin-Expressionsvektoren konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Weder im Kulturüberstand, noch innerhalb der Zellen konnte die Anwesenheit von Lactoferrin gezeigt werden. Auch die Kultivierung von *A. adenivorans* als Myzel führte nicht zum Erfolg. Die Koproduktion von Hilfsfaktoren in *H. polymorpha* führte ebenfalls nicht zu einer nachweisbaren Expression von Lactoferrin. Die Funktionalität der eingesetzten Gens wurde in einem anderen Zusammenhang für *H. polymorpha* demonstriert. [A. Degelmann, persönliche Mitteilung]. Dabei wurden jedoch regulierbare Promotoren (*MOX-P* und *FMD-P*) im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit eingesetzten konstitutiven *TEF1*-Promotors aus *A. adenivorans* verwendet. Weitere Gründe für die fehlende Expression sind denkbar: Die eisen-komplexierende Funktion von Lactoferrin könnte die Verfügbarkeit des für die Wirtsorganismen essentiellen Eisens herabgesetzt und somit Stämme mit hohen Expressionslevel schädigen. Die Knüpfung einer Vielzahl von Disulfidbrücken, die in reifen Lactoferrin zu finden sind könnte eine erhebliche Belastung des sekretorischen Apparates der eingesetzten Wirtshefen darstellen. Dies könnte zu einer unvollständigen Prozessierung und schlussendlich zu einer frühzeitigen Degradation des Produkts führen. Die komplexe Glykosylierung von Lactoferrin ist eine weitere Hürde für das Durchschleusen des Produktes durch den sekretorischen Weg des Wirtsorganismus. Eine nicht vollständige oder fehlerhafte Glykosylierung könnte in einem frühzeitigen Abbau von rekombinanten Lactoferrin resultieren.



## 5 Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wird die Etablierung eines Vektorsystems auf Basis der rDNA-Integration beschrieben, womit das Potenzial verschiedener Hefen zur Herstellung rekombinanter Produkte untersucht werden kann. Durch die Optimierung der integrativen rDNA-Sequenz aus *Hansenula polymorpha* wurden Voraussetzungen geschaffen, die es den Wirtshefen ermöglichten, hohe Kopienzahlen linearisierter Plasmidsequenzen zu integrieren. Dadurch wurde ein eventueller Selektionsnachteil für die rekombinanten Stämme, durch Disruption von rDNA-Einheiten, auf ein Minimum reduziert. Die für *H. polymorpha* etablierte Methode der Kointegration verschiedener Expressionsvektoren, unter Verwendung eines Selektionsmarkers, konnte erfolgreich auf *Arxula adeninivorans* übertragen werden. Die Eigenschaft dieser dimorphen Hefe, als Myzelform hohe Proteinmengen zu sezernieren, sollte für die heterologe Genexpression genutzt werden. Es folgte die Evaluierung der Produktion pharmazeutisch interessanter sekretorischer Proteine in rekombinanten *H. polymorpha*- und *A. adeninivorans*-Stämmen.

Die Produktion von rekombinantem Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Lactoferrin wurde mit dem optimierten integrativen Vektorsystem in *H. polymorpha* und *A. adeninivorans* insbesondere unter dem Aspekt einer Sekretion der Proteine betrachtet. Bekannte Limitierungen im Vermögen von *H. polymorpha* diese pharmazeutischen Proteine zu sezernieren, sollten durch Überexpression verschiedener Hilfsfaktoren aus dem sekretorischen Weg behoben werden. Für diesen Zweck wurden die Hefe-Homologen zu Proteindisulfid-isomerase (*PDI1*), Bindeprotein (*KAR2*), Syntaxin (*SSO2*) und Calnexin (*CNE1*) aus *Hansenula polymorpha* isoliert und überexprimiert. Eine Vielzahl rekombinanter Stämme mit kointegrierten Expressionsvektoren für menschliches IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  und Lactoferrin, kombiniert mit je einem der Hilfsfaktoren aus dem sekretorischen Weg, wurden analysiert. Durch Bestimmung der Kopienzahlen integrierter Expressionskassetten wurden solche Stämme identifiziert, in denen die heterologen Genprodukte in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander vorlagen. Durch diese Auswahl sollten eventuelle Dosis-Effekte der über-exprimierten Hilfsfaktoren in Hinblick auf eine gesteigerte Sekretion der Pharmaproteine betrachtet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass *H. polymorpha* und *A. adeninivorans* in der Lage sind IFN- $\beta$  in geringen Mengen zu exprimieren. Dabei zeigte eine Überproduktion der Hilfsfaktoren in *H. polymorpha* keinen Einfluss auf die Produktmenge oder Sekretion des intrazellulär deponierten unvollständig glykosylierten Produkts. Lactoferrin wurde von keiner der beiden getesteten Hefen in nachweisbaren Mengen produziert. Die Überexpression von Hilfsfaktoren zeigte dabei keine Auswirkungen auf die fehlende Expression in *H. polymorpha*. Die in *H. polymorpha* mögliche IFN- $\gamma$ -Expression konnte in *A. adeninivorans* weder in Myzel- noch in Hefe-Kulturen nachvollzogen werden. Die intrazelluläre Retardierung von rekombinant produzierten IFN- $\gamma$  in *H. polymorpha* konnte durch Überexpression von endogenen *CNE1* aufgehoben werden, wohingegen die drei weiteren überproduzierten Hilfsfaktoren keine Auswirkungen auf die IFN- $\gamma$ -Expression zeigten. Die Überproduktion des Calnexin-Homologs führte zu einer Verlagerung des unvollständig glykosylierten IFN- $\gamma$  in den Kulturüberstand. Dabei hatte das sezernierte Produkt ein relatives Molekulargewicht, welches dem von menschlichen IFN- $\gamma$  entspricht. Die bekannten Chaperon- und Lectin-Funktionen von Calnexin, zusammen mit der gezeigten Wirkung bei Überproduktion von Cne1p, könnte zur Steigerung der Sekretionseffizienz von anderen glykosylierten Proteinen in mikrobiellen Expressionssystemen herangezogen werden.

## 6 Abkürzungen

#	Probenummer	MCS	multi cloning site
A	Alanin	Met	Methionin
<i>A. adenivorans</i>	<i>Arxula adenivorans</i>	MF- $\alpha$ 1-SS	a-Mating factor Signalsequenz
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
<i>A. gossypii</i>	<i>Ashbya gossypii</i>	M <sub>r</sub>	relatives Molekulargewicht
ARF	ADP-ribosylation factor 2	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ARS	autonomously replicating sequence	n.a.	nicht angegeben
ATP	Adenosin Triphosphat	NaAc	Natriumacetat
bp	Basenpaare	NaCl	Natriumchlorid
BCiP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat	NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
BiP	Bindeprotein	NaOH	Natriumhydroxid
BSA	bovine serum albumin	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
C	Cystein	NSF	N-ethylmaleimide-sensitive faktor
CE	core element	NTS	non transcribed spacer
CF	core factor	OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei X nm
CHO	chinese hamster ovary cells	Oligo	synthetische Oligonukleotide
D	Asparaginsäure	ORF	open reading frame
DMF	Dimethylformamid	ori	origin of replication
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
dNTP	Desoxyribonukleotid	PCR	polymerase chain reaction
DSD	double stranded DNA	PDI	protein disulfid isomerase
DTT	Dithiothreitol	PEG	Polyethylenglykol
E	Glutaminsäure	Pol. I/ II/ III	RNA-Polymerase I/ II/ III
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Q	Glutamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Na <sup>+</sup> )	R	Arginin
ER	Endoplasmatische Retikulum	RAC	ribosomes assembly chaperone
ERAD	ER-associated protein degradation	rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
ERC	extra chromosomal circle	RFB	replicating fork block
EtBr	Ethidiumbromid	RNA	Ribonukleinsäure
ETS	external transcribed spacer	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
F	Phenylalanin	S	Serin
G	Glycin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GFP	green fluorescent protein	SDS	Natriumdodecylsulfat
GTP	Guanosin Triphosphat	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
H	Histidin	SF9	<i>Lepidoptera spodoptera frugiperda</i> -Zellen
HAc	Essigsäure	<i>S. macrospora</i>	<i>Sordaria macrospora</i>
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)	SNAP	soluble NSF attachment protein
hLf	human Lactoferrin	snoRNA	small nucleolar RNA
<i>HpCNE1</i>	<i>H. polymorpha CNE1</i>	<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>H. polymorpha</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>	SRP	signal recognition particle
His	Histidin	SSD	single stranded DNA
<i>HOT1</i>	hot spot of recombination	T	Threonin
Hyg.B	Hygromycin B	TBP	TATAA binding protein
I	Isoleucin	TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
IgG	Immunoglobulin	TNG	trans-Golgi network
IFN	Interferon	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ITS	internal transcribed spacer	Trp	Tryptophan
K	Lysin	tSNARE	target-SNAP receptor protein
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kalium(di)hydrogenphosphat	U	Einheit der Enzymaktivität
Kan	Kanamycin	UAE	upstream activating element
kb	Kilo-Basenpaare	UAF	upstream activating factor
KBL	DNA-Größenstandard	UPR	unfolded protein response
kDa	Kilodalton	Ura	Uracil
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	V	Valin
KOAc	Kaliumacetat	vSNARE	vesikular SNAP receptor protein
L	Leucin	W	Tryptophan
Leu	Leucin	wt	Wildtyp
M	Methionin	Y	Tyrosin
M & M	Material und Methoden	YEP(D)	yeast extract plus peptone (glucose)
MAT a/ $\alpha$	mating type a/ $\alpha$	YNB	yeast nitrogen base
Mbp	Mega Basenpaare	X-gal	5Bromo-4Chloro-3Indoyl- $\beta$ D-Galactosid

## 7 Literaturverzeichnis

- Agaphonov, M.O., Romanova, N.V., Trushkina, P.M., Smirnov, V.N. and Ter-Avanesyan, M.D.** (2002) Aggregation and retention of human urokinase type plasminogen activator in the yeast endoplasmic reticulum. *BMC Mol Biol*, **3**, 3-15.
- Allen, S., Naim, H.Y. and Bulleid, N.J.** (1995) Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator. Effects of disulfide bond formation on N-linked glycosylation and secretion. *J Biol Chem*, **270**, 4797-4804.
- Amuel, C., Gellissen, G., Hollenberg, C.P. and Suckow, M.** (2000) Analysis of heat shock promoter in *Hansenula polymorpha*: the *TPS1* promoter, a novel element for heterologous gene expression. *Biotechnol Bioprocess Eng*, **247-252**.
- Arima, K., Oshima, T., Kubota, I., Nakamura, N., Mizunaga, T. and Toh-e, A.** (1983) The nucleotide sequence of the yeast *PHO5* gene: a putative precursor of repressible acid phosphatase contains a signal peptide. *Nucleic Acids Res*, **11**, 1657-1672.
- Arnaud, P.** (2002) The interferons: pharmacology, mechanism of action, tolerance and side effects. *Rev Med Interne*, **23**, 449s-458s.
- Aufdembrinke, B., Horowski, R. and Kapp, J.F.** (2001) Interferon beta-1b in multiple sclerosis. In Dembowski, K. and Stadler, P. (eds.), *Novel Therapeutic Proteins - Selected Case Studies*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 129-153.
- Bae, J.H., Sohn, J.H., Park, C.S., Rhee, J.S. and Choi, E.S.** (2003) Integrative transformation system for the metabolic engineering of the sphingoid base-producing yeast *Pichia ciferrii*. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 812-819.
- Ballou, C.E.** (1990) Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol*, **185**, 440-470.
- Banditt, M., Koller, T. and Sogo, J.M.** (1999) Transcriptional activity and chromatin structure of enhancer-deleted rRNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 4953-4960.
- Bao, W.G. and Fukuhara, H.** (2001) Secretion of human proteins from yeast: stimulation by duplication of polyubiquitin and protein disulfide isomerase genes in *Kluyveromyces lactis*. *Gene*, **272**, 103-110.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M. and Schekman, R.** (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, **77**, 895-907.
- Bedwell, D.M., Strobel, S.A., Yun, K., Jongeward, G.D. and Emr, S.D.** (1989) Sequence and structural requirements of a mitochondrial protein import signal defined by saturation cassette mutagenesis. *Mol Cell Biol*, **9**, 1014-1025.
- Beltrame, M., Henry, Y. and Tollervey, D.** (1994) Mutational analysis of an essential binding site for the U3 snoRNA in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-rRNA. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5139-5147.
- Benguria, A., Hernandez, P., Krimer, D.B. and Schwartzman, J.B.** (2003) Sir2p suppresses recombination of replication forks stalled at the replication fork barrier of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **31**, 893-898.
- Bennett, J.W.** (1998) Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J Biotechnol*, **66**, 101-107.
- Bergkamp, R.J., Kool, I.M., Geerse, R.H. and Planta, R.J.** (1992) Multiple-copy integration of the alpha-galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonoloba* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet*, **21**, 365-370.
- Billiau, A.** (1996) Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol*, **62**, 61-130.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Blobel, G. and Sabatini, D.D.** (1971) Ribosome-membrane interaction in eucaryotic cells. In Manson, L.A. (ed.), *Biomembranes*. Plenum Press, New York, Vol. 2, pp. 193-207.
- Bohni, P.C., Deshaies, R.J. and Schekman, R.W.** (1988) *SEC11* is required for signal peptide processing and yeast cell growth. *J Cell Biol*, **106**, 1035-1042.
- Bordi, L., Cioci, F. and Camilloni, G.** (2001) In vivo binding and hierarchy of assembly of the yeast RNA polymerase I transcription factors. *Mol Biol Cell*, **12**, 753-760.
- Bötcher, F., Klinner, U., Köhler, M., Samsonova, I.A., Kapultsevich, J. and Bliznik, X.** (1988) Verfahren zur Futterhefenproduktion in zuckerhaltigen Medien. DD-Patentschrift 278 354 A1, Deutschland.
- Bourgeois, C.A. and Hubert, J.** (1988) Spatial relationship between the nucleolus and the nuclear envelope: structural aspects and functional significance. *Int Rev Cytol*, **111**, 1-52.
- Brake, A.J.** (1989) Secretion of heterologous proteins directed by the yeast alpha-factor leader. *Biotechnology*, **13**, 269-280.
- Bretscher, M.S. and Munro, S.** (1993) Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*, **261**, 1280-1281.
- Brewer, B.J. and Fangman, W.L.** (1988) A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell*, **55**, 637-643.
- Brewer, B.J., Lockshon, D. and Fangman, W.L.** (1992) The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. *Cell*, **71**, 267-276.
- Brodsky, J.L., Werner, E.D., Dubas, M.E., Goeckeler, J.L., Kruse, K.B. and McCracken, A.A.** (1999) The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem*, **274**, 3453-3460.
- Bryant, N.J. and Stevens, T.H.** (1998) Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 230-247.
- Bryk, M., Banerjee, M., Murphy, M., Knudsen, K.E., Garfinkel, D.J. and Curcio, M.J.** (1997) Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes Dev*, **11**, 255-269.

- Bui, D.M., Kunze, I., Horstmann, C., Schmidt, T., Breunig, K.D. and Kunze, G. (1996) Expression of the *Arxula adenivorans* glucoamylase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **45**, 102-106.
- Bush, G.L. and Meyer, D.I. (1996) The refolding activity of the yeast heat shock proteins Ssa1 and Ssa2 defines their role in protein translocation. *J Cell Biol*, **135**, 1229-1237.
- Cannon, K.S. and Helenius, A. (1999) Trimming and readdition of glucose to N-linked oligosaccharides determines calnexin association of a substrate glycoprotein in living cells. *J Biol Chem*, **274**, 7537-7544.
- Caplan, S., Green, R., Rocco, J. and Kurjan, J. (1991) Glycosylation and structure of the yeast MF alpha 1 alpha-factor precursor is important for efficient transport through the secretory pathway. *J Bacteriol*, **173**, 627-635.
- Chang, C.N., Matteucci, M., Perry, L.J., Wulf, J.J., Chen, C.Y. and Hitzeman, R.A. (1986) *Saccharomyces cerevisiae* secretes and correctly processes human interferon hybrid proteins containing yeast invertase signal peptides. *Mol Cell Biol*, **6**, 1812-1819.
- Chen, Y., Pioli, D. and Piper, P.W. (1994) Overexpression of the gene for polyubiquitin in yeast confers increased secretion of a human leucocyte protease inhibitor. *Biotechnology (N Y)*, **12**, 819-823.
- Chiba, Y., Suzuki, M., Yoshida, S., Yoshida, A., Ikenaga, H., Takeuchi, M., Jigami, Y. and Ichishima, E. (1998) Production of human compatible high mannose-type (Man5GlcNAc2) sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 26298-26304.
- Choi, B.K., Bobrowicz, P., Davidson, R.C., Hamilton, S.R., Kung, D.H., Li, H., Miele, R.G., Nett, J.H., Wildt, S. and Gerngross, T.U. (2003) Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5022-5027.
- Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C. and Dubuisson, J. (1998) Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol*, **72**, 3851-3858.
- Chow, T.Y., Ash, J.J., Dignard, D. and Thomas, D.Y. (1992) Screening and identification of a gene, *PSE1*, that affects protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, **101**, 709-719.
- Conesa, A., Jeenes, D., Archer, D.B., van den Hondel, C.A. and Punt, P.J. (2002) Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 846-851.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38.
- Cosson, P. and Letourneur, F. (1997) Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 484-487.
- Cox, H., Mead, D., Sudbery, P., Eland, R.M., Mannazzu, I. and Evans, L. (2000) Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the *PMA1* promoter. *Yeast*, **16**, 1191-1203.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T. and Sogo, J.M. (1993) Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **21**, 2331-2338.
- Darby, N.J. and Creighton, T.E. (1995) Characterization of the active site cysteine residues of the thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, **34**, 16770-16780.
- de Araujo, A.N. and Giugliano, L.G. (2001) Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *BMC Microbiol*, **1**, 25.
- de Virgilio, C., Burckert, N., Neuhaus, J.M., Boller, T. and Wiemken, A. (1993) *CNE1*, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the genes encoding mammalian calnexin and calreticulin. *Yeast*, **9**, 185-188.
- Defosse, P.A., Prusty, R., Kaerberlein, M., Lin, S.J., Ferrigno, P., Silver, P.A., Keil, R.L. and Guarente, L. (1999) Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Mol Cell*, **3**, 447-455.
- Degelmann, A., Muller, F., Sieber, H., Jenzelewski, V., Suckow, M., Strasser, A.W. and Gellissen, G. (2002) Strain and process development for the production of human cytokines in *Hansenula polymorpha*. *FEM Yeast Res*, **2**, 349-361.
- Dhennin-Duthille, I., Masson, M., Damiens, E., Fillebeen, C., Spik, G. and Mazurier, J. (2000) Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line. *J Cell Biochem*, **79**, 583-593.
- Dingwall, C. and Laskey, R.A. (1991) Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci*, **16**, 478-481.
- Dlatic, M. (2002) A model of the replication fork blocking protein Fob1p based on the catalytic core domain of retroviral integrases. *Protein Sci*, **11**, 1274-1277.
- Duden, R., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Winey, M., Byers, B. and Schekman, R. (1994) Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP). Two coatamer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J Biol Chem*, **269**, 24486-24495.
- Elion, E.A. and Warner, J.R. (1986) An RNA polymerase I enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **6**, 2089-2097.
- Ellgaard, L., Molinari, M. and Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, **286**, 1882-1888.
- Ellgaard, L., Riek, R., Herrmann, T., Guntert, P., Braun, D., Helenius, A. and Wuthrich, K. (2001) NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 3133-3138.
- Faber, K., N. and Veenhuis, M. (2002) Foreign gene expression in *Hansenula polymorpha* - approaches for "difficult" proteins. In Gellissen, G. (ed.), *Hansenula polymorpha - biology and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 146-155.
- Farwick, M. (1998) Untersuchungen der Produktausbeute bei der Sekretion heterologer Proteine durch *S. cerevisiae*. *Heinrich Heine Universität*. Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf.

- Fellinger, A.J., Verbakel, J.M., Veale, R.A., Sudbery, P.E., Bom, I.J., Overbeeke, N. and Verrips, C.T. (1991) Expression of the alpha-galactosidase from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) by *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, **7**, 463-473.
- Fernandez, F.S., Trombetta, S.E., Hellman, U. and Parodi, A.J. (1994) Purification to homogeneity of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase from *Schizosaccharomyces pombe* and apparent absence of the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **269**, 30701-30706.
- Ferro-Novick, S., Hansen, W., Schauer, I. and Schekman, R. (1984) Genes required for completion of import of proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol*, **98**, 44-53.
- Ferro-Novick, S. and Jahn, R. (1994) Vesicle fusion from yeast to man. *Nature*, **370**, 191-193.
- Frand, A.R., Cuozzo, J.W. and Kaiser, C.A. (2000) Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol*, **10**, 203-210.
- Fritze, C.E., Verschueren, K., Strich, R. and Easton Esposito, R. (1997) Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *Embo J*, **16**, 6495-6509.
- Garber, R.C., Turgeon, B.G., Selker, E.U. and Yoder, O.C. (1988) Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. *Curr Genet*, **14**, 573-582.
- Gellissen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, **54**, 741-750.
- Gellissen, G. (2002) *Hansenula polymorpha - Biology and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Gellissen, G. and Hollenberg, C.P. (1997) Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* -- a review. *Gene*, **190**, 87-97.
- Gellissen, G. and Melber, K. (1996) Methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals. *Arzneimittelforschung*, **46**, 943-948.
- Gellissen, G., Weydemann, U., Strasser, A.W., Piontek, M., Janowicz, Z.A. and Hollenberg, C.P. (1992) Progress in developing methylotrophic yeasts as expression systems. *Trends Biotechnol*, **10**, 413-417.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., et al (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**, 387-391.
- Gleeson, M.A. (1986) The genetic analysis of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. University of Sheffield, Sheffield.
- Glick, B.S. (1995) Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell*, **80**, 11-14.
- Gritz, L. and Davies, J. (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **25**, 179-188.
- Grote, E., Carr, C.M. and Novick, P.J. (2000) Ordering the final events in yeast exocytosis. *J Cell Biol*, **151**, 439-452.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2519-2524.
- Hamilton, S.R., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R.C., Li, H., Mitchell, T., Nett, J.H., Rausch, S., Stadheim, T.A., Wischnewski, H., Wildt, S. and Gerngross, T.U. (2003) Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science*, **301**, 1244-1246.
- Hammond, C., Braakman, I. and Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 913-917.
- Hampton, R.Y. (2002) ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 476-482.
- Hampton, R.Y. (2003) *IRE1*: a role in UPR regulation of ER degradation. *Dev Cell*, **4**, 144-146.
- Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A. and Akey, C.W. (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*, **87**, 721-732.
- Harder, W. and Brooke, A.G. (1990) Methylotrophic Yeasts. In Verachtert, H., de Mot, R. (ed.), *Yeast biotechnology and biocatalysis*. Marcel Dekker, New York, pp. 395-428.
- Hardwick, K.G., Lewis, M.J., Semenza, J., Dean, N. and Pelham, H.R. (1990) *ERD1*, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. *Embo J*, **9**, 623-630.
- Harmsen, M.M., Bruyne, M.I., Raue, H.A. and Maat, J. (1996) Overexpression of binding protein and disruption of the *PMR1* gene synergistically stimulate secretion of bovine prochymosin but not plant thaumatin in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, **46**, 365-370.
- Harmsen, M.M., Langedijk, A.C., van Tuinen, E., Geerse, R.H., Raue, H.A. and Maat, J. (1993) Effect of a *pmr 1* disruption and different signal sequences on the intracellular processing and secretion of *Cyamopsis tetragonoloba* alpha-galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **125**, 115-123.
- Hekimi, S. and Guarente, L. (2003) Genetics and the specificity of the aging process. *Science*, **299**, 1351-1354.
- Higgins, M.K., Demir, M. and Tate, C.G. (2003) Calnexin co-expression and the use of weaker promoters increase the expression of correctly assembled Shaker potassium channel in insect cells. *Biochim Biophys Acta*, **1610**, 124-132.
- High, S., Lecomte, F.J., Russell, S.J., Abell, B.M. and Oliver, J.D. (2000) Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett*, **476**, 38-41.
- Hill, K.J. and Stevens, T.H. (1995) Vma22p is a novel endoplasmic reticulum-associated protein required for assembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase complex. *J Biol Chem*, **270**, 22329-22336.
- Hockney, R.C. (1994) Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, **12**, 456-463.
- Hollenberg, C.P. and Gellissen, G. (1997) Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr Opin Biotechnol*, **8**, 554-560.

- Holst, B., Bruun, A.W., Kielland-Brandt, M.C. and Winther, J.R. (1996) Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Embo J*, **15**, 3538-3546.
- Hooker, A. and James, D. (1998) The glycosylation heterogeneity of recombinant human IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res*, **18**, 287-295.
- Hubbard, S.C. and Ivatt, R.J. (1981) Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, **50**, 555-583.
- Jakob, C.A., Burda, P., te Heesen, S., Aebi, M. and Roth, J. (1998) Genetic tailoring of N-linked oligosaccharides: the role of glucose residues in glycoprotein processing of *Saccharomyces cerevisiae* in vivo. *Glycobiology*, **8**, 155-164.
- Jannatipour, M., Callejo, M., Parodi, A.J., Armstrong, J. and Rokeach, L.A. (1998) Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry*, **37**, 17253-17261.
- Jantti, J., Aalto, M.K., Oyen, M., Sundqvist, L., Keranen, S. and Ronne, H. (2002) Characterization of temperature-sensitive mutations in the yeast syntaxin 1 homologues Sso1p and Sso2p, and evidence of a distinct function for Sso1p in sporulation. *J Cell Sci*, **115**, 409-420.
- Johnston, M., Hillier, L., Riles, L., Albermann, K., Andre, B., Ansoorge, W., Benes, V., Bruckner, M., Delius, H., Dubois, E., Dusterhoft, A., Entian, K.D., Floeth, M., Goffeau, A., *et al.* (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. *Nature*, **387**, 87-90.
- Julius, D., Schekman, R. and Thorner, J. (1984) Glycosylation and processing of prepro-alpha-factor through the yeast secretory pathway. *Cell*, **36**, 309-318.
- Jungmann, J. and Munro, S. (1998) Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity. *Embo J*, **17**, 423-434.
- Jungmann, J., Rayner, J.C. and Munro, S. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex. *J Biol Chem*, **274**, 6579-6585.
- Juretzek, T., Le Dall, M., Mauersberger, S., Gaillardin, C., Barth, G. and Nicaud, J. (2001) Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, **18**, 97-113.
- Kaiser, C.A., Gimeno, R.E. and Shaywitz, D.A. (1997) Protein Secretion, Membrane Biogenesis and Endocytosis. In Pringle, J.R., Broach, J.R. and Jones, E.W. (eds.), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, Vol. 3 Cell cycle and cell biology, pp. 91-227.
- Karpusas, M., Whitty, A., Runkel, L. and Hochman, P. (1998) The structure of human interferon-beta: implications for activity. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 1203-1216.
- Keil, R.L. and Roeder, G.S. (1984) Cis-acting, recombination-stimulating activity in a fragment of the ribosomal DNA of *S. cerevisiae*. *Cell*, **39**, 377-386.
- Key, L.L., Jr., Rodriguiz, R.M., Willi, S.M., Wright, N.M., Hatcher, H.C., Eyre, D.R., Cure, J.K., Griffin, P.P. and Ries, W.L. (1995) Long-term treatment of osteopetrosis with recombinant human interferon gamma. *N Engl J Med*, **332**, 1594-1599.
- Kim, S.J., Sohn, B.H., Jeong, S., Pak, K.W., Park, J.S., Park, I.Y., Lee, T.H., Choi, Y.H., Lee, C.S., Han, Y.M., Yu, D.Y. and Lee, K.K. (1999) High-level expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice using genomic lactoferrin sequence. *J Biochem (Tokyo)*, **126**, 320-325.
- Kjeldsen, T. (2000) Yeast secretory expression of insulin precursors. *Appl Microbiol Biotechnol*, **54**, 277-286.
- Klabunde, J., Diesel, A., Waschik, D., Gellissen, G., Hollenberg, C.P. and Suckow, M. (2002) Single-step co-integration of multiple expressible heterologous genes into the ribosomal DNA of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **58**, 797-805.
- Kobayashi, T., Heck, D.J., Nomura, M. and Horiuchi, T. (1998) Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev*, **12**, 3821-3830.
- Kobayashi, T. and Horiuchi, T. (1996) A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes Cells*, **1**, 465-474.
- Kondo, K., Saito, T., Kajiwara, S., Takagi, M. and Misawa, N. (1995) A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *J Bacteriol*, **177**, 7171-7177.
- Kunze, G. and Kunze, I. (1994) Characterization of *Arxula adenivorans* strains from different habitats. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **65**, 29-34.
- Kunze, G. and Kunze, I. (1996) *Arxula adenivorans*. In Wolf, K. (ed.), *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 389-409.
- Kurjan, J. and Herskowitz, I. (1982) Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. *Cell*, **30**, 933-943.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73**, 331-371.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lalev, A.I., Abeyrathne, P.D. and Nazar, R.N. (2000) Ribosomal RNA maturation in *Schizosaccharomyces pombe* is dependent on a large ribonucleoprotein complex of the internal transcribed spacer 1. *J Mol Biol*, **302**, 65-77.
- Lalev, A.I. and Nazar, R.N. (2001) A chaperone for ribosome maturation. *J Biol Chem*, **276**, 16655-16659.
- Lane, B.G. and Tamaoki, T. (1967) Studies of the chain termini and alkali-stable dinucleotide sequences in 16 s and 28 s ribosomal RNA from L cells. *J Mol Biol*, **27**, 335-348.

- Langer, J.A. and Pestka, S.** (1984) Purification, bacterial expression, and biological activities of the human interferons. *J Invest Dermatol*, **83**, 128s-136s.
- Le Dall, M.T., Nicaud, J.M. and Gaillardin, C.** (1994) Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet*, **26**, 38-44.
- Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H. and Cosson, P.** (1994) Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*, **79**, 1199-1207.
- Levine, D.W. and Cooney, C.L.** (1973) Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast. *Appl Microbiol*, **26**, 982-990.
- Lin, C.W., Moorefield, B., Payne, J., Aprikian, P., Mitomo, K. and Reeder, R.H.** (1996) A novel 66-kilodalton protein complexes with Rrn6, Rrn7, and TATA-binding protein to promote polymerase I transcription initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 6436-6443.
- Linskens, M.H. and Huberman, J.A.** (1988) Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **8**, 4927-4935.
- Long, E.O. and Dawid, I.B.** (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, **49**, 727-764.
- Lopes, T.S., de Wijs, I.J., Steenhauer, S.I., Verbakel, J. and Planta, R.J.** (1996) Factors affecting the mitotic stability of high-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 467-477.
- Lopes, T.S., Hakkaart, G.J., Koerts, B.L., Raue, H.A. and Planta, R.J.** (1991) Mechanism of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **105**, 83-90.
- Lopes, T.S., Klootwijk, J., Veenstra, A.E., van der Aar, P.C., van Heerikhuizen, H., Raue, H.A. and Planta, R.J.** (1989) High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene*, **79**, 199-206.
- Lusser, M., Gentsch, M., Sdicu, A.M., Bussey, H. and Tanner, W.** (1995) Protein O-glycosylation in yeast. The *PMT2* gene specifies a second protein O-mannosyltransferase that functions in addition to the *PMT1*-encoded activity. *J Biol Chem*, **270**, 2770-2775.
- Maleszka, R. and Clark-Walker, G.D.** (1993) Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number. *Yeast*, **9**, 53-58.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.** (1982) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Matlack, K.E., Plath, K., Misselwitz, B. and Rapoport, T.A.** (1997) Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science*, **277**, 938-941.
- Mayer, A.F., Hellmuth, K., Schlieker, H., Lopez-Ulibarri, R., Oertel, S., Dahlems, U., Strasser, A.W. and van Loon, A.P.** (1999) An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol Bioeng*, **63**, 373-381.
- Melese, T. and Xue, Z.** (1995) The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 319-324.
- Merckelbach, A., Godecke, S., Janowicz, Z.A. and Hollenberg, C.P.** (1993) Cloning and sequencing of the *ura3* locus of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and its use for the generation of a deletion by gene replacement. *Appl Microbiol Biotechnol*, **40**, 361-364.
- Merker, R.J. and Klein, H.L.** (2002) *hpr1*Delta affects ribosomal DNA recombination and cell life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **22**, 421-429.
- Meyer, H.A. and Hartmann, E.** (1997) The yeast *SPC22/23* homolog Spc3p is essential for signal peptidase activity. *J Biol Chem*, **272**, 13159-13164.
- Middelhoven, W.J., de Jong, I.M. and de Winter, M.** (1991) *Arxula adenivorans*, a yeast assimilating many nitrogenous and aromatic compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **59**, 129-137.
- Middelhoven, W.J., Hoogkamer-Te Niet, M.C. and Kreger-Van Rij, N.J.** (1984) *Trichosporon adenivorans* sp. nov., a yeast species utilizing adenine, xanthine, uric acid, putrescine and primary n-alkylamines as the sole source of carbon, nitrogen and energy. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **50**, 369-378.
- Miller, J.D., Wilhelm, H., Gierasch, L., Gilmore, R. and Walter, P.** (1993) GTP binding and hydrolysis by the signal recognition particle during initiation of protein translocation. *Nature*, **366**, 351-354.
- Molinari, M. and Helenius, A.** (2000) Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science*, **288**, 331-333.
- Mori, K.** (2000) Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **101**, 451-454.
- Naehring, J., Kiefer, S. and Wolf, K.** (1995) Nucleotide sequence of the *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis* ribosomal RNA gene cluster and its phylogenetic implications. *Curr Genet*, **28**, 353-359.
- Nakayama, K., Nakanishi-Shindo, Y., Tanaka, A., Haga-Toda, Y. and Jigami, Y.** (1997) Substrate specificity of alpha-1,6-mannosyltransferase that initiates N-linked mannose outer chain elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **412**, 547-550.
- Newman, A.P. and Ferro-Novick, S.** (1990) Defining components required for transport from the ER to the Golgi complex in yeast. *Bioessays*, **12**, 485-491.
- Ng, D.T., Brown, J.D. and Walter, P.** (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, **134**, 269-278.
- Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M. and Hegemann, J.H.** (1996) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast*, **12**, 773-786.
- Nierras, C.R., Liebman, S.W. and Warner, J.R.** (1997) Does *Saccharomyces* need an organized nucleolus? *Chromosoma*, **105**, 444-451.

- Nieto, A., Prieto, J.A. and Sanz, P. (1999) Stable high-copy-number integration of *Aspergillus oryzae* alpha-AMYLASE cDNA in an industrial baker's yeast strain. *Biotechnol Prog*, **15**, 459-466.
- Nishi, T., Fujita, T., Nishi-Takaoka, C., Saito, A., Matsumoto, T., Sato, M., Oka, T., Itoh, S., Yip, Y.K., Vilcek, J., et al. (1985) Cloning and expression of a novel variant of human interferon-gamma cDNA. *J Biochem (Tokyo)*, **97**, 153-159.
- Noiva, R. and Lennarz, W.J. (1992) Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **267**, 3553-3556.
- Norgaard, P., Westphal, V., Tachibana, C., Alsoe, L., Holst, B. and Winther, J.R. (2001) Functional differences in yeast protein disulfide isomerases. *J Cell Biol*, **152**, 553-562.
- Nyberg, G.B., Balcarcel, R.R., Follstad, B.D., Stephanopoulos, G. and Wang, D.I. (1999) Metabolic effects on recombinant interferon-gamma glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, **62**, 336-347.
- Oakes, M., Aris, J.P., Brockenbrough, J.S., Wai, H., Vu, L. and Nomura, M. (1998) Mutational analysis of the structure and localization of the nucleolus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **143**, 23-34.
- Oakes, M., Nogi, Y., Clark, M.W. and Nomura, M. (1993) Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Mol Cell Biol*, **13**, 2441-2455.
- Orlean, P. (1997) Biogenesis of yeast cell wall and surface components. In Pringle, J.R., Broach, J.R. and Jones, E.W. (eds.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, Vol. 3 Cell cycle and cell biology, pp. 229-263.
- Otto, B. (1985) Recombinant human interferons. *Arzneimittelforschung*, **35**, 1750-1752.
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**, 347-358.
- Papendieck, A., Dahlems, U. and Gellissen, G. (2002) Technical enzyme production and whole cell biocatalysis: application of *Hansenula polymorpha*. In Gellissen, G. (ed.), *Hansenula polymorpha - biology and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 255-271.
- Parker, C.G., Fessler, L.I., Nelson, R.E. and Fessler, J.H. (1995) Drosophila UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase: sequence and characterization of an enzyme that distinguishes between denatured and native proteins. *Embo J*, **14**, 1294-1303.
- Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J.J. and Thomas, D.Y. (1995) *Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J Biol Chem*, **270**, 244-253.
- Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C. and Samuel, C.E. (1987) Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem*, **56**, 727-777.
- Petes, T.D. (1979) Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 410-414.
- Philippsen, P., Stotz, A. and Scherf, C. (1991) DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*, **194**, 169-182.
- Piggott, J.R., Watson, M.E., Doel, S.M., Goodey, A.R. and Carter, B.L. (1987) The secretion and post translational modification of interferons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **12**, 561-567.
- Pihlajaniemi, T., Helaakoski, T., Tasanen, K., Myllyla, R., Huhtala, M.L., Koivu, J. and Kivirikko, K.I. (1987) Molecular cloning of the beta-subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *Embo J*, **6**, 643-649.
- Piontek, M., Hagedorn, J., Hollenberg, C.P., Gellissen, G. and Strasser, A.W. (1998) Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **50**, 331-338.
- Pishvaei, B. and Payne, G.S. (1998) Clathrin coats--threads laid bare. *Cell*, **95**, 443-446.
- Reeder, R.H., Guevara, P. and Roan, J.G. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I terminates transcription at the Reb1 terminator in vivo. *Mol Cell Biol*, **19**, 7369-7376.
- Reinders, A., Romano, I., Wiemken, A. and De Virgilio, C. (1999) The thermophilic yeast *Hansenula polymorpha* does not require trehalose synthesis for growth at high temperatures but does for normal acquisition of thermotolerance. *J Bacteriol*, **181**, 4665-4668.
- Remacle, J.E. and Holmberg, S. (1992) A REB1-binding site is required for GCN4-independent ILV1 basal level transcription and can be functionally replaced by an ABF1-binding site. *Mol Cell Biol*, **12**, 5516-5526.
- Riske, F.J., Cullen, B.R. and Chizzonite, R. (1991) Characterization of human interferon-gamma and human interleukin-2 from recombinant mammalian cell lines and peripheral blood lymphocytes. *Lymphokine Cytokine Res*, **10**, 213-218.
- Robinson, A.S., Hines, V. and Wittrup, K.D. (1994) Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology (N Y)*, **12**, 381-384.
- Roggenkamp, R., Hansen, H., Eckart, M., Janowicz, Z.A. and Hollenberg, C.P. (1986) Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* by autonomous replication and integration vectors. *Mol Gen Genet*, **202**, 302-308.
- Romisch, K. (1999) Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci*, **112 ( Pt 23)**, 4185-4191.
- Rose, M.D., Misra, L.M. and Vogel, J.P. (1989) *KAR2*, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/*GRP78* gene. *Cell*, **57**, 1211-1221.
- Rösel, H. and Kunze, G. (1995) Cloning and characterization of a *TEF* gene for elongation factor 1 alpha from the yeast *Arxula adenivorans*. *Curr Genet*, **28**, 360-366.

- Rösel, H. and Kunze, G. (1996) Identification of a group-I intron within the 25S rDNA from the yeast *Arxula adenivorans*. *Yeast*, **12**, 1201-1208.
- Rösel, H. and Kunze, G. (1998) Integrative transformation of the dimorphic yeast *Arxula adenivorans* LS3 based on hygromycin B resistance. *Curr Genet*, **33**, 157-163.
- Rossolini, G.M., Riccio, M.L., Gallo, E. and Galeotti, C.L. (1992) *Kluyveromyces lactis* rDNA as a target for multiple integration by homologous recombination. *Gene*, **119**, 75-81.
- Runkel, L., Meier, W., Pepinsky, R.B., Karpusas, M., Whitty, A., Kimball, K., Brickelmaier, M., Muldowney, C., Jones, W. and Goelz, S.E. (1998) Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res*, **15**, 641-649.
- Ruohonen, L., Toikkanen, J., Tieaho, V., Outola, M., Soderlund, H. and Keranen, S. (1997) Enhancement of protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae* by overproduction of Sso protein, a late-acting component of the secretory machinery. *Yeast*, **13**, 337-351.
- Salmon, V., Legrand, D., Georges, B., Slomianny, M.C., Coddeville, B. and Spik, G. (1997) Characterization of human lactoferrin produced in the baculovirus expression system. *Protein Expr Purif*, **9**, 203-210.
- Sanchez, J.A., Kim, S.M. and Huberman, J.A. (1998) Ribosomal DNA replication in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res*, **238**, 220-230.
- Sareneva, T., Pirhonen, J., Cantell, K. and Julkunen, I. (1995) N-glycosylation of human interferon-gamma: glycans at Asn-25 are critical for protease resistance. *Biochem J*, **308** ( Pt 1), 9-14.
- Schaefer, S., Piontek, M., Ahn, S.-J., Papendieck, A., Janowicz, Z.A. and Gellissen, G. (2001) Recombinant hepatitis B vaccines: characterization of the viral disease and vaccine production in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. In Dembowski, K. (ed.), *Therapeutic proteins - selected case studies*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 245-274.
- Schaefer, S., Piontek, M., Ahn, S.-J., Papendieck, A., Janowicz, Z.A., Timmermans, I. and Gellissen, G. (2002) Recombinant hepatitis B vaccines - disease characterization and vaccine production. In Gellissen, G. (ed.), *Hansenula polymorpha - biology and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 175-210.
- Schaferkordt, J. and Wagner, R. (2001) Effects of base change mutations within an *Escherichia coli* ribosomal RNA leader region on rRNA maturation and ribosome formation. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3394-3403.
- Scheer, U. and Weisenberger, D. (1994) The nucleolus. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 354-359.
- Scherens, B., Dubois, E. and Messenguy, F. (1991) Determination of the sequence of the yeast YCL313 gene localized on chromosome III. Homology with the protein disulfide isomerase (PDI gene product) of other organisms. *Yeast*, **7**, 185-193.
- Schmid, R.D. (2002) *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N. and Pelham, H.R. (1990) ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell*, **61**, 1349-1357.
- Shahinian, S., Dijkgraaf, G.J., Sdicu, A.M., Thomas, D.Y., Jakob, C.A., Aebi, M. and Bussey, H. (1998) Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **149**, 843-856.
- Shusta, E.V., Raines, R.T., Pluckthun, A. and Wittrup, K.D. (1998) Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat Biotechnol*, **16**, 773-777.
- Siddiqi, I., Keener, J., Vu, L. and Nomura, M. (2001) Role of TATA binding protein (TBP) in yeast ribosomal dna transcription by RNA polymerase I: defects in the dual functions of transcription factor UAF cannot be suppressed by TBP. *Mol Cell Biol*, **21**, 2292-2297.
- Sinclair, D.A. and Guarente, L. (1997) Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell*, **91**, 1033-1042.
- Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, E.P. and Welsh, M.J. (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, **417**, 552-555.
- Siverio, J.M. (2002) Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiol Rev*, **26**, 277-284.
- Smith, J.S. and Boeke, J.D. (1997) An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev*, **11**, 241-254.
- Sollner, T. (1995) SNAREs and targeted membrane fusion. *FEBS Lett*, **369**, 80-83.
- Song, X. and Nazar, R.N. (2002) Modification of rRNA as a 'quality control mechanism' in ribosome biogenesis. *FEBS Lett*, **523**, 182-186.
- Sousa, M. and Parodi, A.J. (1995) The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Embo J*, **14**, 4196-4203.
- Spasov, K., Perdomo, L.I., Evakine, E. and Nazar, R.N. (2002) RAC protein directs the complete removal of the 3' external transcribed spacer by the Pac1 nuclease. *Mol Cell*, **9**, 433-437.
- Srivastava, A., Woolford, C.A. and Jones, E.W. (2000) Pep3p/Pep5p complex: a putative docking factor at multiple steps of vesicular transport to the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **156**, 105-122.
- Srivastava, A.K. and Schlessinger, D. (1991) Structure and organization of ribosomal DNA. *Biochimie*, **73**, 631-638.
- Stack, J.H. and Emr, S.D. (1994) Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *J Biol Chem*, **269**, 31552-31562.
- Steffan, J.S., Keys, D.A., Dodd, J.A. and Nomura, M. (1996) The role of TBP in rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*: TBP is required for upstream activation factor-dependent recruitment of core factor. *Genes Dev*, **10**, 2551-2563.

- Stoltenburg, R., Losche, O., Klappach, G. and Kunze, G.** (1999) Molecular cloning and expression of the *ARFC3* gene, a component of the replication factor C from the salt-tolerant, dimorphic yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Curr Genet*, **35**, 8-13.
- Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., Deutzmann, R. and Tanner, W.** (1993) *PMT1*, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8164-8168.
- Straight, A.F., Shou, W., Dowd, G.J., Turck, C.W., Deshaies, R.J., Johnson, A.D. and Moazed, D.** (1999) Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell*, **97**, 245-256.
- Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S. and Davis, R.W.** (1979) High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1035-1039.
- Subramani, S.** (1993) Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol*, **9**, 445-478.
- Suckow, M. and Hollenberg, C.P.** (1998) The activation specificities of wild-type and mutant Gcn4p in vivo can be different from the DNA binding specificities of the corresponding bZip peptides in vitro. *J Mol Biol*, **276**, 887-902.
- Suzuki, Y.A., Kelleher, S.L., Yalda, D., Wu, L., Huang, J., Huang, N. and Lonnerdal, B.** (2003) Expression, characterization, and biologic activity of recombinant human lactoferrin in rice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **36**, 190-199.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J. and Stahl, F.W.** (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, **33**, 25-35.
- Tate, C.G., Whiteley, E. and Betenbaugh, M.J.** (1999) Molecular chaperones stimulate the functional expression of the cocaine-sensitive serotonin transporter. *J Biol Chem*, **274**, 17551-17558.
- Thomson, A.** (1998) *The Cytocine Handbook*. Academic Press, San Diego, CA.
- Trumel, S., Leger-Silvestre, I., Gleizes, P.E., Teulieres, F. and Gas, N.** (2000) Assembly and functional organization of the nucleolus: ultrastructural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Mol Biol Cell*, **11**, 2175-2189.
- Ulvatne, H., Haukland, H.H., Olsvik, O. and Vorland, L.H.** (2001) Lactoferricin B causes depolarization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* ATCC 25922 and fusion of negatively charged liposomes. *FEBS Lett*, **492**, 62-65.
- Uzawa, S. and Yanagida, M.** (1992) Visualization of centromeric and nucleolar DNA in fission yeast by fluorescence in situ hybridization. *J Cell Sci*, **101**, 267-275.
- Vad, R., Moe, E., Saga, K., Kvinnsland, A.M. and Oyen, T.B.** (1998) High-level production of human parathyroid hormone (hPTH) by induced expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif*, **13**, 396-402.
- van Berkel, P.H., Welling, M.M., Geerts, M., van Veen, H.A., Ravensbergen, B., Salaheddine, M., Pauwels, E.K., Pieper, F., Nuijens, J.H. and Nibbering, P.H.** (2002) Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat Biotechnol*, **20**, 484-487.
- van der Heide, M., Hollenberg, C.P., van der Klei, I.J. and Veenhuis, M.** (2002) Overproduction of BiP negatively affects the secretion of *Aspergillus niger* glucose oxidase by the yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **58**, 487-494.
- van der Klei, I.J., Harder, W. and Veenhuis, M.** (1991) Biosynthesis and assembly of alcohol oxidase, a peroxisomal matrix protein in methylotrophic yeasts: a review. *Yeast*, **7**, 195-209.
- van der Walt, J.P., Smith, M.T. and Yamada, Y.** (1990) *Arxula* gen. nov. (*Candidaceae*), a new anamorphic, arthroconidial yeast genus. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **57**, 59-61.
- Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M.A. and Williams, D.B.** (1998) Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry*, **37**, 3480-3490.
- Veenhuis, M., van der Klei, I.J., Titorenko, V. and Harder, W.** (1992) *Hansenula polymorpha*: an attractive model organism for molecular studies of peroxisome biogenesis and function. *FEMS Microbiol Lett*, **79**, 393-403.
- Verbeet, M.P., Klootwijk, J., van Heerikhuizen, H., Fontijn, R.D., Vreugdenhil, E. and Planta, R.J.** (1984) A conserved sequence element is present around the transcription initiation site for RNA polymerase A in Saccharomycetozoa. *Nucleic Acids Res*, **12**, 1137-1148.
- Wai, H.H., Vu, L., Oakes, M. and Nomura, M.** (2000) Complete deletion of yeast chromosomal rDNA repeats and integration of a new rDNA repeat: use of rDNA deletion strains for functional analysis of rDNA promoter elements in vivo. *Nucleic Acids Res*, **28**, 3524-3534.
- Walch-Solimena, C., Collins, R.N. and Novick, P.J.** (1997) Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *J Cell Biol*, **137**, 1495-1509.
- Walsh, G.** (2000) Biopharmaceutical benchmarks. *Nat Biotechnol*, **18**, 831-833.
- Ward, P.P., Lo, J.Y., Duke, M., May, G.S., Headon, D.R. and Conneely, O.M.** (1992) Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology (N Y)*, **10**, 784-789.
- Warner, J.R.** (1989) Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, **53**, 256-271.
- Wartmann, T., Bellebna, C., Boer, E., Bartelsen, O., Gellissen, G. and Kunze, G.** (2003a) The constitutive *AHSB4* promoter—a novel component of the *Arxula adenivorans*-based expression platform. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Wartmann, T., Gellissen, G. and Kunze, G.** (2001) Regulation of the *AEFG1* gene, a mitochondrial elongation factor G from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Curr Genet*, **40**, 172-178.
- Wartmann, T. and Kunze, G.** (2000) Genetic transformation and biotechnological application of the yeast *Arxula adenivorans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **54**, 619-624.
- Wartmann, T., Rosel, H., Kunze, I., Bode, R. and Kunze, G.** (1998) *AILV1* gene from the yeast *Arxula adenivorans* LS3—a new selective transformation marker. *Yeast*, **14**, 1017-1025.
- Wartmann, T., Stephan, U.W., Bube, I., Boer, E., Melzer, M., Manteuffel, R., Stoltenburg, R., Guengerich, L., Gellissen, G. and Kunze, G.** (2002) Post-translational modifications of the *AFET3* gene product: a component of the iron transport system in budding cells and mycelia of the yeast *Arxula adenivorans*. *Yeast*, **19**, 849-862.

- Wartmann, T., Stoltenburg, R., Boer, E., Sieber, H., Bartelsen, O., Gellissen, G. and Kunze, G. (2003b) The *ALEU2* gene--a new component for an *Arxula adenivorans*-based expression platform. *FEM Yeast Res*, **3**, 223-232.
- Waschk, D., Klabunde, J., Suckow, M. and Hollenberg, C.P. (2002) Characteristics of the *Hansenula polymorpha* genome. In Gellissen, G. (ed.), *Hansenula polymorpha - biology and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 95-104.
- Weinstock-Guttman, B. and Jacobs, L.D. (2000) What is new in the treatment of multiple sclerosis? *Drugs*, **59**, 401-410.
- Wendland, J., Pohlmann, R., Dietrich, F., Steiner, S., Mohr, C. and Philippsen, P. (1999) Compact organization of rRNA genes in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Curr Genet*, **35**, 618-625.
- Wery, J., Gutker, D., Renniers, A.C., Verdoes, J.C. and van Ooyen, A.J. (1997) High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Gene*, **184**, 89-97.
- Whitchurch, C.B., Erova, T.E., Emery, J.A., Sargent, J.L., Harris, J.M., Semmler, A.B., Young, M.D., Mattick, J.S. and Wozniak, D.J. (2002) Phosphorylation of the *Pseudomonas aeruginosa* response regulator AlgR is essential for type IV fimbria-mediated twitching motility. *J Bacteriol*, **184**, 4544-4554.
- Wickerham, L.J. (1970) *Hansenula H. et P. Sydow*. In Lodder, J. (ed.), *The Yeasts, a taxonomic study*. North-Holland Publishing, Amsterdam, pp. 226-315.
- Woodman, P.G. (1997) The roles of NSF, SNAPs and SNAREs during membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*, **1357**, 155-172.
- YaDeau, J.T., Klein, C. and Blobel, G. (1991) Yeast signal peptidase contains a glycoprotein and the Sec11 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 517-521.
- Yang, X.X., Wartmann, T., Stoltenburg, R. and Kunze, G. (2000) Halotolerance of the yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **77**, 303-311.
- Zamenhoff, S. (1957) Preparation and assay of desoxyribonucleic acids from animals tissue. *Methods Enzymol*, **3**, 696-704.
- Zimmermann, R. (1998) The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *Biol Chem*, **379**, 275-282.

## 8 Publikationen

Folgende Publikationen wurden im Laufe der vorgelegten Arbeit veröffentlicht:

- Klabunde, J., Kunze, G., Gellissen, G. and Hollenberg C.P. (2003). Integration of heterologous genes in several yeast species using vectors containing a *Hansenula polymorpha*-derived rDNA-targeting element. *FEMS Yeast Res*, **4**, 185-93.
- Klabunde, J., Diesel, A., Waschk, D., Gellissen, G., Hollenberg, C.P. and Suckow, M. (2002) Single-step co-integration of multiple expressible heterologous genes into the ribosomal DNA of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **58**, 797-805.
- Waschk, D., Klabunde, J., Suckow, M. and Hollenberg, C.P. (2002) Characteristics of the *Hansenula polymorpha* genome. In Gellissen, G. (ed.), *Hansenula polymorpha - biology and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 95-104.

## 9 Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Cornelis. P. Hollenberg für die Bereitstellung des Themas, für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Mikrobiologie durchzuführen und für die freundliche Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. G. Gellissen danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und der hilfreichen Betreuung im Laufe der letzten vier Jahre.

Herrn Dr. Andreas Kranz danke ich für seine zahlreichen wertvollen Ratschläge und die tolle Zusammenarbeit im Labor.

Ein besonderer Dank gilt den anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, die vielen hilfreichen Diskussionen und ein angenehmes Arbeitsklima.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft.