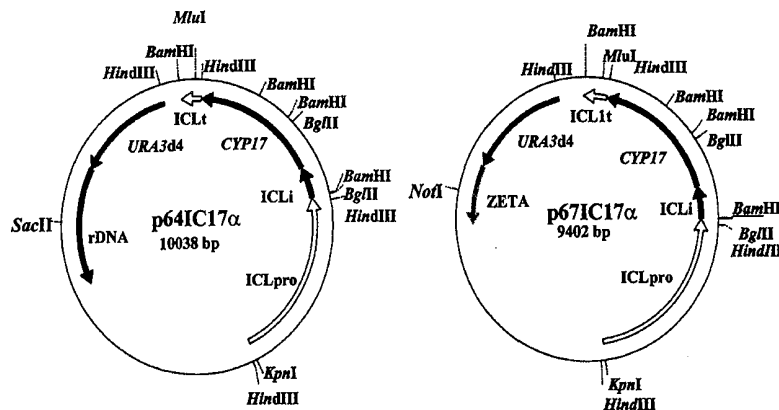


<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/00</b></p>	<b>A2</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/03008</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Januar 2000 (20.01.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02174</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Juli 1999 (09.07.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 30 905.8      10. Juli 1998 (10.07.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder: TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN [DE/DE]; Dezernat 5, SG 5.1, Mommsenstrasse 13, D-01069 Dresden (DE).</p> <p>(72) Erfinder: JURETZEK, Thomas; Bahnhofstrasse 5, D-03130 Spremberg (DE). MAUERSBERGER, Stephan; Wachsbleichstrasse 47, D-01067 Dresden (DE). BARTH, Gerold; Moritzschachstrasse 34, D-01189 Dresden (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN; Sender, Frank, Dezernat 5, SG 5.1, D-01062 Dresden (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: PL, RU, UA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	

(54) Title: RECOMBINANT HAPLOID OR DIPLOID YARROWIA LIPOLYTICA CELLS FOR THE FUNCTIONAL HETEROLOGOUS EXPRESSION OF CYTOCHROME P450 SYSTEMS

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTE HAPLOIDE ODER DIPLOIDE YARROWIA LIPOLYTICA ZELLEN ZUR FUNKTIONELLEN HETEROLOGEN EXPRESSION VON CYTOCHROM P450 SYSTEMEN



(57) Abstract

The invention relates to recombinant haploid or diploid *Yarrowia* (*Y. lipolytica*) cells for the functional heterologous expression of cytochrome P450 (P450) systems, plasmids for the transformation of said cells, a method for producing said cells and to the use of same for the transformation of substances. The cells contain plasmids with expression cassettes which consist of promoters and terminators which are functionally active in *Y. lipolytica*, and genes or cDNA for expressing oligopeptides or proteins and therefore develop properties which are used for substance transformation.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft rekombinante haploide oder diploide *Yarrowia* (*Y. lipolytica*) Zellen zur funktionellen heterologen Expression von Cytochrom P450 (P450) Systemen, Plasmide zur Transformation der Zellen, ein Verfahren zur Herstellung der Zellen sowie die Verwendung dieser zur Stoffumwandlung. Die Zellen beinhalten Plasmide mit Expressionskassetten, wobei die Expressionskassetten aus in *Y. lipolytica* funktionell aktiven Promotoren und Terminatoren und Genen oder cDNA zur Expression von Oligopeptiden oder Proteinen bestehen und damit Eigenschaften ausbilden, die zur Stoffumwandlung ausgenutzt werden.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshon	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Républik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **Rekombinante haploide oder diploide *Yarrowia lipolytica* Zellen zur funktionellen heterologen Expression von Cytochrom P450 Systemen**

### **Beschreibung**

5

Die Erfindung betrifft rekombinante haploide oder diploide *Yarrowia (Y.) lipolytica* Zellen zur funktionellen heterologen Expression von Cytochrom P450 (P450) Systemen, Plasmide zur Transformation der Zellen, ein Verfahren zur Herstellung der Zellen sowie die Verwendung dieser zur Stoffumwandlung.

10

Monooxygenasen vom Cytochrom P450 Typ sind in Organismen der gesamten phylogenetischen Skala verbreitet. Sie katalysieren NAD(P)H- und O<sub>2</sub>-abhängige Reaktionen in einer Vielzahl von anabolen und katabolen Stoffwechselwegen. Cytochrom P450 Enzyme katalysieren die Oxidation zahlreicher physiologischer Substrate wie Steroide, Fettsäuren, Eicosanoide u.a. Lipidmetabolite. Viele P450 Formen metabolisieren Xenobiotica wie Arzneimittel, Alkohol, Procarcinogene, Antioxidantien, organische Lösungsmittel und Anästhetika. Gegenwärtig sind die Primärsequenzen von mehr als 600 verschiedenen P450 Formen bekannt. Sie werden aufgrund charakteristischer Sequenzmerkmale zu einer Super-Genfamilie (*CYP*)  
15 zusammengefaßt (Übersichten bei Nelson et al. 1993 DNA Cell Biol 12:1-38; Nelson et al. 1996 Pharmacogenetics 6:1-42).

20

P450 Systeme zeichnen sich durch ihre hohe Regio- und Stereoselektivität und durch die Oxidation einer großen Vielfalt von meist hydrophoben Substraten aus. P450  
25 katalysierte Biotransformationsreaktionen sind deshalb von besonderem Interesse für eine biotechnologische Anwendung.

30

Die heterologe Expression von Cytochrom P450 cDNA's oder Genen in einem geeigneten Wirt ist ein vielversprechender Weg zur Nutzung der Vielfalt der katalytischen Aktivität von P450 Enzymen in Biotransformationssystemen.

30

Die heterologe Expression ist oft auch der einzige gangbare Weg zur Charakterisierung individueller P450 Formen, bedingt durch die gleichzeitige

Anwesenheit meist mehrerer P450 Isoenzyme mit unterschiedlichen Substratspezifitäten in tierischen und pflanzlichen Geweben und Mikroorganismen.

Die heterologe Expression von membrangebundenen P450 Formen ist heute sowohl in  
5 Bakterien (*E. coli*), in Hefen (meist *Saccharomyces cerevisiae*) als auch in  
Säugerzellkulturen bzw. Insektenzellkulturen möglich (Übersichten bei Yabusaki und  
Ohkawa 1991, In: Frontiers in Biotransformation, Ruckpaul K, Rein H, eds, Vol 4, pp  
87-126, Akademie Verlag, Berlin; Guengerich et al. 1991 Methods Enzymol 206:130;  
Gonzalez und Korzekwa 1995 Annu Rev Pharmacol Toxicol 1995;35:369-390).

10

Die Expression in Zellkulturen wird heute gut beherrscht, ist jedoch für eine  
biotechnologische Nutzung durch meist geringe Expressionsraten und hohen Aufwand  
für die Kulturführung weniger gut geeignet.

15 Im Gegensatz zu den sehr guten Ergebnissen mit löslichen bakteriellen P450 Formen  
(P450<sub>CAM</sub>, P450<sub>BM3</sub>) erfordert die Expression membranständiger P450 Enzyme in  
Bakterien (*E. coli*) einen hohen Aufwand relativ komplizierter gentechnischer  
Modifikationen am P450 Gen selbst (Barnes HJ, Arlotto MP, Waterman MR 1991 Proc  
Natl Acad Sci USA 88: 5597-5601). Für die funktionelle Expression in *E. coli* ist  
20 außerdem die zusätzliche Bereitstellung von ebenfalls membranständigen  
Elektronentransferkomponenten erforderlich.

Dagegen sind Hefen aufgrund ihrer eukaryotischen Zellstruktur gut geeignet, ER-  
gebundene P450 Formen funktionell aktiv zu exprimieren. Sie bieten darüber hinaus  
25 aufgrund ihrer relativ einfachen technologischen Handhabbarkeit sowie genetischen  
und gentechnischen Manipulierbarkeit günstige Voraussetzungen für die Schaffung  
von Biotransformationssystemen. Die Hefezellen können dazu als "rekombinante  
Zellfabriken" zu hohen Zellkonzentrationen (Hochzelldichtefermentation)  
heranwachsen und zur Biotransformation eingesetzt werden. Für die funktionelle  
30 heterologe Expression membrangebundener P450 Formen aus Säugern, Pflanzen und  
eukaryotischen Mikroorganismen wird bislang hauptsächlich die Hefe  
*Saccharomyces cerevisiae* genutzt. Nach ersten erfolgreichen Versuchen zur  
Expression einer cDNA von P450c der Rattenleber unter Kontrolle des *ADH1*-

Promotors (Oeda et al. 1985 DNA 4: 203-210) wurden eine große Anzahl unterschiedlicher P450 Formen (ER-ständige sowie mitochondriale P450 Isoformen) in *S. cerevisiae* unter Kontrolle verschiedener starker Promotoren (*ADH1*, *CUP1*, *PHO5*, *GAL7*, *GAL10*; *GAL-CYC*, *PGK* u.a.) funktionell exprimiert (Übersichten dazu:  
5 Yabusaki und Ohkawa 1991 In: Frontiers in Biotransformation, Ruckpaul K, Rein H, eds, Vol 4, pp 87-126, Akademie Verlag, Berlin; Urban et al. 1990 Biochemie 72: 463-472, Guengerich et al. 1991 Methods Enzymol 206:130; Schunck et al. 1991 Eur J Cell Biol 55: 336-345; Renaud et al. 1993 Toxicology 22: 39-52; Gonzalez und Korzekwa 1995 Annu Rev Pharmacol Toxicol 1995;35:369-390; Dumas et al. 1996 Eur J  
10 Biochem 238: 495-504; Pompon et al. 1996 Methods Enzymol 272:51-64; Pompon et al. 1997 J Hepatol 26S2:81-85; Duport et al. 1998 Nat Biotechnol 16: 186-189).

Die Hefe *S. cerevisiae* hat den Nachteil, daß die relativ geringen Konzentrationen und Aktivitäten der eigenen mikrosomalen Elektronentransportkomponenten (NADPH-P450  
15 Reduktase, NADH-Cytochrome  $b_5$  Reduktase, Cytochrome  $b_5$ ) für die katalytische Aktivität hoher Konzentrationen eines heterologen P450 zum limitierenden Faktor werden können. Es wurde deshalb mit unterschiedlichen Strategien und Erfolg versucht, die Effektivität des mikrosomalen Elektronentransfers auf das P450 zu erhöhen - durch zusätzliche Expression der Gene von verschiedenen NADPH-P450  
20 Reduktasen und in ausgewählten Fällen von Cytochrom  $b_5$  bzw. durch Fusion der Reduktase- und P450 Strukturgenen (Urban et al. 1990 Biochemie 72: 463-472, Sanglard et al. 1990 Biocatalysis 4: 19-28; Sakaki et al. 1990 DNA Cell Biol 9: 603-614; Yabusaki und Ohkawa 1991 In: Frontiers in Biotransformation, Ruckpaul K, Rein H, eds, Vol 4, pp 87-126, Akademie Verlag, Berlin; Urban et al. 1993 Biochem Soc  
25 Trans 21: 1028; Pompon et al. Patent FR-PS-2679 249; Zimmer et al. 1995 DNA Cell Biol 14: 619-628; Zimmer et al. 1995 Patent DE 19507546).

Ein besonderer Nachteil von *Saccharomyces* Hefen ist die relativ geringe Aufnahmekapazität bzw. Aufnahme rate für lipophile Verbindungen wie Fettsäuren und  
30 Alkane (Kohlwein und Paltauf 1984 Biochim Biophys Acta 792: 310-317; Dell'Angelica et al. 1992 Comp Biochem Physiol 102B: 261-265; Dell'Angelica et al. 1996 Biochem Mol Biol Int 39: 439-445). Die katalytischen Leistungen von heterologen P450 in *S. cerevisiae* sind demzufolge meist gering, was offensichtlich mit einem

unzureichenden Substrat- und Elektronentransport in dieser Hefe in Zusammenhang steht.

5 Deshalb wurden in jüngster Zeit neben *S. cerevisiae* auch andere Hefen als Wirte für die heterologe Expression von P450 getestet. Für die Hefe *Kluyveromyces lactis* wurde über die funktionelle Expression, jedoch mit geringer Aktivität, von P450<sub>SCC</sub> und von Adrenodoxin unter Kontrolle des Lactasepromotors berichtet (Mencke et al. 1990, 19 th FEBS-Meeting, Budapest August 1990, Abstracts).

10 In der methanolverwertenden Hefe *Pichia pastoris* gelang die funktionelle Expression des Cytochrom P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxylase/C17,20-lyase) aus einem Haifisch (*Squalus acanthias*) unter Kontrolle des AOX1-Promotors (Trant JM 1996 Arch Biochem Biophys 326:8-14). Für die Expression wird eine Kultivierung dieser Hefe auf Methanol benötigt. Das heterologe P450 zeigt jedoch eine relativ geringe spezifische Aktivität.

15

Die alkanverwertenden Hefen, wie z.B. *Candida maltosa*, *C. tropicalis* oder *Y. lipolytica*, zeichnen sich durch eine hohe katalytische Aktivität ihrer eigenen P450 Systeme (*in vivo* Turnoverzahlen von 1-2  $\mu\text{mol/nmol P450} \times \text{min}$  für die wirtseigenen alkaninduzierbaren P450) aus. Für die Hefen *Y. lipolytica* und *C. maltosa* sind gut entwickelte Wirts-Vektor-Systeme vorhanden (Übersichten in: Barth und Gaillardin 1996 Chapter 10 *Yarrowia lipolytica* In: Wolf K /Ed/ Non-conventional Yeasts in Biotechnology, Springer Verlag Berlin, pp 313-388; Barth und Gaillardin 1997 FEMS Microbiol Rev 19:219-237; Mauersberger et al. 1996 Chapter 12. *Candida maltosa*. In: Non-conventional Yeasts in Biotechnology, Wolf K, ed, Springer Verlag, Heidelberg, 20 pp 411-580).

25

Die *Candida* Hefen sind jedoch insgesamt durch ihre vom universellen genetischen Code abweichende Translation des Codons CUG als Serin anstelle von Leucin insgesamt keine gut geeigneten Wirte für die funktionelle heterologe Expression (Zimmer und Schunck 1995 Yeast 11: 33-41; Sugiyame et al Yeast 11: 43-52; 30 Übersicht in Mauersberger et al. 1996 Chapter 12. *Candida maltosa*. In: Non-conventional Yeasts in Biotechnology, Wolf K, ed, Springer Verlag, Heidelberg, pp 411-580). Das *C. maltosa* System ist deshalb nur für die Expression homologer P450 unter Kontrolle der homologen Promotoren *GAL1-GAL10*, *PGK1* und *ALK* gut

geeignet, nicht jedoch für die Expression heterologer Proteine (Ohkuma et al. 1995 Biochim Biophys Acta **1236**: 163-169).

Die alkanverwertende Hefe *Y. lipolytica* wurde in den zurückliegenden Jahren  
5 biochemisch, genetisch und molekularbiologisch sehr intensiv untersucht (Übersichten  
in Weber und Barth 1988, CRC Crit Rev Biotechnol 7: 281-337; Gaillardin und Heslot  
1988 J Basic Microbiol 28: 161-174; Barth und Gaillardin 1996 Chapter 10  
*Yarrowia lipolytica* In: Wolf K /Ed/ Non-conventional Yeasts in Biotechnology, Springer  
Verlag Berlin, pp 313-388; Barth und Gaillardin 1997 FEMS Microbiol Rev 19:219-  
10 237).

Es sind Transformationssysteme mit integrativen (Davidow et al. 1985 Curr Genet 10:  
39-48; Gaillardin et al. 1985 Curr Genet 10: 49-58) und autonom replizierenden  
(Fournier et al. 1991 Yeast 7: 25-36, Fournier et al. 1993) Plasmiden bekannt.

Für die Nutzung dieser Hefe zur heterologen Expression wurden neben dem gut  
15 untersuchten Expressionssystem mit dem *XPR2*-Promotor andere Vektoren mit  
regulierbaren starken Promotoren entwickelt, beispielsweise die Promotoren des Gens  
*ICL1* der Isocitratlyase aus dem Glyoxylatzyklus (Barth und Scheuber 1993 Mol Gen  
Genet 241: 422-430; Juretzek et al. 1995, Patent DE 195 25 282.9) und des Gens  
*POT1* der Thiolase der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation (Berninger et al. 1993 Eur J  
20 Biochem 216: 607-613). Bisher wurden eine Reihe von heterologen Proteinen in der  
Hefe *Y. lipolytica* exprimiert, wie z.B. der Blut-Gerinnungsfaktor XIIIa des Menschen  
(Tharaud et al. 1992 Gene 121: 111-119). Weitere Beispiele sind in Barth und  
Gaillardin 1996 (Chapter 10 *Yarrowia lipolytica* In: Wolf K /Ed/ Non-conventional  
Yeasts in Biotechnology, Springer Verlag Berlin, pp 313-388) sowie in Barth und  
25 Gaillardin 1997 (FEMS Microbiol Rev 19: 219-237) beschrieben.

Ein weiteres Problem stellt die Tatsache dar, daß natürliche high-copy Plasmide, wie  
sie in *S. cerevisiae* gefunden wurden, in *Y. lipolytica* nicht bekannt sind und nur  
artifizielle autonom replizierende low-copy Plasmide existieren. Die autonom  
30 replizierenden Plasmide vom Typ pINA237 (*LEU2 CEN-ARS18*) oder pINA443 (*URA3*  
*ARS68-CEN*) tragen *ARS/CEN*-Sequenzen und kommen daher nur mit 1-2 Kopien pro  
Zelle vor. Plasmide, die nur die *ARS*-Sequenzen tragen, können mit mehreren Kopien  
pro Zelle vorkommen. Transformanten, die solche Plasmide tragen, sind aber relativ

instabil und verlieren nach wenigen Generationswechseln diese Plasmide (Fournier et al. 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90: 4912-4916). Plasmide, die ins Genom integriert werden, zeichnen sich auch unter nichtselektiven Kultivierungsbedingungen durch eine hohe Stabilität aus. Die bekannten Plasmide dieser Art werden in der Regel in die mutierten Gene *leu2*, *lys5*, *ura3* oder *xpr2* [Locus: mutierte Gene *LEU2*, *LYS5*, *URA3* oder *XPR2*] integriert und komplementieren die entsprechende Mutation. Diese Plasmide werden als eine Kopie ins Genom integriert.

Die als integrative multi-copy Plasmide geeigneten Vektoren tragen dagegen das Selektionsmarkergen *URA3*, dessen Promotorfunktion durch Deletion (*URA3d*) eingeschränkt ist. Eine Komplementation der entsprechenden *ura3* Mutation wird erst durch eine erhöhte Kopiezahl pro Zelle erreicht.

Die ersten für *Y. lipolytica* beschriebenen integrativen multi-copy Plasmide pINA764 bis pINA774 (Le Dall et al. 1994 Curr Genet 26:38-44; Barth und Gaillardin 1996 Chapter 10 *Yarrowia lipolytica* In: Wolf K /Ed/ Non-conventional Yeasts in Biotechnology, Springer Verlag Berlin, pp 313-388; Barth und Gaillardin 1997 FEMS Microbiol Rev 19:219-237) werden in die chromosomalen repetitiven Sequenzen der ribosomalen DNA (rDNA G Einheit, Fournier et al. 1986 Gene 42:273-282) integriert. Als Selektionsmarkergen dient das Gen *URA3d*, dessen deletierte Promotorbereiche nur 41 bis 6 Basepaare "upstream" vom Startcodon ATG lang sind. Die durchschnittliche stabile Kopiezahl liegt zwischen 5 (pINA767) und 13 (pINA772) Kopien pro Zelle. Mit dem Plasmid pINA773 konnten ursprünglich 20-60 Kopien pro Zelle integriert werden. Ein entscheidender Nachteil dieser Plasmide ist, daß unter induzierenden und nichtselektiven Expressionsbedingungen keine stabilen Kopiezahlen erhalten werden konnten bzw. die integrierten Plasmidkopien verloren gingen. Ein weiterer Nachteil dieser Plasmide ist, die Verwendung des Plasmides pBR322 als Basisvektor für die Amplifikation in *E. coli*, was eine geringe Plasmidkopiezahl bedingt, die nur durch Zusatz von Chloramphenicol erhöht werden kann. Dadurch wird die Gewinnung der Plasmide aufwendiger und langwieriger.

Eine andere Serie von integrativen Plasmiden (pINA970 - *URA3d*, ZETA, *XPR2*<sub>Pro</sub>-*XPR2*<sub>Ter</sub>, ermöglicht 5-15 Kopien pro Zelle; pINA1066 bzw. pINA1067 enthalten

URA3d1 bzw. URA3d4, sowie ZETA,  $XPR2_{Pro}$ - $XPR2_{Ter}$ ; (Le Dall et al. 1995 Abstract "First *Yarrowia lipolytica* International Meeting" Paris-Grignon; Barth und Gaillardin 1996 Chapter 10 *Yarrowia lipolytica* **In:** Wolf K /Ed/ Non-conventional Yeasts in Biotechnology, Springer Verlag Berlin, pp 313-388) enthält das LTR-Element ZETA  
5 (long terminal repeat) des Retrotransposons Ylt1 von *Y. lipolytica* (EMBL X74146, Schmid-Berger et al. 1994 J Bacteriol 176:2477-2482) als Zielsequenz für die Integration ins Genom. Die Plasmide pINA1066 und pINA1067 (rDNA-Varianten pINA1064 und pINA1065) sind zur Expression von homologen und heterologen Proteinen unter Kontrolle des  $XPR2$ -Promotors geeignet. Diese Plasmide besitzen  
10 aber ebenfalls die gleichen Nachteile wie die Vektoren pINA776 bis pINA773. Weiterhin besitzen sie keine "Multiple cloning site". Die Komplettierung der Expressionskassette ist unter Nutzung der Schnittstellen *SrfI*, *Apal* und *BglII* möglich. Ein Austausch von Expressionskassetten zur Expression von Proteinen unter Kontrolle anderer Promotoren ist aber erst in mehreren Klonierungsschritten möglich. Daher ist  
15 es von großem Interesse, Plasmide zu entwickeln, die einen Austausch von DNA-Modulen (Expressionskassetten, Genbanken usw.) erlauben und zur multiplen Integration in das Genom geeignet sind.

Die Aufgabe besteht nun darin, ein neues, gut handhabbares System zur heterologen  
20 funktionellen Expression von Cytochrom P450 Genen in der Hefe *Yarrowia lipolytica* zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch rekombinante haploide oder diploide  
*Y. lipolytica* Zellen mit den im Anspruch 1 genannten Merkmalen gelöst. Vorteilhafte  
25 Ausstattungen der Zellen ergeben sich aus den abhängigen Unteransprüchen 2 bis 11.

Die Erfindung wird weiterhin durch Plasmide zur Erzeugung rekombinanter haploider  
oder diploider *Y. lipolytica* Zellen mit den im Anspruch 12 genannten Merkmalen  
30 gelöst. Vorteilhafte Ausführungen der Plasmide ergeben sich aus den abhängigen Unteransprüchen 13 bis 19.

Die Erfindung wird außerdem durch ein Verfahren zur Herstellung rekombinanter haploider oder diploider *Y. lipolytica* Zellen mit den im Anspruch 20 genannten Merkmalen gelöst. Vorteilhafte Varianten des Verfahrens ergeben sich aus den abhängigen Unteransprüchen 21 bis 23.

- 5 Verwendungen der rekombinanten haploide oder diploide *Y. lipolytica* Zellen sind in den Ansprüchen 24 und 25 beschrieben.

Mit der Bereitstellung von neuen low-copy und high-copy Plasmiden, geeignet zur autonomen Replikation oder zur multiplen Integration von Expressionskassetten, die unter Kontrolle eines regulierbaren Promotors (beispielsweise des *ICL1* Gens, kodierend für die Isocitratlyase) der Hefe *Y. lipolytica* stehen, lassen sich rekombinante haploide oder diploide *Y. lipolytica* Zellen erzeugen. Überraschend wurde dabei festgestellt, daß diese Plasmide mit hoher Kopiezahl ins Genom integrieren und unabhängig von den Integrationsorten und Kultivierungsbedingungen stabil in *Yarrowia lipolytica*-Transformanden erhalten werden können.

Die so gewonnenen Zellen sind geeignet zur mikrobiellen Oxidation von hydrophoben Verbindungen und führen in einfacher Kultivierung der rekombinanten Hefen zu guten Ausbeuten des Oxidationsproduktes, insbesondere von Steroiden und anderen hydrophoben Verbindungen.

Die Hefe *Y. lipolytica* wird durch Transformation mit neuen Expressionsvektoren (Expressionskassetten tragende Plasmide) in das Genom so verändert, daß *Y. lipolytica* Zellen in der Lage sind, durch einfache Kulturführung auf Medien mit geeigneter Kohlenstoffquelle zur funktionellen Expression von heterologen Proteinen, insbesondere Cytochrom P450 Enzymen, zu gelangen. Diese heterologen Cytochrom P450 Enzyme können in *Y. lipolytica* Zellen besser als in anderen bisher getesteten Hefen besonders effektiv zu mikrobiellen Stoffwandlungsprozessen eingesetzt werden.

30 Weiterhin werden durch die Plasmide gut handhabbare Vektoren zur Verfügung gestellt, die in hoher Kopiezahl stabil ins Genom der Hefe *Y. lipolytica* integriert werden können und dadurch die Erhöhung der Konzentration des heterolog zu exprimierenden Proteins erlauben. Ein besonderer Vorteil dieser Plasmide ist das

Vorhandensein einer "Multiple cloning site", wodurch sich DNA-Module unterschiedlichster Art (Expressionskassetten) schnell und einfach in die Vektoren einsetzen lassen. Die Plasmide sind in die repetitiven Sequenzen von *Y. lipolytica* (LTR-Element ZETA, rDNA Cluster) integrierbar.

- 5 Durch die Konstruktion geeigneter Plasmide zur multiplen Integration ins Genom von *Y. lipolytica* und die dadurch ermöglichte Erhöhung der Kopiezahl von Expressionskassetten mit regulierbaren starken Promotoren (beispielsweise *ICL1*-Promotor) wird die Aufgabe in vorteilhafter Weise gelöst.
- 10 Verfahrensgemäß werden die Expressionskassetten zur heterologen Expression von Proteinen in *Y. lipolytica*, bestehend aus dem funktionell aktiven Promotor und Terminator (z.B. aus *ICL1*) und dem zu exprimierenden heterologen Genen, in autonom replizierende low-copy Plasmide oder integrative high-copy Plasmide überführt, in die Hefe transformiert und zur Expression gebracht.

15

Die Aufgabe wird vorteilhaft durch Monooxygenasesysteme gelöst, die aus Cytochrom P450 und entsprechender NADPH-Cytochrom P450 Reduktase bestehen, welche in *Y. lipolytica* gleichzeitig exprimiert werden. Dabei kann eine homologe oder heterologe NADPH-Cytochrom P450 Reduktase auch unter Kontrolle eines geeigneten Promotors mit dem P450 co-exprimiert werden.

20

Die hydrophoben Verbindungen (Steroide und Derivate) werden in die Kulturlösung von derart gentechnisch veränderten *Y. lipolytica* Zellen gebracht, wodurch die exprimierten Enzyme eine selektive Hydroxylierung bewirken. Nach der Umsetzung werden die Hydroxylierungsprodukte abgetrennt. Die für die Erfindung genutzten Transformanden der Hefe *Y. lipolytica* können auf lang- und mittelkettigen n-Alkanen oder Ethanol für die Induktion der Expression der heterologen Gene kultiviert werden. Bevorzugte Enzymsysteme sind steroidhydroxylierende Cytochrom P450 Formen, eine NADPH-Cytochrom P450 Reduktase aus *Y. lipolytica* oder anderen Ursprungs.

25

30 Überraschenderweise zeigen besonders die auf n-Alkan (Hexadecan) kultivierten rekombinanten Hefezellen im Vergleich mit auf Ethanol kultivierten Zellen die höchsten spezifischen Umsatzraten (pro Zelle oder pro Molekül P450 Enzym) für das Substrat Progesteron in  $17\alpha$  Hydroxy-Progesteron.

Die hydrophoben Substrate, insbesondere Steroidverbindungen, werden erfindungsgemäß in Kulturen intakter Zellen (Zellsuspensionen) behandelt. Die zu hydroxylierenden Stoffe werden den Zellkulturen fein gemahlen oder in organischen Lösungsmitteln, z.B. Hexadecan oder Ethanol, gelöst zugesetzt.

- 5 Das Verfahren wird bei niedrigen Temperaturen zwischen 28-32°C durchgeführt. Die Umsetzung von mindestens 0,22 g Substrat/L Zellkultur ist im Regelfall bereits nach 10 bis 30 Stunden Kulturführung weitgehend abgeschlossen. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch direkte Extraktion der Kulturflüssigkeit mit Isobutylmethylketon (MiBK) oder Dichlormethan (DCM) bzw. nach Ansäuerung mit verdünnter
- 10 Schwefelsäure. Eine Kontrolle des Umsatzes kann mittels Chromatographie während der Kultivierungsdauer vorgenommen werden.

Inhalt der Erfindung sind rekombinante *Yarrowia lipolytica* Transformanden und die neuen Vektoren pBD64, p64zb, pBD67 und p67zb bzw. ihre Derivate mit einem

15 Promotor p64ICLpro und p67ICLpro oder funktionsfähigen Expressionskassetten (beispielsweise p64IL43, p67IL43, p64IC17 $\alpha$  oder p67IC17 $\alpha$ ), die zur multiplen Integration ins Genom von *Y. lipolytica* geeignet sind. Der Aufbau dieser Vektoren ist in Abb. 3-7 dargestellt.

- 20 Die Herstellung der rekombinanten *Yarrowia lipolytica*-Transformanden wird durch die Konstruktion einer Serie neuer Vektoren auf der Basis eines *E. coli*-Vektors mit Multipler cloning site vorteilhaft gelöst, die ein Markergen zur Selektion von multi-copy Transformanden und andere chromosomale DNA-Abschnitte von *Y. lipolytica* enthalten, welche zur multiplen Integration ins Genom der Hefe *Y. lipolytica* genutzt
- 25 werden.

Diese Vektoren (Plasmidlinien) tragen als Selektionsmarker zur Amplifikation der Plasmid-DNA in *E. coli* das Ampicillin-Resistenzgen (*amp<sup>R</sup>*) und lassen sich durch ihre hohe Kopiezahl in hohen Ausbeuten aus *E. coli* leicht präparieren. Die Sequenzen zur

30 Integration ins Genom der Hefe *Y. lipolytica* (rDNA, ZETA) und das Selektionsmarkergen *URA3d4* werden durch Umklonierung aus den Plasmiden pINA1064 und pINA1067 (Abb. 2) gewonnen. DNA-Module, z.B. Expressionskassetten, lassen sich gut in die "Multiple cloning site" einklonieren. Die

daraus resultierenden erfindungsgemäßen Basisplasmide pBD64 (rDNA) und pBD67 (LTR ZETA, Abb. 3 und 4) lassen sich in einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung in wenigen Schritten leicht gewinnen.

- 5 In diese Basisplasmide lassen sich in die "Multiple cloning site" vorkonstruierte Expressionskassetten, bestehend aus einem starken und gut regulierbaren homologen Promotor (z.B. *ICL1*-Promotor), einem heterologen Gen (z.B. *lacZ* oder *CYP17*) und einem homologen Terminator (z.B. *ICL1* Terminator), leicht einfügen. Die Expressionskassetten können außerdem nach Bedarf einfach gegen andere  
10 ausgetauscht werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden diese neuen Plasmide (Expressionsvektoren) dann zur multiplen Integration der Expressionskassetten ins Genom (chromosomale Sequenzen der rDNA oder LTR ZETA) von *Y. lipolytica*  
15 eingesetzt. Die damit erzeugten Transformanten weisen eine stabile Kopiezahl der Expressionskassetten (von etwa 10-14) auf. Sie zeigen überraschender Weise im Vergleich mit autonom replizierenden Plasmiden (Kopiezahl 1-2) eine deutlich höhere Expression heterologer Proteine, wie es am Beispiel des Reporterproteins  $\beta$ -Galactosidase (*lacZ* Gen aus *E. coli*, Abb. 11) und des Cytochrom P450 $17\alpha$  (*CYP17*  
20 Gen des Rindes, Abb. 13-14) gezeigt werden kann.

Eine für die Durchführung der Erfindung wichtige Besonderheit besteht darin, daß die erhaltenen Transformanten mit einer hohen Kopiezahl der Expressionskassetten mit anderen *Y. lipolytica* Stämmen gekreuzt werden können. Dadurch können vorteilhafte  
25 natürliche Merkmale eingekreuzt bzw. die Expressionskassetten von mindestens zwei heterologen Genen in einem Wirt co-exprimiert werden.

Die dadurch erhaltenen diploiden Stämme zeichnen sich ebenfalls durch Stabilität der Expressionskassetten aus und sind überraschenderweise besonders gut zur P450 katalysierten Biotransformation während des Wachstums auf n-Alkan und Ethanol  
30 geeignet.

Das erfindungsgemäße Verfahren mit rekombinanten *Y. lipolytica* Zellen zeichnet sich durch hohe Hydroxylierungsraten aus. So wird das Steroid Progesteron durch

*Y. lipolytica* besser als mit bisher untersuchten rekombinanten Zellen von *S. cerevisiae* umgesetzt, die ebenfalls ein steroidhydroxylierendes P45017 $\alpha$  exprimieren.

Die Erfindung wird nachfolgend an Hand von Ausführungsbeispielen noch näher  
5 erläutert.

### Ausführungsbeispiel 1:

#### 1. Verwendete Hefestämme und Vektoren

Alle Stämme entstammen, wenn nicht anders angegeben, der Stammsammlung des  
10 Lehrstuhls für Allgemeine Mikrobiologie des Institutes für Mikrobiologie der  
Technischen Universität Dresden.

#### Yarrowia lipolytica Stämme:

- B204-12A-213 (MATB *leu2 ura3 leaky*)
- 15 PO1d (MATA *leu2-270 ura3-302 xpr2-322 SUC2*)  
(Nicaud et al. 1989 Curr Genet 16:253-260)
- T4 PO1d (p67IC17 $\alpha$ T4), kurz T4 genannt:  
integrative Transformande T4 des Stammes PO1d mit dem im  
ZETA Element linearisierten Plasmid p67IC17 $\alpha$  (URA3d4 ZETA),  
20 welche ca. 8-10 Kopien der Expressionskassette  
*ICL1<sub>Pro</sub> / CYP17 / ICL1<sub>Ter</sub>* zur heterologen Expression des  
Cytochrom P45017 $\alpha$  des Rindes unter Kontrolle des Promotors  
und Terminators des *ICL1* Gens von *Y. lipolytica* trägt.
- A1-5 (MATB *met Alk<sup>+</sup>*) Naturisolat.
- 25 A15T4 (*Alk<sup>+</sup>*, prototroph) - diploider Stamm, entstanden durch Kreuzung  
der beiden Elternstämme A1-5 (MATB *met Alk<sup>+</sup>*)  
PO1d (p67IC17 $\alpha$ T4)

#### Saccharomyces cerevisiae:

- GRF18 (MAT $\alpha$  *his3-11 his3-15 leu2-3 leu2-112 can<sup>R</sup>*)  
30

#### E. coli/S. cerevisiae-Shuttle-Vektoren:

**YEp51** (Broach JR, Li Y-Y, Wu L-CC, Jayaram M, 1983, Vectors for high-level  
inducible expression of cloned genes in yeast. In: Experimental Manipulation of

Gene Expression [Inoye M, ed], Academic Press, New York, 83-117) enthält das *LEU2* Gen dieser Hefe als Selektionsmarker, den *GAL1-GAL10*-Promotor und Sequenzen aus dem 2 $\mu$  Plasmid von *S. cerevisiae* als Terminationsbereich und für die Gewährleistung hoher (50-100) Kopiezahlen dieser ARS-Plasmide.

- 5 **YE $\rho$ 5117 $\alpha$**  (High-copy Plasmid, vgl. Abb. 9); *CYP17* unter Kontrolle des sehr starken *GAL10*-Promotors, erhalten von Dr. W.-H. Schunck (MDC Berlin-Buch):  
Literatur zum Wirts/Vektorsystem: Schunck W-H et al. 1991 Eur J Cell Biol 55: 336-345; Zimmer T et al. 1995 DNA Cell Biol 14: 619-628.

10 *E. coli*/*Y. lipolytica*-Shuttle-Vektoren:

**pINA237** - *E. coli*/*Y. lipolytica*-Shuttle-Vektor pINA237 trägt neben der *CEN-ARS18* Sequenz zur autonomen Replikation in *Y. lipolytica* das homologe *LEU2*-Gen sowie einen Anteil von pBR322 zur Amplifikation in *E. coli*. Die Kopiezahl dieses Vektors in *Y. lipolytica* liegt bei 1-3 pro Zelle (Fournier et al. 1993 Proc Natl Acad Sci USA  
15 90: 4912-4916).

**pYLI131D** und **pIL43** (Juretzek et al. 1995 Patent DE 195 25 282 A1.)

- pINA1064** und **pINA1067** (Abb. 2) basieren auf dem *E. coli*-Vektor pBR322 und tragen  
20 das multi-copy Selektionsmarkergen *URA3d4*. Der *URA3*-Promotor besteht aus 8 Basenpaaren. Das Plasmid pINA1064 trägt die rDNA-Sequenz für die integrative Transformation in die rDNA-Sequenz (G-Einheit) des Wirtes (Fournier et al. 1986 Gene 42:273-282). Das Plasmid pINA1067 trägt die Sequenz des LTR ZETA (long terminal repeat) des Retrotransposon Ylt1 aus *Y. lipolytica* (Le Dall et al. 1995  
25 Abstract "First *Yarrowia lipolytica* International Meeting" Paris-Grignon).

Andere Vektoren:

**pUCBM21** Boehringer Mannheim

30 Verwendete DNA-Sequenzen:

Die cDNA für das *CYP17* wurde aus dem Plasmid pCMV17 $\alpha$  (J Biol Chem **266**:5898-5904, 1991) gewonnen und kodiert für das Cytochrom P45017 $\alpha$  der Nebenniere des

Rindes. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. M. Waterman (Vanderbilt Universität Nashville) zur Verfügung gestellt.

#### Verwendete Medien:

5 **Minimalmedium (YNB):** 0,67 oder 1,34% Yeast Nitrogen Base (Difco), 0,4 % NH<sub>4</sub>Cl, 0,3 mg/L FeCl<sub>3</sub>

**Minimalmedium (M)** für die Kultivierung von *Y. lipolytica* im Fermenter (Scheller U et al. 1996 Methods Enzymol 272: 65-75).

Zusätze von Aminosäuren (Leucin, Methionin, 30-50 mg/L) bzw. Uracil (50 mg/L) zur

10 Komplementation der entsprechenden Mutationen je nach Bedarf für den Stamm.

C-Quellen: 1% Glucose, 1% Ethanol, 1% Hexadecan.

**Vollmedium:** 1 % Yeast Extract, 1 % Bactopeptone, 2% Glucose.

Für Plattenkultur wurden die obengenannten Medien mit 2% Agar-Agar hergestellt.

#### 15 **Ausführungsbeispiel 2:**

##### **2. Nachweis der repetitiven Sequenzen rDNA und ZETA in verschiedenen *Yarrowia lipolytica*-Stämmen (Abb. 1) und Transformationseffizienzen zur Integration ins Genom**

Zur Darstellung der repetitiven Sequenzen rDNA und ZETA in verschiedenen *Yarrowia*  
20 *lipolytica*-Stämmen wurden die Stämme H222 (Wildtyp), B512-3, B204-12A-213, B204-12C, PO1d, E150 und E129 mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde auf Nitrocellulose transferiert und mit folgenden Sonden beprobt: Nachweis ZETA-Sequenz mit ZETA-Fragment aus pBD67 (Abb. 3) und Nachweis rDNA mit rDNA-Fragment aus pBD64 (Abb. 3). Dabei zeigte  
25 sich überraschenderweise, daß in den Stämmen PO1d und H222 keine ZETA-Sequenzen nachgewiesen werden konnten (Abb. 1). Trotz der fehlenden ZETA-Sequenzen lassen sich die Plasmide mit der ZETA-Sequenz ins Genom vielfach integrieren (Abb. 8).

#### 30 **Ausführungsbeispiel 3:**

##### **3. Konstruktion der Plasmide pBD64 und pBD67 (Abb. 3)**

Der *E. coli*-Vektor pUCBM21 wurde mit der Restriktionsendonuklease *NdeI* vollständig verdaut. Die einzelsträngigen Enden der verdauten DNA wurden mit Polymerase I

(Klenow-Fragment) aufgefüllt. Die DNA wurde mit *Bam*HI nachgespalten. Der so vorbereitete Vektor wurde jeweils mit den *Eco*RI/*Bam*HI-Fragmenten aus den Vektoren pINA1064 (3178 bp) bzw. pINA1067 (2423 bp) ligiert. Dazu wurden die Vektoren pINA1064 und 1067 (Abb. 2) mit *Eco*RI verdaut und die einzelsträngigen Enden mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt. Anschließend wurde die DNA mit *Bam*HI verdaut. Die resultierenden Vektoren sind die Plasmide pBD64 (mit rDNA als Target-Sequenz) und pBD67 (mit ZETA-Element als Target-Sequenz) (Abb. 3). Diese Plasmide waren nun geeignet, DNA-Fragmente (z.B. Expressionskassetten) in die "Multiple cloning site" aufzunehmen.

10

#### **Ausführungsbeispiel 4**

##### **4. Konstruktion der Vektoren p64ICLpro und p67ICLpro (Abb. 5)**

Für die Konstruktion der Plasmide p64ICLpro und p67ICLpro (tragen *ICL1*-Promotor) wurden die Plasmide pBD64, pBD67 und pYL1131D (Juretzek et al. 1997 DE 195 25 282 A1) mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Kpn*I verdaut. Das den *ICL1*-Promotor enthaltende 2162 bp große *Bam*HI/*Kpn*I-Fragment wurde mit den *Kpn*I/*Bam*HI geöffneten Plasmiden pBD64 und pBD67 ligiert. Die resultierenden Vektoren waren p64ICLpro und p67ICLpro. Diese Plasmide enthalten den *ICL1*-Promotor (Abb. 5).

20

#### **Ausführungsbeispiel 5**

##### **5. Konstruktion der Vektoren p64IL43 und p67IL43 zur heterologen Expression von $\beta$ -Galactosidase (*lacZ*-Gen) aus *E. coli* (Abb. 6)**

Für die Konstruktion der Vektoren p64IL43 und p67IL43 wurden die Plasmide p64ICLpro und p67ICLpro mit *Bam*HI verdaut und anschließend dephosphoryliert. Aus dem Plasmid pIL43 (Juretzek et al. 1995 DE 195 25 282 A1) wurde das 3833 bp große *Bam*HI-Fragment isoliert und mit den geöffneten Vektoren ligiert. Die resultierenden Plasmide waren p64IL43 und p67IL43 (Abb. 6) und enthalten die Expressionskassette *ICL1*-Promotor//*lacZ*-Gen//*ICL1*-Terminator.

30

#### **Ausführungsbeispiel 6**

##### **6. Konstruktion der Vektoren p64IC17 $\alpha$ und p67IC17 $\alpha$ zur heterologen Expression von Cytochrom P45017 $\alpha$ aus der Nebennierenrinde des Rindes**

Die Klonierung der Expressionskassette für die heterologe Expression von *CYP17* (Rind) unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors wurde in mehreren Teilschritten, durch Umklonierung der *CYP17*-cDNA in den Vektor pYLI131D und durch Amplifizierung von DNA, die die korrekte Fusion des *CYP17* ORF an den *ICL1*-Promotor ermöglicht, 5 realisiert. Dazu wurde der für den C-Terminus kodierende Teil der *CYP17* cDNA aus dem Vektor YEp5117 $\alpha$  (Abb. 9) als *HindIII/BglII*-Fragment gemeinsam mit dem *ICL1*-Terminator-Fragment *BamHI/HindIII* in den *BamHI/BglII* geöffneten Vektor pYLI131D ligiert (Vorkonstrukt). Die Expressionskassette wurde komplettiert durch Einfügen des *BglII*-PCR-Fragmentes, welches mittels einer Zweischnitt-rekombinanten PCR erzeugt 10 wurde. Im ersten Schritt wurden separat das *ICL1*-Promotor/Intron- und das *CYP17*-Fragment von den Plasmiden pYLI131D bzw. YEp5117 $\alpha$  mit folgenden Oligonukleotiden amplifiziert.

Amplifizierung *ICL1*-Promotor/ Intronfragment:

Primer 1, 5'-TAGATCTGGGGATCCCCAGTAGACTGACCAAGC-3';

15 Primer 2, 5'-CACTGGGTAGTACGGG-3'.

Amplifizierung des *CYP17*-Fragmentes:

Primer 3, 5'-CCCGTACTAACCAGTGTGGCTGCTCCTGGCTG-3';

Primer 4, 5'-TTATGTTGGTCACCGCC-3'.

Im zweiten Schritt wurden die Fragmente an sich überlappenden Sequenzen 20 rekombiniert und mit Primer 1 und 4 amplifiziert. Das rekombinierte PCR-Produkt wurde als *BglII*-Fragment in das Vorkonstrukt eingesetzt und der autonom replizierende low-copy Vektor pIC17 $\alpha$  (Abb. 9) erhalten. Durch Umklonierung als *MluI/KpnI*-Fragment in die Vektoren p64IL43 oder p67IL43 (Abb. 6) wurden die Vektoren p64IC17 $\alpha$  bzw. p67IC17 $\alpha$  (Abb. 9) erhalten.

25

### **Ausführungsbeispiel 7**

#### **7. Konstruktion der Vektoren p64zb und p67zb**

Die Vektoren pBD64 und pBD67 wurden mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* partiell hydrolysiert, mit dem Enzym Klenow-Fragment die freien DNA-Enden aufgefüllt 30 und religiert. Die Plasmide mit einem *HindIII*-Ort in der Multiple cloning site wurden isoliert und mit *HindIII* erneut hydrolysiert. Die linearisierten Fragmente wurden dephosphoryliert und mit nachfolgend beschriebenen *HindIII*-verdauten PCR-Fragmenten ligiert. Die korrekt orientierten Vektoren p64zb und p67zb wurden isoliert.

Das PCR-Fragment zur Insertion in den Vektor pBD64 wurde von dem selbigen Plasmid mit den Oligonukleotiden 5'-attaagcttcggtatgataggaagag-3' und 5'-tggaagcttgggagacccaagg-3' amplifiziert. Unter Nutzung der Oligonukleotide 5'-tgtaagcttcgtacgggagagtagtcatccgac-3' und 5'-aagaagcttaagggaggtgtcctgtccac-3' wurde vom Plasmid pBD67 das PCR-Fragment zur Insertion in den Vektor pBD67 synthetisiert.

Durch Insertion von Expressionskassetten in die Multiple cloning site muß der dritte *NotI*-Ort (Plasmid p67zb) bzw. *SacII*-Ort (Plasmid p64zb) eliminiert werden, da durch Hydrolyse mit den jeweiligen Enzymen die Abtrennung der *E. coli*-haltigen DNA erfolgt.

10

### Ausführungsbeispiel 8

#### 8. Integrative Transformation von *Y. lipolytica* PO1d und Bestimmung der integrierten Expressionskassetten.

Zur integrativen Transformation in *Y. lipolytica* wurden kompetente Zellen erzeugt und mit linearisierter Plasmid-DNA (0,2-1 µg) und Carrier-DNA (2-5 µg) transformiert. Dazu wurde das Plasmid p64IL43 mit dem Restriktionsenzym *SacII* und das Plasmid p67IL43 mit *NotI* vollständig verdaut (siehe Abb. 6). Die *Ura*<sup>+</sup> Transformanden wurden nach 4 bis 14 Tagen auf Agar-Selektionsmedium erhalten. Die dabei erreichte Transformationseffizienz lag zwischen 3 und 50 Transformanden pro µg Plasmid-DNA (Methoden nach Barth und Gaillardin 1996 *The dimorphic fungus Yarrowia lipolytica*. In *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, Wolf K, ed, Springer Verlag, Heidelberg, pp 313-388).

Zur Bestimmung der Kopiezahl der ins Genom integrierten Expressionskassetten wurde die Total-DNA der untersuchten Transformanden isoliert und vollständig mit *Bam*HI verdaut. Die so gewonnene DNA wurde gelelektrophoretisch in 0,8 % Agarose aufgetrennt und auf Nylonmembran geblottet. Zur Southern-Hybridisierung wurde als Sonde <sup>32</sup>P-radioaktivmarkierte DNA des bekannten *ICL1*-Introns aus *Y. lipolytica* eingesetzt. Die Verteilung der Radioaktivität und deren Intensität wurde mittels Phosphorimager "Storm" (MD) analysiert. Die Kopiezahl wurde aus dem Verhältnis der Intensität der 3833 bp Bande (integrierte *lacZ*-Expressionskassette) und der 2281 bp-Bande (chromosomales homologes *ICL1*-Gen) ermittelt. Die ermittelten Kopiezahlen lagen zwischen 4 und 38 Kopien pro Zelle (Abb. 10). Die durchschnittliche Kopiezahl liegt bei 10 bis 14 Kopien pro Zelle. Transformanden mit

geringerer Kopiezahl wuchsen langsamer als der Wildtyp. Transformanden mit durchschnittlicher oder höherer Kopiezahl wuchsen vergleichbar schnell zum Wildtyp.

### Ausführungsbeispiel 9

#### 5 9. Expression der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität von multi-copy Transformanden

Zur Bestimmung der Expression der  $\beta$ -Galactosidase unter Kontrolle des induzierbaren *ICL1*-Promotors wurden die Transformanden auf Selektionsmedium mit Glucose für 28 h bei 28°C vorkultiviert und nach zweimaligem Waschen mit Medium ohne C-Quelle auf Selektionsmedium mit Ethanol zur Bildung der  $\beta$ -Galactosidase  
10 umgesetzt. Die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) zum Start der Induktion lag bei 0,7-1. Zur Bestimmung der spezifischen  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität wurden alle 30 Minuten über 13 Stunden Proben entnommen (Reynolds und Lundblad 1994 *In: Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al. /Eds/ J Wiley, New York, Vol 2, Unit 13.6.1). Als Vergleich wurde die Expression der  $\beta$ -Galactosidase mit dem low-copy  
15 Expressionssystem pIL43 (Juretzek et al. 1995 D195 25 282 A1) im Stamm PO1d bestimmt (Abb. 11).

### Ausführungsbeispiel 10

#### 10. Bestimmung der Stabilität von Transformanden

20 Zur Ermittlung der Stabilität wurden Transformanden in nichtselektivem Vollmedium (YPD), in Minimalmedium YNB mit Uracil und Glucose sowie in Minimalmedium mit Uracil und Ethanol über 20 Generationen kultiviert. Die Kopiezahlen wurden wie unter Punkt 5 bestimmt. Die getesteten Transformanden trugen nach 20 Generationen vergleichbar viele Kopien wie die Ausgangstransformanden. Transformanden mit 10  
25 bis 14 Kopien pro Zelle wachsen normal und die Kopiezahlen sind in der Zellpopulation stabil.

### Ausführungsbeispiel 11

#### 30 11. Vergleich der Cytochrom P45017 $\alpha$ Aktivität nach heterologer Expression in *Y. lipolytica* ( Abb. 13 und Abb. 14)

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von heterolog exprimiertem Cytochrom P45017 $\alpha$  in *Y. lipolytica* oder in *S. cerevisiae* wurden die Zellen im Schüttelkolben in

Minimalmedium (M) mit induzierenden und nicht induzierenden C-Quellen kultiviert. Zum Zeitpunkt des Startes der Hauptkultur und alle 3 h über 25 h wurden Proben entnommen und die OD<sub>600</sub> durch Zugabe des entsprechenden Mediums auf eine OD<sub>600</sub> von 2 bis 4 eingestellt. Zu 1 ml dieser Verdünnung wurden 100 nmol <sup>3</sup>H-Progesteron (gelöst in Ethanol) zugesetzt und die Kulturen für 30 min bzw. 60 min bei 28°C, 240 U/min im Schüttelinkubator kultiviert. Der Ansatz wurde mit 2 ml Dichlormethan extrahiert und die organische Phase gewonnen, eingedampft und in 100 µl Chloroform/Essigsäureethylester (3:1, Laufmittel) aufgenommen. Die Proben wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten aufgetrennt und die Verteilung der Radioaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 und Abb. 14 dargestellt.

### Ausführungsbeispiel 12

#### 12. Gewinnung des diploiden rekombinanten Stammes (A15T4), Fermentation von A15T4 auf Hexadecan, Biotransformation von Progesteron (Abb. 15)

Der diploide Stamm A15T4 wurde durch Kreuzung der Stämme A1-5 und T4 erzeugt (Diploidisierung nach Barth und Gaillardin 1996) The dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. In: Nonconventional Yeasts in Biotechnology, Wolf K, ed, Springer Verlag, Heidelberg, pp 313-388).

Dieser Stamm wurde zur Umsetzung von Progesteron zu 17α-Hydroxprogesteron im 1-Liter-Bioreaktor eingesetzt (Abb. 15).

#### Medienzusammensetzung:

Minimalmedium (M) für die Kultivierung von *Y. lipolytica* im Fermenter (Scheller U et al. Methods in Enzymology **272**: 65-75 1996).

25

#### Fermentationsparameter:

Volumen	1 Liter Arbeitsvolumen
Temperatur	28°C
Rührung	750 - 1000 U/min
pH-Wert	4,60, Regelung durch Zugabe von ca. 2M NaOH
Belüftung	1- 2 vvm zur Gewährleistung von 30-100% O <sub>2</sub> -Sättigung
Antischaum	Antifoam 289 (SIGMA A5551)

30

**Kulturverlauf:**

1 Liter-Hauptkultur im Fermenter

1. Vorkultur - 10 ml M (1% Glucose)

2. Vorkultur - 100 ml M (1% Glucose)

5 Start der Hauptkultur

**Variante A** 1) 900 ml M (0,2% Glucose) - Start mit 100 ml 2. Vorkultur

Start-OD<sub>600</sub> ca. 1-1,5

2) Wachstum auf Glucose bis zum Glucoseverbrauch (nach ca. 6-8 h),  
bei OD<sub>600</sub> von ca. 5 angezeigt durch Stop der Säuerung bzw. leichten pH-  
Anstieg)

10

3) Zugabe von 1% Hexadecan (autoklaviert)

4) Beginn Verwertung von Hexadecan nach ca. 1-2 h Zugabe von  
0,05% Progesteron mit 1% DMF (0,5 g Progesteron in 10 ml DMF)

5) 2 ml Probennahme vor (Blindwert), sofort nach Progesterongabe

15

und alle 2-3 h während der Kultivierung Extraktion mit 4 ml  
Dichlormethan (oder Isobutylmethylketon) und Analyse

6) Nach ca. 14 h Zugabe von weiteren 3% Hexadecan,

**Variante B (Abb. 15)**

1) 900 ml M (1% Hexadecan)- Start mit 100 ml 2. Vorkultur

20

Start-OD<sub>600</sub> ca. 1-1,5

2) Nach 14 h Zugabe von 0,05% Progesteron mit 1% Dichlormethan  
(0,5 g Progesteron in 10 ml Dichlormethan)

3) weiter wie Variante A Punkt 5

**Analysen:** Biomasse (OD<sub>600</sub>)

25

Progesteron-Umsetzung durch 2 ml Probennahme,  
sofortige Extraktion mit 4 ml Dichlormethan  
bzw. Isobutylmethylketon

Analyse durch TLC, GC oder HPLC

30 Die Erfindung wird nachfolgend an Hand von in den Abbildungen dargestellten  
Ausführungsbeispielen noch weiter erläutert.

**Abb. 1: Nachweis der repetitiven Sequenzen rDNA und ZETA in verschiedenen *Y. lipolytica*-Stämmen durch Southern-Hybridisierung.**

0,5 µg chromosomale DNA wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und geelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion wurden die ZETA-Sequenz **(A)** aus dem Plasmid p67ICLpro bzw. rDNA (G-Unit)-Sequenz **(B)** aus dem Plasmid p64ICLpro als Fluorescein-markierte Sonden eingesetzt. Auftragung: 1 λ-DNA *EcoRI/HindIII*, 2 H222, 3 B512-3, 4 B204-12A-213, 5 B204-12C, 6 PO1d, 7 E150, 8 E129

**Abb. 2: Restriktionskarten der Ausgangsplasmide für die Konstruktion neuer Vektoren für die multi-copy Integration ins Genom von *Y. lipolytica*.**

Das Plasmid pINA1067 enthält das im Promotorbereich stark verkürzte *URA3d4* Gen als Selektionsmarker für die multi-copy Integration, die Sequenz des ZETA-Elements des LTR (long terminal repeat) aus dem Retrotransposon *Ylt1* von *Y. lipolytica* als Zielort für die Integration und den Promotor und Terminator des *XPR2* Gens der alkalische Protease von *Y. lipolytica*. Das Plasmid pINA1064 enthält neben dem *URA3d4* Gen und dem Promotor und Terminator des *XPR2* Gens ein Fragment aus dem rDNA Gen (G-Einheit) von *Y. lipolytica* für die Integration ins Genom. Beide Plasmide wurden von Dr. J.-M. Nicaud (INRA-CNRS, Thiveral-Grignon, Frankreich) erhalten.

20

**Abb. 3: Restriktionskarten der neu konstruierten Basisplasmide pBD67 und pBD64 zur multi-copy Integration in das Genom von *Y. lipolytica*.**

Die Plasmide basieren auf dem *E. coli* Vektor pUCBM21. Sie tragen das im Promotor defekte *URA3d4* Gen als multi-copy Selektionsmarker. Das Plasmid pBD64 ist für die Integration in die rDNA (G-Unit) geeignet, das Plasmid pBD67 kann zur Integration in das LTR-Element ZETA (long terminal repeat) des Retrotransposons *Ylt1* genutzt werden.

rDNA = rDNA-Fragment von *Y. lipolytica* G-Einheit, *URA3d4* = defektives *URA3* Gen von *Y. lipolytica*, *amp<sup>R</sup>* = Ampicillin Resistenzgen, ZETA = LTR (long terminal repeat) des Retrotransposons *Ylt1*.

30

**Abb. 4: Restriktionskarte der multi-copy „self cloning“ Vektoren p64zblCLpr und p67zb zur Integration von *E. coli*-freier DNA ins Genom von *Yarrowia lipolytica*.**

Vektor basiert auf dem Plasmid pBD67 (Abb. 3) und trägt zusätzlich ein verkürztes ZETA-Element. Nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *NotI* kann die DNA mit  
 5 Ursprung aus dem Bakterium *E. coli* abgetrennt werden. *URA3d4* = Selektionsmarker, ZETA = LTR des Retrotransposon Ylt1 aus *Yarrowia lipolytica*. ZETA' = Teil des LTR des Retrotransposons Ylt1 aus *Yarrowia lipolytica*. *amp<sup>R</sup>* = Ampicillin-Resistenzgen.

**Abb. 5: Restriktionskarten der multi-copy Vektoren p64ICLpro und p67ICLpro.**

10 Das Plasmid p64ICLpro enthält das rDNA-Fragment und das *URA3d4* Gen aus pINA1064 und den *ICL1*-Promotor. Der *SacII*-Ort in der rDNA kann zur Linearisierung des Plasmides für eine integrative Transformation in das rDNA-Cluster (G-Einheit) genutzt werden. Das Plasmid p67ICLpro enthält das ZETA Element und das *URA3d4* Gen aus dem Plasmid pINA1067 und den *ICL1*-Promotor. Der *NotI*-Ort kann zum  
 15 Öffnen des Plasmides für die anschließende Integration in die ZETA-Elemente des LTR (long terminal repeat des Retrotransposons Ylt1) des Wirtsgenoms genutzt werden. Heterologe Gene (*lacZ* oder *CYP17*) können nach Fusion mit dem *ICL1*-Terminator leicht in diese Plasmide eingefügt werden. Dadurch werden komplette Expressionskassetten in den abgeleiteten Plasmiden geschaffen (vgl. Abb. 5 und Abb.  
 20 6, Erläuterungen der Abkürzungen vgl. auch Abb. 3).

**Abb. 6: Restriktionskarten der multi-copy Vektoren p64IL43 und p67IL43 zur heterologen Expression des *lacZ* Gens aus *E. coli* in der Hefe *Y. lipolytica*.**

Die Vektoren basieren auf den Plasmiden pBD64 und pBD67 (vgl. Abb. 3) und tragen  
 25 die Expressionskassette für das *lacZ* Gen unter der Kontrolle des *ICL1*-Promotors und Terminators.

rDNA = rDNA-Fragment von *Y. lipolytica* G-Einheit, *URA3d4* = defektives *URA3* Gen, *amp<sup>R</sup>* = Ampicillin Resistenzgen, ICLpro = *ICL1*-Promotor, ICLI = *ICL1*-Intron, ICLt = *ICL1*-Terminator, ZETA = LTR ZETA (long terminal repeat) des Retrotransposons Ylt1  
 30 von *Y. lipolytica*.

**Abb. 7: Restriktionskarten der multi-copy Expressionsvektoren Plasmid p64IC17 $\alpha$  und p67IC17 $\alpha$  für die heterologe Expression des Cytochrom P45017 $\alpha$  (CYP17) der Nebenniere des Rindes in *Yarrowia lipolytica*.**

Die Vektoren basieren auf den Plasmiden pBD64 und pBD67 (vgl. Abb. 3) und tragen  
5 die Expressionskassette für CYP17 P450 Gen unter der Kontrolle des ICL1-Promotors  
und Terminators. Erläuterungen der Abkürzungen vgl. Abb. 6.

**Abb. 8: Transformationseffizienz von kompetenten Zellen der Stämme PO1d und E129**

10 Zellen wurden mit 200 ng linearisierter Plasmid-DNA und 5,0  $\mu$ g Carrier-DNA  
transformiert. Die Transformanden wurden nach 3-14 Tagen beobachtet.

**Abb. 9: Restriktionskarten der autonom replizierenden Plasmide YEp5117 $\alpha$  und pIC17 $\alpha$  zur heterologen Expression des Cytochrom P45017 $\alpha$  der Nebenniere des  
15 Rindes in der Hefe *Yarrowia lipolytica* und in der Hefe  
*Saccharomyces cerevisiae*.**

Der Vektor YEp5117 $\alpha$  wurde durch Dr. W.-H. Schunck (MDC Berlin-Buch) zur  
Verfügung gestellt. Für die Herstellung des Vektors YEp5117 $\alpha$  wurde die cDNA für das  
CYP17 aus dem Plasmid pCMV17 $\alpha$  in mehreren Schritten in den high-copy Hefe-  
20 Shuttle-Vektor YEp51 (LEU2, 2  $\mu$ ARS, Kopiezahlen von 50-100) kloniert. Der Vektor  
YEp5117 $\alpha$  erlaubt die durch Galactose induzierbare Expression des P45017 $\alpha$  in der  
Hefe *S. cerevisiae* unter Kontrolle des GAL10-Promotors. Die cDNA für das CYP17  
wurde aus dem Plasmid pCMV17 $\alpha$  (J Biol Chem **266**:5898-5904, 1991) gewonnen und  
kodiert für das Cytochrom P45017 $\alpha$  der Nebenniere des Rindes. Dieses Plasmid  
25 wurde freundlicherweise von Prof. M. Waterman (Vanderbilt Universität Nashville) zur  
Verfügung gestellt. Das Plasmid pIC17 $\alpha$  basiert auf dem autonom replizierenden low-  
copy Vektor pINA237 (ARS18/CEN, gewährleistet 1-3 Kopien pro Zelle) für *Y. lipolytica*  
und enthält eine Expressionskassette für das Cytochrom P45017 $\alpha$  (CYP17) unter der  
Kontrolle des ICL1-Promotors (ICLp/ICLi/CYP17/ICLt). Die cDNA CYP17, codierend  
30 für das Cytochrom P45017 $\alpha$  des Rindes, wurde in mehreren Schritten in den low-copy  
Vektor pYLI131D für *Y. lipolytica* anstelle des ICL1 Strukturgens eingesetzt. Dazu  
wurde die cDNA mit Hilfe der rekombinanten PCR direkt am T<sub>360</sub>G<sub>361</sub> des 3'-Endes des

Introns im *ICL1*-Promotor fusioniert. Das resultierende Plasmid pIC17 $\alpha$  erlaubt die Expression des P45017 $\alpha$  unter Kontrolle des regulierten *ICL1*-Promotors nach korrektem Spleißen des Introns und der Neuformierung des Translationsstarts A<sub>1</sub>U<sub>360</sub>G<sub>361</sub>.

5

**Abb. 10: Kopiezahlen der Expressionskassetten für das *lacZ* Gen unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors in integrativen multi-copy Transformanden des *Y. lipolytica* Stammes PO1d mit dem Plasmid p64IL43.**

Ausgewählte Transformanden mit dem integrativen Plasmid p64IL43 (vgl. Abb. 6) wurden in YNB/Glucose Medium kultiviert. Die Kopiezahl wurde durch Southern Blot Hybridisierung mit dem <sup>32</sup>P-markierten *ICL1*-Intron als Sonde bestimmt. Die Kopiezahl wurde aus dem Verhältnis der Bandenintensität bei 3.8 kb (*lacZ* Kasette) und 2.2 kb (*ICL1* als eine Kopie pro Genom) kalkuliert. Als Vergleich diente eine Transformande mit dem autonom replizierenden *ARS/CEN* Plasmid pIL43.

15

**Abb. 11: Abhängigkeit der maximalen spezifischen  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität von der Kopiezahl der Expressionskassetten in Transformanden von *Yarrowia lipolytica* PO1d, die durch das low-copy replikative Plasmid pIL43 oder durch das multi-copy integrative Plasmid p64IL43 transformiert wurden.**

Dargestellt ist ein Vergleich der maximalen spezifischen  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten nach 10 bis 12 h Kultivierung im Minimalmedium mit 1% Ethanol als induzierender C-Quelle. Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität wurde als Miller Units bestimmt. Die Kopiezahl der Expressionskasette wurde in jeder Transformande mit Zellen der Glucose-Vorkultur bestimmt (vgl. Abb. 10).

25

**Abb. 12: Nachweis der funktionellen Expression von Cytochrom P45017 $\alpha$  der Nebenniere des Rindes in einer Transformande der Hefe *Yarrowia lipolytica* mit dem low-copy *ARS/CEN* Plasmid pIC17 $\alpha$  unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors.**

(A) Dünnschichtchromatographische Analyse der Umsetzung von <sup>3</sup>H-markiertem Progesteron (P, 100 nmol in 1 ml Versuchsansatz) durch intakte Zellen (1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml) bei der Inkubation von auf Hexadecan kultivierten Transformanden des

30

Stammes *Y. lipolytica* B204-12A-213 mit dem Plasmid pIC17 $\alpha$  und pINA237 (als Negativkontrolle). Der Reaktionsansatz wurde mit 2 ml Dichlormethan extrahiert, bis zur Trockne eingedampft, in jeweils 100  $\mu$ l Laufmittel (Chloroform/Essigsäureethylester 3:1) gelöst und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit einem Bertholdt-Radioscanner bestimmt. Die Laufstrecke für das Hauptprodukt war identisch mit dem des 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesterons (**17 $\alpha$ HP**).

**(B)** Cytochrom P45017 $\alpha$  katalysierte Umwandlung von Progesteron (**P**) in das Produkt 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron (**17 $\alpha$ HP**).

10

**Abb. 13: Vergleich der Expressionssysteme für Cytochrom P45017 $\alpha$  in den Hefen *Yarrowia lipolytica* (low-copy Plasmid pIC17 $\alpha$  und *Saccharomyces cerevisiae* (multi-copy Plasmid YEp5117 $\alpha$ ) bei der Nutzung von autonom replizierenden Plasmiden.**

15

**Abb. 14: Vergleich des spezifischen Gehaltes von Cytochrom P45017 $\alpha$  nach heterologer Expression in den Hefen *Yarrowia lipolytica* und *Saccharomyces cerevisiae* von Plasmiden mit hoher Kopiezahl.**

Maximalwerte des spektral mit Hilfe des CO-Differenzspektrums bestimmbaren P450 Gehaltes in der multi-copy Transformante T4 von *Y. lipolytica* PO1d (Integration von 8-10 Kopien der Expressionskassette mit Hilfe des Plasmides p67IC17 $\alpha$  Expression unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors) bei Kultivierung auf 1% Ethanol im Minimalmedium. Als Vergleich sind Werte aufgeführt, die mit dem autonom replizierenden high-copy Plasmid YEp5117 $\alpha$  (ca. 50 Kopien pro Zelle) im Stamm *S. cerevisiae* GRF18 bei Kultivierung auf Galactose (Expression unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors) erzielt wurden.

25

**Abb. 15: Kultivierung des diploiden *Yarrowia lipolytica* Stammes A15T4 auf Hexadecan (C16) und Biotransformation von Progesteron in 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron.**

30

Vorkultur auf 1% Glucose, Kultur in 1 L Bioreaktor auf 1% C16. Nach 14 h Kultivierung Zugabe von 0.5 g Progesteron in 10 ml Dimethylformamid (DMF) und Zugabe von 2 % C16.

**Patentansprüche**

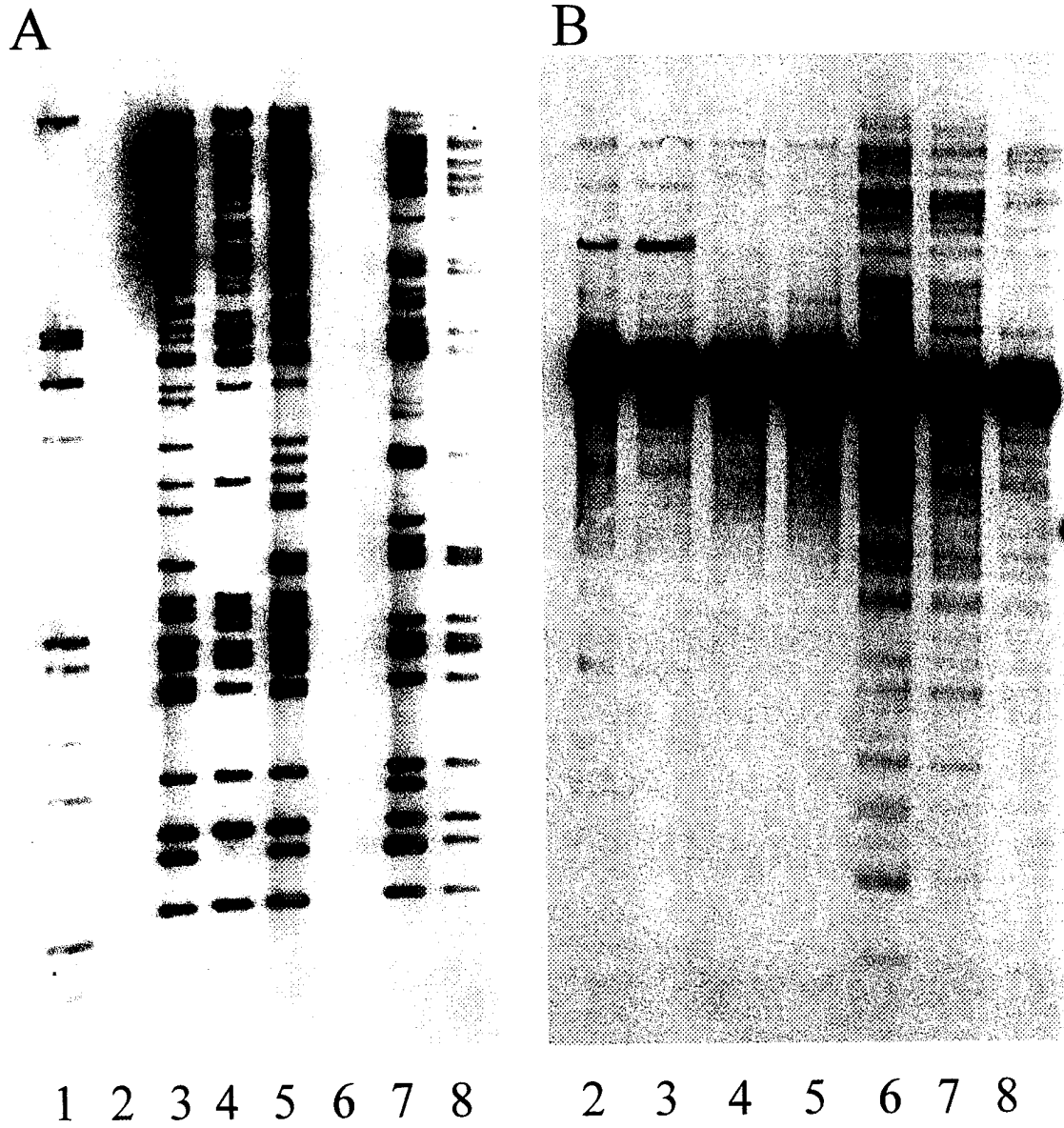
1. Rekombinante haploide oder diploide *Yarrowia (Y.) lipolytica* Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Plasmide mit Expressionskassetten beinhalten,  
5 wobei die Expressionskassetten aus in *Y. lipolytica* funktionell aktiven Promotoren und Terminatoren und Genen oder cDNA zur Expression von Oligopeptiden oder Proteinen bestehen und damit Eigenschaften ausbilden, die zur Stoffumwandlung ausgenutzt werden.
2. Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen  
10 Expressionskassetten zur Expression von Genen oder cDNA, codierend für Cytochrom P450 Enzyme, enthalten.
3. Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen  
15 Expressionskassetten zur Expression von Genen oder cDNA, codierend für Elektronentransfersysteme zur Übertragung von Elektronen auf Cytochrom P450 Enzyme (z.B. NADPH-abhängige Cytochrom P450 Reduktase, Cytochrom B<sub>5</sub>, Adrenodoxin und/oder Adrenodoxin-Reduktase), enthalten.
4. Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die  
20 Zellen verschiedene Expressionskassetten zur gleichzeitigen Expression (Koexpression) von Genen, codierend für Elektronentransfersysteme zur Übertragung von Elektronen auf Cytochrom P450 Enzyme und Cytochrom P450 Proteine, enthalten.
5. Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die  
25 Zellen Expressionskassetten enthalten, bestehend aus dem Promotor und Terminator der homologen Isocitratlyase (*ICL1* Gen) und Genen zur heterologen Expression.
6. Zellen nach Anspruch 2 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen  
Verbindungen, die native oder artifizielle Cytochrom P450 Enzymsubstrate sind, aufnehmen, enzymatisch umwandeln, in der Zelle akkumulieren oder an die  
Umgebung abgeben.
- 30 7. Zellen nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Steroide oder Analoga aufnehmen, enzymatisch umwandeln und in der Zelle akkumulieren oder an die Umgebung abgeben.

8. Zellen nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen diese Eigenschaften unter physiologischen Bedingungen z.B. bei der Verwertung von Glucose, Glycerol, Ethanol, Fettsäuren oder Alkanen ausbilden.
9. Zellen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen diese  
5 Eigenschaften unter physiologischen Bedingungen besonders bei der Verwertung von mittel- und langkettigen n-Alkanen ausbilden.
10. Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen integrative multi-copy Plasmide, bestehend aus *E. coli*-freier DNA („self cloning vectors“), einem Selektionsmarkergen zur Selektion von multi-copy  
10 Transformanden und aus anderen chromosomalen *Y. lipolytica* DNA-Fragmenten, die geeignet sind zur Integration ins Genom der Hefe *Y. lipolytica*, enthalten.
11. Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen integrative multi-copy Plasmide, bestehend aus Replikons bakteriellen Ursprungs, einem Selektionsmarkergen zur Selektion von multi-copy  
15 Transformanden und aus anderen chromosomalen *Y. lipolytica* DNA-Fragmenten, die geeignet sind zur Integration ins Genom der Hefe *Y. lipolytica*, enthalten.
12. Plasmide zur Erzeugung rekombinanter haploider oder diploider *Yarrowia* (*Y.*) *lipolytica* Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide Expressionskassetten, bestehend aus einem  
20 in *Y. lipolytica* funktionell aktiven Promotor und Terminator und einem Gen oder einer cDNA zur Expression von Oligopeptiden und Proteinen, in der Multiple cloning site enthalten.
13. Plasmide nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide Expressionskassetten, bestehend aus dem *Y. lipolytica* *ICL1*-Promotor und *ICL1*-  
25 Terminator und einem Gen zur Expression von Oligopeptiden und Proteinen, in die Multiple cloning site enthalten.
14. Plasmide nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide vielfach ins Genom der Hefe *Y. lipolytica* integriert sind.
15. Plasmide nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die  
30 Plasmide in die Sequenzen des LTR-ZETA-Element ("Long Terminal Repeat" des Retrotransposons Ylt1) von *Y. lipolytica* integriert sind.
16. Plasmide nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide in die Sequenzen der rDNA integriert sind.

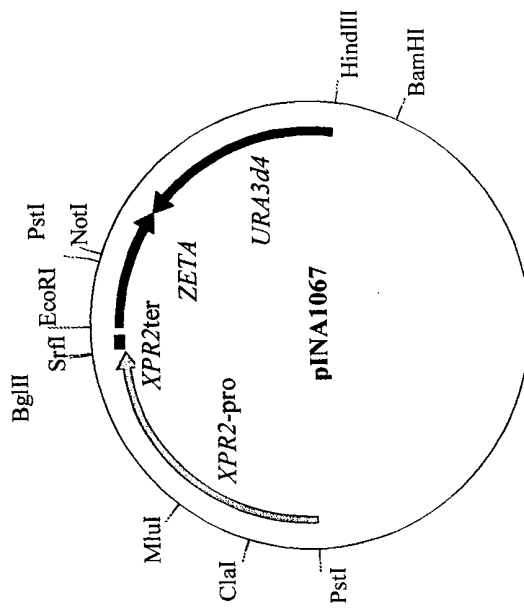
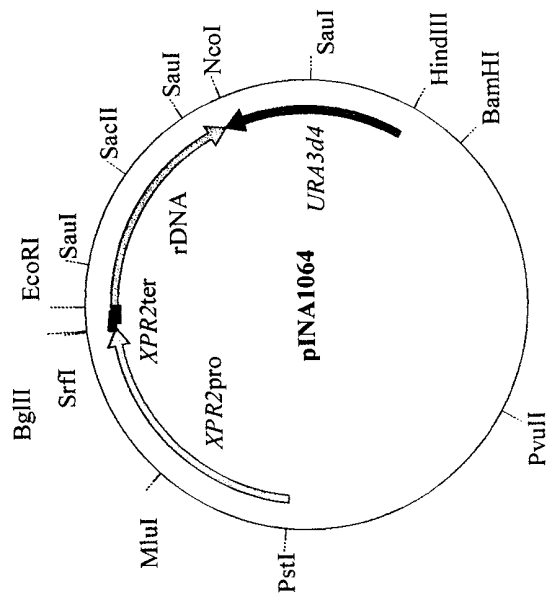
17. Plasmide nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide in die Sequenzen der G-Einheit der rDNA integriert sind.
18. Plasmide nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide illegitim ins Genom integriert sind.
- 5 19. Plasmide nach einem der Ansprüche 12 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide zur Expression von heterologen Proteinen in transformierten Hefezellen geeignet sind.
20. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten haploiden oder diploiden *Yarrowia (Y.) lipolytica* Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch  
10 gekennzeichnet, daß die Expressionskassetten in die Multiple cloning site der Plasmide eingesetzt werden und die *Y. lipolytica* Zellen mit den die Expressionskassetten tragenden Plasmiden transformiert werden.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide auf Replikons bakteriellen Ursprungs aufgebaut werden.
- 15 22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide aus zwei ZETA-Elemente ("Long Terminal Repeats" LTR des Retrotransposons Ylt1) aus *Y. lipolytica* erzeugt werden, die den DNA-Anteil aus *E. coli* flankieren und vor der Transformation der *Y. lipolytica* Zellen der *E. coli* DNA-Anteil abgetrennt wird.
- 20 23. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide aus zwei rDNA-Elemente aus *Y. lipolytica* erzeugt werden, die den DNA-Anteil aus *E. coli* flankieren und vor der Transformation der *Y. lipolytica* Zellen der *E. coli* DNA-Anteil abgetrennt wird.
24. Verwendung von rekombinanter haploider oder diploiden *Y. lipolytica* Zellen nach  
25 einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die transformierten Zellen heterologe Proteine synthetisieren.
25. Verwendung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß nachdem von den transformierten Zellen heterologe Proteine synthetisieren worden sind, die transformierten Zellen zur gezielten Stoffumwandlung eingesetzt werden.

30

Hierzu 15 Blatt Zeichnungen



**Abb.1**





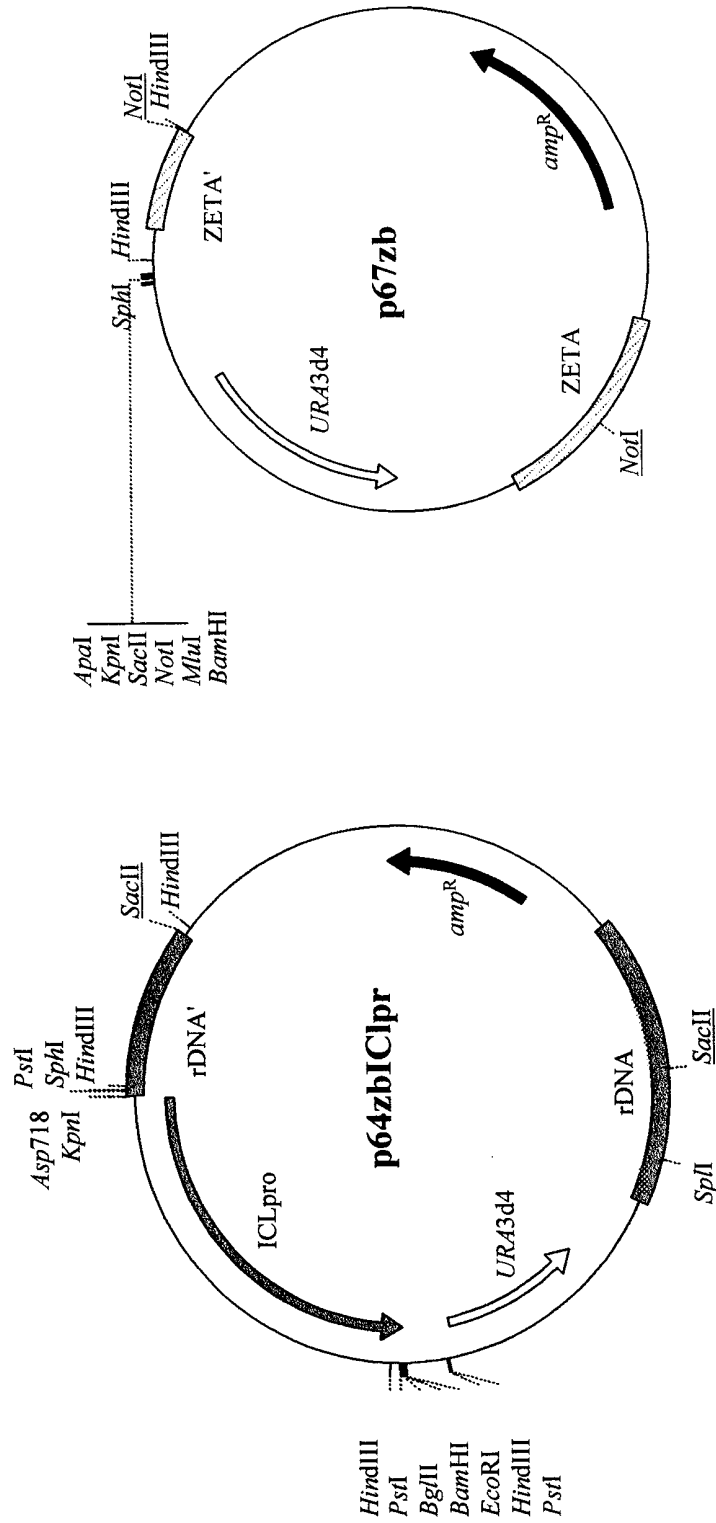


Abb. 4

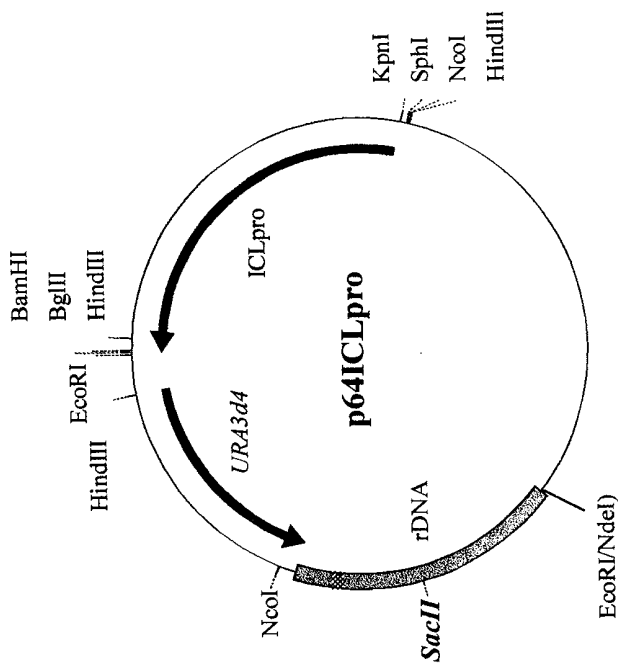
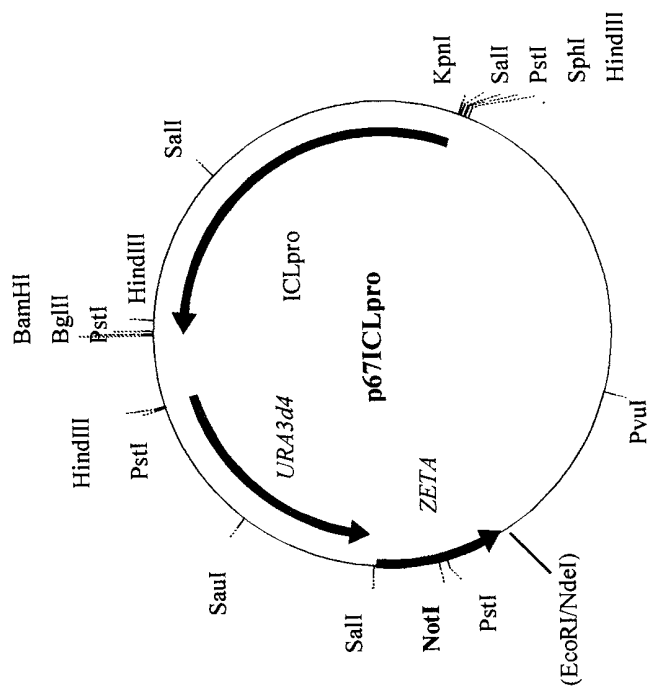


Abb. 5

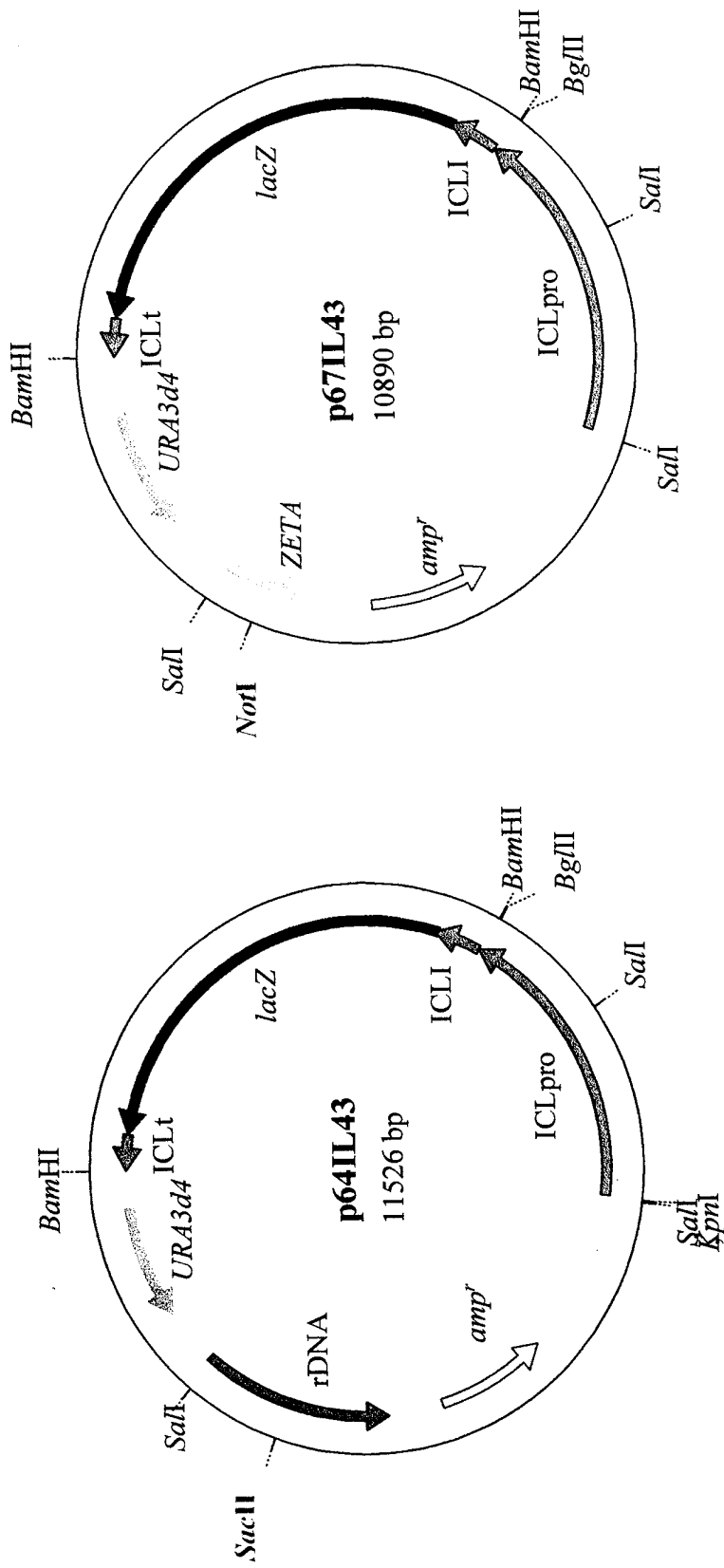


Abb. 6

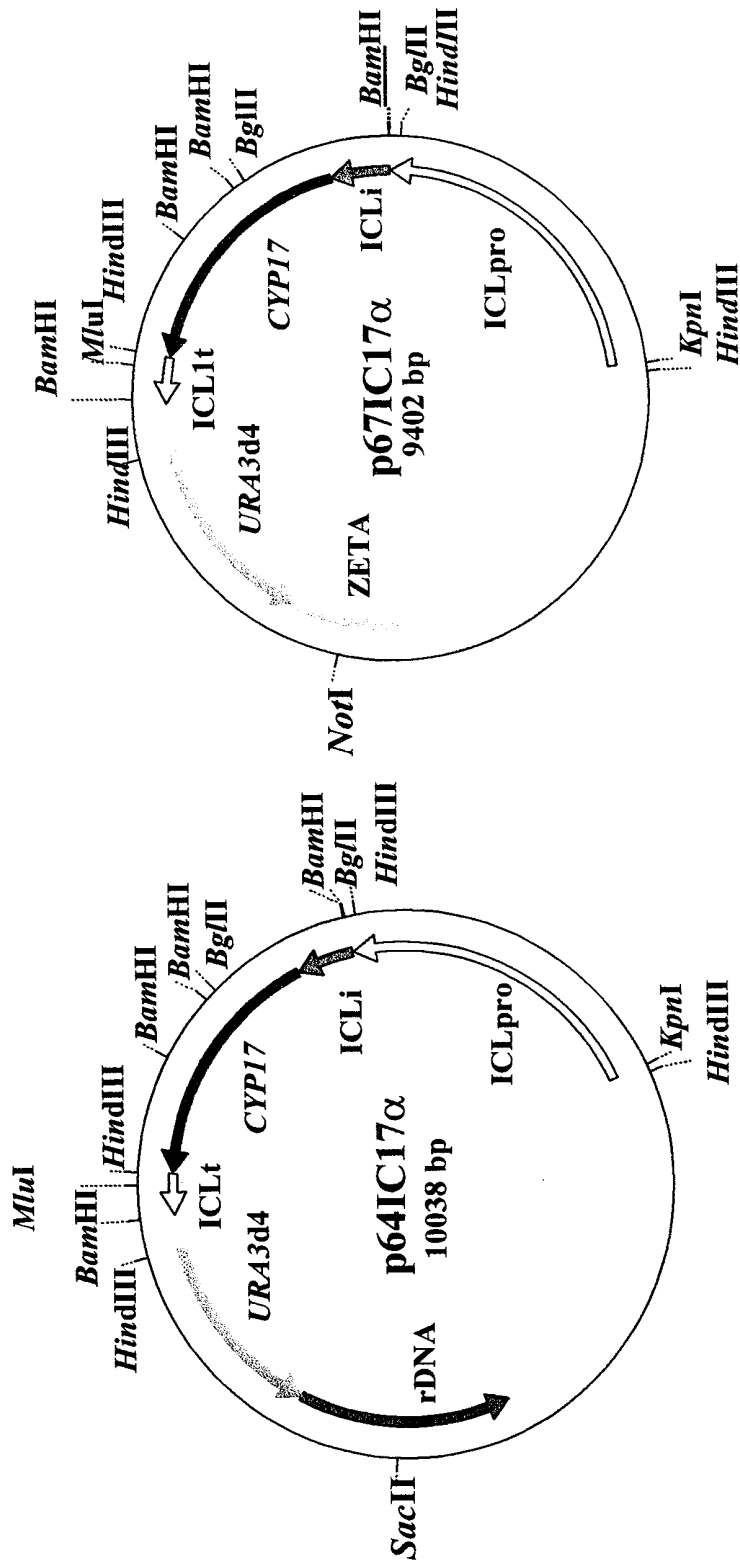


Abb. 7

Plasmid	Integrationsort	Stamm PO1d Transformanden/ $\mu$ g DNA	Stamm E129 Transformanden/ $\mu$ g DNA
pINA62	<i>leu2-270</i>	15000-25000	15000-25000
p64IL43	rDNA	30-50	30-50
p67IL43	ZETA	3-6	30-50
Einsatz von DMSO für die selbe Zellcharge			
pINA62	<i>leu2-270</i>	15000-25000	15000-25000
p64IL43	rDNA	150-350	200-350

Abb. 8

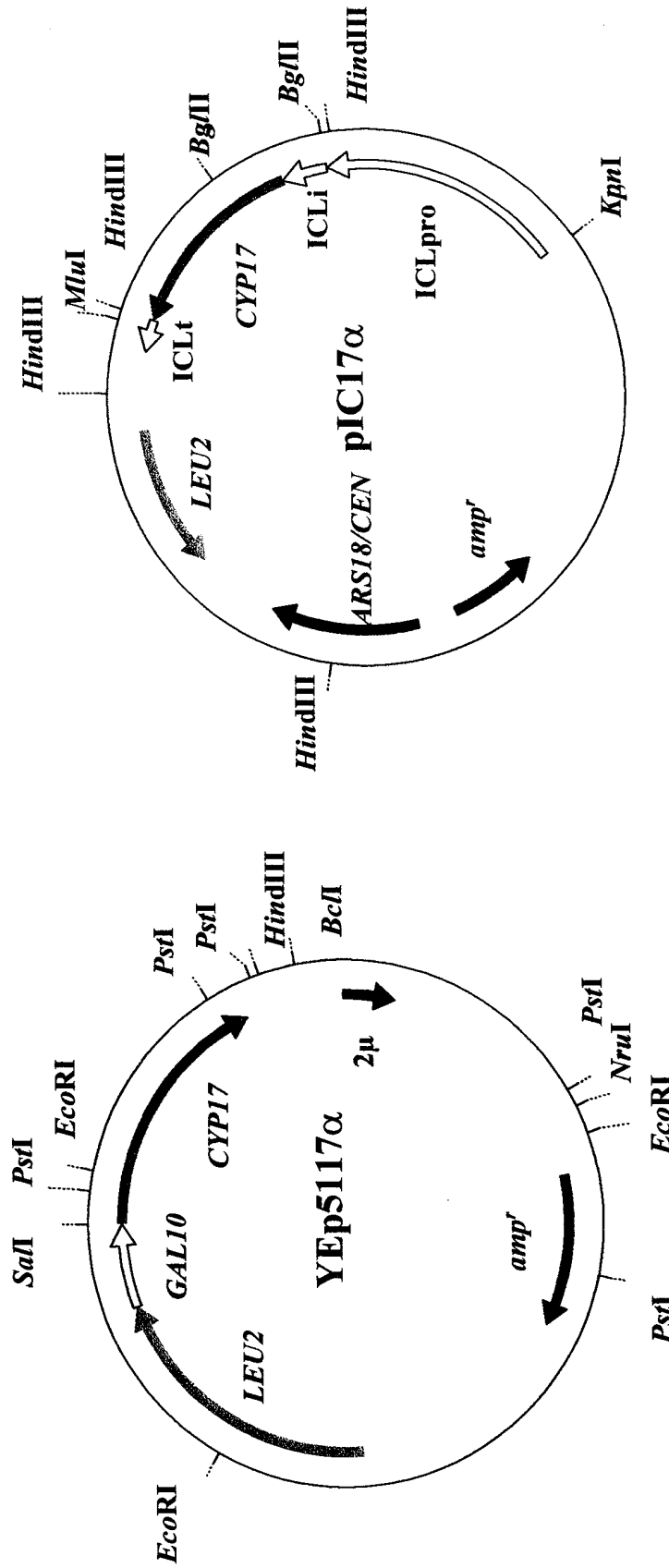


Abb. 9

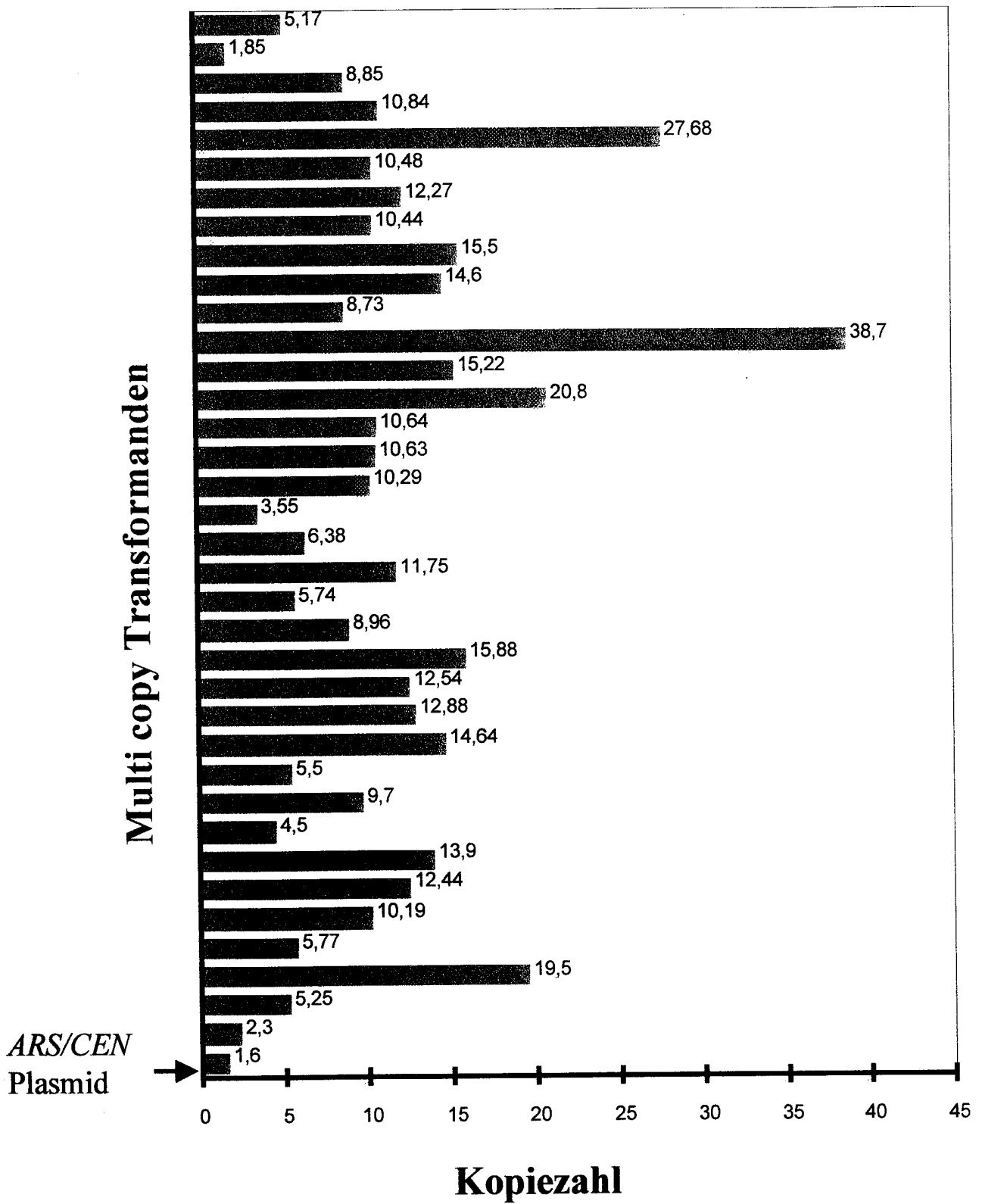
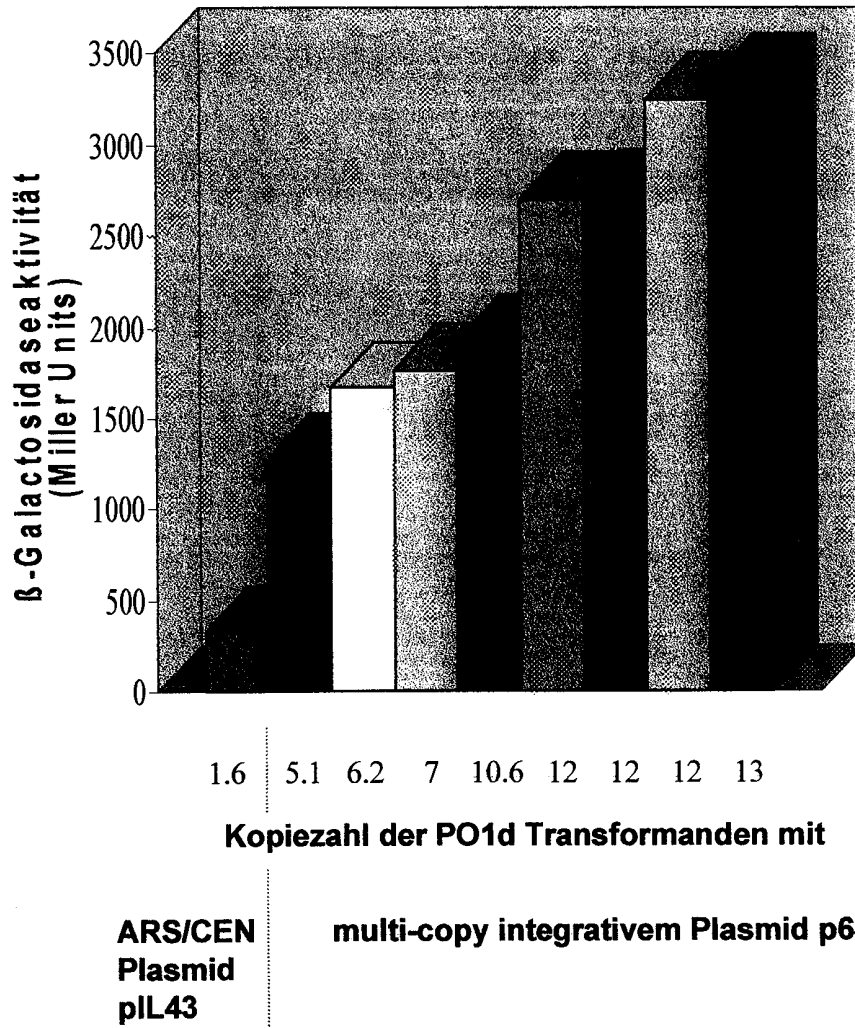


Abb. 10



**Abb.11**

**Tabelle:****Vergleich der Expressionssysteme für Cytochrom P45017 $\alpha$  in den Hefen *Yarrowia lipolytica* (low-copy) und *Saccharomyces cerevisiae* (multi copy) bei Anwendung von autonom replizierenden Plasmiden**

Rezipientenstämme: *Yarrowia lipolytica* B204-12A-213 (*leu2 ura3leaky*)  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18 (*leu2 his3*)

Bestimmung der P45017a Aktivität mit 3H-markiertem Progesteron als Substrat.

Hefestamm / Vektor  (Kopiezahl)	C-Quelle	P450-Gehalt in Mikrosomen  pmol/mgProtein	P450-Aktivität in Zellen  nmol / nmol P450 x min	P450-Aktivität in Mikrosomen  nmol / nmol P450 x min
<i>Y. lipolytica</i> / PIC17 $\alpha$ (1-3)	Ethanol	14 (COD) 10-20 (WB)	74	8,1
<i>Y. lipolytica</i> / PIC17 $\alpha$ (1-3)	Hexadecan	(50) <sup>1</sup> (COD) 10-20 (WB)	124	9,8
<i>S. cerevisiae</i> / YEp5117 $\alpha$ (50-100)	Galactose	370-400	19	7,1

<sup>1</sup> Der spektral detektierbare Cytochrom P450 Gehalt wird hauptsächlich durch die wirtseigenen Alkan-induzierbaren Cytochrome P450 bestimmt.

**Abb. 12**

Rezipientenstämme: *Yarrowia lipolytica* B204-12A-213 (*leu2 ura3*)  
 Plasmide: pIC17a (low-copy, *ICLI* Promotor)

*Saccharomyces cerevisiae* GRF18 (*leu2 his3*)  
 YEp5117 $\alpha$  (high-copy, *GALI10* Promotor)

Rezipient/ Vektor (Kopiezahl)	C-Quelle	P450-Gehalt der Mikrosomen	NADPH- Reduktase <sup>2)</sup> Aktivität der Mikrosomen	Verhältnis Reduktase/P450 U/ pmol	P450-Aktivität intakter Zellen <sup>3)</sup>	P450-Aktivität der Mikrosomen <sup>3)</sup>
		pmol / mg Protein	nmol/min x mg Protein		nmol / nmol P450 x min	nmol / nmol P450 x min
<i>Y. lipolytica</i> / pIC17a (1-3)	Ethanol	14 (COD) 10-20 (WB)	175	12,5	74	8,1
	Hexadecan	(50) <sup>1)</sup> (COD) 10-20 (WB)	580	11,5	124	9,8
<i>S. cerevisiae</i> / YEp5117 $\alpha$ (50-100)	Galactose	370-400 COD	230	0,57 - 0,66	19	7,1

<sup>1)</sup> Der spektral detektierbare Cytochrom P450 Gehalt wird hauptsächlich durch die wirtseigenen alkaninduzierbaren Cytochrome P450 bestimmt. **COI** CO-Differenz-Spektrum; **WB** - Western-Blot. <sup>2)</sup> Bestimmung der NADPH-Cytochrom P450-Reduktaseaktivität als Cytochrom c Reduktaseaktivität. <sup>3)</sup> Bestimmung der P45017 $\alpha$  Aktivität mit <sup>3</sup>H-markiertem Progesteron als Substrat

**Abb.13**

Stamm	C-Quelle	P450 Gehalt (pmol/10 <sup>8</sup> Zellen)	P450 Gehalt (pmol P450 / ml Kultur)
<i>Y. lipolytica</i> PO1d (p67IC17 $\alpha$ T4) (integrativ, 8-10 Kopien)	Ethanol	618	44
<i>S. cerevisiae</i> GRF18/YEp17 $\alpha$ (replikativ, 50 Kopien)	Galactose	94	100

Abb.14

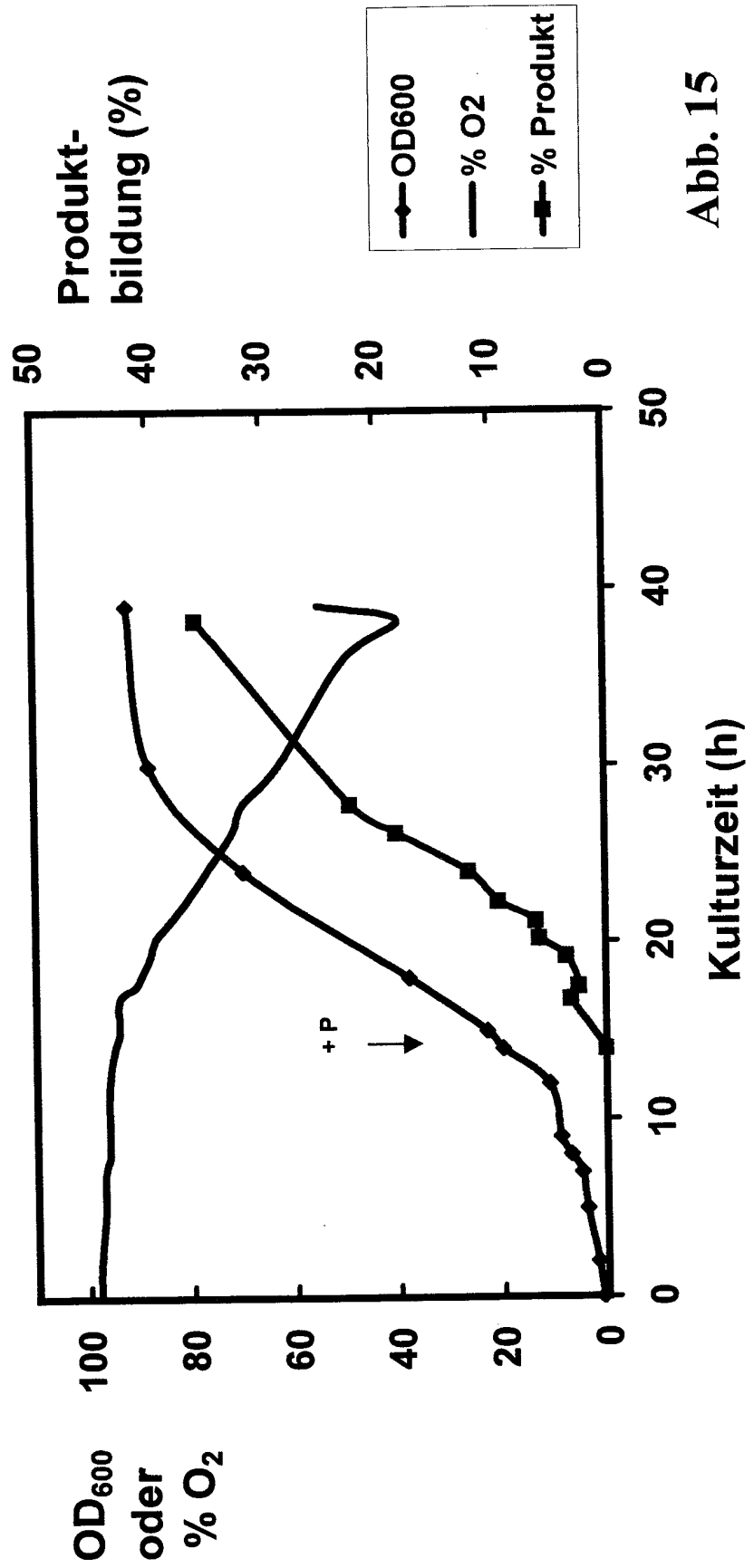


Abb. 15