



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 411 600 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 60/2001
(22) Anmeldetag: 16.01.2001
(42) Beginn der Patentdauer: 15.08.2003
(45) Ausgabetag: 25.03.2004

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 15/60**

(56) Entgegenhaltungen:
PLANT PHYSIOLOGY (1999) VOL. 119,
SEITEN 1535-1546
PLANTA (1999) VOL. 206, NO. 3, SEITEN
388-393

(73) Patentinhaber:
DSM FINE CHEMICALS AUSTRIA NFG
GMBH & CO KG.
A-4021 LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).

(54) DNA-SEQUENZEN KODIEREND FÜR HYDROXYNITRILLYASE, DARAUS ABGELEITETE REKOMBINANTE PROTEINE MIT HYDROXYNITRILLYASE-AKTIVITÄT, VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG

AT 411 600 B

(57) DNA-Sequenzen, kodierend für Hydroxynitrilase, herstellbar durch eine Primerkombination aus einem Primer basierend auf der DNA-Sequenz der aus Blütenmaterial von *Prunus amygdalus* gewonnenen cDNA und einem Primer basierend auf einer der DNA-Sequenzen der Isoenzyme aus *Prunus serotina*, anschließende Amplifikation und Klonierung, sowie rekombinante Proteine, herstellbar durch heterologe Expression der genomischen DNA-Sequenz dieser *hnl* Gene in geeigneten Wirtszellen und daraus abgeleitete Proteine und Fusionsproteine und Verwendung der Proteine zur Herstellung von (R)-Cyanhydrinen.

Biokatalytische Verfahren haben für die chemische Industrie eine hohe Bedeutung erlangt. Die Durchführung chemischer Reaktionen unter Zuhilfenahme biologischer Katalysatoren ist dabei vor allem in solchen Anwendungsgebieten von Interesse, in denen die oft vorhandene Eigenschaft von Enzymen, bei chemischen Reaktionen mit chiralen oder prochiralen Komponenten eines der beiden Enantiomeren bevorzugt umzusetzen oder zu bilden, genutzt werden kann.

Wesentliche Voraussetzungen für die Nutzung dieser günstigen Eigenschaften von Enzymen sind ihre Verfügbarkeit in technisch benötigten Mengen und eine ausreichend hohe Reaktivität, sowie Stabilität unter den realen Bedingungen eines technischen Verfahrens.

Eine besonders interessante Klasse von chiralen chemischen Verbindungen sind Cyanhydrine. Cyanhydrine sind beispielsweise bei der Synthese von α -Hydroxysäuren, α -Hydroxyketonen, β -Aminoalkoholen, die zur Gewinnung biologisch wirksamer Stoffe, z.B. pharmazeutischer Wirkstoffe, Vitamine oder pyrethroider Verbindungen Verwendung finden, von Bedeutung.

Die Herstellung dieser Cyanhydrine erfolgt durch Addition von Blausäure an die Carbonylgruppe eines Ketons oder Aldehyds.

Die technische Herstellung von chiralen Verbindungen, wie etwa (S)-Cyanhydrinen, konnte durch die Erschließung des Enzyms (S)-Hydroxynitril Lyase aus *Hevea brasiliensis* realisiert werden und ist beispielsweise in WO 97/03204, EP 0 951561 und EP 0 927 766 beschrieben.

Es gibt jedoch eine Vielfalt an interessanten chemischen Verbindungen, bei welchen die R-Enantiomeren für technische Anwendungen von Bedeutung sind. Bisher wurden lediglich Verfahren zur Herstellung einer Reihe von Produkten beschrieben, die nur im Labormaßstab eingesetzt werden können (z.B.: EP 0 276 375, EP 0 326 063, EP 0 547 655). Dabei wurden vorwiegend Enzympräparationen eingesetzt, die aus Pflanzen der Familie Rosaceae, beispielsweise aus den Kernen von Mandeln (*Prunus amygdalus*) gewonnen wurden.

In letzter Zeit gewannen *Prunus spezie*s immer mehr an Bedeutung, sodass versucht wurde, diese genauer zu erforschen.

Aus der Fachliteratur, beispielsweise aus Plant Physiology, April 1999, Vol 119, pp. 1535-1546, ist bekannt, dass in *Prunus spezie*s mehrere R-Hnl Isoenzyme vorkommen können. Diese Isoenzyme sind in verschiedenen Geweben der Pflanze unterschiedlich stark exprimiert. Bei der zu *Prunus amygdalus* nahe verwandten Pflanze *Prunus serotina* konnten bislang 5 verschiedene Isoenzyme identifiziert und deren Gene sequenziert werden. Von *Prunus amygdalus* ist bislang nur ein Isoenzym in Planta (1998) 206: 388-393 beschrieben worden, nämlich eines das in der Blütenknospe am stärksten exprimiert ist. Ein Gen für dieses R-Hnl Isoenzyme wurde bereits isoliert und die cDNA sequenziert.

Es ist jedoch noch kein Bericht einer erfolgreichen (funktionellen) heterologen Expression eines solchen Gens in der Fachliteratur oder Patentliteratur beschrieben.

Auch technische Anwendungen im größeren Maßstab sind bislang nicht realisiert worden. Die wesentliche Ursache dafür ist, dass Enzympräparationen aus Mandelkernen mit Hydroxynitrilase-Aktivität bisher nicht in ausreichenden Mengen und zu vertretbaren Kosten verfügbar waren.

Ziel dieser Erfindung war es daher eine Basis zu schaffen, die eine R-Hydroxynitrilase in für technische Anwendungen benötigten Mengen bereitstellen kann.

Zur Erreichung dieses Zieles wurde ein Weg gesucht, ein der R-Hnl Präparation von *Prunus amygdalus* entsprechendes Enzym durch gentechnische Strategien mit Hilfe eines entsprechenden rekombinanten Mikroorganismenstammes zu produzieren. Ein solches rekombinantes Enzym mit R-Hnl Aktivität sollte auf diese Art in ausreichender Menge technisch verfügbar gemacht werden.

Aus den in obiger Literatur beschriebenen DNA Sequenzen kann abgeleitet werden, dass bei den Genen der verschiedenen Isoenzyme bestimmte Bereiche hoch konserviert sind. Das wird erfindungsgemäß als Grundlage herangezogen, Primer für die PCR-Amplifikation von *P. amygdalus* R-Hnl Genen bzw. DNA-Sequenzen zu generieren. Mit Hilfe solcher Primer können dann mit aus Mandelkernen (*P. amygdalus*) isolierter DNA als Template (Vorlage) mittels PCR DNA-Stücke amplifiziert werden, die bei Analyse durch Agarose-Gelelektrophorese konkrete spezifische Banden zeigen. Erfindungsgemäß waren dabei Banden zu finden, die der Größe von mdl Genen (Planta (1998) 206: 388-393) entsprachen. Anschließend werden entsprechende Primer für alle bei *Prunus serotina* bekannten Isoenzyme generiert und entsprechende PCR Produkte gewonnen. DNA aus diesem Bereich wird aus entsprechenden präparativen Agarosegelen isoliert und in Standardvektoren für die Klonierung von PCR-generierten Fragmenten in *Escherichia coli* einkloniert.

Die Sequenzanalyse von einer Serie ausgewählter Klone ergab, dass Klone mit Homologien zu den jeweiligen bereits bekannten R-Hnl Genen von Prunusarten vorhanden sind, obwohl sich die Sequenzen der so erhaltenen Klone bzw. Gene in mehreren Sequenzpositionen von den bereits bekannten bzw. publizierten Sequenzen unterscheiden, wodurch wichtige funktionelle Unterschiede festgelegt werden.

Es wurde daher unerwarteterweise eine neue Variante der Hnl Gene gefunden, obwohl Primerkombinationen verwendet wurden, bei der die bereits bekannte Sequenz einer aus Blütenmaterial von *Prunus amygdalus* gewonnenen cDNA herangezogen wurde.

Die neuen Gene wurden sequenziert und die genomische DNA-Sequenz ermittelt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demnach ein Verfahren zur Herstellung von DNA-Sequenzen, codierend für Hydroxynitrillyase, das dadurch gekennzeichnet ist, dass

eine Primerkombination aus einem Primer 1 basierend auf der DNA-Sequenz des 5'-Bereichs der *mdl* Gene von *Prunus serotina* und *Prunus amygdalus* und einem Primer 2 basierend auf dem 3'-Bereich der DNA-Sequenzen eines der Hydroxynitrillyase Isoenzyme aus *Prunus serotina* oder *Prunus amygdalus* zur Amplifikation mit einer DNA Polymerase unter Verwendung von DNA aus Organismen die für Hydroxynitrillyasen kodierende Gene enthalten als Vorlage verwendet wird und anschließend kloniert wird, sowie die durch dieses Verfahren hergestellten DNA-Sequenzen.

So können beispielsweise genspezifische PCR Primer basierend auf der Sequenzhomologie des *mdl5* Gens von *Prunus serotina* und des MDL1 Gens von *Prunus amygdalus* hergestellt werden, worauf nach Amplifikation und Klonierung ein neues Gen, das *hnl5* Gen, erhalten wird.

Beispielsweise weist das durch PCR-Amplifikation gewonnene *hnl5* Gen aus *Prunus amygdalus* die in Figur 1 abgebildete Nukleotidsequenz auf, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist. Gegenstand der Erfindung sind auch *hnl5* Gene, die eine Nukleotidsequenz aufweisen, die zumindest zu 80%, bevorzugt zu 85%, identisch ist mit der in Fig. 1 abgebildeten Sequenz.

Das neue *hnl5* Gen unterscheidet sich von der publizierten Sequenz des MDL1 Gens von *Prunus amygdalus* in 7 Basenpaaren.

In Analogie können erfindungsgemäß weitere genspezifische PCR Primer, beispielsweise basierend auf der Sequenz der bekannten *mdl1*-, *mdl2*-, *mdl3*- und *mdl4*-Gene von *Prunus serotina* und des MDL1 Gens von *Prunus amygdalus* hergestellt werden, worauf nach Amplifikation und Klonierung weitere neue Gene bzw. DNA-Sequenzen, wie etwa *hnl1-4*, erhalten werden, die alle Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind.

Die genomischen Klone bzw. deren genomische DNA stellen die Basis für die Gewinnung von Enzympräparationen durch heterologe Expression, beispielsweise durch induzierbare oder konstitutive Expression, in verschiedenen Wirtszellen dar.

Weiters ist aus der Sequenzanalyse der genomischen DNA der neuen, erfindungsgemäßen Gene bzw. DNA-Sequenzen ersichtlich, dass es sich bei dem von den neuen Genen bzw. DNA-Sequenzen kodierten Proteinen um Proteine handelt, die über eine Signalsequenz bzw. ein pflanzliches Signalpeptid verfügen, wodurch auch eine sekretorische Expression von heterologen Proteinen in geeigneten Wirtszellen ermöglicht wird.

Dabei werden spezielle Expressionsvektoren verwendet, mit denen das von einem der einklonierten neuen Gene bzw. DNA-Sequenzen codierte Protein als Fusionsprotein mit einem Signalpeptid exprimiert wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft demnach weiters rekombinante Proteine, herstellbar durch heterologe Expression der genomischen DNA-Sequenz der *hnl* Gene (beispielsweise *hnl1*, *hnl2*, *hnl3*, *hnl4* und *hnl5*;) aus *Prunus amygdalus* in geeigneten Wirtszellen bzw. ein Verfahren zur Herstellung derselben.

Geeignete Wirtszellen sind dabei beispielsweise Mikroorganismen. Bevorzugt sind eukaryotische Mikroorganismen, besonders bevorzugt Pilze. Beispiele dafür sind *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*.

Beispielsweise ist die aus der Nukleotidsequenz des *hnl5* Gens abgeleitete Aminosäuresequenz der Hydroxynitrillyase Hnl5 aus *Prunus amygdalus* in Figur 3 dargestellt.

Die Erfindung betrifft außerdem die Verwendung einer DNA-Sequenz, die für das pflanzliche Signalpeptid von Rosacea spezie codiert, zur sekretorischen Expression von heterologen Proteinen in Wirtszellen und die derart gewonnenen Proteine.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind demnach Fusionsproteine bzw. heterologe Protei-

ne, die durch Verwendung einer DNA-Sequenz, die für das pflanzliche Signalpeptid von Rosacea spezie codiert, und durch sekretorische Expression derselben in geeigneten Wirtszellen herstellbar sind bzw. ein Verfahren zur Herstellung derselben.

5 Geeignete Wirtszellen sind dabei wiederum beispielsweise Mikroorganismen. Bevorzugt sind Bakterien oder eukaryotische Mikroorganismen, besonders bevorzugt Pilze, wie etwa *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*.

Beispielsweise ist die Nukleinsäuresequenz des für ein sekretorisches Hybridprotein (PamHNL5xGOX) mit Hnl-Aktivität codierenden DNA Fragments, bestehend aus Sequenzen des *hnl5* Gens von *P. amygdalus* und dem Glukoseoxidase-Gen von *Aspergillus niger* in Figur 4 abge-
10 bildet. Die aus der Nukleotidsequenz (Figur 4) abgeleitete Aminosäuresequenz des Hybridproteins PamHNL5xGOX ist in Figur 5 dargestellt.

Figur 6 zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hnl5 Proteine aus *Prunus amygdalus* und des Hybridproteins PamHNL5xGOX.

15 Um zu den erfindungsgemäßen rekombinanten Proteinen zu gelangen, werden beispielsweise die Klone, die Homologien zu den bekannten Genen für *mdl1*, *mdl2*, *mdl3*, *mdl4* und *mdl5* von *P. serotina* und MDL1 von *P. amygdalus* zeigen, weiter bearbeitet.

Um rekombinante Proteine mit Hydroxynitrilase Aktivität zu erhalten werden die entsprechenden Gene z.B. das *hnl5* Gen, z.B. in einen Expressionsvektor für *Pichia pastoris* oder für *Saccharomyces cerevisiae* eingebaut.

20 Zuvor kann die genomische DNA mittels PCR gespleisst werden. Bevorzugt wird ein Basisfragment zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für die heterologe Expression des entsprechenden Gens in Bakterien und Eukaryonten hergestellt. Dazu wird ein Plasmid konstruiert, aus dem ein für ein erfindungsgemäßes Gen kodierendes DNA Fragment für den Einbau in verschiedene Expressionsvektoren durch Ausschneiden mit Restriktionsendonukleasen gewonnen werden
25 kann.

Mit den erfindungsgemäßen Genen kann somit durch Expression, beispielsweise mit einem induzierbaren Promotorsystem oder einem konstitutiv exprimierenden Promotorsystem, in einem heterologen Wirt eine funktionelle Hnl produziert werden.

30 Aus einer großen Anzahl von Transformanten können somit rekombinante Stämme von beispielsweise *Pichia pastoris* gefunden werden, die rekombinantes Protein mit R-Hnl Aktivität überexprimieren. Das Protein mit R-Hnl Aktivität ist bei diesen Stämmen nach Induktion der Expression zum überwiegenden Teil im Kulturüberstand zu finden.

Somit konnte erstmals ein rekombinantes Protein in für technische Anwendungen nutzbaren Mengen hergestellt werden, das eine zu in Mandelkernen (Kerne von *Prunus amygdalus*) aufzufindende vergleichbare R-Hnl Aktivität aufweist.
35

Unerwarteterweise konnte festgestellt werden, dass die rekombinanten Proteine mit R-Hnl Aktivität, die sich beispielsweise von den erfindungsgemäßen *hnl1-5* Genen ableiten und mit Pam-Hnl1-5 bezeichnet werden, im Vergleich zum aus Mandelkernen isolierten Enzympräparat wesentlich bessere Eigenschaften als Biokatalysator in Reaktionsansätzen zur Herstellung von
40 Cyanhydrinen aufweisen und somit besonders vorteilhaft für die biokatalytische Synthese von Cyanhydrinen verwendet werden können.

Die Sequenzen der erfindungsgemäßen rekombinanten Proteine können weiters auch noch am C-terminalen Ende verkürzt werden, bzw. können die Sequenzen im N- und C-terminalen Bereich durch solche eines verwandten Proteins mit anderen Funktionen ausgetauscht werden.

45 Die rekombinanten Proteine zeichnen sich insbesondere auch dadurch aus, dass sie eine wirtsspezifische Glykosilierung aufweisen, wodurch die rekombinanten Proteine wesentlich stabiler sind als die nativen Proteine.

Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen rekombinanten Proteine ergibt sich durch die wesentlich höhere Stabilität, durch die wesentlich weniger Enzymmenge im Vergleich zu nativem
50 Enzym benötigt wird um hohe Enantiomerenreinheit zu erzielen. So zeigten Vergleichsversuche, dass bei Verwendung der erfindungsgemäßen rekombinanten Proteine lediglich ein Zehntel der benötigten Menge an nativem Protein benötigt wird, um vergleichbare Enantiomerenreinheiten (ee-Werte) zu erzielen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist demnach die Verwendung der erfindungsgemäßen
55 rekombinanten Proteine (HNLs) zur Herstellung von (R)-Cyanhydrinen.

Als Ausgangsmaterialien zur Herstellung der (R)-Cyanhydrinen werden ein Aldehyd oder ein Keton als Substrat, ein Cyanidgruppendonor und ein erfindungsgemäßes rekombinantes Protein eingesetzt.

Unter Aldehyden sind dabei aliphatische, aromatische oder heteroaromatische Aldehyde zu verstehen. Unter aliphatischen Aldehyden sind dabei gesättigte oder ungesättigte, aliphatische, geradkettige, verzweigte oder cyclische Aldehyde zu verstehen. Bevorzugte aliphatische Aldehyde sind geradkettige Aldehyde mit insbesondere 2 bis 30 C-Atomen, bevorzugt von 2 bis 18 C-Atomen, die gesättigt oder ein- oder mehrfach ungesättigt sind. Der Aldehyd kann dabei sowohl C-C-Doppelbindungen als auch C-C-Dreifachbindungen aufweisen. Die aliphatischen, aromatischen oder heteroaromatischen Aldehyde können weiters unsubstituiert oder durch unter den Reaktionsbedingungen inerte Gruppen, beispielsweise durch gegebenenfalls substituierte Aryl- oder Heteroarylgruppen, wie Phenyl-, Phenoxy- oder Indolylgruppen, durch Halogen-, Hydroxy-, Hydroxy-C₁-C₅-Alkyl-, C₁-C₅-Alkoxy-, C₁-C₅-Alkylthio-, Ether-, Alkohol-, Carbonsäureester-, Nitro- oder Azidogruppen substituiert sein.

Beispiele für aromatische oder heteroaromatische Aldehyde sind Benzaldehyd bzw. verschiedenen substituierte Benzaldehyde wie etwa 3,4-Difluorbenzaldehyd, 3-Phenoxybenzaldehyd, 4-Fluor-3-phenoxybenzaldehyd, Hydroxybenzaldehyd, Methoxybenzaldehyd, weiters Furfural, Methylfurfural, Anthracen-9-carbaldehyd, Furan-3-carbaldehyd, Indol-3-carbaldehyd, Naphthalin-1-carbaldehyd, Phthalaldehyd, Pyrazol-3-carbaldehyd, Pyrrol-2-carbaldehyd, Thiophen-2-carbaldehyd, Isophthalaldehyd oder Pyridinaldehyd, Thienylaldehyde u.s.w..

Ketone sind aliphatische, aromatische oder heteroaromatische Ketone, bei denen das Carbonylkohlenstoffatom ungleich substituiert ist. Unter aliphatischen Ketonen sind gesättigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Ketone zu verstehen. Die Ketone können gesättigt oder ein- oder mehrfach ungesättigt sein. Sie können unsubstituiert, oder durch unter Reaktionsbedingungen inerte Gruppen, beispielsweise durch gegebenenfalls substituierte Aryl- oder Heteroarylgruppen wie Phenyl- oder Inolylgruppen, durch Halogen-, Ether-, Alkohol-, Carbonsäureester-, Nitro- oder Azidogruppen substituiert sein.

Beispiele für aromatische oder heteroaromatische Ketone sind Acetophenon, Indolylaceton u.s.w..

Aldehyde und Ketone, die sich erfindungsgemäß eignen, sind bekannt oder wie üblich herstellbar.

Die Substrate werden in Anwesenheit der erfindungsgemäßen HNLs mit einem Cyanidgruppendonor umgesetzt.

Als Cyanidgruppendonor kommen Blausäure, Alkali-Cyanide oder ein Cyanhydrin der allgemeinen Formel I



in Betracht. In der Formel I bedeuten R₁ und R₂ unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine unsubstituierte Kohlenwasserstoffgruppe, oder R₁ und R₂ gemeinsam eine Alkylengruppe mit 4 oder 5 C-Atomen, wobei R₁ und R₂ nicht gleichzeitig Wasserstoff bedeuten. Die Kohlenwasserstoffgruppen sind aliphatische oder aromatische, bevorzugt aliphatische Gruppen. Bevorzugt bedeuten R₁ und R₂ Alkylgruppen mit 1 - 6 C-Atomen, ganz bevorzugt ist der Cyanidgruppendonor Acetoncyanhydrin.

Die Herstellung des Cyanidgruppendonors kann nach bekannten Verfahren erfolgen. Cyanhydrine, insbesondere Acetoncyanhydrin, sind auch käuflich zu erwerben.

Bevorzugt wird Blausäure (HCN), KCN, NaCN, oder Acetoncyanhydrin, besonders bevorzugt Blausäure als Cyanidgruppendonor eingesetzt.

Die Blausäure kann dabei auch erst kurz vor der Reaktion aus einem ihrer Salze wie etwa NaCN oder KCN freigesetzt und in Substanz oder in gelöster Form dem Reaktionsgemisch zugegeben werden.

Die Umsetzung kann im organischen, wässrigen oder 2-Phasensystem oder in Emulsion durchgeführt werden.

Als wässriges System wird eine wässrige, die erfindungsgemäße HNL enthaltende Lösung oder Pufferlösung verwendet. Beispiele dafür sind Na-Citratpuffer, Phosphatpuffer u.s.w.

Als organisches Verdünnungsmittel können mit Wasser nicht oder geringfügig mischbare aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffe, die gegebenenfalls halogeniert sind, Alkohole, Ether oder Ester oder Gemische davon verwendet werden. Bevorzugt werden Methyl-tert. Butylether (MTBE), Diisopropylether, Dibutylether und Ethylacetat oder deren Gemisch eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen HNLs können dabei entweder als solche oder immobilisiert in dem organischen Verdünnungsmittel vorliegen, die Umsetzung kann jedoch auch in einem Zweiphasensystem oder in Emulsion mit nicht-immobilisierter HNL erfolgen.

Beispiel 1:

Isolierung von genomischer DNA aus Mandelkernen (Kerne von *Prunus amygdalus*)

Getrocknete Mandelkerne (Farmgold, Chargennummer L4532, Ernte 1999) wurden mit einem Messer fein gehackt und in einer Reibschale mit flüssigem Stickstoff eingefroren und unter flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zu einem feinen Pulver aufgerieben. 0,1 Gramm gefrorenes Mandelkernpulver wurden direkt mit 65 °C warmem „Breaking Puffer“ (100 mM NaAc; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl, eingestellt auf pH 5,5; 1,4% SDS und 20 µg / ml RNase A) versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation unter ständigem Schütteln wurden die unlöslichen Zellrückstände durch Zentrifugation (10 min. bei 7000 g) abgetrennt und der Überstand mit einem gleichen Volumen 10M Ammoniumacetat versetzt und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 10.000g wurde der Überstand 2 x mit Phenol/Chloroform (1/1, Phenol äquilibriert mit 50 mM Tris, pH 8.0) extrahiert. Nach einer weiteren Extraktion mit doppeltem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) wurde die DNA aus dem Überstand mit einem gleichen Volumen Isopropanol gefällt, abzentrifugiert, das DNA Pellet mit 70% Äthanol gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde dann für 20 min bei 68°C in 200 µl Wasser gelöst und durch eine Ethanol-fällung (Ausubel et al., 1999) gereinigt. Nach der Zentrifugation wurde das DNA Pellet luftgetrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

Beispiel 2:

Amplifikation und Klonierung eines genomischen DNA Abschnittes von Mandel (*Prunus amygdalus*) DNS mit Homologie zu bekannten *mdl* Genen von Rosaceae.

Da bekannt war, dass in *Prunus spezie*s mehrere Isoenzyme von Hydroxytrillylasen mit hoher Sequenzhomologie zueinander auftreten können (Hu und Poulton, 1999), wurden genspezifische PCR Primer basierend auf der Sequenzhomologie des *mdl5* Gens von *Prunus serotina* und des *MDL1* Gens von *Prunus amygdalus* (Suelves et al., 1998) hergestellt:

Primer 1: 5'- CGGAATTCACAATATGGAGAAATCAACAATGTCAG-3'
Primer 2: 5'- CGGAATTCCTTCACATGGACTCTTGAATATTATG-3'

Die Amplifikation erfolgte in einem 50 µl Ansatz mit 1,2 U „Hotstar“ *Taq* DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland), mit 50 ng genomischer Mandel-DNA als „Template“, je 200 ng Primer 1 und 2, 5 µl eines dNTP (je 2 mM) Mix, alles in 1x PCR Puffer entsprechend dem Manual des „Hotstar Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland), beginnend mit einem 15 minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen (1 min 95°C, 30 sec 64°C, 1 min 72°C) zur Amplifikation und einer abschließenden Inkubation für 5 min bei 72 °C zur Herstellung vollständiger Produkte.

Durch diese PCR wurde ein DNA Fragment in der Grösse von ca. 2,16 kb (festgestellt durch Analyse mittels Agrose-Gelelektrophorese) erhalten. Dieses PCR Produkt wurde mittels „Qiaquick Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem beigefügten Manual gereinigt und unter Verwendung des „Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing“ Kits (Applied Biosystems Inc., Forster City, CA, USA) nach der Strategie des „Primer walking“ ausgehend von den beiden zur PCR eingesetzten Primern sequenziert. Die erhaltene DNA Sequenz des insgesamt 2162 Basenpaare langen PCR Fragments ist in Figur 1 dargestellt.

Ca. 0,5 µg des gereinigten PCR Produktes wurden mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnitten und in den Plasmidvektor pBSSK(-) (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA) über die *EcoRI* Schnittstelle einkloniert. Das Insert eines resultierenden rekombinanten Moleküls (das entsprechende Plasmid wurde mit pBSPamHNL5g bezeichnet) wurde nach der oben beschriebenen Methode sequenziert und die Sequenz des klonierten Fragmentes war zu 100 % identisch mit der Sequenz des oben beschriebenen mit den beiden Primern (1 & 2) erhaltenen PCR Produktes.

Beispiel 3:

Sequenzanalyse des durch PCR Amplifikation mit den Primern 1 und 2 erhaltenen genomischen *Prunus amygdalus* DNA Fragmentes.

Im Bereich des durch PCR amplifizierten und sequenzierten DNA Abschnitts wurde ein offener Leserahmen gefunden, der durch 3 Introns unterbrochen ist. Diese drei Introns wurden mit Hilfe der Intron Consensus Sequenz „GT.....AG“ identifiziert.

Der Leserahmen beginnt mit einem ATG Codon bei Position +13 und endet mit einem Stop Codon bei Position +2151.

Für den kodierenden Bereich wurden die Fragmente von Position 13 bis 115 (Exon I), Position 258 bis 917 (Exon II), 1121 bis 1961 (Exon III) und 2078 bis 2150 (Exon IV) zusammengefügt. Die zusammengefügte DNA Sequenz kodiert für ein Protein mit 559 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 61 kDa, bzw. 57, 9 kDa für eine N-terminal prozessierte Form. Die Peptidmassen wurden mit Hilfe des Programmpakets GCG (Genetics Computer Group, Wisconsin, USA) berechnet. Für dieses Protein wurde die Bezeichnung *PamHnl5* festgelegt.

Die für den offenen Leserahmen (ohne Introns) abgeleitete Proteinsequenz ist in Figur 3 gezeigt. Es konnten ausgeprägte Homologien zu bekannten Hydroxynitrilysasen von *Rosaceae* festgestellt werden („Blast“ Programm, GCG Paket, Version 10.1, Genetics Computer Group, Wisconsin, USA) wobei die höchsten Homologien zu den publizierten Sequenzen von Mdl1 aus *Prunus amygdalus* (99 prozentige Identität, Suelves et al. 1998) und von Mdl5 aus *Prunus serotina* (94 prozentige Identität, Hu und Poulton, 1999) bestehen. Mit Hilfe dieser Homologie wurde auch eine spaltbare Signalsequenz mit Spaltung zwischen S27 und L28 identifiziert. Eine solche Spaltstelle konnte bei den beiden Isoenzymen Mdl1 und Mdl4 von *Prunus serotina* durch N-terminale Sequenzierung der aus Pflanzenmaterial gereinigten nativen Proteine nachgewiesen werden (Zihua Hu und Jonathan E. Poulton, Plant Physiology, 119, 1535 - 1546, 1999). Die Sequenzen von verschiedenen in *Rosacea species* vorhandenen HNL Isoenzymen sind nur von *Prunus serotina* bekannt. Aufgrund der höchsten Homologien zur Sequenz von Mdl5 aus *Prunus serotina* wurde das neue *hnl* Gen aus *Prunus amygdalus* als *hnl5* festgelegt. Die Suche nach Sequenzmotiven in der PROSITE-Sequenzmotiv Datenbank (GCG Paket, Version 10.1, Genetics Computer Group, Wisconsin, USA) ergab das Vorhandensein von 13 potentiellen N-Glykosilierungsstellen (in Figur 3 eingezeichnet).

Beispiel 4:

Gewinnung eines intronfreien *Prunus amygdalus hnl5* Gens durch PCR Splicing. Mittels einer speziellen PCR Strategie unter Verwendung von überlappenden Primern wurden die kodierenden Bereiche durch 4 aufeinanderfolgende PCR Reaktionen miteinander verbunden (entsprechend Figur 2).

In der ersten PCR Runde (PCR1-1 und PCR1-2) wurden die Exons II und III mit den Primerpaaren PamHNL5b/PamHNL5c (PCR1-1) bzw. PamHNL5d/PamHNL5e (PCR1-2) amplifiziert. Die 50 µl PCR Ansätze in 1x PCR Puffer (Qiagen) enthielten: je 100 pmol der entsprechenden Primer, 2,5 U „Hotstar“ *Taq* DNA Polymerase (Qiagen), 5 µl eines dNTP (je 2 mM) Mix, 10 ng des Plasmids pBSPamHNL5g als Template. Es wurde folgendes Programm gefahren: 15 min 95 °C, 30 Zyklen 1 min 95 °C, 30 sec. 68°C, 1 min 72 °C und zum Abschluss 5 min 72 °C zur Herstellung vollständiger Produkte). Die Produkte aus PCR1-1 und PCR1-2 wurden nach elektrophoretischer

Trennung in einem Agarosegel mittels QiaexII Kit aus dem Gel eluiert.

Durch Amplifikation von ca. 50 ng des Produktes aus PCR1-1 mit je 100 pmol der Primer PamHNL5a2 und PamHNL5c erfolgte in der zweiten PCR-Runde (PCR2) eine Verlängerung dieses ersten PCR Produktes. Es wurde folgendes Programm gefahren: 15 min 95 °C, 30 Zyklen 1 min 95 °C, 30 sec. 68°C, 1 min 72 °C und zum Abschluss 5 min 72 °C zur Herstellung vollständiger Produkte). Die sonstigen Bedingungen waren gleich wie bei PCR1. Dieses PCR Produkt wurde nach elektrophoretischer Trennung ebenfalls über ein Agarosegel gereinigt und eluiert.

Durch primerlose PCR wurden in der dritten PCR-Runde (PCR3) die Produkte aus PCR1-2 und PCR2 mit Hilfe der überlappenden Enden miteinander verbunden (5 Zyklen mit 1 min bei 94°C, 30 sec bei 68°C und 1,5 min 72°C, je ca. 100 ng der beiden Produkte aus PCR1-1 und PCR2 in 50 µl Ansätzen in 1x PCR Puffer (Qiagen), 5 µl des dNTP (je 2 mM) Mix und 2,5 U „Hotstar“ Taq DNA Polymerase (Qiagen).

Die Ergänzung zur vollen Länge des kodierenden *Prunus amygdalus hnl5* Gens und zur Amplifikation des vollständigen Produktes erfolgte in einer vierten PCR-Runde (PCR4) mit je 100 pmol der Primer PamHNL5a1 und PamHNL5f. Diese wurden direkt zum Reaktionsgemisch der PCR 3 zugegeben. Es wurde folgendes Programm gefahren: 20 Zyklen mit 1 min 95 °C, 30 sec. 63°C, 1,5 min 72 °C und zum Abschluss 5 min 72 °C). Die sonstigen Bedingungen waren gleich wie bei PCR1.

Das in der letzten PCR-Runde erhaltene Produkt wurde über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt und die DNA mit einer Grösse von 1,6 - 1,8 kb mittels „QuiaexII“ Kit (Qiagen) aus dem Gel eluiert und über die *EcoRI* Schnittstelle in das Plasmid pBSSK(-) inkloniert. Ein Klon mit korrektem Restriktionsmuster wurde ausgewählt und sequenziert.

Die Sequenz im kodierenden Bereich war zu 100 % ident mit den Exons der genomischen DNA Sequenz. Dieser Klon wurde als pBSPamHNL5orf bezeichnet.

Oligonukleotid-Primer

PamHnl5a1

5'-

GAAGATCTGAATTCCATGGAGAAATCAACAATGTCAGTTATACTATTTGTGTTGC
ATCTTCTTG-3'

PamHnl5a2

5'-

CTATTTGTGTTGCATCTTCTTGTTCTTCATCTTCAGTATTCAGAGGTTCACTCGCT
TGCCAATACTTC-3'

PamHnl5b

5'-

GTTCACTCGCTTGCCAATACTTCTGCTCATGATTTAGCTACTTGAAGTTTGTGT
ACAACGCCACTG-3'

PamHnl5c

5'-GATGTATTGGAAGAGAAGAGGATCTTCTCTACT-3'

PamHnl5d

5'-

GATCCTCTTCTCTTCCAATACATCAAATTTGTCAGCTATTGGAGTCATATATACG G 3'

PamHnl5e

5'-

CAACCGGATTGACCTTTCTTGCAGGATTTGAAGGCCACATACCTTCCTAACATC
AGATAGAAGCC-3'

PamHnl5f

5'-
GAAGATCTGGAATTCTTCACATGGACTCTTGAATATTATGAATAGCCTCCAACCG
GATTGACCTTTCTTGCAG-3'

5 Beispiel 5

Herstellen eines Basisfragments zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für heterologe Expression des *Prunus amygdalus hnl5* Gens in Bakterien und Eukaryonten.

10 Ziel dieses Experiments war die Konstruktion eines Plasmides, aus dem ein für *Prunus amygdalus hnl5* kodierendes DNA Fragment für den Einbau in verschiedene Expressionsvektoren durch Ausschneiden mit Restriktionsendonukleasen gewonnen werden kann. Dabei wurden durch PCR Amplifikation über entsprechende Primer an den Enden des in pBSPamHNL5orf enthaltenen *Prunus amygdalus hnl5* Gens geeignete Sequenzen addiert.

15 Mit den Primern PCRHNL5-a und PCRHNL5-e wurde das Insert des Plasmids pBSPamHNL5orf mittels PCR amplifiziert (10 ng DNA des Plasmids pBSPamHNL5orf als Template, 400 ng Primer PCRHNL5-a, 200 ng Primer PCRHNL5-e). Die PCR Reaktion erfolgte in 50 µl Ansätzen in 1x PCR Puffer (Qiagen), enthaltend 5 µl des dNTP (je 2 mM) Mix und 1,2 U „Hotstar“ Taq DNA Polymerase (Qiagen). Es wurde folgendes Programm gefahren: 15 min 95 °C, 30 Zyklen
20 1 min 95 °C, 30 sec. 68°C, 1,5 min 72 °C und zum Abschluss 5 min 72 °C zur Herstellung vollständiger Produkte.

Das erhaltene DNA Fragment wurde nach Schneiden mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* in den Vektor pBSSK(-) (Stratagene, USA) einkloniert und durch Sequenzierung verifiziert. Das resultierende Plasmid wurde pBSPamHNL5ex benannt. Oligonukleotid-Primer:

25

PCRHNL5-a

5'-

TCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACATATGGAGAAATCAACAATGTCAGTTATACTATTTGTGTTG
30 CATC-3'

PCRHNL5-e

5'-

CGAATTCGCCCTTTTCGCATGCTCACATGGACTCTTGAATATTATGAATAGCCTC-3'

35

Beispiel 6

Konstruktion von Expressionskonstrukten zur heterologen Expression des *hnl5* Gens in *Pichia pastoris*.

40

DNA des Plasmids pBSPamHNL5ex wurde mit *EcoRI* geschnitten und das *hnl*-Fragment vom Vektoranteil mittels präparativer Gelelektrophorese getrennt. Nach Elution der *hnl*-Fragment DNA mittels Qiaex II Kit (Qiagen) wurde dieses über die *EcoRI* Schnittstellen in die Plasmide pHILD2 und pGAPZ (Invitrogen, San Diego, CA, USA) einkloniert. Die richtige Orientierung der Inserts zu den Promotoren wurde mit Hilfe von Kontrollschnitten überprüft. Jeweils ein Klon mit einem korrekt orientierten Insert wurde ausgewählt und konserviert. Die korrekten Übergänge vom Vektoranteil zum eingebauten *hnl*-Fragment wurden durch Sequenzierung verifiziert. Diese beiden entstandenen Expressionsplasmide für *Pichia pastoris* wurden als pHILD-PamHNL5a (für induzierbare Expression) und pGAPPamHNL5a (für konstitutive Expression) bezeichnet.

50

Beispiel 7

Induzierbare Expression des *Prunus amygdalus hnl5* Gens in *Pichia pastoris*

55

DNA des Plasmids pHILDPamHNL5a wurde mit der Restriktionsendonuklease *NotI* geschnitten

und in *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) transformiert. Die Transformation erfolgte nach den Vorschriften des „Pichia Expression Kit“ (Invitrogen, San Diego, CA, USA). 100 Histidin-prototrophe Klone wurden nach den Vorschriften des „Pichia Expression Kit“ in Flüssigmedium (500 ml Schüttelkulturen) angezüchtet und 48 Stunden mit Methanol induziert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCL, pH 7,6) zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 50.0 suspendiert und nach der „Glaskugelmethode“ (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1999) in einem „Merckenschlager“ Homogenisator (Fa. Braun, Melsungen, BRD) aufgeschlossen. Sowohl die Kulturüberstände als auch die Zellysate wurden auf Hnl-Enzym Aktivität mit einem Standard Aktivitätsassay (analog WO 97/03204) unter Verwendung von racemischem Mandelonitril als Substrat bestimmt. Zwei Klone, die bei diesen Schüttelkolbenexperimenten die besten Aktivitäten im Kulturüberstand zeigten (*Pichia pastoris* PamHNL5-a37 und *Pichia pastoris* PamHNL5-a4) wurden ausgewählt und konserviert. Eine Analyse des Methanolverwertungstyps ergab den Phänotyp Mut⁺ (gute Verwertung von Methanol) für *Pichia pastoris* PamHNL5-a37 und den Phänotyp Mut^s (langsame Verwertung von Methanol) für *Pichia pastoris* PamHNL5-a4.

Beispiel 8

Konstitutive Expression des *Prunus amygdalus hnl5* Gens in *Pichia pastoris*

Das Plasmid pGAPPamHNL5a wurde in *P. pastoris* GS115 transformiert. Die Transformation erfolgte nach den Vorschriften des Pichia Expression Kit der Invitrogen Corp (San Diego, CA, USA). Die Selektion von Transformanten erfolgte auf YPD Vollmediumplatten mit 100 mg/l Zeocin. 100 Zeocin-resistente Klone wurden in je 500 ml YPD Vollmedium angezüchtet und 96 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und die Hnl Aktivität im Kulturüberstand bestimmt. Ein Klon der die beste Aktivität im Kulturüberstand zeigte wurde konserviert und mit *Pichia pastoris* PamHNL5-a2 bezeichnet.

Beispiel 9

Produktion von Hnl mit einem mit dem *hnl5* Gen aus *Prunus amygdalus* transformierten Stamm von *Pichia pastoris* (durch Methanol indizierbares Expressionssystem) im Laborbioreaktor.

Die Züchtung von *Pichia pastoris* PamHNL5-a37 erfolgte in einem Standard-Laborbioreaktor (42 L Gesamtvolumen) in einem dreiphasigen Verfahren. Dieses bestand aus einer ersten exponentiellen und einer zweiten linearen Wachstumsphase zur Bildung von Biomasse und einer anschließenden Expressionsphase zur Bildung des rekombinanten *Prunus amygdalus* Hnl Enzyms, wobei im Prinzip nach der für die Produktion von rekombinanter *Hevea brasiliensis* Hnl beschriebenen Methode (Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Lückl, J., Griengl, H., Kohlwein, S.D., Schwab, H.: High level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. Protein Expression and Purification 11, 61-71, 1997) vorgegangen wurde.

Im Detail wurden folgende Bedingungen eingehalten:

Die Chemikalien 1.-8., bemessen für 20 Liter wurden in 15 Liter Wasser gelöst im Bioreaktor vorgelegt und zusammen mit dem Reaktor bei 121°C für 1 Stunde sterilisiert. Nach Abkühlung auf 29°C wurde der pH Wert im Medium mit Ammoniak (Chemikaliu 9, in steriler Zulaufflasche vorgelegt) auf pH 5,0 eingestellt. Danach wurden ca. 200 ml einer steril filtrierten Spurenelemente-Lösung (Chemikalien 10-18, entsprechende Mengen für 20 L) über eine Zulaufflasche in den Bioreaktor eingebracht.

Der so vorbereitete Bioreaktor wurde mit 2 Liter Vorkultur, die in Schüttelkolben bei 30°C nach den im Handbuch des „Pichia Expression Kit“ (Invitrogen Corp., San Diego, CA, USA) angegebenen Bedingungen angezüchtet wurde, beimpft. Die Kultivierung wurde bei einer konstanten Temperatur von 29°C durchgeführt. Durch Regelung der Belüftung (zwischen 15 und max. 40 Lit Luft/min) und der Rührerdrehzahl (zwischen 250 bis 500 Upm) wurde der O₂-Partialdruck auf einem Wert von größer als 30% der Sättigungskonzentration gehalten. Nach 21 Stunden war die

Biomasse auf einen Wert im Bereich von 22 g/L Zelltrockengewicht (ZTG) angewachsen. Ab diesem Zeitpunkt wurde steriles Glycerin in konstanten kleinen Portionen in Abständen von 15 min zudosiert, wobei pro Stunde 130 g Glycerin zugesetzt wurden. In dieser zweiten linearen Wachstumsphase konnte in einem Zeitraum von 42 Stunden eine Biomassekonzentration im Bereich von 70 g/L ZTG erreicht werden.

Danach wurde die dritte Phase mit der Induktion der Expression durch Zudosierung von Methanol eingeleitet. Dabei wurde der Methanolgehalt in der Kulturbede auf einen Wert von 0,8-1 Gew. % eingestellt. Zu Induktionsbeginn und nach zwei Tagen Induktion wurde jeweils eine weitere Portion sterile Spurenelementelösung (Chemikalien 10-18, entsprechende Mengen für 20 L, gelöst in ca. 200 ml Wasser) zugegeben. Nach 110 Stunden Induktionsphase konnte eine Enzymmenge von 110 U/ml Kulturbede erhalten werden. Nach Abtrennen der Zellen durch beispielsweise Zentrifugation kann eine Rohenzympräparation erhalten werden, die direkt für biokatalytische Umsetzungen eingesetzt werden kann.

Folgende Chemikalien wurden zur Herstellung des Kulturmediums benutzt (Menge pro Liter):

- | | |
|---|--------|
| 1. 85% ortho-Phosphorsäure | 21 ml |
| 2. CaSO ₄ | 0,9 g |
| 3. K ₂ SO ₄ | 14,3 g |
| 4. MgSO ₄ ·7H ₂ O | 12,2 g |
| 5. KOH | 3,3 g |
| (Chemikalien 1 bis 5 in p.a. Qualität) | |
| 6. Glycerin, technische Qualität | 50 ml |
| 7. Entionisiertes Wasser, Hausqualität, Leitfähigkeit 5,5-9,1 µS/cm | |
| 8. Antischaummittel 10 % Acepol 83E | 1 ml |
| (Carl Becker Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland) | |
| 9. 25% Ammoniak, technische Qualität | |

Spurenelemente und Vitamin H (alle Chemikalien in p.a. Qualität):

- | | |
|--|---------|
| 10. Biotin | 0,8 mg |
| 11. CuSO ₄ ·5H ₂ O | 24,0 mg |
| 12. KI | 0,32 mg |
| 13. MnSO ₄ ·H ₂ O | 12,0 mg |
| 14. Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O | 0,2 mg |
| 15. H ₃ BO ₃ | 0,08 mg |
| 16. CoCl ₂ | 2,0 mg |
| 17. ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 80 mg |
| 18. Fe(II)SO ₄ ·7H ₂ O | 260 mg |

Beispiel 10:

Konstruktion eines Klonen zur Expression des *Prunus amygdalus hnl5* Gens als Fusionsprotein mit N-terminalen und C-terminalen Anteilen der Glukoseoxidase von *Aspergillus niger*.

Diese Konstruktion wurde so konzipiert, dass das gebildete Fusionsprotein über die heterologe Signalsequenz in den sekretorischen Weg gelenkt wird.

Durch eine PCR in einem 50 µl Ansatz in 1x PCR Puffer (Qiagen) mit je 100 pmol der Primer Glucx2 und Glucxct, 10 ng Plasmid pPamHNL5orf als Template, 5 µl dNTP (je 2 mM) Mix, und 1,2 U „Hotstar“ Taq Polymerase (Qiagen) wurden das C-terminale und das N-terminale Ende des *hnl5* Gens durch eine von der Glukoseoxidase abgeleitete Sequenz ersetzt bzw. verkürzt. (Programm: 15 min 95 °C, 30 x: 1 min 95 °C, 1 min 68 °C, 2 min 72 °C, und zum Abschluss 10 min 72 °C)

In einer 2. PCR in einem 50 µl Ansatz in 1x PCR Puffer (Qiagen) mit 0,1 µl Produkt aus der ersten PCR als Template, je 100 pmol der primer Glucx1 und Glucxct, 2 µl dNTP (je 2 mM) Mix, und 2, 5 U Pwo Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), (Programm: 5 min

95 °C, 30 mal: 1 min 95 °C, 0,5 min 68 °C, 3 min 72 °C und zum Abschluss 3 min 72 °C) wurde abschließend der 5' Bereich des Gens ergänzt.

Über die gleichzeitig eingeführten *EcoRI* Schnittstellen an den Enden des DNA Fragments wurde das PCR Produkt nach Schneiden mit *EcoRI* in das Plasmid pHILD2 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) eingebaut. Ein Klon mit der richtigen Orientierung des Inserts zum *aox* Promoter des pHILD2 Plasmids wurde durch Sequenzieren der Übergangsbereiche von Vektor zu Insert verifiziert und konserviert. Das auf diese Weise konstruierte Plasmid wurde mit pHILDPamHNL5gox bezeichnet.

Mit *NotI* linearisierte DNA des Plasmids pHILDPamHNL5gox wurde in den Stamm *Pichia pastoris* GS115 sowie in den proteasedefizienten Stamm *Pichia pastoris* SMD1168 transformiert. Von jedem Ansatz wurden mehrere Histidin-prototrophe Klone in Schüttelkolben kultiviert und die Hnl-Aktivität im Kulturüberstand (Standard-assay) bestimmt. Diese Experimente wurden analog wie in Beispiel 7 beschrieben durchgeführt. Im Kulturüberstand war bei einigen Klonen HNL Aktivität aufzufinden womit festgestellt werden konnte, daß die Signalsequenz des *Aspergillus niger gox* Gens befähigt ist, das heterologe Hnl5 Protein bei Expression in *Pichia pastoris* in den sekretorischen Weg zu dirigieren.

Verwendete Oligonukleotid-Primer

- 20 GLUCOX1
5'-
GACGAATTCATCATGCAGACTCTCCTTGTGAGCTCGCTTGTGGTCTCCCTCGCT
GCGGCCCTGCCACACTAC - 3'
- 25 GLUCOX2
5'-
TGCGGCCCTGCCACACTACATCAGGAGCAATGGCATTGAAGCCTACAACGCCA
CTGATACAAGCTCGGAAGGATC-3'
- 30 GLUCOXCT
5'-GAATTCGCATGCGGCCGCTCACTGCATTGACCTTTCTTGCAGGATTTGAAG-3'

Die Nukleinsäuresequenz des für ein sekretorisches Hybridprotein (PamHNL5xGOX) mit Hnl-Aktivität codierenden DNA Fragments ist in Figur 4 dargestellt, die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Figur 5 wiedergegeben. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hnl5 aus *Prunus amygdalus* und des Hybridproteins PamHNL5xGOX ist aus Figur 6 zu entnehmen.

Beispiel 11:

40 Rekombinantes Protein mit Hnl-Aktivität, das mit dem rekombinanten Stamm *Pichia pastoris* PamHnl5-a37 wie in Beispiel 9 beschrieben produziert wurde, wurde einer Analyse der Glykosylierung durch Verdau mit Endoglykosidasen unterzogen. Dazu wurden 100 ml des Kulturüberstandes durch Ultrafiltration (Biomax 30,000 NMWL, Millipore, Bedford, MA, USA) 10 fach konzentriert. Die Proben 1-2 wurden mit N-Glykosidase F (N-Glykosidase F Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, D) behandelt. Bei den Proben 4-5 wurde eine HNL Präparation aus Mandeln der Fa. Roche verwendet und bei den Proben 6 und 7 wurde der aufkonzentrierte Kulturüberstand mit Endoglykosidase H (Roche, Diagnostics, Mannheim, D) behandelt. Alle Ansätze wurden in 10 µl Gesamtvolumen durchgeführt.

- 50 Std. Molekulargewichtsstandard aus dem N-Glykosidase F Kit (5 µl = 5 µg)
Probe 1: 2 U PamHnl5 mit 2,4 U Enzym nach Vorschrift des Kits behandelt.
Probe 2: 2 U PamHnl5 mit 2,4 U Enzym nach Vorschrift des Kits jedoch ohne Denaturierungspuffer und ohne Hitzedenaturierung behandelt
Probe 3: 2 PamHnl5 ohne Behandlung
55 Probe 4: 0,25 U der Roche R-HNL Präparation grade III aus Mandeln (10,3 U/mg) behandelt

mit 2,4 U N-Glycosidase F nach Vorschrift des Kits

Probe 5: 0,25 U der Roche Präparation grade III (10,3 U/mg) unbehandelt

Probe 6: 2,4 U *PamHnl5* wurden mit 50 mU Endoglykosidase H in 20 mM Phosphatpuffer, ohne Denaturierung für 12 Stunden bei 37°C inkubiert.

5 Probe 7: 2,4 U *PamHnl5* wurden mit 5 mU Endoglykosidase H in 20 mM Phosphatpuffer, 0,2% SDS, 0,4 % Merkptoethanol für 12 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach den Behandlungen mit den Glykosidasen wurden die Proben auf einem 12-prozentigen SDS-Polyacrylamid Gel getrennt und mit Commassie Blue gefärbt.

10 Diese Ergebnisse (siehe Figur 7) zeigen, dass ein Grossteil der an *PamHnl5* gebundenen Oligosaccharide durch Endoglykosidase H auch ohne Denaturierung des *PamHnl5* Proteins entfernt werden kann.

Durch die Abspaltung der Oligosaccharide entsteht aus einem bei Größen von 70 bis über 100 kDa sichtbaren Proteinschmier eine scharfe Bande bei etwa 60 kDa, was dem berechneten Molekulargewicht eines nicht glykosylierten *PamHnl5* Proteins entspricht.

15 Eine vergleichbare Proteinbande ist im Roche Präparat nicht oder nur in stark untergeordnetem Ausmass vorhanden. Außerdem kann kein signifikanter Unterschied zwischen einer unbehandelten Proteinpräparation und einer mit Endoglykosidase F behandelten Präparation gesehen werden. Aus diesem Befund kann eindeutig festgestellt werden, dass sich das rekombinante *PamHnl5* 20 Enzym komplett vom aus Mandelkernen gewonnenen Enzymmaterial unterscheidet.

Beispiel 12:

25 0,5 g (3,9 mmol) Octanal wurden in 6 ml tert-Butylmethylether gelöst und mit 7,5 ml einer wäßrigen Enzymlösung mit rekombinanter R-HNL aus Beispiel 9 (pH 3,8) versetzt. Nach Zugabe von 0,33 ml (8,4 mmol) Blausäure wurde zur Bildung einer Emulsion am Magnetrührer bei Raumtemperatur heftig gerührt und die Reaktion mittels GC an einer Cyclodextrinsäule verfolgt. Nach 3 Stunden Reaktionszeit wurde Cyanhydrin mit 81,1 %ee und 48 % Umsatz gebildet.

30 Beispiel 13:

80 ml (34 units / mmol Aldehyd) einer wäßrigen Enzymlösung mit rekombinanter R-HNL (34 units / mmol Aldehyd) wurden mit 10 ml 200 mM Kaliumphosphat / Natriumcitratpuffer pH 3,8 verdünnt und in eine auf 10 °C vorgekühlte Lösung aus 42,2 g (300 mmol) 2-Chlorbenzaldehyd und 42 ml tert-Butylmethylether gegeben. Anschließend wurden unter Rühren mit 950 rpm 19,6 ml (501 mmol) Blausäure innerhalb von 40 min in die Reaktionsmischung dosiert. Der Reaktionsverlauf wurde, nach Derivatisierung des Cyanhydrins mit Acetylchlorid, mittels GC an einer Cyclo- 35 dextrinsäule verfolgt.

40

Stunden	% Umsatz	%ee
3,5	71,5	90,6
22	99,7	90

45

Vergleichsbeispiel:

0,25 bis 1 ml R-OxynitrilaseLösung (E.C.4.1.2.10; 2187 units/ml) wurden mit 50 mM Citrat/Phosphatpuffer (pH 4,0) auf 4 ml verdünnt und der pH-Wert der Enzymlösung gegebenenfalls mit einigen Tropfen Citronensäurelösung auf pH 4,0 eingestellt. Zu dieser Lösung wurde eine 50 Lösung von 3 ml tert-Butylmethylether und 0,8g (5,69 mmol) 2-Chlorbenzaldehyd zugegeben und anschließend 445 µl (11,38 mmol) Blausäure zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde mittels Magnetrührer bei Raumtemperatur mit 900 rpm gerührt.

55 Der Umsatz und die Enantiomerenreinheit des gebildeten (R)-Cyanhydrins wurde mittels GC analysiert.

Dazu wurde eine Probe der Reaktionslösung zentrifugiert und 50 µl der organischen Phase mit Dichlormethan verdünnt. Nach einer Derivatisierung mit Acetylchlorid wurde auf einer Cyclo-dextrinsäule gaschromatografisch analysiert.

5	Zeit (h)	0,25 ml Enzym entspricht 96 units / mmol Aldehyd		0,5 ml Enzym entspricht 192 units / mmol Aldehyd		1,0 ml Enzym entspricht 384 units / mmol Aldehyd	
		% Umsatz	%ee	% Umsatz	%ee	%Umsatz	%ee
10	1,5	79,1	77,5	97,6	81,6	98,7	89,4
	3	98	77,4	100	81,5	100	89,1

Der Vergleichsversuch zeigte, dass bei Verwendung der erfindungsgemäßen rekombinanten Proteine analog Beispiel 13 lediglich ein Zehntel der benötigten Menge an nativem Protein benötigt wird, um vergleichbare Enantiomerenreinheiten (ee-Werte) zu erzielen.

PATENTANSPRÜCHE:

- Verfahren zur Herstellung von DNA-Sequenzen, codierend für Hydroxynitrilase, dadurch gekennzeichnet, dass eine Primerkombination aus einem Primer 1 basierend auf der DNA-Sequenz des 5'-Bereichs der *mdl* Gene von *Prunus serotina* und *Prunus amygdalus* und einem Primer 2 basierend auf dem 3'-Bereich der DNA-Sequenzen eines der Hydroxynitrilase Isoenzyme aus *Prunus serotina* oder *Prunus amygdalus* zur Amplifikation mit einer DNA Polymerase unter Verwendung von DNA aus Organismen, die für Hydroxynitrilasen kodierende Gene enthalten als Vorlage verwendet wird und anschließend kloniert wird.
- Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung einer DNA-Sequenz welche die in Figur 1 abgebildete Nukleotidsequenz aufweist oder mit dieser zumindest 80% identisch ist, dadurch gekennzeichnet, dass als Primer 1 die Nukleotidsequenz
5'- CGGAATTCACAATATGGAGAAATCAACAATGTCAG-3'
und als Primer 2 die Nukleotidsequenz
5'- CGGAATTCTTCACATGGACTCTTGAATATTATG-3'
verwendet wird.
- DNA-Sequenz, hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine wie in Fig. 1 abgebildete Nukleotidsequenz von Nukleotid 13 bis Nukleotid 2151 durchgehend oder diese Sequenz abzüglich der Intron-Bereiche von den Nukleotiden 116 bis 257, 918 bis 1120 und 1962 bis 2077 umfasst.
- Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, dadurch gekennzeichnet, dass eine heterologe Expression der für Hydroxynitrilasen kodierenden DNA-Sequenzen, hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, oder DNA-Sequenz nach Anspruch 3 in geeigneten Wirtszellen durchgeführt wird.
- Rekombinante Proteine, hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine wirtsspezifische Glykosylierung aufweisen.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression in einem eukaryontischen Mikroorganismus erfolgt.
- Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression in einem Pilz erfolgt.
- Rekombinantes Protein hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein die aus der Nukleotidsequenz der Nukleinsäure nach Anspruch 3 abgeleitete und in der Fig. 3 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist.
- Verwendung einer Nukleinsäure, enthaltend Teile von DNA-Sequenzen, hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teile einer DNA-Sequenz nach Anspruch 3, die für ein Signalpeptid einer Hydroxynitrilase aus der Gruppe der Rosacea

spezies codiert, zur sekretorischen heterologen Expression von Proteinen in Wirtszellen.

10. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteine bzw. heterologe Proteine mit Hydroxynitril-lyase-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, dass Teile einer DNA-Sequenz, hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teile einer DNA-Sequenz nach An-
spruch 3 verwendet werden, wobei diese Teile für ein Signalpeptid einer Hydroxynitrillyase
aus der Gruppe der Rosacea spezies codieren, und die sekretorische Expression dersel-
ben in Wirtszellen erfolgt.
11. Fusionsprotein hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekenn-
zeichnet, dass das Fusionsprotein die aus der in Figur 4 abgebildeten Nukleinsäurese-
quenz, bestehend aus Nukleinsäuresequenzen nach Anspruch 3 und dem Glukoseoxida-
se-Gen von *Aspergillus niger*, abgeleitete Aminosäuresequenz gemäß Figur 5 aufweist.
12. Verwendung von Proteinen, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprü-
che 4, 6, 7 und 10 oder Verwendung von Proteinen nach einem der Ansprüche 5, 8 und 11
zur Herstellung von (R)- Cyanhydrinen.
13. Verfahren zur Herstellung von (R)- Cyanhydrinen, dadurch gekennzeichnet, dass aliphati-
sche, aromatische oder heteroaromatische Aldehyde und Ketone in Anwesenheit eines
Cyanidgruppendonors mit Proteinen, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der
Ansprüche 4, 6, 7 und 10 oder mit Proteinen nach einem der Ansprüche 5, 8 und 11 im
organischen, wässrigen oder 2-Phasensystem oder in Emulsion umgesetzt werden.

HIEZU 9 BLATT ZEICHNUNGEN

Figur 1

Nukleotidsequenz des durch PCR-Amplifikation gewonnenen *hnl5* Gens aus *Prunus amygdalus*.

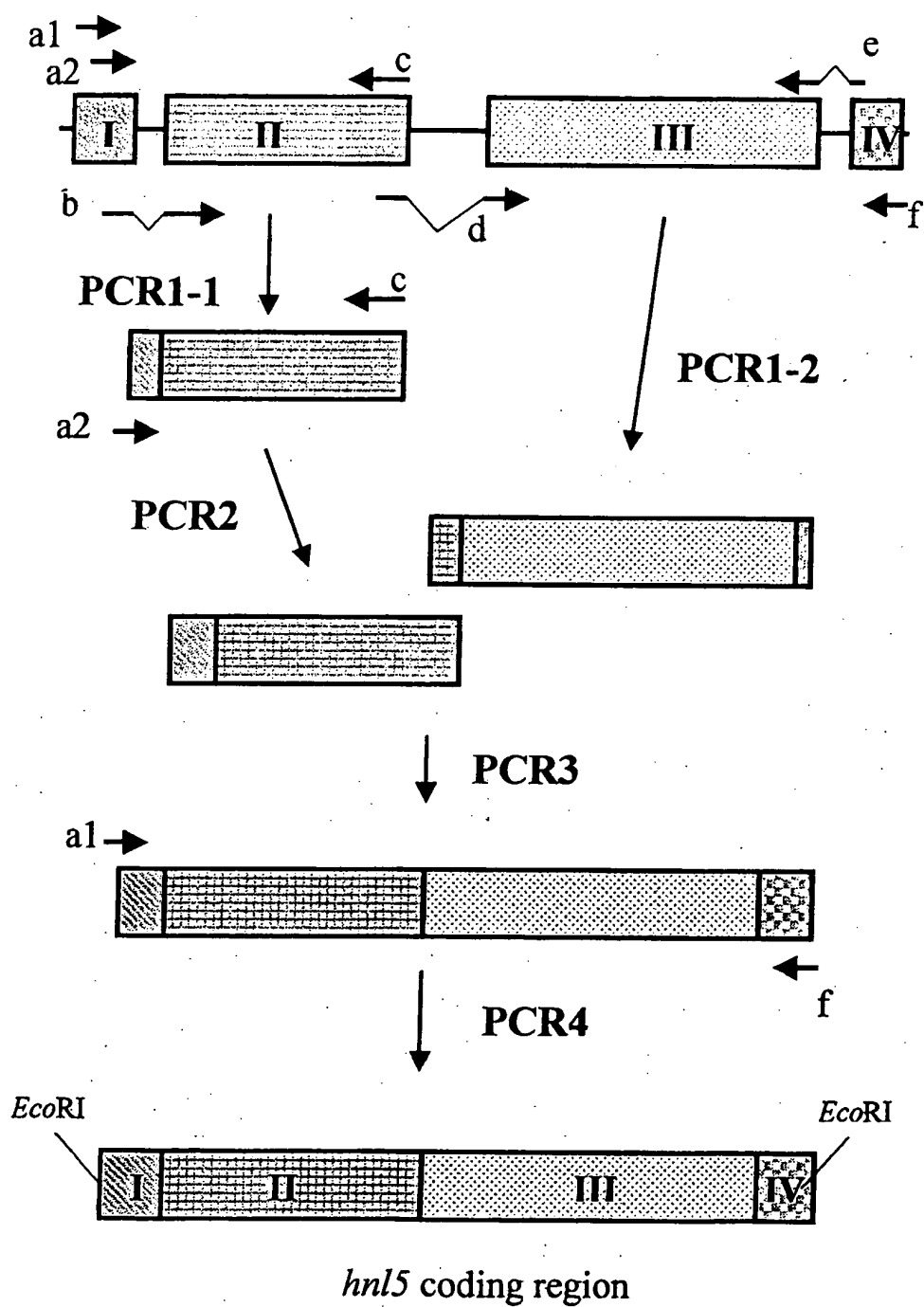
Das Startkodon (ATG) und das Stoppcodon des offenen Leserahmens sind fett gedruckt, die Nukleotide in den Intronbereichen sind in Kleinbuchstaben angegeben. Die über die PCR-Primer angefügten, nicht zum *hnl5* Gen gehörenden Randsequenzen sind unterstrichen. Die Splice sites der Introns wurden mit Hilfe der Consensus Sequenz „GT....AG“ identifiziert.

```
1      GGAATTCACA ATATGGAGAA ATCAACAATG TCAGTTATAC TATTTGTGTT
51     GCATCTTCTT GTTCTTCATC TTCAGTATTC AGAGGTTTAC TCGCTTGCCA
101    ATACTTCTGC TCATGgtaaa ttccatctt cagtattcat ttaacagcaa
151    aatgtgtaga ttataatta agaaaactga cacaagtagt gcaagaaaca
201    agctaattta gatgcatgtt gaaaaaatc ttcatctct tcacatatat
251    ttgcagATT TTAGCTACTT GAAGTTTGTG TACAACGCCA CTGATACAAG
301    CTCGGAAGGA TCATATGACT ACATTGTAAT CGGTGGAGGA ACATCAGGGT
351    GTCCATTGGC AGCAACTTTA TCAGAAAAAT ACAAGGTGCT TCTTCTAGAA
401    AGAGGCACTA TTGCTACAGA ATACCCGAAC ACGTTGACTG CAGATGGGTT
451    TGCATATAAT CTGCAGCAAC AAGATGATGG AAAGACGCCA GTTGAAAGGT
501    TCGTGTCCGA AGATGGCATT GATAATGTGC GAGCCAGGAT CCTCGGTGGC
551    ACGACCATAA TCAATGCAGG CGTCTACGCC AGAGCTAACA TTTCATTCTA
601    TAGTCAAACA GGAATTGAAT GGGACCTGGA TTTGGTCAAT AAGACATATG
```


651 AGTGGGTTGA AGACGCCATT GTGGTCAAGC CAAATAATCA ATCTTGGCAA
701 TCTGTTATAG GAGAGGGATT CTTGGAGGCG GGTATTCTTC CAGACAATGG
751 ATTTAGTTTG GATCACGAAG CAGGAACTAG ACTCACC GGC TCAACTTTTG
801 ACAATAATGG AACGCGACAT GCGGCTGATG AACTGCTTAA TAAAGGAGAC
851 CCTAATAACT TGCTAGTTGC AGTTCAGGCC TCAGTAGAGA AGATCCTCTT
901 CTCTTCCAAT ACATCAAgta tggatcatca gtgatatta atggtagctc
951 clagttgtc atgctgcact cgaaaattat tattttatca tttaaaata
1001 ctaacagaat agtggaagt ctcatattc cctccatat ttcccaaatt
1051 tccataaaca aaacttcca attctcctc gtttagttg acaataatta
1101 taagctattc tcaatgcag ATTTGTCAGC TATTGGAGTC ATATATACGG
1151 ATTCTGATGG AAACCTCAT CAGGCATTG TACGCGGTAA CGGAGAAGTT
1201 ATTGTTAGTG CAGGGACAAT CGGAACGCCT CAGCTTCTAC TACTTAGTGG
1251 CGTTGGACCA GAGTCTTACC TATCTTCTCT CAACATCACA GTTGTTCAGC
1301 CGAATCCTTA TGTTGGGCAG TTTGTGTATG ACAATCCTCG TAATTCATT
1351 AATATTTTGC CCCCAAATCC AATTGAAGCC TCTGTTGTAA CTGTTTTAGG
1401 CATTAGAAGT GATTATTATC AAGTTTCTCT GTCAAGCTTG CCATTTTCCA
1451 CTCCACCCTT TAGTCTTTTT CCTACAACAT CTTACCCCT CCCAAATCG
1501 ACTTTTGCTC ATATTGTTAG CCAAGTTCCA GGACCATTGT CTCATGGTTC
1551 TGTCACGCTA AATTCATCAT CTGACGTGAG AATCGCTCCA AATATTAAAT
1601 TCAATTACTA TTCAAATCC ACAGACCTTG CTAATTGTGT TAGCGGCATG
1651 AAGAAGCTTG GTGACTTATT AAGGACAAAG GCATTAGAAC CATATAAAGC

1701 TCGAGATGTG CTGGGAATTG ACGGTTTCAA TTATTGGGA GTACCTTTGC
1751 CAGAGAACCA AACAGATGAT GCATCCTTCG AAACATTTTG TCTAGATAAT
1801 GTAGCTTCAT ACTGGCATT A CCACGGTGGA AGCCTTGTTG GGAAAGTGCT
1851 TGATGACAGT TTCCGTGTTA TGGGGATCAA AGCATTACGC GTTGTTGATG
1901 CCTCCACTTT CCCTTACGAA CCAAACAGCC ATCCTCAGGG CTTCTATCTG
1951 ATGTTAGGAA Ggtatgtgat gcacacttc aaccactaga gattctcaat
2001 attttgtgt tgtgtaatg aactctctgc cgcattgctc tttttatta
2051 atccttaaaa tttgtgttt tgcgcagGTA TGTGGGCCTT CAAATCCTGC
2101 AAGAAAGGTC AATCCGGTTG GAGGCTATTC ATAATATTCA AGAGTCCATG
2151 TGAAGAATTC CG

Figur 2



Figur 3:

Aus der Nukleotidsequenz des *hnl5* Gens abgeleitete Aminosäuresequenz der Hydroxynitrilase (Hnl5) aus *Prunus amygdalus*. Die aus der Sequenzanalyse ermittelte Signalsequenz ist fettgedruckt und die postulierte Prozessierstelle ist mit einem Pfeil markiert. Die möglichen Glykosylierungsstellen (PROSITE patterns) sind unterstrichen.



MEKSTMSVILFVLHLLVLHLQYSEVHSLANTSAHDFSYLKFFVYNATDTSSEGSYDYI
VIGGGTSGCPLAATLSEKYKVLLLERGTIATEYPNTLTADGFAYNLQQQDDGKTPVE
RFVSEDGIDNVRARILGGTTIINAGVYARANISFYSQTGIEWDLDLVNKTYEWVEDAI
VVKPNNQSWQSVIGEGFLEAGILPDNGFSLDHEAGTRLTGSTFDNNGTRHAADELL
NKGDPNNLLVAVQASVEKILFSSNTSNLSAIGVIYTDSDGNSHQAFVRGNGEVIVSA
GTIGTPQLLLLSGVGPESYLSSLNITVVQPNPYVGQFVYDNPRNFINILPPNPIEASV
TVLGIRSDYYQVSLSSLPFSTPPFSLFPTTSYPLPNSTFAHIVSQVPGPLSHGSVTLN
SSSDVRIAPNIKFNYYSNSTDLANCVSGMKKLGDLLRTKALEPYKARDVLGIDGFNY
LGVLPENQTDASFETFCLDNVASYWHYHGGSLVGKVLDDSFVRVMGIKALRVVD
ASTFPYEPNSHPQGFYMLGRYVGLQILQERSIRLEAIHNIQESM

Figur 4:

Nukleinsäuresequenz des für ein sekretorisches Hybridprotein (PamHNL5xGOX) mit Hnl-Aktivität codierenden DNA Fragments, bestehend aus Sequenzen des *hnl5* Gens von *Prunus amygdalus* und dem Glukseoxidasegen von *Aspergillus niger*.

gaattcatcatgcagactctcctgtgagctcgcttggtctccctcgctgcggccctgcc-
cactacatcaggagcaatggcattgaagcctacaacgccactgatacaagctcggaaggatca-
tatgactacattgtaalcggtggaggaacatcaggggtccattggcagcaactttatcagaa-
aaatacaaggtgcttcttagaaagaggcactattgctacagaatacccgaaacacgtt-
gactgcagatgggttgcataatactgcagcaacaagatgatgaaagacgccagtgga-
aaggttcgtgtccgaagatggcattgataatgtgcgagccaggatcctcggtggcagacca-
taatcaatgcaggcgctacgccagagctaacatttcattctatagtaaacaggaatt-
gaatgggacctggatttggtcaataagacatatgagtgggtgaagacgccattgtggt-
caagccaaataatcaatcttggaatctgttataggagagggattcttgaggcggg-
tattctccagacaatggatttagttggatcacgaagcaggaactagactaccggct-
caacttttgacaataatggaacgcgacatgcggctgatgaactgcttaataaaggagacc-
taataacttgtagttgcagttcaggcctcagtagagaagatcctcttcttccaatacat-
caaattgtcagctattggagtcataatacggattctgatgaaactctcatcaggcatttg-
tacgcggttaacggagaagttattgttagtgacgggacaatcggaacgcctcagcttctac-
tacttagtggcgttgaccagagcttacctatcttctcaacatcacagttgttcagcc-
gaatccttatgtgggcagtttgtagatgacaatcctcgtaatttcattaatattttgccc-
caaatccaattgaagcctctgtgtaactgttttaggcattagaagtattattat-
caagtttctgtcaagcttgccattttccactccacccttagtcttttctacaacatct-
taccctcccaaatcgactttgtcatattgttagccaagttccaggaccattgtct-
catggttctgtcacgctaaattcatcatctgacgtgagaatcgctccaaatattaaattcaat-
tactattcaaatccacagacctgtctaattgtgttagcggcatgaagaagcttggtgact-
tattaaggacaaaggcattagaaccataataagctcgagatgtgctgggaattgacggttt-
caattatttgggagtagctttgccagagaaccaaacagatgatgcattcctcgaaa-
cattttgtctagataatgtagcttcatactggcattaccacggtggaagcctgttgga-
aagtgctgatgacagttccgtgttatgggatcaaagcattacgcgtgttgatgcctc-
cactttccctacgaaccaaacagccatcctcagggcttctatctgatgttaggaagg-
tatgtgggccttcaaatcctgcaagaaggtaaatgcagtgcggccgcatgcgaattc

Figur 5: Aus der Nukleinsäuresequenz (Figur 4) abgeleitete Aminosäuresequenz des Hybridproteins PamHNL5xGOX.

MQTLLVSSLVVSLAAALPHYIRSNGIEAYNATDTSSEGSYDYIVIGGGTSGCPLAATL
SEKYKVLLLERGTIATEYPNTLTADGFAYNLQQQDDGKTPVERFVSEDGIDNVRARI
LGGTTIINAGVYARANISFYSGTGIEWDLDLVNKTYEWVEDAIWKPNNQSWQSVIG
EGFLEAGILPDNGFSLDHEAGTRLTGSTFDNNGTRHAADELLNKGDPNNLLVAVQA
SVEKILFSSNTSNLSAIGVIYTDSDGNSHQAFVRGNGEVIVSAGTIGTPQLLLLSGVG
PESYLSSLNITVVQPNPYVGQFVYDNPRNFINILPPNPIEASVTVLGIRSDYYQVSLS
SLPFSTPPFSLFPTTSYPLPNSTFAHIVSQVPGPLSHGSVTLNSSSDVRIAPNIKFNY
YSNSTDLANCVSGMKKLGDLLRTKALEPYKARDVLGIDGFNYLGVPLPENQTDAS
FETFCLDNVASYWHYHGGSLVGKVLDDSFVMGIKALRVVDASTFPYEPNSHPQG
FYLMLGRYVGLQILQERSMQ

Figur 6: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hn15 aus *Prunus amygdalus* und des Hybridproteins PamHNL5xGOX. Sequenzanteile der Glukoseoxidase von *Aspergillus niger* sind unterstrichen. Sequenzbereiche die zwischen den beiden Proteinen keine signifikante Homologie aufweisen sind kursiv, die Signalpeptide fett gedruckt.

PamHNL5Gox 1 mqtllysslv vslaaalphy irsnqiea----- --YNATDTSS

PamHNL5 1 *mekstmsvil fvhlvlhl qysevhsian tsahdfsylk fv*YNATDTSS

PamHNL5Gox 37 EGSYDIIVIG GGTSGCPLAA TLSEKYKVLL LERGATIEY PNTLTADGFA

PamHNL5 51 EGSYDIIVIG GGTSGCPLAA TLSEKYKVLL LERGATIEY PNTLTADGFA

PamHNL5Gox 87 YNLQQQDDGK TPVERFVSED GIDNVRARIL GGTTIINAGV YARANISFYF

PamHNL5 101 YNLQQQDDGK TPVERFVSED GIDNVRARIL GGTTIINAGV YARANISFYF

PamHNL5Gox 137 QTGIEWDLDL VNKTYEWVED AIVVKPNNQS WQSVIGEGFL EAGILPDNGF

PamHNL5 151 QTGIEWDLDL VNKTYEWVED AIVVKPNNQS WQSVIGEGFL EAGILPDNGF

PamHNL5Gox 187 SLDHEAGTRL TGSTFDNNGT RHADELLNK GDPNNLLVAV QASVEKILFS

PamHNL5 201 SLDHEAGTRL TGSTFDNNGT RHADELLNK GDPNNLLVAV QASVEKILFS

PamHNL5Gox 237 SNTSNLSAIG VIYTDSDGNS HQAFVRGNGE VIVSAGTIGT PQLLLLSGVG

PamHNL5 251 SNTSNLSAIG VIYTDSDGNS HQAFVRGNGE VIVSAGTIGT PQLLLLSGVG

PamHNL5Gox 287 PESYLSSLNI TVVQPNPYVG QFVYDNPRNF INILPPNPIE ASVVTVLGIR

PamHNL5 301 PESYLSSLNI TVVQPNPYVG QFVYDNPRNF INILPPNPIE ASVVTVLGIR

PamHNL5Gox 337 SDYYQVSLSS LPFSTPPFSL FPTTSYPLPN STFAHIVSQV PGPLSHGSVT

PamHNL5 351 SDYYQVSLSS LPFSTPPFSL FPTTSYPLPN STFAHIVSQV PGPLSHGSVT

PamHNL5Gox 387 LNSSSDVRIA PNIKFNYYSN STDLANCVSG MKKLGDLLRT KALEPYKARD

PamHNL5 401 LNSSSDVRIA PNIKFNYYSN STDLANCVSG MKKLGDLLRT KALEPYKARD

PamHNL5Gox 437 VLGIDGFNYL GVPLPENQTD DASFETFCLD NVASYWHYHG-GSLVGKVLDD

PamHNL5 451 VLGIDGFNYL GVPLPENQTD DASFETFCLD NVASYWHYHG GSLVGKVLDD

PamHNL5Gox 487 SFRVMGIKAL RVVDASTFPY EPNSHPQGFY LMLGRYVGLQ ILQERSmg--

PamHNL5 501 SFRVMGIKAL RVVDASTFPY EPNSHPQGFY LMLGRYVGLQ ILQERSirle

PamHNL5Gox 535 -----

PamHNL5 551 *aihniqesm*

Figur 7: Analyse von Hnl Präparationen durch SDS-PAGE. Details sind im Beispiel 11 beschrieben.

