



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

(11) DD 296 699 A5

5(51) C 12 N 15/60
C 12 N 15/80
C 12 N 15/20
C 12 R 1:685

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 343 086 6	(22)	26.07.89	(44)	12.12.91
(31)	8818046.8	(32)	28.07.88	(33)	GB
	8914666.6		26.06.89		

(71) siehe (73)
(72) Heim, Jutta, Dr., DE; Meyhack, Bernd, Dr., DE; Visser, Jacob, Prof., NL
(73) CIBA-GEIGY AG, 4002 Basel, CH

(54) Neuartiges Expressionssystem

(57) Rekombinante DNA-Moleküle mit einer Codierung für Pektinylaseexpressionssysteme (PL-Expressionssysteme) und deren Derivate, wie die Strukturgene von PLA, PLB, PLC, PLE und PLF, und die entsprechenden regulatorischen Sequenzen, z. B. Promotor-, Signal- und Terminatorsequenzen, und Hybridvektoren, welche aus entsprechenden DNA bestehen, einschließlich Hybridvektoren mit einer DNA-Codierung für homologe oder heterologe Polypeptide, Wirte, insbesondere Fadenpilze, z. B. Aspergillus-Wirte, die durch diese Wirte transformiert wurden, Methoden für die Herstellung der rekombinanten DNA-Moleküle und der Wirte und der Einsatz der rekombinanten DNA-Moleküle für die Herstellung von neuen Expressionssystemen. Ein weiteres Ziel ist die Herstellung von Polypeptiden durch diese DNA und diese Wirte.

Patentansprüche:

1. Methode zur Herstellung eines Polypeptids, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Hybridvektor, der eine DNA-Folge aufweist, die das Expressionssystem der Pektinlyasen PLA, PLB, PLC, PLE oder PLF oder deren Derivat codiert, in einem geeigneten Wirt exprimiert wird.
2. Methode nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Hybridvektor mit einem Strukturgen, das heterolog zu *Aspergillus niger* ist, in einem geeigneten Wirt exprimiert wird.
3. Methode nach Anspruch 1 für die Überproduktion der Pektinlyasen PLA, PLB, PLC, PLE oder PLF in *Aspergillus*-Spezies, **gekennzeichnet durch** die Kultivierung eines *Aspergillus*-Wirts, der mit einem Expressionshybridvektor für die Expression dieser Pektinlyasen transformiert wurde.
4. Methode nach Anspruch 2 für die Produktion von Hybrid-Interferon-BDBB in *Aspergillus*-Spezies, **gekennzeichnet durch** die Kultivierung eines *Aspergillus*-Wirts, der mit einem Expressionshybridvektor für die Expression dieses Hybrid-Interferons transformiert wurde.
5. Verfahren für die Herstellung der Pektinlyasen PLA, PLB, PLC, PLE oder PLF in reiner Form.
6. Pektinlyasen PLA, PLB, PLC, PLE oder PLF in reiner Form.

Hierzu 32 Tabellen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft das Gebiet der Gentechnik und beschreibt neue DNA-Moleküle, die aus DNA-Folgen gebildet sind, welche für verschiedene Pektinlyasen von *Aspergillus niger* und/oder deren Promotor-, Signal- und Terminatorsequenzen codieren. Die neuartigen DNA-Moleküle sind von Nutzen für die Überproduktion von Pektinlyasen in *Aspergillus* und/oder für die Konstruktion von Hybridvektoren, welche Fremdgene in Faden- und anderen Pilzen exprimieren. Es ist nun möglich, eine einzelne Pektinlyase zu produzieren, die nicht mit anderen Pektinlyasen kontaminiert ist.

Ausgangssituation der Erfindung

Obwohl auf dem Gebiet der Gentechnik bereits zahlreiche Polypeptidexpressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Wirte bekannt sind, besteht weiterhin ein Bedarf an neuartigen Systemen, die Vorteile gegenüber den bekannten Systemen aufweisen.

Sehr verbreitet eingesetzt werden der prokaryotische Wirt *Escherichia coli* und der eukaryotische Hefewirt, z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, für welche eine große Zahl unterschiedlicher Hybridexpressionsvektoren, vor allem Plasmide, entwickelt worden ist. Die Nachteile von *E. coli*-Wirten bestehen darin, daß sie das gebildete Polypeptid nicht glykosylieren können und daß sich auf Grund fehlender Sekretion das Fremdpeptid innerhalb der Wirtszelle akkumulieren und ein weiteres Wachstum verhindern kann. Die Hefewirte glykosylieren, aber wie *E. coli* scheiden sie die Polypeptide, von ganz kleinen abgesehen, nicht in das Nährmedium aus. Hefen sekretieren nur in den periplasmatischen Raum. Höhere eukaryotische Wirte sind Krebszellen von Säugetieren, die in der Lage sind, zu glykosylieren und in das Nährmedium zu sekretieren, ihre Kultivierung erfolgt jedoch sehr langsam und ist sehr teuer, und es besteht die Gefahr, daß zusammen mit dem gewünschten Peptid onkogene Nukleinsäuren isoliert werden, von denen das Peptid nicht befreit werden kann.

Bei der Suche nach anderen Wirten wurden auch Fadenpilze, beispielsweise *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* und *Aspergillus niger*, untersucht. Solche Pilze werden für industrielle Zwecke bereits verbreitet angewendet, ihre Anwendung in der Gentechnik dagegen blieb zurück, vor allem auf Grund des Fehlens entsprechender Transformationssysteme. Im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* enthalten Fadenpilze keine Plasmide, welche für die Einführung von Fremdgenen und für die Phänotypauswahl genutzt werden könnten. Es ist jedoch möglich, Fadenpilze mit Fremdplasmiden, welches ein wählbares Markergen enthalten, zu transformieren. Alle bisher für Fadenpilze beschriebenen Vektoren replizieren nicht autonom, wie das bei Hefen der Fall ist, sondern werden in das Pilzchromosom integriert. Das geschieht nur mit einer sehr geringen Frequenz. Vorteilhaft ist es dagegen, daß die integrative Transformation die Transformanten mitotisch sehr stabil macht, selbst unter nichtselektiven Bedingungen. Es wurde über die stabile Integration von mehr als einhundert Kopien berichtet.

Der erste beschriebene Vektor für Fadenpilze enthielt als selektierbaren Marker das qa-2-Gen von *Neurospora crassa*. Dieses Gen codiert die enzymkatabolische Dehydrochinase und kann als funktionelle Komplementierung von Aro-Mutanten von *N. crassa* verwendet werden (Case, M. E., Schweizer, M., Kushner, S. R., und Giles, N. H. [1979], Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5259-5263). Aro-Mutanten können ohne ein aromatisches Aminosäuresupplement nicht auf Minimalmedium wachsen. Die Transformation von *N. crassa* durch den qa-2-Vektor erfolgte durch Integration einer einzelnen Kopie des Plasmids in das Chromosom. Bei 30% der stabilen Aro⁺-Integrierten war das integrierte qa-2-Gen noch an die bakteriellen Plasmidfolgen gebunden (Case, M. E., [1982] in Genetic Engineering of Microorganism for Chemicals [Gentechnik von Mikroorganismen für Chemikalien] [Hollander, A., DeMoss, D., Kaplan, S., Konisky, J., Savage, D., und Wolfe, R. S., Hsg.], S. 87-100, Plenum). Durch diese Beobachtung wurde die Kotransformation von nichtselektiven DNA-Folgen zusammen mit selektiven zu einer realisierbaren Aufgabe.

Bei *Aspergillus nidulans*, das einen Sexualzyklus hat und damit für klassische genetische Manipulationen geeignet ist, wurden sowohl negative als auch positive Selektionssysteme identifiziert. Unter Verwendung von heterologer DNA von *N. crassa* oder homologer DNA wurde die funktionelle Komplementierung von *A. nidulans*-pyrG-Mutanten durch Transformation mit Plasmiden, welche das pyrG-Gen enthielten, erreicht (Ballance u. a., BBRC 112, 284 [1983]; Tilburn u. a., Gene 26, 205, 1983). Bei

anderen Systemen wurden Mutationen am *trpC*- oder *argB*-Lokus durch Transformation mit den geeigneten Plasmiden funktionell komplementiert. (Yelton, u. a., PNAS **81**, 1470, 1984; Yelton et Timberlake, J. Cell Biochem. Suppl. **9C** 173, 1985; Johnstone u. a., EMBO J. **4**, 1307, 1983)

Ein dominantes positives Selektionssystem wurde auch unter Verwendung des *amdS*-Gens entwickelt, das aus *A. nidulans* isoliert wurde und es ermöglicht, daß damit transformierte *A. niger* auf Azetamid als der einzigen Stickstoffquelle wachsen (Tilburn u. a., Gene **26**, 205, 1983; Wernars u. a., Curr. Genet. **9**, 361, 1985; Kelly, J. M., u. a., EMBO J. **4**, 475, 1985).

Im Vergleich zu *N. crassa* oder *A. nidulans* ist *A. niger* der bei weitem wichtigere Organismus. Er wird verbreitet bei der industriellen Produktion von Enzymen eingesetzt, z. B. zum Einsatz in der Nahrungsmittelindustrie. *A. niger* unterscheidet sich von *A. nidulans* dahingehend in seiner sekretorischen Kapazität, daß es eine Vielfalt von hydrolytischen Enzymen sekretiert, z. B. Glukoamylase, α -Amylase, Pektinase, Zellulase, β -Glukanase, β -Galaktosidase, Naringinase, Pentosanase, Säureprotease und Lignase, wobei der Glukoamylase- und Pektinasekomplex die wichtigsten sind.

A. niger hat keinen bekannten Sexualzyklus. Mutationen können daher nicht über meiotische Rekombinationen eingeführt werden. Durch klassische Mutations- und Selektionsverfahren sind jedoch umfassende Stammverbesserungen in der Sekretion von hydrolytischen Enzymen erreicht worden.

Von den Genen der *A. niger*-Enzyme wurden nur die von Glukoamylase (Boel u. a., EMBO J. **3**, 1581, 1984) und Alkohol und Aldehyddehydrogenase (WO 86/06097) zusammen mit ihren Promotor- und Signalsequenzen charakterisiert und bei Transformationsexperimenten mit *A. nidulans* bzw. *A. niger* eingesetzt. Als Selektionsmarker für *A. niger* wurden das heterogene *amds*-Gen (Kelly und Hynes, EMBO J. **4**, 475, 1985) und das *argB*-Gen (Buxton u. a., Gene **37**, 207, 1985; EP 184438; WO 86/06097), die beide von *A. nidulans* gewonnen wurden, verwendet.

A. niger ist der wichtigste Organismus für die industrielle Produktion von pektinabbauenden Enzymen. Pektine sind Polygalakturonide mit hohem Molekulargewicht (20000 bis 40000D), die aus α -1,4-glykosidisch gebundenen D-Galakturonsäurepolymeren bestehen und in der Natur als Bestandteile von höheren Pflanzenzellen vorkommen, wo sie an Zellulosemoleküle gebunden werden und wo sie vor allem in der Primärzellenwand und der mittleren Lamelle vorkommen. Zu den reichsten Pektinquellen gehören Zitronen- und Orangenschale, die etwa 30 % dieses Polysaccharids enthalten. Pektinenzyme bauen das Kohlehydratpolymersubstrat entweder durch Hydrolyse der α -1,4-Glykosidbindung (Polygalakturonase) oder durch Transeliminierung des α -4,5-ungesättigten galakturonischen Restes des Pektinmoleküls (unterschiedliche Pektinlyasen) ab. Der Systemname von Pektinlyase ist Pektintranseliminase (EC 4.2.2.10).

In *A. niger* werden die Proteine des Pektinkomplexes nicht konstitutiv exprimiert. Unter induzierenden Bedingungen exprimiert *A. niger* bei Verwendung von Pektin oder dessen Abbauprodukten die oben genannten Enzyme, einschließlich PLI, wenn andere Kohlenstoffquellen, wie Glukose oder Sukrose, begrenzend sind. Bei Oberflächenkulturen besteht für Pektinenzyme die Tendenz, der äußeren Zellwand zugeordnet zu bleiben. Eine Zunahme der Pektin- und der Ca^{2+} -Konzentration im Medium führt zur vollständigen Sekretion.

Pektinasen, beispielsweise PLI, werden von der Nahrungsmittelindustrie vor allem zum Klären von Fruchtsäften eingesetzt. Aus *A. niger* wurden zwei verschiedene Pektinlyasen, PLI und PLII, gereinigt und teilweise von F. E. A. Van Houdenhoven (22) charakterisiert. PLI enthält vier Mannosereste, während PLII jeweils zwei Mannose- und Glukosereste enthält. Die Enzyme haben unterschiedliche Molekulargewichte (PLI: 37,5kD, PLII: 36kD). Die Aminosäurefolge von PLI wurde bestimmt und in EP 88 101 397.3 offengelegt. Diese Erfindung basierte auf einer partiellen Strukturbestimmung von Pektinlyase I (PLI), was die Synthese von DNA-Sonden mit einer Codierung für relevante Teile des Proteins ermöglichte. Mit Hilfe der DNA-Sonden war es möglich, auf DNA-Codierung für PLI zu screenen und diese, eventuell zusammen mit deren Vor- und Nachfolgen, aus einer Genbibliothek von *A. niger* zu isolieren.

Durch Hybridisieren von Teilen des PLI-Gens auf eine genomische Bibliothek von *A. niger* konnten weitere PL-Gene entdeckt werden, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind. Das PLI-Strukturgen mit dem N-Endflankungsbereich, das von *A. niger* N 756 gewonnen wurde, ist am N-Ende mit dem PLD-Gen identisch, das von *A. niger* N 400 gewonnen wurde. Demzufolge ist letztgenanntes nicht Teil der vorliegenden Erfindung. Das vorliegende PLA scheint Teil des früher gereinigten PL-Gemisches mit der Bezeichnung PLII zu sein.

Nachstehend wird PLI auch als PLD bezeichnet, und das PLI-Strukturgen hat die Bezeichnung *pe 1D*.

Ziele der Erfindung

Ziel der Erfindung sind rekombinante DNA-Moleküle, die aus DNA-Folgen bestehen, welche neuartige Pektinlyaseexpressionssysteme und deren Derivate codieren, wie die Strukturgene dieser Pektinlyasen und entsprechende regulatorische Sequenzen, z. B. Promotor-, Signal- und Terminatorsequenzen, und Hybridvektoren, die aus entsprechenden DNA bestehen, einschließlich Hybridvektoren mit einer DNA-Codierung für homologe oder heterologe Polypeptide, Wirte, vor allem Fadenpilze, z. B. *Aspergillus*-Wirte, welche durch diese Vektoren transformiert wurden, Methoden zur Herstellung dieser rekombinanten DNA-Moleküle und dieser Wirte und der Einsatz der rekombinanten DNA-Moleküle für die Herstellung von neuen Expressionssystemen. Ein weiteres Ziel ist die Herstellung von Polypeptiden mittels dieser DNA und dieser Wirte.

Die neuartigen Pektinlyaseexpressionssysteme bestehen aus DNA-Folgen mit der Codierung für die Promotoren, die Signalsequenzen, die Strukturgene und die Terminatoren dieser neuartigen Pektinlyasegene. Die neuartigen Pektinlyasen werden als PLA, PLB, PLC, PLE und PLF bezeichnet.

Insbesondere ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Hybridvektoren zu konstruieren, die aus DNA-Folgen mit der Codierung für die Promotoren von PLA, PLB, PLC, PLE und PLF bestehen, wahlweise für die Signalsequenzen dieser Proteine und wahlweise für deren Terminatoren. Diese Hybridvektoren werden für die Einbeziehung von Genen mit der Codierung für bestimmte Proteine und für die Transformation von Fadenpilzen, wie *Aspergillus*, *Penicillium* und *Cephalosporium* verwendet. Die Kotransformation von *A. niger* mit zwei verschiedenen Plasmiden kann durchgeführt werden, wobei eines der Plasmide aus der Gruppe der neuartigen Hybridvektoren der Erfindung ausgewählt wird und das andere ein speziell konstruiertes Selektionsplasmid ist, das in Verbindung mit einem mutierten Stamm eines Fadenpilzes wirksam wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Überproduktion dieser neuartigen Pektinlyasen in den *Aspergillus*-Spezies und die Produktion von einzelnen PL, die durch andere PL unkontaminiert sind, oder von deren festgelegten künstlichen Gemischen. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung die Produktion jedes Proteins, dessen Strukturgen bei Vorhandensein oder unter Kontrolle der vorliegenden rekombinanten PL-DNA exprimiert werden kann. Die verschiedenen Ziele der Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung der Erfindung ersichtlich.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die rekombinanten DNA-Moleküle

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere ein rekombinantes DNA-Molekül, das aus einer DNA-Folge mit der Codierung für die Expressionssysteme der Pektinlyasen PLA, PLB, PLC, PLE oder PLF oder deren Derivate besteht. Unter dem Begriff „Expressionssystem“ versteht man eine DNA-Folge, die in der Lage ist, ein Polypeptid zu exprimieren, und aus dem Promotor, der Signalsequenz, dem Strukturgen und dem Terminator besteht. Wird der Begriff „Derivat“ in Verbindung mit den neuartigen DNA-Folgen verwendet, soll er größere Derivate oder Ableitungen mit Flankierungssequenzen, Fragmente der genannten DNA-Folge, Mutanten, vor allem natürlich vorkommende Mutanten, und DNA-Folgen einschließen, die entsprechend dem genetischen Code degeneriert sind. Größere Derivate der neuartigen rekombinanten DNA-Moleküle sind die, welche aus dem *A. niger*-Genom herausgeschnitten werden können und aus den DNA-Folgen bestehen, die in den Abbildungen 1 bis 3, 5 und 6 gezeigt werden, wie sie beispielsweise in einer genomischen Bibliothek von *A. niger* N400 gefunden werden, gewonnen durch Fragmentierung der Nucleinsäuren, Behandlung der Fragmente mit einem geeigneten Restriktionsenzym, z. B. EcoRI, BamHI oder HindIII, Ligierung in einen geeigneten Vektor, z. B. das Lambda-Phag und Plasmid pBR322, Klonieren, z. B. in *E. coli*, und erneutes Schneiden mit dem gleichen Restriktionsenzym. Solche Derivate sind z. B. die Inserte der Plasmide pGW820, pGW830, pGW840, pGW850, pGW860 und pGW880, die in den Abbildungen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 gezeigt werden. Fragmente der DNA-Folge mit der Formel I (Abb. 9) sind die, welche sich zwischen zwei Restriktionsstellen dieser Plasmide befinden und Promotor-, Signal-, Struktur- oder Terminatorfunktionen beibehalten. Bevorzugte Fragmente sind die, welche die Promotorsequenz, die Signalfrequenz, das Strukturgen eines neuartigen PL oder die Terminatorsequenz oder jede Kombination dieser Elemente enthalten. Die Fragmente der DNA-Folge können Linker enthalten, die eine erfolgreiche Bindung an andere DNA-Moleküle ermöglichen. Die PL-Promotorfolge ist im DNA-Bereich vor dem Strukturgen enthalten und besteht aus bis zu 2000, vorzugsweise bis zu etwa 1000 bis 1400 Nucleotiden. In pGW820 befindet sich der Promotor auf der Sequenz zwischen SalI (1240) und PstI (2420) als Restriktionsstellen. Für die Promotorsequenz sind die TATAA-Boxen als die RNA-Polymeraseerkennungstellen wichtig. Auf *pelA* befindet sich die TATAA-Box an der Position 1221 (Abb. 10), auf *pelB* in Position 951 (Abb. 11) und auf *pelC* bei Position 1261 (Abb. 12). Die kurzen Promotoren etwa von den TATAA-Boxen bis zum Beginn der Signalsequenzen sind für die nichtinduzierte Expression der Polypeptide von besonderem Interesse. Wenn eine pektininduzierte Expression erforderlich ist, sind die Sequenzen oberhalb der TATAA-Boxen für die Regulierung der Stärke des Promotors erforderlich. Diesen Fragmenten können geeignete Linker angefügt werden. Der Promotor des *PLI* von *A. niger* ist induzierbar, d. h., die Expression des diesem angefügten Strukturgens, z. B. das Strukturgen mit der Codierung für ein PL oder ein Fremdgen, wird durch den Zusatz von Pektin oder Pektinabbauprodukten zum Medium induziert. Fehlt Pektin und ist ausreichend Glukose vorhanden, wird der Promotor nicht wirksam. Fehlen die oberhalb gelegenen regulatorischen Sequenzen, wird der Promotor konstitutiv. Die DNA-Codierung für die Signalsequenz erstreckt sich zwischen dem Ende des Promotors und dem Beginn der Sequenz mit der Codierung für das reife Protein. Bei *PLA* und *PLB* enthält die Signalsequenz etwa 20 Aminosäuren, bei *pelC* sind es etwa 18 Aminosäuren. Der entsprechende Codierungsbereich erstreckt sich bei *pelA* vom ATG-Codon in der Position 1361 bis hinunter zur PstI-Schneidestelle in der Position 1420, bei *pelB* von der Position 1134 bis wenigstens zur Position 1191 und bei *pelC* von der Position 1368 bis zur Position 1422. Wie aus den Formeln I, II und III hervorgeht, enthalten die Strukturgene von *PLA*, *PLB* und *PLC* mehrere Introns. Die Strukturgene können auch geeignete Linker enthalten. Die Terminatoren beginnen mit den Stoppcodons, z. B. TAA, und können bis zu einer der Restriktionsstellen innerhalb dieser Sequenzen reichen. Das Terminatorfragment enthält wenigstens 300bp und kann geeignete Linker enthalten. Geeignete Linker für die obigen Fragmente haben eine DNA-Folge, die in die Restriktionsstelle der DNA paßt, an die das Fragment gebunden ist. Sie können eine festgelegte Restriktionsstelle enthalten. Fragmente der DNA-Folge der Erfindung sind auch die, welche aus kleineren Fragmenten zusammengesetzt sind, z. B. solche, die den Promotor, den Promotor und die Signal- oder Struktursequenz, das Signal und die Struktursequenz oder das Strukturgen ohne die Introns und ähnliche, enthalten. Mutanten der DNA-Folge der Erfindung sind z. B. natürlich vorkommende Mutanten. Die Erfindung beinhaltet auch natürliche oder synthetische Mutanten der Signalsequenz mit einem ähnlichen oder identischen Hydrophobizitätsprofil, z. B., wenn Codons für die polaren Aminosäuren Lysin ($K^{\delta+}$), Tyrosin ($Y^{\delta-}$) und Arginin ($R^{\delta+}$) ausgetauscht werden durch Codons für andere Aminosäuren mit ähnlichen Ladungen und die hydrophoben Aminosäuren Alanin (A), Leucin (L) und Threonin (T) ersetzt werden durch Codons für andere hydrophobe Aminosäuren. Beispielsweise kann das Codon für das positiv geladene Lysin durch ein Codon für Arginin ersetzt werden und umgekehrt, das Codon für das negativ geladene Tyrosin durch ein Codon für Glutamat oder Aspartat und/oder das Codon für das nichtpolare, hydrophobe Alanin durch eines der Codons für Threonin, Prolin, Valin, Isoleucin, Leucin, Methionin oder Phenylalanin und ähnliches. Andere Mutationen sind „schweigende Mutationen“, bei denen ein oder wenige Nucleotide, z. B. bis zu etwa 30, durch ein oder mehrere andere Nucleotide ersetzt werden, wodurch die neuen Codons die Codierung für dieselbe(n) Aminosäure(n) aufweisen. DNA-Folgen der Erfindung, die abgebaut werden, sind wie die schweigenden Mutationen solche, die innerhalb der Bedeutung des genetischen Codes dahingehend abgebaut werden, daß eine unbegrenzte Zahl von Nucleotiden durch andere Nucleotide ersetzt wird, ohne die Aminosäurefolge zu verändern, für die sie codieren. Solche degenerierten DNA-Folgen können auf Grund ihrer unterschiedlichen Restriktionsstellen von Nutzen sein.

Rekombinante DNA-Moleküle, die eine DNA-Folge der Erfindung oder deren Derivat enthalten, sind vor allem rekombinante Vektoren, auch als Hybridvektoren bezeichnet, welche diese DNA-Folgen als Inserts enthalten. Sie können zum Klonieren in Wirten, wie Bakterien, Pilzen oder tierischen Zellen, verwendet werden. Solche Hybridvektoren werden von jedem Vektor abgeleitet, der auf dem Gebiet der Gentechnik eingesetzt wird, beispielsweise von Phagen, Cosmiden, Plasmiden oder Chromosomal-DNA, wie die Derivate von Phag λ , z. B. NM 989, oder von Phag M 13, z. B. M 13mp8-Phag-DNA (Lit. 15), linearisiert durch BamHI-Verdauung, bakterielle Plasmide, z. B. pBR322, pUN 121, pUC 18, oder Hefeplasmide, z. B. Hefe-2u-Plasmid, oder auch Chromosomal-DNA, abgeleitet z. B. von *Aspergillus*, z. B. *A. niger*, z. B. die durch EP 184438 offengelegten, oder defekte Phage oder defekte Plasmide bei Vorhandensein eines Helferphags oder eines Helferplasmids, welche die Replikation dieser defekten Phage oder Plasmide ermöglichen, z. B. M 13(+)KS-Vektor bei Vorhandensein von z. B. dem Helferphag M 13K07. Ein Hybridvektor nach der Erfindung enthält, neben den DNA-Folgen nach der Erfindung oder deren Derivat, eine Replikationsstelle und wahlweise, in Abhängigkeit vom Typ des DNA-Derivats, eine Expressionssteuerungssequenz, wie eine Erweiterungssequenz, oberhalb der Aktivierungsstelle, eine Promotor- und Signalsequenz und/oder ein Strukturgen, das sich von dem unterscheidet, das in *A. niger*-abgeleiteten Sequenzen vorhanden ist. Eine solche Erweiterungssequenz kann von der extrachromosomalen ribosomalen DNA von *Physarum polycephalum* (PCT/EP 8500278) abgeleitet sein, oder es kann die Flußaufwärts-Aktivierungsstelle des Säurephosphatase-PH05-Gens (EP Appl. Nr. 86 111 820.6) oder das PH05, trp PH05-GAPDH-Hybrid (EP Appl. Nr. 86 111 820.6) oder der ähnliche Promotor sein.

Strukturgene, die mit den vorliegenden Promotor-, Signal- und/oder Terminatorsequenzen ligiert sind, sind neben denen mit der Codierung für die Pektinlyasen PLA, PLB, PLC, PLE und PLF mit oder ohne Introns auch andere homologe Pektinlyasene, z. B. das PLD- (oder PLI-) Gen, oder andere *Aspergillus*-Gene und heterologe Strukturgene, die von genomischer DNA oder von aDNA abgeleitet wurden, die über die mRNA-Route hergestellt oder chemisch synthetisiert werden können, mit einer Codierung für eine breite Vielzahl von nützlichen Peptiden, einschließlich glykosylierten Polypeptiden, vor allem von höherem eukaryotischen, besonders Säugetier-, wie tierischem oder speziell menschlichem, Ursprung, wie Enzymen, die beispielsweise für die Produktion von Nahrungsmitteln und für die Durchführung von enzymatischen Reaktionen in Chemie eingesetzt werden können, oder Polypeptide, die nützlich und wertvoll für die Behandlung von Krankheiten bei Mensch und Tier oder für deren Verhinderung sind, beispielsweise Hormone, Polypeptide mit immunmodulatorischen, antiviralen und Antitumoreigenschaften, Antikörper, Virenantigene, Vakzine, Gerinnungsreaktoren, Nahrungsmittel und ähnliche.

Beispiele für solche heterologe Strukturgene sind z. B. die mit der Codierung für Hormone wie Sekretin, Thymosin, Relaxin, Calcitonin, luteinisierende Hormone, Parathyroidhormon, Adrenokortikotropin, melanozytstimulierendes Hormon, β -Lipotropin, Urogastron oder Insulin, Wachstumsfaktoren, wie epidermaler Wachstumsfaktor, insulinartiger Wachstumsfaktor (IGF), z. B. IGF-I und IGF-II, Mastzellenwachstumsfaktor, Nervenwachstumsfaktor, gliaabgeleiteter Nervenzellenwachstumsfaktor oder transformierender Wachstumsfaktor (TGF) wie TGF β , Wachstumshormone wie Menschen- oder Rinderwachstumshormone, Interleukin wie Interleukin-1 oder -2, menschlicher makrophagmigrationshemmender Faktor (MIF), Interferone wie menschliches α -Interferon, beispielsweise Interferon- α A, α B, α D oder α F, β -Interferon, γ -Interferon oder ein Hybrid-Interferon, beispielsweise ein α A- α D- oder ein α B- α D-Hybridinterferon, vor allem das Hybridinterferon BDBB, Proteinaseinhibitoren wie α_1 -Antitrypsin, SLPI und ähnliche, Hepatitisvirusantigene, wie Hepatitis-B-Virus-Oberflächen- oder -Kernantigen oder Hepatitis-A-Virusantigen oder Hepatitis-NonA-NonB-Antigen, Plasminogenaktivatoren wie Gewebeplasminogenaktivator oder Urokinase, Tumornekrosefaktor, Somatostatin, Renin, β -Endorphin, Immunoglobuline wie die leichten und/oder schweren Ketten von Immunoglobulin D, E oder G oder Mensch-Maus-Hybridimmunoglobuline, Immunoglobulinbindungsfaktoren wie Immunoglobulin E-Bindungsfaktor, Calcitonin, menschliches calcitoninverwandtes Peptid, Blutgerinnungsfaktoren, wie die Faktoren IX oder VIIIc, Erythropoietin, Eglin wie Eglin C, Hirudin, Desulfatorhirudin, wie Desulfatorhirudinvariante HV 1, HV 2 oder PA, menschliche Superoxiddismutase, Virenthymidinkinase, β -Laktamase, Glukoseisomerase. Bevorzugte Gene sind die mit einer Codierung für ein menschliches α -Interferon oder Hybridinterferon, menschlichen Gewebeplasminogenaktivator (t-PA), Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen (HBVsAG), insulinähnlichen Wachstumsfaktor I und II, Eglin C und Desulfatorhirudin, z. B. Variante HV 1. Bei den Hybridvektoren der vorliegenden Erfindung sind die vorliegende Promotor- und/oder Signalfolge operabel mit dem Polypeptidcodierungsbereich verbunden, um so die effektive Expression des Polypeptids zu gewährleisten.

Die DNA-Moleküle nach der vorliegenden Erfindung können in Abhängigkeit von dem Wirt, der transformiert, selektiert und kloniert werden soll, selektive Marker enthalten. Es kann jedes Marker-Gen verwendet werden, welches die Auswahl von Transformanten auf Grund der phänotypen Expression des Markers erleichtert. Geeignete Marker sind vor allem solche, die eine antibiotische Resistenz exprimieren, z. B. gegen Tetracyclin oder Ampizillin oder, bei auxotrophen Hefemutanten, Gene, die Wirtsläsionen komplementieren. Entsprechende Gene übermitteln beispielsweise Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Zykloheximid oder vermitteln Prototrophie in einem auxotrophen Hefemutanten, beispielsweise die Gene *ura3*, *leu2*, *his3* oder *trp1*. Möglich ist es auch, als Marker Strukturgene einzusetzen, die mit einem autonom replizierenden Segment assoziiert sind, vorausgesetzt, daß der zu transformierende Wirt für das Produkt, das durch den Marker exprimiert wird, auxotroph ist.

Von besonderer Bedeutung sind Markergene, welche *A. niger*-Wirtsläsionen komplementieren, sie das *argB*-Gen mit der Codierung für Ornithinkarboxyltransferase, z. B. abgeleitet von *A. niger* oder *A. nidulans* (EP 184438), oder *A. nidulans*-DNA-Fragmente, die zum *N. crassa-pyr4*-Gen homolog sind (26).

Bevorzugte Ausführungsbeispiele für die vorliegende Erfindung sind Hybridvektoren, bei denen das Strukturgen, insbesondere das heterologe Strukturgen, operativ an die Promotor- und Signalsequenzen der vorliegenden Erfindung gebunden ist. Ein solcher bevorzugter Hybridvektor ist z. B. pUC 19/pel;-IFN AM 119. Ein anderer bevorzugter Hybridvektor ist z. B. M 13(+)KS/pelA-IFN AM 119.

Bei einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel nach der vorliegenden Erfindung ist das Strukturgen, insbesondere das heterologe Strukturgen, operativ direkt mit den Promotorsequenzen nach der vorliegenden Erfindung verbunden. Ein solcher bevorzugter Hybridvektor ist z. B. M 13(+)KS/pelA-ss-IFN AM 119.

Die DNA-Moleküle nach der Erfindung und deren Derivate, einschließlich Fragmente, können zum Screenen von DNA-Genbanken oder mRNA nach weiteren ähnlichen DNA oder mRNA genutzt werden.

Verfahren für die Herstellung der rekombinanten DNA-Moleküle

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren für die Herstellung eines rekombinanten DNA-Moleküls mit einer Codierung für das Expressionssystem von Pektinlyase PLA, PLB, PLC, PLE oder PLF oder dessen Derivat, welches darin besteht, einen Wirt zu züchten, der mit einem DNA-Molekül transformiert wurde, das eine DNA-Folgcodierung für das Pektinlyaseexpressionssystem oder dessen Derivat enthält, und das gewünschte rekombinante DNA-Molekül oder dessen Derivat zu isolieren oder dieses durch In-vitro-Synthese herzustellen.

Die Züchtung der Wirte erfolgt in einem herkömmlichen Nährmedium, das durch chemische Verbindungen, welche eine positive oder negative Selektion der Transformanten ermöglichen, ergänzt oder von diesen befreit werden kann, d. h., solchen Wirten, die das gewünschte DNA-Molekül zusammen mit einem Selektionsmarker aus den Nichttransformanten, d. h., solchen Wirten, denen das gewünschte DNA-Molekül fehlt.

Es können alle auf diesem Gebiet anwendbaren Wirte eingesetzt werden, z. B. Bakterien wie *E. coli*, Pilze wie *Saccharomyces cerevisiae* oder vor allem Fadenpilze wie *Aspergillus*, z. B. *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. carbonarius*, *A. Awamori* und vor allem *A. niger*. Ein bevorzugter Wirt ist *A. niger* An 8, ein neuartiger Mutant ohne das *pyrA*-Gen, wie weiter unten beschrieben wird. Die Transformation der Wirte erfolgt nach herkömmlichen Methoden.

Die DNA-Folgcodierung für das PL-Expressionssystem erhält man aus Fadenpilzen, die ein solches System enthalten, vor allem aus deren genomischer Bibliothek, oder auch über die mRNA.

Nachfolgend wird die Herstellung der vorliegenden PL-Expressionssysteme ausführlicher beschrieben.

Eine genomische Bibliothek kann hergestellt werden z. B. durch partielle Verdauung von genomischer DNA eines *A. niger*-Stammes, z. B. N 756 oder N 400, mit z. B. *Sau* 3AI oder *Mbol* und Klonierung der DNA-Fragmente mit hohem Molekulargewicht in einen geeigneten Wirtsvektor, z. B. das *E. coli*-Plasmid pUN 121, oder einen Lambda-Vektor, z. B. EMBL 4.

Jeder andere *A. niger*-Stamm, der die gewünschten PL erzeugt, kann ebenfalls als Quelle für die genomische Bibliothek dienen, und ebenso kann jeder andere geeignete Vektor als Rezipient für die Fragmente eingesetzt werden.

Um die genomische Bibliothek erfolgreich nach DNA-Folgen mit der Codierung für PL screenen zu können, wird eine hybridisierende DNA-Sonde gebraucht. Das kann eine synthetische DNA-Sonde sein, wenn die Folge des gewünschten PL bekannt ist, oder es kann ein bekanntes PL-Gen oder Teile davon sein. Die erste Methode wurde angewendet, um das PLI-Gen zu finden, wie das in EP 88 101 397.3 beschrieben wird. Die zweite Methode wurde in der vorliegenden Erfindung angewendet. Da die gesamte DNA-Folge des PLI-Gens verfügbar wurde, können nun entweder DNA-Folgen, die das gesamte Gen enthalten, oder jeder Teil davon mit wenigstens 14bp zum Screenen verwendet werden, was auch das Screenen nach mRNA mit Codierung für das PL-System einschließt.

Für Screening-Zwecke werden die DNA-Sonden 5'-radioaktiv nach den bekannten Methoden unter Verwendung von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und T4-Kinase markiert. Wirtsmikroorganismen, welche die Nukleinsäuren nach der vorliegenden Erfindung tragen, als Insert, werden durch Hybridisierung mit der markierten DNA-Sonde auf Filterkopien der Genbibliothek identifiziert.

Klone, die eine Hybridisierungsreaktion auf eine oder mehrere DNA-Sonden aufweisen, werden isoliert und vermehrt.

Die angewendeten Hybridisierungsbedingungen können mehr oder weniger streng sein, z. B. einfach durch Wahl unterschiedlicher Temperaturen, und in Kombination mit dem Einsatz unterschiedlicher DNA-Sonden, die vom PLI- (oder PLD-) Gen abgeleitet wurden, z. B. durch Messung der verschiedenen Hybridisierungsreaktionen auf das komplette 1,6 kbp-BamHI/PstI-Fragment, das 649bp-BamHI/XhoI-Fragment (das N-Endfragment) und das 244bp-XhoI/PstI-Fragment (das C-Endfragment) von pCG 3B 11 oder pGW 840 (Abb. 4), können die Klone in verschiedene Klassen auf der Grundlage ihres Grades von Homologie eingeteilt werden (Tabellen II oder IV). Fünf λ -Vektoren (λ -PL 113, λ -PL 122, λ -PL 109, λ -PL 102 und λ -PL 116) wurden schließlich identifiziert, restriktiert und in pBR 322 Subklone ihre *pel*-Gene hergestellt, was zu den Plasmiden pGW 820, pGW 830, pGW 850, pGW 860 und pGW 880 führte (Abbildungen 1 bis 3, 5 und 6). Die fünf Gene dieser Klone werden als *pelA*, *pelB*, *pelC*, *pelE* bzw. *pelF* bezeichnet.

Die Gene können sequenziert werden. Vollständige Sequenzen von *pelA*, *pelB* und *pelC* werden durch die Formeln I, II und III dargestellt (Abbildungen 10, 11 und 12).

Eine rechnergestützte Suche nach Konsensus-Sequenzen von Exon/Intron-Spleißverbindungsstellen sowie nach Intron-Innensequenzen (Boel, E., u. a. [24] und Mount S. M. [25]) führt dazu, wie in *pelD* das Vorhandensein von vier Introns in *pelA* und *pelB* (Abbildungen 10 und 11) und von drei Introns in *pelC* (Abb. 12) zu postulieren.

Die Plasmide pGW 820, pGW 830, pGW 850, pGW 860 und pGW 880 werden zur Herstellung anderer rekombinanter DNA-Moleküle nach der Erfindung verwendet. Diese anderen DNA-Moleküle werden auf herkömmliche Weise durch Anwendung herkömmlicher Restriktionsenzyme, Linker, Ligierungs-, Vermehrungs- und Isolierungsprozesse hergestellt.

Beispielsweise wird das Plasmid pGW 820 mit HindIII restriktiert. Das 3,9 kbp-HindIII-Fragment wird in die HindIII-Stelle von pBR 322 subkloniert. Das 3,3 kbp-BamHI-HindIII-Fragment des gewonnenen Plasmids pGW 822 mit dem *pelA*-Gen wird in die BamHI- und HindIII-Stelle des Vektors pUC 19 kloniert und ergibt einen als pUC 19/*pelA* bezeichneten Vektor. Das Strukturgen von *pelA* wird durch Verdauung mit Sall und PstI herausgeschnitten. In das verbleibende Fragment, das die *pelA*-Promotor-, -Signal- und -Terminatorsequenzen enthält, wird zwischen die Signal- und die Terminatorsequenz ein Gen mit einer Codierung für der Interferonhybrid BDBB durch einen geeigneten Linker ligiert. Das gewonnene Plasmid wird als pUC 19/*pelA*-IFN AM 119 (Abb. 11) bezeichnet und enthält die Promotor- und Signalsequenz von *pelA*, das IFN-BDBB-Gen und den *pelA*-Terminator, der an das HindIII-BamHI-Fragment von pUC 19 angefügt ist. Dieses Plasmid wird mit pCG 59 D 7 in den uridinauxotrophen *A. niger*-Mutanten An 8 (DSM 3917) kotransformiert. Transformanten werden in Minimalmedium, das Arginin und Bacto-Agar enthält, selektiert und auf Interferon-Expression analysiert.

Bei einem anderen Ausführungsbeispiel der Erfindung kann die Signalsequenz von *pelA* gelöscht werden. Das gewonnene Plasmid wird als M13(+)*KS/pelA* Δ ss-IFN AM 119 bezeichnet und enthält die Promotersequenz von *pelA*, das IFN-BDBB-Gen und den *pelA*-Terminator, der an das HindIII-BamHI-Fragment des Bluescript-M 13(+)*KS*-Vektors angefügt ist. Dieses Plasmid wird mit pCG 59 D 7 in den uridinauxotrophen *A. niger*-Mutanten An 8 (DSM 3917) kotransformiert. Transformanten werden in Minimalmedium, das Arginin und Bacto-Agar enthält, selektiert und auf Interferon-Expression analysiert.

Mutanten, die neue Restriktionsstellen enthalten, können beispielsweise in vitro durch stellengerichtete Mutagenese nach herkömmlichen Methoden hergestellt werden (siehe Übersichtsartikel von M. J. Zoller und M. Smith, *Methods Enzymol.* 100, 468 [1983]; D. Botstein und D. Shortle, *Science* 229, 1193 [1985] oder K. Norris u. a., *Nucl. Acids Res.* 11, 5103 [1983]).

Für höhere Expressionsraten kann jede eukaryotische Terminatorsequenz an das Ende des Strukturgens ligiert werden.

Bakterien werden nach einer herkömmlichen Methode transformiert, und die Transformanten werden durch ihre Resistenz, z. B. gegen Tetracyclin, identifiziert.

Speziell werden die beschriebenen Expressionsvektoren in geeigneten *E. coli*-Wirtsstämmen, wie HB101, vermehrt, transformiert und nach gebräuchlichen Methoden für das Fachgebiet selektiert. Die vermehrte Plasmid-DNA wird nach herkömmlichen Methoden, wie sie vor allem von Birnboim und Doly (23) beschrieben wurden, von den Bakterien isoliert. Auf ähnliche Weise können andere Plasmide mit anderen homologen oder heterologen Genen konstruiert werden. Die DNA-Moleküle nach der vorliegenden Erfindung können auch nach herkömmlichen Methoden durch eine In-vitro-Synthese hergestellt werden. Die In-vitro-Synthese kann vor allem für die Herstellung kleinerer Fragmente des PL-Expressionssystems eingesetzt werden, z. B. von DNA-Folgen mit der Codierung für die Promotor- oder die Signalsequenz der PL oder deren Mutanten.

DNA-Moleküle nach der vorliegenden Erfindung, die einen PL-Promotor und wahlweise eine PL-Signalsequenz, ein PL-Strukturgen, jedes andere heterologe Strukturgen und/oder einen PL-Terminator enthalten, können auch für die Transformation von Fadenpilzen wie *Aspergillus*, *Penicillium* oder *Cephalosporium*, z. B. *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. carbonarius*, *A. awamori* und vor allem *A. niger*, eingesetzt werden.

Um die Selektion der transformierten von den nichttransformierten Pilzen zu ermöglichen, tragen die DNA-Moleküle der Erfindung einen Selektionsmarker oder werden als Alternative die Pilze mit einem zweiten Vektor, der einen solchen Marker enthält, kotransformiert. Wie in anderen Systemen ist ein solcher Selektionsmarker ein expressierbares Strukturgen, dessen expressiertes Polypeptid (ein Enzym) Resistenz gegen Verbindungen vermittelt, die für den Transformanten toxisch sind, oder welches das Enzymsystem eines Mutanten vervollständigt, dem ein solch wesentliches Polypeptid fehlt. Solche Markergene sind beispielsweise die bekannten *qa-2-*, *pyrG-*, *pyr4-*, *trpC-*, *amdS-* oder *argB-*Gene.

Wie in EP 88 101 397.3 beschrieben wird, wurde aus der genomischen Bibliothek von *A. niger* ein neuartiges Markergen mit der Bezeichnung *pyrA* isoliert, das mit *pyrG* von *A. nidulans* und *pyr4* von *N. crassa* verwandt ist und ähnliche Funktion hat, nämlich die Produktion des Enzyms Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase. Dieses Enzym katalysiert die Decarboxylierung von Orotidin-5'-phosphat in Uridylsäure (Uridin-5'-phosphat) und auch von Fluoroorotinsäure in das toxische Fluorouridin. Ein *E. coli*-Klon, der das *pyrA*-Gen enthält, wurde durch Hybridisieren mit dem 1,1 kb-HindIII-Fragment von pDJB2 (24), welches einen Teil des *pyr4*-Gens enthält, identifiziert, es kann jedoch auch DNA von jedem anderen *pyr*-Gen, das Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase codiert, verwendet werden. Aus einem positiven Klon mit der Bezeichnung *E. coli* B75183/pCG59D7 wurde das Plasmid pCG59D7 mit dem *pyrA*-Gen isoliert und für die Kotransformation eines *A. niger-pyrA*⁻-Mutanten verwendet. Einem solchen *pyrA*⁻-Mutanten fehlt das Orotidin-5'-phosphatdecarboxylasegen, und es ist daher nicht in der Lage, das entsprechende Enzym zu produzieren. Ein solcher Mutant wurde durch Behandlung von Konidiosporen von *A. niger* N756 unter einer mutierenden UV-Bestrahlung hergestellt, und die bei Vorhandensein von Fluoroorotinsäure und Uridin überlebenden Kolonien wurden ausgewählt. Kolonien, die bei Vorhandensein von Fluoroorotinsäure und Fehlen von Uridin überleben, wurden ausgeschaltet. Die verbleibenden uridinbenötigten Mutanten gehören nach ihrer Fähigkeit, transformierbar zu sein, zu zwei Komplementationgruppen *pyrA* und *pyrB*, die durch die Mutanten An8 bzw. An10 dargestellt werden. Sie werden in Form ihrer Protoplaste unter transformierenden Bedingungen mit dem *pyrA*-haltigen Plasmid pCG59D7 behandelt. Es wurde festgestellt, daß nur die An8-Kolonien transformiert worden waren und das *pyrA*-Gen enthalten, wie durch die Hybridisierungsfähigkeit von verdauter DNA mit DNA von pUN121 ausgewiesen wird.

Die Erfindung betrifft außerdem Wirte, die mit den Hybridvektoren der Erfindung transformiert werden, und Methoden zu ihrer Herstellung. Solche Transformanten sind beispielsweise Bakterien wie *E. coli* oder Fadenpilze wie *Aspergillus*, *Penicillium* oder *Cephalosporium* und insbesondere *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. carbonarius*, *A. awamori* und vorzugsweise *A. niger*, z. B. *A. niger* An8. Die Erfindung betrifft auch eine Methode für die Herstellung solcher Transformanten, welche die Behandlung eines Wirts unter transformierenden Bedingungen mit einem rekombinanten DNA-Molekül, insbesondere einem Hybridvektor, nach der Erfindung, wahlweise zusammen mit einem Selektionsmarkergen, und die Selektion der Transformanten einschließt.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der rekombinanten DNA oder deren Derivate für die Herstellung von Hybridvektoren, welche nützliche homologe oder heterologe Polypeptide expressieren. Beispiele für Gene, welche solche nützlichen Polypeptide codieren, werden vorstehend gegeben.

Die Erfindung betrifft außerdem eine Methode für die Herstellung von Polypeptiden, die dadurch gekennzeichnet sind, daß in einem geeigneten Wirt ein Hybridvektor nach der Erfindung exprimiert wird. Bei Bedarf wird das Polypeptid auf herkömmliche Weise isoliert. In Abhängigkeit von der Konstruktion des Vektors werden die Produkte entweder exprimiert oder, wenn eine Signalsequenz vorhanden ist, exprimiert und sekretiert.

Diese Methode beinhaltet die Produktion von nützlichen homologen oder heterologen Proteinen in einem geeigneten Wirt, z. B. den *Aspergillus*-Spezies, durch Kultivierung eines mit einem Expressionshybridvektor transformierten Wirts. Beispiele für Gene, welche solche Proteine codieren, werden vorstehend gegeben.

Es ist nun auch möglich, einzelne Polypeptide PLA, PLB, PLC, PLD, PLE oder PLF zu produzieren, d. h., in reiner Form und nicht durch andere PL kontaminiert, wobei verschiedene Methoden angewendet werden können. Beispielsweise ist eine Methode für die Produktion eines einzelnen Polypeptids, das aus der von PLA, PLB, PLC, PLD, PLE und PLF gebildeten Gruppe ausgewählt wird, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirt, der nicht in der Lage ist, eine Pektinlyase PL zu expressieren, mit einem DNA-Expressionsvektor transformiert wird, der das Produkt von PLA, PLB, PLC, PLD, PLE oder PLF exprimiert.

Ein Wirt, der nicht in der Lage ist, eine Pektinlyase PL zu expressieren, ist entweder ein Mikroorganismus ohne ein entsprechendes Gen, z. B. ein PL⁻-*Aspergillus*-Stamm, ein anderer, nicht zu den *Aspergillus* gehörender Pilz oder jedes andere eukaryotische oder prokaryotische Mikroorganismus oder ein *Aspergillus*-Stamm, dessen Produktion von PL in einem entsprechend konditionierten Wachstumsmedium unterdrückt wird. Beispielsweise kann ein einzelnes PL-Gen exprimiert werden unter der Kontrolle des Glukoamylasepromotors in *A. niger* oder *A. awamori*, unter der Kontrolle des PHO5-Promotors in *S. cerevisiae* oder unter der Kontrolle eines PL-Promotors in einem PL⁻-*A. niger*-Stamm.

Die Erfindung wird veranschaulicht durch die beigefügten Zeichnungen, in denen

Abb. 1 eine Restriktionskarte von pGW820 mit dem *pelA*-Gen zeigt;

Abb. 2 die Restriktionskarte von pGW830 mit dem *pelB*-Gen zeigt;

Abb. 3 die Restriktionskarte von pGW 850 mit dem **pelC**-Gen zeigt;
 Abb. 4 die Restriktionskarte von pGW 840 mit dem **pelD**-Gen zeigt;
 Abb. 5 die Restriktionskarte von pGW 880 mit dem **pelE**-Gen zeigt;
 Abb. 6 die Restriktionskarte von pGW 860 mit dem **pelF**-Gen zeigt;
 Abb. 7 die Sequenzierungsstrategie für das **pelA**-Gen zeigt;
 Abb. 8 die Sequenzierungsstrategie für das **pelB**-Gen zeigt;
 Abb. 9 die Sequenzierungsstrategie für das **pelC**-Gen zeigt;
 Abb. 10 die Sequenz eines DNA-Moleküls **pelA** mit der Formel I zeigt, welches die Gencodierung für PLA enthält;
 Abb. 11 die Sequenz eines DNA-Moleküls **pelB** mit der Formel II zeigt, welches die Gencodierung für PLB enthält;
 Abb. 12 die Sequenz eines DNA-Moleküls **pelC** mit der Formel III zeigt, welches die Gencodierung für PLC enthält;
 Abb. 13 die Homologie beim Aminosäurefolgenpegel zwischen PLD, PLA und PLC zeigt;
 Abb. 14 die Konstruktion des Vektors pUC10/pelA-IFN AM 119 mit der Gencodierung für das Hybridinterferon BDBB zeigt;
 Abb. 15 den nichtcodierenden Strang eines Teils der **pelA**-IFN AM 119 mit herausgezogener Signalsequenz zeigt, die mit dem Oligonukleotidstarter ausgerichtet ist, der für die Deletionsmutagenese des **pelA**-Signalsequenz verwendet wird.

Die folgenden Beispiele dienen der Veranschaulichung der Erfindung, sind jedoch in keiner Weise als Einschränkung zu betrachten.

Die Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

Amp	Ampizillin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäuredinatriumsalz
EGTA	Bis-(Aminoethyl)glykolether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
kbp	Kilobasenpaar
LMP	Niedriger Schmelzpunkt
mOsm	Milliosmole
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen/min
SDS	Natriumdodekylsulfat
Tc	Tetrazyklin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten
V	Volt

Puffer, Medien, Reagenzien:

HHA B/g	10facher Restriktionsenzym-puffer, der für BamHI-, BglII-, HindIII-, MboI-, PstI- und XhoI-Verdauungen verwendet wird und 60 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,4), 60 mM β -Merkaptoethanol, 60 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 0,1 % BSA, 0,1 % Gelatine enthält
EcoRI-Puffer	5facher Restriktionsenzym-puffer, der für EcoRI-Verdauungen verwendet wird und 500 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,2), 25 mM MgCl ₂ , 250 mM NaCl, 0,05 % BSA, 0,05 % Gelatine enthält
IPTG	100 mM Isopropyl- β -thio-galaktopyranosid (23,8 mg/ml) in H ₂ O
LC-Medium	1 % Tryptikasepepton (BBL), 0,5 % Hefeextrakt (BBL), 0,8 % NaCl, 1 ml Tris-HCl, pH-Wert 7,5, je Liter
Minimalmedium	1,05 % K ₂ HPO ₄ , 0,45 KH ₂ PO ₄ , 0,1 % (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,05 % für E. coli Natriumzitat. 2 H ₂ O, 1 mM MgSO ₄ , 1 mM Thiamin-HCl, 0,2 % Glukose
2 XTY-Medium	je Liter 16 g Tryptikasepepton (BBL), 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl
TBE-Puffer	1 Liter enthält 10,8 g Tris, 5,5 g Borsäure, 4 ml 0,5 M EDTA (pH-Wert 8,0)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH-Wert 8,0), 1 mM EDTA (pH-Wert 8,0)
geringer TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH-Wert 8,0), 0,1 mM EDTA (pH-Wert 8,0)
X-gal	2 % (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galaktosid) in Dimethylformamid
SSC	0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumzitat
Minimalmedium für A. niger	1 Liter enthält 1,5 g KH ₂ PO ₄ , 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O, 4,0 g NH ₄ Cl, 10,0 g Glukose, Spuren von FeSO ₄ , MnSO ₄ , ZnCl ₂ , mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 abgestimmt
Komplettmedium für A. niger	Minimalmedium plus 0,2 % Tryptikasepepton für (BBL) 0,1 % Kasaminosäuren (Difco), 0,1 % Hefeextrakt (BBL), 0,05 % Ribonukleinsäurenatriumsalz für Hefe (ICN, Cleveland, USA), 2 ml Vitaminlösung je Liter
Vitaminlösung	je 100 ml 10 mg Thiamin, 100 mg Riboflavin, 10 mg Panthoteinsäure, 2 mg Biotin, 10 mg p-Aminobenzoessäure, 100 mg Nikotinamid, 50 mg Pyridoxin-HCl

Für Platten werden alle Medien durch den Zusatz von 1,5% Agar (BBL) verfestigt, für Topagar(ose) werden 0,7% Agar (BBL) oder Agarose (SEAkem) verwendet.

PBS	je Liter 0,37 g NaH ₂ PO ₄ , 2,7 g Na ₂ HPO ₄ , 8,5 g NaCl
PSB	10 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,6), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 0,05 % Gelatine
LDB	10 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,6), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂

Es wurden folgende Stämme verwendet:

<i>A. niger</i>	Wildtyp N 400
<i>A. niger</i> N 593	<i>cspA</i> , <i>pyrA</i>
<i>A. niger</i> N 756	ausgewählt für die starke Produktion von Pektinasekomplexenzymen
<i>A. niger</i> An 8	DSM 3917, uridinauxotropher Mutant von <i>A. niger</i> N 756
<i>E. coli</i> NM 539	<i>metB</i> , <i>supE</i> , <i>hsdM</i> ⁺ , <i>hsdR</i> ⁻ , <i>supF</i> , (P2 _{cox3})
<i>E. coli</i> MH 1	<i>araD</i> 139, Δ <i>lacX</i> 74, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>hsr</i> ⁻ , <i>hsm</i> ⁺ , <i>strA</i>
<i>E. coli</i> JM 103	Δ <i>lac-pro</i> , <i>thi</i> , <i>strA</i> , <i>supE</i> , <i>endA</i> , <i>sbcB</i> , <i>hsdR</i> 4 F ¹ , <i>traD</i> 36, <i>proAB</i> , <i>lacIq</i> , Δ M 15
<i>E. coli</i> JM 109	Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>recA</i> , <i>endA</i> , <i>gyrA</i> 96, <i>thi</i> , <i>hsdR</i> 17, <i>supE</i> 44, <i>relA</i> , λ ⁻ , [F', <i>traD</i> 36, <i>proAB</i> , <i>lacIq</i> , Δ M 15]
<i>E. coli</i> CJ 236	(<i>dut-1</i> , <i>ung-1</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA-1</i> ; pCJ 105(Cm ^r); BIO-RAD Muta-Gene M 13 In-vitro-Mutagenesesatz)
<i>E. coli</i> MV 1190	Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>thi</i> , <i>supE</i> , Δ (<i>srl-recA</i>)360:Tn 10(<i>tet</i> ^r) (F': <i>traD</i> 36, <i>proAB</i> , <i>lac</i> 1 ^q Δ M 15)]. Stamm MV 1190 wird im Handbuch für den BIO-RAD MUTA-GENE M 13-In-vitro-Mutagenesesatz beschrieben.

Es werden folgende Vektoren verwendet:

EMBL 4

EMBL 4 ist ein Lambda-Austauschvektor mit einer Klonierungskapazität von 9–23 kbp (Frischauf u. a., Lit. 2). Er enthält einen Mehrfachklonierungsbereich zwischen den Lambda-Armen und der nichtwesentlichen Füllregion. Das ermöglicht die Durchführung mehrfacher Restriktionsenzymverdauungen in einer Weise, bei der die Relegation des Füllelementes an die Vektorenarmen verringert wird, da interessierende Fremd-DNA eingefügt wird. Der Vektor nutzt auch den Spi-Phänotypus, um eine direkte Selektion für Rekombinanten zu ermöglichen (Zissler u. a., Lit. 20).

pCG3B 11

Dieses Plasmid wurde in der europäischen Patentanmeldung 88 101 397.3 beschrieben, es enthält das *peID*- (PLI) Gen von *A. niger* N 756, kloniert in pBR322.

pPL29-5

Dieses Plasmid wurde in der europäischen Patentanmeldung 88 101 397.3 beschrieben, es enthält das N-Terminal-EcoRI-Fragment des *peID*- (PLI-) Gens.

pPL35-5

Dieses Plasmid wurde in der europäischen Patentanmeldung 88 101 397.3 beschrieben, es enthält das C-Terminal-EcoRI-Fragment des *peID*- (PLI-) Gens.

pBR322

Plasmid pBR322 trägt Gene für die Resistenz gegenüber den Antibiotika Ampizillin (amp[®]) und Tetrazyklin (tet[®]). Das Plasmid weist mehrere eindeutige Klonierungsstellen auf, von denen sich einige entweder im amp- oder tet-Gen befinden, so daß die Insertion von klonierter DNA zu antibiotikasensitiven Bakterien führt.

pEMBL 18 und pEMBL 19

Diese Plasmide wurden von Dente u. a. (Lit. 7, 8) beschrieben.

pGW613

Dieses Plasmid wurde von Goosen u. a. (Lit. 12) beschrieben.

Phag M 13 mp

Die Vektoren M 13mp 18 und M 13mp 19 (Norrander u. a., Lit. 21) sind Derivate des einzelsträngigen DNA-Bakteriophagen M 13 und wurden zur Erleichterung der DNA-Sequenzierung aufgebaut, da sie die Klonierung von DNA-Fragmenten an einer vielseitigen Polylinkerstelle und die Klonierung desselben Restriktionsfragments in beiden möglichen Orientierungen gestatten. Sequenzen, welche in diese Vektoren kloniert werden, können leicht als Matrizen für Sequenzierungsreaktionen oder für die Produktion von einzelsträngigen Sonden unter Verwendung eines Oligodeoxyribonukleotid-Standardstarters und des Klenow-Fragmentes von *E. coli*-DNA-Polymerase I genutzt werden. Die Vektor-DNA trägt den *E. coli*-*lac*-operon-Promotor und die genetische Information der ersten 145 Aminosäuren von β -Galaktosidase. Die Polylinkersequenzen, welche die Mehrfachrestriktionsstellen enthalten, werden in die Sequenz *lacZ* eingefügt. Der Polylinker erhält das *lacZ*-Leseraster, und der Vektor gibt die allelische Komplementierung eines *LacZa*-Wirtstammes, was auf den Platten blaue Plaques ergibt, die IPTG und X-gal enthalten. Rekombinante Phage, welche Inserts enthalten, die das Leseraster zerstören oder anderweitig die Expression des Peptids *lacZa* beeinträchtigen, erscheinen als farblose Plaques (Flecken).

pCG59D7

Dieses Plasmid wird in EP 88 101 397.3 beschrieben und kann aus *Escherichia coli* BJ 5183/pCG59D7 (DSM 3968) gewonnen werden. Das Plasmid beinhaltet das *pyrA*-Gen und wird für die Kotransformation von *A. niger-pyrA*⁻-Mutanten verwendet.

M 13(+)KS (Bluescript) (STRATEGENE, San Diego, CA, USA) dsDNA-Vektor, den Replikationsursprung von Phag M 13 umfassend. Bei Vorhandensein eines Helfer-Phags, z. B. M 13KO7 (Lit. 29) oder R408 (Lit. 9) wird der (+)-Strang des Vektors repliziert, gepackt und in das Medium freigesetzt.

M 13KO7

Helfer-M 13-Phag für M 13(+)-KS. Von Mead u. a. (Lit. 29) beschrieben.

R408

Helfer-M 13-Phag für M 13(+)-KS. Von Russell u. a. (Lit. 9) beschrieben.

Beispiel 1

Konstruktion einer genomischen Bibliothek von *Aspergillus niger*

Beispiel 1.1

Isolierung der hochmolekulargewichtigen DNA aus *A. niger*

Konidiosporen von *Aspergillus niger*-Stamm N 400 werden in 200 ml Minimalmedium mit einer abschließenden Sporendichte von 10^6 Sporen/ml inokuliert und in einem Erlenmeyer-Kolben von 1 l Fassungsvermögen 24 Stunden lang bei 28°C mit 300 U/min unter Verwendung eines Rotationsschüttlers von New Brunswick geschüttelt. Das Myzel wird unter Verwendung eines Bücher-Trichters mit Myra cloth durch Filtern geerntet, mit kalter, steriler Salzlösung gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und entweder bei -60°C aufbewahrt oder direkt verwendet. Die Methode, die für die Isolierung der DNA zur Herstellung der genomischen Bibliothek angewendet wird, basiert auf dem Verfahren, das von Yelton u. a. (Lit. 1) beschrieben wurde. Der DNA-Ertrag beträgt bei dieser Methode etwa 50–100 µg/g Myzel.

Für die Konstruktion der Bibliothek werden 10 g Myzel in flüssigem Stickstoff in Portionen zu je 1 g in einem Braun-Mikrodosismembrator gemahlen. Das gemahlene Myzel wird in einen sterilen Erlenmeyerkolben von 1 l Fassungsvermögen gebracht, der 200 ml Extraktionspuffer (50 mM EDTA, pH-Wert 8,5, 0,2% SDS) und 200 µl Diethylpyrokarbonat enthält. Das Gemisch wird langsam auf Zimmertemperatur erhitzt und dann 20 min auf 68°C unter gelegentlichem Schütteln erhitzt. Die Suspension wird auf Zimmertemperatur abgekühlt und 15 Minuten lang bei 12000 xg zentrifugiert. Der obenaufschwimmenden Schicht werden $\frac{1}{16}$ Volumen einer 8 M Kaliumazetatlösung, pH-Wert 4,2, zugesetzt, und man läßt das Gemisch eine Stunde lang auf Eis. Der Niederschlag wird durch Zentrifugieren (20 min; 16000 xg; 4°C) entfernt. Die Nucleinsäuren werden aus der obenaufschwimmenden Schicht durch Inkubation mit 0,6 Volumen Isopropanol auf Eis für die Dauer von 15 min ausgefällt. Das Pellet wird durch Zentrifugieren (10 min; 6000 xg; 4°C) aufgefangen, mit 70% Ethanol gewaschen und kurz getrocknet. Das Pellet wird in 10 ml TE, das 20 µg/ml RNase A (Boehringer, Mannheim) enthält, suspendiert und 15 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wird mit nukleasefreier Pronase (1 mg/ml Endkonzentration) behandelt (Kochlight, Coinbrook), Dauer 1 Stunde bei 37°C. Die Pronasevorratslösung in TE-Puffer enthält 20 mg/ml Enzym, das eine Stunde lang bei 37°C inkubiert wird, um die Nucleasen zu verdauen.

In 9 ml DNA-Lösung werden 8,5 g CsCl aufgelöst, es werden 0,2 ml 10 mg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, und diese Lösung wird entweder in einem Beckman-Rotor SW41 60 Stunden bei 33000 U/min zentrifugiert oder in einem Beckman-Rotor 50 Ti mit Schnellverschlusßröhren 40 Stunden lang bei 45000 U/min. Das DNA-Band wird durch Seitdurchschlagen des Rohres aufgenommen. Ethidiumbromid wird durch Mehrfachextraktion mit wasser- und NaCl-gesättigtem Isopropanol entfernt. Es werden 5 Volumen TE zugesetzt, die DNA wird mit TE-gesättigtem Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1, und Chloroform/Isoamylalkohol, 24:1, extrahiert. Die DNA wird durch den Zusatz von 0,1 Volumen von 3 M Natriumazetat, pH-Wert 5,2, 2,5 Volumen Ethanol und Inkubation bei -20°C über Nacht ausgefällt. Der Niederschlag wird durch Zentrifugieren (1 h; 30000 xg; 4°C) aufgefangen, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 400 µl geringerem TE-Puffer aufgelöst.

Beispiel 1.2

Partielle Verdauung von *A. niger*-DNA mit Mbol und Isolierung der Fragmente

Um die Mbol-Konzentration, die die größte Menge an Fragmenten zwischen 13,6 und 23 kbp ergibt, zu bestimmen, werden Portionen von 1 µg von *A. niger* N400-DNA in einem geeigneten Puffer mit abnehmenden Mengen an Mbol (0,5–0,001 Einheiten) für die Dauer von einer Stunde bei 37°C in einem Volumen von 10 µl verdaut. Die Reaktion wird durch den Zusatz von 1 µl 0,25 M EDTA gestoppt, und die Proben werden auf ein 0,6%iges Agarosegel in TBE gebracht, das 1 µg/ml Ethidiumbromid enthält. Geeignete Marker sind ein Gemisch aus Lambda-DNA und mit BgIII verdauter Lambda-DNA, die Bänder von 49, 22,8, 13,6, 9,8, 2,3 kbp und ein nicht sichtbares Fragment von 0,45 kbp ergibt. Die erforderliche Mbol-Konzentration, bei der ein hoher Ertrag der gewünschten Fragmente von 13,6–23 kbp erzielt wird, beträgt 0,02 Einheiten/µg DNA. Folglich werden 200 µg DNA in einem gesamten Volumen von 2 ml verdaut und unmittelbar nach Zusatz des Enzyms in 20 Portionen von gleicher Größe geteilt. Nach einer Stunde bei 37°C werden diese Portionen auf Eis gegeben und eine Probe von 1 µg wird auf einem Gel erprobt, um die richtige Verdauung zu testen. Wenn das Ergebnis positiv ist, wird EDTA auf eine Endkonzentration von 25 mM zugesetzt, um die Reaktion zu stoppen, das Enzym wird bei 65°C über 10 min wärmeinaktiviert, die Proben werden zusammengefaßt und die DNA wird ausgefällt, gewaschen, getrocknet und in 400 µl TE-Puffer aufgelöst.

Die fragmentierte DNA wird über Nacht auf einem 0,4%igen präparativen Agarosegel (Mittelvertiefung 120 × 1,5 mm) getrennt. Mit BgIII verdaute Lambda-DNA wird als Marker verwendet, um die Größe der partiell verdauten DNA-Fragmente nach Elektrophorese bei 4°C und 40 V (3 V/cm) zu bestimmen. Der Gelbereich, welcher die Fragmente mit der richtigen Größe enthält, wird aus dem Gel herausgeschnitten, und die DNA wird aus dem Gel in einem sterilen Dialyse-Rohr in 2 ml TBE-Puffer über 2 bis 3 Stunden bei 100 V elektroeluiert. Der Strom wird 30 s umgekehrt, und der die DNA enthaltende Puffer wird aufgefangen. Dann werden die Fragmente durch Ethanolausfällung konzentriert und in 100 µl geringem TE-Puffer aufgelöst.

Beispiel 1.3

Herstellung von Vektor-DNA und Klonierung der hochmolekulargewichtigen DNA-Fragmente von *A. niger* in EMBL4

Die genomische Bibliothek des *A. niger*-Stammes N400 wird in den Lambda-Vektor EMBL4 konstruiert. Der Vektor, der eine Klonierungskapazität von 9 bis 23 kbp hat, wird von Frischauf u. a. (Lit. 2) und von Karn u. a. (Lit. 3) beschrieben und wurde von der Promega Biotechn. Inc. bezogen. Um Doppelinserts mit Ursprung in unterschiedlichen Teilen des Genoms zu vermeiden, wurde beim Klonieren mit einer minimalen Fragmentlänge von 13,6 kbp gearbeitet.

Es werden 10 µg Lambda-EMBL4-DNA vollständig mit 50 Einheiten BamHI in einem geeigneten Puffer in einem Volumen von 10 µl über die Dauer von 2 Stunden bei 37°C verdaut. Das Enzym wird über 10 min bei 65°C inaktiviert. Die NaCl-Konzentration wird auf 150 mM erhöht, und es werden 50 Einheiten Sall zugesetzt, anschließend wird weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dem Zusatz von EDTA auf 25 mM und der Inaktivierung des Enzyms (10 min, 65°C) wird die Lösung mit gleichen Mengen von Phenol (TE-gesättigt), Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1, und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Um die kleinen BamHI/Sall-Polylinkerfragmente auszusondern, wird die DNA mit 0,6 Volumen Isopropanol ausgefällt, nachdem 0,1 Volumen 3 M Natriumazetat, pH-Wert 5,2, zugesetzt worden waren. Nach 15 min auf Eis und 15 min Zentrifugieren bei 12000 x g und 4°C wird der Niederschlag gründlich mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl geringem TE-Puffer aufgelöst.

Beispiel 1.4

Ligation und In-vitro-Verpackung von genomischen *A. niger*-DNA-Fragmenten

Es ist wesentlich, daß die cos-Stellen des Vektors, der nach Beispiel 1.3 hergestellt worden ist, vor der Ligationsreaktion hybridisiert werden. Der Vektor in 100 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, und 10 mM MgCl₂ wird über 10 min auf 65°C erhitzt und dann eine Stunde lang bei 42°C hybridisiert. Aus Probeligationen wird ein Verhältnis von Vektor zu Fragmenten von etwa 1:1 (Gewichtsgrundlage) ermittelt, das ein Maximum von Rekombinanten ergibt. Die Ligation erfolgt in 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT und 1 mM ATP, wobei 9,5 µg Vektor und 10 µg DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt werden. Dann wird DNA-Ligase (BRL) mit einer Konzentration von 0,5 Einheiten/µg DNA zugesetzt, und das Ligationsgemisch wird über Nacht bei 14°C inkubiert. Um auf Ligation zu prüfen, wird eine Probe der ligierten DNA auf einem Agarosegel erprobt. Außerdem wird eine Menge von 0,5 µg Vektor ohne den Zusatz von Fragmenten in einem Volumen von 5 µl ligiert.

Das Ligationsgemisch mit dem großen Volumen wird durch Ethanolausfällung konzentriert und in 20 µl geringem TE-Puffer vor der In-vitro-Verpackung aufgelöst. Die In-vitro-Verpackung erfolgt mit Promega Packagene-Extrakten nach den Anweisungen des Herstellers unter Verwendung von 10-µl-Portionen zum Verpacken von 1 µg der DNA. Von dem hochmolekulargewichtigen Lambda-cl857-Sam 7, das mit den Extrakten mitgeliefert wird, werden 1 µg getrennt verpackt, um eine Kontrolle zu schaffen. Nach dem Verpacken werden 500 µl Phaglösungspuffer (PSB) und 5 µl Chloroform zugesetzt. Die rekombinanten Phag-Vorräte können bei 4°C gelagert werden. Die gewonnene Bibliothek wurde aus zwei getrennten Ligationsexperimenten konstruiert.

Beispiel 1.5

Titration und Amplifikation der genomischen Bibliothek des *A. niger*-Stammes N 400

Zellen von *E. coli* NM539 werden auf einem LC-Medium, das 0,2% Maltose, 10 mM MgSO₄ und 1 mM CaCl₂ enthält, auf eine optimale Dichte von 1,0 (600 nm) gezogen. Dann werden Aliquote dieser Kultur zu 0,2 ml, 0,1 ml einer Phag-Verdünnungsreihe in PSB zugesetzt. Nach der Adsorption der Phage über 20 min bei 37°C werden 3 ml 0,6%iges LC-Topagar zu 45°C zugesetzt, das Gemisch wird auf LC-Agar-Platten plattiert, und diese werden bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Titrationsergebnisse, ausgedrückt als Anzahl der plaquebildenden Einheiten (pfu) je ml Phag-Suspension, lauten 12×10^5 und $4,2 \times 10^5$ pfu/ml für die beiden Phag-Vorratslösungen, die nach Beispiel 1.4 hergestellt worden sind. Nach der Subtraktion des Hintergrundes, der aus den Kontrolligationen ohne Fragmente berechnet wird (17% bzw. 40%), beträgt die absolute Zahl der Rekombinanten 6×10^5 , was mehr als das 200fache der Genomlänge ist.

Um die Bibliothek zu erweitern, werden Portionen zu 80 µl von beiden Phag-Vorratslösungen verwendet, um *E. coli* NM539-Zellen zu infizieren, die in LC-Topagarose auf LC-Agaroseplatten plattiert und dann bei 37°C über Nacht inkubiert werden. Die Phage werden aus der Agarose durch sanftes Schütteln der Platten mit 5 ml PSB je Platte über eine Stunde bei Raumtemperatur eluiert. PSB wird aufgefangen, zur Entfernung der Bakterien zentrifugiert (10 min bei 6000 x g), und es wird Chloroform zugesetzt (Endkonzentration 0,5%). Beide Phag-Vorratslösungen, die etwa im gleichen Umfang erweitert werden, werden dann gemischt (40 ml Vorrat), titriert (8×10^9 pfu/ml) und bei 4°C aufbewahrt.

Beispiel 2

Screening der genomischen Bibliothek von *A. niger* N400 auf das Pektinlyase-D-Gen (pelD) und Isolierung des Gens

Beispiel 2.1

Screening der Bibliothek

Zur Isolierung des pelD-Gens aus der Lambda-genomischen Bibliothek, die nach der Beschreibung in Beispiel 1 gewonnen wurde, werden $2,5 \times 10^4$ Phage mit verflüssigter LC-Topagarose gemischt und auf 5 LC-Agarplatten plattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert und 2 Stunden lang bei 4°C abgekühlt. Auf jeder Platte werden nach Benton und Davis (Lit. 4) und ihrer Plaque-Hybridisationsmethode 2 Replikate hergestellt. Der erste Filter (Schleicher und Schüll, BA85, oder Millipore, HATF 085) wird für eine Minute oben auf die Platte gelegt, das zweite Replikat für 2 min, und die Position der Replikate wird unter Verwendung von Ausziehtusche markiert.

Nach der Entfernung der Filter werden sie in eine Schale gegeben, die 100 ml einer Denaturierungslösung (1 M NaCl, 0,5 M NaOH) enthält, dort bleiben sie 1 min, anschließend gibt man sie ebenfalls für eine Minute in 100 ml Renaturierungslösung (0,5 M Tris/HCl, pH-Wert 7,5, 1,5 M NaCl). Dann werden die Filter in eine Schale gegeben, die 3x SSC enthält (SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumzitat, pH-Wert 7,0). Die Filter werden vorsichtig mit einer behandschuhten Hand geschrubbt, um Bakterientrümmern zu entfernen, in eine frische Schale mit 3x SSC gegeben und 20 min bei Raumtemperatur vorsichtig

geschüttelt. Die Filter werden auf Whatman-Papier 3 MM übertragen und 10 min bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Filter werden auf 3 Whatman-Papier MM in einem Ofen bei 80°C für die Dauer von 2 Stunden gebacken. Anschließend werden sie 0,5 Stunden in 6× SSC bei Zimmertemperatur gewaschen und dann auf 50 ml vorgewärmtes (56°C) Vorhybridisierungsgemisch übertragen, das aus 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,5% SDS, 0,1% Natriumpyrophosphat, 10× Denhardt-Lösung (50× Denhardt-Lösung = 1% BSA, Boehringer-Fraktion V; 1% Polyvinylpyrrolidon –40; 1% Ficoll 400) besteht. Dem Vorhybridisierungsgemisch werden frisch zugesetzt: 0,1 mg/ml denaturierte Lachssperma-DNA (Maniatis u. a., S. 327; Lit. 5) und 0,01 mg/ml Poly-rA. Die Vorhybridisierung erfolgt unter sanftem Schütteln bei 56°C über die Dauer von 4 Stunden. Als Sonde für die Hybridisierung wird das einzelstrangbruchtranslatierte 3,5 kbp-EcoRI-Fragment von pL35-5 verwendet, welches den C-Terminalbereich des *peID*-Gens des *A. niger*-Stammes N756 (erhältlich von E. coli BJ5183/pCG3B11, DSM3916, EP 88 101 397.3) enthält. Das Fragment wird vorher aus einem niedrigschmelzenden Agarosegel isoliert, und 0,3 µg des Fragments werden einzelstrangbruchtranslatiert (Maniatis u. a., S. 109–112; Lit. 5). Die Einzelstrangbruchtranslatierte DNA wird 10 min lang in einem siedenden Wasserbad denaturiert, auf Eis gekühlt und 50 ml vorgewärmtem Vorhybridisierungsgemisch zugesetzt. Die vorhybridisierten Filter werden einer nach dem anderen auf das Hybridisierungsgemisch übertragen. Die Hybridisierung erfolgt unter sanftem Schütteln über Nacht bei 56°C. Die Filter werden bei 56°C gewaschen: 2× 30 min mit 0,514× SSC, 0,1% SDS und 2× 30 min mit 2× SSC, 0,1% SDS. Die Filter werden auf 3 MM-Papier übertragen und über eine Stunde durch Luft getrocknet. Nachdem sie auf 3 MM-Papier geklebt wurden und eine entsprechende Markierung mit radiomarkierter Tusche erfolgt ist, werden die Filter mit Saran-Deckmaterial abgedeckt und über Nacht bei –70°C autoradiografiert, wozu Konica-Röntgenfilme und röntgen-omatische Kodak-Kassetten sowie normale Intensivierungsschirme verwendet werden. Auf diese Weise erhält man 44 positive Signale von den 5 gescreenten Platten. Positive Plaques werden mit einer sterilen Pasteur-Pipette aufgenommen, wozu die Platten auf dem Autoradiogramm sorgfältig in der richtigen Weise positioniert werden und die Tuschemarkierungen genutzt werden. Die Agarstücke, welche die positiven Plaques enthalten, werden in 1 ml PSB dispergiert. Man läßt die Phage über eine Stunde bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Wirbeln aus dem Agar diffundieren. Das Agar und die bakteriellen Zelltrümmer werden durch fünfminütiges Zentrifugieren entfernt, es werden 10 µl Chloroform zugesetzt und die Phag-Vorratslösungen bei 4°C aufbewahrt. Die positiven Klone erhalten die Bezeichnungen λ-PL1 bis λ-PL44. Da Phage in hoher Dichte plattiert werden, müssen die positiven Plaques zweimal gereinigt werden, wozu sie in geringer Dichte (± 100 Phag je Platte; 0,1 ml einer 10^3 -Verdünnung der Phag-Vorratslösung) plattiert und das gesamte Verfahren der Replikatplattierung, Hybridisierung und Aufnahme der positiven Plaques wiederholt werden.

Beispiel 2.2

Isolierung der Lambda-DNA

Um DNA aus den rekombinanten Klonen zu isolieren, wird zuerst eine Amplifikation der Phage durch Infektion von E. coli NM539 mit 0,1 ml der Phag-Vorratslösungen, die von gereinigten Klonen stammen, wie im Beispiel 1.5 vorgenommen und werden dann die Zellen in LC-Topagarose auf LC-Agar-Platten plattiert. Dadurch erhält man Platten mit konfluenter Lysis der Indikatorbakterien. Über die Platten werden 5 ml PSB gegeben, und die Phage werden über einen Zeitraum von zwei Stunden durch sanftes Schütteln eluiert. Die eluierten Phage werden geerntet, Zelltrümmer werden durch Zentrifugieren entfernt, und es wird Chloroform bis zu 1% zugesetzt. Das resultierende Plattenlysat wird bei 4°C aufbewahrt. Es hat in der Regel ein Titer von etwa 10^{11} pfu/ml.

Da Isolierungsverfahren im kleinen Maßstab aus Plattenlysatvorratslösungen und aus kleinangelegten flüssigen Kulturen (Maniatis, u. a., S. 65–68; Lit. 5) nicht immer verdauungsfähige DNA ergeben, werden Phage aus 250-ml-Lysaten isoliert. Diese werden hergestellt durch Züchten des Wirts, E. coli NM539, auf einen O.D.₆₀₀ von 0,3 in LC + 0,2% Maltose, 10 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂ und anschließendes Zufügen von etwa 10^{10} pfu des Plattenlysats. Nach weiterem Wachstum lösen sich die Bakterien innerhalb von 4 Stunden auf.

RNase und DNase werden den Lysaten bis zu einer Endkonzentration von 2 µg/ml zugesetzt, und man läßt das Lysat bei Zimmertemperatur eine Stunde stehen. Zelltrümmer werden durch Zentrifugieren (20 min, Zimmertemperatur, 10000×g) entfernt. In der obenaufschwimmenden Schicht werden 14,8 g NaCl und 25 g PEG 6000 aufgelöst, um Endkonzentrationen von 1 M NaCl und 25% PEG zu erhalten. Man läßt die Phage über eine Stunde auf Eis oder über Nacht bei 4°C ausfällen und erntet sie durch Zentrifugieren (20 min; 10000×g; 4°C). Die Pellets werden in 3 ml Lambda-Verdünnungspuffer (LDB = 10 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,5, 20 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) suspergiert. In 4 ml der Phagsuspension werden 2,5 g CsCl aufgelöst, und das Gemisch wird mit der Pipette in 5-ml-Beckman-Schnellschlußröhrchen gegeben, die dann bis zur selben CsCl-Konzentration in LDB gefüllt werden. Die Röhrchen werden verschlossen und über Nacht in einem Beckman-Rotor VTi65.2 bei 50000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das trübe Phagband, das unter einer normalen Lampe sichtbar ist, wird von der Seite des Röhrchens punktiert. CsCl wird durch Dialyse in sterilen Röhren anhand von 2 l 10 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,5, 19 mM MgCl₂, 50 mM NaCl bei 4°C über die Dauer von 4 Stunden entfernt. Der Puffer wird einmal ausgewechselt. Phage werden in sterilen Greiner-Röhren aufgefangen, das Volumen wird mit dem Dialysepuffer auf 1 ml abgestimmt, es werden 50 µl 10% SDS, 50 µl 0,5 M EDTA, pH-Wert 8,0, und 25 µl von 20 mg/ml-nukleasefreier Pronase zugesetzt und die Röhrchen 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Das Volumen wird mit TE auf 3 ml erhöht, und diese Lösung wird mit gleichem Volumen von TE-gesättigtem Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1, und Chloroform/Isoamylalkohol, 24:1, extrahiert. Nachdem 0,1 Volumen von 3 M Natriumazetat, pH-Wert 5,2, und 2,5 Volumen Ethanol zugesetzt worden sind, wird die DNA bei –20°C über Nacht ausgefällt und durch Zentrifugieren (1 h, 20000×g bei 4°C) aufgefangen. Das Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl geringem TE-Puffer aufgelöst. Die Ausbeute an Phag-DNA beträgt etwa 200 µg/250 ml Lysat.

Beispiel 2.3

Restriktionsanalyse von *peID*-Klonen

Von den positiven Phagen wurden 10 willkürlich für die weitere Analyse ausgewählt. Es wird 1 µg Phag-DNA mit 10 Einheiten EcoRI oder BglII in einem Volumen von 20 µl für die Dauer von 2 Stunden bei 37°C in den Puffern verdaut, die vom Hersteller empfohlen werden. Die Proben werden auf einem 0,6%igen Agarosegel getrennt, wozu 1 µg Lambda cl857-Sam 7-DNA verwendet wird, die mit HindIII (Lambda × HindIII) verdaut wurde, als Marker, und EMBL4-DNA und pCG3B11-DNA, verdaut mit

EcoRI, dient als Kontrolle. Das Gel wird auf einem UV-Transilluminator unter Verwendung von Polaroid-Filmen 667 (4 s, Blende 8) fotografiert. Die DNA wird auf Nitrozellulosefilter von Schleicher und Schüll, BA 85, nach der Methode von Southern (1975), wie das von Maniatis, S. 382–386 (Lit. 5) beschrieben wurde, übertragen. Die Filter werden mit einem Gemisch von ³²P-markierten (einzelstrangbruchtranslatierten) Fragmenten des *peID*-Gens, die den Bereich des gesamten Gens erfassen, markiert. Diese Fragmente sind das 2,9 kbp EcoRI-Fragment von pPL 29-5 und das 3,5 kbp EcoRI-Fragment von pPL 35-5. Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen sind mit den im Beispiel 2.1 beschriebenen identisch.

Die Bandlängen werden aus den Fotografien und Autoradiogrammen durch grafischen Vergleich auf einfachlogarithmischem Papier mit den bekannten Marker-Bändern errechnet. Die Restriktionskarten der Klone werden in der Abb. 1 gegeben. Die Klone λ -PL 4, -14, und -40 enthalten sowohl das 2,9- als auch das 3,5-kbp-EcoRI-Hybridisierungsfragment, wie es in pCG 3 B 11 gefunden wird. λ -PL 5, -6, -10 und -33 enthalten das 3,5-kp-EcoRI-Fragment zusammen mit einem anderen hybridisierenden EcoRI-Fragment. Die Klone λ -PL 26 und -28 enthalten das 2,9-kbp-EcoRI-Fragment zusammen mit einem anderen hybridisierenden Fragment, während λ -PL 9 nur ein kleines hybridisierendes EcoRI-Fragment von 1,2 kbp enthält. Das vollständige 5,0-kbp-BgIII-Fragment von pCG 3 B 11, welches das gesamte *peID*-Strukturgen enthält, ist nur in den Klonen λ -PL 4, -14 und -40 enthalten. Das 3,7-kbp-Hybridisationsband, das in den Klonen λ -PL 5, -6, -10, -14, -33 und -40, nicht aber in pCG 3 B 11 vorhanden ist, befindet sich flußabwärts des *peID*-Gens im 5,0-kbp-Fragment. Einige hybridisierende BgIII-Fragmente enthalten noch 1,2 kbp des rechten Armes des Vektors. Alle Klone enthalten auch nichthybridisierende Fragmente, die identisch sind. Da es also offensichtlich den Anschein hat, daß die Restriktionsmuster sowohl des Strukturgens als auch den Gens in der Umgebung in allen Klonen identisch sind, wird geschlußfolgert, daß sie ihren Ursprung im selben Gen haben, dem *peID*-Gen des *A. niger*-Stammes N 400. Aus der Anzahl der plattierten Klone und der angenommenen Genomlänge von 3×10^7 bp wird abgeleitet, daß bei 25 000 Klonen mit einer durchschnittlichen Insert-Länge von 15 kbp wenigstens 12 *peID*-Klone gefunden werden. Da nur 2 der 10 analysierten Klone identisch sind, ist die Komplexität der Bibliothek sogar noch höher als angenommen (siehe Beispiel 3).

Beispiel 2.4

Subklonieren von *peID*-Fragmenten

Die 5,0-kbp-BgIII-Fragmente von λ -PL 4 und pCG 3 B 11, welche die *peID*-Gene von *A. niger* N 400 bzw. N 756 enthalten, werden in die BamHI-Stelle von Plasmid pBR322 subkloniert (siehe Klonierungsvektoren). In 20 μ l werden 4 μ g λ -PL 4 und 2 μ g pCG 3 B 11 mit 10 Einheiten BgIII über zwei Stunden bei 37°C bis zur Kompletion verdaut. Die Fragmente werden auf einem 1%igen Agarosegel mit niedrigem Schmelzpunkt (BRL) in TBE + 1 μ g/ml Ethidiumbromid bei 50 V getrennt. Das 5,0-kbp-Fragment wird aus dem Gel herausgeschnitten, mit 0,4 ml TE verdünnt, es wird ein gleiches Volumen Phenol zugesetzt, und das Gemisch wird 10 min auf 65°C erhitzt, um die Agarose zu schmelzen. Nach einem fünfminütigen Zentrifugieren bei 12 000 U/min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5414 S wird die wäßrige Phase mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert, mit Ethanol ausgefällt, gewaschen, getrocknet und schließlich in 10 μ l geringem TE-Puffer aufgelöst.

Es werden 1 μ g pBR322-DNA, die nach der Plasmidherstellungsmethode im großen Maßstab (Maniatis, u. a., S. 86; Lit. 5) hergestellt wurde und durch CsCl-Gradientenzentrifugation gereinigt worden ist, mit 5 Einheiten BamHI für die Dauer von 2 Stunden bei 37°C in einem Volumen von 20 μ l verdaut. Es werden 2 μ l von $10 \times$ CIP-Puffer und 0,02 Einheiten von CIP zugesetzt und weitere 30 min inkubiert. EDTA wird auf eine Endkonzentration von 25 mM zugesetzt, und das Gemisch wird für 10 min auf 65°C erhitzt. Die Lösung wird mit TE auf 200 μ l verdünnt und dreimal mit TE-gesättigtem Phenol, einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert. Nach der Ethanolausfällung wird die DNA in 50 μ l geringen TE-Puffer aufgelöst.

Ein DNA-Fragment zu 100 ng wird mit 20 ng der Vektor-DNA in einem Volumen von 20 μ l unter den in Beispiel 1.4 beschriebenen Bedingungen ligiert. Die Hälfte des Ligationsgemischs wird für die Transformation von *E. coli*-MH 1-kompetenten Zellen verwendet, die nach der CaCl₂-Methode (Maniatis, u. a., S. 250; Lit. 5) hergestellt wurden. Die Zellen werden auf LC-Agar-Platten, die 50 μ g/ml Ampizillin enthalten, plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transformanten werden auf ihre Tetrazyklinsensitivität getestet, wozu sie in Kolonien zuerst auf LC-Platten mit 20 μ g/ml Tc und dann auf LC+amp-Platten gestrichen werden. Die Transformanten werden über Nacht bei 37°C in 5 ml von LC+amp gezogen und die DNA wird unter Anwendung der alkalischen Lysis-Miniprep-Methode (Maniatis, u. a., S. 368; Lit. 5) aus 1,5 ml der Kultur isoliert.

Die Miniprep-DNA werden mit BamHI und PstI verdaut, und die Fragmente werden auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Zwei Plasmide mit ihrem Ursprung von λ -PL 4, welche das 5,0-kbp-BgIII-Fragment in entgegengesetzten Orientierungen enthalten, werden mit pGW 840 und pGW 841 bezeichnet. Weitere Plasmide, die von pCG 3 B 11 stammen, werden mit pGW 870 und pGW 871 bezeichnet. Die MH 1-Zellen, welche sie aufnehmen, werden bei -70°C auf Glycerol gehalten. Plasmid-DNA von 0,5-l-Kulturen dieser Klone wird im großen Maßstab isoliert (Maniatis u. a., S. 86; Lit. 5), durch CsCl-Zentrifugation gereinigt, phenolisiert, mit Ethanol ausgefällt und in 400 μ l geringen TE-Puffer aufgelöst. Die Ausbeute beträgt etwa 500 μ g. Die Plasmide werden der Restriktionskartierung unterzogen. Die Karte für Plasmid pGW 840 wird in der Abb. 2 gezeigt und ist nicht von der für pGW 870 zu unterscheiden. Auch die Plasmide pGW 841 und pGW 871, welche das Fragment in der entgegengesetzten Orientierung enthalten, sind nichtunterscheidbar, was auf die Identität der *peID*-Gene von den *A. niger*-Stämmen N 400 und N 756 hinweist.

Beispiel 3

Screenen nach, Isolierung und Charakterisierung von *peID*-verwandten Genen

Beispiel 3.1

Schaffung der Hybridisationsbedingungen durch Analyse von genomischen Übertragungen von *A. niger*-N 400-DNA

In einem Volumen von 20 μ l werden bei 37°C über die Dauer von 4 Stunden 2- μ g-DNA-Proben des *A. niger*-Stammes N 400, die wie im Beispiel 1.1 isoliert worden sind, unter Verwendung von BamHI (BRL) oder Hind III (BRL) in HHA BOG Puffer verdaut. Die verdauten Proben werden auf 0,6%igen Agarosegels bei 40 V über die Dauer von 18 Stunden elektrophoretisch getrennt. Die DNA wird auf Nitrozellulosefilter transferiert und wie im Beispiel 2.3 gebackten. Die (Vor-)Hybridisationslösungen sind mit den im Beispiel 2.1 beschriebenen identisch.

Die bei der Vorhybridisation angewandte Temperatur ist immer die gleiche wie die Hybridisationstemperatur. Das einzelstrangbruchtranslatierte BamHI/PstI-Fragment von pGW840, das den Codierungsbereich des *pelD*-Gens enthält, wurde als Sonde verwendet. Die Hybridisation wird über 16 Stunden und über 40 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen (52°C, 60°C und 68°C) ausgeführt. Bei den drei unterschiedlichen Temperaturen wird mit den beiden folgenden Waschbedingungen gearbeitet: 2× 30 min 5× SSC, 0,1% SDS, gefolgt von 2× 30 min 3× SSC, 0,1% SDS im Vergleich zu 4× 30 min 5× SSC, 0,1% SDS. Bei 68°C wird außerdem eine Waschung zweimal mit 2× SSC, 0,1% SDS und zweimal mit 0,2× SSC, 0,1% SDS einbezogen. Bei 68°C und Verwendung der 0,2× SSC-Waschungen tritt nur homologe Hybridisation ein. Werden höhere Salzkonzentrationen angewendet, treten einige andere schwache Signale auf. Bei 52°C ist der Hintergrund stark und die Hybridisation schwach. Die besten Bedingungen für eine „heterologe“ Hybridisation erreicht man bei 60°C über die Dauer von 40 Stunden bei Anwendung der Waschkombination 5× SSC und 3× SSC. Diese können noch weiter optimiert werden, wenn man 4× SSC in Verbindung mit 2× SSC anstelle von 5× SSC in Verbindung mit 3× SSC anwendet. Die Signale, die bei diesen genomischen Übertragungen von *A. niger* N400 bei einer Sondierung mit dem 1,6-kbp-BamHI:PstI-Fragment von pGW840 sichtbar werden, werden in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1
Hybridisationssignale in genomischer DNA von *A. niger* N 400, sondiert mit dem 1,6-kb-BamHI/PstI-Fragment von pGW840

BamHI	HindIII
7,5 kbp stark homolog; <i>pelD</i>	21,0 kbp stark homolog; <i>pelD</i>
4,3 kbp stark	3,9 kbp stark
4,1 kbp schwach	7,1 kbp schwächer
18,0 kbp schwach	4,4 kbp schwach
8,4 kbp sehr schwach	4,6 kbp schwach
	1,5 kbp sehr schwach

Beispiel 3.2

Screenen der Bibliothek

Auf 5 Platten werden $2,5 \times 10^4$ Phage der N400-Lambda-Bibliothek plattiert und von jeder Platte 3 Nitrozellulose replikate gemacht, wie das im Beispiel 2.1 beschrieben wurde. Auch der (Vor-) Hybridisationspuffer wird im Beispiel 2.1 beschrieben. Das erste Replikat von jeder Platte wird bei 60°C über 40 Stunden mit dem 1,6-kbp-BamHI/PstI-Fragment von pGW840 hybridisiert und zweimal bei dieser Temperatur über 30 min mit 4× SSC, 0,1% SDS, und zweimal über 30 min mit 2× SSC, 0,1% SDS gewaschen, wie das im Beispiel 3.1 beschrieben wurde. Diese Bedingungen werden als heterologe Bedingungen bezeichnet. Das zweite Replikat von jeder Platte wird bei 68°C mit dem gleichen Fragment hybridisiert und zweimal über 30 min mit 2× SSC, 0,1% SDS, und zweimal über 30 min mit 0,2× SSC, 0,1% SDS, gewaschen. Diese Bedingungen werden als homogene Bedingungen bezeichnet. Das dritte Replikat von jeder Platte wird homolog mit dem 0,35-kbp-BamHI-Fragment von pGW840 hybridisiert, das sich im Promotorbereich von *pelD* direkt im Anschluß an das 1,6-kbp-BamHI/PstI-Fragment befindet. Man erhält 29 Plaques, die heterolog hybridisieren, nicht aber (oder sehr schwach) homolog. Sie werden als λ-PL 101 bis λ-PL 129 bezeichnet. Man erhält 19 Plaques, die stark homolog und heterolog mit der BamHI/PstI-Sonde hybridisieren. Sie werden als λ-PL 130 bis λ-PL 148 bezeichnet und als *pelD*-Klone betrachtet. Davon hybridisieren 2 nur schwach mit der 0,35-kbp-BamHI-Sonde (λ-PL 145 und λ-PL 146) und enthalten daher wahrscheinlich nur einen Teil des Promotorbereiches. Die anderen hybridisieren stark. Man erhält nur einen Klon, der nur mit der 0,35-kbp-BamHI-Sonde hybridisiert (λ-PL 149). Alle Klone werden aufgenommen und zweimal durch Plattieren und heterologes Hybridisieren mit der 1,6-kbp-BamHI/PstI-Sonde gereinigt. Bei einem zweiten Screening-Experiment wurden zusätzlich 23 *pelD*-Klone und 25 andere Klone ermittelt (λ-PL 151 bis λ-PL 198).

Beispiel 3.3

Charakterisierung von Lambda-Klonen durch Plaque-Hybridisierungssignal mit unterschiedlichen, von *pelD* abgeleiteten Sonden

Bei diesem Experiment wird eine Klassifizierung der isolierten Klone unter Verwendung unterschiedlicher Teile des Codierungsbereichs von *pelD* als Sonde beschrieben. Einbezogen werden λ-PL 101 bis -130, während λ-PL 4 als positive Kontrolle verwendet wird. Einbezogen wird auch λ-PL 145. Die Klone werden plattiert, und es wird nur ein Replikat hergestellt, das in 6 Teile unterteilt wird. Auf diese Weise sollen Unterschiede im Hybridisationssignal zwischen Replikaten ausgeschlossen werden. Getrennte Teile der Replikate werden mit den folgenden ³²P-markierten Sonden sowohl homolog als auch heterolog hybridisiert:

- 1: das komplette 1,6-kbp-BamHI/PstI-Fragment von pGW840
- 2: das 649-bp-BamHI/XhoI-Fragment von pGW840 (N-Terminalcodierungsbereich von *pelD*)
- 3: das 244-bp-XhoI/PstI-Fragment von pGW840 (C-Terminalcodierungsbereich von *pelD*).

Wie für *pelD*-Klone erwartet wurde, hybridisieren λ-PL 4, -130 und -145 sowie λ-PL 101 unter homologen und heterologen Bedingungen stark mit diesen Sonden. Der letztgenannte Klon, λ-PL 101, befindet sich am Rand eines Filters in Beispiel 3.2 und wird daher beim ersten Screening nicht als *pelD* aufgeführt. Die eben genannten Klone werden als (*pelD*-) Klone der Klasse I klassifiziert. Alle anderen Klone können in zwei andere Klassen unterteilt werden: Klasse II hybridisiert nicht nur heterogen mit der gesamten Sonde, sondern auch mit der N-Terminalsonde. Die homologe Hybridisation ist mit dem gesamten *pelD*-Gen als Sonde nur schwach. Klone der Klasse III hybridisieren überhaupt nicht mit der N-Terminalsonde und auch nicht homolog mit der gesamten Sonde. Die C-Sonde hybridisiert nicht mit Klonen der Klasse II und III. Aus diesen Experimenten wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß wenigstens zwei verwandte Gene bei den isolierten Klonen sind. Zu den Klonen der Klasse II gehören: λ-PL 104, -105, -109, -113, -114, -115, -119, -122, -124, -125, -128 und -129. Die Klone der Klasse III sind: λ-PL 102, -103, -106, -107, -108, -110, -111, -116, -117, -118, -120, -121 und -123.

Beispiel 3.4

Restriktionsanalyse der isolierten Lambda-Klone (Klasse I, II)

Plattenlysativorratslösungen, 250 ml flüssige Lysate und Phag-DNA-Präparate im großen Maßstab aus diesen Lysaten werden wie im Beispiel 2.2 hergestellt. Das geschieht für 24 Klone, von denen 3 *pelD*-Klone (λ -PL4, -130, -145) sind. Eine Klon-DNA geht während der DNA-Isolierung verloren (λ -PL 124). Die aus diesen Klonen isolierte DNA wird in 1- μ g-Proben in insgesamt 20 μ l mit 10 Einheiten Enzym verdaut. Alle Klone werden mit *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI/BamHI*, *BamHI/HindIII*, *EcoRI/HindIII* und *EcoRI/BamHI/HindIII* verdaut. Die Fragmente werden auf 0,6%igem Agarosegel getrennt und wie im Beispiel 2.3 auf Nitrozellulosefilter übertragen. Übertragungen werden heterolog mit dem 1,6-kbp-*BamHI/PstI*-Fragment von pGW840 hybridisiert, wie das im Beispiel 3.1 beschrieben wurde.

Zwei Klone (λ -PL 112 und λ -PL 129) hybridisieren nicht. Die Bandlängen werden sowohl aus den Fotografien wie auch aus den Autoradiogrammen berechnet. Vom Klon λ -PL 113 abgesehen, enthalten alle Klone zu viele Fragmente, um eine vollständige Karte abzuleiten.

Es ist jedoch möglich, eine Karte des Hybridisierungsbereiches abzuleiten und durch Kombination von Daten zu anderen nichthybridisierenden Bändern zuzuweisen, welche Klone vom selben Gen abgeleitet sind. Es ist klar, daß von den restlichen 18 analysierten Klonen der Klassen II und III 5 Gene vorhanden sind. Sie werden als *pelA*, *pelB*, *pelC*, *pelE* und *pelF* bezeichnet. Die Zuweisung von Klonen zu diesen Genen wird in der Tabelle II zusammengefaßt.

Tabelle II

Zuweisung von isolierten Klonen zu unterschiedlichen *pel*-Genen

(part heißt, daß die Hybridisierungsbänder nur teilweise in diesen Klonen vorhanden sind)

Klasse	Gen	-Klone
I.	<i>pelD</i>	PL 4, PL 130, PL 145 (part)
II.	<i>pelA</i>	PL 113, PL 104, PL 115, PL 125 (part)
	<i>pelB</i>	PL 119, PL 122, PL 128, PL 105 (part)
	<i>pelC</i>	PL 109
III.	<i>pelE</i>	PL 116, PL 107 (part)
	<i>pelF</i>	PL 102, PL 103, PL 110, PL 120, PL 121 (part), PL 123 (part)

Tabelle III

Vergleich der Hybridisationsbänder in Chromosomalübertragungen und isolierten Genen

Die Bandlänge wird in kbp angegeben.

	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>
Chromosomal	2,9 + 3,5 + größere Bänder	7,5 4,3 18,0 8,4 4,1	21,0 homologes Signal <i>pelD</i> 3,9 stärkste heterologe Signale 7,1 schwächere Signale 4,4 schwache Signale 4,6 schwache Signale 1,5 schwache Signale
<i>pelD</i>	2,9 + 3,5	7,5	groß
<i>pelA</i>	7,5	4,3	3,9
<i>pelB</i>	8,7	groß	7,1
<i>pelC</i>	5,0	groß	4,4
<i>pelE</i>	6,2	8,4	4,6
<i>pelF</i>	groß	4,1	1,5 + 2,8 (sehr schwach)

Ein Vergleich der Länge des Hybridisierungsfragmentes der isolierten Gene und der Länge der Hybridisationsfragmente von genomischen DNA-Übertragungen wird in der Tabelle III gegeben. Aus diesen Daten wird geschlußfolgert, daß alle Bänder, die in den genomischen Übertragungen hybridisieren, in den isolierten Klonen vorhanden sind und daß unter diesen Hybridisationsbedingungen keine anderen verwandten Gene isoliert werden können. Die Plaque-Hybridisationsergebnisse (Beispiel 3.3) zeigen, daß jedes Gen, wenn man partielle Klone nicht berücksichtigt, ein spezifisches Hybridisationsmuster mit den getesteten Sonden hat. Das wird in der Tabelle IV zusammengefaßt.

Tabelle IV
Vergleich der Signalstärke von unterschiedlichen Genen bei der homologen und heterologen Plaque-Hybridisation mit unterschiedlichen pelD-Sonden nach dem Experiment in Beispiel 3.3

Der Grad der Hybridisation wird durch die Anzahl der +-Zeichen ausgedrückt. Das homologe pelD-Gen hybridisiert mit wenigstens 10 +-Zeichen; ± sehr schlechte Hybridisation, – keine Hybridisation

Sonde	Heterologe Hybridisation			Homologe Hybridisation		
	Ganzes Gen	N-Term.	C-Term.	Ganzes Gen	N-Term.	C-Term.
pelA	++++	++++	±	+++	±	–
pelB	++++	++++	±	+	±	–
pelC	+++	++++	–	–	–	–
pelE	+++	–	–	–	–	–
pelF	++++	±	±	±n	–	–

Beispiel 3.5

Subklonieren von pelD-verwandten Genen in pBR322

Subklone der Hybridisationsfragmente, die aus den im Beispiel 3.3 gewonnenen λ-Klonen gewonnen werden, werden im Vektor pBR322 hergestellt, der durch EcoRI, BamHI oder HindIII verdaut und anschließend dephosphoryliert wird. Fragmentisolierung aus LMP-Agarosegels, Vektorherstellung, Ligation, Transformation von *E. coli* MH1, Miniprep-DNA-Isolierung und großangelegte Plasmidisolierung werden nach den Standardverfahren durchgeführt, die im Beispiel 2.4 beschrieben worden sind.

Die Fragmente werden in den geeigneten Vektor ligiert, wie das im Beispiel 2.4 beschrieben wurde. Transformierte *E. coli* MH1-Zellen werden auf LC + 50 µg/ml amp plattiert. Die Transformanten werden auf Tetrazyklinsensitivität getestet. Die EcoRI-Klone sind alle resistent. Dann werden Miniprep-DNA mit geeigneten Enzymen verdaut, um auf die richtigen Inserts zu prüfen und die Orientierung der Fragmente zu bestimmen. Die ausgewählten Plasmide werden in der Tabelle V zusammengefaßt. Zellen, welche diese aufgenommen haben, werden bei –70°C auf Glycerol gelagert.

Tabelle V

Subklone von pel-Genen in pBR322

Plasmid	Gen	Fragment	Ursprung	Orientierung
pGW 820	pelA	7,5 EcoRI	λ-PL 113	2
pGW 821		4,3 BamHI		2
pGW 822		3,9 HindIII		2
pGW 823		7,5 EcoRI		1
pGW 824		4,3 BamHI		1
pGW 825	3,9 HindIII	1		
pGW 830	pelB	7,1 HindIII	λ-PL 122	1
pGW 850	pelC	5,0 EcoRI	λ-PL 109	1
pGW 851		5,0 EcoRI		2
pGW 860	pelF	4,1 BamHI	λ-PL 102	1
pGW 880	pelE	4,6 HindIII	λ-PL 109	1
pGW 881		4,6 HindIII		2

Die Plasmide pGW 820, -830, -860 und -880 wurden im großen Maßstab isoliert und einer Restriktionskartierung unterzogen. Karten dieser Plasmide werden in den Abbildungen 1 bis 6 gegeben.

Um die Genlage und -orientierung zu bestimmen, werden Southern-Transfers von Plasmidverdauungen heterolog mit dem 1,6-kbp-BamHI/PstI-Fragment von pGW 840 hybridisiert, und identische Transfers werden heterolog mit einem N-Terminalfragment desselben Plasmids hybridisiert, welches das 649-bp-BamHI/XhoI-Fragment für die Kartierung von pGW 820 und -830 und das 766-bp-BamHI/EcoRI-Fragment für pGW 850 und -860 ist.

Die Plasmide pGW 820, pGW 830, pGW 850, pGW 860 und pGW 880 wurden in *E. coli* HB 101 kloniert und am 1. Februar 1988 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen, Grisebachstr. 8, 3400 Göttingen, hinterlegt. Sie erhielten die DSM-Nr. 4388, 4389, 4390, 4391 bzw. 4392.

Beispiel 4

Sequenzbestimmung der Gene pelD, pelA, pelB und pelC

Beispiel 4.1

Partielle Sequenz des pelD-Gens des *A. niger*-Stammes N400 und deren Identität mit pel I von *A. niger*-Stamm N756
 Nach der LMP-Agarosegel-Elektrophorese, wie sie im Beispiel 2.4 beschrieben, wurde, werden geeignete Restriktionsfragmente von pGW 840 isoliert. Diese werden nach dem BRL-M 13-Cloning/Dideoxysequenzierungshandbuch (S. 26, 27; Lit 6) in die Vektoren M 13 mp 18 RF und M 13 mp 19 RF kloniert. Die Transformation von *E. coli* JM 103, die Plattierung auf Minimal-X-gal-

Die Suche nach Konsensus-Sequenzen für Pilz-Exon/Intron-Spleißungsverbindungen in Intron-Innensequenzen (Ballance, Lit. 11) führt dazu, das Vorhandensein von vier Introns in den Genen *pelA*, *B* und *C* zu postulieren. Die Positionen, an denen sich die Introns innerhalb der Codierungsbereiche dieser *pel*-Gene befinden, bleiben in dem Sinne erhalten, daß potentiell fünf Intron-Positionen vorhanden sind, in jedem Gen aber ein anderes Intron fehlt. Für das *pelC*-Gen werden jedoch nur drei Introns postuliert. Von diesen befindet sich nur eines in einer Position, die einer Position eines Introns in *pelD* und *pelA* (Intron 5) entspricht. Die Positionen dieser Introns und ihre entsprechende Länge werden in der Tabelle VI a zusammenfassend gegeben.

Tabelle VI a

Positionen von Introns in den Sequenzen von *pelD*, *pelA*, *pelB* und *pelC*

Die Positionen beziehen sich auf die Codierungssequenzen in den Abbildungen 10, 11 und 12 und auf die Sequenz von *pelD*

Gen	<i>pelD</i>	<i>pelA</i>	<i>pelB</i>	<i>pelC</i>
Intron	Positionslänge, bp	Positionslänge, bp	Positionslänge, bp	Positionslänge, bp
1	202-267 66	fehlen	1337-1398 62	fehlen
2	410-471 62	1708-1759 52	1543-1598 56	fehlen
3	598-660 63	1886-1933 48	1725-1781 57	fehlen
4	fehlen	fehlen	fehlen	1853-1930 78
5	1446-1502 57	2031-2094 64	fehlen	1998-2062 65
6	fehlen	fehlen	fehlen	2232-2294 63
7	fehlen	2329-2382 54	2113-2169 57	fehlen

Die Länge der Exons zwischen den Introns ist in diesen Fällen bei den vier *pel*-Genen dieselbe. In der Abb. 13 werden die ausgerichteten, abgeleiteten Aminosäurefolgen von *PLA*, *PLB*, *PLC* und *PLD* gezeigt. Im N-Terminaleil der Codierungsbereiche von *pelA*, *pelB* und *pelD* wird auf der Grundlage der Nukleotidfolgenhomologie eine Homologie von etwa 80% beobachtet und von mehr als 80% auf der Grundlage der Aminosäurefolgenhomologie. Dieser Prozentsatz ist bei *pelC* weit geringer. Im C-Terminaleil von *pelA*, *pelB* und *pelD* geht jenseits von des Restes 285 des reifen Proteins (was dem Rest 305 in der Abb. 13 entspricht) die Homologie zum großen Teil verloren und kehrt erst in der Nähe des C-Terminus zurück. Abgesehen von den Konsensus-Sequenzen des Spleißungssignals und von den 5'- und 3'-Spleißungsstellen (Tabelle VI b) wird bei den Introns keine Homologie festgestellt.

Tabelle VI b

Vergleich von Intron-Konsensus-Sequenz

Intron	Donor Exon 1	Intron	Lasso	Akzeptor Intron	Exon 2
<i>pelD</i> 1	AAGAC	GTGAGTTT..32	GGCTGACC..12..TGCCAG	TTCG	
<i>pelB</i> 1	AGAAC	GTAGGTCG..32..GCCTAACA...8..ATCCAG		CTTCG	
<i>pelD</i> 2	ACCTA	GTAAGTTG..37..TGCTGACA...3..GGATAG		CAACA	
<i>pelA</i> 2	GAATA	GTATGTCC..29..ATCTAACT...1..GGATAG		CTACA	
<i>pelB</i> 2	ACTTA	GTATGTTG..31..TGCTGATA...3..GTATAG		TGATA	
<i>pelD</i> 3	ATCCA	GTATGCAT..32..AACTAACC...9..CCACAG		GAACA	
<i>pelA</i> 3	ATCCA	GTAGGTTA..25..CTCTAACG...1..AATCAG		GAACA	
<i>pelB</i> 3	ATCCA	GTGAGTGC..33..TGCTAATA...2..GGCCAG		GAACA	
<i>pelD</i> 5	TTACT	GTAAGTCG..31..CACTAATG...4..CTTCAG		ACTGC	
<i>pelA</i> 5	TTACT	GTACGTCT..40..AGTTAACA...2..TGACAG		ACCGC	
<i>pelC</i> 5	GCGAG	GTAAGACA..39..CGTTGACT...4..GATTAG		ACCTC	
<i>pelC</i> 6	CCAGA	GTACGTGT..30..AACTAACA..11..TCACAG		ACAAC	
<i>pelA</i> 7	ACTGT	GTAAGTTG..24..ACCTGACT...8..TTGCAG		GTCAA	
<i>pelB</i> 7	ACGCC	GTATGTCG..28..TACTGACA...7..CTACAG		GTGAA	
CONSENSUS	-----	GTA-GT---.24.---CTAAC-...1.---CAG		-----	
		g c 40 t G t 12 T			
		a			

Die abgeleiteten Aminosäurefolgen für die Proteine PLA, PLB, PLC und PLD geben eine Gesamtzahl von 359 Resten für die ersten beiden Proteine, 360 für POC und 354 für PLD an. Im Zusammenhang mit der N-Glykosylation ist in allen vier Proteinen eine potentielle Glykosylationsstelle an Position 109 (im reifen Protein) vorhanden (bei PLC entspricht das der Position 105 in der nichtausgerichteten Folge). Bei PLB ist in der Position 232 eine zweite potentielle Stelle vorhanden, während bei PLD zwei andere potentielle Glykosylationsstellen an den Resten 255 und 329 vorhanden sind.

Beispiel 5

Kotransformation von *A. niger* unter Verwendung des *A. niger* pyrA-Gens als Selektionsmarker und von verschiedenen *A. niger* pel-Genen als kotransformierenden Plasmiden

Beispiel 5.1

Fortpflanzung und Reinigung von Plasmiden, die für die Transformation von *A. niger* verwendet werden

Alle Plasmide werden im *E. coli*-Stamm MH 1 vermehrt, und die Plasmid-DNA wird aus 500-ml-Kulturen, die über Nacht gebildet wurden, nach der Methode von Maniatis u. a. (S. 90–91, Lit. 5) gewonnen. Zu 2,5 ml DNA-Lösung in TE, der bis zu 1 mg DNA enthielt, wurden 2,2 g CsCl und 1 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml in Wasser) gegeben. Die Lösung wird in Schnellschlußröhrchen gegeben, die so gefüllt und verschlossen werden, wie das der Hersteller (Beckman) empfiehlt. Das Zentrifugieren erfolgt in einem Rotor VTi 65.2 bei 20°C über die Dauer von 16 Stunden mit 45 000 U/min. Von den beiden fluoreszenten Bändern, die unter Ultraviolettlicht sichtbar sind, wird das untere, in dem sich die Plasmid-DNA befindet, durch seitliches Punktieren des Röhrchens isoliert. Die DNA-Lösung (etwa 1 ml) wird fünfmal mit wassergesättigtem Butanol extrahiert, um das Ethidiumbromid zu entfernen. Dann wird die DNA durch Ethanol ausgefällt, wieder in TE zur Suspension gebracht, einmal mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert, erneut ausgefällt und bei –20°C gelagert.

Das Plasmid pGW613, welches das OMP-Dekarboxylase-Gen (*pyrA*) auf einem 5 kbp-DNA-Fragment von *A. niger* trägt, wird dazu genutzt, Transformanten auszuwählen (Goosen u. a.; Lit. 12).

Die Plasmide pGW820, pGW830, pGW840, pGW850, pGW860 und pGW880, die im Beispiel 3.5 beschrieben wurden, werden als kotransformierende Plasmide verwendet.

Beispiel 5.2

Herstellung von Protoplasten und Transformation des uridinauxotrophen Mutanten *A. niger*-Stammes N593

Der *A. niger*-Stamm N593 (*cspA*, *pyrA*), der ein Derivat des Parentalstammes N400 ist, wurde durch positive Selektion anhand des toxischen, 5-fluoroorotinsäuregleichen Analogs in Hefe (Boeke u. a.; Lit. 13) bei Vorhandensein von Uridin gewonnen, wie das von Goosen u. a. (Lit. 12) beschrieben wurde.

Flüssiges Minimalmedium, ergänzt mit 0,5% Hefeextrakt, 0,2 Kacasaminosäuren, 10 mM Uridin (Janssen Chimica) und 50 mM Glukose, wird mit 10^6 Konidiosporen von *A. niger* N593 inokuliert und 20 Stunden bei 30°C in einem Orbitalschüttelapparat von New Brunswick inkubiert. Myzel wird durch Filtern durch Miraclath geerntet, mit isoosmotischem Minimalmedium (STS STC) mit folgender Zusammensetzung gewaschen: 1,33 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 50 mM CaCl₂, abgestimmt auf 1,7 mOsm. Eine Menge von 1 g Myzel wird in 20 ml STC wieder zur Suspension gebracht. Innerhalb von 2 Stunden werden aus dem Myzel durch den Zusatz von 250 mg filtersterilisiertem Novozym 234 (Novo Industries, Dänemark) und Inkubation des Gemischs bei 30°C in einem Schüttelapparat mit 95 U/min Protoplasten freigesetzt. Die Protoplasten werden vom restlichen Myzel durch Filtern unter Verwendung eines Trichters mit einem Stöpsel aus Glaswolle getrennt und durch Zentrifugieren (10 min 2500 U/min) gereinigt, pelletiert und erneut in STC zur Suspension gebracht.

Zur Transformation werden 5×10^6 Protoplasten in 200 µl gegeben, die dann zusammen mit 1 µg pGW631 und 10 µg eines der Plasmide pGW820, pGW830, pGW850, pGW860 oder pGW880 (Volumen weniger als 20 µl) inkubiert werden. Für pGW840 wird ein Verhältnis von 1:3 unter Verwendung von 6 µg pGW613 angewendet. Nach dem Zusatz von Plasmid-DNA zu den Protoplasten werden 50 µl PCT (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 50 mM CaCl₂ 25% PEG 6000) zugesetzt, und das Inkubationsgemisch wird 20 min auf Eis gehalten.

Dann werden weitere 2 ml PCT zugesetzt, und das Gemisch wird weitere 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Abschließend werden 4 ml STC zugesetzt und gemischt. Aliquote von 1 ml dieser abschließenden Transformationslösung werden mit 4 ml verflüssigtem isoosmotischem MM-Top-Agar gemischt, das durch 0,95 M Sukrose stabilisiert worden war (abgestimmt auf 1,7 mOsm). Das Protoplastgemisch wird sofort auf Agar-Platten plattiert, die das gleiche isoosmotische Minimalmedium enthalten, und diese werden bei 30°C inkubiert. Entsprechende Kontrollexperimente beinhalten Protoplaste, die ebenso, aber ohne Plasmid-DNA, und auf nichtstabilisiertem Minimalmedium mit 2,5 mM Uridin behandelt wurden.

Nach 3 Tagen Wachstum bei 30°C erscheinen gut wachsende Transformanten, die Sporen bilden (50–150 Transformanten je µg pGW613). Außerdem erscheint eine große Zahl von vermutlich abortiven Transformanten. Die Sporen von einzelnen Transformanten werden dann genommen und getrennt auf 50-mM-Glukose-Minimalmedium plattiert, um einzelne Kolonien zu erhalten, die zur Vermeidung der Sporen für die weitere Analyse der Transformanten verwendet werden.

In jedem Fall werden wenigstens zehn Transformanten auf flüssigem Minimalmedium gezogen, die DNA wird extrahiert und auf das Vorhandensein von kotransformierendem Plasmid-DNA analysiert. Pilz-DNA wird nach einem Verfahren isoliert, das gegenüber dem Verfahren zur Isolierung von Pflanzen-RNA leicht modifiziert ist (Slater; Lit. 14). Das Myzel wird mit Salzlösung gewaschen, in flüssigem Stickstoff gefroren, und 0,5 g werden unter Verwendung eines Mikrodismembrators (Braun) aufgebrochen. Das Myzelpulver wird mit frisch hergestelltem Extraktionspuffer extrahiert. Der Extraktionspuffer wird folgendermaßen hergestellt: 1 ml Triisopropyl-naphthalensulfonsäure (TNS), 20 mg/ml, wird mit 1 ml p-Aminosalzylsäure (PAS), 120 mg/ml, und 0,5 ml 5× RNB-Puffer (5× RNB-Puffer enthält 121,1 g Tris, 73,04 g NaCl und 95,1 EGTA in 1 l, pH-Wert 8,5) gemischt. Nach dem Zusatz von 1,5 ml Phenol wird der Extraktionspuffer für die Dauer von 10 min bei 55°C äquilibriert. Der warme Puffer wird dann dem Myzelpulver zugesetzt, und die Suspension wird eine Minute lang mit einem Vortex-Mischer gründlich gemischt. Dann wird ein Milliliter Chloroform zugesetzt, und es wird 1 min lang gemischt.

Durch Zentrifugieren (10 min, 10 000 × g) wird die wäßrige Phase abgetrennt und ein weiteres Mal mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und anschließend zweimal mit Chloroform extrahiert.

Die wäßrige Phase enthält sowohl RNA als auch DNA. Die DNA wird bei Zimmertemperatur mit 2 Volumen Ethanol ausgefällt und durch Zentrifugieren (10 min, 10000 × g) aufgefangen, zweimal durch Auflösen in destilliertem, sterilen Wasser und erneutes Ausfällen mit Ethanol gewaschen. Die RNA wird durch den Zusatz von RNase A (20 µg/ml) zur Endlösung entfernt. Das Verfahren ergibt hochmolekulargewichtige DNA (100 bis 200 kbp) in einer Ausbeute von etwa 300 µg DNA/g Myzel, die weiter gereinigt wird durch CsCl/Ethidiumbromid-Dichtegradientenzentrifugation, wie das im wesentlichen von Maniatis u. a., S. 93; Lit. 5, beschrieben wurde.

Verdauungen von Chromosomal-DNA (2 µg) werden durch Inkubation bei 37°C mit EcoRI für *peIA*-(pGW820) und *peIC*-(pGW 850) Transformanten, HindIII für *peIB*-(pGW 830) Transformanten und EcoRI oder BglII für *peID*-Transformanten über die Dauer von 2 Stunden hergestellt. In allen Fällen werden anfangs 20 Einheiten Restriktionsenzym verwendet, anschließend wird die Inkubation durch den Zusatz von erneut 20 Einheiten Restriktionsenzymen um weitere 2 Stunden verlängert. Die Verdauungen werden in den geeigneten Reaktionspuffern ausgeführt, die von BRL geliefert werden.

Dann wird die DNA auf 0,6% Agarose fraktioniert, auf Nitrozellulose übertragen und im wesentlichen so hybridisiert, wie das von Maniatis u. a. (Lit. 5), S. 382–386 beschrieben wurde, wozu die entsprechend [α - 32 P]-markierten Sonden eingesetzt werden. Es werden folgende Kotransformationshäufigkeiten gefunden: pGW820 (*peIA*) 70%; pGW830 (*peIB*) 70%; pGW840 (*peID*) 15%; pGW850 (*peIC*) 60%.

Das Massenverhältnis von pGW 613 zum kotransformierenden Plasmid pGW820, pGW830, pGW950 (1:10) und pGW840 (1:3) führt in der Mehrzahl der beobachteten Fälle zur Mehrfachkopie der chromosomalen Integration von kotransformierenden Plasmiden.

Beispiel 5.3

Genomische Analyse des *peIA*-transformierten *A. niger*-Stammes A 15

Eine Reihe der Mehrfachkopietransformanten, die in Beispiel 5.2 beschrieben worden sind, wurde analysiert, und die Analyse des *peIA*-Transformanten A 15 wird als ausführliches Beispiel gegeben.

DNA des *A. niger*-Stammes N593 und des mehrfachkopietransformierten *peIA*-Stammes A 15 werden isoliert und durch Hybridisierung von Southern Transfers analysiert, wie das im Beispiel 3.1 beschrieben wurde. Als *peIA*-Sonde wird das 7,5 kbp-EcoRI-Fragment verwendet (siehe Abb. 3a). In der genomischen Übertragung findet man ein intensives Band von 7,4 kbp im transformierten Stamm A 15, das aus Integrationsereignissen vom Typ I und/oder Typ II resultiert (siehe Hinnen u. a.; Lit. 14 a). Es werden auch einige kleinere Bänder von unterschiedlicher Länge gefunden, die Genfragmente von Integrationsereignissen Typ II von Umstellungen darstellen.

Die optischen Dichten der 7,4 kbp-EcoRI-Bänder in den *A. niger-peIA*-Transformanten A 15 und den *A. niger* N 593-Autoradiogrammen werden unter Verwendung eines Geräts Ultrosan XL (LKB) abgetastet. Die Werte werden für geringe Unterschiede in der DNA-Konzentration zwischen N 593 und dem Transformanten A 15 durch Abtasten der ermittelten Dichten mit einer zweiten Sonde korrigiert, welche mit dem Pyruvatkinasegen hybridisiert, das als Einzelkopie in beiden Stämmen vorhanden ist. Aus diesen Daten wird berechnet, daß im *peIA*-Transformanten von A 15 etwa 19 intakte Kopien des *peIA*-Gens vorhanden sind.

Unter Verwendung des HindIII-Inserts von pGW830 (Abb. 3b) als Sonde, zeigt die Analyse des Southern-Transfer des transformierten Stammes A 15, daß die Integration der *peIA*-Sequenzen nicht an der *peIB*-Stelle erfolgt ist. Ebenso ergibt die Analyse des transformierten *peIB*-Stammes B 13, des *peIC*-Stammes C 15 und des *peID*-Stammes D 12 mit entsprechenden, geeigneten Sonden Kopiezahlen von etwa 15, 50 und 10.

Beispiel 5.4

Northern-Transfer-Analyse von induzierten und nichtinduzierten Myzelien des *peIA*-transformierten *A. niger*-Stammes A 15 und von *A. niger* N400

Minimalmedium (250 ml), das 50 mM Glukose oder 1% Apfelpektin (Brown Ribbon, d. e. 72,8%, Obipektin AG, Bischofszell) enthält, wird mit einer Sporendichte von 10⁶ Sporen/ml mit Sporen des Transformanten A 15 oder Sporen des Wildtypstammes N 400 inokuliert, und nach 30 Stunden Wachstum bei 30°C wird geerntet. Es werden auch Proben des Kulturmediums (2 ml) aufgenommen, anhand von 2 l 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH-Wert 7,0, bei 4°C dialysiert und bei -20°C aufbewahrt. Aus dem Myzel werden Nukleinsäuren isoliert, wie das im Beispiel 5.2 beschrieben wurde. Die RNA wird aus der wäßrigen Phase nach Chloroformextraktion durch den Zusatz von 1/3 Volumen von 8 M LiCl ausgefällt. Die RNA wird durch Zentrifugieren (300 U/min, 30 min) unter Verwendung einer Zentrifuge MSE Spuer-MInor aufgefangen und dann einmal mit kaltem (-20°C) 2 M LiCl und einmal mit kaltem (-20°C), 96%igen Ethanol gewaschen. Abschließend wird die RNA in destilliertem Wasser mit einer Konzentration von etwa 1 mg/ml aufgelöst. Die Präparate sind im wesentlichen frei von DNA und ergeben eine Ausbeute von 1–2 mg RNA je Gramm Myzel. Mengen von etwa 10 µg RNA werden behandelt nach Maniatis u. a., S. 202–203 (Lit. 5) auf denaturiertem Formaldehyd-1%-Agarosegel unter Verwendung von HindIII-verdauter Lambda-DNA oder der RNA-Leiter von BRL als Molekulargewicht-Marker. Die Gels werden übertragen und auf Nytran (Schleicher und Schuell) gebacken, wie das vom Hersteller empfohlen wird, und 16 Stunden lang bei 68°C mit der 7,4 kbp-EcoRI-*peIA*-DNA-Sonde hybridisiert. Die Hybridisations- und Waschverfahren sind die gleichen wie bei der DNA-Hybridisation unter homologen Bedingungen nach Beispiel 3.2. Beide *A. niger*-Stämme erzeugen eine pektininduzierbare mRNA mit einer Länge von etwa 1,6 kbp. Das Abtasten der optischen Dichte der beiden Autoradiogramme weist eine 15- bis 20fache Differenz in der Intensität zwischen dem A 15-Transformanten und dem Wildtypstamm auf, was in Korrelation mit der Zunahme der Kopienzahl steht, die aus der Analyse des Southern-Transfer berechnet wurde.

Beispiel 5.5

Pektinylaseproduktion durch den transformierten *A. niger*-Stamm D 12

Der *A. niger-peID*-Transformant D 12, der nach Beispiel 5.2 gewonnen wurde, wird in einem zweistufigen Kultivationsverfahren ähnlich dem Verfahren gezogen, das von Hermersdörfer u. a. (27) für die Produktion von Polygalakturonase beschrieben wurde. Oben auf einer flüssigen Kultur wird eine Myzelschicht gebildet durch Modulation von 10⁶ Sporen je Milliliter des

Vorkultivationsmediums (PCM), das aus Zuckerrübenbrei (4%) und NH_4NO_3 (1%), pH-Wert 4,5, besteht. Nach einer Wachstumsperiode von 5 Tagen bei 30°C wird das in 30 ml Medium gezogene Myzel mit Salzlösung gewaschen und auf 50 ml Hauptkultivationsmedium (MCM) übertragen. Diese Kultur wird bei 30°C in einem Orbitalschüttelapparat bei 100 U/min gezogen. Das Hauptkulturmedium ist je Liter Medium zusammengesetzt aus Glukose (5%), Pektin (d. e. 72,8%; 0,1%), NH_4NO_3 (0,75%), KH_2PO_4 (0,5%), $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,03%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,03%), CaCO_3 (0,03%), NaNO_3 (0,03%), pH-Wert 4,5. Innerhalb von 24 Stunden werden zu unterschiedlichen Zeitintervallen Proben genommen und durch SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese analysiert. Die Expression von *pelD* ist bereits von 7 Stunden nach Kultivierungsbeginn maximal. Das Protein wandert identisch wie *PLI*, das als Referenz verwendet wurde.

Beispiel 5.6

Produktion von Pektinlyase A durch den transformierten *A. niger*-Stamm A15 und durch *A. niger* N400

Die dialysierten Kulturfiltrate (Beispiel 5.4) werden lyophilisiert, in 0,2 ml destilliertem Wasser resuspendiert und einer SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (10% Gel) nach Standardmethoden (Laemmli; Lit. 15) unterzogen. Die abgetrennten Proteine werden auf Nitrozellulose übertragen (Towbin u. a.; Lit. 16). Die Übertragungen werden fünf Stunden lang bei Raumtemperatur mit 1% BSA-Lösung in 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH-Wert 7,5, mit 0,35 M NaCl gesättigt. Daran schließt sich eine sechszehnstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit polyklonalem Antikörper (0,1%) an, gezogen anhand von zwei Pektinlyasen, die nach van Houdehoven (1975) in 50 ml des gleichen Puffers gereinigt wurden, der 150 mM NaCl, 0,5% BSA, 1% Triton X100, 0,5% Deoxycholat und 0,1% SDS enthält. Die Übertragungen werden dann fünfmal mit 200 ml PBS gespült, bevor die Inkubation mit 30 µl Ziegen-Antikaninchen-IgG-HRP (Sigma) als 2. Antikörper je 50 ml erfolgt, und anschließend erneut 5mal mit PBS gewaschen. Abschließend werden die Übertragungen unter Verwendung von 4-Chloro-1-naphthol als Substrat gefärbt. Es werden 40 mg des Substrats in 0,5 ml 96%igem Ethanol aufgelöst und mit 100 ml 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, und 30 µl 30%igem Wasserstoffperoxid gemischt und dann den Übertragungen zugesetzt.

Beispiel 5.7

Screenen der *pelA*-transformierten Stämme durch Halobildung auf pektinhaltigen, festen Medien

Conidia von *pelA*-transformierten Stämmen werden mit einer Sporendichte von etwa 40 Kolonien je Petrischale auf steriles Filterpapier (Schleicher und Schuell) inokuliert, das oben auf 1%-agarverfestigtes Minimalmedium aufgebracht wird, welches 0,01% Triton-X100 und Apfelpektin (1%, D. e. 72,8%, Obipektin) als Kohlenstoffquelle enthält. Die Inkubationszeit beträgt 72 Stunden bei 30°C und ergibt einzelne Kolonien (2–4 mm). Das Filterpapier wird auf eine andere sterile Petrischale übertragen, und das Medium in dieser Schale wird mit wenigstens 5 ml einer Ruthenium-Rot-Lösung (0,1%) in destilliertem Wasser gefärbt, 2 Stunden inkubiert und dann mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen, um den nichtadsorbierten Farbstoff zu entfernen, gefolgt von im wesentlichen dem Verfahren, das von Ried und Collmer (Lit. 17) für Polygalakturonat beschrieben wurde, um die bakterielle Pektatylaseenzymaktivität zu charakterisieren.

Transformanten mit einer Überproduktion an *PL A*-Protein werden anhand einer Zunahme des Halodurchmessers um die einzelnen Kolonien im Vergleich zum Parentalstamm N400 festgestellt.

Beispiel 6

Isolierung, Reinigung und Charakterisierung von Pektinlyase A (PLA) vom *A. niger-pelA*-Transformanten A15

Beispiel 6.1

Kulturbedingungen zur Herstellung von Pektinlyase A

Ein *A. niger-pelA*-Transformant A15, wie er im Beispiel 5 beschrieben wurde, wird auf Kompletmedium in Petrischalen für die Dauer von 3 Tagen bei 28°C gezogen, um *Conidia* zu produzieren. Die *Conidia* werden von diesen Platten durch Suspendieren der Sporen in 5 ml steriler Salzlösung, die 0,005% Tween 80 enthält, geerntet. Die Suspension wird auf einem Griffin-Schüttelapparat 20 min stark gerührt. Minimalmedium (Lit. 21), das 1% Apfelpektin (Brown Ribbon, d. e. 72,8%; Obipektin AG, Bischofzell) enthält, wird mit einer Sporendichte von 10^6 Sporen/ml unter Verwendung von 250 ml Medium in 1 l-Erlenmeyerkolben, die silikonisiert sind, inokuliert. Das Myzel wird 40 Stunden lang bei 30°C auf einem Gallenkamp-Orbitalschüttelapparat bei 200 U/min gezogen. Nach dem Kultivieren wird das Myzel durch Filtern über Miracloth unter Verwendung eines Bücher-Trichters entfernt. Das Kulturfiltrat (Lit. 21) wird mit destilliertem Wasser verdünnt (Lit. 21), der pH-Wert des Filtrats (pH-Wert 3,7) wird unter Verwendung von 1 N NaOH auf 6,0 gebracht, anschließend wird erneut mit Filterpapier Whatman 1 gefiltert.

Beispiel 6.2

Reinigen der PLA

Das verdünnte Kulturfiltrat (4 l) wird in eine Schnellflußkolonne DEAE-Sephrose (Pharmacia) (10 cm × 2,6 cm) gebracht, die mit 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH-Wert 6,0, voräquilibriert wurde. Die Kolonne wird mit dem gleichen Puffer eluiert, bis die Absorbanz bei 280 nm einen Wert von 0,1 OD erreicht. Die Pektinlyaseaktivität wird dann aus der Kolonne unter Anwendung eines linearen Gradienten eluiert, der sich aus 20 mM Natriumphosphatpuffer (150 ml) und 20 mM Natriumphosphatpuffer mit 1 M NaCl (150 ml) zusammensetzt.

Die Fraktionen werden auf das Vorhandensein von aktiver Pektinlyase nach dem Verfahren überprüft, das von van Houdenhoven (Lit. 18, S. 11) beschrieben wurde, wozu Pektin von Brown Ribbon (d. e. 72,8%) als Substrat verwendet wurde. Die Aktivität erscheint um eine Konzentration von 0,43 M NaCl im Salzgradienten. Die aktiven Fraktionen werden dann zusammengefaßt und zweimal anhand von 1 l 20 mM Piperazin-HCl-Puffer, pH-Wert 5,5, dialysiert (Probengröße 45,5 ml).

Im nächsten Schritt wird die dialysierte Probe in 3 Portionen von gleicher Größe unterteilt, die einer anionischen Austauschchromatografie in drei getrennten Durchgängen unter Verwendung einer Standardkolonne MONO Q von Pharmacia in Verbindung mit dem FPLC-System von Pharmacia unterzogen werden. Die Kolonne wird mit 20 mM Piperazin-HCl-Puffer, pH-Wert 5,5, voräquilibriert. Nach der Einführung der Enzymprobe wird die Kolonne mit dem gleichen Puffer bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert, bis erneut die Grundlinienabsorbanz erreicht ist. Dann wird ein linearer Salzgradient angelegt. Im Rahmen von 22 ml des der Kolonnen zugeführten Eluierungspuffers wird eine Endkonzentration von 0,6 M NaCl erreicht.

Die aktiven Fraktionen (4,4 ml) werden aufgefangen, unter Verwendung des Äquilibriumspuffers auf 25 ml verdünnt, und es wird dasselbe Chromatographieverfahren wiederholt. Zwei Fraktionen, die das aktive Enzym enthalten (Gesamtvolumen 3 ml) werden dann anhand von 25 mM Piperazin-Puffer, pH-Wert 5,0, dialysiert und in 1-ml-Portionen auf eine Kolonne MONO P (Pharmacia) gespritzt, die mit dem gleichen Puffer voräquiliert wurde. Nach den Injektionen wird unter Verwendung einer 5%igen Lösung von Polypuffer TM 74 (in destilliertem Wasser, das unter Verwendung von 4N HCl auf einen pH-Wert von 3,0 gebracht wurde) ein pH-Wert-Gradient geschaffen. Das aktive Enzym (3,2 ml) tritt um einen pH-Wert von 3,2 auf. Das Präparat wird extensiv anhand von 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH-Wert 6,0, dialysiert und bei -20°C aufgehoben. Die Reinigungsergebnisse werden in der Tabelle VII a zusammengefaßt und mit den Daten einer ähnlichen Reinigung von Pektinlyase, die durch den *A. niger*-Stamm N400 produziert wurde, verglichen (Tabelle VII b).

Tabelle VII a und VII b

Reinigungsschema für Pektinlyase A aus dem *A. niger*-*peIA*-Transformanten N593 und für Pektinlyase aus dem *A. niger*-Stamm N400

VII a Schritt	Volumen ml	Gesamtakti- vität (I. U.)	Spezifische Pek- tinlyaseaktivität (I. U./mg Protein)
DEAE-Sepharose	45,5	39,8	4,9
MONO Q-Chromatografie (2×)	2,3	19,9	18,4
MONO P-Chromatogr.	3,2	17,4	28,6

VII b Wildtyp Schritt	Volumen ml	Gesamtakti- vität (I. U.)	Spezifische Pek- tinlyaseaktivität (I. U./mg Protein)
DEAE-Sepharose	43,0	10,1	0,9
MONO Q-Chromatografie (2×)	1,1	2,5	6,3
MONO P-Chromatogr.	1,4	1,7	10,0

Proteinkonzentrationen wurden unter Verwendung des BCA-Proteinprobereagens (Pierce) nach den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

Die Gesamtaktivität von *A. niger* N593, transformiert mit pGW820 hat im Vergleich zur Gesamtaktivität des Wildtyps nach der Reinigung etwa um das Zehnfache zugenommen, die spezifische Aktivität etwa das Dreifache.

Beispiel 6.3

Bestimmung der Aminosäurefolgen des N-Terminals von Pektinlyase A

Es werden 500 µg Pektinlyase (PLA), die nach Beispiel 6.2 gereinigt wurden, dreimal anhand von 1 l destilliertem Wasser, das durch Millipore gefiltert wurde, dialysiert und lyophilisiert. Die Aminosäurefolgen werden mit einem Proteinsequenziergerät von Applied Biosystems, Modell 470 A, das direkt mit einem 120A-PTH-Analysegerät verbunden ist, nach der von Hunkapiller (Lit. 17) beschriebenen Methode bestimmt.

Für das Enzym wird folgende N-Terminalaminosäurefolge bestimmt:

VAL-GLY-VAL-SER-GLY-SER-ALA-GLU-GLY-PHE-ALA-GLU-?-VAL-THR-GLY-GLY-GLY-ASP-ALA.

Die so bestimmte Aminosäurefolge entspricht genau der auf der Grundlage der Nukleotidfolge des *peIA*-Gens (siehe Beispiel 4.2).

Beispiel 6.4

Eigenschaften der Pektinlyase A

Der *A. niger*-Stamm N400 und der *peIA*-Transformant A 15 werden wie im Beispiel 6.1 kultiviert, und das Enzym wird aus dem Kulturfiltrat nach dem Verfahren in Beispiel 6.2 gereinigt. Die so gewonnenen zwei Enzympräparate werden mit Pektinlyase II verglichen, die nach van Houdenhoven (Lit. 18) gereinigt wurde.

SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese unter Verwendung von 10%igem Gel ergibt ein einziges Band mit identischem Molekulargewicht in allen drei Fällen wenn in jedem Fall 2 bis 5 µg Protein eingesetzt werden.

Unter Anwendung von Standardverfahren (siehe z. B. Anweisungsblatt von Pharmacia, Isoelectric Focussing, 1982) wurde eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt. Es wurden ein Gerät FSBE-3000 und die entsprechende Stromversorgung ECPS 3000/150 (Pharmacia) eingesetzt. Die gewonnene PLA ist nach dem isoelektrischen Fokussieren homogen und hat einen niedrigeren isoelektrischen Punkt (0,2 pH-Einheiten) als PLII, der nach van Houdenhoven (Lit. 18) mit 3,75 angegeben wird. Die aus dem N400-Filtrat gereinigte PLII ist nach dem isoelektrischen Fokussieren heterogen. Das Hauptband stimmt in der Position mit PLA-Protein überein. Zwei kleinere Bänder sind geringfügig nach der Kathode verschoben. Folglich fehlen beim *A. niger*-Mehrfachkopietransformanten A 15 die kleineren Enzymformen, die bei N400 sichtbar sind.

Ein direkter Vergleich der kinetischen Parameter von PLA und PLII, die im letzteren Fall von van Houdenhoven (Lit. 18) ermittelt wurden, unter Verwendung von 95%igem veresterten Apfelpektin als Substrat, zeigt identische K_m - und V_{max} -Werte für beide Enzyme.

Beispiel 7 Isolierung, Reinigung und Charakterisierung von Pektinlyase D (PLD) aus dem *A. niger*-pelD-Transformanten D 12

Beispiel 7.1

Kulturbedingungen für die Herstellung von Pektinlyase D

Der *A. niger*-pelD-Transformant D 12, der nach Beispiel 5.2 gewonnen wurde, wird anfangs nach Beispiel 5.5 in Aliquoten von 300 ml gezogen. Nach einer Wachstumsperiode von 5 Tagen in PCM bei 30°C wird die Myzelmatte auf 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 6,0), der 0,1 M Natriumchlorid enthält, übertragen. Durch Schütteln des Myzels in 150 ml auf einem Orbitalschüttelapparat mit 200 U/min für die Dauer von 2 Stunden wird der größte Teil der Pektinlyase in das Medium freigesetzt.

Beispiel 7.2

Reinigung von PLD

Nach der Entfernung des Myzels durch Filtern wird die Enzymlösung einer DEAE-Sepharose-Schnellflußkolonne (Pharmacia) (25 cm × 1,25 cm) zugeführt, die mit 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 6,0), der 0,2 M Natriumchlorid enthält, voräquiliert war. Die Kolonne wird mit dem gleichen Puffer eluiert, bis die Absorbanz bei 280 nm einen Wert von < 0,1 erreicht. Die Pektinlyaseaktivität wird aus der Kolonne durch Anwendung eines linearen Natriumchloridgradienten (0,2 bis 0,7 M) in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 6,0) (800 ml Gesamtvolumen) eluiert. Die Fraktionen werden nach dem Vorhandensein von Pektinlyase D durch SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese und Western-Transfer (Towbin u. a., Lit. 16) screeniert, wie das im Beispiel 5.6 beschrieben wurde. Die Fraktionen, die Pektinlyase D enthalten, werden zusammengefaßt und dialysiert anhand von 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 6,0), der 0,15 M Natriumchlorid enthält, und einer Anionenaustauschchromatografie unter Verwendung einer Standard-MONO Q-Kolonne von Pharmacia in Verbindung mit FPLC-System unterzogen. Nach der Beschickung wird die Kolonne mit dem gleichen Puffer gewaschen, bevor ein linearer Natriumchloridgradient zu 50 ml in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 6,0) angewendet wird. Die aktiven Fraktionen werden aufgefangen, und Aliquote zu 1 ml werden einer Superose-12-Gel-Permeationskolonne zu 100 ml zugeführt, die in 20 mM Natriumphosphat (pH-Wert 6,0) äquilibriert wurde, das 0,2 M Natriumchlorid enthält, und mit dem FPLC-System verbunden. Aktive Enzymfraktionen (jeweils 1 ml), die von der GPC-Kolonne gewonnen wurden, werden durch SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese analysiert, um die Reinheit der gewonnenen Pektinlyase zu überprüfen.

Tabelle VIII

Reinigungsschema von Pektinlyase D aus dem *A. niger*-pelD-Transformanten D 12

Schritt	Volumen (ml)	Aktivität (I. U.)	Spezifische Pektinlyaseaktivität (I. U./mg Protein)
Kulturfiltrat	1 950	109	0,096
DEAE-Sepharose FF	103	32,2	5,65
MONO Q und GPC	14,5	10,4	7,5

Beispiel 7.3

Bestimmung der Aminosäurefolge des N-Terminals von Pektinlyase D

Es werden 500 µg Pektinlyase D, gereinigt nach Beispiel 6.2, dreimal anhand von destilliertem Wasser, 1 l, gefiltert durch Millipore, gereinigt und lyophilisiert. Die Aminosäurefolgen werden mit einem Proteinsequenziergerät Applied Biosystems Modell 470A bestimmt, das direkt mit einem Analysegerät 120A PTH verbunden wurde, dabei wurde die von Hunkapillar (Lit. 19) beschriebene Methode angewendet.

Für das Enzym wird folgende N-Terminalaminosäurefolge bestimmt:

VAL-GLY-VAL-SER-GLY-THR-PRO-VAL-GLY-PHE-ALA-SER-SER-ALA-THR-GLY-GLY-GLY-ASP-ALA-THR

Die bestimmte Aminosäurefolge stimmt genau mit der auf der Grundlage der Nukleotidsequenz des pelD-Gens überein.

Beispiel 8

Isolierung, Reinigung und Charakterisierung von Pektinlyase B (PLB) aus dem *A. niger*-Transformanten B 13

Beispiel 8.1

Kulturbedingungen für die Herstellung von Pektinlyase B

Der *A. niger*-pelB-Transformant B 13, der nach Beispiel 5.2 gewonnen wurde, wird nach Beispiel 5.3 auf seinen Mehrfachkopiecharakter analysiert. Die Northern-Transfer-Analyse nach dem im Beispiel 5.4 beschriebenen Verfahren zeigt, daß eine pektininduzierbare mRNA mit einer Länge von etwa 1,6 kb hergestellt wird. Nach einem Wachstum über 35 Stunden bei 30°C in einem Minimalmedium, das 1 % Zitruspektin (d. e. 72,8 %) und 1 % Weizenkleie enthält, wird das Enzym wie im Beispiel 5.4 produziert. Das Enzym wird auch unter Verwendung eines Mediums erzeugt, das aus 4 % Zuckerrübenbrei und 1 % NH₄HO₃ besteht.

Beispiel 8.2

Reinigung der PLB

Das Kulturfiltrat wird zweifach mit destilliertem Wasser verdünnt, und der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf 6,0 gebracht, anschließend wird mit Filterpapier Whatman 1 erneut gefiltert. Das verdünnte Filtrat (2 l) wird dann einer DEAE-Sepharose-Schnellflußkolonne (Pharmacia) (9 cm × 3,2 cm) zugeführt, die mit 50 mM Natriumazetatpuffer, pH-Wert 5,0,

voräquiliert wurde. Ein Teil der Pektinlyaseaktivität ist im Eluat vorhanden, wie durch das Verfahren gezeigt werden kann, das von van Houdenhoven (Lit. 18, S. 11) beschrieben wurde, dabei wird Brown-Ribbon-Pektin (d. e. 72,8%) oder stark verestertes Pektin (d. e. 94%) eingesetzt. Die Mehrheit der Pektinlyaseaktivität kann durch Zuführung eines Salzgradienten eluiert werden. Diese Aktivität erscheint im Salzgradienten, und es wird festgestellt, daß sie mit PLA auf der Grundlage des Eluierungsverhaltens und des scheinbaren Molekulargewichts bei SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese identisch ist, wie das im Beispiel 6 beschrieben wurde.

Das Eluat aus der DEAE-Schnellflußkolonne wird anhand destillierten Wassers dialysiert und einer Kolonne MONO S (Pharmacia) zugeführt, die vorher mit einem 20mM Natriumazetatpuffer, pH-Wert 4,5, äquilibriert wurde. Das Enzym wird aus der Kolonne durch Einsatz eines Natriumchlorid-Salzgradienten von 0 – 1,0M in dem gleichen Puffer eluiert. Das Enzym wird beinahe sofort aus der Kolonne eluiert. Die aktiven Fraktionen werden zusammengefaßt und dann mit destilliertem Wasser etwa vierfach verdünnt. Die Rechromatografie der Enzymlösung ergibt Fraktionen, die auf der Grundlage der SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese das reine PLB-Protein enthalten.

Beispiel 8.3

Eigenschaften von Pektinlyase B

Die Eigenschaften des Enzyms, das nach Beispiel 8.2 aus dem *pelB*-Transformanten B 13 gereinigt wurde, werden bestimmt und mit denen der Pektinlyase A und D verglichen.

SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese unter Verwendung von 10% Gelen führt zu einem einzelnen Band mit einer scheinbaren Molekularmasse von 39,7 kDa. Unter den gleichen Bedingungen ist die scheinbare Molekularmasse von PLA und PLD 49,1 kDa bzw. 52,3 kDa.

Die isoelektrische Fokussierung wird so durchgeführt, wie das im Beispiel 6.4 beschrieben wurde. Der isoelektrische Punkt von PLB ist 6,0, wenn mit einem pH-Wert-Gradienten zwischen pH-Werten von 3 und 7 gearbeitet wird. Die Probe wird etwa in einer Position zugeführt, die einem *pI* von 5,0 entspricht.

Das gereinigte Enzym PLB ist auch mit polyklonalen Antikörpern reaktiv, die anhand von PLI und PLII hergestellt wurden, wie durch die Western-Transfer-Analyse geprüft wurde. PLD, A und B können auf diese Weise leicht anhand der Werte ihrer scheinbaren Molekularmasse unterschieden werden.

Beispiel 8.4

Kinetische Eigenschaften von PLB

Das nach Beispiel 8.2 gereinigte Enzym wird kinetisch charakterisiert. Das Enzym katalysiert eine Pektinlyasereaktion und ist über einem breiten Bereich von pH-Werten (pH-Wert 5–9,5) aktiv, wie in einem McIlvaine-Puffer ($\mu = 0,5$) mit unterschiedlichen pH-Werten getestet wurde (van Houdenhoven; Lit. 18). Das pH-Wert-Optimum ist breit (pH-Wert 7,5–8,5). Bei einem pH-Wert von 6,0 beträgt die Aktivität etwa 55%; bei einem pH-Wert von 9,5 beträgt sie immer noch 85% der Aktivität bei einem pH-Wert von 8,0. Sowohl stark verestertes Pektin (d. e. [= Veresterungsgrad] = 94%) als auch Pektine mit einem niedrigeren Veresterungsgrad, wie Brown Ribbon-Apfelpektin (d. e. 72,8%; Obipektin AG, Bischoffzell), können als Substrat verwendet werden. Die höchste Aktivität erreicht man jedoch mit stark verestertem Pektin. Das Enzym reagiert nicht mit Polygalakturonat. Die Pektinlyasereaktion, die durch PLB katalysiert wird, kann durch den Zusatz von EDTA zum Reaktionsgemisch (es wird mit einer Endkonzentration von 3 mM gearbeitet) unterbunden werden; reaktiviert wird das Enzym durch den Zusatz eines Überschusses an Ca^{2+} -Ionen. Also codiert *pelB* eine Ca^{2+} -abhängige Pektinlyase. Bei 25°C hat das Enzym eine angenäherte Umschlagzahl von 6500 und einen K_m -Wert von 2,5 mM, wenn stark verestertes Pektin als Substrat eingesetzt wird. Diese Werte werden nach dem Verfahren von van Houdenhoven (Lit. 18) unter Einsatz eines McIlvaine-Puffers, pH-Wert 8,0 ($\mu = 0,5$), bestimmt.

Beispiel 9

Expression und Sekretion von Fremdgenen unter der Kontrolle des *pelA*-Promotors

Das 3,9kb-HindIII-Fragment von Plasmid pGW 820 wird in die HindIII-Stelle von pBR 322 subkloniert. Die Plasmid-DNA von ampizillinresistenten Transformanten wird durch HindIII- und Sall-Restriktionsverdauungen analysiert. Ein Klon, der das *pelA*-Insert in Uhrzeigerorientierung enthält, wird als pGW822 bezeichnet. Der induzierbare Promotor von *pelA* wird dazu genutzt, in *A. niger* Fremdgene zu exprimieren. Auf Plasmid pGW822 ist das vollständige *pelA*-Gen vorhanden. Der Promotor und die *pelA*-Signalsequenz befinden sich auf einem 1 kb-BamHI-PstI-Fragment. Die PstI-Schneidestelle in der Nukleotidposition 1420 (Abb. 10) fällt mit dem 3'-Ende der Signalsequenz zusammen und kann für die Rahmenfusion an die Codierungssequenz eines Fremdgens genutzt werden. Die Transkriptionsterminationssignale von *pelA* befinden sich auf einem 1,3 kb-Sall-HindIII-Fragment.

Beispiel 9.1

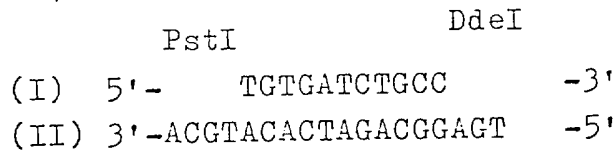
Subklonieren des *pelA*-Gens in den Vektor pUC19

Das 3,3kb-BamHI-HindIII-Fragment von Plasmid pGW322 enthält das *pelA*-Gen. Das Fragment wird in den Vektor pUC19 (Pharmacia) kloniert, der mit BamHI und HindIII geschnitten wurde. Die gereinigten Fragmente werden ligiert. Ein Aliquot des Ligationsgemischs wird dazu verwendet, Ca^{2+} -behandelte, kompetente JM 109-Zellen zu behandeln. Die erfolgreiche Klonierung des 3,3kb-BamHI-HindIII-Fragmentes in pUC19 wird nach Wahl auf Ampizillinplatten bei Vorhandensein von X-Gal und IPTG vorgenommen (T. Maniatis u. a., in „Molecular Cloning, A Laboratory Manual“ (Molekularklonierung, ein Laborhandbuch), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, S. 52). Weiße, ampizillinresistente Transformanten werden herausgegriffen. Die Plasmid-DNA dieser Kolonien wird durch BamHI/HindIII-Doppelverdauung analysiert. Ein Transformant mit einer korrekten Einfügung wird als pUC19/*pelA* bezeichnet. Eine analoge Konstruktion mit pUC18 ergibt pUC18/*pelA*.

Beispiel 9.2**Expression von Humanhybridinterferon-BDBB unter der Kontrolle des *peA*-Promotors****9.2.1: Konstruktion des Plasmids pUC19/*peA*-IFN AM 119 (siehe Abb. 14)**

Plasmid pUC19/*peA* wird mit Sall verdaut. Die kohäsiven Enden des linearen Fragments werden in einer Reaktion mit Klenow-DNA-Polymerase I (BRL) bei Vorhandensein von jeweils 0,1 mM dCTP, dGTP, dATP, dTTP, 60 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, und 10 mM MgCl₂ über die Dauer von 30 min bei Zimmertemperatur gefüllt. Die Reaktion wird durch den Zusatz von EDTA auf eine Endkonzentration von 12,5 mM gestoppt. Die DNA wird mit Ethanol ausgefällt. Das lineare Fragment wird mit PstI verdaut. Nach der Phenol/Chloroform-Extraktion wird die DNA mit Ethanol ausgefällt.

Ein Oligodesoxynukleotid-Linker mit der Formel



wird in die PstI-Stelle des linearisierten Plasmids ligiert. Der Linker füllt das 3'-rezessierte Ende der PstI-Stelle, die mit dem Ende der *peA*-Signalsequenz zusammenfällt, und gewährleistet die Im-Rahmen-Fusion an die Codierungssequenz von Interferon-BDBB. (I) stellt die 5'-Terminalnukleotidsequenz des Interferon-BDBB-Gens bis zur DdeI-Restriktionsstelle dar.

Es werden jeweils 200 pMol der Oligonukleotide (I) und (II) phosphoryliert und hybridisiert. Das PstI-geschnittene pUC19/*peA*-Plasmid und ein einhundertfacher Molüberschuß der doppelsträngigen Linker-DNA werden in 60 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 5 mM DTT und 400 Einheiten T4-DNA-Ligase über 16 Stunden bei 15°C ligiert. Die DNA-Ligase wird über 10 min bei 85°C inaktiviert. Die überschüssigen Linker werden durch Ausfällung bei Vorhandensein von 10 mM EDTA, 300 mM Natriumazetat, pH-Wert 6,0, und 0,54 Volumen Isopropanol entfernt.

Das große 5 kb-Fragment wird auf einem 0,6%igen präparativen Agarosegel isoliert. Das Fragment enthält den *peA*-Promotor und die Signalsequenz (BamHI[PstI]/Linker) und den *peA*-Terminator ([Sall]glatt-HindIII) im Vektor pUC19.

Das Plasmid pJDB207/PH05-IFN AM 119 (EP 205404) enthält das Gen für Hybrid- α -Interferon-BDBB unter der Kontrolle des regulierten Promotors der Hefensäurephosphatase (PHO5). Die Plasmid-DNA wird mit BamHI und HindIII verdaut. Das 1,3 kb-BamHI-HindIII-Fragment wird isoliert, welches den PHO5-Promotor, die Codierungssequenz von IFN BDBB und die PHO5-Transkriptionsterminationssequenzen enthält. Das Fragment wird durch DE52-Chromatografie und Ethanolausfällung gereinigt und weiter mit TaqI verdaut. Die kohäsiven Enden der TaqI-Restriktionsfragmente werden in einer Reaktion mit Klenow-DNA-Polymerase I (BRL) bei Vorhandensein von 0,1 mM von jeweils dCTP und dGTP, 60 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl₂ für die Dauer von 30 min bei Zimmertemperatur gefüllt. Die Reaktion wird durch den Zusatz von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 12,5 mM gestoppt. Die DNA-Fragmente werden mit Ethanol ausgefällt und weiter mit DdeI verdaut. Die DNA-Fragmente werden auf einem 0,8%igen präparativen Agarosegel getrennt. Das 549 bp-DdeI-[TaqI]-glatte Fragment wird aus dem Gel elektroeluiert, durch DE52-Ionenaustauschchromatografie gereinigt und mit Ethanol ausgefällt. Das DNA-Fragment wird in H₂O mit einer Konzentration von etwa 0,1 pMol/ μ l wieder zur Suspension gebracht.

Es werden 0,2 pMol des 549 bp-DdeI-[TaqI]-glatten Fragmentes und 0,1 pMol des 5 kb-Vektorfragmentes in 10 μ l von 60 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl₂, 3,5 mM ATP, 5 mM DTT und 200 Einheiten von T4-DNA-Ligase (Biolabs) über 16 Stunden bei 15°C ligiert. Eine Menge von 1 μ l des Ligationsgemischs wird zur Transformation von Ca²⁺-behandelten, kompetenten HB 101-Zellen verwendet.

Plasmid-DNA wird aus 12 ampizillinresistenten, transformierten Kolonien hergestellt und durch EcoRI-, PvuII-, ClaI- und EcoRI/HindIII-Verdauung analysiert. Es wird ein Klon mit dem erwarteten Restriktionsmuster ausgewählt. Die korrekte Im-Rahmen-Fusion der *peA*-Signalsequenz und der reifen Codierungssequenz von Interferon-BDBB wird durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die Plasmid-DNA des ausgewählten Klons wird als pUC19/*peA*-IFN AM 119 bezeichnet. Eine analoge Konstruktion mit pUC18/*peA* ergibt das Plasmid pUC18/*peA*-IFN AM 119.

Beispiel 9.2.2**Kottransformation des *Aspergillus niger*-Mutanten An8 mit pCG59D7 und pUC19/*peA*-IFN AM 119**

Der uridinauxotrophe Mutant AN8 (\cong DSM 3917, offengelegt in EP 88 101 397.3) wird mit Plasmid pCG59D7 transformiert, um Uridinprototrophe zu ergeben. Zusammen mit dem transformierenden Plasmid wird das nichtselektive Plasmid pUC19/*peA*-IFN AM 119 zugesetzt, um bei Kottransformation zufällige Kointegranen zu ergeben.

Conidialsporen von *A. niger* An8 werden 4 Tage lang bei 28°C bis zur vollständigen Sporenbildung in einem Kompletmedium gezogen. Es werden 2×10^8 Conidiosporen eingesetzt, um 200 ml Minimalmedium, das mit 1 g/l Arginin und Uridin ergänzt wurde, zu inokulieren.

Nach 20 Stunden Wachstum bei 28°C und 180 U/min wird das Myzel durch Filtern durch Miracloth geerntet, zweimal mit 10 ml 0,8 M KCl, 50 mM CaCl₂ gewaschen und wieder zur Suspension gebracht in 20 ml 0,8 M KCl, 50 mM CaCl₂, 0,5 mg/ml Novozym 234 (Novo Industries). Das Gemisch wird in einem Rüttel-Wasserbad (30°C, 50 U/min) inkubiert, bis mikroskopisch eine maximale Protoplastenfreisetzung festgestellt werden kann (90–120 min). Die Protoplastsuspension wird durch einen Glaswollstöpsel in einem Trichter gefiltert, um Myzeltrümmer zu entfernen. Die Protoplaste werden durch sanftes Zentrifugieren (10 min, 2000 U/min) bei Zimmertemperatur pelletiert und zweimal mit 10 ml 0,8 M KCl, 50 mM CaCl₂ gewaschen. Abschließend werden die Protoplaste in 200 bis 500 μ l 0,8 M KCl, 50 mM CaCl₂ wieder zur Suspension gebracht, wobei eine Konzentration von 1×10^8 /ml erreicht wird. Zur Transformation wird ein Aliquot von 200 μ l der Protoplastdispersion mit 5 μ g pCG59D7 und 10 μ g pUC19/*peA*-IFN AM 119-DNA, 50 μ l PCT (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 50 mM CaCl₂, 25% PEG 6000) inkubiert. Das Inkubationsgemisch wird 20 min auf Eis gehalten, es werden weitere 2 ml PCT zugesetzt, und das Gemisch wird weitere 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Es werden 4 ml 0,8 M KCl, 50 mM CaCl₂ zugesetzt, und Aliquote zu 1 ml der abschließenden Transformationslösung werden mit lignifiziertem Minimal-Agar-Medium (Minimalmedium + 1 g/l Arginin + 10 g/l Bacto-Agar [Difco]), stabilisiert mit 0,8 M KCl, gemischt. Das Gemisch wird sofort auf Agar-Platten mit dem gleichen Medium gegossen und bei 28°C inkubiert.

Nach zwei bis drei Tagen Wachstum bei 28°C erscheinen stabile Transformanten als kräftig wachsende und sporenbildende Kolonien auf einem Hintergrundwachstum von vielen hundert kleinen, vermutlich abortiven Transformanten.

Beispiel 9.2.3**Expression des Hybrid-Interferon-BDBB-Gens unter der Kontrolle des *pelA*-Promotors**

Es werden 37 Transformanten des Kotransformationsexperimentes (Beispiel 9.2.2) herausgenommen und auf Interferonexpression analysiert. Die Interferonaktivität wird nach dem Verfahren von Armstrong (J. A. Armstrong, Appl. Microbio. 21, 732 [1971]) unter Verwendung von menschlichen CCL-23-Zellen und des vesikulären Stomatitisvirus (VSV als Herausforderungsvirus durchgeführt).

Conidialsporen von Transformanten werden einzeln in 50 ml eines Vorkulturmedium vorkultiviert (Pectin Slow Set I [Unipectin, SA, Redon, Frankreich], 3g/l, NH₄Cl, 2g/l, KH₂PO₄, 0,5g/l, NaCl, 0,5g/l, Mg₂SO₄ · 7 H₂O, 0,5g/l, Ca₂SO₄ · 2 H₂O, 0,5g/l, pH-Wert 7,0). Die Vorkultur wird 72 Stunden lang bei 250 U/min und 28°C inkubiert. Es werden 10% der Vorkultur dazu genutzt, 50 ml des Hauptkulturmediums (Sojabohnenmehl, 20g/l, Pectin Slow Set, 5g/l) zu inokulieren. Die Kultur wird über 72 bis 96 Stunden bei 250 U/min und 28°C gezogen.

Zu verschiedenen Zeitpunkten (alle 20 Stunden) werden Proben genommen, die Zellen werden durch Zentrifugieren pelletiert und durch Ultraschalldesintegration aufgebrochen. Die obenaufschwimmende Schicht und die Zellextrakte werden beide auf ihre Interferonaktivität untersucht, wie das beschrieben wurde (siehe oben). Es wird festgestellt, daß die Masse der Interferonaktivität in das Medium sekretiert wird.

Beispiel 10**Konstruktion von Plasmid M13(+)/KS/*pelA*_{Δss}-IFN AM 119**

Die 2,8kb-umfassende Expressionskassette von Plasmid M13(+)/KS/*pelA*_{Δss}-IFN AM 119 beinhaltet den induzierbaren *pelA*-Promotor, die Codierungssequenz von Hybrid-Interferon-BDBB und den *pelA*-Transkriptionsterminator auf dem Bluescript-M13(+)-KS-Vektor. Hybrid-Interferon-BDBB wird exprimiert und befindet sich in der Wirtszelle. Plasmid M13(+)/KS/*pelA*_{Δss}-IFN AM 119 wird von pUC18/*pelA*-IFN AM 119 (siehe Beispiel 9.2.1) abgeleitet. Die *pelA*-Signalsequenz (ss) wird durch seitlich gerichtete Mutagenese ausgeschaltet (siehe Abb. 15). Es wird erwartet, daß sich Hybrid-Interferon, das ohne Signalsequenz aus der Konstruktion exprimiert wurde, im Zytosol befindet.

Beispiel 10.1**Subklonieren der *pelA*-IFN AM 119-Kassette in den Bluescript-M13(+)-KS-Vektor**

Plasmid pUC18/*pelA*-IFN AM 119 (siehe Beispiel 9.2.1) wird mit BamHI und HindIII verdaut. Das 2,8kb-BamHI-HindIII-Fragment enthält den *pelA*-Promotor, die Signalsequenz, die IFN-BDBB-Codierungssequenz und den *pelA*-Terminator. Das BamHI-HindIII-Fragment wird isoliert und an den Bluescript-M13(+)-KS-Vektor (Stratagene), der mit BamHI und HindIII geschnitten wurde, ligiert. Ein Aliquot des Ligationsgemisches wird zur Transformation von Ca²⁺-behandelten, kompetenten JM109-Zellen verwendet. Das erfolgreiche Klonieren des 2,8kb-BamHI-HindIII-Fragments in M13(+)-KS wird für Ampizillinplatten bei Vorhandensein von X-Gal und IPTG ausgewählt. Es werden 12 weiße, ampizillinresistente Kolonien aufgenommen. Die Plasmid-DNA dieser Kolonien wird durch BamHI/BglII-Doppelverdauung analysiert. Ein Transformant mit dem korrekten Insert wird als M13(+)/KS/*pelA*-IFN AM 119 bezeichnet.

Beispiel 10.2**Gewinnung von einzelsträngiger DNA aus Zellen, die das Bluescript M13(+)-KS-Plasmid enthalten**

Plasmid M13(+)/KS/*pelA*-IFN AM 119 wird dazu genutzt, den kompetenten *E. coli*-Stamm CJ 236 zu transformieren (dut-1, ung-1, thi-1, *relA*-1; pCJ105 (Cm^r); BIO-RAD Muta-Gene M13-In vitro-Mutagenese-Satz). Dieser Stamm ermöglicht die Einbeziehung von Urzilin in die DNA. CJ 236 wird in 10 ml LB-Medium gezogen, das 100 mg/l Ampizillin enthält. Bei OD₆₀₀ von 0,5 werden die Zellen mit Phag M13KO7 (Mead u. a.; Lit 29) mit einer Infektionsmultiplizität von 50 überinfiziert. Nach einer Stunde bei 37°C wird Kanamycin (50 mg/l) zugesetzt, und die Kultur wird bei 37°C 5 bis 6 Stunden lang auf einem Schüttelapparat inkubiert. Der nichtcodierende Strang in bezug auf das *pelA*-IFN AM 119-Insert von Plasmid M13(+)/KS/*pelA*-IFN AM 119 wird synthetisiert, verpackt und an das Medium freigesetzt. Aus der obenaufschwimmenden Schicht der Kultur wird einzelsträngige DNA nach Kunkel u. a. (Lit. 30) hergestellt.

Beispiel 10.3**Seitlich gerichtete Oligonukleotidmutagenese an der einzelsträngigen DNA-Matrize**

Eine seitlich gerichtete Deletionsmutagenese wird an der nichtcodierenden, einzelsträngigen *pelA*-IFN AM 119-Matrize durchgeführt, um die *pelA*-Signalsequenz herauszulösen (Abb. 15).

Der mutagene Starter besteht aus einem Teil der *pelA*-Promotorsequenz, einschließlich ATG (Nukleotidpositionen 1343 bis 1363 in der Abb. 10), und 21 Nukleotiden mit der Codierung für die Aminosäuren 1 bis 7 des reifen IFN-BDBB.

Für die Mutagenese werden 200 pMol des mutagenen Starters in 20 µl von 50 mM Tris · HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 0,5 mM ATP unter Verwendung von 8 Einheiten T₄-Polynukleotidkinase (Boehringer) phosphoryliert. Nach einer Stunde bei 37°C wird die Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für die Dauer von 10 min gestoppt.

Es werden 0,2 pMol der einzelsträngigen Matrize mit 10 pMol des phosphorylierten, mutagenen Oligodeoxyribonukleotidstarters und 10 pMol des universellen Sequenzierungsstarter M13 in 30 µl 20 mM Tris · HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT bei 80°C über 5 min inkubiert. Man läßt die Lösung langsam über eine Zeitspanne von 30 min auf Zimmertemperatur abkühlen; dem hybridisierten Gemisch werden 10 µl der Enzym-dNTP-(-dATP-, -dGTP-, -dCTP-, -dTTP-) Lösung zugesetzt, die 1 µl Puffer (0,2 M Tris · HCl, pH-Wert 7,5, 0,1 M MgCl₂), 5 µl 2 mM dNTP-Gemisch, 0,5 µl 20 mM ATP, 1 µl 0,2 M DTT, 0,5 µl T₄-DNA-Ligase (Biolabs, 400 Einheiten/µl) und 1,2 µl Klenow-DNA-Polymerase (BRL, 5 Einheiten/µl) enthält. Das Gemisch wird bei 15°C 16 Stunden lang inkubiert. Die Reaktion wird durch Inkubation bei 65°C über die Dauer von 10 min gestoppt.

Es werden 1 µl und 3 µl des Ligationsgemisches zur Transformation von 0,2 ml der kompetenten Zellen des Reparatur-Minus-Stammes *E. coli* MV 1190 (Δ*(lac-proAB)*, thi, supE, Δ*(sr1-recA)*306: :Tn10 (tet^r) (F': traD36, proAB, lac⁺ΔM15)) verwendet. Stamm MV 1190 wird im Handbuch für den In-vitro-Mutagenese-Satz BIO-RAD MUTA-GENE M13 beschrieben. Es werden 12 ampizillinresistente Kolonien aufgenommen. Es wird Plasmid-DNA hergestellt und durch Scal-Verdauung analysiert. Das erfolgreiche Auslösen der *pelA*-Signalsequenz entfernt eine Scal-Stelle. Korrekte Plasmide werden an der Scal-Stelle im

Bluescript-Vektor linearisiert. Ein Plasmid wird weiter analysiert. Die korrekte Verbindung zwischen dem *peIA*-Promotor und der Codierungssequenz für Hybrid IFM BDBB mit ATG wird durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Eine korrekte Konstruktion wird als M13(+)/KS/*peIA*Δ_{ss}-IFN AM 119 bezeichnet.

Beispiel 10.4

Kotransformation von *A. niger* und Expression von Hybrid-Interferon

Die Plasmide M13(+)/KS/*peIA*Δ_{ss}-IFN AM 119 und pCG59D7 werden zur Kotransformation des *A. niger*-Mutanten An8 nach Beispiel 8.2.2 verwendet. Die Transformanten werden wie im Beispiel 8.2.3 kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (alle 20 Stunden) werden Proben genommen, die Zellen werden durch Zentrifugieren pelletiert und durch Ultraschalldesintegration aufgebrochen. Die Zellextrakte werden auf Interferonaktivität getestet (siehe oben). Die Masse der Interferonaktivität wird intrazellulär gefunden.

Deponierung der Mikroorganismen

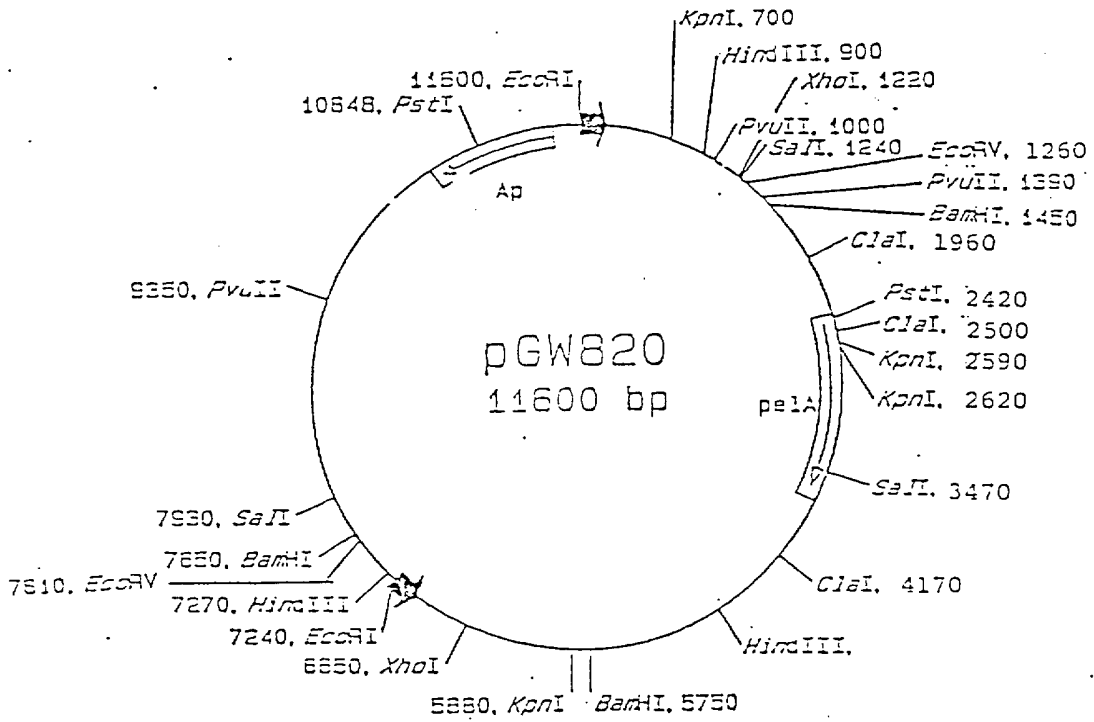
Die folgenden Mikroorganismen wurden nach dem Budapester Vertrag bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Grisebachstr. 8, D-3400 Göttingen, deponiert:

Mikroorganismen	Dep.-Nr.	Deponierungsdatum
Escherichia coli HB 101/pGW 820	DSM 4388	1. Februar 1988
Escherichia coli HB 101/pGW 830	DSM 4389	1. Februar 1988
Escherichia coli HB 101/pGW 850	DSM 4390	1. Februar 1988
Escherichia coli HB 101/pGW 860	DSM 4391	1. Februar 1988
Escherichia coli HB 101/pGW 880	DSM 4392	1. Februar 1988

Literaturangaben

- Yelton, M. M., Hamer, J. E., und Timberlake, W. E. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1470–1474.
- Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poustra, A., und Murray, N. (1983), *J. Mol. Biol.* **170**, 827–842.
- Karn, J., Brenner, S., Barneff, L., und Cesareni, G. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5172–5176.
- Benton, W. D., und Davis, R. W. (1977), *Science* **196**, 180 bis 182.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., und Sambrook, J. (1982) in: *Molecular cloning, a laboratory manual* (Molekulares Klonieren, ein Laborhandbuch), Cold Spring Harbor, Harbor, New York.
- BRL. M13 cloning/dideoxy sequencing instruction manual (Anleitungshandbuch für M13-Klonierung/ Dideoxysequenzierung).
- Dente, L., Cesareni, G., und Cortese, R. (1983), *Nucl. Acids Res.* **11**, 1645–1655.
- Dente, L., Sollazzo, M., Baldari, C., G. Cesareni und R. Cortese, in: *DNA cloning, vol. 1. A practical approach* (DNA-Klonieren. Bd. 1. Ein praktisches Herangehen), Hsg. D. M. Glover, IRL Press, Oxford 1985.
- Russell, M., Kidd, S., und Kelley, M. R. (1986) *Gene* **45**, 333–338.
- Caruther, M. H. *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments: a Laboratory Manual* (Chemische und enzymatische Synthese von Genfragmenten: Ein Laborhandbuch), Verlag Chemie (1982).
- Ballance, D. J. (1986), *Yeast* **2**, 229–236.
- Goosen, T., Bloemheugel, G., Gysler, Ch., de Bier, D. A., van den Broek, H. W. J., und Swart, K. (1987), *Current Genetics* **11**, 499–503.
- Boeke, J. D., Lacroute, F., und Fink, G. R. (1984), *Mol. Gen. Genet.* **197**, 345–346.
- Slater, R. J. (1984), in: *Methods in Molecular Biology* (Methoden in der Molekularbiologie), Bd. 2, Hsg. J. M. Walker, The Humana Press lcc.
- Hinnen, A., Hicks, J. B., und Fink, G. R. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929–1933.
- Laemmli, U. K. (1970), *Nature* **227**, 681–682.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350–4354.
- Ried, J. L., und Collmer, A. (1985), *Applied and Environm. Microbiol.* **50**, 615–622.
- van Houdenhoven, F. E. A. (1975), Ph. D. Thesis (Dissertationsschrift) Landwirtschaftliche Universität Wageningen, Niederlande.
- Hunkapiller, M. W. (1985), *PTH Amino Acids Analysis, User Bulletin* (PTH-Aminosäurenanalyse, Anwenderbulletin), Nr. 14, Applied Biosystems.
- Zissler, J., u. a. (1971), in: *The Bacteriophage Lambda* (Das Bakteriophag Lambda), Cold Spring Harbor Labs, New York, A. D. Hersley, Herausgeber.
- Norrander, J., Kempe, T., und Messing, J. (1983), *Gene* **26**, 101–106.
- F. E. A. von Houdenhoven. *Dissertationsschrift, landwirtschaftliche Universität Wageningen in: Communications Agricultural University Wageningen, Niederlande*, 75–13 (1975).
- Birnboim, H. C., und Doly, J. (1979), *Nucleic Acids Res* **7**, 1513–1523.
- Boel, E., Hansen, M. T., Hjort, I., Hoegh, I., Fiil, N. P. (1984), *EMBO J.* **3**, 1581–1585.
- Mount, S. M. (1982), *Nucleic Acids Res.* **10**, 459–472.
- Ballance, D. J., und Turner, G. (1985), *Gene* **36**, 321–331.
- Hermersdörfer, H., Leuchtenberger, A., Wardsack, Ch., und Ruttloff, H. (1907), Influence of culture conditions on mycelial structure and polygalacturonase synthesis of *A. niger* (Einfluß der Kulturbedingungen auf Myzelstruktur und Polygalakturonasesynthese von *A. niger*). *J. Basic Microbiol.* **27**, 309–315.
- Henikoff, S. (1984), *Gene* **28**, 351–359.
- Mead u. a. (1986), *Protein Engineering* **1**, 67.
- Kunkel u. a. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 485.

Abb. 1: Restriktionskarte von Plasmid pGW820 mit *pelA*



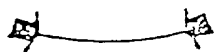
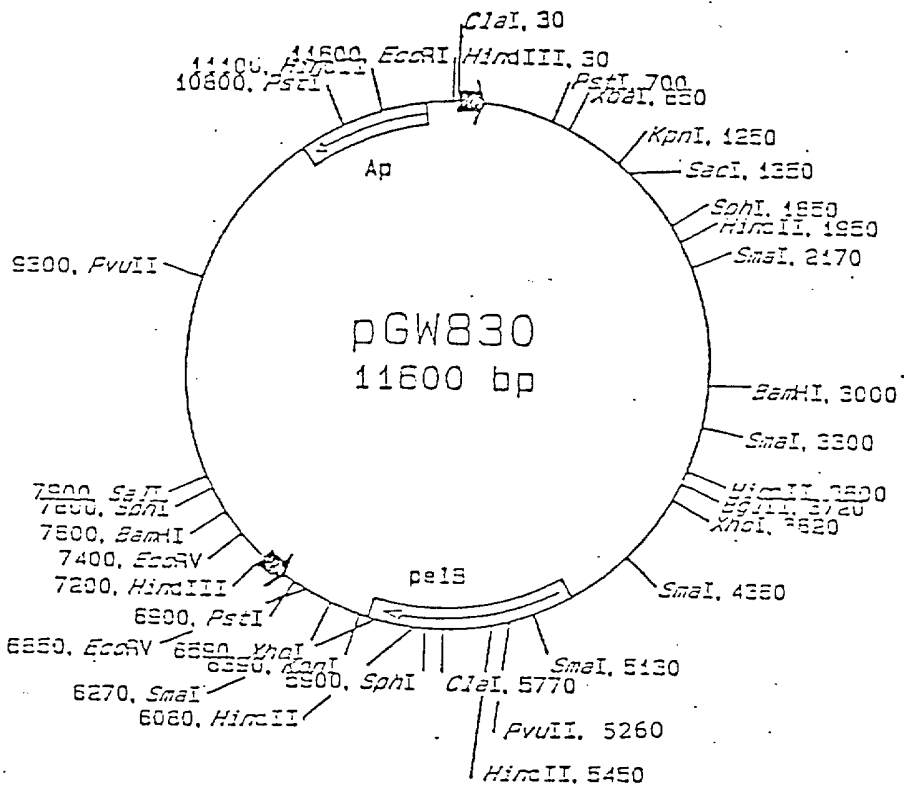
A. niger-N400-DNA

Ap Ampizillinresistentes Gen (pBR322)

pelA pelA-Codierungsbereich

Der Pfeil gibt die Gen-Orientierung an

Abb. 2: Restriktionskarte von Plasmid pGW830 mit pelB



A. niger-M400-DNA

Ap

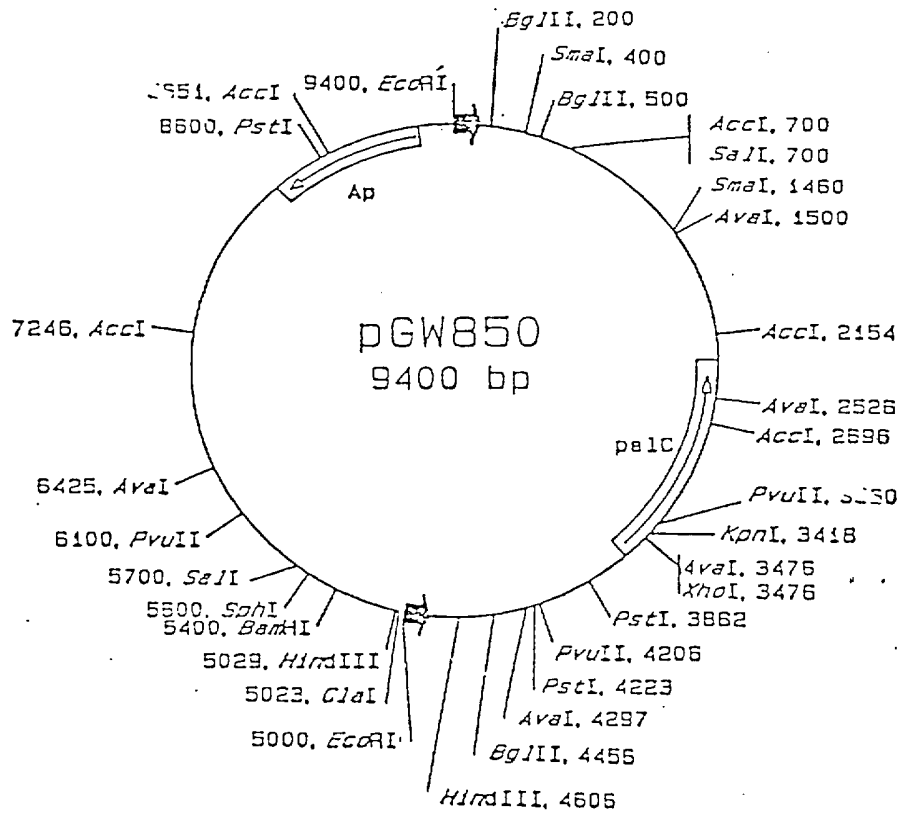
Ampizillinresistentes Gen

pelB

pelB-Codierungsbereich

Der Pfeil gibt die Genorientierung an.

Abb. 3: Restriktionskarte von Plasmid pGW850 mit pelC



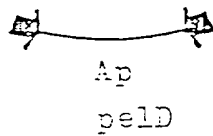
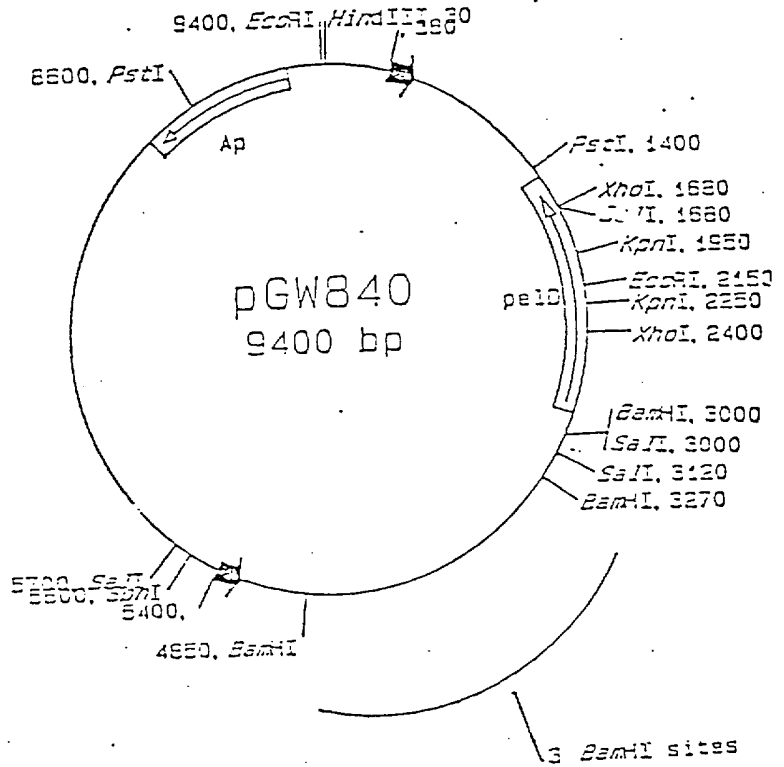
A. niger-N400-DNA

Ap Ampizillinresistentes Gen

pelC *pel*-C-Codierungsbereich

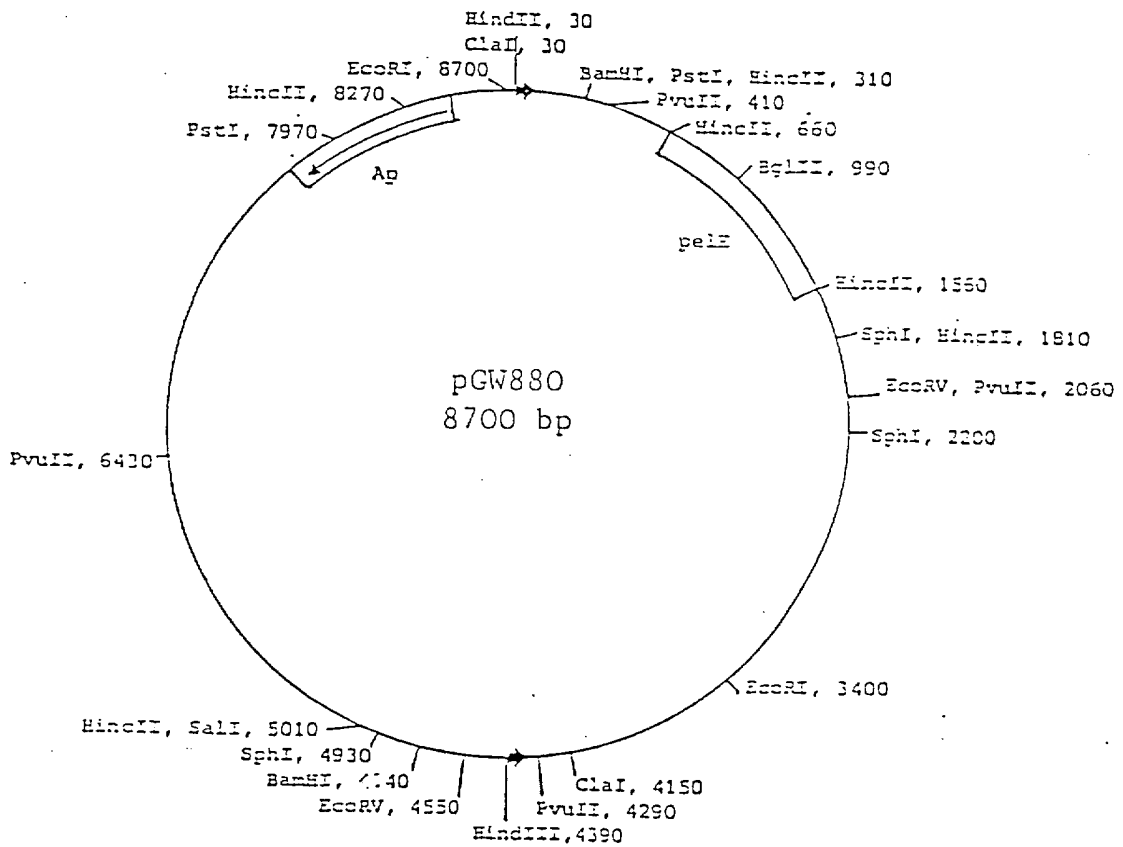
Der Pfeil gibt die Genorientierung an.

Abb: 4: Restriktionskarte von Plasmid pGW840 mit pelD



A. niger-N400-DNA
 Ampizillinresistentes Gen
pelD-Codierungsbereich
 Der Pfeil gibt die Genorientierung an.

Abb. 5: Restriktionskarte von Plasmid pGW880 mit *pelE*



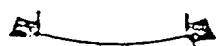
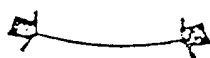
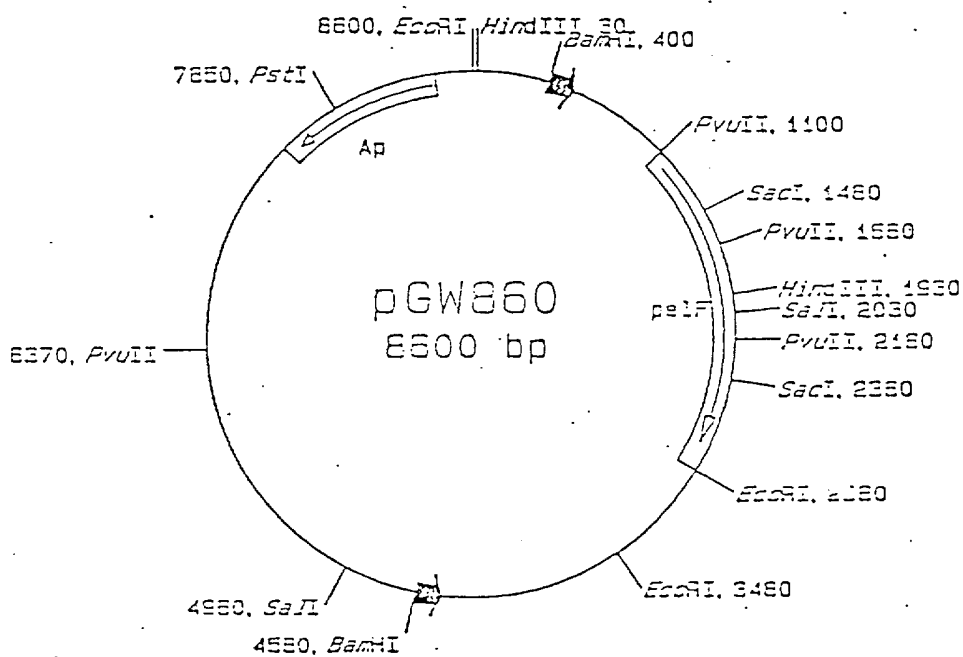
 *A. niger*-M400-DNA
Ap Ampizillinresistentes Gen
pelE *pelE*-Codierungsbereich

Abb. 6: Restriktionskarte von Plasmid pGW860 mit pelF



A. niger-M400-DNA

Ap Ampizillinresistentes Gen

pelF Kleinstes Fragment von pelF, das mit dem pelD-Gen hybridisiert. Der Pfeil gibt die Orientierung des Gens an.

Abb. 7: Sequenzierungsstrategie für das *pelA*-Gen

Das *pelA*-Gen wird als Stab gezeigt, der für nichtcodierende Bereiche offen und für codierende Bereiche schraffiert ist. ss: Signalsequenz; 1 - 5 Intronpositionen.

Die Positionen der Restriktionsstellen werden auf der Linie gezeigt, die Zahlen unter der Linie beziehen sich auf Positionen auf pGW820 (Abb. 1), die Zahlen hinter den Enzymnamen auf Positionen auf der bestimmten Sequenz (Abb. 10). Die erzeugten Subklone werden durch einen Doppelpfeil gezeigt (⇌), n1-n13 in der 5'-3'- und r1-r14 in der 3'-5'-Richtung im Verhältnis zum Gen. Die mit dem universellen Sequenzierungsstarter bestimmten Sequenzen werden durch einen einfachen Pfeil gezeigt (→). Kleine, gefüllte Boxen beziehen sich auf speziell synthetisierte Starter, mit diesen gelesene Sequenzen und Richtungen werden mit Pfeilen gezeigt.

A: HR576, B: HR5636, C: HR5803, D: HR5764, E: HR5767, F: HR5763, G: HR5804, H: HR5763.

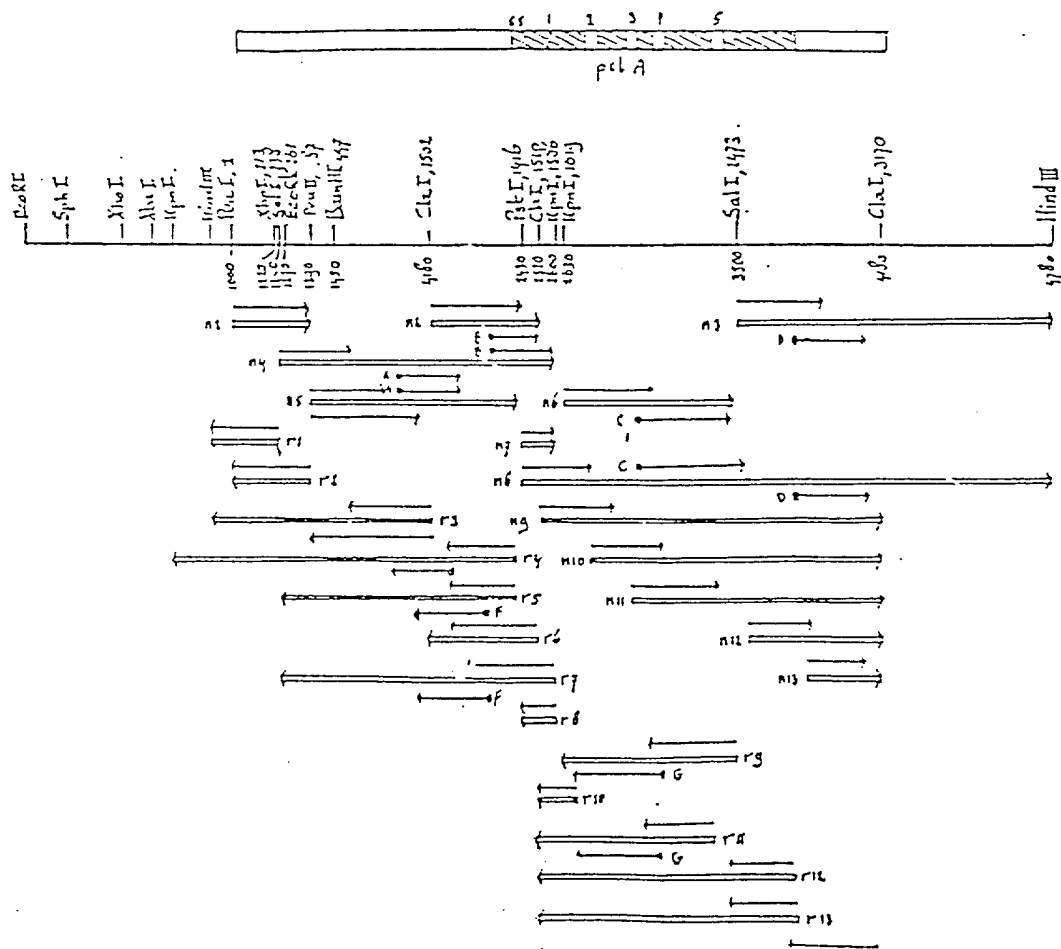


Abb. 8: Sequenzierungsstrategie des pelB-Gens

Das pelB-Gen wird als Stab gezeigt, der für nichtcodierende Bereiche offen und für codierende Bereiche schraffiert ist. ss: Signalsequenz: 1-5 Intronpositionen.

Die Positionen der Restriktionsstellen werden auf der Linie gezeigt, die Zahlen unter der Linie beziehen sich auf Positionen auf pGW830 (Abb. 2), die Zahlen hinter den Enzymnamen auf Positionen auf der bestimmten Sequenz (Abb. 11).

Die erzeugten Subklone werden durch Doppelpfeil (\longleftrightarrow), n1-n13 in der 5'-3'- und r1-r12 in der 3'-5'-Richtung im Verhältnis zum Gen gezeigt. Die mit dem universellen Sequenzierungsstarter bestimmten Sequenzen werden durch einfachen Pfeil (\longrightarrow) gezeigt. Kleine, gefüllte Boxen bezeichnen speziell synthetisierte Starter, mit diesen gelesene Sequenzen und Richtungen werden mit Pfeilen gezeigt.

A: HR5767, B: HR 5770, C: HR5826, D: HR5827, E:HR5828, F: HR5829. Pfeile mit gestrichelten Teilen bezeichnen Sequenzen, die nach der Erweiterten Klenow-Sequenzierungsmethode (Gibco BRL Focus 9:3,1-4) bestimmt wurden. #: Startstelle des inneren M13-Sequenzierungsstarters (14 von 17 Basen) an der pelB-Sequenz.

Abb. 8 (fortgesetzt)

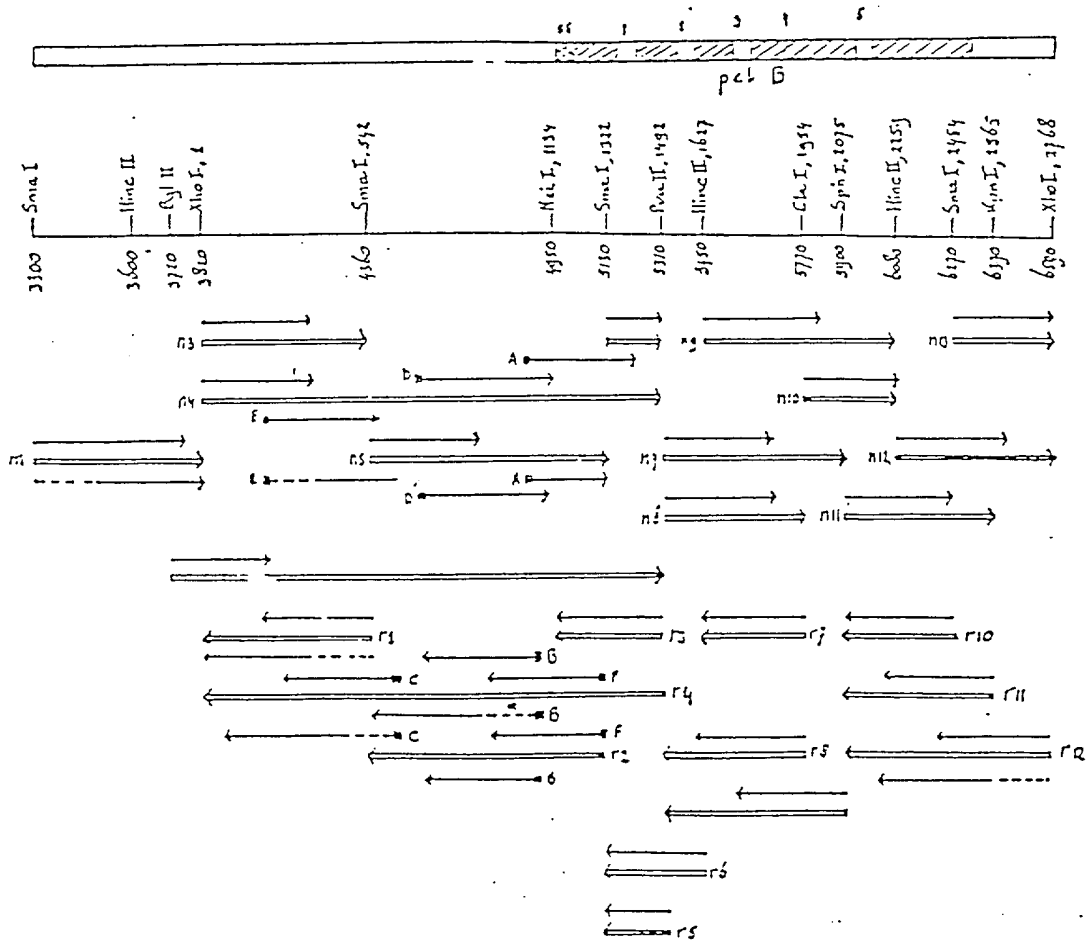


Abb. 9: Sequenzierungsstrategie für das pelC-Gen

Das pelC-Gen wird als Stab gezeigt. Die Orientierung des Gens geht von links nach rechts, von ATG in Position 1368 bis zum Stoppkodon in Position 2708. Die Nummerierung der Positionen der Restriktionsstellen ist gegenüber der Nummerierung der Positionen auf pGW850 (Abb. 3) umgekehrt, entspricht jedoch der Nummerierung in der Sequenz (Abb. 12). Die erzeugten Subklone werden durch Doppelpfeil (\longleftrightarrow), n1-n17 in der 5'-3'- und r1-r12 in der 3'-5'-Richtung im Verhältnis zum Gen gezeigt. Die Länge der bestimmten Folgen wird durch Stäbe gezeigt. Klone von Exonuklease III werden durch massive Pfeile (\longrightarrow), e1-e14, gezeigt.

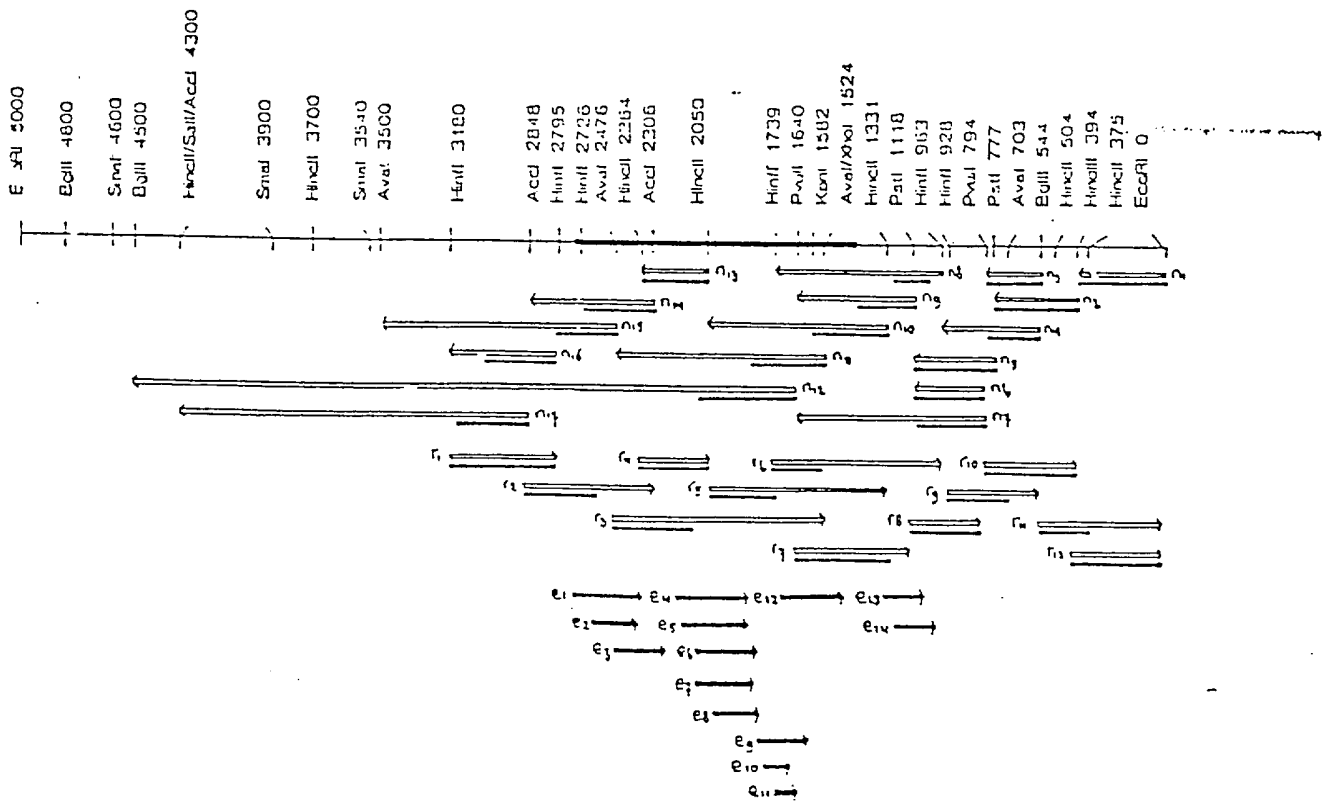


Abb. 10 (Formel I): pelA

PvuII
CAGCTGGACCGGAAATATGATTGATAGGGGCAACGTCACCTCCATCTCCCCTGATTTCGTGA

10 30 50

TAAAAATGAGTTATGATTGATGCCTACGGAGTCCGAGATACTCCCACCTTATCGTGACCA

70 90 110

GTCACCCGTTTCAGACTGGATGACAAAATCATCAGTCAACCAACTAGATCGGTGCTAAAAA

130 150 170

XhoI Sall
TGGACGGCTAAATTTCTGCACTGGATTTCGAAACTCGAGGAGCAATAGCTGCCCGGAGGTC

190 210 230

EcoRV
GACTTGATGGGTGGTGTCTGATATCGCCGAAGCCGAAGGTTCCACTGTGGGCCACTTG

250 270 290

ACCGGCGTTCCTGGCGCCTTACCAAGAAGCGCCTAATTCGTGGCTTTTTTCTTTTCTTTTT

310 330 350

PvuII
TTTTTCTTTACTTTGCCGAGCTTTTCCAGCTGCTCTCATTGACTAGAAGACCGACTGGA

370 390 410

BamHI
GATATAGAGAGCGGTGGGGAGATACTGGATCCATTAATAATCGAAACGGAAACGGTCTCA

430 450 470

GGTGGAGGCTAAACCTTTCAAAGAAGCTGGATTTCGTGATGCAAAAATTGTTTCCCCCCCCGG

490 510 530

TTCCCCTCTTCTTCTTACCCTGATGAACAGCCCTAACTGTTCGAGCACCTCCAGCCTTC

550 570 590

(fortgesetzt)

Abb. 10 (fortgesetzt)

CATCCGTAACATCCTCAAACACTAGCTACACCCCTGATGGTCCGATTCCGGTATTTTCCCG

610 630 650

ACTATCATTGCCACAAGGACTCTGCCAAGACGGAGGAATTGCTTCTTTACAGAATTTCAA

670 690 710

TCGCGAGGTCCACCAGCCCGAGTGGATGGACTAGTTACTTTAGACTACCGTGACTAAGTC

730 750 770

GCCGGCGCGGGCATCATGAAACGCCGTAAATCCCCCGACTCCCTCCTAAGATCCACCTAT

790 810 830

GACCTTCAACAGCCTGCAAGACAGTGGGCTGTCCAGCTCAGTGTCCACGAACAGGGGCCA

850 870 890

TCACCGTGATGGACAACCATGTGGCTACGACTCCTCCCTCCCCCTTCCAATCTTGTTGT

910 930 950

ClaI

CATCGATGCCTATCACTCCATCCATGGTCCGATACGATGGACCCCTTCAATCTACTTGC

970 990 1010

TCGGCCAGTACCGACTTTAGCGCCGGTGGACTGACCGAGAAGAATCAACGGTTTTGCTCA

1030 1050 1070

ATCGCCCTTGGCTACTAATCAAAGATGCACTTGGCCGTTTCATACCGATCACCCGTCCAA

1090 1110 1130

TTTACCCAGAATGGTCTGAGCCAGAGGGGAAGCTCTATCAGATTCTTGTCAAATGCTTCC

1150 1170 1190

GTCAACGAGTCAGTCTTCCCTATAAAAAGGCCCAATCCCATCCGTATTGACCTCTTCTCT

1210 1230 1250

(fortgesetzt)

Abb. 10 (fortgesetzt)

GTATCAAACCATTCCCTTCCTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCATACCTCTATCTTCACCTTAG

1270

1290

1310

M K Y S T I F

CTTTTCTTTTCCCCTTCATAGCTGGTTCACACTTCACCATGAAGTACTCTACTATCTT

1330

1350

1370

PstI

S A A A A V F A G S A A A V G V S G S A
CAGCGCTGCTGCCGCTGTTTTCGCTGGTTCGGCCGCTGCAGTCGGCGTGTCCGGCTCTCG

1390

1410

1430

E G F A E G V T G G G D A T P V Y P D T
TGAGGGTTTCGCCGAGGGCGTCACCGGTGGCGGTGATGCCACCCCGTCTACCCCGACAC

1450

1470

1490

Clai

I D E L V S Y L G D D E A R V I V L T K
TATCGATGACCTGGTCTCTTACCTTGGAGACGATGAGGCCCGCGTTCATTGTCCTGACCAA

1510

1530

1550

KpnI

KpnI

T F D F T D S E G T T T G T G C A P W G
GACCTTCGACTTCACCGACAGCGAAGGTACCACCACTGGCACTGGTTGCGCTCCCTGGGG

1570

1590

1610

T A S A C Q V A I D Q D D W C E N Y E P
TACCGCTTCGCCCTGCCAGGTTGCTATTGACCAGGACCACTGGTGCGAGAACTACGAGCC

1630

1650

1670

D A P S V S V E Y
CGATGCTCCCTCTGTCAGCGTTGAATAGTATGTCCTTGGGGATTGTCACCCGCTTCGATC

1690

1710

1730

Y N A G V L G I T V T S N K
TTGTATCTAACTTGGATAGCTACAACGCTGGTGTCTCGGTATCACCGTCACCTCCAACA

1750

1770

1790

(fortgesetzt)

Abb. 10 (fortgesetzt)

S L I G E G S S G A I K G K G L R I V S
AGTCCCTCATCGGTGAGGGCTCCTCTGGTGCAATCAAGGGCAAGGGTCTCCGTATTGTCA
1810 1830 1850

G A E N I I I Q
CGGGTGTGAGAACATCATCATCCAGTAGGTTATGCTCGGTGTCATTAGGAATTTGCTCT
1870 1890 1910

N I A V T D I N P K Y V W G G D
CTAACGAAATCAGGAACATCGCGGTTACCGACATCAACCCCAAGTACGTCTGGGGTGGTG
1930 1950 1970

A I T L D D C D L V W I D H V T
ATGCTATTACTCTTGATGACTGCGACCTGGTCTGGATCGACCATGTTACTGTACGTCTTC
1990 2010 2030

T A
ATCTTATTCAACTACTACATTATATTTCAAGAGCATTGAGTTAACATATGACAGACCGCC
2050 2070 2090

R I G R Q H Y V L G T S A D N R V S L T
CGCATCGGTGCGCCAGCACTACGTCTTGGAAACCAGCGCCGACAACCGCGTCTCTCTCACC
2110 2130 2150

N N Y I D G V S D Y S A T C D G Y H Y W
AACAACTACATTGACGGTGTCTCCGACTACTCCGCCACCTGCGATGGCTACCACTACTGG
2170 2190 2210

G I Y L D G D A D L V T M K G N Y I Y H
GGCATCTACCTCGATGGTGACGCCGACTTGGTCACCATGAAGGGCAACTACATCTACCAC
2230 2250 2270

T S G R S P K V Q D N T L L H C
ACCTCCGGCCGTAGCCCCAAGGTCCAGGACAACACTCTCCTCCACTGTGTAAGTTGCCCTT
2290 2310 2330

(fortgesetzt)

Tabelle 10 (fortgesetzt)

ATTGATAAGATGGCGATCGTGAACCAA[.]ACTTTCCACCCGATGTCCCAAGATAGGACTAA[.]

2950

2970

2990

AAGTCTAATCTGGATAGCCGAGCCGGCTATACTTCACACTCCCAAAAAGTCTTTTATTAG[.]

3010

3030

3050

TAGAGGCATCATCCTGGAATCGAATATTCTTTGCCATTCAA[.]ACTAAGTTCCAGGATTTTG[.]

3070

3090

3110

ACCC[.]TTTCCTCTCTGAAGCCAGCAAAGTAGCAAAGCAACTTATCNANACATCGAT[.]

ClaI

3130

3150

3170

Abb. 11 (Formel II): pelB

XhoI

CTCGAGTCCAGTAGTTAGTAGTTGCGGATAACAAGGATAGATCATCCCCTTTGGTTATGT

10

30

50

GTGAGTCTGACCAAGGAAGCATTGGGGGAGAGACTATTGGGTCAATGGCACTCACGGGAA

70

90

110

AAAGAGGCGAAAGGGATGGGAGAGGTGATGCCCTGAGGCCGATGAATATATCATGTGAGA

130

150

170

GCAAAGAAGATCAAACAAACAATACAAACCCCAGCGTGACCCCTCACTGCCACGTGATTT

190

210

230

CCCAGCTAATCCTCTTCGGGGTGTTTTCCCCCCAATCGGGGCTTCTTGGCAACCACTAA

250

270

290

TTCCATAATTTCCACTGGACTCTTGAACGGTTCTTGCAATGTCTCACTGTCAGACTGAG

310

330

350

AGTACCACHTTTTCTCCCTCTACCAAGCCTTGAAATAGGTCAGGGCCGTTTCATGGGACCCT

370

390

410

GACCTCCACCCCTTCGGAAGCCAGCCGGATTGCTTCTAAGACATCCTGAAGTGGGCCACC

430

450

470

ATCCGGCTCTCACCATTCTATGCTCTGCCAAGCGACTCGACCTCGTTCTTCACCGGAGT

490

510

530

SmaI

GCCCCGGTCCGCCCTGAACTCAAGGTCTGCATGGGAAGAGATTTCCGGCTGTTTCCCCCA

550

570

590

(fortgesetzt)

Abb. 11 (fortgesetzt)

NcoI

V G A A E G F A H G V T G G G S A S P V
TTGTTGGTGCCGCCGAGGGTTTCGCCCATGGTGTCACTGGCGGTGGCAGCGCTTCCCCCG

1210 1230 1250

SmaI

Y P T T T D E L V S Y L G D N E P R V I
TCTATCCTACGACTACTGATGAGCTGGTCTCTTACCTCGGAGATAACGAGCCCCGGGIGA

1270 1290 1310

I L D R T
TTATCCTGGATAGAACGTAGGTTCGATCCTCAATTGGAAATGGATGGGTAGACGTGGGCCT

1330 1350 1370

PvuII

F D F T G T E G T E T T T G
AACAGGTIGATAATCCAGCTTCGACTTCACCGGCACTGAGGGTACTGAACTACCACCGG

1390 1410 1430

C A P W G T A S Q C Q V A I N L H S W C
ATGTGCCCCCTGGGGAAGTCTTCCCAATGCCAGGTGGCCATCAACCTGCACAGCTGGTG

1450 1470 1490

D N Y Q A S A P K V S V T Y
TGACAACTACCAGGCTAGCGCCCCCAAGGTATCCGTGACTTAGTATGTTGTCCCCGTTCCG

1510 1530 1550

D K A G I L P

ATTGGTGACCCTGTCTTTCCATGCTGATAGCCGTATAGTGATAAGGCGGGTATCCTCCCC

1570 1590 1610

HincII

I T V N S N K S I V G Q G T K G V I K G
ATTACGGTCAACTCCAACAAAAGTATCGTTGGTCAGGGCACCAAGGGAGTCATCAAGGGC

1630 1650 1670

K G L R V V S G A K N V I I Q
AAGGGTCTCCGTGTGGTCAGCGGTGCCAAGAACGTCAATCCAGTGAGTGCAGAACATC

1690 1710 1730

(fortgesetzt)

Abb. 11 (fortgesetzt)

P I S G Q L F S S P D A N T N Q Q C A S
CCCATCAGCGGCCAGCTCTTCAGCTCCCCGACGCCAACACCAACCAGCAGTGCGCCTCC
2290 2310 2330

V F G R S C Q L N A F G N S G S M S G S
GTCTTCGGTCGTTCTCGCCAGCTCAACGCCTTCGGCAACTCCGGCTCGATGTCCGGATCG
2350 2370 2390

D T S I I S K F A G K T I A A A H P P G
GACACCAGCATCATCAGCAAGTTCGCTGGCAAGACCATTGCTGCGGCTCACCCCCGGGT
2410 2430 2450

N I A Q W T M K N A G Q G K
AACATTGCCAGTGGACCATGAAGAAGCTGGCCAGGGCAAATAAGGTTTTACAGCAGAA
2470 2490 2510

CAATTCTGTGAAGGAGGCTGGCCAAAGCCCAGATGAGGATAGAGGGTACCTGCTTCGACA
2530 2550 2570

TCTATAGTTCAATAGTCCAGGATTATAGACGAATGATTATTGCTCCAGAATGGTGAAGTA
2590 2610 2630

TTTCTAGCAGACCATGACGCGTACGCCAACATAGACCGCTCCATGTTACTGACTGCGACTG
2650 2670 2690

TATTTGGAGGATTGAGGAAAGGTAGATAAAAAGTATATACTACAAAACCGCCATAACAGCA
2710 2730 2750

XhoI
ACCGACGCCTCGAG
2770

Abb. 12 (Formel III): pelC

EcoRI

GAATTCGAATCTGGAGGACATTACGTGTGCCTGACTTCGGGGTACTTCTGTCTTCACTGT

10 30 50

AGCCAGGCACTATCCCTGACACTCTGCCCCCTACGTGGTCTTACCTTTATCGGATTTAGA

70 90 110

TAGTAACCAATCTGATCCCACATCCTGATACCTGGATACTTTTCCCATGGCATCGTGTA

130 150 170

ATCTATGATACTCAAAGGAACAAAGCAGATACTTGAAGCTGCATAGACCTTGTCTCAGAG

190 210 230

ATCCGAGCTTTGTTGTTTAGAAACACAGTCTGTCAACCGGTTCCGCAGATTAAGTGTTAAA

250 270 290

CATGTGACAGGCACCTAAAAGCTGACAGCCTCGGCCTGAGCTCGTAGAGTACCCCTCTTCT

310 330 350

AGGTCTTTGTGGGTTGACTGCAAGCAAAGGATCAAGCTTGTCCGAGAATTGGAGCTTTT

370 390 410

GCATGTAATTTTTCCGACTGGGGTCCGAGTATTTCCCGCGGTGTATGTTAGAATGGTTAG

430 450 470

HincII

TATGGATAGATTGGTAGAAAAGTTGACCTGAAACATTGAGATATCTGATTAGTAGTATGC

490 510 530

BglIII

TATAGATCTGGATATACATTTCTGCAATGAAATGTGATCATATGAACTTTTTGAATGAA

550 570 590

(fortgesetzt)

Abb. 12 (fortgesetzt)

BclI
GGAGATATATGCATAGTTGTGAAATATGCGCGTGGCCTGTCCGTTCTCAGCCCTGACGGG
610 630 650

TCACATCCCCTTCGGCTGTTTACTGGAAGCCGCGTGGCTGTCTCGGGGAGTGGGTACG
670 690 710

GGTCCCTCCAGGAATTTTCTTTCTAGGTTAGTTCTTCCAGCCTTCCAGGGTCTGCAGAC
730 750 770

PvuII
CCGCCTCCAAACAGCTGATTGTGGTGAACCGTTTACAAGACTGGCCAGCATATTTTGT
790 810 830

ATATGTCACATATCGTGAAGATTATATTCATCTTATAICAATTGGAGCTTGAGGTCTATCT
850 870 890

CTTAGTGTGCGCACAAAAAGCCGATATGATTCAATGCCGTCTGICAAATAACCCGAACTGT
910 930 950

HinfI
CCGAATCATCACACCCACAGAGTGTGCGAAGGTCGTGATCCTTCCAAGTATCTCAGAAA
970 990 1010

AGACCACTACACTGGACCCCCAACAAAGGTACACAATAACTTCGGGTAGAGAATTGTGCG
1030 1050 1070

ATGCAGAGCATAGTATATCTGAAACAAGTGTCACTGCAGACCTTTCCTACTTGTGCATCC
1090 1110 1130

GGTTCGCATTGCAGTGGGGCAGGGCAGTTCTTGGCCGAAGAACTATGATCACTTTGTAAC
1150 1170 1190

NcoI
AACGGTGGCCCCCTGTAGCTACCAGTGTCTGTACTTCCGGCAAATTCATCCTTGGCTTC
1210 1230 1250

(fortgesetzt)

Abb. 12 (fortgesetzt)

HincII
T T L F H A V N S V W S S I P G H A I E
CAGGACCTCTTCCACGCAGTCAACAGCGTCTGGTCTTCCATCCCCGGACACGCCATCGA

2350 2370 2390

G G D K G R G L F E G C F F E D V V E I
GGGCGGTGACAAGGGCCGGTCTTTTCGAGGGATGCTTCTTGAAGATGTTGTGAGAT

2410 2430 2450

AvaI
A P A K P E N Q L F S A S E A N A A S C
CGCCCCGCCAAGCCCGAGAACCAACTCTTCAGCGCCAGTGAAGCCAACGCCGCATCTTG

2470 2490 2510

K S A L G R A C Q A N G Y S K S G A F G
CAAGTCCGCCTTGGGACGGCTTGGCCAGGCCAATGGCTATAGCAAATCTGGTGCTTTTGG

2530 2550 2570

S S E T G F F K D F A G L T I A P A G S
CAGTCTGAAACTGGCTTTTTCAAGGACTTTGCCGACTGACTATTGCACCGGCCGGCTC

2590 2610 2630

A T D A L A Y V P K N C G I G R L E S C
TGGACCGACGCTCTCGCTTATGTTCCIAAGAATTGGGTATTGGGCGTCTTGAAAGCTG

2650 2670 2690

D A HinfI
CGATGCTTAGGGTGGAGCTTGTGAGTCTATATTTGACCAATAGGGTGTACTTTATTCTA

2710 2730 2750

XhoI
CTTCAGTCCGGTAAATATATGTAATATATTTGGATTCTGCGCGCAACTTGTGCTTTCCCTC

2770 2790 2810

AGTTCTGCAATATCCATTCAAGTAGTCTACGCATCTCTATAGACTATTGATCAATATAAC

2830 2850 2870

ATAGCAGACAACACTGCCAACCAAAAATATAAGACCCAGTATATACTTTCCGTGAAGTATT

2890 2910 2930

(fortgesetzt)

Abb. 12 (fortgesetzt)

TAAAACAGATTACATCTAGCTTGAAAATCATCCCTCTCTGGTTCAAGTATTCACGTCAGT

2950

2970

2990

AGCTGAAAAGGGAATAACGATGACCGCGAATAATTTGACAATCATCTACCCGATGAATAC

3010

3030

3050

CAATCAAGGAAAACAAAAGTCGTGAGAAAAATGCAAGGGAGAAAAGTTATATGTTACAAA

3070

3090

3110

GAAACATACAACAGAAGGAATATGTCAGTGGTCATTGAACATTACAAA

3130

3150

Abb. 13 (fortgesetzt)

PLD E L G I T V N S N K S L I G E G T S G V I K G R G L R M V S
 PLA V L G I T V T S N K S L I G E G S S G A I K G K G L R I V S
 PLB I L P I T V N S N K S I V G Q G T K G V I K G K G L R V V S
 PLC K N G I H I K S N K T L V G E G D K G V L S G K G L Y F E G

160 170 180

PLD G V S N I I I Q N I A V T D I N P E Y V W G G D A I T L D E
 PLA G A E N I I I Q N I A V T D I N P K Y V W G G D A I T L D D
 PLB G A K N V I I Q N I A V T D I N P K Y V W G G D A I T V D D
 PLC G V S N I I V Q N I K I T N L N P G F V W G G D A F T F F G

190 200 210

PLD A D L V W I D H V T T A R I G R Q H Y V L G T D A D S R V S
 PLA C D L V W I D H V T T A R I G R Q H Y V L G T S A D N R V S
 PLB S D L V W I D H V T T A R I G R Q H I V L G T S A D N R V T
 PLC A D L I W I D H C E T S L T G R Q H Y V T G F H P N T R M T

220 230 240

PLD I T N N Y I N G E S D Y S A T C D G H H Y W N V Y L D G S S
 PLA L T N N Y I D G V S D Y S A T C D G Y H Y W G I Y L D G D A
 PLB I S Y S L I D G R S D Y S A T C N G H H Y W G V Y L D G S N
 PLC W S N N F L N G V T T H S A G C D D H H Y W T M E L V G P G

250 260 270

PLD D K V T F S G N Y L Y K T S G R A P K V Q D N T Y L H I Y N
 PLA D L V T M K G N Y I Y H T S G R S P K V Q D N T L L H C V N
 PLB D M V T L K G N Y F Y N L S G R M P K V Q G N T L L H A V N
 PLC D E I T F Q N N Y V Y H T T G R G P A L S G T T L F H A V N

280 290 300

(fortgesetzt)

Abb. 13 (fortgesetzt)

PLD N Y W E N N S G H A F E I G S G G Y V L A E G N Y F S N V D
PLA N Y F Y D I S G H A F E I G E G G Y V L A E G N V F Q N V D
PLB N L F H N F D G H A F E I G T G G Y V L A E G N V F Q D V N
PLC S V W S S I P G H A I E G G D K G R G L F E G C F F E D V V

310 320 330

PLD T V L E T D T F E G A L F S S D S A S S T - - C E S Y I G R
PLA T V L E T - - Y E G A A F T V P S T T A G E V C S T Y L G R
PLB I V V E T - P I S G Q L F S S P D A N T N Q Q C A S V F G R
PLC E I A P A K P E N Q - L F S A S E A N A A S - C K S A L G R

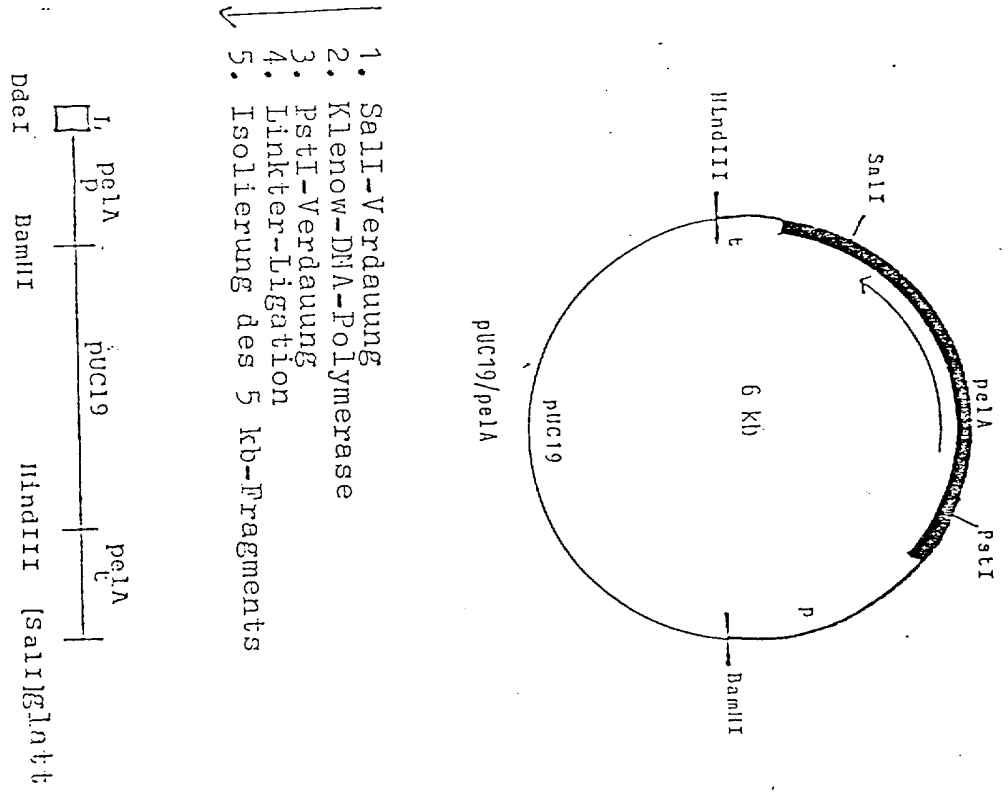
340 350 360

PLD S C V A N V N G G D L T G T S T T V L S N L S G D T L P S A
PLA D C V I N G F G C S G T F S E D S T S F L S D F E G K N I A
PLB S C Q L N A F G N S G S M S G S D T S I I S K F A G K T I A
PLC A C Q A N G Y S K S G A F G S S E T G F F K D F A G L T I A

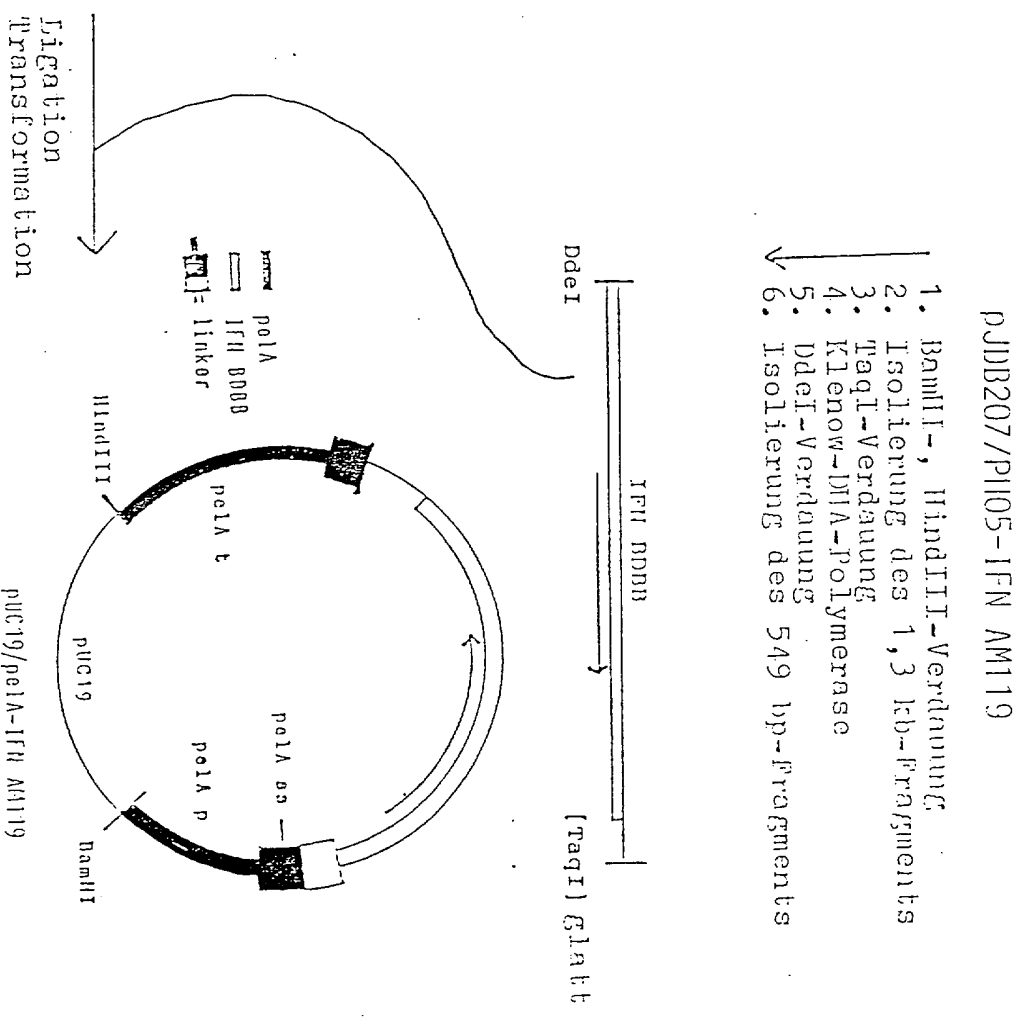
370 380

PLD D A - A S T S P A S - - - - N A G Q G N L
PLA S A S A Y T S V A S R V V A N A G Q G N L
PLB A A H P P G N I A Q W T M K N A G Q G K
PLC P A G S A T D A L A Y V P K N C G I G R L E S C D A

Abb. 14: Konstruktion von Plasmid pUC19/pelA-IFN AM119



1. Sali-Verdauung
2. Klenow-DNA-Polymerase
3. PstI-Verdauung
4. Linkter-Ligation
5. Isolierung des 5 kb-Fragments



1. BamHI-, HindIII-Verdauung
2. Isolierung des 1,3 kb-Fragments
3. TagI-Verdauung
4. Klenow-DNA-Polymerase
5. DdeI-Verdauung
6. Isolierung des 549 bp-Fragments

Ligation
Transformation

pUC19/pelA-IFN AM119

