



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 298 821 A5

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

5(51) C 12 N 15/81
C 12 N 15/65

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 339 797 6	(22)	17.04.90	(44)	12.03.92
(71)	Zentralinstitut für Genetik u. Kulturpflanzenforschung, Corrensstraße 3, O - 4325 Gatersleben, DE				
(72)	Kunze, Gotthard, Dr. sc. nat., DE; Pich, Uta, Dipl.-Biol., DE; Lietz, Karsten, Dipl.-Ing., DE; Barner, Andreas, Dipl.-Ing., DE; Büttner, Roland, Dr. sc. nat., DE; Bode, Rüdiger, Dr. sc. nat., DE; Conrad, Udo, Dr. rer. nat., DE; Samsonova, Ida, Dr. rer. nat., SU; Schmidt, Heike, Dr. rer. nat., DE				
(73)	Zentralinstitut für Genetik und Kulturpflanzenforschung, O - 4325 Gatersleben; Ernst-Moritz-Arndt-Universität, O - 2200 Greifswald, DE				
(74)	siehe (71)				
(54)	Wirts-Vektor-System und Verfahren zu seiner Herstellung				

(55) Wirts-Vektor-System; Hefe; Selektionsmarker; Transformation; screening; Plasmidvektor; Strukturgene; Genprodukt

(57) Die Erfindung auf dem Gebiet der Biotechnologie betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Wirts-Vektor-Systems aus einem Wirts-Mikroorganismus-Stamm der Art *Arxula adenivorans* und einem Plasmidvektor mit einem Selektionsmarker, um ein industriell verwendbares Genprodukt herstellen zu können, wobei verschiedene bereits bekannte Vorteile der genannten Hefe-Art ausgenutzt werden können: hohe Zelltiter, niedriger Aufwand für das Kühlen beim Fermentieren usw. Dazu wird als Selektionsmarker ein homologes Gen aus *Arxula adenivorans* oder ein heterologes Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* oder einer anderen Hefe verwendet; für beide Arten wurde ein passendes Gen *LYS2* gefunden. Weil dabei der pH-Wert der Gen-Produkte herabgesetzt wird, ist ein Wachstum fast aller Bakterien ausgeschlossen, was vor allem bei der Einhaltung von Stabilitätsbedingungen vorteilhaft ist.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Wirts-Vektor-Systems, das aus einem Wirts-Mikroorganismus-Stamm der Art *Arxula adeninivorans* (zeitweilig als Art „*Trichosporon adeninovorans*“ bezeichnet) und einem Plasmidvektor mit einem DNS-Fragment besteht, welches einen Selektionsmarker enthält, dadurch gekennzeichnet, daß als Selektionsmarker ein homologes Gen aus *Arxula adeninivorans* oder ein heterologes Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* oder einer anderen Hefe verwendet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das DNS-Fragment ein Gen LYS2 (Fig. 1) aus *Arxula adeninivorans* oder ein Gen LYS2 (Fig. 2) aus *Saccharomyces cerevisiae* oder einer anderen Hefe enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen LYS2 aus *Arxula adeninivorans* durch Hybridisierung gegen das Gen LYS2 aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) ein Plasmidvektor mit einem der Gene LYS2 in entsprechenden lys2-Mutanten des Wirts-Mikroorganismus-Stammes transformiert wird,
 - b) durch screening diejenigen Transformanten ermittelt werden, die Plasmide mit dem Gen LYS2 oder DNS aus diesen Plasmiden enthalten, und
 - c) die Transformanten durch teilweise autonom replizierende und teilweise in das Genom des Wirts-Mikroorganismus-Stammes integrierte Plasmide charakterisiert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Plasmidvektor ein weiteres DNS-Fragment aufweist, das ein fremdes Gen, beispielsweise ein für die Produktion von Proteinen kodierendes Strukturgen, aufweist.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Plasmidvektor weitere Gene oder Genabschnitte, beispielsweise zur Steuerung der Expression, vorgesehen sind.

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Wirts-Vektor-Systems, das aus einem Wirts-Mikroorganismus-Stamm der Art *Arxula adeninivorans* (zeitweilig als Art „*Trichosporon adeninovorans*“ bezeichnet) und einem Plasmidvektor mit einem DNS-Fragment besteht, welches einen Selektionsmarker enthält,

Stand der Technik

Die Verwendung von Hefestämmen, vor allem der Art *Saccharomyces cerevisiae* zur Herstellung beispielsweise von menschlichem Lysozym /1/, Interleukin 2 /2/, Antithrombin III /3/, alpha-Amylase aus Weizen /4/, der Maus /5/ oder *Bacillus amyloliquefaciens* /6/, Glukoamylase aus *Aspergillus awamori* /7/ oder *Rhizopus oryzae* /8/, beta-Glukanase aus *Bacillus subtilis* /9/, *Bacillus macerans* /10/ oder *Trichoderma reesei* /11/, Chymosin /12/ oder Azetolaktat-Dekarboxylase aus *Enterobacter aerogenes* /13/ ist bekannt.

Dabei zeigte es sich, daß nicht jeder dieser Produkte in der für eine industrielle Ausnutzung erwünschten Art und Menge in einem Hefestamm erzeugt werden kann. Durch unterschiedliche Glykolisierung, ungenaues Abspalten von Sekretions-Sequenzen oder fehlenden oder eingeschränkten Transport des Produktes innerhalb einer Hefezelle und aus einer Hefezelle heraus werden die Eigenschaften des als Produkt beabsichtigten Proteins von dem Wirt selbst nämlich negativ beeinflusst.

Deshalb sind auch außerhalb von *Saccharomyces cerevisiae* eine ganze Reihe von (unterschiedlich gut funktionierenden) Wirts-Vektor-Systemen entwickelt worden, so von *Candida albicans* (US 4735901; EP 173668), *Candida maltosa* /14/; /15/, *Pichia pastoris* (EP 312934; DD 255544); /16/, *Pichia quilliermondii* /14/, *Kluyveromyces lactis* /17/; /18/, *Hansenula polymorpha* /19/; /20/, *Yarrowia lipolytica* (DD 267997; DD 267998; DD 269397); /21/ oder *Schizosaccharomyces pombe* /22/. Alle diese Wirts-Vektor-Systeme sind jeweils für ein bestimmtes Genprodukt gut, für andere heterologe Genprodukte meist weniger geeignet.

Will man ein mit dem gewünschten (natürlichen) Protein möglichst identisches Protein (gleiche primäre, sekundäre und tertiäre Struktur, gleiche Eigenschaften) durch genetic engineering in einer Hefe herstellen, dann ist deshalb ein Test in jeweils ganz unterschiedlichen Wirts-Vektor-Systemen erforderlich, da beispielsweise der Grad und die Art der Glykosilierung oder die Ausbildung entsprechender räumlicher Strukturen wirtsspezifisch sind.

In jüngster Zeit ist auch die Art *Arxula adeninivorans* näher untersucht worden; vor allem einige biochemische Eigenschaften wie beispielsweise die Isolierung, Reinigung und Charakterisierung einer Glukoamylase und einer beta-Glukosidase sind bereits beschrieben worden, und molekularbiologisch konnte etwa die ungefähre Größe des Genoms bestimmt werden (DD 265163; DD 268254; DD-Patentanmeldung WP C12N/327536); /23/.

Als Wirts-Vektor-System konnte *Arxula adeninivorans* bisher aber noch nicht benutzt werden, obwohl es gegenüber den bereits in der industriellen Verwendung befindlichen Hefen eine Reihe von Vorteilen hat, die seinen Einsatz als äußerst wünschenswert erscheinen lassen. So gestattet ein schnelles Wachstum seinen Einsatz in der „single cell production“. Es handelt sich zudem um eine toxikologisch unbedenkliche Hefe, die auch in der Nahrungsmittelindustrie verwendet werden darf. Ferner gewährleistet das Erreichen von sehr hohen Zelltitern in der stationären Wachstumsphase eine hohe Ausbeute von intra- oder extrazellulär gebildeten Genprodukten. Schließlich ist ein Wachstum auch bei einer Temperatur bis zu 45°C möglich, ganz im Gegensatz zu anderen Hefen (30°C), so daß unter Umständen ein bei der Fermentation allgemein üblicher Kühlaufwand verringert oder weggelassen werden kann.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, bestimmte Proteine und dgl. als Genprodukte mittels Hefestämmen der Art *Arxula adeninivorans* zu gewinnen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Es ist demzufolge die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung eines Wirts-Vektor-System anzugeben, in dem sowohl ein geeigneter Selektionsmarker als auch bestimmte Produktgene oder regulatorische DNS-Sequenzen untergebracht werden können.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß als Selektionsmarker ein homologes Gen aus *Arxula adeninivorans* oder ein heterologes Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* oder einer anderen Hefe verwendet wird. Der Plasmidvektor enthält dabei ein DNS-Fragment, das vorzugsweise ein Gen LYS 2 (Fig. 1) aus *Arxula adeninivorans* oder ein Gen LYS 2 (Fig. 2) aus *Saccharomyces cerevisiae* oder einer anderen Hefe besitzt. Besonders günstig ist es, wenn das Gen LYS 2 aus *Arxula adeninivorans* durch Hybridisierung gegen das Gen LYS 2 aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert und a) ein Plasmidvektor mit einem der beiden Gene LYS 2 in entsprechenden lys 2-Mutanten des Wirts-Mikroorganismus-Stammes transformiert wird, b) durch screening diejenigen Transformanten daraus ermittelt werden, die Plasmide mit dem Gen LYS 2 oder DNS aus diesen Plasmiden enthalten, und c) die Transformanten durch teilweise autonom replizierende und teilweise in das Genom des Wirts Mikroorganismus-Stammes integrierte Plasmide charakterisiert werden. Es ist denkbar, daß der Plasmidvektor ein weiteres DNS-Fragment aufweist, das ein fremdes Gen, beispielsweise ein für die Produktion von Proteinen kodierendes Strukturgen, aufweist, und daß auf dem Plasmidvektor weitere Gene oder Genabschnitte, beispielsweise zur Steuerung der Expression, vorgesehen sind.

Durch die Erfindung ist ein Wirts-Vektor-System geschaffen, bei dem auf eine Fermenterkühlung während der industriellen Vermehrung völlig verzichtet oder bei dem diese vermindert werden kann. Oberhalb 42°C sind andere industriell genutzte Hefen nicht mehr lebensfähig bzw. sind sie (bei sporenbildenden Hefen) auf Sporelierung beschränkt. Weil ferner durch Stoffwechselprodukte der pH-Wert der Produkte herabgesetzt wird, ist ein Wachstum fast aller Bakterien ausgeschlossen, was vor allem bei der Einhaltung von Stabilitätsbedingungen vorteilhaft ist. Damit ist aber das erfindungsgemäße Wirts-Vektor-System vergleichbaren anderen Lösungen bei der praktischen Ausnutzung im Produktionsprozeß überlegen.

Ausführungsbeispiel

Weitere Vorteile und die näheren Einzelheiten der Erfindung werden nachstehend an Hand der Zeichnung an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert. Es zeigen

- Fig. 1: die Restriktionskarte des LYS2-Gens aus *Arxula adeninivorans* Ls3,
- Fig. 2: die Restriktionskarte des LYS 2-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae*,
- Fig. 3: ein Plasmid Yep 13/chromosomale DNS Ls3 (in den unikalen BamHI-Restriktionsort des Plasmids Yep 13 wurden mit der Restriktionsendonuklease Sau 3A geschnittene Fragmente chromosomaler DNS eingebaut),
- Fig. 4: die Restriktionskarte des ILV 1-Gens von *Arxula adeninivorans* Ls3 (mittels Komplementation der *ilvA*-Mutation in *Escherichia coli* Cu 106 kann die genaue Länge des ILV 1-Gens bestimmt werden),
- Fig. 5: ein Plasmid pTALa 2,
- Fig. 6: ein Plasmid pBao 1,
- Fig. 7: ein Plasmid pilv 1 (LYS 2),
- Fig. 8: ein Plasmid pilv 1/3,
- Fig. 9: ein Plasmid pDP 12,
- Fig. 10: ein Plasmid pDP 13 und
- Fig. 11: ein Plasmid pLYS 2.

Bei den Darstellungen der DNS in den Plasmiden bedeutet eine einfache dünne Linie Herkunft aus *Escherichia coli*, eine doppelte dünne oder breite Linie Herkunft aus *Saccharomyces cerevisiae* und eine einfache oder kreuzförmig geschraffte Linie Herkunft aus *Arxula adeninivorans*.

1. Herstellung von Genbanken von *Arxula adeninivorans* Ls3

1.1. Isolierung von chromosomaler DNS von *Arxula adeninivorans* Ls3

Die Hefe *A. adeninivorans* Ls3 wird für 18 h in 300 ml Hefe-Vollmedium (HVM) bei 37°C inkubiert, welches 1% Glukose, 0,5% Pepton und 0,5% Hefeextrakt enthält. Nachdem die Hefezellen mit 5000 g 10 min lang abzentrifugiert und zweimal in einer Lösung von 2 mM Tris und 50 mM EDTA, 2,5% SDS mit pH = 8,0 gewaschen worden sind, werden sie bei -20°C eingefroren. Die Hefezellen werden mechanisch durch Zerreiben mit Trockeneis aufgeschlossen und anschließend in einer Lösung von 6,4 ml TE (d. i. 10 mM Tris und 1 mM EDTA mit pH = 8,0), 0,6 ml 0,5 molarem EDTA, 0,6 ml 1 molarem Tris mit pH = 7,4 und 0,32 ml 10%igem SDS suspendiert und 30 min lang unter Schütteln bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml 4 molarem Natriumazetat von pH = 7,0, einstündiger Inkubation bei 0°C und 15minütiger Zentrifugation bei 15000 g werden die Nukleinsäuren mittels 2,5 Vol Ethanol ausgefällt, bei ebenfalls 15000 g abzentrifugiert und in 4 ml TE gelöst. Die noch vorhandene RNS wird durch Zugabe von 0,3 ml RNase auf eine Endkonzentration von 0,1 g/l und 30minütiger Inkubation bei 37°C abgebaut, die Proteine durch weitere Zugabe von 0,25 ml Pronase N (Vertrieb: SERVA Feinbiochemica GmbH & Co.) auf eine Endkonzentration von 1 g/l und nachfolgender abermaliger 30minütiger Inkubation bei 37°C. Ein vollständiger Abbau der Proteine in der Nukleinsäure-Lösung findet nach dreimaligem Zufügen von Phenol/Chloroform (im Verhältnis 1:1) und anschließender einmaliger Chloroformbehandlung statt. Danach werden 1/10 Volumen 3 molares Natriumazetat und 2 Volumen Ethanol zugesetzt und die DNS bei -20°C für 18 h ausgefällt. Die isolierte DNS wird abschließend in einem möglichst kleinen Volumen (<5 ml) gelöst.

1.2. Herstellung von Genbanken der Gattung *Arxula adeninivorans*

Mit Hilfe der unter 1.1. beschriebenen Methode wird eine chromosomale DNS mit einem Molekulargewicht von 80 kbp isoliert. Nach partieller Spaltung dieser DNS mit der Restriktase EcoRI und Isolierung von 10 bis 15 kbp großen, restriktase-erzeugten DNS-Fragmenten /24/ werden diese in den Phagen Charon 4A eingebaut, und man erhält so eine Genbank von etwa 400000 rekombinanten Phagen.

Zusätzlich werden die 80 kbp großen chromosomalen DNS-Fragmente partiell mit der Restriktase Sau 3A gespalten. Man isoliert 5 bis 8 kbp große DNS-Fragmente und baut sie in den unikalen Restriktionsort BamHI eines Hybridplasmids Yep 13, bestehend aus DNS von *E. coli* und *S. cerevisiae* /25/ ein (Fig. 3).

2. Screening der beiden Genbanken aus 1.2.

Aus den ca. 400000 rekombinanten Phagen (Charon 4A/Ls3) werden mittels DNS-Hybridisierung Gene wie folgt isoliert und identifiziert.

Mit dem Phagen Charon 4A/Ls3 infizierte Zellen von *E. coli* LE392 (supE supF hsdR⁻ M⁺S⁺ met trpR lac) werden auf NBY-Agar-Platten durch Übersichtung des Grund-NBY-Agars aufgetragen und 18 h bei 37°C inkubiert. Nach Bildung von Phagen-Plaques werden diese auf Filter aus Nitrozellulose überführt, durch zweimaliges, 5 min währendes Waschen mit einer 0,5 molaren NaOH-Lösung lysiert und deren DNS denaturiert und anschließend durch wiederum zweimaliges und 5 min währendes Waschen in 1 molarer Tris-HCl von pH = 7,4 und 5 min Behandlung in 1,5 molarer NaCl mit 0,5 molarer Tris-HCl von pH = 7,4 wieder neutralisiert.

Die Filter mit der nunmehr fest adsorbierten einzelsträngigen DNS der Phagen Charon 4A/Ls3 werden jetzt 2 h bei 80°C inkubiert und anschließend 5 min in einer 6 × SSC-Lösung (10 × SSC bestehen aus 1,5 M NaCl, 0,15 M Natriumzitat; pH = 7,0) bei Raumtemperatur behandelt. Noch vor der „Vorhybridisierung“ sind die Filter 1,5 h bei 50°C in einer Vorwaschlösung aus 50 mM Tris mit pH = 8,0, 1 M NaCl, 1 mM EDTA und 0,5% SDS inkubiert worden, und danach ist dann bei 50°C eine Lösung von 0,25% Magermilchpulver, 0,1% SDS und 0,1 g/l Kalbsthymus-DNS 4 h lang vorhybridisiert worden.

Für die Hybridisierung wird die gleiche Lösung verwendet, die aber zusätzlich eine radioaktiv markierte DNS /26/ enthält; sie wird bei 50°C 20 h lang vorgenommen.

Danach werden die Filter je einmal in einer 2 × SSC-Lösung mit 0,1% SDS bei Raumtemperatur und bei 50°C gewaschen, und zwar jeweils 30 min lang, und schließlich noch einmal in einer 1 × SSC-Lösung mit 0,1% SDS bei wiederum 50°C für 1 h. Nach Abtrocknung werden durch Autoradiographie die DNS-Stränge der hybridisierten Phagen-Plaques sichtbar.

In der Tabelle 1 ist das Ergebnis der Hybridisierung von Genen bzw. Promotor- und Terminatorsequenzen von *S. cerevisiae*, *Bacillus* und *E. coli* mit ³²P-markierter chromosomaler DNS aus *A. adeninivorans* Ls3 aufgelistet.

Tab. 1

Organismus	DNS-Fragment	Hybridisierung
<i>S. cerevisiae</i>	LYS2	+
	LEU2	-
	ARG4	-
	URA3	-
	TRP1	-
	HIS3	-
	AROM	+
	CEN6	+
	CEN5	+
	CUP1	+
	SUP4	-
	TY96	-
	GAL1 Promotor	-
	GAP Promotor	-

Tab. 1

Organismus	DNS-Fragment	Hybridisierung
	ADH1 Promotor/Terminator	--
	PHO5 Promotor/Terminator	--
	CYC1 Promotor/Terminator	--
<i>Neurospora crassa</i>	Bml ⁻	--
<i>E. coli</i>	aroA	+
<i>B. amyloliquorfaciens</i>	amyA	-
<i>B. macerans</i>	bglM	--

Ist in Tab. 1 ein „+“-Zeichen eingetragen, dann konnte die Hybridisierung im Kontrollversuch nachgewiesen werden. Durch Hybridisierung der DNS der LYS2-Region von *S. cerevisiae* gegen die DNS der rekombinanten Phagen (Charon 4A/Ls3) ist es möglich, ein DNS-Fragment von *A. adeninivorans* zu isolieren, dessen DNS-Sequenz derjenigen der LYS2-Region sehr ähnelt bzw. das zugehörige Gen kodiert. Durch verschiedene Restriktions-Spaltungen kann davon die Restriktionskarte der Fig. 1 ermittelt werden.

Das screening aller Yep 13/chromosomale DNS-Klone erfolgt durch Komplementation der entsprechenden *E. coli*-Mutanten. Das Ergebnis zeigt Tabelle 2.

Tab. 2

Gen	Komplementation	Gen	Komplementation
argH	--	ilvA	+
aroA	--	aroB	--
aroC	--	aroD	--
aroE	--	aroFGH	--
trpE	--	pyrF	--
pyrC	--	pro	--

Es gelingt also, die *ilvA*-Mutation zu komplementieren und von den entsprechenden Ls3-DNS-Fragmenten eine Restriktionskarte aufzustellen. Durch Umklonierung dieser (und noch kleinerer) DNS-Fragmente in *E. coli*-Plasmide pAT 153 /24/) und in „bluescribe“-Vektoren der Fa. Stratagene und darauffolgende Überprüfung der erhaltenen Klone auf Komplementation der *ilvA*-Mutation von *E. coli* Cu 106 (*ilvA* galT) gelingt es, die Länge dieses DNS-Fragments auf 1,6 kbp zu verringern (siehe Fig. 4).

3. Transformation von *Arxula adeninivorans* Ls3

Voraussetzung für die Transformation ist, daß neben den entsprechenden Genen auch die zugehörigen Mutanten verfügbar sind. Mittels Mutagenese mit Nitrosoguanidin wurden die folgenden *A. adeninivorans*-Mutanten isoliert:

<i>A. adeninivorans</i> I 266	ade	lys 2/5
<i>A. adeninivorans</i> I 317	nic	lys 2/5
<i>A. adeninivorans</i> I 704	cys	lys 2/5

Weil das Gen LYS2 und das Gen LYS5 ein Protein, das Enzym Aminoacidipat-Reduktase kodieren, ist es nicht möglich, mittels biochemischer Untersuchungen zu klären, ob die oben angegebenen Mutanten I 266, I 317 oder I 704 lys2- oder lys5-Mutanten sind.

Es kann nun versucht werden, in diese Mutanten Plasmide zu transformieren, die bei erfolgreicher Transformation eine phänotypische Komplementierung der lys2-Mutation erreichen. Dabei zeigt es sich, daß dies bei *A. adeninivorans* I 704 möglich ist. Deshalb wird diese Mutante als „I 704 (cys lys2)“ bezeichnet. Wegen einer geringen Reversionsrate von $< 10^{-8}$ ist ein solcher Stamm für die nachfolgend beschriebenen Transformationsexperimente besonders geeignet.

3.1. Optimierung der Transformanten *Arxula adeninivorans*/Ls3

Es wird eine bereits beschriebene Methode /27/ für die Transformation von *A. adeninivorans*/Ls3 modifiziert. Besonders günstig ist es, wenn wie folgt verfahren wird.

A. adeninivorans-Zellen werden in HVM bis zu einer Zelldichte von etwa 5×10^8 -Zellen/ml kultiviert. Daraus werden 10^8 -Zellen entnommen, abzentrifugiert und in $1 \times \text{TE}$ (10 mM Tris und 1 mM EDTA mit pH = 8,0) gewaschen. Die 5 min lang mit 5000 g bei 20°C zentrifugierten Zellen werden in einer Lösung von 20 mM Tris mit pH = 7,5, 2 mM EDTA und 0,2 M LiCl suspendiert und 1 h bei 30°C langsam geschüttelt. Anschließend werden Aliquote (0,1 ml entsprechend 10^7 -Zellen) abgenommen, und dazu werden 0,001 mg Plasmid-DNS gegeben. Nach abermaliger 30minütiger Inkubation bei 30°C und bei langsamem Schütteln wird ein gleiches Volumen 70%iges Polyethylenglykol (PEG 4000) zugegeben. Nun werden die Proben erneut 1 h lang bei 30°C inkubiert; anschließend wird eine Hitzebehandlung während 5 min bei 37°C vorgenommen und nach wiederum 5minütiger Inkubation im Eisbad werden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und in 0,2 ml SOS (1 M Sorbit, 10 mM CaCl₂ und 33% HVM mit pH = 6,0) 1 h lang bei 30°C unter leichtem Schütteln suspendiert. Anschließend werden in bekannter Weise /28/ entsprechende Aliquote auf Hefe-Minimalmedium HMM /29/ mit den entsprechenden Supplementen ausplattiert und 3 d bis 5 d bei 30°C inkubiert.

Es wurde ohne Erfolg versucht, bessere Ergebnisse durch Veränderung des zur Transformation gehörigen Zelltiters, der Konzentration von LiCl und PEG und der Temperatur während des Hitzeschocks zu erzielen.

3.2. Transformation in *A. adeninivorans* 1704

Für alle weiteren Transformationen wird als Selektionsmarker das LYS2-Gen sowohl von *A. adeninivorans* (Fig. 1) als auch von *S. cerevisiae* (Fig. 2) benutzt. Beide Gene sind in den gemäß Fig. 5 bis Fig. 11 konstruierten Plasmiden vorhanden. Es wird versucht, die Transformation gemäß 3.1. in *A. adeninivorans* 1704 auszuführen. Das Ergebnis zeigt Tabelle 3.

Tab.3

Plasmid	Transformations- frequenz	Anzahl der Transformanten/0,001 mg DNS
pDP12	$1,8 \times 10^{-6}$	18
pDP13	$7,0 \times 10^{-7}$	7
pLYS2	$2,0 \times 10^{-7}$	2
pTALa2	$9,0 \times 10^{-7}$	9
pBao2	$2,0 \times 10^{-7}$	2
pilv1 (LYS2)	$3,0 \times 10^{-7}$	3
pilv1/3	0	0

Der Versuch wurde also belohnt: es konnten Transformanten nachgewiesen werden, sowohl bei Verwendung des *S. cerevisiae*-LYS2-Gens als auch des *A. adeninivorans*-Ls3-Gens als Selektionsmarker. Das Plasmid pilv1/3, das keinen dieser beiden Selektionsmarker enthielt, diente als Kontroll-Plasmid.

3.3. Charakterisierung der Transformanten

Die oben isolierten *A. adeninivorans*-Transformanten weisen auch bei Wachstum unter nicht-selektiven Bedingungen eine hohe mitotische Stabilität auf (90% bis 95% nach 16 Generationen), deren Ursache die Integration der Plasmide in das Hefegenom ist. Mittels Retransformation der Gesamt-DNS /30/ in *E. coli* DH5 /31/ gelingt es, Plasmide zu isolieren, die neben dem beta-Laktamase-Gen (Ampizillin-Resistenz) das entsprechende LYS2-Gen enthalten, sich hinsichtlich ihres Molekulargewichtes jedoch vom jeweiligen Ausgangsplasmid unterscheiden. Ursache hierfür ist möglicherweise die Integration in das und anschließende Wiederfreisetzung aus dem Genom von *A. adeninivorans*, ein Phänomen, das auch bei anderen Hefearten wie *Candida maltosa* schon bekannt und beschrieben /15/ ist.

Literatur

- Hayakawa, T., Toibana, A. et al., *Gene* 56 (1987) 53-59;
- Ernst, J.F., Richman, C.H., *Bio/Technol.* 7 (1989) 716-720;
- Bröcker, M., Ragg, H. et al., *Biochem. Biophys. Acta* 908 (1987) 203-213;
- Rothstein, S.J., Lazarus, C.M. et al. *Nature* 308 (1984) 662-665;
- Thomsen, K.K., Carlsberg Res. Commun. 48 (1983) 545-555;
- Kunze, G., Meixner, M. et al. *J. Bioeng.* 7 (1987) 33-48;
- Innis, M.A., Holland, M.J. et al., *Science* 228 (1985) 21-26;
- Aashikar, T., Nakamura, N. et al., *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 2521-2523;
- Linchcliffe, E., Box, W.G., *Curr. Gent.* 8 (1984) 471-475;
- Kunze, G., Hofmeister, J., *Z. f. BioEngineering* 5/1 (1989) 12-18;
- Penttilä, M.E., Sulhko, M.L. et al., *Curr. Gent.* 12 (1987) 413-420;
- Moir, D., Duncan, M. et al., *Biotech.* 84 (1984) 189-197;
- Sone, H., Kondo, K. et al., *Proc. 21st EBC Congress* (1987) 545-552;
- Kunze, G., Petzoldt, C. et al., *Curr. Genet.* 9 (1985) 205-209;
- Kunze, G., Bode, R. et al., *Curr. Genet.* 11 (1987) 385-391;
- Sreekrishna, K., Potenz, R.H.B. et al., *J. Basic Microbiol.* 28 (1988) 265-278;
- Bianchi, M.M., Falcone, C. et al., *Curr. Genet.* 12 (1987) 185-192;
- Chen, X.J., Wesolowski-Louvel, M. et al., *J. Basic Microbiol.* 28 (1988) 211-220;
- Roggenkamp, R., Hansen, H. et al., *Mol. Gen. Genet.* 202 (1986) 302-308;
- Gleeson, M.A., Ortori, G.S. et al., *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986) 3459-3465;
- Gaillardin, C., Heslot, H., *J. Basic Microbiol.* 28 (1988) 161-174;
- Wright, A.P.H., Maundrell, K. et al., *Curr. Genet.* 10 (1986) 503-508;
- Glenow, U., Kunze, G. et al., *Zentralbl. Mikrobiol.* 145 (1990) 3-12;
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Lab., N.Y. (1982);
- Andreadis, A., Hsu, Y.P. et al., *Cell* 31 (1982) 319-325;
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B., *Anal. Biochem.* 132 (1983) 6-13;
- Ito, H., Fukuda, Y. et al., *J. Bacteriol.* 153 (1983) 153-158;
- Bruschi, C.V., Comer, A.R., *Yeast* 3 (1987) 131-137;
- Tanaka, A., Ohnishi, N. et al., *J. Ferment Technol.* 45 (1987) 617-623;
- Livingston, D.M., Kupfer, D.M., *J. Mol. Biol.* 116 (1977) 249-260;
- Hanahan, D., *J. Mol. Biol.* 116 (1983) 557-580.

Fig. 1

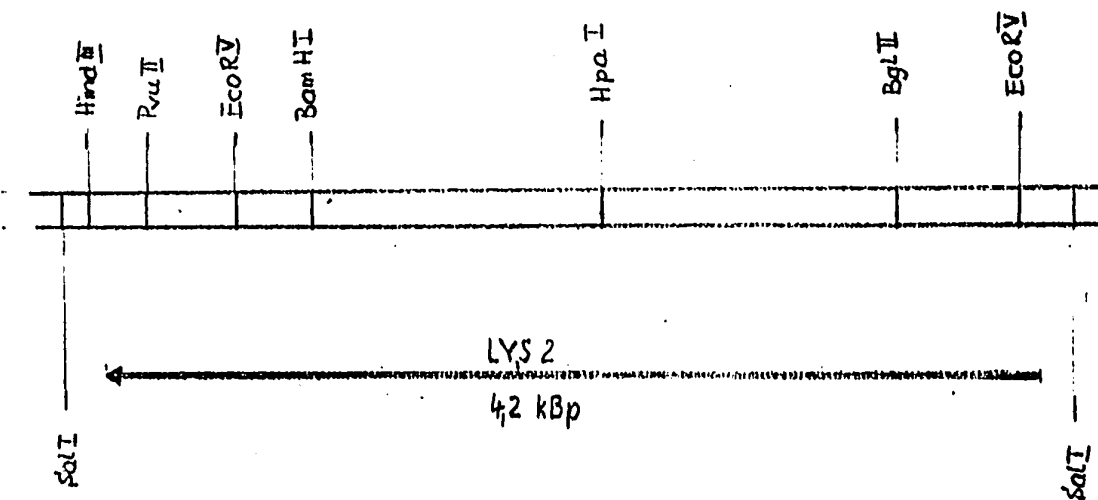
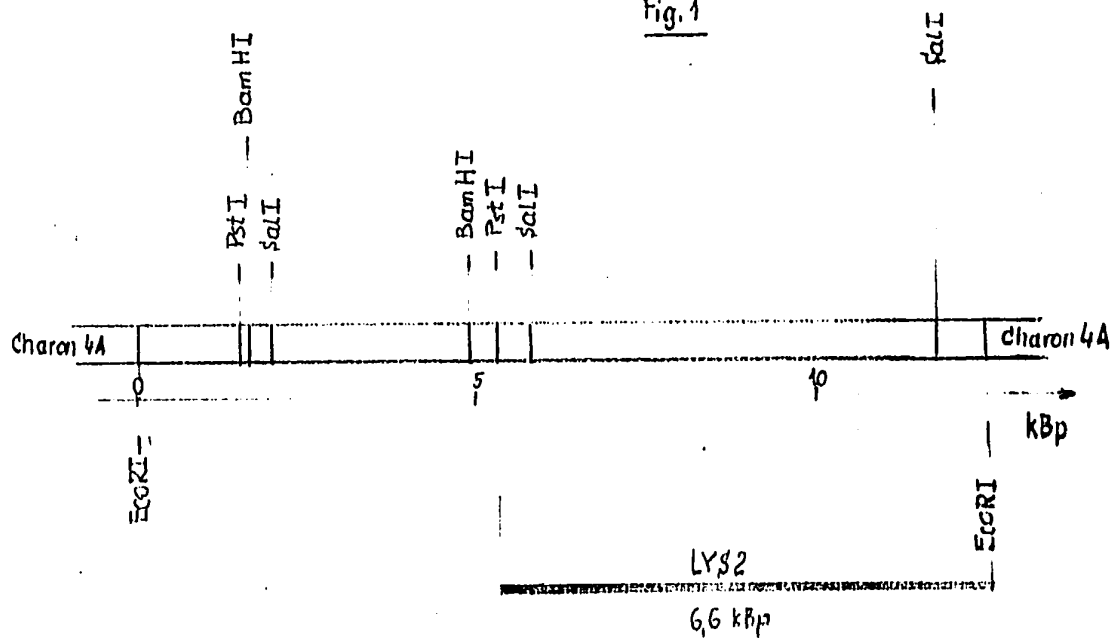


Fig. 2

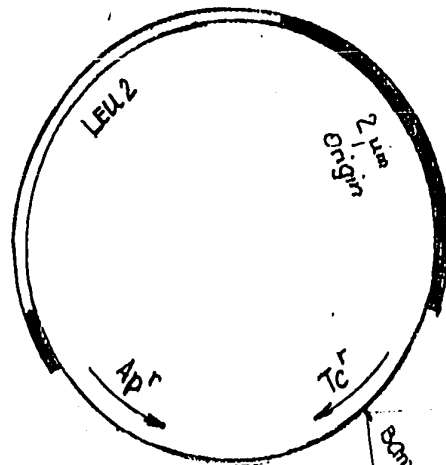


Fig. 3

BamHI
 Sau 3A
A. adenivorans
 LS 3 - DN₅
 5 bis 8 kbp

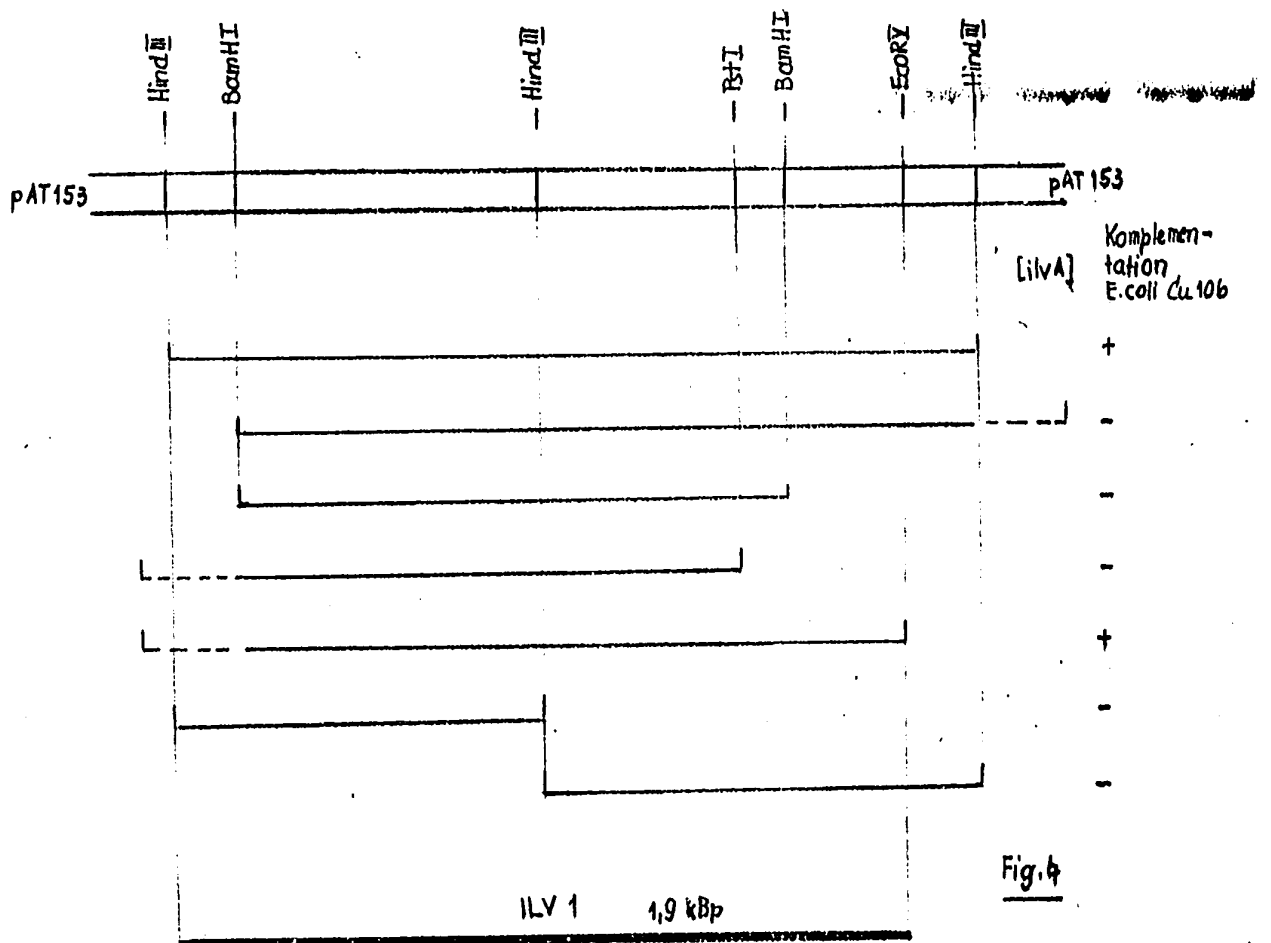


Fig. 4

