

**Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**Entwicklung  
eines Expressionssystems  
zur Produktion  
therapeutischer Proteine  
in filamentösen Hyphenpilzen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von

**Silke Alves**

**Kiel**

**2006**

Referent: Prof. Dr. Frank Kempken

Koreferent: Prof. Dr. Ruth Schmitz-Streit

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2006

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 9.11.2006

Der Dekan

**meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>A.</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen.....</b>	<b>I</b>
<b>B.</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen.....</b>	<b>III</b>
<b>C.</b>	<b>Verzeichnis der Tabellen.....</b>	<b>VI</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Einsatz von Mikroorganismen in der Biotechnologie .....	1
1.2	Hyphenpilze in der Biotechnologie.....	2
1.3	Expression heterologer Gene in Hyphenpilzen.....	4
1.4	Struktur heterologer Expressionssysteme .....	6
1.4.1	Transkriptionskontrolle und Transkriptionsinitiation .....	7
1.4.2	Sekretion heterologer Proteine .....	8
1.4.3	Transkriptionstermination.....	9
1.4.4	Posttranslationale Modifikationen .....	10
1.5	Anwendungen der heterologen Proteinproduktion.....	11
1.6	Optimierung der heterologen Proteinproduktion .....	13
1.6.1	Optimierung der Wirtsorganismen .....	13
1.6.2	Optimierung der Kulturbedingungen .....	14
1.7	Der Modellorganismus <i>Neurospora crassa</i> .....	15
1.8	Ziel der Arbeit.....	18
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1	Material .....	20
2.1.1	Organismen.....	20
2.1.2	Oligonukleotide .....	20
2.1.3	Plasmide .....	22
2.1.4	Membranen und Filter .....	25
2.1.5	Chemikalien .....	25
2.1.6	Radiochemikalien.....	25
2.1.7	Größenstandards .....	25
2.1.8	Enzyme .....	26
2.1.9	Kits .....	26
2.1.10	Antikörper.....	26
2.1.11	Häufig verwendete Lösungen .....	27

2.1.12	Nährmedien für <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.1.13	Nährmedien für <i>Neurospora crassa</i> .....	28
2.2	Molekularbiologische Methoden .....	30
2.2.1	Kultur- und Anzuchsbedingungen .....	30
2.2.1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	30
2.2.1.2	<i>Neurospora crassa</i> .....	30
2.2.2	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen .....	31
2.2.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	31
2.2.4	Transformation von <i>Neurospora crassa</i> .....	31
2.2.5	Mikrokonidien-Passage von <i>Neurospora crassa</i> .....	32
2.2.6	Isolierung von DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	32
2.2.7	Isolierung von Nukleinsäuren aus <i>Neurospora crassa</i> .....	33
2.2.7.1	Isolierung von DNA aus <i>Neurospora crassa</i> -Konidien .....	33
2.2.7.2	Isolierung von DNA aus <i>Neurospora crassa</i> .....	33
2.2.7.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Neurospora crassa</i> .....	34
2.2.8	Gelelektrophorese .....	34
2.2.8.1	Gelelektrophorese von DNA .....	34
2.2.8.2	Gelelektrophorese von RNA .....	35
2.2.9	Hydrolyse von DNA .....	35
2.2.10	Reinigung und Gelelution von DNA .....	35
2.2.11	Dephosphorylierung von DNA .....	35
2.2.12	Erstellung des Polylinkers .....	35
2.2.13	Ligation von DNA-Fragmenten .....	36
2.2.14	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	36
2.2.15	Sequenzierung von DNA .....	36
2.2.16	Southern- und Northern-Blot .....	37
2.2.17	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren .....	37
2.2.18	Radioaktive Hybridisierung von Southern- und Northern- Blots .....	38
2.3	Biochemische Methoden .....	38
2.3.1	Gewinnung rekombinanter Proteine .....	38
2.3.2	Chloroform-Methanol Präzipitation von Proteinen .....	39
2.3.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	39
2.3.4	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen .....	40
2.3.5	Western-Blot .....	40
2.3.6	Dot-Blot .....	40
2.3.7	Detektion rekombinanter Proteine (RNase A) .....	41
2.3.8	RNase-Indikator-Test .....	41

2.3.9	Erstellung Protease-defizienter Mutanten .....	41
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
3.1	Optimierung der Gene zur heterologen Expression in <i>Neurospora crassa</i> .....	42
3.2	Erstellung eines Vektorsystems zur Transformation von <i>Neurospora crassa</i> ....	43
3.3	Transformation von <i>Neurospora crassa</i> und molekulare Charakterisierung der Transformanten .....	47
3.4	Transkriptanalyse der heterologen Gene <i>igf-I</i> , <i>g-csf</i> und <i>maseI</i> .....	52
3.4.1	Transkriptanalyse des heterologen Gens <i>igf-I</i> .....	52
3.4.2	Transkriptanalyse des heterologen Gens <i>g-csf</i> .....	56
3.4.2.1	Untersuchung zur vegetativen Methylierung des <i>g-csf</i> -Gens in <i>Neurospora crassa</i> .....	57
3.4.3	Transkriptanalyse des heterologen <i>maseI</i> -Gens .....	59
3.5	Nachweis rekombinanter Proteine .....	61
3.5.1	Immunologische Detektion der rekombinanten RNase A .....	61
3.5.1.1	Identifizierung von RNase A-produzierenden Transformanten .....	62
3.5.1.2	Zeitlicher Verlauf der RNase A-Produktion .....	63
3.5.1.3	Steigerung der Produktion der rekombinanten RNase A .....	66
3.5.1.4	Vergleich der Proteinproduktion ausgewählter Transformanten .....	73
3.6	Unterschiede zwischen der Überexpression einer homologen Ribonuklease und einer heterologen Ribonuklease .....	76
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
4.1	Vorteile einer Expressionskassette zur heterologen Expression rekombinanter Proteine in filamentösen Hyphenpilzen .....	78
4.1.1	Promotoren zur heterologen Proteinproduktion .....	80
4.1.2	Proteine zur heterologen und homologen Produktion in filamentösen Hyphenpilzen .....	81
4.1.3	Transkriptionstermination.....	83
4.2	Transformation filamentöser Hyphenpilze.....	84
4.3	Transkriptanalyse der heterologen Gene in <i>Neurospora crassa</i> .....	85
4.4	Synthese und Sekretion der heterologen Proteine in <i>Neurospora crassa</i> .....	87
4.4.1	Zeitliche Regulation der RNase A-Expression .....	90
4.4.2	Das Problem der Proteasen.....	91
4.5	Optimierung der rekombinanten Proteinsynthese.....	93
4.5.1	Methoden der Mutagenese .....	94
4.5.2	Optimierung der Kulturbedingungen .....	96

4.5.3	Solid-State-Fermentation (Anzucht auf inerten Oberflächen) .....	98
4.6	Unterschiede in der Produktion heterologer und homologer Proteine in filamentösen Hyphenpilzen.....	100
4.7	Ausblick.....	102
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>104</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur – Summary .....</b>	<b>108</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>129</b>
7.1	Vektorkarten.....	129
7.2	Sequenzen der verwendeten Gene, Promotoren und Terminatoren .....	135
<b>8.</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>143</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>144</b>

## A. Abkürzungen

A	Adenin
b	Base(n)
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
Da	Dalton
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäuren ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	Verstärkte Lumineszenz ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor ( <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> )
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
IGF-I	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor ( <i>Insulin-like Growth Factor</i> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
M	Molar
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger-RNA</i> )
NcT	<i>Neurospora crassa</i> -Transformante
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen ( <i>Open Reading Frame</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RNA	Ribonukleinsäuren ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat

---

TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan
uORF	stromaufwärts gelegener offener Leserahmen
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid

Allgemein gebräuchliche Maßeinheiten und Abkürzungen sind nicht gesondert aufgeführt.

## B. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Expressionskassette zur heterologen Genexpression mit anschließender Sekretion des Proteins .....	7
Abbildung 2: Hyphen von <i>Neurospora crassa</i> .....	15
Abbildung 3: Rosette aus Asci, aus einem Perithezium kurz nach der Reife der ersten Asci .....	16
Abbildung 4: Lebenszyklus von <i>Neurospora crassa</i> .....	17
Abbildung 5: Vorgehensweise dieser Arbeit .....	19
Abbildung 6: Basisvektoren für die heterologe Genexpression in filamentösen Hyphenpilzen .....	44
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Vektoren für die Genexpression in <i>Neurospora crassa</i> .....	46
Abbildung 8: Autoradiogramm der Hybridisierung des heterologen Gens <i>igf-I</i> zur Identifizierung von Transformanten .....	48
Abbildung 9: Autoradiogramm der Hybridisierung des heterologen Gens <i>grn</i> zur Identifizierung von Transformanten .....	49
Abbildung 10: Nachweis der Transkription des heterologen Gens <i>igf-I</i> unter Kontrolle des <i>trpC</i> -Promotors .....	53
Abbildung 11: Nachweis der Transkription des heterologen Gens <i>igf-I</i> unter Kontrolle des <i>acu-5</i> -Promotors .....	54
Abbildung 12: Nachweis der Transkription des heterologen Gens <i>igf-I</i> unter Kontrolle des $\alpha$ -Amylase-Promotors .....	55
Abbildung 13: Autoradiogramm der Hybridisierung des heterologen Gens <i>g-csf</i> unter Kontrolle des $\alpha$ -Amylase-Promotors .....	56
Abbildung 14: Überprüfung des Methylierungsgrades der DNA .....	58
Abbildung 15: Nachweis der Transkription des heterologen Gens <i>rnaseI</i> unter Kontrolle des <i>trpC</i> -Promotors .....	59
Abbildung 16: Autoradiogramm der Hybridisierung des heterologen Gens <i>rnaseI</i> unter Kontrolle des <i>cfp</i> -Promotors .....	60
Abbildung 17: Autoradiogramm der Hybridisierung des heterologen Gens <i>rnaseI</i> unter Kontrolle des $\alpha$ -Amylase-Promotors .....	60
Abbildung 18: Immunologische Detektion der RNase A durch Western-Blot Analyse .....	62
Abbildung 19: Zeitabhängige Bildung der rekombinanten RNase A unter Kontrolle des <i>acu-5</i> -Promotors .....	64

Abbildung 20: Zeitabhängige Bildung der rekombinanten RNase A unter Kontrolle des <i>cfp</i> -Promotors .....	64
Abbildung 21: Zeitabhängige Bildung der rekombinanten RNase A unter Kontrolle des $\alpha$ -Amylase-Promotors .....	65
Abbildung 22: Produktion der rekombinanten RNase A in Abhängigkeit der Kulturbedingungen am Beispiel der Transformante NcT176 .....	67
Abbildung 23: Vergleich der rekombinanten RNase A in der Oberflächen (OF)- und Schüttelkultur (SK).....	69
Abbildung 24: Vergleich der Ribonuklease-Aktivität aus Kulturüberständen der Oberflächen- (OF) und Schüttelkulturen (SK).....	70
Abbildung 25: Bestimmung der Protease-Aktivität der aus der UV-Mutagenese entstandenen Mutanten .....	71
Abbildung 26: Produktion der rekombinanten RNase A von Transformanten des Protease-defizienten Stammes FGSC #6103M.....	72
Abbildung 27: Vergleich der Expression der rekombinanten RNase A von Transformanten des Protease-defizienten Stammes F #6103M und Transformanten des Stammes FGSC #6103 .....	73
Abbildung 28: Vergleich der Bildung rekombinanter RNase A unter der Kontrolle verschiedener Promotoren .....	74
Abbildung 29: Dot-Blot der Transformanten NcT179, NcT250 und NcT267 zur Konzentrationsbestimmung der rekombinanten RNase A-Expression .....	75
Abbildung 30: Vergleich der Ribonuklease-Aktivität in Kulturüberständen der Transformanten der bovinen RNase A und Transformanten der endogenen RNase N1 .....	76
Abbildung 31: Überblick über den Sekretionsweg bei filamentösen Hyphenpilzen mit den limitierenden Schritten bei der heterologen Proteinproduktion .....	89
Abbildung 32: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren.....	129
Abbildung 33: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren.....	130
Abbildung 34: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren.....	131
Abbildung 35: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren.....	132
Abbildung 36: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren.....	133
Abbildung 37: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren.....	134
Abbildung 38: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Insulin-like Growth Factors-I ....	135
Abbildung 39: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Ribonuklease A .....	135
Abbildung 40: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Granulocyte-Colony Stimulating Factor.....	136
Abbildung 41: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Ribonuklease N1 ( <i>N. crassa</i> )....	137

---

Abbildung 42: Promotorsequenz des <i>cfp</i> -Gens .....	138
Abbildung 43: Putative Promotorsequenz des $\alpha$ -Amylase-Gens.....	139
Abbildung 44: Promotorsequenz des <i>trpC</i> -Gens .....	140
Abbildung 45: Promotorsequenz des <i>acu-5</i> -Gens.....	141
Abbildung 46: Terminatorsequenz des <i>arg-2</i> -Gens.....	142

## C. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Charakteristika von Expressionssystemen zur Produktion heterologer Proteine .....	1
Tabelle 2: Metabolite aus Hyphenpilzen mit industrieller Bedeutung .....	3
Tabelle 3: Beispiele für die Anwendung von Hyphenpilzen zur heterologen Expression pilzlicher und anderer eukaryotischer Gene .....	12
Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide .....	20
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Plasmide .....	23
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Größenstandards .....	25
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Enzyme .....	26
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Antikörper.....	26
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Elemente der Expressionskassetten, die zur Genexpression in <i>N. crassa</i> verwendet wurden .....	45
Tabelle 10: Übersicht über die zur Transformation verwendeten Plasmide .....	47
Tabelle 11: Übersicht der Transformanten mit inserierten Expressionsvektoren .....	50
Tabelle 12: Anwendungsbeispiele für die Genexpression in filamentösen Hyphenpilzen unter Verwendung von Fusionsproteinen und Sekretionssignalen.....	82
Tabelle 13: Übersicht über die bisher identifizierten <i>N. crassa</i> -Proteasen .....	92
Tabelle 14: Übersicht über verschiedene Mutagenese-Methoden .....	94
Tabelle 15: In der Nahrungsmittelindustrie verwendete rekombinante Enzyme aus filamentösen Pilzen.....	100

# 1. Einleitung

## 1.1 Einsatz von Mikroorganismen in der Biotechnologie

Die Produktion therapeutischer Proteine in heterologen Wirten ist eine der Grundlagen der modernen Biotechnologie (Gustafsson *et al.*, 2004). Im Jahre 1977 wurde erstmals von Itakura *et al.* die heterologe Produktion des humanen Proteins Somatostatin in *Escherichia coli* beschrieben (Itakura *et al.*, 1977). In den nächsten Jahrzehnten wurden neben prokaryotischen auch eukaryotische Systeme entwickelt, die zur heterologen Produktion von Proteinen verwendet werden konnten (Beispiele in Ikonomou *et al.*, 2003; Cos *et al.*, 2006). Dabei zeigte sich, dass sich die einzelnen Systeme in ihren Charakteristika zum Teil deutlich unterschieden (Nevalainen *et al.*, 2005). Eine Übersicht über die häufigsten Expressionssysteme ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Charakteristika von Expressionssystemen zur Produktion heterologer Proteine** (verändert nach Nevalainen *et al.*, 2005)

<b>Charakteristika</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b>Filamentöse Hyphenpilze</b>	<b>Hefen</b>	<b>Insektenzellen</b>	<b>Säugerkzellen</b>	<b>Pflanzliche Zellkulturen</b>
Zellwachstum bis zur Ernte	Stunden bis Tage	Tage bis 1 Woche	Tage bis 1 Woche	Tage bis 1 Woche	Wochen	Monate
Kosten der Wachstumsmedien	gering bis mittel	gering bis mittel	gering bis mittel	hoch	hoch	mittel bis hoch
Expressionslevel	gering bis hoch	gering bis hoch	gering bis hoch	gering bis hoch	gering bis hoch	gering
Sekretion ins	Periplasma	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
<i>Posttranslationale Modifikationen</i>						
Proteinfaltung	Rückfaltung meist nötig	Rückfaltung kann notwendig sein	Rückfaltung kann notwendig sein	Faltung korrekt	Faltung korrekt	Faltung korrekt
Glykosylierung Phosphorylierung Acetylierung, Acylierung, Di-Sulfidbrücken	nein	ja	ja	ja	ja	ja

Prokaryotische Systeme wie *E. coli* sind einfach zu handhaben und kostengünstig (Jana *et al.*, 2005). Probleme zeigen sich jedoch, wenn für die Aktivität des gewünschten Proteins Modifikationen wie Glykosylierung oder Di-Sulfidbrücken notwendig sind (Schmidt, 2004). Durch die Entwicklung eukaryotischer Expressionssysteme wie z. B. mittels der Hefen *Pichia pastoris* oder *Saccharomyces cerevisiae* konnten diese Probleme umgangen werden (Gustafsson *et al.*, 2004). Allerdings zeigten die in den Hefen gebildeten Proteine oft eine Hyperglykosylierung, welches die Aktivität des Proteins einschränkt oder hemmt (Cereghino und Cregg, 2000).

Filamentöse Hyphenpilze bilden als eukaryotisches Expressionssystem eine kostengünstige Alternative zur Proteinexpression in Hefen und Bakterien. Ähnlich wie die Hefen können auch sie posttranslationale Modifikationen durchführen (Conesa *et al.*, 2001). Zudem sind sie einfacher zu handhaben und kostengünstiger in der Haltung als beispielsweise pflanzliche Zellkulturen (Punt *et al.*, 2000).

## 1.2 Hyphenpilze in der Biotechnologie

Hyphenpilze werden seit Jahrzehnten zur Produktion wirtschaftlich relevanter Metabolite und Enzyme genutzt (Punt *et al.*, 2002). Durch die langjährige Erfahrung in Bezug auf Handhabung und Kultivierung haben die meisten biotechnologisch wichtigen Arten, wie *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* und *Trichoderma reesei*, den so genannten GRAS-Status (*generally recognized as safe*) von der "US Food and Drug Administration" (FDA) zugewiesen bekommen (van den Homberg *et al.*, 1997 [b]). Später wurde auch *Neurospora crassa* als unbedenklich für die biotechnologische Nutzung eingestuft (Perkins und Davis, 2000).

Hyphenpilze sind in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Substanzen zu produzieren (Bennet, 1998). Zu den wichtigsten wirtschaftlichen Anwendungen zählt dabei die Produktion organischer Säuren, wie z. B. Zitronensäure (Papagianni *et al.*, 1998), oder von Antibiotika und Immunosuppressiva (Umezawa, 1982). Durch gentechnische Veränderungen und Stammoptimierung konnte die Produktion solcher Substanzen in den Hyphenpilzen um ein Vielfaches gesteigert werden (Archer, 2000). Eine Übersicht der wichtigsten Produkte aus Hyphenpilzen zeigt Tabelle 2.

**Tabelle 2: Metabolite aus Hyphenpilzen mit industrieller Bedeutung** (verändert nach Bennett, 1998)

<b>Produkt</b>	<b>Organismus</b>
<i>Antibiotika oder andere Pharmazeutika</i>	
Penicillin	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Cephalosporin	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Cyclosporin (Immunsuppressivum)	<i>Tolypocladium inflatum</i>
Griseofulvin	<i>Claviceps purpurea</i>
Mevalonin	<i>Penicillium griseofulvin</i>
<i>Enzyme</i>	
$\alpha$ -Amylase	<i>Aspergillus terreus</i>
Cellulase	<i>Penicillium funiculosum</i>
Glukoamylasen	<i>Aspergillus phoenicis, Rhizopzs delemar</i>
Glukoseoxydase	<i>Aspergillus niger</i>
Invertase	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>
Laccase	<i>Coriolus versicolor</i>
Pectinase	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>
Proteinasen	<i>Aspergillus oryzae, Aspergillus melleus</i>
<i>Organische Säuren</i>	
Zitronensäure	<i>Aspergillus niger</i>

Fortschritte in der Pilzgenetik, wie z. B. die Entwicklung verschiedener Transformationssysteme (Margolin *et al.*, 1997; Michielse *et al.*, 2005), ergaben neue Anwendungsmöglichkeiten in der biotechnologischen Verwendung von Hyphenpilzen (van den Hondel, 1992). So können mittlerweile auch heterologe Gene in Hyphenpilzen exprimiert werden, um im Anschluss rekombinantes Protein zu gewinnen (Metzenberg, 1991).

### 1.3 Expression heterologer Gene in Hyphenpilzen

Die Fähigkeit filamentöser Hyphenpilze zur Sekretion großer Mengen an Proteinen, Metaboliten und organischen Säuren macht sie zu idealen Kandidaten für die kommerzielle Nutzung (Nevalainen *et al.*, 2005). So kommt es bei homologen Proteinen zu Sekretionsraten von bis zu 30 g/L Kulturmedium (Durand *et al.*, 1988). Die Sekretion der zu produzierenden Proteine in das Kulturmedium sorgt zusätzlich für eine vereinfachte Aufreinigung des Proteins (Wösten *et al.*, 1991). Die permanente Verbesserung der Produktionsstämme mittels UV-Mutagenese, Kreuzungen und chemischer Agenzien führte in der Folge zu einer Erhöhung der Ausbeuten (Archer *et al.*, 1994). Mit der Entwicklung von Manipulationsmethoden durch die rekombinante DNA-Technik wurde es möglich, nicht nur die Produktionsstämme zu verbessern (Punt *et al.*, 2002), sondern auch rekombinante Proteine herzustellen (Bennet, 1988).

Von Nutzen bei der rekombinanten Produktion heterologer Proteine in Hyphenpilzen ist dabei deren Fähigkeit, die zu produzierenden Proteine posttranslational zu modifizieren (Gouka *et al.*, 1997). Zu diesen Modifikationen zählen unter anderem N- und O-gebundene Glykosylierungen, Di-Sulfidbrücken und Acetylierungen (Conesa *et al.*, 2001). Die dabei produzierten Proteine zeigten in der Regel eine korrekte Faltung (van den Hombergh *et al.*, 1997 [b]).

Von zunehmendem Interesse ist die Expression pharmazeutisch relevanter Gene zur großtechnischen Gewinnung der jeweiligen Genprodukte. In dieser Arbeit wurden die therapeutisch nutzbaren Proteine Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) und Ribonuklease A (RNase A) für die heterologe Expression in Hyphenpilzen verwendet.

#### Insulin-like Growth Factor (IGF-I)

Der Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) wurde erstmals aus menschlichem Plasma isoliert (Rotwein *et al.*, 1986). Das 7 kDa große Protein gehört zusammen mit Insulin und dem IGF-II zur Insulin-like Growth Factor (IGF)-Familie (Le Roith und Butler, 1999). Das IGF-I ist essentiell für das Wachstum und die normale Entwicklung des menschlichen Organismus (Kiepe *et al.*, 2005). Störung im humanen IGF-I verursachen eine autosomal rezessive Erkrankung, welche sich durch Wachstumsverzögerung, Taubheit und Kretinismus auszeichnet (Le Roith und Butler, 1999). IGF-I konnte bereits erfolgreich in *E. coli* rekombinant exprimiert werden (Choi *et al.*, 2003). Homologe Proteine der IGF-Familie wurden sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten gefunden (Ferreira de Souza und

Lopez, 2004). Die entdeckten Insulin-ähnlichen Proteine wirken auf Komponenten der Gluconeogenese und sind in vielen Organismen konserviert (Barbieri *et al.*, 2003). Auch in *N. crassa* wurden Proteine identifiziert, die Homologien zu Proteinen der IGF-Familie zeigten (Lenard, 1992). Durch Zugabe von Insulin bzw. IGF-I kam es in *N. crassa* zu einem Anstieg der Proteinphosphorylierung (Kole und Lenard, 1991), gefolgt von einem Anstieg der Produktion an Ethanol und Glycogen (Greenfield *et al.*, 1988). Weiterführende Experimente führten zudem zur Entdeckung eines putativen Insulin-Rezeptors in *N. crassa* (Kole *et al.*, 1992).

#### Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF)

Der humane Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) ist ein hormon-ähnliches Protein bestehend aus 174 Aminosäuren. Das Protein wurde erstmals von Nagata *et al.* (1986) rekombinant exprimiert. Das prozessierte G-CSF ist ein 18,7 kDa großes Glykoprotein, welches neben zwei Disulfidbrücken ein freies Cystein besitzt (Lu *et al.*, 1992). Das native G-CSF besitzt keine N-Glykosylierungen. Die einzige O-Glykosylierung am Thr133 schützt das Protein vor Aggregation, ist aber nicht für die biologische Aktivität notwendig (Hill *et al.*, 1993). Durch Stimulierung der Granulozyten-Kolonie-Formation sorgt es für die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung hämatopoetischer Stammzellen des Knochenmarks. Sein Anwendungsgebiet findet das G-CSF in der Krebstherapie im Anschluss an die Chemotherapie sowie bei HIV-assoziierten Defekten der neutrophilen Zellen (Ravandi, 2006). Das humane G-CSF konnte bereits in verschiedenen Wirten wie Bakterien (Jeong und Lee, 2001), Hefen (Lasnik *et al.*, 2001) sowie tierischen Zellkulturen (Devlin *et al.*, 1987) rekombinant exprimiert werden.

#### Ribonuklease A (RNase A)

Die Ribonuklease A (RNase A) wurde erstmals aus dem Pankreas des Rindes isoliert. Das Enzym besitzt eine Größe von 14,0 kDa und wird durch 4 Disulfidbrücken stabilisiert (delCardayre *et al.*, 1995). Es katalysiert die Spaltung der Pyrimidin-Nukleotide am 3'-Ende der RNA (Carsana *et al.*, 1988). Anhand der RNase A wurden bereits Studien zur Primärstruktur sowie zu Mechanismen der Proteinfaltung durchgeführt (Klink *et al.*, 2000). Eine weitere Anwendung findet die RNase A und insbesondere deren Derivate aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaften in der Krebsforschung als potentielles Krebstherapeutikum (Arnold und Ulbrich-Hoffmann, 2006). Die RNase A ist dementsprechend ein ideales Modellprotein zur Entwicklung eines heterologen Genexpressionssystems. Die Produktion rekombinanter RNase A erfolgte bereits in *Saccharomyces cerevisiae* und *E. coli* (delCardayre *et al.*, 1995; Tarragona-Fiol *et al.*, 1992), allerdings lag hier das Protein

meist in unlöslicher Form vor. Die Expression löslicher boviner RNase A konnte bislang nur in *Pichia pastoris* durchgeführt werden (Chatani *et al.*, 2000).

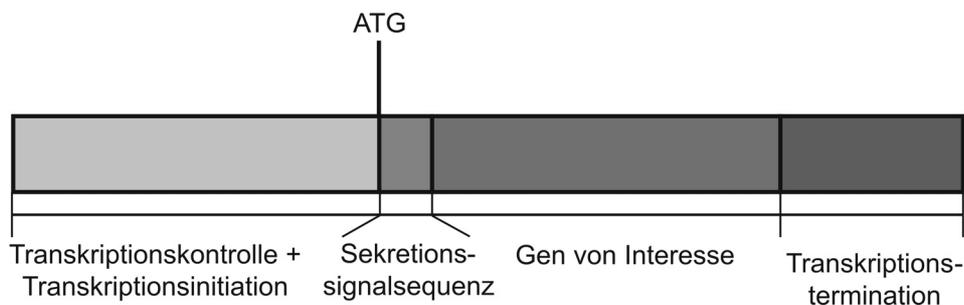
Eine Alternative zur bovinen RNase A bildet der Einsatz einer endogenen Ribonuklease aus dem filamentösen Hyphenpilz *Neurospora crassa*. Die Ribonuklease N1 wird vom Pilz in den Kulturüberstand sekretiert (Takahashi, 1988). Dies wird durch Phosphat-Mangel noch verstärkt (Furukawa *et al.*, 1987). Bei der RNase N1 handelt es sich um eine 12 kDa großes Enzym aus der Familie der Guanin-spezifischen Ribonukleasen, welche eine 68%ige Homologie zu der RNase T1 aus *Aspergillus oryzae* zeigt (Takahashi, 1988). Das Gen besteht aus zwei Exonen, die von einem Intron unterbrochen werden, und kodiert sowohl für die Signalsequenz als auch für das Proprotein selbst (Mannhaupt *et al.*, 2003). Bislang wurden noch keine Überexpressionsstudien zu diesem Protein durchgeführt. Aufgrund seiner Stabilität und einfachen Nachweisbarkeit eignet sich die RNase N1 ideal als Modell für die homologe Genexpression in *N. crassa*. Durch die Sekretion des Proteins in den Kulturüberstand kann die RNase N1 relativ einfach aus dem Kulturmedium isoliert und aufgereinigt werden (Takahashi, 1988).

## 1.4 Struktur heterologer Expressionssysteme

Für die Expression heterologer Proteine in filamentösen Hyphenpilzen müssen zwei Voraussetzungen vorhanden sein: Zum einen muss ein geeigneter Rezipientenstamm vorliegen, der zur Aufnahme und Synthese des Gens befähigt ist (van den Hondel *et al.*, 1991). Zum anderen muss ein geeigneter Expressionsvektor existieren, bei dem das zu exprimierende Gen von den entsprechenden 5'- und 3'-regulatorischen Sequenzen flankiert wird (Radzio und Kück, 1997) und der einen Selektionsmarker besitzt (van den Hondel *et al.*, 1991).

Die Rezipientenstämmen sind in der Regel für die Expression der gewünschten Gene optimiert (van den Hondel *et al.*, 1992). Dies geschieht durch willkürliche Mutagenese und einer anschließenden Selektion auf die gewünschten Merkmale, wie z. B. verminderte Protease-Aktivität (Kruszewska, 1999) oder eine gesteigerte Sekretion (Weenink *et al.*, 2006). Neben der willkürlichen Mutagenese werden diese Stämme auch durch gezielte genetische Eingriffe verändert, um limitierende Produkte wie Transkriptionsfaktoren (Archer *et al.*, 1994) oder Chaperone (Wilkinson und Gilbert, 2004) zu erhöhen.

Die Kasette zur Expression therapeutischer Proteine muss mehrere Voraussetzungen erfüllen: Am 5'-flankierenden Ende muss sich eine Gensequenz befinden, die alle notwendigen Transkriptionskontrollen beinhaltet, sowie einen 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) zur Transkriptionsinitiation (van den Hondel *et al.*, 1991). Am 3'-flankierenden Ende (3'-UTR) befindet sich eine Region zur Transkriptionstermination sowie eine Kontrollregion für die Polyadenylierung (Radzio und Kück, 1997). Zwischen den beiden Bereichen wird das zu exprimierende Gen gesetzt. Soll eine Sekretion des Proteins in das Kulturmedium erfolgen, so muss sich am 5'-Ende des Gens die Sequenz für ein Sekretionssignal befinden (van den Hondel *et al.*, 1991). Der schematische Aufbau einer solchen Expressionskasette ist in Abbildung 1 gezeigt. Im Folgenden wird auf die einzelnen Komponenten der Kasette detailliert eingegangen.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Expressionskasette zur heterologen Genexpression mit anschließender Sekretion des Proteins** (verändert nach van den Hondel *et al.*, 1991)

### 1.4.1 Transkriptionskontrolle und Transkriptionsinitiation

Zur Transkriptionskontrolle werden Promotorelemente mit regulatorischen Funktionen verwendet. Für eine effiziente Genexpression ist es wichtig, die Expression des Gens künstlich durch Promotorsequenzen zu steigern. Diese Sequenzen stammen entweder aus dem Wirtstamm oder einer verwandten Art (Ishida *et al.*, 2004). Dabei werden sowohl Promotoren von konstitutiv exprimierten Genen als auch von induzierbaren Genen verwendet (van den Hondel *et al.*, 1991). Eingesetzt werden in der Regel starke homologe Promotoren, da diese oft zu einer erhöhten Expressionsrate des gewünschten Gens führen (Kruszewska, 1999). Durch Modifikationen der Promotorsequenzen wie die Einführung weiterer Bindestellen für Transkriptionsfaktoren kann die Effizienz solcher Promotoren noch gesteigert werden (Liu *et al.*, 2002).

Der am häufigsten verwendete konstitutive Promotor ist der *gpdA*-Promotor aus *Aspergillus nidulans*. Dieser Promotor kontrolliert die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Punt *et al.*, 1990). Es handelt sich dabei um ein Gen des Primärmetabolismus, dessen Promotorelemente auch in anderen Hyphenpilzen identifiziert werden konnten (Punt *et al.*, 2002). Mit Hilfe dieses Promotors konnten bereits zahlreiche Gene wie das Lysozym des Hühnereiweißes (Jeenes *et al.*, 1994) oder das Lactoferrin (Ward *et al.*, 1995) erfolgreich exprimiert werden. Auch in *Neurospora crassa* wurde der homologe *gpdA*-Promotor bereits erfolgreich verwendet (Wang und Keasling, 2002). Der am erfolgreichsten in *N. crassa* verwendete Promotor ist jedoch der *ccg1*-Promotor (McNally und Free, 1988). Unter Kontrolle dieses Promotors konnte in *N. crassa* unter anderem das bovine Chymosin (Nakano *et al.*, 1993) sowie das eGFP (Freitag *et al.*, 2004) exprimiert werden.

Bei den induzierbaren Promotoren findet häufig der Promotor des *glaA*-Gens Verwendung (Radzio und Kück, 1997). Das *glaA*-Gen kodiert für die Glukoamylase und kann durch Zugabe von Stärke oder Maltose zum Kulturmedium induziert werden (Cullen *et al.*, 1987). In *N. crassa* konnte unter Kontrolle des homologen *glaA*-Promotors bereits ein pflanzliches Protein exprimiert werden (Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997).

Neben der Transkriptionskontrolle ist ein weiteres wichtiges Element bei der Expression die Transkriptionsinitiation. Über die Sequenzen, die für eine effiziente Translation in Hyphenpilzen verantwortlich sind, ist derzeit wenig bekannt. Häufig findet man stromaufwärts des Startkodons Konsensussequenzen für Initiationsbereiche (van den Hondel *et al.*, 1991). Dabei haben Faktoren wie die Länge der 5'-UTR, die Sekundärstruktur, der GC-Gehalt und das Vorhandensein von stromaufwärts gelegenen kurzen offenen Leserastern (uORFs) einen Einfluss auf die Transkriptionsrate (Koda *et al.*, 2004). In der Regel wird die 5'-UTR stark exprimierter Gene zur heterologen Genexpression verwendet (Kruszewska, 1999).

## 1.4.2 Sekretion heterologer Proteine

Bei der Produktion rekombinanter Proteine ist in der Regel eine Sekretion in das Kulturmedium erwünscht, da dies die Aufreinigung des produzierten Proteins erleichtert (van den Hondel *et al.*, 1992). So werden die meisten in Pilzen biotechnologisch produzierten Proteine sekretiert (Archer und Peberdy, 1997). Bei dem Sekretionssignal handelt es sich um eine N-terminale Sequenz für den Transport in das Endoplasmatische

Retikulum (ER), die normalerweise aus 15 – 24 hydrophoben Aminosäuren besteht (Kruszewska, 1999) und mit dem Protein der Wahl fusioniert ist (van den Hondel *et al.*, 1991). Ist das gewünschte Protein *per se* extrazellulär, so kann auch das proteineigene Sekretionssignal genutzt werden (Conesa *et al.*, 2001). Eine Besonderheit der Proteinsekretion in Hyphenpilzen ist, dass sie vorwiegend an den Hyphenspitzen auftritt (Vinck *et al.*, 2005).

Untersuchungen verschiedener Sekretionssignalsequenzen zeigten, dass die Wahl des Sekretionssignals unabhängig vom Organismus erfolgen kann (Archer und Peberdy, 1997). Homologe Signalsequenzen des Wirtes können ebenso genutzt werden wie heterologe Signalsequenzen (Gouka *et al.*, 1997). Jedoch scheinen homologe Sequenzen eine effizientere Sekretion zu bewirken (van den Hondel *et al.*, 1991).

Neben den verwendeten Signalsequenzen können auch Prosequenzen eine wichtige Rolle bei der Sekretion des Proteins einnehmen, da sie unter anderem bei der Proteinfaltung eine wichtige Rolle spielen (Kruszewska, 1999). So wurde das bovine Chymosin als Präproprotein in *N. crassa* erfolgreich sekretiert und prozessiert (Nakano *et al.*, 1993). In einigen Fällen kann die Verwendung von Propeptiden die Ausbeute an rekombinanten Protein aber auch vermindern (van Gemeren *et al.*, 1996).

Eine Alternative zur Verwendung des alleinigen Sekretionssignals ist das Konzept der Genfusion (Gouka *et al.*, 1997). Hierbei erfolgt die Fusion des zu produzierenden Proteins mit dem 5'-Bereich eines effizient sekretierten Genprodukts (Archer und Peberdy, 1997). Durch das Einfügen einer Protease-Schnittstelle – in der Regel einer *Kex2*-Schnittstelle (Punt *et al.*, 2003) – kann das heterologe Protein von dem "Trägerprotein" getrennt werden.

### 1.4.3 Transkriptionstermination

Über die Mechanismen zur Transkriptionstermination und Polyadenylierung in Hyphenpilzen existieren bislang nur wenige Kenntnisse. In der Regel wird das heterologe Gen mit einer bekannten Terminationsregion fusioniert (van den Hondel *et al.*, 1991). Dabei werden oft die vom Promotor stammenden 3'-UTRs des Gens (Zardra *et al.*, 2000) oder 3'-UTRs stark exprimierter Gene verwendet (Gouka *et al.*, 1997).

#### 1.4.4 Posttranslationale Modifikationen

Während des Transfers der Proteine durch das sekretorische System werden diese posttranslationalen Modifikationen unterzogen (Gouka *et al.*, 1997). Es kommt dort zu einer Prozessierung und Faltung, sowie gegebenenfalls zu einer Glykosylierung des Proteins, bevor es zu seinem Ziel transportiert wird (Archer und Peberdy, 1997).

Die Proteinprozessierung und Proteinfaltung erfolgt im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Der erste proteolytische Prozessierungsschritt findet durch die Abspaltung der Signalsequenz mittels spezifischer Endopeptidasen statt (Punt *et al.*, 2003). Zu diesen gehört unter anderem die *Kex2*-Protease, die zu der Unterfamilie der Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen gehört (Jalving *et al.*, 2000).

Nach der Abspaltung der Signalsequenz erfolgt die Proteinfaltung mit Hilfe von ER-spezifischen Chaperonen. Zu den wichtigsten Chaperonen des ER gehört das "*Binding Protein*" (BiP) (Hijarrubia *et al.*, 1997), die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) (Wilkinson und Gilbert, 2004) sowie die Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIase) (Solscheid und Tropschug, 2000). Diese Proteine sorgen für eine Translokation in das ER mit einer anschließenden Proteinfaltung und einer Ausbildung der Di-Sulfidbrücken. Mit Hilfe der oben genannten Chaperone findet auch die Neufaltung und ER-assoziierte Degradation (ERAD) falsch gefalteter Proteine statt (Kleizen und Braakman, 2004).

Bei der ebenfalls im ER stattfindenden Proteinglykosylierung werden kovalent Oligosaccharide an Serin- oder Threoninreste (O-Glykosylierung) bzw. an Asparaginreste (N-Glykosylierung) gebunden (Conesa *et al.*, 2001). Die Glykosylierung sorgt dabei für eine Stabilisierung des Proteins. Durch die Einführung einer weiteren Glykosylierungsstelle konnte beispielsweise die Ausbeute an heterolog produzierten Chymosin um 100 % gesteigert werden (van den Brink *et al.*, 2006). Dabei ist das Glykosylierungsmuster bei Pilzen weniger ausgeprägt als beispielsweise bei Hefen (Gerngross, 2004). So konnten bei der Produktion des rekombinanten Lactoferrins in *A. nidulans* nur geringe Abweichungen im Glykosylierungsmuster zum humanen Lactoferrin gefunden werden (Ward *et al.*, 1993). Diese Fähigkeiten, posttranslationale Modifikationen ähnlich zu denen höherer Eukaryoten durchzuführen, machen Hyphenpilze zu einem günstigen und effektiven System zur Expression therapeutischer Genprodukte (Adrio und Demain, 2003).

## 1.5 Anwendungen der heterologen Proteinproduktion

Es existieren zwei Hauptanwendungsmöglichkeiten für die heterologe Proteinproduktion: die Modifikation von Stoffwechselwegen zur Steigerung der Produktion eines endogenen Produktes sowie die Überproduktion eines heterologen Proteins, welches von medizinischer Bedeutung oder von industriellem Interesse ist (van den Hondel *et al.*, 1991). Die Modifizierung von Stoffwechselwegen durch heterologe Genexpression stellt dabei eine wichtige Möglichkeit zur Stammverbesserung industriell genutzter Hyphenpilze dar (Litzka *et al.*, 1999). Produziert werden *in vivo*-Metabolite, deren Produktion in der chemischen Industrie nur unter hohem Aufwand und erhöhter Kosten stattfinden kann (Wegman *et al.*, 2001). Ein Beispiel hierfür ist die Produktion von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Durch die Überexpression eines essentiellen Gens der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Synthese konnte die Ausbeute an Penicillin beispielsweise um den Faktor 30 gesteigert werden (Kennedy und Turner, 1996).

Das Hauptanwendungsgebiet filamentöser Hyphenpilze liegt aber in der Überproduktion eines heterologen oder homologen Proteins (van Hartingsveldt *et al.*, 1990). In den letzten Jahren wurden Expressionssysteme zur Produktion relevanter Produkte für eine Vielzahl von Hyphenpilzen entwickelt und zur Synthese verschiedenster pilzlicher und eukaryotischer Proteine eingesetzt (Tab. 3). Zu den am häufigsten verwendeten Wirtsorganismen zählen *Aspergillus* und *Trichoderma*, aber auch weitere Hyphenpilze wie *Acremonium* und *Neurospora* wurden bereits für die heterologe Expression verwendet (Nevalainen *et al.*, 2005).

Die ersten Untersuchungen zur heterologen Genexpression in Hyphenpilzen erfolgte mit Hilfe der Reportergene  $\beta$ -Galactosidase (*lacZ*) und  $\beta$ -Glucuronidase (*gusA*) aus *E. coli* (Roberts *et al.*, 1989; Gouka *et al.*, 1996). Mit Hilfe dieser beiden Gene wurden die ersten Systeme zur Bildung heterologer Proteine geschaffen (van den Hondel *et al.*, 1991). Mittlerweile werden noch weitere Proteine verwendet, so unter anderem das "Green-Fluorescent Protein" (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* (Inouye und Tsuji, 1994). Dieses Protein musste allerdings für eine effiziente Produktion in Hyphenpilzen in den verwendeten Kodonen an den Kodongebrauch der Hyphenpilze angepasst werden (Freitag *et al.*, 2001). Daneben wird als neues Reportergen noch das Enzym Laccase verwendet, da dieses einen geringeren Hintergrund in dem pilzlichen System verursacht (Mander *et al.*, 2006).

Die Erkenntnisse aus der Analyse der Expression und Produktion der Reportergene halfen maßgeblich bei der Verbesserung der Produktion industriell und pharmazeutisch genutzter Proteine, wie z. B. Interleukin-6 (Punt *et al.*, 2002) oder humanes  $\alpha$ -Interferon

(Gwynne *et al.*, 1989). Ein weiteres interessantes Anwendungsbeispiel ist die Produktion künstlicher Süßstoffproteine wie Thaumatin (Morajelo *et al.*, 2000) und Neoculin (Nakijama *et al.*, 2006). Gegenwärtig existiert eine Vielzahl verschiedener pilzlicher Expressionssysteme, die sowohl für eine inter- als auch extrazelluläre Proteinproduktion genutzt werden (Punt *et al.*, 2002). In Tabelle 3 ist eine Auswahl unterschiedlicher Proteine dargestellt, die gegenwärtig in filamentösen Hyphenpilzen exprimiert werden.

**Tabelle 3: Beispiele für die Anwendung von Hyphenpilzen zur heterologen Expression pilzlicher und anderer eukaryotischer Gene** (verändert und ergänzt nach Radzio und Kück, 1997)

Protein (Ursprungsorganismus)	Menge	Organismus	Referenz
$\alpha$ -Glukoamylase ( <i>Aspergillus</i> )	4,6 g/L	<i>Aspergillus awamori</i>	Radzio & Kück, 1997
Alkalische Protease ( <i>Fusarium sp.</i> )	4 g/L	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Morita <i>et al.</i> , 1994
Aspartat-Proteinase ( <i>Rhizomucor miehei</i> )	3 g/L	<i>Aspergillus oryzae</i>	Christensen <i>et al.</i> , 1998
Peroxidase ( <i>Arthromyces ramosus</i> )	800 mg/L	<i>Aspergillus awamori</i>	Joosten <i>et al.</i> , 2003
Manganase Peroxidase ( <i>Phaenerochaete chrysosporium</i> )	100 mg/L	<i>Aspergillus niger</i>	Conesa <i>et al.</i> , 2000
Lactoferrin ( <i>Homo sapiens</i> )	2 g/L	<i>Aspergillus oryzae</i>	Ward <i>et al.</i> , 1995
IgG1 ( $\kappa$ ) ( <i>Homo sapiens</i> )	900 mg/L	<i>Aspergillus niger</i>	Ward <i>et al.</i> , 2004
anti p185 <sup>Her2</sup> ( <i>Homo sapiens</i> )	200 mg/L	<i>Aspergillus niger</i>	Ward <i>et al.</i> , 2004
scFv (Antikörper) ( <i>Homo sapiens</i> )	200 mg/L	<i>Aspergillus awamori</i>	Joosten <i>et al.</i> , 2003
Interleukin-6 ( <i>Homo sapiens</i> )	200 mg/L	<i>Aspergillus niger</i>	Punt <i>et al.</i> , 2002
Lysozym ( <i>Gallus gallus</i> )	190 mg/L	<i>Aspergillus niger</i>	Archer <i>et al.</i> , 1995
Thaumatin ( <i>Thaumatococcus daniellii</i> )	105 mg/L	<i>Aspergillus awamori</i>	Morajelo <i>et al.</i> , 2000
Fab (Antikörper) ( <i>Homo sapiens</i> )	50 mg/L	<i>Trichoderma reesei</i>	Nyysönen und Keränen, 1995
Lysozym ( <i>Homo sapiens</i> )	40 mg/L	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Morita <i>et al.</i> , 1994
pankreatische Phospholipase A2 ( <i>Sus scrofa</i> )	10 mg/L	<i>Aspergillus niger</i>	Roberts <i>et al.</i> , 1992
Enterokinase ( <i>Bos taurus</i> )	5 mg/L	<i>Aspergillus niger</i>	Svetina <i>et al.</i> , 2000
Neoculin ( <i>Curculigo latifolia</i> )	2 mg/L	<i>Aspergillus oryzae</i>	Nakajima <i>et al.</i> , 2006
Präprochymosin ( <i>Bos taurus</i> )	200 ng/L	<i>Neurospora crassa</i>	Nakano <i>et al.</i> , 1993
$\alpha$ -Interferon ( <i>Homo sapiens</i> )	200 ng/L	<i>Aspergillus nidulans</i>	Gwynne <i>et al.</i> , 1991
Lymphotoxin $\alpha$ ( <i>Homo sapiens</i> )	50 pg/L	<i>Aspergillus niger</i>	Krasaveć <i>et al.</i> , 2000

Vergleicht man die Daten der heterologen Expressionen der einzelnen Systeme und der Gene, so unterscheiden sich die Ausbeuten pilzlicher Proteine in der Regel deutlich von denen anderer eukaryotischer Proteine (Grimm *et al.*, 2005). Während die Ausbeuten pilzlicher Proteine teilweise im Grammbereich vorliegen, gibt es nur wenige andere eukaryotische Proteine, wie z. B. das Lactoferrin, bei denen eine ebensolche Expression erzielt werden konnte (Ward *et al.*, 1995). Die Produktion heterologer nicht-pilzlicher Proteine liegt in der Regel um den Faktor 5 oder mehr darunter (Nevalainen *et al.*, 2005). Für eine erhöhte Produktion des gewünschten Proteins sind daher weitere Optimierungen notwendig.

## 1.6 Optimierung der heterologen Proteinproduktion

Die Optimierung der heterologen Proteinproduktion wird auf mehreren Ebenen durchgeführt. Dazu zählen unter anderem die Optimierung der zur Expression ausgewählten Wirtsorganismen und die Optimierung der entsprechenden Kulturbedingungen (Archer *et al.*, 1994).

### 1.6.1 Optimierung der Wirtsorganismen

Ein Hauptproblem bei der Gewinnung heterolog gebildeter Proteine aus filamentösen Hyphenpilzen ist der Abbau des Proteins durch extrazelluläre Proteasen des Pilzes im Kulturmedium (van den Hombergh, 1997 [a]). Aus diesem Grund wurde schon früh versucht, die Protease-Aktivität der Wirtsorganismen mit Hilfe klassischer Mutagenese-Methoden wie UV-Bestrahlung oder chemische Mutagenzien zu vermindern (Kruszewska, 1999). Durch gezielte Selektion wurde so eine Vielzahl von Mutanten gewonnen, die eine verminderte Protease-Aktivität besitzen (Mattern *et al.*, 1992). Durch die Verwendung dieser Protease-defizienten Stämme wurde die Expression verschiedener Proteine erheblich gesteigert (Morajelo *et al.*, 2000; van den Hombergh *et al.*, 1997 [a]).

Ein weiterer limitierender Faktor bei der Produktion der heterologen Proteine ist die Menge an vorhandenen Transkriptionsfaktoren oder Chaperonen in den Wirtsorganismen. Durch gezielte Eingriffe konnte auch hier eine gesteigerte Produktion des Proteins erreicht werden (El-Adawi *et al.*, 2000; Lombraña *et al.*, 2004).

## 1.6.2 Optimierung der Kulturbedingungen

Neben der Wahl des Wirtsorganismus ist ein weiterer wichtiger Faktor bei der Produktion heterologer Proteine die Wahl der Kulturbedingungen. Diese kann einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute des heterologen Proteins haben (Archer, 2000). Filamentöse Hyphenpilze sind in der Lage, auf den unterschiedlichsten Medien zu wachsen (van den Hondel *et al.*, 1991). Die Wahl des geeigneten Mediums kann sich maßgeblich auf die Ausbeute an rekombinanten Protein auswirken (Gordon *et al.*, 2000 [b]). So zeigte sich beispielsweise, dass bei der Verwendung von Vollmedien anstelle von Minimalmedien die Ausbeute an Catalase B deutlich erhöht werden konnte (Johnson *et al.*, 2003). In manchen Fällen genügt schon die Zugabe einer weiteren Aminosäurequelle, um die Proteinexpression signifikant zu steigern (Martin *et al.*, 2003; Joosten *et al.*, 2005).

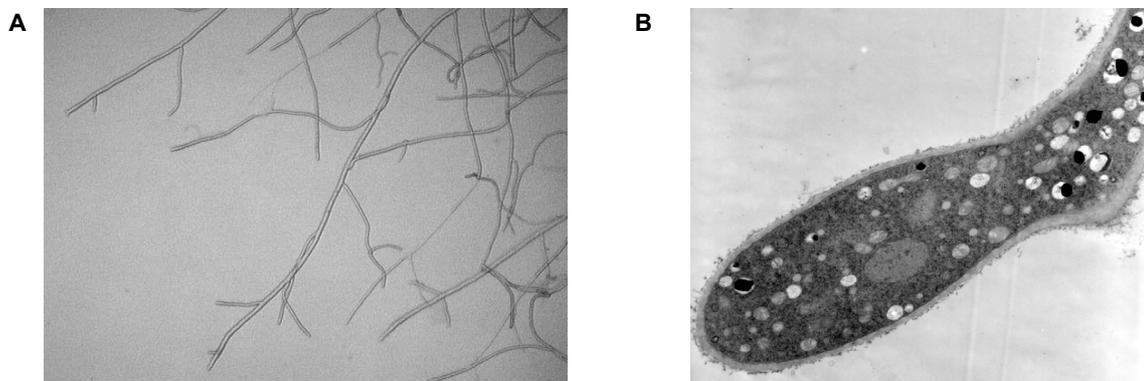
Eine weitere Möglichkeit ist die Kultivierung als so genannte "Solid-State"-Fermentation, die in asiatischen Ländern vermehrt angewandt wird (Iwashita, 2002). Hierbei erfolgt die Kultivierung auf einem inerten Träger oder in einer festen, feuchten Phase bei maximaler Substratkonzentration ohne Rotation (Hölker und Lenz, 2005). Diese Art der Kultivierung spiegelt die natürlichen Wachstumsbedingungen der Pilze wieder (Iwashita, 2002). Es wird hierbei bis zu viermal mehr Protein sekretiert als bei der klassischen Kultivierung in Flüssigkultur (te Bieseke *et al.*, 2005 [a]). Dabei ist die Produktion der sekretierten Proteasen gleichzeitig vermindert (te Bieseke *et al.*, 2005 [b]). Der Vorteil dieser Methode liegt demnach in der hohen Produktivität, einer erhöhten Stabilität der Produkte und geringen Produktionskosten (Hölker *et al.*, 2004). Bei der "Solid-State"-Fermentation muss allerdings darauf geachtet werden, dass die verwendeten Promotoren zur Expression heterologer Proteine unter den gegebenen Bedingungen aktiv sind (te Bieseke *et al.*, 2005 [c]).

Generell existiert keine allgemeingültige Vorgehensweise zur Optimierung der Proteinausbeuten, die optimalen Expressionsbedingungen müssen für jedes Protein im Einzelnen experimentell ermittelt werden (Archer *et al.*, 1994).

## 1.7 Der Modellorganismus *Neurospora crassa*

Der Hauptanteil der heterologen Proteinexpression in filamentösen Hyphenpilzen findet gegenwärtig in Pilzen der Gattung *Aspergillus* statt (van den Hondel, 1992). In den letzten Jahrzehnten wurden jedoch weitere Pilze erfolgreich für die heterologe Expression verwendet, zu denen unter anderem *Trichoderma reesei* (Nyssönen und Keränen, 1995) und *Neurospora crassa* (Nakano *et al.*, 1993, Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997) gehören.

Die Gattung *Neurospora* wurde 1927 von Shear und Dodge beschrieben (Shear und Dodge, 1927), doch der Pilz war bereits seit 1843 in der wissenschaftlichen Literatur bekannt (Payen, 1843). *Neurospora* tritt als Kontamination in Bäckereien auf; er wächst bevorzugt auf feuchtem oder schlecht gebackenem Brot (Davis und Perkins, 2002). Durch dieses Wachstumshabitat und die charakteristische, durch Carotinoid-Pigmente entstandene Färbung, hat der Pilz seinen Namen erhalten: roter Brotschimmel (Shear und Dodge, 1927). In Abbildung 2 sind exemplarisch die Hyphen des Pilzes gezeigt.



**Abbildung 2: Hyphen von *Neurospora crassa***

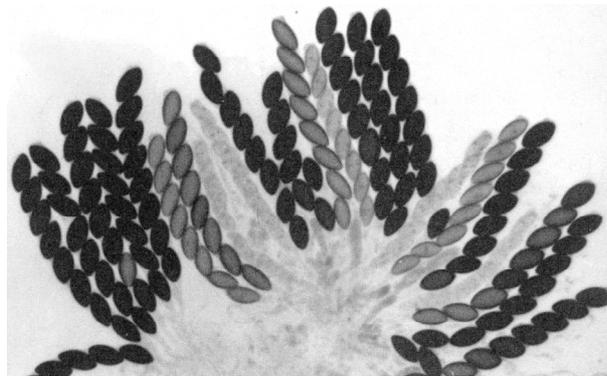
A: Ausschnitt aus der Wachstumszone des Stammes FGSC #6103 (Mercker, 2006), Lichtmikroskopische Aufnahme (b.m.V. 50x)

B: Querschnitt durch eine Hyphe des Stammes FGSC #6103, Elektronenmikroskopische Aufnahme (b.m.V. 6600x)

Aufgrund seiner leichten Handhabung wurde *Neurospora* bereits Anfang der vierziger Jahre des letzten Jahrhunderts zu einem beliebten Forschungsobjekt (Davis und Perkins, 2002). Bekannt wurde der Pilz durch die Forschungen von Beadle und Tatum, die durch Untersuchungen an *N. crassa*-Mutanten ihre "ein Gen – ein Enzym"-Hypothese aufstellten und dafür 1958 den Nobelpreis erhielten (Beadle und Tatum, 1941). Auch heute hat der Pilz nichts von seiner Relevanz als Modellorganismus verloren. Er spielt eine herausragende Rolle unter anderem bei der Erforschung zirkadianer Rhythmiken, der

Evolution mitochondrialer Plasmide sowie der Morphogenese (Übersicht in Borkovich *et al.*, 2004).

*Neurospora* gehört zu den Ascomyceten (Perkins und Turner, 1988). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die Produkte einer einzelnen meiotischen Teilung vorübergehend in einem membranartigen Beutel, dem so genannten Ascus, zusammengehalten werden (Abb. 3). Die Asci befinden sich wiederum in einem Perithezium (Raju, 1980).



**Abbildung 3: Rosette aus Ascii, aus einem Perithezium kurz nach der Reife der ersten Ascii (Raju, 1980)**

Der Lebenszyklus des Pilzes ist ein Wechsel zwischen der haploiden und diploiden Generation (Abb. 4), wobei die haploide Generation vorherrscht (Springer, 1993). Man unterscheidet dabei während des Lebenszyklus zwischen 28 verschiedene Zelltypen (Bistis *et al.*, 2003). Je nach den vorliegenden Kulturbedingungen kann das Myzel einen asexuellen Sporenbildungsprozess durchführen, der entweder zur Bildung der mehrkernigen Makrokonidien oder der einkernigen Mikrokonidien führt (Springer, 1993). Diese können sich ausbreiten und durch Ausbildung eines Myzels erneut in den ungeschlechtlichen Zyklus eintreten. In der sexuellen Phase bilden sich Protoperithezien, die sich nach der Befruchtung zu Perithezien differenzieren. In diesen findet die Bildung der meiotisch entstanden Ascosporen statt. Diese können erneut auskeimen und neue Hyphen bilden (Mishra, 1977) (Abb. 4).

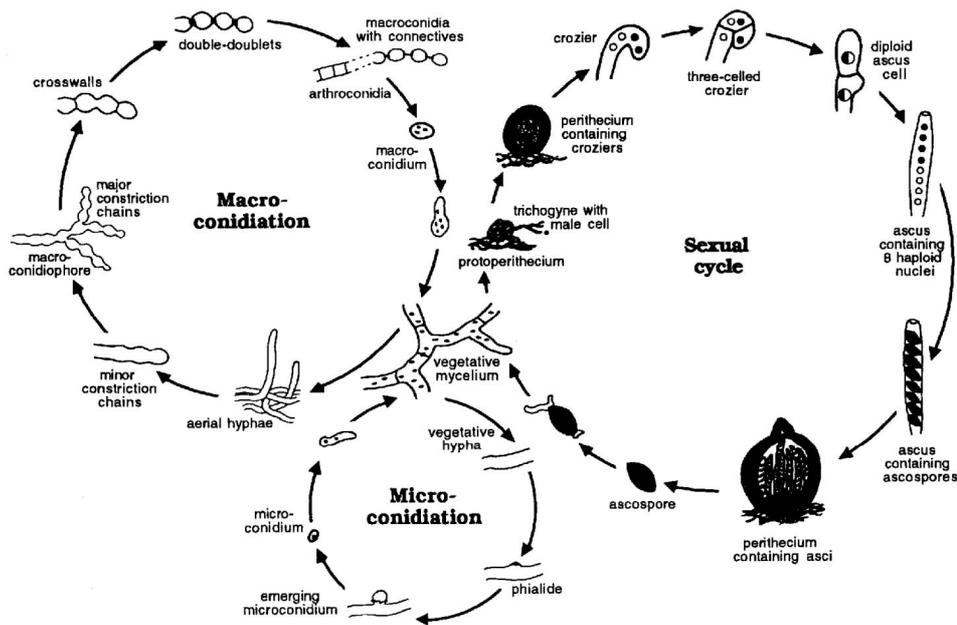


Abbildung 4: Lebenszyklus von *Neurospora crassa* (Springer, 1993)

Auch auf genetischer Ebene wurde *N. crassa* bereits früh charakterisiert (Übersicht in Perkins und Davis, 2002). Das haploide Genom von *N. crassa* enthält sieben Chromosomen (McClintock, 1945) bei einer Genomgröße von 43 Megabasen (Orbach *et al.*, 1988). Im April 2003 wurde das Genom von *N. crassa* in Nature als vollständig sequenziert veröffentlicht (Galagan *et al.*, 2003). Erste bioinformatische Untersuchungen deuten auf das Vorkommen von ca. 11000 ORFs hin (Mannhaupt *et al.*, 2003), von denen ca. 10 % bereits charakterisiert wurden (Borkovich *et al.*, 2004).

Durch die fast acht Jahrzehnte andauernde Forschung an *Neurospora crassa* und dessen einfache Handhabung etablierte sich dieser Pilz als Modellorganismus für viele entwicklungsbiologische und biochemische Fragestellungen (Perkins und Davis, 2000). Er liefert daher auch ideale Voraussetzungen als Wirtsorganismus für die Produktion heterologer Proteine (Nakano *et al.*, 1993).

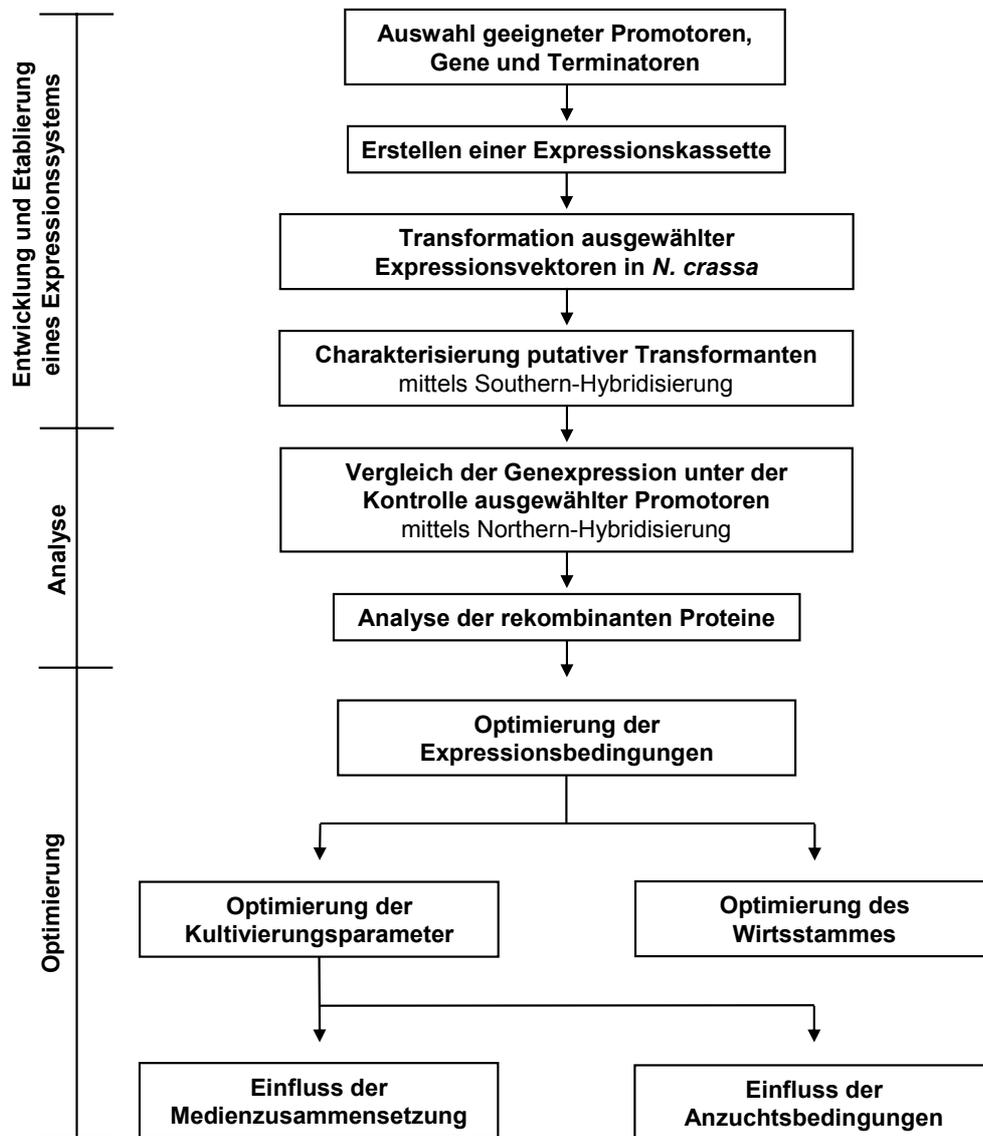
## 1.8 Ziel der Arbeit

Die Produktion pharmazeutisch und industriell relevanter Proteine in Mikroorganismen ist einer der wichtigsten Bereiche der Biotechnologie (Gustaffson *et al.*, 2004). Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden dabei viele Expressionssysteme sowohl prokaryotischer als auch eukaryotischer Natur entwickelt (Nevalainen *et al.*, 2004). Als eines dieser Expressionssysteme haben sich filamentöse Hyphenpilze wie der Ascomycet *Aspergillus* etabliert (Punt *et al.*, 2002). Der filamentöse Ascomycet *Neurospora crassa* wurde dagegen relativ selten zur Expression heterologer Gene eingesetzt. Bislang sind nur wenige Anwendungen bekannt, bei denen dieser Pilz für die heterologe Genexpression verwendet wurde (Nakano *et al.*, 1993, Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997). Dabei bietet *N. crassa* viele Vorteile als Wirt für die heterologe Proteinproduktion. So wird der Pilz seit mehr als 80 Jahren als Modellorganismus für die verschiedensten Studien verwendet und ist daher gut charakterisiert (Davis und Perkins, 2002). Hinzu kommt, dass 2003 dessen Genomsequenz veröffentlicht wurde (Galagan *et al.*, 2003). Da der Pilz nur relativ wenig eigene Proteine ins Medium sekretiert (Lee *et al.*, 1998), lässt sich die weitere Aufreinigung eines sekretierten Proteins zudem wesentlich vereinfachen.

Ziel der Arbeit war die Etablierung eines Systems zur Produktion therapeutischer Proteine in dem filamentösen Hyphenpilz *N. crassa*. Als Modellproteine wurden dafür drei heterologe Proteine gewählt: der humane Insulin-like Growth Factor I (IGF-I), der humane Granulocyte-Colony Stimulating Factor I (G-CSF) sowie die bovine Ribonuklease A (RNase A). Ferner sollte die Überexpression der endogenen RNase N1 aus *N. crassa* mit Hilfe des entwickelten Systems durchgeführt werden.

Die drei heterologen Proteine sollten mittels einer Signalsequenz in das Kulturmedium sekretiert und dort über nachfolgende Analysen detektiert werden. Für diesen Zweck sollte eine Expressionskassette erstellt werden, die einen einfachen Austausch der einzelnen Komponenten ermöglicht. Im Anschluss sollte diese Kassette in den Pilz eingebracht und der Einfluss verschiedener homologer wie heterologer Promotoren auf die Expression der Zielgene untersucht werden. Dabei sollten sowohl konstitutive als auch induzierbare Promotoren getestet werden. Bei einem erfolgreichen Nachweis des Proteins sollte im Anschluss der Einfluss verschiedener Faktoren wie die Art der Kultivierung oder die Verwendung Protease-defizienter Wirtsstämme auf die Menge an erhaltenem Protein überprüft werden. Durch die Überexpression der endogenen RNase N1 sollten zudem Unterschiede in der Expression heterologer und homologer Proteine untersucht werden. Abbildung 5 fasst die geplante Vorgehensweise in einem Fließschema zusammen.

## Entwicklung eines Expressionssystems zur Produktion therapeutischer Proteine in filamentösen Hyphenpilzen



**Abbildung 5: Vorgehensweise dieser Arbeit**

Das Fließschema fasst die Vorgehensweise in dieser Arbeit zusammen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Organismen

*Escherichia coli* (K12) XL1-Blue      recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac  
[F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*]<sup>c</sup>  
Bullock *et al.*, 1987; Stratagene, Heidelberg

*Neurospora crassa* FGSC #6103      his<sup>-</sup>  
Fungal Genetics Stock Center,  
School of Biological Sciences,  
University of Missouri, Kansas City, USA

*Neurospora crassa* F #10292      his<sup>-</sup> arg<sup>-</sup>  
Fungal Genetics Stock Center,  
School of Biological Sciences,  
University of Missouri, Kansas City, USA

#### 2.1.2 Oligonukleotide

Für die Herstellung von Amplifikaten während der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Kapitel 2.2.14) wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Oligonukleotide bei der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert.

**Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide**

Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen.

Bezeichnung	Sequenz [5' - 3']	Spezifität
FK527	GGCCGCTTAATTAAGGCGCGCCATTTA <u>AATGTTTAAACGC</u>	Polylinker mit den Schnittstellen für <i>PacI</i> , <i>AsclI</i> , <i>SwaI</i> und <i>PmeI</i>
FK528	GGCCGCGTTTTAAACATTTAAATGGCGC <u>GCCTTAATTAAGC</u>	Polylinker mit den Schnittstellen für <i>PacI</i> , <i>AsclI</i> , <i>SwaI</i> und <i>PmeI</i>

Bezeichnung	Sequenz [5' - 3']	Spezifität
FK541	GGGGGGATTAAATCGGACGAGAATG TCTTGCATTTTC	<i>N. crassa arg-2</i> -Terminator NCBI-Eintrag J05512 (Position 2869 bp – 2893 bp) <sup>1</sup>
FK542	GGGGGGGTTTAAACTGCAGGACAGGG GGTAGCATC	<i>N. crassa arg-2</i> -Terminator NCBI-Eintrag J05512 (Position 3660 bp – 3680 bp) <sup>1</sup>
FK543	GGGGGGTTAATTAAGATCCCAACCGAA ACTTTGGTTTC	<i>N. crassa acu-5</i> -Promotor NCBI Eintrag Z47725 (Position 206 bp – 231 bp) <sup>2</sup>
FK544	GGGGGGGGCGCGCCGGTGACTGTGA TGTGGTTGTTCTG	<i>N. crassa acu-5</i> -Promotor NCBI Eintrag Z47725 (Position 2598 bp – 2621 bp) <sup>2</sup>
FK547	GGGGGGTTAATTAAGTCGACAGAAGAT GATATTGA	<i>A. nidulans trpC</i> -Promotor NCBI-Eintrag X02390 (Position 886 bp – 905 bp) <sup>3</sup>
FK548	GGGGGGGGCGCGCCTGCTTGGGTAG AATAGGTAAGTC	<i>A. nidulans trpC</i> -Promotor NCBI-Eintrag X02390 (Position 1224 bp – 1246 bp) <sup>3</sup>
FK583	CGCGCCATGGTCACCCTCCGCCGCT CGCCGTCCTCCTCGGCGCCATCCCCG CCGCCCTCGCGCCACTCCATTAG	Kodonoptimierte Signalsequenz der alkalischen Phosphatase aus <i>A. chrysogenum</i> <sup>4</sup>
FK584	GACCTAATGGAGTGGCGGCGAGGGCG GCGGGGATGGCGCCGAGGAGGACGG CGAGGCGGCGGAGGGTGACCATGG	Kodonoptimierte Signalsequenz der alkalischen Phosphatase aus <i>A. chrysogenum</i> <sup>4</sup>
FK585	GGGGCGCGCCATGACTCCATTAGGTC CTGCTTC	3'-Ende <i>g-csf</i> mit <i>Ascl</i> -Schnittstelle <sup>5</sup>
FK586	GGATTTAAATACGGCTGAGCCAGATGA CGC	5'-Ende <i>g-csf</i> mit <i>Swal</i> -Schnittstelle <sup>5</sup>
FK647a	ATGGTCACCCTCCGCCGCC	Kodonoptimierte Signalsequenz der alkalischen Phosphatase aus <i>A. chrysogenum</i> <sup>4</sup>
FK648	TCAGGCGGACTTGCGGGC	3'-Ende humanes <i>igf-1</i> , <i>N. crassa</i> optimiert <sup>6</sup>
FK649	TACGGCTGAGCCAGATGACG	3'-Ende <i>g-csf</i> <sup>5</sup>
FK650	TCAGACGGAGGCGTCAAGTG	3'-Ende bovine <i>masel</i> , <i>N. crassa</i> optimiert <sup>7</sup>
FK764	GTTAATTAATCTCATGGTCGTCATTCTG TC	<i>N. crassa cfp</i> -Promotor NCBI-Eintrag U65927 (Position 87 bp – 107 bp) <sup>8</sup>
FK768	GTTACTGGTCGCAGGATCTCAC	<i>N. crassa</i> , putative $\alpha$ -Amylase Contig 7.52 (NCU08132) (Position 44863 bp – 44842 bp) <sup>9</sup>
FK769	AGGCATATCGTGGTTCTCAATG	<i>N. crassa</i> , putative $\alpha$ -Amylase Contig 7.52 (NCU08132) (Position 44193 bp – 44214 bp) <sup>9</sup>

Bezeichnung	Sequenz [5' - 3']	Spezifität
FK771	<u>GGGCGCGCCG</u> ATGCTCTCTCTTTAGG GTGAG	<i>N. crassa cfp</i> -Promotor NCBI-Eintrag U65927 (Position 1675 bp – 1696 bp) <sup>8</sup>
FK773	<u>GGTTAATTAACA</u> ATGCCATGCTTACCTA CC	<i>N. crassa</i> , putativer $\alpha$ -Amylase- Promotor Contig 7.52 (NCU08132) (Position 46788 bp – 46769 bp) <sup>10</sup>
FK774	<u>GGGCGCGCCG</u> TTGTTGTGTGTTTCTGA TGG	<i>N. crassa</i> , putativer $\alpha$ -Amylase- Promotor Contig 7.52 (NCU08132) (Position 45226 bp – 45246 bp) <sup>10</sup>
FK790	GGACGACATGGAGAAGATTTGG	<i>N. crassa actin</i> Contig 7.13 (NCU04173) (Position 576208 bp – 576187 bp) <sup>11</sup>
FK791	GAGCGGACCTAGCCTATACTGC	<i>N. crassa actin</i> Contig 7.13 (NCU04173) (Position 575501 bp – 575521 bp) <sup>11</sup>
FK867	<u>GGGGCGCGCC</u> ATGGTCCAGCTCCTCT CCGC	<i>N. crassa</i> RNase N1 ( <i>grn</i> ) Contig 7.15 (NCU01045) (Position 684504 bp – 684485 bp) <sup>12</sup>
FK868	<u>GGGATTTAAAT</u> TTAGTTGCAAGCAACA AAGTTG	<i>N. crassa</i> RNase N1 ( <i>grn</i> ) Contig 7.15 (NCU01045) (Position 683879 bp – 683900 bp) <sup>12</sup>

<sup>1</sup> Orbach *et al.*, 1990; <sup>2</sup> Collins *et al.*, 1991; <sup>3</sup> Yelton *et al.*, 1983; <sup>4</sup> Isogai *et al.*, 1991; <sup>5</sup> Nagata *et al.*, 1986; <sup>6</sup> Kiepe *et al.*, 2005; <sup>7</sup> Chatani *et al.*, 2000; <sup>8</sup> Temporini *et al.*, 2004; <sup>9</sup> Borkovich *et al.*, 2004; <sup>10</sup> Galagan *et al.*, 2004; <sup>11</sup> Tinsley *et al.*, 1998; <sup>12</sup> Takahashi, 1988

### 2.1.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die dazugehörigen Plasmidkarten sind in den Abbildungen 32 bis 37 im Anhang dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Bezeichnung	Referenz
pMon	Klonierungsvektor, Derivat des pBlueskript	Borovkov und Rivkin, 1997
pBlueskriptII SK +	Klonierungsvektor	Stratagene (Hamburg)
pSN237	Derivat des pUC19 mit deletiertem <i>his-3</i> -Gen <sup>15</sup>	F. Kempken, persönliche Mitteilung
pSF245	Derivat des pUC19 mit Resistenzkassette aus <i>trpC</i> -Promotor <sup>3</sup> , <i>hph</i> -Gen (Hygromycin B-Resistenz) <sup>14</sup> und <i>arg-2</i> -Terminator <sup>1</sup>	F. Kempken, persönliche Mitteilung
pAS336	Derivat des pSN237 mit zusätzlicher multipler Klonierungsstelle aus den Restriktionsendonukleasen <i>Pacl</i> , <i>Ascl</i> , <i>Swal</i> und <i>Pmel</i>	Diese Arbeit
pAS337	Derivat des pSF245 mit zusätzlicher Multipler Klonierungsstelle aus den Restriktionsendonukleasen <i>Pacl</i> , <i>Ascl</i> , <i>Swal</i> und <i>Pmel</i>	Diese Arbeit
pAS355	Gen für das humane <i>igf-I</i> <sup>6</sup> , für <i>N. crassa</i> optimiert	Diese Arbeit
pAS356	Gen für die bovine <i>rnaseI</i> <sup>7</sup> , für <i>N. crassa</i> optimiert	Diese Arbeit
pAS357	Derivat des pAS336 mit inseriertem <i>trpC</i> -Promotor <sup>3</sup> , humanen <i>igf-I</i> , <i>arg-2</i> -Terminator und deletiertem <i>his-3</i> -Gen <sup>13</sup>	Diese Arbeit
pAS358	Derivat des pAS336 mit inseriertem <i>trpC</i> -Promotor, boviner <i>rnaseI</i> , <i>arg-2</i> -Terminator und deletiertem <i>his-3</i> -Gen	Diese Arbeit
pAS359	Derivat des pAS336 mit inseriertem <i>acu-5</i> -Promotor <sup>2</sup> , humanen <i>igf-I</i> , <i>arg-2</i> -Terminator und deletiertem <i>his-3</i> -Gen	Diese Arbeit
pAS360	Derivat des pAS336 mit inseriertem <i>acu-5</i> -Promotor, boviner <i>rnaseI</i> und <i>arg-2</i> -Terminator	Diese Arbeit
pAS364	Derivat des pAS336 mit inseriertem <i>trpC</i> -Promotor und <i>arg-2</i> -Terminator	Diese Arbeit
pAS365	Derivat des pAS336 mit inseriertem <i>acu-5</i> -Promotor und <i>arg-2</i> -Terminator	Diese Arbeit
pAS366	Gen für das humane <i>g-csf</i> <sup>5</sup> , für <i>E. coli</i> optimiert	Diese Arbeit
pAS367	Derivat des pAS369 mit <i>trpC</i> -Promotor, humanen <i>igf-I</i> und <i>arg-2</i> -Terminator	Diese Arbeit
pAS368	Derivat des pAS369 mit <i>trpC</i> -Promotor, boviner <i>RNase A</i> und <i>arg-2</i> -Terminator	Diese Arbeit

Plasmid	Bezeichnung	Referenz
pAS369	Derivat des pAS337 mit inseriertem <i>trpC</i> -Promotor und <i>arg-2</i> -Terminator	Diese Arbeit
pIB370	humanes <i>g-csf</i>	Diese Arbeit
pIB384	Derivat des pAS336 mit inseriertem <i>trpC</i> -Promotor, humanen <i>g-csf</i> und <i>arg-2</i> -Terminator	Diese Arbeit
pAS385	Derivat des pAS365 mit humanen <i>g-csf</i>	Diese Arbeit
pAS390	Derivat des pAS368, <i>trpC</i> -Promotor ersetzt durch <i>acu-5</i> -Promotor	Diese Arbeit
pAS393	Derivat des pAS369 mit humanen <i>g-csf</i>	Diese Arbeit
pAS395	Derivat des pAS365 mit humanen <i>igf-I</i>	Diese Arbeit
pAS474	<i>cfp</i> -Promotor aus <i>N. crassa</i> <sup>11</sup> in pMon	Diese Arbeit
pAS477	$\alpha$ -Amylase-Promotor in pMon	Diese Arbeit
pAS479	Derivat des pAS358, <i>trpC</i> -Promotor ersetzt durch <i>cfp</i> -Promotor	Diese Arbeit
pAS480	Derivat des pAS358, <i>trpC</i> -Promotor ersetzt durch $\alpha$ -Amylase-Promotor	Diese Arbeit
pAS486	Derivat des pAS357, <i>trpC</i> -Promotor ersetzt durch $\alpha$ -Amylase-Promotor	Diese Arbeit
pAS488	Derivat des pIB384, <i>trpC</i> -Promotor ersetzt durch $\alpha$ -Amylase-Promotor	Diese Arbeit
pAS494	Derivat des pIB384, <i>trpC</i> -Promotor ersetzt durch <i>cfp</i> -Promotor	Diese Arbeit
pNW511	Derivat des pAS358, <i>trpC</i> -Promotor ersetzt durch Enolase-Promotor <sup>14</sup>	Weiland, 2005
pNW521	Derivat des pAS358, <i>trpC</i> -Promotor ersetzt durch <i>ccg-1</i> -Promotor <sup>15</sup>	Weiland, 2005
pAS564	Derivat des pAS479, <i>rnaeI</i> ersetzt durch <i>grn</i> <sup>12</sup>	Diese Arbeit
pAS566	Derivat des pNW521, <i>rnaeI</i> ersetzt durch <i>grn</i> <sup>12</sup>	Diese Arbeit

<sup>13</sup> Legerton und Yanofsky, 1985; <sup>14</sup> Kaster *et al.*, 1983; <sup>15</sup> McNally und Free, 1988

## 2.1.4 Membranen und Filter

Whatman Filterpapier	VWR (Hamburg)
Nylonmembran „GeneScreen Hybridization Transfer Membrane“	Perkin Elmer (Boston, USA)
Nitrocellulose Rundfilter	Millipore (Schwalbach)
Protran BA 79 Cellulosenitratfilter 0,1 µm	Schleicher & Schuell (Dassel)

## 2.1.5 Chemikalien

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0.8)	Roth (Karlsruhe)
Natriumiodoacetoacetat	Sigma (Steinheim)
Hefe-RNA	Roche (Mannheim)

Alle sonstigen in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen BioRad (München), Roche (Mannheim), Merck (Bad Soden), QIAgen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Der Reinheitsgrad der Chemikalien entsprach „*pro analysi* (*p. a.*)“.

## 2.1.6 Radiochemikalien

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP Spezifische Aktivität: 110 Tbq/mmol (= 3000 Ci/mmol)	Hartman Analytics (Braunschweig)
---	----------------------------------

## 2.1.7 Größenstandards

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Größenstandards

Bezeichnung	Größenbereich	Typ	Hersteller
PreStained Marker	6,5 – 172 kDa	Protein-Marker	New England Biolabs (Beverly, USA)
Erweiterter 100 bp-Marker	100 – 5000 bp	DNA-Marker	MBBL (Bielefeld)
$\lambda$ -HindIII-Marker	584 – 23130 bp	DNA-Marker	MBBL (Bielefeld)

## 2.1.8 Enzyme

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Roche (Mannheim)
<i>RNase A</i> , bovin	Sigma (München)
Restriktionsendonukleasen	QBiogene (Heidelberg), New England Biolabs (Beverly, USA)
Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	QBiogene (Heidelberg)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Eppendorf (Hamburg)

## 2.1.9 Kits

NucleoSpin Plasmid Quick Pure	Machery-Nagel (Düren)
NucleoSpin Extract II	Machery-Nagel (Düren)
NucleoBond PC 100	Machery-Nagel (Düren)
DECAprime	Ambion (Austin, USA)
Lumi-Light <sup>Plus</sup> Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit)	Roche (Mannheim)

## 2.1.10 Antikörper

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
monoklonaler humaner Insulin-like growth factor-Antikörper	Maus (IgG)	Acris (Hiddenhausen)
monoklonaler humaner G-CSF-Antikörper	Maus (IgG)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
polyklonaler Ribonuklease A (Rinderpankreas)-Antikörper	Kaninchen (IgG)	DPC Biermann (Bad Nauheim)
polyklonaler Anti-Kaninchen IgG-Antikörper, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Schaf	Roche (Mannheim)
polyklonaler Anti-Maus IgG-Antikörper, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Ziege	Amersham (Freiburg)

### 2.1.11 Häufig verwendete Lösungen

Denaturierungspuffer	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
	pH 12-13	
50x Denhardt's	Ficoll 400	1 % (w/v)
	Polyvinylpyrrolidon	1 % (w/v)
	Rinderserumalbumin	1 % (w/v)
10x MOPS	EDTA	10 mM
	MOPS	0,2 M
	Natriumacetat	50 mM
	pH 7,0 mit NaOH eingestellt	
Neutralisierungspuffer	NaCl	2 M
	Tris	1 M
	pH 5,5 mit HCl eingestellt	
20x SSPE	EDTA	20 mM
	NaCl	3,6 M
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 M
	pH 7,4 mit NaOH eingestellt	
10x TBE	Borsäure	1 M
	Tris	1 M
	EDTA	20 mM
	pH 8,3 mit HCl eingestellt	
10x TBS	NaCl	1,5 M
	Tris	0,5 M
	pH 7,8 mit HCl eingestellt	
Tris-HCl	Tris	10 mM
	pH 8,0 mit HCl eingestellt	
10x Wet-Blot Puffer	EDTA	15 mM
	Natriumacetat	0,2 M
	Tris	0,4 M
	SDS	0,5 % (w/v)
	pH 11,0 mit NaOH eingestellt	

### 2.1.12 Nährmedien für *Escherichia coli*

Zur Anzucht von *E. coli* wurde autoklaviertes (121 °C, 1 bar, 20 min) Luria-Bertani (LB)-Medium (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,2 – 7,5) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Für das Festmedium wurde zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben. Zur Selektion des Ausgangsstammes *E. coli* XL1-Blue wurde das Medium nach dem Autoklavieren mit Tetrazyklin (12,5 mg/L) versetzt. Zur Anzucht der Transformanten wurde das Medium, je nach Abhängigkeit der vom Vektor vermittelten Antibiotika-Resistenz, mit den Antibiotika Ampicillin (50 mg/L) bzw. Kanamycin (30 mg/L)

versetzt. Für die „Blau-Weiß-Selektion“ wurde dem Medium der Farbstoff X-Gal (40 mg/L) und der künstliche Induktor IPTG (0,2 M) zugegeben.

### 2.1.13 Nährmedien für *Neurospora crassa*

Zur Herstellung der Nährmedien für *Neurospora crassa* wurden folgende Stammlösungen verwendet:

Spurenelemente-Lösung [SEL]	Zitronensäure · H <sub>2</sub> O	5 % (w/v)
	ZnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5 % (w/v)
	Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1 % (w/v)
	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,25 % (w/v)
	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,05 % (w/v)
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05 % (w/v)
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,05 % (w/v)
	CHCl <sub>3</sub>	0,2 % (v/v)
50x Vogels-Stammlösung [50x VSL]	Natriumcitrat	15 % (w/v)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 % (w/v)
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	10 % (w/v)
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 % (w/v)
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,5 % (w/v)
	Spurenelemente-Lösung	0,5 % (w/v)
	Biotin	0,0025 % (w/v)
	CHCl <sub>3</sub>	0,02 % (v/v)
20x SGF-Stammlösung [20x SGF]	L-Sorbose	20 % (w/v)
	Glucose	0,5 % (w/v)
	Fructose	0,5 % (w/v)
2x SC-Stammlösung [2x SC]	KNO <sub>3</sub>	0,2 % (w/v)
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,14 % (w/v)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 % (w/v)
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 % (w/v)
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,02 % (w/v)
	NaCl	0,02 % (w/v)
	Biotin	10 mg/L
	SEL	0,02 % (v/v)
CHCl <sub>3</sub>	0,2 % (v/v)	

Mit Hilfe dieser Stammlösungen konnten die Gebrauchsmedien zur Anzucht von *Neurospora crassa* angesetzt werden. Für den Ausgangsstamm FGSC #6103 wurden die Medien mit 200 mg/L Histidin versetzt; für den Ausgangsstamm F#10292 wurden die Medien mit 200 mg/L Histidin sowie 500 mg/L Arginin versetzt. Medien, bei denen stabile Transformanten des Stamms F#10292 verwendet wurden, wurden mit 500 mg/L Arginin versetzt.

Vogels-Minimalmedium mit Saccharose [VMM-S] (für Flüssigmedium)	50x VSL Saccharose	2 % (v/v) 2 % (w/v)
Vogels-Minimalmedium mit Saccharose [VMM-S] (zur Anzucht im Kolben oder Schrägagar-Röhrchen)	50x VSL Saccharose Agar-Agar	2 % (v/v) 2 % (w/v) 1,5 % (w/v)
Vogels-Minimalmedium mit SGF [VVM-SGF] zur Anzucht auf Petrischalen	50x VSL 20x SGF Agar-Agar	2 % (v/v) 5 % (v/v) 1,5 % (w/v)
Vogels-Minimalmedium mit SGF und Glucose [VVM-SGF + G] zur Anzucht auf Petrischalen	50x VSL 20x SGF 10 % (w/v) Glucose Agar-Agar	2 % (v/v) 5 % (v/v) 5 % (v/v) 1,5 % (w/v)
Top-Agar	50x VSL 20x SGF Agarose	2 % (v/v) 5 % (v/v) 1 % (w/v)
Mikrokonidien-Medium [MKM]	Saccharose 2x SC Iodoacetoacetat Agarose	2 % (w/v) 5 % (v/v) 10 mM 2 % (w/v)
Vogels-Minimalmedium mit Acetat [VMM-Ac]	50x VSL Natriumacetat	2 % (v/v) 40 mM
Vogels-Minimalmedium mit Glucose und Ethanol [VMM-G-E]	50x VSL Glucose Ethanol	2 % (v/v) 1 % (v/v) 1 % (w/v)
Vogels-Minimalmedium mit Glucose [VMM-G]	50x VSL Glucose	2 % (v/v) 2 % (v/v)
Vogels-Minimalmedium mit Maltose [VMM-M]	50x VSL Maltose	2 % (v/v) 2 % (v/v)
Vogels-Minimalmedium mit Stärke [VMM-St]	50x VSL Weizenstärke	2 % (v/v) 2 % (v/v)
BMM	Maismehl-Filtrat Malzextrakt	2,5 % (w/v) 3 % (w/v)
CCM	Saccharose NaCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O Fe (SO) <sub>2</sub> · 7 H <sub>2</sub> O Tryptic Soybroth Fleischextrakt Hefeextrakt Dextrin pH-Wert 6,9 – 7,1 mit NaOH eingestellt	0,3 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,05 % (w/v) 10 mg/L 0,5 % (w/v) 0,1 % (w/v) 0,1 % (w/v) 1,5 % (w/v)

Alle Gebrauchsmedien wurden durch Autoklavieren (112 °C, 1 bar, 20 min) sterilisiert. Hitzeempfindliche Komponenten wurden getrennt angesetzt und dem autoklavierten Medium zugefügt.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Alle gentechnischen Arbeiten erfolgten nach der Sicherheitsstufe 1 (S1/B1) des Gentechnikgesetzes und der Gentechniksicherheitsverordnung vom 01.07.1990.

### 2.2.1 Kultur- und Anzuchsbedingungen

#### 2.2.1.1 *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte bei 37 °C über Nacht auf LB-Festmedium oder in LB-Flüssigmedium unter Schütteln bei 280 rpm (Minitron HT Infors Schüttler).

#### 2.2.1.2 *Neurospora crassa*

Die Kultivierung von *N. crassa* erfolgte im Wesentlichen nach Davis und de Serres (1970). Die Kultivierung des Stammes FGSC #6103 erfolgte auf Vogels-Minimalmedium mit Saccharose (VMM-S) und 2 % (w/v) Agar-Agar unter Zugabe von Histidin (200 mg/L). Der Stamm F#10292 wurde auf dem gleichen Medium unter Zugabe von Histidin (200 mg/L) und Arginin (500 mg/L) angezogen. Das Wachstum erfolgte bei Dauerlicht und 25 °C. Zur Selektion von Transformanten wurde Medium ohne Histidin verwendet. Die Anzucht der Pilze erfolgte dabei im Schrägagar-Röhrchen für 5 – 10 Tage. Nach der Elektroporation von *N. crassa*-Konidien (Kapitel 2.2.4) wurden diese mit Hilfe von Top-Agar auf Vogels-Minimalmedium mit SGF und den entsprechenden Aminosäuren ausplattiert.

Die Anzucht zur Gewinnung von Konidien erfolgte in 250 mL Erlenmeyerkolben auf VMM-S-Medium mit 2 % (w/v) Agar-Agar. Das Wachstum des vegetativen Myzels zur Isolation von Nukleinsäuren (2.2.7) und Proteinexpression (2.3.1) fand in Vogels-Minimalmedium bei 25 °C und unter Schütteln (180 rpm, Minitron HT Infors Schüttler) für 2 – 6 Tage statt.

## 2.2.2 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

1 L LB-Medium mit Tetrazyklin (12,5 mg/L) wurden 1%ig mit einer *E. coli* (K12) XL1-Blue Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>595</sub> 0,5 – 0,6 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf 4 °C abgekühlt und in GSA-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 4'500 rpm für 15 min sedimentiert (JLA-16.250 Rotor, Beckman Coulter Avanti J-20 XP-Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Anschluss mehrfach in kaltem sterilen Wasser gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 20 mL kaltem 10%igen Glycerin aufgenommen und 15 min bei 5'500 rpm (JA-25.50 Rotor, Beckman Coulter Avanti J-20 XP-Zentrifuge) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10%igen Glycerin bis zu einem Endvolumen von 2 – 3 mL resuspendiert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bis zum Gebrauch bei – 80 °C.

## 2.2.3 Transformation von *Escherichia coli*

Elektrokompetente *E. coli* –Zellen wurden durch Elektroporation mit dem „Gene Pulser II“ (BioRad, München) nach den Angaben des Herstellers transformiert. Die Transformation erfolgte hierbei nach leicht veränderten Bedingungen (Spannung: 2,5 kV, Widerstand: 200 Ω, Kapazität: 25 µF) in einer Elektroporationsküvette (Spaltbreite: 2 mm) mit 50 – 100 ng Plasmid-DNA bzw. 1/10 Vol eines zuvor entsalzten Ligationsansatzes. Nach der Transformation wurde der Ansatz mit 1 mL SOC-Medium (2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM Mg<sub>2</sub>Cl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 M Laktose) versetzt und nach 10-minütiger Inkubation bei RT auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausgestrichen.

## 2.2.4 Transformation von *Neurospora crassa*

Die Transformation erfolgte wie bei Margolin *et al.* (1997) beschrieben. Hierbei wurden die Stämme FGSC #6103 bzw. F#10292 in 250 mL Erlenmeyerkolben auf Vogels-Minimalmedium mit den entsprechenden Aminosäuren angezogen. Die Kultivierung erfolgte für 9 – 15 Tage bei Dauerlicht und 25 °C. Für die Elektroporation wurden die Konidien vorsichtig mit 40 mL 1 M Sorbit + 0,25 % (v/v) Tween20 durch Schütteln abgeschwemmt. Die Suspension wurde durch Mull filtriert und für 5 min bei 4'000 rpm

zentrifugiert (S4180-Rotor, Beckman Coulter 21R-Zentrifuge). Die Konidien wurden dreimal mit je 50 mL 1 M Sorbit gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Konidien in einem Volumen von 1 mL 1 M Sorbit resuspendiert. Mittels Thoma-Zählkammer wurde die Konidienzahl bestimmt und auf  $2,5 \cdot 10^9$  Konidien/mL eingestellt. Nach Zugabe von 300 ng linearisierter DNA zu 40  $\mu$ L der Suspension wurde das Konidien-DNA-Gemisch für 5 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte in vorgekühlten Küvetten (Gene Pulse Cuvette Spaltbreite 20 mm, BioRad, München) mittels Elektroporation im „Gene Pulser II“ (BioRad, München) unter folgenden Bedingungen: Spannung 1,5 kV, Widerstand 600  $\Omega$  und einer Kapazität von 25  $\mu$ F. Nach der Elektroporation wurden die Konidien in 1 mL Sorbit resuspendiert und mit Hilfe des Top-Agars (Kapitel 2.1.13) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte wie unter 2.2.1.2 beschrieben. Die entstandenen Kolonien wurden auf Schrägagar-Röhrchen mit Vogels-Minimalmedium und den entsprechenden Aminosäuren überimpft.

### **2.2.5 Mikrokonidien-Passage von *Neurospora crassa***

Die Gewinnung der Mikrokonidien erfolgte leicht verändert nach Ebbole und Sachs (1990). *N. crassa*-Konidien wurden auf Mikrokonidien-Medium (Kapitel 2.1.13) überimpft und bei 25 °C für 8 – 12 Tage angezogen. Im Anschluss wurde die Bildung der Mikrokonidien mikroskopisch überprüft. Die Mikrokonidien wurden mit Hilfe einer Impföse auf VMM-SGF mit den jeweils benötigten Zusätzen überführt. Nach 4 – 8 Tagen wurden die entstandenen Kolonien auf VMM-S-Schrägagar-Röhrchen überführt und für weitere 5 Tage bei 25 °C und Dauerlicht inkubiert.

### **2.2.6 Isolierung von DNA aus *Escherichia coli***

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in kleinem Maßstab erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid Quick Pure-Kit (Machery-Nagel, Düren) ausgehend von einer 3 mL-Kultur nach Angaben des Herstellers.

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit dem NucleoBond PC 100-Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Vorgaben des Herstellers isoliert.

## 2.2.7 Isolierung von Nukleinsäuren aus *Neurospora crassa*

### 2.2.7.1 Isolierung von DNA aus *Neurospora crassa*-Konidien

Die Isolation der DNA aus Konidien erfolgte nach dem Protokoll von Yeadon und Catchside (1996). *N. crassa*-Konidien aus 5 – 10 Tage alten Schrägagar-Röhrchen wurden durch Zugabe von 2 mL 1x TE-Puffer gewonnen. Die entstandene Konidien-suspension wurde 10 min bei 100 °C erhitzt und im Anschluss 10 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 13'000 rpm zentrifugiert (F2402H-Rotor, Beckman Coulter 21R-Zentrifuge). Der Überstand enthielt die DNA, die für PCR-Reaktionen (Kapitel 2.2.14) eingesetzt werden konnte.

### 2.2.7.2 Isolierung von DNA aus *Neurospora crassa*

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus *N. crassa* erfolgte in Anlehnung an Borges *et al.* (1990). Das Myzel wurde hierbei nach dreitägiger Anzucht aus der Flüssigkultur entnommen, in flüssigem Stickstoff zerrieben und mit DNA-Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 % (w/v) SDS) versetzt. Nach einer ersten Phenolisierung und einer anschließenden Zentrifugation bei 5'500 rpm (S4180-Rotor, Beckman Coulter 21R-Zentrifuge), wurde der Überstand zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Es folgte eine einstündige Inkubation der Probe mit 20 mg/mL RNase A (Sigma, Steinheim) zum Abbau der RNA. Daran schloss sich eine erneute Phenolextraktion an. Der wässrige Überstand wurde mit 2 Vol Ethanol absolut und 1/10 Vol 8 M Ammoniumacetat versetzt und 30 min bei – 80 °C inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation wurde das Pellet mit 70%igen Ethanol gewaschen und in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst. Die Konzentration der DNA wurde mittels Photometer (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Qualität der DNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

### 2.2.7.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Neurospora crassa*

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus *N. crassa* wurde ausgehend von  $5 \cdot 10^8$  Konidien das Myzel in flüssigem Vogelsminimalmedium mit Saccharose und den entsprechenden Aminosäuren unter Schütteln bei 180 rpm (Minitron HT Infors Schüttler) für 2 – 6 Tage angezogen. Die Isolation erfolgte nach Hoge *et al.*, 1982. Das Myzel wurde in flüssigem Stickstoff zerrieben und mit 2,5 mL kochendem RNA-Lysepuffer (0,2 M Borsäure, 30 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, pH 9,0) versetzt. Nach Zugabe von 60 °C warmem Phenol wurden die Proben für 15 min bei 5'500 rpm zentrifugiert (S4180-Rotor, Beckman Coulter 21R-Zentrifuge). Der wässrige Überstand wurde erneut phenolisiert. Es folgte ein zweimaliges Ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Der wässrige Überstand wurde mit 2 Vol Ethanol absolut und 1/10 Vol 8 M Ammoniumacetat versetzt und 30 min bei – 80 °C inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation wurde das Pellet mit 70%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 5 mL Wasser gelöst und die RNA über Nacht durch Zugabe des gleichen Volumens 4 M LiCl selektiv gefällt. Nach einer erneuten 15-minütigen Zentrifugation wurde das Pellet mit 70%igen Ethanol gewaschen und in 100 µL DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm (Eppendorf, Hamburg) bestimmt und ihre Qualität mittels Gelelektrophorese in einem denaturierenden RNA-Gel (Kapitel 2.2.8.2) überprüft.

## 2.2.8 Gelelektrophorese

### 2.2.8.1 Gelelektrophorese von DNA

Die DNA wurde in 1%igen Agarose-Gelen in 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer nach Sambrook *et al.* (1989) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden dazu mit 20 % (v/v) DNA-Ladepuffer (40 % (w/v) Saccharose, 40 mM EDTA, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Als Größenstandard diente mit *Hind*III hydrolysierte  $\lambda$ -DNA (MBBL, Bielefeld) oder ein 100 – 5000 Basenpaar-Marker (MBBL, Bielefeld). Zur Anfärbung wurde das Gel mit 0,002 % Ethidiumbromid versetzt.

### **2.2.8.2 Gelelektrophorese von RNA**

Die aufzutrennende RNA wurde mit RNA-Ladepuffer (56 % (v/v) Formamid, 11 % (v/v) MOPS (10x), 18 % (v/v) Formaldehyd, 7 % (v/v) Glycerin, 0,5 % w/v Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 65 °C inkubiert und nachfolgend bei 4 °C gehalten. Die Auftrennung der RNA erfolgte in 1,5%igen Formaldehyd-Agarose-Gelen mit 1x MOPS-Puffer.

### **2.2.9 Hydrolyse von DNA**

Die Hydrolyse der DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte in dem vom Hersteller (New England Biolabs, Beverley; QBiogene, Heidelberg) empfohlenen Puffer nach Sambrook *et al.* (1989).

### **2.2.10 Reinigung und Gelelution von DNA**

Die Reinigung von PCR-Proben bzw. von Ligationen erfolgte ebenso wie die Elution von DNA aus einem Agarose-Gel mit dem NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers.

### **2.2.11 Dephosphorylierung von DNA**

Die Dephosphorylierung der DNA erfolgte mit Hilfe der Shrimp Alkalischen Phosphatase (Roche, München) nach Angaben des Herstellers.

### **2.2.12 Erstellung des Polylinkers**

Je 5 µL einer 100 pmol/µL-Lösung der zu verwendenden Oligonukleotide wurden miteinander gemischt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Das entstandene Gemisch wurde bei Raumtemperatur abgekühlt. Zur Vermeidung von Oligomerisierungen wurde der Ansatz 5 min bei 40 °C erhitzt und auf Eis bis zur weiteren Verwendung in der Ligation gelagert.

### 2.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde unter Verwendung der T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers (QBiogene, Heidelberg) durchgeführt. Zur Ligation von *Taq*-PCR-Fragmenten wurde der mit der Restriktionsendonuklease *XcmI* hydrolysierte Klonierungsvektor pMon (Borovkov und Rivkin, 1997) verwendet. PCR-Fragmente, welche durch die Amplifikation mit der *Pfu*-Polymerase erhalten wurden, wurden in den mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* hydrolysierten Klonierungsvektor inseriert. Die linearisierte Vektor-DNA wurde vor der Ligation dephosphoryliert (Kapitel 2.2.11).

### 2.2.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte verändert nach Saiki *et al.* (1988). Gesamt-DNA (60 – 100 ng) oder Plasmid-DNA (0,1 – 1 ng) wurden in einem Gesamt-Volumen von 50 µL in 1x PCR-Puffer (Eppendorf, Hamburg) mit 10 mM dNTPs (Eppendorf, Hamburg), je 5 µM der Oligonukleotide sowie einer Einheit *Taq*-Polymerase zur Amplifikation im "Mastercycler Gradient" (Eppendorf, Hamburg) eingesetzt. Für PCRs, deren Amplifikate zur Klonierung dienten, wurde anstelle der *Taq*-Polymerase die *Pfu*-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Das PCR-Programm sah eine Anfangsdenaturierung von 2 min bei 94 °C vor. Es folgten 43 Zyklen von Denaturierung (1 min bei 94 °C), Hybridisierung (1 min) und Elongation (72 °C). Die Hybridisierungstemperatur wurde den verwendeten Oligonukleotiden angepasst und lag zwischen 55° und 68 °C. Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit von den zu amplifizierenden DNA-Fragmenten gewählt. Zum Abschluss der Reaktion erfolgte eine 5-minütige Endelongation bei 72 °C.

### 2.2.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte nach der „Didesoxy-Methode“ (Sanger *et al.*, 1977) und wurde von der Firma MWG (Martinsried) durchgeführt.

## 2.2.16 Southern- und Northern-Blot

Für den Southern-Blot wurde im Anschluss an die Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten (Kapitel 2.2.8.1) das Gel 45 min mit Denaturierungspuffer und 45 min mit Neutralisierungspuffer behandelt. Der Transfer der DNA erfolgte nach Southern (1975) mit 20x SSPE-Puffer durch einen Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Perkin Elmer, Boston). Die Fixierung der Nukleinsäuren erfolgte durch eine UV-Quervernetzung der DNA mit Hilfe des "UV-Stratalinkers" (Stratagene, Heidelberg). Koloniefilter-Hybridisierungen wurden nach einer Methode von Grundstein und Hogness (1975) durchgeführt.

Für den Northern-Blot erfolgte die Auftrennung der RNA unter denaturierenden Bedingungen (Kapitel 2.2.8.2). Mit Hilfe des Kapillarblots wurde die RNA auf die Membran übertragen. Die RNA wurde mit Hilfe des Stratalinkers auf der Nylonmembran fixiert. Im Anschluss wurde die Membran mit Methylenblau-Lösung (0,5 M Natriumacetat, 0,005 % (w/v) Methylenblau) nach dem Protokoll von Herrin und Schmidt (1988) gefärbt. Das Entfärben erfolgte so lange, bis die rRNA-Banden deutlich von der Umgebung zu unterscheiden waren.

## 2.2.17 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

DNA-Fragmente, die zur DNA-DNA-Hybridisierung dienen, wurden mit Hilfe des "DECAprime II"-Kits (Ambion, Austin) unter Einsatz von [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP (Hartman Analytics, Braunschweig) nach dem Protokoll des Herstellers markiert.

DNA-Fragmente, die zur DNA-RNA-Hybridisierung dienen, wurden mit Hilfe der "*Oligonucleotide Primed Labeling*" (OPL)-Lösungen OPL I (Hexamer-Gemisch, Pharmacia, Freiburg) und OPL II-C (100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM Tris-HCl pH 7,5, 500  $\mu$ M dTTP, 500  $\mu$ M dATP, 500  $\mu$ M dGTP, 70 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) ebenfalls unter Verwendung von [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983). Überschüssige Nukleotide wurden durch Filtration über eine „MicroSpin G-25“-Sephadex-Säule (Amersham, Freiburg) abgetrennt.

## 2.2.18 Radioaktive Hybridisierung von Southern- und Northern-Blots

Die Nylonmembran (Kapitel 2.2.16) wurde in Hybridisierungspuffer (5x SSPE, 0,2 % (w/v) SDS, 5x Denhardts-Lösung, 50 % (v/v) Formamid) für 2 – 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markierten Sonde (Kapitel 2.2.17) und eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Unspezifisch gebundene DNA wurde durch Waschen der Membran in Waschpuffer (5x SSPE, 0,2 % (w/v) SDS) bei einer Temperatur von 55 – 70 °C entfernt. Die Exposition der Membran mit Fuji-Ray Röntgenfilmen erfolgte in Expositionskassetten (Quanta Fast Detail, Dupont, Wilmington) bei – 80 °C für 4 h bis mehrere Tage.

Für eine Rehybridisierung des Blots wurde die Radioaktivität von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran zweimal 15 min in Stripping-Puffer (0,1x SSPE, 0,5 % (w/v) SDS) gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran in 0,02x SSPE gewaschen. Nach dem Trocknen konnte die Membran erneut für die radioaktive Markierung verwendet werden.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Gewinnung rekombinanter Proteine

Die *N. crassa*-Transformanten sowie der Wildtyp wurden in 250 mL Erlenmeyerkolben mit Vogelsminimalmedium mit den entsprechenden Aminosäuren für 9 – 15 Tage bei Dauerlicht und 25 °C angezogen. Die Konidien wurden in 40 mL 1 M Sorbit + 0,25 % (v/v) Tween20 aus dem Myzel gelöst. Die Suspension wurde durch Mull filtriert und für 5 min bei 4'000 rpm zentrifugiert (S4180-Rotor, Beckman Coulter 21R-Zentrifuge). Die Konidien wurden zweimal mit je 50 mL 1 M Sorbit gewaschen und im Anschluss mit Hilfe der Thoma-Zählkammer ausgezählt.  $5 \cdot 10^8$  Konidien/mL wurden als Vorkultur in 50 mL Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 25 °C und unter Schütteln (180 rpm) (Minitron HT Infors Schüttler). Das Myzel wurde durch Mull filtriert, gewaschen und 2 g (Feuchtgewicht) in das jeweilige Expressionsmedium überführt. Die Kulturen wurden anschließend für 8 h – 4 Tage inkubiert.

### 2.3.2 Chloroform-Methanol Präzipitation von Proteinen

Die Fällung der Proteine erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Wessel und Flügge (1984). Soweit nicht anders angegeben wurden 3 mL des Kulturüberstandes (Kapitel 2.3.1) mit 3 Vol Methanol, 1 Vol Chloroform und 3 Vol Wasser versetzt. Die anschließende 15-minütige Zentrifugation erfolgte bei 5'500 rpm (S4180-Rotor, Allegra 21R-Zentrifuge, Beckman Coulter). Die obere Chloroform-Phase wurde verworfen und die untere wässrige Phase mit 3 Vol Methanol gemischt und wie oben beschrieben für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 15 µL 2x SDS-Probenpuffer und 15 µL 8x SDS-Probenpuffer (6,96 % (w/v) SDS, 5,75 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,29 % (v/v) β-Mercaptoethanol) resuspendiert und für 10 min bei 95 °C denaturiert.

### 2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen erfolgte leicht verändert nach Lämmli (1970). Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter Verwendung eines 15%igen Trenngels und eines 5%igen Sammelgels in einer vertikalen Elektrophoresekammer (P8DS-Elektrophorese-Kammer, Emperor Penguin, Portsmouth, England) in 1x SDS-Laufpuffer (50 mM Tris, 2,89 M Glycerin, 0,1 % (v/v) SDS). Als Größenstandard wurde der „PreStained Protein Marker“ (New England Biolabs, Beverley, USA) verwendet.

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	1,1 mL	7,125 mL
0,6 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 mL	-
1,875 M Tris-HCl, pH 8,8	-	3,75 mL
10 % (w/v) APS	50 µL	75 µL
10 % (w/v) SDS	100 µL	150 µL
TEMED	7,5 µL	20 µL
H <sub>2</sub> O	7,82 mL	3,975 mL

### 2.3.4 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Polyacrylamidgelen wurden für 1 Stunde bis über Nacht in Coomassie-Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie R-250, 30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) inkubiert. Die Entfärbung mit Coomassie-Entfärbemittel (30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) erfolgte für 3 h bis über Nacht, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

### 2.3.5 Western-Blot

Nach der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Kapitel 2.3.3) wurde der Western-Blot nach Burnette (1981) mit Hilfe der „Wet-Blot“-Apparatur (BioRad, München) durchgeführt. Die Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel) wurde kurz in Wasser und anschließend für 10 min in 1x Wet-Blot-Puffer (10 % (v/v) 10x Wet-Blot-Puffer, 30 % (v/v) Methanol, 70 % Wasser) äquilibriert. Das Gel wurde ausschließlich in 1x Wet-Blot-Puffer für 10 min inkubiert. Bei einer Stromstärke von 0,65 mA/cm<sup>2</sup> wurden die Proteine innerhalb von 2 – 3 h auf die Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach Beendigung des Blot-Vorgangs wurde die Membran nach Salinovich und Montelaro (1986) in Ponceau-S-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau-S, 3 % (v/v) Essigsäure) gefärbt, um die Proteine auf der Membran zu fixieren und die Transfereffizienz zu überprüfen.

### 2.3.6 Dot-Blot

Der Dot-Blot erfolgte leicht verändert nach einem Protokoll von Heinicke *et al.*, 1992. Die Nitrocellulose-Membran wurde für 5 min in Wasser äquilibriert und in die SRC96D Minifold-Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel) eingespannt. Die Membran wurde für 5 min getrocknet. Anschließend wurden verschiedene Volumina der Kulturüberstände mit Wasser auf ein Volumen von 300 µL aufgefüllt und in die Vertiefung gegeben. Die Membran wurde erneut für 30 – 60 min getrocknet und die verbliebene Flüssigkeit mittels Vakuum entfernt. Es folgte eine 15-minütige Fixierung der Proteine auf der Membran in Fixierungslösung (10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Isopropanol) sowie ein kurzes Waschen der Membran in 1x TBS. Die Membran konnte nun für die Detektion rekombinanter Proteine eingesetzt werden.

### 2.3.7 Detektion rekombinanter Proteine (RNase A)

Nach dem Western-Blot (Kapitel 2.3.5) wurde die Membran in 5 % (w/v) BSA in 1x TBS für 3 – 4 h inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper ( $\alpha$ -RNase A) (DPC Biermann, Bad Nauheim) in einer Verdünnung 1:5000 zugegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran einmal in 1x TBS + 0,5 % (v/v) Tween20 für 15 min, zweimal 10 min in 1x TBS + 0,1 % (v/v) Tween20 und zweimal kurz in 1x TBS gewaschen. Die Membran wurde anschließend für 2 – 4 h mit dem sekundären Antikörper Anti-Kaninchen IgG (Amersham, Freiburg) in einer Verdünnung von 1: 25000 inkubiert. Die Membran wurde wie oben angeführt erneut gewaschen. Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgte mit Hilfe des Lumi-Light<sup>Plus</sup> Western Blotting Kits (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

### 2.3.8 RNase-Indikator-Test

Der Test auf RNase-Aktivität erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Tarragona-Fiol *et al.*, 1992. Je 20  $\mu$ L des Kulturüberstandes ausgewählter Transformanten wurden auf RNase-Indikatorplatten (50 mM Natriumacetat pH 5,0, 2 % (w/v) Bacto-Agar, 0,3 % Hefe-RNA) gegeben und für 2 – 4 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten verschiedene RNase A-Konzentrationen sowie Wasser. Die Reaktion wurde mit 6 % (v/v) HCl abgestoppt.

### 2.3.9 Erstellung Protease-defizienter Mutanten

Zur Erstellung Protease-defizienter Mutanten von *N. crassa* wurden  $1 \cdot 10^4$  *N. crassa*-Konidien auf Protease-Assay-Platten (2 % (v/v) 50x Vogelsstammlösung, 1 % (w/v) Gelatine, 1 % (w/v) Milchpulver, 5 % (w/v) Agar-Agar) ausgestrichen und für 45 sec mit UV-Licht bestrahlt. Im Anschluss wurden die Platten für 9 – 15 Tage bei Dauerlicht und 25 °C inkubiert. Mutanten, die keinen oder einen sehr kleinen Hof auf den Protease-Assay-Platten bildeten, wurden auf VMM-S-His-Medium überimpft. Nach einem erneuten Test auf Protease-Assay-Platten wurden die Kolonien ausgewählt, die keinen Hof bildeten.

### 3. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die heterologe Expression des humanen "Granulocyte-Colony Stimulating Factor" (G-CSF), des humanen "Insulin-like Growth Factor I" (IGF-I), der bovinen "Ribonuklease A" (RNase A) sowie der endogenen "Ribonuklease N1" (RNase N1) in dem filamentösen Hyphenpilz *Neurospora crassa*.

#### 3.1 Optimierung der Gene zur heterologen Expression in *Neurospora crassa*

Für die heterologe Expression wurden drei therapeutisch relevante Proteine gewählt: der humane Granulocyte-Colony Stimulating Factor (*g-csf*), der humane Insulin-like Growth Factor I (*igf-I*) sowie die bovine RNase A (*maseI*).

Der Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), auch Somatomedin C genannt, gehört zu den Cytokinen (Jansen *et al.*, 1983). Er sorgt für ein postnatales Wachstum und dient der Regulation der Zellproliferation (Le Roith und Butler, 1999). Die hier verwendete Basenpaarsequenz des *igf-I* wurde an 49 Positionen an den Kodongebrauch von *N. crassa* angepasst.

Die Ribonuklease A (RNase A) wurde ursprünglich aus dem Rinderpankreas isoliert und sorgt für den Abbau von RNA (Carsana *et al.*, 1988). Die hier verwendete Sequenz wurde ähnlich wie die Sequenz des *igf-I*-Gens an den Kodongebrauch von *N. crassa* angepasst. Die Sequenz unterscheidet sich in 60 Basen von der Originalsequenz. Vor den beiden Genen wurde die Sequenz für das Sekretionssignal der alkalischen Phosphatase aus *Acremonium chrysogenum* eingefügt. Diese Sequenz sollte eine Sekretion des Proteins in den Kulturüberstand ermöglichen. Ähnlich wie die Sequenz der beiden Gene *igf-I* und *maseI* wurde auch das Sekretionssignal an den *N. crassa*-Kodongebrauch angepasst. Die Synthese der Gene *igf-I* und *maseI* erfolgte durch die Firma Entelchon (Regensburg).

Der Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) gehört zu den Cytokinen. Es sorgt während der Hämatopoese für die Produktion und Differenzierung weißer Blutkörperchen und dient zur Granulozyten-Induktion (Nagata *et al.*, 1986). Die Sequenz des hier verwendeten Gens wurde von der Firma Strathmann (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Der Kodongebrauch wurde für die Expression in *E. coli* optimiert und unterscheidet sich in 134 Positionen von der Originalsequenz. Um auch hier eine Sekretion in den

Kulturüberstand zu ermöglichen, wurden zwei komplementäre Oligonukleotide synthetisiert. Diese bestehen aus der oben erwähnten Sequenz der alkalischen Phosphatase aus *Acremonium chrysogenum*. Die Oligonukleotide wurden so konzipiert, dass die entstehenden Enden am 5'-Ende komplementär zu Sequenzen der Restriktionsendonuklease *Ascl* und am 3'-Ende komplementär zu Sequenzen der Restriktionsendonuklease *Drall* waren. Die Fragmente konnten so in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Vektors integriert werden.

Neben den drei heterologen Genen wurde für die Expression noch die endogene RNase N1 (*grn*, NCU01045.2) aus *N. crassa* gewählt (Takahashi, 1988). Ähnlich wie die RNase A sorgt auch die RNase N1 als guanyl-spezifische Ribonuklease für den Abbau von RNA. Die verwendete Sequenz kodiert für das Proprotein mit der dazugehörigen Sekretionssignalsequenz.

Die Sequenzen aller hier verwendeten Gene sind im Anhang (Abb. 38 – Abb. 41) aufgeführt.

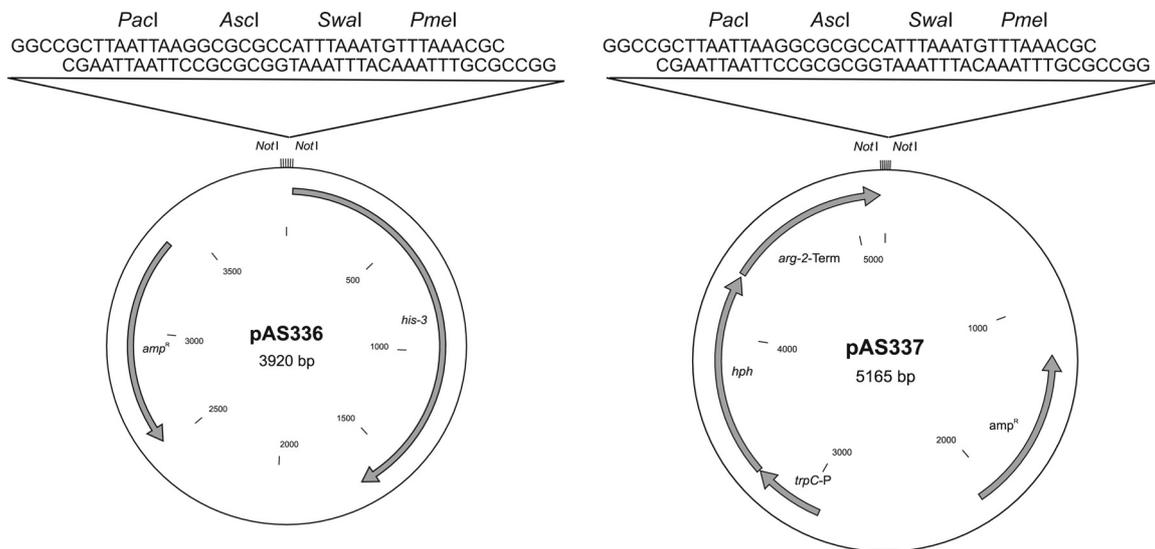
## 3.2 Erstellung eines Vektorsystems zur Transformation von *Neurospora crassa*

Als Grundlage für die Expression der Gene *igf-I*, *g-csf*, *masel* und *grn* wurden Vektoren hergestellt, die einen Polylinker mit Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *PacI*, *Ascl*, *SwaI* und *PmeI* besitzen. Diese Erkennungssequenzen kommen statistisch gesehen selten in DNA-Sequenzen vor und ermöglichen daher den einfachen und gezielten Austausch einzelner Komponenten der Expressionskassette.

Für die Genexpression wurden zwei Vektoren gewählt, die für die Transformation von Hyphenpilzen geeignet sind. Der erste Vektor enthält eine Resistenzkassette, bei der das Gen für die Hygromycin B-Resistenz (*hph*) unter der Kontrolle des *trpC*-Promotors steht. Dieser Vektor integriert zufällig und in mehreren Kopien in das Genom eines Hyphenpilzes (Staben *et al.*, 1989). Der zweite Vektor ist speziell für die Transformation von *N. crassa* konzipiert. Die Integration erfolgt hierbei über homologe Rekombination als einzelne Kopie in den *his3*-Locus des verwendeten *N. crassa*-Stammes (Margolin *et al.*, 1997).

Zur Herstellung des Polylinkers wurden zwei komplementäre Oligonukleotide synthetisiert. Diese waren so konzipiert, dass die entstehenden Enden komplementär zu den durch die Restriktionsendonuklease *NotI* entstandenen Enden waren. Die Fragmente konnten so in

die *NotI*-Restriktionsschnittstelle der Plasmide pSN237 und pSF245 integriert werden. Die entstandenen Vektoren pAS336 und pAS337 sind in Abbildung 6 gezeigt.



**Abbildung 6: Basisvektoren für die heterologe Genexpression in filamentösen Hyphenpilzen**

Für eine effiziente Expression heterologer Gene ist es notwendig, dass die kodierenden Abschnitte durch entsprechende regulatorische Sequenzen flankiert werden. Neben dem Terminator stellt der Promotor ein wichtiges Regulationselement dar. Anhand von Literaturdaten wurden sechs Promotoren ausgewählt (*cfp*, *ccg1*, *trpC*, *acu-5*, Enolase,  $\alpha$ -Amylase; Tab. 9), die eine Expression der Gene ermöglichen sollten. Während es sich bei den Promotoren *trpC*,  $\alpha$ -Amylase, Enolase und *ccg1* um konstitutive Promotoren handelte, sollte der *acu-5*-Promotor durch Acetat als Kohlenstoffquelle induzierbar sein und bei der Verwendung von Saccharose reprimiert werden (Collins *et al.*, 1991). Der *cfp*-Promotor wird hingegen durch die Verwendung von Ethanol reprimiert und durch Glukose induziert (Temporini *et al.*, 2004). Der *ccg1*-Promotor wurde bereits für die heterologe Genexpression in *N. crassa* verwendet (Freitag *et al.*, 2004). Arbeiten mit den beiden Promotoren *ccg1* und Enolase wurden von Weiland (2005) durchgeführt.

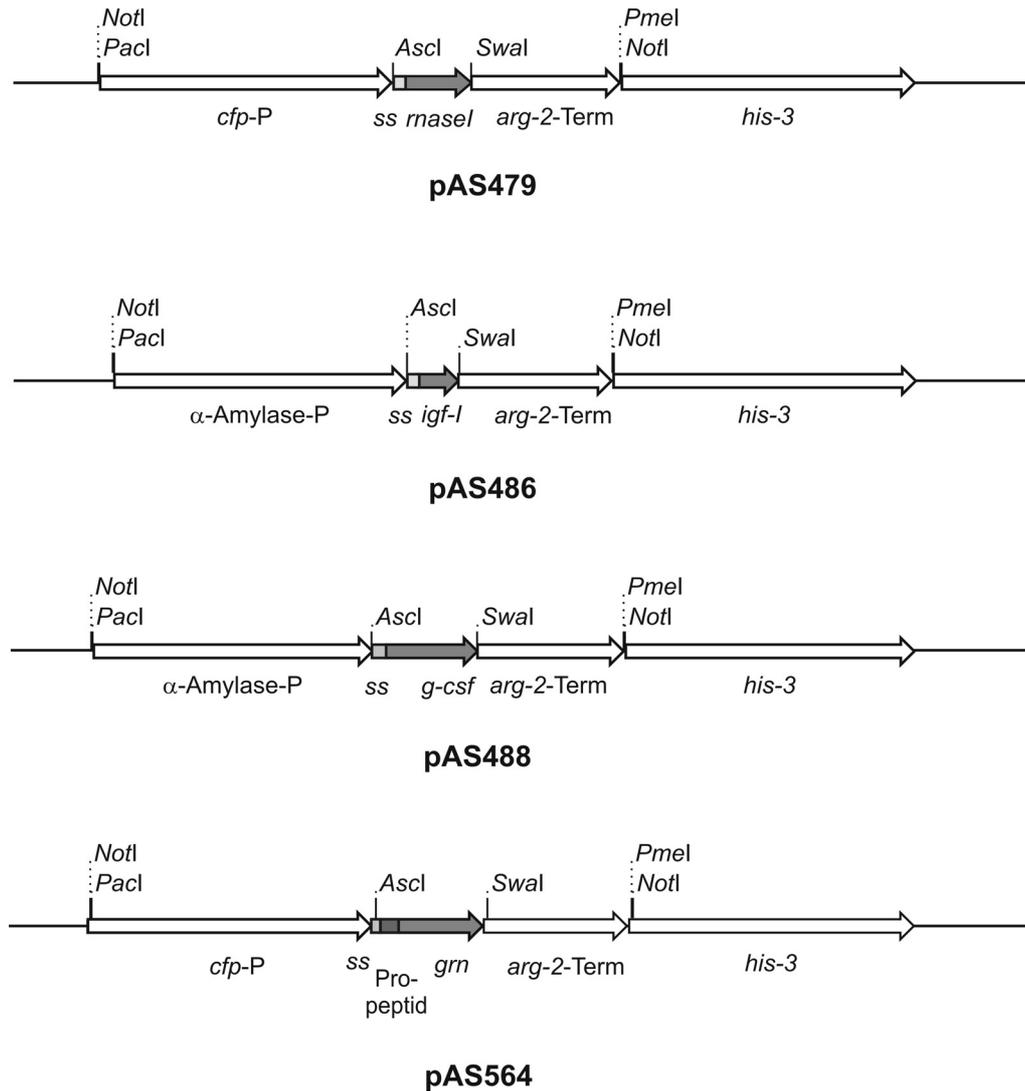
Für die Expression wurden die in Kapitel 3.1 ausgewählten Gene verwendet. Als Terminator diente bei allen Konstrukten der *arg-2*-Terminator aus *N. crassa* (Orbach *et al.*, 1990). Eine Übersicht aller verwendeten Elemente der Expressionskassette ist in Tabelle 9 angegeben.

**Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Elemente der Expressionskassetten, die zur Genexpression in *N. crassa* verwendet wurden**

Promotor	Gen (Ursprungsorganismus)	Terminator
<i>cfp</i> (Temporini <i>et al.</i> , 2004)	<i>g-csf</i> ( <i>Homo sapiens</i> ) (Nagata <i>et al.</i> , 1986)	<i>arg-2</i> (Orbach <i>et al.</i> , 1990)
<i>ccg1</i> (McNally und Free, 1988)	<i>igf-I</i> ( <i>Homo sapiens</i> )(Jansen <i>et al.</i> , 1983)	
<i>trpC</i> (Yelton <i>et al.</i> , 1983)	<i>rnase1</i> ( <i>Bos taurus</i> )(Carsana <i>et al.</i> , 1988)	
<i>acu-5</i> (Collins <i>et al.</i> , 1991)	<i>grn</i> ( <i>N. crassa</i> ) (Takahashi, 1988)	
Enolase (Toda <i>et al.</i> , 2001)		
$\alpha$ -Amylase (Tada <i>et al.</i> , 1991)		

In Klammern sind die Autoren aufgeführt, welche die entsprechenden Elemente beschrieben haben. Für den Enolase- und  $\alpha$ -Amylase-Promotor sind die Autoren aufgeführt, die eine Beschreibung des Promotors in einem verwandten Ascomyceten durchgeführt haben.

Für die Transformation wurden verschiedene Vektorkonstrukte hergestellt, die die einzelnen Gene unter der Kontrolle der verschiedenen Promotoren enthielten. Zunächst wurde der *arg-2*-Terminator mittels PCR amplifiziert (Kapitel 2.2.14) und in die Basisvektoren (Abb. 6) über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *SwaI* und *PmeI* eingefügt. Im Anschluss erfolgte die Amplifikation der Promotoren mit den dazugehörigen Oligonukleotiden (Tab. 4). Diese konnten in die Vektoren mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *PacI* und *AscI* eingeführt werden. Die Gene *igf-I*, *rnase1*, *g-csf* und *grn* wurden durch die Restriktionsendonukleasen *AscI* und *SwaI* hydrolysiert, über eine Gelelektion isoliert und in die vorher entstandenen Vektoren integriert. In Abbildung 7 sind beispielhaft vier der hergestellten Vektoren dargestellt, die für die Genexpression verwendet wurden. Die Karten aller in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind im Anhang aufgeführt (Abb. 32 – Abb. 37).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Vektoren für die Genexpression in *Neurospora crassa***

Dargestellt sind die Expressionskassetten der Plasmide pAS479, pAS486, pAS488 und pAS564. Der bakterielle Anteil ist in den Grafiken nicht dargestellt. (Abkürzungen: P – Promotor, ss – Signalsequenz, Term – Terminator)

Für die Expression der Gene *igf-1*, *g-csf*, *rnas1* und *grn* wurden zwei Vektoren mit einem Polylinker aus Sequenzen für selten schneidende Restriktionsendonukleasen hergestellt (pAS336, pAS337). Die spezifischen Restriktionsschnittstellen ermöglichen einen schnellen und gezielten Austausch einzelner Elemente der Expressionskassette. So entstanden achtzehn Vektoren, die zur Expression der heterologen Gene unter Verwendung unterschiedlicher Promotoren genutzt wurden.

### 3.3 Transformation von *Neurospora crassa* und molekulare Charakterisierung der Transformanten

Zur heterologen Expression der Gene *igf-1*, *g-csf* und *rnase1* in *N. crassa* wurden die Expressionsvektoren (Tab. 10) mittels Elektroporation in Konidien der Stämme FGSC #6103 und F #10292 transformiert. Die hier verwendeten Vektoren enthalten ein im 5'-Bereich deletiertes *his-3* Gen aus *N. crassa*. Dadurch können die Vektoren in Rezipienten-Stämme (FGSC #6103, F #10292) eingebracht werden, die ein *his-3*-Allel mit einer Punktmutation im 3'-Bereich des Gens tragen. Diese Stämme sind auxotroph für die Aminosäure Histidin und wachsen nicht auf Minimalmedium. Die erfolgreiche homologe Integration des Vektors kann daher durch Selektion auf Minimalmedium überprüft werden (Margolin *et al.*, 1997).

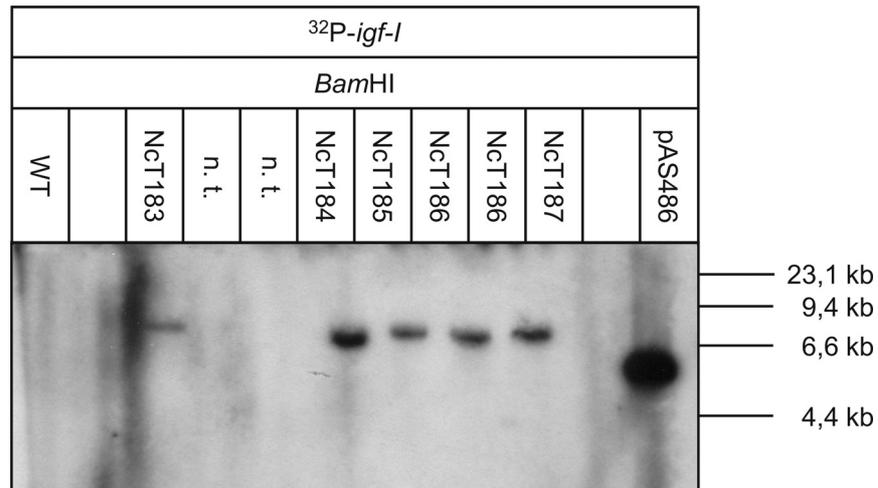
Tabelle 10: Übersicht über die zur Transformation verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Promotor	Gen
pAS357	<i>trpC</i>	<i>igf-1</i>
pAS359	<i>acu-5</i>	<i>igf-1</i>
pAS486	$\alpha$ -Amylase	<i>igf-1</i>
pIB384	<i>trpC</i>	<i>g-csf</i>
pAS385	<i>acu-5</i>	<i>g-csf</i>
pAS488	$\alpha$ -Amylase	<i>g-csf</i>
pAS358	<i>trpC</i>	<i>rnase1</i>
pAS359	<i>acu-5</i>	<i>rnase1</i>
pAS479	<i>cfp</i>	<i>rnase1</i>
pAS480	$\alpha$ -Amylase	<i>rnase1</i>
pNW511	Enolase	<i>rnase1</i>
pNW521	<i>ccg1</i>	<i>rnase1</i>
pAS563	$\alpha$ -Amylase	<i>grn</i>
pAS564	<i>cfp</i>	<i>grn</i>
pAS565	Enolase	<i>grn</i>
pAS566	<i>ccg1</i>	<i>grn</i>

Alle verwendeten Vektoren enthielten den *arg-2*-Terminator.

Nach der Transformation wurden pro Transformationsansatz bis zu 15 Transformanten auf erfolgreiche Integration des Vektors mittels Southern-Hybridisierung untersucht. Die Abbildungen 8 und 9 zeigen exemplarisch die Ergebnisse zweier Southern-Hybridisierungen.

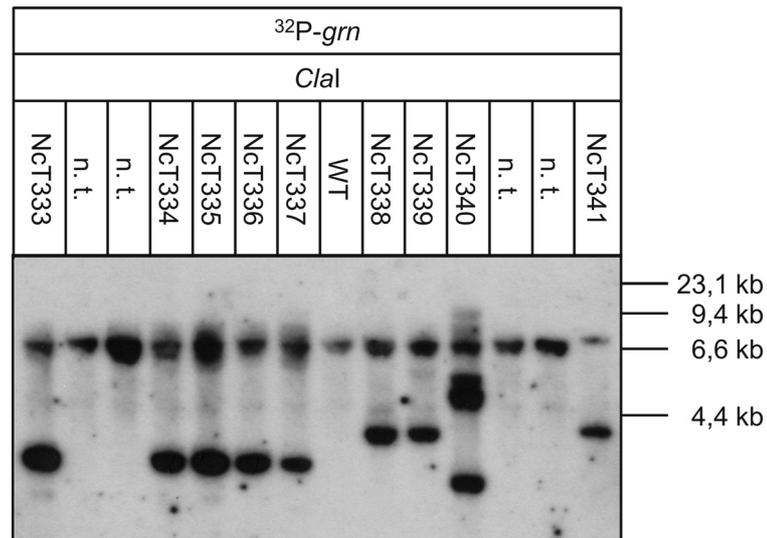
Abbildung 8 zeigt das Ergebnis einer Southern-Hybridisierung am Beispiel des Vektors pAS486. Der Rezipientenstamm FGSC #6103 (WT) zeigte keine Hybridisierungssignale. Bei der Hybridisierung der Transformanten war hingegen ein deutliches Signal bei 8,3 kb zu erkennen.



**Abbildung 8: Autoradiogramm der Hybridisierung des heterologen Gens *igf-I* zur Identifizierung von Transformanten**

Es wurden je 20 µg genomische DNA des Rezipientenstammes F #6103 (WT) sowie 8 putativer Transformanten aufgetragen, die mit dem Vektor pAS486 transformiert wurden. Die DNA wurde mit *Bam*HI hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte mit einem  $^{32}\text{P}$ -markierten 283 bp-Fragment des Vektors pAS486, das dem *igf-I*-Gen entspricht. Als Größenmarker diente mit *Hind*III hydrolysierte λ-DNA. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, n. t. – nicht transformiert, WT – Wildtyp)

In Abbildung 9 ist das Ergebnis einer Southern-Hybridisierung am Beispiel von Transformanten, welche die Plasmide pAS564 und pAS566 enthalten, dargestellt. In allen Spuren ist das Signal der endogenen RNase N1 bei 9,1 kb vorhanden. Transformanten, bei denen eine erfolgreiche Insertion des Plasmids pAS564 stattgefunden hatte, zeigten ein zusätzliches Signal bei 3,3 kb, während bei Transformanten mit dem integrierten Plasmid pAS566 ein Signal bei 4,0 kb zu sehen war.



**Abbildung 9: Autoradiogramm der Hybridisierung des heterologen Gens *grn* zur Identifizierung von Transformanten**

Es wurden je 20  $\mu\text{g}$  genomische DNA des Rezipientenstammes F #6103 sowie 13 putativer Transformanten mit *Clal* hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte mit dem  $^{32}\text{P}$ -markierten *grn*-Gen. Als Größenmarker diente mit *HindIII* hydrolysierte  $\lambda$ -DNA. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, n. t. – nicht transformiert, WT – Wildtyp)

Auf diese Weise wurden in der vorliegenden Arbeit ca. 240 Transformanten untersucht. Die Analysen ergaben, dass 76 Transformanten die gewünschten Expressionsvektoren enthielten. Diesen wurde für die weiteren Untersuchungen eine Transformantenummer zugeteilt (Tab. 11).

Tabelle 11: Übersicht der Transformanten mit inserierten Expressionsvektoren

<i>Transformantennummer</i>	<i>Verwendetes Plasmid</i>	<i>Promotor :: Gen</i>
NcT117	pAS357	<i>trpC :: igf-I</i>
NcT118	pAS357	<i>trpC :: igf-I</i>
NcT119	pAS357	<i>trpC :: igf-I</i>
NcT120	pAS357	<i>trpC :: igf-I</i>
NcT121	pAS357	<i>trpC :: igf-I</i>
NcT122	pAS357	<i>trpC :: igf-I</i>
NcT123	pAS357	<i>trpC :: igf-I</i>
NcT150	pAS359	<i>acu-5 :: igf-I</i>
NcT151	pAS359	<i>acu-5 :: igf-I</i>
NcT152	pAS359	<i>acu-5 :: igf-I</i>
NcT153	pAS359	<i>acu-5 :: igf-I</i>
NcT154	pAS359	<i>acu-5 :: igf-I</i>
NcT155	pAS359	<i>acu-5 :: igf-I</i>
NcT156	pAS359	<i>acu-5 :: igf-I</i>
NcT183	pAS486	$\alpha$ -Amylase :: <i>igf-I</i>
NcT184	pAS486	$\alpha$ -Amylase :: <i>igf-I</i>
NcT185	pAS486	$\alpha$ -Amylase :: <i>igf-I</i>
NcT186	pAS486	$\alpha$ -Amylase :: <i>igf-I</i>
NcT187	pAS486	$\alpha$ -Amylase :: <i>igf-I</i>
NcT188	pAS486	$\alpha$ -Amylase :: <i>igf-I</i>
NcT189	pAS486	$\alpha$ -Amylase :: <i>igf-I</i>
NcT190	pAS486	$\alpha$ -Amylase :: <i>igf-I</i>
NcT191	pAS486	$\alpha$ -Amylase :: <i>igf-I</i>
NcT192	pAS486	$\alpha$ -Amylase :: <i>igf-I</i>
NcT193	pAS486	$\alpha$ -Amylase :: <i>igf-I</i>
NcT134	pIB384	<i>trpC :: g-csf</i>
NcT135	pIB384	<i>trpC :: g-csf</i>
NcT136	pIB384	<i>trpC :: g-csf</i>
NcT163	pAS385	<i>acu-5 :: g-csf</i>
NcT164	pAS385	<i>acu-5 :: g-csf</i>
NcT280	pAS488	$\alpha$ -Amylase :: <i>g-csf</i>
NcT281	pAS488	$\alpha$ -Amylase :: <i>g-csf</i>
NcT282	pAS488	$\alpha$ -Amylase :: <i>g-csf</i>
NcT283	pAS488	$\alpha$ -Amylase :: <i>g-csf</i>
NcT124	pAS358	<i>trpC :: rnasel</i>
NcT125	pAS358	<i>trpC :: rnasel</i>
NcT126	pAS358	<i>trpC :: rnasel</i>
NcT127	pAS358	<i>trpC :: rnasel</i>
NcT128	pAS358	<i>trpC :: rnasel</i>
NcT129	pAS358	<i>trpC :: rnasel</i>
NcT157	pAS360	<i>acu-5 :: rnasel</i>
NcT158	pAS360	<i>acu-5 :: rnasel</i>
NcT159	pAS360	<i>acu-5 :: rnasel</i>
NcT160	pAS360	<i>acu-5 :: rnasel</i>
NcT161	pAS360	<i>acu-5 :: rnasel</i>
NcT162	pAS360	<i>acu-5 :: rnasel</i>
NcT176	pAS480	$\alpha$ -Amylase :: <i>rnasel</i>
NcT177	pAS480	$\alpha$ -Amylase :: <i>rnasel</i>
NcT178	pAS480	$\alpha$ -Amylase :: <i>rnasel</i>
NcT179	pAS479	<i>cfp :: rnasel</i>

<b>Transformantennummer</b>	<b>Verwendetes Plasmid</b>	<b>Promotor :: Gen</b>
NcT180	pAS479	<i>cfp :: rnasel</i>
NcT181	pAS479	<i>cfp :: rnasel</i>
NcT182	pAS479	<i>cfp :: rnasel</i>
NcT330	pNW511	Enolase :: <i>rnasel</i>
NcT331	pNW521	<i>ccg1 :: rnasel</i>
NcT333	pAS564	<i>cfp :: grn</i>
NcT334	pAS564	<i>cfp :: grn</i>
NcT335	pAS564	<i>cfp :: grn</i>
NcT336	pAS564	<i>cfp :: grn</i>
NcT337	pAS564	<i>cfp :: grn</i>
NcT338	pAS566	<i>ccg1 :: grn</i>
NcT339	pAS566	<i>ccg1 :: grn</i>
NcT340	pAS566	<i>ccg1 :: grn</i>
NcT341	pAS566	<i>ccg1 :: grn</i>
NcT345	pAS563	$\alpha$ -Amylase :: <i>grn</i>
NcT246	pAS563	$\alpha$ -Amylase :: <i>grn</i>
NcT347	pAS563	$\alpha$ -Amylase :: <i>grn</i>
NcT348	pAS563	$\alpha$ -Amylase :: <i>grn</i>
NcT349	pAS563	$\alpha$ -Amylase :: <i>grn</i>
NcT350	pAS565	Enolase :: <i>grn</i>
NcT351	pAS565	Enolase :: <i>grn</i>
NcT352	pAS565	Enolase :: <i>grn</i>
NcT353	pAS565	Enolase :: <i>grn</i>
NcT354	pAS565	Enolase :: <i>grn</i>
NcT355	pAS565	Enolase :: <i>grn</i>
NcT356	pAS565	Enolase :: <i>grn</i>

Bei den molekularen Analysen zeigte sich eine unterschiedliche Effizienz der Integration der einzelnen Vektoren. Während ca. 45 – 70 % der Transformanten eine Integration des *igf-I*-, *rnasel*- und *grn*-Gens zeigten, enthielten nur 13 – 26 % der Transformanten Expressionsvektoren mit dem *g-csf*-Gen.

Die positiven Transformanten wurden im Folgenden zur Transkriptanalyse der heterologen Gene verwendet.

**Die aus der Transformation erhaltenen Transformanten wurden mittels Southern-Blot-Analysen auf die erfolgreiche Insertion der entsprechenden Expressionsvektoren überprüft. Es konnten 76 positive Transformanten identifiziert werden. Der Erfolg der Transformation zeigte hierbei deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Expressionsvektoren.**

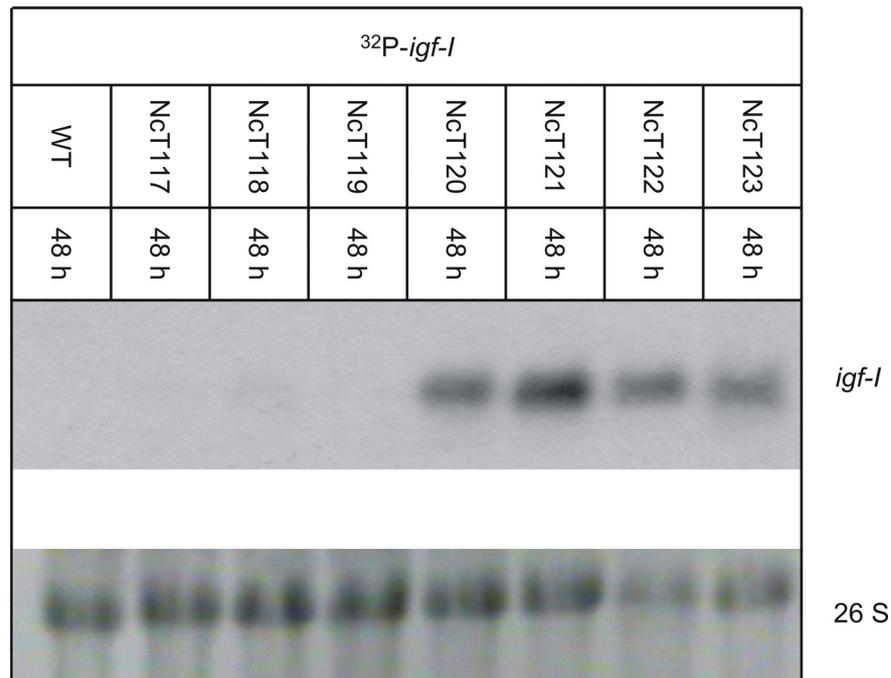
### **3.4 Transkriptanalyse der heterologen Gene *igf-I*, *g-csf* und *rna1***

Nach der Ermittlung der positiven Transformanten mittels Southern-Hybridisierung erfolgte die Charakterisierung der Transformanten auf Transkriptionsebene. Die Transkription wurde mittels Northern-Blot-Analysen untersucht. Dazu wurden Hybridisierungsexperimente mit der Gesamt-RNA der in Kapitel 3.3 ermittelten Transformanten durchgeführt. Als Sonde diente die <sup>32</sup>P-markierte DNA des jeweiligen heterologen Gens.

#### **3.4.1 Transkriptanalyse des heterologen Gens *igf-I***

Zur Transkriptanalyse des heterolog exprimierten Gens *igf-I* wurden Transformanten ausgewählt, die sich auf Promotorebene unterschieden. In den Abbildungen 10 bis 12 sind beispielhaft Ergebnisse für die Expression des *igf-I*-Gens unter Kontrolle des *trpC*-Promotors (Abb. 10), *acu-5*-Promotors (Abb. 11) und  $\alpha$ -Amylase-Promotors (Abb. 12) dargestellt.

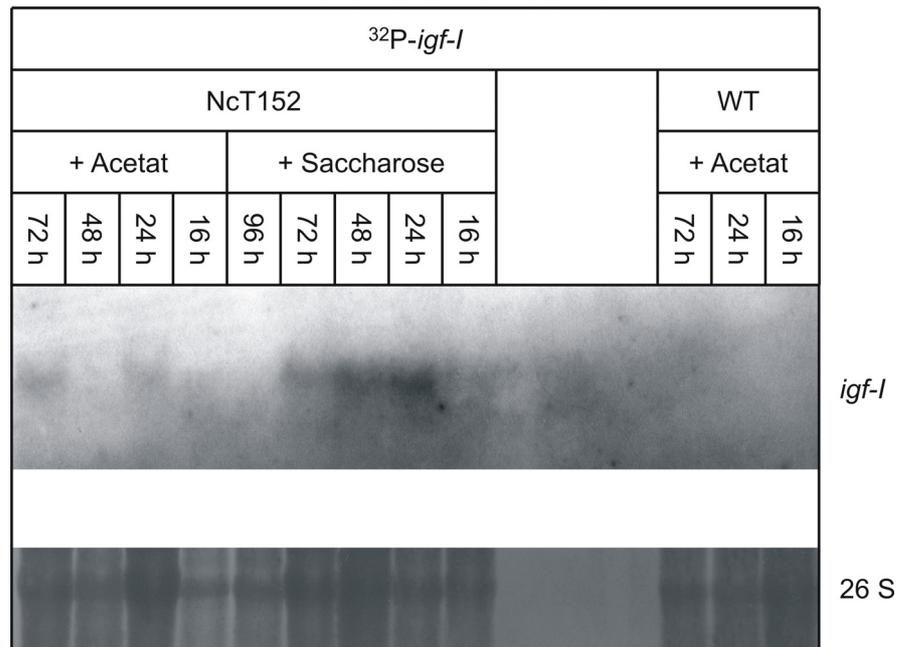
Bei der Verwendung des *trpC*-Promotors konnte in vier von sieben Transformanten (NcT120 – NcT123) eine schwache Transkription des *igf-I*-Gens nachgewiesen werden. Drei Transformanten (NcT117 – NcT119) zeigten keine Transkription (Abb. 10).



**Abbildung 10: Nachweis der Transkription des heterologen Gens *igf-I* unter Kontrolle des *trpC*-Promotors**

Die Transformanten sowie der Wildtyp wurden 48 h in Minimalmedium angezogen. 20 µg Gesamt-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss an den Northern-Blot erfolgte eine Hybridisierung mit der <sup>32</sup>P-markierten *igf-I*-Sonde. Die Expositionszeit betrug 6 Tage. Zur Kontrolle der RNA-Menge wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante; WT – Wildtyp)

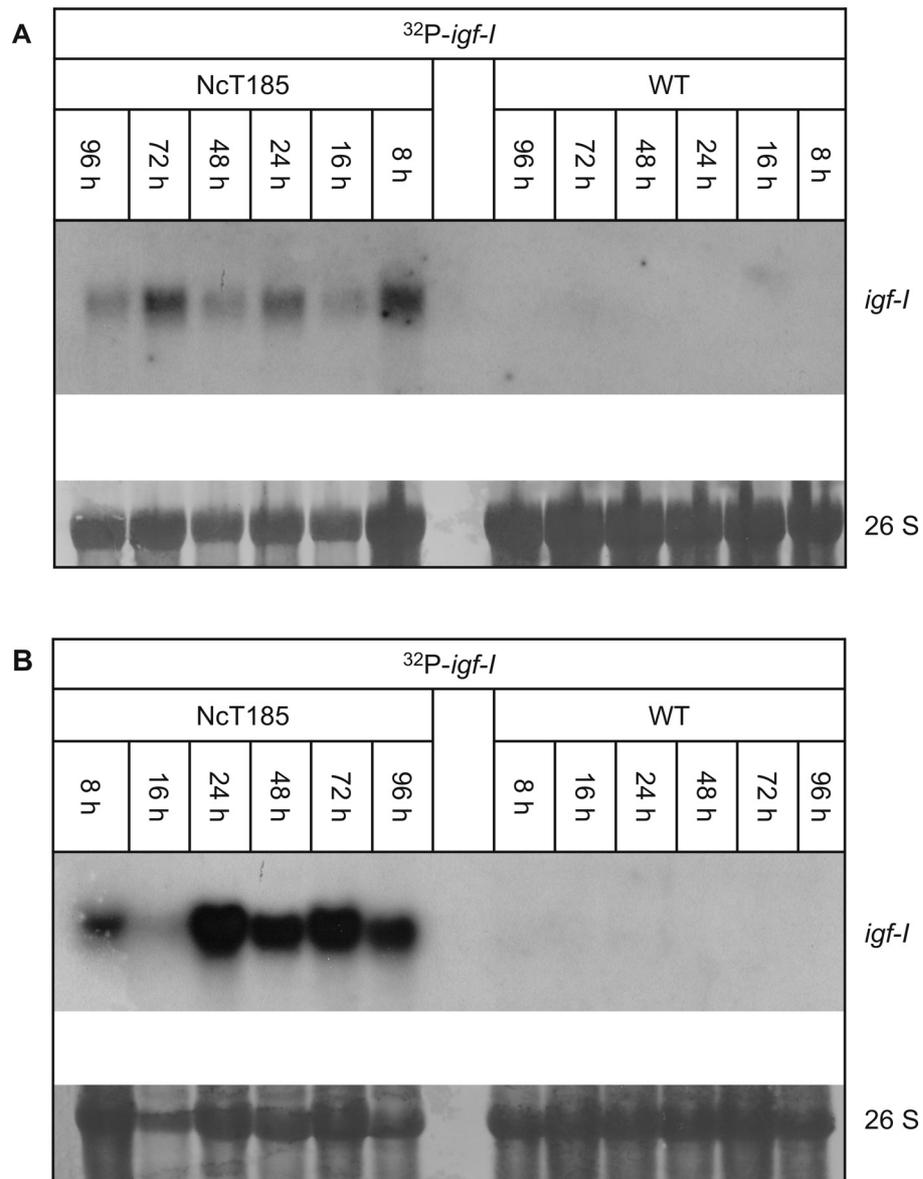
Auch bei der Verwendung des *acu-5*-Promotors war nur eine schwache Transkription des *igf-I*-Gens zu erkennen. Im Gegensatz zur beschriebenen Literatur wurde vermehrt unter reprimierenden Bedingungen eine Transkription beobachtet, die zudem stärker war als unter induzierenden Bedingungen (Abb. 11). Unter induzierenden Bedingungen wurde zusätzlich eine bis zu 75%ige Abnahme des Myzels über den Zeitraum der Expression beobachtet (Daten nicht gezeigt), die vermutlich auf die Autolyse des Myzels zurückzuführen ist.



**Abbildung 11: Nachweis der Transkription des heterologen Gens *igf-I* unter Kontrolle des *acu-5*-Promotors**

Die Transformante NcT152 wurde 16 – 72 h unter induzierenden Bedingungen (+ Acetat) und 16 – 96 h unter reprimierenden Bedingungen (+ Saccharose) angezogen. Der Wildtyp wurde für 16 – 48 h unter induzierenden Bedingungen kultiviert. Es wurden 20 µg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Northern-Blot erfolgte eine Hybridisierung mit der <sup>32</sup>P-markierten *igf-I*-Sonde. Die Exposition erfolgte für 4 Tage. Zur Kontrolle der RNA-Menge wurde die Membran mit Methylenblau gefärbt. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

Im Gegensatz zu den beiden Promotoren *trpC* und *acu-5* zeigte der  $\alpha$ -Amylase-Promotor eine wesentlich stärkere Transkription des *igf-I*-Gens (Abb. 12). Hinsichtlich der Transkriptmenge waren Unterschiede zwischen den einzelnen Transformanten zu beobachten, die nicht auf die Menge der eingesetzten RNA zurückzuführen waren. Während bei der Transformante NcT185 eine zeitliche Ab- und Zunahme der Transkription zu beobachten war (Abb. 12 A), blieb die relative Transkriptmenge der Transformante NcT186 auf einem hohen Niveau nahezu unverändert (Abb. 12 B).



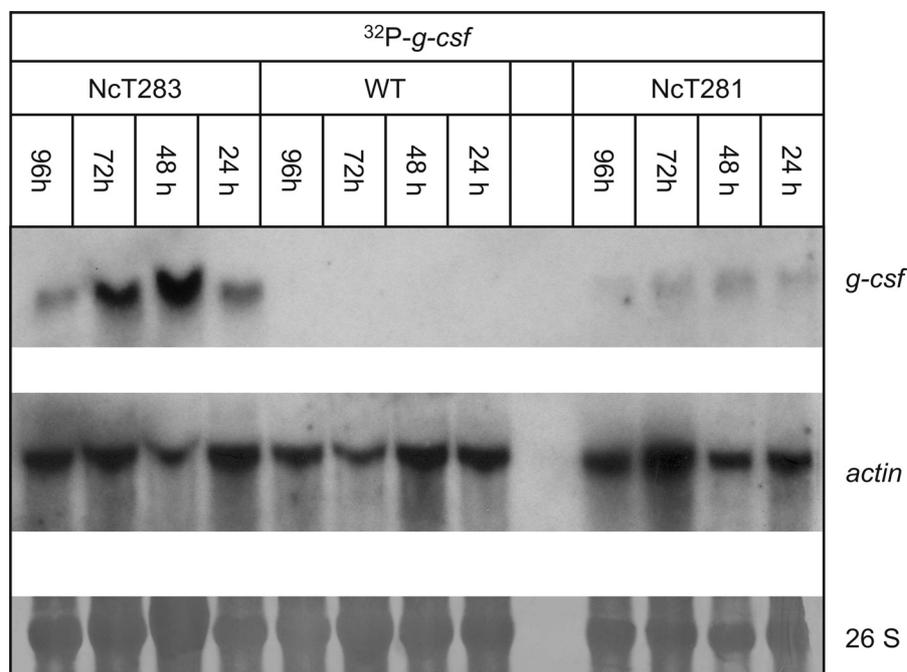
**Abbildung 12: Nachweis der Transkription des heterologen Gens *igf-I* unter Kontrolle des  $\alpha$ -Amylase-Promotors**

Der Wildtyp sowie die Transformanten NcT185 (A) und NcT186 (B) wurden für 8 – 96 h in Minimalmedium mit Maltose angezogen. Es wurden 20  $\mu$ g Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Northern-Blot erfolgte eine Hybridisierung mit der <sup>32</sup>P-markierten *igf-I*-Sonde. Die Expositionszeit betrug 2 Tage. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge wurden die Membranen mit Methylenblau gefärbt. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

**Bei den drei verwendeten Promotoren konnte eine Transkription des *igf-I*-Gens beobachtet werden. Diese war bei dem *trpC*- und *acu-5*-Promotor wesentlich schwächer ausgeprägt als bei dem  $\alpha$ -Amylase-Promotor.**

### 3.4.2 Transkriptanalyse des heterologen Gens *g-csf*

Analog zu den vorhergehenden Analysen wurden auch die Transformanten, welche das *g-csf*-Gen unter der Kontrolle der verschiedenen Promotoren trugen, auf Transkriptebene analysiert. Während bei der Verwendung der *trpC*- und *acu-5*-Promotoren keine Transkripte nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt), war in den Transformanten NcT281 und NcT283 eine Transkription des *g-csf*-Gens unter Verwendung des  $\alpha$ -Amylase-Promotors zu erkennen. (Abb. 13).



**Abbildung 13: Autoradiogramm der Hybridisierung des heterologen Gens *g-csf* unter Kontrolle des  $\alpha$ -Amylase-Promotors**

Es wurden jeweils 30  $\mu$ g Gesamt-RNA der Transformanten NcT283 und NcT284 aufgetragen. Als Negativkontrolle diente der Wildtyp. Die Hybridisierung erfolgte mit dem <sup>32</sup>P-markierten *g-csf*-Gen. Die Expositionszeit betrug 4 Tage. Zur Kontrolle der Expression erfolgte eine Hybridisierung mit einem <sup>32</sup>P-markierten *actin*-Fragment. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen wurde eine Methylenblaufärbung der Membran durchgeführt. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

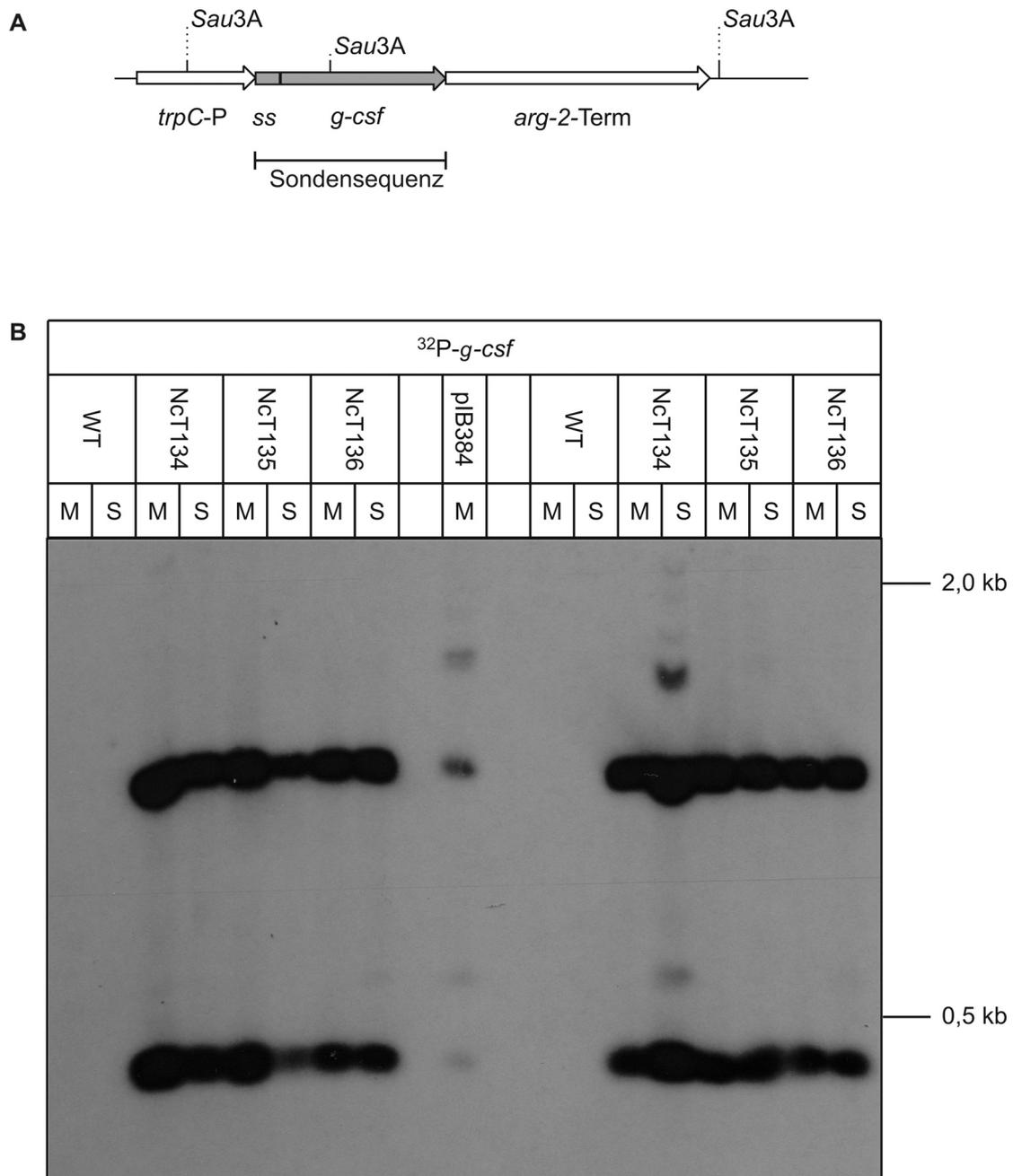
Ein Vergleich der beiden Transformanten NcT283 und NcT284 zeigte deutliche Unterschiede in den jeweiligen Transkriptmengen. In der Transformante NcT283 war eine stärkere Transkription zu erkennen, die nach 48 Stunden ihren Höhepunkt erreichte und anschließend abnahm. Die Transformante NcT281 zeigte hingegen eine deutlich schwächere Expression, in der keine zeitlichen Unterschiede zu sehen waren. Eine Kontrollhybridisierung mit einer *actin*-Sonde erbrachte keine Unterschiede in den Transkriptmengen der beiden Transformanten (Abb. 13). Die unterschiedlichen

Transkriptmengen des *g-csf*-Gens deuteten auf Unterschiede in den regulatorischen Elementen der Transformanten hin.

**Bei der Verwendung des *trpC*- und *acu-5*-Promotors wurde keine Transkription des *g-csf*-Gens nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). In Transformanten mit dem  $\alpha$ -Amylase-Promotor war hingegen eine deutliche Transkription zu erkennen, die sich in ihrer Stärke in den einzelnen Transformanten deutlich unterschied.**

#### **3.4.2.1 Untersuchung zur vegetativen Methylierung des *g-csf*-Gens in *Neurospora crassa***

Der Hyphenpilz *N. crassa* erkennt repetitive Elemente in seinem Genom und kann diese durch Methylierung inaktivieren (Selker, 1990). Um zu überprüfen, ob die fehlende Expression des *g-csf*-Gens bei Verwendung des *trpC*- und *acu-5*-Promotors auf eine Methylierung der eingebrachten Sequenzen beruht, wurde die genomische DNA dreier Transformanten, die den *trpC*-Promotor enthalten, mit *Sau3A* und *Mbol* hydrolysiert. Beide Restriktionsendonukleasen erkennen die Sequenz GATC. Die Endonuklease *Sau3A* ist jedoch sensitiv gegenüber der Methylierung an einem Cytosin. Im Gegensatz zu *Mbol* hydrolysiert sie nicht an einer methylierten Erkennungssequenz des Enzyms. Die Auswertung des Autoradiogramms ergab, dass in den Transformanten keine oder nur eine schwache Methylierung des *g-csf*-Gens vorlag (Abb. 14). Die erwarteten DNA-Fragmente von 1,2 kb und 0,4 kb wurden mit beiden Restriktionsendonukleasen erzielt. Lediglich in der Transformante NcT134 konnte eine partielle Methylierung nachgewiesen werden. Die nicht nachweisbare Expression des *g-csf*-Gens hatte demzufolge seine Ursache vermutlich nicht in einer Methylierung der DNA des Promotors bzw. der eingebrachten Gensequenz, sondern ist eher auf die verwendeten Promotoren *trpC* und *acu-5* zurückzuführen.



**Abbildung 14: Überprüfung des Methylierungsgrades der DNA**

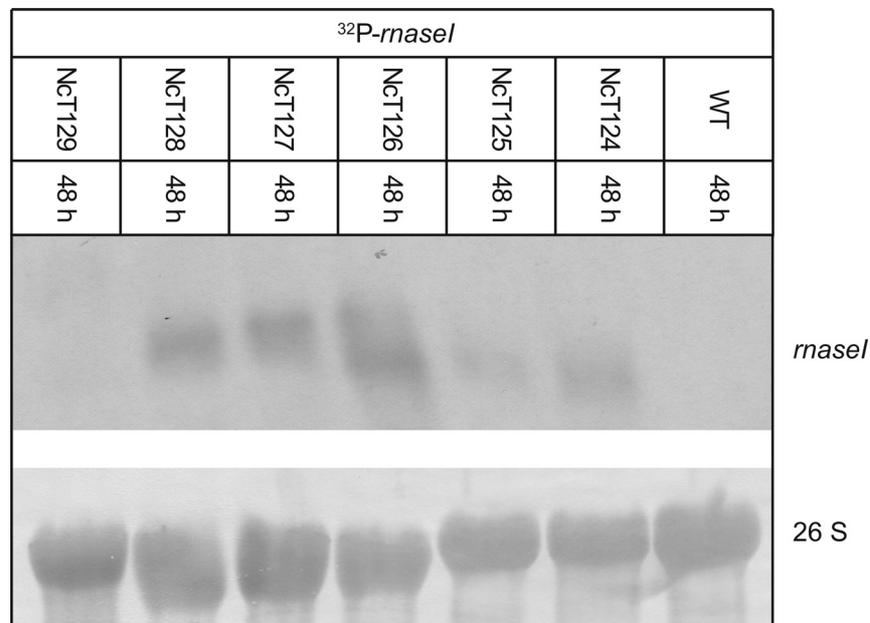
**A:** Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskassette des Vektors pIB384. Eingezeichnet sind die Schnittstellen der Restriktionsendonuklease *Sau3A* sowie der Bereich der verwendeten Sondensequenz.

**B:** Ergebnis des Autoradiogramms. Aufgetragen wurde die Gesamt-DNA aus *N. crassa*-Transformanten, welche mit *Mbol* (M) und *Sau3A* (S) hydrolysiert wurden. Der untransformierte Stamm (WT) sowie das zur Transformation verwendete Plasmid pIB384 wurden als Kontrollen aufgetragen. Als Sonde wurde die  $^{32}\text{P}$ -markierte DNA des *g-csf*-Gens verwendet. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp, M – *Mbol*, S – *Sau3A*)

Durch die Untersuchung des Methylierungsgrades der genomischen DNA konnte nachgewiesen werden, dass eine fehlende Transkription bei Verwendung des *trpC*-Promotors nicht auf eine Methylierung der Sequenz zurückzuführen war. Die fehlende Genexpression muss auf die Stärke des Promotors oder auf fehlende Transkriptionsfaktoren zurückzuführen sein.

### 3.4.3 Transkriptanalyse des heterologen *rnaseI*-Gens

Nach der Identifizierung von Transformanten, welche das *rnaseI*-Gen trugen, wurde diese mittels Southern-Blot-Analysen auf Transkriptebene untersucht. Im Folgenden sind beispielhaft einige Ergebnisse aufgeführt (Abb. 15 – Abb. 17). Von besonderem Interesse war dabei die Menge der gebildeten Transkripte bei Verwendung der verschiedenen Promotoren. Aus diesem Grund wurden Hybridisierungen mit der Gesamt-RNA der identifizierten Transformanten durchgeführt. Als Sonde wurde die radioaktiv markierte DNA des *rnaseI*-Gens verwendet.



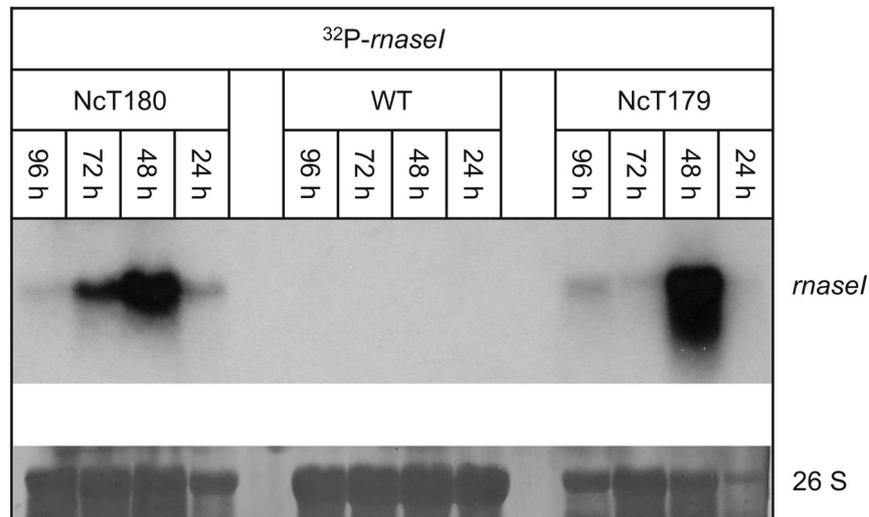
**Abbildung 15: Nachweis der Transkription des heterologen Gens *rnaseI* unter Kontrolle des *trpC*-Promotors**

Die Transformanten sowie der Wildtyp wurden 48 h in Minimalmedium angezogen. 30 µg Gesamt-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss an den Northern-Blot erfolgte eine Hybridisierung mit der <sup>32</sup>P-markierten *rnaseI*-Sonde. Die Expositionszeit betrug 6 Tage. Zur Kontrolle der RNA-Menge wurde die Membran mit Methylenblau gefärbt. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

In Abbildung 15 ist das Autoradiogramm der Transformanten dargestellt, bei denen das *rnaseI*-Gen unter Kontrolle des *trpC*-Promotors stand. Hier war zu erkennen, dass in fünf von sechs Transformanten (NcT124-NcT128) nach 48 h eine schwache Transkription vorhanden war. Die Transformante NcT129 zeigte hingegen keine Transkription.

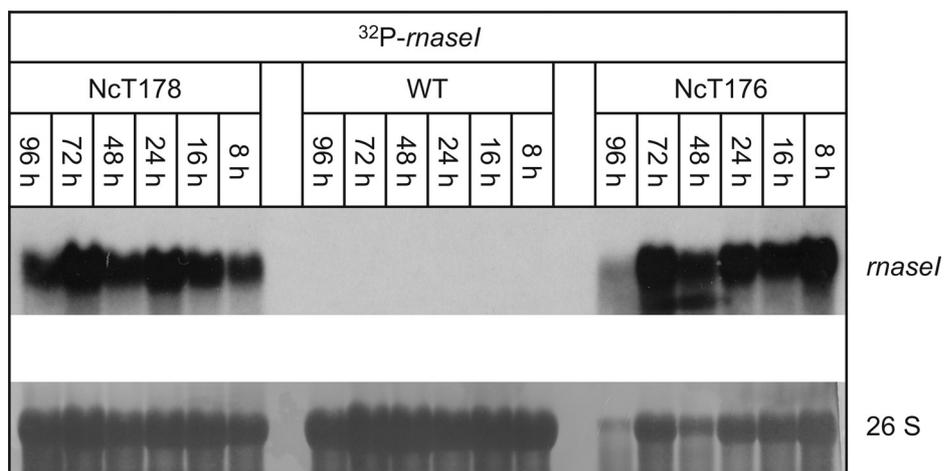
Abbildung 16 zeigt die Transkription des *rnaseI*-Gens unter Verwendung des *cfp*-Promotors unter induzierenden Bedingungen. Bei beiden Transformanten (NcT179 und NcT180) sah man einen hohen Anstieg der Transkriptionsrate, deren Höhepunkt bei

48 Stunden lag und danach abnahm. Im Vergleich dazu kam es bei der Verwendung des  $\alpha$ -Amylase-Promotors zu einer gleichbleibend starken Transkription des heterologen *rnaseI*-Gens über einen Zeitraum von 96 Stunden (Abb. 17).



**Abbildung 16: Autoradiogramm der Hybridisierung des heterologen Gens *rnaseI* unter Kontrolle des *cfp*-Promotors**

Es wurden jeweils 30  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA der Transformanten NcT179 und NcT180 aufgetragen. Als Negativkontrolle diente der Wildtyp. Die Hybridisierung erfolgte mit dem  $^{32}\text{P}$ -markierten *rnaseI*-Gen. Die Expositionszeit betrug 24 h. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen wurde eine Methylenblaufärbung der Membran durchgeführt. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)



**Abbildung 17: Autoradiogramm der Hybridisierung des heterologen Gens *rnaseI* unter Kontrolle des  $\alpha$ -Amylase-Promotors**

Es wurden jeweils 30  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA der Transformanten NcT176 und NcT178 aufgetragen. Als Negativkontrolle diente der Wildtyp. Die Hybridisierung erfolgte mit dem  $^{32}\text{P}$ -markierten *rnaseI*-Gen. Die Expositionszeit betrug 24 h. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen wurde eine Methylenblaufärbung der Membran durchgeführt. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

Es konnte eine Transkription des *rnaseI*-Gens bei allen verwendeten Promotoren nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine starke Transkription bei den Promotoren *cfp* und  $\alpha$ -Amylase, wobei die Transkription beim  $\alpha$ -Amylase-Promotor über 96 Stunden stabil blieb. Bei Verwendung des *trpC*- und *acu-5*-Promotors (Daten nicht gezeigt) war nur eine schwache Transkription zu erkennen.

## 3.5 Nachweis rekombinanter Proteine

In einigen der in Kapitel 3.4 untersuchten Transformanten konnte über Northern-Blot-Analysen die Transkription der heterologen Gene *igf-I*, *g-csf* und *rnaseI* unter der Kontrolle der verwendeten Promotoren nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt erfolgte die Überprüfung, ob die entsprechenden rekombinanten Proteine im Kulturüberstand der Transformanten nachgewiesen werden können.

### 3.5.1 Immunologische Detektion der rekombinanten RNase A

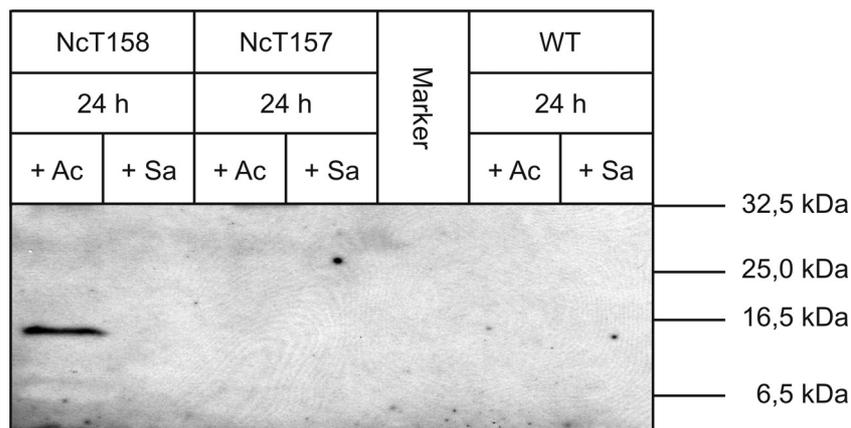
Zum Nachweis der rekombinanten Proteine in den Kulturüberständen wurde das Verfahren des Western-Blots verwendet. Dazu wurden die Proteine aus den Kulturüberständen nach der Methode von Wessel und Flügge (1984) gefällt und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Während in den Kulturüberständen die Proteine IGF-I und G-CSF nicht nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde mittels Western-Blot die rekombinante RNase A in den Kulturüberständen detektiert (vgl. 3.5.1.1 – 3.5.1.4).

### 3.5.1.1 Identifizierung von RNase A-produzierenden Transformanten

Die in Kapitel 3.4.3 identifizierten Transformanten wurden auf eine Produktion der RNase A getestet. In Abbildung 18 ist beispielhaft das Ergebnis eines Western-Blots der Transformanten NcT157 und NcT158 dargestellt.

Nach 24 h Induktion konnte in den Kulturüberständen der Transformante NcT158 das Signal eines Proteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 14 kDa detektiert werden. Das berechnete Molekulargewicht der in *N. crassa* produzierten RNase A beträgt 13,6 kDa, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei um die rekombinante RNase A handelt. Im Kulturüberstand des Wildtyps sowie unter reprimierenden Bedingungen konnten keine Proteine dieser Größe detektiert werden. In der Transformante NcT157 wurde ebenfalls kein rekombinantes Protein in den Kulturüberständen nachgewiesen.



**Abbildung 18: Immunologische Detektion der RNase A durch Western-Blot Analyse**

6 mL gefällter Kulturüberstand der Transformanten NcT157 und NcT158 sowie des Wildtyps wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgte ein Western-Blot mit anschließender Immunodetektion gegen die rekombinante RNase A. Alle Kulturen wurden unter induzierenden (+ Ac) und reprimierenden (+ Sa) Bedingungen angezogen. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp, Ac – Acetat, Sa – Saccharose)

**Mittels Western-Blot-Analyse konnte in den Kulturüberständen ausgesuchter Transformanten die rekombinante RNase A nachgewiesen werden.**

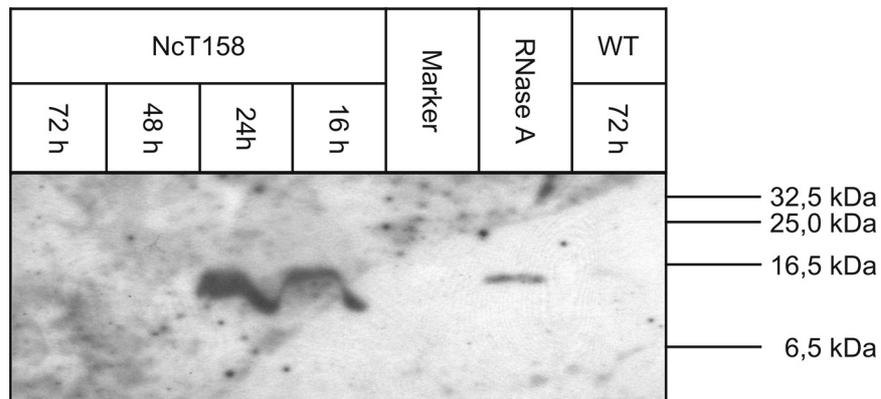
### 3.5.1.2 Zeitlicher Verlauf der RNase A-Produktion

Bei der Produktion rekombinanter Proteine ist vor allem von Interesse, diese über einen längeren Zeitraum zu erhalten. Aus diesem Grund wurde die Expression der RNase A in drei Transformanten mit unterschiedlichen Promotoren über einen Zeitraum von bis zu vier Tagen untersucht (Abb. 19 – Abb. 21).

Bei Verwendung des *acu-5*-Promotors konnte nach 16 und 24 Stunden die rekombinante RNase A in den Kulturüberständen nachgewiesen werden (Abb. 19). Nach diesem Zeitpunkt war keine rekombinante RNase A mehr nachweisbar. Das rekombinant produzierte Protein zeigte ein identisches Molekulargewicht wie die kommerziell erwerbliche RNase A.

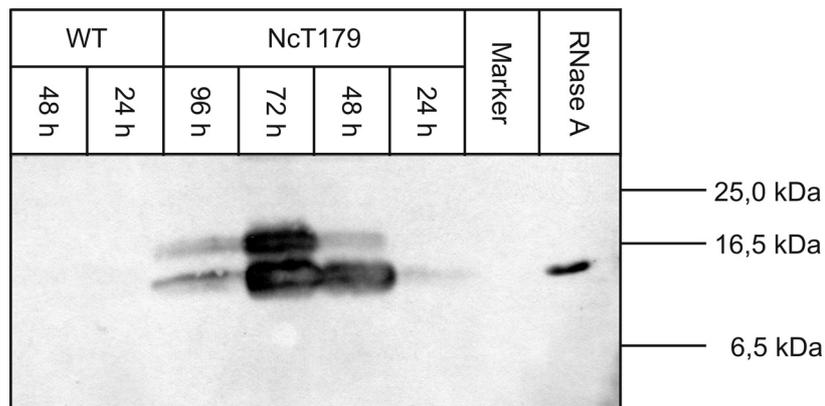
Bei Untersuchungen der Transformante NcT179, die das *rnaseI*-Gen unter Kontrolle des *cfp*-Promotors trug, zeigte sich dagegen ein anderer zeitlicher Verlauf (Abb. 20).

Bei Verwendung des *cfp*-Promotors erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg der Proteinmenge, die ihren Höhepunkt nach 72 Stunden erreichte. Nach 96 h kam es zu einem starken Abfall der Menge an rekombinanter RNase A. Zudem erschien nach einer 48-stündigen Kultivierung eine zweite Bande, die eine Größe von 16 kDa besaß. Bei dieser Bande könnte es sich um unprozessiertes Protein handeln, das noch das Sekretionssignal enthält. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer Glykosylierung des Proteins durch den Hyphenpilz, wodurch das Molekulargewicht geringfügig verändert würde. Ähnliches wurde bereits bei der Produktion rekombinanter RNase A in *Pichia pastoris* beobachtet (Chatani *et al.*, 2000).



**Abbildung 19: Zeitabhängige Bildung der rekombinanten RNase A unter Kontrolle des *acu-5*-Promotors**

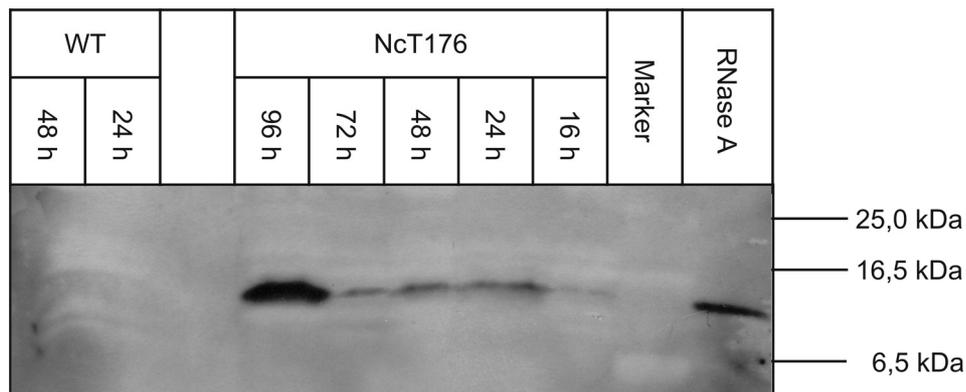
Immunologischer Nachweis der rekombinanten RNase A mittels Western-Blot-Analysen. Verwendet wurde je 6 mL gefälltes Protein aus den Kulturüberständen der Transformante und des Wildtyps. Die Anzucht erfolgte unter induzierenden Bedingungen. Als Kontrolle wurde 30 ng rekombinante RNase A (Sigma, München) aufgetragen. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)



**Abbildung 20: Zeitabhängige Bildung der rekombinanten RNase A unter Kontrolle des *cfp*-Promotors**

Immunologischer Nachweis der rekombinanten RNase A mittels Western-Blot-Analysen. Je 3 mL gefälltes Protein aus den Kulturüberständen der Transformante NcT179 wurden analysiert. Die Anzucht erfolgte für 24 – 96 h unter induzierenden Bedingungen. Als Kontrolle wurden 3 mL des Wildtyp-Überstandes sowie 30 ng rekombinante RNase A (Sigma, München) aufgetragen. (NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

In Abbildung 21 ist die zeitliche Expression der RNase A der Transformante NcT176 dargestellt, die den  $\alpha$ -Amylase-Promotor trägt. Bei der Transformante NcT176 sah man einen leichten Anstieg der Proteinmenge von 16 auf 24 Stunden, der zwei weitere Tage konstant anhielt. Die höchste Proteinmenge war am vierten Tag zu erkennen.



**Abbildung 21: Zeitabhängige Bildung der rekombinanten RNase A unter Kontrolle des  $\alpha$ -Amylase-Promotors**

Immunologischer Nachweis der rekombinanten RNase A-Expression mittels Western-Blot-Analysen. Je 3 mL gefälltes Protein aus den Kulturüberständen der Transformante NcT176 wurden analysiert. Die Anzucht erfolgte für 16 – 96 h im Minimalmedium. Als Kontrolle wurden 3 mL des Wildtyp-Überstandes sowie 30 ng rekombinante RNase A (Sigma, München) aufgetragen. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

Je nach verwendetem Konstrukt sind Unterschiede in der Proteinsynthese zu erkennen. Bei Verwendung einer Transformante, die den *acu-5*-Promotor trug, konnte bereits nach einem Tag keine rekombinante RNase A in den Kulturüberständen detektiert werden. Transformanten, die den *cfp*- und  $\alpha$ -Amylase-Promotor trugen, zeigten hingegen eine Produktion der RNase A über einen Zeitraum von 96 Stunden. Dabei lag die maximale Proteinmenge bei der Transformante NcT179 (*cfp*-Promotor) bei 72 Stunden und die der Transformante NcT176 ( $\alpha$ -Amylase-Promotor) bei 96 Stunden. Bei Verwendung des *cfp*-Promotors trat nach 48 Stunden eine weitere Bande auf, die entweder von unprozessierter RNase A stammte oder von einer glykosylierten Form des Proteins.

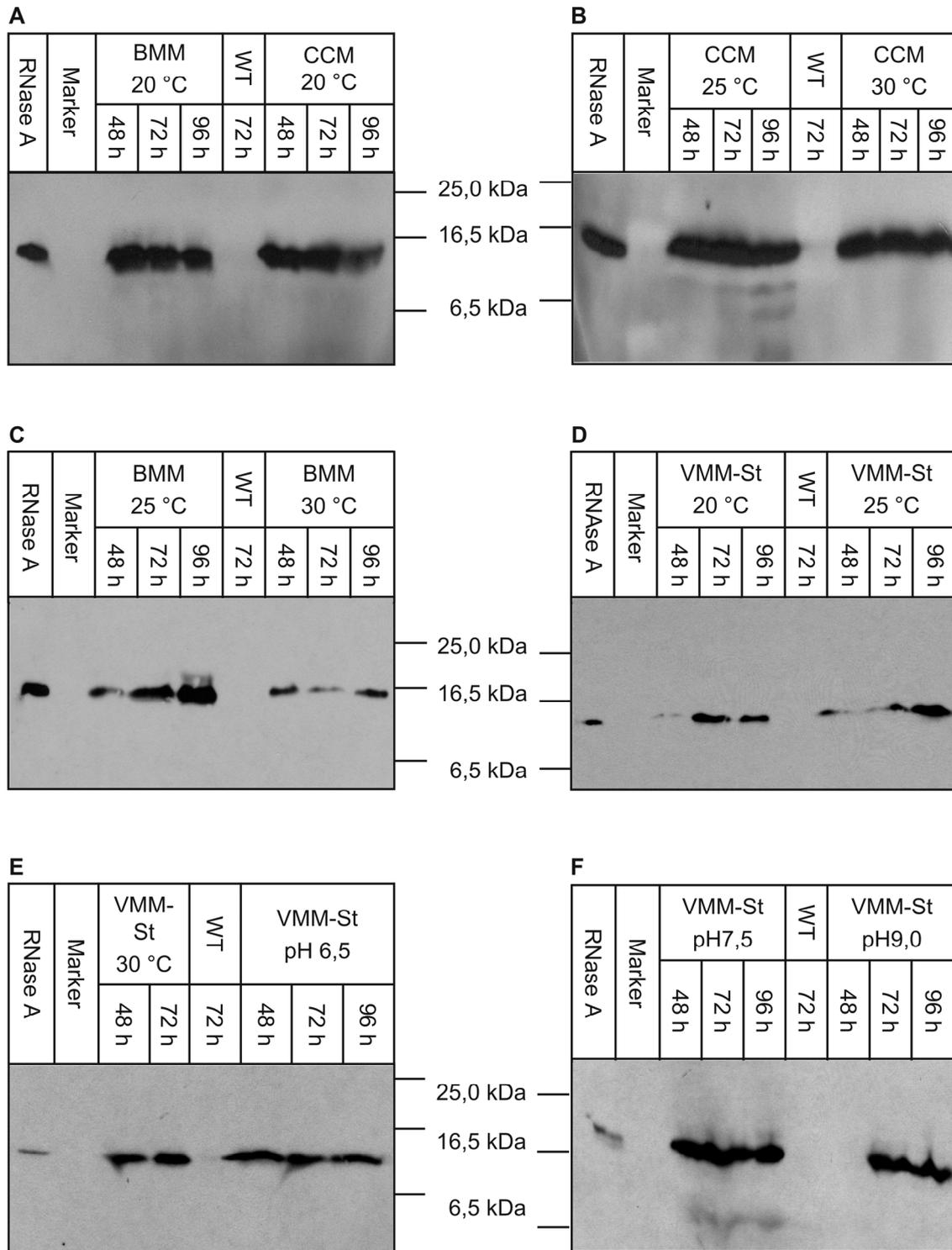
### 3.5.1.3 Steigerung der Produktion der rekombinanten RNase A

Es existieren verschiedene Verfahren zur Steigerung der Expression rekombinanter Proteine. Neben Veränderungen der Kulturbedingungen wie pH-Wert, Medienzusammensetzung oder Temperatur lässt sich die Expression zusätzlich durch Verwendung Protease-defizienter Stämme steigern (van den Hombergh, 1997 [a]). Einige dieser Verfahren wurden im Rahmen dieser Arbeit angewendet und werden im Folgenden beschrieben.

#### Optimierung der Kulturbedingungen

In früheren Studien an Expressionsstämmen von *Aspergillus spec.* konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in den Kulturbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die Produktion rekombinanter Proteine besitzen (Adrio und Demain, 2003). Variationen im pH-Wert, der Wahl des Kulturmediums sowie der verwendeten Temperatur können zu einer Steigerung oder Senkung der Menge an rekombinanten Protein führen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Veränderungen an diesen Parametern vorgenommen, um eine Erhöhung der Proteinausbeute zu erlangen. Ausgewählt wurde dazu die Transformante NcT179 ( $\alpha$ -Amylase-Promotor::*rnaseI*), da diese eine schwächere Produktion nach 48 bzw. 72 h Inkubation zeigte, die aber nach 96 h stark anstieg (Abb. 21). Die Kulturüberstände aus den einzelnen Versuchsansätzen wurden mittels Western-Blot auf die Ausbeute an rekombinanter RNase A untersucht (Abb. 22).

Beim Vergleich der verschiedenen Kulturbedingungen sah man eine verbesserte Produktion der rekombinanten RNase A in den Vollmedien BMM und CCM gegenüber dem Minimalmedium (VMM-St). In den Vollmedien kam es bei 20 °C und 25 °C zu erhöhten Synthese der rekombinanten RNase A (Abb. 22 A – C). Das CCM-Medium zeigte allerdings ein distinktes Abbau-Muster des rekombinanten Proteins bei 25 °C (Abb. 22 B). Bei Verwendung des Minimalmediums zeigten sich bei den verschiedenen Temperaturen keine Unterschiede (Abb. 22 D – E). Eine Anhebung des pH-Werts des Minimalmediums VMM-St von dem pH-Wert 5,6 auf 6,5 brachte ebenfalls keine Veränderung (Abb. 22 E). Die Erhöhung des pH-Werts auf den leicht basischen pH-Wert von 7,5 führte dagegen zu einer Erhöhung der Menge an rekombinanten Protein (Abb. 22 F). Diese war jedoch mit einem Abbau des Proteins verbunden. Durch die Erhöhung des pH-Werts wurde anscheinend ein anderes Protease-Spektrum aktiviert, welches für den Abbau der RNase A verantwortlich war. Bei einer weiteren pH-Wert-Erhöhung auf pH 9,0 sank die Produktion dagegen wieder ab (Abb. 22, F).



**Abbildung 22: Produktion der rekombinanten RNase A in Abhängigkeit der Kulturbedingungen am Beispiel der Transformante NcT176**

Immunologischer Nachweis der rekombinanten RNase A mittels Western-Blot-Analysen. Je 3 mL gefälltes Protein aus den Kulturüberständen der Transformante NcT176 wurden analysiert. Als Kontrollen wurden 3 mL des Wildtyp-Überstandes sowie 30 ng rekombinante RNase A (Sigma, München) aufgetragen.

**A:** Kultivierungsbedingung Vollmedium BMM und CCM, Temperatur 20 °C

**B:** Kultivierungsbedingung Vollmedium CCM, Temperatur 25 °C und 30 °C

**C:** Kultivierungsbedingung Vollmedium BMM Temperatur 25 °C und 30 °C

**D:** Kultivierungsbedingung Minimalmedium VMM-Stärke (VMM-St), Temperatur 20 °C und 25 °C

**E:** Kultivierungsbedingung Minimalmedium VMM-Stärke (VMM-St), Temperatur 30 °C, pH 6,5

**F:** Kultivierungsbedingung Minimalmedium VMM-Stärke (VMM-St), pH 7,5 und pH 9,0

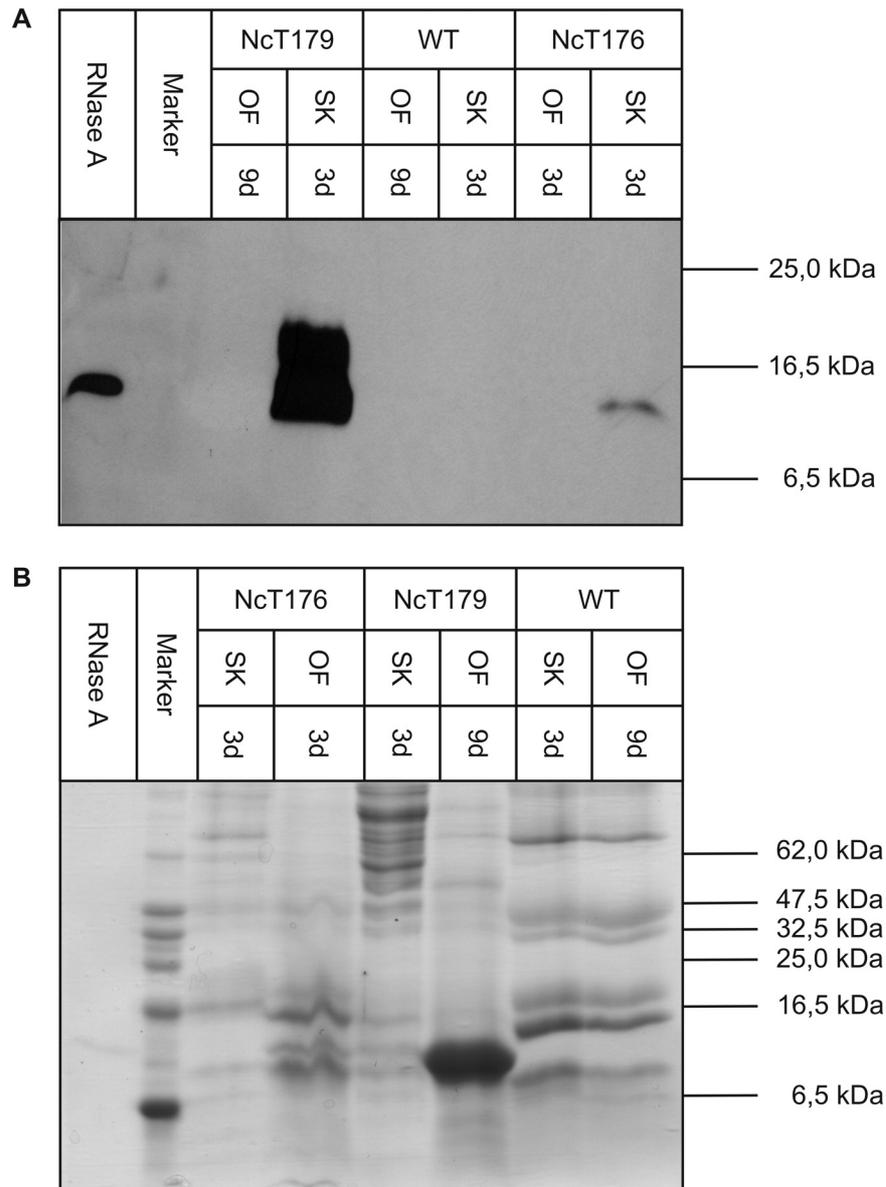
(Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

**Bei der Verwendung eines Vollmediums sowie bei einer pH-Wert-Erhöhung des verwendeten Minimalmediums in einen leicht basischen Bereich kam es zu einer verstärkten Akkumulation der rekombinanten RNase A im Kulturüberstand.**

### **Anzucht als Oberflächenkultur**

Bei Untersuchungen an Oberflächenkulturen von *Aspergillus spec.* wurde festgestellt, dass diese Kultivierungsmethode zu einer erhöhten Sekretion der Proteine führen kann als bei den herkömmlichen Anzuchtmethoden im Schüttelkolben (Oda *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurden die Transformanten NcT176 und NcT179 parallel als Oberflächenkultur und als Schüttelkultur angezogen und die rekombinante Bildung der RNase A miteinander verglichen.

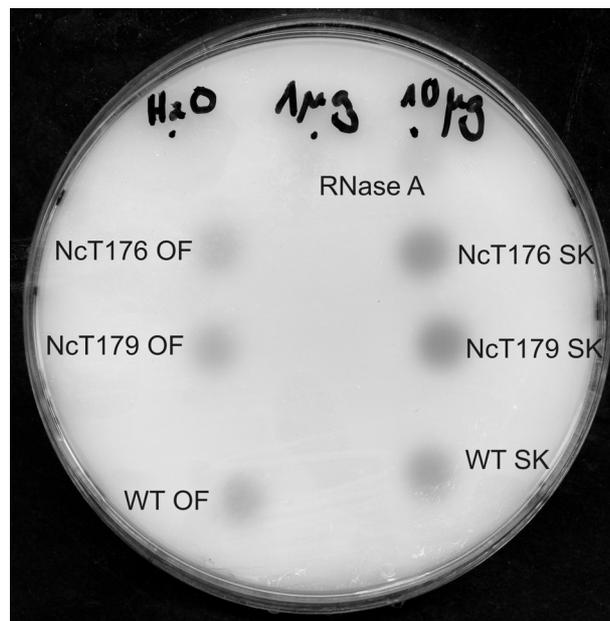
Aufgrund des verzögerten Wachstums in der Oberflächenkultur bei Verwendung des *cfp*-Promotors wurde die Transformante NcT179 statt drei Tage neun Tage kultiviert. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 zu sehen. Während in den Schüttelkulturen der beiden Transformanten ein deutliches Signal zu sehen war, konnten in den Oberflächenkulturen keine Signale der rekombinanten RNase A nachgewiesen werden (Abb. 23 A). Vergleicht man dazu das Coomassie-gefärbte Gel (Abb. 23 B), so war bei der Transformante NcT179 in der Oberflächenkultur eine deutliche Bande auf der Höhe von 14 kDa zu erkennen, die der Größe der rekombinanten RNase A entsprach. Da im Western-Blot dieses Protein nicht mit dem RNase A-spezifischen Antikörper reagierte, handelte es sich demzufolge nicht um die rekombinante RNase A.



**Abbildung 23: Vergleich der rekombinanten RNase A in der Oberflächen (OF)- und Schüttelkultur (SK)**  
**A:** Western-Blot der Kulturüberstände der Transformanten NcT176 und NcT179. Aufgetragen wurden 1 mL gefälltes Protein der beiden Transformanten sowie des Wildtyps. Als Kontrolle diente 30 ng der rekombinanten RNase A (Sigma, München).  
**B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der Kulturüberstände der Transformanten NcT176 und NcT179. Aufgetragen wurde 1 mL gefälltes Protein der beiden Transformanten sowie des Wildtyps. Als Kontrolle diente die rekombinante RNase A (Sigma, München). (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem Protein um die sekretierte RNase N1 aus *N. crassa* handelt (Takahasi, 1988), wurde ein RNase-Platten-Assay mit den Kulturüberständen der Transformanten NcT176 und NcT179 durchgeführt. Mit Hilfe dieses Assays wurden die Kulturüberstände auf Ribonuklease-Aktivität getestet. Hierbei konnten allerdings keine Unterscheidungen zwischen der endogenen RNase N1 und der heterolog exprimierten RNase A getroffen werden. Als Kontrolle diente dabei kommerzielle RNase A. Die Abbildung 24 zeigt das Ergebnis des RNase-Platten-Assays. Es konnten keine

Unterschiede in der Ribonuklease-Aktivität zwischen den beiden Transformanten und dem Wildtyp nachgewiesen werden. Sowohl in den Kulturüberständen der Transformanten als auch in den Kulturüberständen des Wildtyps war eine Ribonuklease-Aktivität zu erkennen, die vermutlich auf die RNase N1 zurückzuführen ist. Auffällig war, dass die Ribonuklease-Aktivität in den Kulturüberständen der Schüttelkultur höher war als in den Kulturüberständen der Oberflächenkulturen.



**Abbildung 24: Vergleich der Ribonuklease-Aktivität aus Kulturüberständen der Oberflächen- (OF) und Schüttelkulturen (SK)**

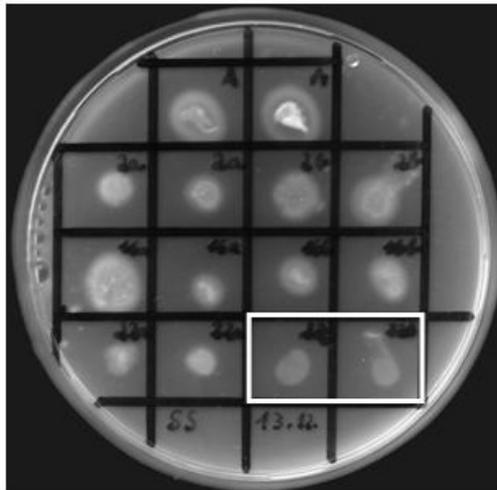
RNase-Platten-Assay der Kulturüberstände der Transformanten NcT176 und NcT179. Aufgetragen wurden jeweils 20 µL des Kulturüberstandes aus Oberflächen- und Schüttelkulturen. Als Kontrolle dienen Kulturüberstände des Wildtyps sowie 1 µg und 10 µg der rekombinanten RNase A (Sigma, München). (Abkürzungen: H<sub>2</sub>O – Negativkontrolle, NcT – *N. crassa* Transformante, WT – Wildtyp, OF – Oberflächenkultur, SK – Schüttelkultur)

**Es konnte keine Expression der rekombinanten RNase A in den Oberflächenkulturen nachgewiesen werden.**

### Erstellung und Verwendung Protease-defizienter Stämme

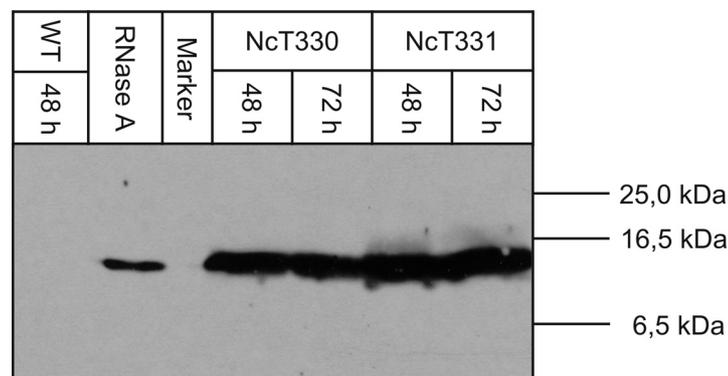
Eine weitere Möglichkeit der Steigerung der rekombinanten Proteinproduktion ist die Verwendung Protease-defizienter Pilz-Stämme. Zur Herstellung solcher Stämme werden diese mittels UV-Bestrahlung mutagenisiert und im Anschluss durch Protease-Assay-Platten auf eine verminderte Protease-Aktivität getestet.

Im Zuge dieser Arbeit wurden Konidien des Wildtyps FGSC #6103 mit UV-Licht mutagenisiert (Kapitel 2.3.9). Nach der Mutagenese wurden die entstandenen Mutanten auf ihre Protease-Aktivität getestet. Mutanten, die eine verminderte Protease-Aktivität in Form eines reduzierten Hofes zeigten, wurden ausgewählt und erneut auf Protease-Assay-Platten überprüft. Eine der daraus entstandenen Mutanten zeigte eine deutlich verminderte Protease-Aktivität (Abb. 25 weißer Kasten). Diese Mutante wurde für die folgenden Versuche verwendet.



**Abbildung 25: Bestimmung der Protease-Aktivität der aus der UV-Mutagenese entstandenen Mutanten**  
Getestet wurden Mutanten, die im Vorversuch eine verminderte Protease-Aktivität zeigten. Verwendet wurden sieben Mutanten, die jeweils doppelt aufgetragen wurden. Markiert ist die Mutante, die keine signifikante Protease-Aktivität zeigte (weißer Kasten).

Der Stamm wird im Weiteren als FGSC #6103M bezeichnet. Nach der Transformation des Stammes FGSC #6103M mit den Plasmiden pNW511 und pNW521 wurden positive Transformanten bestimmt und auf eine Sekretion der rekombinanten RNase A getestet. Beispielhaft ist das Ergebnis des Western-Blots der Transformanten NcT330 (Enolase-Promotor) und NcT331 (*ccg1*-Promotor) in Abbildung 26 dargestellt. Bei beiden Transformanten konnte die rekombinante RNase A im Kulturmedium nachgewiesen werden.



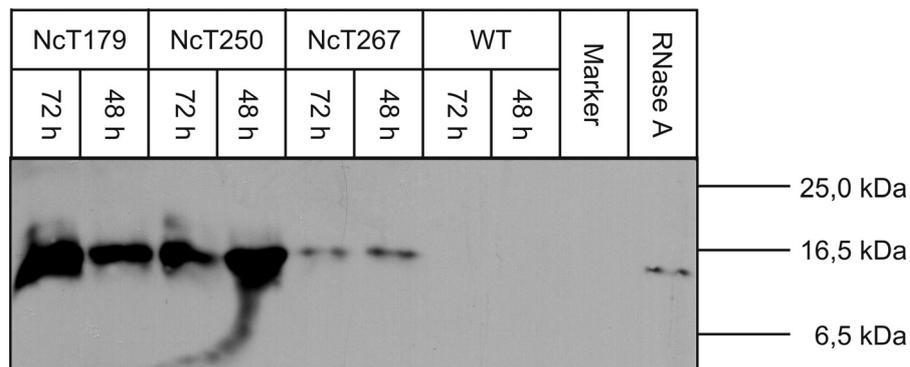
**Abbildung 26: Produktion der rekombinanten RNase A von Transformanten des Protease-defizienten Stammes FGSC #6103M**

Immunologischer Nachweis der rekombinanten RNase A-Expression mittels Western-Blot-Analysen. Je 2,5 mL gefälltes Protein aus den Kulturüberständen unterschiedlich lang angezogener Kulturen der Transformanten NcT330 und NcT331 wurden analysiert. Als Kontrolle wurden 2,5 mL des Wildtyp-Überstandes sowie 30 ng rekombinante RNase A (Sigma, München) aufgetragen. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

Um nun zu prüfen, ob es in dem mutagenisierten Stamm zu einer veränderten Synthese der rekombinanten RNase A kommt, wurden sowohl Kulturüberstände der Transformanten NcT330 und NcT331 (Protease-defizienter Stamm) mit ihren Pendanten NcT250 und NcT267 verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 dargestellt. Vergleicht man die RNase A-Produktion der Transformanten untereinander, die ein identisches Plasmid trugen, so waren keine Unterschiede in der Expression der rekombinanten RNase A zu erkennen (Abb. 28). In allen Transformanten war zudem ein leichter Abbau des Proteins nach 48 h zu sehen. Die verminderte Protease-Aktivität des Stammes FGSC #6103M wirkte sich demzufolge nicht auf die Ausbeute an rekombinantem Protein aus.



Bei den Western-Blot-Analysen war in der Transformante NcT179 die höchste Menge an rekombinanter RNase A zu finden, die jedoch nach 72 h wieder abnahm (Abb. 28). Daneben zeigte die Transformante NcT250 ebenfalls eine erhöhte Expression der RNase A. Die Menge an rekombinanter RNase A in der Transformante NcT267 war deutlich geringer.

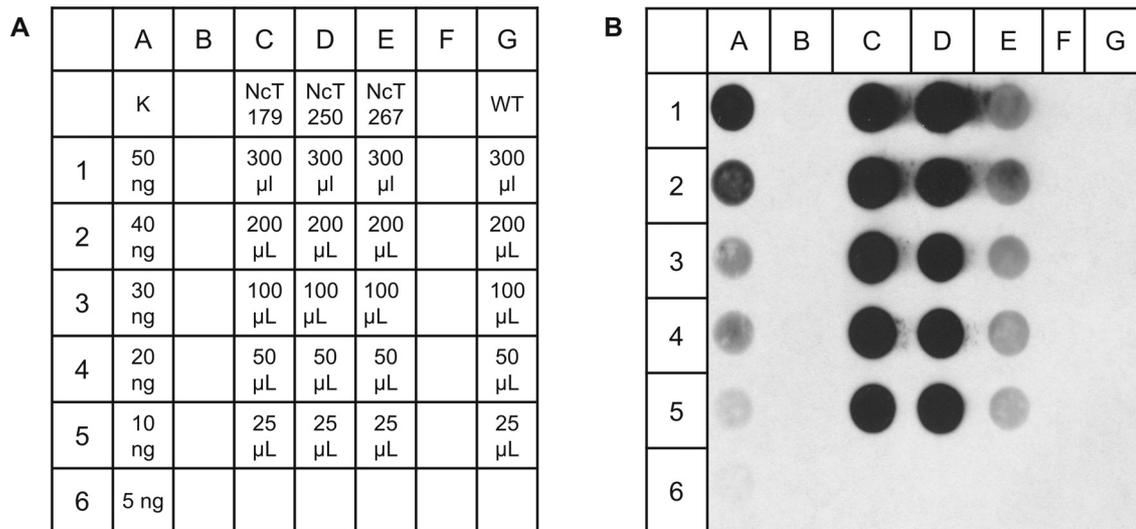


**Abbildung 28: Vergleich der Bildung rekombinanter RNase A unter der Kontrolle verschiedener Promotoren**

Immunologischer Nachweis der rekombinanten RNase A-Expression mittels Western-Blot-Analysen. Je 2 mL gefälltes Protein aus den Kulturüberständen 48 h und 72 h lang angezogener Kulturen der Transformanten NcT179, NcT250 und NcT267 wurden mittels Western-Blot analysiert. Als Kontrolle wurden 2 mL des Wildtyp-Überstandes sowie 30 ng rekombinante RNase A (Sigma, München) aufgetragen. (Abkürzungen: NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen spiegelten sich auch in den Dot-Blot-Analysen wieder. In den Transformanten NcT179 und NcT250 konnten ebenfalls hohe Mengen an rekombinanter RNase A nachgewiesen werden (Abb. 29).

Der Vergleich der RNase A-Konzentration der Transformante NcT267 mit dem RNase A-Standard ergab für die 25 µL-Probe eine Konzentration von ca. 5 - 10 ng RNase A. Auf einen Liter Kulturmedium hochgerechnet würde dies einer Menge von 200 µg/L entsprechen. Eine Minimierung der aufgetragenen Volumina brachte für die Transformanten NcT179 und NcT267 Konzentrationen von 1 mg/L (NcT179) bzw. 500 µg/L (NcT267).



**Abbildung 29: Dot-Blot der Transformanten NcT179, NcT250 und NcT267 zur Konzentrationsbestimmung der rekombinanten RNase A-Expression**

Der Nachweis der rekombinanten RNase erfolgte immunologisch mittels Antikörperdetektion.

**A:** Auftragsschema des Dot-Blots; als Kontrolle (K) dienten die angegebenen Konzentrationen rekombinanter RNase A in Spur A 1-6. Die oben aufgeführten Volumina von Kulturüberständen nach 48 h Inkubation der Transformanten NcT179, NcT250, NcT267 sowie der Wildtyp (Negativ-Kontrolle) wurden in Spuren C – G aufgetragen.

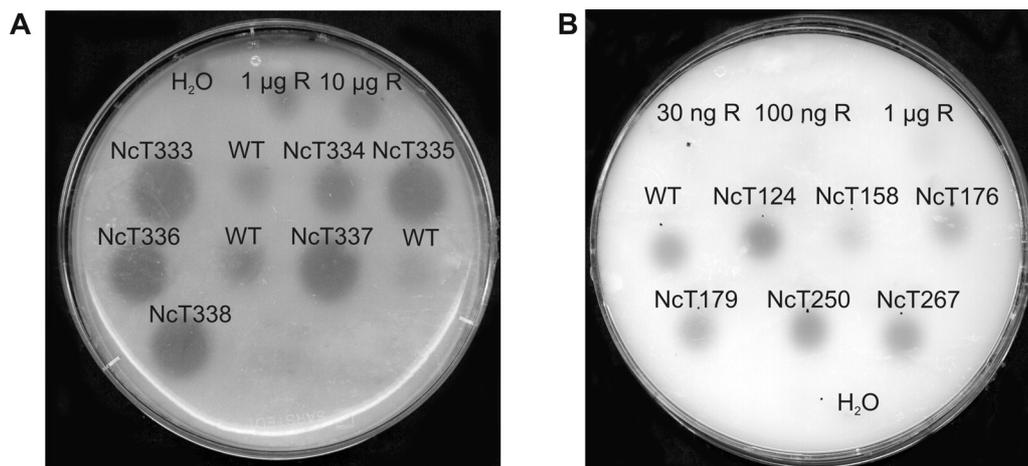
**B:** Ergebnis der Immunodetektion des Dot-Blots.

(Abkürzungen: K – Kontrolle RNase A, NcT – *N. crassa*-Transformante, WT – Wildtyp)

Ein Vergleich der Mengen der rekombinant hergestellten RNase A unterschiedlicher Transformanten ergab, dass die höchsten Proteinmengen bei Verwendung des *cfp*- und *ccg1*-Promotors im Kulturüberstand akkumulierten. Bei der Verwendung der Transformante NcT179 (*cfp*-Promotor) wurde eine Konzentration der RNase A von ca. 1 mg/L nachgewiesen.

### 3.6 Unterschiede zwischen der Überexpression einer homologen Ribonuklease und einer heterologen Ribonuklease

Neben der heterologen RNase A aus dem Rind wurde in dieser Arbeit zusätzlich die endogene RNase N1 aus *N. crassa* überexprimiert. Für die Expression wurden die Promotoren *ccg1* und *cfp* verwendet, die bei der Überexpression der RNase A eine starke Transkriptionsrate zeigten (Kapitel 3.4.3; Weiland, 2005). Nach der Identifizierung positiver Transformanten wurden die Kulturüberstände der Transformanten NcT333 bis NcT338 mit Hilfe des RNase-Platten-Assays auf eine erhöhte Ribonuklease-Aktivität gegenüber dem Wildtyp getestet (Abb. 30 A). Zum Vergleich wurde ein weiterer Assay mit allen untersuchten RNase A-Transformanten durchgeführt (Abb. 30 B).



**Abbildung 30: Vergleich der Ribonuklease-Aktivität in Kulturüberständen der Transformanten der bovinen RNase A und Transformanten der endogenen RNase N1**

**A:** RNase-Platten-Assay der Kulturüberstände der Transformanten NcT333 – NcT338. Aufgetragen wurden jeweils 20  $\mu$ L des Kulturüberstandes. Als Kontrollen dienen Kulturüberstände des Wildtyps sowie 1  $\mu$ g und 10  $\mu$ g der rekombinanten RNase A (Sigma, München). Als Negativkontrolle diente Wasser.

**B:** RNase-Platten-Assay der Kulturüberstände der Transformanten NcT124, NcT158, NcT176, NcT179, NcT250 und NcT267. Aufgetragen wurden jeweils 20  $\mu$ L des Kulturüberstandes. Als Kontrollen dienen Kulturüberstände des Wildtyps sowie 30 ng, 100 ng und 1  $\mu$ g der rekombinanten RNase A (Sigma, München). Als Negativkontrolle diente Wasser. (Abkürzungen: H<sub>2</sub>O – Negativkontrolle, NcT – *N. crassa* Transformante, WT – Wildtyp, R – rekombinante RNase A)

Ein Vergleich der Ribonuklease-Aktivität der Kulturüberstände von Transformanten der endogenen RNase N1 mit Transformanten der rekombinanten RNase A zeigte eine stark erhöhte Ribonuklease-Aktivität bei den untersuchten RNase N1-Transformanten NcT333 – NcT334 (Abb. 30 A) im Gegensatz zu der heterolog gebildeten RNase A (Abb.

30 B). Die Ribonuklease-Aktivität der homologen Überexpression lag dabei deutlich über der der heterologen Überexpression sowie der natürlichen Ribonuklease-Aktivität des Wildtyps. Dies stimmte mit Ergebnissen überein, die besagten, dass die Überproduktion homologer Proteine bis zum Faktor von 100 über der heterologer Proteine liegen kann (Conesa *et al.*, 2000).

**Die endogene RNase N1 aus *N. crassa* konnte erfolgreich mit dem vorhandenen System überexprimiert werden. Ein Vergleich mit Transformanten der heterologen RNase A zeigte dabei eine deutliche Erhöhung der Ribonuklease-Aktivität in Transformanten, die das RNase N1-Konstrukt trugen.**

## 4. Diskussion

Filamentöse Hyphenpilze werden in der Biologie als Modellorganismen zur Bearbeitung vielfältiger Fragestellungen verwendet (Bennett, 1998). Eines der Hauptanwendungsgebiete ist dabei die Expression heterologer Gene (Punt *et al.*, 2002). Als alternatives Expressionssystem zu den vielfach verwendeten Hyphenpilzen der Gattung *Aspergillus* wurde im Rahmen dieser Arbeit der Ascomycet *Neurospora crassa* gewählt. *Neurospora crassa* hat in den letzten achtzig Jahren eine herausragende Stellung bei der Erforschung verschiedenster biochemischer und molekularbiologischer Fragestellungen eingenommen (Davis, 2000) und stellt somit ein ideales System zur heterologen Produktion rekombinanter Proteine dar.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein System zur Expression heterologer und homologer Gene in filamentösen Hyphenpilzen etabliert und in *N. crassa* angewandt. Von besonderem Interesse waren dabei die Analyse der Transkription sowie die Analyse der Synthese rekombinanter Proteine.

### 4.1 Vorteile einer Expressionskassette zur heterologen Expression rekombinanter Proteine in filamentösen Hyphenpilzen

Die Expression pharmazeutisch wichtiger Gene in heterologen Expressionssystemen ist mittlerweile eine wichtige Technik zur Produktion rekombinanter Proteine (Maras *et al.*, 1999). Hierfür werden vor allem Pilze der Gattung *Aspergillus* und *Trichoderma* eingesetzt. Für andere Gattungen, wie beispielsweise *Neurospora*, wurden hingegen bislang nur wenige Produktionsprozesse beschrieben (Nakano *et al.*, 1993). Filamentöse Pilze sind in der Lage, große Proteinmengen zu sekretieren (Gouka *et al.*, 1997), eukaryotische mRNA zu prozessieren und posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung und Di-Sulfidbrückenbildung durchzuführen (Lin *et al.*, 1993). Da viele der zur Transformation verwendeten Plasmide in das Chromosom integrieren, ist eine genetische Stabilität über viele Generationen gewährleistet (Michielse *et al.*, 2005).

Die Grundlage der heterologen und homologen Genexpression in filamentösen Hyphenpilzen bildet meist eine Expressionskassette, bestehend aus einem Promotor, dem zu exprimierenden Gen sowie einem geeigneten Terminator (Abb. 1). Ein Problem

bei der Erstellung solcher Kassetten ist meist das Fehlen einzigartiger Erkennungssequenzen bestimmter Restriktionsendonukleasen entweder im Vektor selbst oder in dem zu klonierenden Element der Restriktionskassette (Toews *et al.*, 2004). Eine Lösung des Problems ist die Verwendung des GATEWAY-Systems, welches auf dem Prinzip der *in vitro*-Klonierung mit Hilfe der basenspezifischen Rekombination des  $\lambda$ -Phagens basiert (Landy, 1989). Solche Vektoren wurden bereits erfolgreich in Pflanzen (Curtis und Grossniklaus, 2003) und Pilzen verwendet (Haag *et al.*, 2003). Ein Nachteil dieses Systems liegt allerdings in dessen Handhabung, da für die Klonierung sowohl besondere *E. coli*-Stämme als auch mehrere Vektoren verwendet werden müssen, um das gewünschte Konstrukt zu erhalten (Landy, 1989). Zudem existieren für die Verwendung in Pilzen nur wenige Plasmide, die einen geeigneten Selektionsmarker sowie Promotor besitzen (Toews *et al.*, 2004).

Für die Produktion heterologer Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit die Basisvektoren pAS336 und pAS337 hergestellt (Kapitel 3.2). Diese Vektoren enthielten einen Polylinker aus vier Restriktionsendonukleasen, die statistisch gesehen nur selten im Genom schneiden. Mit Hilfe dieser spezifischen Schnittstellen wurde ein einfacher und schneller Austausch einzelner Komponenten der Expressionskassette ermöglicht, mit der aufwändige Klonierungsstrategien vermieden werden konnten. Der Unterschied zwischen den beiden Basisvektoren lag vor allem in den späteren Anwendungsgebieten. Derivate des Vektors pAS336 konnten speziell für die Expression in *N. crassa* eingesetzt werden. Der Vektor trug neben dem erwähnten Polylinker eine deletierte Kopie des *his-3*-Gens und integrierte gezielt in den *his-3*-Locus eines Histidin-auxotrophen *N. crassa*-Rezipientenstammes (Margolin *et al.*, 1997). Dagegen konnten Derivate des Vektors pAS337 in verschiedenen filamentösen Hyphenpilzen verwendet werden. Der Vektor trug zusätzlich zum Polylinker eine Kassette zur Expression des *hph*-Gens, welches eine Resistenz gegen Hygromycin B vermittelte (Kaster *et al.*, 1983). Dieser Vektor integriert willkürlich und in der Regel in mehreren Kopien ins Genom (Staben *et al.*, 1988). Durch diese beiden Vektoren war es möglich, in einem kurzen Zeitraum verschiedenste Expressionsvektoren herzustellen, die sich für die Verwendung in unterschiedlichen Ascomyceten eigneten.

### 4.1.1 Promotoren zur heterologen Proteinproduktion

Ein wichtiges Kriterium bei der heterologen Proteinexpression ist die Verwendung starker Promotoren, um eine hohe Expressionsrate des gewünschten Gens zu erzielen (van den Hondel, 1991). Für eine effiziente Expression werden dabei in der Regel Promotorsequenzen verwendet, die entweder aus dem gewählten Wirt oder einer verwandten Art stammen (Cardoza *et al.*, 2003). Meist werden dabei Promotoren hydrolytischer oder glykolytischer Enzyme verwendet (Ishida *et al.*, 2004). Daneben scheinen Promotorsequenzen von konstitutiv exprimierten Haushaltsgenen effektiv zu sein (van den Hondel *et al.*, 1991). Die wichtigsten Elemente zur Kontrolle der Genexpression bei Eukaryoten befinden sich im 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) (Ballance, 1986). Die 5'-UTR-Bereiche zeichnen sich im Allgemeinen durch eine hohe Sequenzvariabilität aus, so dass nur wenige gemeinsame Strukturelemente bekannt sind (Breathnach und Chambon, 1981). Zwei der wichtigsten bekannten Elemente für die Transkription sind die CCAAT-Box (Kato, 2005) sowie die TATA-Box (Kruszewska, 1999). In *Neurospora* besitzen viele Promotoren anstelle der TATA-Box eine pyrimidinreiche Region vor dem Transkriptionsstart (Davis, 2000). Bei den nativen Promotorsequenzen lassen sich noch zusätzliche Sequenzen einfügen, um die Promotorleistung zu optimieren. So konnte durch das Einfügen zusätzlicher *cis*-agierender Elemente (Tsuboi *et al.*, 2005) oder weiterer CCAAT-Boxen (Liu *et al.*, 2005) die heterologe Expression um ein Vielfaches gesteigert werden. Mittlerweile sind für Pilze der Gattung *Aspergillus* verschiedenste Promotoren vorhanden, die erfolgreich für die heterologe Expression verwendet werden (Lubertozzi und Keasling, 2006).

Für die Überexpression heterologer und homologer Gene in *N. crassa* existieren bislang nur wenige Promotoren, die eine erfolgreiche Synthese der gewünschten Proteine zeigen (Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997; Freitag und Selker, 2005). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit sechs Promotoren gewählt, die weitestgehend noch nicht für die heterologe Proteinexpression in *N. crassa* verwendet wurden. Fünf dieser Promotoren (*acu-5*, *cfp*, *ccg1*,  $\alpha$ -Amylase und Enolase) stammten aus dem Wirt *N. crassa* selbst. Als sechster Promotor wurde der *trpC*-Promotor aus dem verwandten Ascomyceten *Aspergillus nidulans* gewählt (Yelton *et al.*, 1983), der dort bereits erfolgreich für die heterologe Proteinproduktion angewendet wurde (Xu und Gong, 2003).

Von den fünf homologen Promotoren aus *N. crassa* wurde bislang nur der *ccg1*-Promotor erfolgreich für die heterologe Expression verwendet (Nakano *et al.*, 1993, Freitag *et al.*, 2004). Das Gen des *ccg1*-Promotors wird insbesondere im vegetativen Myzel stark exprimiert (McNally und Free, 1988). Charakterisiert wurden ebenfalls die beiden

induzierbaren Promotoren *acu-5* und *cfp*. Das *acu-5*-Gen kodiert für die AcetylCoA-Synthetase. Der Promotor wird durch Acetat als Kohlenstoffquelle induziert und durch alle weiteren Kohlenstoffquellen reprimiert (Thomas *et al.*, 1988). Der Promotor selbst wurde in *N. crassa* ursprünglich zur Überexpression der Glutamat-Dehydrogenase verwendet (Collins *et al.*, 1991). Das *cfp*-Gen kodiert für die Pyruvat-Decarboxylase, ein Enzym des Pyruvatcarboxylase-Komplexes (Folco *et al.*, 2003). Er wird durch Glukose und Saccharose induziert, während eine Repression durch Ethanol erfolgt (Temporini *et al.*, 2004). Über die Promotoren der Gene  $\alpha$ -Amylase (*taa*) und Enolase (*enoA*) existieren in *N. crassa* noch keine ausführlichen Studien. Beide Promotoren wurden bislang nur in der Gattung *Aspergillus* beschrieben und erfolgreich für die Genexpression genutzt (Tsuboi *et al.*, 2005, Tada *et al.*, 1991). In *A. oryzae* gehört das *enoA*-Gen zu den am stärksten exprimierten Genen (Machida *et al.*, 1996). Transkriptanalysen der beiden homologen Gene  $\alpha$ -Amylase und Enolase in *N. crassa* zeigten ebenfalls eine starke Transkription (Weiland, 2005). Beide Promotoren schienen sich deshalb für eine heterologe Expression zu eignen. Neben den fünf homologen Promotoren wurde in dieser Arbeit noch der heterologe *trpC*-Promotor für die heterologe Expression in *N. crassa* getestet. Der *trpC*-Promotor stammt aus *A. nidulans* (Hamer und Timberlake, 1987) und wurde bereits mehrfach für die heterologe Expression in *Aspergillus* verwendet (Sinnemann *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2002). Eine Studie von Staben *et al.* (1989) zeigte, dass der Promotor auch in *N. crassa* aktiv ist und sich deshalb für die heterologe Expression eignet.

#### **4.1.2 Proteine zur heterologen und homologen Produktion in filamentösen Hyphenpilzen**

Für die heterologe und homologe Expression in filamentösen Hyphenpilzen wurde bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine verwendet (Archer und Peberdy, 1997). Eine beispielhafte Übersicht ist in Tabelle 3 (S. 12) gegeben. Die Synthese der Proteine erfolgte hierbei sowohl intra- als auch extrazellulär (Punt *et al.*, 2002). Der Vorteil bei der extrazellulären Produktion liegt vor allem in der vereinfachten Aufreinigung des Proteins aus dem Kulturüberstand, da so ein aufwändiger Zellaufschluss mit anschließender Aufreinigung vermieden werden kann (Radzio und Kück, 1997). Für die Sekretion der gewünschten Proteine werden in der Regel zwei Strategien verfolgt: Die Fusion des Gens mit dem N-terminalen Anteil eines stark exprimierten Gens des Wirtes, welches sekretiert wird, oder die Verwendung eines Sekretionssignales (Punt *et al.*, 1994). Bei Fusionsproteinen befindet sich in der Regel zwischen den beiden Proteinen eine Sequenz, die eine Spaltung der beiden Proteine ermöglicht (Archer und Peberdy, 1997).

Dies kann entweder autokatalytisch geschehen (Berka, 1991), durch die Kosekretion einer pilzlichen Protease (Roberts *et al.*, 1992) oder durch das Einführen einer so genannten Kex2-Stelle (Lora *et al.*, 1995). Für die Fusion wird in der Regel die N-terminale Domäne der Glukoamylase verwendet, welche zu den am stärksten sekretierten Proteinen gehört (Radzio und Kück, 1997). Durch diese Fusion kann es zu einer Erhöhung der Ausbeute an rekombinantem Protein um den Faktor 10 kommen (Archer und Peberdy, 1997). Es wird vermutet, dass der N-terminale Träger sowohl die mRNA stabilisiert als auch die Passage durch den Sekretionsapparat erleichtert (Gouka *et al.*, 1997). Allerdings kann es auch zu Problemen während der Abspaltung des Trägerproteins kommen, so dass ein Gemisch aus verschiedenen N-Termina entsteht (Alcocer *et al.*, 2003).

Als Alternative zur N-terminalen Fusion des Proteins kann anstelle eines Fusionsproteins ein Sekretionssignal eines stark sekretierten Proteins verwendet werden (Archer und Peberdy, 1997). Hierbei kann sowohl ein homologes Signal wie auch ein heterologes Signal verwendet werden (Kruszewska, 1999), wobei die Wahl des Sekretionssignals anscheinend keinen großen Einfluss auf die Sekretion besitzt (van Gemeren *et al.*, 1996). Einige Anwendungsbeispiele zu den beiden verwendeten Systemen sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12: Anwendungsbeispiele für die Genexpression in filamentösen Hyphenpilzen unter Verwendung von Fusionsproteinen und Sekretionssignalen** (verändert nach Maras *et al.*, 1999)

	<i>Wirt</i>	<i>Protein</i>	<i>Träger/Sekretions-signal</i>	<i>Protein-menge</i>	<i>Referenz</i>
Fusionsproteine	<i>Aspergillus oryzae</i>	Neoculin ( <i>Curculigo latifolia</i> )	$\alpha$ -Amylase	2 mg/L	Nakijama <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Aspergillus sojae</i>	Interleukin-6 ( <i>Homo sapiens</i> )	Glukoamylase	200 – 300 mg/L	Punt <i>et al.</i> , 2002
	<i>Aspergillus awamori</i>	Chymosin ( <i>Bos taurus</i> )	Glukoamylase	140 mg/L	Ward <i>et al.</i> , 1995
	<i>Trichoderma reesei</i>	Xylanase ( <i>Dictyoglomus thermophilum</i> )	Cellobiohydralase	5 g/L	Bergquist <i>et al.</i> , 2002
	<i>Aspergillus niger</i>	Antikörper $\alpha$ -185p <sup>Her2</sup> ( <i>Homo sapiens</i> )	Glukoamylase	200 mg/L	Ward <i>et al.</i> , 2004
	<i>Aspergillus niger</i>	Tumornekrosefaktor $\alpha$ ( <i>Homo sapiens</i> )	Glukoamylase	50 pg/L	Krasevec <i>et al.</i> , 2000
Sekretionssignal	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Hirundin ( <i>Hirudo medicinalis</i> )	Alkalische Phosphatase	5 – 7 mg/L	Radio und Kück, 1997
	<i>Cladosporium fulvum</i>	Catalase B ( <i>A. nidulans</i> )	Hydrophobin <i>hcf-1</i>	5,4 mkat/L	Johnson <i>et al.</i> , 2003
	<i>Aspergillus niger</i>	Lipase ( <i>Thermomyces lanuginosus</i> )	proteineigenes Sekretionssignal	1,6 KU/g	Prathumpai <i>et al.</i> , 2004
	<i>Neurospora crassa</i>	Chymosin ( <i>Bos taurus</i> )	proteineigenes Sekretionssignal	200 ng/L	Nakano <i>et al.</i> , 1993
	<i>Aspergillus awamori</i>	V <sub>HHS</sub> -Fragment	Endoxylanase A	7,5 mg/L	Joosten <i>et al.</i> , 2005

Ein wichtiger Aspekt zur Entwicklung eines Expressionssystems für *N. crassa* war die Auswahl geeigneter Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurden zu diesem Zweck drei Proteine gewählt, die von therapeutischem Nutzen sind: der humane Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), der humane Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) sowie die bovine Ribonuklease A (RNase A). Keines der drei angeführten Proteine wurde bislang in filamentösen Hyphenpilzen erfolgreich exprimiert. Um die Sekretion der heterologen Proteine in den Überstand zu gewährleisten, wurden vor die Sequenzen der drei heterologen Gene die Signalsequenz der alkalischen Phosphatase aus *Acremonium chrysogenum* gesetzt. Diese Sequenz konnte bereits erfolgreich im homologen System für die Sekretion des rekombinanten Hirundin verwendet werden (Radzio und Kück, 1997). Dabei eignete sich insbesondere die bovine RNase A aufgrund ihrer Stabilität und Protease-Resistenz als Modellprotein (Kim und Raines, 1993). Als Alternative zur bovinen RNase A wurde die endogene RNase N1 aus *N. crassa* gewählt, die ebenfalls eine hohe Stabilität besitzt (Lindberg und Drucker, 1984), um die Unterschiede in der Sekretion heterolog und homolog synthetisierter Proteine zu untersuchen.

### 4.1.3 Transkriptionstermination

Über die Transkriptionstermination ist in filamentösen Hyphenpilzen bislang wenig bekannt. In der Regel werden entweder die 3'-UTRs der jeweiligen Gene verwendet, von denen auch die Promotoren stammen, oder 3'-UTRs von stark exprimierten Genen (Radzio und Kück, 1997). Studien an höheren Eukaryoten haben gezeigt, dass die 3'-UTRs nicht nur eine Kontrollfunktion bei der Transkriptionstermination haben, sondern auch die Stabilität der mRNA beeinflussen können (Gouka *et al.*, 1997). Einer der am häufigsten verwendeten Terminatoren ist der *trpC*-Terminator (Plüddemann und van Zyl, 2003; Lévassieur *et al.*, 2005; Record *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde anstelle des *trpC*-Terminators jedoch der *arg-2*-Terminator verwendet, der bereits erfolgreich in *N. crassa* verwendet wurde (Yeadon *et al.*, 2001).

## 4.2 Transformation filamentöser Hyphenpilze

Eine der Voraussetzungen für die heterologe und homologe Genexpression in einem System ist die stabile Transformation der Expressionskassette in dem Wirtsorganismus (van den Hondel *et al.*, 1991). Hierbei wurden während der letzten Jahrzehnte verschiedene Transformationssysteme für eine Vielzahl biotechnologisch relevanter Pilze entwickelt (Jeenes *et al.*, 1991), wobei die stabile Integration der Plasmide in das Wirtsgenom im Vordergrund stand (Davis, 2000). Die Integration der linearisierten Plasmide findet dabei entweder durch homologe oder heterologe Rekombination statt (Ruiz-Diez, 2002). Prinzipiell können mehrere Kopien eines Plasmids ektopisch in das Wirtsgenom integrieren, wobei sowohl der Integrationsort als auch die Kopienzahl stark variieren (Verdoes *et al.*, 1995). Dabei kann sowohl durch die entstehenden Positionseffekte als auch durch die Anzahl der integrierten Kopien die Expression des heterologen Gens stark beeinflusst werden (Jeenes *et al.*, 1994). Untersuchungen haben gezeigt, dass es keine Abhängigkeit zwischen der Anzahl der Kopien und der Proteinproduktion gibt (van Gemeren *et al.*, 1996).

Neben der ektopischen Integration können Plasmide auch gerichtet via homologer Rekombination in das Wirtsgenom integrieren (Aramayo und Metzberg, 1996). Hierzu werden auxotrophe Mutanten verwendet, die eine Deletion in einem entsprechenden Markergen besitzen (D'Enfert, 1996). Mit Hilfe von Komplementationsanalysen lässt sich so eine erfolgreiche Integration des Plasmids schnell und einfach durch Selektion auf Minimalmedium überprüfen (Unkles *et al.*, 1989). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nur eine Kopie in das Genom integriert wird und so keine Positionseffekte aufgrund des Integrationsortes während der Genexpression auftreten (Lubertozzi und Keasling, 2006). Dies ist vor allem bei *N. crassa* von Bedeutung, da mehrere Kopien eines Gens zu einer Methylierung der Gensequenzen und damit zur Inaktivierung des dazugehörigen DNA-Abschnitts führen können (Selker, 1990). Integriert die Sequenz jedoch als Einzelkopie in das Genom von *N. crassa*, wird sie in der Regel nicht methyliert (Windhofer *et al.*, 2000). Abhängig vom gewählten Markergen können dabei der Erfolg der Integration sowie die Expressionsstärke stark variieren. Vergleiche der Loci *argB*, *trpC* und *niaD* bei *Aspergillus* haben beispielsweise eine höhere Integrationsrate bei Transformanten des *argB*-Locus gezeigt als bei den beiden anderen Loci (Lubertozzi und Keasling, 2006). Bei *N. crassa* wird neben den *qa*-Locus (Case *et al.*, 1979) in der Regel der *his-3*-Locus für die Integration des Plasmids verwendet. Die Integration erfolgt dabei durch homologe Rekombination ohne eine Duplikation der Sequenz (Aramayo und Metzberg, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Integration der

Expressions-kassette die homologe Rekombination in den *his-3*-Locus gewählt, um multiple Kopien und die damit verbundene Methylierung zu vermeiden. Das gewählte Transformationssystem erwies sich dabei als sehr effektiv, nur ein geringer Prozentsatz der untersuchten Transformanten enthielt mehr als eine Kopie der Expressionskassette. Für die Transformation von *N. crassa* wurde wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben die Elektroporation der Konidien verwendet. Eine Alternative zur Elektroporation ist die in neuerer Zeit bekannt gewordene *Agrobacterium*-unterstützte Transformation ("*Agrobacterium-mediated Transformation*" AMT) (Gouka *et al.*, 1999). Mit dieser Methode können eine Vielzahl unterschiedlicher Pilze transformiert werden, wobei sowohl Konidien, vegetatives Myzel als auch Fruchtkörper sich zur Transformation eignen (Michielse *et al.*, 2005). Ein Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, dass für die Transformation eine verlustreiche Protoplastierung des gewählten Materials umgangen werden kann (Yelton *et al.*, 1984), so dass auch die Transformation höherer Pilze möglich ist (Mikosch *et al.*, 2001). Die AMT-Methode erzeugt einen hohen Prozentsatz an Transformanten, die eine einzelne Integration des gewünschten Gens zeigen (Michielse *et al.*, 2004). Auch *N. crassa* konnte bereits erfolgreich mit diesem System transformiert werden (de Groot *et al.*, 1998).

### **4.3 Transkriptanalyse der heterologen Gene in *Neurospora crassa***

Bei der Transkriptionsanalyse der positiven Transformanten zeigten sich deutliche Unterschiede im Expressionsniveau der Gene in Abhängigkeit von den verwendeten Promotoren (Kapitel 3.4). Die Gene der RNase A und des IGF-I wurden in allen Transformanten transkribiert. Unter Verwendung der Promotoren *trpC* und *acu-5* wurden die beiden Gene jedoch nur sehr schwach exprimiert. Zudem wies der *acu-5*-Promotor einen weiteren Mangel auf, da es bei der Verwendung dieses Promotors bei einer verlängerten Inkubationszeit zu einer Autolyse des Myzels kam. Eine wesentlich höhere Expressionsrate der beiden Gene zeigte sich hingegen bei dem  $\alpha$ -Amylase- und dem *cfp*-Promotor. Dabei blieb die Expressionsrate über einen Zeitraum von 96 Stunden stabil (Kapitel 3.4.3).

Ähnliche Ergebnisse bezüglich der verwendeten Promotoren wurden bereits von Freitag *et al.*, 2004 beschrieben. Hier konnte eine Expression des *egfp*-Gens nur unter Verwendung des *ccg1*-Promotors nachgewiesen werden, wohingegen bei der

Verwendung anderer starker Promotoren wie z. B. dem *arg*-Promotor oder dem *qa*-Promotor kein eGFP nachgewiesen werden konnte.

Die hier durchgeführten Expressionsstudien des *g-csf*-Gens zeigten eine niedrige Transkriptionsrate bei Verwendung des  $\alpha$ -Amylase-Promotors und keine Transkription bei Verwendung des *trpC*- und *acu-5*-Promotors. Um auszuschließen, dass die fehlende Transkription bei dem *trpC*-Promotor auf eine Methylierung einzelner Komponenten der Expressionskassette zurückzuführen war, wurden Untersuchungen zum Methylierungsgrad des *g-csf*-Gens durchgeführt. Die durchgeführte Southern-Hybridisierung deutete dabei aber nur auf einen geringen Methylierungsgrad der Sequenz hin. Die Ursache für den fehlenden Nachweis der Expression des *g-csf*-Gens bleibt daher unklar und ist vermutlich auf die Gensequenz selbst zurückzuführen. Die hier verwendete Sequenz des *g-csf*-Gens wurde für den Gebrauch in *E. coli* optimiert, der sich im hohen Maße von dem *N. crassa*-Kodongebrauch unterscheidet. Die Kodonoptimierung zu Gunsten der Expression in *E. coli* kann durchaus die Stabilität des Transkriptes in *N. crassa* beeinflussen und somit ein Grund für das Ausbleiben eines stabilen Transkriptes sein (Gouka *et al.*, 1996). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Expression des Lymphotoxin A beobachtet. Bei Verwendung eines synthetischen Gens, welches an den *E. coli*-Kodongebrauch angepasst wurde, konnte kein Transkript nachgewiesen werden. Wurde stattdessen humane cDNA für die Expression verwendet, konnte ein Transkript sowie das dazugehörige Protein nachgewiesen werden (Kraseveć *et al.*, 2000). Die Stabilität des mRNA-Transkriptes hängt dabei von mehreren Faktoren ab. So führen insbesondere AU-reiche Abschnitte zu einem frühzeitigen Abbruch der Transkription (Gouka *et al.*, 1997). Diese Abschnitte führen entweder zur Ausbildung kryptischer Introne, die falsches Spleißen verursachen können (Hamann und Lange, 2006) oder durch ihre Ähnlichkeit mit Polyadenylierungsstellen zu einem verfrühten Abbruch der Transkription und somit zu einem Abbau der mRNA (Koda *et al.*, 2005). Durch Analysen stark exprimierter und schwach exprimierter Gene konnten Tabellen über den Kodongebrauch in vielen Organismen erstellt werden (Nakamura *et al.*, 2000). So sind in *N. crassa* 8 % der verwendeten Kodone selten (Nelson *et al.*, 2004). Durch eine Anpassung des Kodongebrauchs lässt sich das Expressionsniveau rekombinanter Gene erheblich steigern (Nelson *et al.*, 2004; Hamann und Lange, 2006). Dies wurde erstmals erfolgreich bei der Expression des GFP in filamentösen Hyphenpilzen angewandt (Cormack, 1998). So zeigte das native GFP keine Fluoreszenz (Fernandez-Abalos *et al.*, 1998), während das optimierte GFP, welches einen erhöhten GC-Gehalt besaß, zu einer deutlichen Fluoreszenz im Cytosol der Pilze führte (Freitag *et al.*, 2001). Mittlerweile sind noch weitere Beispiele bekannt, bei denen eine Anpassung der Sequenz an den

Kodongebrauch des jeweiligen Wirtes zu einer Transkription und nachweisbaren Synthese des gewünschten Proteins führte (Kraseveć *et al.*, 2003; Koda *et al.*, 2005). Die Translation ist generell stark mit der Degradation bestimmter mRNAs verbunden (Kinnaird *et al.*, 1991). Kommt es zu einer Verlangsamung der Translationsrate aufgrund seltener Kodone, führt dies zu einem Abbau der mRNA (Hentze, 1991). So zeigte ein Vergleich der Expression des nativen Aequorin-Gens aus der Qualle *Aequorea victoria* mit einer kodonoptimierten Variante des Gens, bei der 44 Kodone ausgetauscht wurden, eine 45fache Steigerung der Protein-Menge (Nelson *et al.*, 2004). Für die hier beschriebene Expression wurde die Gensequenz der RNase A und des IGF-I ebenfalls an den Kodongebrauch des Wirts *N. crassa* angepasst. Im Gegensatz zu dem für *E. coli* optimierten *g-csf*-Gens konnte so die Bildung einer stabilen mRNA für die RNase A und das IGF-I in den *N. crassa*-Transformanten nachgewiesen werden (Kapitel 3.4).

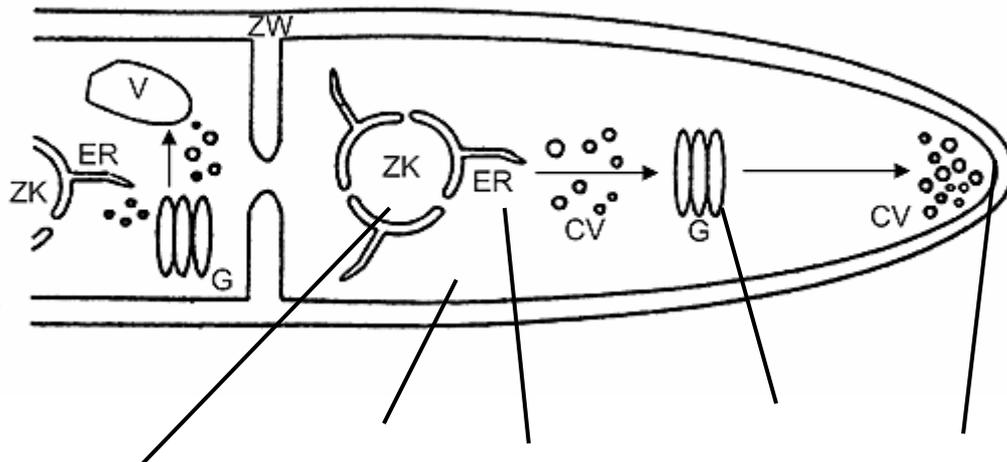
Neben der Optimierung des Kodongebrauchs existieren noch weitere Möglichkeiten, die Stabilität der mRNA und somit deren Menge zu steigern. So konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein eines Introns zu einer detektierbaren mRNA-Menge führte, während eine intronlose Variante des Gens nicht detektiert werden konnte (Xu und Gong, 2003). Eine weitere Methode zur Erhöhung der Transkriptstabilität liegt in einer Fusion des Gens mit dem N-terminalen Bereich des Gens, dessen Promotor verwendet wurde oder eines stark transkribierten Proteins (Nyssönen und Keränen, 1995).

#### **4.4 Synthese und Sekretion der heterologen Proteine in *Neurospora crassa***

Die erfolgreiche Synthese und Sekretion der exprimierten Proteine wurde wie in Kapitel 3.5 beschrieben mittels Antikörperdetektion überprüft. Bei der heterologen Expression können verschiedene Faktoren wie z. B. Limitationen auf Transkriptebene und der proteolytische Abbau des Proteins die Ausbeute an rekombinanten Protein signifikant beeinflussen (Gouka *et al.*, 1997). Während die Antikörperdetektion keine Signale bei den Proteinen IGF-I und G-CSF ergab, konnte eine Sekretion der RNase A in den Kulturüberstand nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich jedoch erneut deutliche Unterschiede in den einzelnen Mengen der sekretierten RNase A in Abhängigkeit von dem verwendeten Promotor. Die geringste Menge an RNase A war in Transformanten zu detektieren, die das Gen unter Kontrolle des *trpC*-Promotors trugen. Die höchsten Ausbeuten wurden hingegen bei Transformanten mit dem *cfp*-Promotor nachgewiesen. Allerdings kam es hier zu einem Nachweis eines zweiten Proteins, das sich mit einem

Molekulargewicht von ca. 16 kDa um ca. 2 kDa von der Größe der rekombinanten RNase A unterschied. Die Unterschiede in den Ausbeuten an rekombinanter RNase A können auf verschiedenen Ebenen des Syntheseprozesses entstanden sein: auf Ebene der Transkription, der Translation oder der Sekretion (Abb. 31). Auf die Probleme während der Transkription wurde bereits im vorangegangenen Kapitel eingegangen. In vielen Fällen ist die Menge der vorhandenen mRNA allerdings nicht limitierend (Gouka *et al.*, 1997; Pakula *et al.*, 2000), so dass aus der Menge an mRNA nicht automatisch auf die Menge an rekombinantem Protein geschlossen werden kann (Nyysönen und Keränen, 1995). Vielmehr entstehen Engpässe auf der Ebene der Translation sowie während der posttranslationalen Prozesse. So konnte nachgewiesen werden, dass es bei der Translation dreier selten verwendeter Kodone der Wirtsorganismus zu einer 70%igen Verringerung der Proteinausbeute kommen kann (Koda *et al.*, 2005). Hier könnte auch der Grund für die nichtvorhandene Detektion des G-CSF liegen, da durch die Anpassung der Gensequenz an den *E. coli*-Kodongebrauch 8 % der verwendete Kodone in *N. crassa* selten sind. Ein weiterer Engpass bei der heterologen Produktion liegt auf der Ebene der Translokation des Proteins vom Cytoplasma ins Endoplasmatische Retikulum (ER). Nach der Translation wird das Protein mit Hilfe der Exportsequenz in das ER transportiert, wo die Faltung erfolgt (Conesa *et al.*, 2001). Im ER erfolgt jedoch nicht nur die korrekte Faltung der Proteine, sondern auch posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung und Phosphorylierung (Conibear und Stevens, 1998). Vom ER erfolgt der weitere Transport über den Golgi-Apparat, in dem weitere Modifikationen des Proteins stattfinden können, in das Kulturmedium (Punt *et al.*, 1994). Die Überexpression rekombinanter Proteine kann zu einer Akkumulation des synthetisierten Proteins im ER führen (Ward *et al.*, 1991), welche die Faltung der Proteine beeinträchtigen kann und die zellulären Sekretionswege des Wirtes überlastet (Arvas *et al.*, 2006). Die fehlerhafte Faltung von Proteinen im ER und die Akkumulationen teilgefalteter Proteine sorgen im Wirt für eine Aktivierung der "Unfolded Protein Response" (UPR) (Sims *et al.*, 2005). Hierbei kommt es zu einer verstärkten Expression solcher Gene, deren Produkte an der Proteinfaltung, Sekretion und Degradation beteiligt sind (Travers *et al.*, 2000). Neben der vermehrten Synthese von Chaperonen und Foldasen (Valkonen *et al.*, 2003) wird im ER auch die ER-assoziierte Degradation gestartet, in deren Verlauf falsch gefaltete Proteine durch intrazelluläre proteolytische Vorgänge abgebaut werden (Cabral *et al.*, 2001). Versuche, die Menge an rekombinantem Protein durch Überexpression verschiedener Komponenten der UPR zu steigern, hatte unterschiedliche Effekte (Conesa *et al.*, 2001). So konnte durch die Überexpression der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) die Ausbeute an rekombinantem Thaumatin um den Faktor 2 bis 2,5 gesteigert werden (Lombraña *et al.*,

2004). Allerdings hatte eine Überexpression der PDI keinen Effekt auf die Ausbeute an rekombinanten Lysozym (Ngiam *et al.*, 2000).



	<b>Zellkern</b>	<b>Cytoplasma</b>	<b>ER</b>	<b>Golgi</b>	<b>Post-Golgi</b>
<b>Schlüsselprozesse</b>	prä-mRNA-Prozessierung	mRNA-Stabilität	Translation Signalerkennung Translokation Faltung Modifikation Glykosylierung	Prozessierung Glykosylierung	post-Golgi-Prozesse Passage durch die Zellwand
<b>mögliche Probleme</b>	AU-reiche Sequenzen	mRNA-destabilisierende Elemente	tertiäre Proteinstruktur Mangel an Foldasen oder Chaperonen ERAD/UPR	inkorrekte Prozessierung	Proteolytischer Abbau
<b>mögliche Lösungen</b>	Kodonoptimierung	Genfusion	Genfusion Überproduktion von Foldasen oder Chaperonen Protease-defiziente Stämme	Überproduktion prozessierender Proteine	Protease-defiziente Stämme

**Abbildung 31: Überblick über den Sekretionsweg bei filamentösen Hyphenpilzen mit den limitierenden Schritten bei der heterologen Proteinproduktion** (verändert nach Gouka *et al.*, 1997)

Gezeigt ist ein allgemeiner Überblick über den Sekretionsweg an den Hyphenspitzen filamentöser Pilze. (Abkürzung: ZK – Zellkern; CV – cytoplasmatische Vesikel; ER – Endoplasmatisches Retikulum; G – Golgi (-ähnliches) Kompartiment; V – Vakuole; ZW – Zellwand).

#### 4.4.1 Zeitliche Regulation der RNase A-Expression

Ein wichtiger Aspekt bei der heterologen Expression in filamentösen Hyphenpilzen ist die durchgängige Expression des gewünschten Zielgens über einen längeren Zeitraum mit einer Akkumulation des Proteins im Kulturüberstand (Radzio und Kück, 1997). Hierbei gab es große Unterschiede zwischen den untersuchten Transformanten (Kapitel 3.5.1.2). So konnte in der Transformante NcT157 (*acu-5::maseI*) nach einer Expressionsdauer von mehr als 24 Stunden keine rekombinante RNase A mehr detektiert werden. Da gleichzeitig eine Autolyse des Myzels beobachtet werden konnte, ist der Rückgang an rekombinatem Protein vermutlich auf proteolytische Enzyme zurückzuführen, die bei der Autolyse des Myzels freigesetzt wurden (Griffith, 1994). Grund für die Autolyse des Myzels war vermutlich eine Konzentrationsabnahme an Nährstoffen im Kulturmedium (Talabardon und Yang, 2005), die trotz regelmäßiger Zugabe der Kohlenstoffquelle Acetat nicht verhindert werden konnte. Dem relativ schnellen Abbau der RNase A in der Transformante NcT157 steht die Ausbeute an rekombinanter RNase A der Transformante NcT176 gegenüber, bei der die Expression des Proteins unter Kontrolle des  $\alpha$ -Amylase-Promotors erfolgte. In dieser Transformante blieb die Menge an rekombinanter RNase A in den ersten 72 Stunden nahezu konstant, nahm danach aber deutlich zu. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen aus den entsprechenden Transkriptanalysen, die eine gleichbleibend starke Expressionsrate zeigten. Ursache für die verzögerte Zunahme an rekombinanter RNase A in den Kulturüberständen der Transformante NcT176 könnte eine verzögerte Passage durch die Zellwand sein (Chang und Trevithick, 1974).

Die höchste Menge an rekombinanter RNase A konnte nach 72 Stunden in der Transformante NcT179 nachgewiesen werden, welche ein Konstrukt unter der Kontrolle des *cfp*-Promotors trug (Kapitel 3.5.1.2). Ähnlich wie bei der Transformante NcT176 erfolgte auch hier die Produktion der rekombinanten RNase A etwas verzögert und erreichte ihren Höhepunkt nach 48 Stunden. Eine der Ursachen könnte in einer verzögerten Translation und Sekretion liegen, die der Expression und Sekretion der RNase A unter Kontrolle des  $\alpha$ -Amylase-Promotors ähnelt. Zudem erschien nach 48 Stunden im Western-Blot eine weitere Protein-Bande von 16 kDa, die sich um ca. 2 kDa von der Größe der rekombinanten RNase A unterschied. Hierbei könnte es sich um eine glykosylierte Form des Enzyms handeln. Ähnliches wurde auch bei der Expression der RNase A in der Hefe *Pichia pastoris* beobachtet (Chatani *et al.*, 2000). Eine andere Möglichkeit wäre die unprozessierte Form der RNase A, bei der die Signalsequenz nicht abgespalten wurde. Dieses Phänomen konnte bereits bei der Überproduktion verschiedener Proteine, wie zum Beispiel dem humanen TNF- $\alpha$  oder der katalytischen

Untereinheit der bovinen Enterokinase, beobachtet werden (Kraseveć *et al.*, 2003; Svetina *et al.*, 2000). Dass es sich bei der zusätzlichen Proteinbande um unprozessierte RNase A handelt, erscheint gegenwärtig wahrscheinlicher als die Möglichkeit einer Glykosylierung. Im Gegensatz zu Hefen ist die Hyperglykosylierung kein typisches Merkmal filamentöser Pilze (Maras *et al.*, 1999). In der Regel liegen bei rekombinanten Proteinen eher kleine Mannose-artige N- und O-Glykane vor (Archer und Peberdy, 1997). Eine Hyperglykosylierung von Proteinen konnte bislang nur in wenigen filamentösen Hyphenpilzen beobachtet werden (Goto *et al.*, 1997). Dabei scheint das Vorhandensein von N-Glykanen oder hyperglykosylierten Strukturen stark von den Wachstumsbedingungen abhängig zu sein (Devchand und Gwynne, 1991)

#### 4.4.2 Das Problem der Proteasen

Bei der Synthese der rekombinanten RNase konnte bei der Transformante NcT179 nach 72 Stunden ein starker Abfall in der Proteinmenge beobachtet werden, was auf einen Abbau der rekombinanten RNase A durch pilzeigene Proteasen hindeutete. Der Abbau rekombinanter Enzyme durch sekretierte Proteasen des Wirtes ist eines der Hauptprobleme bei der heterologen Produktion (van den Hombergh *et al.*, 1997 [b]). Im Rahmen der Genomannotierung konnten in *N. crassa* 55 putative Proteasen identifiziert werden, von denen 12 als extrazellulär eingeordnet wurden (Borkovich *et al.*, 2004). Fünf weitere Proteasen konnten von Cambareri *et al.*, 2003 im experimentellen Ansatz identifiziert werden. *N. crassa* sekretiert dabei sowohl alkalische als auch saure und neutrale Proteasen (Cohen *et al.*, 1975). Eine Übersicht der bisher identifizierten Proteasen sowie der zugehörigen vermuteten Gene ist in Tabelle 13 dargestellt. Die Regulation der Protease-Synthese geschieht in *N. crassa* über den Gehalt an Schwefel, Stickstoff und Kohlenstoff im Kulturmedium (Lampkin *et al.*, 1976). Die Induktion der Protease-Produktion wird dabei auf Transkriptionsebene geregelt (van den Hombergh *et al.*, 1997 [b]). Für einzelne Proteasen existieren dabei verschiedene Regulationsmechanismen. So zeigte eine regulatorische Mutante des Schwefelmetabolismus einen Defekt in der Synthese einer alkalischen Protease bei Schwefelmangel. Unter Kohlenstoff- und Stickstoff-Mangel wurde die Protease dagegen synthetisiert (Hanson und Marzluff, 1975). Die Produktion der Proteasen beginnt in *N. crassa* 5 – 6 Stunden nach der Keimung der Konidien (Drucker, 1972). Dabei werden etwa 0,4 % des gesamten Metabolismus der Zelle für die Protease-Synthese verwendet (Abbot und Marzluff, 1984). Die Induktion der Protease-Synthese erfolgt dabei durch eine bereits im Medium

vorhandene Proteinquelle (Cohen *et al.*, 1975), wobei die Art und Löslichkeit des Proteins nicht von Bedeutung ist (Cohen und Drucker, 1977).

**Tabelle 13: Übersicht über die bisher identifizierten *N. crassa*-Proteasen** (verändert nach Cambareri *et al.*, 2003; Borkovich *et al.*, 2004)

<i>N. crassa</i> Gen	Definition	Induktion durch Mangel an	Referenz
NCU00249.2	saure Protease	n. b.	Borkovich <i>et al.</i> , 2004
NCU00263.2	Serin-Protease	n. b.	Borkovich <i>et al.</i> , 2004
NCU00338.2	saure Protease	Licht	Kallies <i>et al.</i> , 1992
NCU00994.2	saure Protease	n. b.	Cambareri <i>et al.</i> , 2003
NCU02059.2	saure Protease	n. b.	Borkovich <i>et al.</i> , 2004
NCU02956.2	saure Protease	n. b.	Borkovich <i>et al.</i> , 2004
NCU03168.2	saure Protease	n. b.	Borkovich <i>et al.</i> , 2004
NCU05071.2	Protease M1 (Metalloprotease)	N; C	Lindberg <i>et al.</i> , 1982
NCU05756.2	Peptidase M4 (Metallopeptidase)	n. b.	Borkovich <i>et al.</i> , 2004
NCU5908.2	Protease M2 (Metalloprotease)	N; S	Lindberg <i>et al.</i> , 1982
NCU06720.2	Serin- Carboxypeptidase	Licht	Kallies <i>et al.</i> , 1992
NCU06949.2	alkalische Protease	S	Lindberg <i>et al.</i> , 1981
NCU07063.2	saure Protease	n. b.	Borkovich <i>et al.</i> , 2004
NCU07533.2	alkalische Protease	S; N	Lindberg <i>et al.</i> , 1982
NCU08739.2	saure Protease	S	Rhodes <i>et al.</i> , 1983
NCU09155.2	saure Protease	n. b.	Borkovich <i>et al.</i> , 2004
NCU09484.2	saure Protease	n. b.	Borkovich <i>et al.</i> , 2004

(Abkürzungen: n. b. – nicht bekannt; N – Stickstoff; S – Schwefel; C – Kohlenstoff)

Ähnlich wie in *N. crassa* dominieren auch bei *Aspergillus* die sauren Proteasen (van den Hombergh *et al.*, 1997 [b]). Eine der Hauptproteasen ist hierbei Aspergillopepsin A (Berka *et al.*, 1990), welches homolog zu dem Protease-Gen NCU00994.2 aus *N. crassa* ist (Cambareri *et al.*, 2003). Aspergillopepsin A ist für ca. 80 % der proteolytischen Aktivität im Kulturmedium verantwortlich (van den Hombergh *et al.*, 1997 [b]). Ein Ausschalten dieser Protease kann zu einer deutlichen Verringerung des Abbaus des rekombinanten Proteins führen (Archer *et al.*, 1992). Die Protease-Aktivität kann jedoch nicht komplett ausgeschaltet werden (Mattern *et al.*, 1992). Bei der Protease-Aktivität spielt auch der pH-Wert des Kulturmediums eine entscheidende Rolle (Punt *et al.*, 2002). So kann ein saurer pH-Wert zu einem erhöhten Abbau rekombinanter Proteine führen (Archer *et al.*, 1992).

Durch die klassische UV-Mutagenese konnten in Pilzen der Gattung *Aspergillus* Protease-defiziente Stämme generiert werden, die anschließend auf den Abbau rekombinant produzierter Proteine untersucht wurden (Mattern *et al.*, 1992). Mit Hilfe dieser Stämme konnte die Proteinausbeute um den Faktor 20 und mehr gesteigert werden (Faus *et al.*, 1998; Morajelo *et al.*, 2000). Von besonderem Interesse war dabei eine Mutante, die eine fehlende Expression zweier Proteasen zeigte (Mattern *et al.*, 1992). Wie detaillierte Analysen zeigten, besaß die Mutante eine Deletion in dem Transkriptionsregulatorgen *prt-13* (van den Hombergh *et al.*, 1997 [b]). Die Identifikation eines homologen *N. crassa*-Gens und dessen Inaktivierung zeigte allerdings keine Veränderung in der Protease-Aktivität von *N. crassa* (Cambareri *et al.*, 2003). Versuche, durch klassische UV-Mutagenese in dieser Arbeit einen Protease-defizienten Stamm zu generieren (Kapitel 3.5.1.3), brachten keinen Erfolg. Die Ausbeuten an rekombinanter RNase A war in allen Transformanten identisch. Bei Transformanten beider Wirte war ein leichter Abbau des rekombinanten Proteins nach ca. 48 Stunden zu sehen. Das Ausbleiben einer gesteigerten Synthese der RNase A in Transformanten ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass durch die Mutagenese Proteasen ausgeschaltet wurden, die keinen Anteil am Abbau der RNase A hatten.

## 4.5 Optimierung der rekombinanten Proteinsynthese

Die Verbesserung von Wirtsstämmen und die Suche nach optimalen Kultivierungsbedingungen für die Produktion biotechnologisch relevanter Produkte ist ein wichtiger Bestandteil bei der rekombinanten Proteinproduktion (Parekh *et al.*, 2000). Die Optimierung der Produktion kann dabei auf verschiedenen Ebenen durchgeführt werden (z. B. Translation, Sekretion oder Kulturbedingungen), auf denen man die Engpässe bei der Expression vermutet (Archer *et al.*, 1994). Eine Verbesserung der Produktion ist vor allem in der Industrie von Bedeutung, da dadurch die Kosten minimiert und die Ausbeute gesteigert werden kann (Gerngroß, 2004).

### 4.5.1 Methoden der Mutagenese

Die klassische Entwicklung von Produktionsstämmen geschieht in der Regel durch UV- oder chemische Mutagenese (Rowlands, 1984). Bei beiden Methoden wird eine ungerichtete Veränderung der Gensequenz durchgeführt. Ziel ist es dabei, regulatorische Ebenen und Kontrollmechanismen auszuschalten, die zu einer Verminderung der Ausbeuten führen (Parekh *et al.*, 2000), wie beispielsweise eine ineffektive Sekretion des Proteins (Perlinske-Lenart *et al.*, 2005). Eine Übersicht über die verschiedenen Agenzien zur Mutagenese sowie deren Auswirkungen ist in Tabelle 14 aufgeführt.

**Tabelle 14: Übersicht über verschiedene Mutagenese-Methoden** (verändert und ergänzt nach Parekh *et al.*, 2000)

<b>Mutagen</b>	<b>Induzierte Mutation</b>	<b>Einfluss auf die DNA</b>	<b>relativer Effekt</b>	<b>Beispiel in</b>
<i>Strahlung</i> UV-Licht	Pyrimidin-Dimerisierung und DNA-Vernetzung	Transversion, Deletion, Leseraster-Verschiebungen, Transition von GC - AT	Mittel	Mattern <i>et al.</i> 1992, Weenink <i>et al.</i> , 2006
<i>Chemikalien</i> <i>Basenanaloga</i> 5-Bromouracil	Falschpaarung	AT – GC-, GC – AT-Transition	Gering	Drake, 2006
Salpetrige Säure	Deaminierung von A, C und G	Bi-direktionale Translation, Deletion AT – GC und/oder GC – AT	Mittel	Mala <i>et al.</i> , 2001
<i>Alkylierende Agenzien</i> N-Nitrosoguanidin	Alkylierung von C und A	GC – AT Transition	Hoch	Botstein und Jones, 1969
Ethyl-Methansulfonat	Alkylierung von C und A	GC – AT Transition	Hoch	Orndorff <i>et al.</i> , 1988
<i>Biologisch</i> Homologe Rekombination	Basensubstitution, Bruch der DNA	Deletion, Duplikation, Insertion	Hoch	Yeadon <i>et al.</i> , 2004 [b]
Repeat Induced Point Mutation (RIP)	Deaminierung von C	CT-Transition	Mittel	Cambareri <i>et al.</i> , 2005

Eine der gängigsten Mutagenese-Methoden ist die Verwendung von UV-Licht (Mattern *et al.*, 1992). Hierbei kommt es im Genom zu einer permanenten Veränderung in Form von Transversionen, Deletionen, Verschiebungen im Leseraster oder Transitionen (Weenink *et al.*, 2006). Nach der Bestrahlung mit UV-Licht werden die überlebenden Stämme gezielt hinsichtlich ihrer veränderten Eigenschaften selektiert. Dabei ist es von Vorteil,

wenn sich diese Selektion mit Hilfe von Indikatororganismen, Farbstoffen oder Selektionsreagenzien durchführen lässt (Parekh *et al.*, 2000). Eine solche Mutagenese wurde auch in Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um Protease-defiziente *N. crassa*-Stämme für die Expression der rekombinanten RNase A zu gewinnen (Kapitel 3.5.1.3). Der Erfolg der Mutagenese konnte dabei leicht auf Protease-Assay-Platten getestet werden (Ahearn *et al.*, 1968). Wurden eine oder mehrere Proteasen oder deren regulatorische Faktoren erfolgreich in *N. crassa* ausgeschaltet, so zeigen die Nachkommen einen kleineren Hof auf den Protease-Assay-Platten im Vergleich zum Wildtyp. Eine leicht veränderte Strategie wurde von Weenink *et al.* (2006) eingeschlagen. Hier wurde nach einer UV-Mutagenese auf Mutanten selektiert, die eine erhöhte Sekretion der Glukoamylase mit einer gleichzeitig verminderten Protease-Aktivität zeigten. Positive Mutanten wurden mit einem Konstrukt transformiert, welches ein Fusionsprotein aus Glukoamylase und dem Zielprotein enthielt. Das Ziel dieses Ansatzes war es, so die Sekretion des untersuchten rekombinanten Proteins zu steigern (Weenink *et al.*, 2006).

In *N. crassa* kann durch eine Besonderheit des Pilzes die Synthese rekombinanter Proteine relativ einfach optimiert und gesteigert werden. Durch eine erhöhte Rekombination während der Meiose (Catcheside *et al.*, 2003) lassen sich in *N. crassa* zufällige Modifikationen vornehmen, so dass im Anschluss eine Selektion auf die gewünschten Eigenschaften durchgeführt werden kann (Cambareri *et al.*, 2005). Bei der Rekombination während der Meiose wird der Austausch genetischen Materials zwischen homologen Chromosomen häufig an sogenannten "Rekombinations-Hotspots" initiiert, die sich in der 5'-UTR bestimmter Gene befinden (Catcheside *et al.*, 2003). Einer dieser Orte erhöhter Rekombination ist das *cog*-Gen, welches sich etwa 2,6 kb vom 3'-Bereich des *his-3*-Gens befindet (Bowring und Catcheside, 1991). Von dort aus kommt es zur Rekombination homologer Bereiche, die sich auf einen Bereich von bis zu 6 kb über den *his-3*-Locus hinaus ausdehnen kann (Yeadon *et al.*, 2004 [b]). Da Sequenzpolymorphismen in diesem Bereich keinen Einfluss auf die Rekombination haben (Yeadon und Catcheside, 1995), wird auch exogen eingeführte DNA rekombiniert (Catcheside *et al.*, 2003). Durch diese Methode lassen sich in kürzester Zeit *in vivo* eine Vielzahl von Varianten des ursprünglichen Genprodukts generieren. Die dabei entstandenen veränderten Sequenzen befinden sich einzeln in unterschiedlichen Nachkommen und können somit untereinander gekreuzt werden, um weitere Optimierungen zu erlangen (Cambareri *et al.*, 2005). Mit dieser Methode ist in *N. crassa* ein Werkzeug vorhanden, mit dem sich eine direkte Evolution des Proteins zur Verbesserung verschiedenster Proteineigenschaften *in vivo* durchführen lässt (Roodveldt *et al.*, 2005)

## 4.5.2 Optimierung der Kulturbedingungen

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Expression rekombinanter Proteine besteht in Modifikationen des Kulturmediums. So konnte am Beispiel des Lysozyms gezeigt werden, dass bei der Verwendung zweier unterschiedlicher Medien es in einem Medium zu einem schnellen Abbau des Proteins kam, während in dem zweiten Medium das Lysozym über einen längeren Zeitraum akkumulierte (Archer *et al.*, 1994). Ähnliche Untersuchungen wurden mit Hilfe des eGFP in *A. niger* durchgeführt (Gordon *et al.*, 2000 [a]). Bei Verwendung eines Glukoamylase::eGFP-Fusionskonstruktes konnte zwar in einem Minimalmedium eine hohe Fluoreszenz des eGFP in den Hyphen und Septen des Pilzes nachgewiesen werden, in den Überständen war jedoch keine Fluoreszenz detektierbar. Erst der Wechsel zu einem Sojamilch-Medium führte zu einer Fluoreszenz im Kulturüberstand und zu einem positiven Antikörpernachweis des eGFP (Gordon *et al.*, 2000 [b]). Generell hat sich gezeigt, dass die Verwendung eines Vollmediums Vorteile gegenüber Minimalmedien bringt, da hierbei die Katabolitrepression umgangen wird (Adrio und Demain, 2003). Untersuchungen an *Aspergillus awamori* zeigten, dass schon die Zugabe von Hefeextrakten zu einem Minimalmedium ausreicht, um die Protease-Aktivität zu verringern (Pakula *et al.*, 2000). Als Proteolyse-vermindernd haben sich vor allem Malzextrakte und Casaminosäuren erwiesen (Martin *et al.*, 2003). Auch die Zugabe geringer Konzentrationen an BSA kann die Ausbeute an rekombinantem Protein signifikant steigern (Joosten *et al.*, 2005). Die optimale Produktion rekombinanter Proteine ist jedoch nicht nur von der Medienzusammensetzung allein abhängig. Einen weiteren wichtigen Einfluss scheint unter anderem auch die Temperatur zu haben (MacKenzie *et al.*, 1994). So konnte in einem Standardminimalmedium eine Erhöhung der Proteinmenge bei 20 ° – 25 °C erreicht werden, wohingegen Temperaturen von 30 ° – 37 °C zu einer Abnahme an Protein führte. Bei Verwendung eines Sojamilch-Mediums erreichte die Synthese des heterologen Proteins ihren Höhepunkt bei 37 °C. Ein weiterer wichtiger Parameter, der zur Verbesserung der Produktion rekombinanter Proteine führen kann, ist der pH-Wert des Kulturmediums. So wird in filamentösen Hyphenpilzen die Expression der verschiedenen Proteasen unter anderem auch durch den pH-Wert kontrolliert (Punt *et al.*, 2002). Das PACC-pH-Regulatorprotein aus *A. niger* ist beispielsweise nur bei einem basischen pH-Wert aktiv und aktiviert Gene für Proteine, die ebenfalls nur im basischen Bereich aktiv sind (Tilburn *et al.*, 1995). Im Gegenzug werden Gene reprimiert, die für Proteine wie saure Proteasen kodieren (Espeso und Arst, 2000). Eine Aktivierung saurer Proteasen kann hingegen durch Ansäuerung des Kulturmediums erfolgen, wie sie während des initialen Wachstums der Pilze vorkommt (Punt *et al.*, 2002). In Experimenten

konnte gezeigt werden dass ein stabiler pH-Wert die Protease-Aktivität im Kulturmedium um einen Faktor von bis zu 6 senken kann (O'Donnell *et al.*, 2001).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit die heterologe Produktion der rekombinanten RNase A durch gezielte Veränderungen in den Kulturbedingungen optimiert. Für diese Untersuchungen wurde die Transformante NcT176 verwendet, welche die rekombinante RNase A unter Kontrolle des  $\alpha$ -Amylase-Promotors trug (Kapitel 3.5.1.2). Getestet wurden die Parameter: Medienzusammensetzung, Temperatur und pH-Wert. Veränderungen in diesen Parametern führten zu ähnlichen Ergebnissen wie sie bereits bei den oben beschriebenen Arbeiten gefunden wurden. Durch die Steigerung des pH-Werts vom einem sauren pH-Wert auf einen basischen Wert konnte eine Steigerung in der Bildung an rekombinanter RNase A im Minimalmedium erreicht werden. Bei einem pH-Wert von 7,5 zeigte sich dabei die höchste Ausbeute im Minimalmedium. Auch die Nährstoffkonzentration der Kulturmedien sowie die Temperatur zeigten einen deutlichen Einfluss auf die Expression der rekombinanten RNase A. Ein Vergleich der Synthese der rekombinanten RNase A in Minimalmedium VMM-St mit der Ausbeute in den beiden Vollmedien BMM und CCM zeigte, dass im Minimalmedium eine Temperaturerhöhung auf 30 °C zu einer Steigerung an rekombinanter RNase A führen kann. Im Gegensatz dazu kam es bei Verwendung der Vollmedien nur bei niedrigeren Temperaturen zu einer Erhöhung der RNase A. Bemerkenswert war bei der Verwendung des CCM-Mediums ein distinkter Abbau der RNase A nach 72 Stunden, der nach 96 Stunden noch deutlicher wurde. Trotz ihrer kompakten Tertiärstruktur kann die RNase A durch Subtilisin-ähnliche Proteasen gespalten werden. Es entstehen hierbei zwei Fragmente, das so genannte S-Peptid (Aminosäure 1 – 20) sowie das S-Protein (Aminosäure 21 – 124), wobei das S-Protein aktiv ist (Richards und Vithayathil, 1959). Eine ähnliche Spaltung des Proteins wurde durch die unspezifisch schneidende Proteinase K beobachtet (Markert *et al.*, 2001). Durch die Verwendung der hier vorhandenen Proteinquellen wurde anscheinend eine spezifische Protease aktiviert, die an ähnlichen Stellen in der RNase A schneidet. Im BMM-Medium war dieser Abbau nicht zu beobachten.

Neben den Anzuchsbedingungen haben auch Parameter wie Morphologie des Pilzes und Inokulationskonzentrationen einen wichtigen Einfluss auf die Produktion heterologer und homologer Proteine. Die Sekretion der rekombinanten Proteine findet bei den filamentösen Hyphenpilzen an den Hyphenspitzen statt (Asgeirdottir *et al.*, 1999). Durch eine Erhöhung der Anzahl der Hyphenspitzen lässt sich die Sekretion steigern (Lee *et al.*, 1998). Dieses lässt sich unter anderem durch Variationen der Konidien-Konzentration beim Start der Kultur erreichen (Talabardon und Yang, 2005). Abhängig von der Anfangskonzentration an Konidien können sich beispielsweise kleinere Myzel-Pellets bilden. Bei einem Durchmesser der Pellets von 1,6  $\mu\text{m}$  zeigte sich in *A. niger* eine erhöhte

Sekretion des rekombinanten Proteins (Xu *et al.*, 2000). Ähnliche Ergebnisse lassen sich durch Medienzusätze wie Polyvinylpyrrolidon (PVP) erreichen. Die Zugabe von PVP führte zu kleineren Pellets, da durch das PVP eine Aggregation der Konidien verhindert wurde. Dies hat letztendlich einen Anstieg der Proteinausbeute zur Folge, da mehr Protein sekretiert werden kann (Archer *et al.*, 1995).

### 4.5.3 Solid-State-Fermentation (Anzucht auf inerten Oberflächen)

Eine weitere Methode zur Anzucht von Hyphenpilzen ist die sog. "Solid-State-Fermentation". Bei dieser Methode werden die Pilze nicht in Flüssigmedium unter konstanter Rotation angezogen, sondern wachsen als Oberflächenkultur auf einem inerten Träger oder unlöslichen Substrat (Hölker *et al.*, 2004). Diese Art der Anzucht simuliert dabei die natürlichen Wachstumsbedingungen vieler filamentöser Pilze (Hölker *et al.*, 2005). Der Pilz bildet dabei stärkere Verzweigungen der Hyphen, die eine Penetration des Substrates ermöglichen und gleichzeitig eine erhöhte Sekretionsrate aufweisen (te Bieseke *et al.*, 2005 [a]). Dabei kann eine bis zu sechsfach erhöhte Menge sekretiert werden als bei der herkömmlichen Anzucht in Flüssigkultur (Oda *et al.*, 2006). Wie Untersuchungen am Myzels von *A. niger* zeigten, existieren zwei Arten von Hyphen: Hyphen, die eine starke Sekretion zeigten und Hyphen, die nur eine schwache Sekretion aufwiesen. Die stark sekretierenden Hyphenspitzen befanden sich dabei in der Peripherie des Myzels (Vinck *et al.*, 2005). In dieser Region ist auch die Expression von Genen für die Proteinsynthese bis zu sechsfach erhöht als in anderen Bereichen des Myzels (Masai *et al.*, 2006). Als Teil der Untersuchungen zur Steigerung der Proteinexpression wurden in dieser Arbeit auch zwei Transformanten als Oberflächenkultur angezogen (Kapitel 3.5.1.3). Die Anzucht als Oberflächenkultur unterschied sich im Vergleich zur Anzucht als "Solid-State-Fermentation" dadurch, dass es sich bei dem hier verwendeten Medium nicht um einen inerten Träger handelte, sondern um eine nicht-rotierende Flüssigkeit. Für die Oberflächenkultur wurden die Transformanten NcT176 ( $\alpha$ -Amylase-Promotor::*rnaseI*) und NcT179 (*cfp*-Promotor::*rnaseI*) verwendet. Beide Transformanten zeigten allerdings keine Bildung der heterologen RNase A in den Oberflächenkulturen. Der Grund dafür könnte in den verwendeten Promotoren liegen. Zumindest beim *cfp*-Promotor handelt es sich um den Promotor eines Gens aus der Glykolyse. Diese Gene werden während der Anzucht als "Solid State" jedoch herunterreguliert (Oda *et al.*, 2006), was letztendlich zum Ausbleiben der Expression der RNase geführt haben könnte. Die fehlende Produktion der RNase A unter der Kontrolle des  $\alpha$ -Amylase-Promotors ist hingegen unklar.

Möglicherweise handelt es sich bei dem gewählten Promotor um den Promotor einer  $\alpha$ -Amylase, die nur während der Kultivierung in Flüssigkultur aktiviert wird. Ähnliches wurde für zwei Glukoamylasen in *A. oryzae* beobachtet: Während die Glukoamylase A nur in Flüssigkultur exprimiert wurde, war die Glukoamylase B nur unter Solid-State-Bedingungen nachweisbar (te Bieseke *et al.*, 2005 [b]). Untersuchungen mit dem Promotor der zweiten in *N. crassa* bekannten  $\alpha$ -Amylase könnten in diesem Zusammenhang weitere Ergebnisse bringen.

Bei der Anzucht der Transformante NcT179 als Oberflächenkultur erschien im Coomassie-Gel eine Bande bei ca. 12 – 13 kDa, die in etwa der Größe der rekombinanten RNase A entsprach. Da diese Bande jedoch keine Reaktion mit dem spezifischen RNase A-Antikörper zeigte, wurde mittels eines RNase-Platten-Assays getestet, ob es sich bei dem Protein möglicherweise um die RNase N1 aus *N. crassa* handelt, die eine Größe von 12 kDa besitzt. Das Ergebnis war jedoch negativ, die Ribonuklease-Aktivität war bei den beiden Anzuchtbedingungen (Schüttelkultur und Oberflächenkultur) nahezu identisch. Frühere Untersuchungen zur Sekretion von *N. crassa* in Abhängigkeit von Licht/Dunkelheit zeigten jedoch, dass bei der Anzucht unter Dauerlicht ein Protein in der Größe von 12 – 13 kDa verstärkt gebildet wird (Kallies *et al.*, 1992). Da in dieser Arbeit die *N. crassa*-Transformanten während der Oberflächenkultur unter Dauerlicht angezogen wurden, könnte es sich bei dem 12 kDa großen Protein um das eben genannte Protein handeln. Nähere Informationen liegen zu diesem Protein nicht vor, da es von den Autoren nicht näher charakterisiert werden konnte.

## 4.6 Unterschiede in der Produktion heterologer und homologer Proteine in filamentösen Hyphenpilzen

Filamentöse Pilze besitzen die Fähigkeit, pilzeigene Proteine in Konzentrationen von bis zu 30 g/L in das Kulturmedium zu sekretieren (Durand *et al.*, 1988). Bei der Expression heterologer Proteine sind diese Ausbeuten aber um einen Faktor 10 bis 1000 niedriger (Punt *et al.*, 2002). Die Ursachen für diese Diskrepanz sind bisher noch nicht klar. Die Verbesserungen der Produktionsstämme (Mattern *et al.*, 1992), Untersuchungen zur Transkriptstabilität (Gouka *et al.*, 1996) und zur Translation (Cardoza *et al.*, 2003) führten zu Ansätzen, die zu einer Steigerung der Ausbeuten an rekombinanten Protein führten (Lombraña), die Unterschiede zu den endogenen sekretierten Proteinen sind aber immer noch sehr hoch (Archer, 2000). Eine deutliche Steigerung in den Mengen heterolog sekretierter Proteine ist nur bei der Expression von Genen pilzlichen Ursprungs zu beobachten (Verdoes *et al.*, 1995). Enzyme pilzlichen Ursprungs werden in einer Vielzahl industrieller Prozesse verwendet. Sie dienen zur Herstellung von Detergenzien, Textilien und Nahrungsmitteln (Archer und Peberdy, 1997). Eine Hauptauswahl rekombinant überproduzierter pilzeigener Enzyme, welche in der Nahrungsmittelindustrie verwendet werden, ist in Tabelle 15 gegeben.

**Tabelle 15: In der Nahrungsmittelindustrie verwendete rekombinante Enzyme aus filamentösen Pilzen** (nach Archer *et al.*, 2000)

<b>Enzym</b>	<b>Wirt</b>	<b>Ursprungsorganismus</b>
Catalase	<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus spec.</i>
Cellulase	<i>A. oryzae</i>	<i>Humicola spec.</i>
Cellulase	<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma spec.</i>
$\alpha$ -Galactosidase	<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus spec.</i>
$\beta$ -Glucanase	<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma spec.</i>
Glukose-Oxidase	<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus spec.</i>
Lipase	<i>A. oryzae</i>	<i>Candida spec.</i>
Phytase	<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus spec.</i>
Protease	<i>A. niger</i>	<i>Rhizomucor spec.</i>
Xylanase	<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma spec.</i>
Xylanase	<i>A. oryzae</i>	<i>Trichoderma spec.</i>

Der direkte Vergleich zwischen der Expression pilzeigener Proteine und Proteinen fremden Ursprungs zeigt, dass die Limitationen nicht auf der Ebene der Transkription, sondern auf den Ebenen der Translation und der Sekretion liegen (Gouka *et al.*, 1996). Aber auch bei der heterologen Produktion pilzeigener Proteine liegen die Ausbeuten deutlich unter den Konzentrationen der endogenen Proteine (Joosten *et al.*, 2003). Die Verwendung Protease-defizienter Stämme brachte auch hier eine Erhöhung der Ausbeute, die jedoch immer noch um den Faktor 10 unter der Produktion der endogenen Proteine liegt (Conesa *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der rekombinanten RNase A auch die endogene RNase N1 im homologen System überexprimiert. Die endogene RNase N1 wird von *N. crassa* meist nur in geringen Konzentrationen in das Kulturmedium sekretiert (Takahashi, 1988). Vergleicht man die Ribonuklease-Aktivität von Transformanten, welche die RNase N1 unter Kontrolle des *ccg1*-Promotors trugen, mit den vorliegenden Transformanten der RNase A, so zeigten die RNase N1-Transformanten eine deutliche Erhöhung der Ribonuklease-Aktivität in den Kulturüberständen. Die RNase N1 konnte demnach erfolgreich im homologen System überexprimiert und sekretiert werden. Nach einer entsprechenden Aufreinigung könnte sie anstelle der bovinen RNase A für den Abbau von Ribonukleasen im industriellen Maßstab verwendet werden.

## 4.7 Ausblick

In den letzten Jahren wurden die Möglichkeiten für die Verwendung filamentöser Hyphenpilze zur Produktion pilzlicher Proteine und Sekundärmetabolite immer stärker ausgeweitet (Bennett, 1998). Neben der traditionellen Verwendung wie z. B. zur Herstellung von Antibiotika erschließen sich durch die heutigen Verfahren zur genetischen Manipulation ganz neue Anwendungsgebiete insbesondere im Bereich der heterologen Expression (Archer, 2000). Die Weiterentwicklung bestehender Expressionssysteme führte zu einer Verbesserung der Produktion sowohl homologer wie auch heterologer Proteine (Radzio und Kück, 1997). Darüber hinaus sorgten neue Erkenntnisse über bisher limitierende Prozesse während der Transkription, Translation sowie den post-translationalen Prozessen zu einer Verbesserung der heterologen Proteinproduktion (Conesa *et al.*, 2001). Durch die Anpassung der zu exprimierenden Gene an den Kodongebrauch des Wirtes (Koda *et al.*, 2005) und detaillierter Analysen der verwendeten Promotoren konnte die Transkription vieler heterologer Gene gesteigert werden (Kato *et al.*, 2001). Auch Eingriffe auf posttranslationaler Ebene durch Überexpression verschiedener Komponenten des Sekretionsweges wie beispielsweise Foldasen oder Calnexin führten in einigen Fällen zu einer Steigerung in den Ausbeuten des Zielproteins (Conesa *et al.*, 2002). Ähnliche Effekte wurden auch bei der Verwendung Protease-defizienter Stämme beobachtet (Punt *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurden Versuche zur Expression heterologer Proteine durchgeführt sowie verbesserte Produktionsbedingungen getestet. Ausgehend von diesen Ergebnissen sollten weitere Transformanten analysiert werden, insbesondere die Transformanten, welche das *igf-I*-Gen trugen. Bei diesen Transformanten konnte zwar eine Transkription nachgewiesen werden, jedoch keine Translation. Hier könnte die Verwendung eines Fusionsproteins aus dem N-terminalen Bereich der erfolgreich sekretierten RNase N1 in Verbindung mit IGF-I eine Verbesserung der Translation und Sekretion bringen. In Verbindung mit hypersekretierenden Stämmen könnte zudem die Produktion gesteigert werden. Alternativ wäre anstelle eines Fusionsproteins aus RNase N1 und IGF-I der Austausch der Signalsequenz der alkalischen Phosphatase aus *A. chrysogenum* gegen die Signalsequenz der RNase N1 aus *N. crassa* möglich. Versuche in *A. oryzae* mit dem Sekretionssignal der homologen RNase T zeigten eine hohe Sekretionsrate des verwendeten Proteins (Masai *et al.*, 2004).

Des Weiteren sollten Promotoren identifiziert werden, die unter den Bedingungen der Oberflächenkultur aktiv sind. Vorteil einer Kultivierung als Oberflächenkultur wäre eine verringerte Protease-Aktivität sowie die erhöhte Sekretion des Zielproteins (te Bieseke *et*

*al.*, 2005 [a]). Weitere Mutagenese-Versuche zur Gewinnung Protease-defizienter Stämme könnten, wie das Beispiel *Aspergillus* gezeigt hat (Morajelo *et al.*, 2000), zu einer weiteren Steigerung der Ausbeuten an rekombinanten Protein führen. Neben der Verwendung der so generierten Mutanten besteht die Möglichkeit, Stämme zu verwenden, die im Zuge des *Neurospora Knock-out*-Programms gewonnen wurden (Colot *et al.*, 2006). Hierbei müsste ein besonderes Augenmerk auf die Stämme gelegt werden, bei denen Transkriptionsfaktoren ausgeschaltet wurden, die ähnlich wie das PACC-Protein mehrere Proteasen regulieren (Tilburn *et al.*, 1995).

Die hier durchgeführten Versuche zur Medienoptimierung wurden als Schüttelkultur ohne kontinuierliche Kontrolle der verschiedenen Parameter wie pH-Wert, Sauerstoffkonzentration oder Kohlenstoffquelle durchgeführt. Eine Wiederholung der Versuche in Fermentern unter kontrollierten Bedingungen könnte zu einer Erhöhung der bisherigen Ausbeuten führen (Gyamerah *et al.*, 2002). Durch eine systematische Optimierung der einzelnen Expressionsparameter könnte *Neurospora* als ein wichtiger Produktionsstamm in der industriellen Biotechnologie genutzt werden.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Expressionssystem für den Einsatz in filamentösen Hyphenpilzen entwickelt und angewendet. Anhand ausgewählter Promotoren wurden dazu die heterologen Gene *g-csf*, *igf-1* und *rnase1* sowie das endogene Gen *grn* in *Neurospora crassa* exprimiert. Die Produkte ausgewählter Transformanten wurden im Weiteren mit Hilfe einer Signalsequenz ins Kulturmedium sekretiert und näher untersucht. Als Ausgangspunkt für die Expression der Gene *g-csf*, *igf-1*, *rnase1* und *grn* wurden zwei Vektoren hergestellt (pAS336 und pAS337), die jeweils einen Polylinker aus den Erkennungssequenzen für vier selten schneidende Restriktionsendonukleasen besaßen. Der Vektor pAS337 ermöglichte dabei durch die Verwendung eines auf der Hygromycin B-Resistenz basierenden Selektionssystems die Transformation verschiedener filamentöser Hyphenpilze. Der Vektor pAS336 dagegen war speziell für die Transformation von *N. crassa* durch die Integration in den *his3*-Locus konzipiert. In diese Ausgangsvektoren wurden neben den Genen der heterologe Promotor *trpC* aus *Aspergillus nidulans* sowie die homologen Promotoren *acu-5*,  $\alpha$ -Amylase und *cfp* aus *N. crassa* integriert. Als Terminator diente die 5'-UTR des *arg-2*-Gens aus *N. crassa*.

Die entstandenen Expressionsvektoren wurden für die Transformation von *N. crassa* verwendet. Die putativen Transformanten wurden mittels Southern-Blot-Analysen überprüft und positive Transformanten identifiziert. Diese Transformanten wurden mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen auf die Transkription des jeweiligen Gens unter der Kontrolle der verschiedenen Promotoren untersucht. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in den Transkriptionsraten der verwendeten Promotoren. Die geringste Transkription wurde beim *trpC*-Promotor beobachtet; eine verstärkte Transkription war hingegen bei den Promotoren *cfp* und  $\alpha$ -Amylase zu sehen.

Mittels Western-Blot-Analysen konnte in den Kulturüberständen ausgewählter Transformanten eine effektive Synthese und Sekretion der RNase A nachgewiesen werden. Analog zu den Ergebnissen der Northern-Blot-Analysen gab es auch hier Unterschiede in der Menge des synthetisierten Proteins. Die höchste Syntheserate wurde bei Transformanten detektiert, welche das Gen unter der Kontrolle der Promotoren *cfp* und  $\alpha$ -Amylase trugen. Die Synthese der rekombinanten RNase A konnte dabei über einen Zeitraum von 96 Stunden nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Menge an rekombinantem Enzym erbrachten dabei Konzentrationen von bis zu 1 mg/L Kulturüberstand.

Zur Optimierung der Ausbeute an rekombinantem Protein wurden verschiedene Modifikationen in den Kultivierungsbedingungen der Transformanten angewandt. Dabei

zeigte die Verwendung eines durch UV-Mutagenese entstandenen Protease-defizienten Transformationsstammes im Vergleich zu Transformanten des Ursprungsstammes keine Unterschiede in der Menge an rekombinantem Protein. Modifikationen in der Anzucht der Transformanten brachten dagegen eine verstärkte Synthese der rekombinanten RNase A bei Verwendung eines Vollmediums bzw. bei einem leicht basischen pH-Werts des Mediums. Bei einer Kultivierung als Oberflächenkultur konnte dagegen kein rekombinantes Protein detektiert werden.

Mit dem etablierten System konnte neben den heterologen Proteinen (G-CSF, IGF-I und RNase A) auch die endogene RNase N1 erfolgreich in *N. crassa* überexprimiert werden. Dabei zeigten die entsprechenden Transformanten im RNase-Platten-Assay eine deutlich erhöhte Ribonuklease-Aktivität im Gegensatz zu Transformanten, welche die bovine RNase A exprimierten.

## Summary

In this study, an expression-system for the use in filamentous fungi was developed and applied. The heterologous genes *g-csf*, *igf-I* and *rnaseI* as well as the endogenous gene *grn* were expressed in the filamentous fungus *Neurospora crassa* using carefully selected promoters. Heterologous proteins of selected transformants were secreted in the culture supernatant with the help of a signal sequence and were further analysed.

As a starting point for the expression of the genes *g-csf*, *igf-I*, *rnaseI* and *grn*, two vectors (pAS336, pAS337) were constructed, each bearing a polylinker containing the restrictions sites of four rare restriction endonucleases. Vector pAS337 enabled the transformation and expression of genes in a variety of filamentous fungi using a Hygromycin B-resistance cassette. On the other hand, Vector pAS336 was specifically constructed for the use in the filamentous fungi *N. crassa* using the site specific recombination at the *his3*-locus. In these two vectors, the formerly mentioned genes as well as the heterologous promoter *trpC* from *Aspergillus nidulans* and the homologous promoters *acu-5*,  $\alpha$ -Amylase and *cfp* from *N. crassa* were integrated. The terminator used in this study was the *arg-2*-Terminator from *N. crassa*.

The resulting expression vectors were used for transformation of *N. crassa*. Putative transformants were analyzed by southern-blot analysis to identify positive transformants. Analysis of transcription under control of the different promoters was done by northern-hybridisations. The transcriptional strength showed significant differences among the different transformants. The strongest transcription was detected in transformants carrying the promoters *cfp* and  $\alpha$ -Amylase; the lowest transcription rates were found in transformants bearing the *trpC*-Promotor.

Western-blot analysis of selected transformants showed an effective production and secretion of the recombinant RNase A in the culture supernatants. Similar to results of the northern-hybridisations, highest synthesis of recombinant protein was detected in transformants carrying the constructs *cfp::rnaseI* and  $\alpha$ -Amylase::*rnaseI*. Studies on the amount of recombinant RNase A showed concentrations of up to 1 mg/L supernatant.

To optimize the amount of recombinant protein, several modifications of different culture-parameters were applied. A new *N. crassa* host showing reduced protease activity was derived by using UV-mutagenesis. Comparisons of recombinant protein synthesis between transformants of the original host and transformants of the protease-deficient host showed no differences in the resulting amount of RNase A. Modification in culture conditions showed a significant increase in recombinant protein by using a rich medium compared to standard minimal medium. A slight increase in pH towards alkaline values

revealed similar results. The application of solid-state fermentation technique resulted in no detection of recombinant RNase A under the given circumstances.

Using the established expression system, the endogenous RNase N1 was successfully expressed in *N. crassa*. The corresponding transformants showed a significantly increased ribonuclease-activity in ribonuclease-assays in contrast to transformants expressing the bovine RNase A.

## 6. Literatur

- Abbott RJ und Marzluff GA (1984).** Major Extracellular Protease of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **159**, 505-510.
- Adrio JL und Demain AL (2003).** Fungal Biotechnology. *International Microbiology* **6**, 191-199.
- Ahearn DG, Meyers SP und Nichols RA (1968).** Extracellular Proteinases of Yeast and Yeastlike Fungi. *Applied Microbiology* **16**, 1370-1374.
- Alcocer MJC, Furniss CSM, Kroon PA, Campbell M und Archer DB (2003).** Comparison of modular and non-modular xylanases as carrier proteins for the efficient secretion of heterologous proteins from *Penicillium funiculosum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 726-732.
- Aramayo R und Metznerberg RL (1996).** Gene replacements at the *his-3* locus of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetic Newsletter* **43**, 9-13.
- Archer, DB (2000).** Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. *Current Opinions in Biotechnology* **11**, 478-483.
- Archer DB, Jeenes DJ und MacKenzie DA (1994).** Strategies for improving heterologous protein production from filamentous fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* **65**, 245-250.
- Archer DB, MacKenzie DA, Jeenes DJ und Roberts IN (1992).** Proteolytic Degradation of Heterologous Proteins Expressed in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* **14**, 357-362.
- Archer DB, MacKenzie DA und Ridout MJ (1995).** Heterologous protein secretion by *Aspergillus niger* growing in submerged culture as dispersed or aggregated mycelia. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**, 157-160.
- Archer DB und Peberdy JF (1997).** The Molecular Biology of Secreted Enzyme Production by Fungi. *Critical Reviews in Biotechnology* **17**, 273-306.
- Arnold U und Ulbrich-Hofmann R (2006).** Natural and engineered ribonucleases as potential cancer therapeutics. *Biotechnological Letters in Press*.
- Arvas M, Pakula TM, Lanthaler K, Saloheimo M, Valkonen M, Suortti T, Robson G und Penttila M (2006).** Common features and interesting differences in transcriptional responses to secretion stress in the fungi *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* **7**.
- Asgeirsdottir SA, Scholtmeijer K und Wessels JGH (1999).** A Sandwiched-Culture Technique for Evaluation of Heterologous Protein Production in a Filamentous Fungus. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2250-2252.
- Ballance DJ (1986).** Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* **2**, 229-236.

- Barbieri M, Bonafé M, Franceschi C und Paolisso G. (2003).** Insulin/IGF-I-signalling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *American Journal of Physiological and Endocrinological Metabolism* **285**, E1064-E1071.
- Beadle GW und Tatum EL (1941).** Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *PNAS* **27**, 499-506.
- Bennett JW (1998).** Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology* **66**, 101-107.
- Bergquist PL, Te'o VSJ, Gibbs M, Cziferszky A, de Faria FP, Azevedo M und Nevalainen HKM (2002).** Expression of xylanase enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. *Extremophiles* **6**, 177-184.
- Berka RM, Ward M, Wilson LJ, Hayenga KJ, Kodama KH, Carlomagno LP und Thompson SA (1990).** Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*. *Gene* **86**, 153-162.
- Bistis GN, Perkins DD und Read ND (2003).** Different cell types in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter* **50**, 17-19.
- Borges MI, Azevedo MO, Bonatelli R, Felipe MSS und Astolfi-Filho S (1990).** A practical method for preparation of total DNA from filamentous fungi. *Fungal Genetics Newsletter* **37**.
- Borkovich KA, Alex LA, Yarden O, Freitag M, Turner GE, Read ND, Seiler S, Bell-Petersen D, Paietta J, Plesofsky N, Plamann M, Goodrich-Tanrikulu M, Schulte U, Mannhaupt G, Nargang FE, Radford A, Selitrennikoff C, Galagan JE, Dunlap JC, Loros JJ, Catcheside DE, Inoue H, Aramayo R, Polymenis M, Selker EU, Sachs MS, Marzluff GA, Paulsen I, Davis RH, Ebbole DJ, Zelter A, Kalkman ER, O'Rourke R, Bowring F, Yeadon J, Ishii C, Suzuki K, Wataru S und Pratt R (2004).** Lessons from the Genome Sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the Path from Genomic to Multicellular Organism. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 1-108.
- Borovkov AY und Rivkin MI (1997).** *XcmI*-containing vector for direct cloning of PCR products. *BioTechniques* **22**, 812-814.
- Botstein D und Jones EW (1969).** Nonrandom Mutagenesis of the *Escherichia coli* Genome by Nitrosoguanidine. *Journal of Bacteriology* **98**, 847-848.
- Bowring FJ und Catcheside DEA (1991).** The initiation site for recombination *cog* is at the 3' end of the *Neurospora crassa his-3* gene. *Molecular Genome and Genetics* **229**, 273-277.
- Breathnach R und Chambon P (1981).** Organization and Expression of Eucaryotic Split Genes Coding for Proteins. *Annual Reviews in Biochemistry* **50**, 349-383.
- Bullock AY, Fernandez JM und Short JM (1987).** XL1-Blue: A high efficiency plasmid transformation *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-378.

- Burnette WN (1981).** "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioionated protein A. *Analytical Biochemistry* **112**, 195-203.
- Cabral CM, Liu Y und Sifers RN (2001).** Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 619-624.
- Cambareri EB, Montufar JP und Stuart D. (2003).** Mutants of *Neurospora crassa* deficient in secreted proteases. *Fungal Genetic Newsletter* 50, Supplement: Abstract #245.
- Cambareri EB, Montufar JP und Stuart DW (2005).** Modification of an endoglucanase gene (EG III) by Repeat Induced Point (RIP) Mutation to produce gain-of-function mutants. *Neogenesis In-House Publication*.
- Cardoza RE, Gutiérrez S, Ortega N, Colina A, Casqueiro J und Martín JF (2003).** Expression of a synthetic copy of the bovine chymosin gene in *Aspergillus awamori* from constitutive and pH-regulated promoters and secretion using two different pre-pro sequences. *Biotechnology and Bioengineering* **83**, 249-259.
- Carsana A, Confalone E, Palmieri M, Libonati M und Furia A (1988).** Structure of the bovine pancreatic ribonuclease gene: the unique intervening sequence in the 5' untranslated region contains a promoter-like element. *Nucleic Acids Research* **16**, 5491-5502.
- Case ME, Schweizer M, Kushner SR und Giles NH (1979).** Efficient Transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *PNAS* **76**, 5259-5263.
- Catcheside DEA, Rasmussen JP, Yeadon J, Bowring F, Cambareri EB, Kato E, Gabe J und Stuart WD (2003).** Diversification of exogenous genes *in vivo* in *Neurospora*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**, 544-549.
- Cereghino JL und Cregg JM (2000).** Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 45-66.
- Chang PLY und Trevithick JR (1974).** How Important is Secretion of Exoenzymes through Apical Cell Walls of Fungi? *Archives in Microbiology* **101**, 281-293.
- Chatani E, Tanimizu N, Ueno H und Hayashi R (2000).** Expression of Soluble Bovine Pancreatic Ribonuclease A in *Pichia pastoris* and its Purification and Characterization. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **64**, 2437-2444.
- Choi JH, Lee SJ, Lee SJ und Lee SY (2003).** Enhanced Production of Insulin-Like Growth Factor I Fusion Protein in *Escherichia coli* by Coexpression of the Down-Regulated Genes Identified by Transcriptome Profiling. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4737-4742.
- Christensen T, Woeldike H, Boel E, Mortensen SB, Hjortshøj K, Thim L und Hansen, TM (1988).** High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technology* **6**, 1419-1514.
- Cohen BL und Drucker H (1977).** Regulation of exocellular protease in *Neurospora crassa*: Induction and repression under conditions of nitrogen starvation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **182**, 601-613.

- Cohen BL, Morris JE und Drucker H (1975).** Regulation of two extracellular proteases of *Neurospora crassa* by induction and by carbon-nitrogen and sulfur-metabolite repression. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **169**, 324-330.
- Collins ME, Briggs G, Sawyer C, Sheffield P und Connerton IF (1991).** An inducible gene expression system for *Neurospora crassa*. *Enzyme and Microbial Technology* **13**, 400-403.
- Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkova L, Weiss RL, Borkovich KA und Dunlap JC (2006).** A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *PNAS* **103**, 10352-10357.
- Conesa A, Archer DB, van den Hondel CAMJJ und Punt P (2002).** Calnexin Overexpression Increases Manganese Peroxidase Production in *Aspergillus niger*. *Applied And Environmental Microbiology* **68**, 846–851.
- Conesa A, Punt PJ, van Luijk N und van den Hondel CAMJJ (2001).** The Secretion Pathway in Filamentous Fungi: A Biotechnological View. *Fungal Genetics and Biology* **33**, 155-171.
- Conesa A, van den Hondel CAMJJ und Punt P (2000).** Studies on the Production of Fungal Peroxidases in *Aspergillus niger*. *Applied And Environmental Microbiology* **66**, 3016-3023.
- Conibear E und Stevens TH (1998).** Multiple Sorting Ways between the late Golgi and the vacuole in yeast *Biochimica et Biophysica Acta* **1404**, 211-230.
- Cormack B (1998).** Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Current Opinions in Microbiology* **1**, 406-410.
- Cos O, Ramon R, L., Montesinos JL und Valero F (2006).** Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: A review. *Microbial Cell Factories* **6**, 17.
- Cullen D, Gray GL, Wilson LJ, Hayenga KJ, Lamsa MH, Rey MW, Norton S und Berka RM (1987).** Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* **5**, 369-376.
- Curtis MD und Grossniklaus U (2003).** A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis *in planta*. *Plant Physiology* **133**, 462-469.
- Davis RH (2000).** *Neurospora: Contributions of a Model Organism*, Oxford University Press, New York.
- Davis RH und de Serres FJ (1970).** Genetic and microbial research techniques for *Neurospora crassa*. *Methodes in Enzymology* **17A**, 79-143.
- Davis RH und Perkins DD (2002).** *Neurospora*: a model of model microbes. *Nature Reviews Genetics* **3**, 7-13.
- de Groot MJA, Bundock P, Hooykaas PJJ und Beijersbergen AGM (1998).** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* **16**, 833-842.

- delCardayre SB und Raines RT (1995).** A residue to residue hydrogen bond mediates the nucleotide specificity of ribonuclease A. *Journal of Molecular Biology* **252**, 328-336.
- delCardayre SB, Ribo M, Yokel EM, Quirk DJ, Rutter WJ und Raines RT (1995).** Engineering ribonuclease A: production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln11. *Protein Engineering* **8**, 261-273.
- D'Enfert C (1996).** Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5'-decarboxylase gene, *pyrG*, as a unique transformation marker. *Current Genetics* **30**, 76-82.
- Devchand M und Gwynne DI (1991).** Expression of heterologous proteins in *Aspergillus*. *Journal of Biotechnology* **17**, 3-9.
- Devlin JJ, Devlin PE, Myambo K, Lilly MB, Rado TA und Warren K (1987).** Expression of Granulocyte Colony-Stimulation Factor by Human Cell Lines. *Journal of Leukocyte Biology* **41**, 302-306.
- Drake JW (2006).** Chaos and Order in Spontaneous Mutation. *Genetics* **173**, 1-8.
- Drucker H (1972).** Regulation of Exocellular Proteases in *Neurospora crassa*: Induction and Repression of Enzyme Synthesis. *Journal of Bacteriology* **110**, 1041-1049.
- Durand H, Clanet M und Tiraby G (1988).** Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology* **10**, 341-345.
- Ebbole D und Sachs MS (1990).** A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia. *Fungal Genetics Newsletter* **37**.
- El-Adawi H, Khan NQ und Gassen H (2000).** Overexpression of Protein Disulfide Isomerase in *Aspergillus*. *Current Microbiology* **41**, 295-299.
- Espeso EA und Arst HNJ (2000).** On the Mechanism by which Alkaline pH Prevents Expression of an Acid-Expressed Gene. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 3355-3363.
- Faus I, del Moral C, Adroer N, del Rio JL, Patino C, Sisniega H, Casas C, Blade J und Rubio V (1998).** Secretion of the sweet-tasting protein thaumatin by recombinant strains of *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Applied And Microbial Biotechnology* **49**, 393-398.
- Feinberg AP und Vogelstein B (1983).** A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **132**, 6-13.
- Fernandez-Abalos JM, Fox H, Pitt C, Wells B, und Doonan JH (1998).** Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **27**, 121-130.
- Ferreira de Souza AM und López JA (2004).** Insulin or Insulin-Like Studies on Unicellular Organism: A Review. *Brazilien Archives Of Biology And Technology* **47**, 973-981.

- Folco HD, Freitag M, Ramon A, Temporini ED, Alvarez ME, Garcia I, Scazzocchio C, Selker EU und Rosa AL (2003).** Histone H1 Is Required for Proper Regulation of Pyruvate Decarboxylase Gene Expression in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **2**, 341-350.
- Freitag M, Ciuffetti LM und Selker EU (2001).** Expression and visualization of Green Fluorescent Protein (GFP) in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter* **48**, 15-19.
- Freitag M, Hickey PC, Namboori RB, Selker EU und Read ND (2004).** GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics And Biology* **41**, 907-920.
- Freitag M und Selker EU (2005).** Expression and Visualization of Red Fluorescent Protein (RFP) in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter* **52**, 14-17.
- Furukawa K, Hasuuma K und Shinohara Y (1987).** Characterization of P<sub>i</sub>-Repressible Enzymes Secreted in Culture Media by *Neurospora crassa* Wild-Type Cells and Null-Type Mutants. *Journal of Bacteriology* **169**, 4790-4795.
- Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, Jaffe D, FitzHugh W, Ma LJ, Smirnov S, Purcell S, Rehman B, Elkins T, Engels R, Wang S, Nielsen CB, Butler J, Endrizzi M, Qui D, Ianakiev P, Bell-Petersen D, Nelson MA, Werner W, Selitrennikoff CP, Kinsey JA, Braun EL, Zelter A, Schulte U, Kothe GO, Jedd G, Mewes W, Staben C, Marcotte E, Greenberg D, Roy A, Foley K, Naylor J, Stange-Thomann N, Barret R, Gnerre S, Kamal M, Kamvysselis M, Mauceli E, Bielke C, Rudd S, Frishman D, Krystofova S, Rasmussen C, Metzberg RL, Perkins DD, Kroken S, Cogoni C, Macino G, Catcheside DE, Li W, Pratt R, Osmani SA, DeSouza CPC, Glass LN, Orbach MJ, Berglung J A, Voelker R, Yarden O, Plamann M, Seiler S, Dunlap JC, Radford A, Aramayo R, Natvig DO, Alex LA, Mannhaupt G, Ebbole DJ, Freitag M, Paulsen I, Sachs MS, Lander ES, Nusbaum C und Birren B (2003).** The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**, 859-868.
- Gerngross TU (2004).** Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology* **22**, 1409-1414.
- Gordon CL, Archer DB, Jeenes DJ, Doonan JH, Wells B, Trinci APJ und Robson GD (2000 [a]).** A glucoamylase::GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. *Journal of Microbiological Methods* **42**, 39-48.
- Gordon CL, Khalaj V, Ram AFJ, Archer DB, Brookman JL, Trinci APJ, Jeenes DJ, Doonan JH, Wells BJ, van den Hondel, CAMJJ und Robson GD (2000 [b]).** Glucoamylase::green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. *Microbiology* **146**, 415-426.
- Goto M, Ekino K und Furukawa K (1997).** Expression and functional analysis of a hyperglycosylated glucoamylase in a parental host, *Aspergillus awamori* var. *kawachi*. *Applied And Environmental Microbiology* **63**, 2940-2943.

- Gouka RJ, Gerk C, Hooykaas PJJ, Bundock P, Musters W, Verrips CT und De Groot MJA (1999).** Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nature Biotechnology* **17**, 596-601.
- Gouka RJ, Punt PJ, Hessing JG und van den Hondel CAMJJ (1996).** Analysis of heterologous protein production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1951-1957.
- Gouka RJ, Punt P und van den Hondel CAMJJ (1997).** Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**, 1-11.
- Greenfield NJ, McKenzie MA, Adebodun F, Jordan F und Lenard J (1988).** Metabolism of D-Glucose in a Wall-less Mutant of *Neurospora crassa* Examined by <sup>13</sup>C and <sup>31</sup>P Magnetic Resonances: Effects of Insulin. *Biochemistry* **27**, 8526-8533.
- Griffith DH (1994).** *Fungal physiology*, Wiley-Liss, New York.
- Grimm LH, Kelly S, Krull R und Hempel DC (2005).** Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**, 375-384.
- Grundstein M und Hogness DS (1975).** Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *PNAS* **72**, 3961-3965.
- Gustafsson C, Govindarajan S und Minshull J (2004).** Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology* **22**.
- Gwynne DI, Buxton FP, Williams SA, Garven S und Davies RW (1989).** Genetically engineered secretion of active human interferon and a bacterial endoglucanase from *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* **5**, 713-719.
- Gyamerah M, Merichetti G, Adedayo O, Scharer JM und Moo-Yung M (2002).** Bioprocessing strategies for improving hen egg-white lysozyme (HEWL) production by recombinant *Aspergillus niger* HEWL WT-13-16 *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 403-407.
- Haag JR, Lee DW und Aramayo R (2003).** A GATEWAY™ Destination Vector For High-Throughput Construction of *Neurospora crassa histidine-3* Gene Replacement Plasmids. *Fungal Genetics Newsletter* **50**, 6-8.
- Hamann T und Lange L (2006).** Discovery, cloning and heterologous expression of secreted potato proteins reveal erroneous pre-mRNA splicing in *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biotechnology in Press*.
- Hamer JE und Timberlake WE (1987).** Functional organization of the *Aspergillus nidulans trpC* promoter. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2352-2359.
- Hanson MA und Marzluff GA (1975).** Control of the Synthesis of a Single Enzyme by Multiple Regulatory Circuits in *Neurospora crassa*. *PNAS* **72**, 1240-1244.
- Heinicke E, Kumar U und Munoz DG (1992).** Quantitative dot-blot assay for proteins using enhanced chemiluminescence. *Journal of Immunological Methods* **152**, 227-236.

- Hentze MW (1991).** Determinants and regulation of cytoplasmic mRNA stability in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1090**, 281-292.
- Herrin DL und Schmidt GW (1988).** Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridisation *BioTechniques* **6**, 196-197.
- Hijarrubia MJ, Casqueiro J, Gutierrez S, Fernandez FJ und Martin JF (1997).** Characterization of the bip gene of *Aspergillus awamori* encoding a protein with an HDEL retention signal homologous to the mammalian BiP involved in polypeptide secretion. *Current Genetics* **32**, 139-146.
- Hill CP, Osslund TD und Eisenberg D (1993).** The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *PNAS* **90**, 5167-5171.
- Hoge JHC, Springer J, Zantige B und Wessels JGH (1982).** Absence of differences in polysomal RNA from vegetative monokaryotic and dikaryotic cells of the fungus *Schizophyllum commune*. *Experimental Mycology* **6**, 225-232.
- Hölker U, Höfer M und Lenz J (2004).** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**, 175-186.
- Hölker U und Lenz J (2005).** Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages. *Current Opinions in Microbiology* **8**, 301-306.
- Ikonomou L, Schneider YJ und Agathos SN (2003).** Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**, 1-20.
- Inoue I, Namiki F und Tsuge T (2002).** Plant Colonization by the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum* Requires FOW1, a Gene Encoding a Mitochondrial Protein. *Plant Cell* **14**, 1869-1883.
- Inouye S und Tsuji FI (1994).** *Aequorea* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters* **341**, 277-280.
- Ishida H, Hata Y, Kawato A, Abe Y und Kashiwagi Y (2004).** Isolation of a Novel Promotor for Efficient Protein Production in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **68**, 1849-1857.
- Isogai T, Fukagawa M, Kojo H, Kohsaka M, Aoki H und Imanaka H (1991).** Cloning and Nucleotide Sequence of the Complementary and Genomic DNAs for the Alkaline Protease from *Acremonium chrysogenum*. *Agricultural and Biological Chemistry* **55**, 471-477.
- Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heynecker HL, Bolivar F und Boyer HW (1977).** Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* **198**, 1056-1063.
- Iwashita K (2002).** Recent Studies of Protein Secretion by Filamentous Fungi. *Journal Of Bioscience And Bioengineering* **94**, 530-535.

- Jalving R, van de Vondervoort PJI, Visser J und Schaap PJ (2000).** Characterization of the Kexin-Like Maturase of *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 363-368.
- Jana S und Deb JK (2005).** Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**, 289–298.
- Jansen M, van Schaik FM, Ricker AT, Bullock B, Woods DE, Gabbay KH, Nussbaum AL, Sussanbach JS und Van den Brande JL (1983).** Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature* **306**, 609-611.
- Jeenes DJ, MacKenzie DA und Archer DB (1994).** Transcriptional and post-transcriptional events affect the production of secreted hen egg white lysozyme by *Aspergillus niger*. *Transgenic Research* **3**, 297-303.
- Jeenes DJ, MacKenzie DA, Roberts IN und Archer DB (1991).** Heterologous protein production by filamentous fungi. *Biotechnology and genetic engineering reviews* **9**, 327-367.
- Jeong KJ und Lee SY (2000).** Secretory Production of Human Leptin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **10**, 753-758.
- Johnson H, Whiteford JR, Eckert SE und Spanu PD (2003).** Production and secretion of *Aspergillus nidulans* catalase B in filamentous fungi driven by the promotor and signal peptide of *Cladosporium fulvum* hydrophobin gene *hcf-1*. *Current Genetics* **44**, 155-163.
- Joosten V, Gouka RJ, van den Hondel CAMJJ, Verrips TC und Lokman CB (2005).** Expression and production of llama variable heavy-chain antibody fragments (V<sub>HHS</sub>) by *Aspergillus awamori*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**, 384-392.
- Joosten V, Lokman C, van den Hondel CAMJJ und Punt P (2003).** The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeast and filamentous fungi. *Microbial Cell factories*.
- Kallies A, Mohsenzadeh S und Rensing L (1992).** Effects of light on protein secretion in *Neurospora crassa*. *Archives in Microbiology* **157**, 104-106.
- Kaster KR, Burgett SG, Rao RN und Ingolia TD (1983).** Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. *Nucleic Acids Research* **11**, 6895-6911.
- Kato M (2005).** An Overview of the CCAAT-Box Binding Factors in Filamentous Fungi: Assembly, Nuclear Translocation, and Transcriptional Enhancement. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **96**, 663-672.
- Kato M, Naruse F, Kobayashi T und Tsukagoshi N (2001).** No Factors Except for the Hap Complex increase the Taka-amylase A Gene Expression by Binding to the CCAAT Sequence in the Promotor Region. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **65**, 2340-2342.
- Kennedy J und Turner G (1996).**  $\delta$ -(L- $\alpha$ -Aminoapipyl)-L-cysteiny-D-valine synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Genetic and Genomics* **235**, 189-197.

- Kiepe D, Ciarmatori S, Hoeflich A, Wolf E und Tonshoff B (2005).** Differential expression of IGF system components in proliferating vs. differentiating growth plate chondrocytes: The functional role of IGFBP-5. *American Journal of Physiological and Endocrinological Metabolism* **289**.
- Kim JS und Raines RT (1993).** Bovine Seminal Ribonuclease Produced from a Synthetic Gene. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 17392-17396.
- Kinnaid JH, Burns PA und Fincham JRS (1991).** An apparent rare-codon effect on the rate of translation of a *Neurospora* gene. *Journal of Molecular Biology* **221**, 733-736.
- Kleizen B und Braakman I (2004).** Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 343-349.
- Klink TA, Woycechowsky KJ, Taylor KM und Raines RT (2002).** Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A. *European Journal of Biochemistry* **267**, 566-572.
- Koda A, Bogaki T, Minetoki T und Hirotsune M (2005).** High Expression of a Synthetic Gene Encoding Potato  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase in *Aspergillus niger*. *Journal Of Bioscience And Bioengineering* **100**, 531-537.
- Koda A, Minetoki T, Ozeki K und Hirotsune M (2004).** Translation efficiency mediated by the 5' untranslated region greatly affects protein production in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Kole HK und Lenard J (1991).** Insulin-induced stimulation of protein phosphorylation in *Neurospora crassa* cells. *FASEB* **5**, 2728-2734.
- Kole HK, Smith DR und Lenard J (1992).** Characterization and Partial Purification of an Insulinase from *Neurospora crassa*. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **297**, 199-204.
- Krasevec N, Svetina M, Gaberc-Porekar V, Menart V und Komel R (2003).** *In vivo* and *in vitro* Cleavage of Glucoamylase-TNF $\alpha$  Fusion Protein Secreted from *Aspergillus niger*. *Food Technology and Biotechnology* **41**, 345-351.
- Krasevec N, van den Hondel CAMJJ und Komel R (2000).** Expression of human lymphotoxin  $\alpha$  in *Aspergillus niger*. *Pflügers Archive - European Journal of Physiology* **440**, R83-R85.
- Kruszewska JS (1999).** Heterologous expression of genes in filamentous fungi. *Acta Biochimica Polonica* **46**, 181-195.
- Lämmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lampkin SLI, Cole KW, Vitto A und Gaertner FH (1976).** The Protease Problem in *Neurospora*. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **177**, 561-565.
- Landy A (1989).** Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Reviews in Biochemistry* **58**, 913-949.

- Lasnik MA, Porekar VG und Stale A (2001).** Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) expressed by the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Pflügers Archive - European Journal of Physiology* **442** [Suppl 1], R184-186.
- Le Roith D und Butler AA (1999).** Insulin-like Growth Factors in Pediatric Health and Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology und Metabolism* **84**, 4355-4361.
- Lee IH, Walline RG und Plamann M (1998).** Apolar growth of *Neurospora crassa* leads to increased protein secretion of extracellular protein. *Molecular Microbiology* **29**, 209-218.
- Legerton TL und Yanofsky C (1985).** Cloning and characterization of the multifunctional *his-3* gene of *Neurospora crassa*. *Gene* **39**, 129-140.
- Lenard J (1992).** Mammalian hormones in microbial cells. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 147-150.
- Levasseur A, Navarro D, Punt P, Belaich JP, Asther M und Record E (2005).** Construction of Engineered Bifunctional Enzymes and Their Overproduction in *Aspergillus niger* for Improved Enzymatic Tools To Degrade Agricultural By-Products. *Applied And Environmental Microbiology* **71**, 8132-8140.
- Lin WL, Feldberg PJ und Clark EBD (1993).** Kinetics of cell growth and heterologous glucoamylase production in recombinant *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology and Bioengineering* **41**, 273-279.
- Lindberg RA und Drucker H (1984).** Characterization and Comparison of a *Neurospora crassa* RNase Purified from Cultures Undergoing Each of Three Different States of Derepression. *Journal of Bacteriology* **157**, 375-379.
- Lindberg RA, Eirich LD, Price JS, Wolfenbarger L und Drucker H (1981).** Alkaline protease from *Neurospora crassa*. Purification and partial characterization. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 811-814.
- Lindberg RA, Rhodes WG, Eirich LD und Drucker H (1982).** Extracellular Acid Proteases from *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **150**, 1103-1108.
- Litzka O, Bergh KT, den Brulle JV, Steidl S und Brakhage AA (1999).** Transcriptional control of expression of fungal  $\beta$ -lactam biosynthesis genes. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**, 95-105.
- Liu L, Liu J, Qiu RX, Zhu XG, Dong ZY und Tang GM (2002).** Improving heterologous gene expression in *Aspergillus niger* by introducing multiple copies of protein-binding sequence containing CCAAT to the promoter. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 358-361.
- Lombraña M, Moralejo FJ, Pinto R und Martin JF (2004).** Modulation of *Aspergillus awamori* Thaumatin Secretion by Modification of *bipA* Gene Expression. *Applied And Environmental Microbiology* **70**, 5145-5152.
- Lora JM, De la Cruz J, Llobell A, Benitez T und Pitor-Toro JA (1995).** Molecular characterization and heterologous expression of an endo- $\beta$ -1,6-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzanium*. *Molecular Genome and Genetics* **247**, 639-645.

- Lu HS, Clogston CL, Narhi LO, Merewether LA, Pearl WR und Boone TC (1992).** Folding and oxidation of natural and recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 8770-8777.
- Lubertozzi D und Keasling JD (2006).** Marker and promotor effects on heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Machida M, Chang YC., Manabe M, Kunihiro S und Jigami Y (1996).** Molecular cloning of a cDNA encoding enolase from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics* **30**, 423-431.
- MacKenzie DA, Gendron LCG, Jeenes DJ und Archer DB (1994).** Physiological optimization of secreted protein production by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 276-280.
- Mala JGS, Kamini NR und Puvanakrishnan R (2001).** Strain improvement of *Aspergillus niger* for enhanced lipase production. *The Journal of General and Applied Microbiology* **47**, 181-186.
- Mander GJ, Wang H, Bodie E, Wagner J, Vienken K, Vinuesa C, Foster C, Leeder AC, Allen G, Hamill V, Janssen GG, Dunn-Coleman N, Karos M, Lemaire HG, Subkowski T, Bollschweiler C, Turner G, Nusslein B und Fischer R (2006).** Use of laccase as a novel, versatile reporter system in filamentous fungi. *Applied And Environmental Microbiology* **72**, 5020-5026.
- Mannhaupt G, Montrone C, Haase D, Mewes WH, Aign V, Hoheisel JD, Fartmann B, Nyakatura G, Kempken F, Maier J und Schulte U (2003).** What's in the genome of a filamentous fungus? Analysis of the *Neurospora* genome sequence. *Nucleic Acids Research* **31**, 1944-1954.
- Maras M, van Die I, Contreras R und van den Hondel CAMJJ (1999).** Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycoconjugate Journal* **16**, 99-107.
- Margolin BS, Freitag M und Selker EU (1997).** Improved plasmids for gene targeting at the *his-3* locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genetics Newsletter* **44**.
- Markert Y, Koditz J, Mansfeld J, Arnold U und Ulbrich-Hofmann R (2001).** Increased proteolytic resistance of ribonuclease A by protein engineering. *Protein Eng.* **14**, 791-796.
- Martin JA, Murphy RA und Power RFG (2003).** Cloning and expression of fungal phytases in genetically modified strains of *Aspergillus awamori*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **30**, 568-576.
- Masai K, Maruyama J, Kazutoschi S, Nakijama H, Akita O und Kitamoto K (2006).** Square-plate culture method allows detection of differential gene expression and screening of novel, region-specific genes in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

- Masai K, Maruyama JI, Nakijama H und Kitamoto K (2004).** Effects of Protein Transport Inhibitors on the Distribution and Secretion of the Fusion Protein RntA-EGFP in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **68**, 1569-1573.
- Mattern IE, Noort JM, Berg P, Archer DB, Roberts IN. und van den Hondel CAMJJ (1992).** Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Molecular Genetics and Genomics* **234**, 332-336.
- McClintock B (1945).** *Neurospora*. 1. Preliminary observations on the chromosomes of *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany* **32**, 671-678.
- McNally MT und Free SJ (1988).** Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene. *Current Genetics* **14**, 545-551.
- Mercker M (2006).** Funktionsanalyse des *bem46*-Homologs bei *Neurospora crassa*. Diplom-Arbeit, Christian-Albrechts-Universität.
- Metzenberg RL (1991).** The impact of molecular biology on mycology. *Mycological Research* **95**, 9-13.
- Michielse CB, Hooykaas PJJ, van den Hondel CAMJJ und Ram AFJ (2005).** *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics* **48**, 1-17.
- Michielse CB, Ram AFJ, Hooykaas PJJ und Van den Hondel CAMJJ (2004).** *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori* in the absence of full length VirD2, VirC2 or VirE2 leads to insertion of aberrant T-DNA structures. *Journal of Bacteriology* **186**, 2038-2045.
- Mikosch TS, Lavrijssen B, Sonnenberg AS und van Griensven LJ (2001).** Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Genetics* **39**, 35-39.
- Mishra NC (1977).** Genetics and biochemistry of morphogenesis in *Neurospora*. *Advances in Genetic* **19**, 341-405.
- Moralejo FJ, Cardoza RE, Gutierrez S, Sisniega H, Faus I und Martin JF (2000).** Overexpression and lack of degradation of thaumatin in an aspergillopepsin A-defective mutant of *Aspergillus awamori* containing an insertion in the *pepA* gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**, 772-777.
- Morita S, Kuriyama M, Nakatsu M und Kitano K (1994).** High level expression of *Fusarium* alkaline protease gene in *Armonium chrysogenum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **58**, 627-630.
- Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H und Yamazaki T (1986).** Molecular cloning and expression of two cDNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* **319**, 415-418.
- Nakajima K, Asakura T, Maruyama J, Morita Y, Oike H, Shimizu-Ibuka A, Misaka T, Sorimachi H, Arai S, Kitamoto K und Abe K (2006).** Extracellular Production of Neoculin, a Sweet-Tasting Heterodimeric Protein with Taste-Modifying Activity, by *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 3716-3723.

- Nakamura Y, Gojobori T und Ikemura T (2000).** Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research* **28**, 292-293.
- Nakano ET, Fox RD, Clements DE, Koo K, Stuart DW und Ivy JM (1993).** Expression vectors for *Neurospora crassa* and expression of a bovine preprochymosin cDNA. *Fungal Genetics Newsletter* **40**, 54-56.
- Nelson G, Kozlova-Zwinderman O, Collis AJ, Knight MR, Fincham JRS, Stanger CP, Renwick A, Hessing JGM, Punt P, van den Hondel CAMJJ und Read ND (2004).** Calcium measurement in living filamentous fungi expressing codon-optimized aequorin. *Molecular Microbiology* **52**, 1437-1450.
- Nevalainen HKM, Te'o VSJ und Bergquist PL (2005).** Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology* **23**, 468-474.
- Ngiam C, Jeenes DJ, Punt P, van den Hondel CAMJJ und Archer DB (2000).** Characterization of a foldase, protein disulfide isomerase A, in the protein secretion pathway of *Aspergillus niger*. *Applied And Environmental Microbiology* **66**, 775-782.
- Nyssonen E und Keränen S (1995).** Multiple roles of the cellulase CBHI in enhancing production of fusion antibodies by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Current Genetics* **28**, 71-79.
- Oda K, Kakizono D, Yamada O, Lefuji H, Akita O und Iwashita K (2006).** Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 3448-3457.
- O'Donnell D, Wang L, Xua J, Ridgeway D, Gua T und Moo-Yung M (2001).** Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. *Biochemical Engineering Journal* **8**, 187-193.
- Orbach MJ, Sachs MS und Yanofsky C (1990).** The *Neurospora crassa arg-2* Locus. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 10981-10987.
- Orbach MJ, Schneider WP und Yanofsky C (1988).** Cloning of methylated transforming DNA from *Neurospora crassa* in *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 1469-1473.
- Orndorff SA, Costantino N, Stewart D und Durham DR (1988).** Strain Improvement of *Rhodotorula graminis* for Production of a Novel L-Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 996-1002.
- Pakula TM, Uusitalo J, Saloheimo M, Salonen K, Aarts RJ und Penttila M (2000).** Monitoring the kinetics of glycoprotein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*: cellobiohydrolase I (CBHI) as a model protein. *Microbiology* **146**, 223-232.
- Papagianni M, Matthey M und Kristiansen B (1998).** Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* **2**, 197-205.

- Parekh S, Vinci VA und Strobel RJ (2000).** Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**, 287-301.
- Payen A (1843).** *Extrait d'un rapport adressé à M. le Maréchal Duc Dalmatic, Ministre de la Guerre, Président du Conseil, sur une altération extraordinaire du pain munitcion.* *Annals de Chimique et Pyhsique*, (Payen, A., Ed.), 9.
- Perkins DD und Davis RH (2002).** *Neurospora* Chronology - 1843-2002. *Fungal Genetics Newsletter* **49**, 4-8.
- Perkins DD und Davis RH (2000).** *Neurospora* at the Millenium. *Fungal Genetics and Biology* **31**, 153-167.
- Perkins DD und Turner BC (1988).** *Neurospora* from natural populations: Toward the population biology of a haploid eukaryote. *Experimental Mycology* **12**, 91-121.
- Perlinska-Lenart U, Kurzatkowski W, Janas P, Kopinska A, Palamarczyk G und Kruszewska JS (2005).** Protein production and secretion in an *Aspergillus nidulans* mutant impaired in glycosylation. *Acta Biochimica Polonica* **52**, 195-205.
- Plüddemann A und van Zyl WH (2003).** Evaluation of *Aspergillus niger* as host for virus-like particle production, using the hepatitis B surface antigen as a model. *Current Genetics* **43**, 439-446.
- Prathumpai W, Flitter SJ, McIntyre MA und Nielsen J (2004).** Lipase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**, 714-719.
- Punt P, Dingemans MA, Kuyvenhoven A, Soede RDM, Pouwels PH und van den Hondel CAMJJ (1990).** Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* **93**, 101-109.
- Punt P, Zegers ND, Busscher M, Pouwels PH und van den Hondel CAMJJ (2002).** Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology* **20**, 200-206.
- Punt P, Drint-Kuijvenhoven A, Lokman BC, Spencer JA, Jeenes DJ, Archer DB und van den Hondel CAMJJ (2003).** The role of the *Aspergillus niger* furin-type protease gene in processing of fungal proproteins and fusion proteins Evidence for alternative processing of recombinant (fusion-) proteins. *Journal of Biotechnology* **106**, 23-32.
- Punt P, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J und van den Hondel CAMJJ (2000).** Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology* **20**, 200-206.
- Punt PJ, Veldhuisen G und van den Hondel CAMJJ (1994).** Protein targeting and secretion in filamentous fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* **65**, 211-216.
- Radzio R und Kück U (1997).** Synthesis of biotechnologically relevant heterologous proteins in filamentous fungi. *Process Biochemistry* **32**, 529-539.

- Radzio R und Kück U (1997).** Efficient synthesis of the blood-coagulation inhibitor hirudin in the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **48**, 58-65.
- Raju N (1980).** Meiosis and ascospore genetics in *Neurospora* *European Journal of Cell Biology* **23**, 208-223.
- Rasmussen-Wilson SJ, Palas JS, Wolf VJ, Taft CS und Selitrennikoff CP (1997).** Expression of a Plant Protein by *Neurospora crassa*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3488-3493.
- Ravandi F (2006).** Role of cytokines in the treatment of acute leukemias: a review. *Leukemia*, 1-6.
- Record E, Punt P, Chamkha M, Labat M, van den Hondel CAMJJ und Asther M (2002).** Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *European Journal of Biochemistry* **269**, 602-609.
- Rhodes WG, Lindberg RA und Drucker H (1983).** Purification and characterization of an extracellular acid protease from *Neurospora crassa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **223**, 514-520.
- Richards FM und Vithayathil PJ (1959).** The preparation of subtilisin-modified ribonuclease and the separation of the peptide and protein components. *Journal of Biological Chemistry* **234**, 1459-1465.
- Roberts, IN, Jeenes DJ, MacKenzie DA, Wilkinson AP, Sumner IG und Archer DB (1992).** Heterologous gene expression in *A. niger*: a glucoamylase-porcine pancreatic phospholipase A2 fusion protein is secreted and processed to yield mature enzyme. *Gene* **122**, 155-161.
- Roberts IN, Oliver RP, Punt P und van den Hondel CAMJJ (1989).** Expression of the *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase gene in industrial and phytopathogenic filamentous fungi. *Current Genetics* **15**, 177-180.
- Roodveldt C, Aharoni A und Tawfik DS (2005).** Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 50-56.
- Rotwein P, Yokoyama S, Didier DK und Chirgwin JM (1986).** Genetic analysis of the hypervariable region flanking the human insulin gene. *American Journal of Human Genetics* **39**, 291-299.
- Rowlands RT (1984).** Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme and Microbial Technology* **6**, 3-10.
- Ruiz-Diez B (2002).** Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 189-195.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

- Salinovic O und Monteralo RC (1986).** Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **156**, 341-347.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989).** *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press New York.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**, 5463-5467.
- Schmidt FH (2004).** Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**, 363-372.
- Selker E (1990).** Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annual Reviews in Genetic* **24**, 579-613.
- Shear CL und Dodge BO (1927).** Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group. *Journal of Agricultural Research* **34**, 1019-1042.
- Sims AH, Gent ME, Lanthaler K, Dunn-Coleman NS, Oliver SG und Robson GD (2005).** Transcriptome Analysis of Recombinant Protein Secretion by *Aspergillus nidulans* and the Unfolded-Protein Response In Vivo. *Applied And Environmental Microbiology* **71**, 2737-2747.
- Sinnemann SJ, Andr sson  S, Brown DW und Miao VPW (2000).** Cloning and heterologous expression of *Solorina crocea pyrG*. *Current Genetics* **37**, 333-338.
- Solscheid B und Tropschug M (2000).** A novel type of FKBP in the secretory pathway of *Neurospora crassa*. *FEBS Letters* **480**, 118-122.
- Southern EM (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-507.
- Springer ML (1993).** Genetic Control of Fungal Differentiation: The Three Sporulation Pathways of *Neurospora crassa*. *BioEssays* **15**, 365-374.
- Staben C, Jensen B, Singer M, Kinsey JA und Selker EU (1989).** Use of bacterial Hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genetics Newsletter* **36**, 79-81.
- Svetina M, Kraseve  N, Gaberc-Porekar V und Komel R (2000).** Expression of catalytic subunit of bovine enterokinase in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology* **76**, 245-251.
- Tada S, Gomi K, Kitamoto K, Takahashi K, Tamura G und Hara S (1991).** Construction of a fusion gene comprising the Taka-amylase A promoter and the *Escherichia coli*  $\beta$ -Glucuronidase gene and analysis of its expression in *Aspergillus oryzae*. *Molecular Genome and Genetics* **229**, 301-306.
- Takahashi K (1988).** The Amino Acid Sequence of Ribonuclease N<sub>1</sub>, a Guanine-Specific Ribonuclease from the Fungus *Neurospora crassa*. *Journal of Biochemistry* **104**, 375-382.

- Talabardon M und Yang ST (2005).** Production of GFP and Glucoamylase by Recombinant *Aspergillus niger*: Effects of Fermentation Conditions on Fungal Morphology and Protein Secretion. *Biotechnological Progress* **21**, 1389-1400.
- Tarragona-Fiol A, Taylorson CJ, Mard JM und Rabin BR (1992).** Production of mature bovine pancreatic ribonuclease in *Escherichia coli*. *Gene* **118**, 239-245.
- te Biesebeke R, Record E, van Biezen N, Heerikhuisen M, Franken A, Punt P und van den Hondel CAMJJ (2005 [a]).** Branching mutants of *Aspergillus oryzae* with improved amylase and protease production on solid substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**, 44-50.
- te Biesebeke R, van Biezen N, de Vos WM, van den Hondel CAMJJ und Punt P (2005 [b]).** Different control mechanisms regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state und submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**, 75-82.
- te Bieseke R, Levin A, Sagt C, Bartels J, Goosen T, Ram AFJ, van den Hondel CAMJJ und Punt P (2005 [c]).** Identification of growth phenotype-related genes in *Aspergillus oryzae* by heterologous macroarray and suppression subtractive hybridisation. *Molecular Genome and Genetics* **273**, 33-42.
- Temporini ED, Alvarez ME, Mautino MR, Folco HD und Rosa AL (2004).** The *Neurospora crassa cfp* promotor drives a carbon source-dependent expression of transgenes in filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 1256-1264.
- Thomas GH, Connerton IF und Fincham JRS (1988).** Molecular cloning, identification and transcriptional analysis of genes involved in acetate utilization in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* **2**, 599-606.
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Penalva MA und Arst HNJ (1995).** The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal* **14**, 779-790.
- Tinsley JH, Lee LH, Minke PF und Plamann M (1998).** Analysis of actin and actin-related protein 3 (ARP3) gene expressio following induction of hyphal tip formation and apolar growth in *Neurospora*. *Molecular Genome and Genetics* **259**, 601-609.
- Toda T, Sano M, Honda M, Rimoldi OJ, Yang Y, Yamamoto M, Takase K, Hirozumi K, Kitamoto K, Minetoki T, Gomi K und Machida M (2001).** Deletion analysis of the enolase gene (*enoA*) promotor from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics* **40**.
- Toews MW, Warmbold J, Konzack S, Rischitor P, Veith D, Vienken K, Vinuesa C, Wei H und Fischer R (2004).** Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination *in vitro* (GATEWAY). *Current genetics*.
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS und Walter P (2000).** Functional and genomic analysis reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 248-258.

- Tsuboi H, Koda A, Toda T, Minetoki T, Hirotsune M und Machida M (2005).** Improvement of the *Aspergillus oryzae* Enolase Promotor (P-*enoA*) by the Introduction of cis-Element Repeats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **69**, 206-208.
- Umezawa SI (1982).** Low-molecular weight enzyme inhibitors of molecular origin. *Annual Reviews in Microbiology* **36**, 75-99.
- Unkles SE, Campbell E, de Ruiter-Jacobs YMJT, Broekhuijsen M, Marco JA, Carrez D, Contreras R, van den Hondel CAMJJ und Kinghorn JR (1989).** The development of a homologous transformation system for *Aspergillus oryzae* based on the nitrate assimilation pathway: A convenient and general selection system for filamentous fungal transformation. *Molecular Genome and Genetics* **218**, 99-104.
- Valkonen M, Ward M, Wang H, Penttila M und Saloheimo M (2003).** Improvement of Foreign-Protein Production in *Aspergillus niger* var. *awamori* by Constitutive Induction of the Unfolded-Protein Response. *Applied And Environmental Microbiology* **69**, 6979-6986.
- van den Brink HM, Petersen SG, Rahbek-Nielsen H, Hellmuth K und Harboe M (2006).** Increased production of chymosin by glycosylation. *Journal of Biotechnology* In Press.
- van den Hombergh JPTW, Fraissinet-Tachet L, Van de Vondervoort PJI und Visser J (1997 [a]).** Production of the homologous pectin lyase B protein in six genetically defined protease-deficient *Aspergillus niger* mutant strains. *Current Genetics* **32**, 73-81.
- van den Hombergh JPTW, Van de Vondervoort PJI, Fraissinet-Tachet L und Visser J (1997 [b]).** *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends in Biotechnology* **15**, 256-263.
- van den Hondel, CAMJJ, Punt P und Gorcom RFM (1992).** Production of extracellular proteins by the filamentous fungus *Aspergillus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **61**, 153-160.
- van den Hondel CAMJJ, Punt P und van Gorcom RFM (1991).** *Heterologous Gene Expression in Filamentous Fungi*. More Gene Manipulations In Fungi (Bennett, J. W. und Lasure, L. L., Eds.), Academic Press, San Diego.
- van Gemenen IA, Beijersbergen A, Musters W, Gouka RJ, van den Hondel CAMJJ und Verrips CT (1996).** The effect of pre- and pro-sequences and multicopy integration on heterologous expression of the *Fusarium solani pisi* cutinase gene in *Aspergillus awamori*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **45**, 755-763.
- van Hartingsveldt W, van den Hondel CAMJJ, Venestra AE und van den Berg JA (1990).** Gene replacement as a tool for the construction of *Aspergillus* strains. *European Patent Application. EP 0357127*.
- Verdoes JC, Punt P und van den Hondel CAMJJ (1995).** Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by Filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**, 195-205.

- Vinck A, Terlouw M, Pestman WR, Martens EP, Ram AFJ, van den Hondel CAMJJ und Wösten HAB (2005).** Hyphal differentiation in the exploring mycelium of *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology* **58**, 693-699.
- Wang GY und Keasling JD (2002).** Amplification of HMG-CoA reductase enhances carotenoid accumulation in *Neurospora crassa*. *Metabolic Engineering* **4**, 193-201.
- Ward M, Wilson LJ und Kodama KH (1993).** Use of *Aspergillus* overproducing mutants, cured for integrated plasmid, to overproduce heterologous proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* **39**, 738-743.
- Ward M, Lin C, Victoria DC, Fox BP, Fox JA, Wong DL, Meerman HJ, Pucci JP, Fong RB, Heng MH, Tsurushita N, Gieswein C, Park M und Wang H (2004).** Characterization of Humanized Antibodies Secreted by *Aspergillus niger*. *Applied And Environmental Microbiology* **70**, 2567-2576.
- Ward PP, Piddington CS, Cunningham GA, Zhou X, Wyatt RD und Conneely OM (1995).** A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Biotechnology* **13**.
- Weenink XO, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ und Ram AFJ (2006).** A new method for screening and isolation of hypersecretion mutants in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**, 711-717.
- Wegman MA, Janssen MHA, van Rantwijk F und Sheldon RA (2001).** Towards Biocatalytic Synthesis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Advanced Synthesis and Catalysis* **343**, 559-576.
- Weiland N (2005).** Identifizierung und funktionelle Analyse von Promotoren für die heterologe Genexpression in Ascomyceten. Diplom-Arbeit, Christian-Albrechts-Universität.
- Wessel D und Flügge UI (1984).** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* **138**, 141-143.
- Wilkinson B und Gilbert HP (2004).** Protein disulfide isomerases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1699**, 35-44.
- Windhofer F, Catchside DEA und Kempken F (2000).** Methylation of the foreign transposon *Restless* in vegetative mycelia of *Neurospora crassa*. *Current genetics* **37**, 194-199.
- Wösten HAB, Moukha SM, Sietsma JH und Wessels JGH (1991).** Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology* **137**, 2017-2023.
- Xu J und Gong ZZ (2003).** Intron-requirement for AFP gene expression in *Trichoderma viride*. *Microbiology*, 3093-3097.
- Xu J, Wang L, Ridgway D, Gu T und Moo-Young M (2000).** Increased Heterologous Protein Production in *Aspergillus niger* Fermentation through Extracellular Proteases Inhibition by Pelleted Growth. *Biotechnological Progress* **16**, 222-227.

- Yeadon J, Bowring F und Catcheside DEA (2004).** Alleles of the Hotspot *cog* Are Codominant in Effect on Recombination in the *his-3* Region of *Neurospora*. *Genetics* **167**, 1143-1153.
- Yeadon PJ, Bowring FJ und Catcheside DEA (2004).** Sequence heterology and gene conversion at *his-3* of *Neurospora crassa*. *Current Genetics* **45** 289-301.
- Yeadon PJ und Catcheside DEA (1996).** Quick Method for producing template for PCR from *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter* **43**, 71.
- Yeadon PJ und Catcheside DEA (1995).** The chromosomal region which includes the recombinator *cog* in *Neurospora crassa* is highly polymorphic. *Current Genetics* **28**, 155-163.
- Yeadon PJ, Rasmussen JP und Catcheside DEA (2001).** Recombination Events in *Neurospora crassa* May Cross a Translocation Breakpoint by a Template-Switching Mechanism. *Genetics* **159**, 571-579.
- Yelton MM, Hamer JE, de Souza ER, Mullaney EJ und Timberlake WE (1983).** Developmental regulation of the *Aspergillus nidulans trpC* gene. *PNAS* **80**, 7576-7580.
- Yelton MM, Hamer JE und Timberlake WE (1984).** Transformation of *Aspergillus nidulans* by Using a *trpC* Plasmid. *PNAS* **81**, 1470-1474.
- Zadra I, Abt B, Parson W und Haas H. (2000).** *xyIP*-Promotor-Based Expression System and Its Use for Antisense Downregulation of the *Penicillium chrysogenum* Nitrogen Regulator NNRE. *Applied And Environmental Microbiology* **66**, 4810-4816.

# 7. Anhang

## 7.1 Vektorkarten

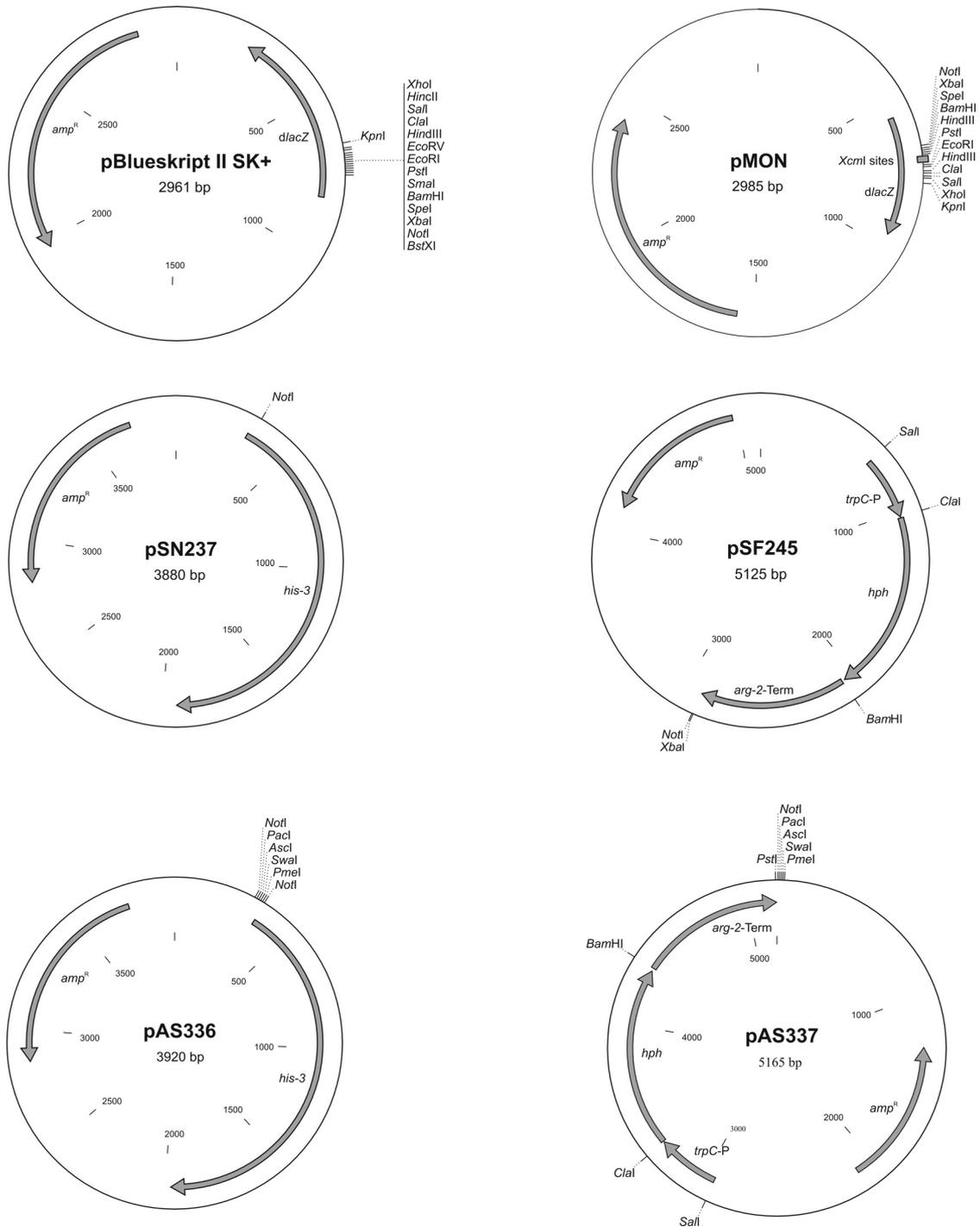


Abbildung 32: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren

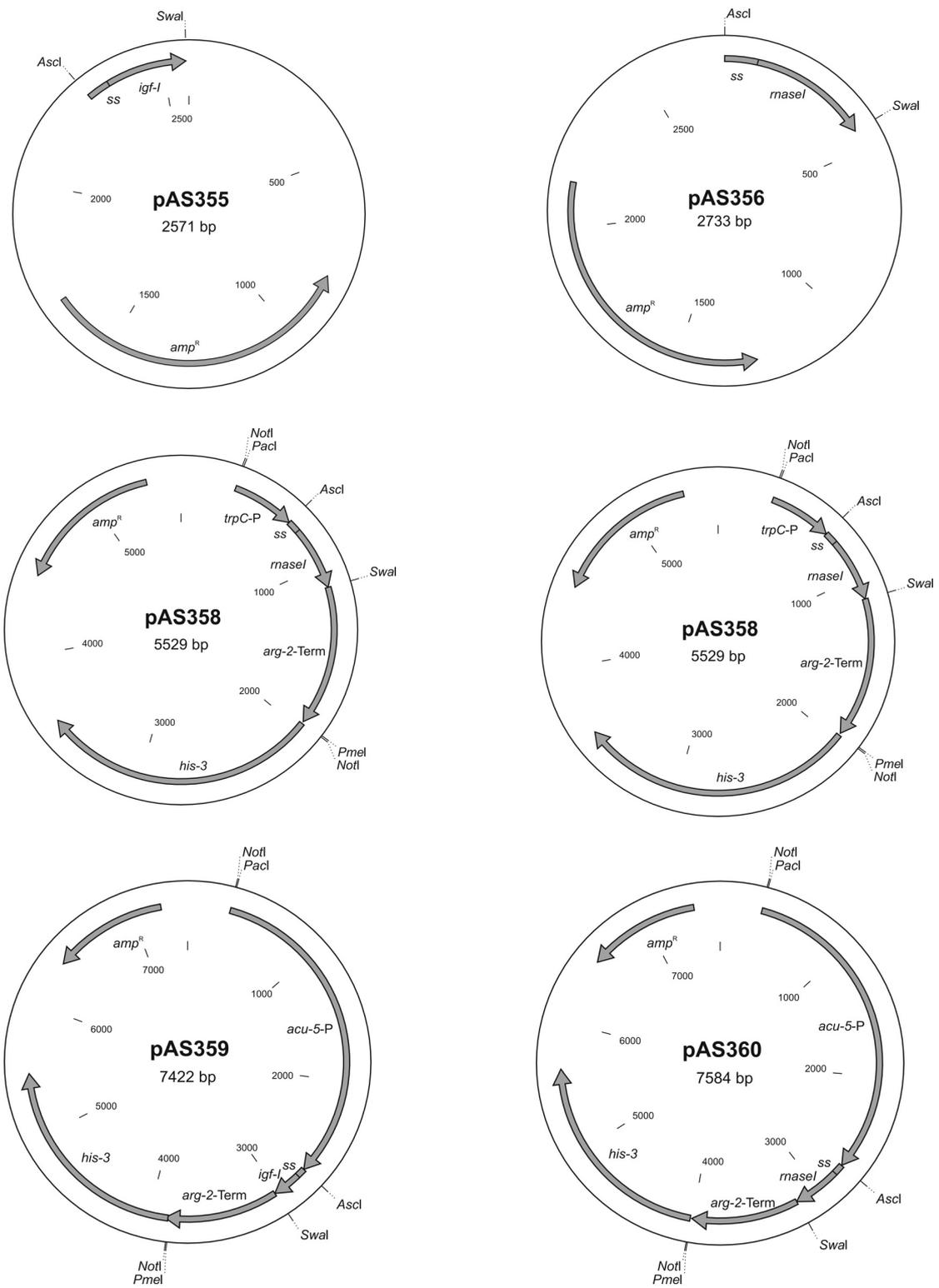


Abbildung 33: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren

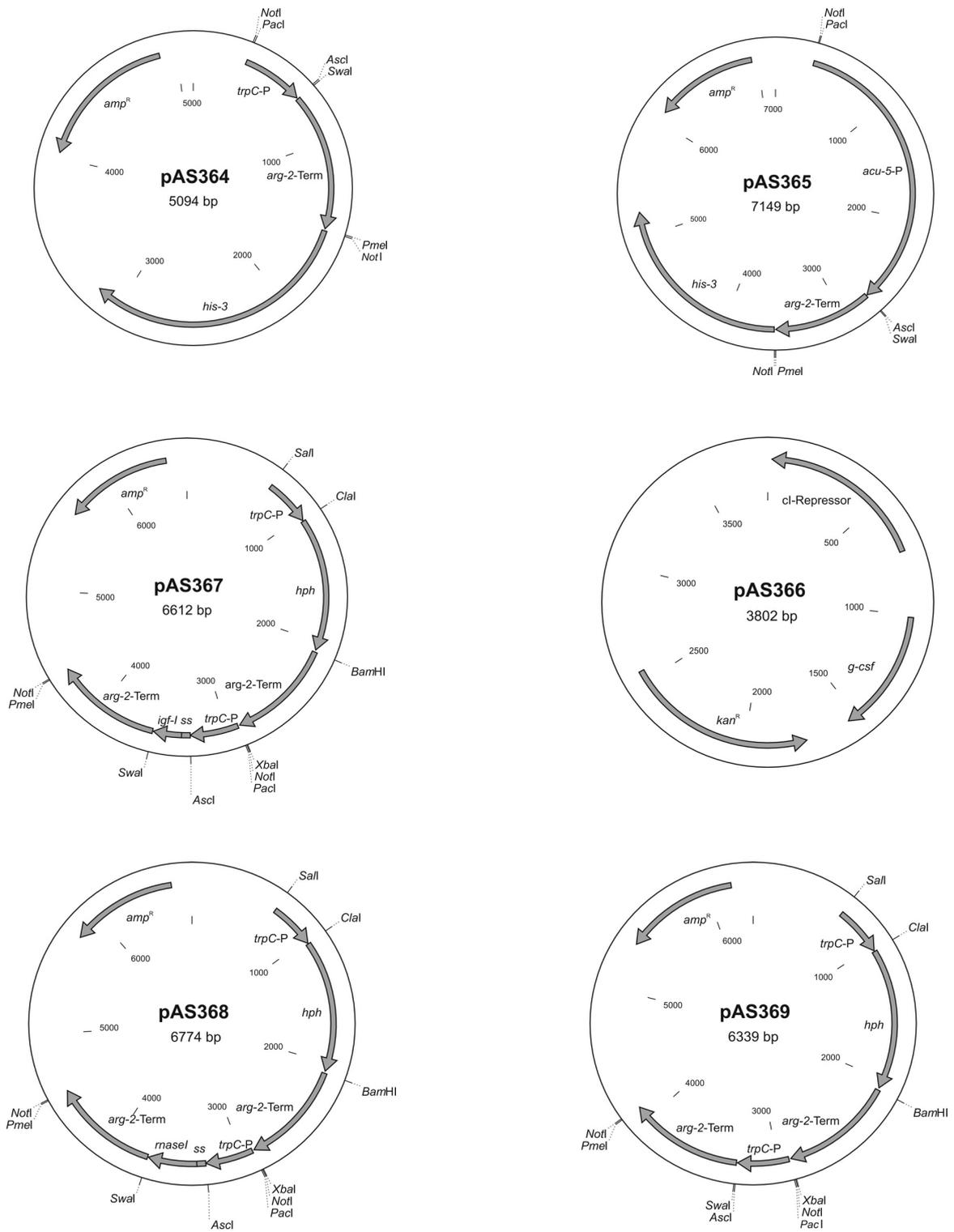


Abbildung 34: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren

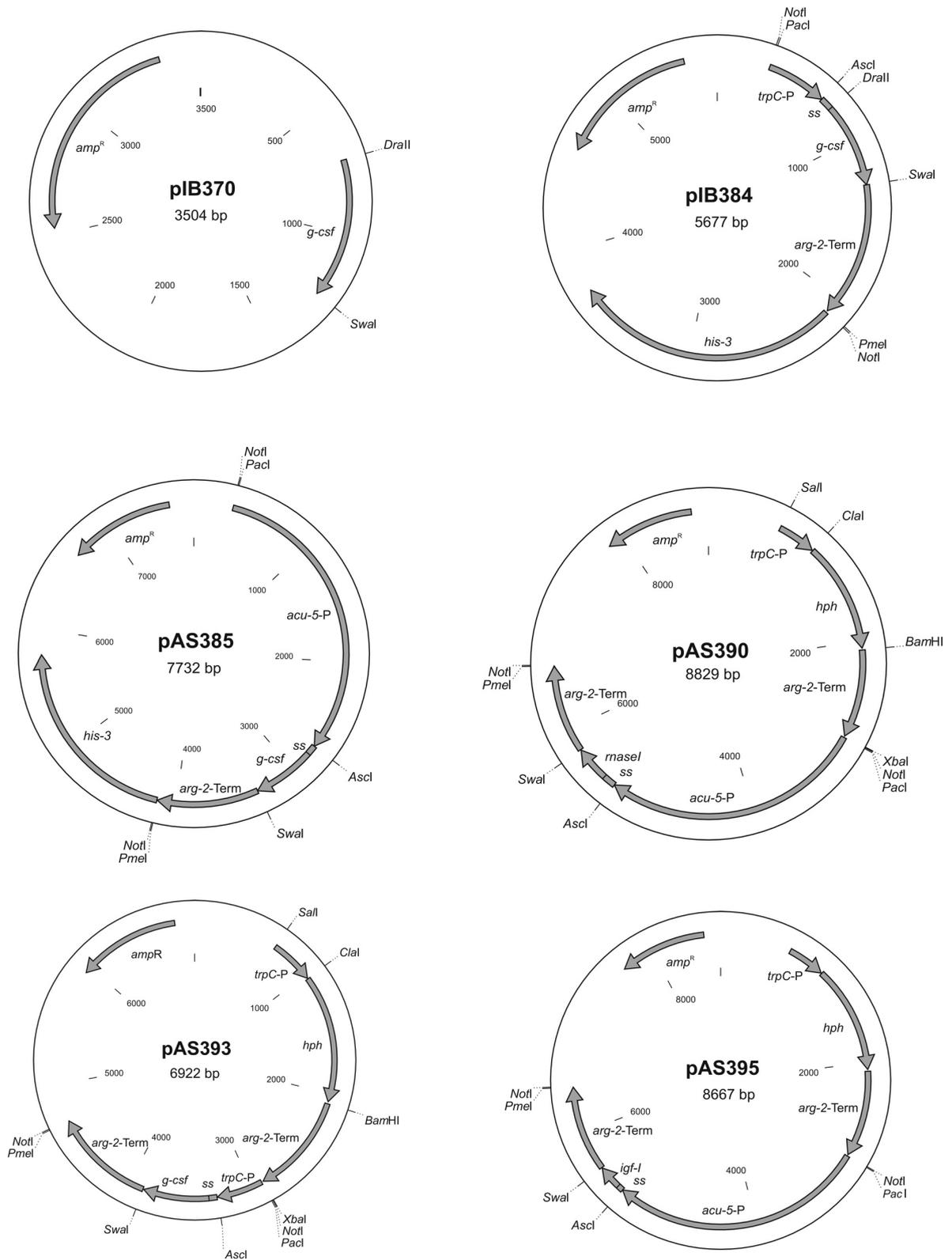


Abbildung 35: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren

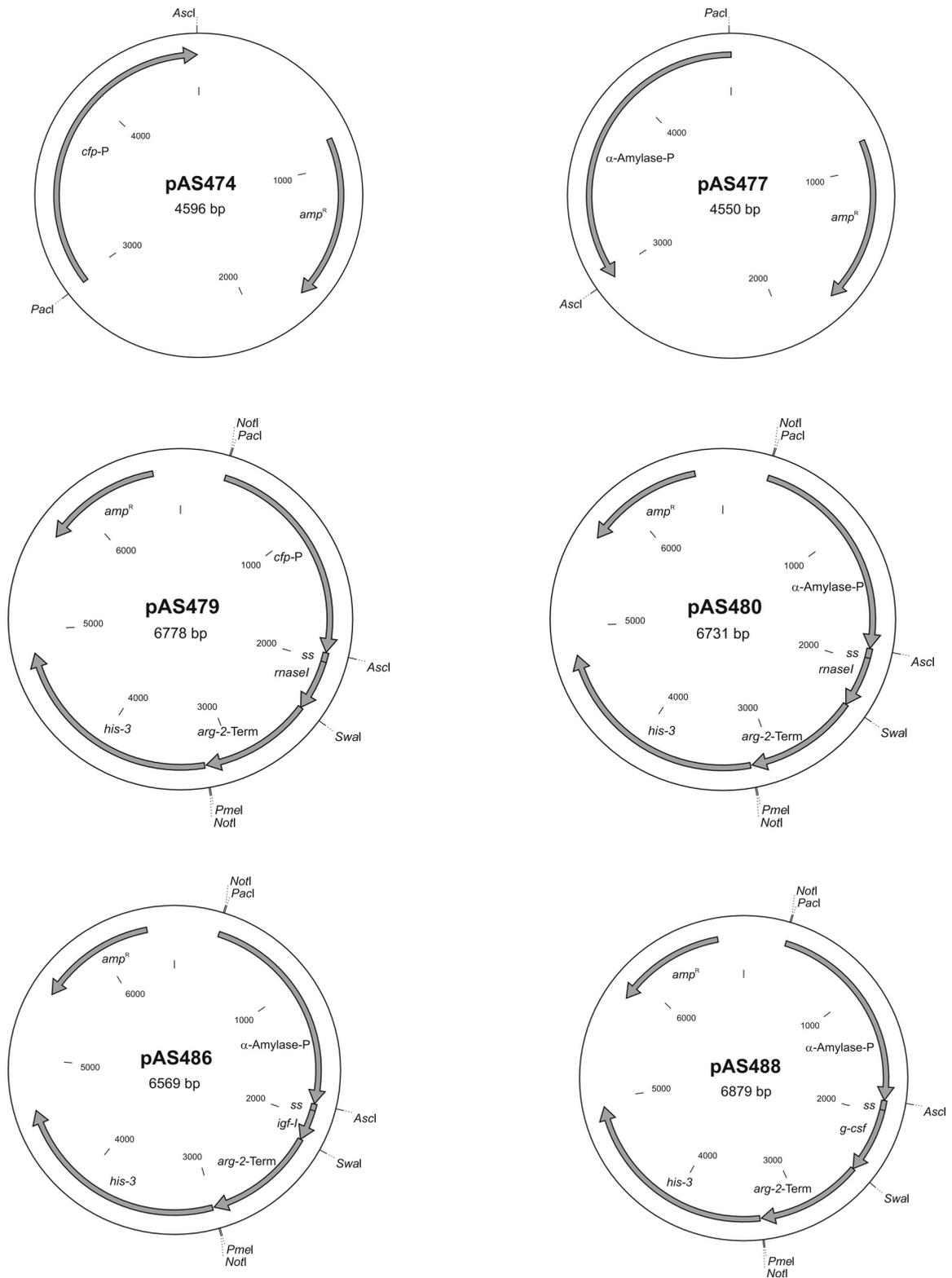


Abbildung 36: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren

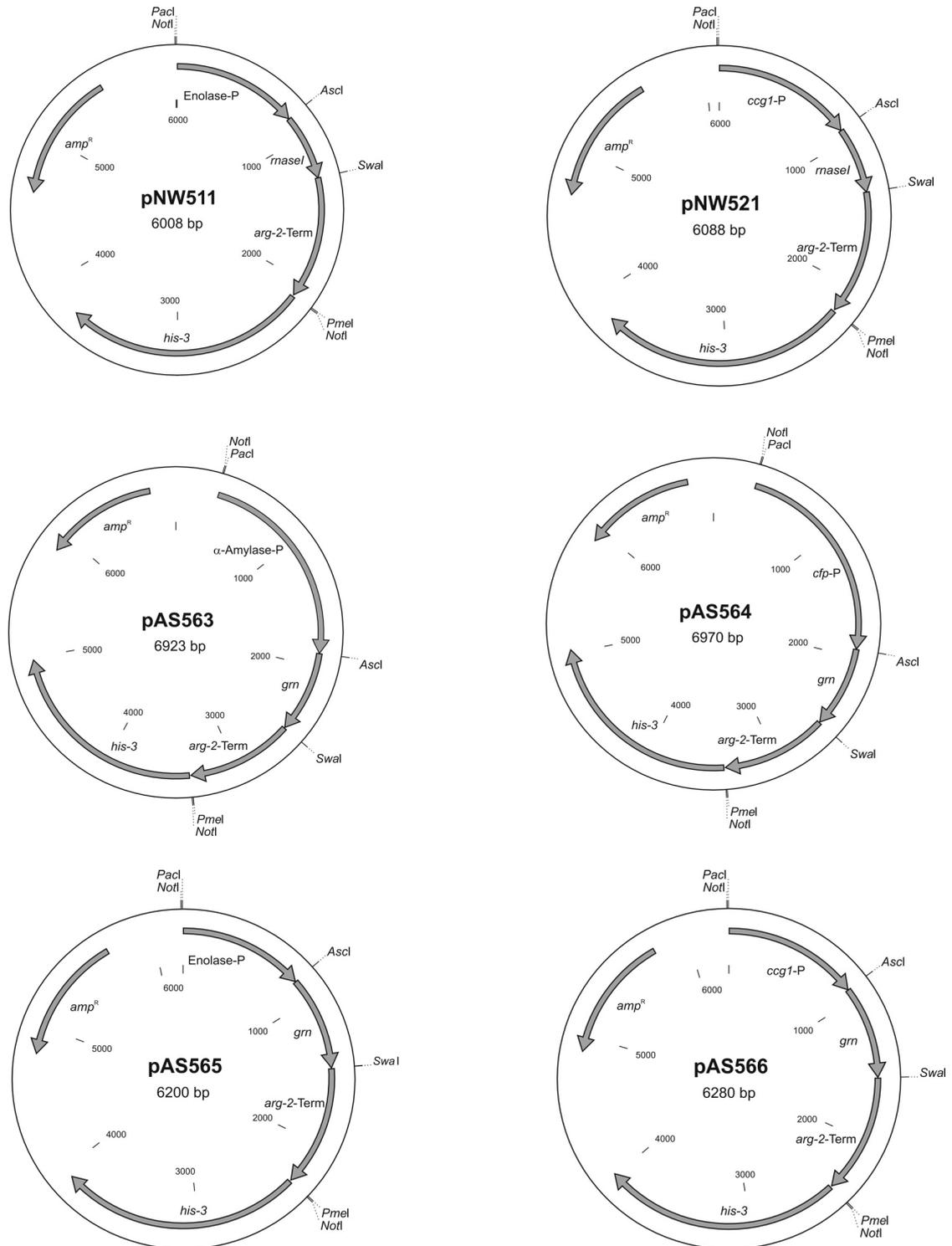


Abbildung 37: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren

## 7.2 Sequenzen der verwendeten Gene, Promotoren und Terminatoren

### Sequenz des *Insulin-like Growth-Factors-I (IGF-I)*

```

1  ATG GTC ACC CTC CGC CGC CTC GCC GTC CTC CTC GGC GCC ATC CCC GCC GCC CTC GCC
1  Met Val Thr Leu Arg Arg Leu Ala Val Leu Leu Gly Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala

58  GCC GGC CCC GAG ACC CTC TGC GGC GCC GAG CTC GTC GAC GCC CTC CAG TTC GTC TGC
20  Ala Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys

115 GGC GAC CGC GGC TTC TAC TTC AAC AAG CCC ACC GGC TAC GGC TCC TCC TCC CGC CGC
39  Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg

172 GCC CCC CAG ACC GGC ATC GTC GAC GAG TGC TGC TTC CGC TCC TGC GAC CTC CGC CGC
58  Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg

229 CTC GAG ATG TAC TGC GCC CCC CTC AAG CCC GCC AAG TCC GCC TGA
77  Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala *
```

**Abbildung 38: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Insulin-like Growth Factors-I (*Homo sapiens*)**  
 In *Kursiv* angegeben ist das Sekretionssignal der alkalischen Phosphatase aus *Acremonium chrysogenum*. In **Fett** gedruckt sind die Nukleotide, die im Zuge der Kodonoptimierung für die Verwendung in *N. crassa* ausgetauscht wurden.

### Sequenz der *Ribonuklease A (RNase A)*

```

1  ATG GTC ACC CTC CGC CGC CTC GCC GTC CTC CTC GGC GCC ATC CCC GCC GCC CTC GCC
1  Met Val Thr Leu Arg Arg Leu Ala Val Leu Leu Gly Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala

58  GCC AAG GAG ACC GCC GCC GCC AAG TTC GAG CGG CAG CAC ATG GAC TCC TCC ACC TCC
20  Ala Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Ser Thr Ser

115 GCC GCC TCC TCC TCC AAC TAC TGC AAC CAG ATG ATG AAG TCC CGC AAC CTC ACC AAG
39  Ala Ala Ser Ser Ser Asn Tyr Cys Asn Gln Met Met Lys Ser Arg Asn Leu Thr Lys

172 GAC CGC TGC AAG CCC GTC AAC ACC TTC GTC CAC GAG TCC CTC GCC GAC GTC CAG GCC
58  Asp Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr Phe Val His Glu Ser Leu Ala Asp Val Gln Ala

229 GTC TGC TCC CAG AAG AAC GTC GCC TGC AAG AAC GGC CAG ACC AAC TGC TAC CAG TCC
77  Val Cys Ser Gln Lys Asn Val Ala Cys Lys Asn Gly Gln Thr Asn Cys Tyr Gln Ser

286 TAC TCC ACC ATG TCC ATC ACC GAC TGC CGC GAG ACC GGC TCC TCC AAG TAC CCC AAC
101 Tyr Ser Thr Met Ser Ile Thr Asp Cys Arg Glu Thr Gly Ser Ser Lys Tyr Pro Asn

343 TGC GCC TAC AAG ACC ACC CAG GCC AAC AAG CAC ATC ATC GTC GCC TGC GAG GGC AAC
116 Cys Ala Tyr Lys Thr Thr Gln Ala Asn Lys His Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly Asn

400 CCC TAC GTC CCC GTC CAC TTC GAC GCC TCC GTC TGA
135 Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val *
```

**Abbildung 39: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Ribonuklease A (*Bos taurus*)**  
 In *Kursiv* angegeben ist das Sekretionssignal der alkalischen Phosphatase aus *A. chrysogenum*. In **Fett** gedruckt sind die Nukleotide, die im Zuge der Kodonoptimierung für die Verwendung in *N. crassa* ausgetauscht wurden.

**Sequenz des Granulocyte-Colony Stimulating Factors (G-CSF)**

1 ATG GTC ACC CTC CGC CGC CTC GCC GTC CTC CTC GGC GCC ATC CCC GCC GCC CTC GCC  
 1 Met Val Thr Leu Arg Arg Leu Ala Val Leu Leu Gly Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala  
  
 58 GCC ACT CCA TTA GGT CCT GCT TCT TCT CTG CCG CAA AGC TTT CTG CTG AAA TGT CTG  
 20 Ala Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu  
  
 115 GAA CAG GTT CGT AAA ATC CAG GGT GAC GGT GCT GCA CTG CAA GAA AAA CTG TGC GCT  
 39 Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala  
  
 172 ACT TAC AAA CTG TGC CAT CCG GAA GAG CTG GTA CTG CTG GGT CAT TCT CTT GGG ATC  
 58 Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile  
  
 229 CCG TGG GCT CCG CTG TCT TCT TGT CCA TCT CAA GCT CTT CAG CTG GCT GGT TGT CTG  
 77 Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu  
  
 286 TCT CAA CTG CAT TCT GGT CTG TTC CTG TAT CAG GGT CTT CTG CAA GCT CTG GAA GGT  
 101 Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly  
  
 343 ATC TCT CCG GAA CTG GGT CCG ACT CTG GAC ACT CTG CAG CTA GAT GTA GCT GAC TTT  
 116 Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe  
  
 400 GCT ACT ACT ATT TGG CAA CAG ATG GAA GAG CTC GGT ATG GCA CCA GCT CTG CAA CCG  
 135 Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro  
  
 457 ACT CAA GGT GCT ATG CAG GCT TTC GCC TCT GCA TTC CAG CGT CGT GCA GGA GGT GTA  
 153 Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val  
  
 514 CTG GTT GCT TCT CAT CTG CAA TCT TTC CTG GAA GTA TCT TAC CGT GTT CTG CGT CAT  
 172 Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His  
  
 573 CTG GCT CAG CCG TAA  
 191 Leu Ala Gln Pro \*

**Abbildung 40: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Granulocyte-Colony Stimulating Factor (*Homo sapiens*)**

In *Kursiv* angegeben ist das Sekretionssignal der alkalischen Phosphatase aus *A. chrysoygenum*. In **Fett** gedruckt sind die Nukleotide, die im Zuge der Kodonoptimierung des Gens für die Verwendung in *E. coli* ausgetauscht wurden.

**Sequenz der Ribonuklease N1 (RNase N1)**

1 ATG GTC CAG CTC CTC TCC GCC TTC GTC TCC CTC CTC TCC GTC GTC GCC GTC TCT GGC  
 1 Met Val Gln Leu Leu Ser Ala Phe Val Ser Leu Leu Ser Val Val Ala Val Ser Gly  
  
 58 GCC GCC ATC CCG GCT CCT GCC CCC GAG GCT GTC GTT GAT GTT GCC CCT GAA ACT GCT  
 20 Ala Ala Ile Pro Ala Pro Ala Pro Glu Ala Val Val Asp Val Ala Pro Glu Thr Ala  
  
 115 ACT ATC GAG CCT ACC GGC AAC TTC ACT GCC CAG GCC TGC ATG TAT ATC TGC GGC TCA  
 39 Thr Ile Glu Pro Thr Gly Asn Phe Thr Ala Gln Ala Cys Met Tyr Ile Cys Gly Ser  
  
 172 GTC TGC TAC AGC TCT TCT GCC ATC TCT GCT GCT CTA AAC AAG GGC TAC TCT TAT TAC  
 58 Val Cys Tyr Ser Ser Ser Ala Ile Ser Ala Ala Leu Asn Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr  
  
 229 GAG GAC GGA GCC ACC GCC GGA AGC AG [TAC GTT TCT TCT CTT TTA TAG TTT CTC TCC  
 77 Glu Asp Gly Ala Thr Ala Gly Ser Ser  
  
 286 TTT CCC TTC TTG CTTT TTC CTT GCT TTA TCT ACG CCC AAT GTC TTC TTG TTC TTT CTC  
  
 343 CTT GTT CAC TCT TCC TTC TTC GGT CCC TTT TCT TTT TTT TTT TTT TTC AAA GCA GGC  
  
 399 GCT AAC AAG CCC CAA CAG G]C AGC TAC CCC CAC CGA TAC AAC AAC TAC GAG GGC TTC  
 86 Ser Tyr Pro His Arg Tyr Asn Asn Tyr Glu Gly Phe  
  
 456 GAC TTC CCC ACC GCC AAG CCC TGG TAC GAG TTC CCG ATC CTG TCG TCC GGC CGC GTC  
 98 Asp Phe Pro Thr Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Phe Pro Ile Leu Ser Ser Gly Arg Val  
  
 513 TAC ACT GGC GGC TCT CCC GGT GCT GAT CGC GTC ATC TTT GAC TCC CAC GGC AAC CTG  
 117 Tyr Thr Gly Gly Ser Pro Gly Ala Asp Arg Val Ile Phe Asp Ser His Gly Asn Leu  
  
 571 GAC ATG CTC ATC ACC CAC AAT GGT GCT AGC GGT AAC AAC TTT GTT GCT TGC AAC TAA  
 136 Asp Met Leu Ile Thr His Asn Gly Ala Ser Gly Asn Asn Phe Val Ala Cys Asn \*

**Abbildung 41: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Ribonuklease N1 (*N. crassa*) (NCU01045)**

In *Kursiv* angegeben ist die Sekretionssignalsequenz. Unterstrichen ist die Prosequenz des Proteins; die Introngrenzen sind in [ ] angegeben.

**Promotorsequenz des *cfp*-Gens**

```

1   TCTCATGGTC GTCATTCTGT CACATCTCGC GGTGTGGGA GGAGGTTGAG CAGACAGAAA
    FK764
61  AGTAAATGGG TACACGAGGG GTGGTGGGTG CCTTTTGTG GCTGGGCGCC AAGGCTTTTC
121 CACCCCTCTC TCCATAGCAG ATATGGCACA TGTGTTTAA TCAATAGGCT CATTTGGTAC
181 TATAAATACA ACCTTACGCC AAACCTTTCA TCGACGAAAC TTGTACCAGG AATATCTATA
241 TTCTCATTGA CTTTCAAGG ACGGAGGTT CAATGATCAG CTCTCGTCCT AAGCTCAAAT
301 GATCTTGTTT GGATTCTATT TGGTAAAGAA GCAGCCGCC TCATCTCCGT TGCCTTGGTT
361 GAGGCGGCAC TTCCGAGGGA CAGAGGTGAA AGTGTTAGGT CGCAGTAGGG CGAATCCTCA
421 TTCCAAGTC AGACAACCTT GACATGATAC GATGTGAAA CTCTTTTCTT CTGAATCTCT
481 GCTCTTATCT TAAGTTTCTT GGAATTTCAA ATACACAAGA GTGGTTGAAT GGAGCTTGGT
541 GGTCTGTTGG TTAACAGGCT TCCAGCACTT GGGTTGCGTT TCTGACTATC GCCCTCACTA
601 AAAACATGTT CCATATTTTC TATCCTCATG CCCTTGGCAC TCAGACTCAA GAGCGCACCC
661 ACCACCCTCA GGGGACCTAG GCATAGCTTC AGTATCGAAC TCATGTCAAC GCCGAGCATT
721 GACCACATCG ACCTCAAACC TCAACAAACA GAACAACCGA CATGAGCTCA GCCCACGTTG
781 CCATTCGGCA GACGGAGCCG AATCGTGCTG ACTGTTTTGA AAATTTACCG CCGGATGGTG
841 CCGTCTCGGA AGCCAGCCT GAGGCATCTG TGTCTGGCAT GTCGCCGACG CGGTTAAGGT
901 CCGCTTTTCT GGGGCGCAAC CCCACCAGCC GCCAATGGGA AGGGCCGGTG TGGCTTGGGT
961 GCGAGTGCCT GGATTGCGGC GGTGGTCTGA TCAAATCGTC GAATGCTCGC TGCATATCGG
1021 ACCGAACGAG GCCGCTTATC TTTCCCTACA AACTTCATC TCGACCGACG TCGAACAACC
1081 GGAGCCCAGC AGCGGATGGC CCTGTGCAAC GTCGTAATCC ATGGTCCCC ACTCCTGTCT
1141 ATGATGCATT GCCCGCATGC TCTGACTTCA CAACCTCGTA ACAGAATGTT CACACCACCA
1201 GCCGACCGTG GTTGCCTTG GTCTGATGGC CCTGTCAAGC AACTGGCGAC CGTCTGGCCA
1261 TTGCTCCCAA CGAACGACAC CATGCAGCCA TGCATCAGCA CACCTTCCTT GTCCCTTGGC
1321 CCATGCGGAG ACGCCGAGC GTCTTCGGG ACATGTCATC GCGGAGATGG CCTCAAGCCA
1381 TCGATGGCAA TCCTGTAGCA GGCAGGCCAT CGGGACAAGC TCTCTGAGCC AATCATCACA
1441 TCACCGTGGT CAACACAGGA CAATAAAAGG CTTCTCGCAG CCCGCCGTCC TCTTGGGTAC
1501 CGGACTTCTG CATGGTCATG AAGTACAGC TTCGACACTA CCACTACTAC TACCACCTCC
1561 AGTCTTTGAC ACTTCTTAC CACCAGATCT CACCCTAAAG AGAGAGCATC
    FK771

```

**Abbildung 42: Promotorsequenz des *cfp*-Gens**

NCBI Datenbank-Eintrag U65927. Referenz: Temporini *et al.*, 2004.

Die grau unterlegten Bereiche kennzeichnen die Bindestellen der in der PCR eingesetzten Oligonukleotide



**Promotorsequenz des *trpC*-Gens aus *Aspergillus nidulans***

```

1   GTCGACAGAA GATGATATTG AAGGAGCATT TTTGGGCTTG GCTGGAGCTA GTGGAGGTCA
      FK547
61  ACACATCAAT GCTATTTTGG TTTAGTCGTC CAGGCGGATC ACAAATTTG TGTCGTTTGA
121 CAAGATGGTT CATTTAGGCA ACTGGTCAGA TCAGCCCACT TGTAAGCAGT AGCGGCGGCG
181 CTCGAAGTGT GACTCTTATT AGCAGACAGG AACGAGGACA TTATTATCAT CTGCTGCTTG
241 GTGCACGATA ACTTGTGCGT TTGTCAAGCA AGGTAAGTGA ACGACCCGGT CATACTTCT
301 TAAGTTCGCC CTTCTCCCT TTATTTTCTA TTCAATCTGA CTTACCTATT CTACCCAAGC
      FK548
361 A

```

**Abbildung 44: Promotorsequenz des *trpC*-Gens**

NCBI Datenbank-Eintrag X02390. Referenz: Hamer und Timberlake, 1987.

Die grau unterlegten Bereiche kennzeichnen die Bindestellen der in der PCR eingesetzten Oligonukleotide

**Promotorsequenz des *acu-5*-Gens**

```

1   GATCCCAACC GAACTTTGG TTTC TCCTTA CATCCGTCTC AGCCGTCACG TATTTACCT
      FK543
61  CCTCAGGAGG CATACTTCTA CCGACGTGCC CGTCCCGCCC ACCTTCAAAA TATCAGCTGG
121 CCCCAAGATT TGCATTTCTA CTGGCTTGCT TACAAGGCTT GTATCATTGT CCATCAACAA
181 CTGATTCTCT AGGCAGTCGG GCTTCACCTC CCTTTAGCCC CCGGCACTGA CGCACTGAAT
241 ACCTGAACAG GCCCCTAGCA ATAACCGACG GCATGCAGCG CTGACGCACG CCATCTACGA
301 AATGACTCGC GACCAATCAC GCGGACGAAT CGGACGAATC GGCCGAAGAC GCGGACGCGC
361 CCGTGCTGTC CTTCAGTCC CCCGTCAAGC CGCACTTCCC AGCGGACAGT ATCATCGACC
421 AGGCAAACCC GAACCAACCG AGTCTTGACG AGAATACGAC AAACCAGCAG CTGTGCATTA
481 CCGATCCAAA GTCGATATAA GCAAGGCAAC AGCAAAGAC ATTTGAAATT CGACGCCTCT
541 CAAGGGTTCA ATCCGGTAAAG GACGAGGTGT TGCAAAAGGC CCCACTGTTA GAACGCTACT
601 GGCAGGCAAG CCTACACTGC CACCTCACAA CTCCTCCCAT ACGACGGGAC CATGGAGACT
661 TTTAGGCGAT TTCTAGTGCA CAACGTGTTT AGAAGCTAGG TAGCGGCTCG TAATTTTGCT
721 GCCCATCCCA TACGGCTTTG GGTCTAGAGG TATCAGGGCA TTACGGACGG CGGCGGCGCA
781 TCGTAGCACG TACTACTGCG ACTAACATGG ACGGCGTAAC GGTCAGCGTC CAAAAGAATC
841 CCGAGAAACT AGTGCAAGAT CCCCTTACGG TCGGTAACGG GGAGGAAACC AGCCATACCA
901 TGCGCCAAGG GGGCAACCAG GTAGGACCTG GCATGTACAA TCGTGCGCTA CTGTAAACCT
961 GACATGGCAT CTGGGTAAAG TAGGTTGTCG GGTCTGAACA ACATTGGTTC CCATTCTCGG
1021 GGTCACCTTC CCTATACCTA CCGTGTAGGT ACGCATGACC TCTTGACGTC ACGTCGATTC
1081 TTCCCATATC AAGCAAACCT AGAAAGCCAT CAATGCTTCT TATCACCATG CCAGTTCTAC
1141 TAGGCATGAA AACTACTAGT GAAGGTCACA AACGCGCTTG GCCAGGTACG TCGATAACTC
1201 CAGCCCGGCG TGAAAGTAGT ACTTTTTCTG CTGTCTGCTG TTGGCCCCGA GTTGCTGCG

```

1261 GCGTGGTATG CTGTGCGCTG CTGCCGCGCT TCGGGTGTGT ATATGCGGTC CGTGTAAGAAC  
 1321 GATTCCAGTT CATTCCGCAG TCGAGAGTGA AGTGATTAAA AGGTTCGCCC GAGCGAAGGG  
 1381 TTAGTTTGCC CGATCGGGAA AGCGCGGGC TCCGGCAAGT AGCGAATAGT CTCGACCTTC  
 1441 GATTGACTGG CTCGACTGAA TACTAACGAG GTAGTCCAAG CGGGGCACCT AGGTCGGGAC  
 1501 TCTTAACTCC TGAGGCGACA TTCTGCAGAG ATAGCATCCC GCTCACAAAG GAAGTCATGA  
 1561 TTATCTGCTA AAGTGTGGCG GGCAGGCAGG GTTCAGAGTT CCGTTGGATG GTCACCCATC  
 1621 CTCGGGCAGA TGGAGAATCA GTAACCGGGT ACCTTACTGG GCATGTCTCT CCGACTGTAG  
 1681 TTGTACGCTG ACGCTGCGAC TCCGGTTCGG CCGTCACCCG CGGAGCCCTT TTGGAACCAA  
 1741 AACAACTCC AGAGTCCAGA CGGGGGATAT GGACATCCCT CATCCCAACC CAAGTCCCCT  
 1801 CCAGGTCCCA ATGGCCCCAA ACTTCCAATG GTGCCATTGG CGGCCCTCCA TAGTCCACAG  
 1861 TAGTCCCAT CCCGAGCCAG CCCAGCTTAT CCACACGTCC GACCCTAGCT AGCAGTGTGC  
 1921 GTGGTAGTAG TCAGTCCATC CGTCCATCCT TTACGGTTAC ATCCTCTATC CACGCAGCTC  
 1981 TTCATGACCT TCTCCATCCT GCGGGGTATG CTTTCGTTTTG GCGGCGGCGC TCGGAGGCGC  
 2041 TCATAATACA AAAGCGCGTC GGCCCTCGTC CTGCCAACCC GCTGTCCTTT CTTTCTGCCT  
 2101 GCTGTACCTC TATACCAACA ACCCGACCTG CCTGCCGTCC TCTCCTTTTC CCTCCTCGCC  
 2161 CTTTTATCCT CACTTTCTCT CTCCGGTTTG CGAAGCCTTG GCCTCCTGTC AACTGGCCAC  
 2221 TGCGGTTTAC TCACCGCCGC GCCTTGTCCT GCATCTTTAA TCGAGCCTTT TCAGCACCGA  
 2281 ATCCACCTTG CTTAGTTAGA GCTGCTTCTA CCTCGCATCA CTCCTTTTCC AGCGAACCTA  
 2341 AGCGCAGAAA GGTATTGCTT GCGACCACCA GTACCCATCT ATCATCACCA CCCAGAACAA  
 2401 CCACATCACA GTCACC

**FK544**

**Abbildung 45: Promotorsequenz des *acu-5*-Gens**

NCBI Datenbank-Eintrag Z47725. Referenz: Collins *et al.*, 1990.

Die grau unterlegten Bereiche kennzeichnen die Bindestellen der in der PCR eingesetzten Oligonukleotide

**Terminatorsequenz des *arg-2*-Gens**

```

1   CGGACGAGAA TGTCTTTGCA TTTCTTAGT GAACGGTGTT TGTCATTGGT CTTGGGTTAT
      FK541
61  TGTTTTCCAG CACAAAGGAT ATGGGTTTTG TAAAAGGGAC TTTCTTGGGC GACGTCCCTCT
121 CGTTATTAAT GGTTTAGGGT GTATATGATA TCTTTTGTTA CTACTTTTGA ATGCAGAATC
181 AGATAAGTTT AGTCGGCATT AGGCTGATAT GGCGCAGAGA GGACAATATC TAGTTGATAC
241 ATACCCATGT GCTATCACGT CTAAACGTCT TCCAGTCGTT GTATTTTACC CATTCCCTGGT
301 GATTGCCGTA TGTCTTCCAG TCCAGTACCT CCCCTAATTC GGTGCCCTTC AACATTCAGG
361 GTTATGTTGA CAGCGTGCTG TATAAGCATG GTTGCCGGGG AACATGGTGT CATTGACTGG
421 TAAGCAGGGC AGCCTCTGGT TCTGTGACAC CTGGTTTTCC CTGGTCTTGA TTTCAAACATA
481 TTATCAAACA AATCAGCGTC GTCTTAGTAG ATGGCAGGTA TCTTAGAACA GAAAGTAGTT
541 ATTCTTCGTC GGATACGACT CAAAATCAT ATACGAACAA GTGGATGCTT TATACTATGC
601 TTCTTTTAC TGTAATCTTG GTCTCGCTCT TCGCTTAGCC TTCTTCACCT GGTAAACCGGT
661 ATAGGTACCT TCGCACCCCTC AATTGGAAGG ATGCATCAAC CCCTCCATGC GCTGCTTATC
721 CTGCTATCTA TCCATACATT TCTATGTTTT TACAGTGTAG AATATTTCTT GTGTATCAGG
781 GTCCGTCCCG CGATGCTACC CCCTGTCCTG CAG
      FK542

```

**Abbildung 46: Terminatorsequenz des *arg-2*-Gens**

NCBI Datenbank-Eintrag J05512. Referenz: Orbach *et al.*, 1990.

Die grau unterlegten Bereiche kennzeichnen die Bindestellen der in der PCR eingesetzten Oligonukleotide

## 8. Publikationen

### Veröffentlichungen

**Mercker M, Weiland N, Alves S, Kempken F (2006).** The *Neurospora crassa* BEM46-like protein is targeted to the E.R. and essential for cell-type-specific polarity. Submitted to *Eukaryotic Cell*

### Tagungsbeiträge

**Alves S, Kempken, F (2005).** Heterologous Protein Expression in the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. XXIII Fungal Genetics Conference, Asilomar, USA

**Alves S, Weiland N, Mercker M, Kempken F (2005).** Analysis of the bem46 gene from *Ascobolus immersus* and *Neurospora crassa*. 7<sup>th</sup> VAAM-Symposium Molecular Biology of Fungi, Bochum

**Mercker M, Alves S, Weiland N, Kempken F (2006).** Analysis of the bem46 gene from *Ascobolus immersus* and *Neurospora crassa*. Abstracts of the "8th European Conference on Fungal Genetics", Wien, Österreich

## 9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Frank Kempken, meinem akademischen Lehrer und Doktorvater, danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie für die interessante Themenstellung. Sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie seine geistige und materielle Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Dr. Ruth Schmitz-Streit danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Dr. Frank Gindullis von der Firma Celltec danke ich für die Einführung in die Nachweise für die RNase A.

Der Innovationsstiftung Schleswig-Holstein und der Firma Strathmann danke ich für die Finanzierung meiner Arbeiten.

Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Mitstreitern der Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie für das angenehme Arbeitsklima, die zahlreichen Hilfestellungen und die wissenschaftlichen Diskussionen: Nina Bolle, Ilka Braumann, Moritz Mercker, Hanna Schmidt, Susanne Steinhauer, Nancy Weiland, Matthias Staudinger und Kerstin Stockmeyer sowie allen, die ich hier vergessen habe. Insbesondere möchte ich mich bei Hanna Schmidt für ihre vielen Ratschläge und die Hilfestellungen gerade am Anfang der Arbeit bedanken. Ein Dank auch an Susanne für die Hilfe bei der Erstellung der Protease-defizienten *N. crassa*-Mutante. Bei Nancy möchte ich mich besonders für die hilfreiche Unterstützung bei der Suche nach funktionierenden Promotoren als Teil ihrer Diplomarbeit bedanken. Nicht zu vergessen natürlich auch ein Dank an alle F-Praktikanten, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben.

Bei Kirsten Krause möchte ich mich ganz herzlich für die aufmunternde Worte sowie die Hilfe bei den Western-Blots am späten Abend bedanken.

Bei Nancy und Martin möchte ich mich für die Korrekturvorschläge an meiner Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Martin, der während der gesamten Doktorarbeit in allen Höhen und Tiefen zu mir gestanden und mich nie im Stich gelassen hat. Ohne seine Unterstützung wäre mir manches schwerer gefallen. Vielen Dank, dass es dich gibt!

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir dies erst ermöglicht haben.

---

# Lebenslauf

**Silke Alves**

## Persönliche Daten:

Geburtsdatum	17.01.1978
Geburtsort	Gifhorn
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung:

September 1984 – Juli 1988	Grundschule Meinersen
September 1988 – Juli 1990	Orientierungsstufe Meinersen
September 1990 – Juli 1997	Humboldt-Gymnasium Gifhorn
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Hochschulstudium:

Oktober 1997 – Oktober 2002	Studium der Biologie an der Technischen Universität Braunschweig Hauptfach: Biochemie/Biotechnologie Nebenfächer: Genetik, Botanik
Januar 2002 – Oktober 2002	Diplomarbeit im Fach Biochemie am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (früher: Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GbF)), Braunschweig
Januar 2003 – November 2006	Arbeiten zur Promotion im Fach Zellbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Betreuung von Prof. Dr. F. Kempken in der Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie des Botanischen Instituts

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit nach Inhalt und Form und die ihr zugrunde liegenden Versuche meine eigene Arbeit sind. Es wurden - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer - keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommene Textstellen sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich hiermit, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den

---

Silke Alves