

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einsatz von Hyphenpilzen in der konventionellen Biotechnologie	2
1.2 Expression heterologer Gene in Hyphenpilzen	5
1.2.1 Transformation	6
1.2.2 Struktur pilzlicher Expressionssysteme	7
1.2.3 Posttranskriptionale Modifikationen	10
1.2.4 Wirtsorganismen zur heterologen Genexpression	11
1.3 Anwendungen der heterologen Genexpression	12
1.3.1 Modifikation von Stoffwechselwegen	13
1.3.2 Überproduktion heterologer Proteine	15
1.4 Ausblick	18
2. Problemstellung	19
3. Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Stämme	23
3.1.2 Nährmedien	23
3.1.3 Chemikalien	23
3.1.4 Enzyme	24
3.1.5 Häufig verwendete Puffer	24
3.1.6 Plasmide	25
3.1.7 Oligonukleotide	26

3.2 Methoden	27
3.2.1 Kulturbedingungen	27
3.2.2 Transformationen	27
3.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren	28
3.2.4 Gelektrophorese	29
3.2.5 Southern Blots und DNA-DNA-Hybridisierungen	29
3.2.6 Northern Blots und DNA-RNA-Hybridisierungen	29
3.2.7 Radioaktive Markierung von DNA	30
3.2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
3.2.9 Deletion mit Exonuklease III/Nuklease S1	30
3.2.10 DNA-Sequenzierung	30
3.2.11 Oligonukleotidsynthese	31
3.2.12 <i>In vitro</i> Rekombination von DNA	31
3.2.13 Nachweis der Reportergen-Expression	31
3.2.13.1 Halbquantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Expression	31
3.2.13.2 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Expression	31
3.2.14 Bestimmung der Proteinkonzentration	32
3.2.15 Analyse von DNA-Protein-Interaktionen durch Gelretentionstests	32
3.2.16 Nachweis von rekombinantem Hirudin	33
3.2.16.1 Enzymatischer Nachweis der Hirudin-Aktivität	33
3.2.16.2 Nachweis von Hirudin durch Festphasen-Enzymimmuntests (ELISA)	33
3.2.16.3 Detektion von Hirudin durch Immunoblots	34
3.2.17 Sicherheitsbestimmungen	34
4. Ergebnisse	35
4.1 Funktionsanalyse des <i>pcbC</i> Promotors aus <i>Acremonium chrysogenum</i>	35
4.1.1 Konstruktion von Vektoren zur Reportergenanalyse des <i>pcbC</i> Promotors	35
4.1.2 Kotransformation von <i>A. chrysogenum</i> und molekulare Charakterisierung der Transformanten	38
4.1.3 Identifizierung funktioneller Sequenzen des <i>pcbC</i> Promotors durch Analyse der Reportergenexpression	41
4.1.4 Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen in einem potentiell regulatorisch wirksamen Sequenzbereich des <i>pcbC</i> Promotors	45

4.2 Anwendung des <i>pcbC</i> Promoters zur Expression eines heterologen eukaryontischen Gens in <i>Acremonium chrysogenum</i>	49
4.2.1 Konstruktion von Vektoren zur Synthese des Modellproteins Hirudin in <i>Acremonium chrysogenum</i>	49
4.2.2 Molekulare Charakterisierung der Kotransformanten zur Hirudin-Expression	52
4.2.3 Transkriptanalyse des Hirudin-Gens in verschiedenen <i>A. chrysogenum</i> Stämmen	54
4.2.4 Nachweis des aktiven rekombinanten Hirudins in Kulturüberständen von <i>A. chrysogenum</i> Kotransformanten	56
4.2.5 Immunologische Detektion des rekombinanten Hirudins durch monoklonale und polyklonale Antikörper	59
4.2.6 Zeitlicher Verlauf der Expression des Hirudin-Gens	61
5. Diskussion	65
5.1 Charakterisierung des <i>pcbC</i> Promoters aus <i>A. chrysogenum</i>: Identifizierung <i>cis</i>-wirksamer Sequenzbereiche	65
5.1.1 Einsatz des <i>lacZ</i> Reportergens zur Promotoranalyse in <i>A. chrysogenum</i>	66
5.1.2 Integrative Kotransformation der Reportergenvektoren	67
5.1.3 Die sequentielle Deletionsanalyse des <i>pcbC</i> Promoters ermöglicht die Identifizierung regulatorisch wirksamer Sequenzregionen	69
5.1.4 Ein potentiell positiv <i>cis</i> -wirksamer Sequenzabschnitt des <i>pcbC</i> Promoters ist an DNA-Protein-Interaktionen beteiligt	73
5.2 Heterologe Genexpression unter Kontrolle des <i>pcbC</i> Promoters	77
5.2.1 Das eukaryontische Polypeptid Hirudin eignet sich als Modellprotein für die heterologe Genexpression	77
5.2.2 Konstruktion von Expressionskassetten zur Hirudin-Synthese in <i>A. chrysogenum</i>	78
5.2.3 Das heterologe Hirudin-Gen wird unter der Kontrolle des <i>pcbC</i> Promoters transkribiert	80
5.2.4 In <i>A. chrysogenum</i> Kotransformanten ist eine effiziente Synthese und Sekretion von aktivem Hirudin möglich	81

5.2.5	Immunologische Analysen weisen auf eine native Struktur des rekombinanten Hirudins hin	85
5.2.6	Die zeitliche Regulation der Hirudin-Expression entspricht der Regulation des <i>pcbC</i> Gens	87
6.	Zusammenfassung	89
7.	Literatur	91
8.	Anhang	111