

**Isolierung des humanen Lactasegens und seine Expression  
in der Hefe *Pichia pastoris***

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde einer  
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

**Rut Bethge**

aus Erkelenz

Hauptberichterstatter:

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Rolf D. Schmid

Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der mündlichen Prüfung:

14. August 2002

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2002



<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>13</b>
<b>2. SUMMARY.....</b>	<b>16</b>
<b>3. EINLEITUNG.....</b>	<b>18</b>
3.1. Lactose.....	18
3.2. Lactosemetabolismus.....	19
3.3. Mit dem Lactosemetabolismus verbundene Stoffwechselstörungen.....	20
3.3.1. Lactoseunverträglichkeit.....	20
3.3.2. Galactosämie.....	21
3.4. Lactase-Phlorizin-Hydrolase.....	23
3.5. Hefen als Expressionssysteme.....	27
3.5.1. <i>Pichia pastoris</i> , eine zur Expression heterologer Proteine geeignete Hefe.....	28
3.6. Aufgabenstellung.....	32
<b>4. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>33</b>
4.1. Geräte.....	33
4.2. Chemikalien, Biochemikalien, Kits, etc.....	34
4.3. Oligonukleotide.....	36
4.4. Mikroorganismen und Plasmide.....	37
4.5. Arbeiten mit Mikroorganismen.....	38
4.5.1. Kultivierung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> .....	38
4.5.2. Kultivierung und Lagerung von <i>Pichia pastoris</i> .....	39
4.5.3. Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Hitzeschock.....	41
4.5.4. Transformation von <i>Pichia pastoris</i> durch Elektroporation.....	41
4.6. Genetische Methoden.....	42

4.6.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus menschlichem Gewebe .....	42
4.6.2. Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus mRNA .....	43
4.6.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) nach Mullis .....	45
4.6.4. Isolierung von Plasmid-DNA .....	46
4.6.5. Restriktionsverdau von DNA .....	48
4.6.6. Dephosphorylierung von DNA.....	48
4.6.7. Ligation von DNA-Fragmenten.....	48
4.6.8. Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	49
4.6.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	49
4.6.10. Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Pichia pastoris</i> .....	50
4.6.11. DNA-Sequenzierung .....	50
4.7. Biochemische Arbeitsmethoden .....	53
4.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	53
4.7.1.1. 'Coomassie Brilliant Blue'-Färbung.....	54
4.7.1.2. Silberfärbung.....	54
4.7.2. Acetonfällung .....	56
4.7.3. Protein-Blotting .....	56
4.7.4. N-terminale Sequenzierung .....	57
4.7.5. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	58
4.7.5.1. Bicinchoninsäure (BCA)-Test.....	58
4.7.5.2. Bradford-Test.....	58
4.7.6. Test auf Disaccharidase-Aktivität nach Dahlqvist .....	59
<b>5. ERGEBNISSE.....</b>	<b>62</b>
5.1. Isolierung der kodierenden Sequenz der Lactase-Phlorizin Hydrolase aus menschlicher Dünndarm cDNA.....	62

5.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus menschlichem Dünndarmgewebe .....	63
5.3. cDNA-Produktion aus mRNA mittels Reverser Transkriptase und Nachweis der Lactase- Phlorizin Hydrolase-Nucleotidsequenz .....	64
5.4. Amplifikation der kodierenden Sequenzen der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase und ihrer beiden Einzeldomänen .....	66
5.5. Klonierung der menschlichen Lactase-Phlorizin-Hydrolase in <i>E. coli</i> .....	70
5.6. Sequenzierung der amplifizierten Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne, sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase.....	73
5.6.1. Lactase-Domäne.....	79
5.6.2. Phlorizin-Hydrolase-Domäne .....	80
5.6.3. Gesamt-Lactase-Phlorizin Hydrolase.....	80
5.7. Klonierung der Domänen für Lactase und Phlorizin-Hydrolase, sowie der Gesamt- Lactase-Phlorizin-Hydrolase in den Expressionsvektor pPICZ $\alpha$ A.....	86
5.8. Transformation der Domänen der Lactase und Phlorizin-Hydrolase, sowie der Gesamt- Lactase-Phlorizin-Hydrolase in <i>Pichia pastoris</i> .....	87
5.9. Expression der Lactase und Phlorizin-Hydrolase, sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin- Hydrolase in <i>Pichia pastoris</i> .....	89
5.9.1. Expression der Lactase-Domäne.....	89
5.9.2. Lactaseaktivität der Lactase-Domäne des Klons <i>Pichia</i> _LPHIII-4 in Abhängigkeit von der Expressionsdauer .....	96
5.9.3. Stabilität der von <i>Pichia</i> _LPHIII-4 exprimierten Lactase-Domäne bei Raum- temperatur .....	98
5.9.4. Aktivität der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne, sowie der Gesamt- Lactase-Phlorizin-Hydrolase.....	100
5.10. Inhibitionsversuche an der rekombinanten Lactase-Domäne, der Phlorizin Hydrolase- Domäne und der Gesamt-Lactase-Phlorizin Hydrolase.....	101

5.10.1. Hemmung der Lactase-Domäne aus <i>Pichia</i> _LPHIII-4 durch verschiedene Konzentrationen von Phlorizin und JG227.....	99
5.10.2. Inhibition der Lactase-Domäne (Klon <i>Pichia</i> _LPHIII-4), der Phlorizin Hydrolase-Domäne (Klon <i>Pichia</i> _LPHIV-B1-1), sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase (Klon <i>Pichia</i> _LPHges-I/F-4) durch ausgewählte Inhibitoren.....	102
<b>6. DISKUSSION.....</b>	<b>107</b>
6.1. Isolierung der kodierenden Sequenz der Lactase-Phlorizin-Hydrolase .....	107
6.2. Sequenzanalyse der Lactase- und Phlorizin Hydrolase-Domäne, sowie der Gesamt-Lactase Phlorizin Hydrolase.....	110
6.2.1. DNA-Sequenzen.....	110
6.2.2. Analyse der resultierenden Aminosäuresequenzen.....	111
6.3. Rekombinante Expression der Lactase-Phlorizin-Hydrolase .....	112
6.4. Inhibition der Lactase-Phlorizin Hydrolase.....	115
6.5. Ausblick.....	117
<b>7. LITERATUR.....</b>	<b>118</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>131</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>132</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
µg	Mikrogramm
µF	Mikrofarad
Ω	Ohm; elektrischer Widerstand
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AMV	Avian myeloblastosis Virus, Vogel-Myeloblastosis-Virus
AOX	Alkoholoxidase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ddNTP	Didesoxyribonucleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
cDNA	komplementäre DNA
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
h	Zeitangabe in Stunden
LB	Luria-Bertani
LPH	Lactase-Phlorizin Hydrolase
M	Molar [mol/l]

mg	Milligramm
ml	Milliliter
Mut <sup>+</sup>	Methanol verwertender Phänotyp von <i>Pichia pastoris</i>
Mut <sup>S</sup>	Methanol sensitiver Phänotyp von <i>Pichia pastoris</i>
nm	Nanometer
NMWL	Nominelle Molekulargewichtsgrenze
OD <sub>405</sub>	Bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessene Optische Dichte
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PräPro	Signalsequenz der nativen Lactase-Phlorizin Hydrolase
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen/min
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sh ble</i>	Resistenzgen gegen Bleomycin-Antibiotika aus <i>Streptoalloteichus hindustanus</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
U	Units

In der vorliegenden Arbeit verwendete Abkürzungen für Nucleotide und Aminosäuren sind Lehrbüchern der Genetik oder Biochemie zu entnehmen.

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abb. 3.1.:</b> Haworth-Projektion des Milchzuckers Lactose.....	18
<b>Abb. 3.2.:</b> Schematische Darstellung des Lactosemetabolismus.....	19
<b>Abb. 3.3.:</b> Reduktion des Monosaccharides Galactose zu seinem für den menschlichen Organismus toxischen Metaboliten Galactitol.....	22
<b>Abb. 3.4.:</b> Schematische Darstellung des Aufbaus des Vorläuferproteins der Lactase-Phlorizin-Hydrolase.....	26
<b>Abb. 5.1.:</b> Auftrennung der mittels PCR erhaltenen Fragmente der Probe 2 im 1%igen Agarosegel.....	65
<b>Abb. 5.2.:</b> Schematische Darstellung der Ansätze zur Amplifizierung der Lactase- und der Phlorizin-Hydrolase-Domäne, sowie der Gesamt-LPH aus menschlicher Dünndarm-cDNA.....	67
<b>Abb. 5.3.:</b> Nachweis der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne in der aus der Dünndarmprobe 2 hergestellten cDNA.....	68
<b>Abb. 5.4.:</b> Nachweis der mittels PCR erhaltenen einander überlappenden Lactase und Phlorizin-Hydrolase-Domäne.....	69
<b>Abb. 5.5.:</b> Nachweis der durch ‚Overlap-Extension‘-PCR erhaltenen Lactase-Phlorizin-Hydrolase.....	70
<b>Abb. 5.6.:</b> In den Klonierungsvektor pUC 18 klonierte Lactase-Domäne.....	71
<b>Abb. 5.7.:</b> Alignment der von Mantei et al. veröffentlichten Nucleotidsequenz der Lactase-Phlorizin-Hydrolase mit DNA-Sequenzen der klonierten Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase, Lactase-Domäne und Phlorizin-Hydrolase-Domäne.....	79
<b>Abb. 5.8.:</b> Alignment der Aminosäuresequenzen der rekombinanten Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase, Lactase-Domäne und Phlorizin-Hydrolase-Domäne.....	84
<b>Abb. 5.9.:</b> Klonierung der Lactase-Domäne (LPHIII) in pPICZ $\alpha$ A.....	84
<b>Abb. 5.10.:</b> Nachweis der aus der genomischen DNA verschiedener <i>Pichia</i> -Klone amplifizierten Lactase-Domäne, Phlorizin-Hydrolase-Domäne und Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase.....	88
<b>Abb. 5.11.:</b> Glucose-Kalibrierungskurve für den Test auf Disaccharidase-Aktivität nach Dahlqvist.....	91
<b>Abb. 5.12.:</b> Graphische Darstellung des Testes auf Disaccharidase-Aktivität nach Dahlqvist mit den <i>Pichia pastoris</i> -Klonen <i>Pichia</i> _LPHIII-4, -5 und -6.....	92

- Abb. 5.13.:** Mit Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel der 120-fach aufkonzentrierten Kulturüberstände von *Pichia pastoris* GS115, *Pichia\_LPHIII-4*, -5 und -6..... 94
- Abb. 5.14.:** Silbergefärbtes SDS-Gel der 120-fach aufkonzentrierten Kulturüberstände von *Pichia pastoris* GS115, *Pichia\_LPHIII-4*, -5 und -6. .... 95
- Abb. 5.15.:** Graphische Darstellung der Aktivität der von dem Klon *Pichia\_LPHIII-4* exprimierten Lactase-Domäne in Abhängigkeit von der Expressionsdauer..... 96
- Abb. 5.16.:** Graphische Darstellung der Stabilität der von dem *Pichia*-Klon *Pichia\_LPHIII-4* exprimierten Lactase bei Raumtemperatur und im Vergleich dazu bei 4 °C. .... 98
- Abb. 5.17.:** Vergleich der Lactaseaktivitäten der Klone *Pichia\_LPHges-I/F-4*, *Pichia\_LPHIII-4* und *Pichia\_LPHIV-B1-1*..... 100
- Abb. 5.18.:** Strukturformel von Phlorizin. .... 102
- Abb. 5.19.:** Strukturformel des  $\beta$ -Glucosidase- und -Galactosidase Inhibitors JG227. .... 103
- Abb. 5.20.:** Untersuchung der inhibierenden Wirkung von Phlorizin und JG 227 auf die Lactase-Domäne des Klones *Pichia\_LPHIII-4*. .... 103
- Abb. 5.21.:** Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von 2 mM Phlorizin und 2 mM JG227 auf die Lactaseaktivität der Klone *Pichia\_LPHges-I-4*, *Pichia\_LPHIII-4* und *Pichia\_LPHIV-B1-1*..... 105

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tab. 3.1.:</b> Substratspezifität der Lactase-Phlorizin-Hydrolase..	24
<b>Tab. 3.2.:</b> Beispiele für die heterologe Genexpression menschlicher Proteine in <i>Pichia pastoris</i> .....	31
<b>Tab. 4.1.:</b> Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.....	34
<b>Tab. 4.2.:</b> Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Biochemikalien, Kits, etc. ....	35
<b>Tab. 4.3.:</b> Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.....	37
<b>Tab. 4.4.:</b> In der vorliegenden Arbeit verwendete Mikroorganismen .....	37
<b>Tab. 4.5.:</b> In dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	38
<b>Tab. 4.6.:</b> Zusammensetzung von LB-Medium. ....	38
<b>Tab. 4.7.:</b> Zusammensetzung von YPD-Medium. ....	39
<b>Tab. 4.8.:</b> Zusammensetzung von BMGY- und BMMY-Medium. ....	40
<b>Tab. 4.9.:</b> Zusammensetzung von BMG- und BMM-Medium. ....	40
<b>Tab. 4.10.:</b> Ansatz einer RT-PCR.....	44
<b>Tab. 4.11.:</b> Komponenten einer in dieser Arbeit durchgeführten Standard-PCR.....	45
<b>Tab. 4.12.:</b> Ablauf einer ‚Touch down‘-PCR. ....	46
<b>Tab. 4.13.:</b> Zusammensetzung der zur Plasmidisolierung verwendeten Puffer.....	47
<b>Tab. 4.14.:</b> Komponenten einer typischen Sequenzierungs-PCR.....	51
<b>Tab. 4.15.:</b> Ablauf einer typischen Sequenzierungs-PCR. ....	51
<b>Tab. 4.16.:</b> Zusammensetzung des denaturierenden Harnstoffgels für die DNA-Sequenzierung.....	52
<b>Tab. 4.17.:</b> Zusammensetzung der zur SDS-PAGE verwendeten Gele und Puffer.....	53
<b>Tab. 4.18.:</b> SDS-PAGE-Laufbedingungen. ....	54
<b>Tab. 4.19.:</b> Verlauf einer Silberfärbung.....	55
<b>Tab. 5.1.:</b> Von der Literatur abweichende Basen der Lactase-Domäne .....	79
<b>Tab. 5.2.:</b> Von der Literatur abweichende Basen der Phlorizin-Hydrolase Domäne. ....	80
<b>Tab. 5.3.:</b> Von der Literatur abweichende Basen der Gesamt-Lactase Phlorizin-Hydrolase. .81	
<b>Tab. 5.4.:</b> Dahlqvist-Test auf Disaccharidase-Aktivität mit den Kulturüberständen der <i>Pichia pastoris</i> -Klone <i>Pichia</i> _LPHIII-4, -5 und 6.....	90

<b>Tab. 5.5.:</b> Auflistung der in den Kulturüberständen der Klone <i>Pichia</i> _LPHIII-4, -5 und -6 ermittelten Menge an freigesetzter Glucose, der daraus resultierenden Lactaseaktivität und der über die Proteinkonzentration ermittelten „spezifischen“ Lactaseaktivität.....	91
<b>Tab. 5.6.:</b> Stabilität der exprimierten Lactase-Domäne des Klons <i>Pichia</i> _LPHIII-4 bei Raumtemperatur und 4 °C.....	99
<b>Tab. 6.1.:</b> Auflistung der unterschiedlichen Aktivitäten der aus verschiedenen Säugetieren isolierten Lactase vor und nach ihrer Aufreinigung.....	113
<b>Tab. 6.2.:</b> Auflistung einiger durch JG 227 gehemmter Enzyme.....	116

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) katalysiert bei der Verdauung die hydrolytische Spaltung des Milchzuckers Lactose in Glucose und Galactose. Dieses Enzym ist im Bürstensaum des Dünndarms der Säugetiere lokalisiert. Seine Aktivität wird nach dem Ende der Laktationsphase sehr stark gesenkt, bzw. die Synthese in Teilabschnitten des Darms eingestellt, was eine Lactoseintoleranz bei 75 % der Weltbevölkerung zur Folge hat. Eine Ausnahme stellen hierbei Nordeuropäer und einige afrikanische Völker mit traditionellem Konsum von Milch und Milchprodukten dar.

Mit dem Lactosemetabolismus sind unter anderem die Stoffwechselkrankheiten Milchunverträglichkeit, die durch einen Defekt in der Lactase-Synthese zustandekommt, und Galactosämie, die auf dem genetischen Defekt der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT) beruht, verbunden. Während die Symptome, Durchfall und Erbrechen, der Milchunverträglichkeit weniger schwerwiegend sind, führt der Verlauf von Galactosämie unbehandelt zu geistiger Zurückgebliebenheit und in vielen Fällen zum Tod.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Entwicklung denkbarer Behandlungsstrategien der Galaktosämie durchgeführt.

Der Grundgedanke besteht darin, die negativen Folgewirkungen der Galactosämie durch Hemmung des ersten Enzyms des Lactosemetabolismus, der LPH, unter Akzeptanz der Folgen einer Milchunverträglichkeit, zu unterbinden. Hierbei kamen unter anderem vom Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart synthetisierte und freundlicherweise zur Verfügung gestellte Glycosidaseinhibitoren zum Einsatz.

In einem ersten Schritt wurde die humane Lactase-Phlorizin-Hydrolase in *Pichia pastoris* exprimiert und die Quantifizierbarkeit ihrer Lactaseaktivität in dem Test auf Disaccharidase-Aktivität nach Dahlqvist untersucht. In einem zweiten Schritt wurde die Anwendbarkeit des Testsystems zur Charakterisierung einer LPH-Hemmung im Allgemeinen, bzw. zur Suche nach neuen spezifischen LPH-Inhibitoren untersucht.

Die LPH wurde aus Gewebeproben menschlichen Dünndarms isoliert. Dazu wurde ihre Gesamt-RNA isoliert, die mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA übersetzt wurde. Daraus konnten durch PCR sowohl die Lactase-, als auch die Phlorizin-Hydrolase-Domäne der LPH amplifiziert werden. Durch den Vergleich ihrer DNA-Sequenzen mit der 1988 von Mantei et al. veröffentlichten Sequenz der LPH ergaben sich in beiden Domänen jeweils

6 Basenabweichungen, von denen angenommen wurde, dass es sich dabei um Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) handelt.

Die Gesamt-LPH wurde durch Zusammenfügen der beiden Einzeldomänen mittels „Overlap-Extension“ erhalten. Bei der Sequenzierung der Gesamt-LPH ergaben sich vor allem im hinteren Bereich, am 3'-Ende, Basenabweichungen, die in den ursprünglichen Einzeldomänen nicht vorhanden waren. Es muß demnach davon ausgegangen werden, daß es sich bei diesen Variationen nicht um SNPs sondern um Mutationen handelt.

Sowohl die einzelnen Domänen, als auch die Gesamt-Lactase Phlorizin-Hydrolase wurden in dem eukaryotischen System der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert. Die erhaltenen Proteine wurden mit Hilfe des Testes auf Disaccharidaseaktivität nach Dahlqvist auf ihre Lactose-Hydrolyse-Aktivität untersucht. Das Verfahren wurde dabei auf eine Anwendung im Mikromaßstab modifiziert.

Während die exprimierte Phlorizin-Hydrolase-Domäne alleine nur geringe Lactaseaktivität zeigte, konnte nach Expression der Lactase-Domäne, sowie der Gesamt-LPH deren hydrolytische Aktivität nachgewiesen werden. Die Lactaseaktivität konnte somit der Lactase-Domäne zugeordnet werden.

Die rekombinanten Proteine waren trotz ihrer Abweichungen von der in der Literatur veröffentlichten Sequenz aktiv. Die Expression in *Pichia pastoris* ermöglicht es demnach, die Aktivität von Varianten der LPH auf einfache Art und Weise zu testen. Zur Durchführung weiterer Experimente sollte ein mutationsfreies Gen hergestellt werden, um einen Vergleich mit der Literatur zu ermöglichen, und festzustellen, wie viele Polymorphismen das Gen besitzt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der modifizierte Dahlqvist-Test eingesetzt, um Verbindungen auf ihre hemmende Wirkung auf die Lactase-Phlorizin-Hydrolase, bzw. ihre Einzeldomänen, zu prüfen. Mit Phlorizin, einem Lactasehemmer, konnte die Zuverlässigkeit des Tests bestätigt werden. Die rekombinanten Proteine waren trotz ihrer Abweichungen von der Literatur für Inhibitionsversuche geeignet. Das Testsystem erlaubt somit die gezielte Durchmusterung synthetisch hergestellter Verbindungen auf deren inhibitorische Wirkung gegenüber der Lactaseaktivität und die Untersuchung der Wirkungsweise von Inhibitoren auf verschiedene Varianten der LPH. Auch für einen von dem Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart synthetisch hergestellten  $\beta$ -Glucosidase- und  $\beta$ -Galactosidase-Inhibitor (JG227) konnte eine Hemmung der Lactaseaktivität festgestellt werden.

Eine weitere, gezielte Durchmusterung von Verbindungen mit Hilfe des etablierten Systems könnte somit zur Charakterisierung neuer Inhibitoren führen und alternative Ansätze zur therapeutischen Behandlung von Galaktosämie eröffnen.

## 2. SUMMARY

The enzyme lactase-phlorizin-hydrolase (LPH; EC 3.2.1.23/62) catalyzes the hydrolysis of lactose (milk sugar), a disaccharide which can be found in dairy products, during digestion. It is located on the brush border membrane of mammalian small intestine absorptive epithelial cells. The enzymatic activity of lactase-phlorizin-hydrolase is elevated during the suckling period but decreases with weaning. This results in lactose intolerance in 75 % of the world's population, whereas populations with a history of consuming dairy products such as Northern Europeans and some african populations tolerate lactose well. There are two diseases connected with the metabolism of lactose: lactose intolerance and galactosemia. Lactose intolerance is either caused by a loss of activity or a defect in the synthesis of lactase, whereas galactosemia, which is a more severe disease, is based upon a genetic defect in galactose-1-phosphate-uridylyltransferase (GALT), causing demetia or death.

The primary goal of this thesis was to produce active lactase-phlorizin-hydrolase. A further goal is to investigate a possible novel strategy to treat galactosemia. The fundamental idea behind this work was to prevent the destructive illness associated with galactosemia by inhibiting lactase-phlorizin-hydrolase the first enzyme of lactose metabolism, while the less severe symptoms of lactose intolerance remain.

Human lactase-phlorizin-hydrolase (LPH) was expressed in the yeast *Pichia pastoris*. A disaccharidase assay by Dahlqvist was adapted to microtiter plate format and used to quantify lactase activity. The assay can also be utilized to screen for substances which inhibit the lactase-phlorizin-hydrolase, respectively the single domains of the enzyme.

Lactose-phlorizin-hydrolase was isolated from a biopsy of human small intestine. Total-RNA from the small intestine tissue was first extracted and translated into cDNA by way of reverse transcriptase. The lactase- and phlorizin-hydrolase-domains of lactose-phlorizin-hydrolase were amplified by PCR. The alignment of their DNA-sequences with the data published by Mantei et al. in 1988 showed 6 differing nucleotides for each domain. These variations are assumed to be single nucleotide polymorphisms (SNPs).

Splicing by overlap extension-PCR of both single domains yielded total mature lactose-phlorizin-hydrolase with added divergencies in its nucleotide sequence. These new variations are thought to be mutations, because they don't occur in the individual domains before splicing by overlap extension.

Both the lactase- and the phlorizin-hydrolase-domain, as well as the total LPH were expressed in the eukaryotic yeast *Pichia pastoris*. The resulting products were tested for lactose-hydrolytic activity using the adapted Dahlqvist disaccharidase assay.

Lactase activity was demonstrated for the recombinant lactase-domain and total lactose-phlorizin-hydrolase, whereas the isolated phlorizin-hydrolase domain showed only low lactase activity. Therefore, lactase activity can be said to be a property of the lactase-domain of lactose-phlorizin-hydrolase.

In spite of their variations in comparison with the published sequences the recombinant proteins were enzymatically active. This proves the expression by *Pichia pastoris* to be a simple system to test the activity of variants of the LPH. Before carrying out further experiments with this system, a gene without mutations should be generated to make possible comparisons with the data from the literature and to determine the number of polymorphisms in this gene.

In the second phase of this work, the modified Dahlqvist assay was tested for its ability to detect lactase inhibitory activity, for example using a library of synthetically produced compounds. The reliability of this assay was confirmed using phlorizin, a known inhibitor of lactase-phlorizin-hydrolase. In addition the suitability of the recombinant proteins for inhibition tests in spite of their variations is proven. Thus the developed system allows direct screening for inhibitory effects of synthetically produced compounds against lactase-activity and furthermore the examination of how inhibitors affect different variations of a protein.

The first tests with a synthetically produced inhibitor for  $\beta$ -glucosidases and  $\beta$ -galactosidases, JG 227, which was produced at the institute of organic chemistry of the university of Stuttgart, showed inhibitory effects on the lactase activity of the expressed, recombinant proteins.

Further screening of substances using this assay could result in the characterization of new inhibitors and in the development of alternative methods in the treatment of galactosemia.

### 3. EINLEITUNG

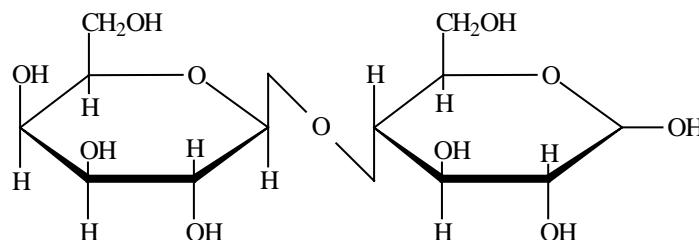
#### 3.1. Lactose

Zucker, oder Kohlenhydrate, gehören neben Proteinen, Nucleinsäuren und Lipiden zu den wichtigsten Biomolekülen.

Sie besitzen im menschlichen Organismus eine Vielzahl an wichtigen Aufgaben. Hauptsächlich fungieren sie als Energiespeicher, Brennstoffe und Metabolite. Außerdem gehen sie mit anderen Biomolekülen eine Vielzahl von Verbindungen ein, so bilden sie z.B. das Rückgrat von DNA und RNA, finden sich in bakteriellen und pflanzlichen Zellwänden und sind ein Hauptbestandteil des Exoskelettes von Gliederfüßlern. Ihre Synthese und Verstoffwechselung sind einer strengen Regelung unterworfen. Kommt es zu Störungen im Ana- oder Katabolismus, so kann das im Organismus schwere Defekte oder Krankheiten hervorrufen, die nur durch die Änderung der Ernährungsgewohnheiten umgangen werden können.

Lactose (*Saccharum lactis*;  $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranose) ist das wichtigste Kohlenhydrat der Milch aller Säugetiere und mit 6 bis 8 % in der Muttermilch und 4 bis 5 % in der Kuhmilch enthalten. Weiterhin kommt sie in Früchten und Pollen vor (Buckingham, 1996).

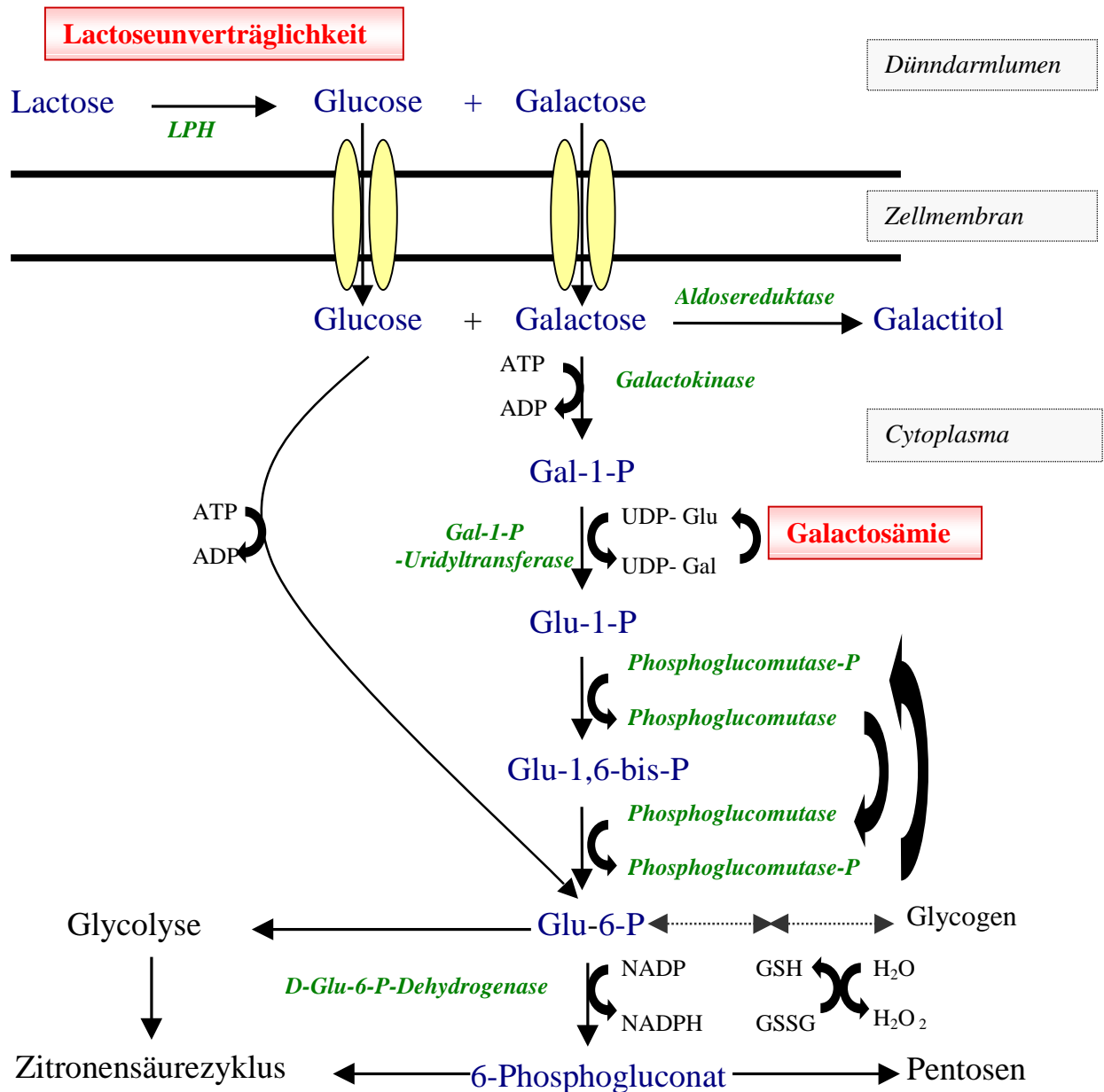
Sie gehört neben Maltose (Malzzucker) und Saccharose (Rohrzucker) zu den am häufigsten vorkommenden Disacchariden und besteht aus den über eine  $\beta$ -1,4-O-glykosidische Bindung verknüpften Monosacchariden Glucose und Galactose (Buller et al., 1991) (vgl. Abb. 3.1.)



**Abb. 3.1.:** Haworth-Projektion des Milchzuckers Lactose.

### 3.2. Lactosemetabolismus

Die Verstoffwechslung von Lactose wird durch das Enzym Lactase eingeleitet, das auf der Oberfläche der Microvilli im Dünndarm aller Säugetiere lokalisiert ist. Es katalysiert die hydrolytische Spaltung des Milchzuckers Lactose in seine Bestandteile Glucose und Galactose. Die resultierenden Monosaccharide werden anschließend ins Darmcytoplasma transportiert und dort dem Kohlenhydratstoffwechsel zugeführt.



**Abb. 3.2.:** Schematische Darstellung des Lactosemetabolismus. Rot hervorgehoben sind die beiden mit der Lactoseverstoffwechslung verbundenen Krankheiten Galactosämie und Lactoseunverträglichkeit; LPH: Lactase-Phlorizin Hydrolase; ATP: Adenosin-5'-triphosphat; ADP: Adenosin-5'-diphosphat; UTP: Uridin-5'-triphosphat; UDP:

Uridin-5'-diphosphat; Glu-: Glucose; Gal-: Galactose; -P: Phosphat; NADP(H): Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-phosphat(hydrat); GSH: reduziertes Glutathion; GSSG: oxidiertes Glutathion (Huskey, 1997).

Abb. 3.2. gibt schematisch den Ablauf der Lactoseverstoffwechslung wieder: Glucose wird zum Glucose-6-Phosphat (Glu-6-P) phosphoryliert und geht direkt in die Glykolyse ein. Im Gegensatz dazu muss Galactose zunächst in Glucose umgewandelt werden, bevor ebenfalls eine Einschleusung in die Glykolyse erfolgen kann. Nach der Phosphorylierung zu Galactose-1-Phosphat (Gal-1-P), wird es mit Hilfe der Galactose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT) auf einen Uridindiphosphat-Rest übertragen und am C-4-Atom zu Glucose epimerisiert (Glu-1-P). Die entstandene Glucose wird als Glucose-6-Phosphat (Glu-6-P) ebenfalls in die Glykolyse eingeschleust.

### 3.3. Mit dem Lactosemetabolismus verbundene Stoffwechselstörungen

Eine Beziehung zwischen Diarrhö im Kindesalter und Lactose wurde zum ersten mal 1901 beobachtet (Kretchmer, 1971). Seitdem werden die Pathogenese der Lactoseabsorption und die Verstoffwechslung des Milchzuckers intensiv erforscht.

Folgende Stoffwechselkrankheiten sind unter anderen mit dem Lactosemetabolismus verbunden: Lactoseunverträglichkeit und Galactosämie.

Wie in Abb. 3.2. schematisch dargestellt, führt ein Verlust der Lactase- oder besser Lactase-Phlorizin Hydrolase-Aktivität zu Milchunverträglichkeit, während die Ursache von Galactosämie mit dem Ausfall der Galactose-1-P-uridyltransferase begründet ist.

#### **3.3.1. Lactoseunverträglichkeit**

Säuglinge und Kinder sind meist in der Lage, den Milchzucker Lactose zu verdauen. Die Aktivität des Enzyms Lactase nimmt jedoch bei den meisten Säugetieren, so auch beim Menschen, während der Laktationsphase sehr stark ab (Kretchmer, 1972). Gründe dafür können in der Reduktion der Synthese der Prä-Pro-Lactase-Phlorizin-Hydrolase (Witte et al.,

1990; Sterchi et al., 1990; Loyd et al., 1990) oder der langsamen Prozessierung des Proteins (Witte et al., 1990; Sterchi et al., 1990) liegen. Der Hauptkontrollmechanismus wird jedoch auf dem mRNA-Level vermutet (Rossi et al., 1997, Wang et al., 1998).

Dadurch leidet die Mehrzahl aller Jugendlichen und Erwachsenen unter Milch- bzw. Lactoseunverträglichkeit (Auricchio et al., 1963; Dahlqvist et al., 1963), was auch eine Folge der Tatsache sein kann, dass dem Organismus keine Milch mehr geboten wird. Eine Ausnahme bilden Nordeuropäer und einige afrikanische Stämme (Uribe-Esquivel, 1997) dort, wo durch die Domestizierung des Rindes vor ca. 10.000 Jahren auch Erwachsenen Milch zur Verfügung stand.

Durch die Einstellung der Lactasesynthese kommt es im Lumen des Dünndarms zu einer Lactoseakkumulation, da ihm ein Mechanismus zur Lactoseresorption fehlt. Diese Lactoseakkumulation führt aufgrund ihres starken osmotischen Effektes zu einem Flüssigkeitseinfluss in den Dünndarm. Die Symptome der Milchunverträglichkeit sind Blähungen, Erbrechen, Krämpfe und Diarrhö (Rosado et al., 1987; Scrimshaw et al., 1988; Sieber et al., 1997).

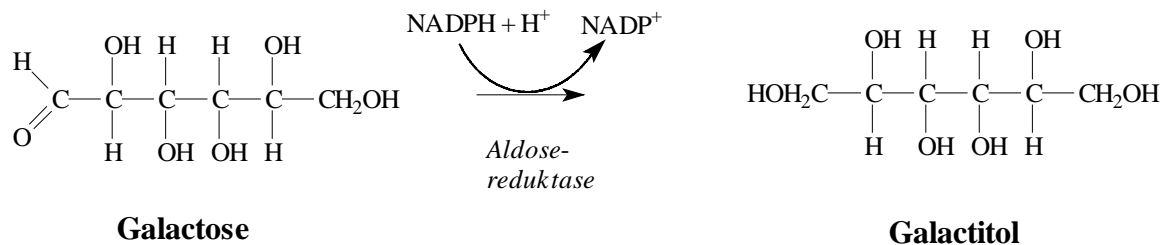
Lactoseintoleranz kann durch den Zusatz von  $\beta$ -Galactosidasen aus Bakterien oder Hefen zur Milch leicht umgangen werden. So vorbehandelte Milch wird besser toleriert als unbehandelte Milch, schmeckt allerdings auch süßer und ist teurer (Grand et al., 1994).

In Deutschland gibt es mehrere Lactasepräparate die kommerziell erhältlich sind (Münscher, 2000). Sie sind in unterschiedlichen Darreichungsformen, wie z.B. Pulvern („Lactase Plus“ und „Lactrase“), Kautabletten („LACTAID“, „Kerulac“ und „Laluk“) und Tropfen („Lac Vaccae D30“ und „Laluk“) zu erhalten und werden von den Firmen Natura, Pro Natura, APH-Allergie, Weleda und Strathmann angeboten. Diese Präparate müssen zu jedem lactosehaltigen Essen eingenommen werden.

### **3.3.2. Galactosämie**

Galactosämie ist ein autosomal rezessiv vererbter Fehler im Lactosemetabolismus (Wang et al., 1998), bei dem die Umwandlung von Galactose zu Glucose unterbunden wird (vgl. Abb. 3.2.). Verursacht wird dies durch einen Defekt der Galactose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT), der die Übertragung von Galactose auf einen Uridindiphosphat-Rest verhindert, wodurch die Epimerisierung der Galactose (Gal-1-P) zu Glucose (Glu-6-P) blockiert wird. Es kommt zur Anhäufung von Galactose, bzw. dem durch Reduktion der Galactose gebildeten

Metaboliten Galactitol im Cytoplasma des Dünndarms (vgl. Abb. 3.3.). Diagnostiziert wird Galactosämie bei betroffenen Personen u.a. durch erhöhte Werte von Galactose-1-Phosphat (Gal-1-P) im Blut und hohen Mengen von Galactose und Galactitol im Urin (Eu et al., 1999; Berry et al., 2001).



**Abb. 3.3.:** Reduktion des Monosaccharides Galactose zu seinem für den menschlichen Organismus toxischen Metaboliten Galactitol.

Die Akkumulation dieses toxischen Galactosemetabolites hat zunächst Erbrechen und Durchfall zur Folge, dann führt sie jedoch zu einer Vergrößerung der Leber, zu Gelbsucht, zu geistiger Zurückgebliebenheit und nicht selten, vor allem bei Säuglingen, sogar zum Tod (Segal, 1995a und b).

Galaktosämie tritt mit einer Häufigkeit von 1:61.000 auf (Levy, 1980). Bei Neugeborenen entwickeln sich die Symptome erst nach dem Abstillen, d.h. nach der reinen Ernährung mit Muttermilch, in der Lactase enthalten ist (Segal, 1995b).

Während Milchunverträglichkeit durch Lactasezusatz zu Milchprodukten vermieden werden kann, stehen für die in ihrem Verlauf schwerwiegendere Galactosämie keine geeigneten Therapeutika zur Verfügung: Die Behandlung an Galactosämie erkrankter Personen erfolgt unter strikter Einhaltung einer Lactose- und Galactose-freien Diät.

### 3.4. Lactase-Phlorizin-Hydrolase

Die Lactase, oder auch Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH; EC 3.2.1.23/62) gehört zu den O-Glycosyl-Hydrolasen (EC 3.2.1.x), einer umfassenden Gruppe von Enzymen, die die glycosidische Bindung zwischen zwei oder mehr Monosacchariden oder zwischen einem Kohlenhydrat- und einem Nicht-Kohlenhydratanteil hydrolysieren (Davies et al., 1995).

Aufgrund ihrer hohen Variabilität wurden Aminosäuresequenzen von 482 Glycosyl-Hydrolasen und verwandten Enzymen miteinander verglichen. Insgesamt konnten davon 467 Sequenzen, die 52 EC-Einträgen zugeordnet werden konnten, zu 45 Familien zusammengefaßt werden. Von diesen Familien waren 30 monospezifisch (mit nur einer EC-Nummer) und 22 polyspezifisch (mit mindestens 2 EC-Nummern) (Henrissat, 1991; Henrissat et al., 1993).

In dieser Klassifizierung der O-Glycosyl-Hydrolasen wurde die Lactase-Phlorizin-Hydrolase der Familie 1 der Glycosyl-Hydrolasen zugeordnet, der hauptsächlich  $\beta$ -Glucosidasen, 6-Phospho- $\beta$ -galactosidasen und 6-Phospho- $\beta$ -glucosidasen und Myrosinasen angehören (Henrissat, 1991).

Die Lactase besitzt zwei enzymatische Aktivitäten, eine Lactose-Hydrolase-, und eine Phlorizin-Hydrolase-Aktivität. Die natürlichen Substrate der Phlorizin-Hydrolase sind  $\beta$ -Glycosylceramide (Schlegel-Haueter et al., 1972; Colombo et al., 1973; Skovbjerg et al., 1981).

Die beiden enzymatischen Aktivitäten werden unterschiedlichen aktiven Zentren zugeordnet, die in verschiedenen Domänen lokalisiert sind. Dies konnte durch differentielle Hitzeinaktivierung des Proteins, unterschiedliche Sensitivität gegenüber Inhibitoren und gegenseitige Hemmbarkeit durch ihre Substrate gezeigt werden (Colombo et al., 1973; Leese et al., 1973).

Durch die Markierung des Enzyms mit [ $^3\text{H}$ ]Conduritol-B-Epoxid, einem Inhibitor, der kovalent an konservierte Asp- und Glu-Reste der aktiven Zentren von Glucosidasen bindet (Legler 1990), konnte herausgefunden werden, dass es sich bei den Carboxylat-Nucleophilen der Prä-Pro-Lactase-Phlorizin-Hydrolase um die Glutamatreste an den Positionen 1273 und 1749 handelt. Die an der Disaccharidhydrolyse beteiligten Protonendonatoren, bei denen es sich ebenfalls um Glutamatreste handelt, sitzen in der Prä-Pro-Lactase-Phlorizin-Hydrolase an den Positionen 1065 und 1538 (Wacker et al. 1992).

Beide Domänen spalten  $\beta$ -Glucopyranoside und  $\beta$ -Galactopyranoside, wobei die Lactase-Domäne hydrophile Aglycone, wie Lactose und Cellobiose bevorzugt (Colombo et al., 1973), während die Phlorizin-Hydrolase-Domäne hydrophobe Substanzen wie Phlorizin, Glycosylceramide, 3-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid und andere aryl- $\beta$ -Glycoside bevorzugt (Colombo et al., 1973; Leese et al., 1973; Skovbjerg et al., 1981).

In Tabelle 3.1. sind unterschiedliche natürliche und künstliche Substrate der Lactase-Phlorizin-Hydrolase, sowie deren relative Enzymaktivitäten für die jeweiligen Substrate aufgelistet (Skovbjerg et al., 1981):

Substrat	Enzymaktivität [%]
Lactose	100
Phlorizin	22
Cellobiose	14
Gentobiose	0,7
<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -galactosid	13
<i>o</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -galactosid	17
<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -glucosid	10
Phenyl- $\beta$ -galactosid	0,1
<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -glucuronid	<0,1
2-Naphthyl- $\beta$ -galactosid	<0,01
6-Bromonaphthyl- $\beta$ -galactosid	<0,1

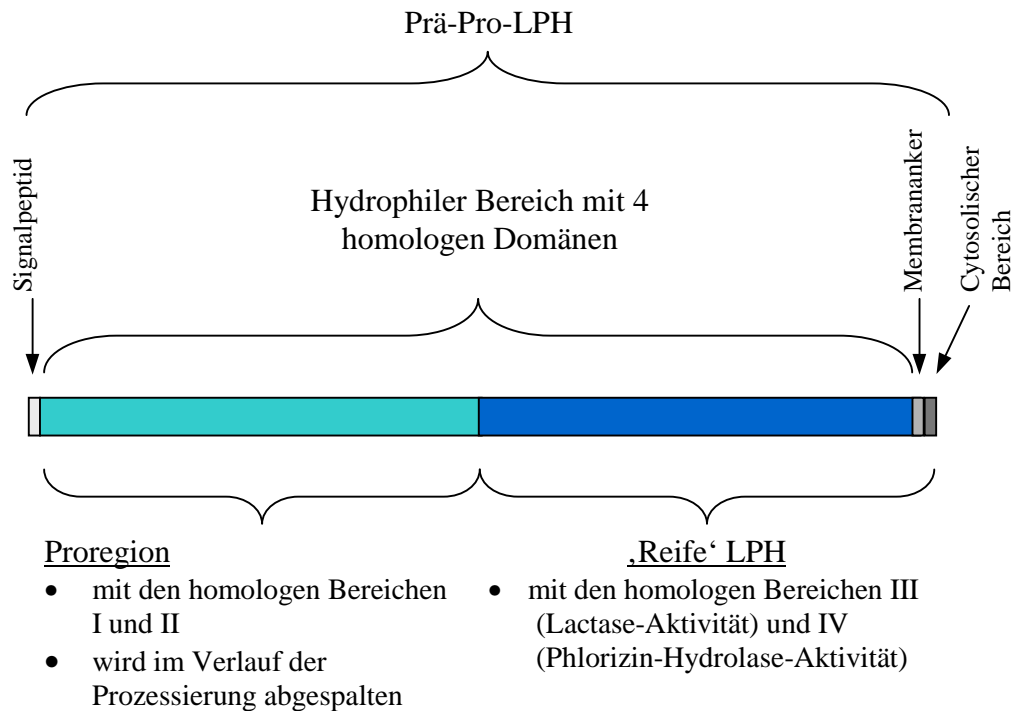
**Tab. 3.1.:** Substratspezifität der Lactase-Phlorizin-Hydrolase. Die Werte spiegeln die prozentuale Enzymaktivität im Vergleich mit der Aktivität für das Substrat Lactose wieder [Skovbjerg et al., 1981].

Das ca. 55 kb große, menschliche Lactase-Phlorizin-Hydrolase-Gen ist im menschlichen Genom auf dem ‚langen Arm‘ des Chromosoms 2 lokalisiert (Kruse et al., 1988). Durch Southern Blotting mit LPH-cDNA und S1-Mapping wurde ermittelt, dass die genetische Information des Lactase-Phlorizin-Hydrolase-Gens in 17 Exons lokalisiert ist (Boll et al.,

1991). Im Verlauf der Transkription werden nicht-codierende DNA-Abschnitte (Introns) durch extensives Spleißen entfernt, so dass die funktionelle mRNA nur noch aus 6282 Nucleotiden besteht, welche die Exons kodieren (Mantei et al., 1988). Die LPH-cDNA besteht aus 4 internen, sich wiederholenden Sequenzbereichen. Zwei Wiederholungen liegen im Bereich der Proregion, die beiden weiteren im Bereich der reifen Lactase-Phlorizin-Hydrolase. Sie entsprechen der Lactase- bzw. der Phlorizin-Hydrolase-Domäne (Boll et al., 1991).

Die Lactase-Phlorizin-Hydrolase wird als ein langes, einzelkettiges Vorläuferprotein von ca. 220 kDa synthetisiert, das durch zahlreiche posttranslationale Modifikationen in die endgültige reife, im Darm vorliegende Form überführt wird (Danielsen et al., 1984; Skovbjerg et al., 1984; Hauri et al., 1985; Buller et al., 1987; Naim et al., 1987). Die Untersuchung der vollständigen Primärstruktur des Lactase-Phlorizin-Hydrolase Vorläufers (Prä-Pro-LPH) (Mantei et al., 1988) führte zu dem in Abb. 3.4. gezeigten Ergebnis (Wacker et al., 1992; Villa et al., 1993):

1. AS 1 – 19: Signalsequenz
2. AS 20 – 1882: Hydrophiler Abschnitt mit vier ähnlich aufgebauten Bereichen (Domänen), von denen nur zwei im reifen Bürstensaumenzym vorkommen und die aktiven Zentren der Lactose- und Phlorizin-Hydrolase enthalten.
3. AS 1883 – 1902: Hydrophober membrandurchspannender Teil nahe dem Carboxylende, der als Membrananker dient.
4. AS 1903 – 1926: Kurzer hydrophiler, cytosolischer Bereich am Carboxylende



**Abb. 3.4.:** Schematische Darstellung des Aufbaus des Vorläuferproteins der Lactase-Phlorizin-Hydrolase.

Das Vorläuferprotein der Lactase-Phlorizin-Hydrolase, die Prä-Pro-Lactase-Phlorizin-Hydrolase, unterliegt einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen. Im endoplasmatischen Retikulum spaltet zunächst eine Signalpeptidase das Signalpeptid ab. Die daraus resultierende Pro-LPH wird anschließend im Golgi-Apparat zunächst zu einem mannosereichen Zwischenprodukt und dann zum komplex glycosylierten Protein modifiziert (Hauri et al., 1979; Skovbjerg et al., 1984). Die Abspaltung der Pro-Region erfolgt entweder im *trans*-Golgi-Bereich, oder direkt am Bürstensaum, jedoch ist weder bekannt, welche Proteasen hier beteiligt sind, noch wo ihre Schnittstellen liegen (Danielsen et al., 1984; Hauri et al., 1985; Naim et al., 1987; Lottaz et al., 1992; Naim et al., 1992; Semenza, 1996; Jacob et al., 1997).

Die hohe Homologie von Proregion (Bereiche I und II in Abb. 3.4.) und reifem Enzym (Bereiche III und IV in Abb. 3.4.), bzw. allen vier Enzymabschnitten untereinander läßt vermuten, dass die menschliche Lactase-Phlorizin-Hydrolase im Laufe der Evolution durch zwei Genduplikationen entstanden ist (Mantei et al., 1988). Dies wird durch die Tatsache

bestätigt, dass Lactaseaktivität auf Säugetiere beschränkt ist, während Phlorizin Hydrolase-Aktivität in allen Vertebraten vorkommt, so dass dieses Enzym der phylogenetische Vorläufer der Lactase-Phlorizin-Hydrolase sein könnte (Grabnitz et al., 1991).

Weiterhin weist die hohe Homologie zwischen Proregion und reifem Enzym darauf hin, dass die Proregion eine Funktion im Reifungsprozeß der Lactase-Phlorizin-Hydrolase besitzt. Die Expression verschiedener Abschnitte der humanen Prä-Pro-Lactase-Phlorizin-Hydrolase in COS-Zellen führte zu der Erkenntnis, dass die Proregion nötig ist, damit das Protein die Plasmamembran erreichen kann (Oberholzer et al., 1993), d.h. um ein transportfähiges Enzym zu erhalten.

Die Annahme jedoch, dass der Vorläufer der Lactase-Phlorizin-Hydrolase notwendig ist, um eine enzymatisch aktive Lactase-Phlorizin-Hydrolase zu erhalten (Naim et al., 1994), konnte nicht aufrecht erhalten werden. Es wurde davon ausgegangen, dass die Proregion des Enzyms während der Faltung im Endoplasmatischen Retikulum als intramolekulares Chaperon dient. Die Expression der reifen Lactase-Phlorizin-Hydrolase in Abwesenheit der Proregion in intestinalen Epithelzellen (HAT 29-G = spezialisierte sekretorische Zellen) resultierte jedoch in einem enzymatisch aktiven und transportfähigen Enzym (Jost et al., 1997). Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Proregion die Entwicklung der Lactase-Aktivität des reifen Enzyms positiv beeinflusst. Bei der Expression des reifen Enzyms in Abwesenheit der Proregion in COS-Zellen entwickelte sich nach drei Tagen Lactaseaktivität, in Anwesenheit der Proregion jedoch schon nach einem Tag. Die Proregion vervielfacht also die Expression der reifen Lactase-Phlorizin-Hydrolase auf der Zelloberfläche (Jost et al., 1997).

### **3.5. Hefen als Expressionssysteme**

Bei der Frage nach einem zur Expression der Lactase-Phlorizin-Hydrolase geeigneten Expressionssystem gibt es einige Vorteile, die Hefen gegenüber anderen Systemen, wie Bakterien, Zelllinien oder Phagen besitzen.

Hefen bieten im Gegensatz zu *E. coli* eine Anzahl von Vorteilen in Bezug auf die Expression komplexer Proteine. Es handelt sich um einzellige Organismen, die trotz ihrer geringen Größe in der Komplexität ihres Aufbaus Pflanzen- und Tierzellen ähneln. Sie besitzen also einerseits die Vorteile bakterieller Systeme hinsichtlich Manipulation und Wachstum, sowie

andererseits die eukaryotischer Systeme hinsichtlich der Fähigkeit, posttranslationale Prozessierung und Modifikation von Proteinen durchzuführen (Buckholz et al., 1991).

### 3.5.1. *Pichia pastoris*, eine zur Expression heterologer Proteine geeignete Hefe

Die Hefe *Pichia pastoris* ist für die Expression heterologer Proteine eines der am besten charakterisierten Systeme (Cregg, 1993). Ursprünglich wurde sie von der Phillips Petroleum Company in den 70er Jahren zur Produktion von ‚Single cell‘-Protein (SCP) entwickelt (Wegner, 1990). Aufgrund der Ölkrise der 70er Jahre, bzw. des dadurch stark angestiegenen Methanpreises, sowie des gleichzeitig gefallenen Sojabohnenpreises, konnte *Pichia pastoris* als SCP-Lieferant jedoch nicht mehr mit der Sojabohne konkurrieren. In Zusammenarbeit mit dem Salk Institute of Biotechnology/Industrial Associates. Inc. (SIBIA, La Jolla, CA) wurde *Pichia pastoris* daraufhin zu einem System für die Expression heterologer Proteine entwickelt (Cregg et al., 1985).

Als methylotrophe Hefe ist *Pichia pastoris* in der Lage mit Methanol als einziger C-Quelle zu wachsen. Die Methanolverstoffwechslung findet in den Peroxisomen statt (Veenhuis et al., 1983). Die durch das Enzym Alkoholoxidase (AOX) katalysierte Oxidation von Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid stellt die erste Reaktion der Methanolverstoffwechslung dar.

Folgende Tatsache macht *Pichia pastoris* zur Expression heterologer Proteine besonders interessant: Das Enzym Alkoholoxidase ist in Zellen, die auf Glucose, Glycerin oder Ethanol wachsen, nicht nachweisbar. In Zellen dagegen, die auf Methanol als einziger C-Quelle wachsen, macht sie bis zu 30% des Zellproteins aus (Couderc et al., 1980). Methanol wirkt dabei als Induktor für den Promotor der Alkoholoxidase-Gene *AOX1* und *AOX2*, wobei *AOX1* für den überwiegenden Teil der Alkoholoxidase-Aktivität in den Zellen verantwortlich ist (Couderc et al., 1980; Roggenkamp et al., 1984; Tschopp et al., 1987). Daraus folgt, dass mittels Methanol unter der Kontrolle des AOX-Promotors exprimiertes, heterologes Protein in großen Mengen, über ein leicht regulierbares System hergestellt werden kann. Bezüglich ihrer Fähigkeit, Methanol zu verwerten, werden drei Typen von *Pichia pastoris*-Stämmen unterschieden. Zusätzlich zum methanolverwertenden Wildtyp  $Mut^+$  ( $Mut^+$ : **m**ethanol **u**tilizing **p**lus phenotype) gibt es Stämme mit *AOX*-Mutationen. Dies sind einerseits  $Mut^S$ -Stämme ( $Mut^S$ : **m**ethanol **u**tilizing **s**low phenotype), bei denen *AOX1* teilweise entfernt

wurde, so dass dieser Stamm auf das schwächere *AOX2* zurückgreifen muß und auf Methanol wesentlich langsamer wächst. Bei *Mut<sup>-</sup>*-Stämmen (*Mut<sup>-</sup>*: **m**ethanol **u**tilizing **m**inus phenotype) hingegen wurden beide *AOX*-Gene deletiert, so dass sie unfähig sind, auf Methanol als Kohlenstoffquelle zu wachsen. All diese Stämme, sogar die *Mut<sup>-</sup>*-Stämme, sind aufgrund ihres *AOX1*-Promotors in der Lage Expressionen auf hohem Niveau zu induzieren (Cereghino et al., 2000).

Alle für *Pichia pastoris* entwickelten Expressionsvektoren wurden als *E. coli*/*Pichia pastoris*-,Shuttle'-vektoren konstruiert. Sie enthalten einen Replikationsstartpunkt für *E. coli* und verschiedene Markergene für beide Organismen. Zur Expression heterologer Proteine dient ein ca. 900 Basen großes Fragment, das aus der 5'-Promotorregion des *AOX1*-Gens, aus der Transkriptionsterminationssequenz desselben Gens und einem zwischengeschalteten Polylinker besteht (Cregg et al., 2000).

Sämtliche zur Expression heterologer Proteine entwickelten *Pichia pastoris*-Stämme leiten sich von dem Wildtyp-Stamm NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL) ab (Cregg et al., 2000). Die meisten dieser Stämme besitzen mindestens eine, zur selektiven Markierung geeignete Mutation. Mögliche Selektivmarker sind unter anderen Deletionen in der Aminosäurebiosynthese ( z.B. im *His4*- oder *Arg4*-Locus). Solche Stämme sind nicht mehr in der Lage auf Minimalmedium ohne Zusatz der jeweiligen Aminosäure, also Histidin oder Arginin zu wachsen (Cregg et al., 2000). Als Resistenzmarker dient bei *Pichia pastoris* häufig das *Sh ble*-Gen aus *Streptoalloteichus hindustanus*, das Resistenz gegen das Bleomycin-verwandte Antibiotikum Zeocin verleiht (Cregg et al., 1985; Cregg et al., 1989; Higgins et al., 1998). Interessant ist Zeocin hierbei jedoch vor allem deswegen, weil es in Pro- und Eukaryonten als Selektionsmarker verwendet werden kann, so dass für Klonierungsarbeiten in Prokaryonten kein weiteres Resistenzgen in den Klonierungsvektor eingebracht werden muß.

Die Expression von Fremdgenen in *Pichia pastoris* erfolgt erst nach Integration der entsprechenden DNA in das Genom der Hefe. Lineare DNA-Fragmente erzeugen dabei durch homologe Rekombination durch ein ‚Cross Over‘-Ereignis zwischen der zu transformierenden DNA und homologen Regionen im Genom stabile Transformanden (Cregg et al., 1985; Cregg et al., 1989). Die resultierenden ‚Integrierten‘ zeigen in Abwesenheit selektiven Drucks extreme Stabilität. Die Geninsertion in den *AOX1*-Locus führt zur Insertion

eines oder mehrerer verwendeter, linearisierter Klonierungsvektoren vor oder hinter *AOX1*-Genen.

Ein großer Vorteil von *Pichia pastoris* gegenüber bakteriellen Expressionssystemen besteht darin, dass die Hefe in der Lage ist, posttranslationale Modifikationen durchzuführen (Cregg et al., 2000). Wie höhere Eukaryonten spaltet *Pichia pastoris* im Laufe der Proteinprozessierung Signalsequenzen ab, bildet Disulfidbrücken aus und heftet Lipide an. Überdies werden *N*- und *O*-Glykosylierungen an Proteinen durchgeführt. *N*-Glykosylierungen finden nur innerhalb der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr statt. Die angeknüpften Oligosaccharidketten bestehen aus Mannoseeinheiten. Die Länge dieser Ketten ist bei *Pichia pastoris* allerdings nicht vorherzusagen. Die von *Pichia pastoris* sekretierte rekombinante Invertase weist vor allem aus 8 – 12 Mannoseeinheiten aufgebaute Oligosaccharidketten auf, jedoch nur wenige Ketten mit bis zu 30 Mannoseeinheiten (Sreerikshna et al., 1996). Allerdings sind andere von *Pichia pastoris* sekretierte rekombinante Proteine, wie z.B. HIV-gp 120 hyperglykosyliert, was bedeutet, dass die angeknüpften Oligosaccharidketten aus 50 – 150 Mannoseeinheiten bestehen (Scorer et al., 1992).

Im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* führt *Pichia pastoris* keine  $\alpha$ -1,3-Verknüpfungen zwischen Mannoseeinheiten durch, da sie keine  $\alpha$ -1,3-Mannosyl-Transferase-Aktivität besitzt (Trimble et al., 1991; Cregg et al., 1993). Dies ist von Vorteil, da  $\alpha$ -1,3-Mannoseseitenketten hoch immunogen und deshalb als Therapeutika ungeeignet sind (Romanos et al., 1992).

Ein Nachteil bei der Verwendung von *Pichia pastoris* als Expressionssystem ist, dass zur Analyse erhaltener Klone keine Plasmidisolierung durchgeführt werden kann, sondern eine Reisolierung mittels PCR nötig ist.

*Pichia pastoris* ist ein für die Expression heterologer Proteine wichtiger Organismus. Seit seiner Markteinführung wurden zahlreiche Proteine aus Bakterien, Viren, Pilzen, Protisten, Pflanzen, Wirbellosen und Wirbeltieren, dem Menschen inbegriffen, mit Hilfe dieses Systems exprimiert (Cregg et al., 2000).

In Tab. 3.2. sind einige Beispiele für menschliche Proteine aufgelistet, die von *Pichia pastoris* erfolgreich rekombinant produziert werden konnten:

<b>Protein</b>	<b>Ausbeute</b>	<b>Sekretion/ Signalsequenz</b>	<b>Referenz</b>
<b><math>\alpha(1,3/4)</math>-Fucosyltransferase</b>	30 mg/l	S, $\alpha$ -F	(Gallet et al., 1998)
<b><math>\alpha</math>-1,2-Mannosidase</b>	k.A.	S, $\alpha$ -F	(Tremblay et al., 1998)
<b><math>\alpha</math>-N-Acetylgalactosaminidase</b>	11,6 mg/l	S, $\alpha$ -F	(Zhu et al., 1998)
<b>Insulin</b>	k.A.	S, synthetischesSignal	(Kjeldsen et al., 1999)
<b>Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 (IGF-1)</b>	600 mg/l	S, $\alpha$ -F	(Brierley, 1998)
<b>Interleukin-17 (hIL-17)</b>	0,35 mg/l	S, $\alpha$ -F	(Murphy et al., 1998)
<b>Lysosomale <math>\alpha</math>-Mannosidase</b>	83 $\mu$ g/l	S, nativ	(Liao et al., 1996)
<b>Pankreatische <math>\alpha</math>-Amylase</b>	20 mg/l	S, $\alpha$ -F	(Rydberg et al., 1999)
<b>Pankreatische Triglycerid- Lipase</b>	75 mg/l	S, $\alpha$ -F	(Yang et al., 1998)
<b>Serumalbumin</b>	3 g/l	S, nativ	(Barr et al., 1992; Ikegaya et al., 1997; Ohtani et al., 1998)

**Tab. 3.2.:** Beispiele für die heterologe Genexpression menschlicher Proteine in *Pichia pastoris*. S: sekretiert;  $\alpha$ -F: Signalsequenz,  $\alpha$ -Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae*; k.A.: keine Angaben.

### 3.6. Aufgabenstellung

Galactosämie ist eine ernstzunehmende Krankheit, die durch medikamentöse Behandlung mit einem Inhibitor gegen das erste Enzym des Lactosemetabolismus, die Lactase-Phlorizin-Hydrolase, behandelt werden könnte.

Ziel dieser Arbeit war, die rekombinante Lactase-Phlorizin-Hydrolase zur Verfügung zu stellen, um Verbindungen mit inhibitorischer Wirkung auf die Lactaseaktivität zu charakterisieren bzw. durchzumustern und so alternative Ansätze zur Behandlung von Galaktosämie zu eröffnen. Ein Vorteil dieser rekombinanten Herstellung wäre zukünftig die Erzeugung genetischer Variationen, die in ihrer Vielzahl kaum aus Patienten isoliert werden können.

Zunächst sollte die menschliche Lactase-Phlorizin-Hydrolase aus Dünndarmzellen isoliert und dann in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert werden. Hierbei sollte ausgehend von mRNA cDNA synthetisiert werden, die als Template für die Amplifizierung der Lactase-Phlorizin-Hydrolase dienen sollte. Nach der Klonierung der Lactase-Phlorizin-Hydrolase, sowie der Lactase- und der Phlorizin Hydrolase-Domäne in die Hefe *Pichia pastoris* sollte ihre Expression optimiert werden. Mit der heterolog exprimierten Lactase-Phlorizin-Hydrolase, bzw. Lactase- und Phlorizin Hydrolase-Domäne, sollte dann auch die Quantifizierung dieser Enzyme möglich sein.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1. Geräte

Tab. 4.1. zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Geräte:

Geräte	Gerätebezeichnung	Firma
<b>Agarose-Gelelektrophorese-Systeme</b>	DNA Sub Cell™, Mini Sub™ DNA Cell Mini Sub™ Cell GT	Bio Rad
<b>Autoklav</b>	Autoklav IP 44 Autoclav Pacs 2000	Certoclav Getringe
<b>DNA-Sequenzierer</b>	373A DNA-Sequencer 377 DNA-Sequencer	Applied Biosystems
<b>Elektroporation</b>	Gene Pulser®, Pulse Controller	BioRad
<b>Netzgeräte (Agarose-, Polyacrylamid-Gelelektrophorese)</b>	Power Pac 300 PowerSupply 200/ 2.0	BioRad
<b>Homogenisator</b>	Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel
<b>Inkubatoren</b>	HAT-Inkubator (30°C, 37°C)	Infors AG
<b>Mikroskop</b>	Axiolab E	Zeiss
<b>Retsch-Mühle (Mixer Mill)</b>	MM 2000	Retsch
<b>pH-Meter</b>	pH-Meter 620 Digitales pH-Meter pH252	Metrohm WTW
<b>Photometer</b>	Ultrospec® 3000 UV/VIS	Pharmacia Biotech
<b>Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Systeme</b>	Minigel-Twin G42 Geltrockner 583	Biometra® BioRad
<b>Protein Blotter</b>	Trans Blot SD	BioRad

<b>Protein Sequenzierer</b>	491 Protein Sequencer 140 C Microgradient System Power Macintosh 7200/90	Applied Biosystems Applied Biosystems Apple Macintosh
<b>Thermocycler (PCR)</b>	Robocycler <sup>®</sup> Gradient 40 Mastercycler Gradient	Stratagene <sup>®</sup> Eppendorf
<b>Thermomixer</b>	Thermomixer 5436	Eppendorf
<b>Ultrafiltrationssystem</b>	Amicon 8050	Amicon
<b>Vortexer</b>	Vortex Genie 2	Scientific Industries
<b>Waagen</b>	Basic MC1 Research RC 210 D	Sartorius Sartorius
<b>Zentrifugen</b>	Tischzentrifuge 5417C Kühlzentrifuge 5415 R Sorvall <sup>®</sup> RC-5B Refrigerated Superspeed C (Rotor: SA 600) Zentrifuge Universal 30 F	Eppendorf Eppendorf DuPont Instruments Hettich

**Tab. 4.1.:** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

#### 4.2. Chemikalien, Biochemikalien, Kits, etc

Es wurden folgende Chemikalien, Biochemikalien (Enzyme, Primer etc.) und Kits verwendet (Tab. 4.2.):

<b>Substanz /Kit</b>	<b>Firma</b>
<b>Ampicillin</b>	Fluka, Deisenhofen, Deutschland
<b>Acrylamid 30 % (m/v) in Wasser mit 0,8 % Bisacrylamid</b>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Agarose</b>	Serva, Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP)</b>	Roche, Mannheim, Deutschland
<b>BCA-Kit zur Proteinbestimmung</b>	Pierce, Baoud-Beijerland, Niederlande

<b>cDNA-Synthese Kit (cDNA Cycle Kit)</b>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<b>Chemikalien zur DNA- und Proteinsequenzierung</b>	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
<b>Chemikalien zur Herstellung von Medien</b>	Difco, Augsburg, Deutschland
<b>o-Dianisidin</b>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
<b>DNA-Polymerasen (Taq-, Pfu-)</b>	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Filter für Ultrafiltration Amicon YM; Amicon</b>	Millipore, Bedford, MA USA
<b>Geextraktionskit (QIAquick Gel Extraction Kit)</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Lactose</b>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
<b>Membranen (PVDF- und Nitrocellulose) und Filterpapiere zum Blotten</b>	BioRad, Hercules, CA, USA
<b>Mikrotiterplatten (96-well)</b>	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<b>Oligonukleotide</b>	MWG, Ebersberg, Deutschland ARK, Darmstadt, Deutschland Gibco BRL GmbH, Eggenstein, Deutschland
<b>Organische Lösungsmittel</b>	Merck, Darmstadt, Germany
<b>PLASMID MINI UND MIDI KIT (PLASMID PURIFICATION KIT)</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Q-Lösung</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Restriktionsenzyme</b>	Roche, Mannheim, Deutschland
<b>RNA-Isolierungs Kit (RNeasy Mini Kit)</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Standard für Agarosegele</b>	Gibco BRL GmbH, Eggenstein, Deutschland
<b>Standard für SDS-PA-Gele</b>	BioRad, München, Deutschland
<b>T4-DNA-Ligase</b>	Roche, Mannheim, Deutschland
<b>Zeocin</b>	Invitrogen, Groningen, Niederlande

**Tab. 4.2.:** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Biochemikalien, Kits, etc.

### 4.3. Oligonukleotide

In Tab. 4.3. sind die in dieser Arbeit bei der PCR verwendeten Oligonukleotide aufgelistet:

Bezeichnung	Nucleotidsequenz (5'⇒3')	Verwendungszweck
<b>5' AOX1</b>	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC	Sequenzierprimer für pPICZαA
<b>3' AOX1</b>	GGA TGT CAG AAT GCC ATT TGC	Sequenzierprimer für pPICZαA
<b>β-Actin</b>	Forward und Reverse-Primer stammen von der Firma Clontech; ohne Sequenzdaten	Positivkontrolle für RNA- Isolierung und cDNA-Synthese
<b>LPH-3FW</b>	CCA TCT GAG GTG CCC TCC AAG G	Test-Primer LPH
<b>LPH-4RV</b>	GTA CAG AAA CTC ATC CTC CCT GG	Test-Primer LPH
<b>LPH-5RV</b>	GGG GAT CCT TGG CAG AGA AGG G	Test-Primer LPH
<b>LPHIII-RVOL</b>	GAA ACT CAT CCT CCC TGG CCA GTG GCA TGC CGT TGT TGG TAA TG	Overlap-Extension
<b>LPHIV-FWOL</b>	CAT TAC CAA CAA CGG CAT GCC ACT GGC CAG GGA GGA TGA GTT TC	Overlap-Extension
<b>LPHIII_SeqP1FW</b>	GGA GAC ATC GCC TGT GAC AGC	Sequenzierung der Lactase- Domäne
<b>LPHIII_SeqP2Rev</b>	CCA GTG TGT ACT GAG GCT CAG C	Sequenzierung der Lactase- Domäne
<b>LPHIV_SeqP3Rev</b>	CCA GCC TCC TAC ATC TTG GAG C	Sequenzierung der Gesamt- Lactase-Phlorizin-Hydrolase
<b>LPHIV_SeqP4FW</b>	CCA CCA GGT ACA TCA ATC AAG C	Sequenzierung der Phlorizin Hydrolase-Domäne
<b>LPHIV_SeqP5FW</b>	CCA GTC AAG GTG GCG TGA TTT CC	Sequenzierung der Phlorizin Hydrolase-Domäne
<b>LPHIV_SeqP6FW</b>	CCT CAA TGA CAC TGC AAG G	Sequenzierung der Phlorizin Hydrolase-Domäne
<b>LPH_EcoFW</b>	CCG GAA TTC GTC AGA GCC TTC ACT TTT CC	Amplifizierung und Klonierung der Lactase-Domäne

<b>LPH_EcoRV</b>	CCG GAA TTC TGG CAT GCC GTT GTT GGT AAT G	Amplifizierung und Klonierung der Lactase-Domäne
<b>LPH-TestFW</b>	CAG GCT GGG CAC CAT ATA GGA TAG C	Test-Primer LPH
<b>LPH-TestRV</b>	CCT ATC AGT ATC CTC CGT GTT CGG	Test-Primer LPH
<b>LPH_XbaFW</b>	CTA GTC TAG ACT GGC CAG GGA GGA TGA GTT TC	Amplifizierung und Klonierung der Phlorizin Hydrolase-Domäne
<b>LPH_XbaRV</b>	CTA GTC TAG ATC ATC AAG CTG TCT GTG CTT CTG TGG	Amplifizierung und Klonierung der Phlorizin Hydrolase-Domäne
<b>M13</b>	<i>GTA AAA CGA CGG CCA GT</i>	Sequenzierprimer für pUC18
<b>M13_Rev</b>	AAC AGC TAT GAC CAT G	Reverser Sequenzierprimer für pUC 18

**Tab. 4.3.:** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

#### 4.4. Mikroorganismen und Plasmide

Die in der Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tab. 4.4. aufgelistet:

Spezies	Stamm	Genotyp	Firma
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argFV169</i> ), $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, F <sup>-</sup>	Pharmacia
<i>Pichia pastoris</i>	GS115	<i>his4</i>	Invitrogen

**Tab. 4.4.:** In der vorliegenden Arbeit verwendete Mikroorganismen.

Die verwendeten Plasmide sind in Tab. 4.5. aufgelistet:

Spezies	Genotyp	Firma
pUC18	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> ; Ampicillinresistenz	MBI Fermentas
pPICZ $\alpha$ A	Schaukelvektor für <i>E. coli</i> und <i>Pichia pastoris</i> mit Zeocinresistenz	Invitrogen

**Tab. 4.5.:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

## 4.5. Arbeiten mit Mikroorganismen

### 4.5.1. Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte, sofern nicht anders angegeben in LB-Medium (Luria Bertani-Medium (Luria et al. 1960)) mit den jeweils erforderlichen Antibiotika. Bei der Kultivierung von *E. coli* mit dem Plasmid pUC 18 wurde das Antibiotikum Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben, enthielt *E. coli* jedoch das Plasmid pPICZ $\alpha$ A wurde Zeocin zu einer Endkonzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$  zum Medium hinzugefügt.

Die Zusammensetzung von LB-Medium ist in Tab. 4.6. dargestellt:

Bestandteil	Menge [g/l]
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	5
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

**Tab. 4.6.:** Zusammensetzung von LB-Medium.

Medien wurden 20 min bei 121 °C sterilisiert. Feste Nährböden für Agarplatten enthielten 15 g/l Agar. Die erforderlichen Antibiotika wurden erst nach dem Autoklavieren steril hinzugefügt.

*E. coli*-Flüssigkulturen wurden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde durch photometrische Trübungsmessung bei 578 nm (OD<sub>578</sub>) verfolgt.

Zur langfristigen Lagerung wurden Glycerinkulturen der Bakterienstämme angelegt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Dazu wurde 1 ml einer exponentiell gewachsenen Kultur ( $\text{OD}_{578} \approx 1$ ) mit 1 ml sterilem, 87%igem (w/w) Glycerin vermischt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

Vor ihrer Verwendung wurden die Glycerinkulturen auf Selektivagarplatten kultiviert und auf Kontaminationen überprüft.

Die kurz- und mittelfristige Lagerung der Bakterienstämme erfolgte auf Selektivagarplatten bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Kühlraum.

#### 4.5.2. Kultivierung und Lagerung von *Pichia pastoris*

Die Kultivierung und Lagerung der Hefe *Pichia pastoris* erfolgte in YPD-Medium (Yeast-extract peptone dextrose-medium), dessen Zusammensetzung in Tab. 4.7. aufgelistet ist:

Bestandteil	Menge [g/l]
Hefeextrakt	10
Pepton	20
Glucose	20

**Tab. 4.7.:** Zusammensetzung von YPD-Medium.

Hefeextrakt und Pepton wurden in 900 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  gelöst und bei  $121^{\circ}\text{C}$  für 20 Min autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 100 ml einer 20 %-igen Glucose-Lösung (w/v) und das Antibiotikum Zeocin zu einer Endkonzentration von  $100\ \mu\text{g/ml}$  steril hinzugefügt.

Zur Kultivierung von *Pichia pastoris* wurden 50 ml YPD-Medium mit einer Kolonie eines Einzelkolonieaustreiches inokuliert und 2-3 Tage bei  $30^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Zur längerfristigen Lagerung wurde 1 ml einer exponentiell gewachsenen YPD-Kultur ( $\text{OD}_{578} \approx 1$ ) mit 1 ml sterilem, 87%igem (w/w) Glycerin vermischt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Die kurz- und mittelfristige Lagerung erfolgte auf Selektivagarplatten bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

Zur Expressionskultivierung wurde einerseits komplexes Medium BMGY bzw. BMMY (**B**uffered **c**omplex **g**lycerol oder **m**ethanol medium) verwendet, dessen Zusammensetzung in Tab. 4.8. aufgelistet ist:

BMGY		BMMY	
Pepton			20 g/l
Hefeextrakt			10 g/l
Kaliumphosphatpuffer			100 mM, pH 6,0
Biotin			$4 \times 10^{-5}$ %
Glycerin	1 %	Methanol	0,5 %

**Tab. 4.8.:** Zusammensetzung von BMGY- und BMMY-Medium.

Pepton und Hefeextrakt wurden in 900 ml dH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Danach wurden 100 ml ebenfalls autoklavierter 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0) und die sterilfiltrierte Biotinlösung hinzugefügt. Abhängig von Vor- und Hauptkultur wurden dann entweder autoklaviertes Glycerin oder Methanol zugegeben.

Andererseits wurde zur Expressionskultivierung das Minimalmedium BMG bzw. BMM (**B**uffered **m**inimal **g**lycerol oder **m**ethanol **m**edium) + Histidin verwendet, dessen Zusammensetzung in Tab. 4.9. aufgelistet ist:

BMG		BMM	
YNB (Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate without amino acids)			1,34 %
Kaliumphosphatpuffer			100 mM, pH 6,0
Biotin			$4 \times 10^{-5}$ %
Histidin			0,004 %
Glycerin	1 %	Methanol	0,5 %

**Tab. 4.9.:** Zusammensetzung von BMG- und BMM-Medium.

100 ml sterilfiltrierte YNB-Lösung wurden zu 700 ml autoklaviertem, abgekühltem dH<sub>2</sub>O gegeben. Anschließend wurden 100 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0) und sterilfiltrierte Biotin- sowie Histidinlösung hinzugefügt. Abhängig von Vor- und Hauptkultur wurden dann entweder autoklaviertes Glycerin oder Methanol zugegeben.

#### **4.5.3. Transformation von *Escherichia coli* durch Hitzeschock**

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50 ml LB-Medium 1:100 mit einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von ca. 0,4-0,7 inkubiert. Nach Ernte der Zellen wurde das Pellet in TSS-Lösung (10 % PEG 6000 oder 15 % PEG 4000, 5 % DMSO und 50 mM MgSO<sub>4</sub> mit LB ad 100 ml; pH 6,5) resuspendiert und zu 200 µl-Portionen aliquotiert. Die kompetenten Zellen konnten entweder sofort zur Transformation eingesetzt werden oder nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert werden. Die Kompetenz blieb so über mehrere Monate erhalten.

Die Transformation erfolgte wie in (Sambrook, 1989) beschrieben. Tiefgefrorene Aliquots (200 µl) kompetenter Zellen wurden dazu auf Eis aufgetaut und mit bis zu 5 µl einer Plasmidlösung (bzw. bis zu 20 µl eines Ligationsansatzes) versetzt und für weitere 20 min auf Eis gehalten. Zur Erleichterung der DNA-Aufnahme mittels Hitzeschock wurde der Ansatz anschließend für 30 s bis 60 s bei 42°C in einem Wasserbad inkubiert und nochmals kurz auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 µl Medium wurden die Zellen zur Ausprägung ihrer Antibiotikaresistenzen 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden schließlich auf Selektivmedium ausplattiert (200 µl/Selektionsplatte) und bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### **4.5.4. Transformation von *Pichia pastoris* durch Elektroporation**

Die Transformation von *Pichia pastoris* erfolgte wie von Invitrogen beschrieben. Dazu wurden 50 ml YPD-Medium (vgl. Tab. 4.7.) mit 5 ml einer *Pichia pastoris*-Übernachtskultur beimpft und bei 30 °C über Nacht kultiviert. Mit 500 µl dieser Kultur wurden 500 ml YPD-Medium in einem 2 l – Kolben inokuliert und bei 30 °C unter Schütteln über Nacht bis zu

einer  $OD_{600}$  von 1,3-1,5 kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1500 x g geerntet und anschließend folgender Waschprozedur unterzogen:

1. Resuspension des Pellets in 500 ml sterilem, eiskaltem Wasser und anschließende Zentrifugation bei 1500 x g.
2. Resuspension des Pellets in 250 ml sterilem, eiskaltem Wasser und anschließende Zentrifugation bei 1500 x g.
3. Resuspension des Pellets in 20 ml steriler, eiskalter 1 M Sorbitollösung und anschließende Zentrifugation bei 1500 x g.
4. Resuspension des Pellets in 1 ml steriler, eiskalter 1 M Sorbitollösung.

Die so erhaltenen kompetenten Zellen wurden in 80  $\mu$ l-Aliquots aufgeteilt, mit je 5-10  $\mu$ g linearisierter Plasmid-DNA (in  $dH_2O$ ) gemischt und in einer Elektroporationsküvette 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in einem Elektroporator (BioRad GenePulser) unter folgenden Bedingungen: 1500 V, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ . Nach dem elektrischen Puls wurden die Transformationsansätze sofort mit 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol vermischt, in sterile 15 ml Falcon-Tubes überführt und für 1-2 h bei 30 °C (ohne Schütteln) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze auf Selektivagarplatten (YPDS mit Zeocin (100  $\mu$ g/ml)) ausgestrichen und für 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

Mit den aus dieser Prozedur resultierenden Kolonien wurden je 5 ml YPD-Medium mit Zeocin (100  $\mu$ g/ml) beimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die genomische DNA dieser Klone isoliert und mittels PCR mit spezifischen Primern auf Insertion des gewünschten DNA-Fragmentes untersucht.

## 4.6. Genetische Methoden

### 4.6.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus menschlichem Gewebe

Gesamt-RNA aus menschlichem Gewebe wurde mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits der Firma Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Das Gewebe wurde dabei zunächst homogenisiert und die Zellen in Gegenwart eines stark denaturierenden guanidinium-isothiocyanat(GITC)-haltigen Puffers lysiert. Dadurch werden im Homogenat enthaltene RNasen sofort inaktiviert, was die Isolierung intakter RNA gewährleistet. Durch Zugabe

70 %igen Ethanols wurden die zur Bindung der RNA an die Silikagel-Matrix nötigen Bedingungen hergestellt. Durch Waschen der an das Säulenmaterial gebundenen Gesamt-RNA konnten vorhandene Kontaminationen effektiv entfernt werden. Mit dH<sub>2</sub>O wurde die hochreine RNA anschließend eluiert.

Mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits werden alle RNA-Moleküle isoliert, die eine Länge von mehr als 200 Nukleotiden aufweisen. Kleinere Moleküle (tRNA, 5,8S RNA, 5S RNA) binden unter den beschriebenen Bedingungen nicht, so dass es zu einer Anreicherung größerer RNA-Moleküle kommt.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in den erhaltenen Eluaten wurde ihre Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. A<sub>260</sub> gleich 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Um eine Aussage machen zu können, sollte A<sub>260</sub> größer sein als 0,15. Die Gesamt-RNA-Menge pro Probe wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Aus dem Verhältnis A<sub>260</sub> : A<sub>280</sub> kann eine Aussage über die Reinheit der isolierten RNA getroffen werden. Dieser Quotient liegt bei reiner, in Wasser aufgenommener RNA zwischen 1,5 und 1,9.

Die in dieser Arbeit aus menschlichem Darmgewebe isolierte Gesamt-RNA wurde entweder sofort mittels reverser Transkription in cDNA umgewandelt oder zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

#### **4.6.2. Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus mRNA**

cDNA wurde unter Verwendung des cDNA-Cycle-Kits für RT-PCR der Firma Invitrogen gemäß den Angaben des Herstellers aus der, nach 4.6.1. hergestellten RNA synthetisiert.

Mit diesem Kit werden mit Hilfe der AMV-Reversen Transkriptase aus mRNA oder Gesamt-RNA als Matrizen, hohe Ausbeuten des ersten cDNA- oder antisense-cDNA-Stranges über die gesamte Länge des RNA-Stranges erzielt. Dieser erste cDNA-Strang dient anschließend

als Template für die Polymerase-Kettenreaktion. Zur Herstellung dieses ersten cDNA-Stranges gibt es mehrere Verfahren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das sogenannte ‚Oligo(dT)-Priming‘ verwendet. Hierbei entsteht durch Anlagerung des im Kit enthaltenen oligo(dT)-Oligonucleotides, an den in der mRNA vorliegenden poly(A)-Schwanz ein kurzer doppelsträngiger Nucleinsäurebereich, der der Reversen Transkriptase als Starter für die Synthese des ersten DNA-Stranges dient (Ibelgaufits 1993). So kann davon ausgegangen werden, dass die cDNA-Synthese in der Nähe des 3'-Endes der RNA-Matrize beginnt.

Als Reverse Transkriptase dient für gentechnologische Zwecke meist das aus einem Vogel-Myeloblastosis-Virus isolierte Enzym AMV-Reverse Transkriptase (Avian myeloblastosis virus).

Zur cDNA-Synthese wurden 0,01 µg-1 µg der in 4.6.1. hergestellten RNA eingesetzt. Nach Zugabe des oligo(dT)-Primers wurde das Gemisch, zur Entfernung der Sekundärstruktur, 10 min bei 65 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde die RT-PCR folgendermaßen, wie in Tab. 4.10. dargestellt, angesetzt:

Komponenten	Volumen [µl]
RNase Inhibitor (RNASEOUT™, Recombinant Ribonuclease Inhibitor; 10 units/µl)	1,0
5x RT-Puffer (500 mM Tris-HCl, pH 8,3; 200 mM KCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5 mM Spermidin)	4,0
100 mM dNTPs (je 25 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	1,0
80 mM Natriumpyrophosphat	1,0
AMV Reverse Transkriptase (10 units/µl)	0,5
	ad 20 µl mit H <sub>2</sub> O

**Tab. 4.10.:** Ansatz einer typischen RT-PCR.

Dieses Gemisch wurde für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend die synthetisierte cDNA 3 min bei 95 °C denaturiert. Für den Fall, dass für die RT-PCR weniger als 100 ng Ausgangsmaterial, d.h. mRNA zur Verfügung standen, konnte die Reverse Transkription durch Zugabe weiterer 0,5 µl AMV Reverser Transkriptase für eine weitere Stunde bei 42 °C fortgesetzt werden.

### 4.6.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) nach Mullis (Mullis et al. 1992)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, DNA-Fragmente enzymatisch *in vitro* zu amplifizieren. Neben der zu amplifizierenden DNA (Target) sind in einem PCR-Ansatz eine DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide (dNTPs), und zwei zu den beiden Enden des Targets komplementäre, synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) enthalten.

Die Amplifizierung der Ziel-DNA erfolgt in 3 Schritten:

1. Denaturierung: Die zu amplifizierende DNA wird bei 95 °C in ihre Einzelstränge zerlegt.
2. Annealing: Die Primer lagern sich bei einer Temperatur von 37-72°C sequenzspezifisch an die komplementären Regionen an den Enden der beiden DNA-Einzelstränge an.
3. Extension: Bei 72 °C synthetisiert die DNA-Polymerase, von den Primern ausgehend den zum Einzelstrang komplementären Strang in 5'-3'-Richtung.

Die Schritte 1.-3. lassen sich bis zu 30 mal wiederholen. Dabei dient die neu synthetisierte DNA in jedem neuen Zyklus als Target, so dass aus einem DNA-Molekül 2<sup>n</sup> DNA-Moleküle entstehen können, wobei n der Zyklenanzahl entspricht.

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt, wie in Tab. 4.11. dargestellt, folgende Komponenten:

Komponente	Volumen [µl]
10 x Reaktionspuffer (100 mM KCl, 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 200 mM Tris-HCl (pH8,8), 20 mM MgSO <sub>4</sub> , 1% Trition X-100 (w/v))	5
dNTPs (10 µM)	4
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4
Q-Lösung (Qiagen)	10
DMSO	5
3'-Primer (20 pM)	2
5'-Primer (20 pM)	2
DNA-Matrize	x (abhängig von der Konzentration der jeweiligen DNA-Lösung)
Taq-Polymerase	1 (ca 1U)
Gesamtvolumen	50 µl (mit dH <sub>2</sub> O aufgefüllt)

Tab. 4.11.: Komponenten einer in dieser Arbeit durchgeführten Standard-PCR.

Bei langen zu amplifizierenden DNA-Fragmenten wurden zur Unterstützung der DNA-Denaturierung DMSO und Q-Lösung hinzugefügt, da auf diese Weise die größten Ausbeuten erzielt werden konnten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten ‚touch down‘-PCR-Reaktionen hatten das in Tab. 4.12. dargestellte Programm:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklusanzahl
<b>Denaturierung</b>	95	4,0	1
<b>Denaturierung</b>	95	1,0	25
<b>Annealing</b>	60	1,5	
	-0,6 °C/Zyklus („ Touch down“)		
<b>Extension</b>	72	2,0	
<b>Extension</b>	72	6,0	1

**Tab. 4.12.:** Ablauf einer ‚Touch down‘-PCR.

Nach Ablauf des PCR-Programms wurde die Amplifizierung des gewünschten Produktes im analytischen Agarosegel überprüft. Die Proben wurden danach entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C eingefroren.

#### 4.6.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Die präparative Isolierung von Plasmid DNA erfolgte unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Purification Kits gemäß den Angaben des Herstellers. Diesem Kit liegt das Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim et al. 1979) zugrunde. Zunächst wurden die Zellen der, je nach Kultivierungsansatz, unterschiedlich großen Kulturen abzentrifugiert. Die Zellen wurden erst in RNaseA-haltigem Resuspensionspuffer aufgenommen, dann mit Lysepuffer lysiert und das Gemisch anschließend mit Neutralisationspuffer versetzt und für 15‘ auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung von im Niederschlag befindlicher genomischer DNA, Proteinen,

Zelltrümmern und SDS wurde anschließend zentrifugiert. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde über eine Anionenaustauscher-Säule gereinigt. Nach ihrer Elution wurde sie mit Isopropanol gefällt, mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer (10 mM Tris und 1 mM EDTA in H<sub>2</sub>O; pH 7,9) aufgenommen. Die aus einem Kulturvolumen von z.B. 2 ml isolierte Plasmid-DNA wurde in 30 µl TE-Puffer gelöst.

In analytischen Ansätzen zur Plasmidisolierung wurde ebenfalls die Extraktionsmethode, basierend auf alkalischer Lyse (Birnboim et al. 1979), verwendet. Jedoch wurde hierbei der Reinigungsschritt über die Anionenaustauscher-Säule ausgelassen. 2 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes wurden abzentrifugiert und das Pellet in 0,2 ml RNaseA-haltigem Resuspensionspuffer aufgenommen. Durch Zugabe von 0,2 ml SDS/NaOH-Puffer erfolgte bei Raumtemperatur die Lyse der Zellen. Zur Neutralisation wurden 0,2 ml Kaliumacetat-Puffer (eiskalt) vorsichtig untergemischt und für 5' auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde das Pellet zur Abtrennung von genomischer DNA, Proteinen und Zelltrümmern, sowie SDS abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA jetzt durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens an Isopropanol gefällt, dann abzentrifugiert und mit 70%igem Ethanol (eiskalt) gewaschen. Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in 30 µl TE-Puffer resuspendiert.

Die Zusammensetzung der zur Plasmidisolierung verwendeten Puffer sind in Tabelle 4.13. aufgelistet:

<b>Pufferbezeichnung</b>	<b>Komponenten</b>
<b>Resuspensionspuffer</b>	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 400 µg RNaseA/ml
<b>Lysepuffer</b>	200 mM NaOH; 1% SDS
<b>Neutralisierungspuffer</b>	3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5
<b>TE</b>	10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA

**Tab. 4.13.:** Zusammensetzung der zur Plasmidisolierung verwendeten Puffer.

#### **4.6.5. Restriktionsverdau von DNA**

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller (Puffer und Reaktionsbedingungen). Sowohl für analytische, als auch für präparative Ansätze wurde die DNA in einem Volumen von 50 µl mit 1 U des jeweiligen Enzyms für 1-2 h verdaut. Das Ergebnis des Restriktionsverdaues wurde im 1%-igen Agarosegel überprüft.

#### **4.6.6. Dephosphorylierung restriktionsverdauter DNA**

Mittels Restriktionsendonucleasen verdaute Vektoren wurden zur Verhinderung der Religation im Rahmen von Subklonierungen nach dem Verdau mit alkalischer Phosphatase (calf intestine alkaline phosphatase) dephosphoryliert. Der Restriktionsansatz wurde dazu mit 1 U der alkalischen Phosphatase für 1 h bei 37°C im jeweiligen Puffersystem inkubiert.

#### **4.6.7. Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase der Firma Roche. Zur Ligation wurden in der Regel linearisierter, dephosphorylierter Vektor und restriktionsverdautes Insert im Verhältnis 1 : 2 (ca. 300 ng und 600 ng) eingesetzt. Nach Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl) und 2 µl 10 x Ligase-Puffer wurde mit dH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte in der Regel 1 h bei 37 °C. Wurden Ligationsansätze nicht sofort zur Transformation eingesetzt, konnten sie bei 4 °C mehrere Wochen aufbewahrt werden.

#### **4.6.8. Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

Zur Aufreinigung für präparative und analytische Zwecke wurde mit Salzen, Oligonucleotiden oder störenden DNA-Fragmenten verunreinigte DNA elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt (Sambrook et al. 1989). 1 g Agarose wurde in 100 ml 1 x TAE-Puffer (0,04 M Tris, 0,02 M Eisessig und 0,05 M EDTA; pH 8) durch Kochen vollständig gelöst. Beim Gießen der Gele wurden, vom Volumen des Gelschlittens abhängige Volumina der 1% igen Agaroselösung 1:10000 mit Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammern gegossen. Die aufzureinigenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/3-Volumen Probenpuffer (30 % (m/V) Glycerin, 0,2 % (m/V) Bromphenolblau und 25 mM EDTA; pH 7,5) versetzt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte bei konstanter Spannung (80-120V) für ca. 30 min. Als Längenstandard dienten 7,5 µl der ‚1Kb DNA Ladder‘ der Firma Gibco Life Technologies. Mit diesem Längenstandard konnten die Größen doppelsträngiger DNA-Fragmente zwischen 500 bp und 12 kb abgeschätzt werden. Zur Dokumentation wurden die Gele im UV-Durchlicht photographiert.

#### **4.6.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Aufgetrennte DNA-Fragmente wurden in UV-Durchlicht mit Hilfe eines Skalpells aus Agarosegelen ausgeschnitten und unter Verwendung des ‚QIAquick Gel Extraction Kits‘ der Firma QIAGEN gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Nach Auflösung des ausgeschnittenen Gelblockes und Auftragen der Probe auf Silikagelsäulen adsorbieren, bei hohen Konzentrationen chaotroper Salze und pH 7,5, DNA-Fragmente mit einer Größe von 70 bp bis 10 kb. Im Gegensatz dazu passieren Kontaminationen oder Verschmutzungen das Säulenmaterial oder werden durch einen Waschvorgang entfernt. Reine DNA wird durch Elution mit Tris-HCl (pH 8,5) oder Wasser erhalten.

#### 4.6.10. Isolierung von Gesamt-DNA aus *Pichia pastoris*

Zur Isolierung der Gesamt-DNA aus *Pichia pastoris* wurden 10 ml einer Übernachtskultur für 3 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l H<sub>2</sub>O; pH 7,4; autoklavieren) und 500 µl Glasperlen (Ø 0,75 – 1,00 mm) gemischt und 30 min bei 4 °C geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren wurde das erhaltene Zellysate abgenommen, zur Ausfällung der Proteine mit 150 µl SDS-TE-Puffer (2 % SDS, 100 mM Tris (pH 9) und 10 mM EDTA mit ddH<sub>2</sub>O ad 50 ml) versetzt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 5 M KAc (pH 5,5) wurde für 30 – 40 min auf Eis inkubiert. Das entstandene Pellet wurde nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm verworfen und der Überstand zur DNA-Fällung weiterverarbeitet. Dazu wurde er zunächst mit 200 µl 3 M NaAc (pH 6,5) versetzt, dann mit 1 ml Isopropanol vermischt und für 10 min bei –80 °C inkubiert. Die ausgefällte DNA wurde nach 10 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm zunächst getrocknet, dann in H<sub>2</sub>O gelöst und nochmals mit 3 M NaAc (pH 6,5) und Isopropanol gefällt. Nach weiteren 10 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm wurde das DNA-Pellet mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Das DNA-Pellet wurde schließlich in 100 µl TE-Puffer mit 100 µg/ml RNase aufgenommen und 1 h bei 37 °C in Lösung gebracht.

Die so erhaltene *Pichia*-Gesamt-DNA wurde entweder sofort zur Polymerase-Kettenreaktionen verwendet oder zur Lagerung bei –20 °C eingefroren.

#### 4.6.11. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al. 1977).

Dabei kann mittels enzymatischer Neusynthese eines komplementären DNA-Einzelstranges, der basenspezifisch unterbrochen wird, die DNA-Sequenz durch Gelelektrophorese der resultierenden DNA-Fragmente ermittelt werden.

Im Gegensatz zur üblichen PCR wird

1. nur ein Primer verwendet und
2. zusätzlich zu den vier 2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphaten (dNTP) ein Gemisch aus fluoreszenzmarkierten 2',3'-Dideoxy-Nucleosid-5'-Triphosphaten (ddNTP) hinzugefügt.

Der Einbau dieser dNTP-analogen Moleküle verhindert aufgrund des fehlenden 3'-Hydroxylendes die Knüpfung der folgenden Phosphodiesterbindung und damit die weitere Elongation des Fragmentes durch die Polymerase. Es entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge mit je einem ddNTP am 3'-Ende, das nach gelelektrophoretischer Auftrennung aufgrund seiner Fluoreszenzmarkierung detektiert werden kann.

Bei Sequenzierungen wurden vorgefertigte Sequenzierungskits der Firma Applied Biosystems (ABI PRISM® BigDye™ Terminators v 3.0 Cycle Sequencing Kit) verwendet.

Sequenzierungs-PCRs wurden aus den in Tab. 4.14. aufgelisteten Komponenten angesetzt:

Komponente	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
Sequenzierungskit (enthält: DNA-Polymerase, dNTP's, ddNTP's)	4
Primer [1 pmol/ $\mu\text{l}$ ]	4
template-DNA	x (abhängig von der Konzentration der jeweiligen DNA-Lösung; 200 – 500 ng)
Endvolumen	20 $\mu\text{l}$ (mit dH <sub>2</sub> O aufgefüllt)

**Tab. 4.14.:** Komponenten einer typischen Sequenzierungs-PCR.

Das PCR-Programm zur Amplifizierung der zu sequenzierenden DNA-Fragmente umfaßte folgende, in Tab. 4.15. dargestellte Schritte:

Schritt	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zeit [min]	Anzahl an Zyklen
Denaturierung	95	6:00	1
Denaturierung	95	0:40	25
Annealing	55	0:30	
Extension	72	4:00	
Extension	72	6:00	1

**Tab. 4.15.:** Ablauf einer typischen Sequenzierungs-PCR.

Nach Ablauf der Sequenzierreaktion wurde die amplifizierte DNA folgendermaßen ausgefällt: Die Ansätze (20 µl) wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 80 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 10 µl 3 M NaAc-Lösung und 250 µl 100 %-iges Ethanol hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand sorgfältig entfernt und das Pellet mit 250 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet, nach Entfernen des Ethanols, im Vakuum getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 3 µl einer Mischung (5:1) aus Formamid und EDTA (25 mM, pH 8,0) aufgenommen und 2 Minuten bei 90 °C denaturiert.

Die Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte im denaturierenden Harnstoffgel, dessen Zusammenstellung in Tab. 4.16. dargestellt ist:

Komponenten	Menge
<b>Harnstoff</b>	18.0 g
<b>40 % ige PAGE-PLUS Lösung (Firma Amresco)</b>	6.6 ml
<b>10 x TBE Puffer (108 g Tris, 55 g Borsäure und 7,4 g EDTA (Dinatriumsalz, Dihydrat))</b>	5.0 ml
<b>10 % ige Ammoniumperoxodisulfatlösung (m/v)</b>	250 µl
<b>TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)</b>	25 µl
<b>H<sub>2</sub>O (HPLC-Qualität)</b>	ad 50 ml

**Tab. 4.16.:** Zusammensetzung des denaturierenden Harnstoffgels für die DNA-Sequenzierung.

Als Laufpuffer diente bei der DNA-Sequenzierung 1 x TBE-Puffer.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Fragmentlängen. Anhand der endständigen, fluoreszenzmarkierten ddNTP'S kann mit Hilfe von Absorptionsspektren ermittelt werden, mit welcher Base die unterschiedlichen DNA-Fragmente enden, da sich die Spektren der an die 4 ddNTP's gekoppelten Fluoreszenzmarker deutlich voneinander unterscheiden. Aus der Abfolge der detektierten Fluoreszenzfarbstoffe ergibt sich somit die Basenabfolge der sequenzierten DNA-Fragmente.

## 4.7. Biochemische Arbeitsmethoden

### 4.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde wie von Laemmli (Laemmli 1970) beschrieben, durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode können Proteine mit einer Größe von 14-98 kDa in einem Polyacrylamidgel mit einem Anteil von 12,5 % Acrylamid (w/v) aufgetrennt werden. In Tab. 4.17. sind Gel- und Pufferzusammensetzungen aufgeführt:

<b>SDS-PAGE-Gele und -Puffer</b>	<b>Komponenten</b>
<b>Sammelgel (4 %ig)</b>	1,0 ml 4 x Upper Tris (0,5 M Tris-HCl, 4 % SDS (w/v), pH 6,8) 0,52 ml 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (w/v) 2,47 ml dH <sub>2</sub> O 40 µl APS (10 % (w/v)) 8µl TEMED
<b>Trenngel (12,5 %ig)</b>	2,0 ml 4 x Lower Tris (1,5 M Tris-HCl, 4 % SDS (w/v), pH 8,8) 3,3 ml 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (w/v) 2,67 ml dH <sub>2</sub> O 40 µl APS (10 % (w/v)) 8 µl TEMED
<b>SDS-Laufpuffer</b>	25 mM Tris-HCl (pH 8,4), 0,192 M Glycerin, 0,1 % SDS (w/v)
<b>SDS-Probenpuffer</b>	20 % Glycerin (w/v), 6 % β-Mercaptoethanol (w/v), 0,0025 % Bromphenolblau (w/v) in 1 x Upper Tris
<b>Protein-Standard</b>	Phosphorylase b (97,4 kDa) Serumalbumin (66,2 kDa) Ovalbumin (45,0 kDa) Carbonsäureanhydrase (31,0 kDa) Trypsin-Inhibitor (21,5 kDa) Lysozym (14 kDa)

**Tab. 4.17.:** Zusammensetzung der zur SDS-PAGE verwendeten Gele und Puffer.

Die Proteinlösungen wurden in der Regel mittels Acetonfällung eingengt (vgl. Abschnitt 4.2.), vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei 95 °C denaturiert und nach dem Abkühlen aufgetragen. Die Laufbedingungen pro Gel wurden folgendermaßen (Tab. 2.18.) gewählt:

Zeit [min]	Stromstärke [V], bei mA = const.
10	10
60	25

**Tab. 4.18.:** SDS-PAGE-Laufbedingungen.

Die SDS-PAGE wurde im Normalfall dann gestoppt, wenn der Probenpuffer das Gel verlassen hatte. Anschließend wurden die Gele gefärbt.

#### 4.7.1.1. Coomassie-Färbung

Die Gele wurden 1 h oder über Nacht in Coomassie-Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 30 % Methanol (v/v), 10 % Eisessig (v/v) in dH<sub>2</sub>O) eingelegt. Anschließend wurden die Gele so lange in Entfärbelösung (30 % Methanol (v/v), 10% Eisessig (v/v) in dH<sub>2</sub>O) eingelegt, bis vorhandene Proteinbanden deutlich vom Gelhintergrund zu unterscheiden waren.

#### 4.7.1.2. Silberfärbung

Zur Silberfärbung von Polyacrylamidgelen wurde der „Silver Stain-Kit“ der Firma Bio-Rad nach Merril (Merril et al. 1981) verwendet. Mit Hilfe dieses Kits können u.a. auch stark glykosylierte Proteine nachgewiesen werden, die mit anderen Färbemethoden nur schwierig zu detektieren sind. Die Färbung mit Hilfe dieses Kits ist ca. 10-50 mal sensitiver, als die mit Coomassie Brilliant Blue R-250.

Eine Standardsilberfärbung verlief nach dem folgendem, in Tab. 4.19. dargestellten Schema:

Schritt-Nr.	Komponenten	Volumen [ml]	Zeit [min]
1	Fixierlösung I (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 50 % H <sub>2</sub> O (v/v/v))	400	30
2	Fixierlösung II (10 % Ethanol, 5 % Essigsäure, 85 % H <sub>2</sub> O (v/v/v))	400	15
3	Fixierlösung II (10 % Ethanol, 5 % Essigsäure, 85 % H <sub>2</sub> O (v/v/v))	400	15
4	Oxidationslösung ( 5 – 10 % (m/v) Kaliumdichromat, 2,5 – 5 % (m/v) Salpetersäure)	200	5
5	dH <sub>2</sub> O	400	5
6	dH <sub>2</sub> O	400	5
7	dH <sub>2</sub> O	400	5; solange wiederholen, bis Gelbfärbung des Gels verschwindet
8	Silberreagenz (10-fach- Konzentrat, 2,5 % Silbernitrat (w/v))	200	20
9	dH <sub>2</sub> O	400	1
10	Entwickler (2,5 % (m/v) Natriumcarbonat, 0,02 % (m/v) Paraformaldehyd)	200	ca. 30 sec, bis die Entwicklerlösung gelb wird, oder braune Flocken ausfallen
11	Entwickler	200	5
12	Entwickler	200	5
13	Stopplösung (5 % Essigsäure, 95 % dH <sub>2</sub> O)	400	5
14	dH <sub>2</sub> O	400	5

**Tab. 4.19.:** Verlauf einer Silberfärbung.

Sowohl mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbte, als auch silbergefärbte Gele wurden zur Aufbewahrung 2 h bei 95 °C zwischen 2 Zellophanfolien im Gel-Trockner der Firma Bio-Rad (Modell 583) getrocknet.

#### **4.7.2. Acetonfällung**

In der Regel wurden aus Kulturüberständen erhaltene Proteinlösungen vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel mittels Acetonfällung auf 1/6 ihres Volumens eingengt. Dazu wurden 300 µl Überstand mit 900 µl eiskaltem Aceton vermischt und 30' auf Eis gehalten. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4°C wurde das entstandene Pellet in der SpeedVac getrocknet und in 50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden entweder sofort 5' bei 95°C denaturiert oder bei -20°C eingefroren.

#### **4.7.3. Protein-Blotting**

Zum Proteinblotting wurden die erhaltenen SDS-Gele nicht gefärbt, sondern zunächst 15 min in Kathodenpuffer (25 mM Tris-HCl, 10 % Methanol (v/v), pH 9,4) äquilibriert. Gleichzeitig wurden pro Gel 9 Filterpapiere und eine PVDF-Membran mit den Maßen 8 cm x 10 cm ausgeschnitten und in den im Folgenden beschriebenen Lösungen äquilibriert:

Filterpapiere 1-3: 10 min in Anodenpuffer 1 (0,3 M Tris-HCl, 10 % Methanol (v/v) in dH<sub>2</sub>O, pH 10,4)

Filterpapiere 4-6: Anodenpuffer 2 (25 mM Tris-HCl, 10 % Methanol (v/v) in dH<sub>2</sub>O, pH10,4)

Filterpapiere 7-9: Kathodenpuffer (25mM Tris-HCl, 10 % Methanol (v/v) in dH<sub>2</sub>O, pH 9,4)

PVDF-Membran: 2-3 s in 100 % Methanol und dann 2-3 min in Anodenpuffer 1 (0,3 M Tris-HCl, 10 % Methanol (v/v) in dH<sub>2</sub>O, pH 10,4)

Nach ausreichender Äquilibrierung wurden Filterpapiere, PVDF-Membran und Gel in der Blotting-Kammer (die Anode befindet sich unten, die Kathode oben) in folgender Reihenfolge übereinandergeschichtet:

1. Filterpapiere 1-3
2. Filterpapiere 4-6
3. PVDF-Membran
4. Gel
5. Filterpapiere 7-9

Zwischen den Lagen vorhandene Luftblasen wurden mit Hilfe eines Glasstabes entfernt. Geblottet wurde für 45-60 min bei einer Spannung von 15 V. Die Membran wurde anschließend für 1-5 min in Coomassie-Färbelösung (0,025 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v) in 40 % Methanol (v/v)) gefärbt und anschließend so lange in 50 % Methanol (v/v in dH<sub>2</sub>O) entfärbt, bis der Membranhintergrund nur noch schwach blau gefärbt war, und die Proteinbanden deutlich hervortraten. Die Membran wurde nach mehrmaligem Spülen mit dH<sub>2</sub>O an Luft getrocknet. Dann konnten die Banden herausgeschnitten und bis zur Proteinsequenzierung bei -20 °C gelagert werden.

#### **4.7.4. N-terminale Sequenzierung**

Die N-terminale Sequenzierung erfolgte im Anschluß an das Proteinblotting mit aus gefärbten PVDF-Membranen ausgeschnittenen Proteinbanden mit dem Procise Protein Sequenzer Modell 491 HT der Firma Applied Biosystems für N-terminale „Pulsed Liquid und Gas Phasen“ Sequenzierung von Proteinen und Peptiden, gemäß den Angaben des Herstellers.

Mit diesem Gerät werden Primärstrukturen von Proteinen basierend auf dem Edmann-Abbau bestimmt, der die schrittweise Bestimmung der Aminosäure-Sequenz vom aminoterminalen Ende her erlaubt. Die Reaktion erfolgt in 3 Schritten:

1. Modifizierung der N-terminalen Aminosäure mit Phenylisothiocyanat,
2. Abspaltung des Phenylthiocarbonyl-(PTC)-Derivates der Aminosäure von der Peptidkette und Überführung in das stabile 3-Phenyl-2-thiohydantoin (PTH)-Derivat, und
3. Identifikation des PTH-Derivates mittels HPLC.

Anschließend beginnt der nächste Zyklus des Edman-Abbaus mit dem um 1 Aminosäure verkürzten Peptid (Edmann, 1950).

#### 4.7.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde entweder der BCA-Kit der Firma Pierce oder der Bradford-Test der Firma BioRad gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet.

##### 4.7.5.1. Bicinchoninsäure (BCA)-Test

Dieser Test beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ - zu  $\text{Cu}^{+}$ - Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung. Die Bildung der  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen wird durch das Bicinchoninsäurereagenz anhand eines Farbumschlags detektiert (Smith et al. 1985). Der entstandene Chelatkomplex hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm, das linear mit der Proteinkonzentration korreliert. Mit Hilfe dieses Testes können Proteinmengen von 25–2000  $\mu\text{g/ml}$  bestimmt werden.

Zur Erstellung der Eichkurve wurde das Referenzprotein BSA (**bovine serum albumin**) verwendet.

##### 4.7.5.2. Bradford-Test (Bradford 1976)

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösung nach Bradford erfolgte unter Verwendung des Proteintestes der Firma Bio-Rad. Der Test beruht auf der Verwendung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250, der mit hoher Spezifität an Proteine bindet. In einer sauren Lösung von an Proteine gebundenem Coomassie Brilliant Blue G-250 kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des ungebundenen Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm. Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich Proteinmengen im Bereich von 1-20  $\mu\text{g}$  bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinkonzentrationen in Mikrotiterplatten gemessen. Dazu wurden je 800  $\mu\text{l}$  Probe, Proteinstandard (1-20  $\mu\text{g}$  BSA) und Nullwert ( $\text{dH}_2\text{O}$ ), mit 200  $\mu\text{l}$  des Coomassie Brilliant Blue G-250-Reagenzes vermischt. Nach 5- bis 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

#### 4.7.6. Test auf Disaccharidase-Aktivität nach Dahlqvist (Dahlqvist 1970; Dahlqvist 1984)

Die Aktivität der von *Pichia pastoris* exprimierten Lactase, Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase und Phlorizin-Hydrolase wurde mit Hilfe des von Dahlqvist entwickelten Testes auf intestinale Disaccharidase-Aktivität getestet. Die Disaccharidase-Aktivität wird hierbei in einem aus zwei Schritten bestehenden Verfahren indirekt über Bestimmung der Menge an freigesetzten Glucosemolekülen bestimmt. Durch Inkubation disaccharidasehaltiger Kultivierungsüberstände mit dem entsprechenden Substrat Lactose wird im ersten Schritt zunächst Glucose freigesetzt. Die Glucose wird in einer zweiten Reaktion mittels Glucoseoxidase zum Gluconolacton reduziert. In dieser Reaktion entsteht zusätzlich  $H_2O_2$ , das nun durch eine Peroxidase zu  $H_2O$  reduziert wird. Der dabei entstandene Sauerstoff oxidiert den Farbstoff o-Dianisidin zu einem braunen Farbstoff, dessen Absorptionsmaximum bei 420 nm liegt. Die Menge an freigesetzten Glucosemolekülen korreliert also mit der bei 420 nm gemessenen Absorption.

Ein typischer Ansatz für einen Dahlqvist-Test sah folgendermaßen aus:

Testansatz: 10 oder 50  $\mu$ l eines *Pichia pastoris*-Kultivierungsüberstandes wurden für wenige Minuten bei 37 °C inkubiert, mit 10  $\mu$ l Substrat-Puffer-Lösung (0,056 M Lactose in 0,1 M Na-Maleat Puffer (pH 5,6) versetzt und wiederum bei 37 °C inkubiert. Nach genau 60 Minuten wurden 200  $\mu$ l TGO-Reagenz (62,5 mg Glucoseoxidase in 25 ml 0,5M Tris-HCl (pH 7,0), 250  $\mu$ l o-Dianisidinlösung (10 mg in 1 ml 100 % Ethanol), 250  $\mu$ l Detergenzlösung (20 g Triton X-100 in 80 ml 95 % Ethanol (v/v), 125  $\mu$ l Peroxidaselösung (10 mg Peroxidase in 10 ml dH<sub>2</sub>O)) hinzugefügt und gut gemischt. Durch Zugabe des Tris-haltigen TGO-Reagenzes wird die Disaccharidase-Reaktion gestoppt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption der Ansätze bei 420 nm gemessen.

Bei den Testansätzen, sowie allen anderen Proben wurden immer jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Negativkontrolle: Pro Test wurden jeweils 2 Negativkontrollen angesetzt, die genauso behandelt wurden, wie der Testansatz. Der Nullwert enthielt statt des Kultivierungsüberstandes 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Des weiteren wurde bei jedem Test eine

Negativkontrolle mit 50 µl des Kultivierungsmediums angesetzt, um Reaktionen des Mediums ausschließen zu können und den Testhintergrund bestimmen zu können.

Positivkontrolle: Zur Überprüfung des einwandfreien Funktionierens des Testansatzes wurden pro Test jeweils 4 U einer rekombinanten Rinder-β-galactosidase eingesetzt.

Glucosestandard: Zur Beurteilung der im Testansatz erhaltenen  $A_{420}$ -Werte wurde eine Glucosestandardreihe von 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15 und 20 µg Glucoselösung (Stammlösung: 0,5 mg/ml in H<sub>2</sub>O, mit Triton X als Stabilisator) angesetzt.

Die Berechnung der Disaccharidase-Aktivität erfolgte folgendermaßen:

1. Mit Hilfe des Testes auf intestinale Disaccharidase-Aktivität wurde zunächst die in den eingesetzten Kultivierungsüberständen freigesetzte Menge an Glucose [µg] ermittelt. Dazu diente die über den Glucosestandard erhaltene Kalibrierungsgerade für Glucose (1 – 20 µg Glucose).
2. Als nächstes wurde die in 10 µl Kultivierungsüberstand gemessene Disaccharidase-Aktivität über folgende Formel (Dahlqvist 1968) ermittelt:

$$\begin{aligned} \text{Disaccharidase-Aktivität [units/ml]} &= 100 \cdot \frac{a}{180} \cdot \frac{1}{60} \cdot \frac{1}{n} \cdot d \quad \text{oder} \\ &= \frac{a \cdot d}{n \cdot 108} \end{aligned}$$

mit:  $a$  = in 60 Minuten freigesetzte Menge an Glucose (Probe – Nullkontrolle)

$d$  = Verdünnungsfaktor der eingesetzten Enzymlösung

$n$  = Anzahl der pro Molekül Disaccharid freigesetzten Glucosemoleküle  
(für Lactose  $n = 2$ )

100 : Der Faktor 100 dient bei Einsatz von 10 µl Probenlösung zur  
Hochrechnung auf 1 ml

180 : Molekulargewicht von Glucose = 180 g/mol

60 : Zeitangabe in sec: Reduktion der freigesetzten Glucosemoleküle zu  
Gluconolacton über den Zeitraum von 60 sec

Die erhaltenen Units an Disaccharidaseaktivität entsprechen der Anzahl an Mikromol des pro Minute hydrolysierten Disaccharides.

3. Dann wurde die mittels des Bicinchoninsäure- oder Bradford-Testes erhaltene Proteinkonzentration (mg Protein/ml) der eingesetzten Kultivierungsüberstände ermittelt. Hierbei diente eine mittels BSA-Standardreihe (0,05 – 20 µg BSA) erhaltene Kalibrierungsgerade als Vergleich.
  
4. Schließlich konnte über die in 2. erhaltene Disaccharidase-Aktivität (U/ml) und die in 3. erhaltene Proteinkonzentration (mg/ml) die spezifische Aktivität (U/mg) der in den Kultivierungsüberständen enthaltenen Disaccharidase ermittelt werden.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Isolierung der kodierenden Sequenz der Lactase-Phlorizin-Hydrolase aus menschlicher Dünndarm cDNA

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hemmung der Lactase-Phlorizin-Hydrolase als möglicher neuer Therapieansatz für Galactosämie untersucht werden. Dazu war die Durchführung grundlegender Inhibitionsversuche an dem gereinigten bzw. überexprimierten Enzym nötig. Der erste Schritt dieser Arbeit bestand zunächst in der Isolierung der kodierenden Sequenz der Lactase-Phlorizin-Hydrolase, die anschließend in einem geeigneten Wirtsorganismus überexprimiert werden sollte.

Als Matrize für die Isolierung der für die menschliche Lactase-Phlorizin-Hydrolase kodierenden DNA diente zunächst menschliche Dünndarm-cDNA. Diese wurde mit Hilfe des ‚cDNA-Cycle-Kits‘ der Firma Invitrogen aus menschlicher Dünndarm-mRNA der Firma Clontech synthetisiert. Zur Amplifizierung der menschlichen Lactase-Phlorizin-Hydrolase mittels PCR wurden anhand der von Mantei et al. (Mantei et al., 1988) veröffentlichten DNA-Sequenz (GenBank Acc.: X07994) des Enzyms unterschiedliche Oligonucleotide (Primer) entworfen. Zur Amplifizierung der Lactase-Domäne wurde das Primerpaar LPH\_EcoFW und LPH\_EcoRV verwendet. Die Phlorizin-Hydrolase-Domäne sollte über das Primerpaar LPH\_XbaFW und LPH\_XbaRV amplifiziert werden. Zur Amplifizierung der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase dienten die Primer LPH\_EcoFW und LPH\_XbaRV. Als Positivkontrolle dienten  $\beta$ -Actin-Primer (Forward- und Reverse-Primer) der Firma Clontech, die ein ca. 700 bp großes Fragment des für  $\beta$ -Actin kodierenden Gens amplifizieren sollten, welches in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Trotz vielfältiger Veränderungen der PCR-Bedingungen war es weder möglich, die Gene der beiden Einzeldomänen der Lactase-Phlorizin-Hydrolase, noch die Nucleotidsequenz des gesamten Gens zu amplifizieren. Im Gegensatz dazu konnte mit den beiden  $\beta$ -Actin-Primern ein ca. 700 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden, das im 1 %-igen Agarosegel detektiert wurde.

Der Ansatz, die für die Lactase-Phlorizin-Hydrolase codierende DNA aus genomischer DNA zu isolieren, wurde nicht in Betracht gezogen. Das Gen für dieses Enzym besteht aus 17 Exons, unterbrochen von 16 Introns (Boll et al., 1991), also DNA-Regionen ohne genetische Information. Von diesen Introns sind 9 im Bereich der reifen Lactase-Phlorizin-Hydrolase

lokalisiert. Um die Nucleotidsequenz der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase zu erhalten, müßten 17 Exons getrennt amplifiziert und anschließend verknüpft werden. Diese Prozedur dauert einerseits sehr lange und beinhaltet andererseits ein erhöhtes Risiko für Sequenzfehler.

Aus diesem Grund wurde beschlossen, die für die Amplifikation der Lactase-Phlorizin-Hydrolase benötigte DNA durch Isolierung von RNA aus menschlichem Dünndarmgewebe und anschließende cDNA-Synthese zu synthetisieren.

## 5.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus menschlichem Dünndarmgewebe

Um die Nucleotidsequenz der menschlichen Lactase-Phlorizin-Hydrolase zu erhalten, sollte Dünndarm-mRNA isoliert werden, um sie anschließend mittels der Reversen Transkriptase in cDNA umzuwandeln. Da cDNA-Synthesen nicht nur ausgehend von mRNA durchgeführt werden können, sondern auch aus Gesamtzell-RNA, wurde die Gesamt-RNA menschlichen Dünndarmgewebes isoliert. Das zur Isolierung der Gesamt-RNA benötigte menschliche Dünndarmmaterial wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Graeve des Fraunhofer Institutes für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik, Abteilung Zellsysteme, der es vom Katharinenhospital der Stadt Stuttgart erhalten hatte, zur Verfügung gestellt.

Da auch hier davon ausgegangen werden mußte, dass nicht jede Darmgewebeprobe mRNA für die Lactase-Phlorizin-Hydrolase enthält, wurden Gewebeproben aus dem Dünndarm mehrerer Patienten verwendet. Mit Hilfe des ‚RNeasy Mini Kits‘ der Firma Qiagen wurde die Gesamt-RNA bzw. nach den Angaben des Herstellers RNA-Moleküle mit einer Länge von mehr als 200 Nucleotiden aus Darmgewebeproben 5 verschiedener Patienten isoliert. Ausgangsmengen waren hierbei jeweils ca. 30 mg Dünndarmmaterial.

Aus den unterschiedlichen Darmgewebeproben konnten 8,4 µg – 36,5 µg, in 30 µl Wasser aufgenommene Gesamt-RNA isoliert werden. Der Quotient aus  $A_{260}$  und  $A_{280}$  lag bei allen 5 Proben im Bereich zwischen 1,5 und 1,9, was für eine gute Reinheit der isolierten Gesamt-RNA spricht. Zur nachfolgenden cDNA-Synthese wurde die isolierte Gesamt-RNA aller 5 Darmgewebeproben eingesetzt.

### 5.3. cDNA-Produktion aus mRNA mittels Reverser Transkriptase und Nachweis der Lactase-Phlorizin-Hydrolase-Nucleotidsequenz

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des ‚cDNA Cycle Kits‘ der Firma Invitrogen durchgeführt. Die Mindestmenge an eingesetzter mRNA sollte hierbei laut ‚cDNA Cycle Kit‘-Anleitung mindestens 0,1 µg mRNA betragen.

mRNA-Konzentrationen in Gesamt-RNA-Lösungen können nicht genau bestimmt werden. Allgemein gilt jedoch, dass der mRNA-Gehalt an Gesamt-RNA zwischen 1 – 5 % liegt. Bei der Reversen Transkription wurden jeweils 5 µl RNA-Lösung aus 5.2. eingesetzt. Die eingesetzten Volumina enthielten somit zwischen 0,01 µg und 0,3 µg mRNA.

Bei dem Einsatz geringerer Mengen als 0,1 µg mRNA wurde von Invitrogen empfohlen, 2 cDNA-Synthese-Cyclen mit AMV-Reverser Transkriptase hintereinanderschalten, um ausreichend hohe Ausbeuten an cDNA für nachfolgende PCRs zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser zweite Cyclus bei sämtlichen Proben angehängt, da bei einem mRNA-Anteil von 1 % an der Gesamtzell-RNA sämtliche Proben weniger als 0,1 µg mRNA enthalten haben.

Da fast alle eukaryotischen mRNAs an ihrem 3‘-Ende polyadenyliert werden, wurde als Primer für die Reverse Transkription der im ‚cDNA Cycle Kit‘ mitgelieferte Oligo-dT-Primer verwendet.

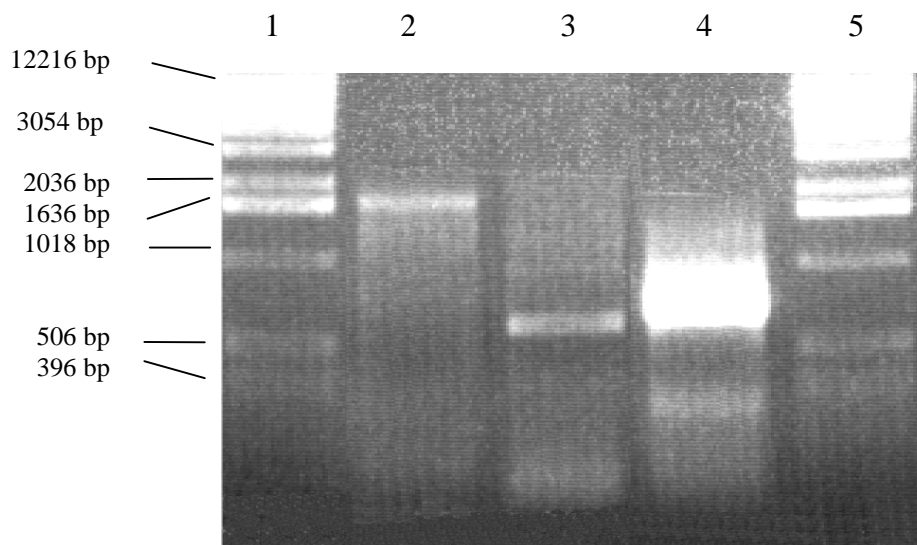
Zum Nachweis der Lactase-Phlorizin-Hydrolase-Nucleotidsequenz in der isolierten Dünndarm-mRNA wurde die mittels Reverser Transkriptase erhaltene komplementäre DNA als Matrize in weiteren PCR-Reaktionen eingesetzt. Pro Probe wurde mit jeweils spezifischen Primern folgendes getestet:

- a) Mit Primern für  $\beta$ -Actin der Firma Clontech wurde überprüft, ob die mRNA-Isolierung funktioniert hat. Dabei sollte ein ca. 700 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden (vgl. Abb 5.1.: Spur 3).
- b) Der Nachweis der Nucleotidsequenz der Lactase-Phlorizin-Hydrolase erfolgte mit folgenden Primern:
  - i) Spur 1 (Abb. 5.1.): Die beiden Primer LPH-3FW und der OligodT-Primer aus dem ‚cDNA Cycle Kit‘ der Firma Invitrogen sollten ein ca. 2 kb großes DNA-Fragment

amplifizieren, welches von der Lactase-Domäne bis zum PolyA-Schwanz der cDNA reicht.

- ii) Spur 2 (Abb. 5.1.): Das Primerpaar LPH-TestFW und LPH-TestRV diente der Amplifikation eines ca. 600 bp großen Fragmentes aus der Lactase-Domäne.

Nach Auftrennung im 1 %-igen Agarosegel ergab sich für eine Probe folgendes Bild:



**Abb. 5.1.:** Auftrennung der mittels PCR erhaltenen Fragmente der Probe 2 im 1%igen Agarosegel; Spuren 1 und 5: kb-Leiter; Spur 2: DNA-Fragment, von der Lactase-Domäne bis zum PolyA-Schwanz der cDNA; Spur 3: 600 bp großes Fragment aus der Lactase-Domäne; Spur 4: Positivkontrolle: 700 bp großes DNA-Fragment aus  $\beta$ -Actin.

In Darmgewebeprobe Nr. 2 wurde die Amplifikation eines Teiles der Lactase-Phlorizin-Hydrolase nachgewiesen. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, waren sowohl die mRNA-Isolierung, als auch die cDNA-Synthese erfolgreich (Abb. 5.1.:  $\beta$ -Actin, Spur 4).

Zum Nachweis der Lactase-Phlorizin-Hydrolase-DNA reichen die in den Spuren 2 und 3 (vgl. Abb. 5.1.) zu erkennenden Banden, die einerseits einem DNA-Fragment entsprechen, das von der Lactase-Domäne bis zum Poly-A-Schwanz der cDNA reicht (Spur 2) und andererseits einem ca. 600 bp großen DNA-Fragment aus der Lactase-Domäne (Spur 3) entsprechen.

In den folgenden Versuchen wurde mit der cDNA der Darmgewebeprobe 2 weitergearbeitet.

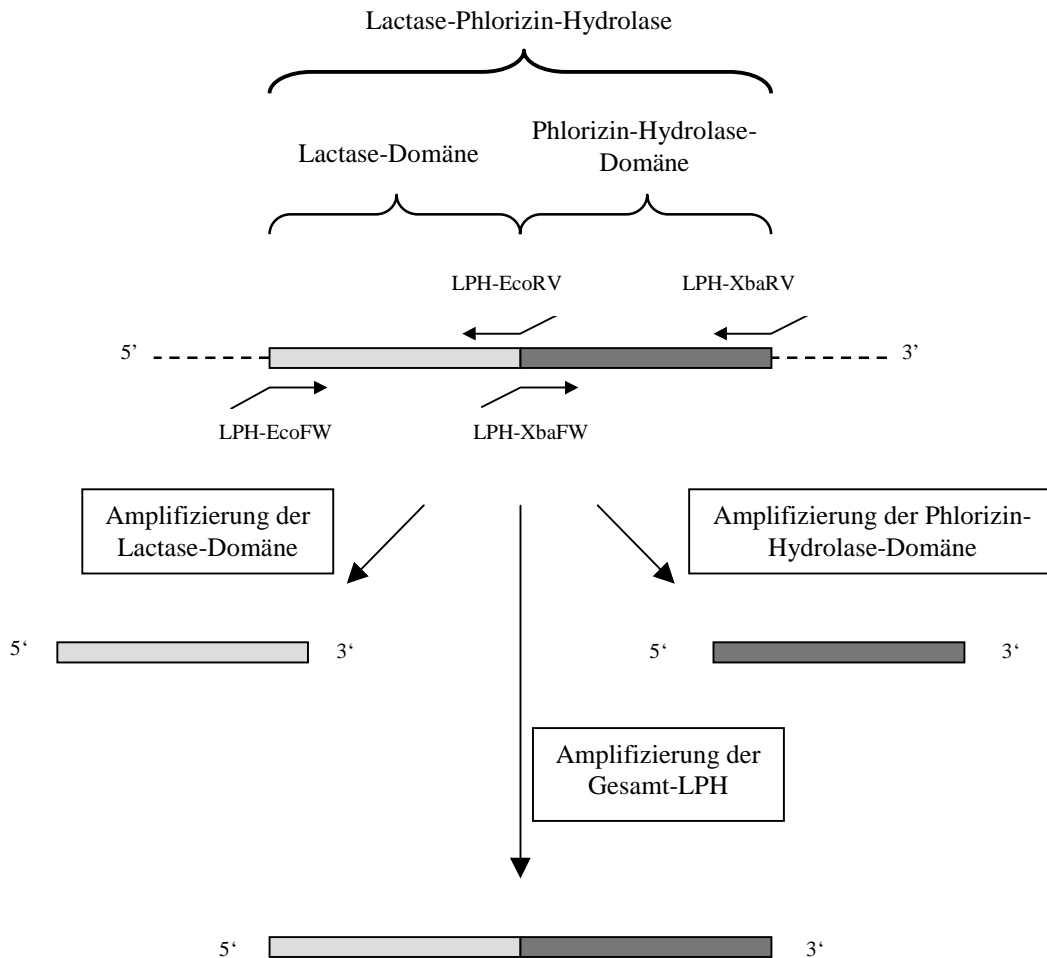
Bei den nachfolgenden Klonierungsexperimenten mit der Lactase-Phlorizin-Hydrolase wurden zur Amplifizierung der unterschiedlichen DNA-Fragmente Primer mit Schnittstellen für die Restriktionsendonucleasen *EcoRI* und *XbaI* verwendet.

#### 5.4. Amplifikation der kodierenden Sequenzen der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase und ihrer beiden Einzeldomänen

Da in späteren Expressionsversuchen sowohl die Lactosehydrolyse-Aktivität der beiden Einzeldomänen (Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne) alleine, als auch der Gesamt-LPH untersucht werden sollte, wurden zur Isolierung bzw. Amplifizierung der jeweiligen kodierenden Regionen, mit der in 5.3. hergestellten cDNA, folgende Ansätze mit neuen spezifischeren Primern durchgeführt:

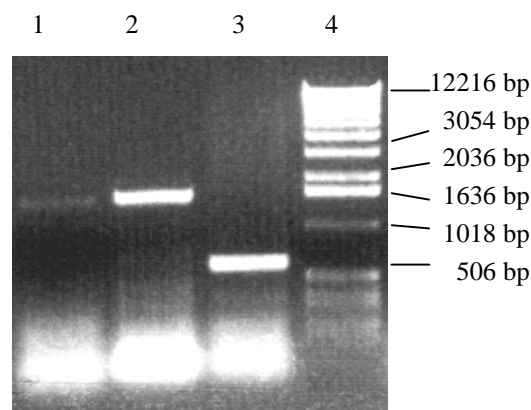
1. Amplifizierung der Lactase-Domäne (1497 bp) mit den beiden Primern LPH-EcoFW und LPH-EcoRV
2. Amplifizierung der Phlorizin-Hydrolase-Domäne (1554 bp) mit dem Primerpaar LPH-XbaFW und LPH-XbaRV
3. Amplifizierung der gesamten Lactase-Phlorizin-Hydrolase (3051 bp) mit den Primern LPH-EcoFW und LPH-XbaRV

Zur Extension wurde dabei zunächst die Taq-Polymerase verwendet.



**Abb. 5.2.:** Schematische Darstellung der Ansätze zur Amplifizierung der Lactase- und der Phlorizin-Hydrolase-Domäne, sowie der Gesamt-LPH aus menschlicher Dünndarm-cDNA.

Auf diese Weise konnten sowohl die Lactase-, als auch die Phlorizin-Hydrolase-Domäne isoliert werden. Im 1 %igen Agarosegel konnte bei diesen Ansätzen jeweils eine Bande bei ca. 1,5 kb nachgewiesen werden. In Abb. 5.3. entspricht die Bande bei 1,5 kb in Spur 1 der Phlorizin-Hydrolase-Domäne (1543 bp), die in Spur 2 der Lactase-Domäne (1496 bp). In Spur 3 ist die Bande eines Test-Fragmentes aus der Lactase-Domäne zu sehen, die ca. 600 bp umfaßt.



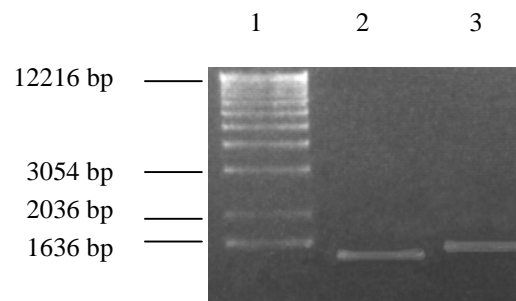
**Abb. 5.3.:** Nachweis der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne in der aus der Dünndarmprobe 2 hergestellten cDNA im 1 %- igen Agarosegel. Spur 1: Mit dem Primerpaar LPH-XbaFW und -XbaRV amplifizierte Phlorizin-Hydrolase-Domäne; Spur 2: Mit LPH-EcoFW und -EcoRV amplifizierte Lactase-Domäne; Spur 3: Mit LPH-TestFW und -TestRV amplifiziertes Test-Fragment aus der Lactase-Domäne; Spur 4: kb-Leiter.

Im Gegensatz zur erfolgreichen Amplifizierung der Lactase- und der Phlorizin-Hydrolase-Domäne war die Amplifizierung der kodierenden Sequenz für die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase direkt aus der in 5.3. hergestellten cDNA, trotz Verwendung unterschiedlicher DNA-Polymerasen (Taq-Polymerase, Pfu-Polymerase, PowerScript-Polymerase, PanScript-Polymerase) und variierender PCR-Bedingungen in mehreren Ansätzen nicht möglich.

Alternativ dazu wurde versucht, die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase durch ‚Overlap-Extension‘-PCR aus den beiden amplifizierten Einzeldomänen zu erhalten.

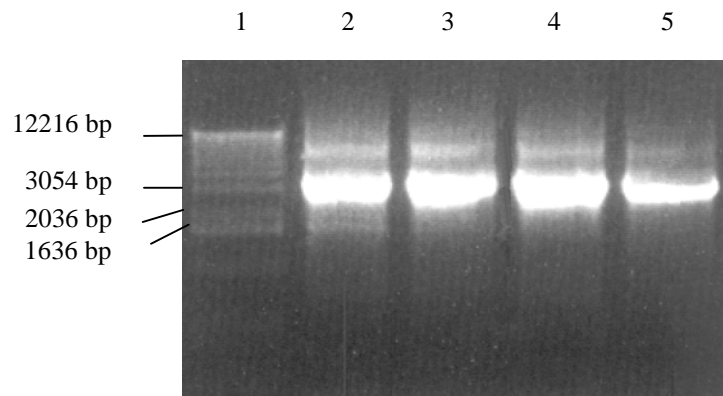
Für die Lactase-Domäne wurde zunächst der Primer LPHIII-RVOL anhand der von Mantei et al. (Mantei et al., 1988) veröffentlichten LPH-Sequenz (GenBank Acc.: X07994) entworfen, der aus den letzten 20 Nucleotiden des 3‘-Endes der Lactase-Domäne und den ersten 20 Nucleotiden des 5‘-Endes der Phlorizin-Hydrolase-Domäne bestand. Entsprechend wurde für die Phlorizin-Hydrolase der Primer LPHIV-FWOL entworfen, der aus 20 Nucleotiden des 5‘-Endes dieser Domäne bestand und das 3‘-Ende der Lactase-Domäne um 20 Nucleotide überlappte. In einer ersten PCR dienten diese beiden Oligonucleotide, neben den Primern LPH\_EcoFW und LPH\_XbaRV zur Amplifikation der sich um jeweils 20 Nucleotide überlappenden Einzeldomänen.

Nach Auftrennung der bei der PCR erhaltenen Fragmente im 1 %igen Agarosegel ergab sich folgendes Bild (Abb. 5.4.), wobei in Spur 2 die amplifizierte Lactase-Domäne zu sehen ist und Spur 3 die Phlorizin-Hydrolase-Domäne zeigt:



**Abb. 5.4.:** Nachweis der mittels PCR erhaltenen einander überlappenden Lactase und Phlorizin-Hydrolase-Domäne; Spur 1: kb-Leiter; Spur 2: Lactase-Domäne, mit 20 Nucleotiden der Phlorizin-Hydrolase-Domäne (1525 bp: Lactase-Domäne mit Nucleotiden von LPH\_EcoFW und LPHIII-RVOL); Spur 3: Phlorizin-Hydrolase-Domäne mit 20 Nucleotiden der Lactase-Domäne (1590 bp: Phlorizin-Hydrolase-Domäne mit Nucleotiden von LPHIV-FWOL und LPH\_XbaRV).

Die sich um je 20 Nucleotide überlappenden Domänen der Lactase-Phlorizin-Hydrolase wurden in einem zweiten Schritt mittels ‚Overlap-Extension‘ bei Annealingtemperaturen zwischen 55 °C und 75 °C zum Gesamtgen (ohne die den C-Terminus des nativen Gens) zusammengefügt. Als randständige Primer zur Amplifikation dienten hierbei die Oligonucleotide LPH\_EcoFW und LPH\_XbaRV. Nach Auftrennung der mittels PCR amplifizierten Fragmente im 1 %igen Agarosegel ergab sich das in Abb. 5.5. dargestellte Agarosegelbild:



**Abb. 5.5.:** Nachweis der durch ‚Overlap-Extension‘-PCR erhaltenen Lactase-Phlorizin-Hydrolase im 1 %igen Agarosegel; Spur 1: kb-Leiter; Spur 2: ‚Overlap-Extension-PCR‘ mit einer Annealingtemperatur von 55 °C; Spur 3: 60 °C; Spur 4: 65 °C; Spur 5: 70 °C.

In Abb. 5.5. ist zu sehen, dass die ‚Overlap-Extension‘ bei allen vier verwendeten Annealingtemperaturen gut funktioniert hat. In Spur 2 ist bei ca. 3 kb die bei 55 °C, in den Spuren 3, 4 und 5 die bei 60 °C, 65 °C und 70 °C synthetisierte Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase (3073 bp: Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase mit Nucleotiden der Primer LPH\_EcoFW und LPH\_XbaRV) zu sehen. Weiterhin ist zu sehen, dass die Ausbeute an synthetisierter Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase in allen 4 Ansätzen sehr hoch ist, bei 65 °C jedoch, nach optischer Auswertung des Agarosegelbildes, am höchsten.

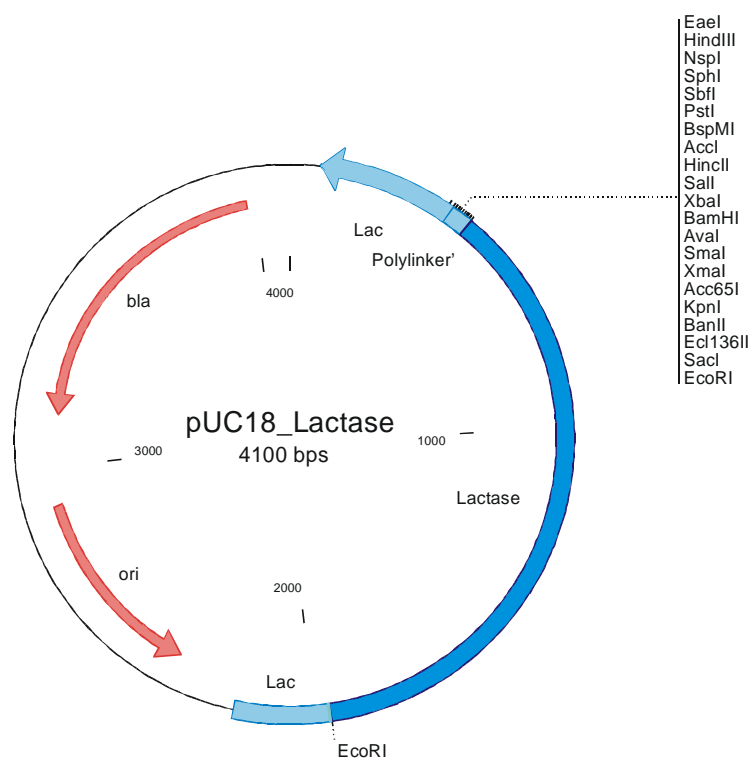
### 5.5. Klonierung der menschlichen Lactase-Phlorizin-Hydrolase in *E. coli*

Die Grundlage zur Durchführung von Inhibitionsversuchen bildet zunächst die Expression aktiver Enzyme. Eine notwendige Voraussetzung dafür bildet die korrekte DNA-Sequenz bzw. Aminosäuresequenz des zu inhibierenden Enzymes, da es durch Mutationen auf DNA-Ebene zu Änderungen in der Basenabfolge kommen kann, was sich wiederum auf die korrekte Faltung eines Proteins und damit auf seine Aktivität auswirken kann.

Um die Sequenz der in 5.4. amplifizierten DNA-Fragmente auf Mutationen hin untersuchen zu können, wurden diese zunächst in den Klonierungsvektor pUC 18 kloniert. Dieser Vektor enthält unter anderem ein *bla*-Gen für Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin. Dadurch ist die Selektion positiver Transformanten auf Agarplatten mit Ampicillinzusatz möglich.

Außerdem enthält es zur Replikation in *E. coli* den Replikationsstartpunkt des Plasmids pBR322 (ori).

Die in 5.4. erhaltenen DNA-Fragmente wurden mittels Gelextraktion isoliert, gereinigt und über die *EcoRI*- (Lactase-Domäne) bzw. *XbaI*-Schnittstellen (Phlorizin-Hydrolase-Domäne) in den Polylinker des Plasmids ligiert. Auch die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase wurde über ihre *EcoRI*- (5'-Ende) und *XbaI*-Schnittstellen (3'-Ende) in pUC18 kloniert. Aus den Klonierungen resultierten die Plasmide pUC18\_Lactase (dargestellt in Abb. 5.6.), pUC18\_Phlorizin-Hydrolase und pUC18\_Lactase-Phlorizin-Hydrolase.



**Abb. 5.6.:** In den Klonierungsvektor pUC 18 klonierte Lactase-Domäne der Lactase-Phlorizin-Hydrolase. Der Vektor enthält ein *bla*-Gen (Ampicillin-Resistenz) zur Selektion positiver Transformanten gegen das Antibiotikum Ampicillin in *E. coli*. Zur Replikation in *E. coli* enthält er den Replikationsstartpunkt (ori) des Plasmids pBR322. Das *lac*-Gen stellt einen regulierbaren Abschnitt des Gens für die  $\beta$ -Galaktosidase aus dem Lactose-Operon von *E. coli* dar, dessen Expression über ein vom *lacI*-Gen, welches in dieser Abbildung als Teil des *lac*-Gens dargestellt ist und vor dem *lac*-Operon liegt, produziertes Repressorproteins reguliert wird.

Nach der Transformation dieser Plasmide in *E. coli*-DH5 $\alpha$  wurden bei allen drei Ansätzen Transformanten erhalten. Daraufhin wurden zunächst einzelne Klone über Nacht kultiviert und am nächsten Tag ihre Plasmide isoliert. Diese wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen (*Eco*RI oder *Xba*I) verdaut und im 1%-Agarosegel auf das Enthalten der jeweiligen Inserts überprüft. Zunächst konnten nur für das Plasmid pUC18\_Lactase positive Transformanten nachgewiesen werden. Nach Verdau der Plasmide der für pUC18\_Phlorizin-Hydrolase und pUC18\_Lactase-Phlorizin-Hydrolase erhaltenen Transformanten, konnten nach Auftrennung der Fragmente im 1 %-igen Agarosegel weder Banden für die Phlorizin-Hydrolase-Domäne bei ca. 1,5 kb, noch für die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase bei ca. 3 kb detektiert werden.

Auch der Einsatz anderer Klonierungsvektoren, wie z.B. pET 20b, pCYTEXP1, und pASKIBA1C, ergab nach Transformation in *E. coli*-DH5 $\alpha$  keine positiven Klone.

Zunächst wurde vermutet, dass die Genprodukte der Phlorizin-Hydrolase-Domäne und der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase für *E. coli*-DH5 $\alpha$  toxisch sein könnten. Weitere Kontrollen, d.h. Sequenzierungen der in pUC18 klonierten Lactase-Phlorizin-Hydrolase-Sequenz ergaben jedoch, dass sich durch Anhängen eines Stopcodons und einer nachfolgenden *Xba*I-Schnittstelle an die Lactase-Phlorizin-Hydrolase folgende Sequenz ergab:



Aus der Überlappung der Sequenz für das Stopcodon TGA mit der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Xba*I resultiert eine Methylierungsstelle für *E. coli*-DH5 $\alpha$ , bzw. für alle *E. coli*-Stämme, die ein intaktes *dam*-Gen besitzen. Dieses Gen kodiert für die *dam*-Methylase (DNA adenine methylase), die eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die N<sup>6</sup>-Position des Adeninrestes der Erkennungssequenz 5'-GATC-3' überträgt (Marinus et al., 1973; Geier et al., 1979). Durch die Methylierung wird die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Xba*I so maskiert, dass sie von ihm nicht mehr erkannt werden kann, d.h. an dieser Schnittstelle kann nicht geschnitten werden.

Um positive Transformanten nach *Xba*I-Verdau erkennen zu können, wurde die Methylierung, bzw. Maskierung der Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Xba*I im Folgenden durch Verwendung des Dam<sup>-</sup>-Stammes *E. coli*-JM110 vermieden. Dieser Stamm

besitzt eine Mutation im *dam*-Gen, so dass Adeninreste der Nucleotidsequenz 5'-GATC-3' nicht methyliert werden.

Nach Transformation der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase, sowie der Phlorizin-Hydrolase-Domäne in *E. coli*-JM110 konnten in beiden Fällen nach *Xba*I-Verdau und Auftrennung der erhaltenen Fragmente im 1 %-igen Agarosegel positive Klone nachgewiesen werden.

### 5.6. Sequenzierung der amplifizierten Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne, sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase

Die Plasmide pUC18\_Lactase, pUC18\_Phlorizin-Hydrolase und pUC18\_Lactase-Phlorizin-Hydrolase wurden sequenziert. Zur Sequenzierung wurden folgende Primer eingesetzt: M13 (Forward und Reverse Primer, die beiderseits der Multiplen Klonierungsstelle von pUC18 binden), LPHIII\_SeqP1FW, LPHIII\_SeqP2Rev, LPHIV\_SeqP3Rev, LPHIV\_SeqP4FW, LPHIV\_SeqP5FW und LPHIV\_SeqP6FW.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen der Lactase-Domäne und Phlorizin-Hydrolase-Domäne, sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase wurden anschließend mit der veröffentlichten Sequenz der humanen Lactase-Phlorizin-Hydrolase ((Mantei et al., 1988); GenBank Acc.: X07994) verglichen.

In Abb. 5.7. ist das Alignment der DNA-Sequenzen der Klone dargestellt, deren Sequenzen im Vergleich mit veröffentlichten Sequenzdaten (Mantei et al. 1988) die kleinste Anzahl an Abweichungen aufwies:

LPH-EMBL	GTCAGAGCCTTCACTTTTCCATCTGAGGTGCCCTCCAAGGCTAAAGTCGTT	51
LPHges	CCGGAATTCGTCAGAGCCTTCACTTTTCCATCTGAGGTGCCCTCCAAGGCTAAAGTCGTT	60
LPHIII	CCGGAATTCGTCAGAGCCTTCACTTTTCCATCTGAGGTGCCCTCCAAGGCTAAAGTCGTT	60
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	TGGGAAAAGTTCTCCAGCCAACCCAAGTTCGAAAGAGATTTGTCTTACCACGGGACGTTT	111
LPHges	TGGGAAAAGTTCTCCAGCCAACCCAAGTTCGAAAGAGATTTGTCTTACCACGGGACGTTT	120
LPHIII	TGGGAAAAGTTCTCCAGCCAACCCAAGTTCGAAAGAGATTTGATCTTACCACGGGACGTTT	120
LPHIV	-----	
	*****	

LPH-EMBL	CGGGATGACTTTCTGTGGGGCGTGTCTCTTCCGCTTATCAGATTGAAGGCGCGTGGGAT	171
LPHges	CGGGATGACTTTCTGTGGGGCGTGTCTCTTCCGCTTATCAGATTGAAGGCGCGTGGGAT	180
LPHIII	CGGGATGACTTTCTGTGGGGCGTGTCTCTTCCGCTTATCAGATTGAAGGCGCGTGGGAT	180
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	GCCGATGGCAAAGGCCCCAGCATCTGGGATAACTTTACCCACACACCAGGGAGCAATGTG	231
LPHges	GCCGATGGCAAAGGCCCCAGCATCTGGGATAACTTTACCCACACACCAGGGAGCAATGTG	240
LPHIII	GCCGATGGCAAAGGCCCCAGCATCTGGGATAACTTTACCCACACACCAGGGAGCAATGTG	240
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	AAAGACAATGCCACTGGAGACATCGCTGTGACAGCTATCACCAGCTGGATGCCGATCTG	391
LPHges	AAAGACAATGCCACTGGAGACATCGCTGTGACAGCTATCACCAGCTGGATGCCGATCTG	300
LPHIII	AAAGACAATGCCACTGGAGACATCGCTGTGACAGCTATCACCAGCTGGATGCCGATCTG	300
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	AATATGCTCCGAGCTTTGAAGGTGAAGGCCTACCGCTTCTCTATCTCCTGGTCTCGGATT	351
LPHges	AATATGCTCCGAGCTTTGAAGGTGAAGGCCTACCGCTTCTCTATCTCCTGGTCTCGGATT	360
LPHIII	AATATGCTCCGAGCTTTGAAGGTGAAGGCCTACCGCTTCTCTATCTCCTGGTCTCGGATT	360
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	TTCCCAACTGGGAGAAACAGCTCTATCAACAGTCATGGGGTTGATTATTACAACAGGCTG	411
LPHges	TTCCCAACTGGGAGAAACAGCTCTATCAACAGTCATGGGGTTGATTATTACAACAGGCTG	420
LPHIII	TTCCCAACTGGGAGAAACAGCTCTATCAACAGTCATGGGGTTGATTATTACAACAGGCTG	420
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	ATCAATGGCTTGGTGGCAAGCAACATCTTTCCCATGGTGACATTGTTCCATTGGGACCTG	471
LPHges	ATCAATGGCTTGGTGGCAAGCAACATCTTTCCCATGGTGACATTGTTCCATTGGGACCTG	480
LPHIII	ATCAATGGCTTGGTGGCAAGCAACATCTTTCCCATGGTGACATTGTTCCATTGGGACCTG	480
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	CCCCAGGCCCTCCAGGATATCGGAGGCTGGGAGAATCCTGCCTTGATTGACTTGTFTTGAC	531
LPHges	CCCCAGGCCCTCCAGGATATCGGAGGCTGGGAGAATCCTGCCTTGATTGACTTGTFTTGAC	540
LPHIII	CCCCAGGCCCTCCAGGATATCGGAGGCTGGGAGAATCCTGCCTTGATTGACTTGTFTTGAC	540
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	AGCTACGCAGACTTTTGTFTTCCAGACCTTTGGTGATAGAGTCAAGTTTGGATGACTTTT	591
LPHges	AGCTACGCAGACTTTTGTFTTCCAGACCTTTGGTGATAGAGTCAAGTTTGGATGACTTTT	600
LPHIII	AGCTACGCAGACTTTTGTFTTCCAGACCTTTGGTGATAGAGTCAAGTTTGGATGACTTTT	600
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	AATGAGCCCATGTACCTGGCATGGCTAGGTTATGGCTCAGGGGAATTTCCCCCAGGGGTG	651
LPHges	AATGAGCCCATGTACCTGGCATGGCTAGGTTATGGCTCAGGGGAGTTTCCCCCAGGGGTG	660
LPHIII	AATGAGCCCATGTACCTGGCATGGCTAGGTTATGGCTCAGGGGAGTTTCCCCCAGGGGTG	660
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	AAGGACCCAGGCTGGGCACATATAGGATAGCCACACCGTCATCAAAGCCCATGCCAGA	711
LPHges	AAGGACCCAGGCTGGGCACATATAGGATAGCCACACCGTCATCAAAGCCCATGCCAGA	720
LPHIII	AAGGACCCAGGCTGGGCACATATAGGATAGCCACACCGTCATCAAAGCCCATGCCAGA	720
LPHIV	-----	
	*****	

LPH-EMBL	GTCTATCACACGTACGATGAGAAATACAGGCAGGAGCAGAAGGGGGTCATCTCGCTGAGC	771
LPHges	GTCTATCACACGTACGATGAGAAATACAGGCAGGAGCAGAAGGGGGTCATCTCGCTGAGC	780
LPHIII	GTCTATCACACGTACGATGAGAAATACAGGCAGGAGCAGAAGGGGGTCATCTCGCTGAGC	780
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	CTCAGTACACACTGGGCAGAGCCCAAGTCACCAGGGGTCCCAGAGATGTGGAAGCCGCT	831
LPHges	CTCAGTACACACTGGGCAGAGCCCAAGTCACCAGGGGTCCCAGAGATGTGGAAGCCGCT	840
LPHIII	CTCAGTACACACTGGGCAGAGCCCAAGTCACCAGGGGTCCCAGGATGTGGAAGCCGCT	840
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	GACCGAATGCTGCAGTTCTCCCTGGGCTGGTTTGTCTACCCCATTTTTAGAAAACGGAGAC	891
LPHges	GACCGAATGCTGCAGTTCTCCCTGGGCTGGTTTGTCTACCCCATTTTTAGAAAACGGGAC	900
LPHIII	GACCGAATGCTGCAGTTCTCCCTGGGCTGGTTTGTCTACCCCATTTTTAGAAAACGGGAC	900
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	TATCCTGACACCATGAAGTGGAAAGTGGGGAACAGGAGTGAAGTGCAGCACTTAGCCACC	951
LPHges	TATCCTGACACCATGAAGTGGAAAGTGGGGAACAGGAGTGAAGTGCAGCACTTAGCCACC	960
LPHIII	TATCCTGACACCATGAAGTGGAAAGTGGGGAACAGGAGTGAAGTGCAGCACTTAGCCACC	960
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	TCCCGCCTGCCAAGCTTCACTGAGGAAGAGAAGAGGTTTCATCAGGGCGACGGCCGACGTC	1011
LPHges	TCCCGCCTGCCAAGCTTCACTGAGGAAGAGAAGAGGTTTCATCAGGGCGACGGCCGACGTC	1020
LPHIII	TCCCGCCTGCCAAGCTTCACTGAGGAAGAGAAGAGGTTTCATCAGGGCGACGGCCGACGTC	1020
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	TTCTGCCTCAACACGTACTACTCCAGAATCGTGCAGCACAAAAACCCAGGCTAAACCCA	1071
LPHges	TTCTGCCTCAACACGTACTACTCCAGAATCGTGCAGCACAAAAACCCAGGCTAAACCCA	1080
LPHIII	TTCTGCCTCAACACGTACTACTCCAGAATCGTGCAGCACAAAAACCCAGGCTAAACCCA	1080
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	CCCTCCTACGAAGACGACCAGGAGATGGCTGAGGAGGAGGACCCTTCGTGGCCTTCCACG	1131
LPHges	CCCTCCTACGAAGACGACCAGGAGATGGCTGAGGAGGAGGACCCTTCGTGGCCTTCCACG	1140
LPHIII	CCCTCCTACGAAGACGACCAGGAGATGGCTGAGGAGGAGGACCCTTCGTGGCCTTCCACG	1140
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	GCAATGAACAGAGCTGCGCCCTGGGGGACGCGAAGGCTGCTGAACTGGATCAAGGAAGAG	1191
LPHges	GCAATGAACAGAGCTGCGCCCTGGGGGACGCGAAGGCTGCTGAACTGGATCAAGGAAGAG	1200
LPHIII	GCAATGAACAGAGCTGCGCCCTGGGGGACGCGAAGGCTGCTGAACTGGATCAAGGAAGAG	1200
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	TATGGTGACATCCCATTACATCACCGAAAACGGAGTGGGGCTGACCAATCCGAACACG	1251
LPHges	TATGGTGACATCCCATTACATCACCGAAAACGGAGTGGGGCTGACCAATCCGAACACG	1260
LPHIII	TATGGTGACATCCCATTACATCACCGAAAACGGAGTGGGGCTGACCAATCCGAACACG	1260
LPHIV	-----	
	*****	
LPH-EMBL	GAGGATACTGATAGGATATTTTACCACAAAACCTACATCAATGAGGCTTTGAAAGCCTAC	1311
LPHges	GAGGATACTGATAGGATATTTTACCACAAAACCTACATCAATGAGGCTTTGAAAGCCTAC	1320
LPHIII	GAGGATACTGATAGGATATTTTACCACAAAACCTACATCAATGAGGCTTTGAAAGCCTAC	1320
LPHIV	-----	
	*****	

LPH-EMBL	AGGCTCGATGGTATAGACCTTCGAGGGTATGTCGCCTGGTCTCTGATGGACAACCTTTGAG	1371
LPHges	AGGCTCGATGGTATAGACCTTCGAGGGTATGTCGCCTGGTCTCTGATGGACAACCTTTGAG	1380
LPHIII	AGGCTCGATGGTATAGACCTTCGAGGGTATGTCGCCTGGTCTCTGATGGACAACCTTTGAG	1380
LPHIV	----- *****	
LPH-EMBL	TGGCTAAATGGCTACACGGTCAAGTTTGGACTGTACCATGTTGATTTCAACAACACGAAC	1431
LPHges	TGGCTAAATGGCTACACGGTCAAGTTTGGACTGTACCATGTTGATTTCAACAACACGAAC	1440
LPHIII	TGGCTAAATGGCTACACGGTCAAGTTTGGACTGTACCATGTTGATTTCAACAACACGAAC	1440
LPHIV	----- *****	
LPH-EMBL	AGGCCTCGCACAGCAAGAGCCTCCGCCAGGTACTIONACACAGAGGTCATTACCAACAACGGC	1491
LPHges	AGGCCTCGCACAGCAAGAGCCTCCGCCAGGTACTIONACACAGAGGTCATTACCAACAACGGC	1500
LPHIII	AGGCCTCGCACAGCAAGAGCCTCCGCCAGGTACTIONACACAGAGGTCATTACCAACAACGGC	1500
LPHIV	-----CTAG	5
	*****	
LPH-EMBL	ATGCCACTGGCCAGGGAGGATGAGTTTCTGTACGGACGGTTTCCTGAGGGCTTCATCTGG	1551
LPHges	ATGCCACTGGCCAGGGAGGATGAGTTTCTGTACGGACGGTTTCCTGAGGGCTTCATCTGG	1560
LPHIII	ATGCCAGAATTCCGG-----	1515
LPHIV	TCTAGACTGGCCAGGGAGGATGAGTTTCTGTACGGACGGTTTCCTGAGGGCTTCATCTGG	64
	*****	
LPH-EMBL	AGTGCAGCTTCTGCTGCATATCAGATTGAAGGTGCGTGGAGAGCAGATGGCAAAGGACTC	1611
LPHges	AGTGCAGCTTCTGCTGCATATCAGATTGAAGGTGCGTGGAGAGCAGATGGCAAAGGACTC	1620
LPHIII	-----	
LPHIV	AGTGCAGCTTCTGCTGCATATCAGATTGAAGGTGCGTGGAGAGCAGATGGCAAAGGACTC	124
	*****	
LPH-EMBL	AGCATTGCGACACGTTTTCTCACACACCACTGAGGGTTGAGAACGATGCCATTGGAGAC	1671
LPHges	AGCATTGCGACACGTTTTCTCACACACCACTGAGGGTTGAGAACGATGCCATTGGAGAC	1680
LPHIII	-----	
LPHIV	AGCATTGCGACACGTTTTCTCACACACCACTGAGGGTTGAGAACGATGCCATTGGAGAC	184
	*****	
LPH-EMBL	GTGGCCTGTGACAGTTATCACAAGATTGCTGAGGATCTGGTCACCCTGCAGAACCTGGGT	1731
LPHges	GTGGCCTGTGACAGTTATCACAAGATTGCTGAGGATCTGGTCACCCTGCAGAACCTGGGT	1740
LPHIII	-----	
LPHIV	GTGGCCTGTGACAGTTATCACAAGATTGCTGAGGATCTGGTCACCCTGCAGAACCTGGGT	244
	*****	
LPH-EMBL	GTGTCCCCTACTACCGTTTTTCCATCTCCTGGTCTCGCATCCTCCCTGATGGAACCACCAGG	1791
LPHges	GTGTCCCCTACTACCGTTTTTCCATCTCCTGGTCTCGCATCCTCCCTGATGGAACCACCAGG	1800
LPHIII	-----	
LPHIV	GTGTCCCCTACTACCGTTTTTCCATCTCCTGGTCTCGCATCCTCCCTGATGGAACCACCAGG	304
	*****	
LPH-EMBL	TACATCAATGAAGCGGGCCTGAACTACTACGTGAGGCTCATCGATACTGCTGGCCGCC	1851
LPHges	TACATCAATGAAGCGGGCCTGAACTACTACGTGAGGCTCATCGATACTGCTGGCCGCC	1860
LPHIII	-----	
LPHIV	TACATCAATGAAGCGGGCCTGAACTACTACGTGAGGCTCATCGATACTGCTGGCCGCC	364
	*****	
LPH-EMBL	AGCATCCAGCCCCAGGTGACCATTTACACTGGGACCTACCACAGACGCTCCAAGATGTA	1911
LPHges	AGCATCCAGCCCCAGGTGACCATTTACACTGGGACCTACCACAGACGCTCCAAGATGTA	1920
LPHIII	-----	
LPHIV	AGCATCCAGCCCCAGGTGACCATTTACACTGGGACCTACCACAGACGCTCCAAGATGTA	424
	*****	

LPH-EMBL	GGAGGCTGGGAGAATGAGACCATCGTGCAGCGGTTTAAGGAGTATGCAGATGTGCTCTTC	1971
LPHges	GGAGGCTGGGAGAATGAGACCATCGTGCAGCGGTTTAAGGAGTATGCAGATGTGCTCTTC	1980
LPHIII	-----	
LPHIV	GGAGGCTGGGAGAATGAGACCATCGTGCAGCGGTTTAAGGAGTATGCAGATGTGCTCTTC *****	484
LPH-EMBL	CAGAGGCTGGGAGACAAGGTGAAGTTTTGGATCACGTTGAATGAGCCCTTTGTCATTGCT	2031
LPHges	CAGAGGCTGGGAGACAAGGTGAAGTTTTGGATCACGTTGAATGAGCCCTTTGTCATTGCT	2040
LPHIII	-----	
LPHIV	CAGAGGCTGGGAGACAAGGTGAAGTTTTGGATCACGTTGAATGAGCCCTTTGTCATTGCT *****	544
LPH-EMBL	TACCAGGGCTATGGCTACGGAACAGCAGCTCCAGGAGTCTCCAATAGCCTGGCACTGCC	2091
LPHges	TACCAGGGCTATGGCTACGGAACAGCAGCTCCAGGAGTCACCAATAAGCCTGGCACTGCC	2100
LPHIII	-----	
LPHIV	TACCAGGGCTATGGCTACGGAACAGCAGCTCCAGGAGTCTCCAATAGCCTGGCACTGCC *****	604
LPH-EMBL	CCCTACATTGTTGGCCACAATCTAATAAAGGCTCATGCTGAGGCCTGGCATCTGTACAAC	2151
LPHges	CCCTACATTGTTGGCCACAATCTAATAAAGGCTCATGCTGAGGCCTGGCATCTGTACAAC	2160
LPHIII	-----	
LPHIV	CCCTACATTGTTGGCCACAATCTAATAAAGGCTCATGCTGAGGCCTGGCATCTGTACAAC *****	664
LPH-EMBL	GATGTGTACCGCGCCAGTCAAGGTGGCGTGATTTCCATCACCATCAGCAGTGA CTGGGCT	2211
LPHges	AATGTGTACCGCGCCAGTCAAGGTGGCGTGATTTCAATCACCATCAGCAGTGA CTGGGCT	2220
LPHIII	-----	
LPHIV	GATGTGTACCGCGCCAGTCAAGGTGGCGTGATTTCCATCACCATCAGCAGTGA CTGGGCT *****	724
LPH-EMBL	GAACCCAGAGATCCCTCTAACCAGGAGGATGTGGAGGCAGCCAGGAGATATGTTTCAGTTC	2271
LPHges	GAACCCAGAGATCCCTCTAACCAGGAGGATGTGGAGGCAGCCAGGAGATATGTTTCAGTTC	2280
LPHIII	-----	
LPHIV	GAACCCAGAGATCCCTCTAACCAGGAGGATGTGGAGGCAGCCAGGAGATATGTTTCAGTTC *****	784
LPH-EMBL	ATGGGAGGCTGGTTTTGCACATCCTATTTTCAAGAATGGAGATTACAATGAGGTGATGAAG	2331
LPHges	ATGGGAGGCTGGTTTTGCACATCCTATTTTCAAGAATGGAGATTACAATGAGGTGATGAAG	2340
LPHIII	-----	
LPHIV	ATGGGAGGCTGGTTTTGCACATCCTATTTTCAAGAATGGAGATTACAATGAGGTGATGAAG *****	844
LPH-EMBL	ACGCGGATCCGTGACAGGAGCTTGGCTGCAGGCCTCAACAAGTCTCGGCTGCCAGAATTT	2391
LPHges	ACGCGGATCCGTGACAGGAGCTTGGCTGCAGGCCTCAACAAGTCTCGGCTGCCAGAATTT	2400
LPHIII	-----	
LPHIV	ACGCGGATCCGTGACAGGAGCTTGGCTGCAGGCCTCAACAAGTCTCGGCTGCCAGAGTTT *****	904
LPH-EMBL	ACAGAGAGTGAGAAGAGGAGGATCAACGGCACCTATGACTTTTTTGGGTTCAATCACTAC	2451
LPHges	ACAGAGAGTGAGAAGAGGAGGATCAGCGGCACCTATGACTTTTTTGGGTTCAATCACTAC	2460
LPHIII	-----	
LPHIV	ACAGAGAGTGAGAAGAGGAGGATCAACGGCACCTATGACTTTTTTGGGTTCAATCACTAC *****	964
LPH-EMBL	ACCACTGTCCTCGCCTACAACCTCAACTATGCCACTGCCATCTCTTCTTTTGATGCAGAC	2511
LPHges	GCCACTGTCCTCGCCTACAACCTCAACTATGCCACTGCCATCTCTTCTTTTGATGCAGAC	2520
LPHIII	-----	
LPHIV	ACCACTGTCCTCGCCTACAACCTCAACTATGCCACTGCCATCTCTTCTTTTGATGCAGAC *****	1024

LPH-EMBL	AGAGGAGTTGCTTCCATCGCAGATCGCTCGTGGCCAGACTCTGGCTCCTTCTGGCTGAAG	2571
LPHges	AGAGGAGTTGCTTCCATCGCAGATCGCTCGTGGCCAGACTCTGGCTCCTTCTGGCTGAAG	2580
LPHIII	-----	
LPHIV	AGAGGAGTTGCTTCCATCGCAGATCGCTCGTGGCCAGACTCTGGCTCCTTCTGGCTGAAG *****	1084
LPH-EMBL	ATGACGCCTTTTGGCTTCAGGAGGATCCTGAACTGGTTAAAGGAGGAATACAATGACCCCT	2531
LPHges	ATGACGCCTTTTAGCGTCAGGAGGATCCTGAACTGGTTAAAGGAGGAATACAATGACCCCT	2640
LPHIII	-----	
LPHIV	ATGACGCCTTTTGGCTTCAGGAGGATCCTGAACTGGTTAAAGGAGGAATACAATGACCCCT ***** ** *****	1144
LPH-EMBL	CCAATTTATGTCACAGAGAATGGAGTGTCCAGCGGGAGAAAACAGACCTCAATGACACT	2691
LPHges	CCAATTTATGTCACAGAGAATGGAGTGTCCAGCGGGAGAAAACAGACCTCAATGACACT	2700
LPHIII	-----	
LPHIV	CCAATTTATGTCACAGAGAATGGAGTGTCCAGCGGGAGAAAACAGACCTCAATGACACT ***** *****	1204
LPH-EMBL	GCAAGGATCTACTACCTTCGGACTTACATCAATGAGGCCCTCAAAGCTGTGCAGGACAAG	2751
LPHges	GCAAGGATCTACTACCTTCGGACTTACATCAATGAGGCCCTCAAAGCTGTGCAGGACAAG	2760
LPHIII	-----	
LPHIV	GCAAGGATCTACTACCTTCGGACTTACATCAATGAGGCCCTCAAAGCTGTGCAGGACAAG *****	1264
LPH-EMBL	GTGGACCTTCGAGGATACACAGTTTGGAGTGCATTTTGGAGTGGCCACAGGC	2811
LPHges	GTGGACCTTCGAGGATACACAGTTTGGAGTGCATTTTGGAGTGGCCACAGGC	2820
LPHIII	-----	
LPHIV	GTGGACCTTCGAGGATACACAGTTTGGAGTGCATTTTGGAGTGGCCACAGGC *****	1324
LPH-EMBL	TTTTTCAGAGAGATTTGGTCTGCATTTTGTGAACTACAGTGACCCTTCTCTGCCAAGGATC	2871
LPHges	TTTTTCAGAGAGATTTGGTCTGCATTTTGTGAACTACAGTGACCCTTCTCTGCCAAGGATC	2880
LPHIII	-----	
LPHIV	TTTTTCAGAGAGATTTGGTCTGCATTTTGTGAACTACAGTGACCCTTCTCTGCCAAGGATC *****	1384
LPH-EMBL	CCCAAAGCATCAGCGAAGTTCTACGCCTCTGTGGTCCGATGCAATGGCTTCCCTGACCCC	2931
LPHges	CCCAAAGCATCAGCGAAGTTCTACGCCTCTGTGGTCCGATGCAATGGCTTCCCTGACCCC	2940
LPHIII	-----	
LPHIV	CCCAAAGCATCAGCGAAGTTCTACGCCTCTGTGGTCCGATGCAATGGCTTCCCTGACCCC ***** *****	1444
LPH-EMBL	GCTACAGGGCCTCACGCTTGTCTCCACCAGCCAGATGCTGGACCCACCATCAGCCCCGTG	2991
LPHges	GCTACAGGGCCTCACGCTTGTCTCCACCAGCCAGATGCTGGACCCACCATCAGCCCCGTG	3000
LPHIII	-----	
LPHIV	GCTACAGGGCCTCACGCTTGTCTCCACCAGCCAGATGCTGGACCCACCATCAGCCCCGTG ***** *****	1504
LPH-EMBL	AGACAGGAGGAGGTGCAGTTTCTGGGGCTAATGCTCGGCACCACAGAAGCACAGACAGCT	3051
LPHges	AGACAGGAGGAGGTGCAGTTTCTGGGGCTAATGCTCGGCACCACAGAAGCACAGACAGCT	3060
LPHIII	-----	
LPHIV	AGACAGGAGGAGGTGCAGTTTCTGGGGCTAATGCTCGGCACCACAGAAGCACAGACAGCT *****	1564
LPH-EMBL		
LPHges	TGATGATCTAGACTAG	3076
LPHIII	-----	
LPHIV	TGATGATCTAGACTAG *****	1580

**Abb. 5.7.:** Alignment der von Mantei et al. veröffentlichten Nucleotidsequenz der Lactase-Phlorizin-Hydrolase (Mantei et al., 1988) mit DNA-Sequenzen der klonierten

Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPHges), Lactase-Domäne (LPHIII) und Phlorizin-Hydrolase-Domäne (LPHIV). Die veröffentlichte Sequenz (Mantei et al., 1988) geht nach Base 3051 mit dem Membrananker weiter. Der Bereich der Lactase-Domäne ist grün dargestellt, der der Phlorizin-Hydrolase-Domäne blau. Die abweichenden Basen sind rot hervorgehoben. Die an die klonierten Sequenzen angehängten Schnittstellen für *EcoRI* und *XbaI*, sowie Stopcodons sind schwarz dargestellt.

Im Folgenden werden die Basenabweichungen der erhaltenen DNA-Sequenzen ausgewertet. Bei diesen Abweichungen kann es sich einerseits um Mutationen handeln, die im Laufe der PCR durch die Taq-Polymerase eingeführt wurden und andererseits um SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismen).

Bei Abweichungen, die in den einzelnen Domänen und der klonierten Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase vorkommen, wurde davon ausgegangen, dass es sich um Polymorphismen handelt, während es sich bei Basenabweichungen, die nur in der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase vorkommen, um Mutationen handeln muß.

### 5.6.1. Lactase-Domäne

Durch das Alignment der DNA-Sequenz der in dieser Arbeit klonierten Lactase-Domäne mit der von Mantei et al. (Mantei et al., 1988) veröffentlichten DNA-Sequenz (vgl. Abb. 5.7.) konnten sechs Basenabweichungen entdeckt werden. Von diesen Abweichungen führen, wie in Tab 5.1. dargestellt, drei zu Aminosäureabweichungen, während es sich bei den anderen drei um stille Mutationen handelt, die zu keiner Aminosäureabweichung führen.

<b>Basen- abweichung Nr.</b>	<b>Base Nr.</b>	<b>abweichende Base: Lit. (Mantei, Villa et al. 1988) ↔ Klon</b>	<b>resultierende Aminosäure: Lit. (Mantei, Villa et al. 1988) ↔ Klon</b>
<b>1</b>	103	T ↔ A	Phe 30 Ile
<b>2</b>	645	A ↔ G	Glu 210
<b>3</b>	680	C ↔ T	Pro 222 Leu
<b>4</b>	697	A ↔ G	Thr 228 Ala
<b>5</b>	825	A ↔ G	Arg 270
<b>6</b>	897	A ↔ G	Gly 294

**Tab. 5.1.:** Von der Literatur (Mantei et al., 1988) abweichende Basen der Lactase-Domäne des Klons mit der kleinsten Anzahl an Abweichungen. Die Basennummerierung

entspricht der aus Abb. 5.7., die Nummerierung der resultierenden Aminosäuren entspricht der aus Abb. 5.8..

### 5.6.2. Phlorizin-Hydrolase-Domäne

Die klonierte Phlorizin-Hydrolase-Domäne wies im Gegensatz zu den Literaturangaben (Mantei et al., 1988) die folgenden sechs, in Tab. 5.2. dargestellten Abweichungen von der DNA-Sequenz auf. Bei vier dieser Basenabweichungen handelt es sich um stille Abweichungen, die nicht in einer Aminosäureabweichung resultieren, während dies bei den anderen beiden Abweichungen der Fall ist.

<b>Basen- abweichung Nr.</b>	<b>Base Nr.</b>	<b>abweichende Base: Lit. (Mantei et al., 1988)</b> <b>↔ Klon</b>	<b>resultierende Aminosäure: Lit. (Mantei et al., 1988)</b> <b>↔ Klon</b>
<b>1</b>	239 (1735)	C ↔ T	Leu 77 (574)
<b>2</b>	391 (1887)	C ↔ T	Tyr (127) 624
<b>3</b>	665 (2161)	G ↔ A	Asp 219 (716) Asn
<b>4</b>	736 (2232)	T ↔ C	Asp 242 (739)
<b>5</b>	863 (2359)	A ↔ G	Arg 285 (782) Gly
<b>6</b>	901 (2397)	A ↔ G	Glu 297 (794)

**Tab. 5.2.:** Von der Literatur (Mantei et al., 1988) abweichende Basen der Phlorizin-Hydrolase Domäne. Die nicht eingeklammerten Basenpositionen entsprechen den Positionen in dieser Domäne. Die in Klammern angegebenen Basenpositionen entsprechen den Positionen der in dieser Arbeit klonierten Gesamt-Lactase Phlorizin-Hydrolase (vgl. Abb. 5.7.). Die Aminosäurenummerierung entspricht derjenigen aus Abb. 5.8..

### 5.6.3. Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase

Die klonierte Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase wies im Gegensatz zu Literaturangaben (Mantei et al., 1988) 23 Abweichungen von der DNA-Sequenz, d.h. deutlich mehr Basenabweichungen als die insgesamt 12 der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne auf. sie sind in Tab. 5.3. dargestellt:

Basen- abweichung Nr.	Base Nr.	abweichende Base:	resultierende Aminosäure:
		Lit. (Mantei et al., 1988) ↔ Klon	Lit. (Mantei et al., 1988) ↔ Klon
1	645*	A ↔ G	Glu 210
2	680*	C ↔ T	Pro 222 Leu
3	697*	A ↔ G	Thr 228 Ala
4	897*	A ↔ G	Gly 294
5	1630	G ↔ C	Asp 539 His
6	1735*	C ↔ T	Leu 574
7	1887*	C ↔ T	Tyr 624
8	1949	A ↔ T	Gln 645 Leu
9	2080	T ↔ A	Ser 689 Thr
10	2087	G ↔ A	Arg 691 Lys
11	2161*	G ↔ A	Asp 716 Asn
12	2196	C ↔ A	Ser 727
13	2232*	T ↔ C	Asp 739
14	2298	A ↔ G	Ala 761
15	2359*	A ↔ G	Ser 782 Gly
16	2426	A ↔ G	Asn 804 Ser
17	2461	A ↔ G	Thr 816 Ala
18	2593	G ↔ A	Gly 860 Ser
19	2596	T ↔ G	Phe 861 Val
20	2614	T ↔ C	Trp 867 Arg
21	2678	A ↔ G	Glu 888 Gly
22	2924	A ↔ G	Asn 970 Ser
23	2979	T ↔ C	Ala 988

**Tab. 5.3.:** Von der Literatur (Mantei et al. 1988) abweichende Basen der Gesamt-Lactase Phlorizin-Hydrolase des Klons mit der kleinsten Anzahl an Abweichungen. Die Basennummerierung entspricht der aus Abb. 5.7., die Nummerierung der resultierenden Aminosäuren entspricht der aus Abb. 5.8.. \*: Markierungen der Basenabweichungen, die schon in der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne vorkommen.

Der Vergleich der DNA-Sequenzen der klonierten Gesamt-Phlorizin-Hydrolase-Gene (LPHges) mit denen der klonierten Lactase-Domäne (LPHIII) und Phlorizin-Hydrolase-

Domäne (LPHIV) führte zu dem Ergebnis, dass es im Bereich der Lactase-Domäne der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase keine zusätzlichen Basenabweichungen gibt und im Bereich der Phlorizin-Hydrolase-Domäne 11 (vgl. Abb. 5.7.).

Neun der in der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase nachgewiesenen Basenabweichungen wurden zuvor ebenfalls in der Lactase- bzw. Phlorizin-Hydrolase-Domäne nachgewiesen. Es handelt sich um die Basen an den Positionen 645, 680, 697, 897, 1735, 1887, 2161, 2232 und 2359. Dies zeigt, dass die zusätzlichen Basenabweichungen durch ‚splicing by overlap extension‘ eingeführt worden sein müssen und es sich bei ihnen um echte Mutationen handelt. Es wurde im Folgenden darauf verzichtet, diese Mutationen zu verbessern, einerseits um zu überprüfen, ob das resultierende Protein Aktivität zeigt, andererseits weil dies die verbleibende Restzeit des Projektes nicht mehr zuließ.

Das in Abb. 5.8. dargestellte Alignment der aus den erhaltenen DNA-Sequenzen resultierenden Aminosäuresequenzen dieser Proteine zeigt, dass die rekombinante Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase nach Vergleich mit den rekombinanten Einzeldomänen im Bereich der Lactase-Domäne eine abweichende Aminosäure (I 30 F) besitzt und in dem der Phlorizin-Hydrolase 11 (D 539 H; N 645 L; S 689 T; R 691 K; N 804 S; T 816 A; G 860 S; F 861 V; W 867 R; E 888 G; N 970 S):

```
LPH_EMBL AFTFPSEVPSKAKVVWEKFSQPKFERDLFYHGTFRRDDFLWGVSSSAYQIEGAWDADGKG 60
LPHges  AFTFPSEVPSKAKVVWEKFSQPKFERDLFYHGTFRRDDFLWGVSSSAYQIEGAWDADGKG 60
LPHIII  AFTFPSEVPSKAKVVWEKFSQPKFERDLIYHGTFRRDDFLWGVSSSAYQIEGAWDADGKG 60
LPHIV   -----
          *****

LPH_EMBL PSIWDFNFTHTPGSNVKDNATGDIACDSYHQLDADLNMLRALKVKAYRFSISWSRIFPTGR 120
LPHges  PSIWDFNFTHTPGSNVKDNATGDIACDSYHQLDADLNMLRALKVKAYRFSISWSRIFPTGR 120
LPHIII  PSIWDFNFTHTPGSNVKDNATGDIACDSYHQLDADLNMLRALKVKAYRFSISWSRIFPTGR 120
LPHIV   -----
          *****

LPH_EMBL NSSINSHGVDYYNRLINGLVASNIFPMVTLFHWDLQPALQDIGGWENPALIDLFDYADF 180
LPHges  NSSINSHGVDYYNRLINGLVASNIFPMVTLFHWDLQPALQDIGGWENPALIDLFDYADF 180
LPHIII  NSSINSHGVDYYNRLINGLVASNIFPMVTLFHWDLQPALQDIGGWENPALIDLFDYADF 180
LPHIV   -----
          *****

LPH_EMBL CFQTFGDRVKFWMTFNEPMYLAWLGYGSGEFPPGVKDPGWALYRIAHAVIKAHARVYHTY 240
LPHges  CFQTFGDRVKFWMTFNEPMYLAWLGYGSGEFPPGVKDPGWALYRIAHAVIKAHARVYHTY 240
LPHIII  CFQTFGDRVKFWMTFNEPMYLAWLGYGSGEFPPGVKDPGWALYRIAHAVIKAHARVYHTY 240
LPHIV   -----
          *****
```

LPH_EMBL	DEKYRQEQKGVISLSLSTHWAEPKSPGVPRDVEAADRMLQFSLGWFAHPIFRNGDYPDTM	300
LPHges	DEKYRQEQKGVISLSLSTHWAEPKSPGVPRDVEAADRMLQFSLGWFAHPIFRNGDYPDTM	300
LPHIII	DEKYRQEQKGVISLSLSTHWAEPKSPGVPRDVEAADRMLQFSLGWFAHPIFRNGDYPDTM	300
LPHIV	----- *****	
LPH_EMBL	KWKVGNRSELQHLATSRLPSFTEEEKRFIRATADVFCCLNTYYSRIVQHKTPRLNPPSYED	360
LPHges	KWKVGNRSELQHLATSRLPSFTEEEKRFIRATADVFCCLNTYYSRIVQHKTPRLNPPSYED	360
LPHIII	KWKVGNRSELQHLATSRLPSFTEEEKRFIRATADVFCCLNTYYSRIVQHKTPRLNPPSYED	360
LPHIV	----- *****	
LPH_EMBL	DQEMAEEDPSWPSTAMNRAAPWGTRRLNWIKEEYGDIPYITENGVLTPNTEDTDR	420
LPHges	DQEMAEEDPSWPSTAMNRAAPWGTRRLNWIKEEYGDIPYITENGVLTPNTEDTDR	420
LPHIII	DQEMAEEDPSWPSTAMNRAAPWGTRRLNWIKEEYGDIPYITENGVLTPNTEDTDR	420
LPHIV	----- *****	
LPH_EMBL	IFYHKTYINEALKAYRLDGLDLRGYVAWSLMDNFEWLNQYTVKFGLYHVDNFNNTNRPRTA	480
LPHges	IFYHKTYINEALKAYRLDGLDLRGYVAWSLMDNFEWLNQYTVKFGLYHVDNFNNTNRPRTA	480
LPHIII	IFYHKTYINEALKAYRLDGLDLRGYVAWSLMDNFEWLNQYTVKFGLYHVDNFNNTNRPRTA	480
LPHIV	----- *****	
LPH_EMBL	RASARYYTEVITNNGMPLAREDEFYGRFPEGFIWSAASAAAYQIEGAWRADGKGLSIWDT	540
LPHges	RASARYYTEVITNNGMPLAREDEFYGRFPEGFIWSAASAAAYQIEGAWRADGKGLSIWHT	540
LPHIII	RASARYYTEVITNNGMP-----	497
LPHIV	-----LAREDEFYGRFPEGFIWSAASAAAYQIEGAWRADGKGLSIWDT	43
	*****	
LPH_EMBL	FSHTPLRVENDAIGDVACDSYHKIAEDLVTLQNLGVSHYRFSISWSRILPDGTTRYINEA	600
LPHges	FSHTPLRVENDAIGDVACDSYHKIAEDLVTLQNLGVSHYRFSISWSRILPDGTTRYINEA	600
LPHIII	-----	
LPHIV	FSHTPLRVENDAIGDVACDSYHKIAEDLVTLQNLGVSHYRFSISWSRILPDGTTRYINEA	103
	*****	
LPH_EMBL	GLNYYVRLIDTLAASIQPQVTIYHWDLPQTLQDVGGWENETIVQRFKEYADVLFQRLGD	660
LPHges	GLNYYVRLIDTLAASIQPQVTIYHWDLPQTLQDVGGWENETIVLRFKEYADVLFQRLGD	660
LPHIII	-----	
LPHIV	GLNYYVRLIDTLAASIQPQVTIYHWDLPQTLQDVGGWENETIVQRFKEYADVLFQRLGD	163
	*****	
LPH_EMBL	KVKFWITLNEPFVIAIQGYGYGTAAPGVSNRPGTAPYIVGHNLKHAHAEAWHLYNDVYRA	720
LPHges	KVKFWITLNEPFVIAIQGYGYGTAAPGVTKRPGTAPYIVGHNLKHAHAEAWHLYNNVYRA	720
LPHIII	-----	
LPHIV	KVKFWITLNEPFVIAIQGYGYGTAAPGVSNRPGTAPYIVGHNLKHAHAEAWHLYNNVYRA	223
	*****	
LPH_EMBL	SQGGVISITISSDWAEPDPSNQEDVEAARRYVQFMGGWFAHPIFKNGDYNEVMKTRIRD	780
LPHges	SQGGVISITISSDWAEPDPSNQEDVEAARRYVQFMGGWFAHPIFKNGDYNEVMKTRIRD	780
LPHIII	-----	
LPHIV	SQGGVISITISSDWAEPDPSNQEDVEAARRYVQFMGGWFAHPIFKNGDYNEVMKTRIRD	283
	*****	
LPH_EMBL	RSLAAGLNKSRLPEFTESEKRRINGTYDFFGFNHYTTVLAYNLNYATAISSFDADRGVAS	840
LPHges	RGLAAGLNKSRLPEFTESEKRRISGTYDFFGFNHYATVLAYNLNYATAISSFDADRGVAS	840
LPHIII	-----	
LPHIV	RGLAAGLNKSRLPEFTESEKRRINGTYDFFGFNHYTTVLAYNLNYATAISSFDADRGVAS	343
	*.*****	

```

LPH_EMBL IADRSWPDSGSFWLKMTPFGFRRIILNWLKKEEYNDPPIYVTENGVSQREEETDLNDTARIYY 900
LPHges IADRSWPDSGSFWLKMTPFSVRRILNRLKKEEYNDPPIYVTENGVSQRGEETDLNDTARIYY 900
LPHIII -----
LPHIV IADRSWPDSGSFWLKMTPFGFRRIILNWLKKEEYNDPPIYVTENGVSQREEETDLNDTARIYY 403
***** . ***** . ***** . *****

LPH_EMBL LRTYINEALKAVQDKVDLRGYTVWSAMDNFEWATGFSERFGLHFVNYS DPSLPRI PKASA 960
LPHges LRTYINEALKAVQDKVDLRGYTVWSAMDNFEWATGFSERFGLHFVNYS DPSLPRI PKASA 960
LPHIII -----
LPHIV LRTYINEALKAVQDKVDLRGYTVWSAMDNFEWATGFSERFGLHFVNYS DPSLPRI PKASA 463
***** . ***** . ***** . *****

LPH_EMBL KFYASVVRCNGFDPATGPHACLHQPDAGPTISPVRQEEVQFLGLMLGTTEAQTA 1015
LPHges KFYASVVRCSGFPDPATGPHACLHQPDAGPTISPVRQEEVQFLGLMLGTTEAQTA 1015
LPHIII -----
LPHIV KFYASVVRCNGFDPATGPHACLHQPDAGPTISPVRQEEVQFLGLMLGTTEAQTA 518
***** . ***** . ***** . *****

```

**Abb. 5.8.:** Alignment der Aminosäuresequenzen der rekombinanten Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPHges), Lactase-Domäne (LPHIII) und Phlorizin-Hydrolase-Domäne (LPHIV). Der Bereich der Lactase-Domäne ist grün dargestellt, der der Phlorizin-Hydrolase-Domäne blau. Die abweichenden Aminosäuren sind rot hervorgehoben.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase mit denen der beiden Einzeldomänen zeigt, dass die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase vor allem im hinteren Sequenzbereich zusätzliche Mutationen aufweist, die in den beiden Einzeldomänen nicht auftraten. Diese Mutationen wurden im Verlauf der Overlap-PCR eingebracht, bei der die Einzeldomänen als Target dienten. Von den 15 zusätzlich in die Sequenz der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase eingebrachten Aminosäuren führen drei zu stillen Mutationen, eine Mutation (I30F) führt zufällig zu der in der Literatur (Mantei et al., 1988) angegebenen Aminosäure (,Rückmutation‘), während die restlichen 11 in Aminosäureabweichungen, d.h. echten Mutationen resultieren.

Im Gegensatz zu den durch die PCR in die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase eingebrachten Mutationen besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den Aminosäureabweichungen der Einzeldomänen im Vergleich mit der von Mantei et al. (Mantei et al., 1988) veröffentlichten Sequenz um genetisch bedingte Variationen ein- und desselben Proteins handelt.

Bezüglich der aktiven Zentren, die als Glutamatrete an den Positionen 405 und 881 (Nucleophile der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne; vgl. Abb. 5.8.), sowie an den Positionen 197 und 670 (Oxocarbeniumion-Stabilisatoren, ebenfalls in jeweils der Lactase-

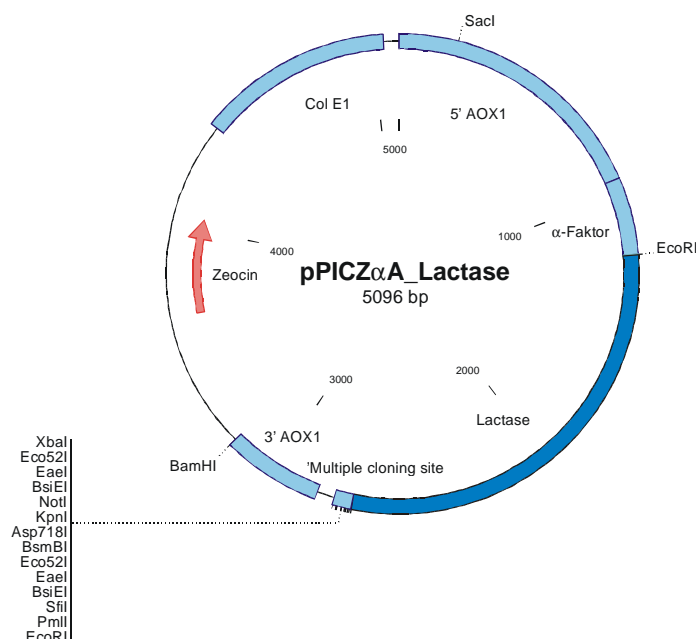
und Phlorizin-Hydrolase-Domäne lokalisiert; vgl. Abb. 5.8.) identifiziert werden konnten (Wacker et al. 1992), wurde festgestellt, dass diese nicht von Mutationen betroffen sind.

Eine der Basenabweichungen in der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase-DNA führt im rekombinanten Protein zu einer Aminosäureabweichung (N 804 S) in einer der möglichen N-Glykosylierungsstellen mit der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr. Dadurch kam es nach der Klonierung der Lactase-Phlorizin-Hydrolase in *Pichia pastoris* zum Verlust dieser potentiellen N-Glykosylierungsstelle. Dieser Tatbestand wurde nicht weiterverfolgt, da einerseits die Glykosylierung in *Pichia pastoris* etwas anders verläuft, als in menschlichen Zellen (Cregg et al., 2000; Sreekrishna et al. 1996; Stryer, 1995) und andererseits nicht bekannt ist, wo und an welchen Stellen die menschliche Lactase-Phlorizin-Hydrolase glykosyliert wird (Naim et al., 1992; Jacob et al., 2000). Dass potentielle Glykosylierungsstellen in der Sequenz enthalten sind, ist keine Garantie dafür, dass diese tatsächlich glykosyliert sind, bzw. es keine unterschiedlichen Glykosylierungsmuster geben könnte (Allen et al., 1995; Jacob et al., 2000).

## 5.7. Klonierung der Domänen für Lactase und Phlorizin-Hydrolase, sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase in den Expressionsvektor pPICZ $\alpha$ A

Die Expression der rekombinanten Einzeldomänen, sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase erfolgte in der Hefe *Pichia pastoris*. Dazu wurden ihre kodierenden Sequenzen in den Expressionsvektor pPICZ $\alpha$ A kloniert. Es wurde hierbei darauf verzichtet, die von der Literatur (Mantei et al., 1988) abweichenden Basen gegen die aus der Literatur zu ersetzen, da nicht bekannt ist, welche Variationen es bei dem Lactase-Phlorizin-Hydrolase-Gen gibt und es sich bei den in der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne nachgewiesenen Abweichungen um Einzelnukleotid-Polymorphismen handeln kann.

Bei dem Vektor pPICZ $\alpha$ A handelt es sich um einen ‚Shuttle-Vektor‘, der sowohl in *E. coli*, als auch in *Pichia pastoris* repliziert werden kann. pPICZ $\alpha$ A enthält zur Selektion positiver Transformanten ein Resistenzgen (*Sh ble*, *Streptoalloteichus hindustanus bleomycin gene*) gegen das Bleo-/ Phleomycin-Antibiotikum Zeocin aus *Streptomyces*, das stark toxisch auf Bakterien, Pilze, Pflanzen und Säugetierzellen wirkt. Zur Sekretion überexprimierter Proteine aus den Hefezellen enthält pPICZ $\alpha$ A den  $\alpha$ -Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Transkription inserierter Gene erfolgt unter Kontrolle des AOX1-Promotors, der durch Methanol induziert, in Anwesenheit von Glucose oder Glycerin jedoch reprimiert wird.



**Abb. 5.9.:** Klonierung der Lactase-Domäne (LPHIII) in pPICZ $\alpha$ A: pPICZ $\alpha$ A\_LPHIII; Zeocin: Resistenzmarker; ColE1: Replikationsstartpunkt aus pBR322 zur Replikation in *E. coli*; AOX1: methanolinduzierbarer Promotor;  $\alpha$ -Faktor: Sekretionsfaktor aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Die in pUC18 klonierte Lactase- und Phlorizin-Hydrolase, sowie die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase, wurden über ihre jeweiligen, endständigen Schnittstellen (Lactase-Domäne: *EcoRI*; Phlorizin-Hydrolase-Domäne: *XbaI*; Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase: *EcoRI* und *XbaI*) zunächst aus pUC18 herausgeschnitten und dann in den mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdauten Vektor pPICZ $\alpha$ A kloniert. Daraus resultierten die Plasmide pPICZ $\alpha$ A\_Lactase (vgl. Abb. 5.9.), pPICZ $\alpha$ A\_Phlorizin-Hydrolase und pPICZ $\alpha$ A\_Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase.

Nach erfolgreicher Transformation in *E. coli*-JM110 wurden einzelne Klone zur Kultivierung ausgewählt und die klonierten Bereiche der Lactase-Phlorizin-Hydrolase mit Hilfe von Primern aus dem AOX1-Bereich (5'AOX1- und 3'AOX1-Primer) sequenziert. Jeweils im Vergleich zur 1. Sequenzierung identische Klone, deren Inserts sich in frame mit dem  $\alpha$ -Faktor befanden, wurden daraufhin zur Transformation in *Pichia pastoris* verwendet.

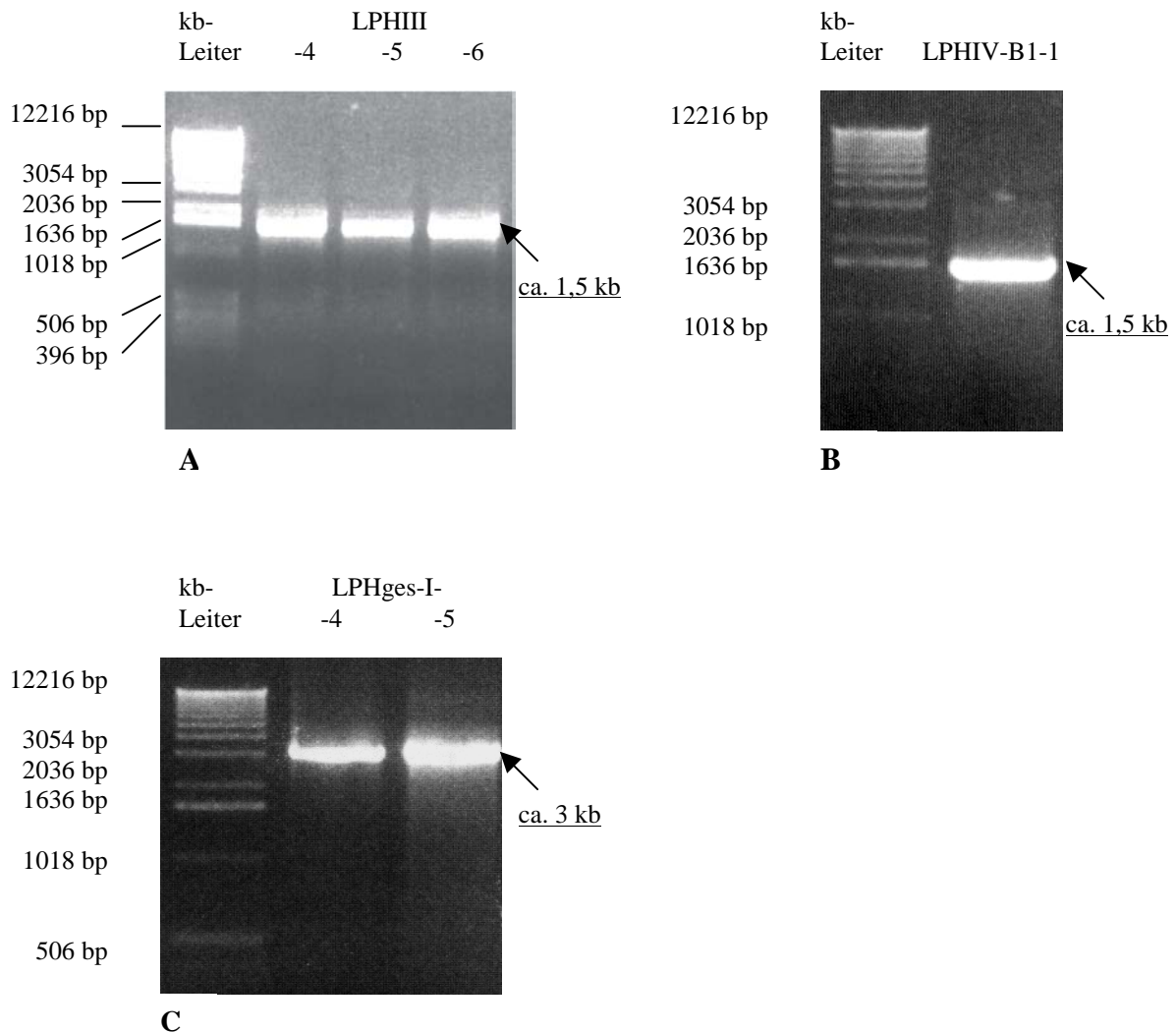
## 5.8. Transformation der Domänen der Lactase und Phlorizin-Hydrolase, sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase in *Pichia pastoris*

Zur Expression der Lactase-Domäne, der Phlorizin-Hydrolase-Domäne, sowie des gesamten Enzyms wurde die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris*, Stamm GS115 ausgewählt. Dieser auxotrophe Stamm besitzt eine Mutation im Histidinol-Dehydrogenase-Gen (*his 4*), was die Hemmung der Histidin-Biosynthese bewirkt, so dass zur Kultivierung in synthetischem Minimalmedium der Zusatz von Histidin nötig ist.

Die Selektion positiver Transformanden erfolgte über ihre Fähigkeit, in Zeocin<sup>TM</sup>-haltigem Medium wachsen zu können.

Zur Transformation in *Pichia pastoris* wurden die Plasmide pPICZ $\alpha$ A\_Lactase, pPICZ $\alpha$ A\_Phlorizin-Hydrolase und pPICZ $\alpha$ A\_Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase mit *SacI* linearisiert und mittels Elektroporation in kompetente *Pichia pastoris* GS115-Zellen transformiert. Dabei erfolgt die Integration der in den Vektor pPICZ $\alpha$ A klonierten DNA-Fragmente in das Genom der Hefe über homologe Rekombination.

Die nach der Transformation erhaltenen *Pichia pastoris*-Klone wurden auf die Integration der DNA der verschiedenen Domänen in das Genom hin untersucht. Dazu wurde die genomische DNA der Klone isoliert, und die darin enthaltenen unterschiedlichen Domänen mit Hilfe ihrer spezifischen Primer (LPHIII: LPHEco-FW und -RV; LPHIV: LPHXba-FW und -RV; LPHges: LPHEco-FW und LPHXba-RV) , wie in Abb. 5.10. zu sehen, mittels PCR nachgewiesen:



**Abb 5.10.:** Nachweis der aus der genomischen DNA verschiedener *Pichia*-Klone amplifizierte Lactase-Domäne (A), Phlorizin-Hydrolase-Domäne (B) und Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase (C).

Wie in Abb. 5.10. dargestellt, konnte die Lactase-Domäne in den 3 Klonen *Pichia*\_LPHIII-4, -5 und -6, die Phlorizin-Hydrolase-Domäne in dem Klon *Pichia*\_LPHIV-B1-1 und die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase in *Pichia*\_LPHges-I-4 und -5 mittels PCR nachgewiesen werden. Diese Klone wurden in den folgenden Expressionsversuchen verwendet.

## 5.9. Expression der Lactase und Phlorizin-Hydrolase, sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase in *Pichia pastoris*

Die Lactosehydrolyse der überexprimierten Proteine wurde mit Hilfe des Testes auf intestinale Disaccharidase-Aktivität nach Dahlqvist (Dahlqvist 1970; Dahlqvist 1984) gemessen, der hinsichtlich seiner Anwendbarkeit im Mikrotiterplattenmaßstab angepaßt wurde. Wie Skovbjerg et al. (Skovbjerg et al., 1982) nach Vergleich verschiedener Substrate feststellten, ist die Substratspezifität der Lactase-Phlorizin-Hydrolase für Lactose am höchsten (vgl. Tab.3.1.). Als Substrat wurde bei dem Test auf Disaccharidase-Aktivität nach Dahlqvist deshalb nur das natürliche Substrat Lactose verwendet.

### 5.9.1. Expression der Lactase-Domäne

Zur Expression der Lactase-Domäne wurden die Überstände von Schüttelkolbenkulturen der Klone *Pichia*\_LPHIII-4, -5 und -6 verwendet. Als Medium diente bei der Kultivierung, um den Testhintergrund möglichst klein zu halten, das Minimalmedium BMGM/BMMM (**B**uffered **m**inimal **g**lycerol or **m**ethanol **m**edium) mit 0,004 % Histidin. Die Induktion der kultivierten Zellen wurde bis zu ihrer Abtrennung nach 3-4 Tagen, durch Methanolzugabe aufrecht erhalten. Als Negativkontrolle diente eine *Pichia pastoris* GS115 - Kultur. Zur Durchführung des Testes wurden die Überstände der Kulturen durch Ultrafiltration (Verwendung von Filterscheiben mit einem ‚Cut off‘ bei 30.000 NMWL, die sowohl für die Lactase-, als auch für die Phlorizin-Hydrolase-Domäne und die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase verwendet wurden) auf ein zwanzigstel ihres Volumens eingengt. Diese konzentrierten Überstände wurden zur Bestimmung der Lactaseaktivität eingesetzt.

Im Folgenden sind für eine Bestimmung der Disaccharidase-Aktivität alle Schritte aufgeführt, die nötig sind, um die spezifische Aktivität des exprimierten Enzyms zu bestimmen:

- i) Tabelle 5.4. zeigt die Werte, die sich bei dem Test auf Disaccharidase-Aktivität für eine Absorption bei 405 nm ergaben. Zunächst wurden nur 2 Volumina getestet: 10

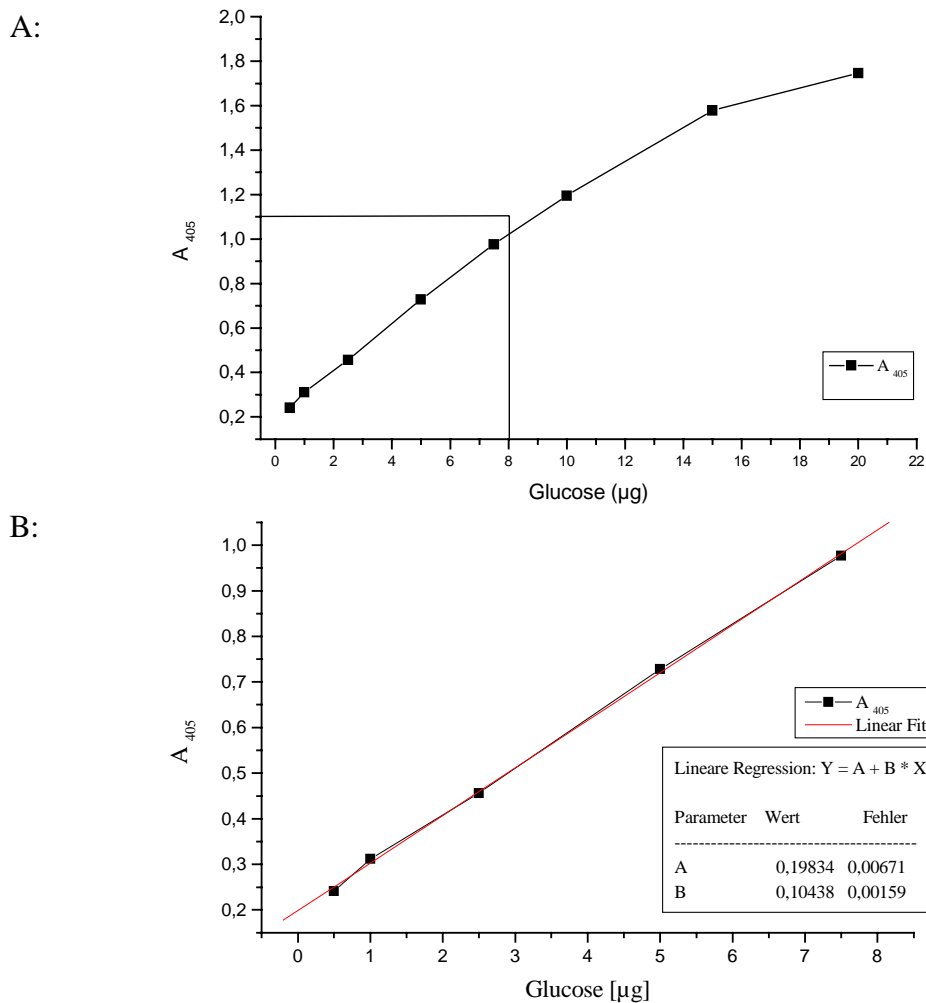
und 50  $\mu\text{l}$ . Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und die resultierenden  $A_{405}$ -Werte gemittelt.

Probe	$A_{405}$ (1)	$A_{405}$ (2)	Standard- Abweichung [ $\pm$ ]	$\overline{A_{405}}$
<b>Positivkontrolle (0,4U) Rinder-<math>\beta</math>-Galaktosidase</b>	1,49	1,45	0,035	1,47
<b>Wasser</b>	0,19	0,19	0,0021	0,19
<b>Medium</b>	0,2	0,2	0,0036	0,2
<b>0,5 <math>\mu\text{g}</math> Glucose</b>	0,21	0,24	0,011	0,23
<b>1 <math>\mu\text{g}</math> Glucose</b>	0,31	0,32	0,015	0,312
<b>2,5 <math>\mu\text{g}</math> Glucose</b>	0,46	0,46	0,023	0,46
<b>5 <math>\mu\text{g}</math> Glucose</b>	0,73	0,73	0,036	0,73
<b>7,5 <math>\mu\text{g}</math> Glucose</b>	0,97	0,98	0,048	0,98
<b>10 <math>\mu\text{g}</math> Glucose</b>	1,2	1,19	0,06	1,2
<b>15 <math>\mu\text{g}</math> Glucose</b>	1,58	1,58	0,079	1,58
<b>20 <math>\mu\text{g}</math> Glucose</b>	1,76	1,73	0,088	1,75
<i>Pichia pastoris</i> GS115 (10 $\mu\text{l}$ )	0,2	0,22	0,0057	0,21
<i>Pichia pastoris</i> GS115 (50 $\mu\text{l}$ )	0,26	0,28	0,0014	0,27
<i>Pichia</i> _LPHIII-4 (10 $\mu\text{l}$ )	0,5	0,53	0,019	0,52
<i>Pichia</i> _LPHIII-4 (50 $\mu\text{l}$ )	1,17	1,16	0,013	1,17
<i>Pichia</i> _LPHIII-5 (10 $\mu\text{l}$ )	0,48	0,49	0,0085	0,49
<i>Pichia</i> _LPHIII-5 (50 $\mu\text{l}$ )	0,94	0,95	0,0029	0,95
<i>Pichia</i> _LPHIII-6 (10 $\mu\text{l}$ )	0,22	0,2	0,0091	0,21
<i>Pichia</i> _LPHIII-6 (50 $\mu\text{l}$ )	0,25	0,23	0,0091	0,24

**Tab. 5.4.:** Dahlqvist-Test auf Disaccharidase-Aktivität mit den Kulturüberständen der *Pichia pastoris*-Klone *Pichia*\_LPHIII-4, -5 und -6.

Die Positivkontrolle (0,4 U der Rinder- $\beta$ -Galaktosidase) zeigt, dass der Test prinzipiell funktioniert, d.h. die durch die Spaltung des Milchzuckers Lactose freigesetzte Glucose detektiert wird. Die  $A_{405}$ -Werte für Wasser und Medium ergeben die Höhe des Wertes der Hintergrundaktivität. Sie liegt ca. bei  $A_{405} = 0,2$ , was durch die leichte Eigenfärbung der Komponenten zu erklären ist. Im Bereich dieser Hintergrundaktivität liegen auch die  $A_{405}$ -Werte für den Kulturüberstand aus der Kultivierung der *Pichia pastoris* GS115-Zellen ohne Plasmid.

ii) Die Werte der Glucosestandardreihe (0,5 µg – 20 µg Glucose; Tab. 5.4.) ergeben die Kalibriergerade des Testes (vgl. Abb 5.11.), aus der die mittels der Lactase freigesetzte Glucosemenge abgelesen werden kann. Der lineare Bereich lag bei Glucosemengen zwischen 0,5 und 7,5 µg Glucose, so dass A<sub>405</sub>-Werte > 1 (für 10 – 20 µg Glucose) nicht in die Auswertung einbezogen werden können.



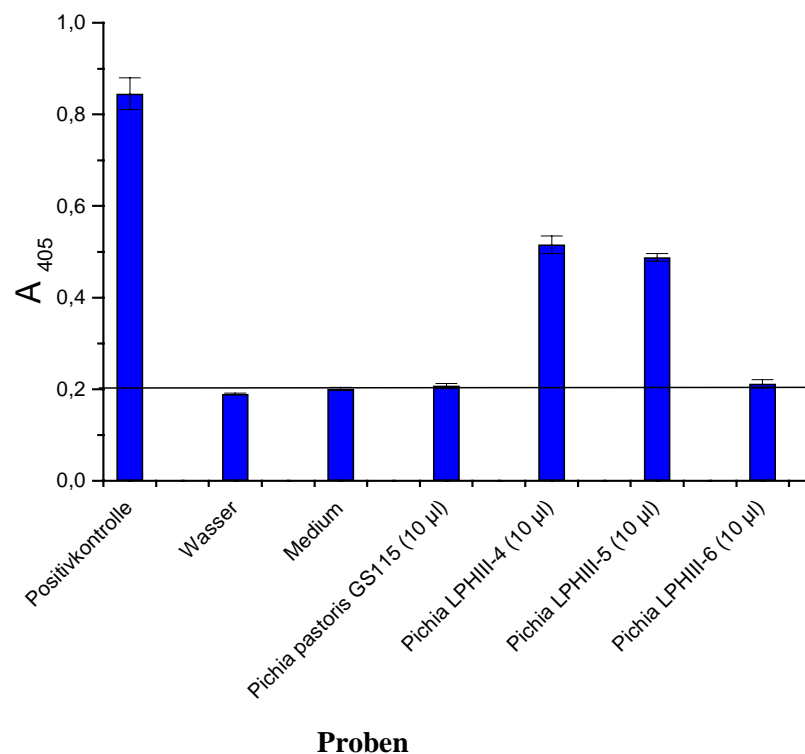
**Abb. 5.11.:** A: Glucose-Kalibrierungskurve für den Test auf Disaccharidase-Aktivität nach Dahlqvist. B: Linearer Bereich der Kalibrierungsgerade.

Mit Hilfe der Steigung der Glucose-Kalibrierungsgerade lässt sich die in den unterschiedlichen Proben des Testes auf Disaccharidase-Aktivität freigesetzte Menge an Glucose ermitteln.

Die Werte der Überstände der Expressionskulturen von *Pichia*\_LPHIII-4, -5 und -6 liegen außer bei dem des Klones *Pichia*\_LPHIII-6 für 10 µl deutlich über dem der Hintergrundaktivität. In der Auswertung des Testes werden nur die A<sub>405</sub> - Werte der

10  $\mu$ l – Proben berücksichtigt, da die Werte für die 50  $\mu$ l – Proben nicht aussagekräftig sind. Sie liegen außerhalb des linearen Bereiches der Glucosestandardkurve, der in diesem Versuch den Bereich von 0 – 7,5  $\mu$ g Glucose umfasst.

iii) Die in Tab. 5.4. dargestellten Mittelwerte der Absorption bei 405 nm der Positiv- und Negativkontrollen, sowie der eingesetzten *Pichia*-Klone ergaben folgende Graphik (Abb. 5.12.):



**Abb. 5.12.:** Graphische Darstellung des Testes auf Disaccharidase-Aktivität nach Dahlqvist mit den *Pichia pastoris*-Klonen *Pichia*\_LPHIII-4, -5 und -6. Die Höhe der Hintergrundaktivität von Wasser, Minimalmedium und *Pichia pastoris* GS115 ohne Plasmid ist mit einem Balken bei  $A_{405} = 0,2$  dargestellt. Als Positivkontrolle diente Rinder- $\beta$ -galactosidase. Die eingetragenen Fehlerbalken beziehen sich auf Doppelbestimmungen.

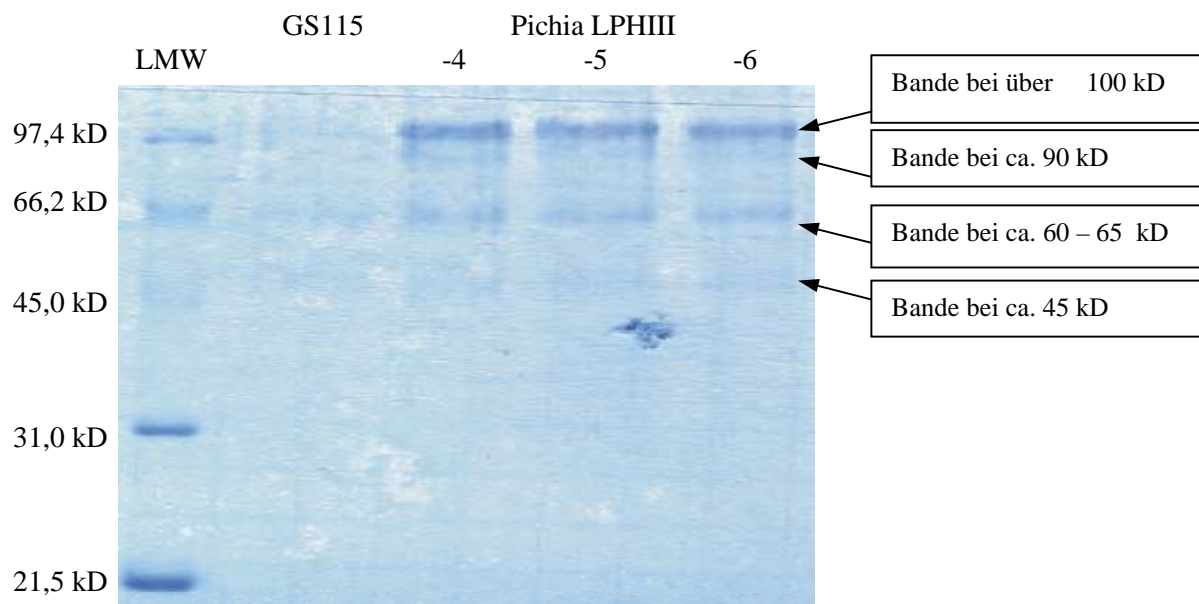
- iv) Die Glucosemenge, der Proteingehalt und die Lactaseaktivität der verwendeten Proben sind in Tab. 5.5. dargestellt.

Proben	freigesetzte Glucose [ $\mu$ g]	Lactase- aktivität [U/ml]	Protein [mg/ml]	Lactase- aktivität [U/mg]
<i>Pichia</i> GS115 [10 $\mu$ l], Wildtyp	0	0	0,046	0
<i>Pichia</i> LPHIII-4 [10 $\mu$ l]	3,154	0,007	0,112	0,065
<i>Pichia</i> LPHIII-5 [10 $\mu$ l]	2,886	0,007	0,094	0,071
<i>Pichia</i> LPHIII-6 [10 $\mu$ l]	0	0	0,049	0

**Tab. 5.5.:** Auflistung der in den Kulturüberständen der Klone *Pichia*\_LPHIII-4, -5 und -6 ermittelten Menge an freigesetzter Glucose, der daraus resultierenden Lactaseaktivität und der über die Proteinkonzentration ermittelten spezifischen Lactaseaktivität (im konzentrierten, nicht aufgereinigten Überstand).

Für die Klone *Pichia*\_LPHIII-4 und -5 lag die Lactaseaktivität bei 0,065 U/mg und 0,071 U/mg in in 10  $\mu$ l Kulturüberstand.

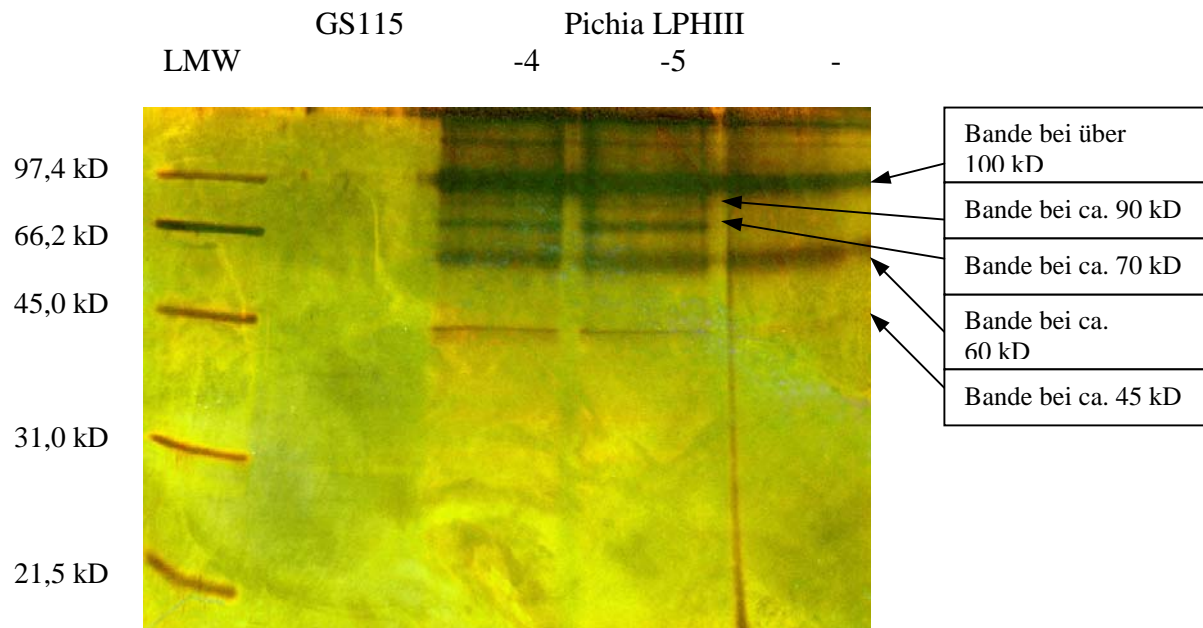
Abb. 5.13. zeigt ein SDS-Gel der Kulturüberstände von *Pichia pastoris* GS115, *Pichia*\_LPHIII-4, -5 und -6. Vor der Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine der Proben aus 300  $\mu$ l konzentriertem Kulturüberstand mittels Acetonfällung ausgefällt. Nach Aufnahme in 50  $\mu$ l SDS-Probenpuffer und 5-minütiger Denaturierung bei 95°C wurden 15  $\mu$ l der Proteinlösung auf das SDS-Gel aufgetragen:



**Abb. 5.13.:** Mit Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel der 120-fach aufkonzentrierten Kulturüberstände von *Pichia pastoris* GS115, *Pichia\_LPHIII-4*, -5 und -6. LMW: ‚Low molecular weight‘-Standard

Das ‚Coomassie Brilliant Blue‘-gefärbte SDS-Gel zeigt, dass im Überstand der *Pichia pastoris* GS115-Kultur im Gegensatz zu den 3 anderen Proben nur sehr wenig Protein enthalten ist. Bei den Kulturüberständen von *Pichia\_LPHIII-4*, -5 und -6 sind 3-4 Proteinbanden zu sehen. Zwei gut sichtbare Proteinbanden liegen bei mehr als 100 kD und 60 – 65 kD. Zwei schwächere Banden liegen bei ca. 90 kD und ca. 40 - 45 kD. Das theoretische Molekulargewicht der Lactase-Domäne liegt bei 57,8 kD. Eine Zuordnung der Banden ist jedoch schwierig, da über die Art der Modifizierung der Lactase-Domäne, bzw. der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase nur wenig bekannt ist (Jacob et al., 2000).

In Abb. 5.14. ist ein silbergefärbtes SDS-Gel mit den Kulturüberständen der Klone *Pichia\_LPHIII-4*, -5 und -6 zu sehen:



**Abb. 5.14.:** Silbergefärbtes SDS-Gel der 120-fach aufkonzentrierten Kulturüberstände von *Pichia pastoris* GS115, *Pichia*\_LPHIII-4, -5 und -6. LMW: ‚Low molecular weight‘-Standard

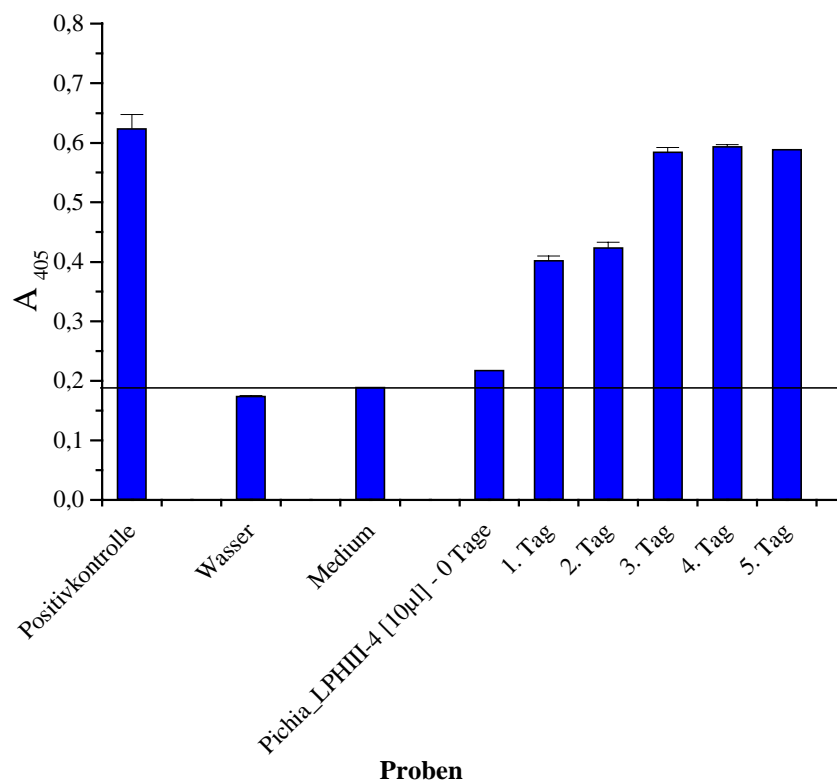
Die Silberfärbung von SDS-Gelen ist ca. 10 – 50 mal sensitiver als die Färbung durch Coomassie Brilliant Blue. In Abb. 5.14. konnten so zwei sehr schwache Banden bei ca. 70 und 90 kD sichtbar gemacht werden, die in Abb. 5.13. nicht zu erkennen sind. Da diese beiden Banden weder im Kulturüberstand der Negativkontrolle, noch in dem des Klones *Pichia* LPHIII-6, in dem keine Lactaseaktivität nachgewiesen werden konnte, detektiert werden konnten, könnte eine dieser Banden möglicherweise der Lactase-Domäne zugewiesen werden.

Aufgrund der geringen Proteinkonzentration in diesen beiden Banden war es nach Elektroblothing der aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen und anschließende N-terminale Sequenzierung jedoch nicht möglich, ihre Aminosäuresequenzen zu bestimmen.

### 5.9.2. Lactaseaktivität der Lactase-Domäne des Klons *Pichia\_LPHIII-4* in Abhängigkeit von der Expressionsdauer

In diesem Versuch wurde untersucht, an welchem Tag der Expressionskultur die von dem Klon *Pichia\_LPHIII-4* exprimierte Lactase-Domäne die höchste Aktivität besitzt. Dazu wurde eine Expressionskultur des Klones mit einem Volumen von 500 ml BMGM/BMMM-Medium im Schüttelkolben angesetzt. Die kultivierten Zellen wurden nach Induktion bei  $OD_{600}=1$  alle 24 h mit 0,5 % Methanol gefüttert. An den Tagen  $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ,  $t_4$  und  $t_5$  ab Induktion wurden der Kultur jeweils 50 ml-Proben entnommen. Nach Abtrennung der Zellen wurden die Überstände durch Ultrafiltration auf 1/20 ihres Volumens aufkonzentriert, ihre Proteinkonzentrationen bestimmt und die Proben bei  $-20\text{ °C}$  bis zur Durchführung des Testes auf Disaccharidase-Aktivität eingefroren.

Abb. 5.15. zeigt das Ergebnis des Testes auf Disaccharidase-Aktivität, bei dem jeweils  $10\text{ }\mu\text{l}$  der aufkonzentrierten Proben eingesetzt wurden:



**Abb. 5.15.:** Graphische Darstellung der Aktivität der von dem Klon *Pichia\_LPHIII-4* exprimierte Lactase-Domäne in Abhängigkeit von der Expressionsdauer. In

Höhe von  $A_{405} = 0,19$  ist die Hintergrundaktivität dargestellt. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um Rinder- $\beta$ -galactosidase.

Wie in Abb. 5.15. zu sehen ist, konnte mit Hilfe des Testes auf Disaccharidase-Aktivität schon nach dem 1. Tag Lactaseaktivität nachgewiesen werden, die deutlich höher war, als die Hintergrundaktivität. Nach 3 Tagen Induktion erreichte die Aktivität der Lactase Domäne des Klones *Pichia\_LPHIII-4* ihren Höhepunkt, erhöhte sich danach allerdings nicht mehr.

Im Einzelnen ergab sich mit Hilfe des Glucosestandards, aus dem die Gleichung  $y = 0,05 \cdot x + 0,15$  resultierte, folgendes:

Schon vom 1. bis zum 3. Tag konnte in den Überständen der Expressionskultur des *Pichia*-Klons *Pichia\_LPHIII-4* durch Lactosehydrolyse freigesetzte Glucose nachgewiesen werden. Die Proteinkonzentrationen in diesen Überständen waren allerdings so gering, dass sie mit Hilfe der verwendeten Proteinbestimmungsmethoden nicht zu erfassen waren. Deshalb war es nicht möglich, die entsprechenden, auf die Proteinkonzentrationen bezogenen Lactaseaktivitäten zu errechnen.

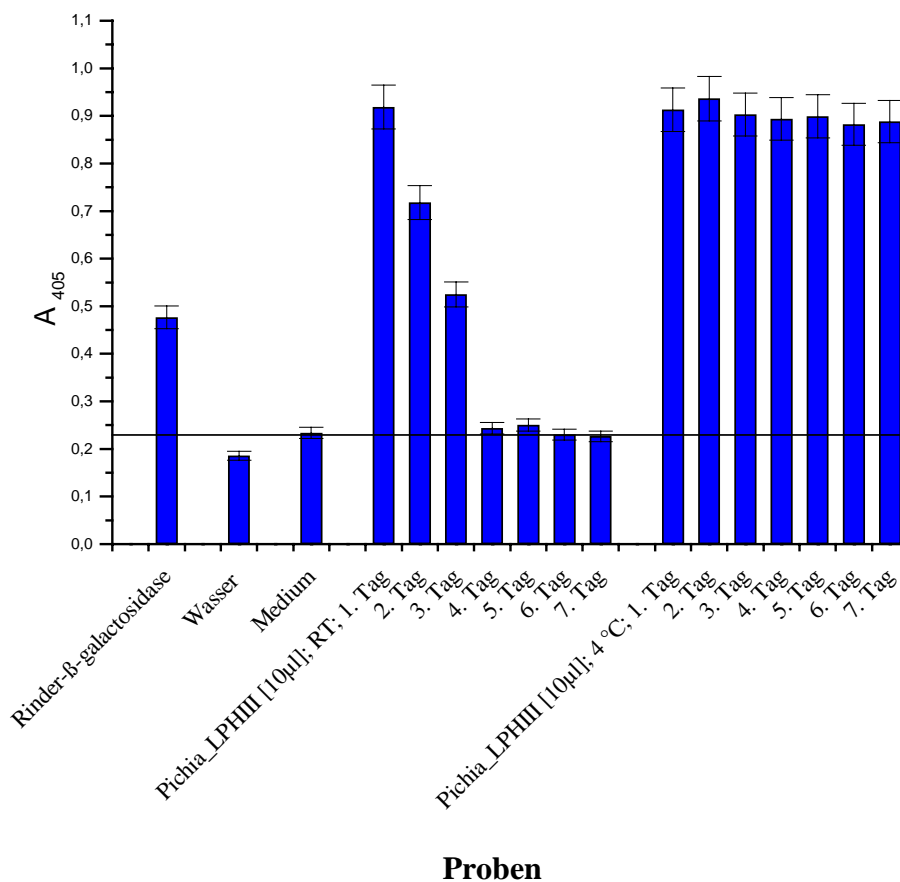
Ab dem 3. Tag der Kultivierung konnte in den Überständen der Proben Protein nachgewiesen werden. Für die Tage 3, 4 und 5 ergaben sich Proteinmengen von 0,007, 0,009 und 0,015 mg Protein/ml im unaufgereinigten Kulturüberstand. Daraus ergab sich für die Probe des 3. Tages der Kultivierung eine Lactaseaktivität von 0,082 U/mg. Am 4. Tag konnte eine Lactaseaktivität von 0,066 U/mg nachgewiesen werden, am 5. Tag eine Lactaseaktivität von 0,039 U/mg. Dies entspricht einem Aktivitätsverlust von 53,4 % innerhalb von 3 Tagen. Im Verlauf der Kultivierung kommt es an den Tagen 3 bis 5 gleichzeitig zu einer Verdopplung der Proteinkonzentration, so dass der Aktivitätsverlust entweder auf eine Inaktivierung des Enzyms oder auf die Produktion anderer Proteine zurückzuführen ist.

In den folgenden Expressionsversuchen wurde die Kultivierung der *Pichia*-Klone 3 Tage nach Induktionsbeginn abgebrochen.

### 5.9.3. Stabilität der von *Pichia\_LPHIII-4* exprimierten Lactase-Domäne bei Raumtemperatur

In dem folgenden Versuch wurde die Stabilität der Lactase-Domäne der Lactase-Phlorizin-Hydrolase bei Raumtemperatur untersucht. Hierzu wurde der auf 1/20 seines Volumens aufkonzentrierte Überstand einer 3-tägigen Expressionskultur des *Pichia*-Klons *Pichia\_LPHIII-4* eine Woche lang bei Raumtemperatur aufbewahrt. Jeden Tag wurde eine Probe mit einem Volumen von 100 µl entnommen und bis zur Durchführung des Testes auf Disaccharidase-Aktivität nach Dahlqvist (Dahlqvist 1970; Dahlqvist 1984) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zum Vergleich wurde jeden Tag eine 100 µl-Probe desselben, bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Kultivierungsüberstandes genommen und ebenfalls bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die graphische Darstellung des Ergebnisses zeigt Abb. 5.16.:



**Abb. 5.16.:** Graphische Darstellung der Stabilität der von dem *Pichia*-Klon *Pichia\_LPHIII-4* exprimierten Lactase bei Raumtemperatur und im Vergleich dazu bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

In Abb. 5.16. ist zu sehen, dass die Aktivität der Lactase-Domäne des bei Raumtemperatur inkubierten Überstandes von *Pichia\_LPHIII-4* nach 3 Tagen auf das Niveau der Hintergrundaktivität absinkt, die Lactase-Domäne also nicht mehr aktiv ist. Im Gegensatz dazu bleibt die Aktivität des bei 4 °C aufbewahrten Überstandes desselben Klones über den Zeitraum von einer Woche stabil.

Bei der Berechnung der Lactaseaktivität der exprimierten Lactase ergaben sich, wie in Tab. 5.6. dargestellt, folgende Werte:

Proben	A <sub>405</sub>	Glucose [µg/10µl]	Lactase- aktivität [U/ml]	Protein [mg/ml]	Lactase- aktivität [U/mg]
<b>Pichia_LPHIII [10µl]; RT;</b>	0,9185	8,295	0,0019	0,0148	0,128
<b>1. Tag</b>					
<b>2. Tag</b>	0,718	5,883	0,0014	0,0148	0,095
<b>3. Tag</b>	0,525	3,56	0,0008	0,0148	0,054
<b>4. Tag</b>	0,244	0,179	0,00004	0,0148	0,0027
<b>5. Tag</b>	0,2505	0,257	0,00006	0,0148	0,0041
<b>6. Tag</b>	0,23	0,011	0	0,0148	0
<b>7. Tag</b>	0,227	0	0	0,0148	0
<b>Pichia_LPHIII [10µl]; 4 °C;</b>	0,913	8,229	0,0019	0,0148	0,128
<b>1. Tag</b>					
<b>2. Tag</b>	0,936	8,506	0,002	0,0148	0,135
<b>3. Tag</b>	0,903	8,109	0,0019	0,0148	0,128
<b>4. Tag</b>	0,894	8	0,0019	0,0148	0,128
<b>5. Tag</b>	0,899	8,06	0,0019	0,0148	0,128
<b>6. Tag</b>	0,882	7,856	0,0018	0,0148	0,122
<b>7. Tag</b>	0,888	7,928	0,0018	0,0148	0,122

**Tab. 5.6.:** Stabilität der exprimierten Lactase-Domäne des Klons *Pichia\_LPHIII-4* bei Raumtemperatur und 4 °C.

Die von dem Klon *Pichia\_LPHIII-4* exprimierte Lactase ist bei Raumtemperatur nicht stabil. Schon nach einem Tag sank ihre spezifische Aktivität von 0,128 U/mg Protein um 25,8 % auf 0,095 U/mg.

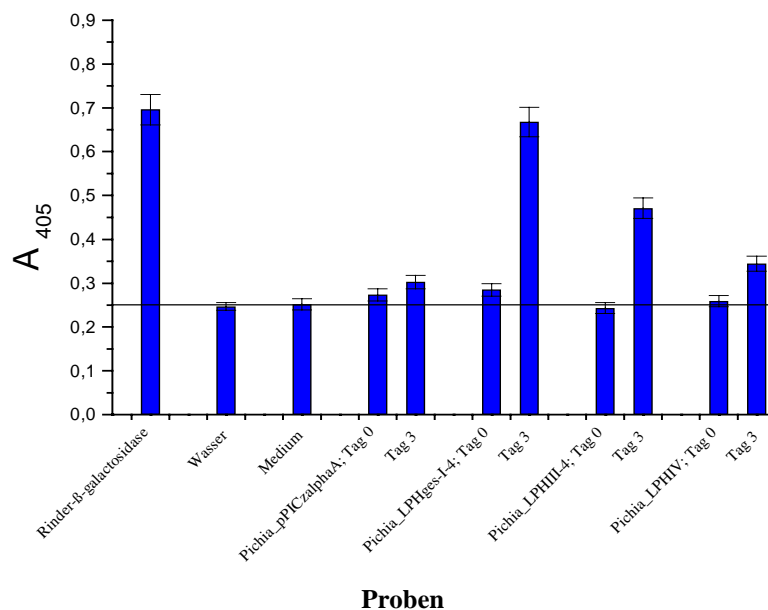
Nach einem weiteren Tag sank sie um weitere 44,1 % auf 0,054 U/mg. Nach 4 und 5 Tagen bei Raumtemperatur war in dem Kulturüberstand noch eine Restaktivität von 0,0007 U/mg Protein zu messen, die allerdings kaum noch von der Hintergrundaktivität zu unterscheiden

ist. Nach 6 Tagen konnte in dem bei Raumtemperatur belassenen Kulturüberstand keine Lactaseaktivität mehr nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu war in dem bei 4 °C aufbewahrten Kulturüberstand des Klones *Pichia\_LPHIII-4* auch nach 2-3 Wochen noch Lactaseaktivität nachweisbar.

#### 5.9.4. Aktivität der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne, sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase

Zur Bestimmung der Lactaseaktivitäten der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne, sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase wurden Schüttelkolbenkulturen mit den Klonen *Pichia\_LPHges-I-4*, *Pichia\_LPHIII-4* und *Pichia\_LPHIV-B1-1* angesetzt. Als Negativkontrolle diente eine Kultur von *Pichia pastoris* GS115 mit dem integrierten Vektor pPICZ $\alpha$ A ohne Insert: *Pichia\_pPICZ $\alpha$ A*. Nach Induktion der Kulturen bei OD<sub>600</sub>  $\approx$  1 wurde diese durch Zugabe von 0,5 % Methanol alle 24 h aufrechterhalten. Die Expression wurde nach 3 Tagen abgebrochen. Nach der Abtrennung der Zellen wurden die erhaltenen Kulturüberstände durch Ultrafiltration auf 1/20 ihres Volumens eingengt und 10  $\mu$ l der jeweiligen Proben beim Test auf Disaccharidase-Aktivität nach Dahlqvist (Dahlqvist 1984) eingesetzt. Abb. 5.17. zeigt die graphische Darstellung des Testes:



**Abb. 5.17.:** Vergleich der Lactaseaktivitäten der Klone *Pichia\_LPHges-I/F-4*, *Pichia\_LPHIII-4* und *Pichia\_LPHIV-B1-1*. Die Höhe der Hintergrundaktivität ist bei A<sub>405</sub> = 0,28 eingezeichnet.

Wie in Abb. 5.17. zu sehen ist, konnte in der Negativkontrolle *Pichia\_pPICZ $\alpha$ A* keine Lactaseaktivität nachgewiesen werden. Die in diesem Überstand gemessene Absorption bei 405 nm liegt im Bereich der Hintergrundaktivität, die durch die Absorptionen der Negativkontrollen Wasser und Medium festgelegt wird.

Der Vergleich der Klone *Pichia\_LPHges-I/F-4*, *Pichia\_LPHIII-4* und *Pichia\_LPHIV-B1-1* zeigt, dass die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase aus *Pichia\_LPHges-I/F4* trotz der vorhandenen Mutationen nach dreitägiger Kultivierung die höchste Lactaseaktivität hat. Der Klon *Pichia\_LPHIV-B1-1* hat in diesem Versuch die geringste Lactaseaktivität.

Im Einzelnen ergaben sich für die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase (Klon *Pichia\_LPHges-I/F-4*) eine spezifische Aktivität von 0,069 U/mg und für die Lactase-Domäne (Klon *Pichia\_LPHIII-4*) 0,092 U/mg im unaufgereinigten Kulturüberstand. Im Überstand des Klones *Pichia\_LPHIV-B1-1* (Phlorizin-Hydrolase-Domäne) wurde mit 0,031 U/mg die geringste Lactaseaktivität in diesem Versuch gemessen.

## 5.10. Inhibitionsversuche an der rekombinanten Lactase-Domäne, der Phlorizin-Hydrolase-Domäne und der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase

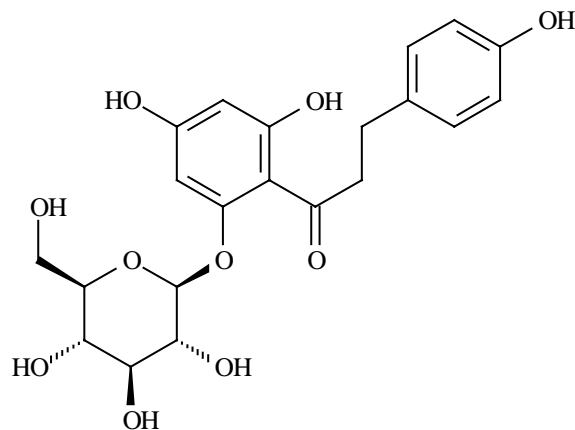
### 5.10.1. Hemmung der Lactase-Domäne aus *Pichia\_LPHIII-4* durch verschiedene Konzentrationen von Phlorizin und JG227

In diesem Versuch sollte die Aktivität der von dem Klon *Pichia\_LPHIII-4* produzierten Lactase-Domäne nach Zusatz verschiedener Inhibitoren getestet werden.

Dazu wurde eine Schüttelkolbenkultur mit einem Volumen von 500 ml BMGM/BMMM-Medium des Klones *Pichia\_LPHIII-4* angesetzt, deren Expression durch die Zugabe von 0,5 % Methanol bei  $OD_{600} \approx 1$  induziert wurde. Nach 3-tägiger Kultivierung wurden Zellen vom Kulturüberstand abgetrennt. Nachdem der Überstand auf 1/20 seines Volumens eingengt wurde, wurde der Test auf Disaccharidase-Aktivität mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt.

In diesem Versuch wurden Phlorizin und JG227 auf ihre Hemmwirkung untersucht:

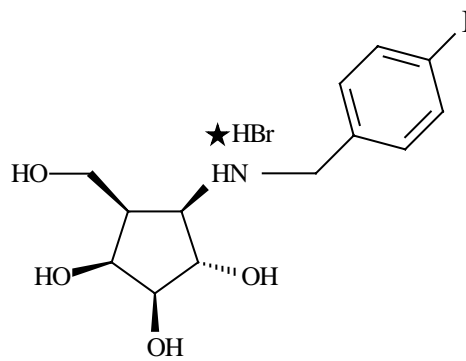
Bei Phlorizin (Phlorhizin; Phloridzin; Phloridzin Dihydrat; CAS RN: 60-81-1; Summenformel:  $C_{21}H_{24}O_{10} \cdot 2H_2O$ ; Molekulargewicht: 436,41 g/mol (als Anhydrid)) handelt es sich um ein Glucosid, das in der Wurzel von Apfel-, Birnen-, Kirsch- und Pflaumenbäumen vorkommt (Buckingham 1996). Es hemmt die Aktivität der Lactase-Phlorizin Hydrolase kompetitiv ( $K_i = 0,44$  mM; (Skovbjerg et al. 1981)). Abb. 5.18. zeigt die Struktur von Phlorizin als Anhydrid:



**Abb. 5.18.:** Strukturformel von Phlorizin.

Bei JG 227 (*N*-4-Iodobenzyl- $\beta$ -D-galacto-desoxyribofuranosylamin-Hydrobromid; Summenformel:  $C_{13}H_{29}BrINO_4$ ; Molekulargewicht: 458,95 g/mol; Codename: VJ-ITB-99/2) handelt es sich um einen künstlich hergestellten  $\beta$ -Glucosidase- und  $\beta$ -Galactosidase-Inhibitor, der freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Jäger des Institutes für Organische Chemie der Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt wurde.

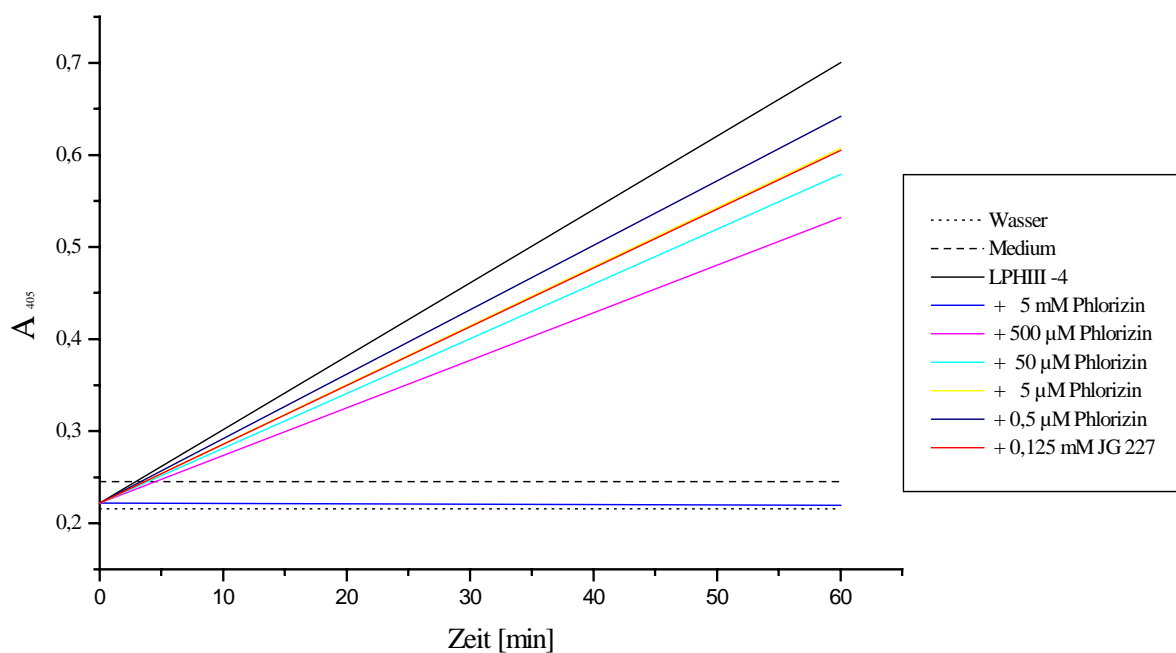
Die Struktur von JG227 ist in Abb. 5.19. dargestellt:



**Abb. 5.19.:** Strukturformel des  $\beta$ -Glucosidase- und -Galactosidase Inhibitors JG227.

Die beiden Inhibitoren wurden in dem Test auf Disaccharidase-Aktivität in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Da der  $\beta$ -Glucosidase- und  $\beta$ -Galactosidase-Inhibitor JG 227 vom Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart zunächst nur in geringen Mengen synthetisiert werden konnte, wurden zunächst 0,125 mM Inhibitor eingesetzt. Die Absorption  $A_{405}$  der Testansätze, deren Volumen ausnahmsweise 3,2 ml betrug, da die Messung in Küvetten durchgeführt werden mußte, wurde hierbei kontinuierlich über einen Zeitraum von einer Stunde aufgenommen.

Die graphische Darstellung des Testes zeigt Abb. 5.20.:



**Abb. 5.20.:** Untersuchung der inhibierenden Wirkung von Phlorizin und JG 227 auf die Lactase-Domäne des Klonen *Pichia*\_LPHIII-4.

Wie in Abb. 5.20. zu sehen, wird die Aktivität der von *Pichia\_LPHIII-4* produzierten, rekombinanten Lactase-Domäne bei Konzentrationen  $> 0,5 \mu\text{M}$  Phlorizin gehemmt, wobei die größte Hemmwirkung durch  $5 \text{ mM}$  Phlorizin erreicht wird.

Durch den in diesem Versuch mitgeführten Glucosestandard ergab sich folgende Gleichung:  $y = 0,045 \cdot x - 0,084$ . Mit der in dem Kulturüberstand dieses Klonen gemessenen Proteinkonzentration von  $0,044 \mu\text{g/ml}$  ergab sich aus den  $A_{405}$ -Werten der unterschiedlichen Proben im Einzelnen folgendes:

In dem unaufgereinigten Kulturüberstand von *Pichia\_LPHIII-4* konnte eine Lactaseaktivität von  $0,116 \text{ U/mg}$  gemessen werden. Dieser Wert entspricht in diesem Versuch einer Lactaseaktivität von  $100 \%$ . Nach Zugabe von  $5 \text{ mM}$  Phlorizin konnte keine Lactaseaktivität nachgewiesen werden. Der  $A_{405}$ -Wert dieser Probe lag im Bereich der Hintergrundaktivität, die durch die Negativkontrollen Wasser und Medium festgelegt wurde und entspricht deswegen einer  $100 \%$ -igen Hemmung. Durch die Zugabe von  $500$ ,  $50$ ,  $5$  und  $0,5 \mu\text{M}$  Phlorizin wurden Lactaseaktivitäten von  $0,097$ ,  $0,102$ ,  $0,105$  und  $0,109 \text{ U/mg}$  gemessen. Im Vergleich mit dem Wert der nicht inhibierten Lactase-Domäne entsprechen diese Werte einer  $76 \%$ -,  $82 \%$ -,  $87 \%$ - und  $91 \%$ -igen Lactaseaktivität.

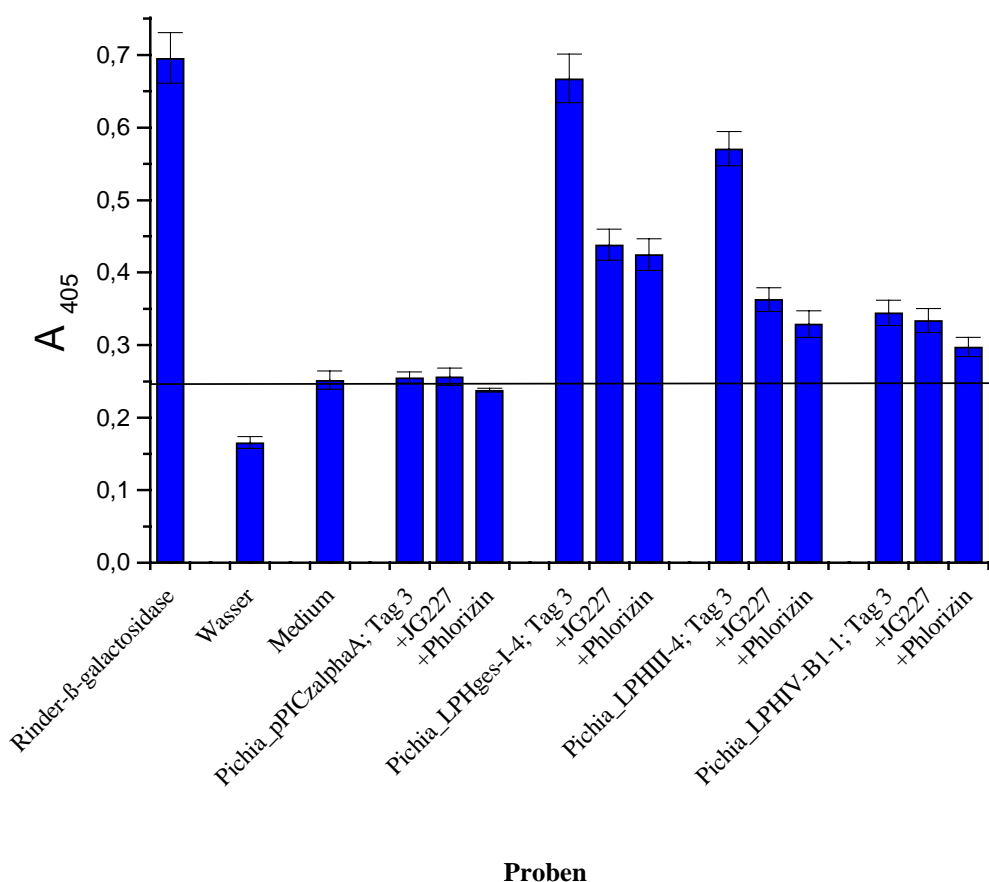
Durch die Zugabe von  $0,125 \text{ mM}$  JG 227 konnte in dem verwendeten Kulturüberstand eine Lactaseaktivität von  $0,082 \text{ U/mg}$  nachgewiesen werden, was  $77 \%$  der Aktivität der ungehemmten Lactase entspricht.

### **5.10.2. Inhibition der Lactase-Domäne (Klon *Pichia\_LPHIII-4*), der Phlorizin-Hydrolase-Domäne (Klon *Pichia\_LPHIV-B1-1*), sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase (Klon *Pichia\_LPHges-I/F-4*) durch ausgewählte Inhibitoren**

In diesem Versuch sollte die Hemmung der Aktivität der Lactase-Domäne (Klon *Pichia\_LPHIII-4*), der Phlorizin-Hydrolase-Domäne (Klon *Pichia\_LPHIV-B1-1*) und der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase (Klon *Pichia\_LPHges-I/F-4*) in Gegenwart der Inhibitoren Phlorizin und JG227 untersucht werden. Da von dem  $\beta$ -Glucosidase- und  $\beta$ -Galactosidase-Inhibitor JG 227 auch hier nur wenig Material zur Verfügung stand, wurden

beide Inhibitoren in gleichen Mengen eingesetzt (2 mM pro Ansatz), um die Testergebnisse hinsichtlich ihrer Hemmwirkung vergleichen zu können.

Zur Kultivierung wurden Schüttelkolbenkulturen der oben genannten Klone angesetzt, deren Expression durch die Zugabe von 0,5 % Methanol bei  $OD_{600} \approx 1$  induziert wurde. Nach 3 Tagen wurde die Kultivierung abgebrochen und die Zellen vom Kulturüberstand abgetrennt. Nachdem der Überstand durch Ultrafiltration auf 1/20 seines Volumens eingengt wurde, wurde der Test auf Disaccharidase-Aktivität mit jeweils 10  $\mu$ l des 20-fach konzentrierten Überstandes durchgeführt (Abb. 5.21.):



**Abb. 5.21.:** Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von 2 mM Phlorizin und 2 mM JG227 auf die Lactaseaktivität der Klone *Pichia\_LPHges-I-4*, *Pichia\_LPHIII-4* und *Pichia\_LPHIV-B1-1*.

In Abb. 5.21. ist zu sehen, dass sowohl JG227, als auch Phlorizin inhibitorische Wirkung auf die Lactaseaktivität der Klone *Pichia\_LPHges-I-4*, *Pichia\_LPHIII-* *Pichia\_LPHIV-B1-1*

haben, wobei die Hemmwirkung von Phlorizin etwas größer ist. Allerdings ist die Differenz so klein, dass sie noch im Rahmen der Fehlerungenauigkeit liegt.

Unter Zuhilfenahme der Gleichung des bei diesem Versuch mitgeführten Glucosestandard  $y = 0,045 \cdot x - 0,084$  und der in den unterschiedlichen Proben erhaltenen Proteinmenge von 0,07 mg/ml für den Überstand von *Pichia\_LPHges-I/F-4*, 0,044 mg/ml für den Überstand von *Pichia\_LPHIII-4* und 0,055 mg/ml für den von *Pichia\_LPHIV-B1-1* ergab sich bei der Berechnung der Lactaseaktivitäten folgendes:

Bei der von dem Klon *Pichia\_LPHges-I/F-4* produzierten Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase konnte ohne Zugabe von Inhibitoren eine Lactaseaktivität von 0,069 U/mg unaufgereinigtem Protein nachgewiesen werden. Durch den Zusatz von 2 mM JG 227 kam es mit einer Lactaseaktivität von 0,037 U/mg zu einem Aktivitätsverlust von 47 % und durch den von 2 mM Phlorizin mit 0,035 U/mg zu einem Verlust von 49 % Aktivität.

Die von dem Klon *Pichia\_LPHIII-4* produzierte Lactase-Domäne besaß in dem Ansatz ohne Zusatz von Inhibitoren eine Lactaseaktivität von 0,092 U/mg im unaufgereinigten Kulturüberstand. In Anwesenheit von 2 mM JG 227 war die Lactase-Domäne mit 0,043 U/mg zu 46 % und in Anwesenheit von 2 mM Phlorizin mit 0,035 U/mg zu 38 % aktiv.

Die beim Ansatz des Klones *Pichia\_LPHIV-B1-1* gemessene Lactaseaktivität im unaufgereinigten Kulturüberstand betrug 0,031 U/mg. Sie wurde durch den Zusatz von 2 mM JG227 mit 0,028 U/mg zu 10 % und durch den Zusatz von 5 mM Phlorizin mit 0,017 U/mg zu 46 % gehemmt.

## 6. DISKUSSION

Der vorliegenden Arbeit liegt die Entwicklung eines Medikamentes für die autosomal rezessive Krankheit Galactosämie zugrunde. Galactosämie-Patienten sind zum derzeitigen Stand dazu gezwungen, eine streng lactosefreie Diät einzuhalten. Einen neuartigen Ansatz zur medikamentösen Behandlung von Galactosämie würde die Hemmung des Enzyms Lactase-Phlorizin-Hydrolase darstellen, welches die hydrolytische Spaltung des Milchzuckers Lactose in die beiden Monosaccharide Galactose und Glucose katalysiert (Crane, 1977; Buller et al., 1990; Naim et al., 1991). Um Inhibitionsversuche durchführen zu können, bzw. ein Screening nach neuen Inhibitoren durchführen zu können, sollte die Lactase-Phlorizin-Hydrolase im Laufe dieser Arbeit aus menschlichem Dünndarm isoliert und in der Hefe *Pichia pastoris* funktionell exprimiert werden.

Da die ‚reife‘ Lactase-Phlorizin-Hydrolase im Darm sowohl aus der Lactose-, als auch der Phlorizin-Hydrolyse-Domäne besteht (Colombo et al., 1973), sollte untersucht werden, ob auch die vereinzelte, in *Pichia pastoris* klonierte, rekombinante Lactase-Domäne in der Lage ist, Lactose zu hydrolysieren. Aus diesem Grund wurden die ersten Versuche zur Ermittlung der Disaccharidase-Aktivität zunächst nur mit der Lactase-Domäne der Lactase-Phlorizin-Hydrolase durchgeführt.

### 6.1. Isolierung der kodierenden Sequenz der Lactase-Phlorizin-Hydrolase

Als Matrize zur Isolierung der kodierenden Sequenz der Lactase-Phlorizin-Hydrolase diente zunächst menschliche Dünndarm-mRNA der Firma Clontech. Mit Hilfe dieser Matrize war es nicht möglich, Lactase-Phlorizin-Hydrolase-cDNA zu erhalten. Allerdings konnten sowohl die erfolgreiche cDNA-Synthese, als auch die erfolgreiche Amplifikation eukaryotischer DNA nachgewiesen werden.

Die erfolgreiche cDNA-Synthese konnte mit Hilfe einer im ‚cDNA-Cycle-Kit‘ der Firma Invitrogen mitgelieferten Test-mRNA nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der erfolgten Amplifikation eukaryotischer DNA wurden  $\beta$ -Actin-Primer eingesetzt, die der Amplifikation einer kurzen Actin-Sequenz (bei Actin handelt es sich um das am häufigsten vorkommende Strukturprotein eukaryotischer Zellen) dienen.

Da unbekannt war, ob in der verwendeten Ausgangs-mRNA der Firma Clontech tatsächlich die Transkripte der Lactase-Phlorizin-Hydrolase enthalten waren, war von vornherein nicht klar, ob der ursprüngliche Dünndarmspender in der Lage war, Lactose zu verstoffwechseln.

Die Fähigkeit, den Milchzucker Lactose verdauen zu können, korreliert mit der Aktivität des ersten Enzyms der Lactoseverstoffwechslung, der Lactase-Phlorizin-Hydrolase.

Untersuchungen der Lactase-Aktivität bei Ratten ergaben, dass sie von einem Zeitpunkt kurz vor der Geburt bis zum Ende der Stillphase sehr hoch ist. Danach nimmt die Aktivität innerhalb weniger Wochen sehr stark ab und bleibt auf dem geringen Niveau der erwachsenen Ratte (Buller et al., 1990). Bei ausgewachsenen Ratten sind die Lactase-Phlorizin-Hydrolase mRNA und das resultierende Protein nur noch im mittleren Teil des Darms vorhanden, während sie im Zwölffingerdarm und Ileum (unterer Teil des Dünndarms) nicht mehr nachzuweisen sind (Rings et al., 1994).

Die Situation beim Menschen ist weit komplexer (Peuhkuri, 2000). Bei Erwachsenen, die Lactose verdauen können, ist Lactaseaktivität, sowie das zugehörige Protein in allen Enterocyten der Dünndarmvilli nachzuweisen. Bei Menschen jedoch, die Lactose schlecht verdauen, ist die Lactase-Phlorizin-Hydrolase nur punktiert auf den Darmvilli verteilt, wobei es sogar Unterschiede bei den Enterocyten des gleichen Villus gibt (Maiuri et al., 1992; Rossi et al., 1997).

Die Fähigkeit Lactose verdauen zu können nimmt bei vielen Menschen nach der Laktationsphase stark ab, was dazu führt, dass sie Lactose nicht mehr verstoffwechseln können (Lactoseintoleranz; Auricchio et al., 1963; Dahlqvist et al., 1963). Dies ist bei Kindern ab dem zweiten Lebensjahr nachweisbar (Wang et al., 1998). Dafür kann es unterschiedliche Gründe geben, wie die Reduktion der Synthese der Prä-Pro-Lactase-Phlorizin-Hydrolase (Witte et al., 1990; Sterchi et al., 1990; Loyd et al., 1990) und die langsame Prozessierung des Proteins (Witte et al., 1990; Sterchi et al., 1990). Der Hauptkontrollmechanismus wird jetzt auf dem mRNA-Level vermutet (Rossi et al., 1997, Wang et al., 1998), wobei die Heterogenität des Verhältnisses zwischen mRNA und Aktivität der Lactase-Phlorizin-Hydrolase die Schlußfolgerung zulässt, dass neben der transkriptionellen Regulierung noch andere Mechanismen beteiligt sind (Rossi et al., 1997).

Die Fähigkeit, Lactose im Erwachsenenalter verstoffwechseln zu können, ist in der Alten Welt weit verbreitet, vor allem in Nordeuropa und bei einigen Völkern Nordafrikas, sowie Arabiens, die traditionell Milchprodukte herstellen und konsumieren.

Lactoseunverträglichkeit hingegen ist dominierend unter den Ureinwohnern Australiens, Ozeaniens, Ost- und Südostasiens, des tropischen Afrikas und in Amerika. Zwischenstadien werden z.B. in Südeuropa beobachtet (Boll et al., 1991).

Nach Rückfrage bei dem Hersteller der Dünndarm-mRNA, der Firma Clontech, diente als Dünndarm-mRNA-Donor ein ca. 55-jähriger Kaukasier. Die Ursache für eine nicht erfolgte Amplifikation der Lactase-Phlorizin-Hydrolase könnte demnach in der eingesetzten Matrize liegen. Wird die Lactase-Synthese in Teilbereichen des Darms eingestellt, da in der Nahrung weder Milch noch Milchprodukte enthalten sind, so ist in ihnen die LPH mRNA nicht nachzuweisen (Villa et al., 1993). Deswegen wäre es aufgrund der Ernährungssituation des Dünndarmspenders möglich, dass die verwendete cDNA keine Informationen über die Lactase-Phlorizin-Hydrolase enthielt.

In einem nächsten Ansatz zur Isolierung der kodierenden Sequenz der Lactase-Phlorizin-Hydrolase wurde die Gesamt-RNA aus dem Dünndarm verschiedener Patienten des Katharinenhospitals in Stuttgart isoliert, die freundlicherweise vom Fraunhofer Institut zur Verfügung gestellt wurde. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und nachfolgender cDNA-Synthese konnten bei einer von fünf Proben aus der synthetisierten cDNA sowohl die Lactase-, als auch die Phlorizin-Hydrolase-Domäne amplifiziert werden. Schwierigkeiten gab es jedoch bei der Amplifikation der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase, die sich auf diese Art nicht amplifizieren ließ. Ein Grund hierfür kann die Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes sein. Bei großen DNA-Fragmenten kommt es häufig vor, dass die verwendeten DNA-Polymerasen nicht in der Lage sind, sie zu amplifizieren, sondern vorzeitig von ihren Matrizen ‚abfallen‘ (Barnes, 1994; Hengen, 1995).

Die Synthese der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase gelang schließlich durch ‚Verknüpfung‘ der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne mittels Overlap-Extension-PCR, bei der die sich um ca. 20 Nucleotide überlappenden Einzeldomänen als Matrizen dienten.

Die Analyse der erhaltenen DNA-Sequenzen führte zu dem Ergebnis, dass im Vergleich mit den Literaturangaben (Mantei et al., 1988) die Lactase-Domäne 6 abweichende Basen aufweist, die zu 3 stillen und 3 echten Mutationen, d.h. zum Austausch dreier Aminosäuren im rekombinanten Protein führen. In der Phlorizin-Hydrolase-Domäne konnten ebenfalls 6 Basenabweichungen nachgewiesen werden, aus denen im rekombinanten Protein 4 stille und

2 echte Mutationen resultieren. In der durch ‚splicing by overlap extension‘ hergestellten rekombinanten Gesamt-Lactase Phlorizin-Hydrolase wurden nach Vergleich mit der veröffentlichten DNA-Sequenz 23 Basenabweichungen nachgewiesen, aus denen sich im rekombinanten Protein 8 stille und 15 echte Mutationen ergeben, wobei 5 der stillen und 4 der echten Mutationen mit denen der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne übereinstimmen. Insgesamt sind also 14 Mutationen durch ‚Splicing by Overlap-Extension‘ hinzugekommen. Von diesen zusätzlichen 14 Mutationen wiederum, führen im rekombinanten Protein 3 zu stillen und 11 zu echten Mutationen .

## 6.2. Sequenzanalyse der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne, sowie der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase

### 6.2.1. DNA-Sequenzen

Im Laufe dieser Arbeit wurden sowohl die Lactase-Domäne, die Phlorizin-Hydrolase-Domäne, als auch die Gesamt-Phlorizin-Hydrolase zunächst in *E. coli* und dann in *Pichia pastoris* kloniert.

Bei den in der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne nachgewiesenen Basenabweichungen von der in der Literatur veröffentlichten Sequenz (Mantei et al., 1988), wurde angenommen, dass es sich um um SNP's (Single Nucleotide Polymorphism = Einzelnukleotid-Polymorphismen) handeln könnte, da die veröffentlichte Sequenz aus dem Dünndarmmaterial nur einer Person stammte und bisher nur wenig über Variationen dieses Gens bekannt ist.

Eine kürzlich erschienene Nucleotidsequenz des Lactase-Phlorizin-Hydrolase-Gens (NCBI Annotation Project, GenBank Acc. No. XM\_002410, direct submission, 2002) weist im Bereich der ‚reifen‘ Lactase-Phlorizin-Hydrolase 3 SNPs im Vergleich mit der von Mantei et al. veröffentlichten Sequenz auf. Diese SNPs betreffen in Abb. 5.7. folgende Basen der LPH\_EMBL: A688G (dbSNP rs2322659) im Bereich der Lactase-Domäne, sowie T1731C (dbSNP rs2304371) und T2008C (dbSNP rs2236783) im Bereich der Phlorizin-Hydrolase-Domäne. Einer dieser Polymorphismen stimmt mit einer der in dieser Arbeit nachgewiesenen

Basenabweichungen überein: (A688G). Damit ist der Beschluß, die abweichenden Basen nicht gegen die in der Literatur angegebenen auszutauschen, gerechtfertigt, vor allem im Hinblick darauf, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt nur die Lactase-Phlorizin-Hydrolase-DNA-Sequenzen zweier Individuen miteinander verglichen wurden, so dass es in der nächsten Zukunft zum Nachweis von weitaus mehr Polymorphismen kommen kann.

In den letzten Jahren hat sich die Aufmerksamkeit immer mehr auf Einzelnukleotid-Polymorphismen gerichtet, da sie trotz nur geringer Abweichungen starke Auswirkungen auf die Aktivität eines Enzyms haben können (Mitchison, 2000). Die Lokalisierung solcher Polymorphismen ist nicht nur für die biologische Forschung, sondern auch für klinische Therapieansätze enorm wichtig.

Bei den Basenabweichungen der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase hingegen handelt es sich um Mutationen, die im Laufe der ‚splicing by overlap extension‘-PCR-Reaktionen durch den Einbau falscher Nukleotide durch die DNA-Polymerase zustande kamen. Die Genauigkeit der Taq-Polymerase, die keine Proofreading-Aktivität besitzt, beträgt beim Einbau ‚falscher‘ Nukleotide in den zu synthetisierenden neuen DNA-Strang  $1-2 \times 10^{-4}$  (Cariello et al., 1991; Hengen, 1995). Auffällig ist bei diesen Mutationen die Häufigkeit im hinteren Bereich der Nucleotidsequenz der Lactase-Phlorizin-Hydrolase, was dafür spricht, dass die Taq-Polymerase bei Nucleotid-Sequenzen mit einer Länge von mehr als ca. 2000 Basen nicht mehr korrekt arbeitet. Dennoch wurde dieses Gen exprimiert und mit dem resultierenden Enzym gearbeitet.

### **6.2.2. Analyse der resultierenden Aminosäuresequenzen**

Unter den 482 sequenzierten und aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in 45 Familien unterteilten Glykosylhydrolasen ist die Lactase-Phlorizin-Hydrolase der Familie 1 zuzuordnen. Die Einteilung der Glykosylhydrolasen in unterschiedliche Familien wurde von Henrissat et al. (Henrissat, 1991; Henrissat et al., 1993) durchgeführt. Bei Sequenzalignments wurden vor allem die konservierten Bereiche um Asp- und Glu-Reste untersucht, die bei Glykosylhydrolasen häufig katalytische Funktion besitzen, entweder in ihrer protonierten Form als Protonendonatoren oder als Nucleophile oder Oxocarbeniumionenstabilisatoren in ihrer geladenen Form (Sinnott, 1990).

Die Zuordnung der aktiven Zentren der Lactase-Phlorizin-Hydrolase erfolgte durch die Markierung des Enzyms mit [<sup>3</sup>H]Conduritol-B-Epoxid, einem Inhibitor, der kovalent an die aktiven Zentren von Glucosidasen bindet (Legler, 1990). Die Lactase-Phlorizin-Hydrolase aus Hasendarm bindet kovalent zwei Moleküle Conduritol-B-Epoxid, was zu einem Verlust der Lactase-, wie auch der Phlorizin-Hydrolase-Aktivität führte. Durch Edmann-Abbau konnte daraufhin festgestellt werden, dass der radioaktiv markierte Inhibitor an die Glutamatreste an den Positionen 1271 und 1747 bindet, sich hier also die Carboxylat-Nucleophile der aktiven Zentren befinden, die H<sup>+</sup> zur Verfügung stellen. Vergleichende Versuche mit der humanen Lactase-Phlorizin-Hydrolase ergaben, dass diese Glutamatreste beim Menschen an den Positionen 1273 und 1749 sitzen. In Abb. 5.8. entsprechen sie den Glutamaten an den Positionen 405 und 881 (Wacker et al., 1992).

Bei den Stabilisatoren der durch den nucleophilen Angriff entstandenen Oxocarbeniumionen handelt es sich ebenfalls um Glutamatreste, die in der Prä-Pro-Lactase-Phlorizin-Hydrolase an den Positionen 1065 und 1538 lokalisiert sind (Grabnitz et al., 1991). In Abb. 5.8. entsprechen sie E197 und E670.

Die Sequenzierung der DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit klonierten Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase, Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne ergaben, dass keine der zur Kenntnis genommenen Basenabweichungen von der Literatur (Mantei et al., 1988) die Glutamatreste des aktiven Zentrums betreffen. Allerdings wurde u.a. im Rahmen der Untersuchungen von SNPs herausgefunden, dass auch schon einzeln auftretende Basenabweichungen außerhalb aktiver Zentren sehr starke Auswirkungen auf die Faltung eines Proteins und damit auf seine Aktivität haben können (Mitchison, 2000).

### 6.3. Rekombinante Expression der Lactase-Phlorizin-Hydrolase

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit im Januar 1998, war die Lactase-Phlorizin-Hydrolase bereits aus Kalb (Wallenfels et al., 1960), Ratte, (Schlegel-Haueter et al., 1972), Schwein (Skovbjerg et al., 1982), Affe (Ramaswamy et al., 1973; Ramaswamy et al., 1975), Hase (Wacker et al., 1981) und dem Menschen (Skovbjerg et al., 1981; Mantei et al., 1988) isoliert worden, um ihre biochemischen und zellbiologischen Eigenschaften zu erforschen. Einige der dabei ermittelten Lactaseaktivitäten sind in Tab. 4.1. aufgelistet:

Quelle	Lactaseaktivität im Homogenat des Ausgangsmaterials [U/mg]	Spezifische Lactaseaktivität nach Reinigung [U/mg]
<b>Menschlicher Dünndarm</b> (Skovbjerg et al., 1981)	0,054	32 (Immunoabsorbent-Chromatographie)
<b>Affen-Dünndarm</b> (Ramaswamy et al., 1973; Ramaswamy et al., 1975)	0,034	16,1 (verschiedene Chromatographietechniken)
<b>Schweine-Dünndarm</b> (Skovbjerg et al., 1982)	0,1	22 (Immunoabsorbent-Chromatographie)
<b>Ratten-Dünndarm</b> (Schlegel-Haueter et al., 1972)	0,055	18 (verschiedene Chromatographietechniken)

**Tab. 6.1.:** Auflistung der unterschiedlichen Aktivitäten der aus verschiedenen Säugetieren isolierten Lactase-Phlorizin-Hydrolase vor und nach ihrer Aufreinigung.

Wie in Tab. 6.1. zu sehen, lag die Aktivität der aus dem Dünndarm verschiedener Säugetiere isolierten Lactase zwischen 0,034 und 0,1 U/mg Homogenat. Die Aktivitätsbestimmung der Lactase erfolgte hierbei nach der von Dahlqvist beschriebenen Methode zur Bestimmung der Aktivität intestinaler Disaccharidasen (Dahlqvist, 1968 und 1970). Die Werte entsprechen den Aktivitäten der nicht aufgereinigten Enzyme. Nach Reinigung der Lactase durch chromatographische Methoden betrug die spezifische Lactaseaktivität zwischen 16,1 und 32 U/mg. Die chromatographische Aufreinigung war bei den Arbeitsgruppen am effektivsten, die das Enzym mit Hilfe gegen die ‚reife‘ Lactase-Phlorizin-Hydrolase gerichteter monoklonaler Antikörper von anderen im Homogenat enthaltenen Proteinen abtrennen konnten.

Expressionsversuche mit rekombinanter menschlicher Lactase-Phlorizin-Hydrolase waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit in folgenden Zelllinien vorgenommen worden: COS Zellen (Naim et al., 1991; Oberholzer et al., 1993; Naim et al., 1994; Jost et al., 1997), in MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney cells; (Naim et al., 1991; Jacob et al., 1997)), und in menschlichen Caco2-Zellen (Darmkrebs-Zelllinie; Hauri et al., 1994; Boukamel et al., 1995; Olsen et al., 1996; Wuthrich et al., 1996). Weiterhin wurde mit dem  $\lambda$ DASH-Vektor (Stratagene; (Boll et al., 1991)) gearbeitet.

Die Expression der Lactase-Phlorizin-Hydrolase durch einen Mikroorganismus ist bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgt.

In dieser Arbeit wurde als Wirtsorganismus die Hefe *Pichia pastoris* auf Grund ihrer Fähigkeit ausgewählt, Fremdproteine zu exprimieren, posttranslational zu prozessieren, zu modifizieren und in das umgebende Medium abgeben zu können (Buckholz et al., 1991).

Die in dieser Arbeit ermittelte Lactaseaktivität der von dem Klon *Pichia\_LPHges-I-4* produzierten Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase lag im Durchschnitt bei 0,07 U/mg im unaufgereinigten Kulturüberstand. Die von dem Klon *Pichia\_LPHIII-4* produzierte Lactase-Domäne hatte im Durchschnitt eine Lactaseaktivität von 0,08 U/mg und die von *Pichia\_LPHIV-B1-1* produzierte Phlorizin-Hydrolase-Domäne eine von 0,03 U/mg. Insgesamt war die in unterschiedlichen Experimenten ermittelte Lactaseaktivität Kultivierungsschwankungen unterworfen und reichte von 0,07 U/mg im unaufgereinigten Kulturüberstand bis zu 0,1 U/mg.

Bei dem Versuch, die Kultivierung der *Pichia*-Klone auf einen höheren Maßstab zu übertragen, d.h. zu fermentieren, konnte keine Lactaseaktivität nachgewiesen werden, deshalb wurden alle Kultivierungen zu der in dieser Arbeit untersuchten Lactaseaktivität im Schüttelkolbenmaßstab in 2 l-Schüttelkolben durchgeführt.

Der Vergleich der Lactaseaktivität der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase mit denen der Lactase- und Phlorizin-Hydrolase-Domäne führte zu dem Ergebnis, dass von diesen drei rekombinant hergestellten Proteinen die Lactase-Domäne eine höhere spezifische Aktivität (auf das im Überstand enthaltene Gesamtprotein bezogen) hinsichtlich der Lactosehydrolyse besitzt, als die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase, wohingegen die Lactaseaktivität der Phlorizin-Hydrolase-Domäne sehr viel geringer ist. Dies bedeutet, dass die Lactase-Domäne auch ohne die Phlorizin-Hydrolase-Domäne, die Bestandteil der ‚reifen‘, im Darm aktiven Lactase-Phlorizin-Hydrolase ist, Lactaseaktivität besitzt. Allerdings ist aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Mutationen/ Aminosäureabweichungen kein direkter Vergleich möglich, da die Auswirkungen der Abweichungen auf das Protein, bzw. die Enzymaktivität nicht untersucht wurden.

Alle Versuche zur Bestimmung der Disaccharidaseaktivität wurden mit den Negativkontrollen Wasser, Medium und mit den Stämmen *Pichia\_pPICZ $\alpha$ A* oder *Pichia* GS115, ohne integriertes Lactase-Phlorizin-Hydrolase-Fragment, durchgeführt, um ausschließen zu können, dass die Hefe ein Protein produziert, welches in der Lage ist, die hydrolytische Spaltung der Lactose zu katalysieren. Da bei diesen Negativkontrollen in dem

Test auf Disaccharidaseaktivität nach Dahlqvist (Dahlqvist, 1984) keine hydrolytische Freisetzung von Glucose aus Lactose nachgewiesen werden konnte, dienten sie u.a. auch als Nachweis für die Expression der Lactase-Domäne durch *Pichia pastoris*.

Versuche zur Abhängigkeit der Lactaseaktivität von der Expressionsdauer ergaben, dass Kultivierungen von *Pichia*\_LPHIII-4 3 Tage nach ihrer Induktion abgebrochen werden sollten. Bis zum 3. Tag der Kultivierung nimmt die Lactaseaktivität pro mg unaufgereinigtem Protein zu, danach nimmt sie bei gleichzeitiger Zunahme der Proteinkonzentration ab. Gründe hierfür könnten sein, dass die rekombinante Lactase-Domäne unter den herrschenden Kultivierungsbedingungen (30 °C unter Schütteln) nicht stabil ist oder von im unaufgereinigten Kulturüberstand vorhandenen Proteasen abgebaut wird.

Der Vergleich der Stabilität der Lactase-Domäne im 20-fach aufkonzentrierten, per Ultrafiltration erhaltenen Kulturüberstand bei Raumtemperatur und bei 4 °C ergab, dass die Lactaseaktivität schon nach einem Tag bei Raumtemperatur um ca. 26 % sinkt. Nach 4 Tagen ist in einem bei Raumtemperatur aufbewahrten Kulturüberstand keine Lactaseaktivität mehr nachweisbar, während die bei 4 °C aufbewahrte Lactase-Domäne auch nach einer Woche nur geringfügige Verluste ihrer Aktivität aufweist. Neben der Tatsache, dass Proteine im Allgemeinen bei 4 °C stabiler sind, als bei Raumtemperatur, kann auch hier ein Grund für den Aktivitätsverlust der Abbau durch im unaufgereinigten Kulturüberstand vorhandene Proteasen sein, die bei höheren Temperaturen aktiver sind als bei 4 °C.

#### 6.4. Inhibition der Lactase-Phlorizin-Hydrolase

Untersuchungen von Skovbjerg et al. führten zu dem Ergebnis, dass die menschliche Lactase-Phlorizin-Hydrolase, wie andere Proteine auch, durch Tris gehemmt wird (Skovbjerg et al., 1981). In weiteren Versuchen wurde außerdem festgestellt, dass die Lactosehydrolyse kompetitiv durch Phlorizin gehemmt wird, während die Phlorizinhydrolyse in Gegenwart von Lactose nicht beeinträchtigt wird (Schlegel-Haueter et al., 1972; Ramaswamy et al., 1975; Skovbjerg et al., 1981; Skovbjerg et al., 1982). Aus diesem Grund wurde in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Inhibitionsversuchen der Inhibitor Phlorizin verwendet.

Zusätzlich zu Phlorizin wurde der von dem Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart zur Verfügung gestellte  $\beta$ -Glucosidase- und  $\beta$ -Galactosidase-Inhibitor *N*-4-Iodbenzyl- $\beta$ -D-*galacto*-desoxyypyranosylamin-Hydrobromid eingesetzt, der in dieser Arbeit der Kürze halber als JG 227 bezeichnet wurde. Mit JG 227 als Inhibitor wurde eine Durchmusterung verschiedener Glycosidasen hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durchgeführt. Dabei wurden die folgenden, in Tab. 6.2. aufgelisteten Enzyme besonders stark inhibiert (Greul, 2000):

Enzym	Quell-Organismus	% I	K <sub>i</sub> [ $\mu$ M]
$\beta$ -Galactosidase EC 3.2.1.51	<i>E. coli</i>	94	0,008
	Rind (Leber)	99	0,003
	<i>Aspergillus niger</i>	100	0,148
	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	0,057
Amyloglucosidase EC 3.2.1.3	<i>Rhizopus sp.</i>	81	0,053
$\beta$ -Glucosidase	Mandel	100	0,053
	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	94	0,187

**Tab. 6.2.:** Auflistung einiger durch JG 227 gehemmter Enzyme. %I: Hemmung der Glycosidase-Aktivität in % bei einer Inhibitorkonzentration von 1 mM (Greul, 2000).

Eine in der Proteindatenbank Swiss-Prot durchgeführte Suche ergab, dass die  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli* der Familie 2, die aus *Aspergillus niger* der Familie 35, die Amyloglucosidase aus *Rhizopus sp.* der Familie 15 und die  $\beta$ -Glucosidase aus *Caldocellum saccharolyticum* der Familie 1 der Glykosylhydrolasen angehören. Da die Einteilung der Glykosylhydrolasen in Familien aufgrund von Sequenzähnlichkeiten erfolgte, die häufig mit Strukturähnlichkeiten einhergehen (Henrissat, 1991; Henrissat et al., 1993), besitzen die meisten der oben aufgelisteten Enzyme eine andere Struktur als die Lactase-Phlorizin-Hydrolase, die der Familie 1 der Glykosylhydrolasen angehört, so dass sich die Inhibition der Aktivität der jeweiligen Enzyme durch JG227 z.T. deutlich unterscheidet (vgl. Tab. 6.2.).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Inhibitionsversuche führten zu folgendem Ergebnis: Bei Einsatz einer Verdünnungsreihe von 5 mM, 500  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 0,5  $\mu$ M Phlorizin wurde die Lactaseaktivität der von dem Klon *Pichia*\_LPHIII-4 produzierten Lactase-Domäne nur durch 5 mM Phlorizin zu 100 % gehemmt. Nahezu keine Hemmung der Lactaseaktivität

durch Phlorizin konnte erst ab 0,5  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden. Wie schon in der Literatur beschrieben (Schlegel-Haueter et al., 1972; Ramaswamy et al., 1975; Skovbjerg et al., 1981; Skovbjerg et al., 1982), handelt es sich bei Phlorizin also um einen starken Inhibitor der Lactaseaktivität, der auch die getrennt produzierte Lactase-Domäne kompetitiv hemmt.

Bei Versuchen zum Vergleich der Hemmwirkungen der Inhibitoren Phlorizin und JG 227 wurde zusätzlich zur Lactase-Domäne auch die Hemmbarkeit der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase sowie der Phlorizin-Hydrolase-Domäne untersucht. Da JG227 nur in begrenztem Maße zur Verfügung stand, wurden in diesem Versuch, um einen Vergleich zu ermöglichen, je 2 mM Phlorizin und JG 227 eingesetzt. Das Ergebnis des Versuches zeigte, dass die Lactaseaktivität der Lactase-Domäne mit beiden Inhibitoren stärker gehemmt wurde, als die Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase. Dies deutet darauf hin, dass die in der Gesamt-Lactase-Phlorizin-Hydrolase vorhandenen Mutationen einen Einfluß auf die Bindung, bzw. Wirkung des Inhibitors haben, zeigt aber auch, dass zumindest teilweise Hemmung möglich ist, und sich die rekombinant exprimierte Lactase-Phlorizin-Hydrolase als Testsystem eignet.

Für weitere Inhibitionsstudien müßte jedoch zunächst ein mutationsfreies Lactase-Phlorizin-Hydrolase-Gen hergestellt und in *Pichia pastoris* exprimiert werden, was aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

## 6.5. Ausblick

Ein Vorteil der Expression der Lactase-Phlorizin-Hydrolase in *Pichia pastoris* liegt in der einfachen Handhabung der rekombinanten Proteinproduktion und der raschen Überprüfung des Einflusses von Variationen des Gens auf die Enzymaktivität. Über die Einführung von Punktmutationen in das Lactase-Phlorizin-Hydrolase- bzw. Lactasegen (Konstruktion von SNPs) ist es möglich, Varianten der Proteine herzustellen und den Einfluß dieser Mutationen auf ihre Aktivität zu untersuchen. Damit wäre ein schnelles Screening von Inhibitoren der Lactase-Phlorizin-Hydrolase und potentieller, krankheitsrelevanter Wirkstoffe möglich, die eine Abstimmung der therapeutischen Behandlung auf den Einzelfall erlauben würden.

## 8. LITERATUR

1. **Allen, S., H. Y. Naim and N. J. Bulleid** (1995). "Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator. Effects of disulfide bond formation on N-linked glycosylation and secretion." J Biol Chem **270**(9): 4797-804.
2. **Auricchio, S., A. Rubino, R. Tosi, G. Semenza, M. Landolt, H. J. Kistler and A. Prader** (1963). "[The quantitative disaccharidase activity of the human small intestine and acquired lactase deficiency in adults]." Helv Med Acta **30**(4): 690-2.
3. **Baird, S. D., M. A. Hefford, D. A. Johnson, W. L. Sung, M. Yaguchi and V. L. Seligy** (1990). "The Glu residue in the conserved Asn-Glu-Pro sequence of two highly divergent endo-beta-1,4-glucanases is essential for enzymatic activity." Biochem Biophys Res Commun **169**(3): 1035-9.
4. **Barnes, W. M.** (1994). "PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda-bacteriophage templates." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 2216-2220.
5. **Barr, K. A., S. A. Hopkins and K. Sreekrishna** (1992). "Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*." Pharm. Eng. **12**: 48-51.
6. **Berry, G. T., J. V. Hunter, Z. Wang, S. Dreha, A. Mazur, D. G. Brooks, C. Ning, R. A. Zimmerman and S. Segal** (2001). "In vivo evidence of brain galactitol accumulation in an infant with galactosemia and encephalopathy." J Pediatr **138**(2): 260-2.
7. **Birnboim, H. C. and J. Doly** (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
8. **Boll, W., P. Wagner and M. N.** (1991). "Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase-phlorizin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase." Am. J. Human. Genet. **48**: 889-902.

9. **Boukamel, R., P. Neuville, I. Duluc and J. N. Freund** (1995). "Activity of the rat lactase gene promoter in transfected human colon cancer cells." C R Acad Sci III **318**(11): 1133-40.
10. **Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem. **72**: 248-54.
11. **Brierley, R. A.** (1998). "Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I)." Methods Mol Biol **103**: 149-77.
12. **Buckholz, R. G. and M. A. Gleeson** (1991). "Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins." Biotechnology (N Y) **9**(11): 1067-72.
13. **Buckingham, J.,** Ed. (1996). Dictionary of Organic Compounds. London, Chapman & Hall.
14. **Buller, H. A., M. J. Kothe, D. A. Goldman, S. A. Grubman, W. V. Sasak, P. T. Matsudaira, R. K. Montgomery and R. J. Grand** (1990). "Coordinate expression of lactase-phlorizin hydrolase mRNA and enzyme levels in rat intestine during development." J Biol Chem **265**(12): 6978-83.
15. **Buller, H. A., R. K. Montgomery, W. V. Sasak and R. J. Grand** (1987). "Biosynthesis, glycosylation, and intracellular transport of intestinal lactase-phlorizin hydrolase in rat." J Biol Chem **262**(35): 17206-11.
16. **Buller, H. A., E. H. Rings, R. K. Montgomery and R. J. Grand** (1991). "Clinical aspects of lactose intolerance in children and adults." Scand J Gastroenterol Suppl **188**: 73-80.
17. **Cariello, N. F., J. A. Swenberg, A. De Bellis and T. R. Skopek** (1991). "Analysis of mutations using PCR and denaturing gradient gel electrophoresis." Environ Mol Mutagen **18**(4): 249-54.

18. **Cereghino, J. L. and J. M. Cregg** (2000). "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." FEMS Microbiol Rev **24**(1): 45-66.
19. **Colombo, V., H. Lorenz-Meyer and G. Semenza** (1973). "Small intestinal phlorizin hydrolase: the "beta-glycosidase complex"." Biochim Biophys Acta **327**(2): 412-24.
20. **Couderc, R. and J. Baratti** (1980). "Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: Purification and properties of alcohol oxidase." Agric. Biol. Chem. **44**: 2279-2289.
21. **Crane, R. K.** (1977). "Digestion and absorption: water-soluble organics." Int Rev Physiol **12**: 325-65.
22. **Cregg, J. M., K. J. Barringer, A. Y. Hessler and K. R. Madden** (1985). "*Pichia pastoris* as a host system for transformations." Mol Cell Biol **5**(12): 3376-85.
23. **Cregg, J. M., J. L. Cereghino, J. Shi and D. R. Higgins** (2000). "Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*." Mol Biotechnol **16**(1): 23-52.
24. **Cregg, J. M., K. R. Madden, K. J. Barringer, G. P. Thill and C. A. Stillman** (1989). "Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*." Mol Cell Biol **9**(3): 1316-23.
25. **Cregg, J. M., T. S. Vedvick and W. C. Raschke** (1993). "Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*." Biotechnology (N Y) **11**(8): 905-10.
26. **Dahlqvist, A.** (1968). "Assay of intestinal disaccharidases." Anal Biochem **22**(1): 99-107.
27. **Dahlqvist, A.** (1970). "Assay of intestinal disaccharidases." Enzymol Biol Clin **11**(1): 52-66.
28. **Dahlqvist, A.** (1984). "Assay of intestinal disaccharidases." Scand J Clin Lab Invest **44**(2): 169-72.

29. **Dahlqvist, A., J. D. Hammond, R. K. Crane, J. V. Dunphy and A. Littman** (1963). "Intestinal lactase deficiency and lactose intolerance in adults: preliminary report." Gastroenterology **45**: 488-491.
30. **Danielsen, E. M. and G. M. Cowell** (1984). "Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. Further characterization of the intracellular processing and transport." FEBS Lett **166**(1): 28-32.
31. **Davies, G. and B. Henrissat** (1995). "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases." Structure **3**(9): 853-9.
32. **Edman, P.** (1950). "Method for the determination of the aminoacid sequence in peptides." Acta.Chem. Scand **4**: 289-298.
33. **Eu, J. Y., C. Y. Wang and J. Andrade** (1999). "Homogeneous bioluminescence assay for galactosuria: interference and kinetic analysis." Anal Biochem **271**(2): 168-76.
34. **Gallet, P. F., Vaujour, H. , Petit, J. M., Maftah, A., Oulmouden, A., Oriol, R., Le Narvor, C., Guilloton, M. and Julien, R.** (1998). "Heterologous expression of an engineered truncated form of human Lewis fucosyltransferase (FucTIII) by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." Glycobiology **8**: 919-925.
35. **Geier, G. E. and P. Modrich** (1979). "Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease." J Biol Chem **254**(4): 1408-13.
36. **Grabnitz, F., M. Seiss, K. P. Rucknagel and W. L. Staudenbauer** (1991). "Structure of the beta-glucosidase gene *bglA* of *Clostridium thermocellum*. Sequence analysis reveals a superfamily of cellulases and beta-glycosidases including human lactase/phlorizin hydrolase." Eur J Biochem **200**(2): 301-9.
37. **Grand, R. J., R. K. Montgomery and H. A. Buller** (1994). Carbohydrate malabsorption. Bayless TM, ed. Current Therapy in Gastroenterology and Liver Disease. St. Louis, MO, Mosby: 1994:303-308.

38. **Greul, J. N.** (2000). Synthese und Optimierung von hochaktiven Glykosidase-Inhibitoren mit galacto-Konfiguration. Dissertation an der Universität Stuttgart; Herdecke; GCA-Verlag.
39. **Hauri, H. P., A. Quaroni and K. J. Isselbacher** (1979). "Biogenesis of intestinal plasma membrane: posttranslational route and cleavage of sucrase-isomaltase." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(10): 5183-6.
40. **Hauri, H. P., B. Sander and H. Naim** (1994). "Induction of lactase biosynthesis in the human intestinal epithelial cell line Caco-2." Eur J Biochem **219**(1-2): 539-46.
41. **Hauri, H. P., E. E. Sterchi, D. Bienz, J. A. Fransen and A. Marxer** (1985). "Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells." J Cell Biol **101**(3): 838-51.
42. **Hengen, P. N.** (1995). "Fidelity of DNA polymerases for PCR." Trends Biochem Sci **20**(8): 324-5.
43. **Henrissat, B.** (1991). "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." Biochem. J. **280**: 309-316.
44. **Henrissat, B. and A. Bairoch** (1993). "New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." Biochem. J. **293**: 781-788.
45. **Henrissat, B., M. Claeyssens, P. Tomme, L. Lemesle and J. P. Mornon** (1989). "Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis." Gene **81**(1): 83-95.
46. **Higgins, D. R. and J. M. Cregg** (1998). Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology. Totawa, N.J.
47. **Huskey, R. J.** (1997). Carbohydrate Metabolism: Initial Biochemical Pathway & Disorders. [<http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/lactase.html>].

48. **Ibelgaufits, H.** (1993). Gentechnologie von A-Z. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, VCH.
49. **Ikegaya, K., M. Hirose, T. Ohmura and K. Nokihara** (1997). "Complete determination of disulfide forms of purified recombinant human serum albumin, secreted by the yeast *Pichia pastoris*." Anal Chem **69**(11): 1986-91.
50. **Jacob, R., J. R. Weiner, S. Stadge and H. Y. Naim** (2000). "Additional N-glycosylation and its impact on the folding of intestinal lactase-phlorizin hydrolase." J Biol Chem **275**(14): 10630-7.
51. **Jacob, R., K. P. Zimmer, H. Naim and H. Y. Naim** (1997). "The apical sorting of lactase-phlorizin hydrolase implicates sorting sequences found in the mature domain." European Journal of Cell Biology **72**: 54-60.
52. **Jost, B., I. Duluc, M. Richardson, R. Lathe and J. N. Freund** (1997). "Functional diversity and interactions between the repeat domains of rat intestinal lactase." Biochem J **327**(Pt 1): 95-103.
53. **Kjeldsen, T., A. F. Pettersson and M. Hach** (1999). "Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*." Biotechnol Appl Biochem **29**(Pt 1): 79-86.
54. **Kretchmer, N.** (1971). "Lactose and lactase--a historical perspective." Gastroenterology **61**(6): 805-13.
55. **Kretchmer, N.** (1972). "Lactose and lactase." Sci Am **227**(4): 71-8.
56. **Kruse, T. A., L. Bolund, K. H. Grzeschik, H. H. Ropers, H. Sjostrom, O. Noren, N. Mantei and G. Semenza** (1988). "The human lactase-phlorizin hydrolase gene is located on chromosome 2." FEBS Lett **240**(1-2): 123-6.
57. **Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.

58. **Leese, H. J. and G. Semenza** (1973). "On the identity between the small intestinal enzymes phlorizin hydrolase and glycosylceramidase." J Biol Chem **248**(23): 8170-3.
59. **Legler, G.** (1990). "Glycoside hydrolases: mechanistic information from studies with reversible and irreversible inhibitors." Adv Carbohydr Chem Biochem **48**: 319-84.
60. **Levy, H. L., Hammerson, G.,** (1980). Screening for galactosemia. Inherited Disorders of Carbohydrate Metabolism. D. Burmann, Holton, J.B., Pennock, C.A. Lancaster, England, MTP: 133-139.
61. **Liao, Y. F., A. Lal and K. W. Moremen** (1996). "Cloning, expression, purification, and characterization of the human broad specificity lysosomal acid alpha-mannosidase." J Biol Chem **271**(45): 28348-58.
62. **Lloyd, M., G. Mevissen, M. Fischer, W. Olsen, D. Goodspeed, M. Genini, W. Boll, G. Semenza and N. Mantei** (1992). "Regulation of intestinal lactase in adult hypolactasia." J Clin Invest **89**(2): 524-9.
63. **Lottaz, D., T. Oberholzer, P. Bahler, G. Semenza and E. E. Sterchi** (1992). "Maturation of human lactase-phlorizin hydrolase. Proteolytic cleavage of precursor occurs after passage through the Golgi complex." FEBS Lett **313**(3): 270-6.
64. **Luria, S. E., J. N. Adams and R. C. Ting** (1960). "Transduction of lactose utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particle." Virology **12**: 348-390.
65. **Mantei, N., M. Villa, T. Enzler, H. Wacker, W. Boll, P. James, W. Hunziker and G. Semenza** (1988). "Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme." The EMBO Journal **7**(9): 2705-2713
66. **Marinus, M. G. and N. R. Morris** (1973). "Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **114**(3): 1143-50.

67. **Maiuri, L., M. Rossi, V. Raia, S. D'Auria, D. Swallow, A. Quaroni and S. Auricchio** (1992). "Patchy expression of lactase protein in adult rabbit and rat intestine." Gastroenterology **103**(6): 1739-46
68. **Merril, C. R., M. L. Dunau and D. Goldman** (1981). "A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels." Anal Biochem **110**(1): 201-7.
69. **Mitchison, N. A.** (2000). "Opinion: Polymorphism in regulatory gene sequences." Genome Biology **2**(1): comment2001.1-2001.6.
70. **Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich** (1992). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986 [classical article]." Biotechnology **24**: 17-27.
71. **Münscher, S.** (2000). lactase.de - Informationen zur Lactose-Intoleranz. [<http://www.lactase.de/Praep.htm>].
72. **Murphy, K. P., Jr., P. Gagne, C. Pazmany and M. D. Moody** (1998). "Expression of human interleukin-17 in *Pichia pastoris*: purification and characterization." Protein Expr Purif **12**(2): 208-14.
73. **Naim, H. Y., R. Jacob, H. Naim, J. F. Sambrook and M. J. Gething** (1994). "The pro region of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase." J Biol Chem **269**(43): 26933-43.
74. **Naim, H. Y., S. W. Lacey, J. F. Sambrook and M. J. Gething** (1991). "Expression of a full-length cDNA coding for human intestinal lactase- phlorizin hydrolase reveals an uncleaved, enzymatically active, and transport-competent protein." J Biol Chem **266**(19): 12313-20.
75. **Naim, H. Y. and M. J. Lentze** (1992). "Impact of O-glycosylation on the function of human intestinal lactase- phlorizin hydrolase. Characterization of glycoforms varying in enzyme activity and localization of O-glycoside addition." J Biol Chem **267**(35): 25494-504.

76. **Naim, H. Y., E. E. Sterchi and M. J. Lentze** (1987). "Biosynthesis and maturation of lactase-phlorizin hydrolase in the human small intestinal epithelial cells." Biochem J **241**(2): 427-34.
77. **Oberholzer, T., N. Mantei and G. Semenza** (1993). "The pro sequence of lactase-phlorizin hydrolase is required for the enzyme to reach the plasma membrane. An intramolecular chaperone?" FEBS Lett **333**(1-2): 127-31.
78. **Ohtani, W., Y. Nawa, K. Takeshima, H. Kamuro, K. Kobayashi and T. Ohmura** (1998). "Physicochemical and immunochemical properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris*." Anal Biochem **256**(1): 56-62.
79. **Olsen, W. A., M. Lloyd, H. Korsmo and Y. Z. He** (1996). "Regulation of sucrase and lactase in Caco-2 cells: relationship to nuclear factors SIF-1 and NF-LPH-1." Am J Physiol **271**(4 Pt 1): G707-13.
80. **Ramaswamy, S. and A. N. Radhakrishnan** (1973). "Lactase-phlorizin hydrolase complex from monkey small intestine: stimulation of phlorizin hydrolase activity by organic acids." Biochem Biophys Res Commun **54**(1): 197-204.
81. **Ramaswamy, S. and A. N. Radhakrishnan** (1975). "Lactase and phlorizin hydrolase from rabbit small intestine." Indian J Biochem Biophys **12**(3): 199-203.
82. **Ramaswamy, S. and A. N. Radhakrishnan** (1975). "Lactase-phlorizin hydrolase complex from monkey small intestine. Purification, properties and evidence for two catalytic sites." Biochim Biophys Acta **403**(2): 446-55.
83. **Rings, E. H., S. D. Krasinski, E. H. van Beers, A. F. Moorman, J. Dekker, R. K. Montgomery, R. J. Grand and H. A. Buller** (1994). "Restriction of lactase gene expression along the proximal-to-distal axis of rat small intestine occurs during postnatal development." Gastroenterology **106**(5): 1223-32.

84. **Roggenkamp, R., Z. Janowicz, B. Stanikowski and C. P. Hollenberg** (1984). "Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*." Mol Gen Genet **194**(3): 489-93.
85. **Rosado, J. L., L. H. Allen and N. W. Solomons** (1987). "Milk consumption, symptom response, and lactose digestion in milk intolerance." Am J Clin Nutr **45**(6): 1457-60.
86. **Rossi, M., L. Maiuri, M. I. Fusco, V. M. Salvati, A. Fuccio, S. Auricchio, N. Mantei, L. Zecca, S. M. Gloor and G. Semenza** (1997). "Lactase persistence versus decline in human adults: multifactorial events are involved in down-regulation after weaning." Gastroenterology **112**(5): 1506-14.
87. **Rydberg, E. H., G. Sidhu, H. C. Vo, J. Hewitt, H. C. Cote, Y. Wang, S. Numao, R. T. MacGillivray, C. M. Overall, G. D. Brayer and S. G. Withers** (1999). "Cloning, mutagenesis, and structural analysis of human pancreatic alpha- amylase expressed in *Pichia pastoris*." Protein Sci **8**(3): 635-43.
88. **Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edition. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
89. **Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson** (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
90. **Schlegel-Haueter, S., P. Hore, K. R. Kerry and G. Semenza** (1972). "The preparation of lactase and glucoamylase of rat small intestine." Biochim Biophys Acta **258**(2): 506-19.
91. **Scrimshaw, N. S. and E. Murray** (1988). "[Lactose tolerance and milk consumption: myths and realities]." Arch Latinoam Nutr **38**(3): 543-67.
92. **Segal, S.** (1995(a)). "Defective galactosylation in galactosemia: is low cell UDPgalactose an explanation?" Eur J Pediatr **154**(7): S65-71.
93. **Segal, S.** (1995(b)). "Galactosemia unsolved." Eur J Pediatr **154**(7): S97-102.

94. **Semenza** (1996). "Biosynthesis and Proteolytic Processing of Small Intestinal Pre-Pro-Lactase-Phlorizin Hydrolase (LPH)." ETHZ Research Projekt; provided by the Eurospider Information Retrieval System.
95. **Sieber, R., M. Stransky and M. de Vrese** (1997). "[Lactose intolerance and consumption of milk and milk products]." Z Ernährungswiss **36**(4): 375-93.
96. **Sinnott, M. L.** (1990). "Catalytic mechanisms of enzymic reactions." Chem. Rev. **90**: 1171-1202.
97. **Skovbjerg, H., E. M. Danielsen, O. Noren and H. Sjostrom** (1984). "Evidence for biosynthesis of lactase-phlorizin hydrolase as a single- chain high-molecular weight precursor." Biochim Biophys Acta **798**(2): 247-51.
98. **Skovbjerg, H., O. Noren, H. Sjostrom, E. M. Danielsen and B. S. Enevoldsen** (1982). "Further characterization of intestinal lactase/phlorizin hydrolase." Biochim Biophys Acta **707**(1): 89-97.
99. **Skovbjerg, H., H. Sjostrom and O. Noren** (1981). "Purification and characterisation of amphiphilic lactase/phlorizin hydrolase from human small intestine." Eur J Biochem **114**(3): 653-61.
100. **Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson and D. C. Klenk** (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
101. **Sreekrishna, K. and K. E. Kropp** (1996). *Pichia pastoris. Nonconventional Yeasts in Biotechnology - A Handbook*. K. Wolf. Aachen, Springer Verlag. **1**: 203-250.
102. **Sterchi, E. E., P. R. Mills, J. A. Fransen, H. P. Hauri, M. J. Lentze, H. Y. Naim, L. Ginsel and J. Bond** (1990). "Biogenesis of intestinal lactase-phlorizin hydrolase in adults with lactose intolerance. Evidence for reduced biosynthesis and slowed-down maturation in enterocytes." J Clin Invest **86**(4): 1329-37.

103. **Stryer, L.** (1995). Biochemie. Heidelberg; Berlin; Oxford, Spektrum, Akad. Verlag.
104. **Tremblay, L. O., Campbell Dyke, N. und Herscovics, A.** (1998). "Molecular cloning, chromosomal mapping and tissue-specific expression of a novel human alpha-1,2-mannosidase gene involved in *N*-glucan maturation." Glycobiology **8**: 585-595.
105. **Tschopp, J. F., P. F. Brust, J. M. Cregg, C. A. Stillman and T. R. Gingeras** (1987). "Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*." Nucleic Acids Res **15**(9): 3859-76.
106. **Tuite, M. F.** (1991). Expression of heterologous genes. Saccharomyces. M. F. Tuite and S. G. Oliver. New York, Plenum Press. **4**: 169-212.
107. **Uribe-Esquivel, M., S. Moran, J. L. Poo and R. M. Munoz** (1997). "In vitro and in vivo lactose and lactulose effects on colonic fermentation and portal-systemic encephalopathy parameters." Scand J Gastroenterol Suppl **222**: 49-52.
108. **Veenhuis, M., J. P. Van Dijken and W. Harder** (1983). "The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts." Adv Microb Physiol **24**: 1-82.
109. **Villa, M., D. Brunschwiler, T. Gächter, W. Boll, G. Semenza and N. Mantei** (1993). "Region-specific expression of multiple lactase-phlorizin hydrolase genes in intestine of rabbit." FEBS **336**(1): 70-74.
110. **Wacker, H., R. Jaussi, P. Sonderegger, M. Dokow, P. Ghera, H. P. Hauri, P. Christen and G. Semenza** (1981). "Cell-free synthesis of the one-chain precursor of a major intrinsic protein complex of the small-intestinal brush border membrane (pro-sucrase-isomaltase)." FEBS Lett **136**(2): 329-32.
111. **Wacker, H., P. Keller, R. Falchetto, G. Legler and G. Semenza** (1992). "Location of the two catalytic sites in intestinal lactase-phlorizin hydrolase; Comparison with sucrase-isomaltase and with other glycosidases, the membrane anchor of lactase-phlorizin hydrolase." J. Biol. Chem. **267**: 18744-18752.

112. **Wallenfels, K. and J. Fischer** (1960). Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **321**(223-245).
113. **Wang, B. B. T., Y.-K. Xu, G. N. Won and L.-J. C. Wong** (1998). "Molecular and Biochemical Basis of Galactosemia." Molecular Genetics and Metabolism **63**: 263-269.
114. **Wegner, G. H.** (1990). "Emerging applications of the methylotrophic yeasts." FEMS Microbiol Rev **7**(3-4): 279-83.
115. **Witte, J., M. Lloyd, V. Lorenzsonn, H. Korsmo and W. Olsen** (1990). "The biosynthetic basis of adult lactase deficiency." J Clin Invest **86**(4): 1338-42
116. **Wuthrich, M., J. Grunberg, D. Hahn, R. Jacob, I. Radebach, H. Y. Naim and E. E. Sterchi** (1996). "Proteolytic processing of human lactase-phlorizin hydrolase is a two-step event: identification of the cleavage sites." Arch Biochem Biophys **336**(1): 27-34.
117. **Yang, Y. and M. E. Lowe** (1998). "Human pancreatic triglyceride lipase expressed in yeast cells: purification and characterization." Protein Expr. Purif. **13**: 36-40.
118. **Zhu, A., Wang, Z.K. and Beavis, R.** (1998). "Structural studies of alpha-N-acetylgalactosaminidase: effect of glycosylation on the level of expression, secretion efficiency, and enzyme activity." Arch. Biochem. Biophys. **352**:1-8.
119. **Zvelebil, M. J. and M. J. Sternberg** (1988). "Analysis and prediction of the location of catalytic residues in enzymes." Protein Eng **2**(2): 127-38.

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Überlassung des interessanten Themas, die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Technische Biochemie unter hervorragenden Bedingungen anzufertigen sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. H. Brunner und Dr. T. Graeve vom Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart sowie Prof. Dr. V. Jäger und Dr. J. Greul vom Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Galactosämieprojektes. Dr. T. Graeve danke ich dabei vor allem für das Beschaffen der Darmgewebeproben vom Katharinenhospital der Stadt Stuttgart, Dr. J. Greul für die Synthese des verwendeten Inhibitors.

Dem Land Baden-Württemberg danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Galactosämieprojektes.

Dr. Jutta Schmitt danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft, ihr Interesse, ihre zahlreichen guten Ratschläge im Laufe dieser Arbeit und ihre Unterstützung bei der Literaturrecherche.

Bei Volker Nödinger bedanke ich mich für seine freundschaftliche Leitung des Laboralltages und die zahlreichen Sequenzierungen, die er oft zu Ungunsten seiner Freizeit durchgeführt hat.

Den Mitarbeitern und Freunden am Institut danke ich für ihre Unterstützung in den schweren Zeiten dieser Arbeit sowie für ihre Ehrlichkeit und Aufgeschlossenheit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern Gunter und Bärbel Bethge, die immer hinter mir standen, an mich geglaubt und mich aufgebaut haben, sowie mir die Möglichkeit gegeben haben, finanzielle Sorgen während meiner gesamten Ausbildung in den Hintergrund zu schieben.

Meinem Freund Markus danke ich für seine große Geduld, seine positive Energie und dafür, dass er mich in allen Lebenslagen mit Rat und Tat unterstützt, selbst wenn sich dies aufgrund seines Italiaufenthaltes oft als schwierig erweist.

Meiner Tante Karin Bethge danke ich für ihre samstäglichen Essenseinladungen zum Auffüllen meiner bzw. unserer Kraftreserven.

Allen meinen Freunden danke ich für ihr Verständnis und ihre ständigen, erfolgreichen Aufmunterungen. Holger Zinser danke ich im speziellen noch dafür, dass ich jederzeit seinen Scanner benutzen durfte.

## LEBENS LAUF

<b>Name</b>	Rut Bethge
<b>Geburtsdatum/ -ort</b>	27. Mai 1969 in Erkelenz
 <b>Wissenschaftliche Ausbildung</b>	
Oktober 1990 – Mai 1997	Studium der Biologie an der Universität Hohenheim
Juni 1996 – Mai 1997	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Franz Lingens, Institut für Mikro- und Molekularbiologie, Universität Hohenheim, Thema: Untersuchungen zur Hydroxylierung von Carbazol durch <i>Pseudomonas putida</i> 86.
Seit Januar 1998	Promotion bei Prof. Dr. Rolf Schmid, Institut für Technische Biochemie Universität Stuttgart, Thema: Isolierung des humanen Lactasegens und seine Expression in der Hefe <i>Pichia pastoris</i> .
 <b>Berufsausbildung</b>	
September 1988 – Juli 1990	Ausbildung zur Staatlich geprüften Chemisch- Technischen Assistentin
 <b>Schulbildung</b>	
1975 – 1979	Grundschule in Hückelhoven
1979 – 1988	Cusanus-Gymnasium in Erkelenz, Abschluß: Abitur

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Stuttgart, den 25. Juni 2002