



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 38 158 T2** 2008.06.19

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 616 580 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 38 158.7**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **05 109 743.4**

(96) Europäischer Anmeldetag: **07.07.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.01.2006**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **19.09.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.06.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 48/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

74096 05.07.1996 DK

(73) Patentinhaber:

Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

Christensen, Tove, 2880, Bagsvaerd, DK

(54) Bezeichnung: **Alpha-Amylase Transkriptionsfaktor**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen Transkriptionsfaktor, der in filamentösen Pilzen, insbesondere Aspergillii vorgefunden wird, DNA-Sequenzen, die den Faktor codieren, seine Transformation zu und Expression in pilzlichen Wirtsorganismen und die Verwendung des Faktors in solchen Wirten zur verstärkten Expression eines Polypeptids von Interesse, das von dem Wirt produziert wird.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Transkriptionsfaktoren sind wohlbekannte Proteine, die an der Initiation der Transkription beteiligt sind. Sie wurden bereits ausgiebig in vielen verschiedenen Organismen untersucht und auch bereits in Pilzen beschrieben. Dhawale und Lane (NAR (1993) 21 5537-5546) haben unlängst die Transkriptionsfaktoren aus Pilzen, einschließlich filamentösen Pilzen, zusammengetragen.

[0003] Viele der Transkriptionsfaktoren sind regulatorische Proteine; sie binden an die Promotor-DNA, und entweder aktivieren oder unterdrücken sie die Transkription als Reaktion auf Stimuli der Zelle.

[0004] Die Expression des α -Amylase-Gens in *A. oryzae* wird als Reaktion auf die zur Verfügung stehende Kohlenstoffquelle reguliert. Das Gen wird bei seinem Maximum exprimiert, wenn der Organismus auf Stärke oder Maltose gezüchtet wird (Lachmund et al., (1993) Current Microbiology 26 47-51; Tada et al., (1991) Mol. Gen. Genet. 229 301-306). Die Expression von α -Amylase wird auf dem transkriptionalen Niveau, wie von Lachmund et al. (supra) gezeigt, reguliert, was sehr stark nahelegt, dass Transkriptionsfaktoren an der Regulation beteiligt sind, allerdings wurde bisher noch kein Gen für einen solchen Faktor identifiziert.

[0005] Der Promotor des α -Amylase-Gens wurde bereits durch Deletionsanalyse untersucht (Tada et al., (1991) Agric. Biol. Chem. 55 1939-1941; Tsuchiya et al., (1992) Biosci. Biotech. Biochem. 56 1849-1853; Nagata et al. (1993) Mol. Gen. Genet. 237 251-260). Die Autoren dieser Druckschriften schlagen vor, dass eine spezielle Sequenz des Promotors für die Maltose-Induktion verantwortlich ist. Nagata et al. (supra) verwendeten diese Sequenz als eine Sonde bei einem Gel-Verschiebungsexperiment, um zu sehen, ob Proteine aus *A. nidulans*-Kernextrakten in der Lage waren, an die Promotorsequenz zu binden. Drei solche Proteine wurden gefunden, jedoch wurde keine Beteiligung dieser Proteine an der Expression nachgewiesen. Keines der Proteine wurde bisher durch andere Mittel gereinigt oder identifiziert. Auch ihre Gene bleiben unbekannt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die vorliegende Erfindung betrifft einen Transkriptionsfaktor, der die Expression des α -Amylase-Promotors in filamentösen Pilzen reguliert. Siehe Anspruch 1.

[0007] Die genomische Vollängen-DNA-Sequenz, die einen Transkriptionsfaktor codiert, wurde von einem Stamm des filamentösen Pilzes *Aspergillus oryzae* abgeleitet und in das Plasmid pToC320, das in *E. coli* ToC1058, DSM 10666, vorhanden ist, kloniert.

[0008] Es wird angenommen, dass der Transkriptionsfaktor, der die in pToC320, DSM 10666, beheimatete DNA-Sequenz codiert, die gleiche Sequenz wie diejenige aufweist, die in SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2 präsentiert wird. Demnach soll, wann immer auf den Transkriptionsfaktor-codierenden Teil der DNA-Sequenz Bezug genommen wird, die in das Plasmid pToC320 kloniert wurde, das in DSM 10666 vorhanden ist, eine solche Bezugnahme auch den Transkriptionsfaktor-codierenden Teil der DNA-Sequenz einschließen, die in SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2 vorhanden ist.

[0009] Demnach können die Begriffe „der Transkriptionsfaktor-codierende der Teil der DNA-Sequenz, die zu Plasmid pToC320 kloniert wird, das in SM 10666 vorhanden ist" und „der Transkriptionsfaktor-codierende Teil der DNA-Sequenz, die in SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2 vorhanden ist" austauschbar verwendet werden.

[0010] In weiteren Aspekten stellt die Erfindung einen Expressionsvektor, der das erfindungsgemäße DNA-Konstrukt beheimatet, eine Zelle, die das DNA-Konstrukt oder den Expressionsvektor umfasst, und ein Verfahren zur Herstellung eines Peptids, das Transkriptionsfaktoraktivität aufweist, bereit, wobei das Verfahren das Kultivieren der Zelle unter Bedingungen umfasst, die die Produktion des Transkriptionsfaktors gestatten.

[0011] Ein solcher erfindungsgemäßer Transkriptionsfaktor stammt typischerweise von einem filamentösen Pilz.

[0012] Der Begriff „filamentöser Pilz“ soll die Gruppen Phycomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes und Fungi imperfecti, einschließlich Hyphomycetes, wie die Arten Aspergillus, Penicillium, Trichoderma, Fusarium und Humicola umfassen.

[0013] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer filamentösen pilzlichen Wirtszelle, welches das Einbringen eines DNA-Fragments, das einen beliebigen derartigen Faktor codiert, in einen filamentösen Pilz umfasst, wobei ein α -Amylase-Promotor oder ein co-regulierter Promotor die Expression eines Polypeptids von Interesse auf eine Weise regelt, wodurch der Faktor in dem Pilz exprimiert wird.

[0014] Bei einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids von Interesse, dessen Expression durch einen α -Amylase-Promotor oder einen co-regulierten Promotor reguliert wird, welches das Züchten einer filamentösen pilzlichen Wirtszelle, wie vorstehend beschrieben, unter Bedingungen, die der Produktion des Faktors und des Polypeptids von Interesse förderlich sind, und Gewinnen des Polypeptids von Interesse umfasst.

[0015] Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung des Faktors zur Regulierung der Expression eines Polypeptids von Interesse in einem filamentösen Pilz.

[0016] In diesem Zusammenhang bedeutet Regulierung die Änderung der Bedingungen, unter denen der Faktor von Interesse aktiv ist. Dies könnte verschiedener pH, Substrat etc., Regime bedeuten, wobei die resultierende Wirkung eine verbesserte Regulierung der Expression des Proteins von Interesse ist.

[0017] Weiterhin umfasst die Regulierung auch Ereignisse, die in der Wachstumsphase des Pilzes eintreten, während der der Transkriptionsfaktor aktiv ist. In Abhängigkeit von den Umständen kann sowohl das Vorwärtsschieben und/oder das Zurückschieben der Phase, wobei der Faktor aktiv ist, die Expression und somit die Ausbeute verbessern.

[0018] Zusätzlich können unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannten Standardverfahren die speziellen DNA-Sequenzen, die an dem Binden eines Transkriptionsfaktors beteiligt sind, identifiziert werden, wodurch es möglich ist, solche Sequenzen in andere Promotoren zu inserieren, die normalerweise nicht von dem Faktor reguliert werden, und diesen Promotoren das Vorliegen unter der Regulierung des Faktors zu ermöglichen.

KURZE BESCHREIBUNG DER TABELLEN UND ZEICHNUNG

[0019] In den Figuren zeigen

[0020] [Fig. 1](#) die Struktur des Plasmids pMT1657, dessen Konstruktion in Beispiel 1 beschrieben ist;

[0021] [Fig. 2](#) die Struktur des Plasmids pToC316, dessen Konstruktion in Beispiel 1 beschrieben ist;

[0022] [Fig. 3](#) die Struktur des Plasmids pToC320, dessen Konstruktion in Beispiel 1 beschrieben ist;

[0023] [Fig. 4](#) die Struktur der Plasmide pToC342 und pToC359, deren Konstruktion in Beispiel 3 beschrieben ist;

[0024] [Fig. 5](#) die Struktur des Plasmids pToC298, dessen Konstruktion in Beispiel 4 beschrieben ist;

[0025] [Fig. 6](#) die Ergebnisse der Lipase-Produktion durch einen p960-Transformanten von *A. oryzae* IFO4177, kultiviert in YP-Medium, das 2 % Glucose (—■—) oder 10 % Glucose (—◆—) enthält, im Vergleich zu ToC1075, das in YP-Medium kultiviert wurde, das 2 % Glucose (— —) oder 10 % Glucose (—◇—) enthält und in Beispiel 4 beschrieben ist.

[0026] [Fig. 7](#) die Ergebnisse der Lipase-Produktion durch ToC1139, das in YP-Medium kultiviert wurde, welches 2 % Glucose (—■—) oder 10 % Glucose (—◆—) enthält, im Vergleich zu ToC1075, das in YP-Medium kultiviert wurde, das 2 % Glucose (— —) oder 10 % Glucose (—◇—) enthält und in Beispiel 4 beschrieben ist; und

[0027] [Fig. 8](#) die autoradiographischen Ergebnisse einer A. niger-DNA, die mit den folgenden Restriktionsenzymen verdaut wurde: Spur 2, XbaI; Spur 3, XmaI; Spur 4, Sall; Spur 5, HindIII; Spur 6, EcoRI; Spur 7, BglII; Spur 8, BamHI; Spuren 1 und 9 enthalten ³²P-markierte 1 DNA, die mit BstEII verdaut wurde. Das Experiment ist in Beispiel 5 beschrieben.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0028] In einem ersten Aspekt betrifft die Erfindung ein DNA-Konstrukt, das eine DNA-Sequenz umfasst, die einen Transkriptionsfaktor codiert, der einen α -Amylase-Promotor reguliert, siehe Anspruch 1.

[0029] Bei der Durchführung von Nucleotid-Substitutionen sind Aminosäurerest-Änderungen vorzugsweise von geringfügiger Natur, d. h. konservative Aminosäurerest-Substitutionen, die das Falten oder die Aktivität des Proteins nicht signifikant beeinflussen, kleine Deletionen, typischerweise von 1 bis 30 Aminosäureresten; kleine Amino- oder Carboxyl-terminale Extensionen.

[0030] Beispiele für konservative Substitutionen liegen in der Gruppe von basischen Aminosäuren (wie Arginin, Lysin, Histidin), sauren Aminosäuren (wie Glutaminsäure und Aspartamsäure), polaren Aminosäuren (wie Glutamin und Asparagin), hydrophoben Aminosäuren (wie Leucin, Isoleucin, Valin), aromatischen Aminosäuren (wie Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin) und kleinen Aminosäuren (wie Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Methionin). Für eine allgemeine Beschreibung von Nucleotidsubstitutionen siehe z. B. Ford et al., (1991), Protein Expression and Purification 2, 95-107.

[0031] Den Fachleuten wird klar, dass solche Substitutionen außerhalb der Regionen vorgenommen werden können, die für die Funktion des Moleküls kritisch sind, und immer noch zu einem aktiven Transkriptionsfaktor führen. Aminosäurereste, die für die Aktivität des Transkriptionsfaktors essentiell sind, der von einem erfindungsgemäßen DNA-Konstrukt codiert wurde und darum vorzugsweise nicht Gegenstand der Substitution ist, können nach auf dem Fachgebiet bekannten Verfahrensweisen identifiziert werden, wie ortsgerichtete Mutagenese oder Alanin-Scanning-Mutagenese (vgl. z. B. Cunningham und Wells, (1989), Science 244, 1081-1085). Bei der letzteren Technik werden Mutationen in jedem Rest in dem Molekül eingebracht, und die resultierenden mutanten Moleküle werden auf biologische Aktivität getestet (d. h. Transkriptionsfaktor, der einen α -Amylase-Promotor reguliert), um Aminosäurereste zu identifizieren, die für die Aktivität des Moleküls kritisch sind.

[0032] Die Homologie, auf die in (i), vorstehen, Bezug genommen wird, wird als der Identitätsgrad zwischen den beiden Sequenzen bestimmt, was eine Abweichung von der einen Sequenz von der anderen angibt. Die Homologie kann zweckmäßigerweise mittels Computerprogrammen, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, bestimmt werden, wie GAP, das in dem GCG-Programmpaket bereitgestellt ist (Needleman, S.B. und Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology 48, 443-453). Unter Verwendung von GAP mit den folgenden Einstellungen für den DNA-Sequenzvergleich: GAP creation penalty 5,0 und GAP extension penalty 0,3, die codierende Region der DNA-Sequenz zeigt einen Identitätsgrad von vorzugsweise mindestens 60 %, stärker bevorzugt von mindestens 70 %, stärker bevorzugt von mindestens 80 %, stärker bevorzugt von mindestens 90 %, stärker bevorzugt von mindestens 95 % mit dem Transkriptionsfaktor-codierenden Teil der DNA-Sequenz, die in SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2 gezeigt ist, auf.

[0033] Die in (ii), vorstehend, erwähnte Hybridisierung soll angeben, dass die analoge DNA-Sequenz mit der gleichen Sonde hybridisiert wie die DNA-Sequenz, die den Transkriptionsfaktor unter bestimmten spezifizierten Bedingungen codiert, die ausführlich in dem Abschnitt Materialien und Methoden im Folgenden beschrieben werden. Die zu verwendende Oligonucleotidsonde ist die DNA-Sequenz, die dem Transkriptionsfaktor-codierenden Teil der in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 gezeigten DNA-Sequenz oder einem Fragment davon entspricht.

[0034] Die in (iii), vorstehend, erwähnte Homologie wird als der Identitätsgrad zwischen den beiden Sequenzen bestimmt, was eine Abweichung der ersten Sequenz von der zweiten angibt. Die Homologie kann zweckmäßigerweise mittels Computerprogrammen, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, wie GAP, bereitgestellt in dem GCG-Programmpaket (Needleman, S.B. und Wunsch, C.D., supra), bestimmt werden. Unter Verwendung von GAP mit den folgenden Einstellungen zum Transkriptionsfaktor-Sequenzvergleich: GAP creation penalty 3,0 und GAP extension penalty 0,1, der von einer analogen DNA-Sequenz codierte Transkriptionsfaktor zeigt einen Identitätsgrad vorzugsweise von mindestens 50 %, stärker bevorzugt mindestens 60 %, stärker bevorzugt mindestens 70 %, noch stärker bevorzugt mindestens 80 %, besonders mindestens 90 % mit dem Transkriptionsfaktor auf, der von einem DNA-Konstrukt codiert wird, das den Transkriptionsfaktor-codierenden Teil

der in SEQ ID NO:2 gezeigten DNA-Sequenz umfasst, z. B. mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3.

[0035] In Verbindung mit Eigenschaft (iv) kann die immunologische Reaktivität durch das Verfahren bestimmt werden, das im späteren Abschnitt Materialien und Methoden hier beschrieben wird.

[0036] In Relation zu der Eigenschaft (v) wird das Komplementationsverfahren hier in Beispiel 1 beschrieben.

[0037] Die DNA-Sequenz, die einen erfindungsgemäßen Transkriptionsfaktor codiert, kann aus dem Stamm *Aspergillus oryzae* IFO 4177 unter Verwendung von Standardverfahren, z. B. wie bei Sambrook, et al., beschrieben (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab.; Cold Spring Harbor, NY, isoliert werden.

[0038] Allgemeine RNA- und DNA-Isolierungsverfahren sind auch in WO 93/11249 und WO 94/14953 offenbart, deren Inhalt hier durch Bezugnahme mit eingeschlossen ist. Eine ausführlichere Beschreibung des Komplementationsverfahrens ist in Beispiel 1 hier angegeben.

[0039] Alternativ kann die DNA, die einen erfindungsgemäßen Transkriptionsfaktor codiert, nach wohlbekannten Verfahren, zweckmäßigerweise aus einer geeigneten Quelle, isoliert werden, wie einer der nachstehend erwähnten Organismen, unter Verwendung von synthetischen Oligonucleotid-Sonden, die auf der Grundlage einer hier offenbarten DNA-Sequenz hergestellt werden. Beispielsweise kann eine geeignete Oligonucleotid-Sonde auf der Grundlage des Transkriptionsfaktor-codierenden Teils der als SEQ ID NO:1 dargestellten Nucleotidsequenzen oder jeder geeigneten Subsequenz davon oder auf der Grundlage der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3 hergestellt werden.

[0040] Die Erfindung betrifft speziell einen Transkriptionsfaktor, der die Expression des α -Amylase-Promotors in einem filamentösen Pilz reguliert, wobei der Faktor, wie in Beispiel 2 angegeben, auch die Expression von anderen Genen regulieren kann.

[0041] In diesem Zusammenhang soll der Begriff „filamentöser Pilz“ die Gruppe Phycomyces, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes und Fungi imperfecti einschließen, einschließlich Hyphomycetes, wie die Arten *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* und *Humicola*.

[0042] In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „ α -Amylase-Promotor“ eine Sequenz von Basen, unmittelbar stromaufwärts von einem α -Amylase-Gen, das RNA-Polymerase erkennt und bindet, um die Transkription des Gens, das die α -Amylase codiert, zu beschleunigen.

[0043] Wie angegeben, sind Transkriptionsfaktoren aus vielen Organismen bekannt, und es wird darum erwartet, dass ähnliche oder entsprechende Faktoren gefunden werden können, die aus anderen Pilzen der Arten *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, etc. stammen, mit einer verstärkenden Wirkung auf die Expression eines Polypeptids, das sich unter der Regulation von Amylase-Promotoren in einem Pilz befindet, der einer dieser Arten angehört.

[0044] Ein Vergleich der DNA-Sequenz, die den Transkriptionsfaktor codiert, der den α -Amylase-Promotor codiert, weist einen Homologiegrad mit einem Transkriptionsfaktor (CASUCI) auf, der die Expression von Glucosidase in *Candida* reguliert, und mit MAL63 von *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, wie bei Kelly und Kwon-Chung (1992), *J. Bacteriol.* 174 222-232 offenbart.

[0045] Es wird derzeit davon ausgegangen, dass eine DNA-Sequenz, die einen Transkriptionsfaktor codiert, der zu dem erfindungsgemäßen Transkriptionsfaktor homolog ist, d. h. eine analoge DNA-Sequenz, aus anderen Mikroorganismen erhalten werden kann. Beispielsweise kann die DNA-Sequenz durch ein vergleichbares Screening einer cDNA-Bibliothek eines anderen Mikroorganismus abgeleitet werden, wie ein Stamm von *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Erwinia*, *Fusarium* oder *Trichoderma*.

[0046] Ein Isolat eines Stammes von *A. oryzae*, aus dem das Gen, das einen erfindungsgemäßen Transkriptionsfaktor codiert, inaktiviert wurde, wurde von den Erfindern nach dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren am DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, hinterlegt.

Hinterlegungsdatum: 6. Mai 1996 (06.05.96)
 Hinterlegernummer: ToC879 = NN049238
 DSM-Bezeichnung: Aspergillus oryzae DSM Nr. 10671

[0047] Der hinterlegte Stamm *Aspergillus oryzae* DSM Nr. 10671 kann zur Isolierung eines erfindungsgemäßen Transkriptionsfaktors aus jedem Stamm von *Aspergillus oryzae* verwendet werden und aus jedem anderen pilzlichen Stamm mit einem solchen Gen durch Komplementation, wie im Folgenden beschrieben, verwendet werden.

[0048] Das Expressionsplasmid pToC320, das die genomische Vollängen-DNA-Sequenz umfasst, die den erfindungsgemäßen Transkriptionsfaktor codiert, wurde zu einem Stamm von *E. coli* transformiert, der zu dem Stamm ToC1058 führt, der von den Erfindern nach dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren am DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, hinterlegt wurde.

Hinterlegungsdatum: 6. Mai 1996 (06.05.96)
 Hinterleernummer: ToC1058 = NN049237
 DSM-Bezeichnung: *E. coli* DSM Nr. 10666

[0049] Erfindungsgemäß sind Faktoren dieses Typs, die aus den Arten *A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori* etc., speziell *A. oryzae* IFO4177 stammen, bevorzugt.

[0050] Es wurde festgestellt, dass der erfindungsgemäße Transkriptionsfaktor nicht nur an der Regulierung des α -Amylase-Promotors, sondern auch an der Regulierung des Glucoamylase-Promotors aus *A. oryzae* beteiligt ist.

[0051] Insbesondere umfasst die Erfindung jeden Faktor mit einer Aminosäuresequenz, die ein oder mehrere Fragmente oder Kombinationen von Fragmenten der als SEQ ID NO:3 beschriebenen Aminosäuresequenz umfasst.

[0052] Verkürzte Formen des Transkriptionsfaktors können ebenfalls aktiv sein. Verkürzte Formen bedeutet Modifikationen des Transkriptionsfaktors, wobei N-terminale, C-terminale oder ein oder mehrere interne Fragmente deletiert wurden.

[0053] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine DNA-Sequenz, die einen dieser Faktoren codiert.

[0054] Bei diesem Aspekt umfasst die Erfindung speziell jede DNA-Sequenz, die ein oder mehrere Fragmente der als SEQ ID NO:3 beschriebenen Aminosäuresequenz codiert.

[0055] Spezieller betrifft die Erfindung eine DNA-Sequenz, die ein oder mehrere Fragmente oder eine Kombination von Fragmenten der als SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2 beschriebenen DNA-Sequenz umfasst.

[0056] Nach einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer filamentösen pilzlichen Wirtszelle, umfassend das Einbringen von einem der oben erwähnten DNA-Fragmente in einen filamentösen Pilz, wobei der α -Amylase-Promotor oder ein anderer co-regulierter Promotor die Expression eines Polypeptids von Interesse auf eine Weise regelt, wodurch der Faktor in dem Pilz exprimiert wird.

[0057] Das Einbringen des DNA-Fragments kann durch jedes beliebige wohlbekanntes Standardverfahren zum Einbringen von DNA in einen filamentösen Pilz, wie durch die Verwendung eines Expressionsvektors und Wirtszellen, wie nachstehend beschrieben, durchgeführt werden.

[0058] Darum stellt die Erfindung auch einen rekombinanten Expressionsvektor bereit, der das erfindungsgemäße DNA-Konstrukt umfasst.

[0059] Der erfindungsgemäße Expressionsvektor kann jeder Expressionsvektor sein, der zweckmäßigerweise DNA-Rekombinationsverfahren unterworfen wird, und die Wahl des Vektors hängt oft von der Wirtszelle ab, in die er eingebracht werden soll.

[0060] Somit kann der Vektor ein autonom replizierender Vektor sein, d. h. ein Vektor, der als extrachromoso-

male Einheit existiert, dessen Replikation unabhängig von der chromosomalen Replikation ist, z. B. ein Plasmid. Alternativ kann der Vektor ein Vektor sein, der, beim Einbringen in eine Wirtszelle, in das Wirtszellengenom integriert und zusammen mit dem Chromosom(en), in die er integriert worden ist, repliziert wird.

[0061] In dem Expressionsvektor sollte die DNA-Sequenz, die den Transkriptionsfaktor codiert, entweder ebenfalls das Expressionssignal enthalten, das normalerweise mit dem Transkriptionsfaktor in Zusammenhang steht, oder sollte mit einem geeigneten Promotor und einer Terminatorsequenz operabel verknüpft sein. Der Promotor kann jede DNA-Sequenz sein, die transkriptionale Aktivität in der Wirtszelle der Wahl zeigt, und kann sich von Genen ableiten, die entweder homolog oder heterolog für die Wirtszelle sind. Die Verfahrensweisen, die zur Ligation der DNA-Sequenzen, die den Transkriptionsfaktor, den Promotor bzw. den Terminator codieren, und um sie in geeignete Vektoren zu inserieren, verwendet werden, sind den Fachleuten wohl bekannt (vgl. Sambrook, et al., supra).

[0062] Beispiele für geeignete Promotoren zur Verwendung in filamentösen pilzlichen Wirtszellen sind beispielsweise der A.-nidulans-ADH3-Promotor (McKnight, et al. (1985) The EMBO J. 4, 2093-2099) oder der tpiA-Promotor. Beispiele für andere geeignete Promotoren sind diejenigen, die sich von dem Gen, das *Aspergillus-oryzae*- α -Amylase, *Aspergillus-niger*neutral- α -Amylase, *Aspergillus-niger*-säurestabile- α -Amylase, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* oder *Aspergillus-oryzae*-Glucoamylase (gluA), A.-*oryzae*-Alkalische-Protease (alp), A.-*oryzae*-Nitratreduktase (niaD), *Aspergillus-oryzae*-Triosephosphatisomerase (tpi), *Aspergillus-nidulans*-Acetamidase codiert, oder einem *Aspergillus*-Promotor, der ein Aminosäure-biosynthetisches Gen, wie argB, codiert, ableiten.

[0063] Bei wieder einem anderen Aspekt stellt die Erfindung eine Wirtszelle bereit, die das erfindungsgemäße DNA-Konstrukt und/oder den erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektor umfasst.

[0064] Vorzugsweise ist die erfindungsgemäße Wirtszelle eine eukaryotische Zelle, insbesondere eine Pilzzelle, wie eine Hefezelle oder eine filamentöse Pilzzelle. Insbesondere kann die Zelle einer Spezies von *Trichoderma*, insbesondere *Trichoderma harzianum* oder *Trichoderma reesei*, oder einer Spezies von *Aspergillus*, besonders bevorzugt *Aspergillus oryzae* oder *Aspergillus niger*, angehören. Pilzzellen können durch ein Verfahren transformiert werden, das die Protoplastenbildung und -transformation der Protoplasten und die anschließende Regenerierung der Zellwand auf eine an sich bekannte Weise umfasst. Die Verwendung von *Aspergillus* als ein Wirts-Mikroorganismus ist in EP 238 023 (Novo Nordisk A/S) beschrieben, dessen Inhalt hiermit als Referenz mitumfasst ist. Die Wirtszelle kann auch eine Hefezelle sein, z. B. ein Stamm von *Saccharomyces*, insbesondere *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri* oder *Saccharomyces uvarum*, ein Stamm von *Schizosaccharomyces* sp., wie *Schizosaccharomyces pombe*, ein Stamm von *Hansenula* sp., *Pichia* sp., *Yarrowia* sp., wie *Yarrowia lipolytica* oder *Kluyveromyces* sp., wie *Kluyveromyces lactis*.

[0065] Das endogene amyR-Gen der Wirtszelle kann deletiert oder durch andere Mittel inaktiviert werden. Das Einbringen von amyR-Kontrolle durch einen heterologen Promotor führt dann zu einem vollkommen neuen Schema der Regulierung des α -Amylase-Promotors. Wenn beispielsweise amyR mit dem A.-*oryzae*-niaD-Promotor fusioniert wird, wird der α -Amylase-Promotor durch Nitrat induzierbar. Wenn statt des niaD-Promotors ein palC-regulierter Promotor verwendet wird, wird die Aktivität des α -Amylase-Promotors durch den pH reguliert.

[0066] Die Erfindung umfasst auch ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids von Interesse, wobei eine Wirtszelle, wie vorstehend beschrieben, unter Bedingungen, die der Produktion des Faktors und des Polypeptids von Interesse förderlich sind, gezüchtet und das Polypeptid von Interesse gewonnen wird.

[0067] Das zur Kultivierung der transformierten Wirtszellen verwendete Medium kann jedes herkömmliche Medium sein, das zum Züchten der Wirtszellen geeignet ist. Das exprimierte Polypeptid von Interesse kann zweckmäßigerweise in das Kulturmedium sezerniert und daraus durch wohl bekannte Verfahrensweisen, einschließlich Abtrennen der Zellen aus dem Medium durch Zentrifugation oder Filtration, Präzipitation proteinartiger Komponenten des Mediums mittels eines Salzes, wie Ammoniumsulfat und anschließende chromatographische Verfahrensweisen, wie Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie oder dergleichen, gewonnen werden.

[0068] Erfindungsgemäß kann das Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids von Interesse verwendet werden, das ein medizinisches Polypeptid ist, insbesondere solche medizinische Polypeptide wie Wachstumshormon, Insulin, Blutgerinnungsfaktor und dergleichen.

[0069] Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur Produktion industrieller Enzyme verwendet werden, wie Proteasen, Lipasen, Amylasen, Glucoamylasen, Oxidoreduktasen, Carbohydrasen, Carbonylhydrolasen, Cellulasen, Esterasen etc.

[0070] Nach einem weiteren Aspekt der Erfindung kann der Transkriptionsfaktor zur Verstärkung der Expression eines Polypeptids von Interesse in einem filamentösen Pilz verwendet werden, wie ein Pilz der Art *Aspergillus*, *Trichoderma*, *penicillium*, *Fusarium*, *Humicola* etc., insbesondere der Spezies *A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori* etc. und speziell *A. oryzae*.

[0071] Der erfindungsgemäße Transkriptionsfaktor kann somit zur Verstärkung der Expression eines medizinischen Polypeptids verwendet werden, wie Wachstumshormon, Insulin, Blutgerinnungsfaktor etc. Auch die Expression von industriellen Enzymen, wie Proteasen, Lipasen, Amylasen, Glucoamylasen, Oxidoreduktasen, Carbohydrasen, Carbonylhydrolasen, Cellulasen, Esterasen etc., kann durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Transkriptionsfaktors verstärkt werden.

[0072] Der Transkriptionsfaktor kann auch zur Identifizierung der Sequenzen in dem α -Amylase-Promotor, an den er bindet, verwendet werden. Beispielsweise könnte dies durch Herstellen eines GST-Fusionsproteins mit der DNA-Bindungsdomäne von AmyR, wie der Zinkfinger, zur Produktion in *E. coli* erfolgen. Solche Fusionsproteine können zweckmäßigerweise unter Verwendung von im Handel erhältlichen Testsätzen, beispielsweise „The GST Gene Fusion Kit“ von Pharmacia, hergestellt werden. Das gereinigte GST-Fusionsprotein kann sodann bei herkömmlichen *in vitro* Techniken, wie Gelverschiebungsassays oder DNA-Footprint-Analysen (Kulmburg, P., et al. (1992), *Molecular and Cellular Biology* 12 1932-1939; Lutfiyya, L.L. und Johnston, M. (1996), *Molecular and Cellular Biology* 16 4789-4797) verwendet werden. Die Identifizierung der AmyR-Bindungsstelle macht es möglich, diese Sequenzen in andere Promotoren, die normalerweise nicht von AmyR reguliert werden, zu inserieren.

MATERIALIEN UND METHODEN

Hybridisierung:

[0073] Geeignete Hybridisierungsbedingungen zur Bestimmung der Hybridisierung zwischen einer Nucleotidsonde und einer „analogen“ erfindungsgemäßen DNA-Sequenz kann wie nachstehend beschrieben definiert werden. Die zu verwendende Oligonucleotidsonde ist die DNA-Sequenz, die dem Transkriptionsfaktor-codierenden Teil der in SEQ ID NO:1 gezeigten DNA-Sequenz, d. h. die Nucleotide 1691..2676 + 2743..3193 + 3278..3653 in SEQ ID NO:1, oder einem Fragment davon, z. B. Nucleotide 1770-1800 in SEQ ID NO:1., entspricht.

Hybridisierungsbedingungen

[0074] Geeignete Bedingungen zur Bestimmung der Hybridisierung zwischen einer Nucleotidsonde und einer homologen DNA- oder RNA-Sequenz umfassen das Voreinweichen des Filters, welches die DNA-Fragmente oder RNA, oder zu hybridisierende RNA enthält, in 5 \times SSC (Standard-Salzcitrat-Puffer) 10 min und Vorhybridisieren des Filters in einer Lösung von 5 \times SSC (Sambrook, et al., supra), 5 \times Denhardt's-Lösung (Sambrook, et al., supra), 0,5 % SDS und 100 μ g/ml denaturierte ultrabeschallte Lachssperma-DNA (Sambrook, et al., supra) und anschließende Hybridisierung in der gleichen Lösung, die eine statistisch gepreimte (Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983), *Anal. Biochem.* 132, 6-13), 32 P-dATP-markierte (spezifische Aktivität $> 1 \times 10^9$ cpm/ μ g) Sonde enthält, für 12 h bei etwa 65 $^{\circ}$ C. Das Filter wird dann zweimal für 30 Minuten in 2 \times SSC, 0,5 % SDS bei bevorzugt nicht über 50 $^{\circ}$ C, stärker bevorzugt nicht über 55 $^{\circ}$ C, stärker bevorzugt nicht über 60 $^{\circ}$ C, stärker bevorzugt nicht über 65 $^{\circ}$ C, noch stärker bevorzugt nicht über 70 $^{\circ}$ C und insbesondere nicht über 75 $^{\circ}$ C gewaschen.

[0075] Moleküle, an die die Nucleotidsonde unter diesen Bedingungen hybridisiert, werden unter Verwendung eines Phosphorimage-Detektors nachgewiesen.

Immunologische Kreuzreaktivität:

[0076] Bei der Bestimmung von immunologischer Kreuzreaktivität zu verwendende Antikörper können unter Verwendung eines gereinigten Transkriptionsfaktors hergestellt werden. Insbesondere kann Antiserum gegen den erfindungsgemäßen Transkriptionsfaktor durch Immunisierung von Kaninchen (oder Nagern) nach der Verfahrensweise gezüchtet werden, die von N. Axelsen et al. in: *A Manual of Quantitative Immunoelectropho-*

resis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Kap. 23, oder A. Johnstone und R. Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, 1982 (spezieller die Seiten 27-31) beschrieben ist. Gereinigte Immunglobuline können aus den Antiseren, beispielsweise durch Salzpräzipitation ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und anschließende Dialyse und Ionenaustauschchromatographie, z. B. auf DEAE-Sephadex, erhalten werden. Die immunchemische Charakterisierung von Proteinen kann entweder durch Outcherlony Doppeldiffusionsanalyse (O. Outcherlony in: *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir, Hrsg.), Blackwell Scientific Publications, 1967, Seiten 655-706), durch gekreuzte Immunelektrophorese (N. Axelsen et al., supra, Kap. 3 und 4), oder durch Raketenimmunelektrophorese (N. Axelsen et al., op. cit., Kap. 2) erfolgen.

BEISPIELE

BEISPIEL 1

[0077] Das Klonierung des amyR-Transkriptionsfaktors aus *A. oryzae* amyR wurde durch Komplementation eines *A.-oryzae*-Mutanten-Stamms, der nicht in der Lage war, zwei verschiedene Proteine beide unter der Kontrolle des TAKA-Amylase-Promotors zu exprimieren, kloniert. Der mutante *A.-oryzae*-Stamm ToC879 wurde durch Mutagenese eines Stamms, SRe440, hergestellt, welcher eine Lipase (HLL), die cDNA unter der Kontrolle des TAKA-Promotors codiert, und eine Kopie des TAKA-Amylase-Gens, das aus seinem eigenen Promotor transkribiert wurde, enthält.

[0078] Die Mutante wurde durch ihren Amylase-negativen-(Amylase⁻)-Phänotyp identifiziert und isoliert, und es zeigte sich anschließend, dass sie auch Lipase-negativ (Lipase⁻) war.

[0079] Der Stamm ToC879 enthält intakte Kopien beider Expressionskassetten. Der Amylase⁻-Phänotyp macht ToC879 unfähig, auf Platten zu wachsen, die 1 % Cyclodextrin als einzige Kohlenstoffquelle enthalten, während der Elternstamm SRe440 auf solchen Platten wächst.

[0080] ToC879 wurde bei der DSM unter dem Namen DSM Nr. 10671 hinterlegt

[0081] amyR wurde durch Co-Transformieren von ToC879 mit einer *A.-oryzae*-Cosmid-Bibliothek und einem autonom replizierenden pHelp1-basierten Plasmid (D. Gems, 1. L. Johnstone und A. J. Clutterbuck (1991), *Gene* 98, 61-67), das das bar-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* trägt, welches Resistenz gegenüber Glufosinat überträgt, isoliert. Die Transformanten wurden der Selektion auf Platten unterzogen, die Cyclodextrin als einzige Kohlenstoffquelle enthielten, und wurden auf eine gleichzeitige Reversion des Lipase⁺-Phänotyps gescreent.

[0082] Die transformierende DNA wurde aus Kolonien erhalten, die in der Lage waren, auf Cyclodextrin zu wachsen. Subklonieren ergab die Isolierung eines 4,3-kb-DNA-Fragments, das in der Lage war, beide Phänotypen von ToC879 zu komplementieren. Das Gen, das an diesem Fragment beheimatet war, wurde als amyR bezeichnet.

Konstruktion des pHelp1-Derivats pMT1657

[0083] Ein Plasmid, pMT1612, wurde durch Ligation (und anschließende Transformation zu *E. coli* DH5a) der folgenden vier Fragmente hergestellt:

- i) der *E.-coli*-Vektor pToC65 (beschrieben in EP 531 372), geschnitten mit SphI/XbaI,
- ii) ein PCR-Fragment (enthaltend den *A.-nidulans*-amdS-Promotor), geschnitten mit SphI/BamHI,
- iii) ein 0,5-kb-BamHI/XhoI-Fragment aus pBP1T (B. Staubinger et al. (1992), *Fungal Genetics Newsletter* 39, 82-83), enthaltend das bar-Gen, und
- iv) ein 0,7-kb-XhoI/XbaI-Fragment aus pIC AMG/Term (EP-Anmeldung Nr. 87103806.3), enthaltend den *A.-niger*-Glucosylase-Transkriptionsterminator.

[0084] Das PCR-Fragment, das den amdS-Promotor enthielt, wurde unter Verwendung des Plasmids pMSX-6B1 (M. E. Katz et al. (1990), *Mol. Gen. Genet.* 220, 373-376) als Substrat-DNA und der beiden Oligonucleotide 4650 (SEQ ID NO:4) und 4651 (SEQ ID NO:5) als Primer hergestellt.

4650: CTTGCATGCCGCCAGGACCGAGCAAG, SEQ ID NO:4

4651: CTTGGATCCTCTGTGTTAGCTTATAG, SEQ ID NO:5

[0085] pMSX-6B1 enthält eine amdS-Promotor-up-Mutation, die I666 genannt wird.

[0086] pMT1612 wurde mit HindIII geschnitten, dephosphoryliert und mit einem 5,5-kb-HindIII-Fragment aus pHelp1 ligiert, das die AMA1-Sequenz enthielt. Das resultierende Plasmid pMT1657 ist in *Aspergilli* selbstreplizierend und kann gegenüber verstärkter Resistenz auf Glufosinat selektiert werden. pMT1657 ist in [Fig. 1](#) abgebildet, wobei PamDS den amdS-Promotor von Fragment ii), vorstehend, darstellt, bar Fragment iii), vorstehend, darstellt, und Tamg Fragment iv), vorstehend, darstellt.

Konstruktion der Cosmid-Bibliothek

[0087] Eine Cosmid-Bibliothek von *Aspergillus oryzae* wurde im Wesentlichen nach den Anweisungen der Lieferfirma des „SuperCos1 cosmid vector kit“ (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA) konstruiert.

[0088] Genomische DNA von *A. oryzae* IFO4177 wurde aus Protoplasten hergestellt, die durch Standardverfahren hergestellt wurden (Christensen, T., et al. (1988), *Biotechnology* 6, 1419-1422).

[0089] Nach der Isolierung wurden die Protoplasten durch Zentrifugation bei 2500 U/min 5 min in einer Labofuge T (Heto) pelletisiert; das Pellet wurde anschließend in 10 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 100 µg/ml Proteinase K und 0,5 % SDS, wie in der Anleitung aus dem SuperCos 1 Cosmidvektor-Testsatz ausgeführt, suspendiert; der Rest der DNA-Präparation wurde nach den Anweisungen des Testsatzes vorgenommen.

[0090] Die Größe der genomischen DNA wurde durch Elektrophorese unter Verwendung des CHEF-Gel-Geräts (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) analysiert. Ein 1-%-Agarosegel wurde 20 h bei 200 Volt mit einem 10-50 Sekundenpuls laufengelassen. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und photographiert. Die DNA war 50-100 kb groß. Die DNA wurde teilweise unter Verwendung von Sau3A verdaut. Die Größe der verdauten DNA betrug 20-50 kb, bestimmt durch den gleichen Typ von CHEF-Gelanalyse, wie vorstehend. Der CsCl-Gradientenbande-SuperCos1-Vektor wurde nach dem Handbuch hergestellt. Ligation und Packen wurden gleichermaßen wie im Handbuch beschrieben durchgeführt.

[0091] Nach der Titration der Bibliothek wurde das gesamte Packungsgemisch aus einer Ligation und das Packen in die Wirtszellen, XL1-Blue MR, transfiziert, und auf 50 µg/ml Ampicillin-LB-Platten plattiert. Ungefähr 3800 Kolonien wurden erhalten. Cosmid-Präparationen aus 10 Kolonien zeigten, dass sie alle Inserts der erwarteten Größe aufwiesen. Die Kolonien wurden einzeln verlesen und in Mikrotiterplattenvertiefungen mit 100 µl LB (100 µg/ml Ampicillin) beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 100 µl 50 % Glycerin wurde jeder Vertiefung zugesetzt, und die gesamte Bibliothek wurde bei -80 °C eingefroren. Insgesamt wurden 3822 Kolonien gelagert.

[0092] Dies stellt das *A.-oryzae*-Genom ungefähr 4,4 Mal dar. Nach Verlesen der Kolonien wurden die Platten abgeschabt, das Abgeschabte vereinigt, und die gesamte Bibliothek wurde ebenfalls in vier Pools als tiefgefrorener Glycerinvorrat gelagert. Die vier Pools wurden ToC901-ToC904 genannt.

[0093] Die einzelnen tiefgefrorenen Kolonien in der Bibliothek wurden auf LB-Platten (100 µg/ml Ampicillin) unter Verwendung einer Mehrstift-Vorrichtung von 6 Reihen von 8 Stiften, die in die Hälfte einer Mikrotiterschale passten, beimpft. Platten wurden hergestellt, die Kolonien aus sämtlichen Klonen in der Bibliothek enthielten.

[0094] Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Sterilisierte Whatman-540-Filter, die auf die Größe einer Petrischale geschnitten wurden, wurden auf die Kolonien aufgelegt, die für zwei weitere Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Die Filter wurden auf LB-Platten übergeführt, die 200 µg/ml Chloramphenicol enthielten, und die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

[0095] Am nächsten Tag wurden die Filter zweimal in 0,5 M NaOH 5 min gewaschen, dann zweimal in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4) 5 Minuten und dann zweimal in 2 × SSC für 5 min. Die Filter wurden mit Ethanol benetzt und luftgetrocknet.

Selektion der amyR-Klone

[0096] Cosmid-DNA wurde aus ToC901-904 hergestellt und in ToC879 durch Co-Transformation mit pMT1657 eingebracht. Das Transformationsverfahren ist in der EP-Anmeldung Nr. 87103806.3 beschrieben. Ungefähr 8700 Transformanten wurden durch Resistenz gegenüber 1 mg/ml Glufosinat in Minimalplatten (Cove D.J. (1966), *BBA* 113, 51-56), die 1 M Saccharose zur osmotischen Stabilisierung und 10 mM (NH₄)₂SO₄

enthielten, selektiert.

[0097] Zehn statistisch ausgewählte Transformanten wurden einmal auf dem gleichen Typ von Platten reisoliert. Conidiosporen aus diesen 10 Transformanten wurden in Minimalmedium übergeimpft, das 1 mg/ml Glufosinat enthielt, und bei 30 °C wachsgelassen, bis genug Mycel zur DNA-Präparation geerntet werden konnte. Die DNA wurde wie bei T. Christensen et al. (supra) beschrieben, hergestellt.

[0098] Die ungeschnittene DNA wurde auf ein 0,7%-Agarosegel aufgebracht, und die Elektrophorese und anschließend der Southern Blot wurden durchgeführt. Der Blot wurde mit einem ³²P-markierten SuperCos1-spezifischen DNA-Fragment hybridisiert.

[0099] Jede der zehn Transformanten zeigte eine Bande mit einer höheren Mobilität als die lineare chromosomale DNA. Jede der Banden hybridisierte auch an eine pHelp1-spezifische Sonde, was angab, dass die Co-Transformationsfrequenz der Cosmid-Bibliothek nahe an 100 % lag, und dass die Cosmide sich in den autonomen Replikationsvektor pHelp1 integriert hatten.

[0100] Die Transformanten waren, wie für pHelp1-Transformanten erwartet, instabil. Weniger als 10 % der Conidiosporen aus einer Glufosinat-resistenten Kolonie ließen Glufosinat-resistente Abkömmlinge entstehen.

[0101] Die Conidiosporen aus allen Transformanten wurden in 8 Pools gesammelt und auf Minimalplatten plattiert (Cove D.J., supra), die 1 mg/ml Glufosinat, 10 mM (NH₄)₂SO₄ und 1 % β-Cyclodextrin (Kleptose von Roquette Frères', 62136 Lestem, Frankreich) enthielten.

[0102] Vier Kolonien wurden aus einem der Pools und eine aus einem der anderen Pools erhalten. Zwei der Kolonien aus dem ersten Pool wurden einmal auf derselben Art von Platten reisoliert.

[0103] Conidiosporen aus den re-isolierten Kolonien wurden auf Minimalplatten entweder mit Glucose oder Cyclodextrin als eine Kohlenstoffquelle und auf Glufosinat-enthaltenden Platten plattiert. Die Glufosinat-Resistenz und die Fähigkeit zum Wachsen auf Cyclodextrin waren beides instabile Phänotypen mit dem gleichen Grad an Instabilität. Dies zeigte, dass das Gen, das die Fähigkeit zum Wachsen auf Cyclodextrin übertrug, physikalisch mit pMT1657 in den Transformanten verknüpft war.

[0104] Kolonien aus den Re-Isolationsplatten wurden ausgeschnitten und durch Raketenimmunelektrophorese (RIE) unter Verwendung von Antikörper, der gegen die HLL-Lipase gezüchtet wurde, analysiert. Die Transformanten ergaben eine eindeutige Reaktion mit dem Antikörper, während ToC879-Kolonien, die auf Maltose gewachsen waren, keine Reaktion ergaben. Dies führte zu dem Schluss, dass sowohl die Expression von Amylase (d. h. Wachstum auf Cyclodextrin) als auch von Lipase (d. h. Antikörper-Binden), in diesen Transformanten wiederhergestellt worden war. Das Gen, das für diesen Phänotyp verantwortlich ist, wurde als amyR bezeichnet.

Isolierung des amyR-Gens

[0105] Um das amyR-Gen aus den Amylase⁺-, Lipase⁺-Transformanten von ToC879 zu befreien, wurden zwei verschiedene Ansätze nacheinander verwendet.

[0106] DNA wurde aus Mycel hergestellt, das in Minimalmedium mit Cyclodextrin als Kohlenstoffquelle gewachsen war.

[0107] Bei dem ersten Ansatz wurde die DNA unter Verwendung des Gigapack[®]II-Testsatzes von Stratagene in einem Versuch, das Ursprungscosmid aus der Gesamt-DNA zu befreien, in λ-Köpfe gepackt. Die Packungsreaktion wurde mit XL1-Blue MR E. coli unter den von der Testsatz-Lieferfirma ausgeführten Bedingungen inkubiert. Die E. coli-Zellen wurden auf LB-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Zwei Kolonien erschienen auf den Platten; die Cosmide, die sie enthielten, waren identisch und wurden als ToC1012 bezeichnet.

[0108] Bei dem zweiten Ansatz wurde die Gesamt-DNA in einem Versuch zur Transformation kompetenter E. coli-DH5a-Zellen verwendet. Sechzehn Kolonien wurden isoliert, und es wurde durch Restriktionsenzymverdau gezeigt, dass sie sechs verschiedene Plasmide enthielten. Jedes der Plasmide wurde mit EcoRI verdaut und einer Southern-Analyse unterzogen. Eine ³²P-markierte Sonde eines Gemischs von pMT1657 und SuperCos1 wurde zur Identifizierung von DNA-Fragmenten verwendet, die nicht Teil von einem dieser Vektoren waren. Zwei EcoR1-Fragmente, mit einer Größe von ungefähr 0,7 und 1,2 kb, hybridisierten nicht an eine

dieser Sonden. Das 1,2-kb-Fragment wurde isoliert, mit ^{32}P markiert und als Sonde bei einem Hybridisierungsexperiment verwendet, wobei die Filter den Teil der Cosmid-Bibliothek enthielten, der die ursprünglichen Transformanten entstehen ließ. Sechs Cosmide aus dem Pool (ToC904), der ungefähr 1000 Klone enthielt, hybridisierten.

[0109] Von diesen wurde durch Restriktionsenzymverdau gezeigt, dass einige identisch waren, was zur Isolierung von vier verschiedenen Cosmiden führte. Sämtliche Cosmide enthielten ebenso mindestens Teile des TAKA-Amylase-Gens. Die vier Cosmide und das Cosmid ToC1012 wurden in ToC879 durch Co-Transformation mit pMT1623 transformiert, einem pUC-basierten Plasmid, das das bar-Gen unter der Kontrolle des A.-oryzae-tpi-Promotors trägt. Fünfzehn Transformanten aus jeder Co-Transformation wurden aufgrund von Resistenz gegenüber Glufosinat isoliert und auf die Fähigkeit zum Wachsen auf Cyclodextrin getestet.

[0110] Acht Transformanten von ToC1012 und drei Transformanten von einem der anderen Cosmide, 41B12, waren in der Lage, zu wachsen. Keiner der Transformanten der anderen Cosmide wuchs. Dass nicht alle der Transformanten von ToC1012 und 41B12 in der Lage waren, zu wachsen, beruht wahrscheinlich auf einer Reflexion der Co-Transformationsfrequenz in jedem Experiment. Kolonien aus den Transformanten, die auf Cyclodextrin wuchsen, wurden durch RIE analysiert und zeigten, dass sie alle Lipase produzierten.

[0111] DNA-Fragmente, die durch Verdau von 41B12 entweder mit BglIII, HindIII oder PstI erhalten wurden, wurden zu pUC19 kloniert, um aus dem Cosmid amyR zu subklonieren. Die Subklone wurden in ToC879 transformiert, und die Transformanten auf die Fähigkeit zum Wachsen auf Cyclodextrin und zur Produktion von Lipase, wie vorstehend beschrieben, analysiert. Wie in [Fig. 2](#) beschrieben, wurde gezeigt, dass ein Plasmid, pToC316 genannt, ein ungefähr 9-kb-HindIII-Fragment enthielt, das als amyR enthaltend identifiziert wurde.

[0112] Weiteres Subklonieren ergab ein als pToC320 bezeichnetes Plasmid, das ein 4,3-kb-HindIII/SacI-Fragment enthielt, das in [Fig. 3](#) gezeigt ist, und das anschließend unter Verwendung sowohl von weiterem Subklonieren als auch Primer-Weitergehen auf einem ABI-DNA-Sequenzierer sequenziert wurde.

[0113] Eine DNA-Sequenz von 3980 bp, einschließlich des amyR-Gens, ist in SEQ ID NO:1 gezeigt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist in SEQ ID NO:3 gezeigt und ergibt eine Zinkfinger-Sequenz vom Typ Gal 4 zwischen den Aminosäuren 28-54. Solche Sequenzen binden bekanntlich an DNA (Reece, R.J., und Ptashne, M. (1993), Science 261, 909-910).

[0114] amyR wird nahe an eines der drei Amylasegene in IFO4177 kartiert, da es aus einem Cosmid isoliert wurde, das auch Amylase-spezifische DNA-Fragmente enthielt. Das Kartieren des Cosmids zeigte, dass das α -Amylasegen und amyR 5-6 kb auseinander sind. Die Southern-Analyse genomischer DNA zeigte, dass nur eine Kopie von amyR in IFO4177 vorhanden ist, und bestätigte, dass sie nahe an einem der Amylasegene kartiert wird.

Analyse von amyR cDNA

[0115] mRNA wurde durch das Verfahren von Wahleithner, J. A., et al. (1996, Curr. Genet. 29, 395-403) aus einer Kultur von A. oryzae hergestellt, die in Maltose enthaltendem Medium unter Bedingungen wachse gelassen wurde, die für die α -Amylase-Produktion günstig waren. Doppelsträngige cDNA wurde durch Standardverfahren hergestellt und für die PCR-Reaktionen mit den folgenden Primern verwendet:

oligo dT-Primer:	TTTTGTAAGCT ₃₁	SEQ ID NO:9
23087:	CCCCAAGCTTCGCCGCTCTGCGCTGCTGCCG	SEQ ID NO:6
20865:	CGGAATTCATCAACCTCATCAACGCTTTC	SEQ ID NO:7
20866:	CGGAATTCATCGGCGAGATAGTATCCTAT	SEQ ID NO:8

[0116] Eine PCR-Reaktion mit den Primer 20866 und 23087 ergab ein Fragment von ungefähr 1,1 kb. Das Fragment wurde mit EcoRI und HindIII verdaut; diese Restriktionsstellen wurden in den Primer eingebaut und in einem pUC19-Vektor, der mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde, kloniert.

[0117] Die Inserts in dem resultierenden Plasmid wurden sequenziert, das Ergebnis lokalisierte ein Intron in diesem Teil des Gens. Das Intron wird in SEQ ID NO:2 angegeben.

[0118] Eine weitere PCR-Reaktion mit dem oligodT-Primer und dem Primer 20866 ergab kein distinktes Fragment. Ein Aliquot dieser Reaktion wurde als Ausgangspunkt für eine neue Reaktion mit dem oligodT-Primer und dem Primer 20865 verwendet, was zu einem Fragment von ungefähr 1,1 kb führte. Dieses Fragment wurde mit EcoRI und HindIII verdaut und in pUC19 kloniert.

[0119] Das Sequenzieren zeigte, dass das Fragment den 3'-Teil von amyR enthielt, und ein weiteres Intron wurde lokalisiert. Dies wird ebenfalls in der SEQ ID NO:2 angegeben. Drei unabhängige Plasmide wurden am 3'-Ende sequenziert, und zwei polyA-Additionsstellen, eine am bp No. 3227 und eine an bp No. 3927, wurden lokalisiert.

BEISPIEL 2:

[0120] Quantifizierung der Glucoamylase-Synthese in einem amyR-Stamm. *A. oryzae* produziert eine Glucoamylase, die von dem glaA-Gen codiert wird, welches durch die gleichen Substanzen wie α -Amylase reguliert wird (Y. Hata et al. (1992), Curr. Genet. 22, 85-91). Um zu sehen, ob amyR ebenfalls an der Regulierung von glaA beteiligt ist, wurde die Synthese von Glucoamylase unter induzierenden Bedingungen in dem amyR⁻-Stamm ToC879 und in dem amyR-wt-Stamm SRe440 gemessen, aus dem ToC879 direkt abgeleitet wurde.

[0121] Conidiosporen aus jedem Stamm wurden in 10 ml YPM (YP enthaltend 2 % Maltose) übergeimpft und vier Tage bei 30 °C wachsgelassen. Die Überstände wurden gesammelt und auf den Glucoamylase-Gehalt durch Inkubation mit p-Nitrophenyl- α -D-glucoopyranosid analysiert, ein Substrat, das sich bei Spaltung durch Glucoamylase gelb färbt. Bei dem eingesetzten Verfahren wurden 0,5 ml Fermentationslösung mit 1 ml 0,1 M Na-Acetat pH = 4,3, enthaltend 1 mg/ml des Substrates, gemischt. Die Proben wurden 3 h bei Raumtemperatur inkubiert, und 1,5 ml 0,1 M Na₂B₄O₇ wurden zugesetzt. Die gelbe Farbe wurde in einem Spektralphotometer bei 400 nm gemessen. Die Farbproben wurden durch Mischen der Überstände zunächst mit dem Borat und anschließend mit der Substratlösung hergestellt. Die Ergebnisse lauteten:

Reaktionskontrolle (OD-Einheiten)

SRe440	0,655
ToC879	0,000

[0122] Die Abwesenheit einer OD-Ablesung in der Probe, die aus ToC879 genommen wurde, zeigt eindeutig, dass die Synthese von Glucoamylase von *A. oryzae* die Expression des amyR-Transkriptionsfaktors erfordert.

BEISPIEL 3

Überexpression von amyR

[0123] Ein Plasmid, pToC342, das die codierende Region und 3'-nicht-codierende Sequenzen von amyR, fusioniert mit dem Promotor für das *A. oryzae*-tpi-Gen, enthielt, wurde konstruiert. Das tpi-Gen codiert Triosephosphatisomerase, ein konstitutiv exprimiertes Enzym, das am Primärmetabolismus beteiligt ist. Das *A. oryzae*-tpi-Gen wurde durch Kreuzhybridisierung mit einem *A. nidulans*-cDNA-Klon nach dem Verfahren von McKnight, G.L., et al. (1986, Cell 46, 143-147) isoliert. Die Sequenzierung führte zur Identifizierung des Strukturgens. Der verwendete Promotor war ein Fragment von ungefähr 700 bp unmittelbar stromaufwärts der codierenden Region. pToC342 war in der Lage, die Mutation in ToC879 zu komplementieren. Zu pToC342 wurde weiterhin das *A. oryzae*-pyrG-Gen zugesetzt, und das resultierende Plasmid, pToC359, wurde zu JaL250, eine pyrG-Mutante von JaL228, die in der Patentanmeldung DK1024/96, eingereicht 1996-09-19, beschrieben ist, transformiert. Es wurde festgestellt, dass Stämme, die mehrere Kopien von pToC359 enthielten, erhöhte Konzentrationen an Glucoamylase synthetisieren.

Konstruktion von pToC342 und pToC359

[0124] Eine PCR-Reaktion wurde mit pToC320 als Templat und den folgenden Primern vorgenommen:

8753 GTTTCGAGTATGTGGATTCC

8997 CGGAATTCGGATCCGAGCATGTCTCATTCTC

[0125] Das resultierende Fragment wurde mit EcoRI/ApaI geschnitten, um ein Fragment von ungefähr 180 bp

zu erzeugen, das anschließend in pToC320 kloniert wurde, das mit EcoRI/ApaI verdaut wurde. Das resultierende Plasmid, pToC336, wurde sequenziert, um zu bestätigen, dass das PCR-Fragment intakt war. Das 2,6-kb-BamHI/SacI-Fragment von pToC336, das die codierende Region und die 3'-untranslatierte Sequenz von amyR und ein EcoRI/BamHI-Fragment von ungefähr 700 bp enthielt, das den tpi-Promotor enthielt, wurde in EcoRI/SacI-verdauten pUC19 kloniert. Die BamHI-Schnittstelle stromabwärts des tpi-Promotors wurde in vitro eingeführt, wohingegen die EcoRI-Schnittstelle eine endogene Stelle aus dem ursprünglichen tpi-Klon ist. Das resultierende Plasmid, das pToC342 genannt wird, wurde mit HindIII geschnitten, dephosphoryliert und zu einem 1,8-kb-HindIII-Fragment ligiert, das das A.-oryzae-pyrG-Gen enthielt, was zu einem Plasmid führte, das pToC359 genannt wurde. Die Struktur von sowohl pToC342 als auch pToC359 ist in [Fig. 4](#) gezeigt, wobei Ptpi den tpi-Promotor darstellt und TamyR die 3'-nicht-codierende Region von amyR darstellt. Das Klonieren des pyrG-Gens wurde bereits zuvor in WO 95/35385 beschrieben.

Expression in A.-oryzae-JaL250

[0126] JaL250 ist eine pyrG-Mutante von JaL228, selektiert durch Resistenz gegenüber 5-Fluororothsäure. JaL228 wurde bereits in der Patentanmeldung DK 1024/96, eingereicht 1996-09-19, beschrieben. JaL250 wurde mit pToC359 unter Anwendung von Standardverfahren und durch Selektieren auf Erlass der Uridin-Anforderung transformiert. Die Transformanten wurden zweimal durch Conidiosporen reisoliert und vier Tage in YP + 2 % Maltose bei 30 °C wachsgelassen. Sezernierte Glucoamylase wurde durch die Fähigkeit zur Spaltung von p-Nitrophenyl- α -D-gluco-pyranosid gemessen. Die Transformanten besaßen 5-31 willkürliche Glucoamylase-Einheiten/ml in der Fermentationslösung, während JaL228 2-3 Einheiten/ml aufwies. Die besten Transformanten wurden mit ToC1200 bezeichnet. Die Southern-Analyse zeigte, dass mehrere Kopien von pToC359 in das Genom von ToC1200 integriert waren.

[0127] Aufgrund des α -Amylase-Promotors kann ToC1200 zweckmäßigerweise als Wirtsstamm zur Expression von Plasmiden verwendet werden.

BEISPIEL 4

Kohlenstoffkatabolit-Repression des TAKA-Promotors

[0128] Der TAKA-Amylase-Promotor unterliegt der Kohlenstoffkatabolit-Repression. In Aspergilli wird die Kohlenstoffkatabolit-Repression mindestens teilweise über den transkriptionalen Repressor CreA vermittelt, ein Homolog zu *S. cerevisiae* MIG1. Die DNA-Bindungsstellen in Promotoren unter CreA-Kontrolle sind bekanntlich GC-reich und anscheinend mit den MIG1-Stellen in *S. cerevisiae* identisch. Der TAKA-Amylase-Promotor enthält mehrere potentielle CreA-Bindungsstellen. Um zu bestimmen, ob dieser Promotor an der Kohlenstoffkatabolit-Repression beteiligt ist, wurden drei solche Stellen mutiert, stellten allerdings nur eine teilweise Entspannung der Kohlenstoffkatabolit-Repression bereit. Im Gegensatz dazu entspannte das Einbringen von Kopien von konstitutiv exprimiertem amyR in Stämme, die den modifizierten Promotor, gekoppelt an ein Reporter-gen, enthielten, vollständig die Repression des Reporters.

Konstruktion eines CreA-Stellen-deletierten TAKA-Amylase-Promotors

[0129] Drei Stellen wurden als potentielle CreA-Bindungsstellen in dem TAKA-Amylase-Promotor durch Sequenzvergleich mit bekannten CreA- und MIG1-Stellen identifiziert. Die resultierenden Stellen besitzen die folgenden Sequenzen:

Stelle I	CCCCGGTATTG
Stelle II	CCCCGGAGTCA
Stelle III	ATATGGCGGGT

[0130] Die unterstrichenen Basen wurden in A geändert, da solche Änderungen bekanntlich MIG1-Bindungsstellen zerstören. Die Substitutionen wurden unter Verwendung von ortsspezifischen Standardmutagenese-Verfahrensweisen durchgeführt. Ein Expressionsvektor, pToC297, der den modifizierten Promotor und die 3'-nicht-transkribierte Sequenz des Glucoamylases aus *A. niger* enthielt, wurde konstruiert. pToC297 ist mit pToC68, beschrieben in WO 91/17243, identisch, mit der Ausnahme der Änderungen in dem Promotor. Beide Plasmide besitzen eine einzige BamHI-Schnittstelle zwischen dem Promotor und dem Terminator.

Expression einer durch einen CreA⁻-TAKA-Amylase-Promotor regulierten Lipase

[0131] Ein BamHI-Fragment von ungefähr 950 bp, das die cDNA enthielt, die eine Humicolalanuginosa-Lipase codiert, wurde in pToC297 kloniert (Klonieren und Expression der H.-lanuginosa-Lipase wurde bereits in EP 305 216 beschrieben). Das resultierende Plasmid, pToC298, wurde in *A. oryzae* IFO4177 durch Co-Transformation mit dem A.-nidulans-amdS-Gen transformiert, und seine Struktur ist in [Fig. 5](#) gezeigt, wobei Ptaka-creA den CreA-Bindungsstellen-defizienten TAKA-Amylase-Promotor darstellt. Die Transformanten wurden zweimal durch Conidiosporen reisoliert und eine solche Transformante, ToC1075, die Lipase produziert, wurde zur weiteren Bewertung gewählt. ToC1075 und ein p960-Transformant von IFO4177 (zuvor in EP 305 216 beschrieben), der die Lipase, fusioniert an dem Wildtyp-TAKA-Promotor, enthielt, wurden bei 30 °C in 10 ml YP, enthaltend 2 % oder 10 % Glucose, wachselassen. Es wurden täglich zur Analyse der Lipase in der Fermentationslösung Proben genommen. Der Lipase-Gehalt wurde durch Raketenelektrophorese unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers, der gegen gereinigte Lipase gezüchtet wurde, gemessen. Die verbrauchte Fermentationslösung aus *A. oryzae* IFO4177 reagierte nicht mit dem Antikörper. Der Glucose-Gehalt der Fermentationslösung wurde gleichermaßen täglich unter Verwendung von Tes-tage von Lilly gemessen.

[0132] Am Tag eins wurde Glucose in sämtlichen Kulturen nachgewiesen, jedoch konnte am Tag zwei Glucose nur in Kulturen, die ursprünglich 10 % enthielten, nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Lipase-Produktion, die in [Fig. 6](#) gezeigt sind, zeigen, dass der Wildtyp-Promotor repressiert ist, bis keine Glucose mehr vorhanden ist. Wenn somit Glucose erschöpft wird, beginnt sich die Lipase zu akkumulieren. [Fig. 6](#) zeigt auch, dass der modifizierte Promotor nicht so streng reguliert ist, da niedrige Niveaus an Lipase in Gegenwart von Glucose in der 10-%-Glucose-Fermentation produziert werden. Somit besteht eine partielle Glucose-Derepression, die in ToC1075 gesehen wird.

[0133] Entspannung der Kohlenstoffkatabolit-Repression von Lipase in ToC1075 durch pToC342 ToC1075 wurde mit pToC342 durch Co-Transformation mit dem bar-enthaltenden Plasmid pMT1623 transformiert. Stämme, die mehrere Kopien von pToC342 enthielten und die die Lipase-Expressionskassette zurückhielten, wurden durch Southern-Blot-Analyse identifiziert; ein solcher Stamm war ToC1075, und ToC1139 wurden bei 30 °C in 10 ml YP, enthaltend entweder 2 % oder 10 % Glucose, gezüchtet, und die Proben wurden täglich auf Lipase und Glucose getestet. Die Lipase wurde durch Spaltung von Paranitrophenylbutyrat gemessen. Der Glucose-Gehalt wurde mit Tes-tage von Lilly gemessen. Die in [Fig. 7](#) gezeigten Ergebnisse geben an, dass ToC1075 wie zuvor eine partielle Entspannung der Glucose-Repression bereitstellt, während die Lipase-Produktion durch ToC1139 unabhängig von der Gegenwart von Glucose ist.

BEISPIEL 5

Southern-Analyse von *A. niger* auf das amyR-Gen

[0134] Die Synthese von α -Amylase und Glucoamylase in *A. niger*, wie in *A. oryzae*, werden durch die Kohlenstoffquelle reguliert. Es ist darum wahrscheinlich, dass *A. niger* ebenfalls ein amyR-Gen enthält. Diese Hypothese wurde durch Suchen nach Kreuzhybridisierung zwischen dem A.-oryzae-amyR-Gen und A.-niger-chromosomaler DNA getestet.

[0135] DNA wurde aus *A. niger* durch herkömmliche Verfahren hergestellt. Die DNA wurde mit BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, Sall, XmaI oder XbaI geschnitten, und die resultierenden DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde anschließend auf einer Nitrocellulose-Membran geblottet und mit einer ³²P-markierten Sonde, die Teil des strukturellen A.-oryzae-amyR-Gens enthielt, hybridisiert. Die Sonde wurde durch PCR an pToC320 hergestellt und beginnt bei bp No. 1683 und endet bei bp No. 2615, wie in SEQ ID NO:1 gezeigt. Die Hybridisierung wurde in 10 × Denhardt's Lösung, 5 × SSC, 10 mM EDTA, 1 % SDS, 0,15 mg/ml polyA, 0,05 mg/ml Hefe tRNA) bei 50 °C über Nacht durchgeführt. Nach Hybridisierung wurde die Membran unter Bedingungen erhöhter Stringenz gewaschen und die Radioaktivität auf der Membran durch einen Phosphorimager analysiert. [Fig. 8](#) zeigt das Ergebnis, wenn die Membran in 2 × SSC, 0,1 % SDS bei 58 °C gewaschen wurde. Einzelne Banden können mit mehreren der Restriktionsenzyme gesehen werden. Somit kann das A.-niger-amyR-Gen auf der Grundlage dieses Kreuzhybridisierungsergebnisses kloniert werden.

IN DER BESCHREIBUNG ZITIERT DRUCKSCHRIFTEN

Dhawale und Lane (1993) NAR 21 5537-5546

Lachmund et al. (1993) *Current Microbiology* 26 47-51
Tada et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 229 301-306
Tada et al. (1991) *Agric. Biol. Chem.* 55 1939-1941
Tsuchiya et al. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 1849-1853,
Nagata et al. (1993) *Mol. Gen. Genet.* 237 251-260
Ford et al., (1991), *Protein Expression and Purification* 2, 95-107
Cunningham und Wells, (1989) *Science* 244 1081-1085
Needleman, S.B. und Wunsch, C.D., (1970) *Journal of Molecular Biology* 48 443-453
Sambrook, J., et al., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab.; Cold Spring Harbor, NY.
WO 93/11249
WO 94/14953
Kelly und Kwon-Chung (1992) *J. Bacteriol.* 174 222-232
McKnight et al. (1985) *The EMBO J.* 4 2093-2099
EP 238 023
Kulmburg, P., et al. (1992) *Molecul and and Cellular Biology* 12 1932-1939
Lutfiyya, L.L., und Johnston, M. (1996) *Molecular and Cellular Biology* 16 4790-4797
Examples:
Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132:6-13
N. Axelsen et al. in: *A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis*, Blackwell Scientific Publications, 1973, Kapitel 23
A. Johnstone und R. Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, 1982, pp. 27-31
O. Ouchterlony in: *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir, Hrsg.), Blackwell Scientific Publications, 1967, Ss. 655-706
D. Gems, I. L. Johnstone, und A. J. Clutterbuck, (1991) *Gene* 98 61-67
EP 531 372
B. Staubinger et al. (1992) *Fungal Genetics Newsletter* 39 82-83
M. E. Katz et al. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 220 373-376
Christensen, T., et. al., (1988) *Biotechnology* 6 1419-1422
Cove D.J., *BBA* (1966) 113 51-56
Reece, R.J., und Ptashne, M. (1993) *Science* 261 909-910
Wahleithner, J. A., et al. (1996) *Curr. Genet.* 29 395-403
Hata, Y., et al. (1992) *Curr. Genet.* 22 85-91
McKnight, G.L., et al, (1986, *Cell* 46 143-147)
DK 1024/96
WO 95/35385
WO 91/17243
EP 305 216

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) Anmelder:

- (A) NAME: Novo Nordisk A/S
- (B) STRASSE: Novo Alle
- (C) STADT: Bagsvaerd
- (E) LAND: Dänemark
- (F) POSTLEITZAHL (ZIP): DK-2880
- (G) TELEFON: +45 4442 2668
- (H) TELEFAX: +45 4442 6080

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Ein Transkriptionsfaktor

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) COMPUTERLESBARE FORM

- (A) MEDIUM TYP : Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 3980 Basenpaare
- (B) TYP : Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

- (A) ORGANISMUS: Aspergillus oryzae

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

TCTAGAOGG CCATGTGTG GTCGGCAAG TTGATTOGG AOCGTGTGT AGTTGCTTCT	60
TTAAGAAC GGCACCCCTC TGOOGTCTDC GAACCGAAT TGTAGCTAGA TGTATATGTC	120
TGACGAAC AGGTGTCCAC GGGCAATCC CTCACAAITG ATGGCCCGTC COGTTCCAT	180
CGATTGTGC TAOCTGCGT GCAAGGCAA ACATCCCGT CAAAGCTCG AGGGGCATG	240
CCTGCAATCT CTGACCATG AGAGGGGAG CAAGTCAAGC TAGTGTCAAG GGTATAGGTC	300
CTACGCAGCA ATGAGGTGGC TTCACCGTA OGGAGTGGG ACAGCATGAT CAAGCCTTTT	360
GGGAACTGA OGAAAGAGTA COGTTAAGC OGAAGTGGG AGATGAATCT CTGCGAGCA	420
AAGGAGAGA COGAAAAGA GTGTGTGAT TCTTGGGAGC AGTTACAGTA CTTCGGTGC	480
CGGAAITGG AAAAGTCTC GACCAATGCT GCGATCATC TGATATCCCT AOCCTGATG	540
GTCCATCCC CGATAAATC COGACAGAC GCTTGAGCC TGAAAAGTA GTATTCTCG	600
AGAGATCCAT TCACCAGAT CAATACTGGC AAATACATG TTCCCACT CATATTCAA	660

GGTGOCTAAA COOCTOOGGT GTGCOOGTGA GGGTTTTOCA CGOCATCTCT AGTGGTGOCA	720
TGAOOGGAGC ATCOGATGGC TTCCAGTATT GGGTGGTTGG GATGGACAAC AAGCTOCAA	780
TAAGGGGAAT TTGOCTTTGG TOCAGGAATG AAGTODDGGT GGGGAOCAGC GCCTCAGOC	840
AGGCTAAGAG TGGAAATAG TCATAGAOC TCGGCTCATG GGAGGTTGG AGGTGTTAG	900
ATCTCTTCA ATGOCATTCA TTCTCTGTTT TGAOCTGGC TTCCGAGAG TGGTGOCTOC	960
CTTACATOC CACATGCTGG ATGCAAGOC GTGGTACGCT GTTCTTTCA GAAGTAGCAG	1020
GCTAGSITCA CGATGAGCTG OCTTTCAAC CTGGAATAAC CATTACGTGA GACTGTTCA	1080
CTTCTIGAAT TGATOOCTGA CTAGAGCTG CTCTAATATG CTGTGIGGCA OGGOOGGTCC	1140
OCTGGGGIT GCTAAGGCTG AITTAATGAC TOCGTACAGT ATAACCCAGG GTGGCTATAG	1200
AITCOCTGCA TCTTCCAGC TOOCTCACA OCTGATTOCA CCAITCTTAA GGGCOGTTA	1260
GOCTOGATGG GGTATAATGG AGTTAACTAT AAACAAGACT CTACAAGAA TOCOGATGIG	1320
AGTTTGGAC GAGTTGTAC CGATGGGTCC TOCCATTGT TAGGAGTGAC GCTAGGGAC	1380
CTTIAGGGCA CAGACTAAC CAAGACAAG ATGGAGTAGA CTCCAGGTAG AITTAATTOCA	1440
ATCTTCTGC CAAAGTAAAG OGGGTTTTT TGAOCTGCA GCTCTTTTTT TTTCTTTTTT	1500
CTTTTTTTC TTTTTTAIT GTTCCOCAGA TTTCTTTCT TTTCTTCAA TOCTGAOGTT	1560
CTCAACGGT ATGGOGCAC AGCOOGCTC GCTATCCCTC GTTTTAAGT OGGODATTCT	1620
TCTAGTTGCT CTGGGGGAT GCCATGATT CTAAAGGCTC CACATGGGG AGATAGTATC	1680
CTATCOGAGC ATGCTCAIT CTCCAACGA CATTOOCTCA ACATCOGAAA AGGAAATGGA	1740
GTCACOOCA GAAAAGOCG CTAACAGGC CTGGGACAAT TGOGTGAC GCAAAATCAA	1800
GTGTTCTAGA GAGCTTCAT GGGACAAGT CCAGGCTCTT CTCTCTOCT GTTCTACAG	1860
CGAGTCTC CTGOCAGG GCOCAAGT CCGCAGCTC TACCTCTOG CTCCATTOCA	1920
TOCACTGOC TCAAGCAC GTCTCTCAC CAAGGAATG CTGCOOCAA AOCAGGGGC	1980
TTGCCATTG GGTCCOOGA CGTCTOOGC GTCCACOGTA GGGAGGOC AGTATCTACA	2040
TOCAGACTT TOGGAGTGT TCACTOGACT ACCACOOCA GATCTGTCT OCTCTOOGA	2100
CTGACAAAC TOGCTATTG ACTOCTCAC TATGGGGCA CTCCOOGC CAGCOGTCT	2160
GTGACGGCA AACCTCTAG CCAATGCAA TGCTTCTC AAGTACTGT TOCGATCAT	2220
GCOGTGCTG AGACAGGAC AGCTGCAGCA GACTGOCAC CAGCOGAGC GCTGTCTCC	2280
OCAAGCTAC GCTTTCATG CGCTCTAG CGGGOCAG CACATOCAAC TGAAGCTGGA	2340
CGTGCAGCA OGGGTCCG AGGGGCTC CGGGGAGC AGOCTOGAG GACATCTAT	2400
GTGTGGGA GAAGACTOC TGGCTGAGC CGTGGGGCA AGAAAGGAAT ACAAGTGGT	2460
CGACGAAIT AACATGAAA AOCCTTAC CTCTTCTT CTCTTGGCG OCTACGGAAA	2520
OCTAGACAGA CAGGATCAG OCTGGTTCTA OCTATGTCAG ACCAGTCA TGGTCTCAC	2580

ACTAGGOCTA CAACGGGAAT CCACATACTC GAAACTAAGC GTOGAGGAAG CAGAAGAGAA	2640
AAGGAGAGTA TTCTGGCTCT TATTGGTAC AGAAAGGTAA GAAAAGAAA AACTCTACTT	2700
TCCCAATCAC CAACAGTAC CAAAAATAAC ACGAAAAAC AGAGGCTACG CATTACAACA	2760
AGCAAAACCA GTCATGCTOC GCACTCCAT CCACAAACCA CAGGTOCTGT GCTCAGAOGA	2820
CCCAATCTA GCCTACGGGT TCATCAAGCT CATCAAGTC TTGAAAAGC TCAGCCCAA	2880
TCTCTAGAC TGGGTCTCG CCGGGGCGAG CAGGGCAGAC GGCGACCCOC CGCTACTTC	2940
TTCTATOCOA TCCAGTCTCG CCAAGCAAT CTCCTCGAG GGGTCTCG AGATCCAGAA	3000
AGTAGACATC CTCATCACTC AGCAATGGCT ACAAACCATG ATGTGAAAC TCTCATGAC	3060
CCAAGTACA CAGCCCGCT CTCGGATGA GCGGTCTC CCTTCCAC TGCCCGTCT	3120
AGTGGCAAG GCGTCATGG GGTTCATGC GCGGCATOC CAAGGTGCTG TTGAOGTCA	3180
TGGTATOGGA ATGGTAAGAA AGGCACTTA CCTCATACA CCTCCCTCA TCAGTCACTC	3240
CCCATCATCT ATACCCGCA TCTAACAAA ACGCAGGAA CAAAACTCT ACGACCTGG	3300
CACCTCGTA GCGAAGTCT CCGCTCCCT AAGCACAAA GCGCCACAC AACTCGCGA	3360
ATGACCATC GACCCCGAG AACTCTCTG GGGCATCTC ACAACCTAT CCGAATCCG	3420
CGGTCCCAA TCATACCTCT TCCAGGCT CGTGGAGCA AGTGGAGCA TCATCAGTTT	3480
CGACTGTTCG CTTTCATCA GTGACTTCT GCTTGTIT GGTTGGGCG CGCTATAT	3540
GTGGGGAGG GGTGAATCTG GGTITGATTT ATTTGGGATC GGGATGATT TGCAAGAGAG	3600
GGAGATGAG GSTGGGGAGG GGATGTGTT GCTGGGGAG GAGATTTOGT TTTGAGGGGG	3660
CTCTTTCTT TTTCTTTGT GGTGTGTGT GTTGGTGT TCTGGGGGG OGGGGGTGA	3720
TATACGCTTG ACGATGTCA TTGGGATTGG GGTCTACT GGTATATAAT ATGGATTGTT	3780
TTGTATATAG TCCGTCGGAG ACGGTGCAAT GATGTGGGA TCAATCACTT CTTAGACTC	3840
GGAGCACAGG GTGTGGTTC TGGGTTATT CTGAGTATGA GATTATATAG AATCAGTTAA	3900
TGATCAATTAT TGTACATACC TTAAGAAAG ATATGCTTGG CACCCGATA TGACATAGA	3960
AAACTGGTCT TCATCTAGA	3980

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 3980 Basenpaare
- (B) TYP : Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

- (A) ORGANISMUS: *Aspergillus oryzae*

- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: exon
 (B) LOCATION:1691..2676
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: intron
 (B) LOCATION:2677..2742
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: exon
 (B) LOCATION:2743..3193
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: intron
 (B) LOCATION:3194..3277
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: exon
 (B) LOCATION:3278..3653
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION:join(1691..2676, 2743..3193, 3278..3653)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: : SEQ ID NO: 2:

TCTAGACGG	CCAIGTGTG	GTCGCAAG	TIGATTCGG	ACCGTGTGT	AGTTGCTTCT	60
TTAAGAAC	GGCACCCCTC	TGCGTCTCC	GAACGGAAAT	TGIAGCTAGA	TGATATATGTC	120
TTGACGAACC	AGGTGTCCAC	GGGCAATCC	CTCACAATG	ATGGCCCGTC	CGTTCCCAT	180
CGATTTGTGC	TACCTGCGGT	GCAAGCCAAA	ACATCCCGGT	CAAAAGTCCG	AGGGGCATTG	240
CCTGCAATCT	CTGACCAATG	AGAGGGGAAG	CAAGTCAACC	TAGTTGCAAG	GGTATAGGTC	300
CTACCCAGCA	ATGAGGTGEC	TTCACCGTGA	CGGAGTGGGG	ACAGCATGAT	CAAGCCTTTT	360
GGAAAGTGA	CGAAGAGTGA	CCGGTTAAGC	CGAAGATGGG	AGATGAATCT	CTGCGGAGCA	420
AAGGACGAGA	CCGAAAAGA	GTGTGTGTAT	TCTTGGGAGC	AGTTACAGTA	CTCCGCTGTC	480
CCGAAATGG	AAAGTTCCT	GACCAATGCT	GGCGATCATC	TGATATCCCT	ACGCTGATTG	540
GTCCATCCCC	CGATAAATGC	CCGACACGAC	GCTTGAGGCC	TGAAAAGGTA	GTATTTCTCG	600
AGAGATCCAT	TCACAGAGT	CAATACTGGC	AAATACATCG	TTCGCCACT	CATATTCCAA	660
GGTCCCTAAA	CCCTCCCGGT	GTGCGGGTGA	GGGTTTCCCA	CGCCATCTCT	AGTGGTGGCA	720
TGACGGGAGC	ATCCGATGGC	TTCAGTAT	GGGTGGTTGG	GATGGACAAC	AAGCTCCAAA	780
TAAGGGGAAT	TTGCCTTTGG	TCCAGGAATG	AAGTCCCGGT	GGGACCCAGC	GGCTCAGGCC	840
AGGCTAAGAG	TGGAAATCG	TCATAGACT	TGGCTCATG	GGAGTTCCG	AGGTGTAAAG	900
ATCTCTTCA	ATGCATTCA	TCTCTGTTT	TGACCTGGC	TTCGGAGAG	TGGTCCCTCC	960
CTTACATCC	CACATGCTGG	ATGCAAGCCT	GTGGTACGCT	GTTCCTTCA	GAAGTAGCAG	1020
GCTAGGTCA	CGATGAGCTG	CCTTTCAAAC	CTGGAATAAC	CAITACGTGA	GACTGTCTCA	1080
CTTCTTGAAT	TGATCCCTGA	CTAGAGTCTG	CTCTAATATG	CTGTGTGGCA	CGGCGGTCC	1140
CCTCGGGTT	GCTAAGGCTG	ATTIATGCAC	TCCGTACAGT	ATAACCCAGG	GTGGCTATAG	1200

ATFOOCTGCA TCTTCCAGCG TCCCTCACAA OCTGATTOCA CCATTCTTAA GGGGCOGTTA	1260
GOCTOGATGG GGTATAATGG AGTTAACTAT AAACAAGACT CTACAAOGAA TOCOGATGTG	1320
AGTTTGGAAC GAGTGTGTAC OGATGGGTCC TOCCATTGTG TAGGAGTGAC GCTAGGGGAC	1380
CTTTAGGGCA CAGACTAAAC CAAGACAAAG ATGGAGTAGA CTCCAGGTAG ATTAATTOCA	1440
ATCTTCTTGC CAAAGTAAAG OGGGGTTTTT TGCAOCTGCA GOCTCTTTTT TTTCTTTTTT	1500
CTTTTTTTC TTTTTTIATT GTTCCCAGA TTTCTTTTCT TTTTCTTCAA TOCTGAGGT	1560
CTCAACGGTG ATGGOGACAC AGOCCGCTTC GCTATOCTC GCTTTTACGT CGGCCATTCT	1620
TCTAGTGTCT CTGGGGGAT GCCATGATTT CTAAGGCCT CACATGGGG AGATAGTATC	1680
CTATCCGAGC ATG TCT CAT TCT OCA ACC GAC ATT OCC TCA ACA TOC GAA	1729
Met Ser His Ser Pro Thr Asp Ile Pro Ser Thr Ser Glu	
1 5 10	
AAG GAA ATG GAG TCA ACC OCA GAA AAG CCG OCT AAA CAG GOC TGC GAC	1777
Lys Glu Met Glu Ser Thr Pro Glu Lys Pro Pro Lys Gln Ala Cys Asp	
15 20 25	
AAT TGC CGT OGA CCG AAA ATC AAG TGT TCT AGA GAG CTT OCA TGC GAC	1825
Asn Cys Arg Arg Arg Lys Ile Lys Cys Ser Arg Glu Leu Pro Cys Asp	
30 35 40 45	
AAG TGC CAG CGT CTT CTT CTC TOC TGT TOC TAC AGC GAC GTG CTC CGT	1873
Lys Cys Gln Arg Leu Leu Leu Ser Cys Ser Tyr Ser Asp Val Leu Arg	
50 55 60	
OGC AAG GGC OCC AAG TTC OGC ACG CTC TAC OCT CTC GCT OCC ATC CAT	1921
Arg Lys Gly Pro Lys Phe Arg Thr Leu Tyr Pro Leu Ala Pro Ile His	
65 70 75	
OCA CTC GOC TCA OGA OCA OGT OCT CTC ACC AAG GAA TGG CTG OCC OCA	1969
Pro Leu Ala Ser Arg Pro Arg Pro Leu Thr Lys Glu Trp Leu Pro Pro	
80 85 90	
AAC OCA GGG GCT TGC CAT TTG GCG TOC CCG ACG TCT CCG CCG TOC ACC	2017
Asn Pro Gly Ala Cys His Leu Ala Ser Pro Thr Ser Pro Pro Ser Thr	
95 100 105	
GTA GCG GAC GCC CAG TAT CTA CAT OCA GAC TTC TOG GAG TOG TTC ACT	2065
Val Ala Asp Ala Gln Tyr Leu His Pro Asp Phe Ser Glu Ser Phe Thr	
110 115 120 125	
OGA CTA OCA OCC OCA GAT CTC GTC TOC TCT OCC GAC TOG ACA AAC TOG	2113
Arg Leu Pro Pro Pro Asp Leu Val Ser Ser Pro Asp Ser Thr Asn Ser	
130 135 140	
CTA TTC GAC TOG TOC ACT ATC GGC GCA CTC OCC GCG OCA OGC OGT CTG	2161
Leu Phe Asp Ser Ser Thr Ile Gly Ala Leu Pro Ala Pro Arg Arg Leu	
145 150 155	
TOG ACG OCA AAC CTT CTA GOC CAT GTC AAT GTC TTC CTC AAG TAC CTG	2209
Ser Thr Pro Asn Leu Leu Ala His Val Asn Val Phe Leu Lys Tyr Leu	
160 165 170	
TTC CCG ATC ATG OCC GTC GTG AGA CAG GAC CAG CTG CAG CAG GAC TGC	2257
Phe Pro Ile Met Pro Val Val Arg Gln Asp Gln Leu Gln Gln Asp Cys	
175 180 185	

CAC CAG CCG GAG GGC TTG TCT CCC CAA GGC TAC GCT TTC ATT GGC GCT His Gln Pro Glu Arg Leu Ser Pro Gln Arg Tyr Ala Phe Ile Ala Ala 190 195 200 205	2305
CTA TGC GCG GCC ACG CAC ATC CAA CTG AAG CTG GAC GGT GCA GCA CCG Leu Cys Ala Ala Thr His Ile Gln Leu Lys Leu Asp Gly Ala Ala Pro 210 215 220	2353
GGT CCC GAG GCG GCT TCC GCG CGA GCC AGC CTC GAC GGA CAT OCT ATG Gly Pro Glu Ala Ala Ser Ala Arg Ala Ser Leu Asp Gly His Pro Met 225 230 235	2401
TTG TCG GGA GAA GAA CTC CTG GCT GAA GCC GTG CCG GCA AGA AAG GAA Leu Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ala Glu Ala Val Arg Ala Arg Lys Glu 240 245 250	2449
TAC AAC GTG GTC GAC GAA ATT AAC ATG GAA AAC CTC CTA ACC TCC TTC Tyr Asn Val Val Asp Glu Ile Asn Met Glu Asn Leu Leu Thr Ser Phe 255 260 265	2497
TTT CTC TTC GGC GCC TAC GGA AAC CTA GAC AGA CAG GAT CAG GCC TGG Phe Leu Phe Ala Ala Tyr Gly Asn Leu Asp Arg Gln Asp Gln Ala Trp 270 275 280 285	2545
TTC TAC CTA TGT CAG ACC ACG TCC ATG GTC TTC ACA CTA GGC CTA CAA Phe Tyr Leu Cys Gln Thr Thr Ser Met Val Phe Thr Leu Gly Leu Gln 290 295 300	2593
CCG GAA TCC ACA TAC TCG AAA CTA AGC GTC GAG GAA GCA GAA CAG AAA Arg Glu Ser Thr Tyr Ser Lys Leu Ser Val Glu Glu Ala Glu Glu Lys 305 310 315	2641
AGG AGA GTA TTC TGG CTC TTA TTC GTC ACA GAA AG GTAAGAAAAG Arg Arg Val Phe Trp Leu Leu Phe Val Thr Glu Arg 320 325	2686
AAAAAACTCT ACTTTCCCAA TCACCACCAC GTACCAAAAA TAACAAGAAA AACCCAG A	2743
GGC TAC GCA TTA CAA CAA GCA AAA CCA GTC ATG CTC CCG AAC TCC ATC Gly Tyr Ala Leu Gln Gln Ala Lys Pro Val Met Leu Arg Asn Ser Ile 330 335 340 345	2791
CAC AAA CCA CAG GTC CTG TGC TCA GAC GAC CCA ATC CTA GCC TAC GGG His Lys Pro Gln Val Leu Cys Ser Asp Asp Pro Ile Leu Ala Tyr Gly 350 355 360	2839
TTC ATC AAC CTC ATC AAC GTC TTC GAA AAG CTC AGC CCA AAT CTC TAC Phe Ile Asn Leu Ile Asn Val Phe Glu Lys Leu Ser Pro Asn Leu Tyr 365 370 375	2887
GAC TGG GTC TCC GCC GGC GGC AGC AGC GCA GAC GGC GAC CCC CCG CCT Asp Trp Val Ser Ala Gly Gly Ser Ser Ala Asp Gly Asp Pro Pro Pro 380 385 390	2935
ACT TCT TCT ATC CAA TCC AGT CTC GCC AAG CAA ATC TCC CTC GAG GGC Thr Ser Ser Ile Gln Ser Ser Leu Ala Lys Gln Ile Ser Leu Glu Gly 395 400 405	2983
GTC TCC GAG ATC CAG AAA GTA GAC ATC CTC ATC ACT CAG CAA TGG CTA Val Ser Glu Ile Gln Lys Val Asp Ile Leu Ile Thr Gln Gln Trp Leu 410 415 420 425	3031
CAA ACC ATG ATG TGG AAA CTC TCC ATG ACC CAC GTC ACA CAG CCC GGC	3079

Gln Thr Met Met Trp Lys Leu Ser Met Thr His Val Thr Gln Pro Gly	
430	435
440	
TCT CGC GAT GAC GGC GTT CTC OOC TTC CAC CTG OOC GTG CTA GTC GGC	3127
Ser Arg Asp Asp Ala Val Leu Pro Phe His Leu Pro Val Leu Val Gly	
445	450
455	
AAG GGC GTC ATG GGC GTC ATC GGC GCG GCA TOC CAA GGT GCT GTT GAC	3175
Lys Ala Val Met Gly Val Ile Ala Ala Ala Ser Gln Gly Ala Val Asp	
460	465
470	
GCT CAT GGT ATC GGA ATG GTAAGAAAGC GAOCTTAOCT CATCACAOOC	3223
Ala His Gly Ile Gly Met	
475	
TOOCTCATCA GTCACCTOOC ATCATCTATA OCOGCAATCT AACAAAAAOC GCAG GAA	3280
	Glu
	480
CAA AAA CTC TAC GAC CTC GGC ACC TOC GTA GOC GAC GTC TOC OGC TOC	3328
Gln Lys Leu Tyr Asp Leu Gly Thr Ser Val Ala Asp Val Ser Arg Ser	
485	490
495	
CTA AGC ACA AAA GOC GOC CAC CAC CTC GGC GAA TOG ACC ATC GAC CCC	3376
Leu Ser Thr Lys Ala Ala His His Leu Ala Glu Ser Thr Ile Asp Pro	
500	505
510	
CGA GAA CTC CTC TGG GGC ATT CTC ACA ACC CTA TOC OGA ATC OGC GGT	3424
Arg Glu Leu Leu Trp Gly Ile Leu Thr Thr Leu Ser Arg Ile Arg Gly	
515	520
525	
TOC CAA TCA TAC CTC TTC CCA GCG CTC GTC GAG CAA AGT OGA GGC ATC	3472
Ser Gln Ser Tyr Leu Phe Pro Ala Leu Val Glu Gln Ser Arg Gly Ile	
530	535
540	
ATC AGT TTC GAC TGT TOG CTT TOC AIC AGT GAC TTT CTG OCT TOG TTT	3520
Ile Ser Phe Asp Cys Ser Leu Ser Ile Ser Asp Phe Leu Pro Ser Phe	
545	550
555	560
GGT GGG CCG CCG GCT ATT ATG TGG CCG ACG GGT GAA TCT GGG TTT GAT	3568
Gly Gly Pro Pro Ala Ile Met Trp Arg Thr Gly Glu Ser Gly Phe Asp	
565	570
575	
TTA TTG GGG ATC GCG GAT GAT TTG CAA GAG AGG GAG AAT GAG GGT GGG	3616
Leu Leu Gly Ile Ala Asp Asp Leu Gln Glu Arg Glu Asn Glu Gly Gly	
580	585
590	
GAG GGG ATT GTG GTG GCT GGG GAG GAG ATT TOG TTT TGAGGGGGCT	3662
Glu Gly Ile Val Val Ala Gly Glu Glu Ile Ser Phe	
595	600
CTTTCTTTT TOCTTTGTTG TGTTGTTGTT TGGGTGGTTC TGGGGGGGCG GGGGTGTATA	3722
TAOGCTTGAC GAJGTGCAIT GGGAITGGGG TTCTACTGG TATATAATAT GGATTGTTTT	3782
GIATATAGTC CGCTGGAGAC GGTGCAATGA TGTTGGGATC AATCACTTCT TAGGACTGG	3842
AGCACAGGGT GTGGTTCTC GGGTTATTCT GAGTATGAGA TTATATAGAA TCAGTTAATG	3902
ATCATATATG TACATACCTT AAAGAAAGAT ATGCTTGGCA CCOGATATG ACAATAGAAA	3962
ACTGGICTTC ATTCTAGA	3980

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 604 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE : linear

(ii) MOLEKÜLTYP : Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQ ID NO: 3:

```

Met Ser His Ser Pro Thr Asp Ile Pro Ser Thr Ser Glu Lys Glu Met
 1                               5                               10                               15
Glu Ser Thr Pro Glu Lys Pro Pro Lys Gln Ala Cys Asp Asn Cys Arg
                20                25                30
Arg Arg Lys Ile Lys Cys Ser Arg Glu Leu Pro Cys Asp Lys Cys Gln
          35                      40                      45
Arg Leu Leu Leu Ser Cys Ser Tyr Ser Asp Val Leu Arg Arg Lys Gly
 50                      55                      60
Pro Lys Phe Arg Thr Leu Tyr Pro Leu Ala Pro Ile His Pro Leu Ala
 65                      70                      75                      80
Ser Arg Pro Arg Pro Leu Thr Lys Glu Trp Leu Pro Pro Asn Pro Gly
          85                      90                      95
Ala Cys His Leu Ala Ser Pro Thr Ser Pro Pro Ser Thr Val Ala Asp
                100                105                110
Ala Gln Tyr Leu His Pro Asp Phe Ser Glu Ser Phe Thr Arg Leu Pro
                115                120                125
Pro Pro Asp Leu Val Ser Ser Pro Asp Ser Thr Asn Ser Leu Phe Asp
 130                135                140
Ser Ser Thr Ile Gly Ala Leu Pro Ala Pro Arg Arg Leu Ser Thr Pro
 145                150                155
Asn Leu Leu Ala His Val Asn Val Phe Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Ile
                165                170                175
Met Pro Val Val Arg Gln Asp Gln Leu Gln Gln Asp Cys His Gln Pro
                180                185                190
Glu Arg Leu Ser Pro Gln Arg Tyr Ala Phe Ile Ala Ala Leu Cys Ala
 195                200                205
Ala Thr His Ile Gln Leu Lys Leu Asp Gly Ala Ala Pro Gly Pro Glu
 210                215                220
Ala Ala Ser Ala Arg Ala Ser Leu Asp Gly His Pro Met Leu Ser Gly
 225                230                235                240
Glu Glu Leu Leu Ala Glu Ala Val Arg Ala Arg Lys Glu Tyr Asn Val
                245                250                255
Val Asp Glu Ile Asn Met Glu Asn Leu Leu Thr Ser Phe Phe Leu Phe
 260                265                270
Ala Ala Tyr Gly Asn Leu Asp Arg Gln Asp Gln Ala Trp Phe Tyr Leu
 275                280                285
Cys Gln Thr Thr Ser Met Val Phe Thr Leu Gly Leu Gln Arg Glu Ser
 290                295                300

```


Thr Tyr Ser Lys Leu Ser Val Glu Glu Ala Glu Glu Lys Arg Arg Val
 305 310 315 320
 Phe Trp Leu Leu Phe Val Thr Glu Arg Gly Tyr Ala Leu Gln Gln Ala
 325 330 335
 Lys Pro Val Met Leu Arg Asn Ser Ile His Lys Pro Gln Val Leu Cys
 340 345 350
 Ser Asp Asp Pro Ile Leu Ala Tyr Gly Phe Ile Asn Leu Ile Asn Val
 355 360 365
 Phe Glu Lys Leu Ser Pro Asn Leu Tyr Asp Trp Val Ser Ala Gly Gly
 370 375 380
 Ser Ser Ala Asp Gly Asp Pro Pro Pro Thr Ser Ser Ile Gln Ser Ser
 385 390 395 400
 Leu Ala Lys Gln Ile Ser Leu Glu Gly Val Ser Glu Ile Gln Lys Val
 405 410 415
 Asp Ile Leu Ile Thr Gln Gln Trp Leu Gln Thr Met Met Trp Lys Leu
 420 425 430
 Ser Met Thr His Val Thr Gln Pro Gly Ser Arg Asp Asp Ala Val Leu
 435 440 445
 Pro Phe His Leu Pro Val Leu Val Gly Lys Ala Val Met Gly Val Ile
 450 455 460
 Ala Ala Ala Ser Gln Gly Ala Val Asp Ala His Gly Ile Gly Met Glu
 465 470 475 480
 Gln Lys Leu Tyr Asp Leu Gly Thr Ser Val Ala Asp Val Ser Arg Ser
 485 490 495
 Leu Ser Thr Lys Ala Ala His His Leu Ala Glu Ser Thr Ile Asp Pro
 500 505 510
 Arg Glu Leu Leu Trp Gly Ile Leu Thr Thr Leu Ser Arg Ile Arg Gly
 515 520 525
 Ser Gln Ser Tyr Leu Phe Pro Ala Leu Val Glu Gln Ser Arg Gly Ile
 530 535 540
 Ile Ser Phe Asp Cys Ser Leu Ser Ile Ser Asp Phe Leu Pro Ser Phe
 545 550 555 560
 Gly Gly Pro Pro Ala Ile Met Trp Arg Thr Gly Glu Ser Gly Phe Asp
 565 570 575
 Leu Leu Gly Ile Ala Asp Asp Leu Gln Glu Arg Glu Asn Glu Gly Gly
 580 585 590
 Glu Gly Ile Val Val Ala Gly Glu Glu Ile Ser Phe
 595 600

(2) INFORMATION ZU ID NO: 4:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE : linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Primer 4650

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQ ID NO: 4:

CTTGCATGCC GCCAGGACCG AGCAAG 26

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(ii) MOLEKÜLTYP: Primer 4651

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CTTGGATCCT CTGTGTTAGC TTATAG 26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Primer

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBECHREIBUNG : SEQ ID NO: 6:

CCCCAAGCTT CGCCGTCTGC GCTGCTGCCG 30

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 29x Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Primer

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CGGAATTCAT CAACCTCATC AACGTCTTC 29

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Primer

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

CGGAATTCAT CGGCGAGATA GTATCCTAT 29

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 41 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Primer

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TTTIGTAAGC TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT T 41

Patentansprüche

1. Transkriptionsfaktor, der zur Regulierung der Transkription in der Lage ist, die von einem filamentösen Pilz-alpha-Amylase-Promotor sequenzspezifisch gesteuert wird, welcher eine Aminosäuresequenz umfasst, die mindestens zu 90 % mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3 identisch ist.

2. Transkriptionsfaktor nach Anspruch 1, der die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3 umfasst.

3. Isolierter Transkriptionsfaktor, der Aktivität bei der Regulierung der Expression eines alpha-Amylase-Promotors in einem filamentösen Pilz aufweist, der codiert wird durch:

(a) den Transkriptionsfaktor-codierenden Teil der DNA-Sequenz, die in das Plasmid pToC320 kloniert ist, welches in E. coli, DSM 10666, vorhanden ist, oder

(b) eine DNA-Sequenz, die mindestens zu 70 % mit der in (a) definierten DNA-Sequenz identisch ist.

4. Transkriptionsfaktor nach Anspruch 3, wobei die DNA-Sequenz aus einem filamentösen Pilz erhalten wird.

5. Transkriptionsfaktor nach Anspruch 4, wobei der filamentöse Pilz aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Ascomyceten, Basidiomyceten, Phycomyceten, Zygomyceten und Fungi imperfecti besteht.

6. Transkriptionsfaktor nach Anspruch 4, wobei der filamentöse Pilz aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Aspergillus, Fusarium, Humicola, Penicillium und Trichoderma besteht.

7. Transkriptionsfaktor nach Anspruch 6, wobei der filamentöse Pilz A. awamori, A. niger oder A. oryzae ist.

8. Transkriptionsfaktor nach Anspruch 7, wobei der filamentöse Pilz Aspergillus oryzae ist.

9. Transkriptionsfaktor nach Anspruch 8, wobei der filamentöse Pilz *A. oryzae*, IFO 4177, ist.
10. Transkriptionsfaktor nach Anspruch 3, wobei die DNA-Sequenz aus einem Hefestamm erhalten wird.
11. Transkriptionsfaktor nach Anspruch 3, wobei die DNA-Sequenz aus *Escherichia coli*, DSM 10666, erhalten wird.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

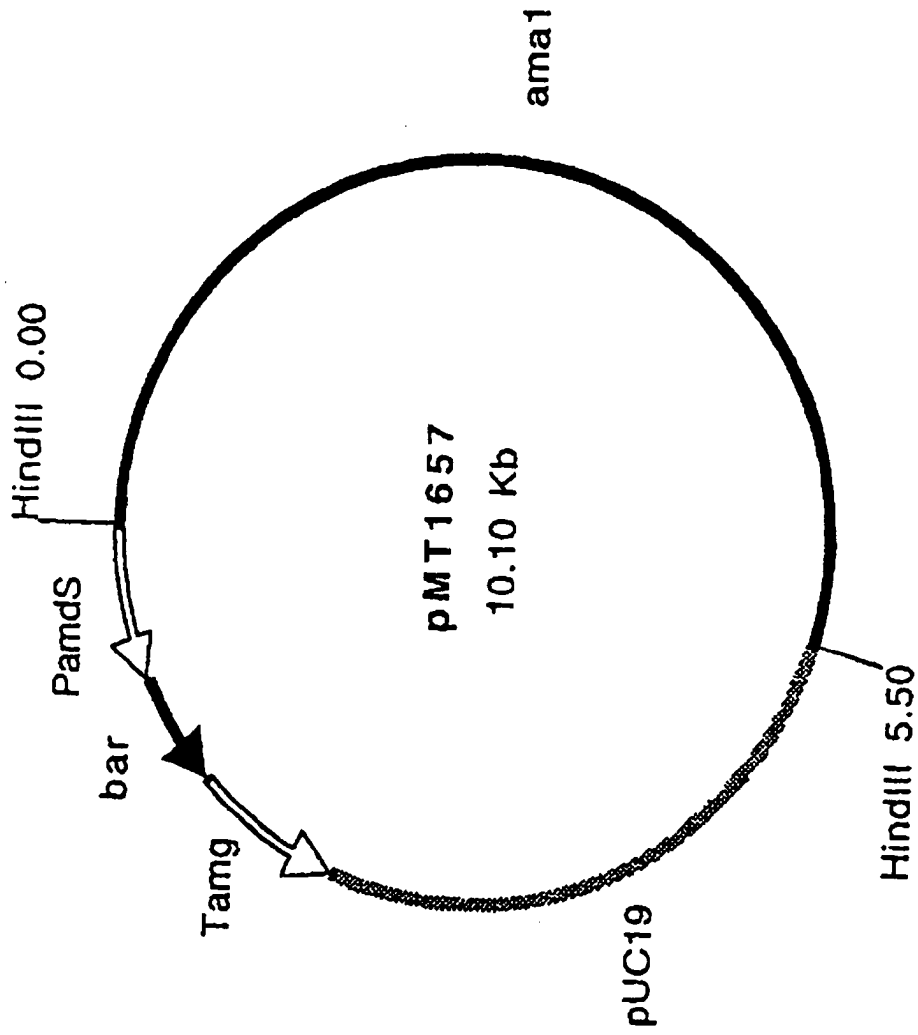


Fig. 1

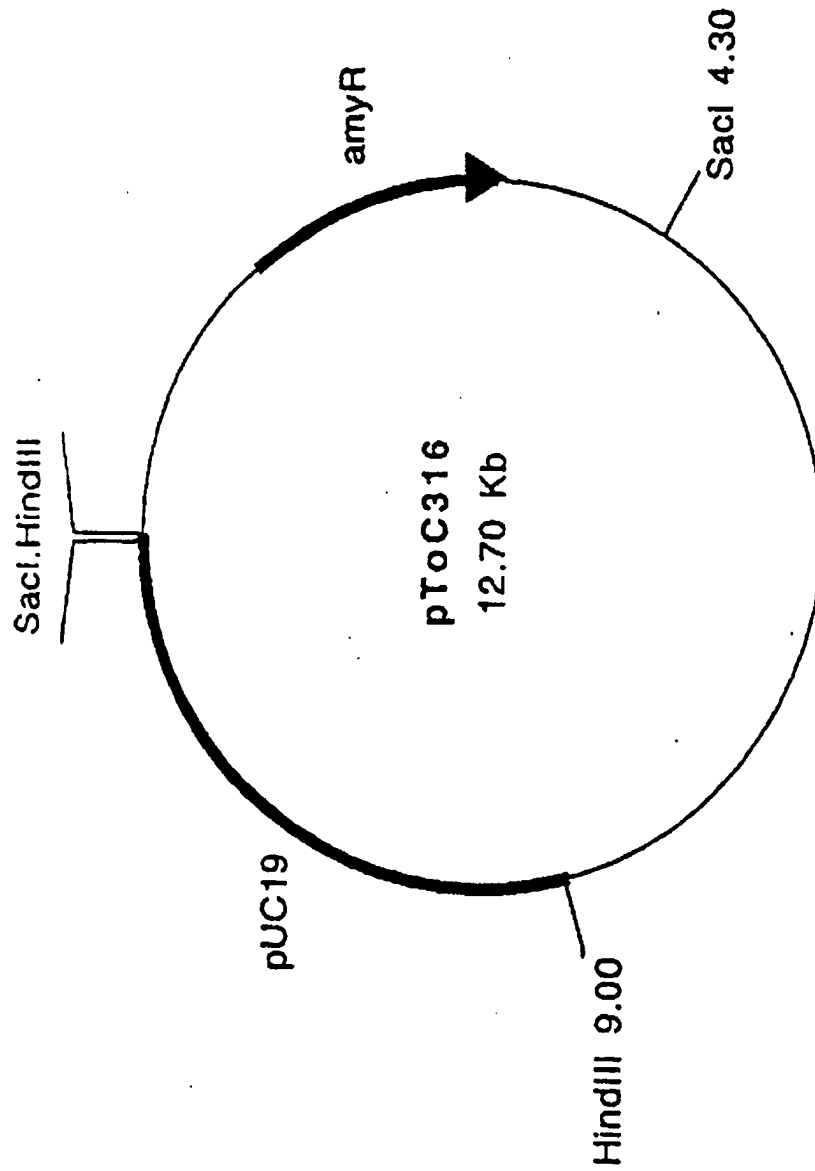


Fig. 2

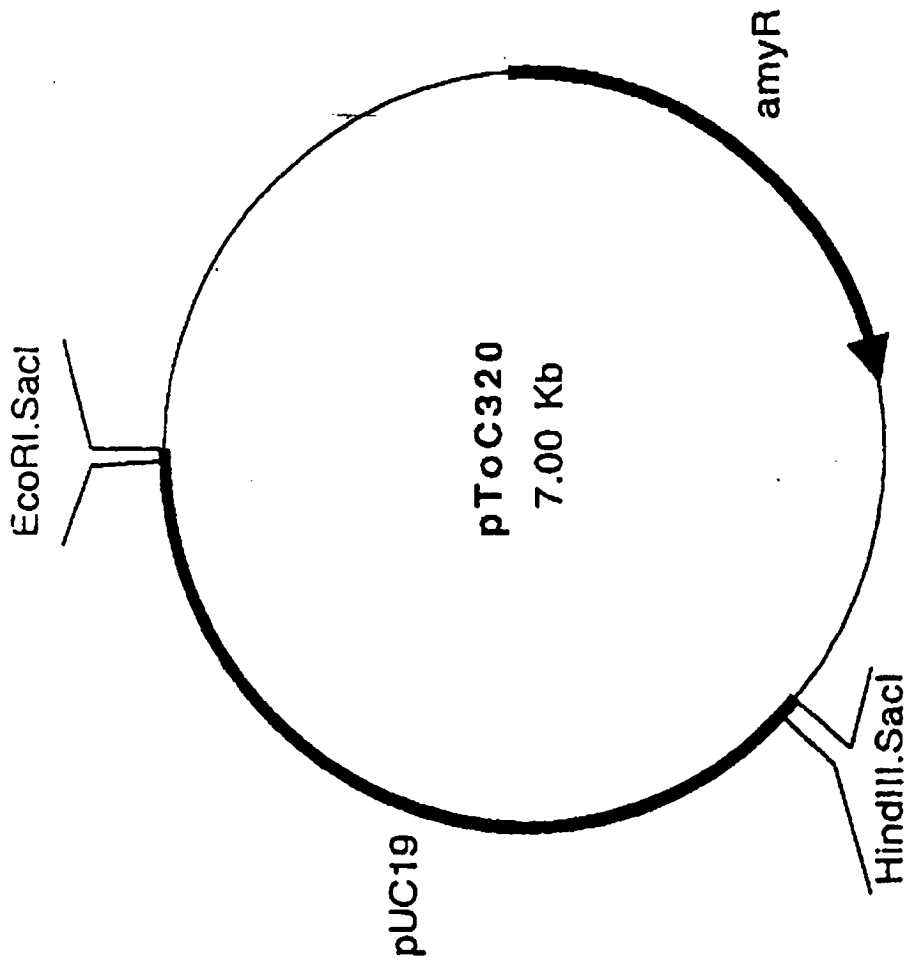


Fig. 3

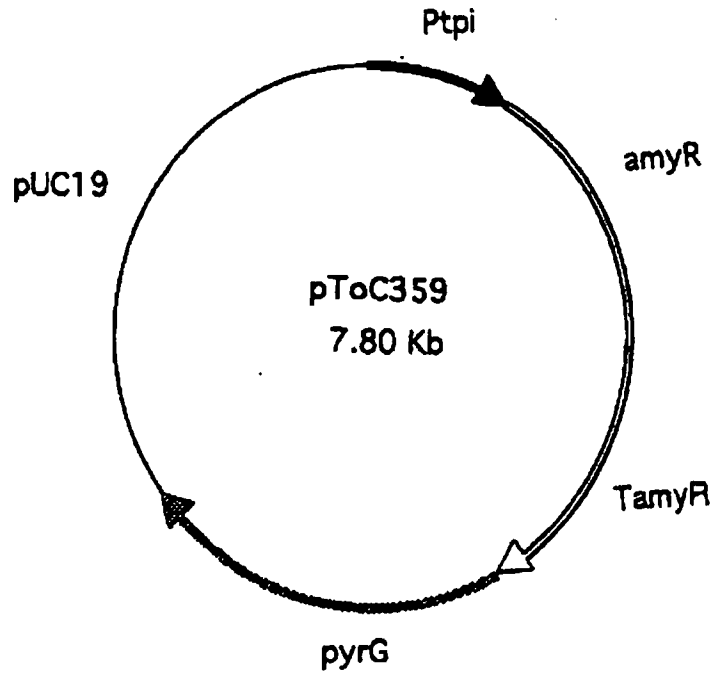
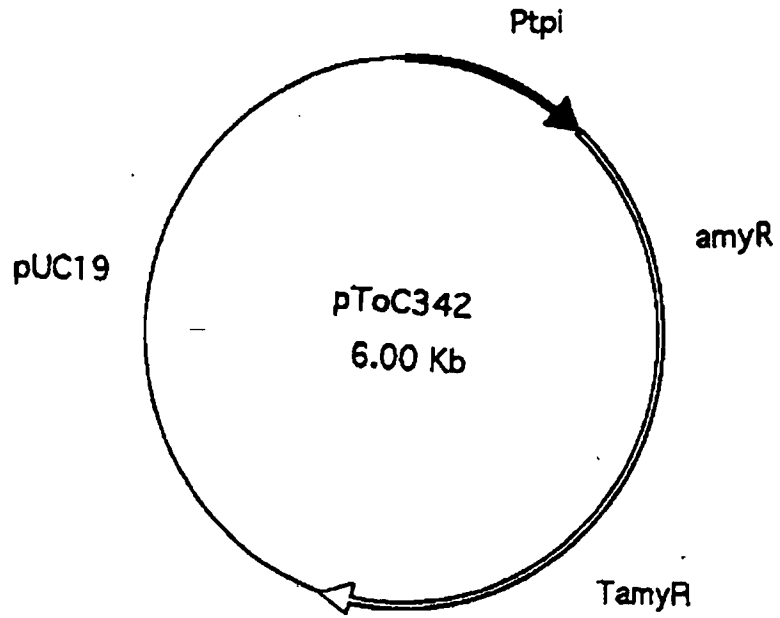


Fig. 4

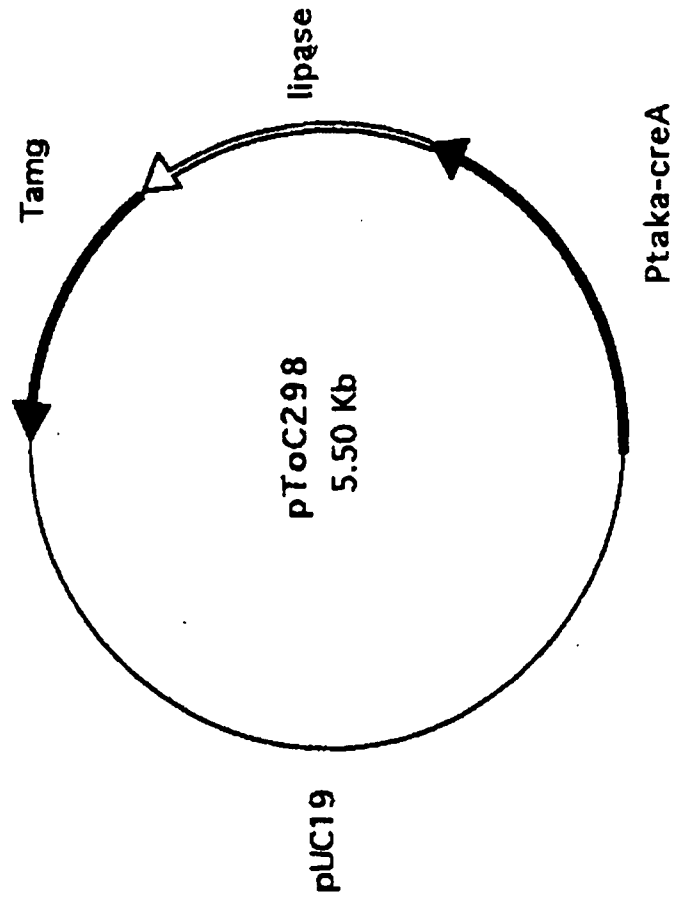


Fig. 5

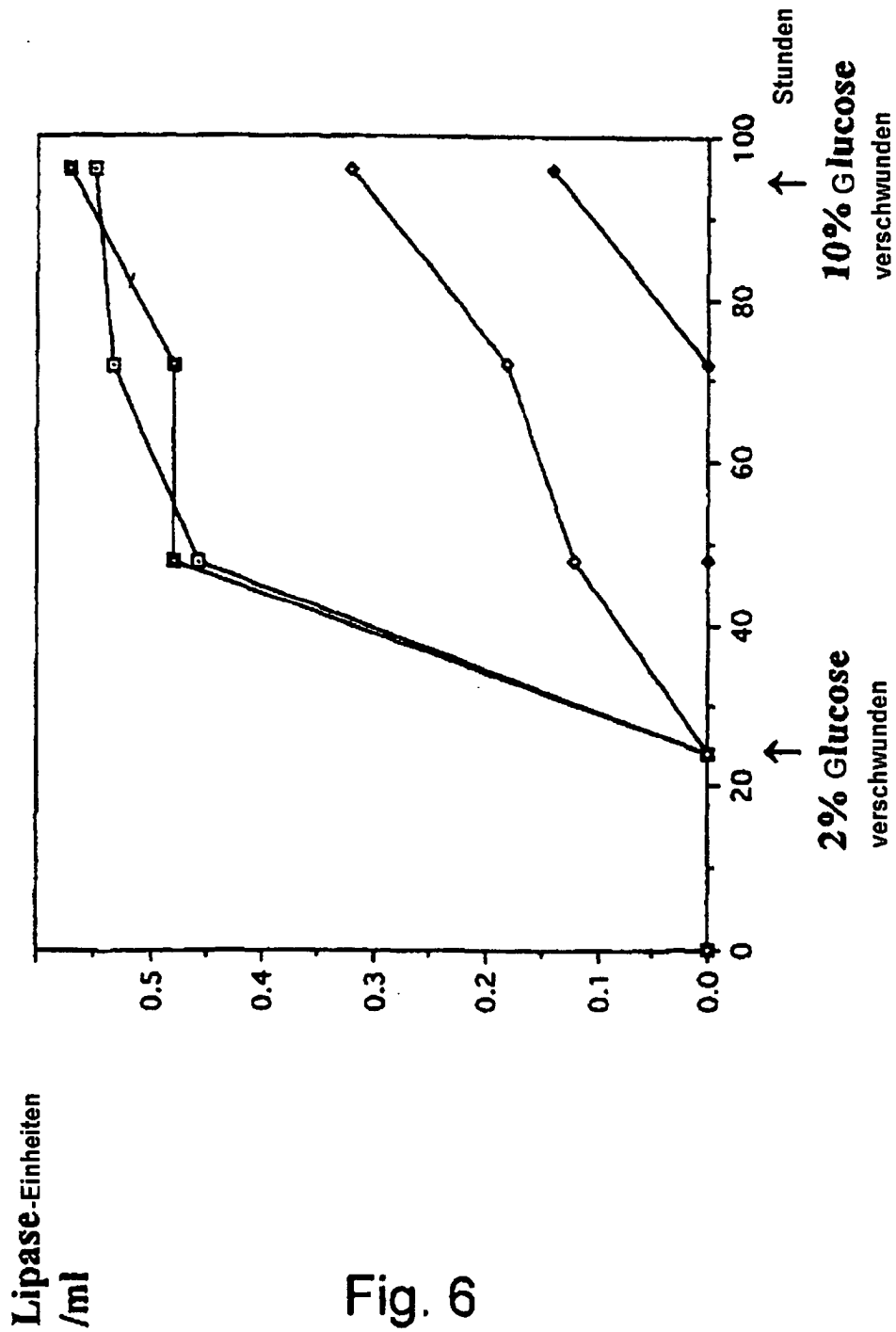


Fig. 6

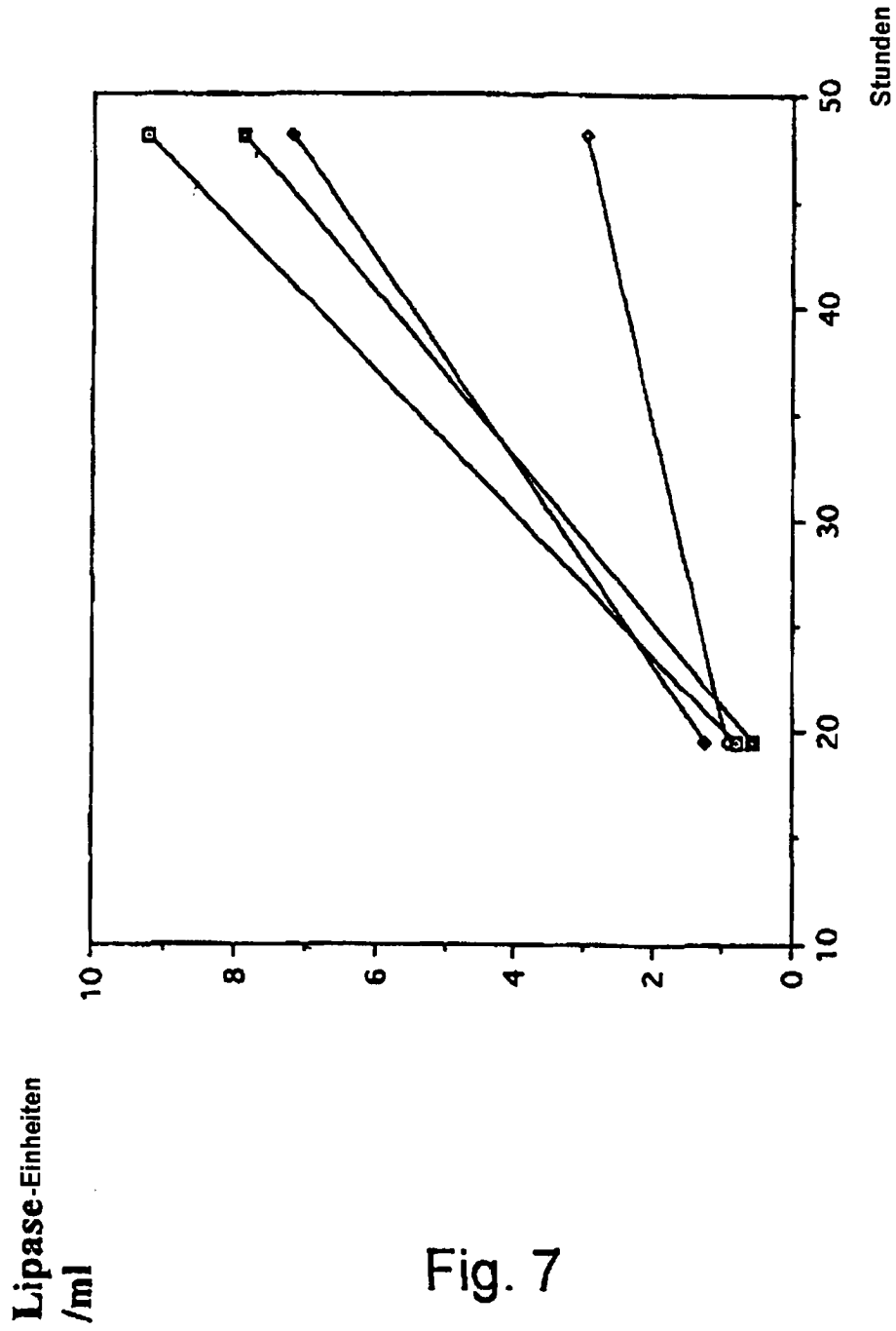


Fig. 7

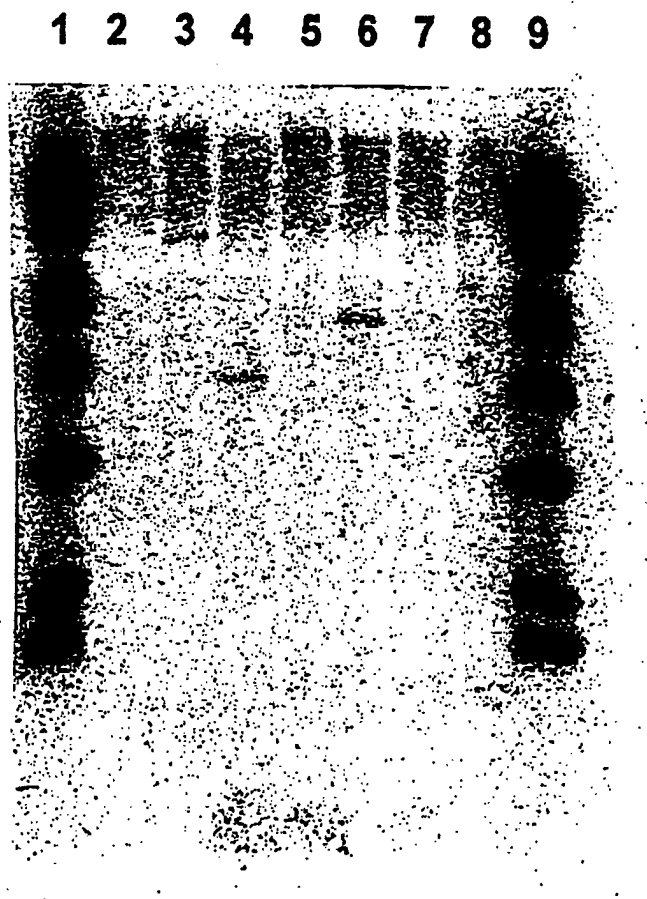


Fig. 8