



Vorteile von einzelligen Grünalgen (*Chlamydomonas reinhardtii*) als Expressionssystem

1. Ähnliche Glykosylierungsmuster im Vergleich zu Säugerzellen

Bakterien sind nicht zu posttranslationalen Modifikationen von exprimierten Proteinen wie z.B. Glykosylierung befähigt, die aber oftmals nötig für die Funktionalität von Proteinen sind. Grünalgen dagegen zeigen sowohl N- als auch O-Glykosylierung bei exportierten Proteinen. Ein lange bekanntes Beispiel ist das Sexualpheromon von *Volvox carteri* (Balshusemann D, Jaenicke L. 1990, Eur J Biochem. 192(1):231-7.). Genauere Analytik von extrazellulären Glycoproteinen wird derzeit von S. Waffenschmidt durchgeführt. Wir planen in Kooperation mit Frau Waffenschmidt die exakte Glucanstruktur eines sezernierten Modellproteins mit einer einzigen definierten N-Glykosylierungsstelle zu untersuchen. Im Vergleich zu höheren Pflanzen (am Beispiel therapeutischer Antikörper, Bakker et al., 2001, PNAS 98, 2899-2904) liegen Unterschiede vor, die aber möglicherweise sogar von Vorteil sind. Insbesondere wurde keine 1-3 verknüpfte Fucose am ersten N-glycosidisch gebundenen N-Acetyl-Glucosamin des N-Glucans gefunden. Diese für Säuger untypische Verknüpfung könnte aber ein (nicht einfach durch Gene-knockout zu beseitigendes) Problem bei Glycoproteinen aus höheren Pflanzen darstellen. Kontrollantikörper aus einer Hybridoma-Linie zeigten eine 1-6 verknüpfte Fucose an entsprechender Position. Das Anfügen von zusätzlichen Kohlenhydratresten kann man im Gegensatz dazu aber durch das Einbringen geeigneter Transferasen aus Säugern erreichen (ebenfalls Bakker et al., 2001). Die Qualität der in Algen exprimierten Proteine ist der Qualität von in höheren Pflanzen exprimierten Proteinen vergleichbar. Für die meisten Antikörper die in höheren Pflanzen exprimiert wurden, wurde grundsätzlich Funktionalität nachgewiesen (z.B. Bakker et al., 2001; Ko et al., 2003, PNAS 8013-8018 etc.).

2. Biologische Sicherheit, Pyrogene

Bei Produkten, die in Bakterien oder tierischen Zellkulturen hergestellt wurden, kann die Kontamination mit Pathogenen oder Endotoxinen oftmals nicht ausgeschlossen werden, bzw. nur mühsam beseitigt werden. So können z.B. grundsätzlich Hybridoma Linien endogene Retroviren enthalten. Dagegen sind Grünalgen, soweit bisher bekannt, frei von Human-pathogenen. Lediglich für Cyanobakterien (oftmals fälschlicherweise als „BlauAlgen“ bezeichnet) sind toxische Substanzen und das als effizientes Pyrogen charakterisierte microcystin bekannt. Für Grünalgen (z.B. *Haematococcus pluvialis*, *Chlamydomonas reinhardtii*) wurden dagegen bisher keine effizienten Pyrogene beschrieben, allerdings wurden auch keine expliziten Tests, wie z.B. LAL oder rabbit pyrogen tests durchgeführt. Lediglich Toxizitätstests für die orale Toxizität bei Ratten wurden durchgeführt (Istituto di Recherche Biomediche “Antoine Marxer” RBM S.p.A. via Ribes, i, 10010- COLLERETTO GIACOSA (Torino), Italy,

1996). Es ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine Beeinträchtigung der Tiere bei der maximal applizierbaren Dosis (6g/kg/day).

3. Algen sind experimentell gut zugänglich

Mikroalgen können als heterologe Expressionssysteme herangezogen werden, da mittlerweile große Erfahrungen sowohl in klassischer als auch molekularer Genetik für ausgewählte Modellorganismen bestehen. Mehrere selektierbare Markergene (sowohl über Resistenzen, als auch durch Komplementation auxotropher Mutationen), die (RNAi)-Antisense-Technik für Algen und Vektoren zur Expression synthetischer Transgene in Algen wurden an der Universität Regensburg entwickelt. Darüber hinaus wurde das komplette Genom der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* sequenziert. Individuelle EST-Klone und genomische BAC-Bibliotheken, Microarrays und ausgearbeitete Proteomics-Methoden stehen zur Verfügung.

4. Einfache und billige Kultivierung

Algenkulturen sind geeignet für einfache und billige Kulturmethode unter photoautotrophen Bedingungen. Die Kulturmedien für Algen beinhalten lediglich Wasser und Mineralsalze. Zur Erhöhung der Zelldichte und für beschleunigtes Wachstum kann die Zucht aber auch unter photomixotrophen oder heterotrophen Bedingungen erfolgen.

5. Sekretion der Produkte ins Medium möglich

Der Einsatz von Algenstämmen mit Zellwand-Defekten ermöglicht die Sekretion der exprimierten Produkte in das umgebende Medium (eigene unveröffentlichte Experimente, sowie analog für sehr große Proteine in *Volvox* (allerdings nicht frei löslich, da keine entsprechende Mutante): Ender et al. 2002, *Plant Cell*, 1147-60. Damit wird die Abtrennung der Produkte vom produzierenden Organismus und die weitere Aufreinigung dieser Produkte (aus Medium = einem Niedrigsalz-Ausgangspuffer) stark vereinfacht.

6. Vorteile im Vergleich zu Pflanzen

Ein weiterer Vorteil ist die Kultivierbarkeit von Algen in geschlossenen Systemen, z.B. Fermentern, Aquarien oder Kunststoffschläuchen. Auf diese Weise wird die problematische Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen, z.B. Freilandanbau von Pflanzen mit der Auskreuzungsproblematik, verhindert. Zudem verhindert die Nutzung von Algenstämmen mit Defekten in der Zellwand oder im Stoffwechsel die Verbreitung von Laborstämmen in der Umwelt (eigene nicht veröffentlichte Experimente – Überlebensraten in verschiedenen Teichwasserproben,

Nachweisbarkeit von Reporterproteinen und Genen (PCR)). Die Kultivierung von Algen in Bioreaktoren ermöglicht darüber hinaus eine effiziente Prozesskontrolle, die vollständige Produktisolierung unter sterilen Bedingungen, und die effektive Anpassung des Prozesses an GMP-Richtlinien.

Wolfenbüttel, 03.11.2004
ASA Spezialenzyme GmbH

Dr. A. Cordes
Geschäftsführer

ASA Spezialenzyme GmbH Amtsgericht Braunschweig HRB 6252 Geschäftsführer: Dr. Arno Cordes

Bankverbindung: VB Vechede eG BLZ 250 693 70 Kto. 2409746200
 NORD / LB BLZ 250 500 00 Kto. 2938009