

Heterologe Expression von Enzymen aus Basidiomyceten

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Master of Science Kateryna Zelena

geboren am 22. Juni 1972 in Odessa

Hannover 2009

Referent: Prof. Dr. Dr. R. G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. H. Zorn

Tag der Promotion: 08.06.2009

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holger Zorn und Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger für die Möglichkeit zur Promotion, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die stete hilfsbereite Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Herrn Prof. Dr. R.G. Berger danke ich desweiteren für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie für die hilfsbereite Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis im Institut.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Manfred Nimtz (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) für die Sequenzierung von Peptiden mittels ESI-MS/MS.

Dem BMBF Cluster Biokatalyse2021 (FKZ0315172B) danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

Nadine Eisele danke ich für die Mitwirkung an dieser Arbeit im Rahmen ihres Praktikums.

Bei meinem lieben Ehemann Vyacheslav Pushkarenko bedanke ich mich vom ganzen Herzen für seine stete liebevolle Unterstützung während meiner Diplom- und Promotionsarbeit. Ganz besonderer Dank gilt ihm jedoch für seine humorvolle Lebenseinstellung, die mir vieles erleichtert hat.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich ständig motiviert und ermuntert hat.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Untersuchungen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, 12.03.2009

Kateryna Zelena

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2005 bis Februar 2009 am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Günter Berger angefertigt.

Das Forschungsprojekt wurde vom BMBF Cluster Biokatalyse2021 (FKZ0315172B) gefördert. Teile der Arbeit wurden in international anerkannten Zeitschriften veröffentlicht, sowie in einem Vortrag und in Form von Postern präsentiert.

Veröffentlichungen

Zelena, K., Krügener, S., Lunkenbein, S., Zorn, H., Berger, R.G. (2009) Functional expression of the lipase gene Lip2 of *Pleurotus sapidus* in *Escherichia coli*. Biotechnol. Lett. 31, 395-401.

Zelena, K., Zorn, H., Nimtz, M., Berger, R.G. (2009) Heterologous expression of the *msp2* gene from *Marasmius scorodoni*. Arch. Microbiol. 191, 397-402.

Krügener, S., **Zelena, K.**, Zorn, H., Nimtz, M., Berger, R.G. (2009) Heterologous expression of an extra-cellular lipase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 57, 16-21.

Scheibner, M., Hülsdau, B., **Zelena, K.**, Nimtz, M., de Boer, L., Berger, R.G., Zorn, H. (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodoni* degrade β -carotene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 1241-1250.

Krings, U., **Zelena, K.**, Wu, S., Berger, R.G. (2006) Thin Layer High Vacuum Distillation to Isolate Flavour Compounds of Cocoa Powder. Eur. Food Res. Technol. 223, 675-681.

Präsentationen

Zelena, K., Hardebusch, B., Hülsdau, B., Berger, R.G., Zorn, H. (2009) Generation of Norisoprenoid Flavours from Carotenoids by Fungal Peroxidases. Proc.12th Weurman Flavour Symposium, Eds. Imre Blank, Matthias Wüst, Chahan Yeretian. In press.

Zelena, K., Zorn, H., Berger, R.G. (2008) Heterologous expression of the MsP2 gene from *Marasmius scorodonius*. Fourth International Congress on Biocatalysis. Book of abstracts, 122.

Krügenger, S., **Zelena, K.**, Zorn, H., Nimtz, M., Berger, R.G. (2008) Functional heterologous expression of a basidiomycetous extracellular carboxylesterase. Fourth International Congress on Biocatalysis. Book of abstracts, 120.

Krügenger, S, **Zelena, K.**, Zorn, H, Nimtz, M., Berger, R.G. (2008) Xanthophyllester Hydrolyse durch eine heterolog exprimierte Carboxylesterase aus *Pleurotus sapidus*. Lebensmittelchemie 62, 149.

Zelena, K., Scheibner, M., Hülsdau, B., Nimtz, M., Berger, R.G., Zorn, H. (2006) Neuartige Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius*. Lebensmittelchemie 61, 136.

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonsäure)
Ad	auffüllen auf
bp	Basenpaaren
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Glutathion _{ox}	Glutathion oxidiert
kDa	kilo Dalton
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
mU	Milliunit
MWCO	„molecular weight cut off“ (Größenausschluss)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Species
U	Unit
V	Volumen

Aminosäuren und Basen werden nach dem internationalen Einbuchstabencode abgekürzt.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Basidiomyceten als potentielle Enzymquelle	1
1.2 Mikrobielle Peroxidasen (EC 1.11.1.-).....	2
1.3 Mikrobielle Lipasen (EC 3.1.1.-).....	6
1.4 Heterologe Expression	9
1.4.1 <i>Escherichia coli</i> als Expressionswirt.....	10
1.4.2 Expressionssysteme mit Hefen als Wirtsorganismen.....	14
1.4.3 Weitere Expressionssysteme	22
1.5 Zielsetzung.....	28
2 Functional expression of the lipase gene Lip2 of <i>Pleurotus</i> <i>sapidus</i> in <i>Escherichia coli</i> (Zelena, K., Krügener, S., Lunkenbein, S., Zorn, H., Berger, R.G. Biotechnol. Lett. 2009, 31, 395-401)	29
2.1 Abstract.....	29
3 Heterologous expression of the <i>msp2</i> gene from <i>Marasmius</i> <i>scorodonius</i> (Zelena, K., Zorn, H., Nimtz, M., Berger, R.G. Arch. Microbiol. 2009, 191, 397-402)	30
3.1 Abstract.....	30
4 Zusammenfassung	31
5 Summary	33
6 Literaturverzeichnis	34
7 Lebenslauf	51

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Basidiomyceten als potentielle Enzymquelle

Die Untersuchung und Anwendung von Naturstoffen ist einer der am schnellsten wachsenden interdisziplinären Bereiche der modernen Lebenswissenschaften. Dank der technischen Entwicklungen und Identifizierungstechniken sind heutzutage zahlreiche Naturstoffe bekannt, die aus unterschiedlichen Quellen isoliert wurden. Mikroorganismen, die breite Möglichkeiten für die Entdeckung von neuen Strukturen und biologischen Aktivitäten eröffnen, stehen im Mittelpunkt der Forschung. Unter den Mikroorganismen sind Basidiomyceten (Ständerpilze) für ihre hohe Produktionsleistung und eine erstaunliche Diversität an biologisch aktiven, zum Teil auf anderen Wegen schwer zugänglichen Metaboliten bekannt. Das umfangreiche Spektrum von bioaktiven Substanzen schließt sowohl antimikrobielle als auch antifungale, antivirale und cytotoxische Aktivitäten ein. Die Enzymausstattung ist so reichhaltig, dass selbst vermeintlich pflanzentypische Stoffe wie Wachstumsregulatoren und Aromastoffe von Basidiomyceten produziert werden (Feofilova *et al.* 1998, Wasser 2002, Quang *et al.* 2006). Diese Enzyme wirken als biochemische Katalysatoren und können entweder zu Forschungszwecken oder von der Industrie für Spezialapplikationen vielfältig genutzt werden. Die Anwendung von industriellen Enzymen erlaubt den Technologen, Prozesse zu entwickeln, die sehr nahe an die schonenden, effizienten Prozesse in der Natur heranreichen. Die Fortschritte in der modernen Kultivierungstechnologie wie programmierte Anzucht, automatisierte Ernte, Anfertigung von besonderen Substraten gekoppelt mit kosteneffizienter Verwertung von diversen Abfällen, darunter auch schwer zu degradierender Lignocellulose (Sánchez 2006), eröffnen die Möglichkeit, Pilze mit

verbesserten Eigenschaften in kostengünstigen Bioprozessen zu erzeugen. Die gezielte Suche nach neuen wertvollen Enzymen und ihre heterologe Expression sind weitere Zweige der Pilzforschung. Die vielversprechendsten Enzymklassen sind innerhalb der Klasse der Oxidoreduktasen vor allem die Peroxidasen und innerhalb der Hydrolasen die Lipasen.

1.2 Mikrobielle Peroxidasen (EC 1.11.1.-)

Peroxidasen sind Enzyme, die Wasserstoffperoxid bei der katalytischen Oxidation diverser organischer und anorganischer Substrate als Co-Substrat verwenden. Aufgrund von Sequenzhomologien wird die große Superfamilie pflanzlicher Peroxidasen, die auch Pilz- und Bakterien-Peroxidasen einschließt, in drei Klassen unterteilt (Welinder 1992). Die Klasse I beinhaltet neben der mitochondrialen Hefe Cytochrom C Peroxidase und Ascorbat-Peroxidasen aus Chloroplasten und Cytosol auch die bakteriellen Peroxidasen. Die bekannteste, im großtechnischen Maßstab produzierte Meerrettichperoxidase ist ein Vertreter der Klasse III, die extrazelluläre pflanzliche Peroxidasen innerhalb der Superfamilie der pflanzlichen Peroxidasen umfasst. Zu der Klasse II gehören die extrazellulären Pilzperoxidasen aus Weißfäulepilzen, die in den Ligninabbau involviert sind. Lignin- und Manganperoxidasen (LiP und MnP) wurden unter anderem für *Phanerochaete chrysosporium* und eine polyvalente Peroxidase für *Pleurotus eryngii* beschrieben (Leisola *et al.* 1987, Ruiz-Dueñas *et al.* 1999). Eine wichtige Besonderheit dieser Enzyme besteht darin, dass sie umfangreichen posttranslationalen Modifikationen unterliegen und sowohl Signalpeptide als auch Disulfidbrücken, Glykane und strukturelles Calcium enthalten (Conesa *et al.* 2002, Martínez 2002).

In den letzten Jahrzehnten entwickelte sich das Bestreben, die einzigartige Fähigkeit der Weißfäulepilze zum Ligninabbau wirtschaftlich anzuwenden. Dank der eleganten Enzymproduktion sind diese Pilze ebenso im Stande, eine Reihe von Umweltschadstoffen wie DDT und andere Pestizide, Farbstoffe, Cyanide, Azide und quervernetzte Polymere abzubauen (Higson 1991, Sutherland *et al.* 1997). Mit der Entdeckung der Fähigkeit des Pilzes *Phanerochaete chrysosporium* synthetische Farbstoffe zu degradieren (Glenn und Gold 1983), hat die Ära der gezielten Suche nach peroxidativen Aktivitäten begonnen (Pelaez *et al.* 1995, Lucas *et al.* 2007). Dank ihrer peroxidativen Aktivität finden Weißfäulepilze Verwendung als eine biologisch umweltfreundliche Alternative zu problematischen Aufschluss- und Bleichungsverfahren in der Papier- und Faserstoffindustrie (Bajpai *et al.* 2006). Lignin- und Manganperoxidasen sind effektiv in der Entfärbung von Brennereiabflüssen und der Oxidation von zahlreichen xenobiotischen Substanzen. Für die Entfärbung von Abflüssen aus Rohrzucker basierter Brennerei wurde zum Beispiel an Weizenstroh und Maiskolben immobilisierte Biomasse diverser Pilzstämme verwendet. Nach 28 Tagen wurde eine natürliche Entfärbung von Melasse mit an Maiskolben immobilisiertem *Pleurotus ostreatus* Eger EM 1303 (Florida) erreicht (Pant und Adholeya 2007).

Ein vor kurzem neu isolierter Pilz, *Geotrichum candidum* Dec 1, war in der Lage, diverse xenobiotische Komponenten abzubauen. Die Fähigkeit des Pilzes, synthetische Farbstoffe, Lebensmittelfarben, Melasse, organische Halogene, Lignin und Betriebsabflüsse zu degradieren (Shoda 2003), wurde ebenfalls der Peroxidaseproduktion zugeschrieben.

Wegen der Lebensmittelorientierung vieler biotechnologischen Firmen wird bei der Suche nach peroxidativen Aktivitäten den essbaren Basidiomyceten besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Marasmius scorodonius (Knoblauchsschwindling, Abb. 1) ist ein kleiner essbarer Pilz, der auf Grund seines intensiven Knoblauchgeschmacks seine Verwendung bevorzugt als Würzpilz findet.



Abb. 1 *Marasmius scorodonius* (www.pilze-pilze.de)

In Kulturüberständen von *M. scorodonius* wurden zwei neuartige Peroxidasen identifiziert, welche Tetraterpene zu C13-norisoprenoiden Aromen zu spalten vermögen (Zorn *et al.* 2003b). Die ubiquitär in Tee oder Beeren vorkommenden α - und β -Ionone sind zwei von vielen Produkten des β -Carotinabbaus, die auch durch Peroxidasen aus *M. scorodonius* entstehen können. Mit ihren holzigen, fruchtigen und blumigen Geruchseindrücken bei gleichzeitig niedrigen sensorischen Schwellenwerten stellen α - und β -Ionon hochattraktive Zielkomponenten der Aromabiotechnologie dar.

In der Feinchemikalienindustrie sind Pilzperoxidasen ebenfalls von großem Interesse. Die CPO Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago* ist bekannt für ein breites Substratspektrum und eine hohe Reaktionsselektivität. Zusätzlich zu der

natürlichen Halogenierungsaktivität katalysiert dieses Enzym unterschiedliche enantioselektive Sauerstofftransferreaktionen, z. B. die asymmetrische Epoxidierung von Olefinen, allylische und benzyllische Hydroxilierung, asymmetrische Sulfoxidation und regioselektive Indoloxidation (Conesa *et al.* 2000).

Trotz des erkennbaren industriellen Potentials der Pilzperoxidasen haben die aktuellen Anwendungen dieser Enzyme in großtechnischen Prozessen zwei große Einschränkungen: die limitierte Verfügbarkeit dieser Proteine und ihre niedrige Stabilität. In ihren natürlichen Produzenten werden lignolytische Enzyme im Laufe des sekundären Metabolismus oft nur in sehr geringen Mengen exprimiert (Reddy und D'Souza 1994). So konnte zum Beispiel aus einem Liter Submerskultur von *M. scorodoni* nur 1,3 mg der gepoolten MsP1 und MsP2 isoliert werden (Scheibner 2008). Die Chlorperoxidase CPO wird dagegen in *C. fumago* im Laufe des primären Metabolismus in relativ hohen Mengen produziert ($\sim 500 \text{ mg L}^{-1}$, Pickard und Hashimoto 1982). Peroxidasen werden jedoch durch hohe H_2O_2 Konzentrationen oder erhöhte Temperaturen deaktiviert. Hämperoxidasen werden zusätzlich durch Oxidation inaktiviert. Der Verlust der biologischen Aktivität kann durch eine Destruktion des Porphyrinringes, eine irreversible Inhibierung mit Natriumazid und Hydrazin oder durch die Bildung einer Oxyperoxidase nach der Reaktion mit H_2O_2 als Reduktionsmittel erfolgen (van de Velde *et al.* 2001).

Zum Erhöhen der oxidativen und thermischen Stabilität von Peroxidasen und zur Gewinnung von größeren Mengen dieser hochwertigen Enzyme stellen die gezielte Mutagenese und heterologe Expression nützliche Instrumente dar.

1.3 Mikrobielle Lipasen (EC 3.1.1.-)

Lipasen, Triacylglycerolhydrolasen, sind eine weitere wichtige Gruppe von biotechnologisch relevanten Enzymen. Mikrobielle Lipasen sind sehr vielfältig in ihren enzymatischen Eigenschaften und Substratspezifitäten. Vor allem katalysieren sie enantio- und regioselektive Hydrolyse und Synthese von natürlichen und nicht natürlichen Estern an der Grenzfläche zwischen dem unlöslichen Substrat und Wasser. Dank ihrer extrazellulären Natur können die meisten mikrobiellen Lipasen vom Organismus in großen Mengen produziert werden und sind relativ stabil unter nativen Bedingungen. Die aus unterschiedlichen Quellen isolierten Lipasen haben ein breites Spektrum an Eigenschaften u.a. bezüglich Substratspezifität, Fettsäurespezifität, Thermostabilität und pH-Optimum. Dadurch sind diese Enzyme attraktiv für industrielle Anwendungen in Detergentien, in der Lebensmittelindustrie für die Biotransformation und in molekularbiologischen Anwendungen (Bornscheuer 2002, Gupta *et al.* 2004). Einige wichtige Lipaseproduzierende Gattungen sind *Bacillus*, *Pseudomonas* und *Burkholderia*. Sehr ausführlich sind die für ihre hohe 1,3-Regioselektivität bekannten Lipasen aus unterschiedlichen *Rhizopus* Stämmen charakterisiert. Diese Besonderheit macht die aus *R. oryzae*, *R. niveus* und *R. delemar* stammenden Lipasen zu den vielseitigsten Katalysatoren der Modifikation von Triacylglycerolen (Pandey *et al.* 1999).

Die Temperaturstabilität von Lipasen gilt als eines der wichtigsten Charakteristika in der Industrie. Einer der neuesten Trends im Bereich der Enzymtechnologie sind psychrophile Lipasen, die aus Mikroorganismen kalter Regionen, wie z. B. *Candida antarctica*, isoliert werden. Dank ihres niedrigen Temperaturoptimums ziehen diese Enzyme große Aufmerksamkeit auf sich und erfahren eine steigende Anwendung in der organischen Synthese von chiralen Intermediaten. Niedrige Temperaturen sind

günstig für die Produktion von empfindlichen Substanzen. Anwendungen einer bei Raumtemperatur aktiven Lipase aus *C. antarctica* wurden in der Pharma-, chemischen und Lebensmittelindustrie patentiert (Joseph *et al.* 2008).

Im Gegensatz zu den kältestabilen arbeiten thermostabile Lipasen bei hohen Temperaturen. So zeichnete sich die thermostabile Lipase aus dem Rauchporling *Bjerkandera adusta* R59 sowohl im freien als auch im immobilisierten Zustand durch eine gute Thermostabilität bei bis zu 60 °C aus. Die Lipase vermag ein breites Spektrum von synthetischen und natürlichen Fetten zu hydrolysieren. Außerdem zeigt sie eine gute Stabilität in kommerziellen Detergentien bei Waschttemperaturen von 30 °C bis 90 °C und pH 6 — 9 (Bancerz und Ginalska 2007).

Zur Zeit sind Fett- und Ölmodifikationen wichtige Bereiche in der Enzymtechnologie, wo neue ökonomische und grüne Technologien nachgefragt sind. Maßgeschneiderte Öle mit nativ strukturierten Triacylglycerolen und veränderten physikochemischen Eigenschaften haben ein großes Potenzial auf dem zukünftigen Markt. Mikrobielle Lipasen, die regiospezifisch und substratspezifisch sind, können für maßgeschneiderte vegetarische Öle verwendet werden. Außerdem können preiswerte Öle zur Synthese von ernährungsrelevanten Triacylglycerolen wie z. B. Kakaobutter-Substituten, PUFA-angereicherten und Oleinsäure-angereicherten Ölen verwendet werden. Die physikalischen Eigenschaften von natürlichen Ölen können durch Umesterung so verändert werden, dass sie zu Margarine und festen Fetten mit höherem Schmelzpunkt verarbeitet werden können (Gupta *et al.* 2003). Bei der Brotherstellung können Lipasen zur Verbesserung der physikalischen Eigenschaften des Teigs und somit zur Qualität von Brot beitragen. Dies wird möglich durch eine Erhöhung des Teigvolumens oder eine Verzögerung der Aufgehzeit (Monfort *et al.* 1999).

In den letzten Jahren wurden biotechnologische Wege zur Produktion von Biodiesel intensiv erforscht. Enzymgesteuerte Alkoholyse mit immobilisierten oder freien Lipasen sowie mit Ganzzellsystemen stellt eine umweltfreundliche Alternative zu chemischen Verfahren dar (Du *et al.* 2008).

Die steigende Anzahl an potentiellen biotechnologischen Anwendungen stimuliert die Forschung im Bereich der Suche nach neuen Lipase-Produzenten für spezielle Fragestellungen. Im Gegensatz zu zahlreichen Bakterien und Ascomyceten, die als übliche Lipase-Quellen betrachtet werden, wurden höhere Pilze hinsichtlich der lipolytischen Eigenschaften erstaunlicherweise wenig erforscht (Hädrich-Meyer und Berger 1994, Nair *et al.* 1990, Bancarz und Ginalska 2007). Das erste auf molekularer Ebene charakterisierte Pilzenzym der Lipase/Esterase Familie (Zorn *et al.* 2005) wurde aus Kulturüberständen von *Pleurotus sapidus* (Abb. 2) isoliert. Die Lip2 Lipase aus *Pleurotus sapidus* katalysiert die Hydrolyse von Xanthophyllestern zu den freien Xanthophyllen (Zorn *et al.* 2003, Krügener *et al.* 2008), die als Farbstoffe und Antioxidantien in der Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikindustrie verwendet werden.



Abb. 2 *Pleurotus sapidus* (David Lewis, Tennessee)

Die Vertreter der Gattung *Pleurotus* gehören zu der drittgrößten Gruppe der kultivierbaren Speisepilze. Sie können auf unterschiedlichen Substraten gezüchtet werden und sind unter anderem für ihre therapeutischen Eigenschaften und Anwendungen in der Bodensanierung bekannt (Cohen *et al.* 2002). Für die Pilze wird ein großes Potenzial an wertvollen lipolytischen Enzymen vermutet. Auch für diese Enzyme können ausreichende Mengen und gezielt gesteuerte Eigenschaften durch heterologe Expression in unterschiedlichen Wirtsorganismen gewährleistet werden.

1.4 Heterologe Expression

Die Expression von rekombinanten Proteinen ist einer der wichtigsten Forschungsbereiche in der molekularen Biotechnologie. Es ist möglich, bioaktive Proteine in preiswerten Kulturmedien und mit anspruchslosen Stämmen zu produzieren, anstatt sie aus den Wildstämmen zu extrahieren. Die Überexpression von Enzymen in rekombinanten Systemen soll zum einen dazu dienen, die Produktausbeute zu erhöhen, zum anderen wird damit ein breites Feld für die gerichtete Mutagenese eröffnet, um erwünschte Eigenschaften wie die Oxidationsstabilität und die Enzymaktivität zu steigern. Ein optimales Expressionssystem kann nur selektiert werden, wenn die Produktivität, die Bioaktivität und biochemische Charakteristika des Zielproteins zusammen mit den Prozesskosten und der Sicherheit des Systems in Betracht gezogen werden. Die meist verwendeten Expressionssysteme sind prokaryotische Organismen, Hefen, Insekten und Säugetierzellen (Yin *et al.* 2007). In den letzten 20 Jahren wurden im Bereich der heterologen Proteinproduktion umfangreiche Erfahrungen gemacht und zahlreiche Expressionssysteme mit dazugehörigen Vektoren und Produktionsstämmen entwickelt, von denen viele bereits kommerziell erhältlich sind.

Dennoch müssen in vielen Fällen mehrere Wirtsorganismen und Expressionskonstrukte getestet werden, um eine detektierbare Menge des Zielproteins zu erreichen. Durch vielfältige Optimierungsverfahren wird desweiteren versucht, Produktausbeuten und enzymatische Aktivitäten zu erhöhen.

Die folgende Übersicht über gebräuchliche Expressionssysteme soll einen Überblick über ihre Eignung für die heterologe Produktion von mikrobiellen Lipasen und Peroxidasen geben.

1.4.1 *Escherichia coli* als Expressionswirt

Als Produktionsorganismus wird *E. coli* (Abb. 3) vor allem zur kosteneffizienten Produktion großer Mengen von Proteinen verwendet, die eine relativ einfache Struktur und definierte Größe haben. Allerdings werden in *E. coli* zum Teil auch komplexe Proteine produziert. Bei der Entwicklung einer Expressionsstrategie wird zunächst versucht, das Zielgen in *E. coli* zu exprimieren. Alternative Expressionssysteme werden erst dann angewendet, wenn das Produkt biologisch inaktiv, falsch gefaltet, oder die Ausbeute zu gering ist.



Abb. 3 *Escherichia coli* (<http://universityofcalifornia.edu>)

Parameter, die wichtig für eine erfolgreiche Proteinproduktion in *E. coli* sind, schließen transkriptionale und translationale Effizienz, Stabilität des Expressionsvektors und der transkribierten mRNA, Lokalisierung, Faltung und Stabilität des Proteins gegenüber Proteolyse ein. Zum gezielten Steuern des Genproduktes kommt genetisches Design zum Einsatz, zum Beispiel die Produktion von Fusionsproteinen. Diese werden hergestellt, indem man die Zielgene mit einem entsprechenden Epitop fusioniert, z. B. mit FLAG- oder Poly-His-tag Epitop oder einem Fluoreszenzprotein. Dies kann die nachfolgende Proteinanreicherung zum Beispiel durch Immunpräzipitation, Proteinreinigung und auch die Detektion erleichtern und für den Schutz gegen intrazelluläre Peptidasen vorteilhaft sein (Baneyx 1999, Georgiu 1996).

Da es oft schwierig ist, vorherzusagen, in welcher Form das Genprodukt hergestellt wird, sind empirische Untersuchungen in jedem Fall notwendig. Generell gibt es drei Formen von Proteinen, die von Bakterien exprimiert werden (Jonasson *et al.* 2007):

- intrazelluläre lösliche Proteine;
- unlösliche *inclusion bodies*;
- sekretierte Proteine.

Bei den intrazellulär akkumulierten löslichen Proteinen ist es von Vorteil, dass eine aufwendige Solubilisierung mit anschließender Reaktivierung nicht notwendig ist. Dafür sind oft komplexe Aufreinigerungsverfahren erforderlich. Außerdem sind solche Proteine anfällig für Proteolyse durch wirtseigene Peptidasen. Die Bildung von Disulfidbrücken findet nicht statt, und hohe Konzentrationen an dem intrazellulären Produkt können für die bakteriellen Zellen metabolisch problematisch sein. Im Gegensatz dazu sind die aggregiert vorliegenden *inclusion bodies* besser gegen Proteolyse geschützt. Allerdings kann das Proteinprodukt als unlösliches falsch

gefaltetes Aggregat entstehen, so dass anschließende Solubilisierungs- und Reaktivierungsschritte erforderlich sind. Vorteilhaft in solchen Fällen ist es, dass das inaktive Produkt harmlos für die Produktionszellen ist, problemlos durch Zentrifugation abgetrennt werden kann, und hohe Reinheiten und Konzentrationen des Zielproteins nach der Solubilisierung und Renaturierung erreicht werden können (Rudolph und Lilie 1996).

Ein sekretiertes Protein kann im periplasmatischen Raum akkumuliert werden. Das Periplasma enthält nur ca. 100 eigene Proteine. Im Vergleich dazu sind im Cytoplasma ca. 4000 Proteine lokalisiert. Dies gewährleistet bereits einen Konzentrierungs- und Reinigungseffekt der Zielproteine. Zusätzlich besteht die Möglichkeit zur Bildung von Disulfidbrücken, verminderter Proteolyse und Minimierung von unerwünschten Interaktionen der heterolog produzierten Proteinen mit Kompartimenten und Bestandteilen der Wirtszelle. Die produzierten Proteine werden aus den Zellen mittels osmotischen Schocks herausgelöst. Es gibt auch die Möglichkeit, die Abgabe von heterologen Proteinen ins Medium durch Temperaturerhöhung zu erzwingen. Ein allgemeines System zur Sekretion eines heterolog produzierten Proteins ins Kulturmedium existiert nicht. Einige Proteine rufen eine erhöhte Permeabilität der äußeren Membran hervor und können durch die entstandenen Poren ins Medium gelangen. Die mutierten Stämme sind sehr sensibel und revertieren zum normalen Phänotyp, so dass sie für die Großproduktion ungeeignet sind. Andere Alternativen zur Proteinfreisetzung sind Supplementierung des Kulturmediums mit Glycin oder eine Co-Expression mit Bakteriocin als Freisetzungprotein (Georgiu 1996, Baneyx 1999, Jonasson *et al.* 2002).

Heterologe Produktion von mikrobiellen Peroxidasen und Lipasen in E. coli

Die Expression von Pilzperoxidasen in *E. coli* wurde mehrmals untersucht und resultierte fast ausschließlich in der Produktion von *inclusion bodies*. Erst nach zeit- und kostenaufwendigen Reaktivierungsverfahren gelang es, ein aktives Protein zu rekonstruieren (Doyle und Smith 1996, Whitwam und Tien 1996, Perez-Boada *et al.* 2002). Vor kurzem wurde ein Expressionssystem für eine Dyp-Peroxidase konstruiert. Unter Verwendung des pET Vektors wurde in *E. coli* BL21(DE3) in Hämin supplementiertem LB Medium neben den üblichen *inclusion bodies* auch ein kleiner Teil an löslichem und aktivem Protein erhalten. Die Charakteristika der aufgereinigten rekombinanten eDyP-Peroxidase waren zum größten Teil identisch mit dem nativen Enzym aus *Thanatephorus cucumeris* Dec 1 (Sugano 2004). Die heterologe Expression von *M. scorodoni* MsP2 Peroxidase mit dem gleichen Expressionssystem führte dagegen zu keiner detektierbaren Produktion von rekombinantem Protein (Zelena *et al.* 2009).

Die Vertreter der Lipase/Esterase-Familie gehören zu einer Gruppe von Enzymen, die seit langer Zeit in *E. coli* mit Erfolg heterolog produziert werden. Innerhalb der letzten drei Dekaden wurden in unterschiedlichen *E. coli* Stämmen zahlreiche mikrobielle Lipasen funktionell exprimiert (Aoyama *et al.* 1998, Joerger und Haas 1993, Rúa *et al.* 1998, Kim *et al.* 2000, Kitaura *et al.* 2001, Blank *et al.* 2006, Shu *et al.* 2007a). Wie erwähnt, beziehen sich neuere Entwicklungen in der Lipase-Forschung auf die Isolierung, Charakterisierung und Anwendung von psychro- bzw. thermophilen Lipasen aus mikrobiellen Spezies. Einige von diesen einzigartigen Biokatalysatoren sind aktuelle Objekte für die heterologe Expression. Die Lipase PalB aus *Pseudozyma antarctica* wurde stabil im Cytoplasma von *E. coli* BL21(DE3) als *inclusion bodies* produziert, bei der periplasmatischen Produktion war das Enzym

jedoch extrem instabil. Es ist gelungen, die Stabilität des produzierten Enzyms durch Coexpression von Periplasmafaltungsfaktoren wie DegP, FkpA, DsbA, and DsbC zu erhöhen (Xu *et al.* 2008). Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) erwies sich auch geeignet für die funktionelle Expression des *lipP* Gens aus einem anderen antarktischen Bakterium, *Moritella* sp. 2-5-10 (Yang *et al.* 2008). Die leistungsfähige alkalische ($\text{pH}_{\text{opt}} 9$) bei niedrigen Temperaturen ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$) aktive Lipase aus einem neu isolierten psychrotrophen *Pseudomonas* sp. 7323 (Prydz Bay, Antarktis), wurde ebenso aktiv in *E. coli* TOP10' überexprimiert. Die rekombinante Lipase vermag, analog zum nativen Enzym, p-Nitrophenylester und Triglyceride mit hoher Geschwindigkeit zu hydrolisieren (Zhang und Zeng 2008). Die heterologe Produktion einer thermostabilen Lipase aus *Geobacillus* sp. lieferte rekombinantes Enzym mit einer Aktivität, die 4,5-mal höher war als im Wildtyp. Nach 1 Stunde Inkubation bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde beim rekombinanten Protein noch eine Restaktivität von 30% beobachtet (Abdel-Fattaha 2008).

Die erste fungale Lipase LiP2 aus *P. sapidus* wurde in unserer Arbeitsgruppe vor kurzem in *E. coli* heterolog produziert (Krügener *et al.* 2008). Die extrazelluläre Lipase wurde zunächst in Form von *inclusion bodies* exprimiert. Nach einem Reaktivierungsschritt konnte in Übereinstimmung mit dem nativen Enzym die ungewöhnliche Umsetzung von Xanthophyllestern aus *Capsicum annum* zu den freien Xanthophylle nachgewiesen werden.

1.4.2 Expressionssysteme mit Hefen als Wirtsorganismen

Wenn das Zielprotein multiple Untereinheiten enthält oder substantieller post-transnationaler Modifikationen bedarf, ist der bevorzugte Wirt meist eukaryotischen

Ursprungs. Die in Hefen heterolog produzierten Proteine unterliegen umfangreichen posttranslationalen Modifikationen inklusive der Polypeptidfaltung, Glykosidierung, Methylierung, Acylierung und Adaptation gegen Proteolyse. Zudem besteht die Möglichkeit zur Produktion von sekretierten Proteinen, die problemlos aus den Kulturmedien aufgereinigt werden können.

Die Expression eines fremden Gens in Hefen besteht aus drei Hauptschritten:

- Insertion des Zielgens in einen Expressionsvektor;
- Integration des Expressionsvektors ins Hefe-Genom;
- Selektion von potentiell für die Expression geeigneten Transformanten.

Die Vektoren für die Transformation von Hefen sind normalerweise Hybride zwischen Hefe-Derivaten und bakteriellen Sequenzen. Der prokaryotische Teil des Vektors enthält einen Replikationsursprung und gewährleistet Resistenzen gegen spezifische Antibiotika zur Propagation und der Selektion in bakteriellen Wirten. Der Hefeanteil enthält die Elemente für Selektion von Hefe-Transformanten, zum Beispiel 3-Isopropylmalatdehydrogenase (LEU2) oder Orotidin-5'-decarboxylase (URA3) zum komplementieren von Auxotrophien des Wirtsstammes (Gellissen *et al.* 1992).

Eine große Anzahl von mutierten Produktionsstämmen steht heutzutage zur Verfügung. Neben der traditionellen Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* finden weitere Expressionswirte wie die methylotrophen Hefen *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* und *Pichia methanolica* Anwendung (Gellissen und Hollenberg 1997).

Heterologe Expression in Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae (Abb. 4) ist ein einzellulärer, eukaryotischer Organismus, welcher auch als Bäcker- oder Bierhefe bekannt ist. *S. cerevisiae* wurde zur Expression von unterschiedlichen heterologen Genen in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts konzipiert. Dank der ökonomischen Effizienz und der biologischen Sicherheit wird *S. cerevisiae* zur Produktion von Arzneimitteln verwendet, z. B. von Vakzinen gegen Hepatitis B (DiMiceli *et al.* 2006, Antoniukas *et al.* 2006).

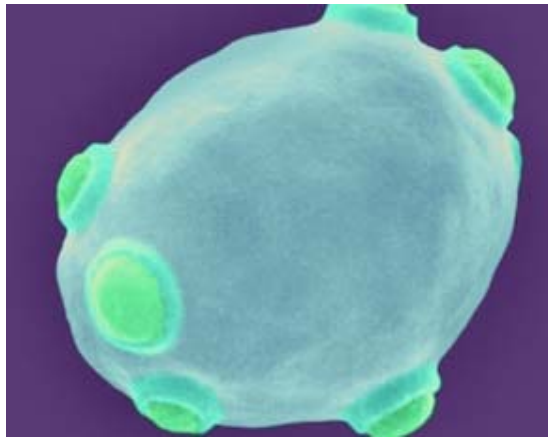


Abb. 4 *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.phototakeusa.com>)

Für die Produktion von Pilzperoxidasen wurde das *S. cerevisiae* System bis jetzt selten und nur mit begrenztem Erfolg angewendet. Nur bei CiP Peroxidase aus *Coprinopsis cinereus* konnte eine geringe Aktivität von $0,02 \text{ U mL}^{-1}$ erzielt werden (Sawai-Hatanaka *et al.* 1995).

Im Gegensatz dazu werden in nicht modifizierten oder in glykosidierungsdefizienten oder peptidasedefizienten *S. cerevisiae* Stämmen rekombinante Lipasen aus zahlreichen Mikroorganismen produziert. Die Phospholipase A1 (PLA1) aus *Aspergillus oryzae*, die die Abspaltung der Acylgruppe von der Position 1 von Lecithin zu Lysolecithin katalysiert, wurde funktionell in *S. cerevisiae* KS58-2D exprimiert (Watanabe *et al.* 1999). Vor kurzem wurde zum ersten Mal über die

Expression von *B. subtilis* Lipase A berichtet. Das war die erste bakterielle Lipase, die intrazellulär in Backhefe exprimiert wurde. Es wurde gezeigt, dass Lipasen bei der Brotherstellung als technologische Additive verwendet werden können (Sánchez *et al.* 2002). Für Lipase A wurde eine Sekretionsausbeute von bis zu 400 IU mL⁻¹ im Kulturüberstand erzielt (Mormeneo 2008). Mit molekularbiologischen Techniken wurde ein Gen, das für eine extrazelluläre Lipase CaLIP4 aus *Candida albicans* kodiert, nach der gezielten Mutagenese von ihrem untypischen Serin-Codon CUG in *S. cerevisiae* exprimiert (Roustan *et al.* 2005).

Bei der Suche nach einem System für die heterologe Produktion der eukaryotischen Proteine war die Hefe *S. cerevisiae* der erste Treffer, bei dem die Voraussetzungen für eine korrekte Proteinfaltung, proteolytische Prozessierung und postranslationale Modifikationen wie N- und O-Glykosidierung oder N-terminale Phosphorylierung erfüllt wurden (Innis *et al.* 1985, Gellissen *et al.* 1992). Dennoch haben sich bei den kommerziellen und industriellen Applikationen des Expressionswirtes auch Nachteile ergeben. Begrenzte Stabilität von Produktionsstämmen, Hyperglykosidierung vieler sekretierter Proteine sowie eine relativ niedrige Sekretionseffizienz (Gellissen und Hollenberg 1997) zählen zu den wesentlichen Limitierungen des Systems. Diese Beschränkungen werden jedoch zurzeit durch eine steigende Anzahl alternativer, nichtkonventioneller Hefen vermindert, die besonders günstige Eigenschaften als Produktionsorganismen für zahlreiche heterologe Proteine zeigen.

Methylotrophe Hefe Pichia pastoris

P. pastoris wird für die umfangreiche Produktion von Vakzinen, fibrinolytischen Substanzen, Allergenen, Antikörpern, Peptidaseinhibitoren, Hormonen, Rezeptoren

und Liganden verwendet. Die rekombinante Proteinproduktion in *P. pastoris* hat zahlreiche Vorteile gegenüber prokaryotischen und anderen eukaryotischen Systemen (Daly und Hearn 2005, Macauley-Patrick *et al.* 2005). Eine schnelle Wachstumsrate gekoppelt mit Einfachheit der Kultivierung erlaubt Fermentationen bis zu hohen Zelldichten in relativ kurzer Zeit. In nahezu proteinfreien Medien kann eine hohe Produktivität erreicht werden. Bei methylophilen Hefen besteht keine Gefahr der Kontamination durch Endotoxine und Bakteriophagen, auch ist die Hefe selbst nicht humanpathogen. Die zur Verfügung stehenden kommerziellen Hefevektoren sind gut charakterisiert und einfach genetisch zu manipulieren.

Alle *P. pastoris* Stämme sind Derivate von NRRL-Y 11430 (Li *et al.* 2007). Die meisten haben eine Mutation im Histidinoldehydrogenase Gen (*HIS4*) als Selektionsmarker, andere auxotrophe Stämme werden nur gelegentlich verwendet. Einige sekretierte Proteine unterliegen schneller Degradation durch Peptidasen. Da vakuolare Peptidasen eine signifikante Rolle in der Proteindegradation spielen, wurden einige peptidasedefiziente Stämme, wie SMD1163 (*his4 pep4 prb1*) oder SMD1168 (*his4 pep4*) entwickelt.

Die meisten *P. pastoris* Expressionssysteme verwenden einen starken Methanol-induzierten Alkoholoxidase AOX1 Promotor (Cregg *et al.* 2000, Cos *et al.* 2006). Unter Kontrolle dieses Promotors kann der Anteil an rekombinantem löslichem Protein nach der Induktion mit Methanol bis zu 30% des Gesamtproteins betragen. Die Stabilität von sekretierten Proteinen kann durch Zugabe von Aminosäure- oder Pepton-reichen Zusätzen oder durch gezielte Steuerung der Kulturbedingungen erhöht werden (Cereghino und Cregg 2000). *P. pastoris* lässt sich problemlos im pH-Bereich von 3,3 bis 7,0 kultivieren. Dies ist besonders hilfreich, wenn der proteolytische Abbau der ins Kulturmedium sekretierten Proteine minimiert werden

muss. Die Reinigung der von *P. pastoris* sekretierten löslichen Proteine kann direkt aus den Kulturmedien mittels Ultrafiltration, Präzipitation oder mit Hilfe von diversen chromatographischen Verfahren erfolgen. Die Ausbeute an Zielprotein lässt sich bei den „scale up“ Fermentationen deutlich erhöhen. Das macht dieses System besonders attraktiv für industrielle Anwendungen.

Heterologe Expression von Pilzperoxidasen

Bei der Expression von mikrobiellen Peroxidasen wurde die Hefe *Pichia pastoris* bis jetzt relativ begrenzt eingesetzt. Ein Beispiel dafür ist die extrazelluläre Expression eines für eine Lignin-Peroxidase kodierenden Fragmentes der chromosomalen DNA des lignolytischen Actinobakterium *Streptomyces viridosporus* T7A. Das 4,1-kb lange Fragment wurde in den kommerziellen pPIC9 Vektor für eine extrazelluläre Expression in *P. pastoris* kloniert. Unter Kontrolle des Methanol-induzierbaren AOX1 Promotors wurden in *P. pastoris* zwei Aktivitäten exprimiert, die bei der Hefe selbst und bei der Hefe mit leerem Vektor nicht detektiert wurden: die gesuchte extrazelluläre Peroxidase und eine intrazelluläre Endoglucanase. In den besten *P. pastoris* Transformanten war die extrazelluläre Produktion der Peroxidase wesentlich höher als in *S. viridosporus*. Die Ergebnisse zeigten, dass die für den lignolytischen Katabolismus verantwortlichen Gene im *S. viridosporus* Chromosom als Cluster vorliegen (Thomas und Crawford 1998).

Die erfolgreichen Projekte bezüglich der Pilzperoxidasen sind auf die Expression des MnP1 Manganperoxidase Gens aus *Phanerochaete chrysosporium* beschränkt. Das für die MnP1 kodierende Gen wurde unter Kontrolle des Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase GAP Promotors exprimiert. Das MnP1 Gen wurde in den

Vektor für die extrazelluläre Proteinproduktion entweder mit enzymeigener Signalsequenz bzw. mit enzymeigener Signalsequenz und dem α -Faktor oder für die intrazelluläre Expression entsprechend ohne natives Exportsignal und ohne α -Faktor kloniert. Die rekombinante Peroxidase rMnP konnte in *P. pastoris* extrazellulär exprimiert werden. Das teilaufgereinigte rMnP zeigte ähnliche kinetische Charakteristika wie die native MnP, und die beiden Enzyme hatten die gleichen pH-Stabilitätsprofile; die Thermostabilität des rekombinanten Enzyms war jedoch geringer als bei der nativen Peroxidase (Gu *et al.* 2003).

Die Expression des Lignin-Peroxidase Gens LiPH8 aus *P. chrysosporium* wurde außerdem erfolgreich in einer anderen methylo trophen Hefe, *Pichia methanolica*, durchgeführt. Im 5 L Bioreaktor wurde eine stabile und aktive Peroxidase mit der Enzymaktivität von 7568 U L^{-1} produziert (Wang *et al.* 2004).

Ausgehend von dem großen Potenzial der methylo trophen Hefe und basierend auf den erwähnten Ergebnissen, wurden in unserer Arbeitsgruppe umfangreiche Untersuchungen vorgenommen, weitere potente Pilzperoxidasen heterolog zu exprimieren. Dafür wurden zwei Expressionsstämme eingesetzt: der bekannteste histidinauxotrophe *P. pastoris* GS115 Stamm und der peptidasedefiziente *P. pastoris* SMD 1168 Stamm. Die für eine Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* und für die Peroxidase MsP2 aus *Marasmius scorodoni us* kodierenden Gene wurden in den pPIC9K Vektor für die extrazelluläre Proteinproduktion bzw. in den pPIC3,5K Vektor für die intrazelluläre Proteinproduktion kloniert. Trotz eindeutig nachgewiesener, zum Teil auch multipler, erfolgreicher Insertion der Zielgene ins Hefe-Genom (Scheibner 2006) und umfassender Optimierungsversuche (Zelena, nicht publizierte Daten) konnte in keinem der Fälle eine heterologe Proteinproduktion detektiert werden.

Heterologe Expression mikrobieller Lipasen

Für die Überexpression von mikrobiellen Lipasen erwies sich *P. pastoris* als ein hervorragender Wirt. Die heterologe Expression von Lipasen aus *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia cepacia*, *Geotrichum candidum*, *Candida rugosa* und *Bacillus thermocatenuatus* (Schmidt-Dannert 1999) resultierte in der Sekretion von 100-200 U mL⁻¹ Lipase in den Kulturüberständen. Weitere Beispiele dafür sind eine ch-3 Lipase aus einem psychrophilen *Geotrichum candidum* Stamm (Fu *et al.* 2007) und zwei Gene aus *Yarrowia lipolytica* LIPY7 und LIPY8 (Song *et al.* 2006). Eine der zahlreichen *Candida rugosa* Lipasen wurde bereits in einem 800 L Bioreaktor produziert, wobei eine Enzymaktivität von 14000 IU mL⁻¹ erzielt wurde (Zhao *et al.* 2008). Die extrazelluläre Produktion von *Galactomyces geotrichum* BT107 Lipase I lieferte eine Proteinausbeute von 200 mg L⁻¹ (Fernandez *et al.* 2006). Bei der heterologen Expression von *Candida parapsilosis* Lipase/Acyltransferase konnte mit rekombinanten *P. pastoris* GS115 Klonen ein Proteingehalt von 5,8 g L⁻¹ an nahezu reinem rekombinantem Protein erreicht werden, wobei das rekombinante Enzym die gleichen katalytischen Eigenschaften aufwies wie das native Enzym (Brunel *et al.* 2004).

Die Expression von Lipasen aus Basidiomyceten in methylotrophen Hefen wurde bis jetzt noch nicht beschrieben. Es ist nicht auszuschließen, dass die Verwendung von unterschiedlichen *P. pastoris* Stämmen als Expressionswirte eine neue Perspektive für die heterologe Produktion von Lipasen aus Basidiomyceten darstellt.

1.4.3 Weitere Expressionssysteme

Baculovirus

Das Baculovirus gehört zu den doppelsträngigen, filamentösen DNA-Viren, die hauptsächlich Mottenlarven befallen (Abb. 5).

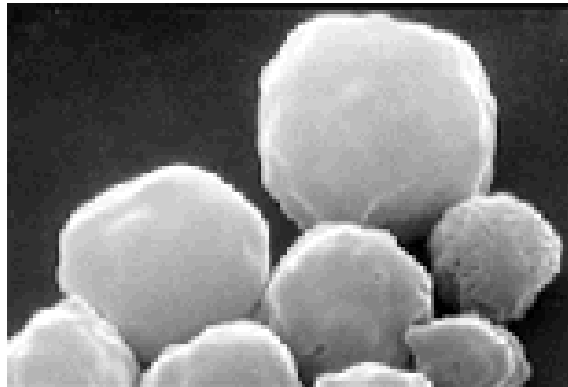


Abb. 5 Baculovirus Partikel (<http://www.nysaes.cornell.edu>)

Eine der attraktivsten Fähigkeiten des Baculovirus besteht darin, dass mit dem System eukaryotische Proteine heterolog produziert werden können. Dieses System zeichnet sich besonders bei der Expression von rekombinanten Glykoproteinen aus. Etwa 1000 hochwertige Proteine, die ihre Anwendung in der Produktion von Vakzinen oder Gentherapie finden (Kang 1997, Ghosh *et al.* 2002), wurden aktiv in diesem System exprimiert.

Der Bereich der mit Baculovirus exprimierten Lipasen ist relativ begrenzt und umfasst die heterologe Produktion von humanen und Säugetier-Enzymen. Über die heterologe Expression von mikrobiellen Lipasen wurde nicht berichtet.

In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden einige Versuche unternommen, Pilzperoxidasen im Baculovirus-System zu produzieren. Das Mn Peroxidase H4 Isozym (Pease *et al.* 1991), Ligninperoxidasen H8 (Johnson und Le 1991, Lin *et al.* 1997) und H2 Isozym (Johnson *et al.* 1992) aus *P. chrysosporium* wurden in

Baculovirus aktiv exprimiert. Trotz der gelungenen Experimente hat sich das wissenschaftliche Interesse im Bereich der rekombinanten Peroxidaseproduktion nicht weiter verbreitet. Die Ursache dafür liegt in einigen wichtigen Begrenzungen des Systems. Die mit dem Virus infizierten Wirtszellen sterben in der Regel, so dass das heterologe Gen nicht kontinuierlich exprimiert werden kann. Wichtiger ist aber, dass, obwohl Baculoviren eine hochspezifische Wirtsauswahl (Insekten) haben, sie nicht ganz harmlos für Menschen, Tiere und Vögel sind. Daher ist dieses System für industrielle Anwendungen eher ungeeignet.

Filamentöse Pilze

In der letzten Dekade gewannen andere potente Expressionssysteme, die auf der Basis von filamentösen Pilzen wie *Aspergillus* (Abb. 6) oder *Trichoderma* konzipiert wurden, immer mehr an Bedeutung.

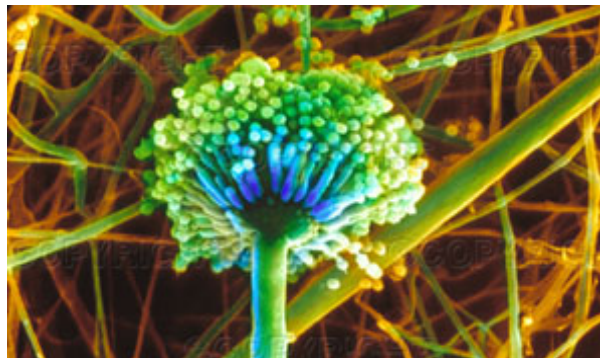


Abb.6 *Aspergillus niger* (<http://www.fotosearch.com>)

Das arp Peroxidase Gen aus *Arthromyces ramosus* wurde in *Aspergillus awamori* genetisch entweder am 5'- oder 3'-Terminus des Gens, das für llama variable „heavy chain antibody“ Fragment V(HH) R9 kodiert, fusioniert. Dies resultierte in den Fusion-Expressions-kassetten ARP-R9 oder R9-ARP. Es wurden Transformanten gefunden,

die bis zu 30 mg L^{-1} Fusionsprotein in das Kulturmedium sekretierten, und beide Proteine zeigten eine peroxidative Aktivität im ABTS Test. Da deutliche Mengen an Zielprotein auch intrazellulär detektiert wurden, könnte das ein Hinweis darauf sein, dass der Pilz möglicherweise Probleme bei der Sekretion dieser Art von Proteinen hat (Joosten *et al.* 2005).

Häm-haltige Peroxidasen aus Weißfäulepilzen wurden im Gegensatz zu den meisten Proteinen pilzlicher Herkunft lange Zeit nur begrenzt in industriellen filamentösen Pilzstämmen hergestellt. Faktoren, die die Produktion der Peroxidasen limitieren, liegen unter anderem auf der posttranslationalen Ebene. Besonders die ungenügende Verfügbarkeit der prosthetischen Gruppen, die zur Biosynthese der Peroxidasen notwendig sind, wird als wichtiger Schwachpunkt diskutiert. Um den Einblick in die limitierenden Faktoren für die Produktion der Pilzperoxidasen in filamentösen Pilzen zu gewinnen, wurde die Expression von Ligninperoxidase H8 (lipA) und Manganperoxidase (MnP) H4 (mnp1) aus *P. chrysosporium* in einem peptidasedefizienten *A. niger* Stamm untersucht. Sowohl die Manganperoxidase als auch die Ligninperoxidase wurden ins Kulturmedium sekretiert. Während die rekombinante Manganperoxidase jedoch aktiv exprimiert und korrekt am N-Terminus prozessiert wurde, war die sezernierte Ligninperoxidase nicht aktiv, vermutlich aufgrund einer inkorrekten Prozessierung (Conesa *et al.* 2000). Die rekombinante MnP Produktion wurde nach Zugabe von Hämoglobin in das Kulturmedium auf bis zu 100 mg L^{-1} erhöht. Obwohl die Zugabe von Häm bzw. Hämin ins Kulturmedium für einige Peroxidasen essentiell erscheint (Stewart *et al.* 1996, Conesa *et al.* 2001, Conesa *et al.* 2002a), werden andere Pilzperoxidasen auch ohne externe Zugabe von Häm-liefernden Agentien in aktiver Form produziert (Sugano *et al.* 2000, Lokman *et al.* 2003).

Die Verwendung von bekannten Optimierungsstrategien wie Genfusion oder Coexpression von Chaperonen kann zum Teil zur Produktion eines aktiven Proteins führen. Nachdem die Expression der zu *A. niger* Glucoamylase fusionierten LipA und Mnp1 Gene aus *P. chrysosporium* zu keiner Verbesserung des Produktionsniveaus führte, wurde die Rolle von zwei Komponenten, des Chaperons Calnexin und des Bindeproteins (BiP) in dem Sekretionsstoffwechselweg und der Produktion der Pilzperoxidasen untersucht (Conesa *et al.* 2002a). Die Expression der MnP Mangan-Peroxidase aus *P. chrysosporium* in *A. niger* resultierte in der Steigerung der Expression der *clxA* and *bipA* Gene. In einem mit Häm supplementierten Medium, in dem MnP effizient überexprimiert wurde, war die Induktion von *clxA* and *bipA* gleichfalls höher. Es wurde der Einfluss der Überexpression dieser beiden Chaperone in einem MnP-produzierenden Stamm auf die MnP Produktion analysiert. Während eine *bipA* Überexpression die MnP Produktion wesentlich reduzierte, resultierte die Überexpression von Calnexin in einer vier- bis fünffachen Steigerung der extrazellulären MnP Produktion. Bei zusätzlicher Zugabe von Häm in das Kulturmedium hatte die Überexpression von Calnexin keinen synergetischen Effekt auf die MnP Produktion.

Die Komplexität des Aufbaus und der Funktion der Peroxidasen bereiten diverse Schwierigkeiten bei der heterologen Produktion der einzelnen Enzyme. Das für eine Peroxidase optimierte System kann für ein anderes Enzym erst nach einer starken Optimierung angewendet werden oder erweist sich als ungeeignet.

Die Expression der rekombinanten polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* in unterschiedlichen *Aspergillus* Wirtsstämmen wurde durch Variation der Kultivierungstemperatur im Bioreaktor optimiert (Eibes 2008). Eine Absenkung der Temperatur von 28 auf 19 °C beeinflusste die Erhöhung der extrazellulären

Produktion der aktiven Peroxidase in *A. nidulans* um den Faktor 5,8 auf 466 U L^{-1} und reduzierte die proteolytische Aktivität um die Hälfte. Dagegen wurde bei einem rekombinanten *A. niger* bei gleichen Bedingungen keine Peroxidase-Aktivität nachgewiesen, weil die proteolytische Aktivität im Vergleich mit *A. nidulans* 3 bis 11 mal höher war.

Die Eignung von *Aspergillus*-basierten Expressionssystemen wurde auch für die Produktion von rekombinanten mikrobiellen Lipasen demonstriert (Huge-Jensen 1989). Die für den Precursor für *Rhizomucor miehei* Triglyceridlipase kodierende cDNA wurde in einen *A. oryzae* Expressionsvektor inseriert. Unter Kontrolle des Promotors für das *A. oryzae* α -amylase Gen und des *A. niger* Glucoamylase Gen Terminators wurde die rekombinante Triglyceridlipase ins Kulturmedium sezerniert. Die aufgereinigte, enzymatisch aktive rekombinante Lipase rRML hatte die gleichen Charakteristika bei der SDS-PAGE und Aminosäurekomposition wie das native Enzym.

Zellfreie Expression

Zellfreie Proteinsynthese ist eine moderne Methode, die zahlreiche Vorteile gegenüber der zellbasierten Expression anbietet. Neben der einfachen Modifikation von Reaktionsbedingungen zum Begünstigen der Proteinfaltung und der geringen Neigung zur Produkttoxizität, zeichnet sich das Verfahren durch die Eignung für Hochdurchsatzstrategien dank des reduzierten Reaktionsvolumens und kürzeren Prozesszeiten aus. *In vitro* Translationssysteme basieren auf früheren Beobachtungen, dass ganze Zellen nicht obligatorisch für eine Proteinsynthese sind. In der Kombination mit extern zugefügten RNA-Template, Aminosäuren und

Energiequelle, kann eine Translation in der einfachsten Form mit rohem Zellysat von einem Organismus durchgeführt werden, der über eine entsprechende translationale Maschinerie, Enzyme, tRNA und Faktoren verfügt (Katzen *et al.* 2005, Yokohama 2003).

Für die MnP Peroxidase aus *P. chrysosporium* wurde bereits ein funktionales Expressionssystem mit dem auf *E. coli* basierten *in vitro* gekoppelten Transkription/Translation System in der Anwesenheit von fungaler Proteindisulfidomerase und Hämin entwickelt. Die Methode ermöglichte es, nach dem Screening einer großen Vielfalt von mutanten Enzymen, die enzymatische H₂O₂ Stabilität der rekombinanten Peroxidase deutlich zu verbessern (Miyazaki-Imamura *et al.* 2003).

Zellfreie Technologien für eine Proteinsynthese werden intensiv entwickelt und sind geeignet für ein schnelles Screening, standardisierte Produktion von markierten Proteinen und Automatisierung der Proteinexpression und Aufreinigung.

1.5 Zielsetzung

Aufgrund des steigenden Bedarfs an Biokatalysatoren für unterschiedliche Anwendungsgebiete gewinnen höhere Pilze als vielversprechende neue Enzymquellen zunehmend an Bedeutung (Bouws *et al.* 2008). Die technologisch wichtigen Enzyme aus Basidiomyceten lassen sich oft nur mit zeit- und kostenaufwändigen Verfahren isolieren, wobei die niedrigen Konzentrationen an Zielsubstanzen einen wirtschaftlichen Einsatz dieser Biokatalysatoren in der Industrie erschweren. Zurzeit ist nur eine sehr begrenzte Anzahl von Pilzenzymen kommerziell verfügbar, wie Glucose-Oxidase aus *Aspergillus niger* oder Hexose-Oxidase aus *Chondrus crispus*.

Abgesehen von dem hohen Potenzial der heterologen Expression zur Produktion großer Mengen wertvoller Enzyme, sollten in dieser Arbeit für die MsP2-Peroxidase aus *Marasmius scorodonius* und die Lip2-Carboxylesterase aus *Pleurotus sapidus* geeignete Expressionssysteme gefunden werden. In einem Screening sollte für jedes der Enzyme sowohl ein passender Wirtstamm als auch ein Expressionsvektor etabliert werden. Anschließend sollten die Kulturbedingungen optimiert werden, um die Ausbeute an Zielprotein zu maximieren und nach Aufreinigung das reine Protein in aktiver Form zu erhalten.

2 Functional expression of the lipase gene Lip2 of *Pleurotus sapidus* in *Escherichia coli* (Zelena, K., Krügener, S., Lunkenbein, S., Zorn, H., Berger, R.G. *Biotechnol. Lett.* 2009, 31, 395-401)

2.1 Abstract

The lipase Lip2 of the edible basidiomycete *Pleurotus sapidus* is an extra-cellular enzyme capable of hydrolysing xanthophyll esters with high efficiency. The gene encoding Lip2 was expressed in *Escherichia coli* TOP10 using the gene III signal sequence to accumulate proteins in the periplasmic space. The heterologous expression under control of the araBAD promoter led to the high level production of recombinant protein, mainly as inclusion bodies, but partially in soluble and active form. A fusion with a C-terminal His-tag was used for purification and immunochemical detection of the target protein. This is the first example of a heterologous expression and periplasmic accumulation of a catalytically active lipase from a basidiomycete fungus.

Keywords: Basidiomycete; *Escherichia coli*; Heterologous expression; Lipase.

The fulltext is protected by copyright of Springer Science+Business Media.

3 Heterologous expression of the *mSP2* gene from *Marasmius scorodoni* (Zelena, K., Zorn, H., Nimtz, M., Berger, R.G. Arch. Microbiol. 2009, 191, 397-402)

3.1 Abstract

For the heterologous expression of the *mSP2* gene from the edible mushroom *Marasmius scorodoni* in *Escherichia coli* the cDNA encoding the extracellular Msp2 peroxidase was cloned into pBAD III expression plasmid. Expression of the protein with or without signal peptide was investigated in *E. coli* strains TOP10 and LMG194. Different PCR products were amplified for expression of the native target protein or a modified polypeptide. Omitting the native stop codon and addition of six His-residues resulted in a fusion protein amenable to immune detection and purification by immobilised metal affinity chromatography (IMAC). In *E. coli* the recombinant protein was produced in high yield as insoluble inclusion bodies. The influence of different parameters on MsP2 refolding was investigated. Active enzyme was obtained by glutathione-mediated oxidation in a medium containing urea, Ca²⁺, and hemin.

Keywords: basidiomycete; *E. coli*; heterologous expression; *in vitro* refolding; peroxidase.

The fulltext is protected by copyright of Springer Science+Business Media.

4 Zusammenfassung

Weißfäulepilze als potente Quelle von einzigartigen Hydrolasen und Oxidoreduktasen sind gegenwärtig von großem Interesse für unterschiedliche Bereiche wie Papier- und Lebensmittelindustrie, Pharmazie und Kosmetikproduktion.

Die Lipase Lip2 aus *Pleurotus sapidus* ist eines der wenigen Enzyme, welche die Hydrolyse von Xanthophyllestern zu den freien Xanthophyllen katalysieren, die ihre breite Anwendung als Farbstoffe und Antioxidantien finden. Konventionelle Methoden zur Gewinnung freier Xanthophylle von ihren Ester-Precursoren resultieren in der Bildung von Nebenprodukten und stellen hohe Anforderungen bezüglich der Sicherheit und Abfallentsorgung.

Eine neue extracelluläre Peroxidase MsP2 aus *Marasmius scorodoni* katalysiert Carotenoid-Abbau und gehört zu einer seltenen Gruppe der bei höheren Pilzen produzierten farbstoffentfärbenden Peroxidasen. Der niedrige Expressionsgrad lignolytischer Enzyme solcher Art beschränkt ihre Isolierung, Charakterisierung und technische Anwendung.

Die für die Lip2 aus *Pleurotus sapidus* und die MsP2 aus *Marasmius scorodoni* kodierenden Gene wurden unter Anwendung des pBAD-Vektors mit der *gene III* Signalsequenz für die periplasmatische Akkumulation des Zielproteins in *Escherichia coli* exprimiert. Eine Fusion der Zielgene mit einem C-terminalen His-tag wurde für die Aufreinigung und immunochemische Detektion der Zielproteine verwendet. Die periplasmatische Expression von der Lip2 lieferte lösliches Protein, aber die Methode erfordert weitere Entwicklungen zur Steigerung der Ausbeute des aktiven Katalysators. MsP2 wurde in hoher Menge als unlösliche *inclusion bodies* produziert.

Ein aktives Enzym wurde in einem Glutathion_{ox}⁻, Harnstoff-, Ca²⁺- und Häminhaltigen Renaturierungsmedium erzielt.

Schlüsselbegriffe: Basidiomycet; *Escherichia coli*; heterologe Expression; *in vitro* Rekonstitution; Lipase; Peroxidase.

5 Summary

White-rot fungi as a potent source of unique hydrolases and oxidoreductases are currently of special interest for different areas such as feed, food, pharmaceutical, and cosmetics industries.

The lipase Lip2 from *Pleurotus sapidus* is one of few enzymes catalysing the hydrolysis of xanthophyll esters to free xanthophylls which are widely used as colorants and antioxidants. The conventional method to liberate free xanthophylls from their ester precursors results in the formation of side products and imposes high requirements concerning safety issues and waste disposal.

The new extracellular peroxidase MsP2 from *Marasmius scorodonius* catalyses the degradation of carotenoids and belongs to the rare group of the dye-decolorizing peroxidases produced by higher fungi. The low expression levels of such lignolytic enzymes limit their isolation, characterisation, and technical application.

The genes encoding Lip2 from *Pleurotus sapidus* and MsP2 from *Marasmius scorodonius* were expressed in *Escherichia coli* using a pBAD vector with the gene III signal sequence to accumulate proteins in the periplasmic space. A fusion with a C-terminal His-tag was used for purification and immunochemical detection of the target proteins. The periplasmic expression of Lip2 has delivered a certain amount of soluble protein, but the method requires further development to increase the level of active catalyst. MsP2 was produced in high yield as insoluble *inclusion bodies*. Active enzyme was obtained in a renaturation medium containing glutathione_{ox}, urea, Ca²⁺, and hemin.

Keywords: basidiomycete; *Escherichia coli*; heterologous expression; *in vitro* refolding; lipase; peroxidase.

6 Literaturverzeichnis

Abdel-Fattah, Y.R. and Gaballa, A.A. (2008) Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*. Microbiol. Res.163, 13-20.

Alam, M., Ho, S., Vance, D.E., Lehner, R. (2002) Heterologous expression, purification, and characterization of human triacylglycerol hydrolase. Prot. Expr. Purif. 24, 33-42.

Antoniukas, L., Grammel, H., Reichl, U. (2006) Production of hantavirus Puumala nucleocapsid protein in *Saccharomyces cerevisiae* for vaccine and diagnostics J. Biotechnol. 124, 347-362.

Aoyama, S., Yoshida, N., Inouye, S. (1988) Cloning, sequencing and expression of the lipase gene from *Pseudomonas-fragi* IFO-12049 in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 242, 36-40.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Struhl, K. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, 2005.

Bajpai, P. Anand, A., Bajpai, P.K., El-Gewely, M.R. (2006) Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. Biotechnol. Annu. Rev. 12, 349-378.

Bancerz, R. and Ginalska, G. (2007) A novel thermostable lipase from basidiomycete *Bjerkandera adusta* R59: characterisation and esterification studies. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34, 553-560.

Baneyx F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Curr. Opin. Biotechnol. 10, 411-421.

- Blank, K., Morfill, J., Gump, H., Gaub, H.E. (2006) Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. J. Biotechnol. 125, 474-483.
- Boeke, J.D. and Model, P. (1982) A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminus of bacteriophage f1 Gene III protein retains it in the membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 5200-5204.
- Bornscheuer, U.T. (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiol. Rev. 26, 73-81.
- Bouws, H., Wattenberg, A., Zorn, H. Fungal secretomes – nature’s toolbox for white biotechnology. (2008) Appl. Microbiol. Biotechnol. 80, 381-388.
- Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, W.N., Moulin, G., Bigey, F., Dubreucq, E. (2004) High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. J. Biotechnol. 111, 41-50.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Rev. 24, 45-66.
- Chang, S.W., Lee, G.C., Shaw, J.F. (2006) Efficient production of active recombinant *Candida rugosa* LIP3 lipase in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified enzyme. J. Agric. Food Chem. 54, 5831-5838.
- Cohen, R., Persky, L., Hadar, Y. (2002) Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 582–594.
- Conesa, A., Jeenes, D., Archer, D.B., van den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J. (2002a) Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 846-851.

Conesa, A., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J. (2002b) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J. Biotechnol.* 93, 143-158.

Conesa, A., van de Velde, F., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., van den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J. (2001) Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *J. Biol. Chem.* 276, 17635-17640.

Conesa, A., van den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J. (2000) Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3016-3023.

Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L., Valero, F. (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb. Cell Fact.* 5, 17-37.

Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J.Y, Higgins, D.R. (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16, 23-52.

Daly, R. and Hearn, M.T.W. (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18, 119-138.

DeAngelis, Y.M., Saunders, C.W., Johnstone, K.R., Reeder, N.L, Coleman, C.G., Kaczvinsky, J.R., *et al.* (2007) Isolation and expression of a *Malassezia globosa* lipase gene, LIP1. *J. Investig. Dermatol.* 127, 2138-2146.

Di Lorenzo, M., Hidalgo, A., Haas, M., Bornscheuer, U.T. (2005) Heterologous production of functional forms of *Rhizopus oryzae* lipase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8974-8977.

DiMiceli, L., Pool, V., Kelso, J.M., Shadomy, S.V., Iskander, J., Team, V.A.E.R.S. (2006) Vaccination of yeast sensitive individuals: review of safety data in the US vaccine adverse event reporting system (VAERS). *Vaccine* 24, 703-707.

Doyle, W.A. and Smith, A.T. (1996) Expression of lignin peroxidase H8 in *Escherichia coli*: folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and haem. *Biochem. J.* 315, 15-19.

Du, W., Li, W., Sun, T., Chen, X., Liu, D.H. (2008) Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 331-337.

Eibes, G.M., Lú-Chau, T.A., Ruiz-Dueñas, F.J., Feijoo, G., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Lema, J.M. (2009) Effect of culture temperature on the heterologous expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Aspergillus* hosts. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32, 129-134.

Feofilova, E.P. (1998) Current trends in studies of biologically active substances of basidial fungi. *Appl. Biochem. Microbiol.* 34, 541-550.

Fernandez, L., Perez-Victoria, I., Zafra, A., Benitez, P.L., Morales, J.C, Velasco, J., Adrio, J.L. (2006) High-level expression and characterization of *Galactomyces geotrichum* (BT107) lipase I in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 49, 256-264.

Fu, J.-H., Yao, B., Yang, H.-M., Huang, H.-Q., Shi, Y.-H. (2007) Cloning and expression of cold-adapted lipase gene from *Geotrichum candidum* ch-3 in *Pichia pastoris*. *Shengwu Jishu Zazhi Bianjibu* 17, 25-29.

Gellissen, G. and Hollenberg, C.P. (1997) Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. *Gene* 190, 87-97.

Gellissen, G., Melber, K., Janowicz, Z.A., Dahlems, U.M., Weydemann, U., Piontek, M. *et al.* (1992) Heterologous protein production in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek* 62, 79-93.

Georgiu, G. and Valax, P. (1996) Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 190-197.

Ghosh, S., Parvez, M.K., Banerjee, K., Sarin, S.K., Hasnain, S.E. (2002) Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. *Mol. Ther.* 6, 5-11.

Giniger, E., Varnum, S.M., Ptashne, M. (1985) Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40, 767-774.

Glenn, J.K. and Gold, M.H. (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1741-1747.

Gu, L., Lajoie, C., Kelly, C. (2003) Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* 19, 1403-1409.

Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 763-781.

Gupta, R., Rathi, P., Bradoo, S. (2003) Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 43, 635-644.

Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter, *J. Bacteriol.* 177, 4121-4130.

- Hädrich-Meyer, S. and Berger, R.G. (1994). Localization of lipolytic and esterolytic activities in *Tyromyces sambuceus*, a 4-decanolide-producing basidiomycete. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 210–214.
- Higson, F.K. (1991) Degradation of xenobiotics by white rot fungi. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 122, 111-152.
- Huge-Jensen, B., Andreasen, F., Christensen, T., Christensen, M., Thim, L., Boel, E. (1989) *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is processed and secreted from transformed *Aspergillus oryzae*. Lipids 24, 781-785.
- Imamura, S., Hirayama, T., Arai, T., Takao, K., Misaki, H. (1989) An enzymatic method using 1,2-Diglyceride for pancreatic lipase test in serum. Clin. Chem. 35, 1126.
- Innis, M.A., Holland, M.J, McCabe, P.C., Cole, G.E., Wittman, V.P., Tal, R. *et al.* (1985) Expression, glycosylation, and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. Science 228, 21-26.
- Joerger, R.D. and Haas, M.J. (1993) Overexpression of a *Rhizopus delemar* lipase gene in *Escherichia coli*. 28, Lipids 81-88.
- Johnson, T.M. and Li, J.K. (1991) Heterologous expression and characterization of an active lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* using recombinant baculovirus. Arch. Biochem. Biophys. 291, 371-378.
- Johnson, T.M., Pease E.A., Li, J.K. Tien, M. (1992) Production and characterization of recombinant lignin peroxidase isozyme H2 from *Phanerochaete chrysosporium* using recombinant baculovirus. Arch. Biochem. Biophys. 296, 660-666.

Jonasson, P., Liljequist, S., Nygren, P-A., Ståhl, S. (2002) Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 91-105.

Joosten, V., Roelofs, M.S., van den Dries, N., Goosen, T., Verrips, C.T., van den Hondel, C.A.M.J.J., Lokman B.C. (2005) Production of bifunctional proteins by *Aspergillus awamori*: llama variable heavy chain antibody fragment (V-HH) R9 coupled to *Arthromyces ramosus* peroxidase (ARP). *J. Biotechnol.* 120, 347-359.

Joseph, B., Ramteke, P.W., Thomas. G. (2008) Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol. Adv.* 26, 457-470.

Kang, C.Y. (1997) Expression of human immunodeficiency virus genes using baculovirus expression system. *Mol. Biotechnol.* 8, 173-187.

Katzen, F., Chang, G., Kudlicki, W. (2005) The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol.* 23, 150-156.

Kim, K.R., Kwon, D.Y., Yoon, S.H., Kim, W.Y., Kim, K.H. (2005) Purification, refolding and characterization of recombinant *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Protein Expr. Purif.* 39, 124-129.

Kim, M.H., Kim, H.K., Lee, J.K., Park, S.Y., Oh, T.K. (2000) Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*: high-level production, purification, and calcium-dependent thermostability. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 64, 280-286.

Kim, S.J. and Shoda, M. (1999) Purification and characterisation of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1029-1035.

- Kitaura, S., Suzuki, K., Imamura, S. (2001) Monoacylglycerol lipase from moderately thermophilic *Bacillus* sp. strain H-257: Molecular cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the gene. *J. Biochem.* 129, 397-402.
- Kojo, H., Greenberg, B.D., Sugino, A. (1981) Yeast 2- μ m plasmid DNA replication *in vitro* — origin and direction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7261-7265.
- Krügner, S., Zelena, K., Zorn, H., Nimtz, M., Berger, R.G. (2009) Heterologous expression of an extra-cellular lipase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57, 16-21.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Le, H.V. and Trotta, P.P. (1991) Purification of secreted recombinant proteins from *Escherichia coli*. *Bioprocess. Technol.* 12, 163-181.
- Lee, N., Francklyn, C., Hamilton, E.P. (1987) Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84, 8814-8818.
- Leisola, M.S.A., Kozulic, B., Meussdoerffer, F., Fiechter, A. (1987) Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. 262, 419-424.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.-G., Ilangovan, K., Suzara, V.V, Düzgüneş N, Renugopalakrishnan, V. (2007) Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142, 105-124.
- Lin, Q.Y., Li, J.K.K., Lam, H.Y.P. (1997) Improved heterologous expression of the white-rot fungal ligninase H8 by crossover linker mutagenesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66, 269-279.

- Linke, D., Bouws, H., Peters, T., Nimtz, M., Berger, R.G., Zorn, H. (2005a) Laccases of *Pleurotus sapidus*: characterization and cloning. J. Agric. Food Chem. 53, 9498-9505.
- Linke, D., Zorn, H., Gerken, B., Parlar, H., Berger, R.G. (2005b) Foam fractionation of exo-lipases from a growing fungus (*Pleurotus sapidus*). Lipids 40, 323-327.
- Lokman, B.C., Joosten, V., Hovenkamp, J., Gouka, R.J., Verrips, C.T., van den Hondel, C.A.M.J.J. (2003) Efficient production of *Arthromyces ramosus* peroxidase by *Aspergillus awamori*. J. Biotechnol. 103, 183-190.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Lucas, M., Mertens, V., Corbisier, A.M., Vanhulle, S. (2008) Synthetic dyes decolourisation by white-rot fungi: development of original microtitre plate method and screening. Enzyme Microb. Technol. 42, 97-106.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast 22, 249-270.
- Markides, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 60, 512-538.
- Martínez, A.T. (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. Enzyme Microb. Technol. 30, 425-444.
- Miyazaki-Imamura, C., Oohira, K., Kitagawa, R., Nakano, H., Yamane, T., Takahashi, H. (2003) Improvement of H₂O₂ stability of manganese peroxidase by combinatorial mutagenesis and high-throughput screening using in vitro expression with protein disulfide isomerase. Protein Eng. 16, 423-428.

- Monfort, A., Blasco, A., Sanz, P., Prieto, J.A.(1999) Expression of LIP1 and LIP2 genes from *Geotrichum* species in baker's yeast strains and their application to the bread-making process. J. Agric. Food Chem. 47, 803-808.
- Montesinos, J.L., Dalmau, E., Casas, C. (2003) Lipase production in continuous culture of *Candida rugosa*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 78, 753-761.
- Morawski, B., Lin, Z.L., Cirino, P.C., Joo, H., Bandara, G., Arnold, F.H. (2000) Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. Protein Eng. 13, 377-384.
- Mormeneo, M., Andrés, I., Bofill, C., Díaz, P., Zueco, J. (2008) Efficient secretion of *Bacillus subtilis* lipase A in *Saccharomyces cerevisiae* by translational fusion to the Pir4 cell wall protein Appl. Microbiol. Biotechnol. 80, 437-445.
- Nair, N.G., Holley, M.P., Song, C.H., Cho, K.Y. (1990). Lipid metabolism of *Pleurotus sajor caju*. Ann. Appl. Biol. 116, 455–462.
- Nie, G., Reading, N.S., Aust, S.D. (1998) Expression of the lignin peroxidase H2 gene from *Phanerochaete chrysosporium* in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 249, 146-150.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T. (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol. Appl. Biochem. 29, 119-131.
- Pant, D. and Adholeya, A. (2007) Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewater by fungi under solid state fermentation. Biodegradation 18, 647-659.

- Pease, E.A., Aust, S.D., Tien, M. (1991) Heterologous expression of active manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* using the baculovirus expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 897-903.
- Pelaez, F., Martínez, M.J., Martínez, A.T. (1995) Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol. Res.* 99,37-42.
- Pérez-Boada, M., Doyle, W.A., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Smith, A.T. (2002) Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of in vitro folding. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 518-524.
- Pfeffer, J., Rusnak, M., Hansen, C.E., Bel Rhlid, R.B., Schmid, R.D., Maurer, S.C. (2007) Functional expression of lipase A from *Candida antarctica* in *Escherichia coli* – A prerequisite for high-throughput screening and directed evolution. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 45, 62-67.
- Pickard, M.A. and Hashimoto, A. (1982) Isoenzymes of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Can. J. Microbiol.* 28, 1382-1388.
- Quang, D.N, Hashimoto, T., Asakawa, Y. (2006) Inedible mushrooms: a good source of biologically active substances. *Chem. Rec.* 6, 79-99.
- Reddy, C.A.and D'Souza, T.M. (1994) Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 137-152.
- Resina, D., Serrano, A., Valero, F., Ferrer, P. (2004) Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *J. Biotechnol.* 109, 103-113.

- Rotticci-Mulder, J.C., Gustavsson, M., Holmquist, M., Hult, K., Martinelle, M. (2001) Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Protein Expr. Purif.* 21, 386-392.
- Roustan, J.L., Chu, A.R., Moulin, G., Bigey, F. (2005) A novel lipase/acyltransferase from the yeast *Candida albicans*: expression and characterisation of the recombinant enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 203-212.
- Rúa, M.L., Atomi, H., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R.D. (1998) High-level expression of the thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus* in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 405-410.
- Rudolph, R. and Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10, 49-56.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Aguilar, A., Martínez, J.M., Zorn, H., Martínez, A.T. (2007) Gene cloning, heterologous expression, *in vitro* reconstitution and catalytic properties of a versatile peroxidase. *Biocatal. Biotransform.* 25, 276-285.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T. (1999) Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* 31, 223-235.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez, M., Prim, N., Rández-Gil, F., Pastor, F. I. J., Diaz, P. (2002) Engineering of baker's yeasts, *E. coli* and *Bacillus* hosts for the production of *Bacillus subtilis* lipase A. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 339-345.

Sánchez, C. (2004) Modern aspects of mushroom culture technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 756-762.

Sawai-Hatanaka, H., Ashikari, T., Tanaka, Y., Asada, Y., Nakayama, T., Minakata, H. *et al.* (1995) Cloning, sequencing, and heterologous expression of a gene coding for *Arthromyces ramosus* peroxidase. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 59, 1221-1228.

Scheibner, M. (2006) Identifizierung und Charakterisierung carotinoidabbauender Enzyme aus Basidiomyceten. Dissertation, Leibniz University Hannover.

Scheibner, M., Hülsdau, B., Zelena, K., Nimtz, M., de Boer, L., Berger, R.G., Zorn, H. (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodonius* degrade β -carotene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1241-1250.

Schmidt-Dannert, C. (1999) Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorg. Med. Chem.* 7, 2123-2130.

Shoda, M. (2003) Characteristics of a newly isolated fungus *Geotrichum candidum* Dec 1 with broad degradation spectrum of xenobiotic compounds. *Commun. Agric. Appl. Biol Sci.* 68, 269-274.

Shu, Z.Y, Yan, Y.J., Yang, J.K, Xu, L. (2007a) *Aspergillus niger* lipase: gene cloning, over-expression in *Escherichia coli* and in vitro refolding. *Biotechnol. Lett.* 29, 1875-1879.

Shu, Z.Y, Yang, J.K, Xu, L., Y, Yan, Y.J. (2007b) Cloning of the lipase gene of *Aspergillus niger* F044 and its expression in *Pichia pastoris*. *Wuhan Daxue Xuebao* 53, 204-208.

Siegele, D.A. and Hu, J.C. (1997) Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Microbiol. 94, 8168-8172.

Sigle R.O. (1993) Expression of chloroperoxidase for site-specific mutagenesis. In: Department of Biochemistry. University of Illinois, Urbana-Champaign, IL, 144.

Song, H.T., Jiang, Z.B., Ma, L.X. (2006) Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS 2.1216. Protein Expr. Purif. 47, 393-397.

Stewart, P., Whitwam, R.E., Kersten, P.J., Cullen, D., Tien, M. (1996) Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*. Appl. Environ. Microbiol. 62, 860-864.

Sugano, Y., Ishii, Y., Shoda, M. (2004) Role of H164 in a unique dye-decolorizing heme peroxidase DyP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 322, 126-132.

Sugano, Y., Nakano, R., Sasaki, K., Shoda, M. (2000) Efficient heterologous expression in *Aspergillus oryzae* of a unique dye-decolorising peroxidase, DyP, of *Geotrichum candidum* Dec 1. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1754-1758.

Sutherland, G.R.J., Haselbach, J., Aust, S.D. (1997) Biodegradation of crosslinked acrylic polymers by a white-rot fungus. Environ. Sci. Pollut. Res. 4, 16-20.

Tamalampudi, S., Talukder, M.D.M.R., Hama, S., Tanino, T., Suzuki, Y., Kondo, A., Fukuda, H. (2007) Development of recombinant *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst expressing lipase-encoding gene from *Candida antarctica*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75, 387-395.

Thomas, L. and Crawford, D.L. (1998) Cloning of clustered *Streptomyces viridosporus* T7A lignocellulose catabolism genes encoding peroxidase and

endoglucanase and their extracellular expression in *Pichia pastoris*. *Can. J. Microbiol.* 44, 364-372.

Thomas, P.E., Ryan, D., Levin, W. (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 75, 168-176.

Thongekkaew, J. and Boonchird, C. (2007) Molecular cloning and functional expression of a novel extracellular lipase from the thermotolerant yeast *Candida thermophila*. *FEMS Yeast Res.* 7, 232-243.

van de Velde, F., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. (2001) Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. *Trends Biotechnol.* 19, 73-80.

Wang, H., Lu, F., Sun, Y., Du, L. (2004) Heterologous expression of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia methanolica*. *Biotechnol. Lett.* 26, 1569-1573.

Wasser, S.P. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 258-274.

Watanabe, I., Koishi, R., Yao, Y., Tsuji, T., Serizawa, N. (1999) Molecular cloning and expression of the gene encoding a phospholipase A(1) from *Aspergillus oryzae*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 63, 820-826.

Welinder, K.G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 388-393.

Whitwam, R. and Tien, M. (1996) Heterologous expression and reconstitution of fungal Mn peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 439-446.

Wulfing, C. and Plückthun, A. (1994) Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 12, 685-692.

Xu, Y.L., Lewis, D., Chou, C.P. (2008) Effect of folding factors in rescuing unstable heterologous lipase B to enhance its overexpression in the periplasm of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 1035-1044.

Yang, X.X., Lin, X.Z., Fan, T.J, Bian, J., Huang, X.H. (2008) Cloning and expression of lipP, a gene encoding a cold-adapted lipase from *Moritella* sp. 2-5-10-1. *Curr. Microbiol.* 56, 194–198.

Yin, J., Li, G., Ren, X., Herrler, G. (2007) Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.* 127, 335-347.

Yokoyama, S. (2003) Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Cur. Opin. Chem. Biol.* 7, 39-43.

Zelena, K., Zorn, H., Nimtz, M., Berger, R.G. (2009) Heterologous expression of the *msp2* gene from *Marasmius scorodonius*. *Arch. Microbiol.* 191, 397-402.

Zhang, J.W. and Zeng, R.Y. (2008) Molecular cloning and expression of a cold-adapted lipase gene from an antarctic deep sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 7323. *Mar. Biotechnol.* 10, 612-621.

Zhao, W., Wang, J.W., Deng, R.Q., Wang, X.Z. (2008) Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 189-195.

Zorn, H., Bouws, H., Takenberg, M., Nimitz, M., Getzlaff, R., Breithaupt, D., Berger, R.G. (2005) An extra-cellular carboxylesterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyses xanthophyll esters. Biol. Chem. 386, 435-440.

Zorn, H., Breithaupt, D.E., Takenberg, M., Schwack, W., Berger, R.G. (2003) Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. Enzyme Microb. Technol. 32, 623-628.

Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimitz, M., Berger, R.G. (2003a) A peroxidase from *L. irina* cleaves β,β -carotene to flavour compounds. Biol. Chem. 384, 1049-1056.

Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Berger, R.G. (2003b) Cleavage of β,β -carotene to flavour compounds by fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 62, 331-336.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Zelena, Kateryna
Anschrift	Im Wölpfelde, 30519 Hannover
Geburtsdatum, -ort	22.06.1972, Odessa, Ukraine

Schulbildung

1979-1989	Allgemeinbildende Schule in Odessa
	Abschluss: Hochschulreife

Bildungsweg

1989-1994	Staatliche Universität „I.I. Metschnikov“, Odessa, Fakultät Chemie. Fachrichtung: Analytische Chemie Abschluss: Diplom. Berufsbezeichnung: Chemikerin. Lehrerin Angerechnet im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien in Niedersachsen als Prüfung im Unterrichtsfach Chemie
2001-2002	Teilnahme am Intensiv-Deutschkurs, Koordinationsbüro Arbeit und Leben/VHS Hannover Abschluss: Zeugnis Zentrale Mittelstufeprüfung

Teilnahme am Intensiv-Deutschkurs, Gemeinnütziges
Bildungswerk Niedersachsen des Deutschen
Gewerkschaftsbundes e.V.

Abschluss: Zeugnis Zentrale Deutsche Sprachprüfung

2002-2004

Masterstudiengang Analytische Chemie,

Fachbereich Chemie, Leibniz Universität Hannover

Abschluss: Master of Science

Berufserfahrung

1994-1997

Institut für Analytische Chemie, Staatliche Universität

„I.I. Metschnikov“, Odessa

Assistentin

1998-1999

Firma „Eurosystems GmbH“, Odessa

Chef-Sekretärin

1999-2001

Labor für Umweltschutz- und Qualitätskontrolle,

„Kabelwerk GmbH“, Odessa

Ingenieurin

2005-2009

Institut für Lebensmittelchemie Leibniz Universität Hannover

Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Hannover, 12.03.2009