

**Heterologe Produktion
basidiomycetischer Peptidasen
zur Reduktion von Speisesalz
in Lebensmitteln**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
von
Kirsten Vorwerk, M.Sc.

2022

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Ralf G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 29.06.2022

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat im Institut für Lebensmittelchemie zu promovieren. Ich möchte mich für eine sehr gute wissenschaftliche Betreuung mit anregenden und konstruktiven Diskussionen bedanken. Außerdem möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen und den gewährten Freiraum bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und Herrn Prof. ALP Dr. oec. Troph. Andreas Hahn (Institut für Lebensmittelwissenschaften und Humanernährung, Leibniz Universität Hannover) für die Bereitschaft, den Vorsitz meiner Disputation zu übernehmen, danken.

Außerdem möchte ich mich für die Ermöglichung der Förderung des Projektes „Salzgeschmack verstärkende Peptide aus enzymatisch gewonnenen Proteinhydrolysaten“ (BMEL, 281A201316) und die finanzielle Unterstützung bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. Ulrich Krings und natürlich Frau Dr. Franziska Ersoy. Ihr hattet stets eine offene Tür oder Zeit für ein ausgiebiges Telefonat. Danke für viele anregende Gespräche und wertvolle Tipps, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben!

Natürlich gilt ein besonderer Dank auch allen Kolleginnen und Kollegen, die mich während meiner Zeit am LCI begleitet haben. Danke für die gemeinsame Zeit, die hervorragende Arbeitsatmosphäre und natürlich für viele unvergessliche Momente.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Projektpartner Henning Diestelhorst, sowie den BachelorstudentInnen Till Redeker, Simon Prohl, Niklas Friedhoff und Karla Reinicke für die großartige Zusammenarbeit und das Mitwirken an dieser Arbeit bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung jeglicher Art bedanken. Danke für euer entgegengebrachtes Vertrauen sowie den moralischen und seelischen Beistand der letzten Jahre.

Zusammenfassung

In der Vergangenheit rückte das Thema eines überhöhten Salzkonsums und damit einhergehend verschiedener chronischer Erkrankungen in den Fokus der Wissenschaft. Enzyme wie Hydrolasen und speziell Peptidasen werden bereits industriell eingesetzt, da sie keine Cofaktoren benötigen, oft bei hohen pH-Werten stabil sind und eine breite Spaltspezifität haben. Eine neue Anwendung von Peptidasen könnte die Generierung von L-Arginyldipeptiden sein. Diese Dipeptide haben keinen Eigengeschmack, sind aber in der Lage, den vorhandenen Salzgeschmack zu intensivieren. Um diese Dipeptide zu generieren, sollten in der vorliegenden Arbeit arginylspezifische Peptidasen aus Basidiomyceten isoliert und identifiziert werden.

Zunächst wurden verschiedene Peptidasegene aus *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* und *Schizophyllum commune* isoliert und in *Escherichia coli* bzw. *Komagataella phaffii* exprimiert. Eine Serinpeptidase (ABB73029) aus *P. chrysosporium* sowie eine Aspartatpeptidase aus *T. versicolor* (EIW62808) wurden erfolgreich gereinigt. Aktivitätsassays zeigten, dass es sich bei der Aspartatpeptidase nicht um eine arginylspezifische Peptidase handelt, während die Schnittstellenanalyse für die Serinpeptidase aus *P. chrysosporium* auf eine Exopeptidase hindeutet.

In einem zweiten Ansatz wurden 29 Basidiomyceten in Minimalmedium mit 1 % Gluten über einen Zeitraum von 24 Tagen kultiviert und hinsichtlich ihrer Endo- und Exopeptidaseaktivität untersucht. Von den 29 Pilzen wurden insgesamt fünf interessante Spezies mit arginylspezifischer Peptidaseaktivität ausgewählt, darunter *Agrocybe aegerita*, *Fomitopsis pinicola*, *Flammulina velutipes*, *Hypholoma sublateritium* und *Pleurotus eryngii*. Nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels Größenausschlusschromatographie, wurden aktive Fraktionen mit dem Substrat Casein inkubiert und die Spaltprodukte analysiert. Nur für Peptidasen aus *A. aegerita*, *F. velutipes* und *P. eryngii* wurden Schnittstellen detektiert. Da neben arginylspezifischen Schnittstellen auch ein hoher Anteil unerwünschter Exopeptidaseschnittstellen ermittelt wurde, handelt es sich bei den Enzymen vermutlich um Exopeptidasen anstatt arginylspezifische Peptidasen.

Die Generierung salzgeschmackverstärkender Dipeptide sollte final mit Hilfe einer Dipeptidylpeptidase V (DPPV) aus *Pleurotus floridanus* erfolgen. PfIDPPV wurde heterolog in *E. coli* produziert und zeigte Optima bei pH 8,5 und 60 °C gegenüber dem Substrat H-L-Ala-L-Ala-*para*-Nitroanilin. Zudem wurde die Aktivität durch keinen Peptidaseinhibitor vollständig inhibiert.

Schlagnworte: Basidiomyceten, Dipeptidylpeptidase, heterologe Expression, L-Arginyldipeptide, Peptidasen, *Pleurotus floridanus*, Salzgeschmackverstärker

Abstract

In the past, the topic of excessive salt consumption associated with various chronic diseases became a focus of nutritional science. Enzymes such as hydrolases and specifically peptidases are widely used in industry since they do not require cofactors, are often stable at high pH values, and have a broad cleavage specificity. Thus, a new approach to use peptidases would be the generation of L-arginyl dipeptides, which do not have a taste on their own, but are able to enhance the salty taste. This thesis should focus on the isolation and characterisation of arginyl-specific peptidase genes from basidiomycetes to generate these dipeptides.

First, various peptidase genes from *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Schizophyllum commune* were isolated and expressed in *Escherichia coli* or *Komagataella phaffii*. The serine (ABB73029) peptidase from *P. chrysosporium* and the aspartate peptidase from *T. versicolor* (EIW62808) were successfully purified. Activity assays showed that the aspartate peptidase from *T. versicolor* is not an arginyl-specific peptidase, while the analysis of cleavage sites indicates that the serine peptidase from *P. chrysosporium* is an exopeptidase. Next, 29 basidiomycetes were cultivated over 24 days in minimal medium with 1 % gluten and analysed regarding their endo- and exopeptidase activity. Out of 29 fungi, five interesting species with arginyl-specific peptidase activity were chosen, namely *Agrocybe aegerita*, *Fomitopsis pinicola*, *Flammulina velutipes*, *Hypholoma sublateritium* and *Pleurotus eryngii*. After purification of the culture supernatant using size exclusion chromatography, active fractions were used to hydrolyse the substrate casein, and cleavage products were analysed. Cleavage sites were only detected for *A. aegerita*, *F. velutipes* and *P. eryngii*. Beside arginyl-specific cleavage sites also a high amount of undesired exopeptidase cleavage sites was determined assuming that these peptidases are probably exopeptidases rather than arginyl-specific peptidases.

Generation of salt taste enhancing dipeptides should finally be achieved with a dipeptidyl-peptidase V (DPPV) from *Pleurotus floridanus*. PflDPPV was heterologously produced in *E. coli*, had optima at pH 8.5 and 60 °C and was not completely inhibited by the tested peptidase inhibitors.

Keywords: basidiomycetes, dipeptidylpeptidase, L-arginyl dipeptides, heterologous expression, peptidases, *Pleurotus floridanus*, salt taste enhancer

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Zusammenfassung	II
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XVI
1. Einleitung	1
1.1. Speisesalz in Lebensmitteln	1
1.2. Gesundheitliche Beeinträchtigung durch Speisesalz	1
1.3. Strategien zur Senkung	2
1.3.1. Arginyldipeptide	4
1.4. Peptidasen	5
1.4.1. Peptidasen aus Basidiomyceten	7
1.4.2. Dipeptidylpeptidasen	8
1.5. Heterologe Expressionssysteme	11
1.5.1. <i>Escherichia coli</i>	11
1.5.1.1. Verbesserung der Löslichkeit von Proteinen in <i>E. coli</i>	11
1.5.2. <i>Komagataella phaffii</i>	12
1.5.2.1. Heterologe Expression in <i>K. phaffii</i>	13
1.5.2.2. Sekretion in <i>K. phaffii</i>	14
2. Zielsetzung	15
3. Material und Methoden	16
3.1. Material	16
3.1.1. Chemikalien	16
3.1.2. Vektoren	16
3.1.3. Peptidasegene	16
3.1.4. Primer	18
3.1.5. Organismen	21
3.2. Methoden	23
3.2.1. Kultivierung von Organismen	23
3.2.1.1. Basidiomyeten	23

3.2.1.2.	<i>Escherichia coli</i>	25
3.2.1.2.1.	Transformation von <i>E. coli</i>	26
3.2.1.3.	<i>Komagataella phaffii</i>	26
3.2.1.3.1.	Transformation <i>K. phaffii</i>	28
3.2.2.	Klonierung, Expression und Reinigung	28
3.2.2.1.	RNA Isolation	28
3.2.2.2.	cDNA Synthese	29
3.2.2.3.	Isolierung genomischer DNA	29
3.2.2.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
3.2.2.5.	Touchdown PCR	32
3.2.2.6.	Agarosegelelektrophorese	33
3.2.2.7.	Restriktionsverdau	34
3.2.2.8.	Dephosphorylierung	34
3.2.2.9.	Phosphorylierung	34
3.2.2.10.	DNA Ligation	35
3.2.2.11.	Plasmidisolation und Sequenzierung	35
3.2.3.	Zellaufschluss	35
3.2.3.1.	Precellys	35
3.2.3.2.	Ultraschall	36
3.2.4.	Proteinbiochemische Methoden	36
3.2.4.1.	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	36
3.2.4.2.	Heterologe Expression in <i>K. phaffii</i>	37
3.2.4.3.	Proteinkonzentrationsbestimmung	38
3.2.4.4.	Denaturierende SDS-PAGE und semi-native PAGE	38
3.2.4.5.	Western Blot	40
3.2.4.6.	Zymographie	41
3.2.4.7.	<i>Peptide mass fingerprint</i>	42
3.2.4.8.	Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie (SEC)	44
3.2.4.9.	Reinigung mittels His SpinTrap™-Säulen	45
3.2.4.10.	Reinigung mittels Affinitätschromatographie (Ni ²⁺ -NTA)	45
3.2.4.11.	Schnittstellenspezifität	46
3.2.4.12.	Biochemische Charakterisierung der PfIDPPV	47
3.2.5.	Peptidase Aktivität	48
3.2.5.1.	Azocaseinassay	48

3.2.5.2.	FRET-Assay	49
3.2.5.3.	<i>para</i> -Nitroanilin Assay	50
4.	Ergebnisse	52
4.1.	Klonierungsarbeiten	52
4.1.1.	<i>Trametes versicolor</i>	52
4.1.1.1.	<i>E. coli</i>	52
4.1.1.2.	<i>K. phaffii</i>	54
4.1.2.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	56
4.1.2.1.	<i>E. coli</i>	56
4.1.2.2.	<i>K. phaffii</i>	57
4.1.3.	<i>Schizophyllum commune</i>	60
4.2.	Peptidase Screening	60
4.2.1.	Zymographie	61
4.2.2.	Azocaseinassay	64
4.2.3.	FRET-Assay	64
4.2.4.	Größenausschlusschromatographie (SEC)	66
4.2.5.	Schnittstellenanalyse	67
4.3.	Dipeptidylpeptidase	71
4.3.1.	Biochemische Charakterisierung der PfIDPPV	72
4.3.2.	Einfluss verschiedener Inhibitoren	74
5.	Diskussion	76
5.1.	Klonierungsarbeiten	76
5.1.1.	<i>E. coli</i>	76
5.1.2.	<i>K. phaffii</i>	77
5.1.3.	His-Tag	78
5.1.4.	Sekretion	79
5.2.	Peptidase Screening	80
5.2.1.	pH-Wert	80
5.2.1.	Zymographie	80
5.2.2.	Peptidaseaktivität	81
5.2.3.	Schnittstellenanalyse	82
5.3.	Dipeptidylpeptidase	83
6.	Ausblick	86

7. Literaturverzeichnis	88
8. Anhang	102
8.1. Verwendete Vektoren	102
8.2. DNA und Proteingrößenstandard	103
8.3. Klonierungsarbeiten	104
8.3.1. <i>Trametes versicolor</i>	104
8.3.2. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	107
8.4. Peptidase Screening	109
8.4.1. FRET-Assay	109
8.4.2. Größenausschlusschromatographie (SEC)	113
8.5. Dipeptidylpeptidase	119
9. Lebenslauf	123

Abkürzungsverzeichnis

aU	<i>Arbitrary unit</i> (arbiträre Einheit)
Aae	<i>Agrocybe aegerita</i>
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BCIP/NBT	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat/ <i>para</i> -Nitroblautetrazoliumchlorid
BMMY	<i>Buffered methanol complex medium</i> (gepuffertes Minimalmedium mit Methanol)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
cDNA	Komplementäre DNA
<i>cspA</i>	<i>cspA</i> Promotor (<i>cold-shock protein A</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPP	Dipeptidylpeptidase
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E-64	N-(trans-Epoxysuccinyl)-L-leucin-4-guanidinobutylamid
EC	<i>Enzyme commission</i> (Enzymklassifizierung)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Exo	Exopeptidaseschnittstellen
Exo R	Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung der Aminosäure Arginin führen
Fpi	<i>Flammulina velutipes</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i> (schnelle Proteinflüssigchromatographie)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FU	<i>Fluorescence unit</i> (Fluoreszenzeinheit)
Fve	<i>Fomitopsis pinicola</i>
gDNA	Genomische DNA
Gfr	<i>Grifola frondosa</i>
Glu-C	Glutamylspezifische Endopeptidase von <i>Staphylococcus aureus</i> V8

GRAS	<i>Generally recognized as safe</i> (allgemein als sicher anerkannt)
HK	Hauptkultur
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hsu	<i>Hypholoma sublateritium</i>
IAA	Iodacetamid
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k. A.	Keine Angaben
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LAL	L-Aminosäure Ligase
LB	<i>Lysogeny broth</i> (Komplexmedium)
LC-MS	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)
M	Molar
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
MBT	<i>Maltose-binding protein</i> (Maltose-bindendes Protein)
MCS	<i>Multiple cloning site</i> (multiple Klonierungsstelle)
MeOH	Methanol
MM	Minimalmedium
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MW	<i>Molecular weight</i> (molekulare Masse)
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i> (Molekülmassengrenze)
Na ⁺	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i> (Nationales Zentrum für Biotechnologische Informationen)
Ni ²⁺ -NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i> (Nickel-Nitrilotriessigsäure)
n. k.	Nicht klassifiziert
NK	Negativkontrolle
NRPS	Nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen
NusA	<i>N-utilization substance A</i>
OD ₆₀₀	<i>Optical density</i> (Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm)
oSP	Ohne Signalpeptid
P	Pellet

PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
Pch	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Per	<i>Pleurotus eryngii</i>
Pfl	<i>Pleurotus florida</i>
pl	Isoelektrischer Punkt
PK	Positivkontrolle
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	<i>Para</i> -Nitroanilin
PNK	Polynukleotid Kinase
Pos	<i>Pleurotus ostreatus</i>
qPCR	Quantitative PCR
QTOF	<i>Quadrupole time of flight</i> (Quadropol-Flugzeitmassenspektrometer)
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
SET	<i>Solubility-enhancer peptide sequence</i> (Peptidsequenz zur Verbesserung der Löslichkeit)
SNL	Standardnährlösung
SP	Signalpeptid
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related modifier</i> (Familie der ubiquitin-ähnlichen Proteine)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol gepufferte Kochsalzlösung)
TBS-T	<i>Tris buffered saline with Tween 20</i> (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20)
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris mit EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TrxA	Thioredoxin A
U	Unit ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
ÜS	Überstand
v/v	<i>Volume by volume</i> (Volumen pro Volumen)

w/v	<i>Weight by volume</i> (Masse pro Volumen)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
YEPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i> (Hefeextrakt Pepton Dextrose)
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i> (stickstoffhaltiges Basismedium)

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- bzw. Dreibuchstabencode abgekürzt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anteil der Länder, die verschiedene Strategien zur Senkung des Salzkonsums umsetzen. Es wurden nur Länder mit einer Initiative zur Salzreduktion berücksichtigt (Stand 2021).....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Schnittstelle von Peptidasen anhand der Nomenklatur von Schechter und Berger (1967). P3 bis P3´ stellen Aminosäuren des Substrats dar.	5
Abbildung 3: Aufbau der FRET Peptide 1 und 2. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. FAM: Fluorescein dient als Donor. Dabcyl dient als Akzeptor.	49
Abbildung 4: SDS-Gel nach Reinigung der Aspartatpeptidase (EIW62808) aus <i>T. versicolor</i> mittels His SpinTrap™-Säule. ÜS: Überstand. P: Pellet. LF: lösliche Fraktion. D: Durchfluss. W1 bis W3: Waschschrift 1 bis 2. E1 und E2: Elutionsfraktion 1 und 2.....	53
Abbildung 5: SDS-Gel nach Reinigung der Metallopeptidase (EIW51569) aus <i>T. versicolor</i> mittels His SpinTrap™-Säule. ÜS: Überstand. P: Pellet. LF: lösliche Fraktion. D: Durchfluss. W1 bis W3: Waschschrift 1 bis 2. E1 und E2: Elutionsfraktion 1 und 2.....	53
Abbildung 6: SDS-Gel nach Reinigung der Serinpeptidase (EIW59803) aus <i>T. versicolor</i> mittels His SpinTrap™-Säule. ÜS: Überstand. P: Pellet. LF: lösliche Fraktion. D: Durchfluss. W1 bis W3: Waschschrift 1 bis 2. E1 und E2: Elutionsfraktion 1 und 2.....	54
Abbildung 7: Ergebnisse des Azocaseinassay nach Expression der Metallopeptidase aus <i>T. versicolor</i> (XP_008032702) in <i>K. phaffii</i> (n=3).	55
Abbildung 8: Ergebnisse des FRET-Assays nach Expression der Metallopeptidase aus <i>T. versicolor</i> (XP_008032702) in <i>K. phaffii</i> (n=2).	55
Abbildung 9: Ergebnisse des Azocaseinassays nach Reinigung der Serinpeptidase (ABB73029) aus <i>P. chrysosporium</i> mittels His SpinTrap™-Säule. ÜS: Überstand. LF: lösliche Fraktion. D: Durchfluss. W1 bis W4: Waschschrift 1 bis 4 (n=3). E1 und E2: Elutionsfraktion 1 und 2 (n=2).	56
Abbildung 10: Ergebnisse des FRET-Assays nach Reinigung der Serinpeptidase (ABB73029) aus <i>P. chrysosporium</i> mittels His SpinTrap™-Säule. ÜS: Überstand. LF: lösliche Fraktion. D: Durchfluss. W1 bis W4: Waschschrift 1 bis 4. E1 und E2: Elutionsfraktion 1 und 2 (n=2).	57
Abbildung 11: Ergebnisse des Azocaseinassays nach Expression der Serinpeptidase (ABB73029) aus <i>P. chrysosporium</i> in <i>K. phaffii</i> (n=3).....	58

Abbildung 12: Ergebnisse des FRET-Assays nach Expression der Serinpeptidase (ABB73029) aus <i>P. chrysosporium</i> in <i>K. phaffii</i> (n=2).....	58
Abbildung 13: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL ⁻¹ Casein) von Fraktion 22 bis 25 nach Reinigung der Serinpeptidase (ABB73029) aus <i>P. chrysosporium</i> mittels FPLC-basierter SEC. Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, die Anzahl der arginylspezifischen Schnittstellen (R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R). ÜS: Überstand.....	59
Abbildung 14: pH-Verlauf des Kulturüberstandes von <i>A. aegerita</i> (Aae), <i>F. pinicola</i> (Fpi), <i>F. velutipes</i> (Fve), <i>H. sublateritium</i> (Hsu) und <i>P. eryngii</i> (Per). Kultivierung in Minimalmedium (1 % Gluten) über einen Zeitraum von 24 Tagen (24 °C, 150 rpm).	61
Abbildung 15: Zymographie (1 mg mL ⁻¹ Casein) des Kulturüberstandes von <i>A. aegerita</i> über eine Kultivierungsdauer von 24 Tagen. Zahlen: Tag der Probennahme. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24. M: Marker (<i>Precision Plus Protein Unstained Standard</i>).	62
Abbildung 16: Zymographie (1 mg mL ⁻¹ Casein) des Kulturüberstandes von <i>F. velutipes</i> über eine Kultivierungsdauer von 24 Tagen. Zahlen: Tag der Probennahme. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24. M: Marker (<i>Precision Plus Protein Unstained Standard</i>).	62
Abbildung 17: Zymographie (1 mg mL ⁻¹ Casein) des Kulturüberstandes von <i>F. pinicola</i> über eine Kultivierungsdauer von 24 Tagen. Zahlen: Tag der Probennahme. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24. M: Marker (<i>Precision Plus Protein Unstained Standard</i>).	62
Abbildung 18: Zymographie (1 mg mL ⁻¹ Casein) des Kulturüberstandes von <i>H. sublateritium</i> über eine Kultivierungsdauer von 24 Tagen. Zahlen: Tag der Probennahme. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24. M: Marker (<i>Precision Plus Protein Unstained Standard</i>).	63
Abbildung 19: Zymographie (1 mg mL ⁻¹ Casein) des Kulturüberstandes von <i>P. eryngii</i> über eine Kultivierungsdauer von 24 Tagen. Zahlen: Tag der Probennahme. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24. M: Marker (<i>Precision Plus Protein Unstained Standard</i>).	63
Abbildung 20: Ergebnisse des Azocaseinassays von <i>A. aegerita</i> (Aae), <i>F. pinicola</i> (Fpi), <i>F. velutipes</i> (Fve), <i>H. sublateritium</i> (Hsu) und <i>P. eryngii</i> (Per). Es wurde der Kulturüberstand an verschiedenen Tagen (Zahl) bzw. das lysierte Pellet an Tag 24 (24P) verwendet (n=2).....	64

- Abbildung 21: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL⁻¹ Casein) ausgewählter Unterfraktionen von *A. aegerita* (Aae, Tag 10) nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, die Anzahl der arginylspezifischen Schnittstellen (R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).68
- Abbildung 22: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL⁻¹ Casein) ausgewählter Unterfraktionen von *P. eryngii* (Per, Tag 3) nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, die Anzahl der arginylspezifischen Schnittstellen (R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).69
- Abbildung 23: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL⁻¹ Casein) ausgewählter Unterfraktionen von *F. velutipes* (Fve, Tag 10 nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, die Anzahl der arginylspezifischen Schnittstellen (R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).70
- Abbildung 24: Ergebnisse des pNA-Assays der zwölf Fraktionen nach FPLC-basierter Ni²⁺-NTA Reinigung der heterolog produzierten PfIDPPV. Als Substrat wurde H-L-Ala-L-Ala-pNA verwendet.72
- Abbildung 25: SDS-PAGE (a), semi-native PAGE (b) und Western Blot (c) der rekombinanten PfIDPPV (Bande 1). M: *Precision Plus Protein Unstained* (a, b) oder *All Blue Standard* (c) (Bio-Rad).72
- Abbildung 26: Effekt des pH-Wertes auf die Aktivität (Quadrat) und Stabilität (Kreis) der PfIDPPV. Es wurde Britton-Robinson-Puffer im pH-Bereich von 2 bis 9,5 verwendet. Für die pH-Stabilität wurden die Proben für eine Stunde bei den entsprechenden pH-Werten inkubiert und anschließend ein Aktivitätsassay unter optimalen Bedingungen (pH 8,5) durchgeführt. Die relative DPPV Aktivität [%] wurde gegenüber der höchsten Aktivität in jedem Experiment definiert.73
- Abbildung 27: Effekt der Temperatur auf die Aktivität (Quadrat) und Stabilität (Kreis) der PfIDPPV. Für die Temperaturstabilität wurden die Proben für eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Anschließend wurde ein Aktivitätsassay unter optimalen Bedingungen (60 °C) durchgeführt. Die relative DPPV Aktivität [%] wurde gegenüber der höchsten Aktivität in jedem Experiment definiert.73

Abbildung 28: Lineare Michaelis-Menten Regression zur Umsetzung von H-L-Ala-L-Ala-pNA durch die PflDPPV.	74
Abbildung 29: Effekt verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität der PflDPPV gegenüber dem Substrat H-L-Ala-L-Ala-pNA. Die relative Aktivität [%] der Kontrolle (-) wurde als 100 % definiert (gestrichelte Linie).	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über Dipeptidylpeptidasen (DPP). n. k.: nicht klassifiziert. k. A.: keine Angaben.....	9
Tabelle 2: Verwendete Vektoren.	16
Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Peptidasegene aus <i>P. chrysosporium</i> , <i>S. commune</i> und <i>T. versicolor</i>	17
Tabelle 4: Überblick der verwendeten Primer zur Klonierung verschiedener Peptidasegene aus <i>Trametes versicolor</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> und <i>Schizophyllum commune</i>	18
Tabelle 5: Verwendete Basidiomyceten. k. A.: keine Angaben.	21
Tabelle 6: Name und Genotyp der für die Klonierung und Expression verschiedener Peptidasegene verwendeten Organismen.....	23
Tabelle 7: Übersicht über die Basidiomyceten aus dem Peptidase Screening, sowie die Kultivierungsdauer in der Vor- und Hauptkultur. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24.	24
Tabelle 8: Zusammensetzung der Standardnährlösung (SNL) zur Kultivierung der Basidiomyceten in der Vorkultur.....	25
Tabelle 9: Zusammensetzung des Minimalmediums zur Kultivierung der Basidiomyceten in der Hauptkultur.....	25
Tabelle 10: Zusammensetzung der Spurenelementlösung.	25
Tabelle 11: Zusammensetzung des <i>Lysogeny Broth</i> (LB) Mediums zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	26
Tabelle 12: Zusammensetzung des YEPD Mediums zur Kultivierung von <i>K. phaffii</i>	27
Tabelle 13: Zusammensetzung der His ⁻ Platten zur Kultivierung von <i>K. phaffii</i>	27
Tabelle 14: Zusammensetzung des YNB (<i>yeast nitrogen base</i>) Mediums.	27
Tabelle 15: Zusammensetzung des BMMY Mediums zur Kultivierung von <i>K. phaffii</i>	27
Tabelle 16: MSSI Verdau zur Linearisierung des pPIC9 Vektors.	28
Tabelle 17: Ansatz zur Synthese komplementärer DNA (cDNA).....	29
Tabelle 18: Zusammensetzung des Lysis-Puffers zur Isolierung genomischer DNA.....	30
Tabelle 19: Zusammensetzung des TE-Puffers (Tris EDTA) zur Isolierung genomischer DNA (gDNA).....	30
Tabelle 20: Reaktionsansatz zur Amplifizierung von DNA Fragmenten mittels Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.	31
Tabelle 21: Programm zur Amplifizierung von DNA Fragmenten mittels Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. Tm: Primerspezifische Annealingtemperatur.	31
Tabelle 22: Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR mittels Dream™ Taq DNA Polymerase....	31

Tabelle 23: Programm für die Kolonie-PCR mittels Dream™Taq DNA Polymerase. Tm: Primerspezifische Annealingtemperatur.	32
Tabelle 24: Vektorspezifische Primer für die Kolonie-PCR.	32
Tabelle 25: Programm für die Touchdown-PCR mittels Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. Tm: Primerspezifische Annealingtemperatur.....	33
Tabelle 26: Zusammensetzung des 1X TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffers und des 6X DNA Ladepuffers für die Agarosegelelektrophorese.	33
Tabelle 27: Ansatz für den Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA.	34
Tabelle 28: Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung der 5´ Enden von DNA.	34
Tabelle 29: Reaktionsansatz zur Phosphorylierung von DNA mittels T4 Polynukleotid Kinase.	35
Tabelle 30: Übersicht über die Expression verschiedener Peptidasegene in <i>E. coli</i> . HK: Hauptkultur. N: N-Terminus. C: C-Terminus.....	37
Tabelle 31: Übersicht über die Expression verschiedener Peptidasegene in <i>K. phaffii</i> . HK: Hauptkultur. N: N-Terminus. C: C-Terminus. SP: Signalpeptid.	38
Tabelle 32: Verwendete Lösungen für die denaturierende und semi-native SDS-PAGE.....	39
Tabelle 33: Zusammensetzung eines diskontinuierlichen Gels mit 12 % Acrylamid.....	39
Tabelle 34: Zusammensetzung eines 12 %-igen Single Gels.	40
Tabelle 35: Zusammensetzung des 2X Single Gel Puffers zur Herstellung eines 12 %-igen Single Gels.....	40
Tabelle 36: Zusammensetzung des 10X TBS (<i>Tris buffered saline</i>) Puffers.	41
Tabelle 37: Zusammensetzung des 1X TBS-T (<i>Tris buffered saline with Tween 20</i>) Puffers.	41
Tabelle 38: Verwendete Lösungen für die Zymographie.....	41
Tabelle 39: Zusammensetzung eines Zymographie-Gels mit 12 % Acrylamid.....	42
Tabelle 40: Puffer und Chemikalien für den tryptischen Verdau von Proteinbanden aus einem SDS-Gel.....	44
Tabelle 41: Ansatz für den proteolytischen Verdau von Casein (1 mg mL ⁻¹).	47
Tabelle 42: Liste der verwendeten <i>para</i> -Nitroanilin Substrate.....	51
Tabelle 43: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL ⁻¹ Casein) von Fraktion 22 bis 25 nach Reinigung der Serinpeptidase (ABB73029) aus <i>P. chrysosporium</i> mittels FPLC-basierter SEC. Angegeben ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, der Anteil der arginylspezifischen Schnittstellen (R) (ohne Exo R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).	60

Tabelle 44: Übersicht über die verschiedenen Basidiomyceten und die Kultivierungstage, an denen der Kulturüberstand auf Peptidaseaktivität untersucht wurde. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24.	63
Tabelle 45: Überblick über die arginylspezifische Peptidaseaktivität der ausgewählten Kulturüberstände verschiedener Basidiomyceten.	65
Tabelle 46: Überblick über die aktiven Unterfraktionen der einzelnen Basidiomyceten nach Reinigung mittels FPLC-basierter SEC.	66
Tabelle 47: Übersicht über verschiedene Substrate und deren Argininanteil.	67
Tabelle 48: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL ⁻¹ Casein) ausgewählter Unterfraktionen von <i>A. aegerita</i> (Aae, Tag 10) nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Angegeben ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, der Anteil der arginylspezifischen Schnittstellen (R) (ohne Exo R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).	68
Tabelle 49: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL ⁻¹ Casein) ausgewählter Unterfraktionen von <i>P. eryngii</i> (Per, Tag 3) nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Angegeben ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, der Anteil der arginylspezifischen Schnittstellen (R) (ohne Exo R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) und der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).	69
Tabelle 50: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL ⁻¹ Casein) ausgewählter Unterfraktionen von <i>F. velutipes</i> (Fve, Tag 10) nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Angegeben ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, der Anteil der arginylspezifischen Schnittstellen (R) (ohne Exo R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) und der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).	70
Tabelle 51: Überblick über die kinetischen Parameter der PflDPPV, AfdPPV (Beauvais <i>et al.</i> , 1997a), AodppE und AodppF (Maeda <i>et al.</i> , 2016). Als Substrat wurde H-L-Ala-L-Ala-pNA verwendet. k. A.: keine Angaben.	74

1. Einleitung

1.1. Speisesalz in Lebensmitteln

Zu den vier Geschmacksrichtungen zählen süß, sauer, bitter und salzig. Für die Geschmacksrichtung salzig sind die zellulären und molekularen Mechanismen bisher nicht vollständig aufgeklärt (Roper 2015). Es wird aber vermutet, dass der salzige Geschmack über den amilorid-sensitiven bzw. amilorid-unsensitiven Weg wahrgenommen wird (Schindler *et al.*, 2011).

Speisesalz (Natriumchlorid, NaCl) ist ein wichtiger Bestandteil in Lebensmitteln, beeinflusst die Struktur und Geschmackswahrnehmung von Lebensmitteln, hat eine antimikrobielle Wirkung und überdeckt einen bitteren oder astringierenden Geschmack (Rao and Lalmanpuia 2020). Speisesalz ist somit nicht nur für den Geschmack von Lebensmitteln, sondern auch für deren Textur und Haltbarkeit wichtig (Schindler *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2017). Es wird vorwiegend bei der Verarbeitung von Lebensmitteln verwendet, u. a. bei Saucen, Dressings und Süßigkeiten, aber auch in Backwaren und Fertigprodukten.

1.2. Gesundheitliche Beeinträchtigung durch Speisesalz

Mengenmäßig betrachtet findet man Salz vermehrt in Fertiggerichten und Knabbersachen, aber auch Brot, Milch oder Wurstwaren tragen zu einem erhöhten Salzkonsum bei (Schindler *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2017). Jedoch bringt ein überhöhter Salzkonsum auch gesundheitliche Gefahren mit sich. Es kann zu einem erhöhten Risiko für Bluthochdruck, zur Zunahme an Herz-Kreislauf-erkrankungen oder Osteoporose kommen (Schindler *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2017). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfiehlt erwachsenen Menschen daher, die Tagesmenge von 5 g Speisesalz nicht zu überschreiten. Eine Studie aus dem Jahr 2013 hat jedoch gezeigt, dass Menschen in der westlichen Welt fast das Doppelte dieser Menge (8 bis 11 g) zu sich nehmen. Das erklärte Ziel der WHO bis 2025 ist daher eine Reduzierung der Salzzufuhr um bis zu 30 % (World Health Organization 2012; Gray 2013).

Die Empfehlung der WHO von weniger als 5 g Speisesalz pro Tag wird besonders in westlichen Ländern deutlich überschritten. Gerade in Industrieländern wie Großbritannien, Irland oder den USA sind 80 % des erhöhten Salzkonsums auf den Verzehr von verarbeiteten Lebensmitteln (z. B. Fertigprodukte) zurückzuführen. Als Folge nehmen Herz-Kreislauf-erkrankungen, die durch Bluthochdruck verursacht werden, stetig zu und zählen damit weltweit

zu den häufigsten Todesursachen durch nicht-übertragbare Krankheiten. 2012 kam eine weltweit angelegte Studie zu dem Schluss, dass ca. 15 % (2,3 Mio.) der Todesfälle durch Herzinfarkt oder Schlaganfall mit einem erhöhtem Salzkonsum in Verbindung stehen (Schindler *et al.*, 2011; Gray 2013). 2017 starben 10,4 Millionen Menschen an Bluthochdruck, von denen 3,2 Millionen Todesfälle mit einem überhöhten Salzkonsum in Verbindung gebracht werden (Santos *et al.*, 2021). Die Reduzierung der täglichen Salzzufuhr ist daher von großem Interesse.

In Studien konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Aufnahme von Speisesalz den Blutdruck senken kann, besonders bei Patienten, die bereits an Bluthochdruck leiden (Cook *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2019). Bluthochdruck steht zudem in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Nierenerkrankungen, Schlaganfällen und Herz-Kreislauf-erkrankungen (Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Linksventrikelhypertrophie) (Cianciaruso *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 2007; He *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2019). Neben Auswirkungen auf das Herz und die Nieren wirkt sich ein erhöhter Konsum von Speisesalz auch auf das Gefäßsystem, die Haut, das Gehirn und die Knochen aus. Auslöser dafür sind erhöhte Entzündungsreaktionen und oxidativer Stress, die u. a. zu einer Verhärtung der Arterien führen können und in Zusammenhang mit Schlaganfällen stehen (Nagata *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2019). Überschüssige Ablagerungen von Na⁺-Ionen in der Haut sind zudem Anzeichen für Alterung, Diabetes Typ 2 oder Hyperlipidämie (Robinson *et al.*, 2019). Andere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Salzkonsum und Asthma, Magenkrebs, Anzeichen für Alzheimer-ähnliche kognitive Veränderungen, Nierenbeckenentzündungen, Osteoporose oder der Bildung von Nierensteinen (Cappuccio *et al.*, 2000; Kurosawa *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2019; Fyfe 2020; Wang 2020). Insgesamt birgt ein überhöhter Salzkonsum zahlreiche gesundheitliche Risiken und sollte daher vermieden werden.

1.3. Strategien zur Senkung

Besonders in einkommensstarken Ländern nimmt der Konsum von Fertiggerichten und verarbeiteten Lebensmitteln stetig zu (Santos *et al.*, 2019). Daher gibt es immer mehr nationale und internationale Richtlinien zur Reduzierung des täglichen Salzkonsums. Von 2010 bis 2014 hat sich die Anzahl der Initiativen zur Salzreduktion verdoppelt. 2021 gab es insgesamt 96 Initiativen zur Salzreduktion (Santos *et al.*, 2021).

Alle Initiativen beinhalten fünf wichtige Kernbereiche, wobei die Länder unterschiedliche Schwerpunkte bei der Umsetzung der Richtlinien setzen (Abbildung 1). Die Kernbereiche umfassen die Reduzierung des Salzgehaltes in Lebensmitteln, Bildungsprogramme und Ernährungsrichtlinien für öffentliche Einrichtungen wie Schulen oder Krankenhäusern, Sensibilisierung der Verbraucher, Kennzeichnung von Verpackungen und eine Salzsteuer

(World Health Organization 2016; Santos *et al.*, 2019). Der Großteil der Länder (75 %) setzt auf Bildungsprogramme und Ernährungsrichtlinien für öffentliche Einrichtungen sowie salzärmere Fertigprodukte (71 %), während eine Salzsteuer lediglich in 5 % der Länder umgesetzt wird (Santos *et al.*, 2021).

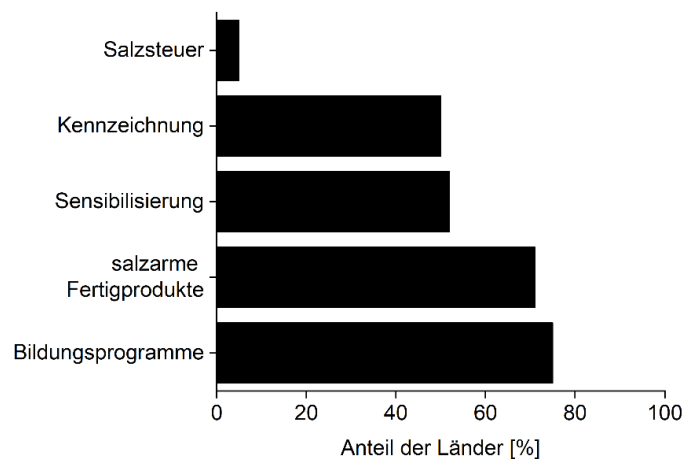


Abbildung 1: Anteil der Länder, die verschiedene Strategien zur Senkung des Salzkonsums umsetzen. Es wurden nur Länder mit einer Initiative zur Salzreduktion berücksichtigt (Stand 2021).

In einigen Ländern wurden bereits erste Erfolge erzielt. Canada konnte mittels freiwilliger Richtlinien in verschiedenen Einrichtungen (Schulen, Arbeitsplatz, Krankenhäuser) oder der Kennzeichnung von Speisekarten in Restaurants die Aufnahme von Speisesalz im Zeitraum von 2004 bis 2015 um bis zu 19 % senken. Auch in Finnland konnte durch zahlreiche Maßnahmen eine Senkung der Aufnahme von Speisesalz um bis zu 29 % (1979 bis 2002) erreicht werden. Dabei setzte Finnland sowohl auf freiwillige Richtlinien, als auch auf eine Beschaffungspolitik für Schulen. Zusätzlich setzen sowohl Canada als auch Finnland auf verpflichtende Warnhinweise auf Verpackungen. Um dennoch das erklärte Ziel der WHO, eine Reduzierung der Salzzufuhr um bis zu 30 % bis 2025, zu erreichen, müssen die erfolgreichen Strategien (Kennzeichnung von Lebensmitteln, Sensibilisierung der Verbraucher, Bildungsprogramme) in weiteren Ländern angewendet werden. Zudem sind strengere Überwachungen und ein Bewertungssystem zur Kontrolle der Salzreduktion nötig (Santos *et al.*, 2021).

Neben den genannten Strategien zur Reduzierung von NaCl in Lebensmitteln gibt es weitere Ansätze, den Gehalt an Speisesalz in Lebensmitteln zu reduzieren. Durch Salzersatzstoffe wie Kalium-, Calcium- oder Magnesiumchlorid soll NaCl vollständig in Lebensmitteln ersetzt werden.

Allerdings hängt die Wirkung der Salzersatzstoffe von der Konzentration ab, und die Ersatzstoffe haben oft einen bitteren oder metallischen Beigeschmack. Auch die Inhaltsstoffe natürlich vorkommender Gewürze oder Kräuter (Knoblauch, Ingwer, Pfeffer, Chilli), die antimikrobielle Eigenschaften haben, können eingesetzt werden (Rao and Lalmanpuia 2020). Neben dem vollständigen Ersatz von NaCl gibt es neuere Ansätze, die sich mit Salzgeschmackverstärkern wie L-Lysin, L-Arginin, Trehalose oder Glutamat befassen. Ziel dabei ist es, den vorhandenen Salzgeschmack ohne unerwünschten Fehlgeschmack zu intensivieren, sodass bei der Herstellung von Lebensmitteln weniger Salz verwendet werden kann (Nakata *et al.*, 1995; Maehashi *et al.*, 1999; Schindler *et al.*, 2011; Rao and Lalmanpuia 2020). Ein Beispiel zur Reduzierung von Speisesalz in Lebensmitteln sind L-Arginyldipeptide (Schindler *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2017).

1.3.1. Arginyldipeptide

Bisher wurden L-Arginyldipeptide kaum für die Reduzierung von Speisesalz in Lebensmitteln in Betracht gezogen. Dennoch konnte eine Studie mit humanen Geschmackspapillen zeigen, dass die Dipeptide Ala-Arg, Arg-Ala und Arg-Pro die Zellantwort gegenüber NaCl signifikant steigern, während für Glu-Arg und Arg-Glu keine gesteigerte Zellantwort gemessen werden konnte (Xu *et al.*, 2017). Die Zellantwort hängt zusätzlich von der Konzentration der Dipeptide ab. Für das Dipeptid Ala-Arg konnten Effekte zwischen 10 und 100 μM gemessen werden. Bisher konnte jedoch kein Effekt auf die Zellantwort anhand der Aminosäureabfolge im Dipeptid festgestellt werden, sodass dies vermutlich vernachlässigt werden kann (Xu *et al.*, 2017). Zudem wurde gezeigt, dass beispielsweise isoliertes L-Arginin in geringen Konzentrationen (5 mM) bitter und in höheren Konzentrationen (10 mM) süß schmeckt, während L-Arginyldipeptide keinen Eigengeschmack aufweisen (Schindler *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2017).

Dipeptide und somit L-Arginyldipeptide können u. a. chemisch synthetisiert werden (Derave *et al.*, 2010). Allerdings handelt es sich dabei um einen mehrstufigen und komplexen Prozess, der für die industrielle Anwendung zu teuer ist (Merrifield 1976; Nilsson *et al.*, 2005; Noguchi *et al.*, 2012). Weiterhin gibt es nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen (NRPS), bei denen die Ausbeuten allerdings sehr gering und die Enzyme ATP-abhängig sind (Doekel and Marahiel 2000). Eine andere Möglichkeit, Dipeptide zu generieren, sind L-Aminosäureligasen (LAL), die zwei Aminosäuren unter ATP-Verbrauch kondensieren. Nachteile dieser Methode sind ein hoher ATP-Verbrauch und eher geringe Ausbeuten. Zudem sind nicht alle L-Aminosäureligasen für die Generierung salzgeschmackverstärkender Dipeptide geeignet (Tabata *et al.*, 2005; Bordewick *et al.*, 2021).

Neben der gezielten Verknüpfung von einzelnen Aminosäuren bietet die hydrolytische Spaltung von Proteinen eine weitere Möglichkeit zur Generierung von Dipeptiden. Mit geeigneten Peptidasen kann eine spezifische Spaltung von Substraten und damit die Bildung spezifischer Produkte erreicht werden. Zusätzlich können Nebenreaktionen reduziert werden (Tavano 2013). Ein weiterer Grund, aus dem Enzyme chemischen Verfahren in der Industrie bevorzugt werden, ist die Tatsache, dass enzymatische Reaktionen schneller und effizienter ablaufen, weniger Substrat eingesetzt werden muss und die Toxizität geringer ist (Neto, Garzon, Pedezzi, & Cabral, 2018).

1.4. Peptidasen

Peptidasen sind in der Natur weit verbreitet und gehören zur Klasse der Hydrolasen (EC 3.4.), die Peptidbindungen in Anwesenheit von Wasser nach dem *induced fit* Prinzip spalten (Abbildung 2; Neto, Garzon, Pedezzi, & Cabral, 2018). Viele Peptidasen werden als inaktive Vorläufer produziert und erst durch Veränderungen in der Umgebung oder die Bindung kleinerer Peptide in die aktive Konformation überführt (Li *et al.*, 2013). Aktuell gibt es 261 bekannte Peptidasefamilien, die wiederum in *Clans* eingeteilt werden können (Rawlings and Bateman 2019).

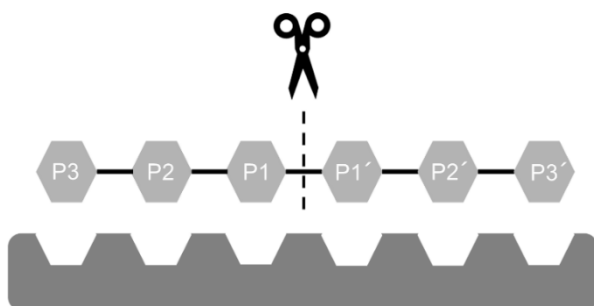


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Schnittstelle von Peptidasen anhand der Nomenklatur von Schechter und Berger (1967). P3 bis P3' stellen Aminosäuren des Substrats dar.

Peptidasen werden anhand verschiedener Kategorien (Ursprung, katalytische Reaktion, Wirkmechanismus (aktives Zentrum), Sequenzhomologie) in Gruppen eingeteilt (da Silva, 2017; Rawlings *et al.*, 2014). Anhand des Wirkmechanismus unterscheidet man zwischen Endo- und Exopeptidasen. Endopeptidasen, z. B. Chymotrypsin, Papain oder Pepsin, hydrolysieren Peptidbindungen innerhalb einer Polypeptidkette und werden in verschiedene Klassen eingeteilt. Dazu zählen Serin- (EC 3.4.21), Cystein- (EC 2.4.22), Aspartat- (EC 3.4.23), Metallo- (EC 3.4.24) und Threoninendopeptidasen (EC 3.4.25).

Am häufigsten vertreten sind Cystein-, Metallo- und Serinpeptidasen, gefolgt von Aspartat-, Threonin- und Glutamatpeptidasen (Rawlings *et al.*, 2007, 2014; Li *et al.*, 2013; Rawlings and Bateman 2019).

Exopeptidasen hingegen spalten maximal drei Aminosäuren vom N- bzw. C-Terminus ab. Dafür benötigen diese Enzyme eine freie Aminogruppe am N-Terminus oder eine Carboxygruppe am C-Terminus. Exopeptidasen können in folgende Unterklassen unterteilt werden: Amino- (EC 3.4.11), Carboxy- (EC 3.4.16 – 18), Dipeptidyl- (EC 3.4.14), Peptidyl- (EC 3.4.15), Tripeptidyl- (EC 3.4.14) und Dipeptidasen (EC 3.4.13) (Rawlings *et al.*, 2007).

Die Substratbindung und Katalyse von Peptidasen findet im aktiven Zentrum statt, das in verschiedene Bereiche unterteilt werden kann und spezifisch für bestimmte Aminosäuren des Substrates ist (Neto *et al.*, 2018; Schechter & Berger, 2012). Die Schnittstellenspezifität wird zusätzlich durch die Struktur des Substrates beeinflusst. Benachbarte Aminosäuren zur Schnittstelle im Substrat können einen positiven oder negativen Effekt auf die Bindung im aktiven Zentrum der Peptidasen und damit die Spaltung haben (Neto *et al.*, 2018; Rawlings, 2016).

In der Natur sind Peptidasen an vielfältigen Prozessen beteiligt, z. B. dem intrazellulären Proteintransport, der Nahrungsaufnahme und -verdauung oder bei der Immunantwort (Li *et al.*, 2013). Generell katalysieren sie Reaktionen, die z. B. für den Zellzyklus, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung oder die Apoptose von Bedeutung sind (Neto *et al.*, 2018). Peptidasen spielen zudem eine Rolle beim Proteinabbau, der Blutgerinnung, sowie dem Transport von sekretorischen Proteinen über die Membran. Generell unterscheidet man zwischen intra- und extrazellulären Peptidasen. Intrazelluläre Peptidasen sind bei Pilzen an zellulären und metabolischen Prozessen beteiligt, wie der Sporulation und Differenzierung. Extrazelluläre Peptidasen hingegen katalysieren die Hydrolyse von Proteinen in der Umgebung, um die hydrolytischen Spaltprodukte später in die Zellen aufnehmen zu können (Rawlings *et al.*, 2007; de Souza *et al.*, 2015).

Peptidasen werden aufgrund ihres breiten pH- und Temperaturspektrums bereits in der Industrie (Leder-, Futtermittel- und Lebensmittel, Waschmittel), Pharmazie, Medizin oder der Forschung eingesetzt (Li *et al.*, 2013; Neto *et al.*, 2018). Sie gehören zu den drei größten Gruppen industrieller Enzyme (Inacio *et al.*, 2015). Weltweit beträgt der Anteil industrieller Enzyme ca. 60 %, von dem Peptidasen wiederum einen Anteil von 20 % ausmachen (Razzaq *et al.*, 2019). Der jährliche Anteil am weltweiten Verkauf von Enzymen lag 2021 bei 6,4 Milliarden US-Dollar und könnte 2026 bei 8,7 Milliarden US-Dollar liegen (BBC Market Research Report, Juli 2021).

Um den Einsatz von Peptidasen in der Industrie unter nicht-physiologischen Bedingungen, wie hohen Temperaturen und pH-Werten oder in Gegenwart von Detergenzien zu ermöglichen, werden zielgerichtete Mutationen oder gerichtete Evolution eingesetzt (Li *et al.*, 2013). Aber auch der Einsatz besonders produktiver Stämme oder die Optimierung der Kultivierung und des Mediums sind von Interesse (Inacio *et al.*, 2015).

1.4.1. Peptidasen aus Basidiomyceten

Peptidasen sind in allen Organismen vertreten und wurden bisher in über 8.000 Organismen klassifiziert (Rawlings *et al.*, 2014; Rawlings and Bateman 2019). Dazu zählen auch die als Ständerpilze bekannten Basidiomyceten. Zusammen mit Ascomyceten repräsentieren sie ca. 98 % im Unterreich Dikarya im Reich der Pilze (Wang *et al.*, 2010). Von den bisher beschriebenen Pilzen sind deutlich mehr Ascomyceten als Basidiomyceten erforscht (Schmidt-Dannert 2016).

Zur Zeit existieren ca. 30.000 bekannte Arten von Basidiomyceten, von denen zahlreiche den GRAS Status (*generally recognized as safe*) haben, der den Einsatz im Bereich der Lebensmittelindustrie erleichtert (Bouws *et al.*, 2008; de Souza *et al.*, 2015). In der Natur sind Basidiomyceten in vielen ökologischen Nischen zu finden. Sie wachsen auf Holz, Blättern, Wurzeln oder anderem organischen Material (de Souza *et al.*, 2015; Schmidt-Dannert 2016). Um die diversen Lebensräume besiedeln zu können, sekretieren Pilze eine Vielzahl an Enzymen, darunter Peroxidasen, Laccasen, Lipasen/Esterasen oder Peptidasen, die dem Pilz zur Erschließung von Nährstoffquellen und zum Überleben dienen (Bouws *et al.*, 2008; Rytioja *et al.*, 2014; de Souza *et al.*, 2015; Gopinath *et al.*, 2017).

Die Sekretion von Proteinen hat den großen biotechnologischen Vorteil, dass die Reinigung von Proteinen erleichtert wird und postranslationale Modifikationen wie Glykosilierungen bei der Sekretion zu einer verbesserten Löslichkeit und Stabilität der Proteine beitragen (Bouws *et al.*, 2008; Shental-Bechor and Levy 2008; Sola and Griebenow 2009; Rytioja *et al.*, 2014; de Souza *et al.*, 2015; Gopinath *et al.*, 2017).

Die kostengünstige und schnelle Kultivierung von Basidiomyceten ermöglicht zudem die Produktion von Proteinen in großen Mengen, was für die Industrie von großer Bedeutung ist (Bouws *et al.*, 2008; de Souza *et al.*, 2015; Gopinath *et al.*, 2017). Dennoch haben die richtigen Parameter wie pH-Wert, Temperatur und Medienzusammensetzung einen entscheidenden Einfluss auf die Produktion von Proteinen (de Souza *et al.*, 2015; Gupta and Shukla 2017). Zur Produktion von Peptidasen werden derzeit vorwiegend Medien mit Nebenströmen aus Sojabohne, Casein, Gluten, Weizen oder Hefe verwendet (Sumantha *et al.*, 2006; Inacio *et al.*, 2015).

Das steigende Interesse an der Verwendung pilzlicher Enzyme und Peptidasen in der Industrie ist auch mit der steigenden Anzahl sequenzierter Genome verbunden. Bisher wurden Peptidasen u. a. aus *Agaricus bisporus*, *Armillariella mellea*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Phanerochaete chrysosporium* oder *Schizophyllum commune* beschrieben (Datta 1992; Healy *et al.*, 1999; Wang and Ng 2001; Eisele *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2014; Inacio *et al.*, 2015).

1.4.2. Dipeptidylpeptidasen

Wie bereits erwähnt, können Peptidasen in Endo- und Exopeptidasen unterteilt werden. Eine Unterklasse der Exopeptidasen sind Dipeptidylpeptidasen (DPP, EC 3.4.14), die zwei endständige Aminosäuren als Dipeptid von längerkettigen Proteinen abspalten. Dipeptidylpeptidasen werden nach der Freisetzung ihrer Dipeptide sowie der zellulären Lokalisation klassifiziert (Beauvais *et al.*, 1997b). Eine Übersicht über die verschiedenen DPP gibt Tabelle 1. DPP der Klasse I (EC 3.4.14.1) spalten das Substrat unspezifisch, während DPP der Klasse II (EC 3.4.14.2) bevorzugt Xaa-Ala oder Xaa-Pro Dipeptide von Oligo- oder Tripeptiden abspalten. DPP der Klasse III (EC 3.4.14.4) sind ebenfalls unspezifisch und spalten zahlreiche Peptidbindungen. Klasse IV (EC 3.4.14.5) umfasst die am besten untersuchten DPP mit einer Schnittstellenspezifität für Xaa-Pro. Dipeptidylpeptidasen der Klasse EC 3.4.14.6 (auch Dipeptidyligasen genannt) spalten Dipeptide von einem Tripeptid ab. Daneben gibt es noch weitere Dipeptidylpeptidasen, die bisher nicht anhand einer EC Nummer klassifiziert wurden, u. a. die DPPV (Yokotani *et al.*, 1993; Abbott *et al.*, 2000; Bairoch 2000; Fukasawa *et al.*, 2001; Olsen and Wagtmann 2002; Qi *et al.*, 2003; Reinhold 2006; Ken McDonald 2013; Waumans *et al.*, 2015; Maeda *et al.*, 2016).

Beim Menschen spielen Dipeptidylpeptidasen in vielen physiologischen Prozessen und bei der Immunantwort eine Rolle (Beauvais *et al.*, 1997b; Waumans *et al.*, 2015), während DPP bei Pilzen sekretiert werden und der Nahrungsaufnahme oder der Pathogenabwehr dienen (Yike 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Sekretion dieser Enzyme und der anschließende Transport von Peptiden aus dem extrazellulären Milieu in die Zelle effektiver ist als die Aufnahme einzelner Aminosäuren (Hartmann *et al.*, 2011; Maeda *et al.*, 2016). In *Aspergillus fumigatus* wurden für die Sekretion dieser Enzyme Oligopeptidtransporter beschrieben (Hartmann *et al.*, 2011; Maeda *et al.*, 2016), während bei anderen Pilzen wie *A. oryzae* die Aufnahme von Peptiden in die Zelle bisher nicht vollständig aufgeklärt wurde (Maeda *et al.*, 2016).

Tabelle 1: Übersicht über Dipeptidylpeptidasen (DPP). n. k.: nicht klassifiziert. k. A.: keine Angaben.

Peptidase	Synonym	EC Nummer	Peptidasefamilie	Spaltspezifität	Literatur
DPPI	Cathepsin C, Dipeptidylaminopeptidase	3.4.14.1	Cystein, C1	Xaa-Yaa- -Zaa Xaa ≠ Arg, Lys Yaa ≠ Zaa, Pro	Bairoch, 2000; Rawlings <i>et al.</i> , 2014
DPPII = DPPVII	Carboxytripeptidase, Dipeptidylpeptidase 7 DPP 7	3.4.14.2	Serin, S28	Xaa-Pro Xaa-Ala	Bairoch, 2000; Fukasawa <i>et al.</i> , 2001; Qi <i>et al.</i> , 2003; Rawlings <i>et al.</i> , 2014; Waumans <i>et al.</i> , 2015
DPPIII	Dipeptidylaminopeptidase III	3.4.14.4	Metallo, M49	Xaa-Pro	Bairoch, 2000; Rawlings <i>et al.</i> , 2014
DPPIV	Dipeptidylaminopeptidase IV, CD26 (<i>cluster of differentiation</i> ; beim Menschen)	3.4.14.5	Serin, S9B	Xaa-Pro	b Bairoch, 2000
Dipeptidyl-dipeptidase	Dipeptidylligase, Dipeptidyltetrapeptid- Hydrolase	3.4.14.6	k. A.	Ala-Gly- -Ala-Gly	Bairoch, 2000; Ken McDonald, 2013
DPPV	k. A.	n. k.	Serin, S9B	Xaa-Ala	Beauvais <i>et al.</i> , 1997a; Rawlings <i>et al.</i> , 2014

Peptidase	Synonym	EC Nummer	Peptidasefamilie	Spaltspezifität	Literatur
DPPVI DPPIV Ortholog	DPPX (DPRP3, DPPIV <i>related protein 3</i>)	n. k.	Serin, S9B Cystein, C40 (Bakterien)	keine Aktivität	Qi <i>et al.</i> , 2003; Rawlings <i>et al.</i> , 2014; Yokotani <i>et al.</i> , 1993
DPP8 DPPIV Homolog	DPRP1 (DPPIV <i>related protein 1</i>)	n. k.	Serin, S9B	Xaa-Pro	Abbott <i>et al.</i> , 2000; Qi <i>et al.</i> , 2003; Rawlings <i>et al.</i> , 2014; Reinhold, 2006; Waumans <i>et al.</i> , 2015
DPP9 DPPIV Homolog zur DPP8	DPRP2 (DPPIV <i>related protein 2</i>)	n. k.	Serin, S9B	Xaa-Pro	Waumans <i>et al.</i> , 2015 Olsen & Wagtmann, 2002; Qi <i>et al.</i> , 2003; Rawlings <i>et al.</i> , 2014; Reinhold, 2006
DppB ähnlich der DPPIV	k. A.	n. k.	k. A.	Xaa-Pro	Maeda <i>et al.</i> , 2016
DppE ähnlich der DPPV	k. A.	n. k.	k. A.	Xaa-Ala	Maeda <i>et al.</i> , 2016
DppF ähnlich der DPPIV und DPPV	k. A.	n. k.	k. A.	Xaa-Pro Xaa-Ala	Maeda <i>et al.</i> , 2016

1.5. Heterologe Expressionssysteme

1.5.1. *Escherichia coli*

Prokaryotische Expressionssysteme wie *Escherichia coli* sind weit verbreitet, da sie sich u. a. durch ein schnelles Zellwachstum und hohe Proteinausbeuten auszeichnen (Chen 2012; Khow and Suntrarachun 2012; Effer *et al.*, 2019; Kutyschenko *et al.*, 2019). *E. coli* zeichnet sich zudem durch eine einfache Handhabung, geringe Kosten bei der Kultivierung, verschiedene Expressionsstrategien sowie die Produktion großer Biomassen aus (Rosano and Ceccarelli 2014; Gupta and Shukla 2017). Allerdings gibt es nur wenige etablierte *E. coli* Stämme, die dazu in der Lage sind, Proteine zu sekretieren (Chen 2012; Khow and Suntrarachun 2012). Dies wiederum führt zur Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine und zur Bildung von *inclusion bodies* (Francis and Page 2010; Khow and Suntrarachun 2012). Auch hohe Proteinausbeuten können in *E. coli* zur Akkumulation von Proteinen und damit zur Bildung von *inclusion bodies* führen (Effer *et al.*, 2019). Weiterhin spielen posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen bei eukaryotischen Genen eine Rolle. In prokaryotischen Zellen fehlen solche Mechanismen, was die Produktion katalytisch aktiver Proteine erschwert (Tolia and Joshua-Tor 2006). Um die Glykosylierung dennoch zu ermöglichen, können verschiedene Glykosyltransferasen aus Eukaryoten sowie eine Oligosaccharyltransferase aus dem Bakterium *Campylobacter jejuni* in *E. coli* eingebracht werden (Valderrama-Rincon *et al.*, 2012). Neben der fehlenden Glykosylierung können auch Disulfidbrücken einen negativen Effekt auf die Faltung von Proteinen in *E. coli* haben, da im Cytoplasma reduzierende Bedingungen vorliegen (Francis and Page 2010; Kamionka 2011). Um die Ausbildung von Disulfidbrücken zu ermöglichen, können Proteine mit einer speziellen Signalsequenz in den periplasmatischen Raum transportiert und mittels co-exprimierter Chaperone und Proteindisulfidisomerasen prozessiert werden (de Marco 2009).

1.5.1.1. Verbesserung der Löslichkeit von Proteinen in *E. coli*

Es wurde gezeigt, dass der N- und C-Terminus einen Einfluss auf die Löslichkeit von Proteinen in *E. coli* haben kann. Die Deletion weniger Aminosäuren an einem Terminus kann bereits dazu führen, dass die Löslichkeit der Proteinen ab- oder zunimmt. Werden nur wenige Aminosäuren (4 - 12) deletiert, so entstehen vorwiegend lösliche Proteine, während die Deletionen mehrerer Aminosäuren (> 16) zur Bildung von unlöslichen Proteine führt (Klock *et al.*, 2008). Daneben können Chaperone co-exprimiert, die Kultivierungsbedingungen optimiert oder genetisch modifizierte Stämme eingesetzt werden, um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen (Francis and Page 2010; Porro *et al.*, 2011).

Die Absenkung der Kultivierungstemperatur in Kombination mit speziellen Promotoren, die bei niedrigen Temperaturen aktiv sind, kann bereits zu einer verbesserten Löslichkeit und Proteinfaltung beitragen (Schein 2004; Khow and Suntrarachun 2012; San-Miguel *et al.*, 2013).

Häufig werden auch Protein-*Tags* verwendet, die neben der Reinigung auch die Expression, Löslichkeit und Faltung der Proteine verbessern können. Andererseits ist bei größeren Protein-*Tags* die Wahrscheinlichkeit höher, dass diese die biologische Aktivität der rekombinanten Proteine beeinflussen und die *Tags* nach erfolgreicher Reinigung enzymatisch entfernt werden müssen (Francis and Page 2010). Mit Hilfe dieser verschiedenen Strategien konnte bisher eine Vielzahl an Enzymen in *E. coli* produziert werden.

1.5.2. *Komagataella phaffii*

Lassen sich Proteine nicht heterolog in *E. coli* produzieren oder sind komplexe Modifizierungen notwendig, gibt es zahlreiche eukaryotische Expressionssysteme. Ein mittlerweile weit verbreitetes Expressionssystem ist die Hefe *Komagataella phaffii* (vormals *Pichia pastoris*), deren Genom seit 2009 vollständig sequenziert ist (De Schutter *et al.*, 2009).

Die einfache Kultivierung, genetische Manipulierbarkeit, posttranslationale Modifikationen, hohe Proteinausbeuten bis zu 20 g L⁻¹ und die Sekretion der heterolog produzierten Proteine in das Medium haben *K. phaffii* zum meist genutzten Hefe-basierten Expressionssystem gemacht (Gasser *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2014). Zudem besitzt die Hefe den GRAS Status, der die Anwendung rekombinant produzierter Proteine in der Lebensmittelindustrie erleichtert.

K. phaffii zählt zu den methylotrophen Hefen und ist daher in der Lage, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen (Ogata *et al.*, 1969; Cregg *et al.*, 2000). Methanol wird in den Peroxisomen durch die Alkoholoxidase (AOX1 und AOX2) metabolisiert. Der AOX1 Promotor (P_{AOX}) ist für ca. 85 % des Methanolumsatzes verantwortlich und ist der am meisten genutzte Promotor, da er leicht zu regulieren und ein stark induzierbarer Promotor ist (Baratti and Couderc 1980; Cregg *et al.*, 1989; Damasceno *et al.*, 2012; Vogl *et al.*, 2013).

Neben *K. phaffii* ist *Saccharomyces cerevisiae* ein weiteres, Hefe-basiertes Expressionssystem. Der Vorteil von *K. phaffii* gegenüber *S. cerevisiae* ist u. a. die Kultivierung in hohen Zelldichten, eine effektive Sekretion und höhere Produktivität.

Da *K. phaffii* selbst wenig eigene Proteine in das Medium sekretiert, können heterolog produzierte Proteine bis zu 80 % im Medium ausmachen (Cregg *et al.*, 2000; Damasceno *et al.*, 2012; Berlec and Štrukelj 2013; Vogl *et al.*, 2013; Spohner *et al.*, 2015).

1.5.2.1. Heterologe Expression in *K. phaffii*

Für die heterologe Expression in *K. phaffii*, wird das Zielgen im ersten Schritt in den Expressionsvektor kloniert und anschließend über homologe Rekombination in das Genom der Hefe integriert (Damasceno *et al.*, 2007). Vor der Klonierung kann es notwendig sein, die Nukleotidverteilung der Gene an den typischen GC-Gehalt von *K. phaffii* anzupassen, um die Transkriptionseffizienz zu steigern. Die *Codon-usage* scheint dagegen bei *K. phaffii* eine geringere Rolle zu spielen (Sinclair and Choy 2002; Boettner *et al.*, 2007). Neben der Anpassung der Gene spielt auch die Wahl des Stammes eine Rolle. Zur Produktion von Peptidasen eignet sich z. B. der proteasedefiziente Stamm SMD1168. Dieser besitzt eine verringerte Peptidaseaktivität und reduziert somit die Degradation heterolog produzierter Proteine im Medium (Spohner *et al.*, 2015). Bei proteasedefizienten Stämmen fehlt meist die vakuoläre Aspartatpeptidase Pep4 (Proteinase A), die wiederum weitere vakuoläre Peptidasen (Carboxypeptidase Prc1 (Carboxypeptidase Y) und Serinpeptidase Prb1 (Proteinase B)) aktiviert (James M. Cregg *et al.*, 2000; Lin-Cereghino & Lin-Cereghino, 2007; Spohner *et al.*, 2015). Zusätzlich fehlt dem Stamm SMD1168 das Gen der Histidindehydrogenase (*his4*), was eine Selektion auf Basis der Histidinbiosynthese erlaubt (Spohner *et al.*, 2015). Ein Nachteil von proteasedefizienten Stämmen ist jedoch, dass diese häufig ein schlechteres Wachstum und eine geringere Vitalität sowie Transformationseffizienz aufweisen (Lin-Cereghino & Lin-Cereghino, 2007).

Für die erfolgreiche heterologe Expression in *K. phaffii* spielt weiterhin die Wahl des Expressionsvektors und des Promotors eine entscheidende Rolle. Bei den Promotoren unterscheidet man zwischen konstitutiven und induzierbaren Promotoren. Der P_{AXO1} Promotor ist ein induzierbarer Promotor, der vornehmlich genutzt wird, wenn das zu exprimierende Gen potentiell schädlich für den Wirtsorganismus ist. Dazu werden die Zellen in der ersten Kultivierungsphase in hohen Zelldichten herangezogen und Glucose oder Glycerol als reprimierende Kohlenstoffquelle genutzt, um die Produktion des heterologen Proteins zu verhindern. In der zweiten Phase wird die Genexpression durch ein methanolhaltiges Medium induziert (Ellis *et al.*, 1985; Daly and Hearn 2005; Kang *et al.*, 2017).

Beim P_{GAP} Promotor (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Promotor) handelt es sich um einen konstitutiven Promotor, der verwendet wird, wenn das Genprodukt weniger schädlich für den Wirtsorganismus ist. Zudem ist die Kultivierung weniger aufwendig, da das Medium nicht gewechselt werden muss (Waterham *et al.*, 1997). Ziel bei der Verwendung konstitutiver Promotoren ist die verbesserte Proteinfaltung oder eine angepasste Genregulation (Vogl *et al.*, 2013).

Beide genannten Promotoren sind natürlich vorkommende Promotoren. Daneben gibt es auch synthetische Promotoren, die die Effizienz der Transkription steigern oder die Proteinfaltung verbessern sollen (Vogl *et al.*, 2013).

1.5.2.2. Sekretion in *K. phaffii*

Wie bereits erwähnt, ist ein entscheidender Vorteil des eukaryotischen Expressionssystem gegenüber *E. coli* die Sekretion der heterolog produzierten Proteine in das Medium. Dazu werden Proteine über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat transportiert und die Proteine parallel posttranslational modifiziert (Ahmad *et al.*, 2014; Lin-Cereghino *et al.*, 2013). Für die Sekretion von Proteinen in *K. phaffii* wird vorwiegend die α -Faktor-Signalsequenz von *S. cerevisiae* verwendet. Dabei handelt es sich um ein 86 Aminosäuren langes Präpro-Peptid, das sich am N-Terminus des heterolog produzierten Proteins befindet (Kurjan and Herskowitz 1982). Das Prä-Peptid ist für den Transport der Proteine in das ER zuständig und wird anschließend durch eine Peptidase abgespalten. Das Pro-Peptid spielt vermutlich beim Transport vom ER in den Golgi-Apparat eine Rolle und wird durch die Endopeptidase Kex2 abgespalten (Ahmad *et al.*, 2014; Lin-Cereghino *et al.*, 2013). Das Einbringen von *Spacer*-Sequenzen am N-Terminus kann dabei die Produktion und Sekretion heterolog produzierter Proteinen verbessern (Kjeldsen *et al.*, 1996). Nach der Prozessierung wird das heterolog produzierte Protein über sekretorische Vesikel aus der Zelle transportiert (Julius *et al.*, 1983; Fuller *et al.*, 1989).

Neben den bisher genannten Einflussfaktoren haben auch Kultivierungsbedingungen wie der pH-Wert, die Osmolarität, die Sauerstoffzufuhr oder die Temperatur einen Einfluss auf die Expression und Sekretion (Gasser *et al.*, 2007). Es wurde z. B. gezeigt, dass die Senkung der Kultivierungstemperatur von 28 bis 30 °C auf 15 bis 20 °C die Proteinfaltung und -sekretion verbessert und die Produktion von Proteinen, die an der zellulären Stressantwort beteiligt sind, reduziert (Jahic *et al.*, 2003; Gasser *et al.*, 2007; Dragosits *et al.*, 2009).

Die oben genannten Eigenschaften machen *K. phaffii* somit zu einem beliebten Hefe-basierten Expressionssystem, um diverse Proteine extrazellulär in großen Mengen für eine industrielle Anwendung produzieren zu können.

2. Zielsetzung

Die Reduktion des Speisesalzgehaltes in Lebensmitteln und damit einhergehend die Reduzierung des übermäßigen Konsums an Speisesalz ist das erklärte Ziel nationaler und internationaler Organisationen wie der WHO. Mit den bisherigen Bemühungen bewusst auf Speisesalz (NaCl) zu verzichten oder Salzersatzstoffe einzusetzen, konnte das Ziel nicht erreicht werden. Ein neuer Ansatz befasst sich mit Salzgeschmackverstärkern wie z. B. L-Arginyldipeptiden, die keinen Eigengeschmack haben, aber in der Lage sind, den vorhandenen Salzgeschmack zu intensivieren.

Peptidasen stellen eine vielversprechende Möglichkeit dar, salzgeschmackverstärkende L-Arginyldipeptide zu generieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Peptidasegene aus Basidiomyceten zu isolieren und zu klonieren. Anschließend sollten die Peptidasegene heterolog exprimiert und die Proteine gereinigt werden. Final sollte die arginylspezifische Schnittstellenspezifität der gereinigten Peptidasen mit synthetischen Substraten untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Herstellern Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Switzerland), Promega (Wisconsin, USA) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. PCR Primer wurden von *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg, Deutschland) und *Seqlab* (Göttingen, Deutschland) synthetisiert. Peptide für den FRET-Assay wurden von der Firma Caslo ApS (Kongens Lyngby, Dänemark) bezogen.

3.1.2. Vektoren

In Tabelle 2 sind die verwendeten Vektoren aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die dazugehörigen Vektorkarten können dem Anhang entnommen werden (Kapitel 8.1).

Tabelle 2: Verwendete Vektoren.

Vektor	Antibiotikaresistenz	Herkunft
pUC57	Ampicillin	Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
pCOLD I	Ampicillin	TaKaRa (Göttingen, Deutschland)
pET28a (+)	Kanamycin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
pPIC9	Ampicillin	Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)

3.1.3. Peptidasegene

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die klonierten Peptidasegene aus den Basidiomyceten *P. chrysosporium*, *S. commune* und *T. versicolor* sowie die *Accession number*, Einteilung, Homologie und molekulare Masse (MW) der verschiedenen Peptidasegene.

Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Peptidasegene aus *P. chrysosporium*, *S. commune* und *T. versicolor*.

Basidiomycet	Accession number	Einteilung	Homologie zu	MW [kDa]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	ABB73030	Endopeptidase	Aspartatpeptidase A01	42
	ABB73029	Endo- /Tripeptidylpeptidase	Serinpeptidase S53	58
<i>Schizophyllum commune</i>	XP_003037751	Endopeptidase	Peptidyl-Lys Metallopeptidase M35	36
	XP_003035465	Endopeptidase	Peptidyl-Lys Metallopeptidase M35	37
	XP_003032752	Amino-/Carboxy-/Di- /Tripeptidase	Metallopeptidase MH	42
<i>Trametes versicolor</i>	EIW62808	Endopeptidase	Aspartatpeptidase A01	44
	EIW63301	Endopeptidase	Aspartatpeptidase A01	41
	XP_008032702	Endopeptidase	Peptidyl-Lys Metallopeptidase M35	37
	EIW51569	Endopeptidase	Metallopeptidase M36	64
	EIW65216	Endopeptidase	Serinpeptidase S28	58
	EIW61562	Endopeptidase	Serinpeptidase S28	58
	XP_008043737	Endopeptidase	Serinpeptidase S41	72
	EIW61376	Tripeptidylpeptidase	Tripeptidylpeptidase A S53	66
	EIW61051	Endo- /Tripeptidylpeptidase	Serinpeptidase S53	58
	EIW59803	Endo- /Tripeptidylpeptidase	Serinpeptidase S53	63

3.1.4. Primer

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Primer zur Amplifikation verschiedener Peptidasegene aus *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* und *Schizophyllum commune*.

Tabelle 4: Überblick der verwendeten Primer zur Klonierung verschiedener Peptidasegene aus *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* und *Schizophyllum commune*.

Basidiomycet	Primername	Sequenz 5´→3´
	fwd_TVE_EIW62808_start	TCGCCATGTTCTGCAAAGC
	rev_TVE_EIW62808_stop	CCAATCAAGCAAGGGTGGC
	fwd_TVE_EIW- 62808_EcoRI_BL21	AAAGAATTCGCCATGTTCTGCAA GCCTC
	rev_TVE_EIW- 62808_XbaI_BL21	AAATCTAGACAATCACATCATCACC ATCACCACAGCAAGGGTGGCGAA
<i>T. versicolor</i> EIW62808	fw_oSP62808_EcoRI	AAAAGAATTCAGTCCCCTCAAGGA CGCC
	rev_TVE62808HNotI	AAAAGCGGCCGCTCACATCATCAT CATCACCATCACCACCACCACAGC AAGGGTGGCGAAGC
	fwd_TVE_EIW62808_ohne Start_Kp	AAATTCTGCAAAGCCTCCCTCGTT AC
	rev_TVE_EIW62808-His_Kp	AAATCACATCATCATCATCACCATC ACCACCACCACAGCAAGGGTGGC GAAGC
	fwd_TVE_XP008032702_ start	CGCCATGTTCTCCTCTGC
	rev_TVE_XP008032702	TAGGACTGGGCGGGGT
<i>T. versicolor</i> XP_008032702	fwd_TVE2702_BamHI	AAAGGATCCATGTTCTCCTCTGCT CTTCGC
	rev_TVE2702-His_XbaI	AAATCTAGATTAATGGTGATGGTG ATGGTGATGGTGATGGTGGGACTG GGCGGGGTTGTTC

Basidiomycet	Primername	Sequenz 5' → 3'
<i>T. versicolor</i>	fwdHTVE2702_EcoRI	AAAGAATTCCATCATCATCACCA TCACCACCACCACTTCTCCTCTGCT CTTCGCAC
	rev_TVE2702_NotI	AAAGCGGCCGCTTAGGACTGGGCG GGGTTG
XP_008032702	fwd2702_EcoRI_oSP	AAAAGAATTCGAGCGCGGCCTCTCC CTC
	rev_T2702His_NotI	AAAAGCGGCCGCTTAATGGTGATGG TGATGGTGATGGTGATGGTGGGACT GGGCGGGGTTG
<i>T. versicolor</i> EiW51569	fwd_TVE_EiW51569_start	ACAATGTTTCGCATTCAAGAAGGTC
	rev_TVE_EiW51569_3	CGCCAGCTGCTTAGCAG
	fwd_TVE_EiW51569_ EcoRI_BL21	AAAGAATTCACAATGTTTCGCATTCAA GAAGGTC
	rev_TVE_EiW51569 _XbaI_BL21	AAATCTAGATTACATCATCACCATCA CCACGCAGCCCGAGGGGAC
<i>T. versicolor</i> EiW59803	fwd_TVE_EiW59803_start	CATGTTCTGGTCGTCTGCCG
	rev_TVE_EiW59803_stop	CCGCTCACCCAATGAGAGC
	fwd_TVE59803_XhoI_BL21	AAACTCGAGCATGTTCTGGTCGTCT GCCG
	rev_TVE59803_His_EcoRI_ BL21	AAAGAATTCTCAATGGTGATGGTGA TGGTGCCAATGAGAGCCTGGAG
<i>T. versicolor</i> EiW62196	fwd_TVE_EiW62196_start	CGCCATGTTCTCTCTCGC
	rev_TVE_EiW62196	TAGCACTGCGTGTTCTGG
<i>T. versicolor</i> EiW61562	fwd_TVE_EiW61562_start	GACATGGCGCCCCTCTG
	rev_TVE_EiW61562_stop	AGCCTCAGTGCTTCGTGC
<i>T. versicolor</i> EiW61051	fwd_TVE_EiW61051_start	ACGATGGTCGCCACCAGC
	rev_TVE_EiW61051_stop	TTTTTTTACAGGCCAACGGCGGTG
<i>T. versicolor</i> EiW61376	fwd_TVE_EiW61376_start	AGCATGCGGTCGCTCTCC
	rev_TVE_EiW61376_stop	CTCCTCACAGGCCCGGG
<i>P. chrysosporium</i> ABB73029	fwd_PCH_ABB73029_start	ATGGTGTCGAAGCTCCTCG
	rev_PCH_ABB73029_2	CAAACACCAGCAGCCG

Basidiomycet	Primername	Sequenz 5' → 3'
<i>P. chrysosporium</i> ABB73029	fwd_HPCH29_NdeI	AAACATATGATGGTGTCTGAAGCTCC TCG
	rev_PCH29_BamHI	AAAGGATCCTCAAACACCAGCAGCC G
	fwd_PCH29_NcoI	AAACCATGGATGGTGTCTGAAGCTCC TCG
	rev_PCH29_NotI	AAAGCGGCCGCTCAAACACCAGCA GCCGC
	fwd_HisPCH29EcoRI	GAATTCCATCATCATCATCACCATCA CCACCACCACGTGTCTGAAGCTCCTC GTCC
	rev_PCH29_NotI	AAAGCGGCCGCTCAAACACCAGC AGCCG
	fwdPCH29_EcoRIoSP	AAAAGAATTCAAGCCCACGGCTCGC AG
	rev_PCH_ABB73029_6x- His_NotI_Pp	atatatGCGGCCGCTCAATGGTGATGG TGATGGTGAACACCAGCAGCCGCCT TCAAAG
	fwd_PCH_ABB73029_ EcoRI_Pp_ohne Start_neu	atatatGAATTCGTGTCTGAAGCTCCTC GTCCTC
	rev_PCH29_NotI_Kp	AAAAGCGGCCGCTCAATGGTGATG GTGATGGTGAACAC
<i>P. chrysosporium</i> ABB73030	fwd_PCH_ABB73030_start	ATGCATCTCAGCCAGTCTTTTCG
	rev_PCH_ABB73030_2	CAGTTGGTGGTTCGCAGTG
	fwd_PCH_ABB73030_ EcoRI_Pp_ohne Start	ATATATGAATTCATCTCAGCCAGTC TTTCG
	rev_PCH_ABB73030_His_ NotI_Pp	ATATATGCGGCCGCTCAATGGTGAT GGTGATGGTGGTTGGTGGTTCGCAG TG
	fwd_PCH_ABB73030_ EcoRI_Pp_ohne Start	atatatGAATTCATCTCAGCCAGTCTT TCG
rev_PCH30_NotI_Pp	atatatGCGGCCGCTCAGTTGGTGGTC GCAGTG	

Basidiomycet	Primername	Sequenz 5´ → 3´
<i>P. chrysosporium</i> ABB73030	fwd_PCH_ABB73030_	ATATATGAATTCCATCTCAGCCAGTC
	EcoRI_Pp_ohne Start	TTTCG
	rev_PCH30_NotI_Pp	ATATATGCGGCCGCTCAGTTGGTGG TCGCAGTG
<i>S. commune</i> XP003037751	fwd_SCO_XP003037751_1	AAGATGTTGCCCCCTC
	rev_SCO_XP003037751_	AGCCCTTAGCACTGCGTG
	stop	
<i>S. commune</i> XP003035465	fwd_SCO_XP003035465_1	ATCATGCTCGCCCTCG
	rev_SCO_XP003035465_	AGATTTAGGCGTAGTCGGAGAAG
	stop	
<i>Pleurotus</i> <i>floridanus</i> DPPV	Pos DPPV fwd	ATGAGGTTCTCTCTGCCTTTGC
	Pos DPPV rev	TTACTCCTTTTCACCTACGAACTTATC G
	fwd_DPPVPosf_Ndel	AAACATATGATGAGGTTCTCTCTGC CTTTGC
	rev_DPPVPosf_Bam	AAAGGATCCTTACTCCTTTTCACCTA CGAACTTATCG

3.1.5. Organismen

In Tabelle 5 sind die Namen der verwendeten Basidiomyceten, deren Abkürzung sowie Stammnummer und Herkunft aufgelistet. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verwendeten Empfängerorganismen inklusive Genotyp, die für die Klonierung und Expression der Peptidasegene verwendet wurden.

Tabelle 5: Verwendete Basidiomyceten. k. A.: keine Angaben.

Basidiomycet	Abkürzung	Stammnummer	Herkunft
<i>Agrocybe aegerita</i>	Aae	267	Institut für Molekulare Holzbiotechnologie
<i>Armillaria mellea</i>	Ame	100.12	CBS
<i>Bjerkandera adusta</i>	Bad	230.93	CBS
<i>Coprinus cinereus</i>	Cci	886	DSMZ
<i>Coniophora puteana</i>	Cpu	4831	DSMZ
<i>Flammulina velutipes</i>	Fve	1658	DSMZ

Basidiomycet	Abkürzung	Stammnummer	Herkunft
<i>Fomes fomentarius</i>	Ffo	1182	DSMZ
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Fpi	4957	DSMZ
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	God	444.61	CBS
<i>Grifola frondosa</i>	Gfr	480.63	CBS
<i>Hericium erinaceum</i>	Her	STMA 06176B	Helmoltz Zentrum Braunschweig (Prof. Stadler)
<i>Hypholoma sublateritium</i>	Hsu	8260	DSMZ
<i>Lentinula edodes</i>	Led	A 20-5	CBS
<i>Marasmius scorodonius</i>	Msc	137.83	CBS
<i>Meripilius giganteus</i>	Mgi	561.86	CBS
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pch	L13-2	k. A.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pch	1547	DSMZ
<i>Pleurotus eryngii</i>	Per	613.91	CBS
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pos	1833	DSMZ
<i>Pleurotus floridanus</i>	Pfl	k. A.	Institut für Molekulare Holzbiotechnologie
<i>Pycnoporus coccineus</i>	Pco	483.72	CBS
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Psa	8266	DSMZ - LCI
<i>Schizophyllum commune</i>	Sco	1024	DSMZ
<i>Trametes versicolor</i>	Tve	11309	DSMZ
<i>Tremella mesenterica</i>	Tme	1557	DSMZ
<i>Wolfiporia cocos</i>	Wco	279.55	CBS
<i>Ustilago maydis</i>	Uma	11269	DSMZ

Tabelle 6: Name und Genotyp der für die Klonierung und Expression verschiedener Peptidasegene verwendeten Organismen.

Organismus	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK λ - rpsL(StrR) endA1 nupG
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3) F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5- T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λ S)
<i>Komagataella phaffii</i> SMD1168	niaD ⁻ , sC ⁻ , Δ argB, adeA ⁻

3.2. Methoden

3.2.1. Kultivierung von Organismen

3.2.1.1. Basidiomyeten

Die Basidiomyceten wurden in einer 125 mL Vorkultur in Standardnährlösung (SNL, Tabelle 8) bei 24 °C und 150 rpm (*rounds per minute*) kultiviert. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die kultivierten Basidiomyceten sowie die Dauer der Kultivierung in der Vor- und Hauptkultur. Nach der Vorkultur wurden die Pilze in eine 250 mL Hauptkultur in Minimalmedium (Tabelle 9 und Tabelle 10) mit 1% Gluten als Substrat angeimpft. Das Gluten wurde zuvor im Schikanekolben über Nacht bei 140 °C trockensterilisiert. Für die Hauptkultur wurde die Vorkultur jeweils zweimal mit dH₂O gewaschen und das Pellet in Minimalmedium resuspendiert. Die Hauptkulturen wurden ebenfalls bei 24 °C und 150 rpm kultiviert.

Vom Kulturüberstand wurde über einen Zeitraum von 24 Tagen jeweils eine Probe entnommen und der pH-Wert gemessen. Um die intrazelluläre Peptidaseaktivität zu überprüfen, wurden die Kulturen nach 24 Tagen durch Zentrifugation geerntet (5.000 x g, 4 °C, 15 Min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 mL 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 resuspendiert und Glasperlen hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mittels Precellys 24-Dual (PeqLab, Erlangen, Deutschland; 5.800 Min⁻¹, 3 x 20 Sek mit 20 Sek Pause, Kapitel 3.2.3.1) aufgeschlossen und der Überstand zweimal zentriugiert (12.000 x g, 4 °C, 2 Min). Final wurde der Überstand zur Lagerung in 100 μ L aliquotiert.

Tabelle 7: Übersicht über die Basidiomyceten aus dem Peptidase Screening, sowie die Kultivierungsdauer in der Vor- und Hauptkultur. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24.

Basidiomyceten	interne Stammnummer	Abkürzung	Vorkultur [Tage]	Hauptkultur [Tage]
<i>Agrocybe aegerita</i>	207	Aae	10	10
<i>Armillaria mellea</i>	1	Ame	10	13
<i>Bjerkandera adusta</i>	299	Bad	7	24P
<i>Coprinus cinereus</i>	228	Cci	8	10
<i>Coniophora puteana</i>	278	Cpu	6	24P
<i>Fomes fomentarius</i>	1182	Ffo	6	8
<i>Fomitopsis pinicola</i>	17	Fpi	6	24P
<i>Flammulina velutipes</i>	232	Fve	3	7
<i>Grifola frondosa</i>	246 und 341	Gfr	8	13
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	20	God	10	10
<i>Gleophyllum trabeum</i>	272	Gtr	7	17
<i>Hericium erinaceum</i>	22	Her	10	20
<i>Hypholoma sublateritium</i>	299	Hsu	6	21
<i>Lentinula edodes</i>	25	Led	8	12
<i>Meripilius giganteus</i>	40	Mgi	8	13
<i>Marasmius scorodonius</i>	44	Msc	10	17
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	24	Pch	7	19
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	246	Pch	7	21
<i>Pycnoporus cinnabarius</i>	58	Pci	10	19
<i>Pycnoporus coccineus</i>	76	Pco	6	15
<i>Pleurotus eryngii</i>	60	Per	4	3
<i>Pleurotus floridanus</i>	216	Pfl	4	6
<i>Pleurotus ostreatus</i>	218	Pos	4	6
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	21	Psan	10	12
<i>Schizophyllum commune</i>	262	Sco	7	3
<i>Tremella mesenterica</i>	231	Tme	6	10
<i>Trametes versicolor</i>	86	Tve	7	17
<i>Ustilago maydis</i>	293	Uma	7	8
<i>Wolfiporia cocos</i>	88	Wco	6	24P

Tabelle 8: Zusammensetzung der Standardnährlösung (SNL) zur Kultivierung der Basidiomyceten in der Vorkultur.

Chemikalie	Konzentration
D+ Glucose x ddH ₂ O	30 g L ⁻¹
L-Asparagin x ddH ₂ O	4,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 10)	1 mL L ⁻¹
pH-Wert mit 1 M NaOH auf 6 einstellen und autoklavieren	

Tabelle 9: Zusammensetzung des Minimalmediums zur Kultivierung der Basidiomyceten in der Hauptkultur.

Chemikalie	Konzentration
D-Glucose Monohydrat	10 g L ⁻¹
Hefeextrakt	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 10)	1 mL L ⁻¹
pH-Wert mit 1 M NaOH auf 6 einstellen und autoklavieren	

Tabelle 10: Zusammensetzung der Spurenelementlösung.

Chemikalie	Konzentration
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,08 g L ⁻¹
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,09 g L ⁻¹
MnSO ₄ x H ₂ O	0,03 g L ⁻¹
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,005 g L ⁻¹
EDTA	0,4 g L ⁻¹

3.2.1.2. *Escherichia coli*

E. coli Stämme wurden in Standard *Lysogeny Broth* Medium (LB, Tabelle 11) bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Das LB Medium wurde zunächst autoklaviert und nach dem Abkühlen mit Antibiotika versetzt (Tabelle 11). Für die Kultivierung auf Agarplatten wurde dem LB Medium 15 g L⁻¹ Agar-Agar hinzugefügt und die Platten bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung des *Lysogeny Broth* (LB) Mediums zur Kultivierung von *E. coli*.

Chemikalie	Konzentration
NaCl	10 g L ⁻¹
Trypton	10 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5 g L ⁻¹
pH auf 7 einstellen und autoklavieren	
Ampicillin	100 µg L ⁻¹
Kanamycin	50 µg L ⁻¹

3.2.1.2.1. Transformation von *E. coli*

Alle verwendeten *E. coli* Stämme (TOP10 und BL21 (DE3)) waren chemisch kompetent. Für die Transformation wurden jeweils 5 µL Plasmid mit 100 µL kompetenten Zellen gemischt und der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min. Danach wurden die Zellen 2 min auf Eis inkubiert und 500 µL eisgekühltes LB Medium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 45 min bei 37 °C regeneriert und zentrifugiert (12.000 x g, 1 min, RT). Vom Überstand wurden 500 µL verworfen, die Zellen im restlichen Medium resuspendiert und auf LB Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Im Fall vom pUC57-Vektor wurden zusätzlich 100 µL X-Gal für das Blau-Weiß Screening auf die Agarplatten gegeben.

3.2.1.3. *Komagataella phaffii*

K. phaffii Stämme wurden in YEPD Medium (Tabelle 12) bei 28 °C und 200 rpm bzw. auf His⁻ Platten (Tabelle 13) bei 28 °C kultiviert. Die verwendeten Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert.

Für die Genexpression wurde *K. phaffii* SMD1168 in BMMY (*buffered methanol complex*) Medium (Tabelle 15) kultiviert und der Kultur zu Beginn sowie alle 24 Stunden 1 % (v/v) Methanol zur Induktion des AOX1 Promotors zugegeben.

Nachdem die Plasmide in die Hefe eingebracht wurden (Kapitel 3.2.1.3.1), wurden die Klone auf ihre Aktivität überprüft. Dazu wurden von der Agarplatte (His⁻-Platte) 48 bzw. 96 Klone ausgewählt und mit einem sterilen Zahnstocher in eine 96 *Deep-well* Platte überführt, in die zuvor 600 µL YEPD Medium vorgelegt wurden. Die Klone wurden drei Tage bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (4.600 x g, 4 °C, 15 min), zweimal mit 600 µL sterilem Wasser gewaschen und das Pellet in 600 µL BMMY Medium

resuspendiert. Die Klone wurden über einen Zeitraum von 96 h bei 20 °C und 150 rpm kultiviert und alle 24 h wurde eine Probe vom Überstand entnommen. Die Aktivität der einzelnen Klone wurde mittels Azocaseinassay und FRET-Assay (Kapitel 3.2.5.1 und 3.2.5.2) überprüft.

Tabelle 12: Zusammensetzung des YEPD Mediums zur Kultivierung von *K. phaffii*.

Chemikalie	Konzentration
Hefeextrakt	10 g L ⁻¹
Pepton aus Casein	20 g L ⁻¹
D-Glucose Monohydrat	20 g L ⁻¹
auf 1 L ⁻¹ dH ₂ O auffüllen und autoklavieren	

Tabelle 13: Zusammensetzung der His⁻ Platten zur Kultivierung von *K. phaffii*.

Chemikalie	Konzentration
Agar-Agar	15 g L ⁻¹
D-Glucose Monohydrat	20 g L ⁻¹
dH ₂ O	900 mL L ⁻¹
autoklavieren	
500-fach Biotin (steril) (20 mg 100 mL ⁻¹)	2 mL L ⁻¹
<i>Yeast nitrogen base</i> (YNB, steril) (Tabelle 14)	100 mL L ⁻¹

Tabelle 14: Zusammensetzung des YNB (*yeast nitrogen base*) Mediums.

10-fach YNB	Konzentration
YNB	13,4 g 100 mL ⁻¹
steril filtrieren	

Tabelle 15: Zusammensetzung des BMMY Mediums zur Kultivierung von *K. phaffii*.

BMMY Medium	Konzentration
Hefeextrakt	10 g L ⁻¹
Pepton aus Casein	20 g L ⁻¹
dH ₂ O	800 mL L ⁻¹
autoklavieren	
0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6 (steril)	100 mL L ⁻¹
10-fach YNB (steril, Tabelle 14)	100 mL L ⁻¹
500-fach Biotin (steril) (20 mg 100 mL ⁻¹)	2 mL L ⁻¹

3.2.1.3.1. Transformation *K. phaffii*

Im ersten Schritt wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *MSSI* (Tabelle 16) linearisiert. Es wurden 5 µg des linearisierten Plasmids auf 80 µL chemisch kompetente SMD1168 Zellen gegeben und der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde in einer Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm; VWR, Darmstadt, Deutschland) mit dem Eppendorf Eporator® (1.500 V, Hamburg, Deutschland) die Elektroporation durchgeführt. Danach wurden 500 µL eisgekühltes YEPD (*yeast extract peptone dextrose*, Tabelle 12) und 500 µL eisgekühltes Sorbitol (1 M) auf die Zellen gegeben und der Ansatz 1 h bei 30 °C und 800 rpm regeneriert. Die Zellen wurden zentrifugiert (2.000 x g, 4 min, RT), 800 µL vom Überstand verworfen und das Pellet in 200 µL Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf His⁻-Platten (Tabelle 13) ausplattiert und diese für drei Tage bei 28 °C inkubiert.

Tabelle 16: *MSSI* Verdau zur Linearisierung des pPIC9 Vektors.

Komponenten	Volumen
≤ 1 µg pPIC9	x µL
10X Puffer	2 µL
<i>MSSI</i>	1 µL
dH ₂ O	auf 20 µL auffüllen
Inkubation: 37 °C, 10 Min	
Inaktivierung: 65 °C, 10 Min	

3.2.2. Klonierung, Expression und Reinigung

3.2.2.1. RNA Isolation

Zur Isolierung von RNA aus Basidiomyceten wurde das Pilzmycel von der SNL-Agarplatte abgeschabt und mit 1 mL 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 sowie Glasperlen versetzt. Anschließend wurde das Mycel mit der Precellys 24-Dual (PeqLab, Erlangen, Deutschland; 5.800 Min⁻¹, 3 x 20 Sek mit 20 Sek Pause, Kapitel 3.2.3.1) aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das „innuPREP RNA Mini Kit 2.0“ von Analytik Jena (Jena, Deutschland) nach Herstellerangaben zur Isolation von RNA verwendet. Die gewonnene RNA wurde dann in cDNA umgeschrieben (Kapitel 3.2.2.2).

3.2.2.2. cDNA Synthese

Zur Synthese komplementärer DNA (*complementary DNA*, cDNA) wurde das FastGene Scriptase II cDNA Synthese Kit von Nippon Genetics (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet (Tabelle 17).

Tabelle 17: Ansatz zur Synthese komplementärer DNA (cDNA).

Komponente	Volumen/ Konzentration
RNA	1 ng bis 5 µg
Oligo (dT) Primer (80 µM)	2 µL (8 µM)
Inkubation: 5 Min, 42 °C	
5X FastGene Scriptase II Puffer	4 µL
dNTPs (2 mM)	2 µL (0,2 mM)
DTT (0,1 M)	2 µL (20 mM)
RNase Inhibitor (40 U µL ⁻¹)	0,5 µL
FastGene Scriptase II (200 U µL ⁻¹)	0,5 µL
dH ₂ O	auf 20 µL auffüllen
Inkubation: 60 Min, 42°C	
Inaktivierung: 15 Min, 70 °C	

3.2.2.3. Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus *K. phaffii* wurde eine 10 mL YEPD Kultur bei 28 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde zentrifugiert (5.000 x g, 4 °C, 5 Min) und das Pellet in Lysispuffer (Tabelle 18) resuspendiert. Anschließend wurden 400 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Glasperlen hinzugegeben. Die Zellen wurden mittels Precellys 24-Dual (PeqLab, Erlangen, Deutschland; 5.800 Min⁻¹, 3 x 20 Sek mit 20 Sek Pause, Kapitel 3.2.3.1) aufgeschlossen und zentrifugiert (5.000 x g, 5 Min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µL TE Puffer (Tris EDTA; Tabelle 19) versetzt und der Ansatz 5 bis 10 mal invertiert. Nach dem Zentrifugieren (5.000 x g, 5 min, 4 °C) wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Überstand wurden 200 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und 5 bis 10 mal invertiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 mL 96 % Ethanol versetzt, invertiert und für 10 Minuten bei - 80 °C inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (14.000 x g, 10 Min, RT) wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei 50 °C getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 50 µL dH₂O resuspendiert.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Lysis-Puffers zur Isolierung genomischer DNA.

Chemikalien	Konzentration
NaCl	100 mM
Tris-HCl, pH 8	100 mM
EDTA	1 mM
SDS	1 %
Triton X-100	2 %
pH-Wert auf 7,6 bis 7,7 einstellen	

Tabelle 19: Zusammensetzung des TE-Puffers (Tris EDTA) zur Isolierung genomischer DNA (gDNA).

Chemikalien	Konzentration
Tris-HCl, pH 8	10 mM
EDTA	1 mM
pH-Wert auf 7,6 bis 7,7 einstellen	

3.2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde im Thermocycler Biometra Trio der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) durchgeführt. Tabelle 20 und Tabelle 21 geben einen Überblick über den Reaktionsansatz und das PCR-Programm zur Amplifizierung von DNA mittels Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

Tabelle 22 und Tabelle 23 geben einen Überblick über den Reaktionsansatz und das PCR-Programm zur Durchführung einer Kolonie-PCR mit der DreamTag™ Polymerase (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland). Die Kolonie-PCR diente der Identifizierung positiver *E. coli* oder *K. phaffii* Klone nach der Transformation. Statt DNA wurde für die Kolonie-PCR ein Klon von der Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in den vorbereiteten Kolonie-PCR Ansatz überführt. Für die Kolonie-PCR wurden vektorspezifische Primer verwendet (Tabelle 24).

Tabelle 20: Reaktionsansatz zur Amplifizierung von DNA Fragmenten mittels Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

Komponente	Volumen [μL]
5X Phusion Puffer	10
dNTPs	2
forward Primer (10 μM)	2,5
reverse Primer (10 μM)	2,5
DNA	2
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2 U μL^{-1})	1
dH ₂ O	auf 50 μL auffüllen

Tabelle 21: Programm zur Amplifizierung von DNA Fragmenten mittels Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. T_m: Primerspezifische Annealingtemperatur.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98 °C	2 Min	
Denaturierung	98 °C	30 Sek	30x
Annealing	T _m [°C]	30 Sek	30x
Extension	72 °C	30 Sek/kb	30x
Finale Extension	72 °C	10 Min	
	4 °C	∞	

Tabelle 22: Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR mittels Dream™Taq DNA Polymerase.

Komponente	Volumen [μL]
forward Primer (10 μM)	1
reverse Primer (10 μM)	1
dNTPs (2 mM)	1
DMSO	1
5X DreamTag™ Puffer	4
DreamTaq™ Polymerase (5 U μL^{-1})	0,1
Template DNA oder Kolonie	1
dH ₂ O	auf 20 μL auffüllen

Tabelle 23: Programm für die Kolonie-PCR mittels Dream™Taq DNA Polymerase. T_m: Primerspezifische Annealingtemperatur.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Initiale Denaturierung	95 °C	10 Min	
Denaturierung	95 °C	1 Min	25x
Annealing	T _m [°C]	1 Min	25x
Extension	72 °C	1 Min/kb	25x
Finale Extension	72 °C	10 Min	
	4 °C	∞	

Tabelle 24: Vektorspezifische Primer für die Kolonie-PCR.

Vektor	Primername	Sequenz 5'→3'
pUC57	M13 fwd	TGTAACGACGGCCAG
	M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC
pCOLD I	pCOLD fwd	ACGCCATATCGCCGAAAGG
	pCOLD rev	ATTACGCGATCGATTATTTATTTCTG
pPIC9	3'AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC
	5'AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC

3.2.2.5. Touchdown PCR

Peptidasegene, die nicht mit der herkömmlichen PCR (Kapitel 3.2.2.4) amplifiziert werden konnten, wurden mittels Touchdown-PCR amplifiziert. Die PCR nutzt höhere Temperaturen für die spezifische Bindung von Primer an die *Template* DNA. Mit der Anzahl der definierten Zyklen sinkt die Annealingtemperatur um einen bestimmten Wert (in dieser Arbeit um 1 °C) und unspezifische PCR Produkte werden amplifiziert (Korbie and Mattick 2008). Der Reaktionsansatz für die Touchdown-PCR ist Tabelle 20 zu entnehmen. Tabelle 25 gibt einen Überblick über das PCR-Programm der Touchdown-PCR mittels Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

Tabelle 25: Programm für die Touchdown-PCR mittels Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. T_m: Primerspezifische Annealingtemperatur.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98 °C	2 Min	
Denaturierung	98 °C	30 Sek	
Annealing	T _m °C [x - 1 °C/ Zyklus]	30 Sek	12x
Extension	72 °C	30 Sek/kb	
Denaturierung	98 °C	30 Sek	
Annealing	T _m °C [x - 12 °C]	30 Sek	25x
Extension	72 °C	30 Sek/kb	
Finale Extension	72 °C	10 Min	
	4 °C	∞	

3.2.2.6. Agarosegelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Agarose wurde in Tris-Acetat-EDTA (TAE; Tabelle 25) Puffer gelöst und mit Midori Green (5 µL 50 mL⁻¹, Nippon Genetics, Düren, Deutschland) versetzt. Als Standard wurde der 1 kb GeneRuler™ (Abbildung A2) von Thermo Fischer Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Der Puffer für die Phusion® und Dream™ Taq Polymerase enthält bereits den DNA Ladepuffer. Für alle anderen Ansätze (Restriktionsverdau, Ligation) wurden die Proben mit DNA Ladepuffer (Tabelle 25) im Verhältnis 1:6 versetzt. Die Gele wurden bei 100 V für ca. 25 Minuten in TAE Puffer laufen gelassen. Anschließend wurden die DNA Banden mit der FastGene FAS V (Nippon Genetics, Düren, Deutschland) visualisiert. Zur Extraktion spezifischer DNA Fragmente wurden die Banden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „NucleoSpin® Gel and PCR clean up Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt.

Tabelle 26: Zusammensetzung des 1X TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffers und des 6X DNA Ladepuffers für die Agarosegelelektrophorese.

1X TAE Puffer	6X DNA Ladepuffer
400 mM Tris-HCl, pH 8	50 % (v/v) Glycerol
20 mM Eisessig	0.005 % (w/v) Bromphenolblau
10 mM EDTA	

3.2.2.7. Restriktionsverdau

Der Ansatz für den Restriktionsverdau ist in Tabelle 27 dargestellt. Die Restriktionsenzyme wurden von den Herstellern New England Biolabs GmbH (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) bzw. Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Germany) bezogen. Der Restriktionsverdau wurden nach Herstellerangaben bei 37 °C durchgeführt.

Tabelle 27: Ansatz für den Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA.

Komponente	Volumen/ Konzentration
Template DNA	≈ 600 ng
10X Puffer	2 µL
Restriktionsenzym I	1 µL
Restriktionsenzym II	1 µL
dH ₂ O	auf 20 µL auffüllen

3.2.2.8. Dephosphorylierung

Die *Antarctic* Phosphatase wurde nach Herstellerangaben verwendet. Der Reaktionsansatz (Tabelle 28) wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 80 °C für 2 Minuten inaktiviert.

Tabelle 28: Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung der 5´ Enden von DNA.

Komponente	Volumen/ Konzentration
DNA	1 pmol
10 X Puffer	1 µL
Antartic Phosphatase (5 U)	1 µL
dH ₂ O	auf 20 µL auffüllen

3.2.2.9. Phosphorylierung

Die T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK; Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) überträgt eine Phosphatgruppe von Adenosinriphosphat (ATP) auf das 5´ Ende von Nukleotiden und Desoxyribonukleotiden und erleichtert eine anschließende Ligation mit der T4 Ligase (Kapitel 3.2.2.10). Der Reaktionsansatz (Tabelle 29) wurde bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert und anschließend bei 75 °C für 10 Minuten inaktiviert.

Tabelle 29: Reaktionsansatz zur Phosphorylierung von DNA mittels T4 Polynukleotid Kinase.

Komponente	Volumen/ Konzentration
lineare DNA	1 - 20 pmol
10X Puffer A	2 μ L
10 mM ATP	2 μ L
T4 PNK	1 μ L
dH ₂ O	auf 20 μ L auffüllen

3.2.2.10. DNA Ligation

Für die Ligation von DNA Fragmenten mit einem Vektor wurde die T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Dazu wurden Insert und Vektor zuvor mit Restriktionsenzymen geschnitten (Kapitel 3.2.2.7) und die DNA im Verhältnis 1:3 oder 1:5 eingesetzt. Zudem wurden 1 μ L 10 X T4 Ligasepuffer und 1 μ L T4 DNA Ligase hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 μ L mit dH₂O aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.2.2.11. Plasmidisolation und Sequenzierung

Für die Plasmidisolierung aus *E.coli* wurden Klone in 5 mL LB Amp Medium über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Plasmide mit dem „innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0“ von Analytik Jena (Jena, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Die Plasmide wurde final in 50 μ L Puffer eluiert.

Zur Sequenzierung von DNA Fragmenten oder Plasmiden wurden 600 bis 1.200 ng Plasmid in einem Gesamtansatz von 12 μ L eingesetzt. Es wurde jeweils ein *forward* oder ein *reverse* Primer für die Sequenzierung verwendet. Die Sequenzierung wurde von der Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt und die Ergebnisse mit dem Programm SnapGene®5.1.7 (GSL Biotech, Chicago, USA) ausgewertet.

3.2.3. Zellaufschluss

3.2.3.1. Precellys

Für den Zellaufschluss mit der Precellys 24-Dual (PeqLab, Erlangen, Deutschland; 5.800 Min⁻¹, 3 x 20 Sek mit 20 Sek Pause) wurden die Proben jeweils in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 resuspendiert und mit Glasperlen versetzt.

Die Methode wurde verwendet, um RNA oder genomische DNA zu isolieren und die Zellen nach der Expression in *E. coli* aufzuschließen, um die Proteine anschließend mittels His SpinTrap™-Säule (Ni²⁺-NTA) reinigen zu können. Der Zellaufschluss wurde auch zur Überprüfung intrazellulärer Peptidaseaktivität verwendet. Diese wurde nach der Expression in *K. phaffii* und im Peptidase Screening der Basidiomyceten an Tag 24 bestimmt.

3.2.3.2. Ultraschall

Der Zellaufschluss mittels Ultraschall (UP50H/UP100H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland) wurde verwendet, um die Zellen nach der Expression in *E. coli* aufzuschließen und die Proteine anschließend mittels FPLC-basierter Ni²⁺-NTA zu reinigen. Dazu wurde das Pellet jeweils in 5 bzw. 10 mL 50 mM Bis-Tris Puffer pH 8, 0,5 M NaCl resuspendiert. Die Einstellungen waren wie folgt: Zyklus: 0,5, Amplitude: 50 %.

3.2.4. Proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1. Heterologe Expression in *E. coli*

Die rekombinanten Enzyme wurden heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) exprimiert. Dafür wurden die Gene in den pCOLD I bzw. pET28a (+) Vektor kloniert (Tabelle 29). Für die Expression wurde eine Kultur in LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum (pCOLD I: 100 µg mL⁻¹ Ampicillin; pET28a(+): 50 µg mL⁻¹ Kanamycin) über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Hauptkultur wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,05 in LB Medium und entsprechendem Antibiotikum angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Danach wurde die Hauptkultur für zwei Minuten auf Eis gestellt und die Genexpression durch Zugabe von 0,1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, wenn nicht anders angegeben) induziert. Die Kulturen wurden bei 17 °C und 150 rpm für 20 Stunden kultiviert (falls nicht anders angegeben).

Anschließend wurden die Zellen geerntet (5.000 x g, 4 °C, 15 Min), das Pellet in 50 mM Bis-Tris Puffer pH 8, 0,5 M NaCl resuspendiert und die Zellen mit der Precellys (Kapitel 3.2.3.1) oder Ultrachall (Kapitel 3.2.3.2) aufgeschlossen. Nach dem Zentrifugieren (5.000 x g, 4 °C, 15 Min) wurde die lösliche Fraktion mittels Affinitäts- bzw. Größenausschlusschromatographie gereinigt (Kapitel 3.2.4.8, 3.2.4.9 und 3.2.4.10) und auf Peptidaseaktivität überprüft (Kapitel 3.2.5.1 und 3.2.5.2).

Tabelle 30: Übersicht über die Expression verschiedener Peptidasegene in *E. coli*. HK: Hauptkultur. N: N-Terminus. C: C-Terminus.

Basidiomycet	Accession number	Vektor	His-Tag	Volumen HK [mL]	Reinigung
<i>T. versicolor</i>	EIW62808	pCOLD I	N	50	His SpinTrap™
	XP_008032702	pCOLD I	N	10	-
	EIW51569	pCOLD I	N	50	His SpinTrap™
	EIW59803	pCOLD I	N	50	His SpinTrap™
<i>P. chrysosporium</i>	ABB73029	pCOLD I	N	50	His SpinTrap™
	ABB73029	pET28a(+)	-	100	SEC
<i>P. floridanus</i> DPPV	KDQ25582	pCOLD I	N	1.000	Ni ²⁺ -NTA (FPLC)

3.2.4.2. Heterologe Expression in *K. phaffii*

Die rekombinanten Peptidasegene wurden heterolog im proteasedefizienten *K. phaffii* Stamm SMD1168 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) exprimiert (Tabelle 31). Dazu wurden die Gene ohne das Startcodon in den Expressionsvektor pPIC9 kloniert.

Nachdem die Plasmide in die Hefe eingebracht wurden (Kapitel 3.2.1.3.1), wurde für die Genexpression eine Vorkultur in YEPD Medium 3 Tage bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur zweimal mit sterilem dH₂O gewaschen und die OD₆₀₀ der Hauptkultur auf 1 eingestellt. Um den AOX1-Promotor zu induzieren, wurde zu Beginn und alle 24 Stunden 1 % (v/v) MeOH in die Kultur gegeben und diese bei 20 °C und 150 rpm kultiviert. Die Kultivierungsdauer richtete sich nach der maximalen Peptidaseaktivität der einzelnen Klone aus der 96 *Deep-well* Platte (Kapitel 3.2.1.3).

Anschließend wurden die Kulturen geerntet (5.000 x g, 4 °C, 15 Min) und der Kulturüberstand mittels Affinitäts- bzw. Größenausschlusschromatographie (Kapitel 3.2.4.8 und 3.2.4.10) gereinigt. Um intrazelluläre Peptidaseaktivität zu bestimmen, wurde das Pellet in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 resuspendiert und die Zellen mittels Precellys (Kapitel 3.2.3.1) aufgeschlossen. Nach dem Zentrifugieren (5.000 x g, 4 °C, 15 Min) wurde die lösliche Fraktion auf Peptidaseaktivität überprüft (Kapitel 3.2.5.1 und 3.2.5.2).

Tabelle 31: Übersicht über die Expression verschiedener Peptidasegene in *K. phaffii*. HK: Hauptkultur. N: N-Terminus. C: C-Terminus. SP: Signalpeptid.

Basidiomycet	Accession number	Vektor	His-Tag	Volumen HK [mL]	Reinigung
<i>T. versicolor</i>	EIW62808	pPIC9	C (+ SP)	100	-
	XP_00803270	pPIC9	N (+ SP)	100	-
	2				
<i>P. chrysosporium</i>	XP_00803270	pPIC9	C (- SP)	100	-
	2				
	ABB73029	pPIC9	N (+ SP)	100, 500, 1.000	SEC/ Ni ²⁺ -NTA (FPLC)
	ABB73029	pPIC9	C (- SP)	100	SEC (FPLC) His SpinTrap™
	ABB73029	pPIC9	-	100	SEC (FPLC)
	ABB73030	pPIC9	C (+ SP)	100	His SpinTrap™ SEC (FPLC)
	ABB73030	pPIC9	-	100	-

3.2.4.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Assay nach Herstellerangaben durchgeführt (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, USA). Die Absorption wurde in Triplikaten bei 595 nm in einem *microplate reader* (Eon, BioTek, Winooski, USA) gemessen. Zur Kalibrierung wurde eine BSA Standardreihe zwischen 0,1 und 2 mg mL⁻¹ verwendet.

3.2.4.4. Denaturierende SDS-PAGE und semi-native PAGE

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) dient der Überprüfung der molaren Masse und der Reinheit eines Proteins. Bei der denaturierenden SDS-PAGE wurden die Proben zuvor mit denaturierendem Ladepuffer (Tabelle 31) im Verhältnis 1:1 versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Für eine semi-native PAGE wurden die Proben mit nativen Ladenpuffer (Tabelle 38) im Verhältnis 1:1 gemischt und nicht aufgeköcht. Die Proben wurden zusammen mit einem Proteinstandard (*Precision Plus Protein Unstained* oder *All Blue*

Standard, BioRad, München, Deutschland, s. Anhang Abbildung A3) auf einem 12 %-igen Gel (Tabelle 32) oder einem 12 %igen Single Gel (Tabelle 33, Tabelle 35) aufgetragen. Die Elektrophorese für die SDS-PAGE wurde bei 20 mA pro Gel und für die semi-native PAGE bei 10 mA pro Gel und 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit Imperial™ Protein Stain (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) angefärbt.

Tabelle 32: Verwendete Lösungen für die denaturierende und semi-native SDS-PAGE.

Lösung	Komponenten	Konzentration
APS Lösung Lagerung bei – 20 °C	Ammoniumperoxidsulfat	0,4 g L ⁻¹ (1,75 mM)
Elektrophorese-Laufpuffer	Tris Base pH 6,8	3,02 g L ⁻¹ (25 mM)
	Glycin	14,42 g L ⁻¹ (192 mM)
	SDS	1,0 g L ⁻¹ (3,5 mM)
2X Ladepuffer, denaturierend Lagerung bei – 20 °C	Tris-HCl	23,64 g L ⁻¹ (150 mM)
	Dithiothreitol (DTT)	30,85 g L ⁻¹ (200 mM)
	Glycerol	20 % (v/v)
	SDS	4 % (w/v)
2X Ladepuffer, nativ Lagerung bei – 20 °C	Tris-HCl pH 6,8	23,64 g L ⁻¹ (150 mM)
	Glycerol	40 % (v/v)
	SDS	2 % (w/v)
	Bromphenolblau	25 mg L ⁻¹

Tabelle 33: Zusammensetzung eines diskontinuierlichen Gels mit 12 % Acrylamid.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
dH ₂ O	2,15 mL	1,45 mL
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	1,5 mL	243,5 µL
1,5 M Tris pH 8,8	1,25 mL	-
1,5 M Tris pH 6,8	-	250 µL
10 % (w/v) SDS	50 µL	20 µL
APS Lösung (40 %)	12,5 µL	10 µL
TEMED	4 µL	4 µL

Tabelle 34: Zusammensetzung eines 12 %-igen Single Gels.

Komponente	Volumen
dH ₂ O	1,4 mL
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	2,1 mL
2X Single Gel Puffer	3,5 mL
APS Lösung	7,5 µL
TEMED	3,5 µL

Tabelle 35: Zusammensetzung des 2X Single Gel Puffers zur Herstellung eines 12 %-igen Single Gels.

Komponente	Konzentration
Tris Base	76 mM
L-Serin	100 mM
Glycin	100 mM
L-Asparagin	100 mM
pH 7,4 einstellen, Lagerung bei 4 °C	

3.2.4.5. Western Blot

Zuvor wird eine SDS-PAGE (Kapitel 3.2.4.4) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (VWR, Darmstadt, Deutschland) übertragen. Das *Blotten* erfolgt bei 15 V, 8 W und 350 mA für 30 Minuten.

In dieser Arbeit wurde die Expression der Proteine mit einem AP-konjugierten (Alkalische Phosphatase) His-Tag Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) überprüft.

Nach dem *Blotten*, wurde die Membran mit 5 % BSA in 1X TBS Puffer (*Tris buffered saline*; Tabelle 36) für 1 Stunde bei RT blockiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 1X TBS und einmal mit 1X TBS-T Puffer (Tabelle 37) jeweils für 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem His-Tag Antikörper (1:1.000 in 1 % BSA, 1X TBS) 1 Stunde bei RT inkubiert und erneut gewaschen. Für die Detektion mittels BCIP/NBT Lösung (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat/ *para*-Nitroblautetrazoliumchlorid; Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde die Membran 10 Minuten bei RT in der Lösung geschwenkt und die Reaktion durch Zugabe von Wasser gestoppt.

Tabelle 36: Zusammensetzung des 10X TBS (*Tris buffered saline*) Puffers.

Komponenten	Konzentration
Tris-Base	24 g L ⁻¹
NaCl	88 g L ⁻¹
dH ₂ O	900 mL L ⁻¹
pH mit HCl auf 7,6 einstellen und auf 1 Liter auffüllen	

Tabelle 37: Zusammensetzung des 1X TBS-T (*Tris buffered saline with Tween 20*) Puffers.

Komponenten	Konzentration
10 X TBS	100 mL L ⁻¹
dH ₂ O	900 mL L ⁻¹
Tween 20 (0,1 %)	1 mL L ⁻¹

3.2.4.6. Zymographie

Die Zymographie basiert auf einer semi-nativen PAGE, und es handelt sich dabei um eine Negativfärbung, wobei helle Bereiche Peptidaseaktivität repräsentieren und der Hintergrund angefärbt wird. Die Aktivität rekombinanter Peptidasen wurde u. a. mittels Zymographie untersucht, wobei ein Substrat (in dieser Arbeit 1 mg mL⁻¹ Casein) in das Gel einpolymerisiert wird (Tabelle 38, Tabelle 39). Zudem wurden die Proben im Verhältnis 1:1 (v/v) mit einem nativen Ladepuffer (Tabelle 38) versetzt und nicht aufgeköcht.

Die Proben wurden zusammen mit einem Proteinstandard (*Precision Plus Protein All Blue Standard*, BioRad, München, Deutschland, s. Anhang Abbildung A3) aufgetragen. Um die Peptidaseaktivität zu erhalten, erfolgte der Gellauf bei 10 mA und 4 °C. Nach dem Gellauf wurde das Gel dreimal jeweils 30 Minuten bei RT mit Waschlösung (Tabelle 38) gewaschen und über Nacht bei RT in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (K₂HPO₄/KH₂PO₄) pH 6 inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Gel jeweils dreimal mit Wasser gewaschen und mit Imperial™ Protein Stain gefärbt. Da es sich um eine Negativfärbung handelt, deuten weiße Bereiche auf Peptidaseaktivität hin (Fernández-Resa *et al.*, 1995).

Tabelle 38: Verwendete Lösungen für die Zymographie.

Lösung	Komponente	Konzentration
2X Ladepuffer, nativ	Tris-HCl	23,64 g L ⁻¹ (150 mM)
	Glycerol	20 % (v/v)
	SDS	4 % (w/v)
	Bromphenolblau	25 mg L ⁻¹
Lagerung bei – 20 °C		
2X Single Gel Puffer	Tris Base	18,42 g L ⁻¹ (152 mM)
	Glycin	21,02 g L ⁻¹ (200 mM)
	Serin	15,02 g L ⁻¹ (200 mM)
	Asparagin	30,02 g L ⁻¹ (200 mM)
in dH ₂ O lösen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen		
Lösung filtrieren (0,22 µm) und bei 4 °C lagern		
Waschlösung	Triton-X-100	25 g L ⁻¹
	Tris Base pH 7,5	6,06 g L ⁻¹

Tabelle 39: Zusammensetzung eines Zymographie-Gels mit 12 % Acrylamid.

Komponente	Volumen
dH ₂ O	1,4 mL
2X Single Gel Puffer (mit 1 mg mL ⁻¹ Casein)	3,5 mL
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	2,1 mL
APS Lösung (40 %)	8 µL
TEMED	5 µL

3.2.4.7. Peptide mass fingerprint

Um einige Peptidasegene zu analysieren, wurden Banden aus einem SDS-Gel ausgeschnitten und für 30 Minuten in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator plus, Modus: D-AQ; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) getrocknet und bei – 20 °C gelagert.

Im ersten Schritt findet die Carbamidomethylierung statt. Dazu wurden 200 µL Acetonitril zu den Gelstücken gegeben, 10 Minuten bei RT inkubiert und der Überstand verworfen. Dann wurden 40 µL 20 mM DTT zugegeben, inkubiert (56 °C, 30 Min) und der Überstand erneut verworfen. Es wurde erneut mit 200 µL Acetonitril inkubiert (10 Min, RT), mit 40 µL 55 mM Iodacetamid überschichtet und die Proben im Dunkeln inkubiert (30 Min, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Gelstücke mit 200 µL Acetonitril dehydriert (10 Min, RT) und der Überstand verworfen.

Im zweiten Schritt wurden die Gelstücke umgepuffert. Dazu wurden die Gelstücke mit 200 μL 0,1 M NH_4HCO_3 gewaschen (15 Min, RT) und der Überstand verworfen. Die Gelstücke wurden mit 200 μL Acetonitril inkubiert (10 Min, RT), der Überstand verworfen und in der Vakuumzentrifuge (Modus: V-AQ) getrocknet.

Für die Hydrolyse wurden 20 μg Trypsin (17.069 U mg^{-1} , *sequencing grade modified trypsin*, Promega, Wisconsin, USA) verwendet und in 100 μL Resuspensionspuffer des Herstellers gelöst. Im ersten Schritt wurde Trypsin aktiviert (15 Min, 30 °C) und mit 900 μL 0,1 M NH_4HCO_3 verdünnt, aliquotiert (50 μL) und bei – 20 °C gelagert. Für den tryptischen Verdau wurden 50 μL Trypsinlösung mit 450 μL dH_2O gemischt und 40 μL (0,08 μg) der fertigen Trypsinlösung (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) zum Überschichten der Gelstücke verwendet und 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben bei 37 °C mindestens 4 Stunden (oder über Nacht) inkubiert.

Für die Extraktion wurden die Proben mit 40 μL Stopplösung (Tabelle 40) versetzt und 30 Minuten bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppi überführt und auf Eis gekühlt. Danach wurde der Überstand mit 40 μL Extraktionslösung (Tabelle 40) überschichtet und inkubiert (37 °C, 800 rpm, 30 Min). Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt und die Überstände vereinigt. Final wurden die Gelstücke mit 40 μL Acetonitril für 5 Minuten bei RT inkubiert, der Überstand zu den Extrakten gegeben und in der Vakuumzentrifuge (Modus: V-AQ) getrocknet.

Für die Messung wurden die Proben in 30 μL Puffer P (Tabelle 40) aufgenommen und 5 bis 10 Minuten bei 800 rpm und RT inkubiert. Nach einer Minute im Ultraschallbad wurden die Proben abzentrifugiert (12.000 x g, 1 Min, RT) und 25 μL in ein *Vial* für die Messung überführt. Die erhaltenen Peptide wurden mittels nano-HPLC (EASY-nLC II, Bruker, Bremen, Deutschland) gekoppelt mit einem *maXis Quadrupol time of flight* (QTOF) Massenspektrometer (Bruker, Bremen, Deutschland) analysiert.

Als *Trap* wurde eine C18 Säule (100 μm x 2 cm, nanoViper, 5 μm Partikel, 100 Å Poren, Acclaim PepMap™ 100, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) und als Kapillarsäule eine C18 Säule (0,75 x 15 cm, nanoViper, 3 μm Partikel, 100 Å Poren; Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) mit einem Fluss von 500 nL Min^{-1} verwendet. Für Puffer A wurde Wasser mit 0,1% Ameisensäure und für Puffer B Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure verwendet.

Die Proben wurden mit folgendem Gradienten gemessen: 0 Min: 95 % Puffer A, 20 Min: 55 % Puffer A, 35 Min: 5 % Puffer A und 45 Min: 5 % Puffer A. Bei der Massenspektrometrie wurde im Bereich von 50 bis 2.000 m/z detektiert. Die entstandenen Peptide wurden mit den Programmen „Compass Data Analysis 4.1“ und „Protein Scape 3.0.0 346“ (Bruker, Billerica, United States) ausgewertet.

Tabelle 40: Puffer und Chemikalien für den tryptischen Verdau von Proteinbanden aus einem SDS-Gel.

Puffer/Chemikalien	Konzentration
0,1 M NH ₄ HCO ₃	0,79 g 100 mL ⁻¹ H ₂ O
20 mM DTT	31 mg 10 mL ⁻¹ 0,1 M NH ₄ HCO ₃
55 mM Iodacetamid (IAA)	102 mg 10 mL ⁻¹ 0,1 M NH ₄ HCO ₃
	570 µL H ₂ O
Stopplösung (frisch ansetzen)	570 µL Acetonitril (99,95 %)
	60 µL Ameisensäure (98 %)
	594 µL H ₂ O
Extraktionslösung (frisch ansetzen)	594 µL Acetonitril (99,95 %)
	12 µL Ameisensäure (98 %)
Puffer P (frisch ansetzen)	980 µL H ₂ O mit 0,1 % Ameisensäure (98 %)
	20 µL Acetonitril (99,95 %)

3.2.4.8. Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie (SEC)

Bei der Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) werden die Moleküle, z. B. Proteine, anhand ihrer Größe separiert. Diese Methode wurde verwendet, um Proteine aus dem Kulturüberstand von *A. aegerita* (Tag 10), *F. pinicola* (lysiertes Pellet an Tag 24), *F. velutipes* (Tag 7), *H. sublateritium* (Tag 21) und *P. eryngii* (Tag 3) zu konzentrieren. Nach der Expression der Aspartatpeptidase A01 (ABB73030) und der Serinpeptidase S53 (ABB73029) aus *P. chrysosporium* in *K. phaffii* SMD1168 wurde der Kulturüberstand ebenfalls mittels SEC gereinigt.

Die FPLC-basierte SEC Reinigung erfolgte mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden). Für die Chromatographie (NGC Quest 10, Bio-Rad, Hercules, USA) wurde 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7, 0,15 M NaCl Puffer verwendet. Nach der Äquilibration bei einem Fluss von 0,3 mL Min⁻¹ mit 5 mL Puffer wurde die Säule mit 500 µL Probe und einem Fluss von 0,3 mL Min⁻¹ beladen. Die Probe wurde mit 35 mL Puffer eluiert und die Säule mit 24 mL Puffer reäquilibriert.

Die gesammelten Elutionsfraktionen (70) wurden mit dem Azocaseinassay und dem FRET-Assay auf Peptidaseaktivität überprüft. Dazu wurden im ersten Schritt jeweils fünf Fraktionen (1 - 5, 6 - 10, etc.) gepooled und auf Aktivität getestet. Wenn eine gepoolte Fraktion Aktivität zeigte (Azocasein > 100 aU mL⁻¹, FRET-Assay > 1.000 FU), wurden ihre einzelnen Unterfraktionen auf Peptidaseaktivität untersucht.

Unterfraktionen, die sowohl im Azocaseinassay als auch gegenüber dem FRET Peptid 1 oder 2 Aktivität zeigten, wurden für eine Schnittstellenanalyse (Kapitel 3.2.4.11) verwendet.

3.2.4.9. Reinigung mittels His SpinTrap™-Säulen

Um die Expression verschiedener Peptidasegene in *E. coli* BL21 (DE3) im kleinen Maßstab zu überprüfen, wurde der Kulturüberstand mittels His SpinTrap™-Säulen (Sigma, Darmstadt, Deutschland) gereinigt. Im ersten Schritt wurden die Kulturen geerntet (5.000 x g, 4 °C, 15 Min) und das Pellet in Puffer (50 mM Bis-Tris pH 8, 0,5 M NaCl) resuspendiert. Das Volumen für die Resuspension betrug jeweils 10 % (v/v) des Volumens der Hauptkultur. Anschließend wurden Glasperlen hinzugegeben und die Zellen mit der Precellys aufgeschlossen (Kapitel 3.2.3.1), zentrifugiert und mit der His SpinTrap™-Säule nach Herstellerangaben gereinigt. Insgesamt wurde dreimal mit jeweils 600 µL Puffer gewaschen (50 mM Bis-Tris pH 8, 0,5 M NaCl). Für die Waschrunde 1 und 2 wurde dem Puffer zusätzlich 20 mM Imidazol und für den Waschrunde 3 50 mM Imidazol hinzugefügt. Die anschließende Elution erfolgte zweimal mit jeweils 200 µl Puffer und 500 mM Imidazol. Für die Reinigung der Serinpeptidase (ABB73029) aus *P. chrysoosporium* wurden vier Waschrunde ohne Imidazol durchgeführt. Folgende Proben wurden anschließend für eine SDS-PAGE verwendet (Kapitel 3.2.4.4): Überstand, lösliche Fraktion, unlösliche Fraktion, Durchfluss, Waschrunde und die beiden Elutionsfraktionen. Die Reinigung mittels His SpinTrap™-Säule wurde für folgende Peptidasen nach der Expression in *E. coli* durchgeführt: Aspartat- (EIW62808), Metallo- (EIW51569) und Serinpeptidase (EIW59803) aus *T. versicolor* sowie die Aspartatpeptidase aus *P. chrysoosporium* (ABB73030). Nach der Expression der Peptidyl-Lys-Metallopeptidase (XP_008032702) aus Tve in *K. phaffii* wurde der Kulturüberstand ebenfalls mit dieser Methode gereinigt, aber es wurde Waschpuffer ohne Imidazol verwendet.

3.2.4.10. Reinigung mittels Affinitätschromatographie (Ni²⁺-NTA)

Die Affinitätschromatographie beruht auf der Affinität von Proteinen zu ihren Liganden. Die Nickel²⁺-Chelat Affinitätschromatographie (Ni²⁺-NTA) dient der Reinigung von Proteinen, die mit einem His-Tag gekoppelt sind. Diese Methode wurde verwendet, um die Proteine aus *E. coli* BL21 (DE3) bzw. *K. phaffii* SMD1168 Kulturen zu reinigen. Es wurden jeweils 12 Fraktionen gesammelt und auf Peptidaseaktivität (Kapitel 3.2.5.1 und 3.2.5.2) getestet. Die FPLC-basierte Ni²⁺-NTA Reinigung wurde für folgende Peptidasen verwendet: Serinpeptidase S53 aus *P. chrysoosporium* (ABB73029) nach der Expression in *K. phaffii* und für die DPPV aus *P. floridanus* nach der Expression in *E. coli*.

Für die Reinigung der Enzyme aus *E. coli* wurde das Pellet in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 Puffer resuspendiert und die Zellen mit der Precellys (Kapitel 3.2.3.1) aufgeschlossen. Das Volumen für die Resuspension betrug jeweils 10 % (v/v) des Volumens der Hauptkultur. Für die Reinigung aus *K. phaffii* wurde der Kulturüberstand verwendet.

Die Ni²⁺-NTA Säule wurde mit 10 mL (Bettvolumen) Protino Ni²⁺-NTA (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) vorbereitet. Die Chromatographie (NGC Quest 10, Bio-Rad, Hercules, US) wurde mit den Puffern A (50 mM Bis-Tris, 0,5 M NaCl, pH 8) und Puffer B (50 mM Bis-Tris, 0,5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8) wie folgt durchgeführt: 8 mL Probe wurden auf die Säule mit einem Fluss von 0,25 mL Min⁻¹ geladen. Anschließend wurde die Säule mit 8 mL Puffer A und 20 mL L⁻¹ Puffer B gewaschen und die Probe final mit 16 mL Puffer B eluiert (12 Fraktionen à 0,5 mL) gefolgt von einer Reäquilibration mit 32 mL Puffer A. Die 12 Elutionsfraktionen wurden gesammelt und auf Aktivität überprüft.

Für die DPPV aus *P. floridanus* wurde der *para*-Nitroanilin Assay (*pNA* Assay, Kapitel 3.2.5.3) und für die anderen Peptidasen der Azocaseinassay und FRET-Assay (Kapitel 3.2.5.1 und 3.2.5.2) zur Überprüfung der Peptidaseaktivität verwendet.

Nach der Reinigung der DPPV auf *P. floridanus* wurden die aktive Fraktionen gepooled, mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5 umgepuffert (Ultrafiltrationseinheit, 10 kDa, PES; Sartorius, Göttingen, Deutschland) und mit der Ultrafiltrationseinheit konzentriert. Das Enzym wurde mit 25 % Glycerol versetzt und bei – 20°C gelagert.

3.2.4.11. Schnittstellenspezifität

Um die Schnittstellenspezifität der Enzyme zu ermitteln, wurde 1 mg mL⁻¹ Casein in Wasser gelöst und als Substrat verwendet. Im ersten Schritt wurde Casein mittels Centricon (PES, 10 kDa cut-off, Sartorius, Göttingen, Deutschland) vorgereinigt, um vorhandene kleinere Peptide abzutrennen. Dazu wurde Casein auf die Membran gegeben und mehrmals mit dH₂O gewaschen. Die Amicon Ultra-0.5 Zentrifugenfilter (3 kDa, Merck Millipore, Burlington, United States) wurden ebenfalls gereinigt, indem diese dreimal mit jeweils 500 µL Reinstwasser gewaschen und zentrifugiert (10 Min, 14.000 x g, RT) wurden. Der Durchfluss wurde entsorgt, die Säule umgekehrt in das *Receiver Tube* gestülpt und erneut zentrifugiert (1 Min, 1.000 x g, RT). Für die Zentrifugation der Spaltprodukte wurde ein neues *Receiver Tube* verwendet.

Als Probe für den proteolytischen Verdau diente zum einen der Kulturüberstand verschiedener Basidiomyceten aus dem Peptidase Screening. Zum anderen wurde der unbehandelte sowie der gereinigte Kulturüberstand aus *K. phaffii* (SEC, Kapitel 3.2.4.8) für den proteolytischen Verdau verwendet.

Der Ansatz für den Verdau ist in Tabelle 41 dargestellt und wurde für 1 Stunde bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit einem gereinigten Amicon Ultra-0.5

Zentrifugenfilter für 30 Minuten bei 14.000 x g und RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurden mittels nano-HPLC (EASY-nLC II, Bruker, Bremen, Deutschland) gekoppelt mit einem maXis Quadropol *time of flight* (QTOF) Massenspektrometer (Bruker, Bremen, Deutschland) analysiert. Die Parameter der Messung können Kapitel 3.2.4.7 entnommen werden.

Für die Auswertung wurden die Gesamtanzahl der Schnittstellen in einer Probe und der prozentuale Anteil der arginylspezifischen Schnittstellen (R) ermittelt. Als arginylspezifisch wurden Schnittstellen gewertet, die N- oder C-terminal von Arginin liegen und nicht zur Abspaltung der Aminosäure Arginin geführt haben. Zudem wurde der prozentuale Anteil der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung der Aminosäure Arginin führen, (Exo R) ermittelt. Als Exopeptidaseschnittstellen wurden Schnittstellen gewertet, die zur Abspaltung einer einzigen Aminosäure geführt haben.

Tabelle 41: Ansatz für den proteolytischen Verdau von Casein (1 mg mL⁻¹).

Komponente	Volumen [µL]
1 M Carbonatpuffer pH 6	10
98 mg mL ⁻¹ Casein in dH ₂ O	1,02
Kulturüberstand (Peptidasen)	50
dH ₂ O	auf 100 µL auffüllen

3.2.4.12. Biochemische Charakterisierung der PflDPPV

Für die Bestimmung des pH und Temperaturoptimums der PflDPPV wurden das Substrat H-L-Ala-L-Ala-pNA (2 mM, DMSO) verwendet. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde jeweils dH₂O statt Enzym verwendet. Enzymaktivitäten wurden als relative Werte angegeben (%). Die relative DPPV Aktivität (%) wurde anhand der maximalen Aktivität im entsprechenden Experiment definiert.

Um das pH Optimum der DPPV zu bestimmen, wurde der Britton-Robinson-Puffer (40 mM H₃BO₃; 40 mM H₃PO₄; 40 mM CH₃COOH; 20 mM NaOH um den pH-Wert einzustellen; pH Bereich von pH 2 bis 9,5) verwendet. Für die pH Stabilität wurde das Enzym für eine Stunde bei 60 °C in Britton-Robinson-Puffer inkubiert.

Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH bzw. 6 M HCl auf 8,5 eingestellt und die Peptidaseaktivität unter optimalen Bedingungen (60 °C) gemessen.

Für das Temperaturoptimum wurde die DPPV in 50 mM KH₂PO₄ Puffer pH 8,5 zwischen 20 und 65 °C inkubiert. Für die thermische Stabilität wurde die DPPV für eine Stunde bei 4, 20, 40, 60 und 80 °C in 50 mM KH₂PO₄ Puffer pH 8,5 inkubiert und die Peptidaseaktivität anschließend bei 60 °C gemessen.

Um den Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die DPPV zu untersuchen, wurde das Enzym mit verschiedenen Inhibitoren in 50 mM KH_2PO_4 Puffer pH 8,5 bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Peptidaseaktivität unter optimalen Bedingungen (pH 8,5, 60 °C) gemessen. Die Peptidaseaktivität ohne Zugabe eines Inhibitors wurde auf 100 % gesetzt.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde die DPPV unter optimalen Bedingungen mit dem Substrat H-L-Ala-L-Ala-pNA im Bereich zwischen 0,3 und 200 mM getestet. k_{cat} , K_m und die Michaelis-Menten Gleichung wurden mit Hilfe des Programms SigmaPlot 12,5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) ermittelt.

3.2.5. Peptidase Aktivität

Für die Bestimmung der Peptidaseaktivität wurde der Azocaseinassay und der FRET-Assay verwendet. Der Azocaseinassay dient der Bestimmung der allgemeinen Peptidaseaktivität, während der FRET Assay der Bestimmung der arginylspezifischen Aktivität dient.

3.2.5.1. Azocaseinassay

Der Azocaseinassay wurde verwendet, um die Gesamtpeptidaseaktivität aller vorhandenen Peptidasen in der Probe zu ermitteln. Als Substrat wurde Casein verwendet, das mit einem Azofarbstoff gekoppelt ist.

Der Azocaseinassay wurde jeweils in Duplikaten (n=2) bzw. Triplikaten (n=3) und einem zusätzlichen Blindwert (BW) durchgeführt. Für die Reaktion wurden 5 % (w/v) Azocasein und 375 μL 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6 inkubiert (43 °C, 1.000 rpm 10 Min). Anschließend wurde 25 μL Probe hinzugegeben und der Ansatz erneut inkubiert (43 °C, 700 rpm, 20 Min). Um die Reaktion abzustoppen, wurde 1 mL 3 % TCA hinzugegeben und der Ansatz für 10 Minuten auf Eis gelagert. Beim Blindwert wurden 25 μL Probe erst nach der Zugabe von 3 % TCA zugegeben. Nachdem die Proben bei 15.000 x g für 15 Minuten und RT zentrifugiert wurden, wurden 300 μL vom Überstand in eine 96 well Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 366 nm in einem *microplate reader* (Eon, BioTek, Winooski, USA) gemessen. Die Berechnung der Aktivität pro mL erfolgte mithilfe der Formel (1).

$$\left[\frac{aU}{mL} \right] = \frac{(MW - BW) * 60[min]}{V_{Probe}[mL] * t[min] * 0,01} * F_{verd.} * F_{MPR}. \quad (1)$$

MW ist der Mittelwert der gemessenen Absorption der Proben, BW die gemessene Absorption des Blindwertes, V_{Probe} ist das Probenvolumen, t ist die Zeit der Reaktion (20 Min), $F_{\text{verd.}}$ ist der Verdünnungsfaktor der Probe und F_{MPR} der Korrekturfaktor für die Mikrotiterplatte (1,261).

Die Enzymaktivität wird in *arbitrary Units* (aU) angegeben. Eine aU ist definiert als die Enzymmenge, die unter den gewählten Bedingungen zu einer Änderung der Extinktion um 0,01 pro h führt. In dieser Arbeit wurde Aktivität als ein Wert $> 100 \text{ aU mL}^{-1}$ definiert.

3.2.5.2. FRET-Assay

Der FRET-Assay wurde verwendet, um arginylspezifische Peptidaseaktivität zu bestimmen. Dafür wurden 5,6 FAM (Carboxyfluorescein) als Donor am N-Terminus und 4-([4'-dimethylamino) phenyl] azo) benzoyl (Dabcyl) als Akzeptor am C-Terminus über eine Peptidsequenz miteinander verknüpft. Das Dabcyl wird an die Aminogruppe der Seitenkette eines zusätzlichen, C-terminalen Lysins konjugiert. Beim Dabcyl handelt es sich um einen *quecher*, der die Energie des Donors absorbiert und als Licht wieder abgibt (Martins *et al.*, 2019). Die synthetischen FRET Peptide 1 und 2 (Abbildung 3) wurden basierend auf der Arbeit von Schindler *et al.*, (2011) designed und bestehen aus acht (Peptid 1) bzw. neun (Peptid 2) Aminosäuren (Schindler *et al.*, 2011).

Peptide 1	Peptide 2
(FAM)–RRIRVIPK- (Dabcyl)	(FAM)–RKRRARMREK- (Dabcyl)

Abbildung 3: Aufbau der FRET Peptide 1 und 2. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. FAM: Fluorescein dient als Donor. Dabcyl dient als Akzeptor.

Der Assay wurde in Duplikaten ($n=2$) in einer Mikrotiterplatte (*half area, black*; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 5 μL 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6, 5,71 μL (10 μM) Peptid 1 bzw. Peptid 2 und 14,29 μL dH_2O sowie 25 μL Kulturüberstand gemischt. Für die Negativkontrolle (NK) wurde kein Kulturüberstand, sondern dH_2O verwendet. Als Positivkontrolle wurde eine glutamylspezifische Endopeptidase von *Staphylococcus aureus* V8 (Glu-C; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), die C-terminal von Aspartat und Glutaminsäure schneidet, verwendet (Prasad *et al.*, 2004). Glu-C ist somit nur in der Lage das FRET Peptid 2 zu spalten. Für die Positivkontrolle (PK) wurde 1 μL Glu-C mit 24 μL dH_2O verdünnt.

Die Aktivität wurde im BioTek Synergy 2™ (Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 37 °C für 60 Minuten gemessen. Die Fluoreszenz wurde bei 482/20 nm (Exzitation/Bandbreite) und

520/20 nm (Emission/Bandbreite) gemessen. Der *topmirror* wurde auf 510 nm und der *gain* auf 40 eingestellt. Der gemessene Wert wird in *Fluorescence Units* (FU) angegeben. In dieser Arbeit wurde Aktivität als ein Wert von mindestens 1.000 FU im Vergleich zur Hintergrundaktivität definiert. Dabei wurden die Fluoreszenzintensitäten zum Zeitpunkt nach 60 Minuten (t60) von den Intensitäten zum Zeitpunkt nach 0 Minuten (t0) abgezogen.

3.2.5.3. *para*-Nitroanilin Assay

Für den *para*-Nitroanilin (*p*NA) Assay wurden vier unterschiedliche Substrate (2 mM in DMSO) verwendet (Tabelle 42) und der Assay wurde in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Pro *well* wurden 120 μ L 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6, 10 μ L Substrat (2 mM, DMSO) und 20 μ L Probe verwendet. Als Blindwert wurde dH₂O statt Probe genommen. Die photometrische Messung erfolgte im BioTek Synergy 2™ (Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 37 °C und 405 nm für 60 Minuten. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Enzymaktivität wird in Units pro Liter (U L⁻¹) angegeben. Eine Unit ist definiert als die Enzymaktivität, die 1 μ mol *p*-Nitroanilin pro Minute freisetzt. Der molare Extinktionskoeffizient von *p*-Nitroanilin beträgt bei 405 nm in einem wässrigen System $\epsilon = 9960 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Visetnan *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2011). Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte mit Hilfe der Formel 2. F ist der Verdünnungsfaktor der Probe. Die Steigung MaxV wird bei 405 nm [mOD Min⁻¹] angegeben. Die Kreiszahl π beträgt 3,14159 und der Radius r 3,47 mm. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt 9960 l mol⁻¹ cm⁻¹. Das Volumen der Probe V_P beträgt 20 μ L und das Gesamtvolumen des Ansatzes V_G 150 μ L.

$$A \left[\frac{U}{L} \right] = \frac{F \cdot (\text{Steigung Probe} - \text{Steigung Blindwert}) \cdot \pi \cdot r^2 \cdot V_g}{\epsilon \cdot V_P \cdot V_g} \cdot \frac{1000}{\text{Umrechnung}} \cdot \frac{10^6}{\text{Umrechnung}}$$

1 L = 0,001 m³ mol auf μ mol (2)

Tabelle 42: Liste der verwendeten *para*-Nitroanilin Substrate.

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Hydrochlorid Alanin-Alanin- <i>para</i> -Nitroanilin H-L-Ala-L-Ala- <i>p</i> NA	≥ 98 %	Bachem AG
Natriumtrifluoracetat Arginin-Prolin- <i>p</i> NA H-L-Arg-L-Pro- <i>p</i> NA	≥ 98 %	Bachem AG
Hydrochlorid Glycin-Arginin- <i>p</i> NA H-L-Gly-L-Arg- <i>p</i> NA	≥ 98 %	Bachem AG
Hydrochlorid Glycin-Glutaminsäure- <i>p</i> NA H-L-Gly-L-Glu- <i>p</i> NA	≥ 98 %	Bachem AG

4. Ergebnisse

4.1. Klonierungsarbeiten

In einer vorausgehenden Arbeit wurden Peptidasegene aus verschiedenen Basidiomyceten identifiziert, darunter in den Basidiomyceten *G. frondosa* (Gfr246), *P. chrysosporium* (Pch264), *P. eryngii* (Per60), *P. ostreatus* (Pos218), *T. versicolor* (Tve86) und *S. commune* (Sco262) (Harth 2016). Da zu Beginn dieser Arbeit nur das Genom von Pch, Tve und Sco sequenziert war, lag der Fokus auf der Identifizierung verschiedener Peptidasegene aus diesen drei Basidiomyceten. Bei den genannten Proteinen handelt es sich jeweils um hypothetische Proteine. Im Folgenden wird nur die Identifizierung ausgewählter Peptidasen behandelt.

4.1.1. *Trametes versicolor*

Tabelle A1 gibt einen Überblick über die Klonierung und Expression verschiedener Peptidasegene aus Tve. Eine Aspartatpeptidase (EIW63301) und zwei Serinpeptidasen (EIW65216 und XP_008043737) konnten nicht amplifiziert werden. Zwei Serinpeptidasen (EIW61562, EIW61051) und eine Tripeptidyl-Peptidase A (EIW61376) wurden nur in den pUC57-Vektor kloniert.

4.1.1.1. *E. coli*

In der BSc-Arbeit von Till Redeker wurden die Gene einer Aspartatpeptidase (EIW62808), einer Metallopeptidase (EIW51569) und einer Serinpeptidase (EIW59803) erfolgreich in den pCOLD I-Vektor kloniert und anschließend exprimiert. Alle Gene wurden so in die *multiple cloning site* (MCS) eingebracht, dass sich der His-Tag am N-Terminus des Proteins befand. Nach dem Zellaufschluss (Precellys), wurde die lösliche Fraktion mittels His SpinTrap™-Säule gereinigt (Waschpuffer mit Imidazol) und die Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen. In den Elutionsfraktionen der Aspartatpeptidase (EIW62808, erwartete Größe: 44 kDa, Abbildung 4) und der Metallopeptidase (EIW51569, erwartete Größe: 64 kDa, Abbildung 5) wurde jeweils eine Bande bei ca. 40 und 75 kDa detektiert.

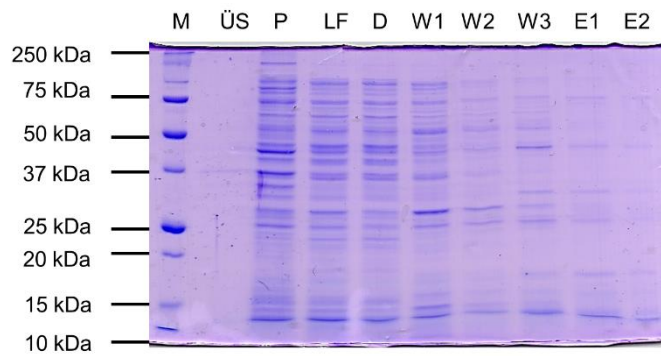


Abbildung 4: SDS-Gel nach Reinigung der Aspartatpeptidase (EIW62808) aus *T. versicolor* mittels His SpinTrap™-Säule. ÜS: Überstand. P: Pellet. LF: lösliche Fraktion. D: Durchfluss. W1 bis W3: Waschschr. 1 bis 2. E1 und E2: Elutionsfraktion 1 und 2.

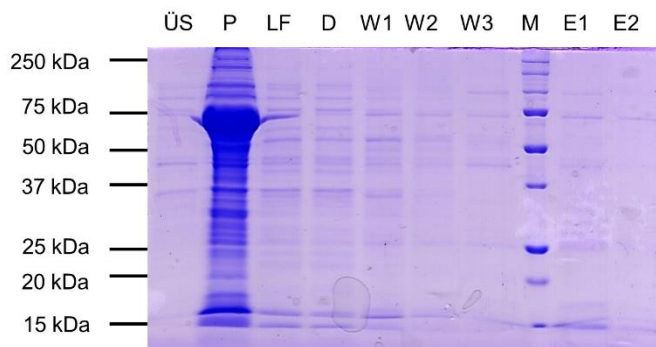


Abbildung 5: SDS-Gel nach Reinigung der Metallopeptidase (EIW51569) aus *T. versicolor* mittels His SpinTrap™-Säule. ÜS: Überstand. P: Pellet. LF: lösliche Fraktion. D: Durchfluss. W1 bis W3: Waschschr. 1 bis 2. E1 und E2: Elutionsfraktion 1 und 2.

In den Elutionsfraktionen der Serinpeptidase (EIW59803) wurden Banden bei 40, 50 und 75 kDa detektiert (erwartete Größe: 63 kDa, Abbildung 6). Nach der Durchführung der Aktivitätsassays wurde nur für die Aspartatpeptidase (EIW62808) Peptidaseaktivität im Azocaseinassay (189 aU mL^{-1}) detektiert. Im FRET-Assay wurde für keine Peptidase Aktivität nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

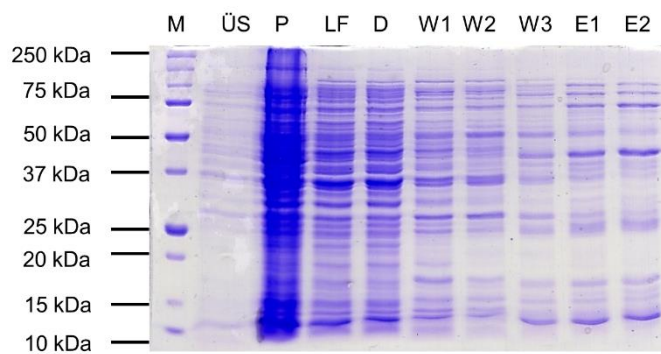


Abbildung 6: SDS-Gel nach Reinigung der Serinpeptidase (EIW59803) aus *T. versicolor* mittels His SpinTrap™-Säule. ÜS: Überstand. P: Pellet. LF: lösliche Fraktion. D: Durchfluss. W1 bis W3: Waschschrift 1 bis 2. E1 und E2: Elutionsfraktion 1 und 2.

4.1.1.2. *K. phaffii*

Da es sich bei den Peptidasegenen um eukaryotische Gene handelt, wurde in einem neuen Ansatz untersucht, ob posttranslationale Modifikationen für die Proteinfaltung und -produktion essentiell sind. Daher wurde das Gen der Peptidyl-Lys-Metallopeptidase (XP_008032702) ohne Signalpeptid (oSP) und mit einem C-terminalen His-Tag in den pPIC9-Vektor kloniert und in *K. phaffii* SMD1168 exprimiert.

Im Verlauf der Kultivierung wurde für die Negativkontrolle keine Peptidaseaktivität nachgewiesen (Abbildung A5 und Abbildung A4). Nach Produktion der Metallopeptidase wurde nach 48 Stunden die maximale Aktivität im Azocaseinassay (378 aU mL^{-1} , Abbildung 7) und nach 72 Stunden die maximale Aktivität gegenüber dem FRET Peptid 1 bzw. 2 detektiert (91.000 bzw. 32.000 FU , Abbildung 8). Es wurde jedoch keine Bande auf der erwarteten Höhe von 37 kDa im SDS-Gel detektiert (Daten nicht gezeigt).

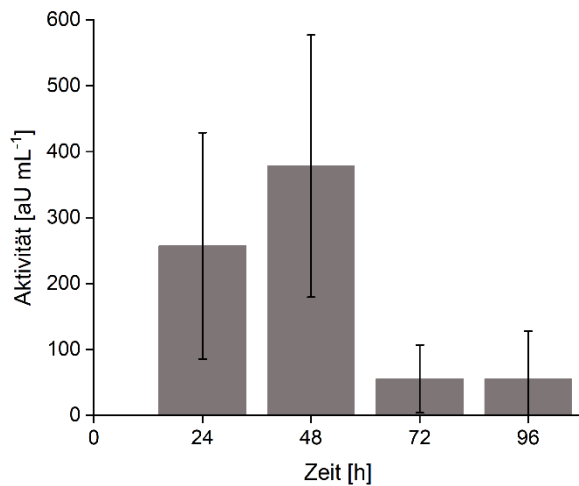


Abbildung 7: Ergebnisse des Azocaseinassay nach Expression der Metallopeptidase aus *T. versicolor* (XP_008032702) in *K. phaffii* (n=3).

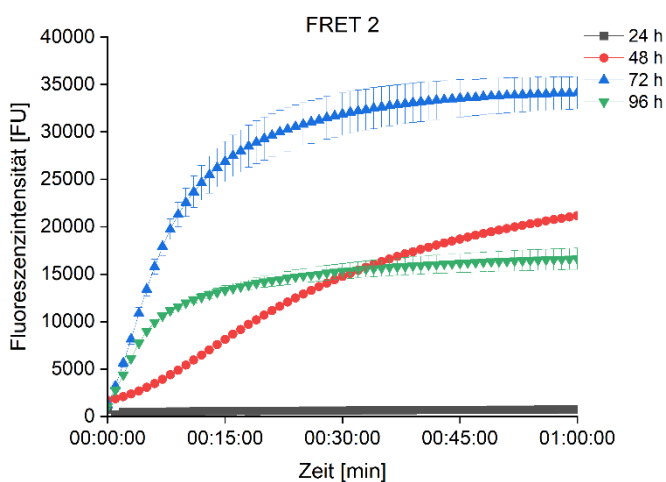
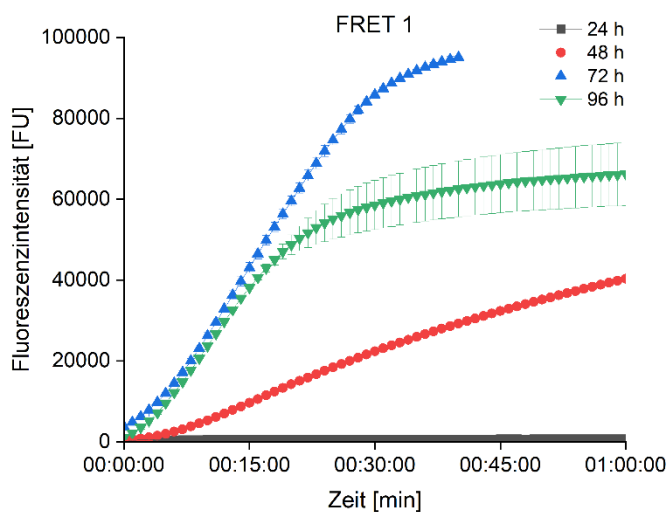


Abbildung 8: Ergebnisse des FRET-Assays nach Expression der Metallopeptidase aus *T. versicolor* (XP_008032702) in *K. phaffii* (n=2).

4.1.2. *Phanerochaete chrysosporium*

Tabelle A2 gibt einen Überblick über die Klonierung und Expression des Gens einer Serinpeptidase S53 (ABB73029) und Aspartatpeptidase A01 (ABB73030) aus Pch. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse der Serinpeptidase dargestellt.

4.1.2.1. *E. coli*

In der BSc-Arbeit von Niklas Friedhoff wurde das Gen der Serinpeptidase (ABB73029) mit einem N-terminalen His-Tag in den pCOLD I-Vektor kloniert und in einer 50 mL Kultur in *E. coli* exprimiert. Nach dem Zellaufschluss (Precellys) wurde die lösliche Fraktion mittels His SpinTrap™-Säule (Waschpuffer ohne Imidazol) gereinigt und anschließend die Peptidaseaktivität in den Fraktionen ermittelt. Für die gereinigte Peptidase in den Elutionsfraktionen 1 und 2 wurde im Azocaseinassay (363 bzw. 302 aU mL⁻¹, Abbildung 9) und gegenüber dem FRET Peptid 2 (ca. 5.400 FU, Abbildung 10) Peptidaseaktivität detektiert. Anschließend wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Für das gereinigte Protein wurden mehrere Banden im SDS-Gel (30, 37, 40, 50, 60 und 75 kDa; erwartete Größe: 58 kDa), aber nicht im Western Blot detektiert (Daten nicht gezeigt).

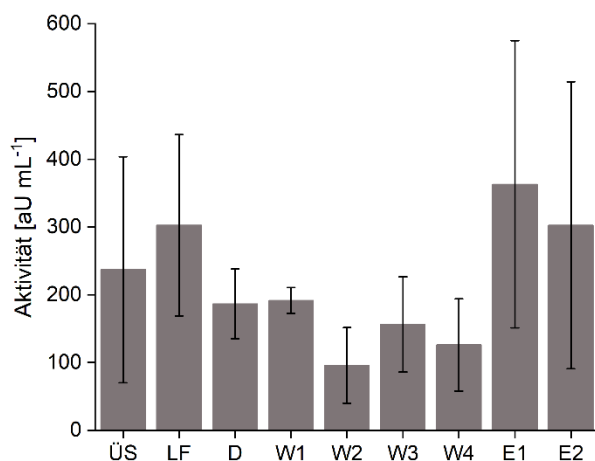


Abbildung 9: Ergebnisse des Azocaseinassays nach Reinigung der Serinpeptidase (ABB73029) aus *P. chrysosporium* mittels His SpinTrap™-Säule. ÜS: Überstand. LF: lösliche Fraktion. D: Durchfluss. W1 bis W4: Waschschrift 1 bis 4 (n=3). E1 und E2: Elutionsfraktion 1 und 2 (n=2).

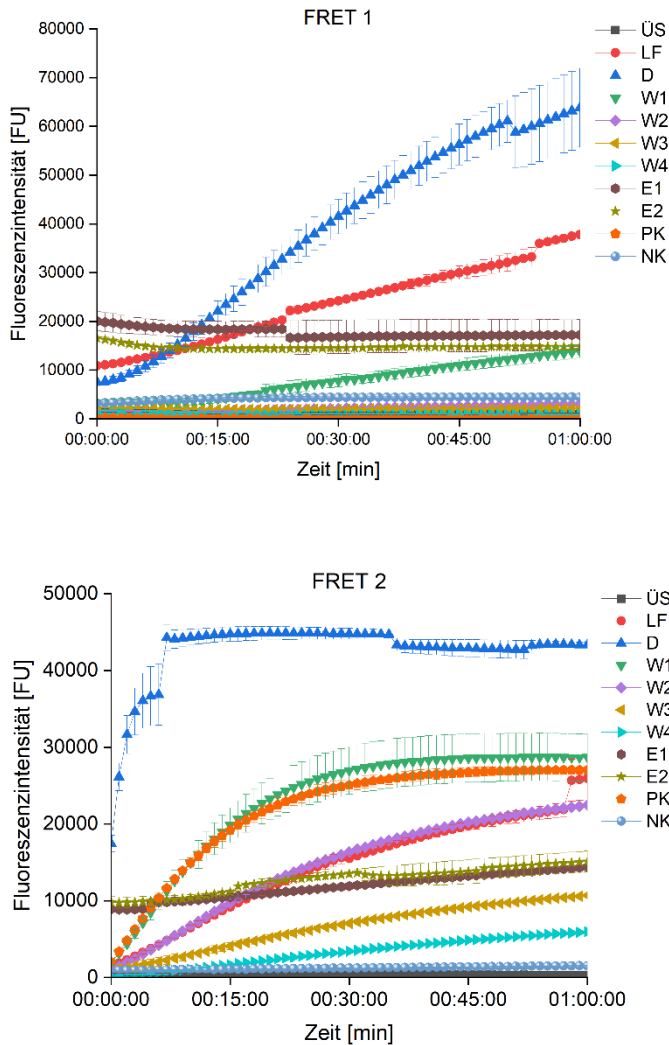


Abbildung 10: Ergebnisse des FRET-Assays nach Reinigung der Serinpeptidase (ABB73029) aus *P. chrysosporium* mittels His SpinTrap™-Säule. ÜS: Überstand. LF: lösliche Fraktion. D: Durchfluss. W1 bis W4: Waschschrift 1 bis 4. E1 und E2: Elutionsfraktion 1 und 2 (n=2).

4.1.2.2. *K. phaffii*

Da die Serinpeptidase (ABB73029) nicht in *E. coli* produziert werden konnte, wurde das Gen ohne His-Tag in den pPIC9-Vektor kloniert und in *K. phaffii* exprimiert. Die maximale Aktivität im Azocaseinassay wurde nach 96 Stunden ($30.168 \text{ aU mL}^{-1}$, Abbildung 11) und im FRET-Assay nach 96 Stunden (FRET Peptid 1: 62.912 FU) bzw. 72 Stunden (FRET Peptid 2: 67.644 FU) erreicht (Abbildung 12, Abbildung A7), während die Negativkontrolle keine Peptidaseaktivität zeigte (Abbildung A6 und Abbildung A7). Nach 48 und 72 Stunden wurden im SDS-Gel Banden bei 40 und 60 kDa detektiert (erwartete Größe: 58 kDa, Daten nicht gezeigt).

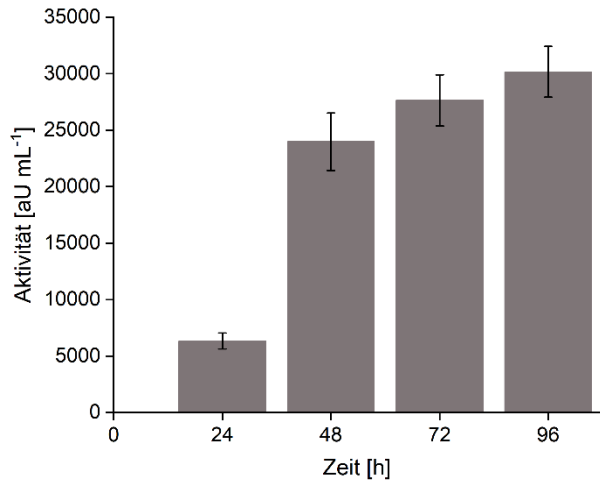


Abbildung 11: Ergebnisse des Azocaseinassays nach Expression der Serinpeptidase (ABB73029) aus *P. chrysosporium* in *K. phaffii* (n=3).

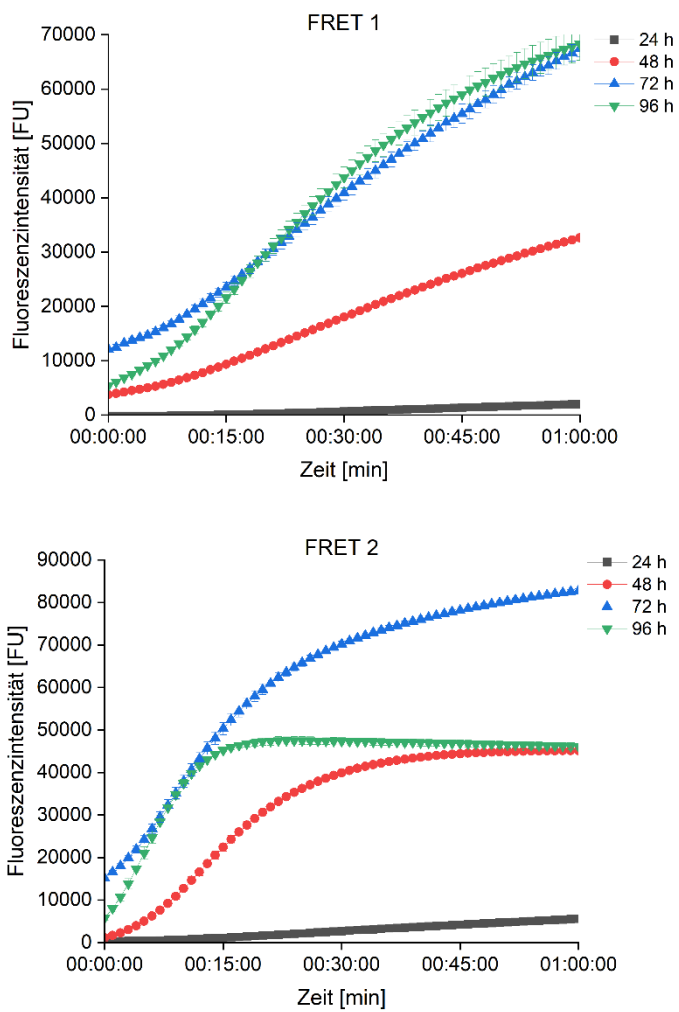


Abbildung 12: Ergebnisse des FRET-Assays nach Expression der Serinpeptidase (ABB73029) aus *P. chrysosporium* in *K. phaffii* (n=2).

Nach der Reinigung des Kulturüberstandes (72 h) mittels SEC (Abbildung A8) wurde in mehreren Fraktionen Peptidaseaktivität nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Für die anschließende Schnittstellenanalyse wurden der Kulturüberstand sowie die aktiven Fraktionen 22 bis 25 ausgewählt (Abbildung 13, Tabelle 43). Verglichen mit dem Kulturüberstand wurden in allen Fraktionen mehr Schnittstellen detektiert; insgesamt zwischen 92 (Fraktion 22) und 117 (Fraktion 25). Der Anteil arginylspezifischer Schnittstellen für die verschiedenen Fraktionen war höher als im Kulturüberstand (3 %) und variierte zwischen 6,8 % (Fraktion 25) und 8,0 % (Fraktion 24), ebenso der Anteil der Exopeptidaseschnittstellen, der zwischen 30 % (Fraktion 23) und 46 % (Fraktion 25) variierte. Zwischen 1 % (Fraktion 23) und 4,2 % (Fraktion 25) der Exopeptidaseschnittstellen führten zur Abspaltung von Arginin.

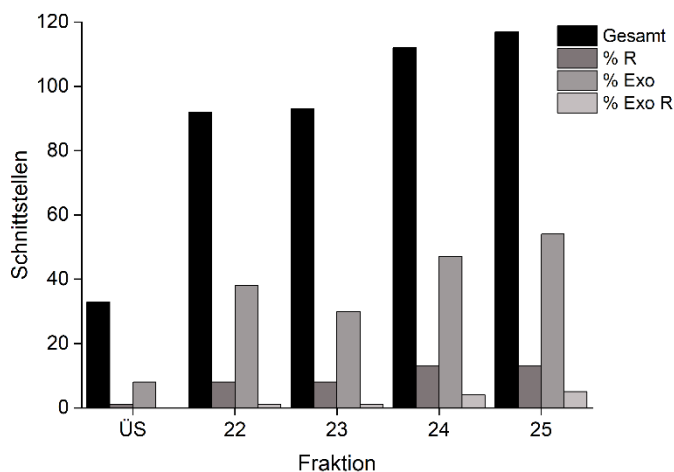


Abbildung 13: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL⁻¹ Casein) von Fraktion 22 bis 25 nach Reinigung der Serinpeptidase (ABB73029) aus *P. chrysosporium* mittels FPLC-basierter SEC. Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, die Anzahl der arginylspezifischen Schnittstellen (R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R). ÜS: Überstand.

Tabelle 43: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL⁻¹ Casein) von Fraktion 22 bis 25 nach Reinigung der Serinpeptidase (ABB73029) aus *P. chrysosporium* mittels FPLC-basierter SEC. Angegeben ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, der Anteil der arginylspezifischen Schnittstellen (R) (ohne Exo R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).

Fraktion	Gesamtanzahl Schnittstellen	Anteil R [%]	Anteil Exo [%]	Anteil Exo R [%]
Überstand	33	3,0 (∑ 1)	24,2 (∑ 8)	-
22	92	7,6 (∑ 8)	41,3 (∑ 38)	1,0 (∑ 1)
23	93	7,5 (∑ 8)	32,2 (∑ 30)	1,0 (∑ 1)
24	112	8,0 (∑ 13)	41,9 (∑ 47)	3,6 (∑ 4)
25	117	6,8 (∑ 13)	46,1 (∑ 54)	4,2 (∑ 5)

4.1.3. *Schizophyllum commune*

Aus Sco sollten die Gene von zwei hypothetischen Peptidyl-Lys-Metallopeptidasen (XP_003037751 und XP_003035464) isoliert und kloniert werden, jedoch konnte in keinem Fall das Gen amplifiziert und in den pUC57-Vektor kloniert werden.

4.2. Peptidase Screening

Im Peptidase Screening wurden verschiedene Basidiomyceten auf das Vorhandensein von arginylspezifischen Peptidasen untersucht. Dazu wurden 29 Basidiomyceten zuerst in einer Vorkultur (SNL Medium) und anschließend in einer Hauptkultur (Minimalmedium mit 1 % Gluten) kultiviert. An verschiedenen Tagen der Hauptkultur wurde eine Probe vom Kulturüberstand entnommen, der pH-Wert gemessen und der Überstand mittels Zymographie auf Peptidaseaktivität untersucht.

Im Folgenden werden nur die Ergebnisse der fünf interessanten Basidiomyceten aus dem Peptidase Screening erläutert, darunter *A. aegerita* (Aae), *F. pinicola* (Fpi), *F. velutipes* (Fve), *H. sublateritium* (Hsu) und *P. eryngii* (Per).

Der pH-Wert aller Kulturüberstände lag zu Beginn der Kultivierung im sauren und am Ende im basischen Bereich (Abbildung 14). Die größte Veränderung des pH-Wertes wurde bei Fpi beobachtet. An Tag 3 wurde ein pH-Wert von 3,1 und an Tag 24 von 8,4 gemessen. Bei allen anderen Basidiomyceten (Aae, Fve, Hsu, Per) hat sich zwischen Tag 7 und 8 der Kultivierung ein pH-Wert im neutralen Bereich (pH 6 bis 8) eingestellt.

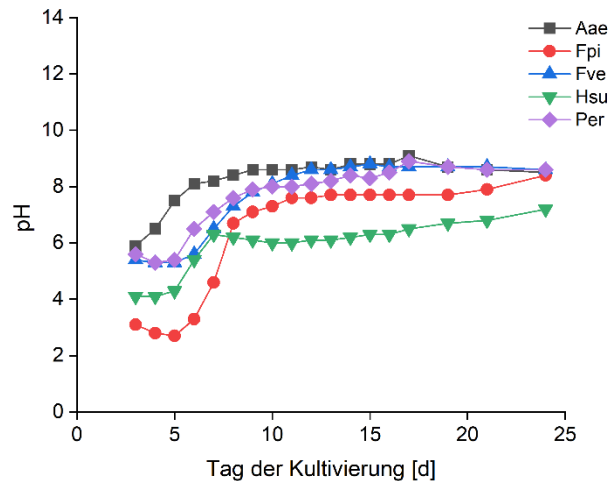


Abbildung 14: pH-Verlauf des Kulturüberstandes von *A. aegerita* (Aae), *F. pinicola* (Fpi), *F. velutipes* (Fve), *H. sublateritium* (Hsu) und *P. eryngii* (Per). Kultivierung in Minimalmedium (1 % Gluten) über einen Zeitraum von 24 Tagen (24 °C, 150 rpm).

4.2.1. Zymographie

Im nächsten Schritt wurde das Expressionsmuster der verschiedenen Peptidasen analysiert. Dazu wurden alle Kulturüberständen an den verschiedenen Probenahmetagen mittels Zymographie visualisiert. Für alle Basidiomyceten wurde über den zeitlichen Verlauf peptidolytische Aktivität durch eine oder mehrere (Endo-) Peptidasen detektiert (Abbildung 15 bis Abbildung 19). Die Aktivitäten wurden bei molekularen Massen zwischen 25 und 75 kDa detektiert. Aae zeigte Aktivitäten bei 25, 50 und 75 kDa (Abbildung 15), während für Fve Aktivitäten bei 25, 37 und 40 kDa detektiert wurden (Abbildung 16). Fpi und Hsu hingegen zeigten nahezu über den gesamten Kultivierungszeitraum nur Aktivität bei 25 (Fpi, Abbildung 17) bzw. 75 kDa (Hsu, Abbildung 18). Für Per wurden an verschiedenen Tagen Aktivitäten bei 25 (Tag 3 bis 12) bzw. 75 kDa (Tag 6, 7 und 8) detektiert (Abbildung 19). Aktivität im lysierten Pellet wurde lediglich bei Fpi (Abbildung 17) und Hsu (Abbildung 18) detektiert. Auffällig waren die Aktivitäten bei hohen molekularen Massen (> 100 kDa) bei Aae (Abbildung 15), Fve (Abbildung 16) und Fpi an Tag 3 (Abbildung 17).

Ausgehend von den Ergebnissen der Zymographie wurden für die interessanten Pilze bestimmte Tage ausgewählt, an denen der Kulturüberstand auf Peptidaseaktivität überprüft wurde (Tabelle 44).

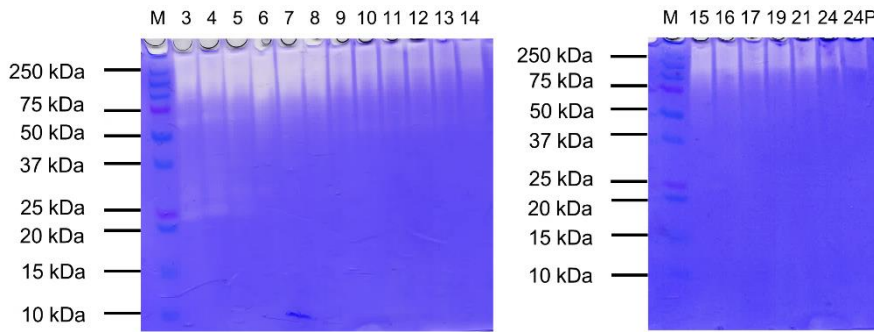


Abbildung 15: Zymographie (1 mg mL^{-1} Casein) des Kulturüberstandes von *A. aegerita* über eine Kultivierungsdauer von 24 Tagen. Zahlen: Tag der Probennahme. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24. M: Marker (*Precision Plus Protein Unstained Standard*).

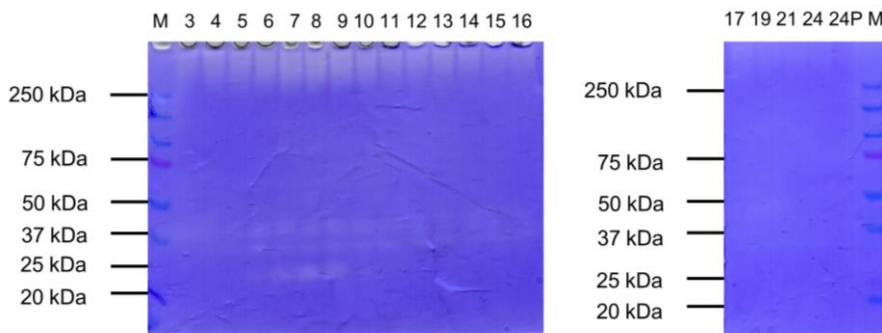


Abbildung 16: Zymographie (1 mg mL^{-1} Casein) des Kulturüberstandes von *F. velutipes* über eine Kultivierungsdauer von 24 Tagen. Zahlen: Tag der Probennahme. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24. M: Marker (*Precision Plus Protein Unstained Standard*).

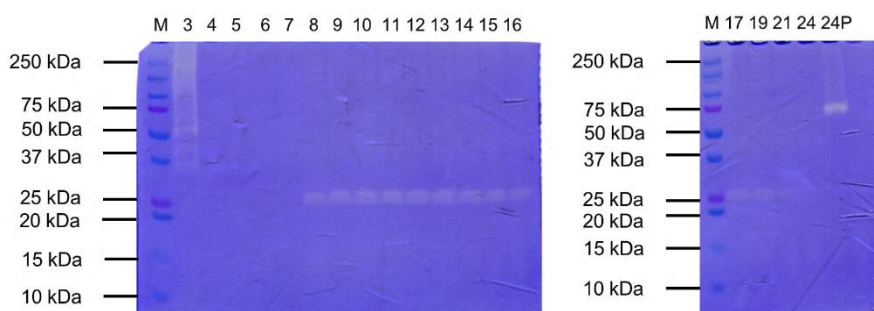


Abbildung 17: Zymographie (1 mg mL^{-1} Casein) des Kulturüberstandes von *F. pinicola* über eine Kultivierungsdauer von 24 Tagen. Zahlen: Tag der Probennahme. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24. M: Marker (*Precision Plus Protein Unstained Standard*).

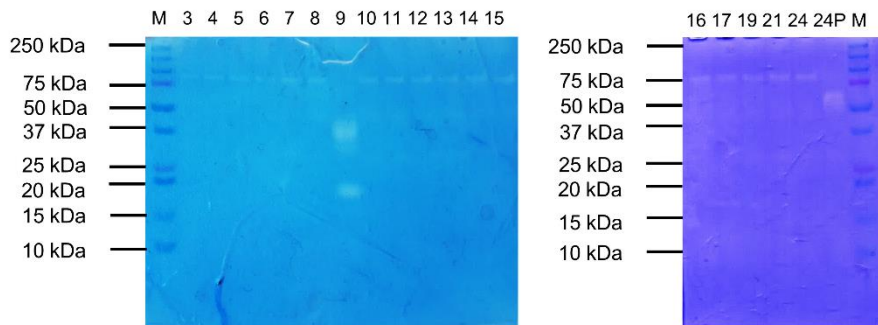


Abbildung 18: Zymographie (1 mg mL^{-1} Casein) des Kulturüberstandes von *H. sublateritium* über eine Kultivierungsdauer von 24 Tagen. Zahlen: Tag der Probennahme. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24. M: Marker (*Precision Plus Protein Unstained Standard*).

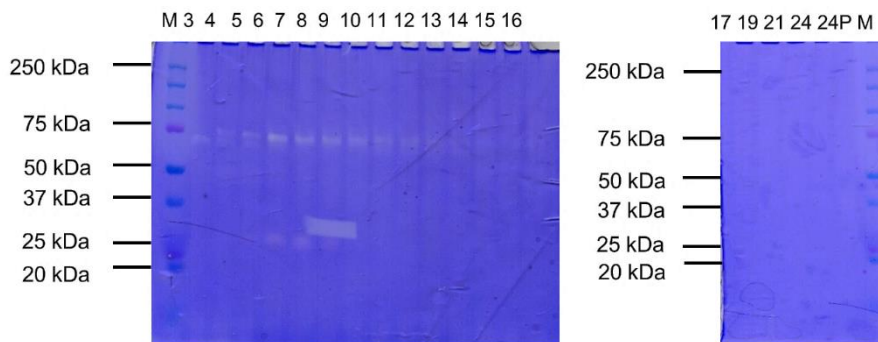


Abbildung 19: Zymographie (1 mg mL^{-1} Casein) des Kulturüberstandes von *P. eryngii* über eine Kultivierungsdauer von 24 Tagen. Zahlen: Tag der Probennahme. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24. M: Marker (*Precision Plus Protein Unstained Standard*).

Tabelle 44: Übersicht über die verschiedenen Basidiomyceten und die Kultivierungstage, an denen der Kulturüberstand auf Peptidaseaktivität untersucht wurde. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24.

Basidiomycet	Tag der Kultivierung
Aae	3, 6, 10, 17, 21
Fpi	3, 10, 24P
Fve	3, 7, 24
Hsu	3, 9, 21, 24P
Per	3, 5, 7, 15

4.2.2. Azocaseinassay

Im nächsten Schritt wurde der Kulturüberstand an ausgewählten Tagen (Tabelle 44) auf allgemeine Peptidaseaktivität hin untersucht. Im Kulturüberstand der fünf Basidiomyceten wurde an allen ausgewählten Tagen Peptidaseaktivität detektiert ($> 100 \text{ aU mL}^{-1}$, Abbildung 20). Fpi und Hsu zeigte die geringsten Aktivitäten im Vergleich zu Aae, Fve und Per. Insgesamt wurde die höchste Aktivität bei Fve im Kulturüberstand an Tag 7 (9.684 aU mL^{-1}) die geringste Aktivität bei Hsu im Kulturüberstand an Tag 3 erreicht (174 aU mL^{-1}).

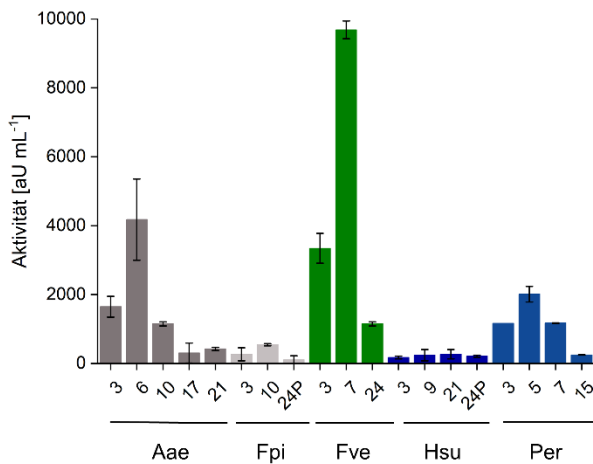


Abbildung 20: Ergebnisse des Azocaseinassays von *A. aegerita* (Aae), *F. pinicola* (Fpi), *F. velutipes* (Fve), *H. sublateralitium* (Hsu) und *P. eryngii* (Per). Es wurde der Kulturüberstand an verschiedenen Tagen (Zahl) bzw. das lysierte Pellet an Tag 24 (24P) verwendet (n=2).

4.2.3. FRET-Assay

Mit dem FRET-Assay wurde die arginylspezifische Peptidaseaktivität im Kulturüberstand überprüft. Als arginylspezifische Aktivität wurde ein Anstieg von mindestens 1.000 FU im Vergleich zum Hintergrund definiert. Für die Negativkontrolle wurde keine Peptidaseaktivität gemessen. Als Positivkontrolle wurde die Peptidase Glu-C verwendet, die spezifisch C-terminal von Glutaminsäure und somit bevorzugt das FRET-Peptid 2 spaltet (Prasad *et al.*, 2004).

Bei allen fünf Basidiomyceten wurde arginylspezifische Peptidaseaktivität im Kulturüberstand nachgewiesen (Tabelle 45, Abbildung A9 bis Abbildung A13). Für die Pilze Aae, Fve, Fpi und Per waren die Aktivitäten gegenüber dem FRET Peptid 1 an den ausgewählten Kultivierungstagen höher als gegenüber dem FRET Peptid 2, während die Aktivitäten von Hsu an den einzelnen Kultivierungstagen ähnliche Werte gegenüber beiden FRET Peptiden

erreichten. Insgesamt wurde die höchste Aktivität für Per (FRET Peptid 1: 21.412 FU) und die geringste für Aae (FRET Peptid 2: 5.491 FU) detektiert.

Anhand der Zymographie sowie der Aktivitätsassays wurden folgende Kulturüberstände für eine Reinigung mittels FPLC-basierter SEC ausgewählt: Aae Tag 10, Fve Tag 7, Fpi lysiertes Pellet an Tag 24, Hsu Tag 21 und Per Tag 3. Diese Überstände zeigten eine Gesamtpeptidaseaktivität im Azocaseinassay sowie arginylspezifische Peptidaseaktivität gegenüber dem FRET Peptid 1 oder 2.

Tabelle 45: Überblick über die arginylspezifische Peptidaseaktivität der ausgewählten Kulturüberstände verschiedener Basidiomyceten.

Basidiomycet	Tag der Kultivierung	Fluoreszenzintensität [FU]	
		FRET Peptid 1	FRET Peptid 2
<i>A. aegerita</i> (Aae)	3	15.096 ± 655	-
	6	15.504 ± 171	-
	10	16.464 ± 2.858	4.463 ± 21
	17	2.034 ± 69	5.491 ± 149
	21	1.451 ± 209	4.253 ± 486
<i>F. velutipes</i> (Fve)	3	16.415 ± 1.113	6.349 ± 943
	7	14.591 ± 418	2.836 ± 486
	24	15.588 ± 196	9.243 ± 66
<i>F. pinicola</i> (Fpi)	3	12.088 ± 111	14.255 ± 3.523
	10	13.028 ± 311	3.919 ± 3.558
	24P	15.996 ± 306	8.595 ± 751
<i>H. sublateritium</i> (Hsu)	3	3.589 ± 117	6.955 ± 324
	9	6.088 ± 81	7.666 ± 72
	21	7.641 ± 288	9.595 ± 499
	24P	1.506 ± 5	1.659 ± 0,7
<i>P. eryngii</i> (Per)	3	21.426 ± 1.291	3.923 ± 89
	9	20.972 ± 1.246	9.650 ± 2.687
	14	21.412 ± 1.388	8.829 ± 157
	15	19.503 ± 2.217	11.047 ± 1.465

4.2.4. Größenausschlusschromatographie (SEC)

Um potentielle Peptidasen der fünf interessanten Pilze zu reinigen, wurde der Kulturüberstand an ausgewählten Tagen mittels FPLC-basierter SEC gereinigt und die gesammelten Fraktionen anschließend auf Peptidaseaktivität untersucht. Im ersten Schritt wurden jeweils fünf Fraktionen gepooled (1 - 5, 6 - 10, etc.) und getestet. Wurde Peptidaseaktivität in einer Fraktion detektiert, wurden die entsprechenden Unterfraktionen erneut einzeln auf Peptidaseaktivität untersucht. Im Folgenden wird nur auf die Aktivitäten der Unterfraktionen eingegangen.

Für alle Basidiomyceten wurde in einer oder mehreren Fraktionen Gesamtpeptidaseaktivität oder arginylspezifische Peptidaseaktivität detektiert (Tabelle 46, Abbildung A14 bis Abbildung A23). Im Vergleich zu Fve, Fpi und Per wurde bei Aae und Hsu jeweils nur in einer Fraktion Gesamtpeptidaseaktivität (Aae: 54, Hsu: 14), aber keine arginylspezifische Peptidaseaktivität nachgewiesen. Arginylspezifische Aktivität wurde bei Aae, Fve, Fpi und Per in ähnlichen Fraktionen (Fraktion 25 bis 40) detektiert, während Hsu auch in den ersten Fraktionen (2 bis 10), die einem höherem Molekulargewicht entsprechen, Aktivität zeigte.

Im Anschluss an die Aktivitätsassays wurden Unterfraktionen für eine Schnittstellenanalyse mit dem Substrat Casein ausgewählt (Kapitel 4.2.5). Es wurden primär Unterfraktionen ausgewählt, in denen Peptidaseaktivität im Azocaseinassay und gegenüber dem FRET Peptid 1 oder 2 nachgewiesen wurde. Fraktion 54 von Aae und Fraktion 14 von Hsu wurden nicht ausgewählt, da in diesen Fraktionen keine arginylspezifische Peptidaseaktivität detektiert wurde. Tabelle 46 gibt einen Überblick über die aktiven Unterfraktionen der einzelnen Basidiomyceten, die so analysiert wurden.

Tabelle 46: Überblick über die aktiven Unterfraktionen der einzelnen Basidiomyceten nach Reinigung mittels FPLC-basierter SEC.

Basidiomycet	aktive Fraktionen	Azocaseinassay [> 100 aU mL ⁻¹]	FRET Peptid 1 [> 1.000 FU]	FRET Peptid 2 [> 1.000 FU]
Aae	31, 34, 35, 36, 38	54	32 - 38	30 - 40
Fpi	32, 33, 35	16, 35	29, 31	26 - 28, 30 - 35
Fve	33, 34, 35, 36, 37, 40	34, 35, 36, 40	26, 28 - 39	25, 26, 28, 29, 31 - 40
Hsu	6, 20	14	2, 3, 4, 5	3 - 8, 17, 19, 20
Per	33, 34, 36, 37, 38	35, 37, 38, 39, 42	29 - 34, 36 - 38	29 - 35, 37 - 43

4.2.5. Schnittstellenanalyse

Um zu untersuchen, in welchen Fraktionen potentiell arginylspezifische Peptidasen vorhanden sind, wurden die aktiven Fraktionen (Tabelle 46) mit Casein inkubiert und die Schnittstellen anschließend mittels LC-MS/MS (Kapitel 3.2.4.11) analysiert. In Vorarbeiten von Till Redeker wurde Casein aufgrund seiner Löslichkeit und einem moderaten Argininanteil von 3,6 % für die Schnittstellenanalyse ausgewählt (Tabelle 47).

Tabelle 47: Übersicht über verschiedene Substrate und deren Argininanteil.

Substrat	Argininanteil [%]*
Casein	3,6
Lysozym	8,5
BSA	4,2
Ovalbumin	3,8

* Anteil des Arginins bezogen auf alle enthaltenen Aminosäuren.

Für Fpi und Hsu wurden keine Schnittstellen detektiert. Daher wurden diese Basidiomyceten nicht weiter betrachtet. Für Aae wurden nur in Unterfraktion 31 und 34 Schnittstellen durch Peptidasen detektiert (Abbildung 21, Tabelle 48). In Unterfraktion 34 wurde der höchste Anteil arginylspezifischer Schnittstellen (12,5 %) sowie Exopeptidaseschnittstellen (12,5 %) ermittelt. Weder in Unterfraktion 31 noch 34 wurde die Aminosäure Arginin durch enzymatische Spaltung freigesetzt.

Bei Per wurden insgesamt zwischen 94 (Unterfraktionen 33) und 89 (Unterfraktion 34) Schnittstellen nachgewiesen (Abbildung 22, Tabelle 49). Für Unterfraktion 38 wurde der höchste Anteil arginylspezifischer Schnittstellen (10 %) sowie der geringste Anteil an Exopeptidaseschnittstellen (20 %) ermittelt. Für die Unterfraktionen 33, 34 und 37 wurden zusätzlich Schnittstellen detektiert, die zur Abspaltung von Arginin führen (< 5 %). Im Fall von Fve wurden nach der Hydrolyse von Casein die meisten Schnittstellen für die Unterfraktionen 33 (Σ 78) und 37 (Σ 75) detektiert (Abbildung 23, Tabelle 50). Der Anteil arginylspezifischer Schnittstellen war mit 23 % für Unterfraktion 40 am höchsten, während für die anderen Unterfraktionen ein Anteil von weniger als 10 % ermittelt wurde. Für alle Unterfraktionen wurde ein ähnlich hoher Anteil an Exopeptidaseschnittstellen von 30 bis 35 % ermittelt, von denen weniger als 3 % zu einer Abspaltung der Aminosäure Arginin führten.

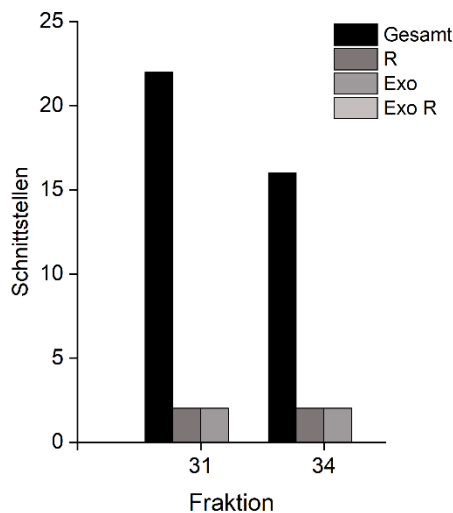


Abbildung 21: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL⁻¹ Casein) ausgewählter Unterfraktionen von *A. aegerita* (Aae, Tag 10) nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, die Anzahl der arginylspezifischen Schnittstellen (R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).

Tabelle 48: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL⁻¹ Casein) ausgewählter Unterfraktionen von *A. aegerita* (Aae, Tag 10) nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Angegeben ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, der Anteil der arginylspezifischen Schnittstellen (R) (ohne Exo R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).

Aae	Gesamtanzahl Schnittstellen	Anteil R [%]	Anteil Exo [%]	Anteil Exo R [%]
Unterfraktion 31	22	9,1 ($\sum 2$)	9,1 ($\sum 2$)	-
Unterfraktion 34	16	12,5 ($\sum 2$)	12,5 ($\sum 2$)	-
Unterfraktion 35	-	-	-	-
Unterfraktion 36	-	-	-	-
Unterfraktion 38	-	-	-	-

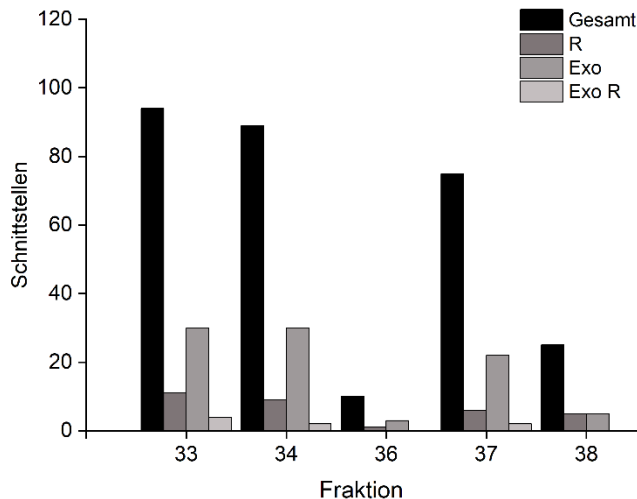


Abbildung 22: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL^{-1} Casein) ausgewählter Unterfraktionen von *P. eryngii* (Per, Tag 3) nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, die Anzahl der arginylspezifischen Schnittstellen (R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).

Tabelle 49: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL^{-1} Casein) ausgewählter Unterfraktionen von *P. eryngii* (Per, Tag 3) nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Angegeben ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, der Anteil der arginylspezifischen Schnittstellen (R) (ohne Exo R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) und der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).

Per	Gesamtanzahl Schnittstellen	Anteil R [%]	Anteil Exo [%]	Anteil Exo R [%]
Unterfraktion 33	94	7,4 (Σ 7)	31,9 (Σ 30)	4,2 (Σ 4)
Unterfraktion 34	89	7,9 (Σ 7)	33,7 (Σ 30)	2,2 (Σ 2)
Unterfraktion 36	10	10 (Σ 1)	30 (Σ 3)	-
Unterfraktion 37	75	5,3 (Σ 4)	29,3 (Σ 22)	2,7 (Σ 2)
Unterfraktion 38	25	20 (Σ 5)	20 (Σ 5)	-

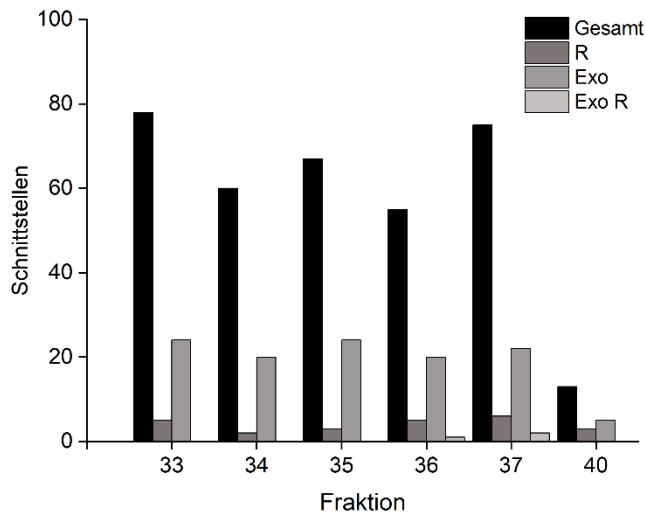


Abbildung 23: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL⁻¹ Casein) ausgewählter Unterfraktionen von *F. velutipes* (Fve, Tag 10 nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, die Anzahl der arginylspezifischen Schnittstellen (R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) sowie der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).

Tabelle 50: Ergebnisse der Schnittstellenanalyse (1 mg mL⁻¹ Casein) ausgewählter Unterfraktionen von *F. velutipes* (Fve, Tag 10) nach Reinigung des Kulturüberstandes mittels FPLC-basierter SEC. Angegeben ist die Gesamtanzahl der Schnittstellen, der Anteil der arginylspezifischen Schnittstellen (R) (ohne Exo R), der Exopeptidaseschnittstellen (Exo) und der Exopeptidaseschnittstellen, die zur Abspaltung von Arginin führen (Exo R).

Fve	Gesamtanzahl Schnittstellen	Anteil R [%]	Anteil Exo [%]	Anteil Exo R [%]
Unterfraktion 33	78	6,4 (Σ 5)	30,8 (Σ 24)	-
Unterfraktion 34	60	3,3 (Σ 2)	33,3 (Σ 20)	-
Unterfraktion 35	67	4,5 (Σ 3)	35,8 (Σ 24)	-
Unterfraktion 36	55	7,3 (Σ 4)	36,4 (Σ 20)	1,8 (Σ 1)
Unterfraktion 37	75	5,3 (Σ 4)	29,3 (Σ 22)	2,7 (Σ 2)
Unterfraktion 40	13	23,0 (Σ 3)	38,5 (Σ 5)	-

4.3. Dipeptidylpeptidase

Die Vorarbeiten von Karla Reinicke wurden als Grundlage für die Klonierung der Dipeptidylpeptidase V aus *P. floridanus* verwendet. In ihrer BSc-Arbeit wurde die Sequenz der DPPV aus *A. fumigatus* (Accession number: B0XRV0; Abbildung A24) gegen das Genom einiger Basidiomyceten aus dem Peptidase Screening (Kapitel 3.1.5) geblasted (Altschul *et al.*, 1990; Madden *et al.*, 1996). Zu den Basidiomyceten gehörten: *A. aegerita* (Aae), *C. cinereus* (Cci), *C. puteana* (Cpu), *F. velutipes* (Fve) und *P. floridanus* (Pfl).

Anhand bioinformatischer Analysen wurde für Pfl (KDQ25585) ein hypothetisches Protein (Accession number: OK624782) mit einer Länge von 769 Aminosäuren identifiziert. Zur Identifizierung und Verifizierung der Dipeptidylpeptidaseaktivität wurde am sechsten Tag der Kultivierung mRNA aus Pfl isoliert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die maximale Peptidaseaktivität, im Azocaseinassay gemessen (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde cDNA synthetisiert, das Gen amplifiziert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Die *pfl*dppv mRNA hatte eine Länge von 2310 bp und das translatierte Protein von 769 Aminosäuren mit einem vorhergesagten Signalpeptid von 22 Aminosäuren (AA 1 bis 22; SignalP 5.0) (Almagro Armenteros *et al.*, 2019). Ein Sequenzalignment mit anderen bekannten DPPV (AfDPPV, AoDPPV, AoDppE und AoDppF) zeigte, dass die Sequenzen eine Ähnlichkeit von weniger als 36 % zueinander haben. Weiterhin enthält PflDPPV das typische GX SXG Motiv (623 bis 627) sowie die Aminosäurereste Ser, Asp und His (Ser625, Asp710, His742) der katalytischen Triade (Abbildung A25) (Monod and Beauvais 2013).

Nach erfolgreicher Produktion der PflDPPV in *E. coli* wurden die Zellen mittels Ultraschall (Kapitel 3.2.3.2) aufgeschlossen und mit FPLC-basierter Ni²⁺-NTA gereinigt (Kapitel 3.2.4.10). Die zwölf gesammelten Fraktionen wurden anschließend mit verschiedenen pNA Substraten auf Peptidaseaktivität (Kapitel 3.2.5.3) überprüft. Die höchste Aktivität wurde gegenüber dem Substrat H-L-Ala-L-Ala-pNA gemessen, während für andere Substrate (H-L-Arg-L-Pro-pNA, H-Gly-L-Arg-pNA und H-Gly-L-Glu-pNA) keine Aktivität gemessen wurde (Daten nicht gezeigt). Daher wurde für alle weiteren Versuche H-L-Ala-L-Ala-pNA als Substrat verwendet. Nach der Reinigung zeigten Fraktionen 7 und 8 die höchste Peptidaseaktivität (167 bzw. 131 aU L⁻¹) (Abbildung 24), wurden nachfolgend *gepooled* und ca. 10-fach konzentriert (10 kDa *cut-off* Filter). Die Peptidaseaktivität nach der Konzentrierung der PflDPPV betrug 1.040 aU L⁻¹. Mittels SDS-PAGE, semi-nativer PAGE und Western Blot wurde die PflDPPV als 84 kDa großes Monomer identifiziert (Abbildung 25).

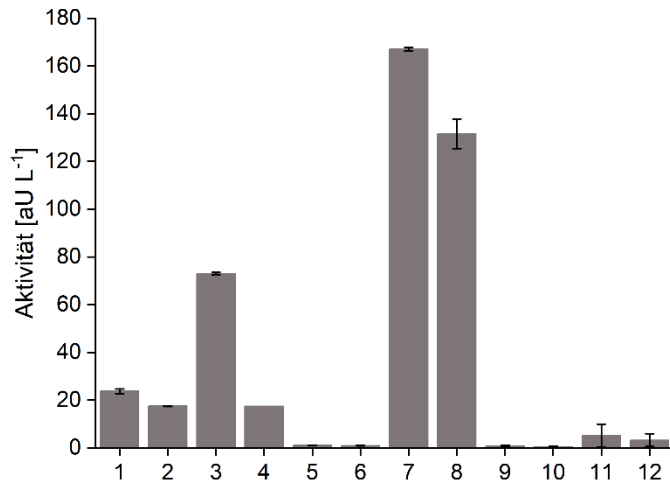


Abbildung 24: Ergebnisse des pNA-Assays der zwölf Fraktionen nach FPLC-basierter Ni²⁺-NTA Reinigung der heterolog produzierten PfIDPPV. Als Substrat wurde H-L-Ala-L-Ala-pNA verwendet.

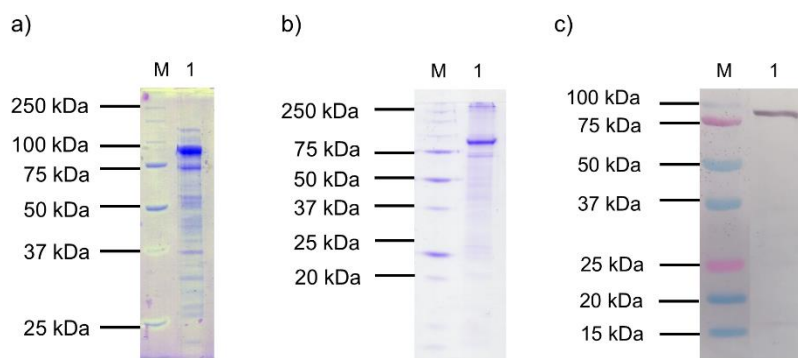


Abbildung 25: SDS-PAGE (a), semi-native PAGE (b) und Western Blot (c) der rekombinanten PfIDPPV (Bande 1). M: Precision Plus Protein Unstained (a, b) oder All Blue Standard (c) (Bio-Rad).

4.3.1. Biochemische Charakterisierung der PfIDPPV

PfIDPPV hatte ein breites pH-Optimum mit der höchsten Aktivität bei pH 8,5 (Abbildung 26). Zwischen pH 5 und 6 zeigte PfIDPPV die beste pH-Stabilität mit einer Restaktivität von 38 bzw. 74 % (Abbildung 26). Das Temperaturoptimum der PfIDPPV lag bei 60°C, und die DPPV war bei Temperaturen zwischen 30 und 40 °C stabil (Abbildung 27). Die Stabilität der PfIDPPV nahm bei höheren Temperaturen stark ab und zeigte bei über 60 °C nur noch 11 % Restaktivität (Abbildung 27).

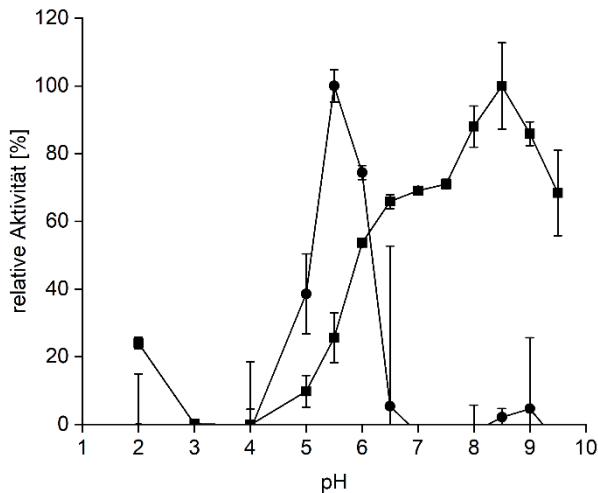


Abbildung 26: Effekt des pH-Wertes auf die Aktivität (Quadrat) und Stabilität (Kreis) der PfIDPPV. Es wurde Britton-Robinson-Puffer im pH-Bereich von 2 bis 9,5 verwendet. Für die pH-Stabilität wurden die Proben für eine Stunde bei den entsprechenden pH-Werten inkubiert und anschließend ein Aktivitätsassay unter optimalen Bedingungen (pH 8,5) durchgeführt. Die relative DPPV Aktivität [%] wurde gegenüber der höchsten Aktivität in jedem Experiment definiert.

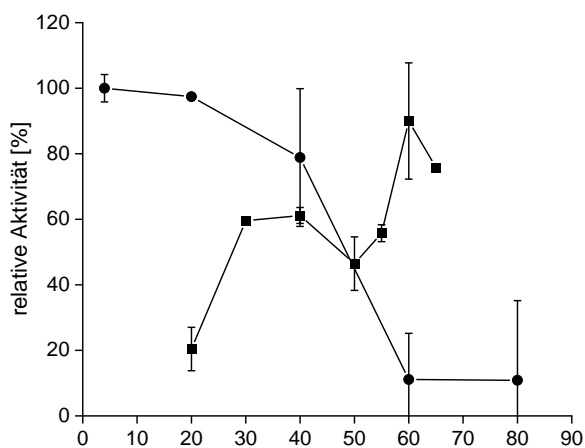


Abbildung 27: Effekt der Temperatur auf die Aktivität (Quadrat) und Stabilität (Kreis) der PfIDPPV. Für die Temperaturstabilität wurden die Proben für eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Anschließend wurde ein Aktivitätsassay unter optimalen Bedingungen (60 °C) durchgeführt. Die relative DPPV Aktivität [%] wurde gegenüber der höchsten Aktivität in jedem Experiment definiert.

Tabelle 51: Überblick über die kinetischen Parameter der PflDPPV, AfDPPV (Beauvais *et al.*, 1997a), AoDppE und AoDppF (Maeda *et al.*, 2016). Als Substrat wurde H-L-Ala-L-Ala-pNA verwendet. k. A.: keine Angaben.

H-L-Ala-L-Ala-pNA	PflDPPV	AfDPPV	AoDppE	AoDppF
K_M [mM]	36,3	0,4	5,93	2,05
k_{cat} [s^{-1}]	260,64	k. A.	22,2	35,9
k_{cat}/K_M [$s^{-1} mM^{-1}$]	7,17	k. A.	3,4	17,5

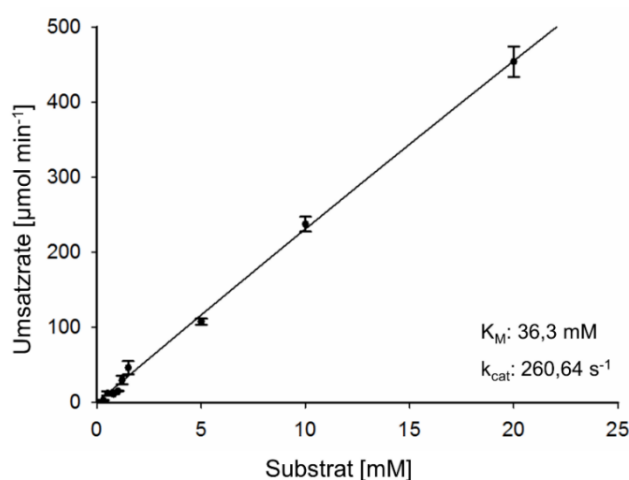


Abbildung 28: Lineare Michaelis-Menten Regression zur Umsetzung von H-L-Ala-L-Ala-pNA durch die PflDPPV.

4.3.2. Einfluss verschiedener Inhibitoren

Im weiteren Verlauf wurde die Sensitivität der PflDPPV gegenüber verschiedenen Inhibitoren untersucht (Abbildung 29,

Tabelle A3). Bei den meisten Inhibitoren (Bestatin, E-64, Chymostatin, Pepstain A, EDTA, Aprotinin, PMSF) war der Einfluss auf die Peptidaseaktivität von der Inhibitorkonzentration unabhängig. Im Fall von Antipain war die Inhibierung konzentrationsabhängig. Für Bestatin, Chymostatin, EDTA und PMSF konnte kein Einfluss auf die Peptidaseaktivität festgestellt werden. Pefabloc (1 μ M und 5 μ M) und Antipain (6,3 mM) steigerten die Peptidaseaktivität um 40, 12 bzw. 19 %. Die Inhibitoren E-64, Antipain (86 μ M), Pepstain A und Aprotinin senkten die Peptidaseaktivität. Die stärkste Inhibierung wurde durch 86 μ M Antipain und 10 μ M Aprotinin mit einer Restaktivität von 64 bzw. 66 % hervorgerufen.

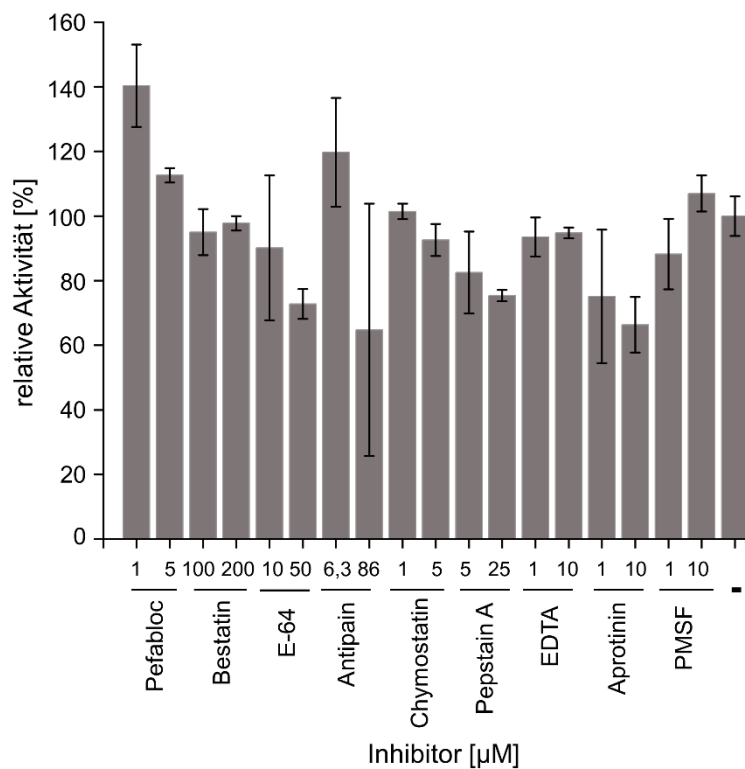


Abbildung 29: Effekt verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität der PflDPPV gegenüber dem Substrat H-L-Ala-L-Ala-pNA. Die relative Aktivität [%] der Kontrolle (-) wurde als 100 % definiert (gestrichelte Linie).

5. Diskussion

In dieser Arbeit sollten arginylspezifische Peptidasegene aus Basidiomyceten identifiziert und kloniert werden. Angestrebt wurde die Generierung von L-Arginyldipeptide und deren Einsatz in der Lebensmittelindustrie. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Peptidasegene aus *T. versicolor*, *P. chrysosporium* und *S. commune* kloniert und auf arginylspezifische Peptidaseaktivität untersucht. In einem zweiten Ansatz wurden verschiedene Basidiomyceten in Minimalmedium mit 1 % Gluten kultiviert und hinsichtlich ihrer peptidolytischen Aktivität untersucht. Der dritte Ansatz zur Identifizierung arginylspezifischer Peptidasen befasste sich mit der Klonierung und Charakterisierung einer Dipeptidylpeptidase V aus *P. floridanus*.

5.1. Klonierungsarbeiten

Basierend auf der Dissertation von Lisa Harth wurden in der vorliegenden Arbeit Peptidasegene aus *T. versicolor*, *P. chrysosporium* und *S. commune* kloniert, da die Genome dieser Basidiomyceten vollständig sequenziert waren (Harth 2016). Die Peptidasegene wurden sowohl in *E. coli* als auch *K. phaffii* exprimiert und anschließend mittels Affinitäts- (Ni^{2+} -NTA) bzw. Größenausschlusschromatographie (SEC) gereinigt.

Im Fall von Sco war die Amplifikation der beiden Gene (XP_003037751 und XP_003035464) nicht erfolgreich. Der Zeitpunkt der RNA Isolation (Tag 8 der Kultivierung) wurde anhand der Aktivitäten im Azocaseinassay gewählt (Daten nicht gezeigt). Es wäre denkbar, dass zu diesem Zeitpunkt nicht ausreichend mRNA vorhanden war. Daher könnte zu einem anderen Zeitpunkt der Kultivierung erneut RNA isoliert werden. Der Zeitpunkt der maximalen mRNA Konzentration könnte zusätzlich mittels quantitativer PCR (qPCR) ermittelt werden. Um die Gene erfolgreich zu amplifizieren, könnten in einem ersten Schritt Teilsequenzen mit verschiedenen Primern amplifiziert und final ligiert werden. Für die Amplifikation könnten zudem Primer verwendet werden, die nicht an der mRNA, sondern den untranslatierten Bereichen binden.

5.1.1. *E. coli*

Die Peptidasegene aus Tve und Pch wurden im ersten Schritt in *E. coli* exprimiert, da sich *E. coli* durch ein schnelles Zellwachstum und hohe Proteinausbeuten auszeichnet (Chen 2012; Khoo and Suntrarachun 2012; Effer *et al.*, 2019; Kutysenko *et al.*, 2019). Für die Expression wurde der pCOLD I-Vektor gewählt. Der pCOLD I-Vektor hat einen *cspA* Promotor (*cold-shock protein A*) und ermöglicht die Kultivierung bei niedrigen Temperaturen (15 – 17 °C), erhöht gleichzeitig die Löslichkeit der Proteine und verbessert die Proteinfaltung (Schein 2004; Khoo

and Suntrarachun 2012; San-Miguel *et al.*, 2013). Dies begünstigt die korrekte Proteinfaltung und kann die Bildung von *inclusion bodies* während der Expression minimieren.

Die Gene der Serinpeptidase (EIW59803) aus Tve wurde nicht erfolgreich exprimiert. Nach der Reinigung wurde keine Peptidaseaktivität und keine Bande im SDS-Gel auf der erwarteten Größen von 63 kDa (EIW59803, Abbildung 6) detektiert. Bei der Metallopeptidase (EIW51569) aus Tve wurde für das Pellet eine Bande auf der erwarteten Höhe von 64 kDa im SDS-Gel detektiert (Abbildung 5). Vermutlich lag das Protein in *inclusion bodies* vor und konnte nicht gereinigt werden. In diesem Fall könnte die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Bei der Aspartatpeptidase (EIW62808) aus Tve deutete die Aktivität im Azocaseinassay sowie die Bande im SDS-Gel bei der erwarteten Höhe von 44 kDa (Abbildung 4) auf die Produktion der gewünschten Peptidase hin. Allerdings wurde keine Aktivität im FRET-Assay detektiert, sodass es sich bei der Aspartatpeptidase nicht um eine arginylspezifische Peptidase handelt.

Das Gen der Serinpeptidase (ABB73029) aus Pch wurde ebenfalls nicht erfolgreich in *E. coli* exprimiert. Im SDS-Gel wurde eine Bande auf der zu erwartenden Höhe von 58 kDa, jedoch nicht im Western Blot detektiert (Daten nicht gezeigt). Um die Expression der Metallo- (EIW51569) und Serinpeptidase (EIW59803) aus Tve sowie der Serinpeptidase (ABB73029) aus Pch zu ermöglichen, könnten verschiedene Expressionsbedingungen in *E. coli* (IPTG Konzentration, Temperatur, Kultivierungsdauer) optimiert werden.

5.1.2. *K. phaffii*

Um zu untersuchen, ob posttranslationale Modifikationen für die korrekte Proteinfaltung nötig sind, wurden die Metallopeptidase (XP_008032702) aus Tve sowie die Serinpeptidase (ABB70329) aus Pch in den pPIC9-Vektor kloniert und in *K. phaffii* exprimiert (Tabelle A1 und Tabelle A2). Für die Metallopeptidase (XP_008032702) wurden bisher verschiedene Bedingungen für die Expression in *E. coli* getestet. Das Gen der Serinpeptidase (ABB73029) konnte bisher nicht erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden.

Nach Produktion der Metallopeptidase (XP_008032702) aus Tve wurde für den Kulturüberstand keine Bande im SDS-Gel bei 37 kDa detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Peptidase wurde also nicht erfolgreich exprimiert. Eine Möglichkeit wäre, dass die Transformationseffizienz und Vitalität des proteasedefizienten Stammes SMD1186 zu gering war oder, dass das eingebrachte Gen durch homologe Rekombination wieder aus dem Genom der Hefe herausgeschnitten wurde (Cregg 2007).

In diesem Fall kann mit der Isolation genomischer DNA und einer PCR mit spezifischen Primern der Einbau des in das Hefegenom überprüft werden.

Das Gen der Serinpeptidase (ABB73029) aus Pch wurde ebenfalls in *K. phaffii* exprimiert und es wurde eine Bande im SDS-Gel bei 60 kDa detektiert, die der erwarteten Größe von 58 kDa entsprach (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Peptidase erfolgreich gereinigt, für die Fraktionen 22 bis 25 arginylspezifische Peptidaseaktivität nachgewiesen (Daten nicht gezeigt) und die Fraktionen für eine Schnittstellenanalyse ausgewählt. Die Ergebnisse der Schnittstellenanalyse deuteten jedoch darauf hin, dass es sich bei der Serinpeptidase aus Pch vermutlich um eine Exopeptidase handelt (Abbildung 13 und Tabelle 43). Im Vergleich zum Kulturüberstand war der Anteil arginylspezifischer Schnittstellen für die gereinigten Fraktionen um bis zu 5 % (Fraktion 24, Tabelle 43) höher. Allerdings wurde für alle Fraktionen ein hoher Anteil an Exopeptidaseschnittstellen (30 %) ermittelt. Von den Exopeptidaseschnittstellen wurde wiederum ein Anteil von bis zu 4,2 % ermittelt (Fraktion 25, Tabelle 43), der zur Abspaltung der Aminosäure Arginin führte. Die Abspaltung von Arginin ist unerwünscht, da in keine L-Arginyldipeptide mehr durch enzymatische Spaltung freigesetzt werden können.

5.1.3. His-Tag

In dieser Arbeit wurde für die Reinigung verschiedener Peptidasegene ein His-Tag verwendet und kann sowohl am N- als auch C-Terminus kloniert werden. Während andere Protein-Tags die Löslichkeit und Faltung von Proteinen verbessern können (Francis and Page 2010), ist der His-Tag nicht dazu geeignet, die Löslichkeit von Proteinen zu erhöhen (Terpe 2003; Francis and Page 2010).

Für die Expression in *E. coli* wurde der His-Tag jeweils nur an den N-Terminus kloniert und könnte somit die Faltung des Proteins beeinflussen und die Bindung an das Säulenmaterial blockiert haben. Daher könnten die Peptidasegene aus Tve (EIW62808, EIW51569, EIW59803) und Pch (ABB73029) mit einem C-terminalen His-Tag kloniert und exprimiert werden. In *K. phaffii* wurde das Gen der Metallopeptidase (XP_008032702) aus Tve mit einem C-terminalen His-Tag kloniert und exprimiert. In diesem Fall könnte das Gen mit einem N-terminalen His-Tag kloniert und exprimiert werden. Um die Expression der Peptidasegene und damit das Vorhandensein des His-Tags zu überprüfen, könnte ein Western Blot durchgeführt werden. Beim Western Blot werden die Proteine vorher denaturiert, sodass der His-Tag unabhängig von der Faltung des Proteins detektiert werden kann. Bei der Reinigung dagegen, die unter nativen Bedingungen stattfindet, kann der His-Tag durch eine Fehlfaltung blockiert sein und nicht mehr mit dem Säulenmaterial interagieren.

Mit Ausnahme der Aspartatpeptidase aus Tve (EIW62808) konnte keine Peptidase gereinigt werden. Eine Möglichkeit wäre, dass der His-Tag blockiert und nicht an das Säulenmaterial gebunden hat oder, dass das Protein vorzeitig von der Säule eluiert wurde (Drees *et al.*, 2004).

Um eine Fehlfaltung des Proteins zu vermeiden und den His-Tag zugänglich zu machen, kann die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Zudem kann ein längerer His-Tag (His₁₀) verwendet werden (Bornhorst and Falke 2000). Denkbar wäre auch ein doppelter His-Tag, bei dem beide Tags durch eine Linker-Sequenz miteinander verbunden sind oder eine Linker-Sequenz zwischen dem His-Tag und dem Protein, um die Flexibilität zu erhöhen (Khan *et al.*, 2006). Eine weitere Option wäre die Nutzung anderer Tags, wie NusA, TrxA, SET oder SUMO. Diese können in Kombination mit dem His-Tag verwendet werden, um gleichzeitig die Löslichkeit der Proteinen zu erhöhen (Terpe 2003; Francis and Page 2010). Auch das *Maltose-binding protein* (MBP) verbessert die Löslichkeit, ist allerdings sehr groß und kann die biologische Aktivität beeinflussen (Terpe 2003; Francis and Page 2010). Um zu gewährleisten, dass die Proteine nicht vorzeitig von der Säule eluieren, sollte im Waschpuffer kein Imidazol verwendet bzw. die Konzentration angepasst werden (Drees *et al.*, 2004). Geringe Imidazolkonzentrationen können bereits dem Binde- oder Waschpuffer zugesetzt werden. Im Bindepuffer verhindert Imidazol die Bindung endogener Proteinen an das Säulenmaterial, und im Waschpuffer werden unerwünschte Proteine vorzeitig von der Säule eluiert (Yasmon *et al.*, 2011). Unspezifisch gebundene, endogene Proteine binden im Vergleich zu Proteinen mit einem His-Tag nur schwach an das Säulenmaterial und können daher leichter von der Säule eluiert werden.

5.1.4. Sekretion

Im Gegensatz zu *E. coli* werden in *K. phaffii* heterolog produzierte Proteine in das Medium sekretiert. Die Sekretion wird durch die α -Faktor Signalsequenz aus *S. cerevisiae* hervorgerufen (Kurjan and Herskowitz 1982). Dass im Kulturüberstand von *K. phaffii* nach der Produktion der Metallopeptidase aus Tve (XP_008032702) keine Bande im SDS-Gel auf der erwarteten Höhe von 37 kDa detektiert wurde, könnte auf eine fehlerhafte Sekretion hindeuten. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die hydrophoben Bereiche der α -Faktor Signalsequenz die Flexibilität und Sekretion des Pro-Peptids negativ beeinflussen (Ahmad *et al.*, 2014; Lin-Cereghino *et al.*, 2013; Rakestraw *et al.*, 2009). Dies könnte auch für die Metallopeptidase aus Tve (XP_008032702) zutreffen. Die Deletion von Teilsequenzen der α -Faktor Signalsequenz könnten daher zu einer gesteigerten Sekretion der heterolog produzierten Peptidase führen und eine anschließende Reinigung ermöglichen (Lin-Cereghino *et al.*, 2013).

Um zu überprüfen, ob die Peptidase exprimiert, aber nicht sekretiert wurde, könnten die Zellen aufgeschlossen und das Expressionsmuster der löslichen Fraktion mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft werden. Zusätzlich kann die unlösliche Fraktion auf ein SDS-Gel aufgetragen werden, um zu überprüfen, ob die Proteine in *inclusion bodies* vorliegen.

5.2. Peptidase Screening

Im Peptidase Screening wurden 29 Basidiomyceten mit 1 % zugesetztem Gluten kultiviert. Anhand verschiedener Aktivitätsassays (Zymographie, FRET-Assay, Azocaseinassay) wurden die fünf interessanten Basidiomyceten *A. aegerita* (Aae), *F. pinicola* (Fpi), *F. velutipes* (Fve), *H. sublateralium* (Hsu) und *P. eryngii* (Per) ausgewählt. Der Kulturüberstand dieser Pilze wurden anschließend gereinigt und die Spaltspezifität der gereinigten Peptidasen analysiert.

5.2.1. pH-Wert

Im ersten Schritt wurden die pH-Werte über den Verlauf der Kultivierung betrachtet. Dabei fällt auf, dass die pH-Werte bei Fpi und Hsu zu Beginn der Kultivierung eher im sauren (Fpi: 3,1; Hsu: 4,1) und bei Aae, Fve und Per im neutralen Bereich lagen (Abbildung 14). Am Ende der Kultivierung lag der pH-Wert bei allen Pilzen im leicht alkalischen Bereich (Hsu: 7,2; Fpi: 8,4; Aae: 8,5; Fve und Per: 8,6) was auf eine breite pH Stabilität hindeutet.

In einer Studie von Semenova *et al.*, (2017) zur Kultivierung (Czapek Medium mit Casein) verschiedener Ascomyceten und Basidiomyceten wurde gezeigt, dass Basidiomyceten primär Metallopeptidasen produzieren, während Ascomyceten bevorzugt Serinpeptidasen produzieren. Metallopeptidasen zeigen Aktivität im leicht sauren bis neutralen pH-Bereich (pH 5,4 bis 7,7), während Serinpeptidasen im alkalischen pH Bereich (pH 7,5 und 8,6) ihr Optimum haben und Aspartatpeptidasen bevorzugt bei sauren pH-Werten gebildet werden (Semenova *et al.*, 2017). Demnach könnte es sich bei den Peptidasen aus Aae, Fpi, Fve, Hsu und Per um Metallo- oder Serinpeptidasen handeln. Die genaue Identifizierung der Peptidasen kann durch die Zugabe spezifischer Inhibitoren und einer anschließenden Zymographie sowie Aktivitätsassays überprüft werden. Zur Identifizierung der Aminosäuresequenz können Banden aus dem SDS-Gel oder der Zymographie ausgeschnitten, tryptisch verdaut und sequenziert werden.

5.2.1. Zymographie

Mittels Zymographie wurde der Kulturüberstand der fünf Pilze an den verschiedenen Probenahmetagen auf Endopeptidaseaktivität untersucht (Yasumitsu 2017). Bei allen fünf Pilzen wurde extrazelluläre Peptidaseaktivität nachgewiesen (Abbildung 15 bis Abbildung 19). Hsu und Fpi zeigten zusätzlich eine Bande im lysierten Pellet an Tag 24 (Abbildung 17 und Abbildung 18), was für die Produktion intrazellulärer Peptidasen spricht. Insgesamt zeigte die Zymographie, dass für jeden Pilz mindestens eine extrazelluläre Peptidase produziert wurde. Bei Aae wurde in den ersten Tagen der Kultivierung (Tag 3 bis 6, Abbildung 15) eine weitere

Peptidase produziert sowie bei Fve und Per an den Tagen sechs bis neun (Abbildung 16 und Abbildung 19). Die meisten Pilze passen die Produktion und Sekretion extrazellulärer Enzyme an die Umgebung an. Viele Gene werden konstitutiv auf einem geringen Level exprimiert, bis eine brauchbare Nährstoffquelle zur Verfügung steht. Dann erst werden bestimmte Peptidasen in größeren Mengen sekretiert, um den Abbau des Substrates zu ermöglichen (Semenova *et al.*, 2017). Somit stellt das Expressionsmuster der Peptidasen aus dem Kulturüberstand der fünf Basidiomyceten die optimale Strategie der Pilze zum Abbau von Gluten im Medium dar.

Auffällig in der Zymographie waren zudem die hellen Bereiche bei Aae, Fve und Fpi. Bei Aae (Abbildung 15) traten diese Bereiche über den gesamten Kultivierungszeitraum auf, bei Fve nur bis Tag 16 (Abbildung 16) und bei Fpi nur an Tag 3 (Abbildung 17). Möglich wäre, dass die Proteine von Aae, Fve und Fpi Aggregate gebildet oder an das Casein gebunden haben. Dieses als *binding mode* bekannte Phänomen könnte dazu geführt haben, dass nicht alle Proteine in der Lage waren, in das Gel zu wandern (Jeong *et al.*, 2009). Demnach könnten die hellen Bereiche die Aktivität von Proteinaggregaten darstellen.

5.2.2. Peptidaseaktivität

Im weiteren Verlauf wurde die Aktivität der Kulturüberstände an ausgewählten Tagen mit dem Azocasein- und FRET-Assay bestimmt. Für alle Pilze wurde im Azocaseinassay Endopeptidaseaktivität nachgewiesen (Abbildung 20). Der Fokus dieser Arbeit lag jedoch auf der Identifizierung arginylspezifischer Peptidasen. Daher wurde der Kulturüberstand im nächsten Schritt mit synthetischen Substraten auf Exopeptidaseaktivität untersucht, und in allen Proben wurde arginylspezifische Aktivität nachgewiesen (Tabelle 45, Abbildung A9 bis Abbildung A13). Nach der Reinigung ausgewählter Kulturüberstände, wurde für alle fünf Basidiomyceten ebenfalls Gesamt- und arginylspezifische Peptidaseaktivität für einzelne Fraktionen nachgewiesen (Tabelle 46, Abbildung A14 bis Abbildung A23).

Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Peptidasen bevorzugt N- oder C-terminal von der Aminosäure Arginin schneiden, und auch die genaue Position der Spaltung kann nicht ermittelt werden. Laut Schindler *et al.*, (2011) hat die Aminosäureabfolge im Dipeptid jedoch einen Einfluss auf die salzgeschmackverstärkende Wirkung, sodass nicht alle arginylspezifischen Peptidasen für die Produktion von salzgeschmackverstärkenden L-Arginyldipeptiden geeignet sind (Schindler *et al.*, 2011). In einer anderen Studie von Xu *et al.*, aus dem Jahr 2017 konnte jedoch kein Effekt der Aminosäureabfolge im Dipeptid auf den Salzgeschmack festgestellt werden (Xu *et al.*, 2017). Um dennoch die Position der Spaltung zu analysieren, könnten die Spaltprodukte nach dem FRET-Assay gereinigt und mittels nano-HPLC/MS analysiert werden.

Dabei ist jedoch zu beachten, dass anhand der verwendeten Methode (Kapitel 3.2.4.11) nur Peptide mit mindestens fünf Aminosäuren detektiert werden können. Um auch kleinere Peptide detektieren zu können, sollte die Methode angepasst werden.

5.2.3. Schnittstellenanalyse

Die Schnittstellenanalyse diente dazu, die Spaltspezifität der gereinigten Peptidasen aus Aae, Fve, Fpi, Hsu und Per zu analysieren. Dazu wurde Casein aufgrund seiner Löslichkeit und einem moderaten Anteil an Arginin (3,6 %) als Substrat ausgewählt (Tabelle 47). Die Zugänglichkeit der Peptidbindungen von Casein und besonders von β -Casein wird jedoch erschwert, da Casein keine definierte Tertiärstruktur besitzt und zur Selbstassemblierung neigt. Einige Bereiche können daher im Inneren des Proteins liegen und nicht mehr frei zugänglich sein (*masking of peptide bond*) (Vorob'ev 2009).

Bei Fpi und Hsu wurden nach der Hydrolyse von Casein keine Schnittstellen detektiert. Es wäre es möglich, dass potentielle Schnittstellen nicht frei zugänglich waren (Vorob'ev 2009). Zusätzlich hängt die Schnittstellenspezifität auch mit der Aminosäureabfolge des Substrates zusammen. An der Schnittstelle können benachbarte Aminosäuren im Substrat die Spaltung beeinflussen oder verhindern (Neto *et al.*, 2018). Bei Fpi und Hsu wurde sowohl vor als auch nach der Reinigung Peptidaseaktivität nachgewiesen und demnach Peptidasen produziert (Tabelle 46). Es wäre möglich, dass die Struktur oder die Aminosäureabfolge des Caseins eine Spaltung verhindert hat. Daher könnten weitere, argininreiche Substrate für eine erneute Schnittstellenanalyse getestet werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die generierten Peptide zu klein waren, um mittels LC-MS/MS detektiert zu werden, da mit der verwendeten Methode (Kapitel 3.2.4.11) nur Peptide mit einer Länge von mindestens fünf Aminosäuren detektiert werden können. Zudem kann ein autopeptidolytischer Prozess während der Schnittstellenanalyse nicht ausgeschlossen werden.

Bei den gereinigten Peptidasen der anderen Basidiomyceten (Aae, Fve, Per) handelte es sich vermutlich um Exopeptidasen, da neben arginylspezifischen Schnittstellen auch ein hoher Anteil an Exopeptidaseschnittstellen von bis zu 38 % (Fve) detektiert wurde (Tabelle 48 bis Tabelle 50). Insgesamt wurden bei Aae nur in zwei von fünf Unterfraktionen Schnittstellen ermittelt, 16 Schnittstellen in Unterfraktion 34 und 22 in Unterfraktion 31 (Tabelle 48). Möglicherweise waren die Peptide in den anderen Unterfraktionen zu klein und konnten nicht mit der verwendeten Methode (Kapitel 3.2.4.11) detektiert werden.

Bei Per und Fve wurde für jeweils eine Unterfraktion ein deutlich höherer Anteil arginylspezifischer Schnittstellen ermittelt; 20 % für Unterfraktion 38 von Per (Tabelle 49) bzw. 23 % für Unterfraktion 40 von Fve (Tabelle 50). Somit könnte es sich bei diesen Peptidasen auch eine arginylspezifische Peptidase handeln.

Für die Reinigung einer potentiell arginylspezifischen Peptidase wurde bei Fve der Kulturüberstand an Tag 7 verwendet. In der Zymographie wurden an diesem Tag Aktivitäten von Peptidasen mit verschiedener molekularer Masse (25, 37, 40 kDa, Abbildung 16) detektiert. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Unterfraktion 40 von Fve mehrere Peptidasen gereinigt vorlagen und die Ergebnisse der Schnittstellenanalyse können nicht eindeutig einer Peptidase zugeordnet werden. Daher könnten die Peptidasen in den entsprechenden Unterfraktionen nach der Reinigung anhand einer Zymographie visualisiert werden.

5.3. Dipeptidylpeptidase

Da mit den bisherigen Herangehensweisen keine Peptidase erfolgreich exprimiert und gereinigt werden konnte, sollte in einem neuen Versuch das Gen einer Dipeptidylpeptidase V kloniert und exprimiert werden. Als Grundlage dafür wurde Flavourzyme® genutzt. Flavourzyme ist ein Peptidasegemisch aus verschiedenen Endo- und Exopeptidasen des Pilzes *A. oryzae* und wird bereits vielfach zur Proteinhydrolyse in der Industrie eingesetzt. Es enthält auch zwei Dipeptidylpeptidasen (DPPIV und DPPV). DPPIV spaltet spezifisch das Substrat H-L-Ala-L-Pro-pNA und DPPV das Substrat H-L-Lys-L-Ala-pNA (Merz *et al.*, 2015). Die Schnittstellenspezifität der DPPV kann genutzt werden, um salzgeschmackverstärkende L-Arginyldipeptide zu generieren, u. a. Arg-Ala oder Pro-Ala.

Bisher wurde keine DPPV aus Basidiomyceten charakterisiert. Die PflDPPV ist die erste DPPV, die in *E. coli* produziert wurde. *dppe* und *dppf* aus *A. oryzae* wurden in *A. nidulans* (Maeda *et al.*, 2016) und die *dppv* aus *A. fumigatus* in *K. phaffii* exprimiert (Beauvais *et al.*, 1997a).

Die geringe Sequenzähnlichkeit (< 36 %) der PflDPPV zu DPP aus Ascomyceten (AfDPPV, AoDPPV, AoDppE, AoDppF) ist vermutlich auf die evolutionär unterschiedliche Entwicklung von Ascomyceten und Basidiomyceten zurückzuführen.

Die molekulare Masse der PflDPPV von 84,3 kDa (ExpASy; Gasteiger, 2003) war vergleichbar mit der molekularen Masse anderer DPP. AfDPPV hat eine molekulare Masse von 88 kDa und DppE und DppF aus *A. oryzae* von 90 bzw. 71,1 kDa (Beauvais *et al.*, 1997b; Maeda *et al.*, 2016). Das pH-Optimum der PflDPPV lag im leicht basischen Bereich bei pH 8,5, während das pH-Optimum der AfDPPV im leicht sauren (pH 6,5) und das Optimum der AoDppE und AoDppF aus *A. oryzae* im neutralen Bereich (pH 7) lagen (Beauvais *et al.*, 1997a; Maeda *et al.*, 2016). Neben dem pH-Optimum unterscheidet sich auch die pH-Stabilität zwischen Ascomyceten und Basidiomyceten. Ascomycetische DPP zeigen eine pH-Stabilität über einen breiteren pH-Bereich als die PflDPPV (pH 6 bis 8 für AfDPPV (Beauvais *et al.*, 1997a); pH 4

bis 9 für AoDppE; pH 6 bis 9 für AoDppF (Maeda *et al.*, 2016)). Zudem ist auffällig, dass das pH-Optimum der PflDPPV außerhalb des Bereiches der pH-Stabilität lag, während dies für DPP aus Ascomyceten nicht der Fall war. Die Restaktivität der PflDPPV am pH-Optimum von 8,5 lag bei ca. 2 %.

Das Temperaturoptimum der PflDPPV ähnelte den Optima anderer DPP. In *A. oryzae* wurden Temperaturoptima bei 70 °C (AoDppE) und 50 °C (AoDppF) beobachtet, die im Bereich der Temperaturstabilität lagen (Maeda *et al.*, 2016). Sowohl im Falle der PflDPPV als auch der AoDppE und AoDppF lagen die Temperaturoptima höher als in der natürlichen Umgebung. Die Temperaturstabilität der PflDPPV dagegen war geringer als bei AoDppE und AoDppF. Für AoDppF und AoDppE wurden Stabilitäten bis 50 °C bzw. 60 °C gemessen, während PflDPPV nur bis 40 °C stabil war (Maeda *et al.*, 2016). Für PflDPPV passte der Stabilitätsbereich zu den Kultivierungsbedingungen (24 °C) des Pilzes, während der Stabilitätsbereich bei AoDppE und AoDppF höher ist als in der natürlichen Umgebung. Die geringe Sequenzähnlichkeit von 36 % zwischen der PflDPPV und den anderen DPP könnte den Unterschied in der Temperaturstabilität zwischen Ascomyceten und Basidiomyceten erklären. Zudem wäre es möglich, dass der pH- und Temperaturstabilitäten der PflDPPV durch das Substrat oder die Reaktionsbedingungen während der Aktivitätsmessung beeinflusst wurden. Die Assays wurden jeweils für eine Stunde bei entsprechender Temperatur durchgeführt. Zur Ermittlung von pH und Temperaturstabilität, wurden die Proben zusätzlich eine Stunde vorinkubiert. Die DPPV erreichte jedoch bereits nach ca. zehn Minuten das Aktivitätsmaximum (Daten nicht gezeigt). Während der zusätzlichen Vorinkubation könnten die Proteine teilweise denaturiert worden sein, sodass Enzymkonzentration und Aktivität der PflDPPV negativ beeinflusst wurden (Almeida and Marana 2019).

Die Substratspezifität der PflDPPV gegenüber dem Substrat H-L-Ala-L-Ala-pNA war fünf- bis zehnmal höher verglichen mit anderen DPP (AflDPPV: 0,4 mM; AoDppE: 5,93 mM; AoDppF: 2,05 mM) (Beauvais *et al.*, 1997a; Maeda *et al.*, 2016). PflDPPV hatte zudem eine zehnmal höhere Umsatzrate verglichen mit AoDppE (k_{cat} : 22,2 s⁻¹) und AoDppF (k_{cat} : 35,9 s⁻¹) und eine höhere katalytische Effizienz verglichen mit AoDppE (3,74 s⁻¹ mM⁻¹). Gegenüber AoDppF hatte PflDPPV jedoch eine geringere katalytische Effizienz (17,5 s⁻¹ mM⁻¹) (Tabelle 51) (Maeda *et al.*, 2016).

Die Inkubation der PflDPPV mit verschiedenen Inhibitoren ergab kein eindeutiges Ergebnis. Für die extrazelluläre DPPV aus *A. fumigatus* (AflDPPV) wurde ebenfalls kein spezifischer Inhibitor publiziert (Beauvais *et al.*, 1997a). Sowohl PflDPPV als auch AflDPPV wurde nicht durch typische Serinepeptidaseinhibitoren wie PMSF oder Pefabloc inhibiert (Beauvais *et al.*, 1997a).

2013 publizierten Monod und Beauvais, dass Pefabloc teilweise einen Effekt und PMSF keinen Effekt auf die Aktivität der AfDPPV hatten (Monod and Beauvais 2013). Die Aktivität der PfIDPPV wurde ebenfalls nicht durch PMSF inhibiert, jedoch steigerte Pefabloc die Aktivität geringfügig. PfIDPPV kann dennoch als Serinpeptidase eingestuft werden, da die DPPV das typische GX SXG Motiv enthält und geringfügig durch die Serinpeptidaseinhibitoren Antipain und Aprotinin inhibiert wurde.

6. Ausblick

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse in dieser Arbeit belegen das Potential von Basidiomyceten zur Produktion von Peptidasen. Peptidasen aus Basidiomyceten haben eine breite Spaltspezifität und tolerieren eine Vielzahl an Peptidaseinhibitoren, was die Enzyme für den Einsatz in der Industrie und besonders in der Lebensmittelindustrie interessant macht.

In dieser Arbeit konnte keine arginylspezifische Peptidase aus Tve, Pch oder Sco eindeutig identifiziert werden. Lediglich die Schnittstellenanalyse der Serinpeptidase (ABB73029) aus Pch deutete auf eine arginylspezifische Peptidase hin. Dennoch wurden die meisten Schnittstellen durch Exopeptidasen generiert. Anhand (synthetischer) Substrate mit variierender Peptidlänge könnte untersucht werden, ob es sich bei der Serinpeptidase um eine Exo- oder Endopeptidase handelt. Mit verschiedenen Peptidaseinhibitoren (Aprotinin, PMSF, Pefabloc) kann zudem untersucht werden, ob die gereinigte Peptidase zur Gruppe der Serinpeptidasen gehört.

Um die Expression der Peptidasegene (EIW51569, EIW59803) in *E. coli* zu optimieren, sollten die Gene statt mit einem N- mit einem C-terminalen His-Tag kloniert und exprimiert werden. Zusätzlich sollte die Expression der Peptidasegene mittels Western Blot überprüft und die Expressionsbedingungen (IPTG-Konzentration, Temperatur, Inkubationsdauer) optimiert werden. Die Reinigung der Metallopeptidase (EIW51569) aus Tve könnte durch einen längeren His-Tag (His₁₀) oder eine Linker-Sequenz zwischen dem Gen und dem His-Tag ermöglicht werden.

Anhand des Peptidase Screenings wurden fünf interessante Pilze (Aae, Fpi, Fve, Hsu, Per) mit arginylspezifische Peptidaseaktivität identifiziert. Für keinen Pilz konnte jedoch eine arginylspezifische Peptidase eindeutig identifiziert werden. Die Schnittstellenanalyse von Per und Fve deutet jedoch auf eine arginylspezifische Peptidase hin. Weitere Substrate wie H-L-Arg-L-Pro-pNA oder H-L-Gly-L-Arg-pNA könnten genutzt werden, um die Spaltspezifität zu untersuchen. Substrate mit variierender Peptidlänge könnten zudem Aufschluss geben, ob es sich um eine Endo- oder Exopeptidase handelt. Um die Position der Spaltung (N- oder C-terminal von Arginin) zu ermitteln, könnten die Spaltprodukte des FRET-Assays gereinigt und mittels LC-MS/MS analysiert werden.

Bei Fve wurden an Tag 7 der Kultivierung drei Banden in der Zymographie mit ähnlicher molekularer Masse (25, 37 und 40 kDa) visualisiert. Um auszuschließen, dass mehrere gereinigte Peptidasen in den SEC Fraktionen vorlagen, sollte das Volumen der gesammelten Fraktionen verringert werden.

Abschließend wurde in dieser Arbeit eine Dipeptidylpeptidase (DPPV) aus *P. floridanus* erfolgreich gereinigt und charakterisiert. PflDPPV hat eine Spaltspezifität für Alanin und kann somit für die Generierung salzgeschmackverstärkender L-Arginyldipeptide wie Arg-Ala eingesetzt werden. Denkbar wäre die Kombination der PflDPPV mit einer Endopeptidase (z. B. Chymotrypsin), um argininreiche Substrate (BSA, Casein, Lysozym) zu hydrolysieren. Die Endopeptidase würde im ersten Schritt das Substrat vorverdauen, um kleinere Peptide für die PflDPPV zu generieren. Die Dipeptide könnte anschließend mit verschiedenen Dipeptidstandards quantifiziert werden. Um eine maximale Ausbeute an L-Arginyldipeptiden zu erzielen, könnten die Bedingungen der Hydrolyse (pH-Wert, Temperatur, Zeit) variiert werden. Für eine anschließende Sensorik sowie den Einsatz in der Lebensmittelindustrie sollten alle Schritte unter *food grade* Bedingungen stattfinden.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass der salzgeschmackverstärkende Effekt der Dipeptide von deren Konzentration abhängt. Um die richtige Konzentration der Dipeptide in Lebensmitteln einsetzen zu können, sollten bei Sensoriken bereits unterschiedliche Konzentrationen berücksichtigt werden. Außerdem sollte untersucht werden, wie sich der salzgeschmackverstärkende Effekt der Dipeptide oder die Kombination von Dipeptiden in verschiedenen Matrices auswirkt. Weiterhin muss beachtet werden, dass in den Proteinhydrolysaten Peptide mit unerwünschtem Nebengeschmack enthalten sein könnten und z. B. durch Flüssigkeitschromatographie abgetrennt werden müssten. Abschließend muss die Deklaration von L-Arginyldipeptiden in Lebensmitteln rechtlich beurteilt werden, bevor diese in Lebensmitteln eingesetzt werden können.

7. Literaturverzeichnis

- Abbott, C. A., Yu, D. M. T., Woollatt, E., Sutherland, G. R., McCaughan, G. W., & Gorrell, M. D. (2000). Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), 6140–6150. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01617.x>
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5301–5317. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Almeida, V. M., & Marana, S. R. (2019). Optimum temperature may be a misleading parameter in enzyme characterization and application. *PLoS ONE*, 14(2), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212977>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bairoch, A. (2000). The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 304–305. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.304>
- Baratti, J., & Couderc, R. (1980). Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(10), 2279–2289. <https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10864320>
- BBC Research. (2021). Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. In *Focus on Catalysts* (Issue 5). <https://www.reportbuyer.com/product/870778/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html> (zuletzt abgerufen am 13.4.2022)
- Beauvais, A., Monod, M., Debeaupuis, J. P., Diaquin, M., Kobayashi, H., & Latgé, J. P. (1997a). Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6238–6244. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6238>
- Beauvais, A., Monod, M., Wyniger, J., Debeaupuis, J. P., Grouzmann, E., Brakch, N., Svab, J., Hovanessian, A. G., & Latgé, J. P. (1997b). Dipeptidyl-peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans. *Infection and Immunity*, 65(8), 3042–3047. <https://doi.org/10.1128/iai.65.8.3042-3047.1997>

- Berlec, A., & Štrukelj, B. (2013). Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(3–4), 257–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0>
- Boettner, M., Steffens, C., von Mering, C., Bork, P., Stahl, U., & Lang, C. (2007). Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris* - A comparative view on 79 human genes. *Journal of Biotechnology*, 130(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.019>
- Bordewick, S., Mast, T. A., Berger, R. G., & Ersoy, F. (2021). Recombinant Production of Arginyl Dipeptides by L-Amino Acid Ligase RizaA Coupled with ATP Regeneration. *Catalysts*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/catal11111290>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245–254. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)26058-8)
- Bouws, H., Wattenberg, A., & Zorn, H. (2008). Fungal secretomes - Nature's toolbox for white biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(3), 381–388. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1572-5>
- Cappuccio, F. P., Kalaitzidis, R., Duneclift, S., & Eastwood, J. B. (2000). Unravelling the links between calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism. *Journal of Nephrology*, 13(3), 169–177.
- Chen, R. (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1102–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013>
- Cianciaruso, B., Bellizzi, V., Minutolo, R., Tavera, A., Capuano, A., Conte, G., & De Nicola, L. (1998). Salt intake and renal outcome in patients with progressive renal disease. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 24(4), 296–301. <https://doi.org/10.1159/000057385>
- Cook, N. R., Cutler, J. A., Obarzanek, E., Buring, J. E., Rexrode, K. M., Kumanyika, S. K., Appel, L. J., & Whelton, P. K. (2007). Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: Observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *British Medical Journal*, 334(7599), 885–888. <https://doi.org/10.1136/bmj.39147.604896.55>
- Cregg, J. (2007). *Pichia* Protocols (2. Auflage). In *Methods in Molecular Biology*. Totowa, USA. <https://doi.org/10.1385/0896034216>
- Cregg, J M, Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P., & Stillman, C. A. (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 9(3), 1316–1323. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.3.1316-1323.1989>

- Cregg, James M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16(1), 23–52.
<https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23>
- da Silva, R. R. (2017). Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1007/s12010-017-2427-2>
- Daly, R., & Hearn, M. T. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119–138. <https://doi.org/10.1002/jmr.687>
- Damasceno, L. M., Anderson, K. A., Ritter, G., Cregg, J. M., Old, L. J., & Batt, C. A. (2007). Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(2), 381–389.
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0652-7>
- Damasceno, L. M., Huang, C. J., & Batt, C. A. (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 31–39. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3654-z>
- Datta, A. (1992). Purification and characterization of a novel protease from solid substrate cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry*, 267(2), 728–732. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48344-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48344-5)
- de Marco, A. (2009). Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 8.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-26>
- De Schutter, K., Lin, Y. C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Van De Peer, Y., & Callewaert, N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 27(6), 561–566.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1544>
- de Souza, P. M., de Assis Bittencourt, M. L., Caprara, C. C., de Freitas, M., de Almeida, R. P. C., Silveira, D., Fonseca, Y. M., Filho, E. X. F., Pessoa Junior, A., & Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337–346. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>
- Derave, W., Everaert, I., Beeckman, S., & Baguet, A. (2010). Muscle Carnosine Metabolism and β -Alanine Supplementation in Relation to Exercise and Training. *Sports Medicine*, 40(3), 247–263. <https://doi.org/10.2165/11530310-000000000-00000>
- Doekel, S., & Marahiel, M. A. (2000). Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chemistry and Biology*, 7(6), 373–384. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00118-6](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00118-6)

- Dragosits, M., Stadlmann, J., Albiol, J., Baumann, K., Maurer, M., Gasser, B., Sauer, M., Altmann, F., Ferrer, P., & Mattanovich, D. (2009). The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of Proteome Research*, 8(3), 1380–1392. <https://doi.org/10.1021/pr8007623>
- Drees, J., Smith, J., Schäfer, F., & Steinert, K. (2004). High-throughput expression and purification of 6xHis-tagged proteins in a 96-well format. *Methods in Molecular Medicine*, 94, 179–190. <https://doi.org/10.1385/1-59259-679-7:179>
- Effer, B., Lima, G. M., Cabarca, S., Pessoa, A., Farías, J. G., & Monteiro, G. (2019). L-Asparaginase from *E. chrysanthemi* expressed in glycoswitch®: effect of His-Tag fusion on the extracellular expression. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(7), 679–685. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1599396>
- Eisele, N., Linke, D., Nimitz, M., & Berger, R. G. (2011). Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*, 46(9), 1840–1846. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.06.013>
- Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F., Harpold, M. M., & Gingeras, T. R. (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 5(5), 1111–1121. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.5.1111-1121.1985>
- Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. L., & Guillaume, D. (2014). Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.011>
- Fernández-Resa, P., Mira, E., & Quesada, A. R. (1995). Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Analytical Biochemistry*, 224(1), 434–435. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1063>
- Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science*, SUPPL. 61, 1–29. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61>
- Fukasawa, K. M., Fukasawa, K., Higaki, K., Shiina, N., Ohno, M., Ito, S., Otagoto, J., & Ota, N. (2001). Cloning and functional expression of rat kidney dipeptidyl peptidase II. *Biochemical Journal*, 353(2), 283–290. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3530283>
- Fuller, R. S., Brake, A., & Thorner, J. (1989). Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(5), 1434–1438. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.5.1434>

- Fyfe, I. (2020). High-salt diet promotes Alzheimer disease-like changes. *Nature Reviews Neurology*, 16(1), 2–3. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0289-7>
- Gasser, B., Maurer, M., Rautio, J., Sauer, M., Bhattacharyya, A., Saloheimo, M., Penttilä, M., & Mattanovich, D. (2007). Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. *BMC Genomics*, 8, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-179>
- Gasser, B., Prielhofer, R., Marx, H., Maurer, M., Nocon, J., Steiger, M., Puxbaum, V., Sauer, M., & Mattanovich, D. (2013). *Pichia pastoris*: Protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiology*, 8(2), 191–208. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.133>
- Gasteiger, E. (2003). ExpASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784–3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>
- Gonçalves, C., Rodrigues, J., Júnior, H., Carneiro, J., Freire, T., & Freire, L. (2017). Sodium reduction in margarine using NaCl substitutes. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 89(3), 2505–2513. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150618>
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Arshad, M. K. M., Lakshmi Priya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. V. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>
- Gray, N. (2013). High salt intake causes 2.3 million deaths per year. Food navigator. <https://www.foodnavigator.com/Article/2013/03/25/High-salt-intake-causes-2.3-million-deaths-per-year> (zuletzt abgerufen am 13.04.2022).
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2017). Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 8(JUL), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00419>
- Harth, L. (2016). Freisetzung von salzgeschmacksverstärkenden Peptiden aus Milch- und Eiklarproteinen mittels Peptidasen aus Basidiomyceten. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Hartmann, T., Cairns, T. C., Olbermann, P., Morschhäuser, J., Bignell, E. M., & Krappmann, S. (2011). Oligopeptide transport and regulation of extracellular proteolysis are required for growth of *Aspergillus fumigatus* on complex substrates but not for virulence. *Molecular Microbiology*, 82(4), 917–935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07868.x>
- He, F. J., Li, J., & MacGregor, G. A. (2013). Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ (Online)*, 346(7903), 1–15. <https://doi.org/10.1136/bmj.f1325>

- Healy, V., O'Connell, J., McCarthy, T. V., & Doonan, S. (1999). The lysine-specific proteinase from *Armillaria mellea* is a member of a novel class of metalloendopeptidases located in basidiomycetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262(1), 60–63. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1151>
- Hefti, M. H., Van Vugt-Van Der Toorn, C. J. G., Dixon, R., & Vervoort, J. (2001). A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Analytical Biochemistry*, 295(2), 180–185. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5214>
- Inacio, F. D., Ferreira, R. O., Araujo, C. A. V. De, Brugnari, T., Castoldi, R., Peralta, R. M., & Souza, C. G. M. De. (2015). Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/290161>
- Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A. K., Martinelle, M., & Enfors, S. O. (2003). Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology*, 102(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00003-8)
- Jeong, W. J., Kwon, G. H., Lee, A. R., Park, J. Y., Lee, M. R., Chun, J., Cha, J., Song, Y. S., & Kim, J. H. (2009). Production of cheonggukjang by using a recombinant *Bacillus licheniformis* strain. *Journal of Food Science and Nutrition*, 14(1), 90–93. <https://doi.org/10.3746/jfn.2009.14.1.090>
- Julius, D., Blair, L., Brake, A., Sprague, G., & Thorner, J. (1983). Yeast α factor is processed from a larger precursor polypeptide: The essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. In *Cell* (Vol. 32, Issue 3, pp. 839–852). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90070-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90070-3)
- Kamionka, M. (2011). Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(2), 268–274. <https://doi.org/10.2174/138920111794295693>
- Kang, Z., Huang, H., Zhang, Y., Du, G., & Chen, J. (2017). Recent advances of molecular toolbox construction expand *Pichia pastoris* in synthetic biology applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2185-2>
- Ken McDonald, J. (2013). Dipeptidyl-Dipeptidase. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Vol. 2). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00558-5>
- Khan, F., He, M., & Taussig, M. J. (2006). Double-Hexahistidine Tag with High-affinity binding for protein immobilization, purification, and detection on Ni-nitrilotriacetic acid surfaces. In *Analytical Chemistry* (Vol. 78, Issue 9, pp. 3072–3079). <https://doi.org/10.1021/ac060184l>

- Khoo, O., & Suntrarachun, S. (2012). Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 159–162. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60213-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60213-X)
- Kjeldsen, T., Brandt, J., Andersen, A. S., Egel-Mitani, M., Hach, M., Pettersson, A. F., & Vad, K. (1996). A removable spacer peptide in an α -factor-leader/insulin precursor fusion protein improves processing and concomitant yield of the insulin precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Gene* (Vol. 170, Issue 1, pp. 107–112). [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00822-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00822-5)
- Klock, H. E., Koesema, E. J., Knuth, M. W., & Lesley, S. A. (2008). Combining the polymerase incomplete primer extension method for cloning and mutagenesis with microscreening to accelerate structural genomics efforts. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 71(2), 982–994. <https://doi.org/10.1002/prot.21786>
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452–1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>
- Kurjan, J., & Herskowitz, I. (1982). Structure of a yeast pheromone gene (MF α): A putative α -factor precursor contains four tandem copies of mature α -factor. *Cell*, 30(3), 933–943. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90298-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90298-7)
- Kurosawa, M., Kikuchi, S., Xu, J., & Inaba, Y. (2006). Highly salted food and mountain herbs elevate the risk for stomach cancer death in a rural area of Japan. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 21(11), 1681–1686. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04290.x>
- Kutyshenko, V. P., Mikoulinikaia, G. V., Chernyshov, S. V., Yegorov, A. Y., Prokhorov, D. A., & Uversky, V. N. (2019). Effect of C-terminal His-tag and purification routine on the activity and structure of the metalloenzyme, L-alanyl-D-glutamate peptidase of the bacteriophage T5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 810–818. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.219>
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*, 587(8), 1155–1163. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>
- Lin-Cereghino, G. P., Stark, C. M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L. K., Tran, N., Huang, A. D., Nattestad, M., Oshiro, K. T., Chang, J. W., Chavan, A., Tsai, J. W., & Lin-Cereghino, J. (2013). The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. In *Gene* (Vol. 519, Issue 2, pp. 311–317). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.062>

- Lin-Cereghino, J., & Lin-Cereghino, G. P. (2007). *Vectors and Strains for Expression BT - Pichia Protocols* (James M Cregg (ed.); pp. 11–25). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-456-8_2
- Madden, T. L., Tatusov, R. L., & Zhang, J. (1996). [9] Applications of network BLAST server. *Methods in Enzymology*, 266, 131–137. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)66011-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)66011-x)
- Maeda, H., Sakai, D., Kobayashi, T., Morita, H., Okamoto, A., Takeuchi, M., Kusumoto, K. I., Amano, H., Ishida, H., & Yamagata, Y. (2016). Three extracellular dipeptidyl peptidases found in *Aspergillus oryzae* show varying substrate specificities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(11), 4947–4958. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7339-5>
- Maehashi, K., Matsuzaki, M., Yamamoto, Y., & Udaka, S. (1999). Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties. In *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (Vol. 63, Issue 3, pp. 555–559).
<https://doi.org/10.1271/bbb.63.555>
- Martins, C. D. F., Raposo, M. M. M., & Costa, S. P. G. (2019). Intermolecular Quenching of Edans/Dabcyl Donor–Acceptor FRET Pair. *Proceedings*, 41(1), 34.
<https://doi.org/10.3390/ecsoc-23-06613>
- Merrifield, R. B. (1976). Solid phase peptide synthesis. *Excerpta Med., I.C.S., No.374*, 29–39. <https://doi.org/10.1201/9781003069225-2>
- Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., Stressler, T., & Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5682–5693.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01665>
- Monod, M., & Beauvais, A. (2013). Dipeptidyl-peptidases IV and V of *Aspergillus*. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3, 3392–3394. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00749-3>
- Nagata, C., Takatsuka, N., Shimizu, N., & Shimizu, H. (2004). Sodium intake and risk of death from stroke in Japanese men and women. *Stroke*, 35(7), 1543–1547.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000130425.50441.b0>
- Nakata, T., Takahashi, M., Nakatani, M., Tamura, M., Okai, H., & Kuramitsu, R. (1995). Role of Basic and Acidic Fragments in Delicious Peptides(Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) and the Taste Behavior of Sodium and Potassium Salts in Acidic Oligopeptides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(4), 689–693.
<https://doi.org/10.1271/bbb.59.689>

- Neto, Y. A. A. H., Garzon, N. G. da R., Pedezzi, R., & Cabral, H. (2018). Specificity of peptidases secreted by filamentous fungi. *Bioengineered*, *9*(1), 30–37.
<https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1373531>
- Nilsson, B. L., Soellner, M. B., & Raines, R. T. (2005). Chemical synthesis of proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *34*, 91–118.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.34.040204.144700>
- Noguchi, T., Tehara, N., Uesugi, Y., Jung, S., & Imai, N. (2012). Convenient peptide synthesis without protection of C-Terminals. *Chemistry Letters*, *41*(1), 42–43.
<https://doi.org/10.1246/cl.2012.42>
- Ogata, K., Nishikawa, H., & Ohsugi, M. (1969). A yeast capable of utilizing methanol. *Agricultural and Biological Chemistry*, *33*(10), 1519–1520.
<https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859497>
- Olsen, C., & Wagtmann, N. (2002). Identification and characterization of human DPP9, a novel homologue of dipeptidyl peptidase IV. *Gene*, *299*(1–2), 185–193.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)01059-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01059-4)
- Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Branduardi, P., Sauer, M., & Mattanovich, D. (2011). Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *89*(4), 939–948. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3019-z>
- Prasad, L., Leduc, Y., Hayakawa, K., & Delbaere, L. T. J. (2004). The structure of a universally employed enzyme: V8 protease from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *60*(2), 256–259.
<https://doi.org/10.1107/S0907444490302599X>
- Qi, S. Y., Riviere, P. J., Trojnar, J., Junien, J. L., & Akinsanya, K. O. (2003). Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochemical Journal*, *373*(1), 179–189.
<https://doi.org/10.1042/BJ20021914>
- Rakestraw, J. A., Sazinsky, S. L., Piatasi, A., Antipov, E., & Wittrup, K. D. (2009). Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, *103*(6), 1192–1201. <https://doi.org/10.1002/bit.22338>
- Rao, E. S., & Lalmuanpuia, C. (2020). Salt reduction strategies in foods. *International Journal of Chemical Studies*, *8*(6), 2458–2468.
<https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i6ai.11142>

- Rawlings, N. D. (2016). Peptidase specificity from the substrate cleavage collection in the MEROPS database and a tool to measure cleavage site conservation. *Biochimie*, *122*, 5–30. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.003>
- Rawlings, N. D., & Bateman, A. (2019). Origins of peptidases. *Biochimie*, *166*(January), 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.026>
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., & Barrett, A. J. (2007). An introduction to peptidases and the MEROPS database. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, 161–179. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_10
- Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D503–D509. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt953>
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*(JUN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
- Reinhold, D. (2006). Dipeptidyl Aminopeptidases. In *Dipeptidyl Aminopeptidases* (Vol. 575). <http://link.springer.com/10.1007/0-387-32824-6>
- Robinson, A. T., Edwards, D. G., & Farquhar, W. B. (2019). The Influence of Dietary Salt Beyond Blood Pressure. *Current Hypertension Reports*, *21*(6), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11906-019-0948-5>
- Roper, S. D. (2015). The taste of table salt. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *467*(3), 457–463. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1683-z>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, *5*(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R. P., & Mäkelä, M. R. (2014). Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *78*(4), 614–649. <https://doi.org/10.1128/mmb.00035-14>
- Saitoh, E., Yamamoto, S., Okamoto, E., Hayakawa, Y., Hoshino, T., Sato, R., Isemura, S., Ohtsubo, S., & Taniguchi, M. (2007). Identification of Cysteine Proteases and Screening of Cysteine Protease Inhibitors in Biological Samples by a Two-Dimensional Gel System of Zymography and Reverse Zymography. *Analytical Chemistry Insights*, *2*, 117739010700200. <https://doi.org/10.4137/117739010700200011>
- San-Miguel, T., Pérez-Bermúdez, P., & Gavidia, I. (2013). Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *SpringerPlus*, *2*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-89>

- Santos, J. A., Sparks, E., Thout, S. R., McKenzie, B., Trieu, K., Hoek, A., Johnson, C., McLean, R., Arcand, J. A., Campbell, N. R. C., & Webster, J. (2019). The Science of Salt: A global review on changes in sodium levels in foods. *Journal of Clinical Hypertension*, 21(8), 1043–1056. <https://doi.org/10.1111/jch.13628>
- Santos, J. A., Tekle, D., Rosewarne, E., Flexner, N., Cobb, L., Al-Jawaldeh, A., Kim, W. J., Breda, J., Whiting, S., Campbell, N., Neal, B., Webster, J., & Trieu, K. (2021). A Systematic Review of Salt Reduction Initiatives around the World: A Midterm Evaluation of Progress towards the 2025 Global Non-Communicable Diseases Salt Reduction Target. *Advances in Nutrition*, 12(5), 1768–1780. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab008>
- Schechter, I., & Berger, A. (2012). On the size of the active site in proteases. I. Papain. 1967. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(3), 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.015>
- Schein, C. H. (2004). A cool way to make proteins. *Nature Biotechnology*, 22(7), 826–827. <https://doi.org/10.1038/nbt0704-826>
- Schindler, A., Dunkel, A., Stähler, F., Backes, M., Ley, J., Meyerhof, W., & Hofmann, T. (2011). Discovery of salt taste enhancing arginyl dipeptides in protein digests and fermented fish sauces by means of a sensomics approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12578–12588. <https://doi.org/10.1021/jf2041593>
- Schmidt-Dannert, C. (2016). Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. *Current Opinion in Chemical Biology*, 31, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.002>
- Semenova, T. A., Dunaevsky, Y. E., Beljakova, G. A., Borisov, B. A., Shamraichuk, I. L., & Belozersky, M. A. (2017). Extracellular peptidases as possible markers of fungal ecology. *Applied Soil Ecology*, 113, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.01.002>
- Shental-Bechor, D., & Levy, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(24), 8256–8261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801340105>
- Sinclair, G., & Choy, F. Y. M. (2002). Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 26(1), 96–105. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00526-0](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00526-0)
- Sola, R. J., & Griebenow, K. (2009). Effects of glycosylate on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(4), 1223–1245. <https://doi.org/10.1002/jps.21504>

- Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H., & Czermak, P. (2015). Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, *202*, 118–134. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.027>
- Sterchi, E. E., & Stöcker, W. (1999). Proteolytic enzymes. In *Naika. Internal medicine* (Vol. 9). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-59816-6>
- Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology*, *44*(2), 211–220.
- Tabata, K., Ikeda, H., & Hashimoto, S. I. (2005). ywfE in *Bacillus subtilis* codes for a novel enzyme, L-amino acid ligase. *Journal of Bacteriology*, *187*(15), 5195–5202. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5195-5202.2005>
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *90*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*(5), 523–533. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1158-6>
- Tolia, N. H., & Joshua-Tor, L. (2006). Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nature Methods*, *3*(1), 55–64. <https://doi.org/10.1038/nmeth0106-55>
- Valderrama-Rincon, J. D., Fisher, A. C., Merritt, J. H., Fan, Y. Y., Reading, C. A., Chhiba, K., Heiss, C., Azadi, P., Aebi, M., & DeLisa, M. P. (2012). An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, *8*(5), 434–436. <https://doi.org/10.1038/nchembio.921>
- Visetnan, S., Donpuksa, S., Supungul, P., Tassanakajon, A., & Rimphanitchayakit, V. (2009). Kazal-type serine proteinase inhibitors from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* and the inhibitory activities of SPIPm4 and 5. *Fish and Shellfish Immunology*, *27*(2), 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.05.014>
- Vogl, T., Hartner, F. S., & Glieder, A. (2013). New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, *24*(6), 1094–1101. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.024>
- Vorob'ev, M. M. (2009). Kinetics of peptide bond demasking in enzymatic hydrolysis of casein substrates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *58*(1–4), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.12.007>
- Wang, H., & Ng, T. B. (2001). Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *289*(3), 750–755. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6037>

- Yasmon, A., Ibrahim, F., & Bela, B. (2011). Troubleshooting In Expression And Purification Of Recombinant Server Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Nucleocapsid Protein In *Escherichia Coli* BL21. *MAKARA of Science Series*, 14(2), 140–144. <https://doi.org/10.7454/mss.v14i2.741>
- Yasumitsu, H. (2017). Serine protease zymography: Low-cost, rapid, and highly sensitive RAMA casein zymography. *Methods in Molecular Biology*, 1626, 13–24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_2
- Yike, I. (2011). Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. *Mycopathologia*, 171(5), 299–323. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9386-2>
- Yin, C., Zheng, L., Chen, L., Tan, Q., Shang, X., & Ma, A. (2014). Cloning, expression, and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (Po-Asp) from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 2119–2131. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0674-4>
- Yokotani, N., Doi, K., J.wenthold, R., & Wada, K. (1993). Non-conservation of a catalytic residue in a dipeptidyl aminopeptidase IV-related protein encoded by a gene on human chromosome 7. *Human Molecular Genetics*, 2(7), 1037–1039. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.7.1037>

8. Anhang

8.1. Verwendete Vektoren

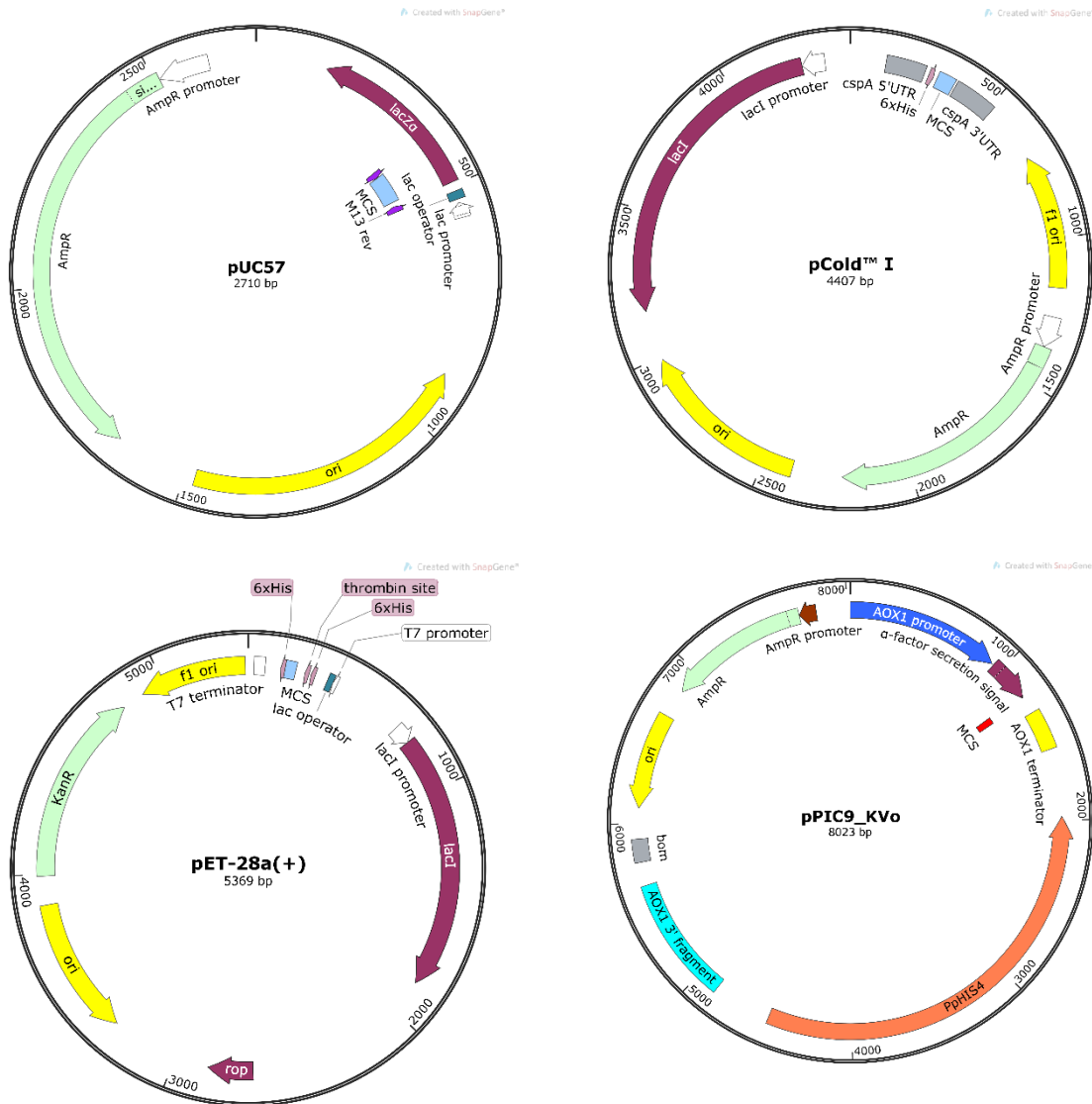


Abbildung A1: Verwendete Vektoren. pUC57 wurde für die Klonierung von PCR-Fragmenten in *E. coli* verwendet. Der pCOLD I- und pET28a(+)-Vektor wurde für die Expression in *E. coli* und der pPIC9-Vektor für die Expression in *K. phaffii* verwendet (SnapGene 5.1.7, GSL Biotech).

8.2. DNA und Proteingrößenstandard

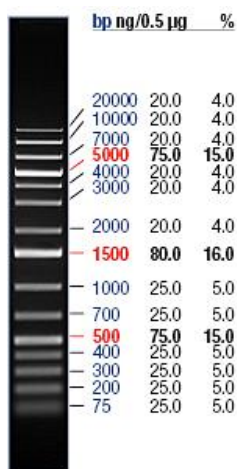


Abbildung A2: Standard DNA-Marker für die Agarosegelelektrophorese. GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Marker von Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems, Invitrogen, St. Leon-Rot, Deutschland).

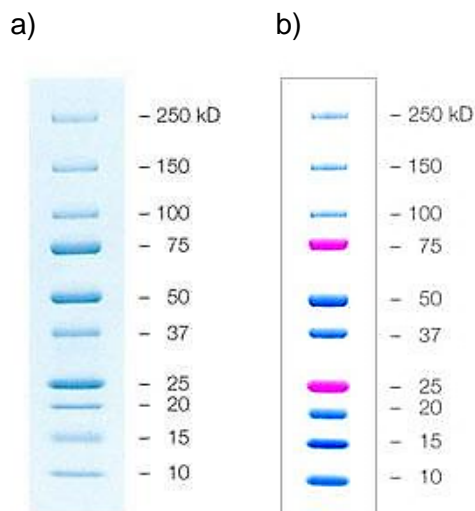


Abbildung A3: Standard Proteinmarker für denaturierende SDS-PAGE (a), semi-native PAGE (a), Zymographie (b) und Western Blot (b). Precision Plus Protein unstained (a) oder All Blue Standard (b) (BioRad, München, Deutschland).

8.3. Klonierungsarbeiten

8.3.1. *Trametes versicolor*

Tabelle A1: Klonierung und Expression verschiedener Peptidasegene aus *Trametes versicolor*. N: N-Terminus. C: C-Terminus.

<i>T. versicolor</i> <i>Accession number</i>	Homologie zu	Vektor	His-Tag	Expressionssystem	Signalpeptid	Reinigung
EIW62808	Aspartatpeptidase A01	pUC57	-	-	+	-
		pCOLD I	N	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	+	Ni ²⁺ -NTA
		pPIC9	C	<i>K. phaffii</i> SMD1168	+	-
XP_008032702	Peptidyl-Lys Metallopeptidase M35	pUC57	-	-	+	-
		pCOLD I	N und C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	+	-
		pPIC9	C	<i>K. phaffii</i> SMD1168	-	-
EIW51569	Metallopeptidase M36	pPIC9	N	<i>K. phaffii</i> SMD1168	+	-
		pUC57	-	-	+	-
		pCOLD I	N	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	+	Ni ²⁺ -NTA
EIW59803	Serinpeptidase S53	pPIC9	C	<i>K. phaffii</i> SMD1168	+	-
		pUC57	-	-	+	-
EIW62196	Metallopeptidase M35	pCOLD I	N	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	+	Ni ²⁺ -NTA
		pUC57	-	-	+	-
EIW61562	Serinpeptidase S28	pPIC9	C	<i>K. phaffii</i> SMD1168	+	-
		pUC57	-	-	+	-
EIW61051	Serinpeptidase S53	pUC57	-	-	+	-

<i>T. versicolor</i> <i>Accession number</i>	Homologie zu	Vektor	His-Tag	Expressionssystem	Signalpeptid	Reinigung
EIW61376	Tripeptidyl-Peptidase A S53	pUC57	-	-	+	-
EIW63301	Aspartatpeptidase A01	-	-	-	+	-
EIW65216	Serinpeptidase S28	-	-	-	+	-
XP_008043737	Serinpeptidase S41	-	-	-	+	-

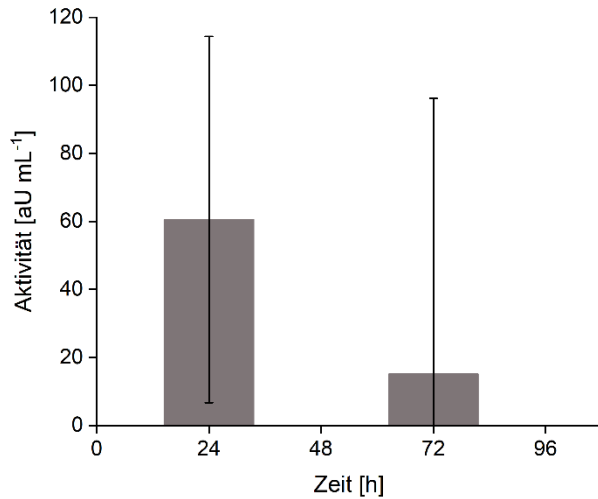


Abbildung A4: Ergebnisse des Azocaseinassays nach Ergebnisse der Negativkontrolle in *K. phaffii* (pPIC9-Leervektor) (n=3).

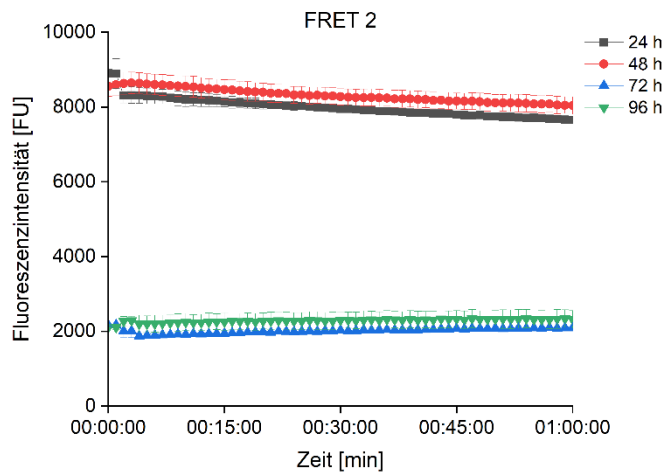
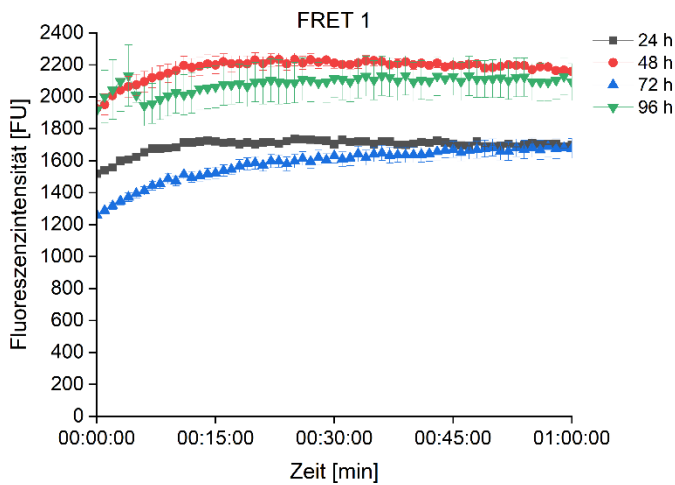


Abbildung A5: Ergebnisse des FRET-Assays nach Expression der Negativkontrolle (pPIC9-Leervektor) in *K. phaffii* (n=2).

8.3.2. *Phanerochaete chrysosporium*Tabelle A2: Klonierung und Expression verschiedener Peptidasegene aus *Phanerochaete chrysosporium*. N: N-Terminus. C: C-Terminus.

<i>P. chrysosporium</i> Accession number	Homologie zu	Vektor	His-Tag	Expressionssystem	Signalpeptid	Reinigung
ABB73029		pUC57	-	-	+	-
		pCOLD I	N	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	+	-
	Serinpeptidase S53	pET28a (+)	-	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	+	SEC
		pPIC9	N	<i>K. phaffii</i> SMD1168	+	SEC/ Ni ²⁺ -NTA
		pPIC9	C	<i>K. phaffii</i> SMD1168	-	SEC/ Ni ²⁺ -NTA
ABB73029	Serinpeptidase S53	pPIC9	-	<i>K. phaffii</i> SMD1168	+	SEC
ABB73030		pUC57	-	-	+	-
	Aspartatpeptidase A01	pPIC9	C	<i>K. phaffii</i> SMD1168	+	SEC/ Ni ²⁺ -NTA
		pPIC9	-	<i>K. phaffii</i> SMD1168	+	-

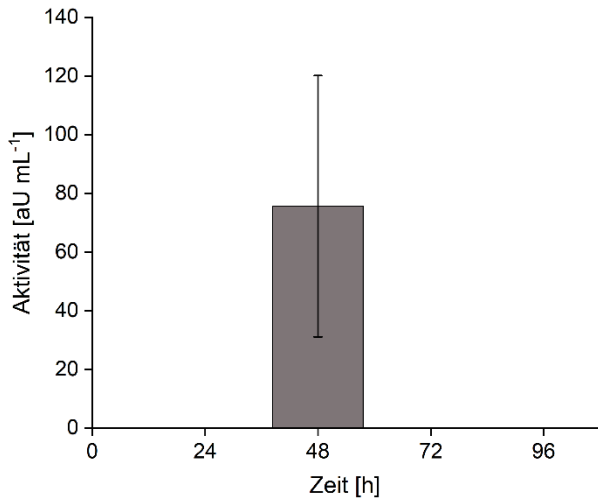


Abbildung A6: Ergebnisse des Azocaseinassays nach Expression der Negativkontrolle (pCOLD-Leervektor) in *K. phaffii* (n=3).

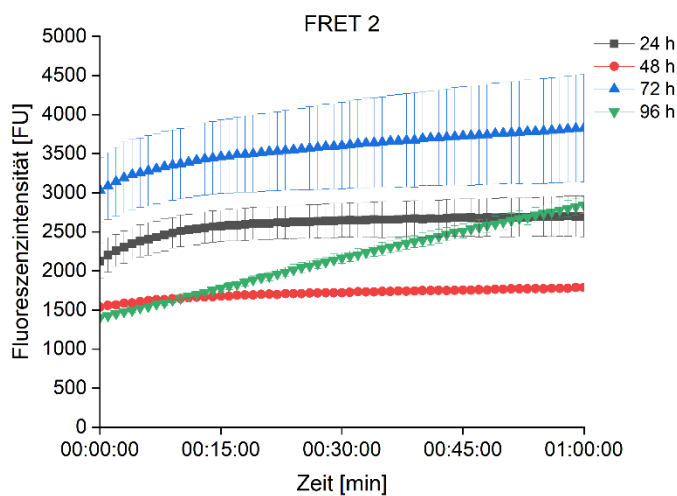
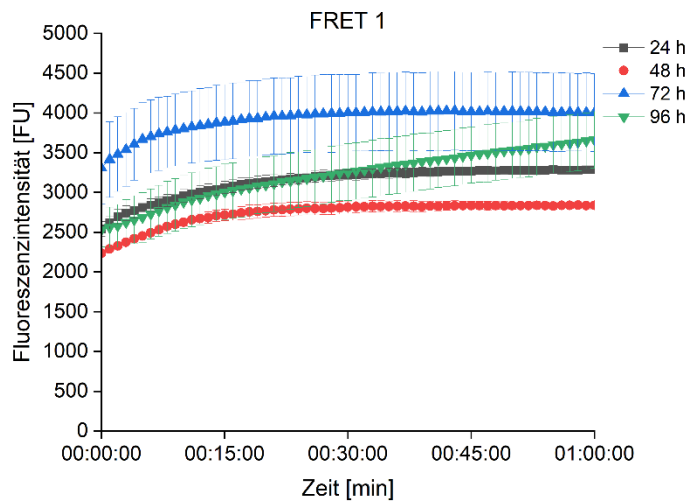


Abbildung A7: Ergebnisse des FRET-Assays nach Expression Negativkontrolle (pCOLD-Leervektor) in *K. phaffii* (n=2).

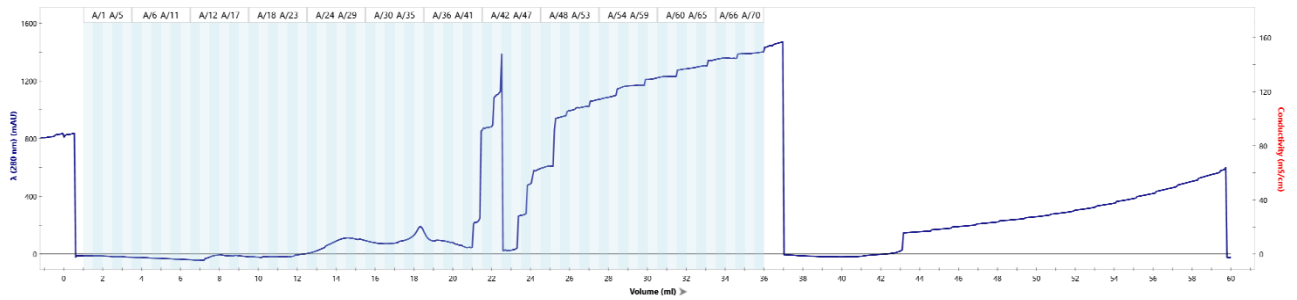


Abbildung A8: Chromatogramm nach Reinigung des Kulturüberstandes der Serineptidase aus Pch (ABB73029) mittels FPLC-basierter SEC.

8.4. Peptidase Screening

8.4.1. FRET-Assay

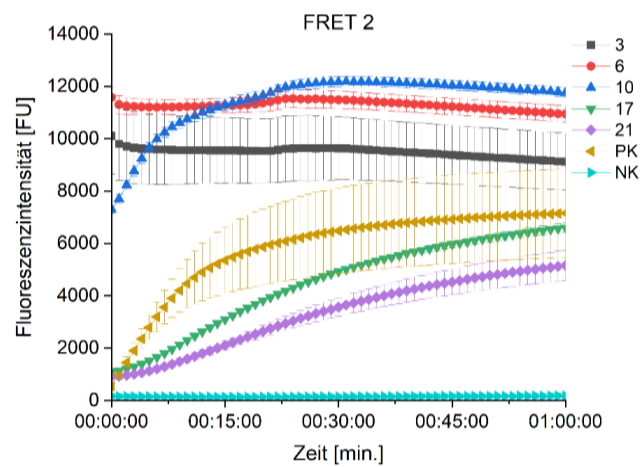
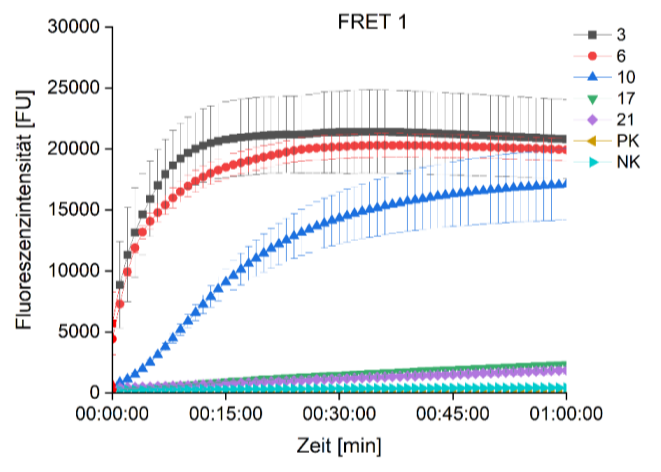


Abbildung A9: Ergebnisse des FRET-Assays von *A. aegerita* (Aae). Es wurde der Kulturüberstand an verschiedenen Tagen getestet (Zahl). PK: Positivkontrolle (Glu-C). NK: Negativkontrolle (n=2).

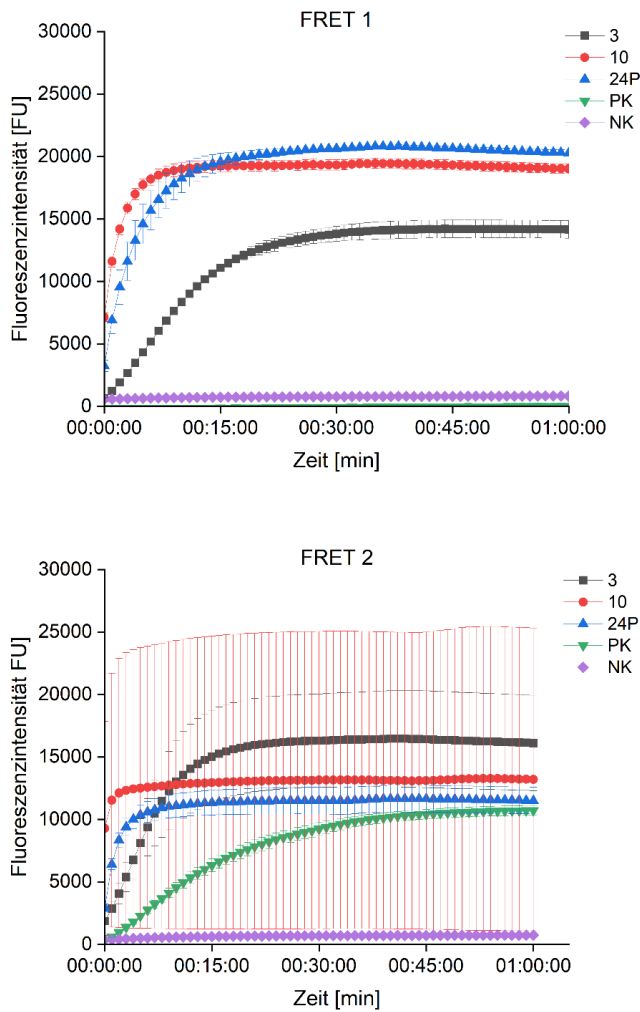


Abbildung A10: Ergebnisse des FRET-Assays von *F. pinicola* (Fpi). Es wurde der Kulturüberstand an verschiedenen Tagen getestet (Zahl). PK: Positivkontrolle (Glu-C). NK: Negativkontrolle. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24 (n=2).

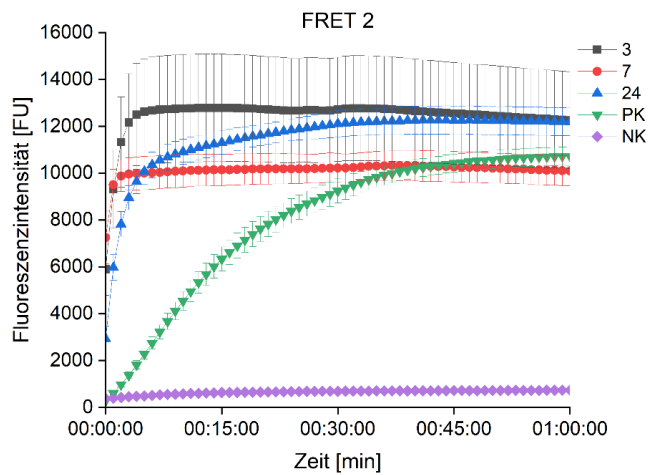
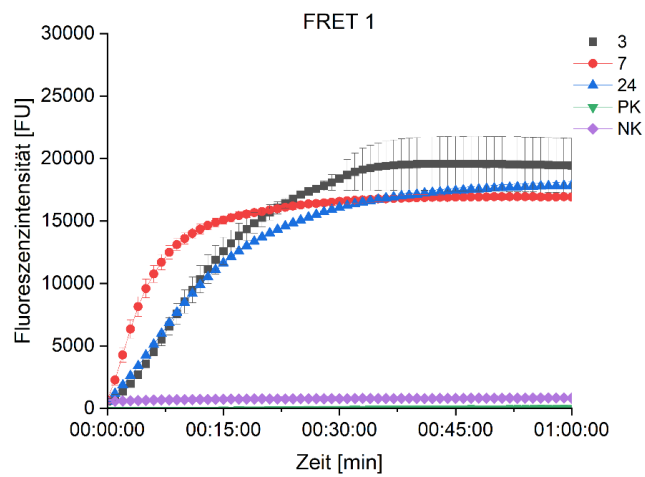


Abbildung A11: Ergebnisse des FRET-Assays von *F. velutipes* (Fve). Es wurde der Kulturüberstand an verschiedenen Tagen getestet (Zahl). PK: Positivkontrolle (Glu-C). NK: Negativkontrolle (n=2).

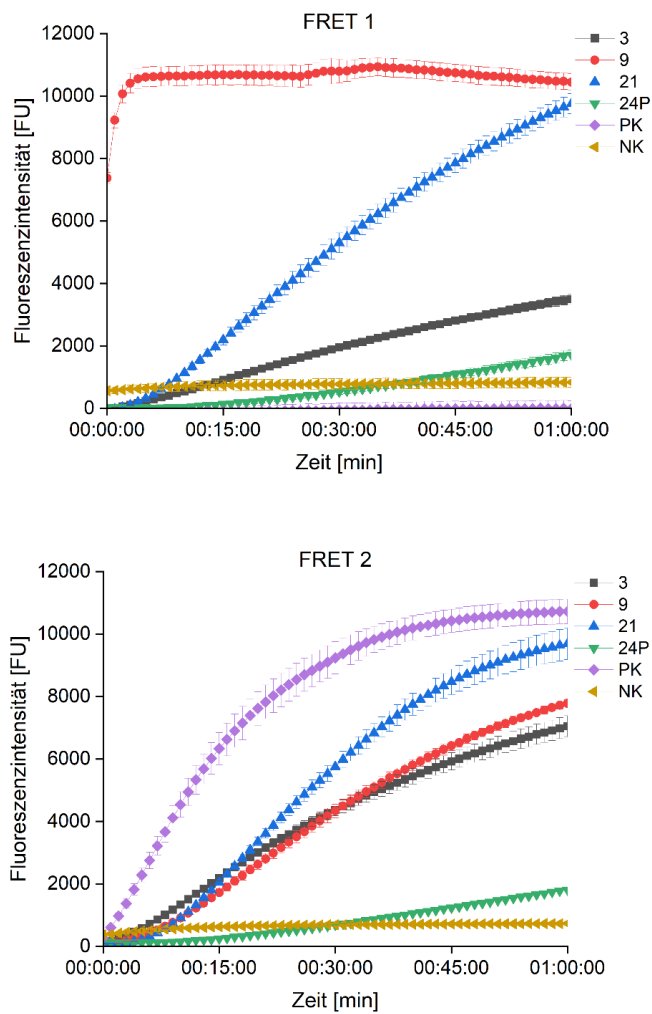


Abbildung A12: Ergebnisse des FRET-Assays von *H. sublateritium* (Hsu). Es wurde der Kulturüberstand an verschiedenen Tagen getestet (Zahl). PK: Positivkontrolle (Glu-C). NK: Negativkontrolle. 24P: lysiertes Pellet an Tag 24 (n=2).

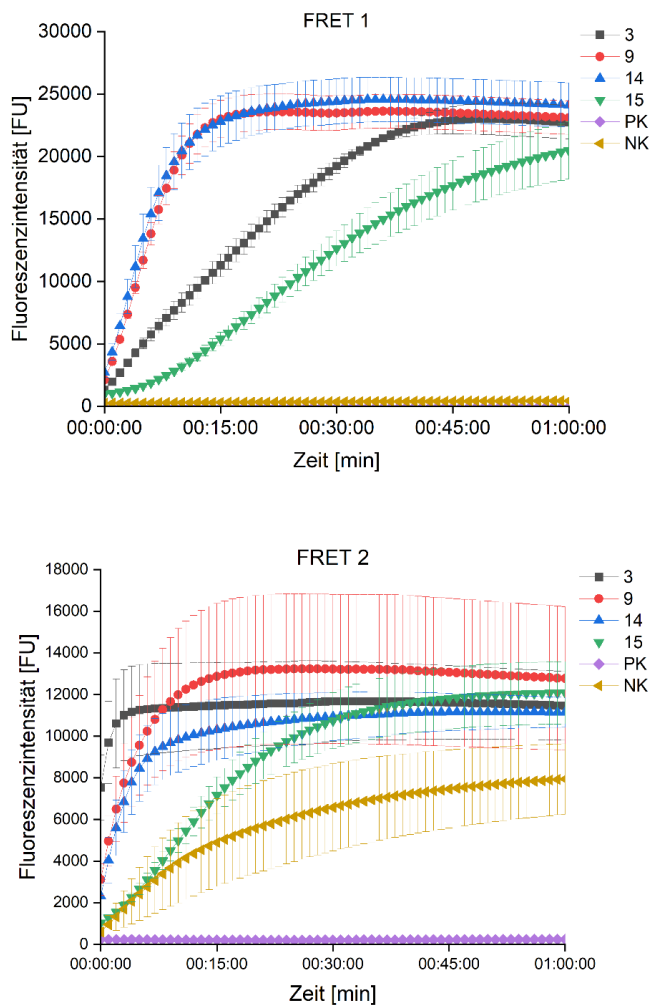


Abbildung A13: Ergebnisse des FRET-Assays von *P. eryngii* (Per). Es wurde der Kulturüberstand an verschiedenen Tagen verwendet (Zahl). PK: Positivkontrolle (Glu-C). NK: Negativkontrolle (n=2).

8.4.2. Größenausschlusschromatographie (SEC)

Unterfraktionen, die keinerlei Peptidaseaktivität zeigten, werden in den entsprechenden Abbildungen (Abbildung A14 bis Abbildung A23) nicht dargestellt.

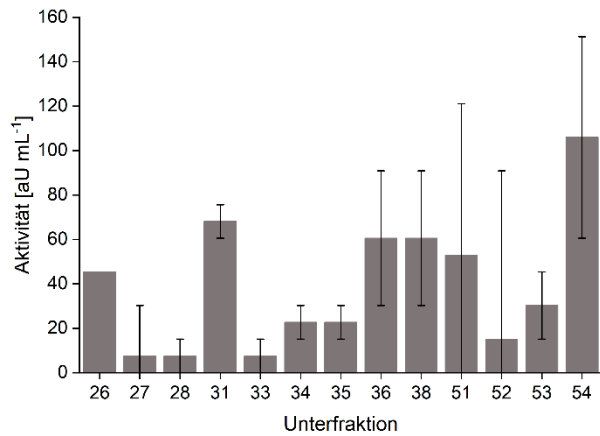


Abbildung A14: Ergebnisse des Azocaseinassays der einzelnen, aktiven Unterfraktionen (26 - 40, 51 - 55) nach Reinigung des Kulturüberstandes (Tag 10) von *A. aegerita* (Aae) mittels FPLC-basierter SEC (n=2).

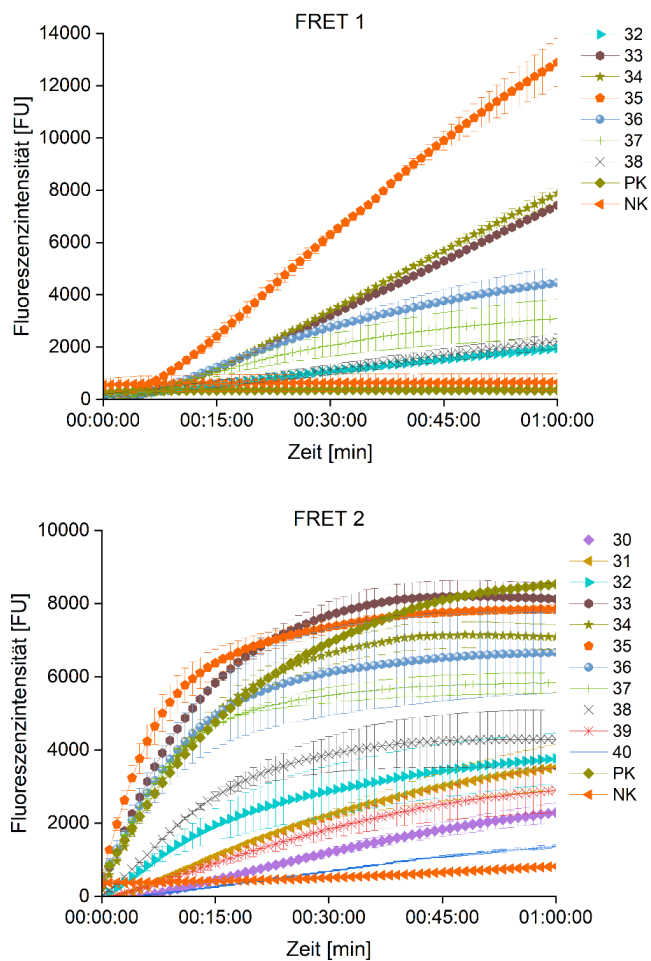


Abbildung A15: Ergebnisse des FRET-Assays der einzelnen, aktiven Unterfraktionen (26 - 40, 51 - 55) nach Reinigung des Kulturüberstandes (Tag 10) von *A. aegerita* (Aae) mittels FPLC-basierter SEC. PK: Positivkontrolle (Glu-C). NK: Negativkontrolle (n=2).

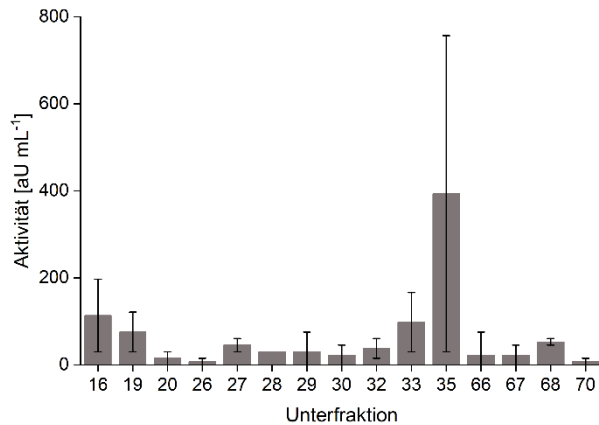


Abbildung A16: Ergebnisse des Azocaseinassays der einzelnen aktiven Unterfraktionen (16 - 20, 26 - 35, 66 - 70) nach Reinigung des lysierten Pellets (Tag 24) von *F. pinicola* (Fpi) mittels FPLC-basierter SEC (n=2).

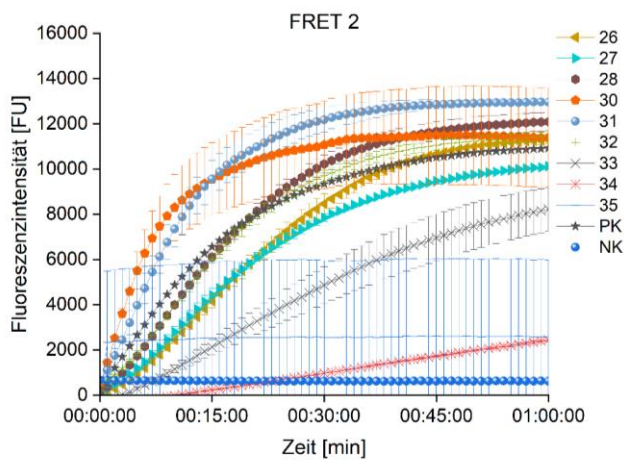
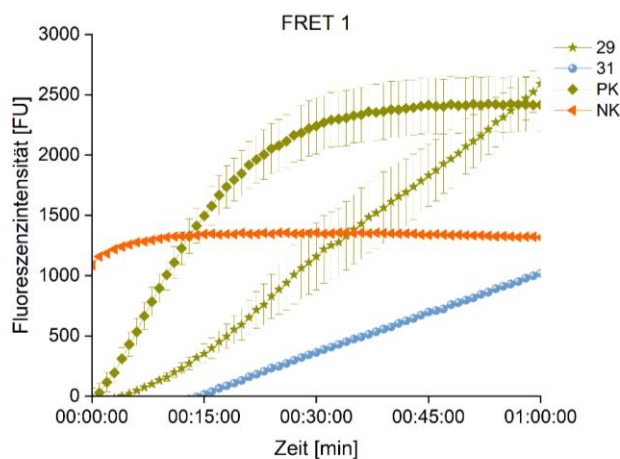


Abbildung A17: Ergebnisse des FRET-Assays der einzelnen aktiven Unterfraktionen (16 - 20, 26 - 35, 66 - 70) nach Reinigung des lysierten Pellets (Tag 24) von *F. pinicola* (Fpi) mittels FPLC-basierter SEC. PK: Positivkontrolle (Glu-C). NK: Negativkontrolle (n=2).

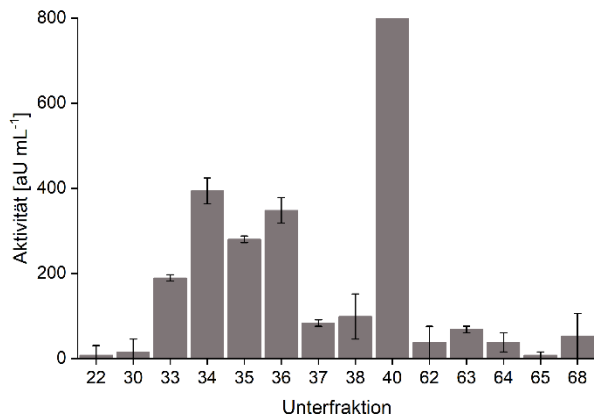


Abbildung A18: Ergebnisse des Azocaseinassays der einzelnen aktiven Unterfraktionen (21 - 40, 61 - 70) nach Reinigung des Kulturüberstandes (Tag 7) von *F. velutipes* (Fve) mittels FPLC-basierter SEC (n=2).

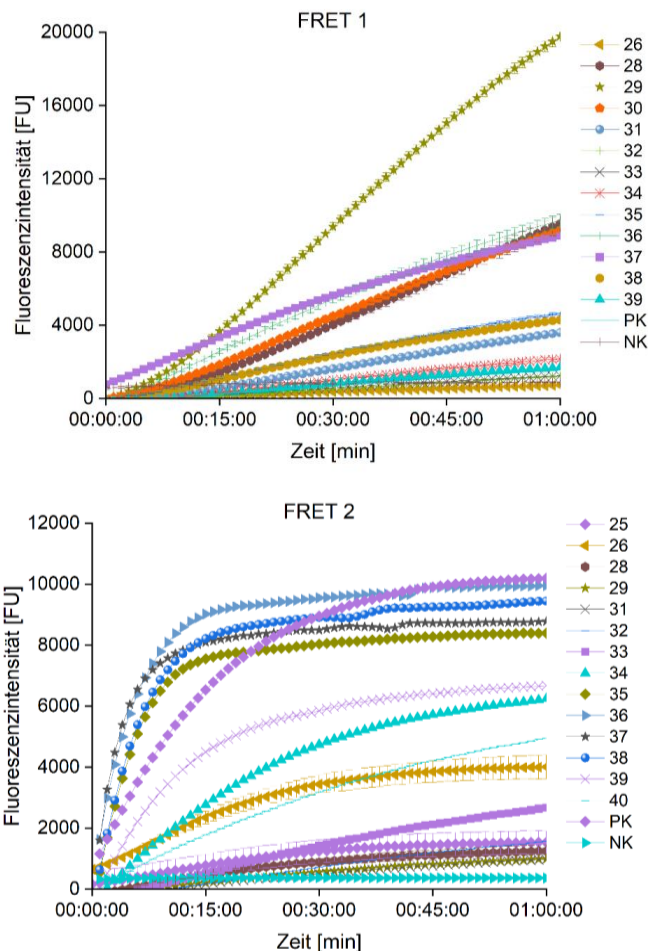


Abbildung A19: Ergebnisse des FRET-Assays der einzelnen aktiven Unterfraktionen (21 - 40, 61 - 70) nach Reinigung des Kulturüberstandes (Tag 7) von *F. velutipes* (Fve) mittels FPLC-basierter SEC. PK: Positivkontrolle (Glu-C). NK: Negativkontrolle (n=2).

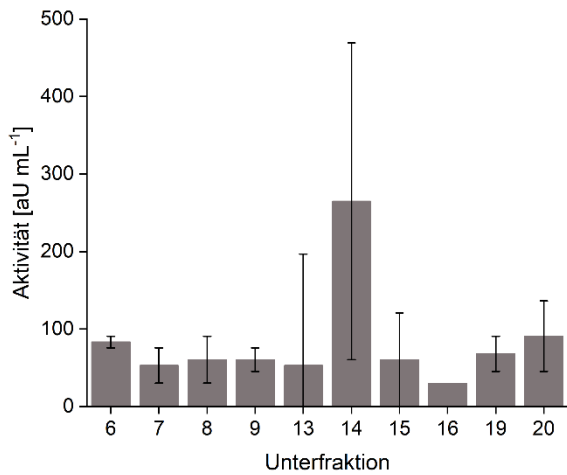


Abbildung A20: Ergebnisse des Azocaseinassays der einzelnen aktiven Unterfraktionen (1 - 20) nach Reinigung des Kulturüberstandes (Tag 21) von *H. sublateritium* (Hsu) mittels FPLC-basierter SEC (n=2).

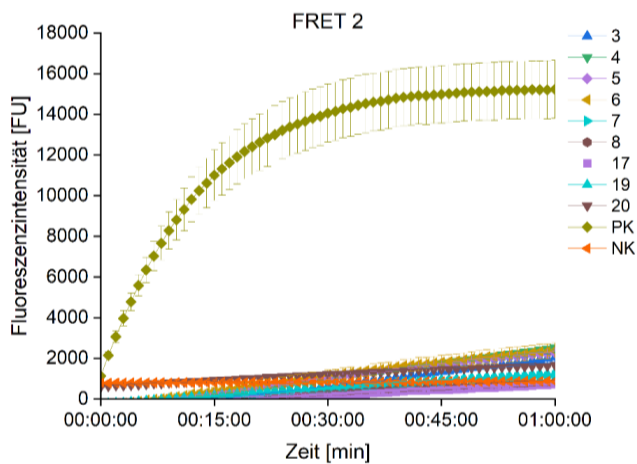
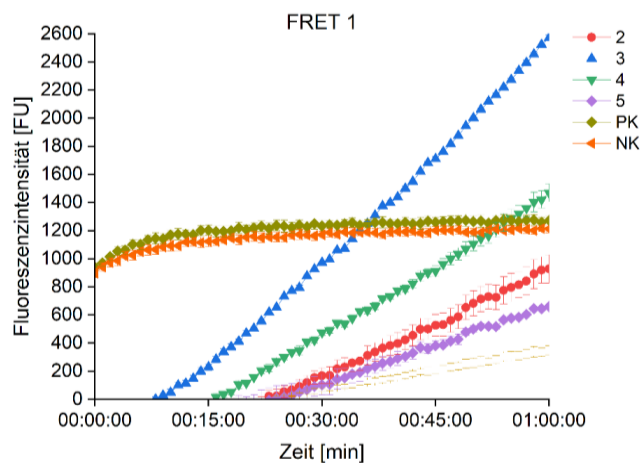


Abbildung A21: Ergebnisse des FRET-Assays der einzelnen aktiven Unterfraktionen (1 - 20) nach Reinigung des Kulturüberstandes (Tag 21) von *H. sublateritium* (Hsu) mittels FPLC-basierter SEC. PK: Positivkontrolle (Glu-C). NK: Negativkontrolle (n=2).

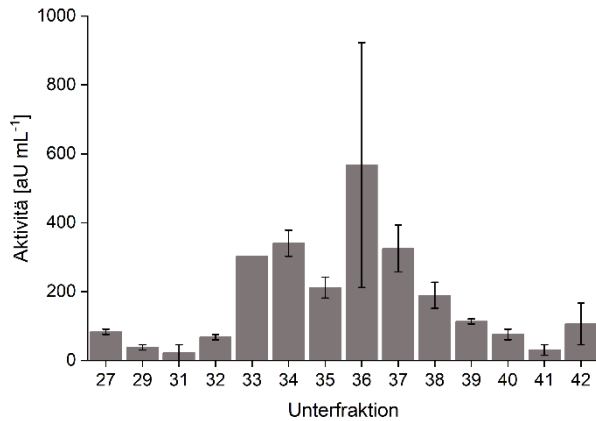


Abbildung A22: Ergebnisse des Azocaseinassays der einzelnen aktiven Unterfraktionen (26 - 45, 61 - 65) nach Reinigung des Kulturüberstandes (Tag 3) von *P. eryngii* (Per) mittels FPLC-basierter SEC (n=2).

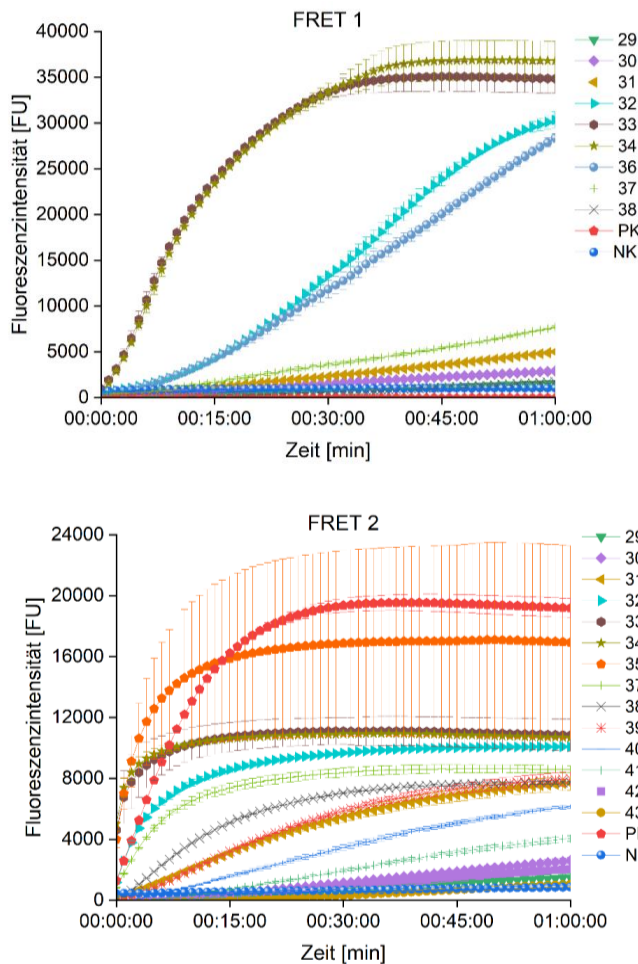


Abbildung A23: Ergebnisse des FRET-Assays der einzelnen aktiven Unterfraktionen (26 - 45, 61 - 65) nach Reinigung des Kulturüberstandes (Tag 3) von *P. eryngii* (Per) mittels FPLC-basierter SEC. PK: Positivkontrolle (Glu-C). NK: Negativkontrolle (n=2).

8.5. Dipeptidylpeptidase

MGAFRWLSIAAAASTALALTPEQLITAPRRSEAI PDPGKVAVFSTSQYSFETHKRTSWWSLLDLKTGQTKVL
 TNDSSVSEIVWLSDDSI LYVNSTNADI PGGVELWVTQASSFAKGYKAASLPASFGLKAAKTKSGDIRFVAYG
 QSYPNGTAYNEELATAPLSSARIYDSIYVRHWDYWLSTTFNAVFSGLTKKGHGKNGYSLDGELKNLVSPVKNA
 ESPYPPFGGASDYDLSPDGKWWAFKSKAPEL PKANFTTSYIYLVPHDASETARPINGPDS PGTPKGIKGDSSS
 PVFSPNGDKLAYFQMRDETYESDRRVLYVYSLGSKKTI PSVAGDWRSPDSVKWTPDGKTLIVGSEDLGRTRL
 FSLPANAKDDYKPKNFTDGGSVSAYYFLPDSLLVTGSALWTNWNVYTAKPEKGVIKKIASANEIDPELKGGLG
 PSDISEFYFQGNFTDIHAWVIYPENFDKSKKYPLIFFIHGGPQGNWADGWSTRWNPKAWADQGYVVVAPNPTG
 STGFGQALTDAIQNNWGGAPYDDLKVCWEYVHENLDYVDTDHGVAAGASYGGFMINWIQGSPLGRKFKALVSH
 DGTFFVADAKVSTEELWFMQREFNGTFWDARDNYRRWDPSAPERILQFATPMLVIHSDKDYRLPVAEGLSLFNV
 LQERGVPSRFLNFPDENHWVNPENSLVWHQQALGWINKYSGVEKSNPNAVSLEDTVVPVNYN

Abbildung A24: Sequenz der DPPV aus *A. fumigatus* (Accession number: B0XRV0).

Pf1DPPV	MRFSLPLLGLATQVPLQSP LRSATQQPMQQPSALNDVYNFN SPPDFVFKEAADIMSPKDM	60
AoDppF	-----MTIRPMKFTPEVL	13
AfDPPV	-----MGAFRWLS--IAAAASTALALTPEQL	24
AoDPPV	-----MGALRWLS--IAATASTALALNPEGL	24
AoDppE	-----MGALRWLS--IAATASTALALNPEGL	24
	:.*: :	
Pf1DPPV	IELQRPGQGVANLAGELVLVPTSKYSFSEKKNKKS VVISPLESVVEPLEIPLPDGGEVFW	120
AoDppF	LGAPRRSAAVPNSSGTLAVYTQTSYSFESHAKTSEIRVLDIT TGRSSLITNDPSASSPQW	73
AfDPPV	ITAPRRSEAI PDPGKVAVFSTSQYSFETHKRTSWWSLLDLKTGQTKVLTNDSSVSEIVW	84
AoDPPV	ISAPRRSEAI PNPSGDVAVFSQSQYSFKTHKTT SQWNVLDLKS GDIKLLTNDSDVSEIVW	84
AoDppE	ISAPRRSEAI PNPSGDVAVFSQSQYSFKTHKTT SQWNVLDLKS GDIKLLTNDSDVSEIVW	84
	: * . . : : : * : : . : * * * . : . . : : : : . . . *	
Pf1DPPV	LDPR TIAHAVPVESEKKINIYAI PLEFKHKADDFAGVLR TESAPI LLSIPTTSASNFY	180
AoDppF	LGND DRLIWLKTKA-----NGNTSFIVGHAREAGKTYTAGT-----VPGPV-ANLKV	119
AfDPPV	LSD--DSILYVNSTNADI--PGGVELWVTQASSFAKGYKAAS-----LPASF-SGLKA	132
AoDPPV	LGSD DSTVLYVNGTNADI--PGGVELWVSDI SDFANGYKAAS-----LPASF-SGFKV	134
AoDppE	LGSD DSTVLYVNGTNADI--PGGVELWVSDI SDFANGYKAAS-----LPASF-SGFKV	134
	*. : . . . : : : * : : :	
Pf1DPPV	-TLVPGILVFS DY--VYANGNLS DSRRLDEAWENRGTSALVYDATYERHWD TWVTPKKLS	237
AoDppF	TVIESGKIGFAVTGKANPDGSLH----NPQDAKKPHTTGR LYS SLYVRHWD SYIEPQTNS	175
AfDPPV	AKTKSGDIRFVAYGQSY PNGTAY----NEELATAPLSSARIYDSIYVRHWDYWLSTTFNA	188
AoDPPV	VTTDSGDVRYVAYAESWANGTAY----NEELVAKPLSSARIYDSIYVRHWDY YLTTRENA	190
AoDppE	VTTDSGDVRYVAYAESWANGTAY----NEELVAKPLSSARIYDSIYVRHWDY YLTTRENA	190
	* : : : * . : : . : * : : * * * * : : :	

Pf1DPPV	LFSVRLFKDPDHK-----WNFDGTFINLL---KGTSHSSPVEPFGGTDDFDISHSHLV-	287
AoDppF	IWYGLLQQAPLTPATRHAQKYSTSALTNLISVCGLTGVEPIPPFGGSGDFDISPSAIVF	235
AfDPPV	VFSGTLKKG--HG---KNGYSLDGELKKNLV--SPVKNAESPYPPFGGASDYDLSPDGKVV	241
AoDPPV	VFSGTLKKGSEKGG---KATYKADGDLKKNLV--SPVKNAESPYPPFGGASDYDLSPDGKVV	245
AoDppE	VFSGTLKKGSEKGG---KATYKADGDLKKNLV--SPVKNAESPYPPFGGASDYDLSPDGKVV	245
	: : * : . : **: .. .** *****:.*:*:*	
Pf1DPPV	-YTTKDPELPEAWHTKQNVYVVDLQNQ-----HQRKELTSQQGAIHSPVFNLEGNK	338
AoDppF	V--AKDPNENPATHTSCSCYCPMFSWTS-VTAMESQKIYAVKGLQGAMSSPVLSSDGSS	292
AfDPPV	AFKSKAPELPMANFTTSYIYLPHDASETARPINGPDSPGTPKGIKGDSSSPVFPNGDK	301
AoDPPV	AFKSKAHDIPRANYTTAYIFLVPHDGSKTAVPINGPDSPGTPEGVKGDAGSPVFPDSSK	305
AoDppE	AFKSKAHDIPRANYTTAYIFLVPHDGSKTAVPINGPDSPGTPEGVKGDAGSPVFPDSSK	305
	:* : * *. : : . * :* ***: . : . . .	
Pf1DPPV	VAWLELDKDGYESDRAKIV-IYDLNKGV-----RFTVTQDWDRSPDKLAFSKEGNFLYF	391
AoDppF	IALLAMREDGYESDKNRIYVNPWPWSEMGIEAFASPDGEGLWHLSPSAVTFANDDQSLLV	352
AfDPPV	LAYFQMRDETYESDRR-VLYVYSLGSKKT-----IPSVAGDWDRSPDSVKWTPDGKTLIV	355
AoDPPV	IAYWQMADES YEADHR-TLYVYTVGSEET-----IPSLAADWDRSLDSVKWADD-DNLII	358
AoDppE	IAYWQMADES YEADHR-TLYVYTVGSEET-----IPSLAADWDRSLDSVKWADD-DNLII	358
	:* : . : **:*: : : . * . * . : : : . * .	
Pf1DPPV	TAGDEAKVKVYVLPVPPTPSASTTHPKLDKKYTTPIPLTHS--AAASGLQTLFTGRLIFT	449
AoDppF	QVEENGRGVLYQLPIANFRHS---RPSALKKLTHSGYVTDVFPASANSKLLVASNSLVE	409
AfDPPV	GSEDLGRTRLFSLPANAKDDY---KPKN---FTDGGSVSAYYFLP--DSSLVTGSAWLT	407
AoDPPV	GVEDAGRSRLFSIPADAGDDY---KPKN---FTDGGVVSAYYQLP--DSTYLVTSTAIWT	410
AoDppE	GVEDAGRSRLFSIPADAGDDY---KPKN---FTDGGVVSAYYQLP--DSTYLVTSTAIWT	410
	: . : : :* :* . * : : . * . . : :	
Pf1DPPV	RSSFTSPNNVFIIRGLKRFETELEQSDSSLQFSGVVEQVTR--FNENELQGKNLSEGEFF	507
AoDppF	NSRW----TI--IDPQ-----SPESPKVISSLRGGAAFGLSPAQVDEI	447
AfDPPV	--NW----NVYTAKPE-----KGVIKKIASANEIDPELKGGLGSPDISEF	445
AoDPPV	--SW----NVYIASPE-----KGVIKTLATANKIDPELKGGLGPEIVDEF	448
AoDppE	--SW----NVYIASPE-----KGVIKTLATANKIDPELKGGLGPEIVDEF	448
	: . : . : * . * :	
Pf1DPPV	WFTGAEDKKVQGWVLKPKGFKAGEEKKWPAVLLIHGGPQGAWEDQWSTRWNPVFAAQGY	567
AoDppF	WFRGAKDHPVHAWVVKPSDFKPG--NKYPLAYLIHGGPQGAWNDQWSTRWNPVFAEQGY	505
AfDPPV	YFQGNF-TDIHAWVIYPENFDKS--KYPPLIFFIHGGPQGNWADGWSTRWNPKAWADQGY	502
AoDPPV	YYEGNW-TKIQAQFVIYPENFDKS--KSYPLLYYIHGGPQSSWLDSWSTRWNPKVFAAQGY	505
AoDppE	YYEGNW-TKIQAQFVIYPENFDKS--KSYPLLYYIHGGPQSSWLDSWSTRWNPKVFAAQGY	505
	: : * : : : * : * . * . : : * * * * * * . * * * * * * . : * * * *	

PfIDPPV	VTVMINPTGSTTFGQEFTDAIAEDWGGKPFVDMQAGWKYILEQVPEIDPERAVAA	GASWG	627
AoDppF	VVITPNPTGSTGYGQAFDTAIRGSWGLPYIDLEKGLDYIEKNLDYVDTTRAVAI	GASFG	565
AfDPPV	VVVA PNPTGSTGFGQALTD AIQNNWGGAPYDDL VKWEYVHENLDYVDTDHGVAA	GASYG	562
AoDPPV	VVVA PNPTGSSSGFGDALQDAIQNWGGYPYEDLVKGWEYVNNENFDFIDTDNGVAA	GASYG	565
AoDppE	VVVA PNPTGSSSGFGDALQDAIQNWGGYPYEDLVKGWEYVNNENFDFIDTDNGVAA	GASYG	565
*.: *****: :*: : *** .*** *: *: .*: :. :* ..** ***:*			
PfIDPPV	GYAINWIQGHPEYGFNFKALVCHDGVFDATYNGYSTDELFFFNHEWGGRPWDKKTTLAE		687
AoDppF	GYMVNWIQGHE-LGRRFKALVTHDGI FSMR-SLLSTEELYFPVRDLQGPYWKVPENWDKW		623
AfDPPV	GFMINWIQGSP-LGRKFALVSHDGT FVAD-AKVSTEELWFMQREFNGTFWDARDNYRRW		620
AoDPPV	GFMINWIQGS-D-LGRKFALVSHDGT FVAD-AKVSTEELWFMQHEFNGTFWDNRENYRRW		623
AoDppE	GFMINWIQGS-D-LGRKFALVSHDGT FVAD-AKVSTEELWFMQHEFNGTFWDNRENYRRW		623
*: :***** * .***** *** * **:***:~ :~ * * . :			
PfIDPPV	LMSPSNFVHQWSTPQLIIHGSKDYRLPETEGIGAFHALLQREVPTRLVIFPDEN	HVVLNH	747
AoDppF	DPSRFT--GNWQTPHLVIHNELDYRLTIAEGLA AFNVLQMRGVDSQFLTFPDEN	HVVLNH	681
AfDPPV	DPSAPERILQFATPMLVIHSDKDYRLPVAEGLS LFNVLQERGVPSRFLNFPDEN	HVVVNP	680
AoDPPV	DPSAPERILKFSTPMLIIHSDLDYRLPVSEGLS LFNILQERGVPSRFLNFPDEN	HVVQNK	683
AoDppE	DPSAPERILKFSTPMLIIHSDLDYRLPVSEGLS LFNILQERGVPSRFLNFPDEN	HVVQNK	683
* :~ ** *:*~. ***** :*~. *: * * * :~:~ ***** *			
PfIDPPV	LNSLKWHEYVFRWFDKVFGEKE*-----		769
AoDppF	ENSLMWHRTIFNFINKYVGLPSESRADLENGVANMSL*----		718
AfDPPV	ENSLVWHQQALGWINKYSGVEKSNPNAVSL EDTVVPVNYN-		721
AoDPPV	ENSLVWHQQVLGWLNKYSGVEESNEDAVSLDDTVIPVVDYNP		725
AoDppE	ENSLVWHQ-VLGWLNKYSGVEESNEDAVSLDNTVIPVVDYNP		724
*** ** : :~*~: * .			

Abbildung A25: Alignment des hypothetischen Proteins (OK624782) von *P. floridanus* und anderen DPP. AfDPPV (B0XRV0; 35,20 % Identität zur PfIDPPV) aus *A. fumigatus*, AoDPPV (AAD41777; 34,02 % Identität zur PfIDPPV) aus *A. oryzae*, AoDppE (AO070340000111; 34,07 % Identität zur PfIDPPV) und AoDppF (AO090005000697; 33,98 % Identität zur PfIDPPV) aus *A. oryzae*. Sternchen kennzeichnen konservierte Bereiche, Kommata gleiche Aminosäurereste und Punkte teilweise Übereinstimmungen. Schwarze Box: GX SXG Motiv. Das Alignment wurde mit Clustal Omega (European Bioinformatics Institute, Hinxton, UK) erstellt.

Tabelle A3: Effekt verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität der PfIDPPV. Die Aktivität wurde mit dem Substrat H-Ala-Ala-pNA bei pH 8,5 und 37°C überprüft. Relative Aktivität [%] der Kontrolle (-) wurde als 100 % definiert.

Inhibitor	inhibierte Peptidaseklasse	Konzentration [μ M]	relative PfIDPPV Aktivität [%]
Pefabloc	Serin	1	140 \pm 12,72
		5	112,62 \pm 2,24
Bestatin	Amino	100	95 \pm 7,14
		200	97,75 \pm 2,24
E-64	Cystein	10	90,16 \pm 22,40
		50	72,77 \pm 4,64
Antipain	Serin/Cystein	6,3	119,75 \pm 16,84
		86	64,75 \pm 39,05
Chymostatin	Cystein	1	101,41 \pm 2,39
		5	92,59 \pm 4,92
Pepstatin A	Aspartat	5	82,52 \pm 12,63
		25	75,40 \pm 1,77
EDTA	Metallo	1	93,50 \pm 6,06
		10	94,76 \pm 1,66
Aprotinin	Serin	1	75,10 \pm 20,63
		10	66,34 \pm 8,59
PMSF	Serin	1	88,24 \pm 10,89
		10	106,95 \pm 5,58

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Kirsten Vorwerk
14.12.1992, Soltau

SCHULBILDUNG

1999 – 2003	Grundschule	Grundschule am Pietzmoor, Schneverdingen
2003 – 2004	Orientierungsstufe	Kooperative Gesamtschule, Schneverdingen
2004 – 2011	Gymnasialzweig	Kooperative Gesamtschule, Schneverdingen Abschluss: Abitur Prüfungsfächer: Biologie, Chemie, Mathe, Deutsch, Geschichte

STUDIUM

10/2019 – 09/2015	Bachelor	B. Sc. Biowissenschaften Westfälische Wilhelms Universität Münster Abschluss: Bachelor of Science Abschlussarbeit: "Comparative investigation of <i>G. pulex</i> populations from a freshwater and a saline creek (Teutoburg forest)"
10/2015 – 11/2017	Master	M. Sc. Biowissenschaften Westfälische Wilhelms Universität Münster Abschluss: Master of Science Abschlussarbeit: "Functional characterisation of enzymes involved in triterpene biosynthesis, and analysis of the rubber and inulin metabolism under different cultivation conditions in <i>Taraxacum koksaghyz</i> "
03/2018 – 12/2021	Wissenschaftliche Mitarbeiterin	Institut für Lebensmittelchemie Leibniz Universität Hannover
seit 03/2018	Promotionsvorhaben	Institut für Lebensmittelchemie Leibniz Universität Hannover