

Identifizierung und Charakterisierung
carotinoidabbauender Enzyme aus
Basidiomyceten

Der naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Assessorin des Lehramtes an Gymnasien Manuela Scheibner
geboren am 8. Juni 1969 in Marne

Hannover 2006

Referent: Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger

Korreferent: PD Dr. Holger Zorn

Tag der Promotion: 27.07.06

für meine Eltern und Großeltern

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

Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover

Manuela Scheibner

Veröffentlichungen

O. Barckhausen, M. Scheibner, W. Oehlmann, H. Follmann und G. Auling:
Manganese containing (class IV) ribonucleotide reductases in coryneform bacteria;
Poster, Jahrestagung der VAAM 2001

Olga E. Zhrebilo, Nataliya Kucheryava, Rostislav I. Gvodyak, Daniela Ziegler,
Manuela Scheibner and Georg Auling: Diversity of Polyamine Patterns in Soft Rot
Pathogens and Other Plant-Associated Members of the Enterobacteriaceae, System.
Appl. Microbiol. 24, 54-62 (2001)

Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Berger, R. G.: Cleavage of β,β -carotene to
flavor compounds by fungi; Appl. Microbiol. Biotechnol. 62(4), 331-336 (2003)

Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimtz, M., Berger, R. G.: A peroxidase of *L.*
irina cleaves β,β -carotene to flavour compounds; Biol. Chem. 384(7), 1049-1056
(2003)

Scheibner, M., Zorn, H., Langhoff, S., Berger, R. G.: Blütendüfte aus dem
Knoblauchswindling; Lebensmittelchemie 58(4); 67-68 (2004)

Zorn, H., Scheibner, M., Langhoff, S., Berger, R. G.: Cleavage of carotenoids to
flavor compounds by fungal enzymes (Gordon Research Conference on
Carotenoids, Ventura, Californien) (2004)

Zorn, H., Scheibner, M., Hülsdau, B., Berger, R. G., de Boer, L., Meima, R. B.: Novel
enzymes for use in enzymatic bleaching of food products, Patent pending (2005)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2001 bis Mai 2005 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Berger und Herrn PD Dr. Holger Zorn für die Möglichkeit zur Promotion, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die stete Gesprächsbereitschaft, den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung des Themas und die wirklich hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut. Ferner gilt mein besonderer Dank für die zahlreichen anregenden Diskussionen, vielen guten Tips sowie die konstruktive Kritik beim Verfassen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis. Besonders bedanke ich mich bei meinen Laborkollegen Sabine Langhoff, Birgit Veddeler, Diana Linke und Bärbel Hülsdau für die besondere Form der Zusammenarbeit: anregende fachliche Diskussionen gepaart mit einer großen Portion Humor.

Frau Maike Takenberg danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den *Pichia*-Arbeiten.

Herrn Dr. Manfred Nimtz von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig danke ich für die Ansequenzierung der Proteine mittels ESI-MS/MS und Edman-Abbau.

Herrn Dr. Jochen Meens und Herrn Prof. Dr. Axel Brakhage ehemals Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover und ihrer Mitarbeiterin Sybille Traupe für die Durchführung zahlreicher DNA-Sequenzierungen.

Herrn Prof. Dr. Georg Auling vom Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover für die Bereitstellung des Elektroporators.

Danksagung

Frau Prof. Maria Jesus Martinez vom "Consejo superior de investigaciones cientificas" in Madrid für die Bereitstellung des Antikörpers gegen die polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*.

Herrn Georg Müller, dem Betreiber der Internetseite www.pilzepilze.de danke ich für die Bereitstellung des Bildes von *Marasmius scorodoni*.

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ohne die liebevolle Betreuung meiner Tochter Ann Kristin hätte ich nicht ruhigen Gewissens promovieren können. Von ganzem Herzen danke ich Familie Korf und Familie Gehrke für all das, was sie für uns getan haben. Familie Tönnies und Familie Onnen danke ich sehr herzlich dafür, dass sie immer sehr kurzfristig eingesprungen sind, wenn tatsächlich beide Tagesmütter ausfielen.

Meinen Eltern gilt ein besonderer Dank dafür, dass sie mich auf all meinen Wegen nach Kräften unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

Durch ihre einmalige Art hat meine Tochter Ann Kristin, die ich über Alles liebe, auf ihre Weise sehr zur Unterstützung dieser Promotion beigetragen.

Abschließend bedanke ich mich bei meinem Mann Olaf für seine Liebe und seinen Beistand während der gesamten Zeit. Ohne seine liebevolle Unterstützung bei Ann Kristins Betreuung hätte ich schwierigen Zeiten entgegen gesehen.

Zusammenfassung

In vorangegangenen Untersuchungen wurden mit *Pleurotus eryngii*, *Marasmius scorodonius*, *Ischnoderma benzoinum* und *Trametes versicolor* Pilze aus der Klasse der Basidiomyceten identifiziert, deren zellfreie Kulturüberstände zum Abbau von β,β -Carotin befähigt waren.

Im Kulturüberstand von *M. scorodonius* wurden zwei Enzyme (MsP1 und MsP2) identifiziert, die den Carotinoidabbau katalysieren. Zur Detektion der Enzymaktivität wurde ein photometrischer Test entwickelt und für die Isolierung und biochemische Charakterisierung der Enzyme eingesetzt. Mit Hilfe zweier chromatographischer Reinigungsschritte (Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie) wurden beide Enzyme mit Ausbeuten von > 50% rein dargestellt. MsP1 besitzt einen isoelektrischen Punkt (pI) von 3,7 und ein Molekulargewicht von 64,2 kDa. Das native Protein ist 513 Aminosäuren lang und beinhaltet am N-Terminus ein Exportsignal von 55 Aminosäuren Länge. Auf Grund von Sequenzhomologien zu einer ungewöhnlichen Peroxidase aus *Geotrichum candidum* (DyP) wurde MsP1 der Familie der DyP-ähnlichen Enzyme zugeordnet. MsP2 verfügt über einen pI von 3,5 und ein Molekulargewicht von 52,4 kDa. Es gehört der Gruppe der Proteine mit Häm-gebundenen Eisen an. Beide Enzyme liegen in der aktiven Form als Dimere vor.

Auf molekularer Ebene konnte eine polyvalente Peroxidase (VPL3) aus *Pleurotus eryngii* identifiziert werden. Das native Enzym ist 361 Aminosäuren lang und beinhaltet am N-Terminus ein Exportsignal von 30 Aminosäuren Länge. Zur heterologen Überexpression von VPL3 in *Pichia pastoris* GS115 wurden verschiedene Vektorkonstrukte mit und ohne Exportsignal hergestellt. Für nachfolgende Arbeiten stehen Klone aller Konstrukte mit unterschiedlicher Insertzahl zur Verfügung.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit drei Enzyme aus zwei verschiedenen Basidiomyceten auf Sequenzebene beschrieben werden. Die Enzyme gehören zwei unterschiedlichen Enzymfamilien an, die bisher nicht mit dem Abbau von Carotinoiden in Verbindung gebracht wurden.

Schlagworte: Carotinoidabbau, Basidiomycet, DyP

Abstract

In previous studies with *Pleurotus eryngii*, *Marasmius scorodoni*, *Ischnoderma benzoinum* and *Trametes versicolor*, fungi from the class of the basidiomycetes were found to degrade β,β -carotene to norisoprenoid flavour compounds.

From the culture supernatant of *M. scorodoni* two enzymes (MsP1 and MsP2) were isolated, which catalysed the oxidative degradation of β,β -carotene. For the detection of enzyme activity a photometric assay was developed and used for the isolation and biochemical characterization of the enzymes. By means of two chromatographic purification steps (ion exchange and gel filtration chromatography) both enzymes were enriched to electrophoretic homogeneity with yields of more than 50%. MsP1 shows an isoelectric point (pI) of 3.7 and a molecular weight of 64.2 kDa. The native protein consists of 513 amino acids and contains an export signal of 55 amino acids length at the *N*-terminus. Based on sequence homologies to an unusual peroxidase from *Geotrichum candidum* (DyP), MsP1 was assigned to the family of the DyP analogue enzymes. The pI of MsP2 is 3.5 and its molecular weight is 52.4 kDa. It was found to belong to the group of proteins with heme bound iron. Both enzymes are dimers in their active form.

A polyvalent peroxidase (VPL3) from *Pleurotus eryngii* was identified on the molecular level. The native enzyme consists of 361 amino acids and contains a *N*-terminal export signal of 30 amino acids length. For the heterologous expression of VPL3 in *Pichia pastoris* GS115, various vector constructs with and without export signal were generated. For future studies clones of all constructs with differing insert numbers are available.

After all, three enzymes from two different basidiomycetes were described on sequence level in this work. These enzymes belong to two different enzyme families, which have not been described for carotene degradation before.

Key words: carotene degradation, basidiomycetes, DyP

Abkürzungen

AA/Bis	40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 :1)
ad	auffüllen auf
amp	Ampicillin
AOX	Alkoholoxidase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
b	Base(n)
BCIP	5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidin-Salz
bidest.	bidestilliert
BisAA	N,N-Methylen-bisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CCD	9,10-Dioxygenase
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ER	endoplasmatisches Retikulum
G418	Geneticindisulfat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k.A.	keine Angabe
KAc	Kaliumacetat
konz.	konzentriert
λ DNA	DNA oder cDNA aus dem λ -Phagen
LB	Luria Bertani
LiP	Lignin-Peroxidase
LIR	<i>Lepista irina</i>
LOX	Lipoxygenase
MCS	Multiple Cloning Site
MnP	Mangan-Peroxidase
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure

Abkürzungen

mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MSC	<i>Marasmius scorodonius</i>
MWCO	„molecular weight cut-off“ (Größenausschluss)
NaAc	Natriumacetat
NBT	4-Nitroblautetrazolinumchlorid
NEB	New England Biolabs
NECD	<u>9</u> -(Z)- <u>E</u> poxy- <u>C</u> arotinoid- <u>D</u> ioxygenase
OD _x	optische Dichte der Zellen bei x nm
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pfu	„plaque forming units“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	single stranded
Std	Standard
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
tech.	technisch
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
ÜN	Übernachtskultur
UV	ultravioletter Wellenlängenbereich des Lichtes
VPL	polyvalente Peroxidase
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galaktosid
YNB	Yeast Nitrogen Base

Aminosäuren wurden nach dem internationalen Ein- oder Drei-Buchstaben-Code abgekürzt. Eine Zahl hinter der Bezeichnung kennzeichnet die Position der Aminosäure innerhalb des Proteins.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Unspezifische carotinoidspaltende Enzyme	2
1.2 Spezifische carotinoidspaltende Enzyme aus Pflanzen	2
1.2.1 9-(Z)-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenasen (NECD).....	2
1.2.2 9,10-Dioxygenasen.....	3
1.3 Spezifische carotinoidspaltende Enzyme aus Tieren	4
1.3.1 15,15'-Dioxygenasen.....	4
1.3.2 9,10-Dioxygenasen.....	5
1.4 Carotinoidspaltende Enzyme aus Mikroorganismen und Pilzen	5
1.4.1 Screening auf β,β -Carotin-abbauende Pilze.....	6
1.4.2 Die flüchtigen Abbauprodukte und ihre Bedeutung für die Aromaindustrie	8
1.5 Zielsetzung	10
2 Materialien und Methoden	11
2.1 Chemikalien	11
2.2 Organismen und Plasmide	13
2.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	14
2.3.1 Spurenelementlösung für SNL-Medium.....	14
2.3.2 Wässrige β,β -Carotin-Lösung	14
2.3.3 Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffer	14
2.3.4 Natriumacetatpuffer	15
2.3.5 50 x TAE-Puffer	15
2.3.6 1x TAE-Puffer	15
2.3.7 6x DNA-Auftragspuffer (Sambrook et al., 2001)	15
2.3.8 10x FA-Gel-Puffer	15
2.3.9 1x FA Gel-Puffer mit Formaldehyd	16
2.3.10 5x RNA Probenauftragspuffer	16
2.3.11 10x YNB	16
2.3.12 500x B (0,02% Biotin).....	16
2.3.13 100x H (0,4% Histidin).....	16
2.3.14 10x D (20% Glucose)	17
2.3.15 10x M (5% Methanol)	17
2.3.16 10x GY (10% Glycerol).....	17

Inhaltsverzeichnis

2.3.17 10x AA (0,5% jeder Aminosäure)	17
2.3.18 1 M Phosphat-Puffer pH 6	17
2.4 Wachstumsmedien	18
2.4.1 SNL-Standardmedium (Sprecher und Hanssen, 1982)	18
2.4.2 SNL-Agar	18
2.4.3 SNL- β , β -Carotin-Agar	18
2.4.4 LB-Medium (Miller) bzw. LB _{amp} -Medium	18
2.4.5 LB-Agarplatten bzw. LB _{amp} -Platten	19
2.4.6 SOC-Medium (Dower et al., 1988)	19
2.4.7 YPD-Medium	19
2.4.8 YPD-Agarplatten	20
2.4.9 YPD-Geneticin-Agarplatten	20
2.4.10 RD- bzw. RDH-Medium	21
2.4.11 RDB- bzw. RDHB-Agarplatten	21
2.4.12 RD- bzw. RDH-Top-Agarose	21
2.4.13 SOS-Medium	22
2.4.14 MD-Agarplatten	22
2.4.15 MM-Agarplatten	22
2.5 Anzuchtverfahren für <i>E. coli</i>	22
2.5.1 Stammhaltung von <i>E. coli</i> TOP 10F'	22
2.5.2 Stammhaltung von <i>E. coli</i> TOP 10F'-Kulturen mit Vektoren	23
2.5.3 Übernachtkulturen (ÜNs)	23
2.5.4 Glycerolkulturen von <i>E. coli</i>	23
2.6 Anzuchtverfahren für <i>Pichia pastoris</i> GS115	23
2.6.1 Stammhaltung von <i>Pichia pastoris</i> GS115	23
2.6.2 Stammhaltung der rekombinanten <i>Pichia pastoris</i> -Stämme	23
2.6.3 Glycerolkulturen von <i>Pichia pastoris</i>	24
2.7 Anzuchtverfahren für <i>Pleurotus eryngii</i>	24
2.7.1 Stammhaltung	24
2.7.2 Anzucht der Vorkulturen	24
2.7.3 Anzucht der Hauptkulturen	24
2.8 Anzuchtverfahren für <i>Marasmius scorodoni</i> CBS 137.86	25
2.8.1 Stammhaltung	25
2.8.2 Anzucht der Vorkulturen	25

Inhaltsverzeichnis

2.8.3 Anzucht der Hauptkulturen	25
2.9 Kulturernte von <i>Marasmius scorodonius</i> und <i>Pleurotus eryngii</i>.....	26
2.10 Konzentrierung.....	26
2.10.1 Ammoniumsulfat-Präzipitation.....	26
2.10.2 Polyethylenglykol-Präzipitation.....	26
2.10.3 Konzentrierung mittels Centricon-Plus-80	27
2.10.4 Konzentrierung mittels Vivacell 70.....	27
2.10.5 Konzentrierung mittels Ultrafree-4-Zentrifugal-Filter und -Tube	27
2.10.6 Konzentrierung mittels Vivacell 15R.....	28
2.10.7 Konzentrierung mittels Vivaflow 200.....	28
2.10.7.1 Reinigung der Vivaflow-200-Einheit	29
2.11 Dialyse	29
2.12 Proteinreinigung	30
2.12.1 Das FPLC-System.....	30
2.12.2 Ionenaustauschchromatografie	30
2.12.2.1 Vorversuche zur Reinigung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus <i>Marasmius scorodonius</i>	30
2.12.2.2 Scale up zur Reinigung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus <i>Marasmius scorodonius</i>	31
2.12.2.3 Reinigung der polyvalenten Peroxidase aus <i>Pleurotus eryngii</i> (Langhoff, 2002)	32
2.12.3 Gelfiltrationschromatographie (GFC).....	32
2.12.3.1 Analytische GFC zur Reinigung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus <i>Marasmius scorodonius</i>	32
2.12.3.2 Präparative GFC zur Reinigung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus <i>Marasmius scorodonius</i>	33
2.12.3.3 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels GFC	33
2.12.4 Säulenreinigung/pflege.....	34
2.12.4.1 Reinigung der Q-Sepharose-Säule.....	34
2.12.4.2 Reinigung der Superdex 200-Säule HR 10/30	35
2.13 Proteinbestimmungsmethoden	35
2.13.1 Proteinbestimmung nach Lowry	35
2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	35
2.14.1 Standardproteintrennung im SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970)....	35

Inhaltsverzeichnis

2.14.2 Coomassie-Färbung	38
2.14.3 Silber-Färbung.....	38
2.14.4 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-Page	39
2.15 Isoelektrische Fokussierung.....	40
2.15.1 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI).....	42
2.15.2 Aktivitätsentfärbung	43
2.16 Biochemisch-analytische Methoden	43
2.16.1 Aktivitätsbestimmung.....	43
2.16.1.1 Temperaturoptimum.....	44
2.16.1.2 pH-Optimum.....	44
2.16.1.3 Optimale Pufferkonzentration.....	44
2.16.1.4 NaCl-Toleranz.....	44
2.16.1.5 Wasserstoffperoxid-Einfluss.....	44
2.16.1.6 Aktivitätsbestimmung der polyvalenten Peroxidase aus <i>Pleurotus</i> <i>eryngii</i>	45
2.16.2 Massenspektrometrische Analyse	45
2.16.3 UV/VIS-Spektroskopie.....	45
2.16.4 Kinetik des β,β -Carotin-Abbaus.....	45
2.16.5 MALDI-TOF-Massenspektroskopie	46
2.17 Western-Blot.....	46
2.17.1 Verwendete Western-Blot-Lösungen und –Puffer	47
2.18 Molekularbiologische Methoden.....	47
2.18.1 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	47
2.18.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	48
2.18.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
2.18.3.1 Analytische PCR.....	49
2.18.3.2 Präparative PCR.....	49
2.18.3.3 PCR-Screening der <i>Pichia</i> -Klone.....	50
2.18.4 Plasmidisolierung	50
2.18.4.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab	50
2.18.4.2 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab	51
2.18.5 DNA-Fragmentisolierung (Gel-Elution).....	51
2.18.6 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonucleasen.....	52
2.18.7 Inaktivierung von Restriktionsenzymen	52

Inhaltsverzeichnis

2.18.8 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion	52
2.18.9 Ethanol-Fällung	53
2.19 Methoden zum Gentransfer.....	53
2.19.1 Herstellung kompetenter Zellen von <i>Escherichia coli</i> (RbCl).....	53
2.19.1.1 Verwendete Puffer	54
2.19.2 Transformation selbst hergestellter, kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	54
2.19.3 Ligation und Transformation mit den TA Cloning® Kits (Invitrogen).....	55
2.19.3.1. Ligation und Transformation mit dem TOPO TA Cloning® Kit Version M/R	55
2.19.3.2 Ligation und Transformation mit dem TA Cloning® Kit Version V.....	56
2.19.3.3 Blau/Weiß-Screening	56
2.19.4 Ligation in die <i>Pichia</i> -Vektoren	57
2.19.5 Transformation von <i>Pichia pastoris</i> nach Spheroblastierung.....	57
2.19.5.1 Vorkulturführung	57
2.19.5.2 Hauptkulturführung	57
2.19.5.3 Bildung der Spheroblasten.....	58
2.19.5.4 Transformation.....	59
2.19.5.5 Puffer und Lösungen.....	59
2.19.6 Transformation von <i>Pichia pastoris</i> durch Elektroporation	60
2.19.6.1 Vorkulturführung	60
2.19.6.2 Hauptkulturführung	61
2.19.6.3 Zellernte und Transformationsvorbereitung	61
2.19.6.4 Elektroporation.....	61
2.20 Screening auf Mehrfach-Insertionen	62
2.21 Isolierung der RNA aus <i>Marasmius scorodonius</i>	62
2.21.1 Reinheitsüberprüfung der RNA-Isolierung mit FA-Gelelektrophorese	63
2.21.2 Fotometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der RNA- Isolierung.....	63
2.22 cDNA-Synthese	64
2.22.1 Erststrang-cDNA-Synthese	64
2.22.2 Zweitstrangsynthese (LD-PCR).....	64
2.23 Isolierung genomischer DNA aus <i>Marasmius scorodonius</i>.....	64
2.24 Sterilisation	65
2.24.1 Sterilisation der Arbeitsmaterialien	65

Inhaltsverzeichnis

2.24.2 Sterilisation der S1-Abfälle	65
2.24.3 Oberflächenkontaminationen.....	66
2.25 Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien	66
2.26 Geräte.....	67
3 Ergebnisse	69
3.1 Identifizierung und Charakterisierung der β,β-Carotin-spaltenden	
Enzyme aus <i>Marasmius scorodoni</i>	69
3.1.1 Optimierung der Anzuchtbedingungen von <i>Marasmius scorodoni</i>	69
3.1.1.1 Enzymsekretion in Abhängigkeit von der Stammhaltung	69
3.1.1.2 Enzymsekretion in Abhängigkeit von der Hauptkulturführung.....	69
3.1.2 Charakterisierung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus <i>Marasmius</i>	
<i>scorodoni</i>	70
3.1.2.1 Bestimmung der Enzymaktivität.....	70
3.1.2.2 Reproduzierbarkeit des Enzymtestes	71
3.1.2.3 Einfluss der Pufferkonzentration auf die Enzymaktivität	72
3.1.2.4 pH-Optimum.....	74
3.1.2.5 Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität.....	75
3.1.2.6 Enzymstabilität bei Raumtemperatur	76
3.1.2.7 Auswahl des Arbeitspuffers.....	77
3.1.2.8 Natriumchlorid-Toleranz.....	77
3.1.2.9 Wasserstoffperoxid-Einfluss.....	78
3.1.3 Konzentrierung	79
3.1.3.1 Ammoniumsulfat-Präzipitation	79
3.1.3.2 Polyethylenglykol-Präzipitation	80
3.1.3.3 Konzentrierung mittels Centricon-Plus-80.....	81
3.1.3.4 Konzentrierung mittels Vivacell 70	81
3.1.3.5 Konzentrierung mittels Ultrafree-4-Centrifugal-Einheiten	81
3.1.3.6 Konzentrierung mittels Vivacell 15R	82
3.1.3.7 Konzentrierung mittels Vivaflow 200	82
3.1.4 Enzymreinigung.....	83
3.1.4.1 Ionenaustauschchromatographie.....	83
3.1.4.1.1 Vorversuche	83
3.1.4.1.2 Scale up	84
3.1.4.2 Gelfiltrationschromatographie (GFC)	86

Inhaltsverzeichnis

3.1.5 Proteinbiochemische Identifizierung der Proteine MsP1 und MsP2	87
3.1.5.1 Kombinierte Aufreinigung.....	87
3.1.5.2 Die isoelektrischen Punkte von MsP1 und MsP2.....	91
3.1.5.3 Sequenzierung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme MsP1 und MsP2.....	93
3.1.5.3.1 N-terminale Sequenzierung mittels Edman-Abbau.....	93
3.1.5.3.2 Sequenzierung mittels ESI-tandem-MS.....	93
3.1.6 Proteinbiochemische Charakterisierung der Proteine MsP1 und MsP2	95
3.1.6.1 pH-Wert-Abhängigkeit der Enzymaktivität von MsP2.....	95
3.1.6.2 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Enzymaktivität von MsP2 ...	96
3.1.6.3 Natriumchlorid-Toleranz der Enzyme MsP1 und MsP2	96
3.1.6.4 Absorptionsspektrum von MsP2	97
3.1.7 Charakterisierung der Proteine MsP1 und MsP2 auf molekularbiologischer Ebene	98
3.1.7.1 Sequenzvergleich	98
3.1.7.2 Ableitung der Primer	99
3.1.7.3 Identifizierung der Gene der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus <i>Marasmius scorodoni</i> aus einer λ cDNA –Bank	105
3.1.7.3.1 Herstellung einer λ cDNA –Bank von <i>Marasmius scorodoni</i> ...	105
3.1.7.3.2 Gradienten-PCRs mit λ cDNA als Template.....	105
3.1.7.4 Identifizierung des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms MsP1 aus <i>Marasmius scorodoni</i> aus cDNA.....	106
3.1.7.4.1 Synthese von <i>Marasmius-scorodoni</i> -cDNA	106
3.1.7.4.2 Identifizierung des cC-Fragmentes des MsP1-Gens	108
3.1.7.4.3 Ableitung neuer Primer auf Basis des cC-Fragmentes.....	110
3.1.7.4.4 Identifizierung des MsP1-cDNA-Sequenz	111
3.1.7.5 Identifizierung des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms MsP1 aus <i>Marasmius scorodoni</i> aus genomischer DNA	115
3.2 Identifizierung und Überexpression der polyvalenten Peroxidase aus <i>Pleurotus eryngii</i>.....	116
3.2.1 Charakterisierung einer polyvalenten Peroxidase auf molekularbiologischer Ebene	116
3.2.1.1 Ableitung der Primer	116
3.2.1.2 Herstellung einer λ cDNA-Bank von <i>Pleurotus eryngii</i>	117

3.2.1.3 Identifizierung des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms aus <i>Pleurotus eryngii</i> aus einer λ cDNA-Bank	117
3.2.2 Expression der polyvalenten Peroxidase aus <i>Pleurotus eryngii</i> in <i>Pichia pastoris</i>	120
3.2.2.1 Die Expressionsvektoren	120
3.2.2.1.1 Herstellung der Expressionsvektoren	121
3.2.2.2 Transformation und Integration der Vektoren ins <i>Pichia pastoris</i> -Genom	125
3.2.2.2.1 Transformation von <i>Pichia pastoris</i> nach Spheroblastierung.....	125
3.2.2.2.2 Transformation von <i>Pichia pastoris</i> durch Elektroporation	125
3.2.2.3 Selektion auf mehrfache Vektorinsertionen	126
3.2.2.4 PCR-Screening der <i>Pichia</i> -Stämme.....	127
3.2.3 Testung des Antikörpers gegen die polyvalente Peroxidase	129
4 Diskussion	131
4.1 Die β,β-Carotin-abbauenden Enzyme aus <i>Marasmius scorodonius</i>	
CBS 137.83	131
4.1.1 Der Stamm <i>Marasmius scorodonius</i> CBS 137.83	131
4.1.2 Erste Charakterisierung der β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus <i>Marasmius scorodonius</i>	132
4.1.3 Konzentrieren der β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus Kulturüberständen von <i>Marasmius scorodonius</i>	134
4.1.3.1 Ammoniumsulfat- bzw. Polyethylenglykol-Präzipitation	134
4.1.3.2 Konzentrierung mittels verschiedener, kommerzieller Konzentratoren	135
4.1.4 Reinigung der β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus <i>Marasmius scorodonius</i>	137
4.1.4.1 Ionenaustauschchromatographie	137
4.1.4.2 Gelfiltrationschromatographie	138
4.1.4.3 Kombinierte Aufreinigung	138
4.1.4.4 Enzymreinigung im großtechnischen Maßstab	139
4.1.5 Identifizierung und Charakterisierung der β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus <i>Marasmius scorodonius</i>	139
4.1.5.1 Das Enzym MsP1	139
4.1.5.2 Das Enzym MsP2	147

4.2 Die polyvalente Peroxidase aus <i>Pleurotus eryngii</i>	152
4.2.1 Identifizierung der polyvalenten Peroxidase aus <i>Pleurotus eryngii</i> auf molekularbiologischer Ebene	152
4.2.2 Überexpression der polyvalenten Peroxidase aus <i>Pleurotus eryngii</i>	155
4.2.2.1 Wahl eines geeigneten Expressionssystems	155
4.2.2.2 Herstellung der verschiedenen Expressionsstämme	157
4.2.2.3 Selektion auf mehrfache Vektorinsertionen	159
4.2.2.4 Monitoring der Überexpression der polyvalente Peroxidase	160
4.3 Die β,β-Carotin-spaltenden Enzyme aus Basidiomyceten	161
4.4 Ausblick	162
5 Anhang	165
5.1 Sequenzdaten von MsP1 aus <i>Marasmius scorodonius</i>	165
5.1.1 cEAll.2-M13-RP1	165
5.1.2 cEAll.3-M13-FP1	165
5.1.3 cEAll.3-M13-RP1	165
5.1.4 cBII.1-M13-RP1	166
5.1.5 cCAI.3-M13-FP1	166
5.1.6 cCAI.3-M13-RP1	166
5.1.7 cBIIa.1-M13-FP	167
5.1.8 cBIIa.1-M13-RP	167
5.1.9 cBIIa.2-M13-FP	168
5.1.10 cBIIa.2-M13-RP	168
5.1.11 cBIIa.3-M13-FP	168
5.1.12 cBIIa.3-M13-RP	169
5.1.13 cBIIa.4-M13-FP	169
5.1.14 cBIIa.4-M13-RP	169
5.1.15 cBIIa.5-M13-FP	170
5.1.16 cBIIa.5-M13-RP	170
5.1.17 cHA1.2-M13-FP	171
5.1.18 cHA1.2-M13-RP	171
5.1.19 cHA2.2-M13-FP	171
5.1.20 cHA2.2-M13-RP	172
5.1.21 cHA2.1-M13-FP	172
5.1.22 cHA2.1-M13-RP	172

Inhaltsverzeichnis

5.1.23 cGA1.1-M13-FP.....	173
5.1.24 cGA1.1-M13-RP	173
5.1.25 cGA1.2-M13-FP.....	173
5.1.26 cGA1.2-M13-RP	174
5.1.27 cEAll.3-M13-FP (long distance).....	174
5.1.28 cEAll.3-M13-RP (long distance)	175
5.1.29 cBII.2-M13-FP (long distance).....	175
5.1.30 cBII.2-M13-RP (long distance)	176
5.1.31 cBII.3-M13-FP (long distance).....	176
5.1.32 cBII.3-M13-RP	176
5.2 Sequenzdaten der polyvalenten Peroxidase aus <i>Pleurotus eryngii</i>.....	177
5.2.1 Sequenzdaten zur Identifizierung der polyvalenten Peroxidase	177
5.2.1.1 PCR I fw	177
5.2.1.2 PCR I rev	177
5.2.1.3 PCR II fw	178
5.2.1.4 PCR IV fw.....	178
5.2.1.5 PCR IV rev	178
5.2.2 Kontrollsequenzierung.....	179
5.2.2.1 Stamm <i>Pichia pastoris</i> GS115 + pPIC3,5K + A1a α , Vorwärts- Sequenzierung.....	179
5.2.2.2 Stamm <i>Pichia pastoris</i> GS115 + pPIC3,5K + A1a α , Rückwärts- Sequenzierung.....	179
5.2.2.3 Stamm <i>Pichia pastoris</i> GS115 + pPIC9K + A1aohne α , Kolonie 3, Vorwärts-Sequenzierung	180
5.2.2.4 Stamm <i>Pichia pastoris</i> GS115 + pPIC9K + A1aohne α , Kolonie 3, Rückwärts-Sequenzierung.....	180
5.2.2.5 Stamm <i>Pichia pastoris</i> GS115 + pPIC9K + A1a α , Kolonie 2, Vorwärts-Sequenzierung	180
5.2.2.6 Stamm <i>Pichia pastoris</i> GS115 + pPIC9K + A1aohne α , Kolonie 2, Rückwärts-Sequenzierung.....	181
5.3 Selektion auf mehrfache Vektorinsertionen (Screening-Tabellen)	181
5.3.1 Stamm <i>Pichia pastoris</i> GS115 + pPIC9K + A1a α	181
5.3.1.1 Screening I, 1. Ausstrich	182
5.3.1.2 Screening I, 2. Ausstrich	183

Inhaltsverzeichnis

5.3.2 Stamm <i>Pichia pastoris</i> GS115 + pPIC3,5K + A1α.....	184
5.3.2.1 Screening I, 1. Ausstrich	184
5.3.2.2 Screening I, 2. Ausstrich	185
5.3.2.3 Screening II, 1. Ausstrich	186
5.3.2.4 Screening II, 2. Ausstrich	187
5.3.3 Stamm <i>Pichia pastoris</i> GS115 + pPIC9K + A1αohneα.....	188
5.3.3.1 Screening I, 1. Ausstrich	188
5.3.3.2 Screening I, 2. Ausstrich	189
5.3.3.3 Screening II, 1. Ausstrich	190
5.3.3.4 Screening II, 2. Ausstrich	192
5.4 Vektorkarten	194
5.4.1 pCR [®] 2.1 (Version V), Vektorkarte (Invitrogen, Instruction Manual, modifiziert).....	194
5.4.2 pCR [®] 2.1-TOPO, Version R, Vektorkarte (Invitrogen, Instruction Manual, modifiziert)	195
5.4.3 pCR [®] 2.1-TOPO, Version M, Vektorkarte (Invitrogen, Instruction Manual, modifiziert)	196
5.4.4 pPIC3,5K, Vektorkarte (a) und Multiple Cloning Site (b) (Invitrogen, Instruction Manual, modifiziert).....	197
5.4.5 pPIC9K, Vektorkarte (a) und Multiple Cloning Site (b) (Invitrogen, Instruction Manual, modifiziert).....	198
6 Literatur	200
7. Lebenslauf	213

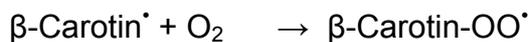
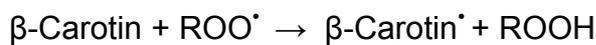
1 Einleitung

Jährlich werden etwa 10 Mio. Tonnen Carotinoide in der Natur gebildet (Britton et al., 1998), wobei weit mehr als 600 verschiedene Carotinoide bekannt sind (Britton et al., 1995). So vielfältig wie ihr Vorkommen sind auch ihre Funktionen. Ihre Hauptaufgabe im Pflanzenreich liegt in ihrer Funktion als akzessorische Pigmente während der Fotosynthese (Richter, 1997). Als sogenannte Sekundärcarotinoide (Richter, 1997) treten sie in vielfältiger Form in den Chromoplasten der Blüten und Früchte auf. Neben ihrer Funktion als Lockstoffe schützen sie die Pflanze vor fotooxidativen Effekten. Obwohl Tiere nicht zur *de novo* Synthese von Carotinoiden befähigt sind und sie diese über die Nahrung zu sich nehmen müssen, spielen Carotinoide auch innerhalb des Tierreiches eine wichtige Rolle. Die aufgenommenen Carotinoide werden modifiziert (Penzlin, 1996), wobei einige Carotinoide als Provitamin A dienen. Sie führen auch zur Färbung der Tiere, wie z. B. das in die Federn der Flamingos eingelagerte Astaxanthin (Britton et al., 1995). Ferner sind Carotinoide oft für die Färbung nicht-fototropher Mikroorganismen wie Bakterien, Schimmelpilze und Hefen verantwortlich (Britton et al., 1995). Auch hier übernehmen die Carotinoide eine fotoprotektive Rolle (Madigan et al., 2001). Eine Vielzahl der am Carotinoideaufbau beteiligten Enzyme aus verschiedenen Organismen (Bakterien, Hefen, Pflanzen) sind identifiziert und charakterisiert worden (Verdoes et al., 1999; Armstrong et al., 1997; Bartley et al., 1993).

Neben den oben genannten Funktionen stellen viele Carotinoide Vorstufen von verschiedenen, wirtschaftlich relevanten Aromastoffen wie z. B. α - und β -Ionon, Dihydroactinidiolid, Geraniol, Damascenol u.v.a. dar (Winterhalter, 1996; Winterhalter et al., 2002). Vor allen in den letzten 10 Jahren wurde die Forschung bezüglich des oxidativen Carotinoidabbaus und der Bildung von aromarelevanten Verbindungen vorangetrieben. Während Arbeiten über die unspezifische und erste Erkenntnisse über die spezifische Carotinoidspaltung mittels pflanzlicher und tierischer Enzyme vorlagen, waren zu Beginn dieser Untersuchungen nur wenige Informationen über die mikrobielle Carotinoidspaltung verfügbar, obwohl viele Organismen z. B. auf dem Waldboden siedeln und ihnen, bedingt durch den Herbstfall Carotinoide theoretisch in ausreichender Form zur Metabolisierung zur Verfügung stehen.

1.1 Unspezifische carotinoidspaltende Enzyme

Lipoxygenasen (LOX) und Xanthin-Oxygenase-Systeme sind in der Lage Carotinoide durch Co-Oxidation zu spalten. Ein erster Beweis hierfür erfolgte bereits im Jahr 1934 (Hass et al., 1934). Die Carotinoide werden dabei durch freie Radikale oxidiert, die nicht direkt durch das Enzym übertragen werden. Ein zusätzliches Substrat reagiert mit dem entsprechenden Enzym unter Radikalbildung, welches dann auf das Carotinoid übertragen wird (Aziz et al., 1999). Der Mechanismus wird initiiert über das durch LOX gebildete Peroxy-Radikal, welches zur Bildung von Carotinoid- und Peroxycarotinoid-Radikalen führt (Burton, 1989):



In der Backindustrie kommt ein Gemisch aus LOX-Isoformen zur Bleichung des Mehls und zur Verbesserung der Eigenschaften des Mehls zum Einsatz (Wu et al., 1999).

Im Allgemeinen ist die Ausbeute an Norisoprenoiden durch Co-Oxidation von Carotinoiden gering (Winterhalter et al., 2002), so dass ein Einsatz in der Aromaindustrie als wenig sinnvoll erscheint.

1.2 Spezifische carotinoidspaltende Enzyme aus Pflanzen

1.2.1 9-(Z)-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenasen (NECD)

Mit der Identifikation des Mais-Enzyms VP14, welches 9-(Z)-Epoxy-Carotinoide spezifisch an der 11,12- bzw. 11',12'-Doppelbindung spaltet (Schwartz et al., 1997), ist der Grundstein für die Identifizierung carotinoidspaltender Enzyme gelegt worden. Die sogenannte 9-(Z)-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenase (NECD) aus Mais spaltet spezifisch die 9-(Z)-Isomere des Violaxanthins und Neoxanthins, nicht aber die all-(E)-Isomere unter Bildung des Sesqui-Terpenoids Xanthoxin und des korrespondierenden C₂₅-Apocarotinals (Abb. 1-1) (Schwartz et al., 1997). Diese enzymatische Reaktion stellt den ersten Schritt in der Abscisinsäure-Bildung dar (Schwartz et al., 1997; Qin et al., 1999). In den darauffolgenden Jahren wurden

1 Einleitung

mehrere zu VP14 homologe Gene u. a. aus der Tomate (Burbidge et al., 1999), Bohne (Qin et al., 1999), Avocado (Chernys et al., 2000), Kuhbohne (Iuchi et al., 2000) und *Arabidopsis thaliana* (Iuchi et al., 2001) identifiziert.

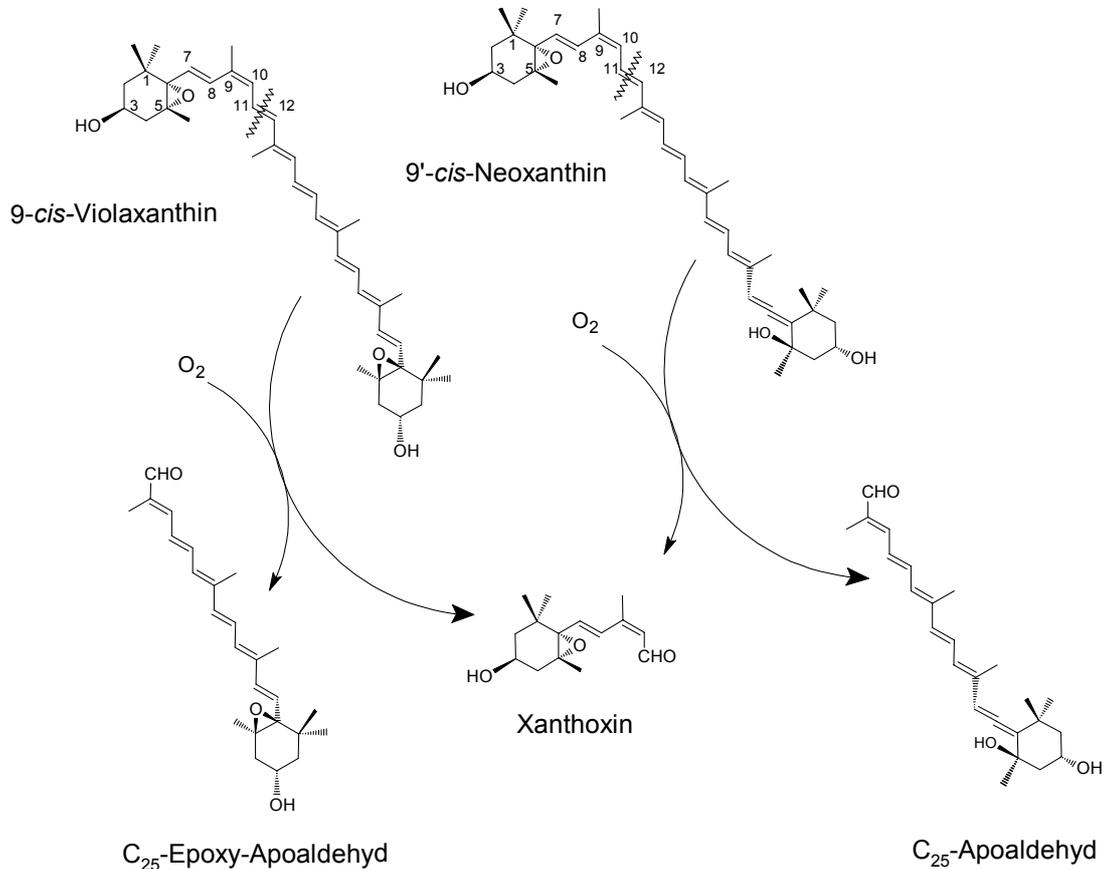


Abb. 1-1: Abbau der 9-(Z)-Isomere des Violaxanthins und Neoxanthins durch NCED aus Mais (Schwartz et al., 1997, modifiziert)

1.2.2 9,10-Dioxygenasen

Das Genom von *A. thaliana* weist insgesamt 9 potentielle carotinoidspaltende Enzyme auf. Neben den Enzymen der AtNECD-Familie existiert eine weitere Familie, die der AtCCD-Enzyme (Neill et al., 1998; Schwartz et al., 2001). Das rekombinante AtCCD1-Protein spaltet in *in vitro* Experimenten verschiedene Carotinoide unter Bildung von C₁₃-Norisoprenoiden und einem C₁₄-Dialdehyd (Abb. 1-2) symmetrisch an der 9,10- bzw. 9',10'-Position. Die 9-(Z)-Isomere des Neoxanthins und Violaxanthins werden nur an einer Stelle unter Bildung eines C₁₃-Norisoprenoids und des dazu gehörigen C₂₇-Apocarotinals (Abb. 1-2) gespalten.

1 Einleitung

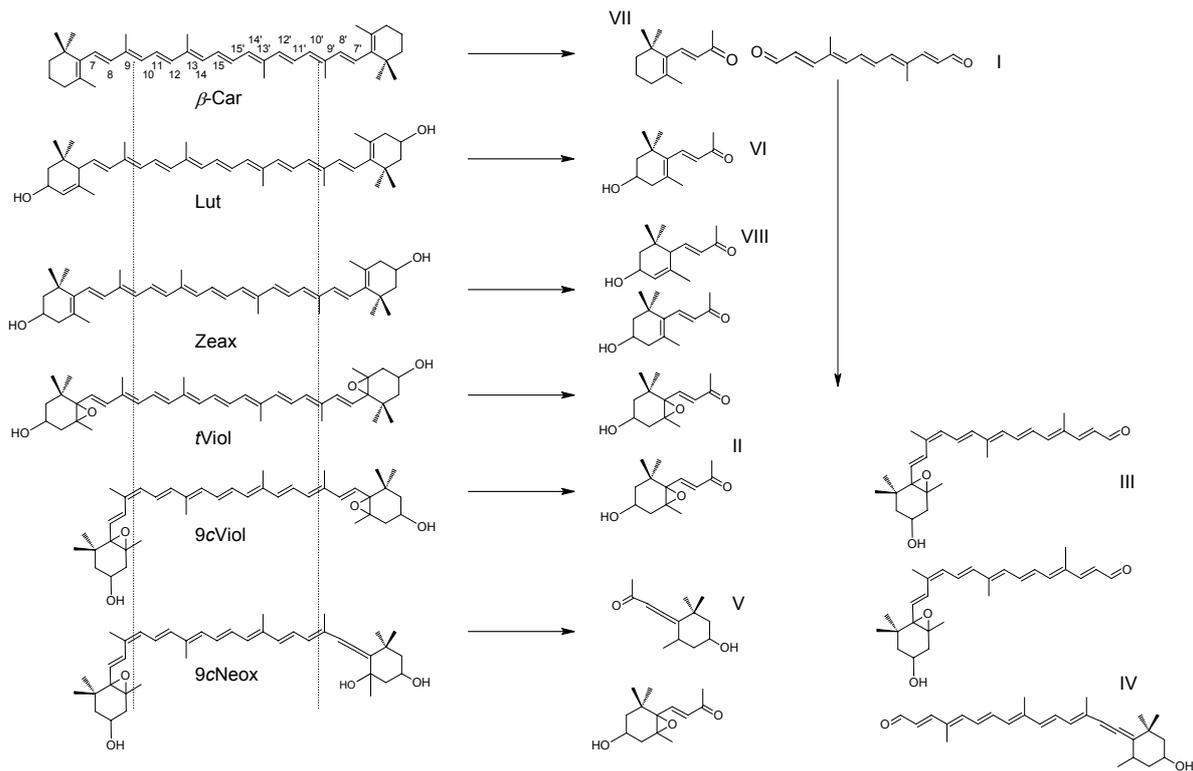


Abb. 1-2: Carotinoidspaltung durch das rekombinante Enzym AtCCD1 (Schwartz et al., 2001, modifiziert). β -Car: β,β -Carotin; Lut: Lutein; Zeax: Zeaxanthin; *t*Viol: all-*trans*-Violaxanthin; 9cViol: 9-*cis*-Violaxanthin; 9cNeox: 9'-*cis*-Neoxanthin; I: C_{14} -Dialdehyd; II: 5,6-Epoxy-3-hydroxy-9-apo- β -9-carotin-9-on; III: C_{27} -Epoxy-apocarotinal; IV: C_{27} -Apocarotinal; V: Grasshoper-Keton; VI: 3-Hydroxy- β -lonon; VII: β -lonon; VIII: 3-Hydroxy- α -lonon

1.3 Spezifische carotinoidspaltende Enzyme aus Tieren

1.3.1 15,15'-Dioxygenasen

Bereits in den 60iger Jahren des vorangegangenen Jahrhunderts wurden 15,15'-Dioxygenasen beschrieben, die β,β -Carotin symmetrisch in all-*trans*-Retinal spalten (Goodman et al., 1966a; Goodman et al., 1966b; Goodman et al., 1967). In den nächsten 40 Jahren wurden diese Dioxygenasen für eine Vielzahl von Organismen wie z. B. die Ratte (Duszka et al., 1996, During et al., 1996), das Kaninchen (Lakshmanan et al., 1972), das Schwein (Fidge et al., 1969) und das Meerschweinchen (Devery et al., 1994) beschrieben. Da Tiere nicht zur *de novo* Synthese der für den Sehvorgang unerlässlichen Retinoide befähigt sind, stellt die symmetrische Spaltung der Carotinoide an Position 15,15' und die damit verbundene Entstehung der Provitamine A den ersten Schritt zur Bildung der Sehpigmente dar.

Erst mit der Kenntnis der Sequenz des VP14 Enzyms und des entsprechenden Gens aus Mais (vgl. 1.2.1), gelang es im Jahr 2000 die 15,15'-Dioxygenase der Fruchtfliege zu klonieren und näher zu charakterisieren (v. Lintig et al., 2000). Ebenso wurden die entsprechenden Enzyme des Huhns, der Maus und des Menschen identifiziert und charakterisiert (Wyss et al., 2000; Paik et al., 2001; Redmond et al., 2001; Yan et al., 2001). Die Enzyme der Vertebraten zeigen untereinander eine hohe Homologie (v. Lintig et al., 2001).

1.3.2 9,10-Dioxygenasen

Neben der symmetrischen Spaltung von Carotinoiden erfolgt in tierischen Organismen überraschenderweise auch eine asymmetrische an Position 9,10 der Polyen-Kette unter Bildung von β -Ionon und dem komplementären C₂₇-Apocarotinal. Erste Hinweise auf die Existenz asymmetrisch spaltender Dioxygenasen wurden bereits 10 Jahre zuvor gewonnen (Wang et al., 1991). Das erste Enzym wurde in der Maus nachgewiesen. Mit Kenntnis der Genstruktur wurden auch homologe cDNA-Abschnitte des Menschen, des Zebrafisches und der Ratte, nicht aber der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert (Kiefer et al., 2001). Neben β,β -Carotin wird auch Lycopin gespalten (Kiefer et al., 2001). Interessanterweise zeigen die 15,15'-Dioxygenase und die 9,10-Dioxygenase aus der Maus eine Homologie von 39%. Es existieren hoch konservierte Aminosäuresequenzabschnitte und sechs konservierte Histidinreste, die wahrscheinlich in die Bindung des Fe²⁺-Cofaktors involviert sind.

Die asymmetrische β,β -Carotin-Spaltung stellt über die Bildung von Retinsäure aus Apocarotinalen wahrscheinlich einen weiteren Syntheseweg zur Bildung der Sehpigmente dar (Kiefer et al., 2001; Wang et al., 1991). Die physiologische Rolle des β -Ionons für den tierischen Organismus ist bisher unbekannt.

1.4 Carotinoidspaltende Enzyme aus Mikroorganismen und Pilzen

Bis zum Beginn dieser Arbeit war über carotinoidspaltende Enzyme aus Mikroorganismen und Pilzen nur wenig bekannt.

1 Einleitung

Eine Mischkultur aus *Trichosporon asahii* und *Paenibacillus amylolyticus* spaltet Lutein unter Bildung von β -Ionon, 7,8-Dihydro- β -ionol, 7,8-Dihydro- β -ionon und 3-Hydroxy- β -ionon (Sanchez-Contreras et al., 2000; Rodriguez-Bustamante et al., 2005). Eine Identifizierung und Charakterisierung der beteiligten Enzyme erfolgte nicht.

Das Cyanobakterium *Microcystis* weist ein Enzym auf, das β,β -Carotin ebenso wie Zeaxanthin spezifisch an der 7,8- und 7',8'-Position unter Bildung von β -Cyclocitral bzw. Hydroxy- β -Cyclocitral und Crocetindial spaltet (Abb. 1-3) (Jüttner et al., 1985). Eine Identifizierung und Charakterisierung des Enzyms erfolgte ebenfalls nicht.

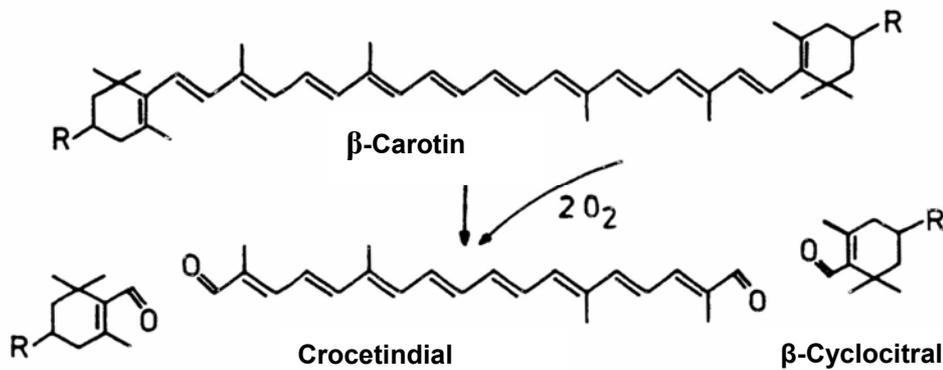


Abb. 1-3: β,β -Carotin-Abbau durch das Cyanobakterium *Microcystis* (Jüttner et al., 1985)

1.4.1 Screening auf β,β -Carotin-abbauende Pilze

51 Pilze wurden in einem Screening-Verfahren auf ihre Fähigkeit zur Transformation von β,β -Carotin geprüft, in dem ihr Wachstum auf β,β -Carotin-haltigen Agarplatten getestet wurde (Langhoff, 2002). β,β -Carotin-abbauende Stämme bildeten um das Mycel herum einen entfärbten Hof (Abb. 1-4).

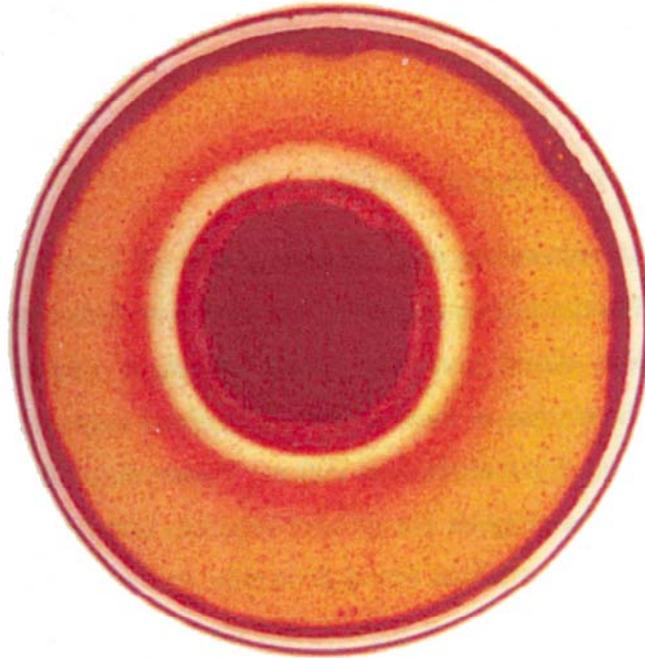


Abb. 1-4: Entfärbung des β,β -Carotinagars durch *Pleurotus eryngii* (Langhoff, 2002)

Folgende Stämme wurden positiv getestet: *Cryptococcus laurentii*, *Cyathus pallidus*, *Ganoderma applanatum*, *Hypomyces odoratus*, *Ischnoderma benzoinum*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Lepista irina*, *Marasmius scorodonius*, *Phaffia rhodozyma*, *Trametes suaveolens*, *Trametes versicolor* und *Pleurotus eryngii* (Langhoff, 2002).

Der ursprünglich als *Lepista irina* bezeichnete Stamm (Langhoff, 2002) erwies sich zum Ende dieser Arbeit nach molekularbiologischer Charakterisierung als *Pleurotus-eryngii*-Spezies (persönliche Mitteilung CBS). Dementsprechend wurde die korrekte Zuordnung des Pilzes für diese Arbeit übernommen.

Die Transformation von β,β -Carotin mit Kulturüberständen der o. g. Pilze lieferte nur für einige Pilze norisoprenoide Abbauprodukte (Tab. 1-1) (Langhoff, 2002).

1 Einleitung

Tab. 1-1: Produktbildung und Abbauraten bei Umsetzung von β,β -Carotin mit Kulturüberständen (Langhoff, 2002, modifiziert)

Art	Abbauraten [%]	Flüchtige Abbauprodukte
Blindwert	< 8	-
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	95	β -Ionon, Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon
<i>Pleurotus eryngii</i>	> 99	β -Ionon, Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon
<i>Marasmius scorodoni</i>	93	β -Ionon, Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon
<i>Trametes versicolor</i>	98	β -Ionon, Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde das β,β -Carotin-spaltende Enzym aus *Pleurotus eryngii* gereinigt und charakterisiert (Langhoff, 2002).

1.4.2 Die flüchtigen Abbauprodukte und ihre Bedeutung für die Aromaindustrie

Bei den Abbauprodukten des β,β -Carotins (Abb. 1-5) handelt es sich um die sogenannten C₉-, C₁₀-, C₁₁- und C₁₃-Norisoprenoide, wobei die C₁₃-Norisoprenoide die größte Gruppe der aromarelevanten Carotinoid-Spaltprodukte darstellen (Winterhalter, 1996). Norisoprenoide sind u. a. in Früchten (z.B. Sternfrucht, Quitte, Apfel, Trauben, Passionsfrucht), Gemüse (Tomate, Melone), Gewürzen (Safran, Paprika), etherischen Ölen, Tabak, Tee, Rum, Kaffee und Wein nachweisbar (Winterhalter et al., 2002).

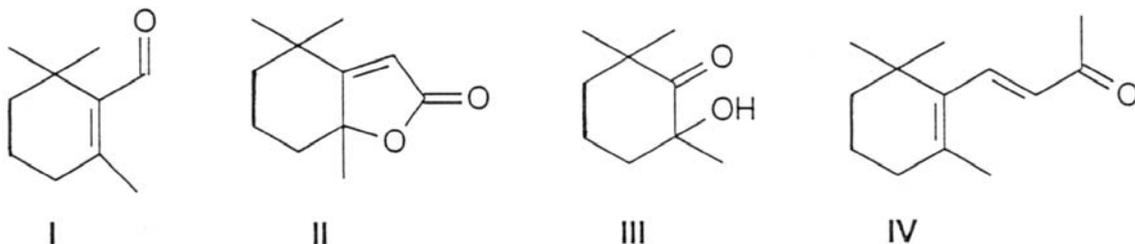


Abb. 1-5: I: β -Cyclocitral; II: Dihydroactinidiolid; III: 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon; IV: β -Ionon

1 Einleitung

Diese Aromastoffe finden Einsatz in der Kosmetik-, Parfum- und Reinigungsmittelindustrie sowie in der Lebensmittelherstellung (Feron et al., 1996). Die oben genannten Aromastoffe kommen in der Natur nur in Spuren vor und sind zu dem oftmals glykosidisch gebunden (Winterhalter, 1992). Traditionell wurden diese mit geringer Ausbeute aus den Pflanzen extrahiert. Die schonende biotechnologische Herstellung von Aromastoffen gewinnt gegenüber der chemischen Synthese immer größeres Interesse und gewinnt somit stark an Bedeutung.

β -Ionon:

Der Geruch von β -Ionon wird als holzig, fruchtig und himbeerartig beschrieben. β -Ionon ist in den etherischen Ölen verschiedener Blüten (z. B. *Viola odorata* L., *Boronia megastigma* Nees., *Osmanthusfragrans* Lour.), in Früchten (z. B. *Viola odorata*, Tomate) und in Gemüse (Larsen et al., 1990; Ohloff, 1994; Baldwin et al., 2000) zu finden.

β -Ionon kann als Ausgangsstoff für die Dihydroactinidiolid-Herstellung z. B. durch Fotooxidation (Enzell, 1985), für die Herstellung von β -Damascenon (Winterhalter, 1996) und von β -Damascon (Hoffman, 1978) dienen. β -Damascenon und β -Damascon stellen Schlüsselverbindungen des Rosenöls (*Rosa damascena* Miller) dar (Demole et al., 1970). Sie besitzen einen narkotisch-würzigen Geruch nach exotischen Blumen. Sowohl β -Ionon als auch β -Damascenon und β -Damascon besitzen einen äußerst niedrigen Geruchsschwellen-Wert (0,007, 0,009 bzw. 0,09 $\mu\text{g/L}$ Wasser) (Buttery et al., 1971; Ohloff, 1978; Ohloff, 1994). Alle drei Verbindungen sind auf Grund ihrer ansprechenden Aromaeigenschaften von besonderem Interesse für die Riechstoff- und Aromaindustrie. Sie finden vor allem in Parfums und Körperpflegemitteln Verwendung. Ferner verhindert β -Ionon das Wachstum von vielen pathogenen Pilzen z. B. von *Peronospora tabacina* (Schiltz, 1974), *Colletotrichum musae* (Utama et al., 2002) und *Fusarium solani* (Mikhlin et al., 1983).

Dihydroactinidiolid:

Dihydroactinidiolid wurde erstmals aus dem etherischen Öl der Blätter von *Actinidia polygama* isoliert und identifiziert (Sakan et al., 1967). Es stellt eine Hauptkomponente des Aromas von schwarzem Tee (Bricout et al., 1967) und Tabak

1 Einleitung

(Steglich et al., 1997) dar und wird aus diesem Grund von der Aromaindustrie synthetisch hergestellt (Isoe et al., 1968; Yao et al., 1998). Da Dihydroactinidiolid synthetisch in größeren Mengen oftmals schwierig herzustellen ist (Bossler et al., 1995), ist ein alternativer, enzymatischer Syntheseweg von Interesse.

β -Cyclocitral:

β -Cyclocitral kommt u. a. in Tee, Tabak, Erbse, Friesen- und Akazienblüten vor und vermittelt einen süßlich/fruchtigen sensorischen Eindruck.

2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon:

2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon ist u. a. in Tabak, Tee und der Tomate nachweisbar (Mügler-Chevan et al., 1969) und hinterlässt einen heuartigen Geruchseindruck.

1.5 Zielsetzung

In den Vorarbeiten (Langhoff, 2002) wurde das für den β,β -Carotinabbau verantwortliche Enzym aus dem Kulturüberstand von *P. eryngii* isoliert und biochemisch charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die für das Enzym kodierende cDNA kloniert und sequenziert werden. Zu diesem Zweck sollten durch Homologievergleiche von bekannten 9,10-Dioxygenasen Primer abgeleitet werden, die zur Identifikation des Zielgens führen sollten. Nach der Wahl eines geeigneten Expressionssystems sollte das Zielgen in einen Produktionsstamm kloniert werden.

Ferner sollte das β,β -Carotin-spaltende Enzym aus *Marasmius scorodoni* isoliert und charakterisiert werden. Zu diesem Zweck sollte ein einfacher und schneller Test zum Nachweis der Enzymaktivität etabliert und eine Reinigungsstrategie entwickelt werden. Ausgehend von Peptidsequenzen des isolierten Enzyms sollten Primer zur Identifikation des zu Grunde liegenden Gens abgeleitet werden und die entsprechende cDNA identifiziert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien

Tab. 2-1: Chemikalien

Chemikalien	Qualität	Hersteller
AA/Bis (40%)	37,5:1 (Verh. AA:Bis)	Roth (Karlsruhe)
Aceton	redest.	Hochschullieferung
Agar-Agar	f. d. Mikrobiologie	Merck (Darmstadt)
Agarose GTQ	gentechn. Qualität	Roth
Ammoniumpersulfat	> 98%	Roth
Ampicillin (Na-Salz)	gentech. Qualität	Roth
β,β -Carotin	> 97%	Fluka (Neu-Ulm)
BCIP	f. Molekularbiologie, > 98%	Sigma
Biotin	f. Mikrobiologie, > 99%	Fluka
Bromphenolblau	f. d. Elektrophorese	Roth
BSA	fettsäurearm, >96%	Fluka
CaCl ₂ ·2H ₂ O	p.a.	Riedel de Haen (Seelze)
Citronensäure·H ₂ O	p. a., > 99,5%	Fluka
Coomassie Brilliant Blue G 250	f. d. Elektrophorese	Merck
Coomassie Brilliant Blue R 250	pure	Serva (Heidelberg)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	99%	Fluka
D-Glucose·H ₂ O	f. d. Mikrobiologie	Merck
Dichlormethan	redest.	Hochschullieferung
dNTPs	> 98%, pH 7, 100mM	Roth
D-Sorbitol	> 98%, f.d. Biochemie	Roth
DTT	f. d. Biochemie	Merck
Essigsäure	> 99,8%	Fluka
Ethanol, unvergällt	96,4%	KWS
Ethanol, vergällt	96,4%, mit Petroether vergällt	KWS
Ethidiumbromidlösung	1% (10 mg/mL)	Roth
FeCl ₃ ·6H ₂ O	reinst	Riedel de Haen
Formaldehyd	37% (w/v) Lsg. in Wasser	Aldrich (Taufkirchen)
Formamid	f. d. Molekularbiologie	Roth
Geneticindisulfat	> 700 U/mg	Roth
Glycerol	> 98%	Roth
Glycin	f. d. Elektrophorese	Merck
Hefeextrakt	f. d. Mikrobiologie	Merck
IPTG	> 99%, Dioxan-frei	Roth
Isoamylalkohol	> 98%	Roth

2 Materialien und Methoden

KAc	reinst	Merck
KCl	p. a.	Baker (Griesheim)
KH ₂ PO ₄	p. a.	Fluka
K ₂ HPO ₄	p. a.	Merck
Kerosin	purum	Fluka
L-Asparagin·H ₂ O	99%	Merck
LB-Medium (Miller)	f. d. Mikrobiologie	Merck
LB-Agar	-	LAB M (über Roth)
L-Glutaminsäure	> 99,0%	Fluka
L-Histidin	f. biochemische Zwecke	Merck
L-Isoleucin	> 99%	Fluka
L-Leucin	> 99,5%	Fluka
L-Lysin	> 98%	Fluka
L-Methionin	> 99,5%	Fluka
Maltose	90-95%	Sigma (Taufkirchen)
Methanol	HPLC-grade	Baker
MgCl ₂ ·6H ₂ O	p. a.	Fluka
MgSO ₄	Chem. rein, DAB 7	Riedel de Haen
Milchpulver	blotting grade, pulv.	Roth
MnSO ₄ ·H ₂ O	> 98%	Fluka
MOPS	> 99,5%	Sigma
NaCl	p. a.	Roth
Na ₂ HPO ₄	p. a., Puffersubstanz	Riedel-de-Haen
NaOH	reinst	Merck
Natriumacetat	p. a.	Merck
NBT	-	Biomol
Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	f. d. Mikrobiologie	Sigma-Aldrich
Roti-Phenol	f. d. DNA/RNA Isolierung	Roth
Rubidiumchlorid	p. a.	Merck
Salzsäure	reinst	Riedel-de-Haen
SDS	> 99%, f. d. Elektrophorese	Roth
TEMED	f. Elektrophorese	Roth
Titriplex III (EDTA)	> 99%	Merck
Tris	> 99%	Fluka
Tris Base	> 99,9%	Roth
Tris HCl	> 99%	Roth
Tween 20	-	Fluka
Tween 40	-	Fluka
Tween 80	-	Riedel de Haen
X-Gal	> 99%	Roth
Xylencyanol	für die Elektrophorese	Roth
Yeast Nitrogen Base	-	Invitrogen (Karlsruhe)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	puriss. p. a.	Fluka

2 Materialien und Methoden

1 kb DNA Leiter	500 µg/mL	NEB (Schwalbach)
1000 bp Fragment	100 ng/µL	gensura (über Roth)

2.2 Organismen und Plasmide

Tab. 2-2: Verwendete Organismen

Stamm	Relavanter Geno-/Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>Marasmius scorodonius</i>	-	CBS 137.86
<i>Pleurotus eryngii</i>		CBS ? ¹
<i>Pichia pastoris</i> GS115	-	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP10F'	F' { <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> ΔM15, Tn0 (Tet ^R)} <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> λ ⁻	Invitrogen

Tab. 2-3: Verwendete Plasmide

Plasmid ²	Herkunft
pCR [®] 2.1 (Version V)	Invitrogen
pCR [®] 2.1-TOPO (Version M)	Invitrogen
pCR [®] 2.1-TOPO (Version R)	Invitrogen
pPIC3,5K	Invitrogen
pPIC9K	Invitrogen

¹ Dieser Stamm wurde ursprünglich von der niederländischen Sammlung für Pilzkulturen in Baarn als *Lepista irina* CBS 458.79 erworben.

² Die entsprechenden Plasmidkarten sind Kap. 5.4 zu entnehmen

2.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

2.3.1 Spurenelementlösung für SNL-Medium

FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,08 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,09 g/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,03 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g/L
Titriplex III (EDTA)	0,4 g/L
H ₂ O	ad 1 L

2.3.2 Wässrige β,β -Carotin-Lösung

5 mg β,β -Carotin und 0,5 g Tween 80 wurden in Dichlormethan gelöst. Das Lösungsmittel wurde weitgehend mittels Rotationsverdampfer in einem 250 mL Rundkolben entfernt (40 °C, 800 mbar) und der Rückstand wurde in ~ 45 mL dest. Wasser aufgenommen. Anschließend wurde das restl. Lösungsmittel in 200 mbar Schritten bis hin zu 200 mbar abgezogen. Das β,β -Carotin lag nun vollständig in Wasser solubilisiert vor. Die β,β -Carotin-Lösung wurde für 30 min mit Stickstoff abgeblasen, um letzte Dichlormethanreste zu eliminieren. Zur Entfernung ungelöster Teilchen wurde eine Membranfiltration (CHROMAFIL PET-45/25, 0,45 μ m Porengröße, Macherey und Nagel) durchgeführt. Abschließend wurde die Lösung mit Wasser im Messkolben auf 50 mL aufgefüllt. Sämtliche Arbeitsschritte fanden unter Lichtausschluss statt.

2.3.3 Citronensäure/Na₂HPO₄-Puffer

Der Puffer wurde aus einer 0,1 M Citronensäurelösung und einer 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung hergestellt. Durch Mischung der Stammlösungen im definiertem Verhältnis wurde der pH-Wert des Puffers, durch Verdünnung mit dest. Wasser die Konzentration eingestellt (LAB TOOLS, Tabellen für das Labor, Merck, W.280011/1200).

2.3.4 Natriumacetatpuffer

Je nach Bedarf wurden je 0,1 M oder 1 M Stammlösungen der Essigsäure und des Natriumacetats hergestellt. Mit diesen Stammlösungen wurde durch Mischen der gewünschte pH-Wert und anschließend durch Verdünnung mit dest. Wasser die Zielkonzentration eingestellt (LAB TOOLS, Tabellen für das Labor, Merck, W.280011/1200).

2.3.5 50 x TAE-Puffer

Tris	242 g
Essigsäure konz.	57,1 mL
0,5 M EDTA, pH 8	100 mL
H ₂ O	ad 1 L

2.3.6 1x TAE-Puffer

50x TAE-Puffer	20 mL
H ₂ O	ad 1 L

2.3.7 6x DNA-Auftragspuffer (Sambrook et al., 2001)

Bromphenolblau	0,025 g
Xylencyanol	0,025 g
Glycerol	3 mL
H ₂ O	ad 10 mL

2.3.8 10x FA-Gel-Puffer

MOPS	41,86 g/L
Natriumacetat	6,8 g/L
EDTA	3,72 g/L
H ₂ O (RNase frei)	ad 1 L

Einstellung des pH Wertes mit NaOH auf 7.

2.3.9 1x FA Gel-Puffer mit Formaldehyd

10x FA Gel-Puffer	100 mL
Formaldehyd (37%)	20 mL
H ₂ O (RNase frei)	ad 1 L

2.3.10 5x RNA Probenauftragspuffer

Bromphenolblau-Lösung (gesättigt)	16 µL
500 mM EDTA, pH 8	80 µL
Formaldehyd (37%)	720 µL
Glycerol	2 mL
Formamid	3084 µL
10x FA Gel-Puffer	4 mL

2.3.11 10x YNB

134 g Yeast Nitrogen Base (YNB) mit Ammoniumsulfat ohne Aminosäuren wurden in 1 L Wasser gelöst und nach kurzem Erwärmen sterilfiltriert und bei 4 °C für max. 1 Jahr gelagert.

2.3.12 500x B (0,02% Biotin)

Biotin	20 mg
H ₂ O	ad 100 mL

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C für max. 1 Jahr gelagert.

2.3.13 100x H (0,4% Histidin)

L-Histidin	400 mg
H ₂ O	ad 100 mL

Die Lösung wurde zur Beschleunigung des Lösungsvorganges auf max. 50 °C erwärmt, sterilfiltriert und bei 4 °C für max. 1 Jahr gelagert.

2.3.14 10x D (20% Glucose)

D-Glucose	200 g
H ₂ O	ad 1 L

Die Lösung wurde für 15 min autoklaviert.

2.3.15 10x M (5% Methanol)

Methanol	5 mL
H ₂ O	ad 100 mL

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C für max. 2 Monate gelagert.

2.3.16 10x GY (10% Glycerol)

Glycerol	100 mL
H ₂ O	ad 1 L

Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.3.17 10x AA (0,5% jeder Aminosäure)

L-Glutaminsäure	500 mg
L-Methionin	500 mg
L-Lysin	500 mg
L-Leucin	500 mg
L-Isoleucin	500 mg
H ₂ O	ad 100 mL

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C für max. 1 Jahr gelagert.

2.3.18 1 M Phosphat-Puffer pH 6

1 M K ₂ HPO ₄	132 mL
1 M KH ₂ PO ₄	868 mL

Der Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.4 Wachstumsmedien

2.4.1 SNL-Standardmedium (Sprecher und Hanssen, 1982)

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g
Hefextrakt	3,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
MgSO ₄	0,5 g
Spurenelementlösung (vgl. 2.3.1)	1 mL
H ₂ O	ad 1 L

Einstellung des pH-Wertes auf 6,0 mit 1 N NaOH.

2.4.2 SNL-Agar

Dem SNL-Medium (vgl. 2.4.1) wurde für die Kultivierung auf Platten 15 g/L Agar-Agar zugesetzt.

2.4.3 SNL- β,β -Carotin-Agar

Für 500 mL:

200 mg β,β -Carotin und 20 g Tween 80 wurden in ~ 200 mL Dichlormethan gelöst. Das Lösungsmittel wurde zum großen Teil mittels Rotationsverdampfer abgezogen (vgl. 2.3.2) und der Rückstand in 100 mL Wasser aufgenommen. Der Rest des Lösungsmittels wurde gänzlich entfernt.

Der SNL-Agar wurde gemäß 2.4.2 bzw. 2.4.1 hergestellt, jedoch lediglich auf ein Volumen von 400 mL aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurden die 100 mL β,β -Carotin-Lösung steril in den ~ 60 °C heißen Agar filtiert.

2.4.4 LB-Medium (Miller) bzw. LB_{amp}-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	ad 1 L

2 Materialien und Methoden

Zur Herstellung von LB_{amp}-Medium wurde eine Ampicillin-Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mg/mL hergestellt und sterilfiltriert. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei - 20 °C gelagert. Das LB_{amp}-Medium fand stets Verwendung mit einer Ampicillin-Konzentration von 50 µg/mL. Zur Einstellung der Zielkonzentration wurde z. B. 1 L Medium mit 1 mL Ampicillin-Stammlösung versetzt.

2.4.5 LB-Agarplatten bzw. LB_{amp}-Platten

LB-Medium (Miller)	1 L
Agar-Agar	15 g

Die Herstellung und Verwendung der Ampicillin-Stammlösung erfolgte wie unter 2.4.4. Die Ampicillin-Stammlösung wurde dem Agar nach dem Abkühlen auf ~ 60 °C zugeführt. Die Lagerung der Platten erfolgte im Kühlschrank.

2.4.6 SOC-Medium (Dower et al., 1988)

Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM
H ₂ O	ad 1 L

2.4.7 YPD-Medium³

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
H ₂ O	ad 900 mL

Die Lösung wurde 20 min autoklaviert. Nach dem Autoklavieren erfolgte der Zusatz von 100 mL steriler 10x D-Lösung (vgl. 2.3.14).

³Sämtliche Lösungen, Medien und Methoden für die *Pichia*-Arbeiten mit Ausnahme von Kap. 2.21 wurden folgenden Werken entnommen: 1. Instruction Manual für den Multi-Copy *Pichia* Expression Kit Version F; 2. Schimpf, 2002; 3. Higgins et al., 1998)

2.4.8 YPD-Agarplatten

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Agar-Agar	20 g
H ₂ O	ad 900 mL

Die Lösung wurde 20 min autoklaviert. Nach dem Autoklavieren erfolgte der Zusatz von 100 mL steriler 10x D-Lösung (vgl. 2.3.14).

2.4.9 YPD-Geneticin-Agarplatten

Das Medium für die Agarplatten wurde gemäß 2.4.8 hergestellt. Die Geneticin-Stammlösung hatte eine Konzentration von 100 mg/mL. Nach dem Autoklavieren wurde die Geneticin-Stammlösung bei ~ 60 °C vor dem Gießen der Platten zugesetzt. Die Menge der Geneticin-Stammlösung richtete sich nach gewünschter Endkonzentration und ist Tab. 2-4 zu entnehmen.

Tab. 2-4: Zusammensetzung der YPD-Platten mit unterschiedlicher Geneticin-Konzentration

Geneticin-Endkonzentration [mg/mL]	mL Geneticin-Stammlösung pro 250 mL YPD
0,25	0,625
0,5	1,25
0,75	1,875
1,0	2,5
1,5	3,75
1,75	4,375
2,0	5,0
3,0	7,5
4,0	10,0

Die Lagerung der Platten erfolgte im Kühlschrank für 6 Monate.

2.4.10 RD- bzw. RDH-Medium

Sorbitol	186 g
H ₂ O	700 mL

Die Lösung wurde autoklaviert und anschließend im Wasserbad auf 45 °C temperiert.

Herstellung folgender auf 45 °C vorgewärmter Stammlösung:

10x D	100 mL
10x YNB	100 mL
500x B	2 mL
100x AA	10 mL
100x H	10 mL
steriles Wasser	78 mL

Für die Herstellung von RD-Medium wurde die Histidinlösung weggelassen und durch steriles Wasser ersetzt.

Die Sorbitollösung wurde zur Stammlösung gegeben. Die Lagerung des Flüssigmediums erfolgte für mehrere Monate bei 4 °C.

2.4.11 RDB- bzw. RDHB-Agarplatten

Sorbitol	186 g
Agar	20 g
H ₂ O	700 mL

Die Lösung wurde autoklaviert und anschließend auf 60 °C temperiert. Es erfolgte der Zusatz der auf 45 °C erwärmten Stammlösung (vgl. 2.4.10). Für die Herstellung von RDB-Platten wurde die Stocklösung ohne Histidin-Zusatz hergestellt. Die Platten wurden bei 4 °C für mehrere Monate gelagert.

2.4.12 RD- bzw. RDH-Top-Agarose

Sorbitol	186 g
Agarose	10 g
H ₂ O	700 mL

2 Materialien und Methoden

Die Lösung wurde autoklaviert und anschließend auf 60 °C temperiert. Es erfolgte der Zusatz der auf 45 °C erwärmten Stammlösung (vgl. 2.4.10). Für die Herstellung von RD-Top-Agarose wurde die Stammlösung ohne Histidin-Zusatz hergestellt. Die Lösung wurde bis zum Gebrauch auf 45 °C temperiert.

2.4.13 SOS-Medium

Sorbitol	1 M
YPD	0,3fach
CaCl ₂	10 mM

2.4.14 MD-Agarplatten

15 g Agar und 800 mL Wasser wurden autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 60 °C mit folgenden Lösungen versetzt:

10x YNB	100 mL
500x B	2 mL
10x D	100 mL

2.4.15 MM-Agarplatten

15 g Agar und 800 mL Wasser wurden autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 60 °C mit folgenden Lösungen versetzt:

10x YNB	100 mL
500x B	2 mL
10x M	100 mL

2.5 Anzuchtverfahren für *E. coli*

2.5.1 Stammhaltung von *E. coli* TOP 10F'

Der native Stamm ohne Vektor wurde auf LB-Agarplatten gehalten. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die Lagerung der Kulturen erfolgte im Kühlschrank für 2 Wochen.

2.5.2 Stammhaltung von *E. coli* TOP 10F'-Kulturen mit Vektoren

Sämtliche zum Einsatz gekommenen Vektoren verfügten über eine Ampicillin-Resistenz. Entsprechend wurden die Stämme auf LB_{amp}-Platten mit einer Antibiotikumkonzentration von 50 µg/mL gehalten. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank für 2 Wochen.

2.5.3 Übernachtkulturen (ÜNs)

Es wurden 5 mL LB-Medium im Reagenzglas mit einer Einzel-Kolonie von einer frischen LB-Platte angeimpft. Das Wachstum erfolgte für mindestens 7 h max. über Nacht bei 200 rpm und 37 °C. Bei Plasmid-tragenden Stämmen erfolgte der Zusatz von 50 µg/mL Ampicillin.

2.5.4 Glycerolkulturen von *E. coli*

Die zu lagernden Stämme wurden als ÜNs in LB-Medium angezogen. Bei Plasmid-tragenden Stämmen erfolgte der Zusatz von 50 µg/mL Ampicillin. Jeweils 850 µL Kultur wurde mit 150 µL Glycerol versetzt, gut durchmischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei – 70 °C.

2.6 Anzuchtverfahren für *Pichia pastoris* GS115

2.6.1 Stammhaltung von *Pichia pastoris* GS115

Der native Stamm wurde auf YPD-Platten angezogen. Die Inkubation erfolgte bei 28-30 °C in der Regel für 2 Tage bis die Kolonien gut sichtbar waren. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank für 2 Wochen.

2.6.2 Stammhaltung der rekombinanten *Pichia pastoris*-Stämme

Von den verschiedenen rekombinanten Stämmen wurden sogenannte Masterplatten angelegt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 50 Kolonien eines Stammes auf eine YPD-Platte aufgebracht. Diese Platten wurden bei 30 °C für 1-2 Tage bis zum Erscheinen gut sichtbarer Kolonien inkubiert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank für 2 Wochen. Die Masterplatten bildeten den Ausgangspunkt für jedes Screening.

2.6.3 Glycerolkulturen von *Pichia pastoris*

Die zu lagernden *Pichia pastoris*-Stämme wurden in 10-15 mL YPD-Medium in einem 50-mL-Falcon-Tube über Nacht bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Die Zellen wurden bei 2000 g für 5 min geerntet und anschließend in YPD+15% (v/v) Glycerol resuspendiert, so dass die OD₆₀₀ zwischen 50-100 lag. Die Ansätze wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei – 70 °C.

2.7 Anzuchtverfahren für *Pleurotus eryngii*

2.7.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *Pleurotus eryngii* erfolgte auf SNL- β,β -Carotin-Agarplatten (vgl. 2.4.3). Die Petrischalen wurden mit einem ~ 1 cm² großen, gut bewachsenen Agarstück angeimpft. Die Platten wurden zum Schutz gegen das Austrocknen auf Grund des längeren Wachstums mit Parafilm versiegelt und entgegen der gängigen mikrobiologischen Laborpraxis nicht über Kopf kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 24 °C für 2-3 Wochen, bis die Platten gut bewachsen waren. Die Lagerung der Kulturen erfolgte für maximal 6 Monate bei 4 °C im Kühlschrank

2.7.2 Anzucht der Vorkulturen

Die Vorkulturen wurden in einem 300-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben mit 100 mL SNL-Medium (vgl. 2.4.1) mit einem ~ 1 cm² großen Agarstück der Stammhaltungskultur angeimpft. Die Homogenisierung erfolgte mit einem Ultraturrax-Stab bis das Agarstück gleichmäßig feinverteilt im Kulturkolben vorlag. Die Kultivierung erfolgte unter Lichtausschluss bei 24 °C und 150 rpm in einem Schüttler für 1 Woche (Langhoff, 2002).

2.7.3 Anzucht der Hauptkulturen

Die Hauptkulturen wurden in 500-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben mit 250 mL SNL-Medium (vgl. 2.4.1) geführt. Angeimpft wurden die Kolben mit ~ 10 mL frisch homogenisierter Vorkultur, die mit einem sterilem 50-mL-Falcon-Tube abgemessen wurde. Die Kultivierung erfolgte unter Lichtausschluss bei 24 °C und 150 rpm. Die

Ernte fand in Abhängigkeit von der Aktivität des Zielenzym in der Regel am 10. Tag statt (Langhoff, 2002).

2.8 Anzuchtverfahren für *Marasmius scorodonius* CBS 137.86

Der Stamm *Marasmius scorodonius* CBS 137.86 wurde von der niederländischen Stammsammlung für Pilzkulturen, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Baarn (List of cultures 1994) bezogen.

2.8.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *Marasmius scorodonius* erfolgte auf SNL- β,β -Carotin-Agarplatten (vgl. 2.4.3). Die Petrischalen wurden mit einem $\sim 1 \text{ cm}^2$ großen, gut bewachsenen Agarstück angeimpft. Die Platten wurden auf Grund des längeren Wachstums zum Schutz gegen das Austrocknen mit Parafilm versiegelt und entgegen der gängigen mikrobiologischen Laborpraxis nicht über Kopf kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 24 °C für 2-3 Wochen, bis die Platten gut bewachsen waren. Die Lagerung der Kulturen erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C für maximal 6 Monate.

2.8.2 Anzucht der Vorkulturen

Die Vorkulturen wurden in einem 300-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben mit 100 mL SNL-Medium (vgl. 2.4.1) mit einem $\sim 1 \text{ cm}^2$ großen Agarstück der Stammhaltungskultur angeimpft. Die Homogenisierung erfolgte mit einem Ultraturrax-Stab bis das Agarstück gleichmäßig feinverteilt im Kulturkolben vorlag. Die Kultivierung erfolgte unter Lichtausschluss bei 24 °C und 150 rpm in einem Schüttler für 1 Woche.

2.8.3 Anzucht der Hauptkulturen

Die Hauptkulturen wurden in 500-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben mit 250 mL SNL-Medium (vgl. 2.4.1) geführt. Angeimpft wurden die Kolben mit $\sim 20 \text{ mL}$ Vorkultur, die mit einem sterilen 50-mL-Falcontube abgemessen wurde. Die Hauptkulturen wurden zu Beginn des Wachstums nicht homogenisiert. Kultiviert wurde unter

Lichtausschluss bei 24 °C und 150 rpm. Die Ernte erfolgte in Abhängigkeit von der Aktivität des Zielenzym am 4. – 6. Tag.

2.9 Kulturernte von *Marasmius scorodonius* und *Pleurotus eryngii*

Der Kulturüberstand wurde von dem Mycel mittels Zentrifugation (16000 rpm = 38775 g, 1 h, 4 °C) in einer Sorvall RC28S Zentrifuge unter Verwendung eines F-16/250 Rotors getrennt vom Mycel getrennt.

2.10 Konzentrierung

2.10.1 Ammoniumsulfat-Präzipitation

Es wurden verschiedene Ammoniumsulfat-Fällungen (80%ig; 90%ig; fraktioniert: 0-30%, 30-60%, 60-75%) durchgeführt. Die erforderlichen Ammoniumsulfat-Mengen wurden Tabellenwerken entnommen (Cooper, 1981). Die feingemörserten und getrockneten Ammoniumsulfat-Portionen wurden dem Kulturüberstand kontinuierlich über einen Zeitraum von 30 min unter Rühren im Eisbad zugesetzt. Zur Lösung etwaig überfällter Proteine wurde die Lösung weitere 30 min nachgerührt. Im Falle der fraktionierten Präzipitation betrug die Nachrührzeit 1 h. Zur Sedimentation der gefällten Proteine erfolgte nach jedem Nachrühren ein 30 min Zentrifugationschritt bei 28000 rpm (100000 g). Anfänglich wurde bei sehr hohen Geschwindigkeiten zentrifugiert, um ein aufschwimmendes, weißes Pellet mit zu sedimentieren (vgl. 3.1.3.1). Da sich das weiße Pellet nicht abzentrifugieren ließ und das Ammoniumsulfat-Pellet auf Grund der hohen Kräfte nur schwer zu resuspendieren war, erfolgte ab dem 2. Experiment (80%) die Zentrifugation bei 18000 rpm (86948 g). Zur Visualisierung des Fällungserfolgs wurden sämtliche Proben dialysiert (vgl. 2.11) und die Enzymaktivität mittels Aktivitätstest bestimmt.

2.10.2 Polyethylenglykol-Präzipitation

Für die Polyethylenglykol-Fällung (PEG-Fällung) wurde eine 50%ige PEG-6000-Lösung in NaAc-Puffer (pH 5, 0,05 M) hergestellt. Die PEG-Lösung wurde unter Rühren über einen Zeitraum von 30 min zu dem im Eisbad befindlichen Kulturüberstand bis zu einer Konzentration von 16,6% in gleichmäßigen Abständen

pipettiert. Die Nachrührzeit betrug 1 h. Die Proteine wurden bei 18000 rpm (86948 g) für 30 min bei 4 °C sedimentiert und das PEG-Pellet in NaAc-Puffer resuspendiert. Die Wirksamkeit der Fällung wurde mittels Enzymtest (in NaAc-Puffer, pH 5, 0,05 M) verfolgt.

2.10.3 Konzentrierung mittels Centricon-Plus-80

Zur Konzentrierung des Kulturüberstandes (< 300 mL) sowohl von *Marasmius scorodonius* als auch von *Pleurotus eryngii* fanden Centricon-Plus-80-Einheiten mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa Verwendung. Diese Ultrafiltrationseinheiten der Firma Millipore waren mit sogenannten Biomax-Membranen ausgestattet und fassten ein maximales Probenvolumen von 80 mL. Die Zentrifugation erfolgte bei 3313 g und 4 °C in einer RT7-Plus-Zentrifuge.

2.10.4 Konzentrierung mittels Vivacell 70

Zur Konzentrierung des Kulturüberstandes (< 300 mL) von *Marasmius scorodonius* kamen z. T. Vivacell-70-Einheiten (Polyethersulfon-Membran) der Firma Vivascience mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa zum Einsatz. Sie verfügten über ein Volumen von 70 mL. Die Einheit mit 70 mL E-pure-Wasser gespült, um Glycerolreste zu entfernen. Die Zentrifugation erfolgte bei 1000 g und 4 °C in einer RT7-Plus-Zentrifuge.

2.10.5 Konzentrierung mittels Ultrafree-4-Zentrifugal-Filter und -Tube

Für die Konzentrierung oder Umpufferung sehr kleiner Probenvolumina von *M. scorodonius* wurden Ultrafree-4-Zentrifugal-Filter und -Tubes der Firma Millipore mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet, die ein Probenvolumen von 4 mL fassten. Die Filtrationseinheiten wiesen eine Biomax-Membran auf. Die Zentrifugation erfolgte bei 3313 g und 4 °C in einer RT7-Plus-Zentrifuge.

2.10.6 Konzentrierung mittels Vivacell 15R

Für die Konzentrierung kleinerer Probenvolumina (*M. scorodoni*, *P. eryngii*) wurden zusätzlich Vivacell-15R-Einheiten (Ausschlussgröße (MWCO) 10 kDa) mit Hydrosart-Membran verwendet, die ein Probenvolumen von 15 mL fassten. Die Einheiten wurden zu Beginn mit 15 mL E-pure-Wasser gespült, um Glycerolreste zu entfernen. Die Zentrifugation erfolgte bei 2537 g und 4 °C in einer RT7-Plus-Zentrifuge. Die Zeit der Zentrifugation richtete sich ebenfalls nach den Arbeitsanforderungen.

2.10.7 Konzentrierung mittels Vivaflow 200

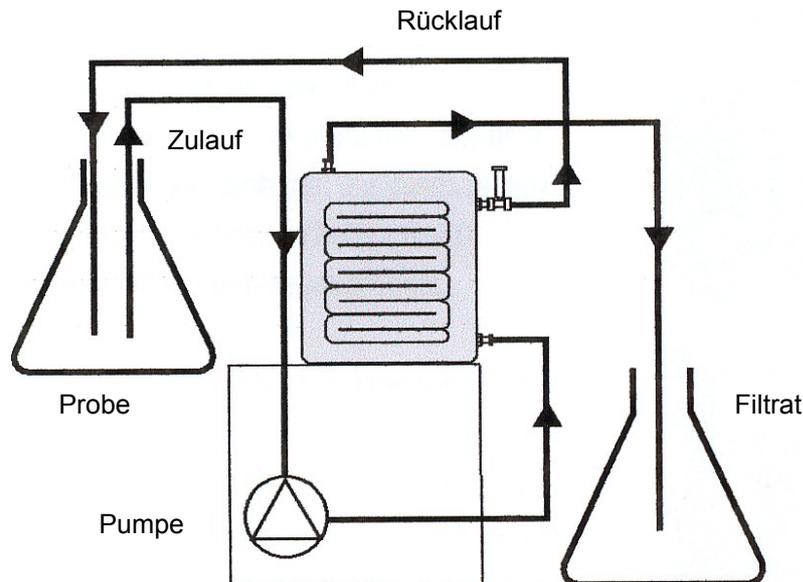


Abb. 2-1: Schematische Darstellung des Konzentrierungsvorgangs mittels Vivaflow 200 (Vivaflow 200: Technical data and operating instructions, Vivascience, modifiziert)

Die Konzentrierung großer Kulturvolumina erfolgte mit der Vivaflow-200-Einheit, (MWCO 10 kDa) ausgestattet mit einer Hydrosart-Membran.

Zu Beginn jeder Benutzung wurde die Einheit mit Wasser gespült. Zu diesem Zweck befand sich der Schlauch des Zulaufs in einem Gefäß mit 0,5 L Wasser. Der Rücklaufschlauch und der des Filtrats befanden sich in einem Abfallgefäß. Die Flussrate betrug 300 mL/min. Nachdem das Wasser durch die Einheit geleitet wurde,

wurde erneut mit Wasser gespült. Der Rücklaufschlauch befand sich jedoch mit dem Zulauf im Wasser-Vorratsgefäß. Die Flussrate betrug 300 mL/min. Es wurde solange mit Wasser gespült bis sich ~ 300 mL Wasser im Abfallgefäß befanden. Um sämtliches Wasser aus der Filtrationseinheit zu entfernen, wurde kurzfristig über den Zulauf Luft angesogen, bis sämtliches Wasser aus der Einheit verdrängt war.

Zum Aufkonzentrieren der Probe waren Zulauf und Rücklauf im Probengefäß, während sich der 3. Schlauch in einem gesonderten Abfallgefäß befand. Die Einheit wurde mit einer Flussrate von 300 mL/min solange betrieben, bis die Probe auf das Zielvolumen eingeeengt war. Zum Abschluss wurde über den Zulauf bei einer Flussrate von 20-40 mL/min für 2 min Luft angesogen, um die restliche Probe aus der Filtrationseinheit zurück zu gewinnen. Anschließend wurde letzte Proteinreste durch Spülen mit 20 mL NaAc-Puffer, pH 6, 0,05 M zurückgewonnen.

2.10.7.1 Reinigung der Vivaflow-200-Einheit

Über den Zulauf wurde 0,5 L Wasser bei einer Flussrate von 600 mL/min durch die Einheit gepumpt. Die anderen beiden Schläuche befanden sich im Abfallgefäß. Im Anschluss wurden bei einer Flussrate von 50-100 mL/min für 40 min 0,5 M NaOH durch den Konzentrator geleitet. Alle 3 Schläuche befanden sich in dem NaOH-Gefäß. Zum Abschluss dieser Phase wurde Luft durch die Einheit gesogen. Es wurde nun mit Wasser (0,5 L) gespült, in dem sich nur der Zulauf in dem Wassergefäß befand. Der Fluss betrug ebenfalls 50-100 mL/min. Daraufhin wurde mit Wasser bei einer Flussrate von 300 mL/min gespült, in dem Zulauf und Rücklauf im Vorratsgefäß waren, bis 200 mL Abfall vorhanden war. Die Lagerung der Vivaflow-200-Einheit erfolgte im 10%igen Ethanol.

2.11 Dialyse

Die Proteinproben wurden im Dialyseschlauch (VISKING[®] dialysis Tubing 20/32, 16 mm Ø, SERVA) 2 x 1 h gegen den entsprechenden vorgekühlten Puffer (je 2 L) bei 4°C dialysiert.

2.12 Proteinreinigung

2.12.1 Das FPLC-System

Bei dem in dieser Arbeit verwendete FPLC-System handelte es sich um das Biologic-Duo-Flow-Chromatography-System mit Fraktionssammler Modell 2128 der Firma Bio-Rad. Die Datenaufnahme erfolgte mittels Biologic Duo Flow Workstation. Die Detektionswellenlänge zur Aufnahme der Elutionsprofile der Proteine betrug 280 nm.

2.12.2 Ionenaustauschchromatografie

2.12.2.1 Vorversuche zur Reinigung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus *Marasmius scorodoni*

Aus dem HiTrap IEX Selection Kit (Amersham Pharmacia) wurden die DEAE Sepharose Fast Flow Säule (schwacher Anionentauscher) und die Q-Sepharose Fast Flow Säule (starker Anionentauscher) verwendet. Das Säulenvolumen betrug 1 mL, die Bindungskapazität jeweils 40 mg/mL. Die Säulen wurden mit einer Flussrate von 1 mL/min betrieben. Die Beladung der Säulen erfolgte mit Hilfe einer 200- μ L-Probenaufgabeschleife. Während des gesamten Laufes wurden unter Einsatz des Fraktionssammlers 1-mL-Fractionen eingesammelt. Der Nachweis des Zielproteins erfolgte mittels Enzymtest (vgl. 2.16.1).

Programm zum Spülen der Testsäulchen:

1. 5 mL Startpuffer
2. 5 mL Elutionspuffer
3. 10 mL Startpuffer

Programm der Probenläufe:

1. UV-Lampe an
2. 1 mL Startpuffer
3. Autozero
4. Injektion: Spülen der Probenschleife mit 400 μ L Startpuffer
5. 5 mL Startpuffer
6. 10 mL Elutionspuffer

2.12.2.2 Scale up zur Reinigung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus *Marasmius scorodoni*

Säulenmaterial: Q-Sepharose High performance (Pharmacia Biotech)

Säulenmantel: (Pharmacia Biotech)

Säulenvolumen: 18,1 mL

Bindungskapazität: 70 mg/mL (techn. Service, persönl. Mitteilung)

Die Flussrate (NaAc-Puffer, pH 6, 0,05 M) betrug zu Beginn 4 mL/min. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde der Fluss auf 3 mL/min abgesenkt, da der Säulendruck sonst in Abhängigkeit von der Konzentrierung der Probe zu stark anstieg. Es wurden 5-mL-Fractionen gesammelt. Bei dem „2-mL-Lauf“ erfolgte die Probenaufgabe über eine 2-mL-Schleife. Bei den „10-mL-Probenläufen“ wurde das Ultrafiltrat über das Umschaltventil an Pumpe B (Port 4) aufgetragen. Das Ultrafiltrat wurde mit demselben Volumen an Arbeitspuffer verdünnt, da so die Verluste beim Auftragen auf die Säule verringert werden konnten. Um zu verhindern, dass Luft auf die Säule gelangt, wurden jeweils nur 19 mL der 20 mL verdünnter Probe auf die Säule aufgetragen.

Programm des „2-mL-Laufes“:

1. UV-Lampe an
2. 4 ml NaAc-Puffer
3. Autozero
4. Injektion: Spülen der Probenschleife mit 4 mL NaAc-Puffer
5. 75 mL NaAc-Puffer
6. Linearer Gradient über 220 mL von 0% zu 100% NaAc-Puffer + 1 M NaCl
7. 40 mL NaAc-Puffer + 2 M NaCl
8. 60 mL NaAc-Puffer

Programm des „10-mL-Laufes“:

1. UV-Lampe an
2. 20 mL NaAc-Puffer (Pumpe A)
3. Autozero
4. Injektion von 19 mL verd. Probe über Pumpe B, Port 4
5. 200 mL NaAc-Puffer (Pumpe B, Port 3)

6. Linearer Gradient über 320 mL von 0% zu 100 % NaAc-Puffer + 1 M NaCl
7. 40 mL NaAc-Puffer + 2 M NaCl
8. 60 mL NaAc-Puffer (Pumpe B, Port 3)

2.12.2.3 Reinigung der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* (Langhoff, 2002)

Säule: HiPrep 16/10 DEAE FF (Pharmacia biotech)

Säulenvolumen: 20 mL

Bindungskapazität: 80 mg/mL

Fließmittel A: 7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer, pH 4,5

Fließmittel B: 7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer, pH 3,5

Flussrate: 4 mL/min

Probenauftragsvolumen: 5 mL

Elution: 25 min 100% Fließmittel A

45 min 100% Fließmittel B

Es wurde über den gesamten Verlauf 4-mL-Fractionen gesammelt.

2.12.3 Gelfiltrationschromatographie (GFC)

2.12.3.1 Analytische GFC zur Reinigung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus *Marasmius scorodoni*

Für die analytische GFC kam eine Superdex-200-HR-10/30-Säule mit einem Säulenvolumen von 24 mL zum Einsatz (Pharmacia Biotech) (Trennbereich von 10-600 kDa).

Die Probe wurde über eine 200- μ L-Schleife aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,5 mL/min. Als Arbeitspuffer kam NaAc-Puffer (pH 6, 0,05 M) zum Einsatz. Über den gesamten Bereich wurden anfänglich 1-mL-Fractionen gesammelt. Nach der Identifizierung der aktiven Fractionen wurde die Fraktionsgröße in diesem Bereich auf 0,5 mL herabgesetzt.

Programm der analytischen GFC:

1. UV-Lampe an
2. 1 mL NaAc-Puffer (Pumpe A)
3. Autozero
4. Injektion: Spülen der 200- μ L-Schleife mit 0,3 mL NaAc-Puffer
5. 35 mL NaAc-Puffer

2.12.3.2 Präparative GFC zur Reinigung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus *Marasmius scorodoni*

Bei der präparativen GFC-Säule handelte es sich um eine selbstgegossene Säule auf der Basis von Superdex-200-Material. Das Säulenvolumen betrug 200 mL. Die Elution erfolgte unter Verwendung von NaAc-Puffer, pH 5, 0,05 M mit einer Flussrate von 1 mL/min⁴. Nach 90 mL begann das Sammeln von Fraktionen mit einer Fraktionsgröße von 4 mL.

Programm der präparativen GFC:

1. UV-Lampe an
2. 2 mL NaAc-Puffer
3. Autozero
4. Injektion: Spülen der 2-mL-Schleife mit 6 mL Puffer
5. 250 mL NaAc-Puffer

2.12.3.3 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels GFC

Standardproteine (HMW und LMW Gel Filtration Calibration Kit, Pharmacia Biotech) wurden auf die Säule aufgetragen. Die Retentions-Koeffizienten (K_{av}) der Proteine wurden gegen die Logarithmen ihrer Molekulargewichte aufgetragen. Die Kalibrierfunktion wurde mit Hilfe der linearen Regression erhalten.

⁴ Anfänglich wurde als Laufpuffer für alle Arbeiten NaAc-Puffer, pH 5,0, 0,05 M verwendet. Auf Grund der Erfahrungen mit der IEC wurde der pH-Wert auf 6 erhöht (vgl. Diskussion) und für die GFC beibehalten.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

V_e : Elutionsvolumen [mL]

V_0 : Ausschlussvolumen [mL]

V_t : Gesamtvolumen [mL]

Für die Ermittlung des Ausschlussvolumens wurde auf die Verwendung von Blue Dextran 2000 verzichtet, da sich dieser Farbstoff unter den gewählten Bedingungen nur sehr schwer von der Säule eluieren ließ. Das Standardprotein Thyroglobulin wurde zur Bestimmung des Ausschlussvolumens herangezogen. Ein geringer Prozentsatz dieses Proteins eluiert als Dimer mit einem Molekulargewicht von 1338 kDa von der Säule, das somit weit außerhalb des Trennbereiches der Säule liegt. Das Elutionsvolumen dieses Dimers entspricht dem Ausschlussvolumen der Superdex 200 Säule (persönl. Mitteilung, tech. Service Pharmacia Biotech).

2.12.4 Säulenreinigung/pflege

Sollten die zur Verwendung gekommenen Säulen vorab zur Proteinreinigung anderer Organismen Verwendung gefunden haben, erfolgte vor der Benutzung eine Reinigung der Säule, um Kreuzkontaminationen der Zielproben mit Fremdproteinen anderer Organismen zu verhindern.

2.12.4.1 Reinigung der Q-Sepharose-Säule

Die Säule wurde rückwärts gespült. Begonnen wurde mit 1 N NaOH für 2 h mit einer Flussrate von 40 cm/h, was einer Flussrate von 1,3 mL/min entsprach. Dieser Schritt diente zur Entfernung hydrophobgebundener Proteine und Lipoproteinen. Im Anschluss wurde mit 4 Säulenvolumina Arbeitspuffer (NaAc, pH 6, 0,05 M) bei einer Flussrate von 3 mL/min gespült. Zur Entfernung sehr stark gebundener, hydrophober Proteine, Lipoproteine und Lipide schloss sich eine Reinigung mit 4 Säulenvolumina 70%igem Ethanol bei einer Flussrate von 10 cm/min an, was einer Laufgeschwindigkeit von 0,34 mL/min entsprach. Abschließend wurde mit 3

Säulenvolumina mit dem Arbeitspuffer (3 mL/min) gespült. Anschließend wurde die Säule in Laufrichtung eingebaut und mit dem Arbeitspuffer äquilibriert.

2.12.4.2 Reinigung der Superdex 200-Säule HR 10/30

Die Säule wurde bei einer Flussrate von 0,5 mL /min mit einem Säulenvolumen 0,5 M NaOH gespült. Anschließend wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina NaAc-Puffer, pH 6, 0,05 M bei einer Flussrate von 0,5 mL/min äquilibriert.

2.13 Proteinbestimmungsmethoden

2.13.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Für die Proteinbestimmung nach Lowry kam der *DC*-Protein-Assay (Bio-Rad) zum Einsatz, der aus zwei Lösungen bestand. Reagenz A bestand aus einer alkalischen Kupfertartrat-Lösung, Reagenz B enthielt verdünntes Folin-Reagenz. Der Test basierte auf einer von Lowry entwickelten Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes unter Verwendung eines Folin-Phenol-Reagenzes (Lowry et al., 1951; Peterson et al., 1979). Der Anwendungsbereich des Testsystem lag bei 0,2 – 1,5 mg/mL Protein. Waren die Proben zu hoch konzentriert, so wurden sie mit Wasser entsprechend verdünnt. Zu 20 µL Probe wurde 100 µL Reagenz A gegeben und sofort durchmischt. Es erfolgte der Zusatz von 800 µL Reagenz B. Nach einer Wartezeit von 15 min wurden die Proben spektralfotometrisch bei 750 nm gegen Wasser als Blindwert vermessen. Mittels Standardproteinlösungen (0,2 mg – 1,2 mg/mL BSA) wurde mit den Mitteln der linearen Regression eine Kalibriergerade erstellt.

2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.14.1 Standardproteintrennung im SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970)

Für die Gelelektrophorese kam das Mini-Twin-System (1 mm, 8,6x7,7 cm) der Firma Biometra GmbH (Göttingen) zum Einsatz.

Das Trenngel enthielt je nach Anforderung unterschiedliche Acrylamidgehalte. Das Sammelgel wies stets einen 4 %igen Acrylamidgehalt auf.

2 Materialien und Methoden

Stammlösungen für das SDS-Gel:

Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS):

400 g APS
E-pure-Wasser ad 1L

Die APS-Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Lower Tris, 4x:

Tris base 181,7 g
SDS 4,0 g
E-pure-Wasser ad 1 L

Einstellung des pH-Wertes mit HCl auf 8,8. Lagerung bei 8 °C im Kühlschrank.

Upper Tris, 4x:

Tris base 60,55 g
SDS 4,0 g
E-pure-Wasser ad 1 L

Einstellung des pH-Wertes auf 6,8. Lagerung bei 8 °C im Kühlschrank.

Für 2 Gele wurden folgende Stammlösungen zusammengegeben: Tab. 2-5/2-6

Tab. 2-5: Zusammensetzung der Trenngele mit unterschiedlicher Konzentration (Angaben für 2 Gele)

Acrylamid	8%	12%	16%
E-pure-Wasser	6,5 mL	5,4 mL	4,8 mL
Lower Tris, 4x	3,0 mL	3,0 mL	3,0 mL
AA/Bis ⁵	2,5 mL	3,6 mL	4,2 mL
APS	30 μ L	30 μ L	30 μ L
TEMED	15 μ L	15 μ L	15 μ L

⁵ AA/Bis: 40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)

2 Materialien und Methoden

Tab. 2-6: Zusammensetzung des Sammelgels (Angaben für 2 Gele)

Bestandteile	4%
E-pure-Wasser	1,8 mL
Upper Tris, 4x	0,75 mL
AA/Bis	0,45 mL
APS	15 μ L
TEMED	6 μ L

Nach der Zusammensetzung der Gelplatten wurde zunächst das Trenngel blasenfrei gegossen. Es erfolgte die Überschichtung des Gels mit Isopropanol zum Erhalt einer scharfen, stabilen Trennlinie. Nach einer Polymerisationszeit von ~ 45 min wurde das Isopropanol durch Spülen mit dest. Wasser entfernt. Der Plattenzwischenraum wurde vorsichtig mit einem Stück Filterpapier getrocknet. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm wurde eingesetzt. Nach einer Polymerisationszeit von ~ 30 min stand das Gel zur Verfügung.

SDS-PAGE-10x-Laufpuffer:

Trisbase	30,2 g
Glycin	144,2 g
SDS	10 g
dest. Wasser	ad 1 L

Der Laufpuffer wurde vor dem Gebrauch 1:10 verdünnt.

SDS-PAGE-Probenauftragspuffer:

1M Tris/HCl, pH 6,8	1 mL
20%ige SDS-Lösung	2 mL
Bromphenolblau	20 mg
87%iges Glycerol	2,3 mL
dest. Wasser	ad 8 mL

Probenvorbereitung:

10 µL Probe wurde mit 8 µL Auftragspuffer versetzt und für 10 min im Thermoshaker auf 96 °C erhitzt. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis gelagert und jeweils mit 2 µL 1 M DTT-Lösung versetzt. Je nach Konzentration der Probe wurde 10-15 µL dieses Ansatzes in eine Geltasche aufgetragen. Fanden derartig vorbereitete Proben keinen sofortigen Einsatz, erfolgte die Lagerung bei – 20 °C.

Probenlauf:

Nach dem Einspannen der Gele in die Gelkammer wurde diese mit 1x SDS-PAGE Laufpuffer blasenfrei befüllt, so dass die Geltaschen mit Puffer bedeckt waren. Im Anschluss daran erfolgte das Auftragen der Proben. Zum Sammeln der Proteine an der Phasengrenze zwischen Sammel- und Trenngel wurde pro Gel ein Stromstärke von 10 mA angelegt. Anschließend wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht. Die Gelelektrophorese endete mit dem Herauslaufen des blauen Farbstoffs des Probenauftragspuffers.

2.14.2 Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Lösung aus 40% Ethanol und 10% Essigsäure (konz.) und Coomassie Brilliant Blue G/R-250 (Serva) (290 mg/L) unter leichtem Schütteln für 1 h fixiert und gefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund mit einem Gemisch aus 25% Ethanol und 8% Essigsäure konz. wieder entfärbt.

SDS-Gele wurden mit einer Färbelösung aus Coomassie Brilliant Blue R-250 und IEF-Gele mit einer Färbelösung aus Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt.

2.14.3 Silber-Färbung

Für die Durchführung der Silberfärbung (Blum et al., 1987, modifiziert) wurden vor jeder Färbung folgende Lösungen jeweils frisch hergestellt:

Lösung I:	50%	Methanol
	12%	Essigsäure
	0,5 mL/L	Formaldehyd (37%ig)

2 Materialien und Methoden

Lösung II:	30%	Ethanol
Lösung III:	0,2 g/L	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5 H ₂ O
Lösung IV:	2 g/L	AgNO ₃
	0,75 mL/L	Formaldehyd (37%ig)
Lösung V:	60 g/L	Na ₂ CO ₃
	0,5 mL/L	Formaldehyd (37%ig)
	10 mg/L	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5 H ₂ O
Lösung VI:	10%	Methanol
	12%	Essigsäure

Protokoll:

1. Gel 20 min in Lösung I fixieren
2. Zweimal jeweils 10 min waschen mit Lösung II
3. Gel 1 min in Lösung III inkubieren
4. Dreimal 20 s in E-pure-Wasser waschen
5. Imprägnieren des Gels für 20 min in Lösung IV
6. Dreimal 20 s in E-pure-Wasser waschen
7. Entwickeln des Gels in Lösung V bis Proteinbanden gut sichtbar
8. Abbruch der Färbung durch Inkubation in Lösung VI für 10 min
9. Zweimal 5 min Waschen in E-pure-Wasser

2.14.4 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-Page

Auf die SDS-Gele wurde jeweils ein Proteinstandard mit aufgetragen (14,5-200 kDa, Roth). Die Logarithmen der Molekulargewichte wurden gegen ihre Retentionsfaktoren aufgetragen und das Molekulargewicht der Zielproteine durch Vergleich mit einer Regressionsgeraden abgeschätzt.

2 Materialien und Methoden

Tab. 2-7: Zusammensetzung des Proteinstandards (14,5-200 kDa, Roth)

Protein	Molekulargewicht [kDa]
Myosin (Rind)	200
β -Galactosidase (rekombinant aus <i>E. coli</i>)	119
Serumalbumin (Rind)	66
Ovalbumin (Huhn)	43
Carbonanhydrase (k. A.)	29
Trypsin Inhibitor (Soja)	20
Lysozym (Huhn)	14,3

2.14.5 SDS-PAGE mit einer IEF-Bande

Um einem Protein mit bekannten pI direkt das dazugehörige Molekulargewicht zuordnen zu können, wurde eine Probe mehrfach auf ein IEF-Gel (vgl. 2.15) aufgetragen. Das Gel wurde geteilt. Eine Gelhälfte wurde zur Identifizierung der Lage der Zielbande Coomassie- oder Silber-gefärbt. Aus der anderen Hälfte wurde auf der Höhe der Bande, das Gel ausgeschnitten (3 Spuren). Das IEF-Gel wurde mit 30 μ L SDS-Probenauftragspuffer und 4 μ L 1 M DTT versetzt und für 10 min auf 96 °C erhitzt. Im Anschluss erfolgte der sofortige Transfer auf Eis. Die IEF-Stückchen wurden in die Taschen des SDS-Gels überführt, bis die Tasche komplett gefüllt war. Die Elektrophorese erfolgte wie unter 2.14.1 beschrieben.

2.15 Isoelektrische Fokussierung

Es kamen Polyacrylamidgele (12,5 cm x 12,5 cm x 0,3 mm) mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH 3-10 bzw. 3-6) der Firma Serva zum Einsatz.

Probenvorbereitung:

Die Proben wurden, wenn eine Salzkonzentration > 50 mM erwartet wurde, mittels Ultrafiltrationseinheit (Ultrafree 4, MWG 10 kDa, Millipore bzw. Vivaspin 15R, MWG 10 kDa) mit E-pure-Wasser entsalzt. In Abhängigkeit vom Proteingehalt wurden bis zu 12 μ L Probe aufgetragen. Das Auftragsvolumen des Standards betrug 5 μ L.

2 Materialien und Methoden

Lösungen, Puffer und Standards:

Anodenflüssigkeit (Serva)

Kathodenflüssigkeit (Serva)

Kerosin als Kühlmittel

Proteinstandard: Low pl Kit, pl 2,8-6,5 (Amersham Bioscience)

Geräte und Utensilien:

Pharmacia LKB Multiphor II Flachgel-Elektrophoresekammer

Multi Drive XL Power Supply

Elektrodendochte (Serva)

Applikatorstreifen (Silikon, 3,5x2 mm, Serva)

Cryostat

Vorbereitung des IEF-Gels:

- Vorkühlung der Kühlplatte auf 0 °C
- Aufbringung von ~ 2 mL Kerosin auf die Mitte der Kühlplatte
- Auflegen des IEF-Gels mit der Deckfolienseite nach oben luftblasenfrei auf das Kerosin
- Ausrichtung der roten Markierung zur Anode (+)
- Tränken zweier passgenauer Elektrodendochte mit jeweils 0,1 mL Anoden- bzw. Kathodenflüssigkeit pro cm Docht
- Entfernung der Schutzfolie
- Auflegen der Elektrodendochte auf die markierten Stellen
- Reinigung des Applikatorstreifens mit Ethanol
- Auflegung des Applikatorstreifens mittig, passgenau und parallel zu den Elektrodendochten

IEF-Elektrophorese:

- Platzierung der Minus-Elektrode auf den Kathodendocht (schwarz), der Plus-Elektrode auf den Anodendocht (rot)
- Schließen des Gehäusedeckels der Kammer

Arbeitsbedingungen: 6 mA, 2000 V, 12 W, 3500 Vh

Nachbehandlung:

Je nach der Zielsetzung der Arbeit wurde das Gel im Anschluss an die Elektrophorese in zwei Hälften zerteilt oder aber gedrittelt. Je nach Anforderung erfolgte mit einem Gelstück eine Coomassie- und/oder Silberfärbung (vgl. 2.14.2 bzw. 2.14.3). Zur Identifizierung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme wurde mit einem Gelabschnitt eine Aktivitätsentfärbung durchgeführt. Zum Zweck der Dokumentation wurden die gefärbten Gele eingescannt.

2.15.1 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI)

Für die Ermittlung des pI wurden die zu untersuchenden Proben doppelt aufgetragen, so dass das Gel nach Beendigung der Fokussierung geteilt werden konnte. Der Proteinstandard befand sich ebenfalls auf den Gelen. Die eine Gelhälfte wurde Coomassie- oder Silber-gefärbt. Die andere Gelhälfte wurde einer Aktivitätsentfärbung unterzogen (vgl. 2.15.2). Die farblosen Banden des Aktivitätsgels wurden exakt vermessen und konnten auf diese Weise eindeutig Banden auf dem Coomassie-Gel zu geordnet werden. Die Kalibrierfunktion wurde erstellt, in dem die pI der Standardproteine gegen ihre Retentionsfaktoren R_F aufgetragen wurden. Durch lineare Regression wurden die pI der Zielenzyme ermittelt.

Tab. 2-8: Zusammensetzung des Proteinstandards für die IEF (Low pI Kit, Amersham Bioscience)

Protein	pI
Pepsinogen (k. A.)	2,8
Amyloglukosidase (k. A.)	3,5
Glucoseoxidase (k. A.)	4,15
Trypsininhibitor (k. A.)	4,55
β -Lactoglobulin A (k. A.)	5,2
Carboanhydrase B (bovin)	5,85
Carboanhydrase B (human)	6,55

2.15.2 Aktivitätsentfärbung

Herstellung eines β,β -Carotingels:

50 mL β,β -Carotinlösung (vgl. 2.3.2) wurden mit 15 mL NaAc-Puffer, pH 6, 0,05 M versetzt und mit 0,7 g Agarose für 3 min in der Mikrowelle aufgekocht. Gießen des Gels mit einer Schichtdicke von ~ 2 mm.

Das IEF-Gel wurde mit dem β,β -Carotingel überschichtet, beschwert (800 g) und bei 27 °C für 2-4 h inkubiert. Zur Dokumentation wurde das β,β -Carotingel eingescannt.

2.16 Biochemisch-analytische Methoden

2.16.1 Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach einem von Ben Aziz et al., 1971 entwickelten, photometrischen Aktivitätstest, der von Langhoff, 2002 modifiziert und für diese Arbeit den gegebenen Umständen angepasst wurde. Die Abnahme der Extinktion einer β,β -Carotin-haltigen Probenlösung wurde bei 450 nm verfolgt. 1,5 mL der Probenlösung wurden im Photometer (Perkin Elmer, Lambda 12) für 5 min auf 27 °C in einer Quarzküvette (1 cm Schichtdicke, Hellma) im temperierbaren Küvettenhalter des Photometers vorgewärmt. Nach dem Zusatz von 100 μ L β,β -Carotin-Lösung (vgl. 2.3.2) und einer guten Durchmischung der Probe erfolgte die Detektion der Extinktionsabnahme bei 27 °C über einen definierten Zeitraum (max. 15 min). Die Messung der Enzymaktivität wurde gewöhnlich als Doppelbestimmung durchgeführt. Messreihen, die dieses Vorgehen nicht zu ließen, wurden zweifach durchgeführt.

Die Enzymaktivität berechnete sich wie folgt:

$$E_A \left[\frac{U}{mL} \right] = \frac{\Delta E [1/\text{min}] \cdot V_G [mL]}{V_P [mL] \cdot d [cm] \cdot \varepsilon \left[\frac{L}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]} \cdot 1000000$$

- ΔE : Extinktionsabnahme pro Minute
 V_G : Gesamtvolumen in der Küvette [mL]
 V_P : Probenvolumen [mL]

- d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)
- ε : molarer Extinktionskoeffizient von β,β -Carotin in Wasser
(95000 L mol⁻¹cm⁻¹, λ = 450 nm, (S. Langhoff, 2002))

2.16.1.1 Temperaturoptimum

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde konz. Kulturüberstand mit Arbeitspuffer so weit verdünnt, dass die Messung im linearen Bereich der Extinktionsabnahme stattfinden konnte. Die Probe wurde für 5 min im temperierbaren Küvettenhalter des Photometers vorgewärmt und gemäß 2.16.1 vermessen.

2.16.1.2 pH-Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde konz. Kulturüberstand (Ultraretentat) mit den entsprechenden Arbeitspuffern so weit verdünnt, dass die Messung im linearen Bereich der Enzymaktivität des Enzyms stattfinden konnte. Die pH-Werte der eingesetzten Pufferlösungen wurden gemäß 2.3.3 und 2.3.4 eingestellt.

2.16.1.3 Optimale Pufferkonzentration

Die optimale Pufferkonzentration wurde ermittelt, in dem ein geringes Volumen Ultraretentat so weit mit den entsprechenden Arbeitspuffern verdünnt wurde, so dass im linearen Messbereich des Enzyms gemessen wurde.

2.16.1.4 NaCl-Toleranz

Zur Ermittlung der NaCl-Toleranz wurde das Ultrafiltrat mit NaAc-Puffern, pH 6, 50 mM versetzt, die unterschiedliche Konzentrationen an NaCl (0 M; 0,25 M; 0,5 M; 0,75 M; 1 M) enthielten.

2.16.1.5 Wasserstoffperoxid-Einfluss

Der H₂O₂-Einfluss wurde untersucht, in dem direkt zum Enzymtest, d. h. zum Zeitpunkt der β,β -Carotinzugabe, 10 μ L einer 0,02 M H₂O₂-Lösung gegeben wurde.

Als Arbeitspuffer fand NaAc-Puffer, 0,05 M, pH 6 Verwendung. Als Blindwert wurde der Arbeitspuffer genauso behandelt wie die mit Puffer versetzte Probe.

2.16.1.6 Aktivitätsbestimmung der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*

Der von Langhoff (2002) für die polyvalente Peroxidase entwickelte Test verlief analog zu 2.16.1. Die Temperatur betrug allerdings 34 °C. Als Puffer diente ein Gemisch aus 100 mM Citronensäure/ 200 mM Dinatriumhydrogenphosphat (pH 3,5).

2.16.2 Massenspektrometrische Analyse

Die mittels IEC und GFC aufgereinigten Proteine MsP1 und MsP2 wurden nach Hydrolyse durch Trypsin massenspektrometrisch analysiert. Ein Q ToF II-Massenspektrometer (Micromass) mit Nanospray-Ionenquelle und goldbeschichteten Kapillaren (Protona, Odense) diente zur Elektrospray-Massenspektrometrie. Dabei wurden mehrfach geladene Molekülionen vom Quadrupol-Analysator selektiv in die Kollisionszelle zur kollisionsinduzierten Fragmentierung überführt. Die gebildeten Tochterionen wurden mittels orthogonalem Flugzeit-(*time of flight*)-Analysator getrennt und die aufgenommenen MS-MS-Spektren nach Verstärkung zur Sequenzbestimmung der tryptischen Peptide verwendet.

2.16.3 UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-Spektren wurden bei einer Scangeschwindigkeit von 60 nm/min im Bereich von 330-650 nm aufgenommen. 10 µL aufgereinigtes F19-Enzym wurde mit 90 µL NaAc-Puffer, pH 6 0,05 M versetzt. Der Blindwert bestand aus reinem NaAc-Puffer, pH 6. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette.

2.16.4 Kinetik des β,β -Carotin-Abbaus

50 mL Kulturüberstand wurde mit 50 mL Citronensäure/Na₂HPO₄-Puffer (19,6 mM/ 40,8 mM) pH 5 gemischt. Das Gemisch wurde mit 10 mL β,β -Carotin-Lösung (vgl. 2.3.2) versetzt, was einer Menge von 1 mg β,β -Carotin entsprach. Die Inkubation

erfolgte bei 27 °C und 50 rpm unter Lichtausschluss. Der β,β -Carotin-Abbau wurde fotometrisch bei 450 nm verfolgt.

2.16.5 MALDI-TOF-Massenspektroskopie

Die Massenspektren wurden am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie (HKI), Jena an einem Bruker ultraflex TOT/TOF Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics (Bremen) gemessen. Die Proben wurden in einer Dried-Droplet-Präparation mit Sinapinsäure als Matrix bei einer Beschleunigungsspannung von 20kV im Linearmodus gemessen.

2.17 Western-Blot

Der Western-Blot wurde in einer Semi-dry Fast-Blot-Apparatur (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Eine Protran Nitrocellulose-Membran BA 85, 0,45 μm (Schleicher & Schüll) und Blottingpapier GB 003 (Schleicher & Schüll) wurden auf Gelgröße zugeschnitten. Membran und Blottingpapier wurden im Transferpuffer (80% SDS-Laufpuffer + 20% Methanol) für mindestens 10 min äquilibriert. Gel und Membran wurden von Anode zu Kathode folgendermaßen plziert: 3 Lagen Blottingpapier → Nitrocellulosemembran → SDS-Gel → 3 Lagen Blottingpapier. Es wurde darauf geachtet, dass zwischen Membran und Gel keine Luftblasen verblieben. Der Blot erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Membran für 2 h.

Die Membran wurde für 6-10 h mit TBT + 5% Milchpulver bei 4 °C blockiert. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper⁶ in TBT + 5% Milchpulver 1:1000 verd. erfolgte über Nacht in Folie eingeschweißt bei 4 °C im Kühlraum unter leichtem Schütteln. Es schloss sich ein Waschschrift mit TBT 2 x 30 min an. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Ziege Anti-Kaninchen, Sigma), der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war. Die Membran wurde mit dem 2. Antikörper 1:2000 verd. in TBT + 5% Milchpulver für 1 h bei 37 °C in Folie geschweißt geschüttelt. Ein Waschschrift 2 x 30 min mit TBT schloss sich an. Für 5 min wurde die Membran mit Phosphatase-Puffer äquilibriert. Die Entwicklung des Blots erfolgte

⁶ Der 1. Antikörper wurde von M. J. Martinez, Centro de Investigacions Biológicas (CSIC), Madrid zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um einen polyklonalen Antikörper gegen die polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*.

2 Materialien und Methoden

mit 10 mL Phosphatase-Puffer dem 35 μ L BCIP und 45 μ L NBT zugesetzt waren und wurde abgebrochen, nachdem klare Banden sichtbar wurden. Der Blot wurde mit E-pure-Wasser gespült, getrocknet und vor Licht geschützt aufbewahrt.

2.17.1 Verwendete Western-Blot-Lösungen und –Puffer

TBT:

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
0,1 %	Tween 20

Phosphatase-Puffer :

100 mM	Tris, pH 9,5
100 mM	NaCl
25 mM	MgCl ₂

BCIP gelöst :

BCIP wird mit einer Konzentration von 50 μ g/mL in E-pure-Wasser gelöst.

NBT gelöst:

NBT wird mit einer Konzentration von 75 μ g/mL in 70% DMF gelöst.

2.18 Molekularbiologische Methoden

2.18.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Präparation von Plasmid- oder Fragment-DNA wurde nach Sambrook et al. (2001) durchgeführt. Dazu wurde die Extinktion (E) einer Probe bei 260 nm photometrisch bestimmt. $E_{260} = 1$ entspricht dabei etwa 50 ng/ μ L doppelsträngiger DNA.

Geringe DNA-Gehalte wurden über ein analytisches Agarosegel mittels DNA-Quantifizierungsmarker (500 bp bzw. 1000 bp, 100 ng/ μ L) abgeschätzt, in dem 25, 50, 75 und 100 ng des Standards auf das Gel aufgebracht wurden. Es fand ein Vergleich der Bandenintensitäten statt.

2.18.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Für die analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gelelektrophoresen nach Sambrook et al. (2001) durchgeführt. In Abhängigkeit der Größe der zu trennenden Fragmente wurden Gele mit unterschiedlicher Konzentration verwendet. 1-1,2%ige Agarosegele kamen für Fragmente < 2 kb zum Einsatz, 0,8%ige Gele für Fragmente > 2 kb. Die Agarose wurde in 1x-TAE-Puffer (vgl. 2.3.6) suspendiert, bis zum vollständigen Lösen in der Mikrowelle aufgekocht, auf etwa 60 °C abgekühlt, mit 0,5 µL/10 mL Ethidiumbromid-Lösung versetzt und anschließend in die Gelvorrichtung mit darüber hängendem Kamm gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die Dauer und angelegte Spannung richtete sich nach der Größe der Gele (80-140 V). Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Als Standard zum Größenvergleich der aufgetrennten DNA-Fragmente diente die „1kb DNA Leiter“ der Firma New England BioLabs. Die DNA wurde durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht (Anregung bei 312 nm, UV-Transilluminator Vilber-Lourmat TFX-20.M, Torcy, Frankreich). Die digitale Dokumentation der Agarosegele erfolgte mit einer Anlage der Firma INTAS (Göttingen, digitale Kamera mit Videoprinter P90, Mitsubishi (Ratingen)).

2.18.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei den durchgeführten PCRs kam die HotStarTaq DNA Polymerase der Firma Qiagen zum Einsatz, die zu Beginn einen Aktivierungsschritt bei 95 °C für 15 min benötigte. Im Anschluss folgte ein Denaturierungsschritt bei 94 °C für 1 min, ein Anlagerungsschritt für die Primer für 1 min und ein Elongationsschritt von 2 min bei 72 °C. Diese drei Schritte wurden 30-40x wiederholt. Abschließend fand ein Elongationsschritt von 10 min bei 72 °C statt. Bis zur Entnahme der PCR-Produkte aus den Cyclern wurden die Proben bei 4 °C gelagert. Die Hybridisierungstemperatur der einzelnen Primerkombinationen wurde empirisch ermittelt. Ausgangspunkt für die Wahl der Hybridisierungstemperatur stellte die jeweils vom Hersteller (Roth) der Primer mitgelieferte Schmelztemperatur nach der „2+4-Regel“ dar.

Die eingesetzten dNTPs stammten von der Firma Roth. Die einzelnen Bestandteile (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) wurden getrennt voneinander beschafft und

anschließend zu gleichen Anteilen (10 mmol/μL dNTPs) zusammenpipettiert. Der dNTP-Mix wurde in 20-μL-Portionen aliquotiert und bei – 20 °C gelagert.

2.18.3.1 Analytische PCR

Analytische PCRs wurden im 20-μL-Maßstab in 200-μL-Cups (Brandt) durchgeführt. Sie dienten dazu, unbekannte Primerkombinationen auf ihren Erfolg hin zu testen. Sie wurden anfänglich in einem einfachen PCR-Cycler (Eppendorf) mit unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen durchgeführt. Später erfolgte die Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur im Gradienten-Cycler (Eppendorf). Der Gradient umfasste in der Regel 10 °C. Die einzusetzende Template-Menge wurde empirisch ermittelt, in dem zu Beginn unterschiedliche Konzentrationen zum Einsatz kamen. Ein 20-μL-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Template	variabel
dNTPs	0,4 μL
10x PCR-Puffer	2 μL
Primer a	1 μL
Primer b	1 μL
HotStarTaq	0,1 μL
E-pure-Wasser	ad 20 μL

Wurden mehrere PCR-Ansätze durchgeführt, wurde ein Master-Mix angesetzt, der in der Regel alle Bestandteile des Ansatzes bis auf das Template enthielt.

2.18.3.2 Präparative PCR

Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen wurden im Anschluss an die Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur 50-μL-PCRs in 500-μL-Cups durchgeführt. In Abhängigkeit von der Effektivität und der Intention der PCR wurden pro Fragment 3-6 Ansätze hergestellt. Zeigte sich, dass die Ausbeute der PCRs zu gering war, wurde das Zielfragment der 1. PCR als Template für eine 2. PCR eingesetzt. Abhängig von der Reinheit des 1. PCR-Produktes wurde das Amplifikat entweder über eine

2 Materialien und Methoden

Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Gel-Elution gereinigt oder der PCR-Ansatz diente direkt als Template für die 2. PCR. ein 50- μ L-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Template	variabel
dNTPs	1 μ L
10x PCR-Puffer	5 μ L
Primer a	2,5 μ L
Primer b	2,5 μ L
HotStarTaq	0,3 μ L
E-pure-Wasser	ad 50 μ L

Es wurde für die einzelnen Ansätze jeweils ein Master-Mix verwendet (vgl. 2.18.3.1).

2.18.3.3 PCR-Screening der *Pichia*-Klone

Eine Einzel-Kolonie wurde in 10 μ L Wasser resuspendiert und mit 5 μ L Lyticase-Lösung (5 U/ μ L) bei 30 °C für 10 min inkubiert. Die Probe wurde anschließend bei – 70 °C für 10 min gefroren. 5 μ L dieser Lysate wurden in einer präparativen PCR gemäß 2.18.3.2 eingesetzt.

2.18.4 Plasmidisolierung

2.18.4.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab

Kleine Plasmidmengen wurden mit dem Plasmid DNA Purification Kit der Firma Machery-Nagel isoliert. Die Zellen einer < 5-mL-Kultur wurden bei max. Drehzahl abzentrifugiert und in einem entsprechenden Arbeitspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels alkalischer Lyse in Anwesenheit von SDS. Die vorhandene RNA wurde mittels RNase hydrolysiert. Zelltrümmer und SDS-Präzipitat wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine spezielle NucleoSpin[®]Plasmidsäule aufgetragen, an der die Plasmid-DNA band. Verunreinigungen wie Salze, Metaboliten und lösliche zelluläre Makromoleküle wurden durch einen Waschschriff mit einem ethanolischem Puffer eliminiert. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte unter schwach ionischen Bedingungen entweder

mit dem im Kit gelieferten Elutionspuffer (Tris-HCl-Puffer) oder mit E-pure-Wasser (pH 7,4).

Die genaue Durchführung ist dem Plasmid-DNA Purification User Manual, March 2002/Rev. 01 der Firma Machery-Nagel, S. 10 ff. zu entnehmen.

2.18.4.2 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab

Größere Plasmidmengen (bis zu 100 µg Plasmid-DNA) wurden mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen) isoliert. Das Arbeitsprinzip dieses Kits gleicht dem für die analytische Plasmidisolierung (vgl. 2.18.4.1).

Der Zielstamm wurde frisch auf die entsprechende LB_{amp}-Agarplatte (50 µg/mL) ausgestrichen. Ausgehend von dieser Platte wurde eine 5-mL-ÜN im RG angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler. Mit dieser ÜN wurde die Hauptkultur (100 mL LB_{amp}/ 500 mL Erlenmeyer-Enghalskolben) mit einem Verhältnis 1/500-1/1000 angeimpft. Das Wachstum erfolgte über Nacht bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer Zelldichte von ~ 3-4x10⁹ Zellen. Anschließend erfolgte die Zellernte mittels 50-mL-Falcon-Tubes durch Zentrifugation in der RT7-Plus-Zentrifuge bei 3313 g. Um die Lysis-Bedingungen zu optimieren, wurde (entgegen dem Herstellerprotokoll) die Menge der Puffer P1, P2 und P3 verdoppelt. Die Elution der Plasmid-DNA von der Säule erfolgte mit dem im Kit gelieferten Elutionspuffer EB (Tris-HCl-Puffer).

Die genaue Durchführung ist dem Qiagen Plasmid Purification Handbook Sept. 2000, S. 16-17 zu entnehmen.

2.18.5 DNA-Fragmentisolierung (Gel-Elution)

Über Agarose-Gelelektrophorese gereinigte DNA- bzw. PCR-Fragmente wurden isoliert, in dem die Zielbanden mittels UV-Licht visualisiert und ausgeschnitten wurden. Anschließend kamen kommerziell erhältliche Kits zur Gel-Elution zum Einsatz, die alle nach demselben Prinzip arbeiteten. Das Agarosestück wurde mit einem Puffer, der chaotrophe Salze enthielt, 50 °C in Lösung gebracht und

anschließend auf eine spezielle Kieselgel-Säule aufgetragen. Verunreinigungen wie Primer, Salze und Makromoleküle wurden durch einen Waschschrift mit einem ethanolischem Puffer eliminiert. Die Elution der Ziel-DNA von den Säulchen erfolgte unter schwach ionischen Bedingungen entweder mit dem im Kit mitgeliefertem Elutionspuffer (Tris-HCl Puffer) oder mit E-pure-Wasser (pH 7,4).

DNA-Fragmente < 4 kb wurden mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben (MinElute™ Handbook, April 2001, S.19 ff.) isoliert. DNA-Fragmente > 4 kb wurden mit dem Kit NucleoSpin® Extract (Machery-Nagel) gemäß User Manual March 2002/Rev. 01, S. 11 ff. isoliert.

2.18.6 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonucleasen

Zur analytischen und präparativen DNA-Spaltung kamen Restriktionsenzyme der Firma New England BioLabs zum Einsatz. Diese wurden entsprechend den Herstellerangaben dosiert (1 U/1 µg DNA). Die Inkubation erfolgte für 1-3 h bei 37 °C im Thermoshaker. Optimale Reaktionsbedingungen wurden durch den Zusatz von mitgelieferten Reaktionspuffern geschaffen. Bei der Durchführung eines Doppelverdaus wurde der günstigste Arbeitspuffer (100% Enzymaktivität) gewählt. Alternativ hierzu wurden die Verdaue z. T. hintereinander mit einer dazwischen geschalteten Hitzeinaktivierung des ersten Restriktionsenzym durchgeführt.

2.18.7 Inaktivierung von Restriktionsenzymen

Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte für 20-30 min bei 65 bzw. 80 °C gemäß den Herstellerangaben im Thermoshaker. Bei hitzeresistenten Enzymen erfolgte die Inaktivierung mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung.

2.18.8 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion

Um Produktverluste zu reduzieren wurde das Probenvolumen mit H₂O auf 100 µL erhöht und Proteine durch den Zusatz von 1 Volumen (= 100 µL) Phenol-Chloroform (1:1) gefällt. Nach gründlicher Durchmischung mittels Vortexen wurde in einer

Tischzentrifuge (Eppendorf, 5415 C) bei RT und maximaler Umdrehung (15800 g) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Der Fällungsschritt wurde wiederholt.

Zur der wässrigen Phase wurde 1 Volumen eines Chloroform-Isoamylalkohol Gemisches (24:1) gegeben, gründlich gemischt und erneut in einer Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehung und RT für 5 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt.

2.18.9 Ethanol-Fällung

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc, 1/10 Volumen 0,1 M MgAc₂ und 2 Volumen gekühltem Ethanol abs. (Lagerung bei – 20 °C) versetzt. Die Präzipitation erfolgte über Nacht bei – 20 °C. Anschließend wurde bei 4 °C und maximaler Drehzahl (16060 g) 30 min in einer Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellets mit 1 mL eiskaltem 70%igen Ethanol (- 20 °C) überschichtet. Der Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 30 min wurde wiederholt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet unter der sterilen Werkbank getrocknet. Die Aufnahme der DNA erfolgte in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4). Das Puffervolumen richtete sich nach der aufzunehmenden DNA-Menge. Zur vollständigen Resuspension wurde die DNA 30 min auf Eis gestellt.

2.19 Methoden zum Gentransfer

2.19.1 Herstellung kompetenter Zellen von *Escherichia coli* (RbCl)

Der entsprechende *E. coli* Stamm wurde von einer frisch ausgestrichenen LB-Platte in eine 5-mL-Übernachtskultur im RG überimpft und bei 200 U/min und 37 °C geschüttelt. Ein 500-mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL LB-Medium wurde mit der Übernachtskultur beimpft, so dass ein OD₅₇₈-Wert von 0,05 zu Beginn der Kultivierung eingestellt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 200 U bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3. Anschließend wurde die Kultur in sterile Falcon-Tubes gefüllt und für 15 min auf Eis gestellt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation in einer RT7-Plus-Zentrifuge bei 1864 g und 4 °C. Die Zellen wurden vorsichtig in 1/3 des

2 Materialien und Methoden

Ausgangsvolumens eiskaltem RF1-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert, vorsichtig in 1/12,5 des Ausgangsvolumens eiskaltem RF2-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis gestellt. Aliquots von 200 μ L wurden in vorgekühlte Eppendorf-Cups gegeben und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70 °C.

2.19.1.1 Verwendete Puffer

RF1

Für 100 ml:

RbCl	1,2 g
MnCl ₂	0,99 g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,15 g
KAc	0,29 g
Glycerol (99%)	15 g
H ₂ O	ad 100 mL

Mit 0,2 N Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt, steril filtriert.

RF2

Für 100 mL:

MOPS	0,21 g
RbCl	0,12 g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,11 g
Glycerol (99%)	15 g
H ₂ O	ad 100 mL

Mit NaOH den pH auf 6,8 eingestellt, steril filtriert.

2.19.2 Transformation selbst hergestellter, kompetenter Zellen von *E. coli*

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, DNA (bis zu 20 μ L) zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis gelagert. Der Transformationsansatz wurde im Wasserbad für 2 min auf 42 °C erhitzt, danach zum Abkühlen sofort auf Eis gestellt. Zur Ausprägung der Resistenz wurden die Zellen mit

800 µL LB-Medium bei 200 U und 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde auf dem Selektionsmedium (LB_{Amp}, 50 µg/mL) ausplattiert (max. 300 µL) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.19.3 Ligation und Transformation mit den TA Cloning[®] Kits (Invitrogen)

2.19.3.1. Ligation und Transformation mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit Version M/R

Beim TOPO TA Cloning[®] Kit der Version M handelte es sich um ein schnelles Ligations- und Transformationsverfahren. Der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor ist mit den beiden überstehenden Deoxythymidinresten bereits mit einer Topoisomerase verknüpft. Bei Zugabe von DNA-Fragmenten mit überhängenden Desoxyadenosin-Resten kommt es zur Verknüpfung zwischen den Überhängen des Vektors und der Fragmente unter Freisetzung der Topoisomerase. Die für diese Reaktion benötigte Energie ist in einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphatrest des Vektors und dem Tyrosylrest (Tyr-274) der Topoisomerase gespeichert. Diese Bindung kann unter Freisetzung jener Energie von einem 5'-Hydroxyl-Rest angegriffen werden.

Die Ligation wurde nach dem Handbuch des Kits (Version M, 042401, 25-0184 bzw. Version R, 8 April 2004, 25-0184) durchgeführt.

Zusammensetzung des Ansatzes:

Frisches PCR-Produkt	variabel
Salzlösung	1 µL
Steriles Wasser	ad 5 µL
TOPO [®] Vektor	1 µL

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für die sofortige Weiterverarbeitung für 5 min bei Raumtemperatur stengelassen oder über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Nach Auftauen der zum Kit gehörigen kompetenten Zellen (*E. coli* TOP10F') auf Eis wurden 2 µL des Transformationsansatzes (s.o.) zugesetzt und in der Regel für 15-20 min auf Eis stehen gelassen. Es erfolgte im Wasserbad bei 42 °C ein Hitzeschock

für 30 s und der direkte Transfer auf Eis. Nach dem Zusatz von 250 μL SOC-Medium wurde zur Ausbildung der ersten Resistenz für 1 h bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurde auf das Selektionsmedium (LB_{Amp} , 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ausplattiert und ein Blau/Weiß-Screening (vgl. 2.19.3.3) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

2.19.3.2 Ligation und Transformation mit dem TA Cloning® Kit Version V

Bei dem TA Cloning® Kit der Version V kam der Vektor pCR®2.1 zum Einsatz. Die Ligation wurde nach dem Handbuch des Kits (Version V, 7. April 2004, 25-0024) durchgeführt.

Zusammensetzung des Ansatzes:

Frisches PCR-Produkt (~ 10 ng)	variabel
10x Ligationspuffer	1 μL
pCR®2.1 Vektor (25 ng/ μL)	2 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
Steriles Wasser	ad 10 μL

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlschrank. Die Transformation erfolgte nach 2.19.2 mit selbst hergestellten, kompetenten Zellen. Es schloss sich ein Blau/Weiß-Screening (vgl. 2.19.3.3) an.

2.19.3.3 Blau/Weiß-Screening

Zur Identifizierung positiver Transformanten wurde ein Blau/Weiß-Screening eingesetzt. Die verwendeten Vektoren enthielten den lac-Promotor und das LacZ'-Gen, mit der darin liegenden „multiple cloning site“ (MCS). Die verwendeten Wirtsbakterien enthielten das LacZ Δ M15 Gen. Beherbergt das Plasmid ein Insert, so ist das LacZ'-Gen unterbrochen und das N-terminale α -Fragment der β -Galaktosidase kann nicht exprimiert werden. Derartige Stämme verfügen über keine β -Galaktosidaseaktivität und bleiben bei Wachstum auf IPTG und X-Gal weiß. Stämme mit β -Galaktosidaseaktivität wachsen in Gegenwart von IPTG und X-Gal blau.

2 Materialien und Methoden

Es wurde eine X-Gal-Stammlösung (40 mg/mL) in DMF hergestellt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei – 20 °C gelagert. Eine 100 mM IPTG-Lösung wurde in Wasser angesetzt, die ebenfalls aliquotiert bei – 20 °C gelagert wurde.

Das Screening erfolgte mit dem Selektionsmedium (LB_{Amp}, 50 µg/mL). Direkt vor der Nutzung der Platten wurde jeweils 40 µL IPTG- und 40 µL X-Gal-Stammlösung auf die Platten aufgebracht und gründlich auf den Platten verteilt. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C für 30 min vorinkubiert und danach die Transformanten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

2.19.4 Ligation in die *Pichia*-Vektoren

Die Ziel-DNA-Fragmente wurden mittels NEB-T4-DNA-Ligase unter Verwendung des mitgelieferten Ligationspuffers in die beiden Vektoren pPIC3,5K und pPIC9K ligiert. Das Molverhältnis DNA/Plasmid betrug 5/1. Die Ligation erfolgte über Nacht im Kühlschrank.

2.19.5 Transformation von *Pichia pastoris* nach Spheroblastierung

2.19.5.1 Vorkulturführung

10 mL YPD-Medium wurden in einem 100-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben mit einer frischen Kolonie des Stammes *Pichia pastoris* GS115 angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 28 °C und 265 rpm. Diese Kultur konnte für mehrere Tage im Kühlschrank gelagert werden.

2.19.5.2 Hauptkulturführung

Die Kultivierung erfolgte in 500-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben mit Aluminium-Kappe, die 200 mL YPD-Medium enthielten. 3 Kolben wurden mit 5, 10 bzw. 20 µL Vorkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C und 265 rpm über Nacht.

Die Zellen wurden mit einer OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,3 geerntet, in dem sie bei Raumtemperatur und 1500 g RT7-Plus-Zentrifuge sedimentiert wurden.

2.19.5.3 Bildung der Spheroblasten

Die unter 2.19.5.2 geernteten Zellen wurden in 20 mL sterilem Wasser resuspendiert und in ein 50-mL-Falcon-Tube überführt. Es schlossen sich folgende Arbeitsschritte an:

- Zentrifugation in der RT7-Zentrifuge 5 min bei 1500 g und Raumtemperatur
- Waschen des Zellpellets mit frischer SED-Lösung
- Zentrifugation 5 min bei 1500 g und Raumtemperatur
- Waschen der Zellen mit 20 mL 1 M Sorbitol-Lösung
- Zentrifugation 5 min bei 1500 g und Raumtemperatur
- Resuspendieren der Zellen in 20 mL SCE-Buffer
- Aufteilung des Ansatzes in 2 Falcon-Tubes

Zymolase-Verdau:

Durch den Zusatz von Zymolase (3 mg/mL Wasser) wird die Zellwand abgebaut. Für optimale Ergebnisse musste die Spheroblastierung zu 70% vollzogen sein. Da der Zeitpunkt je nach Enzym-Charge variiert, wurde ein Ansatz für die Ermittlung der optimalen Inkubationszeit herangezogen. Die Spheroblastierung wurde durch die Messung der OD₈₀₀ bestimmt. 200 µL Zellsuspension wurden mit 800 µL 5%iger SDS-Lösung versetzt. Als Referenz wurde eine Lösung aus 800 µL 5% SDS-Lösung und 200 µL SCE-Lösung verwendet. Es galt:

$$\% \text{ Spheroblastierung} = 100 - [(OD_{800} \text{ zur Zeit } t / OD_{800} \text{ zur Zeit } 0) \times 100]$$

Direkt vor dem Zusatz von 7,5 µL Zymolase zum 1. Ansatz wurde eine Probe als „Null-Wert“ entnommen und auf Eis gestellt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C im Wasserbad. Nach dem Zusatz der Zymolase wurde nach 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, und 50 min 200 µL Probe gezogen und im Spektralfotometer vermessen.

Der optimale Abbruchzeitpunkt des Verdaus wurde errechnet und der 2. Ansatz exakt für die ermittelte Zeit mit Zymolase inkubiert.

Die Spheroblasten wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 750 g und RT geerntet. Die Zellen wurden anschließend mit 10 mL 1 M Sorbitol-Lösung gewaschen und

erneut für 10 min bei 750 g und RT zentrifugiert. Die Spheroblasten wurden in 10 mL CaS-Lösung gewaschen und für 10 min bei 750 g und RT zentrifugiert. Die Spheroblasten wurden in 600 µL CaS-Lösung resuspendiert und waren 30 min stabil (Nutzerhandbuch).

2.19.5.4 Transformation

Zur Transformation kam jeweils 10 µg linearisierter, rekombinanter Vektor zum Einsatz. Als Hintergrundkontrollen wurden die linearisierten, nativen Vektoren verwendet. Pro Transformationsansatz wurden 100 µL Spheroblasten-Suspension in 10 mL Facon-Tubes eingesetzt. Nach dem Zusatz von 10 µg DNA wurde für 10 min bei RT inkubiert. Jeder Ansatz wurde mit 1 mL frischer PEG/CaT-Lösung versetzt, vorsichtig gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Es wurde für 10 min bei 750 g und RT zentrifugiert. Die PEG/CaT-Lösung wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt, das Zellpellet in 150 µL SOS-Medium resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert.

Ausplattierung:

Jeweils 100, 200 bzw. 300 µL der Spheroblasten-DNA-Suspension wurde mit 10 mL geschmolzener RD-Agarose vermischt und auf eine RDB-Platte gegossen. Nach dem Erhärten erfolgte die Inkubation bei 28,5 °C für 4-6 Tage.

Vitalitätstest der Spheroblasten:

100 µL Spheroblasten-Suspension wurden mit 900 µL 1 M Sorbitol-Lösung versetzt. 100 µL dieser Lösung wurde wiederum mit 10 mL geschmolzener RDH-Agarose vermischt und RDHB-Platten gegossen. Nach dem Erhärten erfolgte die Inkubation für 4-6 Tage bei 28,5 °C bis deutlich sichtbare Kolonien erschienen.

2.19.5.5 Puffer und Lösungen

SE

Sorbitol	1 M
EDTA	25 mM, pH 8

2 Materialien und Methoden

SED

SE	19 mL
1 M DTT	1 mL

SCE

Sorbitol	1 M
Natriumcitrat-Puffer	10 mM, pH 5,8
EDTA	1 mM

CaS

Sorbitol	1 M
Tris-HCl	10 mM, pH 7,5
CaCl ₂	10 mM

PEG

PEG 3350	40%
----------	-----

CaT

Tris-HCl	20 mM, pH 7,5
CaCl ₂	20 mM

PEG/CaT-Lösung

Die Lösung wurde zu gleichen Teilen aus PEB- und CaT-Lösung hergestellt.

2.19.6 Transformation von *Pichia pastoris* durch Elektroporation

2.19.6.1 Vorkulturführung

Von einer frischen YPD-Platte wurde eine Einzelkolonie in 15 mL YPD in einem 50-mL-Falcon-Tube angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 250 rpm über Nacht. Die Kultur wurde bis zum nächsten Abend im Kühlschrank gelagert.

2.19.6.2 Hauptkulturführung

Zwei 1 L Enghals-Erlenmeyerkolben mit 250 mL YDP-Medium wurden mit jeweils 250 μ L Vorkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 250 rpm über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3-1,5.

2.19.6.3 Zellernte und Transformationsvorbereitung

Die Zellernte erfolgte in sterilen 250-mL-Zentrifugenbehältern bei 1500 g, 4 °C für 5 min.

Die Zellen wurden in 500 mL eiskaltem E-pure-Wasser resuspendiert und bei 1500 g, 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Waschschrift wurde mit 250 mL eiskaltem Wasser wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 20 mL eiskalter 1 M Sorbitol-Lösung resuspendiert und bei 1500 g, 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die *Pichia*-Zellen wurden in 1 mL eiskalter Sorbitol-Lösung resuspendiert und bis zur Transformation auf Eis gelagert.

2.19.6.4 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 0,2-cm-Elektroporations-Küvetten (Biorad) verwendet. Die Küvetten wurden auf Eis vorgekühlt und mit 90 μ L Zellsuspension und 10 μ g in Wasser gelöstem, linearisiertem Plasmid befüllt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min erfolgte die Elektroporation bei einer Feldstärke von $\sim 7500 \text{ V}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und einer Pulslänge von 8 ms. Sofort nach der Elektroporation wurde in die Küvette 1 mL eiskalte 1 M Sorbitol-Lösung pipettiert.

Ausplattierung:

Die Elektroporationsansätze wurden in 200-, 300- und 400- μ L-Portionen auf MD-Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 2 Tage bis zum Erscheinen gut sichtbarer Kolonien.

2.20 Screening auf Mehrfach-Insertionen

Den Ausgangspunkt für das Screening bildeten die unter 2.6.2 hergestellten Masterplatten. Die einzelnen Klone wurden unter Beibehaltung der Klonfolge auf YPD-Platten mit steigendem Geneticin-Gehalt (vgl. 2.4.9) ausgestrichen. Ausgehend von diesen Platten wurden sämtliche Klone nochmals auf eine Platte mit derselben Geneticin-Konzentration überimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für ~ 4 Tage bis deutlich sichtbare Kolonien erschienen.

2.21 Isolierung der RNA aus *Marasmius scorodonius*

Bei den RNA-Arbeiten wurde streng auf die Abwesenheit von RNasen, die im Vergleich zu DNasen eine wesentlich höhere Stabilität aufweisen, geachtet. Zu diesem Zweck wurden alle Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt. DEPC wirkt durch kovalente Modifikation, u. a. am Histidinrest des aktiven Zentrums der RNasen, inaktivierend. Nach einer Inkubationszeit von mehreren Stunden wurden die Lösungen autoklaviert. Durch das Autoklavieren zerfällt das DEPC zu Ethanol und Wasser. Glasgeräte wurden zur Inaktivierung der RNasen mit 0,5 N NaOH und mit RNase-freiem Wasser gespült. Mörser und Schalen wurden für 2 h bei 600 °C gebacken und anschließend bei -70 °C gelagert.

Gesamt-RNA aus *Marasmius scorodonius* wurde mittels RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Handbuch Juni 2001) isoliert. Dieser Kit ermöglichte die Isolierung von bis zu 100 µg Gesamt-RNA. Ein mechanischer Zellaufschluss erfolgte bei – 70 °C durch Mörsern unter flüssigem Stickstoff. Während des Zellaufschlusses wurde ein Guanidinhydrochlorid-haltiger Lysispuffer zu gesetzt, welcher denaturierend wirkte und Schutz vor Nukleasen bot. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Nach einem Ethanol-Zusatz, welcher die Bindung der RNA an eine spezielle Kieselgel-Säule ermöglichte, erfolgte die Auftragung auf jene Säule. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Die RNA wurde am Tag der höchsten β,β -Carotin-spaltenden Aktivität (0,51 mU/mL) aus MSC Mycel isoliert. Das Mycel wurde nach der Ernte sofort im flüssigen Stickstoff Schock gefroren, um die RNA vor dem Verdau durch RNasen zu schützen.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden dem Handbuch des Kits (S. 75 ff.) entnommen, abweichend von der Herstellervorschrift wurden allerdings 210 mg Mycel eingesetzt.

2.21.1 Reinheitsüberprüfung der RNA-Isolierung mit FA-Gelelektrophorese

Da einzelsträngige RNA durch intra- und intermolekulare Basenpaarung Sekundärstrukturen ausbilden kann, wird sie in denaturierenden Gelen analysiert. Die Agarose (1,2%ige Gele) wurde in 1x FA-Puffer (vgl. 2.3.9) suspendiert, bis zum vollständigen Lösen in der Mikrowelle aufgekocht auf etwa 60 °C abgekühlt, mit 0,5 µL/10 mL Ethidiumbromidlösung versetzt und anschließend in die Gelvorrichtung mit darüber hängendem Kamm gegossen. Als Laufpuffer diente 1x-FA-Puffer. Die Dauer und angelegte Spannung richtete sich nach der Größe der Gele (80-140 V). Die Proben wurden mit 1/4 Volumen 5x-RNA-Auftragspuffer (vgl. 2.3.10) versetzt. Als Standard zum Größenvergleich der getrennten RNA-Fragmente diente die „1kb-DNA-Leiter“ der Firma New England BioLabs. Die RNA wurde durch das in die RNA interkalierte Ethidiumbromid mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht (Anregung bei 312 nm, UV-Transilluminator Vilber-Lourmat TFX-20.M, Torcy, Frankreich). Die digitale Dokumentation der Agarosegele erfolgte mit einer Anlage der Firma INTAS (Göttingen, digitale Kamera mit Videoprinter P90, Mitsubishi (Ratingen)).

2.21.2 Fotometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der RNA-Isolierung

Die Konzentration der RNA wurde fotometrisch bei 260 nm ermittelt. Eine Extinktion₂₆₀ von 1 entspricht 40 µg/mL ssRNA (Schimpf, 2002). Die Messung der Konzentration erfolgte in Quarzküvetten. Die Proben wurden mit Wasser in so weit verdünnt, dass die Messwerte einen Betrag von < 1 aufwiesen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte wie folgt:

$$c_{\text{RNA}} \text{ µg/mL} = 40 \times E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Reinheit der RNA ließ sich mittels des Quotientens der Extinktionen bei 260 und 280 nm ermitteln. Die Absorption bei 280 nm wird hauptsächlich durch die

aromatischen Reste der Aminosäuren verursacht. Für reine RNA-Lösungen sollte der Quotient E_{260}/E_{280} bei 2 liegen.

2.22 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde mittels SMART PCR cDNA Library Construction Kit Version PR 87510 nach dem Protokoll PT3000-1 synthetisiert.

2.22.1 Erststrang-cDNA-Synthese

Die Erststrang-cDNA-Synthese verlief nach dem o. g. Hersteller-Protokoll mit 3 μ L MSC RNA (~ 0,5 μ g). Abweichend vom Protokoll erfolgte die reverse Transkription nicht mit MMLV reverser Transkriptase, sondern mittels Super Script II RNase H⁻ reversen Transkriptase (GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) mit dem dazugehörigen Arbeitspuffer.

2.22.2 Zweitstrangsynthese (LD-PCR)

Die cDNA-Synthese erfolgte nach dem Hersteller-Protokoll. Abweichend vom Protokoll wurden jedoch ein 50x-Advantage-cDNA-Polymerase-Mix der Firma BD Bioscience sowie der dazugehörige 10x-cDNA-PCR-Puffer verwendet. Das Cyclers-Programm sah wie folgt aus:

95 °C	1 min
25 Cyclen:	
95 °C	15 s
68 °C	6 min

Die MSC cDNA wurde aliquotiert und bei – 20 °C gelagert.

2.23 Isolierung genomischer DNA aus *Marasmius scorodoni*

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mittels „Genomic DNA from Plant“ Kit (Macherey und Nagel) nach Herstellerangaben (Handbuch 07/2003/Rev 02).

2 Materialien und Methoden

Das Pilzmycel wurde bei – 70 °C schockgefroren und unter flüssigem Stickstoff in Anwesenheit von Seesand und eines Lysis-Puffers gemörsert. Der Lysis-Puffer enthielt chaotrophe Salze und CTAB als Detergenz. Das Lysat wurde nach Filtration an eine Kieselgelsäule adsorbiert. Durch verschiedene Waschschriffe wurden Kontaminanten entfernt. Die Elution erfolgte mit dem im Kit angebotenen Elutionspuffer (CE).

Mörser und Pistill wurden autoklaviert und anschließend bei – 70 °C gelagert. Der Aufschluss des Pilzmycels und die DNA-Isolierung erfolgten nach Herstellerangaben. Während des Zellaufschlusses wurden dem Lysispuffer C1 10 µl RNase A zugesetzt. Nachdem die DNA auf das Kieselgelsäulchen aufgetragen wurde, erfolgten die Waschschriffe und die Elution wie unter Protokollpunkt 4.1.6 ff. (vgl. S. 16) angegeben. Zur Verbesserung der Ausbeute erfolgte die DNA-Elution in 2 Schritten. Der Elutionspuffer wurde auf 70 °C vorgewärmt. 50 µL dieses vorgewärmten Puffers wurde auf das Säulchen aufgetragen. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 3 min bei 70 °C. Im Anschluss wurde erneut 50 µL CE-Puffer aufgetragen. Nach einer weiteren Inkubation von 2 min erfolgte die Elution durch Zentrifugation.

2.24 Sterilisation

2.24.1 Sterilisation der Arbeitsmaterialien

Alle zu sterilisierenden Medien und Lösungen wurden bei 121 °C für 20 min, Geräte für 30 min im Heißdampf-Autoklaven bei 1 bar Überdruck autoklaviert. Das Autoklavieren wurde mittels Indikatorband überprüft. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden mit Millex[®]-GP-Sterilfiltern (Porendurchmesser 0,22 µm) steril filtiert. Arbeitsgeräte (z.B. Zentrifugenbecher), die nicht autoklavierbar waren, wurden über Nacht in 70%igen Ethanol eingelegt. Im Anschluss wurden die Gerätschaften unter der sterilen Werkbank getrocknet.

2.24.2 Sterilisation der S1-Abfälle

Alle flüssigen Abfälle wurden in verschließbaren Sammelbehältern aufbewahrt. Festabfälle wurden in autoklavierbaren Tüten gesammelt, die in speziellen

Autoklavier-Boxen sterilisiert wurden. Sämtliche Abfälle wurden bei 121 °C für 45 min bei 1 bar Überdruck autoklaviert.

2.24.3 Oberflächenkontaminationen

Die sterile Werkbank wurde vor und nach jeder Benutzung mit 70% Ethanol oder Isopropanol gereinigt. Kontaminierte Arbeitsflächen wurden ebenfalls mit 70% Ethanol gereinigt.

2.25 Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien

Die Entsorgung an Lösungsmitteln wurde durch die weitgehende Wiederverwertung nach destillativer Aufreinigung auf ein Minimum reduziert. Nicht wieder verwertbare Lösungsmittel wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nicht halogenierte, mit Wasser mischbare Lösungsmittel
- nicht halogenierte, nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittel
- halogenierte, mit Wasser mischbare Lösungsmittel
- halogenierte, nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittel

Diese Lösungsmittel wurden ebenso wie die Chemikalienreste der zentralen Entsorgungseinrichtung der Universität Hannover zugeführt.

Phenol- und Ethidiumbromid-haltige Abfälle wurden getrennt gesammelt.

2.26 Geräte

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	VST 50/70	Zirbus (Bad Grund)
Autoklav	Varioklav 75 S	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Brutschrank	BE 500	Memmert (Büchenbach)
Brutschrank mit Schüttler	HT	Infors AG (Einsbach)
BTX Elektroporations- system	Electro Cell Manipulator 600 Sub-Cell GT	BTX
dest. Wasseranlage	RO	Wilhelm Werner GmbH (Leverkusen)
E-pure-Anlage	D4623S mit Kit I Stand	Barnstead (Dubuque, USA)
Gelkammer	Minigel-System	Bio-Rad (München)
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph (Schwabach)
pH-Meter	731 Calimatic	Knick (Berlin)
UV-VIS-Spektrofotometer	Perkin Elmer Lambda 12	Perkin Elmer (Rodgau- Jügesheim)
Software Spektrometer	UV Win Lab 2.0	Perkin Elmer
PCR-Cycler	Mastercycler personal	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Pipette 0,1-1 µL	Finnpipette	Labsystems (Helsinki, Finnland)
Pipette 0,1-1 µL	-	Brand (Wertheim)
Pipette 0,1-10 µL	-	Brand
Pipette 0,2-20 µL	Finnpipette	Finnpipette
Pipette 2-20 µL	Pipetman	Gilson (Villiers-le-Be, Frankreich)
Pipette 20-200 µL	Pipetman	Gilson
Pipette 200-1000 µL	Pipetman	Gilson
Pipette 100 µL	-	Eppendorf
Rotationsverdampfer	Laborota 4002	Heidolph
Schüttler	Infors HAT	Infors

2 Materialien und Methoden

SDS-Gelelektrophorese-kammer	Mini-Twin	Biometra (Göttingen)
Spannungsquelle	Power Supply 2	Bio-Rad (München)
Sterile Werkbank	Clean Air CA RE 4	Clean Air Deutschland (Hilden)
Thermoshaker	-	Schutron (Quedlinburg)
Tischzentrifuge	5415 C	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Transilluminator	Ti 4	Biometra
Ultratiefkühlschrank	VX 350 Series 2	Jouan (Fernwald)
Ultraturrax	TP-18/10	IKA-Werke (Staufen)
Vakuumzentrifuge	Sorvall RC 28 S	Kendro (Langenselbold)
Wärmeschrank	k.A.	Memmert
Zentrifuge	Variofuge	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge	RT7 Plus	Kendro

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Charakterisierung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus *Marasmius scorodonius*

3.1.1 Optimierung der Anzuchtbedingungen von *Marasmius scorodonius*

Die Kultivierung von *Marasmius scorodonius* CBS 137.83 erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Langhoff (Disseration, 2002) mit dem Basidiomyceten *Pleurotus eryngii*. Es wurden einige Variationen in den Anzuchtbedingungen durchgeführt, die zu einer Optimierung der Enzymausbeuten führen sollten.

3.1.1.1 Enzymsekretion in Abhängigkeit von der Stammhaltung

Die Kultivierung von *M. scorodonius* erfolgte auf SNL-Platten bzw. auf β,β -Carotin-haltigen SNL-Platten. Das Animpfen der Vor- und Hauptkulturen erfolgte wie unter 2.8.2 bzw. 2.8.3 beschrieben.

Zum Zeitpunkt der Ernte am 4. Kulturtag wies die auf die SNL-Platte zurückgehende Hauptkultur lediglich $\sim 75\%$ der Aktivität der β,β -Carotin-haltigen Kultur auf. Dementsprechend erfolgte auch weiterhin die Stammhaltung auf β,β -Carotin-haltigen Agarplatten.

3.1.1.2 Enzymsekretion in Abhängigkeit von der Hauptkulturführung

Das Animpfvolumen einer Hauptkultur sollte in der Regel $\sim 1/10$ des Hauptkulturvolumens betragen (Diekmann und Metz, 1991). Aus diesem Grund wurde das Animpfvolumen von 10 mL auf 20 mL heraufgesetzt, was einem Volumenverhältnis von 1/12,5 entsprach. Die mit 20 mL Vorkultur angeimpfte Hauptkultur zeigte am 5. Tag die höchste Aktivität (Abb. 3-1). Die „10-mL-Kultur“ zeigte am 7. Kulturtag maximale Aktivität, die jedoch nur 75% der maximalen Aktivität der „20-mL-Kultur“ entsprach. Daher wurde das Animpfvolumen auf 20 mL heraufgesetzt.

3 Ergebnisse

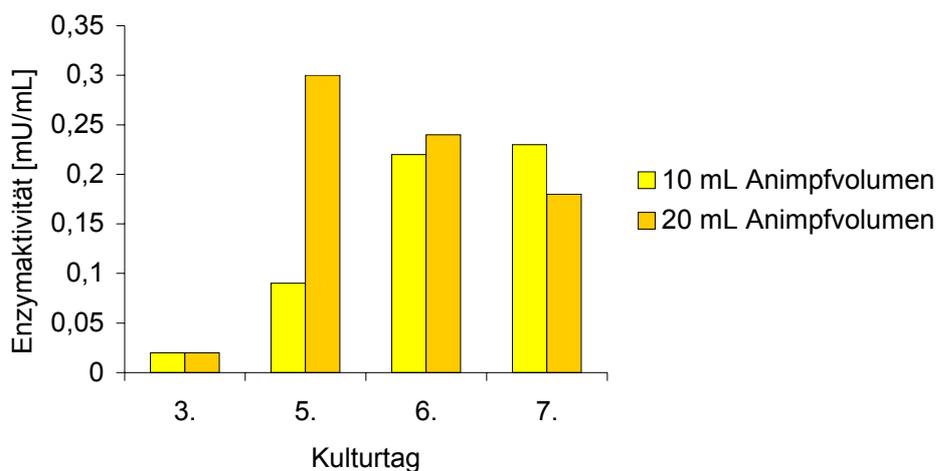


Abb. 3-1: Enzymaktivität [mU/mL] in Abhängigkeit vom Kulturtag der Hauptkultur bei unterschiedlichen Animpfvolumina

Anschließend wurde der Einfluss einer unterschiedlichen Behandlung der Vorkulturen auf die Aktivität der Hauptkulturen untersucht. Mit einer Vorkultur wurde die Hauptkultur direkt angeimpft. Eine weitere Vorkultur wurde direkt vor dem Animpfen der Hauptkultur mittels Ultra-Turraxstab homogenisiert.

Hinsichtlich der Aktivitäten wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Die Hauptkulturen, die auf eine homogenisierte Vorkultur zurückgingen, waren allerdings sehr viskos. Nach der Ernte dieser Kulturen war stets ein signifikanter Aktivitätsverlust von bis zu 75% zu verzeichnen. Aus diesem Grund wurde auf ein Homogenisieren der Vorkultur vor dem Animpfen verzichtet.

3.1.2 Charakterisierung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus *Marasmius scorodonius*

3.1.2.1 Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Proteinreinigung und zur Enzymcharakterisierung wurde ein schneller und zuverlässiger Assay benötigt. Hierzu wurde der von Langhoff zur Bestimmung der Aktivität der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* (2002) modifizierte und auf Ben Aziz et al. (1971) zurückgehende Enzymtest adaptiert. Die enzymhaltige Lösung wurde mit einer wässrigen β,β -Carotinlösung versetzt (vgl. 2.16.1) und die Abnahme der Extinktion spektrofotometrisch bei 450 nm verfolgt.

3 Ergebnisse

3.1.2.2 Reproduzierbarkeit des Enzymtestes

Über eine gewisse Zeitspanne muss die Extinktion mit der Zeit linear abnehmen. Dieses war für hinreichend verdünnte Proben für mindestens 15 min erfüllt (Abb. 3.2).

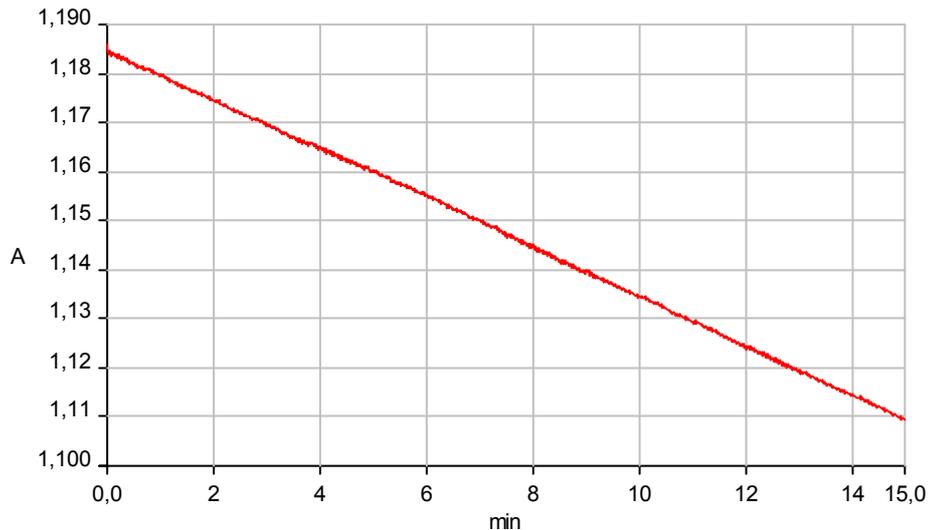


Abb. 3-2: Extinktionsabnahme im Verlauf des Enzymassays

Ein weiteres zwingendes Kriterium für die Anwendbarkeit des Enzymtests ist die Proportionalität zwischen der Enzymkonzentration und der – aktivität (Suelter, 1990). Zu diesem Zweck wurde der Assay mit unterschiedlichen Volumina des mittels Ultrafiltration aufkonzentrierten Kulturüberstandes von *M. scorodoni* mit Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffer⁷ (49 mM/ 102 mM), pH 5 durchgeführt. Die Arbeitstemperatur betrug 26 °C, da Vorversuche Hinweise auf ein Temperatur-optimum im Bereich von 26 °C ergaben.

Über einen gewissen Konzentrationsbereich bestand die geforderte Proportionalität zwischen der Aktivität und der Enzymkonzentration (Abb. 3.3).

⁷ Anfängliche Messungen der Enzymaktivität wurden in Anlehnung an die Arbeiten von S. Langhoff mit Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffer durchgeführt. Nach weiterführender Charakterisierung der Proteine wurde ein anderer Arbeitspuffer verwendet (vgl. 3.1.2.7)

3 Ergebnisse

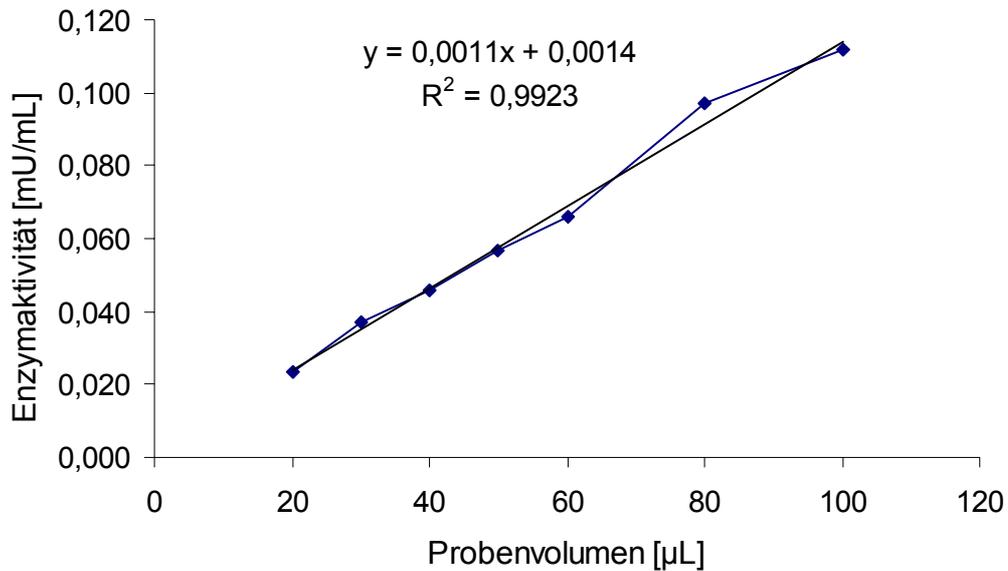


Abb. 3-3: Abhängigkeit der Enzymaktivität [mU/mL] von dem Probenvolumen [µL]

3.1.2.3 Einfluss der Pufferkonzentration auf die Enzymaktivität

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration des NaAc-Puffers wurde ein geringes Ultraretentatvolumen mit den entsprechenden Puffern versetzt (vgl. 2.16.1.3). Der pH-Wert betrug 5,0, die Arbeitstemperatur 26 °C⁸.

Eine erste Messreihe ergab ein Aktivitätsmaximum bei einer Pufferkonzentration von 40 mM (Abb. 3-4). In einer zweiten Messung wurde der Bereich um das Aktivitätsmaximum näher beleuchtet (Abb. 3-4). So konnte die endgültige Arbeitskonzentration von 50 mM festgelegt werden.

⁸ Die Arbeitstemperatur betrug bei dieser Versuchsreihe 26 °C, da zu diesem Zeitpunkt die Messungen zur Bestimmung des Temperaturoptimums noch nicht abgeschlossen waren.

3 Ergebnisse

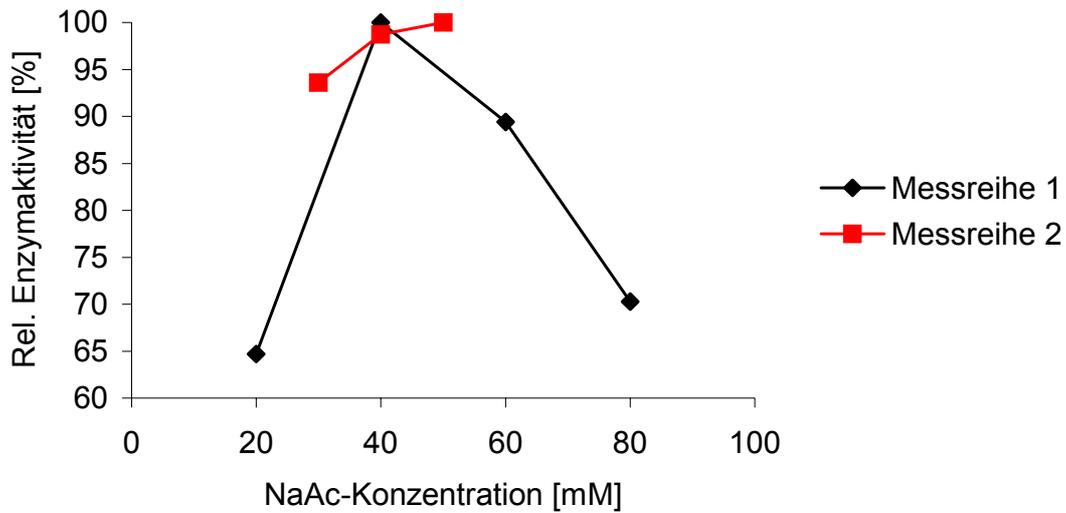


Abb. 3-4: Relative Enzymaktivität [%] in Abhängigkeit von der Konzentration des NaAc-Puffers [mM]

Die Ermittlung der optimalen Konzentration des Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffers erfolgte ebenfalls bei einem pH-Wert von 5. Die Arbeitstemperatur betrug 27 °C. Die höchste Umsatzrate fand sich bei einer Pufferkonzentration von 14,7 mM Citronensäure/ 30,6 mM Na_2HPO_4 .

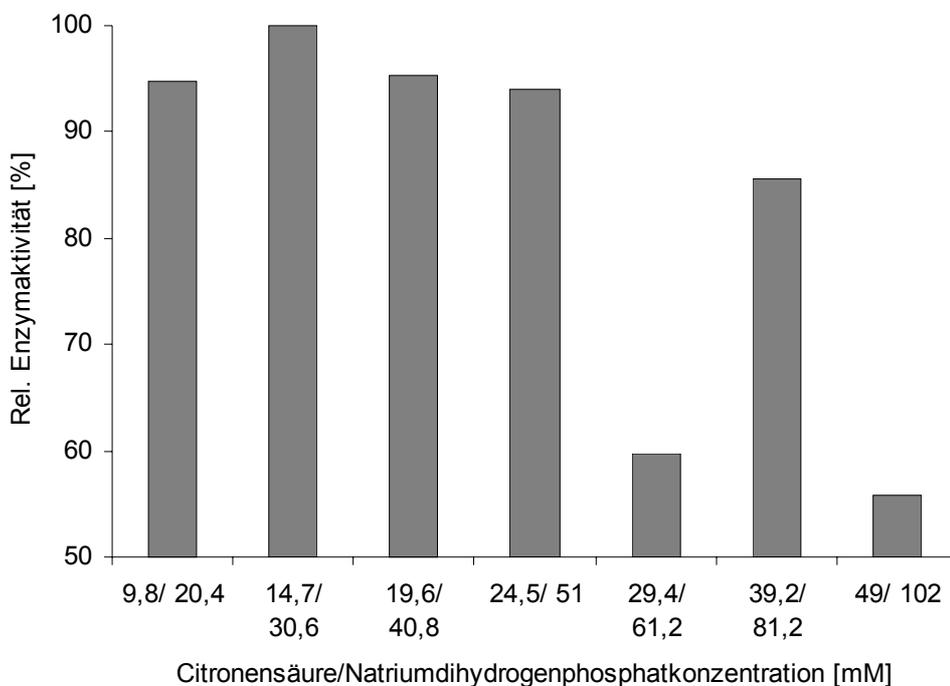


Abb. 3-5: Relative Enzymaktivität [%] in Abhängigkeit von der Konzentration des Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffers

3.1.2.4 pH-Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde der aufkonz. Kulturüberstand mit den entsprechend eingestellten Puffern versetzt (vgl. 2.16.1.2). Bei der Verwendung des Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffers (49 mM/102 mM)⁹, 26 °C war die höchste Aktivität bei pH 5 zu verzeichnen (Abb. 3-6).

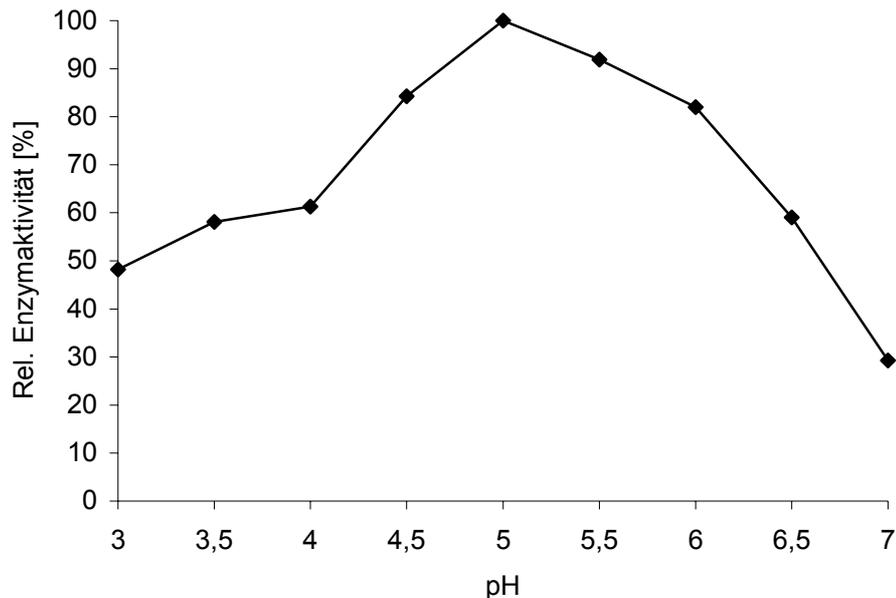


Abb. 3-6: Relative Enzymaktivität [%] des Ultraretentats in Abhängigkeit vom pH-Wert des Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffers

Bei Verwendung von NaAc-Puffer, 50 mM, 27 °C konnte kein scharfes pH-Optimum ermittelt werden. Es trat vielmehr ein pH-Plateau im Bereich von pH 3,5-4,5 auf. Insgesamt gesehen konnte über den gesamten pH-Bereich (3-6) eine Aktivität > 70% verzeichnet werden.

⁹ Es fand in dieser Versuchsreihe Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffer (49 mM/102 mM) Verwendung, da zu diesem Zeitpunkt die Messungen zur Bestimmung der optimalen Pufferkonzentration noch nicht abgeschlossen waren.

3 Ergebnisse

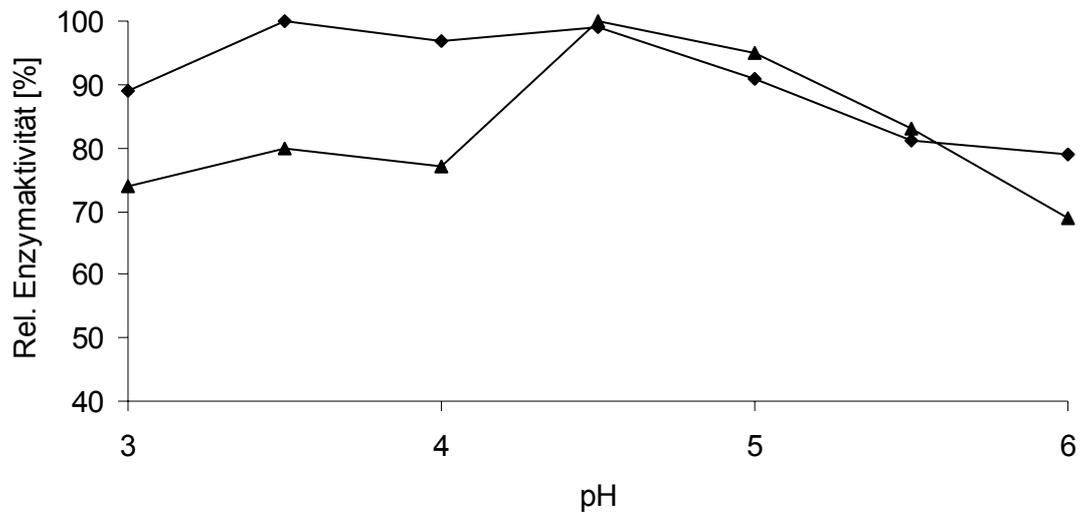


Abb. 3-7: Relative Enzymaktivität [%] des Ultraretentats in Abhängigkeit vom pH-Wert des NaAc-Puffers (Doppelbestimmung)

3.1.2.5 Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität

Das Temperaturoptimum wurde mit dem vorliegenden Ultraretentat unter Verwendung von Natriumacetat-Puffer, 0,05 M, pH 5 durchgeführt (2.16.1.1). Eine Temperierungsphase von 5 min erwies sich als ausreichend. Bei einer Temperatur von 27 °C war die höchste Aktivität zu verzeichnen (Abb. 3-8). In Folge dessen wurden alle weiteren Messungen bei dieser Temperatur durchgeführt.

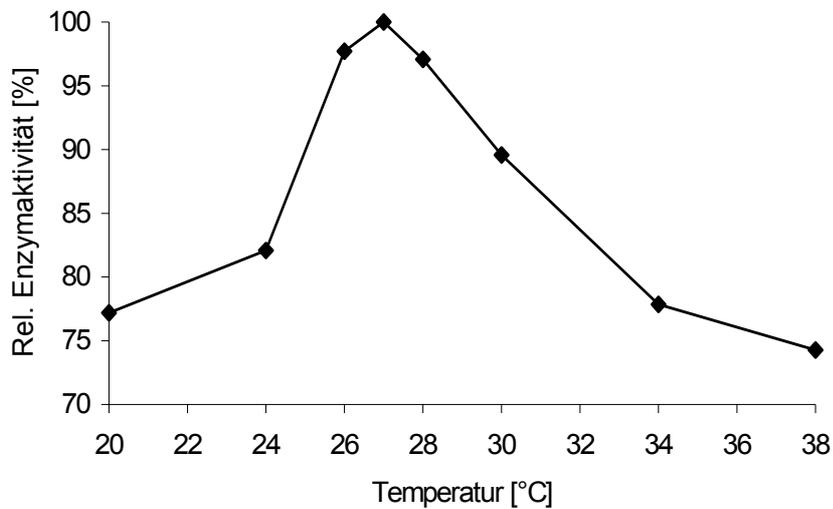


Abb. 3-8: Temperaturoptimum der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus *M. scorodonius*

3.1.2.6 Enzymstabilität bei Raumtemperatur

Der Kulturüberstand von *M. scorodonius* wurde auf der Laborbank (20 bzw. 23 °C) gelagert. Zu definierten Zeitpunkten wurde eine Probe gezogen und die Aktivität mittels Enzymtest bestimmt.

Bei einer Raumtemperatur von 20 °C sank die Enzymaktivität bereits nach 2 h unter 50%. Bei 23 °C war nach 2 h nur noch eine Aktivität von unter 25% zu finden (Abb. 3-9).

3 Ergebnisse

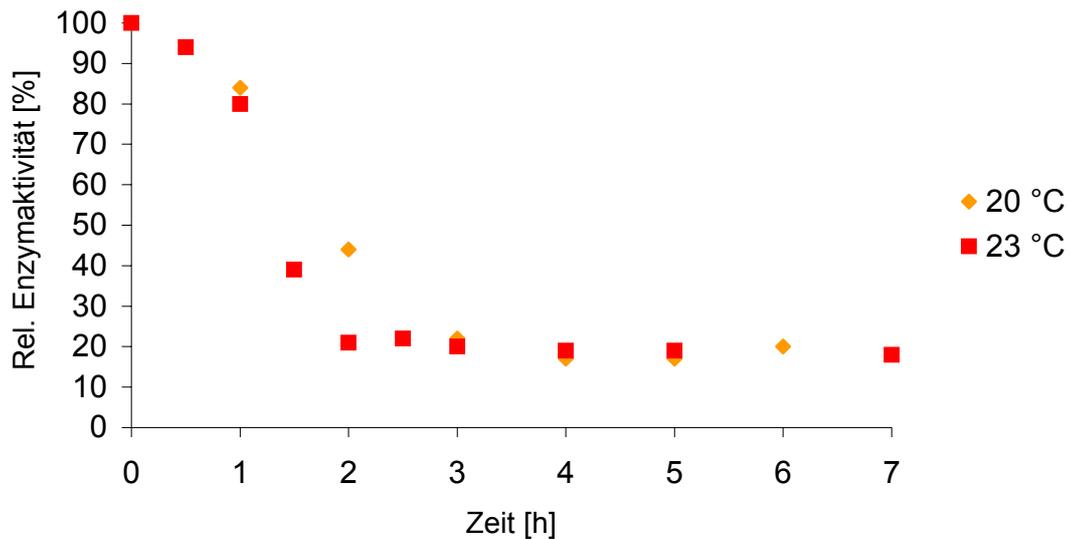


Abb. 3-9: Thermostabilität der β,β -Carotin-abbauenden Aktivitäten aus *Marasmius scorodonius* bei 20 °C und 23 °C

Da die Enzyme des Kulturüberstandes bei Raumtemperatur instabil waren, wurden alle Proben bis zum Gebrauch auf Eis gelagert, Arbeitsschritte wie Zentrifugation, Filtration und Aufreinigung fanden unter Kühlung (4 °C) statt.

3.1.2.7 Auswahl des Arbeitspuffers

Die optimierten Puffersysteme wurden einander vergleichend gegenüber gestellt. Bei Verwendung eines Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffers, 14,7/30,6 mM, pH 5 war lediglich ~ 65% der Aktivität zu finden, die bei Arbeit mit NaAc-Puffer, 50 mM, pH 3,5 zu finden war. Alle nachfolgenden Arbeiten wurden daher in NaAc-Puffer, 50 mM gegebenenfalls mit wechselnden pH-Werten durchgeführt.

3.1.2.8 Natriumchlorid-Toleranz

Da im Verlauf der Proteinreinigung NaCl-haltige Puffer Verwendung finden sollten, wurde der Einfluss von Natriumchlorid auf die Enzyme des konz. Kulturüberstandes untersucht (vgl. 2.16.1.4). Das Ultraretentat zeigte bei einer NaCl-Konzentration von 0,25 M die höchste Aktivität (Abb. 3-10). Die geringste Aktivität war bei einer NaCl-Konzentration von 0,5 M vorhanden.

3 Ergebnisse

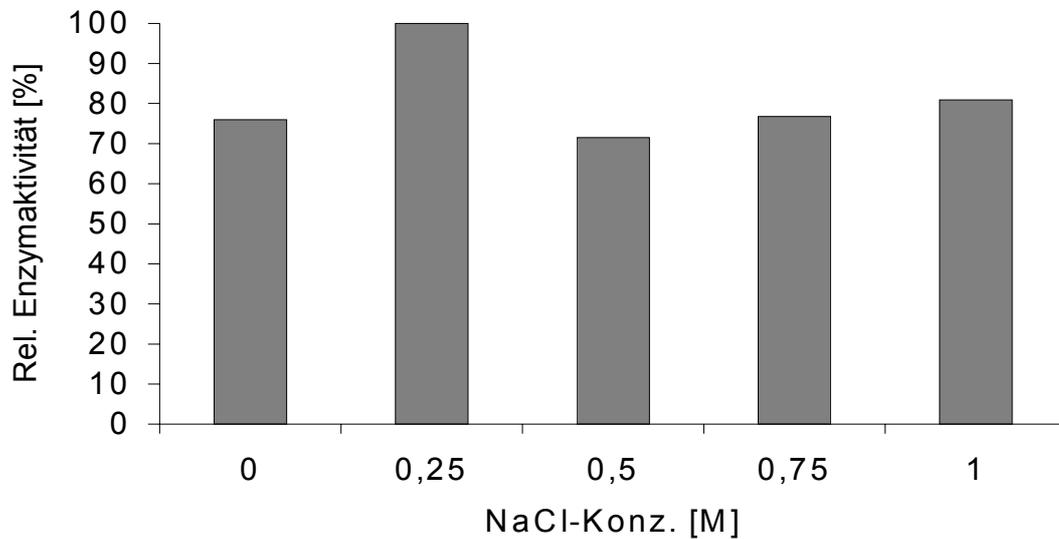


Abb. 3-10: Relative Enzymaktivität [%] in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration [M]

3.1.2.9 Wasserstoffperoxid-Einfluss

Der Zusatz von H_2O_2 zum Enzymtest (vgl. 2.16.1.5) führte beim Ultraretentat zu einer Aktivitätssteigerung auf ~ 187% im Vergleich zu einem Ansatz ohne H_2O_2 -Zusatz. Der dazugehörige Blindwert (Puffer ohne Ultraretentat) wies keine Aktivität auf.

3.1.2.10 Kinetik des β,β -Carotin-Abbaus

Die bei der Kinetik des β,β -Carotin-Abbaus eingesetzte Gesamtaktivität betrug 10 mU. Bereits nach 1 h waren knapp 40% des Substrates abgebaut (Abb. 3-11).

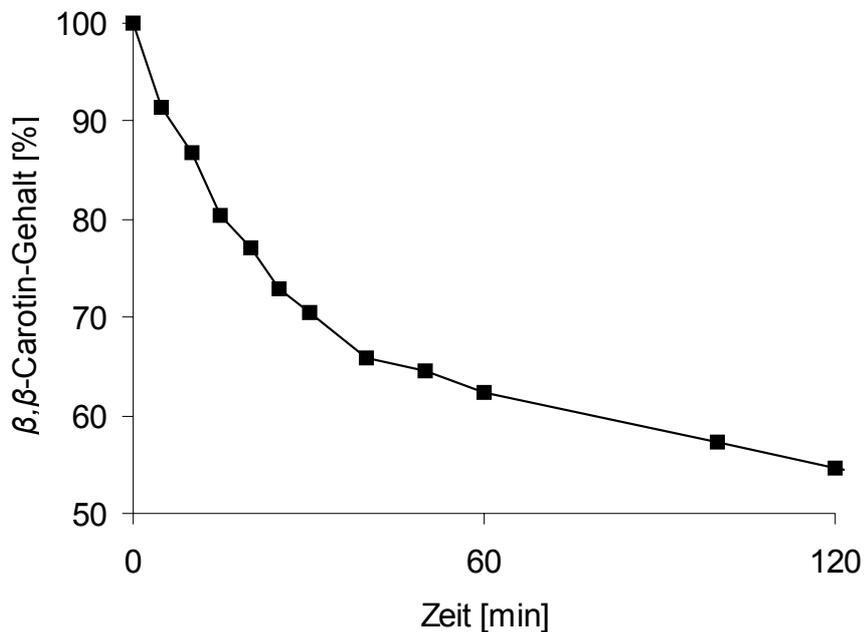


Abb. 3-11: Kinetik des β, β -Carotin-Abbaus mit Kulturüberstand von *Marasmius scorodoni*

3.1.3 Konzentrierung

3.1.3.1 Ammoniumsulfat-Präzipitation

Zur Präzipitation wurde die Ammoniumsulfat-Fällung als klassische Methode zur Proteinseparierung angewandt (vgl. 2.10.1).

Anfänglich wurde eine 80%ige $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung mit einer Nachrührphase von 30 min durchgeführt. Im $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Pellet waren $\sim 30\%$, im Überstand $\sim 15\%$ der Ausgangsaktivität nachweisbar. Ferner bildete sich während der Fällung ein weißes, aufschwimmendes Pellet, das auch durch Zentrifugation nicht sedimentiert werden konnte. Eine Erhöhung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration auf 90% erbrachte keine besseren Ausbeuten (Tab. 3-1). In diesem Fall betrug die Aktivität des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Pellets nur 5% der Ausgangsaktivität. Die Gesamtwiederfindung lag bei 27%.

3 Ergebnisse

Tab. 3-1: Bilanzierung der 90%igen Ammoniumsulfat-Fällung

Probe	Aktivität [mU/mL]	Gesamtaktivität [mU]	Anreicherungs- Faktor	Ausbeute [%]
Kulturüberstand	0,215	12,9	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ - Pellet	0,297	0,624	1,4	5
Überstand	0,014	2,78	0,07	22

Die im Anschluss durchgeführte fraktionierte Ammoniumsulfat-Präzipitation (0-30%, 30-60%, 60-75%) mit einer verlängerten Nachrührphase (1 h) erbrachte keine Verbesserung der Ausbeute. Während des zweiten Fällungsschrittes entstand das weiße, aufschwimmende Pellet, was in diesem Fall in die Bilanzierung mit aufgenommen wurde. Es konnte in diesem Pellet eine geringe Aktivität nachgewiesen werden. Insgesamt konnte nur ~ 30% der Ausgangsaktivität wiedergefunden werden, lediglich 15% ging auf die (NH₄)₂SO₄-Pellets zurück.

Auf Grund des mangelnden Erfolges wurde die Ammoniumsulfat-Präzipitation nicht in die Reinigungsstrategie mit aufgenommen.

3.1.3.2 Polyethylenglykol-Präzipitation

Als Alternative zur Ammoniumsulfat-Fällung wurde eine Polyethylenglykol-Fällung mit PEG 6000 durchgeführt. Die Ergebnisse der PEG-Präzipitation fielen schlechter als die der ersten Fällungsmethode aus. Im PEG-Pellet, das sich zu dem sehr schlecht resuspendieren ließ, war nur 0,8% der Ausgangsaktivität bei einer Gesamtwiederfindung von ~ 32,5 % (Tab. 3-2) zu finden.

3 Ergebnisse

Tab. 3-2: Bilanzierung der Polyethylenglykol-Fällung

Probe	Aktivität [mU/mL]	Gesamtaktivität [mU]	Anreicherungs-faktor	Ausbeute [%]
Kulturüber-stand	0,2775	16,65	1	100
PEG-Pellet	0,0256	0,1325	0,09	0,8
Überstand	0,0276	5,26	0,10	31,6

Auf Grund der schlechten Ausbeute wurde dieser Fällungstyp nicht weiter verfolgt.

3.1.3.3 Konzentrierung mittels Centricon-Plus-80

Centricon-Plus-80-Einheiten (MWCO 30000) wurden verwendet, um Kulturvolumina < 300 mL aufzukonzentrieren. Anfänglich konnte unter vollständigem Aktivitätserhalt konzentriert werden. Da im Verlauf der Promotion die Membranzusammensetzung (Millipore, techn. Service, persönl. Mitteilung) der Centricons verändert wurde, konnte anschließend nur noch mit einem Aktivitätserhalt von 65-80% konzentriert werden.

3.1.3.4 Konzentrierung mittels Vivacell 70

Die Vivacell-70-Einheiten (MWCO 30000) sollten eine Alternative zur Aufkonzentrierung mit den Centricon-Plus-80-Einheiten darstellen. Die Verluste beim Aufkonzentrieren lagen in der selben Größenordnung wie bei den Centricons mit modifizierter Membran. Dies war einer der Gründe, aus welchen die Arbeiten mit den Vivacell-70-Einheiten keine Fortsetzung fanden (vgl. 4.1.3).

3.1.3.5 Konzentrierung mittels Ultrafree-4-Centrifugal-Einheiten

Ultrafree-4-Centrifugal-Einheiten (Millipore: UFV4BGC25, MWCO 10000) wurden verwendet, um kleine Probenvolumina aufzukonzentrieren. Anfänglich konnten die Proben unter absolutem Aktivitätserhalt aufkonzentriert werden (vgl. 3.1.1.3), dann erfolgte auch bei diesen Filtrationseinheiten eine Modifikation bezüglich der

3 Ergebnisse

Zusammensetzung der Membran. In Folge dessen verlief die Konzentrierung unter Aktivitätsverlusten, die im Bereich der Centricon-Plus-80-Einheiten anzusiedeln waren.

3.1.3.6 Konzentrierung mittels Vivacell 15R

Die Konzentrierung der Zielfractionen der IEC- und GPC-Läufe (vgl.3.1.4) fand unter Einsatz von Vivacell-15R-Einheiten, MWCO 10000 statt. Zur Konzentrierung gering konzentrierter Lösungen, wie sie bei den IEC-Läufen anfielen, konnten größere Volumina konzentriert werden. In diesem Fall wurde das Filtrat entfernt und weitere Probe nachgefüllt. Die Verluste beim Aufkonzentrieren der Q-Sepharose-Fractionen betrugen 10-15%.

3.1.3.7 Konzentrierung mittels Vivaflow 200

Für die Aufkonzentrierung großer Kulturvolumina (> 300 mL) fanden Vivaflow-200-Einheiten (MWCO 10000) Verwendung. Große Volumina konnten mit dieser Einheit zügig unter weitgehendem Aktivitätserhalt (Tab. 3-3) um den Faktor 20-30 aufkonzentriert werden.

Tab. 3-3: Bilanzierung der Konzentrierung mittels Vivaflow-200-Einheit

Probe	Aktivität [mU/mL]	Gesamtaktivität [mU]	Anreicherungs- faktor	Ausbeute [%]
Kulturüberstand	0,29	200,1	1	100
Ultraretentat	5	144	17,2	72
Rückspülung	1,53	29,4	5,3	15

Im Ultraretentat waren > 70% der Ausgangsaktivität zu finden. Bei dem anschließenden Spülschritt konnte nochmals ~ 15% Zielprotein zurückgewonnen werden, so dass die Verluste lediglich im Bereich von 15% lagen.

3 Ergebnisse

3.1.4 Enzymreinigung

3.1.4.1 Ionenaustauschchromatographie

3.1.4.1.1 Vorversuche

Als schwacher Anionenaustauscher kam eine DEAE-Säule zum Einsatz, als starker eine Q-Sepharose-Säule.

In ersten Probenläufen wurde das Ultraretentat mit einem NaAc-Puffer, pH 5, 0,05 M auf die Säule aufgetragen und sollte mit einem pH-Shift auf pH 3,5 eluiert werden. Weder bei der DEAE- noch bei der Q-Sepharose-Säule bestand die Möglichkeit, das Zielprotein durch den pH-Shift von der Säule zu eluieren. Aus diesem Grund wurde dem Elutionspuffer 1 M NaCl hinzugefügt. Die Fraktionen des Durchbruchs (Frak. 3-6) und die Fraktionen des Eluats (Frak. 8-10) wurden gepoolt, mittels Ultrafree-4-Centrifugal-Einheiten (vgl. 3.2.5, 2.10.5) konzentriert und umgepuffert. Die Proben lagen in NaAc-Puffer, pH 3,5, 0,05 M vor. Mittels Enzymtest konnte der Reinigungserfolg visualisiert werden (Tab. 3-4 und 3-5).

Beide Säulen eigneten sich nahezu gleich gut zur Enzymreinigung. Die Proteine ließen sich unter Erhalt der Ausgangsaktivität von den Säulen eluieren. Bei der Q-Sepharose-Säule war der Enzymverlust beim Beladen der Säule etwas geringer. Die Fraktionen 3/4/5/6 wiesen nur 7% der Aktivität auf, die der DEAE-Säule hingegen 15% (Tab. 3-4 bzw. 3-5). Auf Grund dieser Tatsache wurde für die Enzymreinigung eine Q-Sepharose-Säule verwendet.

Tab. 3-4: Bilanzierung des HighTrap-DEAE-Laufes mit 1 M NaCl (vgl. 2.12.2.1)

Probe	Aktivität [mU/mL]	Gesamtaktivität [mU]	Ausbeute [%]
Ultraretentat	5,02	1,00	100
Frak. 3/4/5/6	0,29	0,15	15
Frak. 8/9/10	2,21	1,11	111

3 Ergebnisse

Tab. 3-5: Bilanzierung des HighTrap-Q-Sepharose-Laufes mit 1M NaCl (vgl. 2.12.2.1)

Probe	Aktivität [mU/mL]	Gesamtaktivität [mU]	Ausbeute [%]
Ultraretentat	5,02	1,00	100
Frak. 3/4/5/6	0,13	0,07	7
Frak. 8/9/10	2,29	1,15	115

3.1.4.1.2 Scale up

Nach der Optimierung des Gradienten wurden optimale Ergebnisse unter Verwendung eines 50 mM NaAc-Puffers, pH 6 und Anlegung eines linearen Salzgradienten (vgl. 2.12.2.2) erzielt.

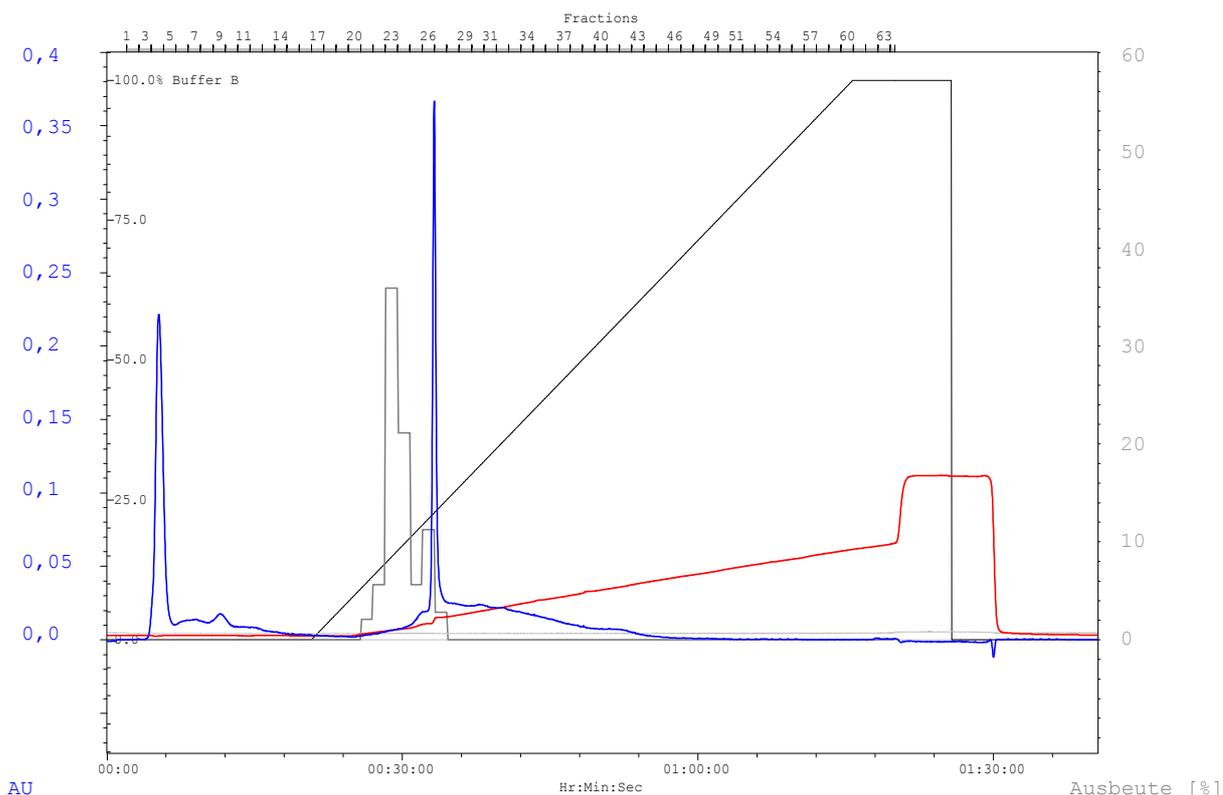


Abb. 3-12: IEC an Q-Sepharose High Performance; Einsatz einer 2-mL-Probenschleife; UV-Absorption (—), Leitfähigkeit (—), Enzymaktivität (—) [mU/mL]

Durch nur einen Reinigungsschritt konnten ~ 97% der Fremdproteine abgetrennt werden (Abb. 3-12). In dem 1. Hauptpeak (Frak. 4-5) war keine Aktivität

3 Ergebnisse

nachweisbar. Die Hauptaktivität war in den Fraktionen 21-25 zu finden, wobei die Wiederfindungsrate 70-90%¹⁰ betrug

In diesen ersten Läufen kam eine 2-mL-Probenschleife zum Einsatz. Um möglichst viel Protein in kurzer Zeit aufzureinigen wurde „Scale up“ durchgeführt, da die Säulenkapazität nicht ausgeschöpft war. Zunächst wurden die Bedingungen so adaptiert, dass eine 5-mL-Probenschleife erfolgreich zum Einsatz kam. Anschließend erfolgte die Aufgabe von 10 mL Ultraretentat. Auch diese Modifikation verlief erfolgreich. Das Elutionsprofil glich dem des „2-mL-Probenlaufs“ (Abb. 3-13). Die Wiederfindungsrate betrug 60-80%.¹¹

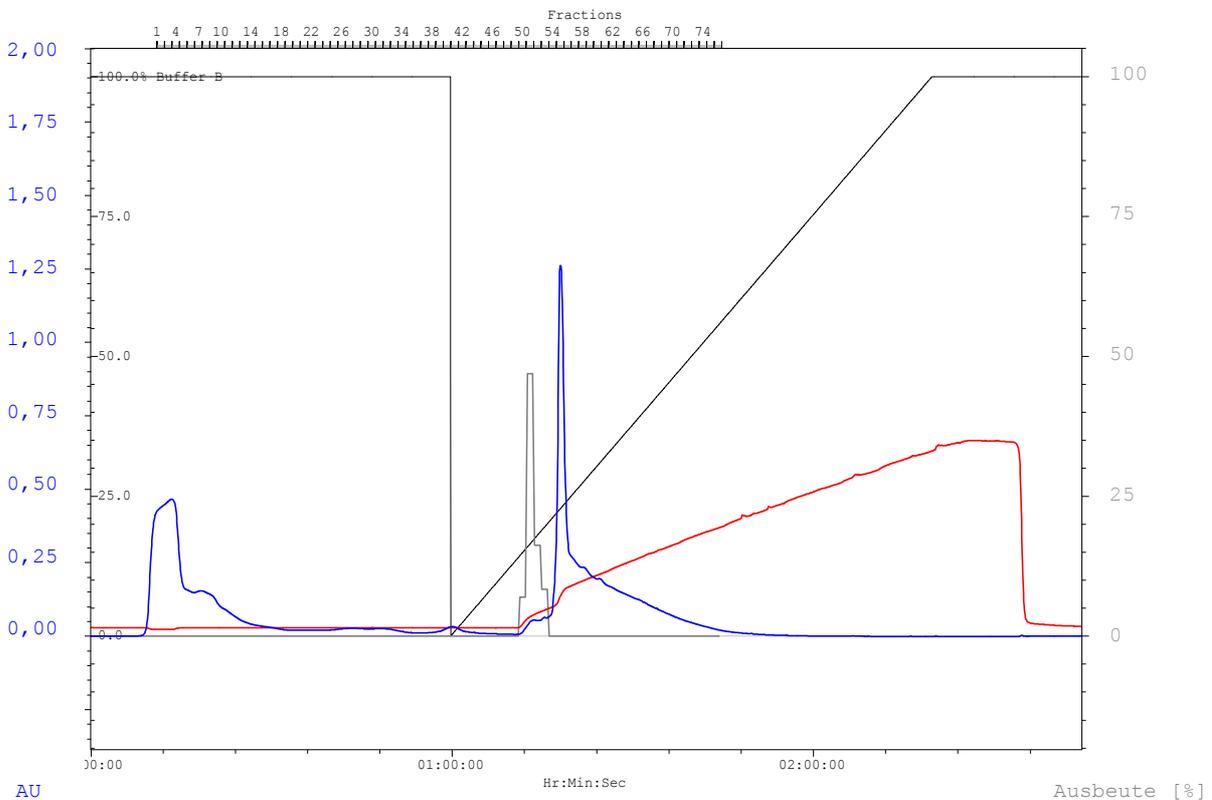


Abb. 3-13: IEC mit Q-Sepharose High Performance; Probenauftragsvolumen 10 mL; UV-Absorption (—), Leitfähigkeit (—), Enzymaktivität (—) [mU/mL]¹²

¹⁰ Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden die Proben nicht umgepuffert.

¹¹ Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden die Proben nicht umgepuffert. Die nächst höheren Fraktionen wurden nicht auf Aktivität getestet.

¹² Die Enzymaktivität der ersten Fraktionen, die sich an den Vorpeak anschlossen, wurden nicht getestet. Auf Grund der vorangegangenen Versuche ist mit einer geringen Aktivität zu rechnen.

3 Ergebnisse

3.1.4.2 Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Mit dem Ultraretentat wurde eine analytische GFC zur Etablierung eines zweiten Reinigungsschrittes durchgeführt. Das Superdex-200-Material stellte sich für die Aufreinigung als sehr wirksam heraus. Das Zielenzym eluierte in wenigen Fraktionen (15-17) von der Säule. Die Wiederfindungsraten betragen 63-85%.

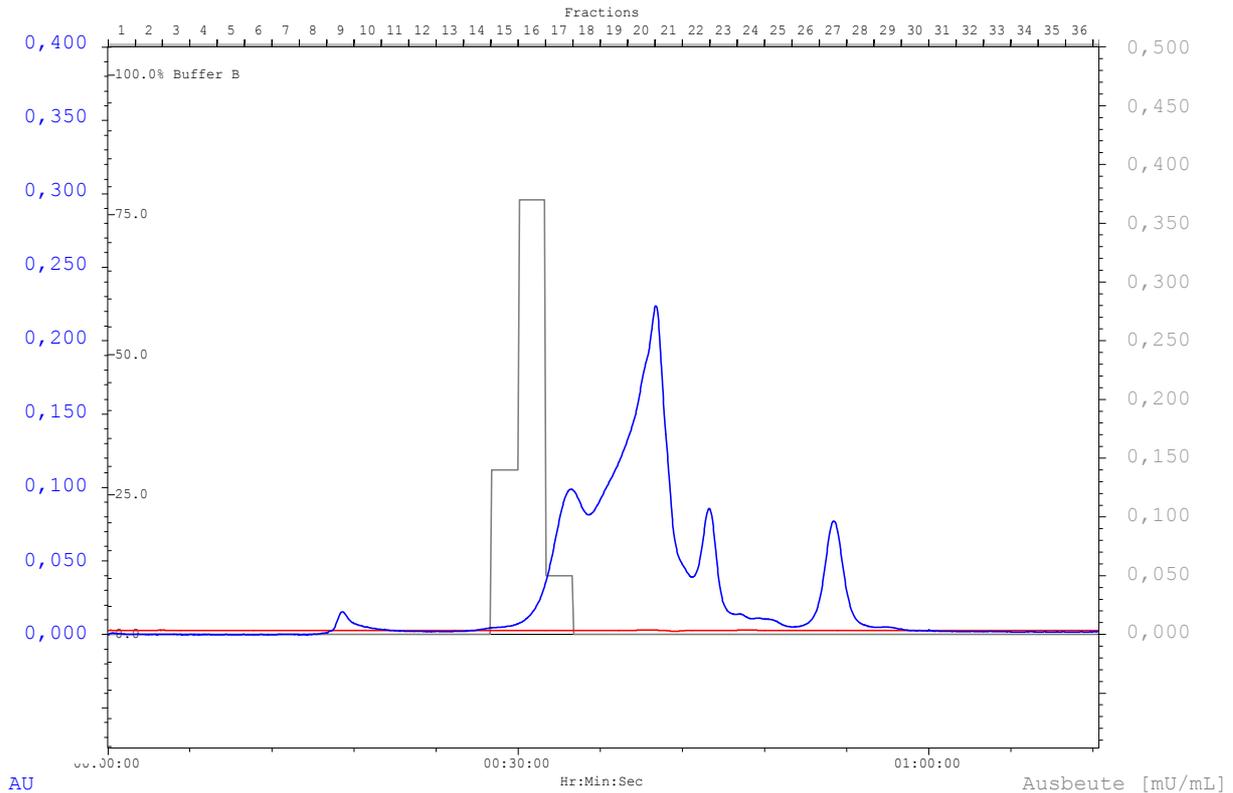


Abb. 3-14: Analytische GFC mit Superdex-200-Material; UV-Absorption (—), Leitfähigkeit (—), Enzymaktivität (—) [mU/mL]

Es stand eine präparative Superdex-200-Säule zur Verfügung, die ebenfalls zur Proteinreinigung herangezogen wurde. Das Elutionsprofil dieser Säule glich dem der analytischen Säule (Abb. 3-15). Die Trennschärfe dieser Säule war jedoch schlechter. Die Hauptenzymaktivität erstreckte sich über mehrere, größere Fraktionen (13-19) bei einem Aktivitätsverlust von ~ 80%.

3 Ergebnisse

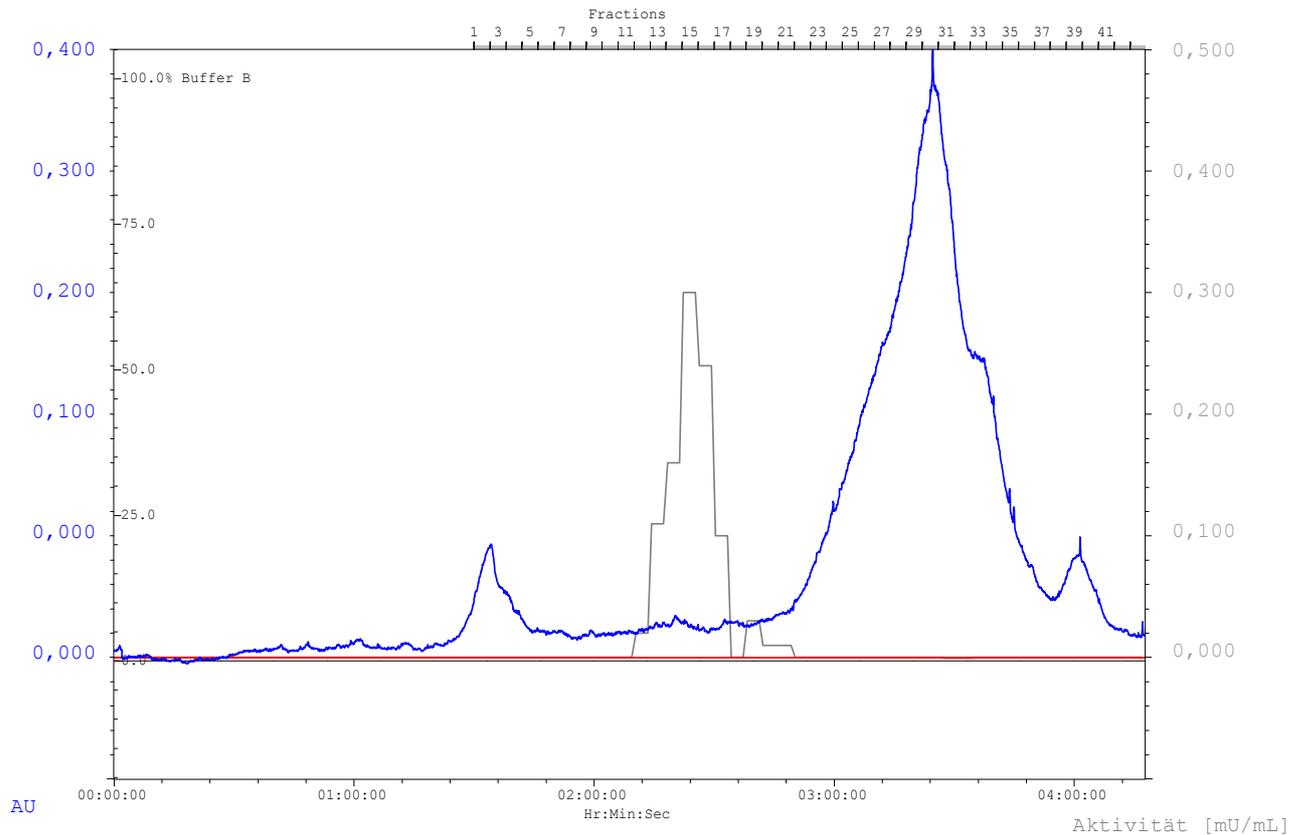


Abb. 3-15: Präparative GFC mit Superdex-200-Material; UV-Absorption (—), Leitfähigkeit (—), Enzymaktivität (—) [mU/mL]

3.1.5 Proteinbiochemische Identifizierung der Proteine MsP1 und MsP2

3.1.5.1 Kombinierte Aufreinigung

Je nach Volumen des Kulturüberstandes wurde dieser entweder mittels Centricon-Plus-80- oder mittels Vivaflow-200-Einheit konzentriert. Anschließend wurden die beiden oben beschriebenen Chromatographieschritte (vgl. 3.1.4) zur Darstellung vollständig gereinigten Enzyms miteinander kombiniert. Die aktiven Fraktionen der IEC-Läufe wurden gepoolt, mittels Vivaspin-15R-Einheiten aufkonzentriert und auf die analytische Superdex-Säule aufgetragen. Die aktiven Fraktionen der GFC-Läufe wurden erneut mittels Vivaspin-15R-Einheiten aufkonzentriert. Der Erfolg der Reinigung wurde mittels SDS-Gelelektrophorese kontrolliert (Abb. 3-16).

3 Ergebnisse

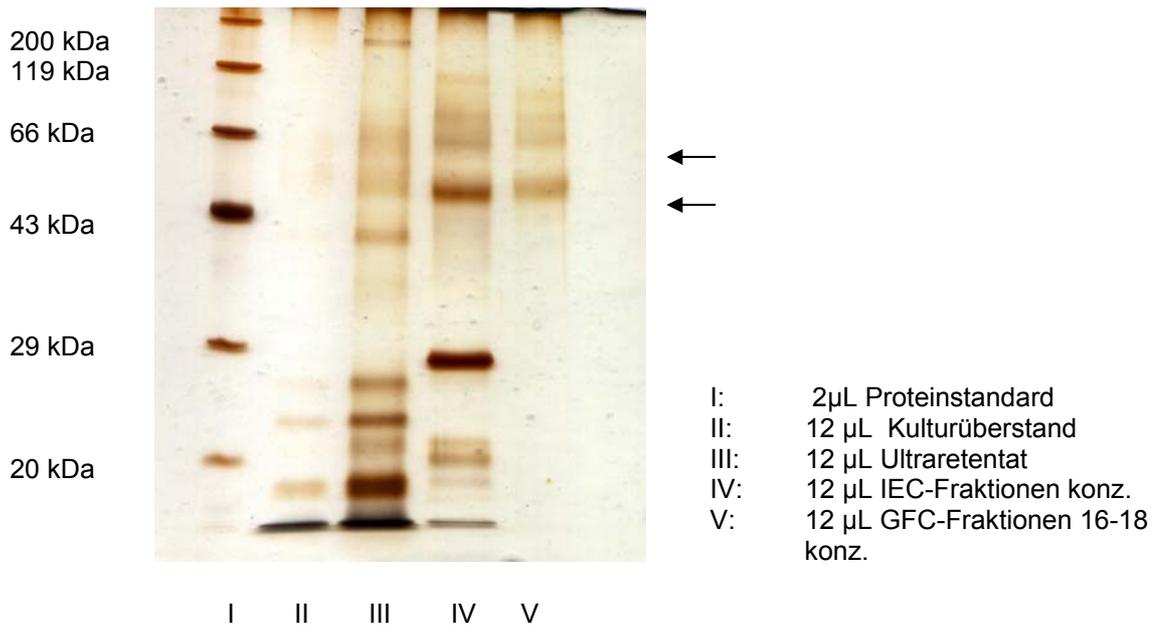


Abb. 3-16: 12%iges SDS-Gel der einzelnen Reinigungsstufen des Zielenzym

Anhand des SDS-Gels der kombinierten Reinigung war zu erkennen, dass sich die Zahl der Proteine durch die GFC im Wesentlichen auf zwei Hauptkomponenten reduzieren ließ. Der Anreicherungsfaktor betrug 291 (Tab. 3-5). Der Anteil des potentiellen Zielproteins betrug 0,2 % des Gesamtproteins des Kulturüberstandes.

Tab. 3-5: Bilanzierung einer zweistufigen Reinigung der β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus *M. scorodoni*

Probe	Protein- gehalt [mg/mL]	Gesamt- protein [mg]	Aktivität [mU/mL]	Gesamt- aktivität [mU]	Ausbeute [%]	spez. Aktivität [mU/mg]	Anreicher- ungsfaktor
Rohextrakt	1,34	87,03	0,55	35,72	100	0,41	1
Ultraretentat	1,66	15,3	2,56	23,55	65,9	1,54	4
IEC konz.	0,28	0,4	16,45	20,56	57,6	48,95	119
GFC konz. (F 16-18)	0,29	0,15	35,36	17,89	50,1	119,27	291

3 Ergebnisse

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden die aktiven Fraktionen (F16-19) mehrerer GFC-Läufe getrennt voneinander gepoolt und mittels Vivaspin-15R-Einheiten aufkonzentriert.

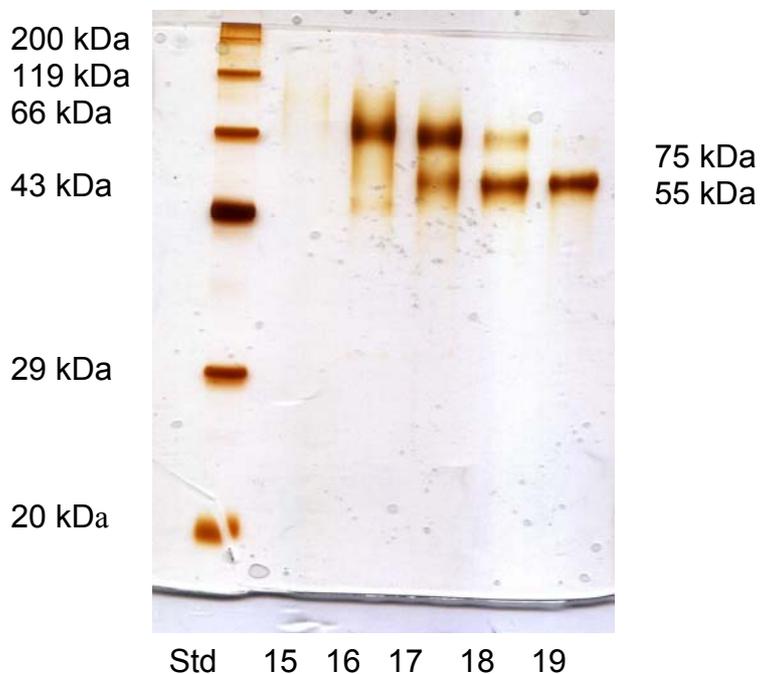


Abb. 3-17: 16%iges SDS-Gel der einzelnen aktiven GFC-Fraktionen; Auftragsvolumen: Std.: 2 μ L, F15: 10 μ L, F16-19: 5 μ L

Durch eine getrennte Aufkonzentrierung der aktiven GFC-Fraktionen konnte mittels SDS-PAGE gezeigt werden, dass die verbleibenden Proteine durch die GFC vollständig voneinander getrennt werden konnten. Fraktion 16 wies unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE ein Protein MsP1 mit einem abgeschätzten Molekulargewicht von 75 kDa auf. Das Protein MsP2 der Fraktion 19 wies eine Größe von 55 kDa auf. In den dazwischen liegenden Fraktionen traten beiden Enzyme gemeinsam auf.

Für die beiden Enzyme MsP1 und MsP2 ließen sich unter den nativen Bedingungen der Größenausschlusschromatographie Molekulargewichte von 150 bzw. 120 kDa ermitteln. Für die Ermittlung dieser Molekulargewichte der beiden Proteine wurden die Retentionszeiten der Peakmaxima von 11 verschiedenen Läufen gemittelt.

3 Ergebnisse

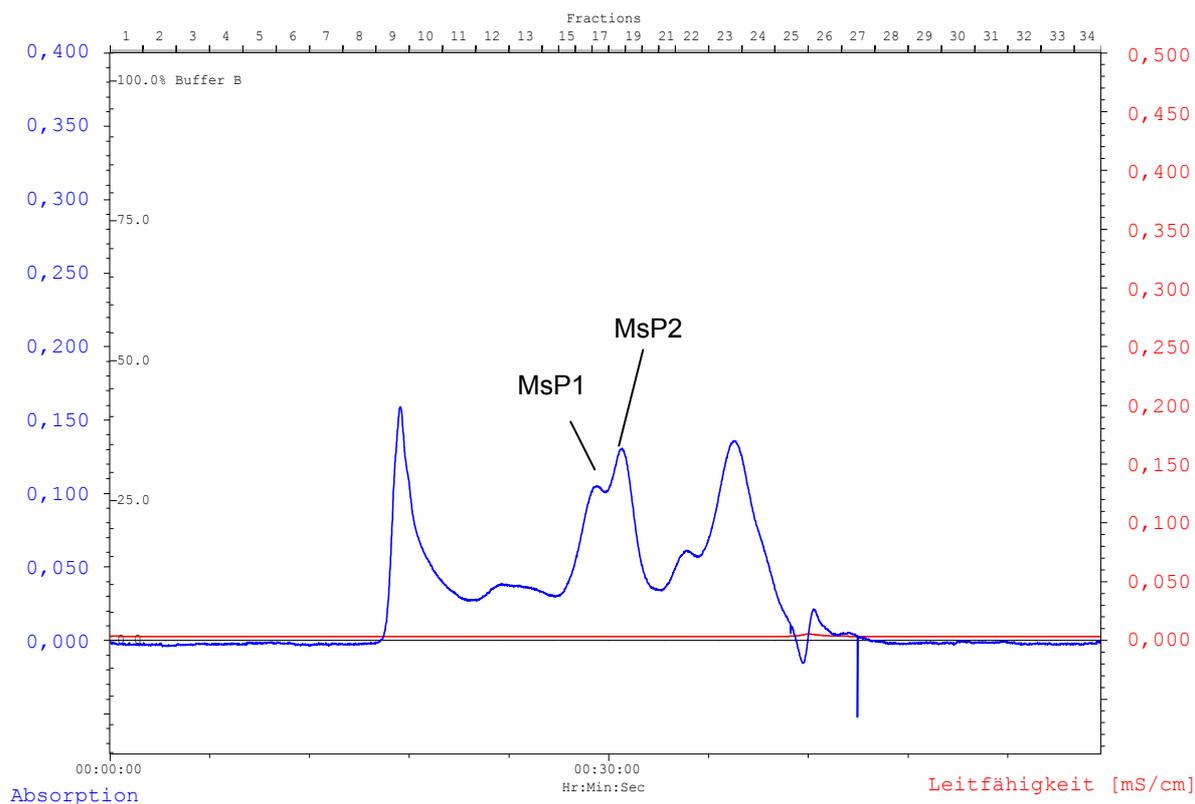


Abb. 3-18: 2. Reinigungsstufe der β,β -Carotin-abbauenden Zielenzyme, analytische GFC; UV-Absorption (—), Leitfähigkeit (—)

MsP2 wies eine höhere spezifische Aktivität auf als MsP1 (Tab. 3-6).

Tab. 3-6: Bilanzierung der einzelnen, aufkonzentrierten Superdex-Fractionen

Probe	Proteingehalt [mg/mL]	Gesamtprotein [mg]	Aktivität [mU/mL]	Gesamt- aktivität [mU]	spez. Aktivität [mU/mg]
F16, konz.	0,44	0,18	17,57	7,03	39,06
F17, konz.	0,66	0,25	31,8	12,08	48,32
F 18, konz.	0,76	0,3	37,87	14,77	49,23
F 19, konz.	0,48	0,18	25,37	9,39	52,17

3 Ergebnisse

3.1.5.2 Die isoelektrischen Punkte von MsP1 und MsP2

Die Superdex-Fractionen F15-19 wurden auf ein IEF-Gel (pH 3-6) aufgetragen. Aktivitätsentfärbungen im direkten Anschluss an die IEF ergaben in Abhängigkeit der Probenkonzentration bis zu vier entfärbte Banden (Abb. 3-19).

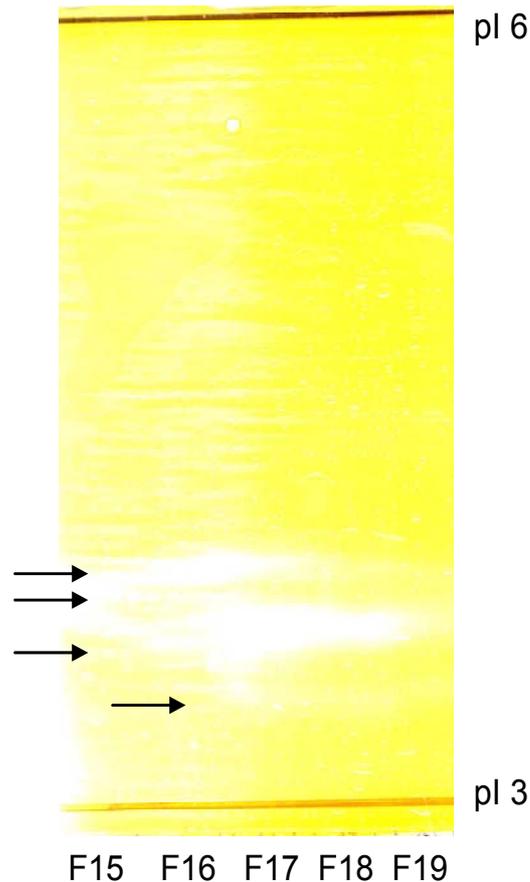


Abb. 3-19: IEF-Gel mit anschließender Aktivitätsentfärbung mit den Superdex-Fractionen F15-19, Auftragsvolumen: 12,5 μL ¹³. Die Pfeile markieren die Lage der entfärbten Banden.

Durch eine Kopplung der isoelektrischen Fokussierung mit der SDS-Gelelektrophorese konnten den beiden Proteinen MsP1 und MsP2 direkt die isoelektrischen Punkte zugeordnet werden.

¹³ Es sind auf dem dargestellten Aktivitätsgel z. T. keine diskreten Banden sichtbar, da die Gele für längere Zeit inkubiert werden mussten, damit die Banden nach dem Scannen zu sehen waren. Dies führte in einigen Fällen zu einem Beginn des Zusammenlaufens der Banden. Die Lagen der diskreten Banden wurden im Vorfeld, als sie als Einzelbande gut sichtbar waren, ermittelt. Sie konnten durch mehrfache Wiederholung der Entfärbung reproduziert werden.

3 Ergebnisse

Zu diesem Zweck wurden die einzelnen Fraktionen auf ein IEF-Gel aufgetragen. Die eine Hälfte des Gels wurde Coomassie-gefärbt, die andere Hälfte des Gels wurde einer Aktivitätsentfärbung unterzogen. Anhand der Aktivitätsentfärbung konnte 3 Banden eine β,β -Carotin-spaltende Aktivität zugeordnet werden (Abb. 3-20).

Ein Vergleich der SDS-Gele mit den IEF-Gele ergab, dass die Fraktionen 16 und 19 im Wesentlichen nur eine Proteinbande aufwiesen. Auf diese Weise war der indirekte Beweis erbracht, dass das Enzym MsP1 eine Enzymgröße von ~ 75 kDa und einen pI von $\sim 3,7$ aufwies. Für das Protein MsP2 ergab sich ein Molekulargewicht von ~ 55 kDa und ein pI von $\sim 3,5$.

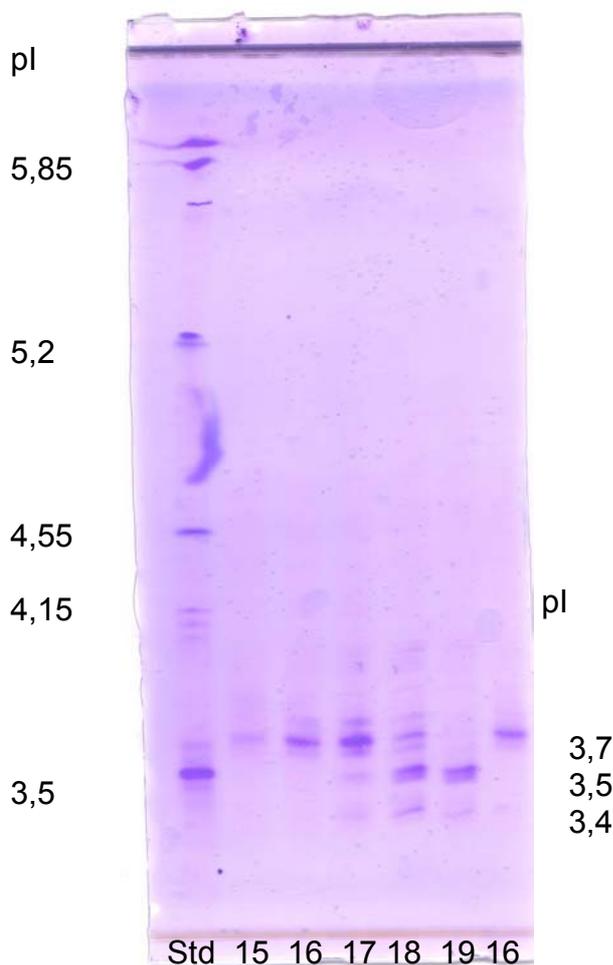


Abb. 3-20: IEF-Gel (pH 3-6) mit anschließender Coomassie-Färbung der konz. Superdex-Fractionen 15-19, Auftragsvolumen: Std.: 5 μ L, F15: 10 μ L, F16-19: 5 μ L

Ein direkter Beweis wurde erbracht, in dem eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt wurde, bei der nur ein Teil des Gels zur Detektion der Lage der einzelnen Banden Coomassie-gefärbt wurde. Aus dem ungefärbten IEF-Gel wurden

3 Ergebnisse

Gelstücke auf der Höhe der pls 3,7 und 3,5 ausgeschnitten. Diese Gelstückchen wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt (vgl. 2.14.5) und auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Gele wiesen jeweils eine Proteinbande auf, die die oben genannten Ergebnisse bestätigten.

3.1.5.3 Sequenzierung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme MsP1 und MsP2

Im Anschluss an die chromatographische Aufreinigung der Enzyme MsP1 und MsP2 (vgl. 3.1.5.1) wurden die oben beschriebenen Superdex-Fraktionen 16 und 19 direkt der Sequenzierung unterzogen.

3.1.5.3.1 N-terminale Sequenzierung mittels Edman-Abbau

Die N-terminale Sequenzierung mittels Edman-Abbau lieferte folgende Ergebnisse:

MsP1: **ASF?AGL?LTDIQGDIL?TMKKNKELFF¹⁴**

MsP2: **AP?L?LTDIQGDILIGMKKNKE?FF**

3.1.5.3.2 Sequenzierung mittels ESI-tandem-MS

Weitere Aminosäure-Sequenzinformationen interner Proteinfragmente wurden nach Trypsinverdau durch massenspektrometrische *ab initio* Sequenzierung gewonnen¹⁵:

MsP1:

Peptid 1: **GGEYFFSPSLSALR**

Peptid 2: **QLPYGPEVTDAEK**

Peptid 3: **NSGTDAPNTPR**

MsP2:

Peptid 1: **DGSFLAFR**

¹⁴ Fettdruck: sichere Identifizierung

¹⁵ Eine Unterscheidung der isomeren Aminosäuren Leucin und Isoleucin war durch die ESI-tandem-MS nicht möglich, der Einbuchstabencode „L“ steht daher stellvertretend für „L“ oder „I“.
Fettdruck: sichere Identifizierung

3 Ergebnisse

Peptid 2: **PQNTNNHLLR**

Peptid 3: **LVLNTDFVSSR**

Peptid 4: **FLADNAALTQGNADLL**

Peptid 5: **SGAPVDLAPTADDVDLANDPQR**

Sowohl bei MsP1 als auch bei MsP2 handelt es sich um ein Glykoprotein des „high-Mannose-Typs“.

3.1.5.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

3.1.5.4.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie von MsP1

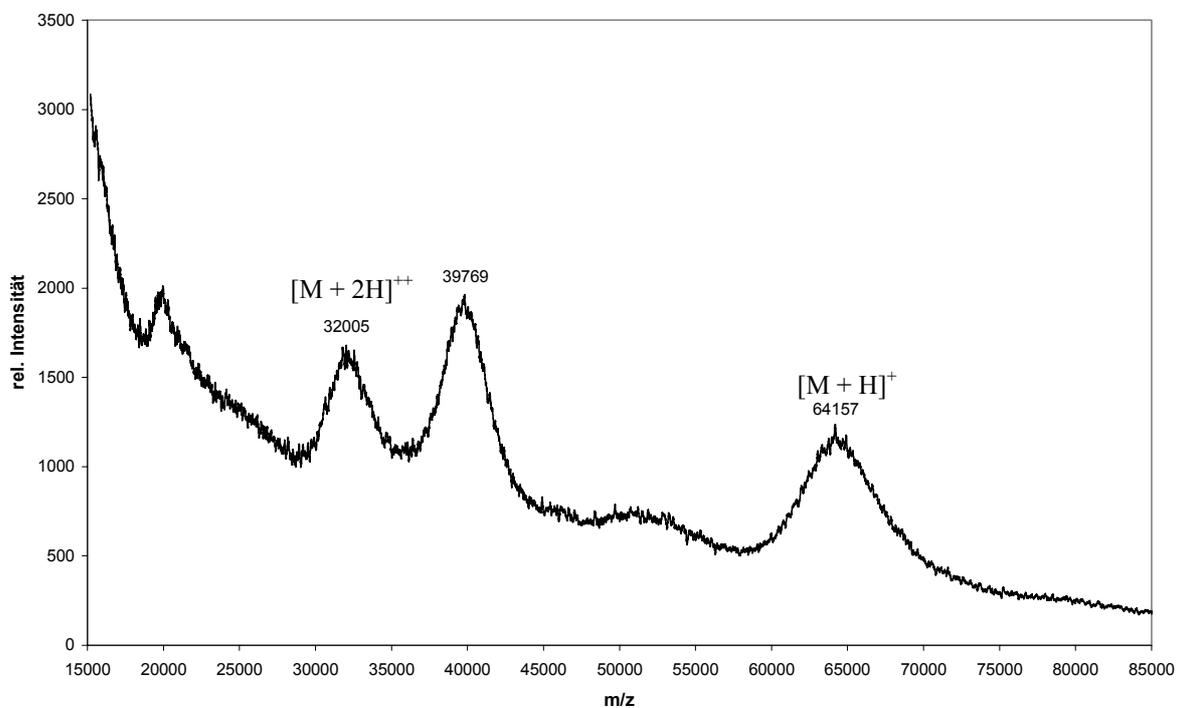


Abb. 3-21: MALDI-TOF-Spektrum von MsP1

Die MALDI-TOF-Analyse (Abb. 3-21) ergab für MsP1 ein Molekulargewicht von 64,2 kDa. Das Signal bei 32 kDa resultierte aus dem zweifach protonierten Molekül. Bei dem dritten Peak des Spektrums (40,0 kDa) handelte es sich um eine Verunreinigung.

3 Ergebnisse

3.1.5.4.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie von MsP2

Die Molekulargewichtsbestimmung von MsP2 mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie ergab eine Masse von 52,4 kDa. Das Spektrum (Abb. 3-22) zeigt, dass die Probe zur Homogenität gereinigt werden konnte. Bei dem Signal bei 24,5 kDa handelte es sich um das doppelt geladene Molekül.

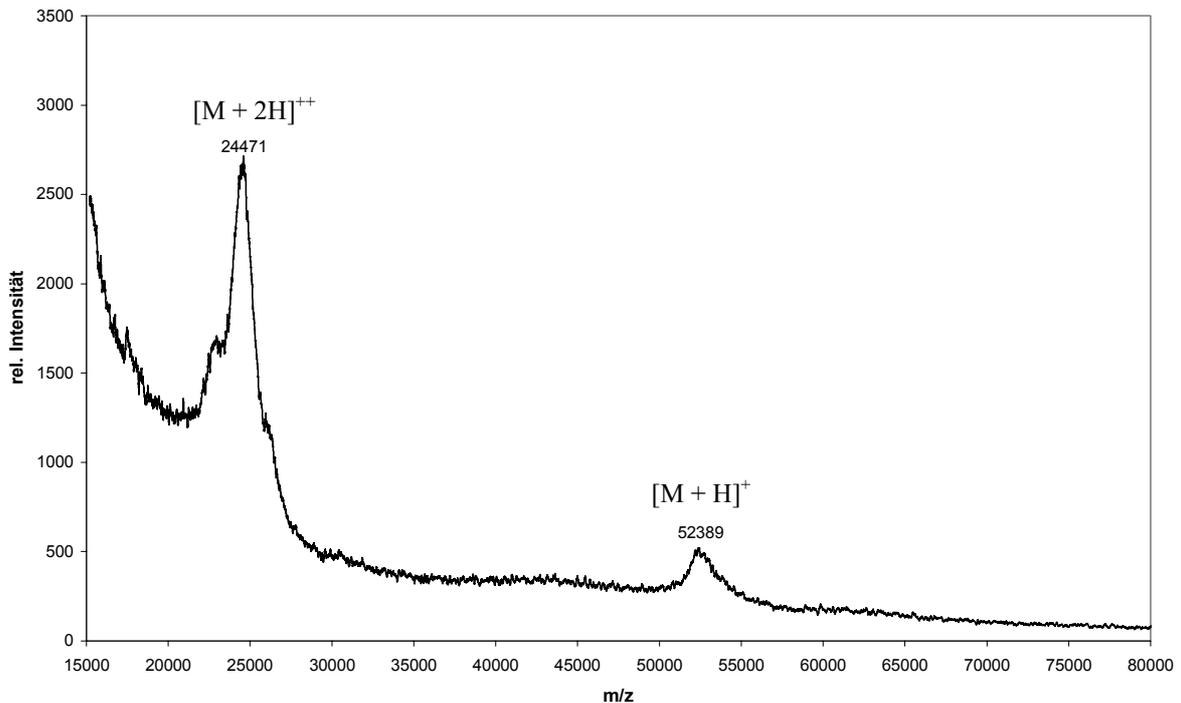


Abb. 3-22: MALDI-TOF-Spektrum von MsP2

3.1.6 Proteinbiochemische Charakterisierung der Proteine MsP1 und MsP2

3.1.6.1 pH-Wert-Abhängigkeit der Enzymaktivität von MsP2

Für das Enzym MsP2 ergab sich unter Verwendung von NaAc-Puffer, 50 mM, 27 °C kein scharfes pH-Optimum als solches, sondern ein Aktivitätsplateau. Im Bereich von pH 3-5 war eine Aktivität von > 89% zu verzeichnen. Insgesamt verfügte das Enzym über eine große Toleranz gegenüber wechselnden pH-Werten, da selbst bei einem pH-Wert von 6 noch mehr als 80 % Aktivität vorhanden war (Abb. 3-21).

3 Ergebnisse

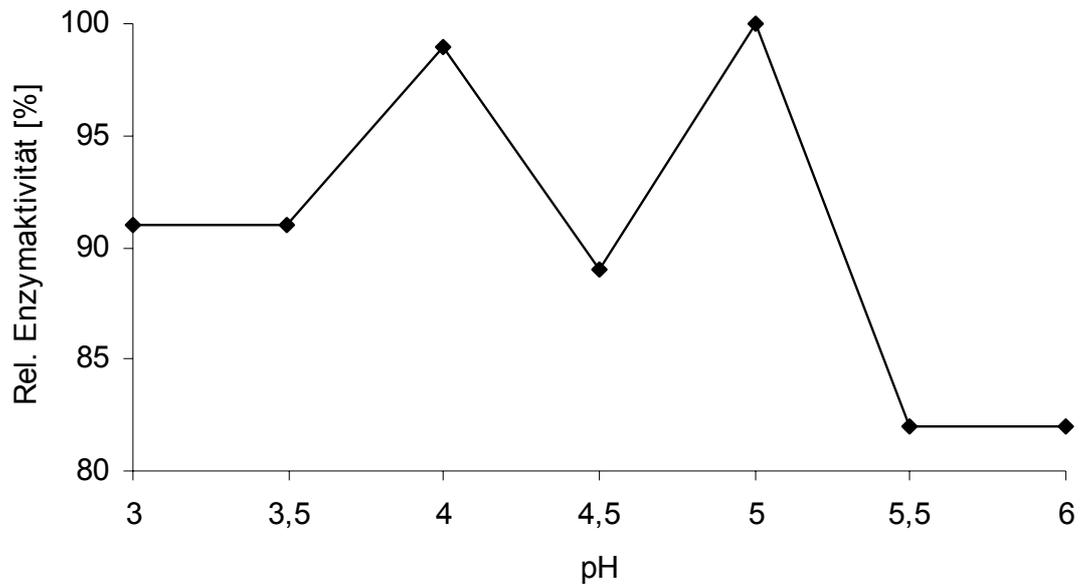


Abb. 3-23: Relative Enzymaktivität [%] des Enzyms MsP2 in Abhängigkeit vom pH-Wert des NaAc-Puffers

3.1.6.2 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Enzymaktivität von MsP2

Der Zusatz von H_2O_2 zum Enzymtest (vgl. 2.16.1.5) führte beim Enzym MsP2 zu einer Aktivitätssteigerung auf $\sim 145\%$ im Vergleich zu einem Ansatz ohne H_2O_2 -Gabe. Im Blindwert (Puffer mit H_2O_2 ohne Enzym) war keine Aktivität nachweisbar.

3.1.6.3 Natriumchlorid-Toleranz der Enzyme MsP1 und MsP2

Sowohl MsP1 als auch MsP2 zeigten bei einer NaCl-Konzentration von 0,25 M die höchste Aktivität. Es erfolgte eine Aktivitätssteigerung von 30% (Ansatz ohne NaCl) auf 100% (Abb. 3-24). Eine Steigerung der NaCl-Konzentration auf 1 M führte jedoch in beiden Fällen zu starken Aktivitätsverlusten. Bereits bei einer NaCl-Konzentration von 0,5 M sank die Aktivität auf einen Betrag unterhalb der Ausgangsaktivität ohne NaCl-Gabe.

3 Ergebnisse

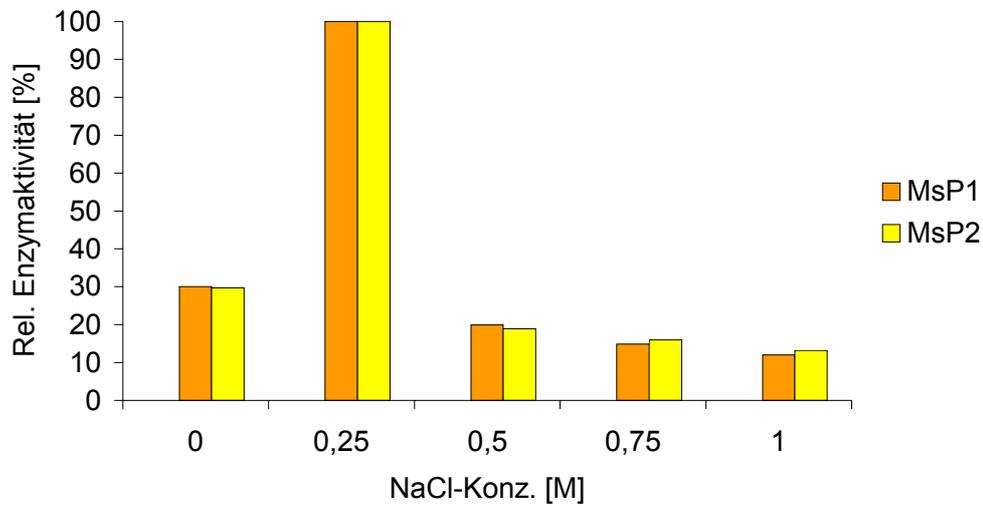


Abb. 3-24: Relative Enzymaktivität [%] der Enzyme MsP1 und MsP2 in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration

3.1.6.4 Absorptionsspektrum von MsP2

Das UV/VIS-Spektrum von aufgereinigtem MsP2-Enzym wurde im Bereich von 330 bis 650 nm aufgenommen. Ein Absorptionsmaximum wurde bei 405 nm registriert (Abb. 3-25); ferner trat ein breites Maximum im Bereich von 510 nm auf.

3 Ergebnisse

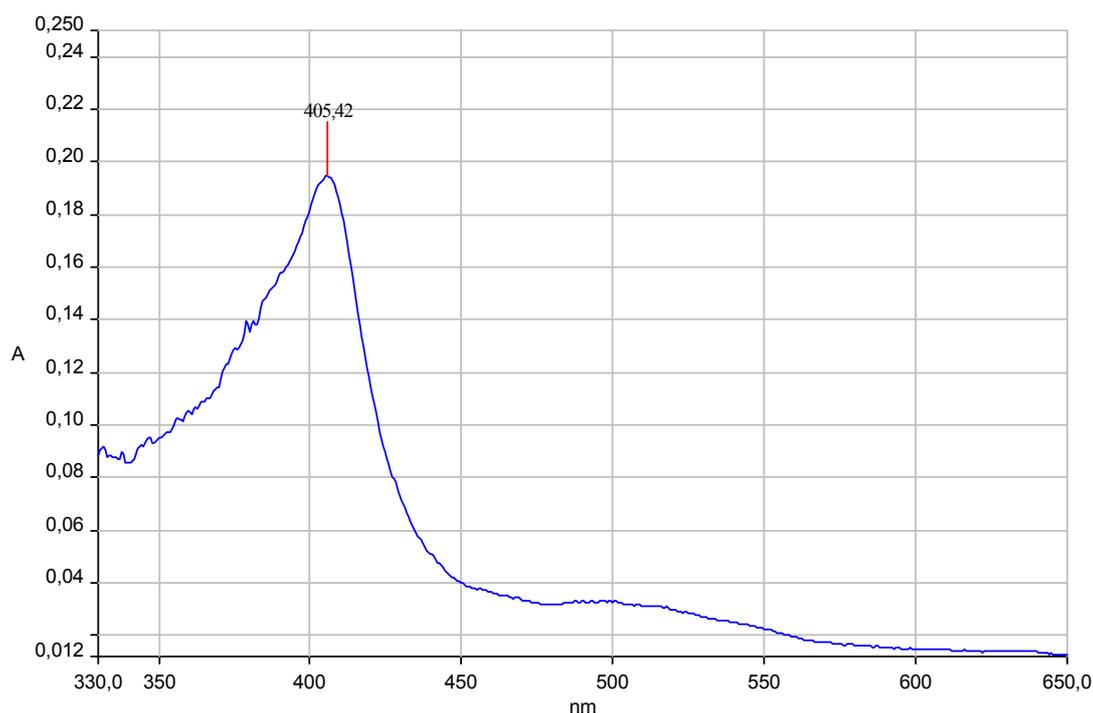


Abb. 3-25: UV/VIS-Spektrum von MsP2

3.1.7 Charakterisierung der Proteine MsP1 und MsP2 auf molekularbiologischer Ebene

3.1.7.1 Sequenzvergleich

Mit den oben genannten Peptidfragmenten aus den Enzymen MsP1 und MsP2 wurden Datenbankrecherchen (European Bioinformatics Institute: Fasta) zur Identifizierung homologer Sequenzen durchgeführt. Ausgehend von den homologen Peptidsequenzen zu Grunde liegenden DNA-Sequenzen sollten Primer für die Identifizierung der den Proteinen MsP1 und MsP2 zu Grunde liegenden DNA-Sequenz konstruiert werden.

Für das Protein MsP1 ergab der Sequenzvergleich für die Peptide 1 und 2 und die Edman-Sequenz hauptsächlich Homologien zu verschiedenen Peroxidasen. Bei den Peroxidasen bzw. Oxidasen mit höchster Homologie handelte es sich um eine neue Peroxidase (DyP) aus *Geotrichum candidum*, eine Peroxidase aus *Polyporaceae sp.* und einer peroxidabhängigen Phenoloxidase (TAP) aus *Termitomyces albuminosus*. Peptid 3 wies keine eindeutigen Homologien zu bekannten Proteinen auf.

3 Ergebnisse

Für das Enzym MsP2 ergab der Sequenzvergleich für die Peptide 1 und 5 und die Edman-Sequenz ebenfalls signifikante Homologien zu den oben genannten Enzymen, während für die Peptide 2-4 keine konkrete Zuordnung möglich war. Ferner blieb festzustellen, dass sich die Edman-Sequenzen beider Enzyme sehr ähnelten.

3.1.7.2 Ableitung der Primer

Für die Ableitung der Primer wurden ausschließlich die Gensequenzen der Peroxidase (DyP) aus *Geotrichum candidum*, einer Peroxidase aus *Polyporaceae sp.* und einer peroxidabhängigen Phenoloxidase (TAP) aus *Termitomyces albuminosus* herangezogen. Es war davon auszugehen, dass der Codon-Gebrauch innerhalb des Pilzreiches (Ascomyceten und Basidiomyceten) ähnlicher war als zwischen Pilzen und Bakterien oder höheren Organismen.

Eine genauere Analyse der Proteinsequenz der DyP aus *G. candidum* ergab, dass dieses Protein sowohl homologe Peptidsequenzen zu MsP1 als auch zu MsP2 aufwies:

3 Ergebnisse

a)

MRLSLFVVSVAVLVGSSSHVNAAKLGARQTRTTPLLTNFPGQAPLPTLTQHHTTESG
ANDTILP **LNMIQGDILVGMKKQKE**RFVFFQVNDATSFKTALKTYVPERITSAAILISDP
SQQPLAFVNLGFSNTGLQALGITDDLGDAGFPDGGQFADAANLGDDLSQWVAPFTG
TTIHGVFLIGSDQDDFLDQFTDDISSTFGSSITQVQALSG **DGSFMAFR**SARPGDQAG
HEHFGFLDGISQPSVTGWETTVPFGQAVVPPGIILTGRDGDGTGRPSWALHFQQKV
PEFNAYTLANAIPANSAGNLTQQEGAEFLGARMFGRWK **SGAP/DLAPTADDPALGA**
DPQRNNNFDYSDTLTDETRCPFGAHVRKTNPRQDLGGPVDTFHAMRS **SIPYGPE7**
SDAELASGVTAQDRGLLFVEYQSIIGNGFRFQQINWANNANFPFSKPITPGIEPIIGQ
TTPRTVGGLDPLNQNETFTVPLFVIPK **GGEYFFLPSISAL**TATIAA 498 aa

b)

MsP2: L*TDIQGDIL/GMKKNKE* **(1) DGSFLAFR (2)**

SGAPVDLAPTADDVDLANDPQR (3)

MsP1: L*TDIQGDIL?TMKKNKE* **(1) Q(L/I)PYGPEVTDAEK(4)**

GGEYFFSPS(L/I)SALR (5)

Abb. 3-26: a) Aminosäuresequenz des Enzyms DyP aus *Geotrichum candidum*. Darstellung der Sequenzhomologie zu den Edman-Sequenzen von MsP1 und MsP2 in grün, zu MsP1 in blau und zu MsP2 in rot (ESI-tandem-MS). Unterschiede in der AS-Sequenz kursiv. b) Tryptische Peptide der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme MsP1 und MsP2 aus *Marasmius scorodonius*.

Die Homologien der einzelnen Peptide aus MsP1 und MsP2 zu DyP aus *G. candidum* ließen Rückschlüsse über die potentielle Lage bzw. Orientierung dieser Peptide innerhalb der beiden unbekannt Enzyme zu. Ausgehend von diesen Kenntnissen wurden die Primer entsprechend abgeleitet (Tab. 3-7). Für die Primerableitung wurden jeweils die Gensequenzen aus 2 der 3 oben genannten Organismen miteinander verglichen. An den Stellen, an denen sich die Nukleotide voneinander unterschieden, wurden in die Primer „Wobbels“ eingebaut. Das Übereinanderlegen aller 3 Gensequenzen erwies sich für die Primerableitung als nicht sinnvoll, da die Anzahl der Abweichungen innerhalb der Nukleotidfolge zu hoch war. Einige Primer leiteten sich von nur einem Organismus ab.

3 Ergebnisse

Tab. 3-7: Primer für die Identifizierung der Gene MsP1 und MsP2 aus *Marasmius scorodonius*. Teil I: Primerableitung auf Grund des o. g. Homologievergleiches. Teil II: Primerableitung auf Grund eines bekannten Teilstücks von MsP1.

Primer (Nummer/ Name)	Sequenz	Schmelz- Tempera- tur [°C]
6071E / λfw2	5'>CGC GCC ATT GTG TTG GTA<3'	56,0
3396M / F19 Edman fw1	5'>TT(AGCT) AT(ACT) GG(AGCT) ATG AAG AAA AA<3'	50,6
3397M / F19 Edman fw2	5'>TT(AGCT) AT(ACT) GG(AGCT) ATG AA(AG) AAG AA<3'	51,8
9483M / F16 start fw1	5'>GA (CT) ATT (CT) T (GT) GT (GT) GGC ATG AAG<3'	59,6
3471E / F16/19 II fw1	5'>GAT GGG AGT TTC ATG GCA TT<3'	58,0
0065M / F19 midfw1	5'>TGG (GT)TC (AT)TT CCT (CT)GC (ACT)TT C<3'	56,5
3394M / F19/1-1rv	5'>AA(AGCT) GC(AGCT) A(AGT)G AA(AG) CTC CCA TC<3'	59,8
3395M / F19/1-2rv	5'>AA(AGCT) GC(AGCT) A(AGT)G AA(AG) CTC CCG TC<3'	61,8
3398D / F19/1-3rv	5'>AA(AGCT) GC(AGCT) A(AGT)G AA(AGCT) GAC CCA TC<3'	59,7
3399D / F19/1-4rv	5'>AA(AGCT) GC(AGCT) A(AGT)G AA(AGCT) GAC CCG TC<3'	61,7
0066M / F19 mid rv1	5'>GAA (ACT)GC (CT)AG GAA (AT)GA (GT)CC A<3'	56,5
9486D / F16 end fw1	5'>TAT GGG CCT GAG GTT ACC G<3'	60,0
9484M / F16 end fw2	5'>CC (GT) TA (CT) GG (GC) CC (AT) GAG GTT AC<3'	63,8
3472E / F16 end rv3	5'>CGC AGA GAT AGA GGG CAA<3'	64,0
9487D / F16 end rv1	5'>AGA GAT GGA GAG AAG AAA TAT TCG<3'	66,0
9485M / F16 end rv2	5'> AGA GA (GT) GG (AC) (AG) AG AA (AG) AA (AG) TAT TCG<3'	67,4
0064E / λ rv1	5'>TGC ATA AGC TTG CTC GAG TCT<3'	62,0
8131D / F16 start rev	5'>CAT TCA AAA TGG TTT GGA TGT TG<3'	62,0
8132D / F16 end fw	5'>CAA ATA GCT CTA GCA CTG ACC CTA<3'	70,0

3 Ergebnisse

8444e / CT smart 3 for2	5'>GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT<3'	64,0
1473 / CT CDS3 rev3	5'>AGG CCG AGG CGG CCG ACA<3'	64,0
7375d / F16 cC rev2	5'>AGA AAT ATT CGC CTC CAC GAG<3'	62,0
7376d / F16 cC rev3	5'>AAG TAT TCG CCT CCA CGA GA<3'	60,0
7377d / F16 cC fw1	5'>TCC TCT CAT CGG TAC AAA TTC TCG<3'	70,0
7378d / F16 cC rev1	5'>TTT GTA CCG ATG AGA GGA TCT ACA <3'	68,0

Basierend auf der Peptidverteilung von MsP1 und MsP2 im Enzym DyP aus *G. candidum* wurde eine Strategie zur Identifizierung der zu Grunde liegenden Gene dieser Enzyme entwickelt. Die nachfolgende Abbildung gewährte einen Überblick über die Lage und Orientierung der generierten Primer.

3 Ergebnisse

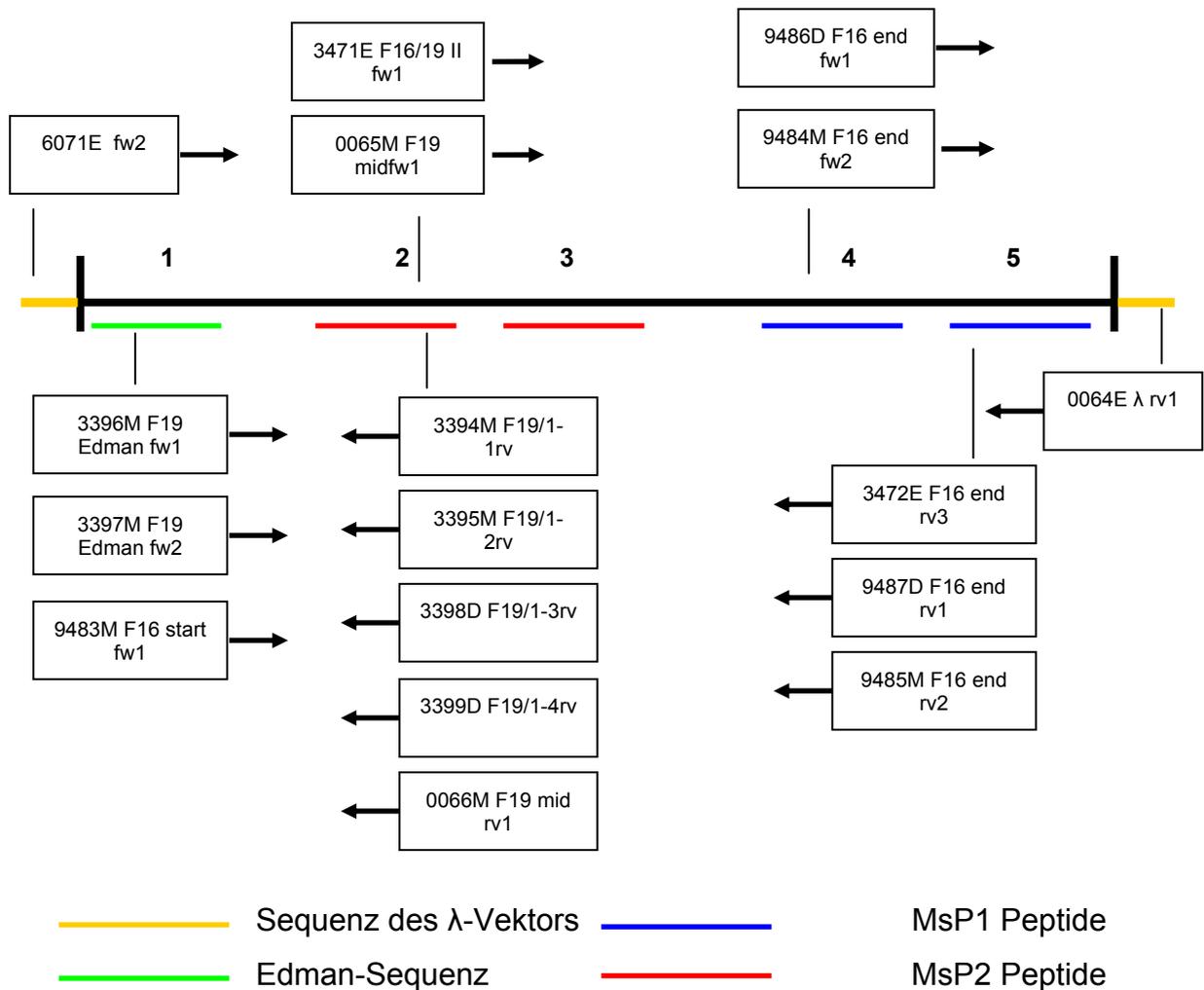


Abb. 3-27: Übersicht über die potentielle Lage der generierten Primer zur Identifizierung der beiden β, β -Carotin-abbauenden Enzyme aus *M. scorodonius*

Ausgehend von den generierten Primern wurde eine Vielzahl an Primerkombinationen entwickelt (Tab. 3-8) und die Größe der zu erwartenden PCR-Produkte abgeschätzt. Diese Abschätzung erfolgte wiederum auf der Basis des DyPs aus *Geotrichum candidum*.

3 Ergebnisse

Tab. 3-8: Primerkombinationen nebst der erwarteten Fragmentgrößen

Name des PCR-Produktes	5'-Primer	3'-Primer	Erwartete Produktgröße [bp]
PCR I	9484	0064	~ 400
PCR III	6071	9485	~ 1500
A	9486	9487	~ 300
B	9483	9485	~ 1200
C	9484	9485	~ 300
D	9486	0064	~ 400
E	6071	9487	~ 1500
F	0065	0064	~ 900
G	6071	0066	~ 650
H	3471	9485	~ 850
J	3471	0064	~ 1000
K	3471	3472	~ 850
L	6071	3472	~1500
M	3396	3394	~ 450
N	3397	3394	~ 450
O	3396	3395	~ 450
P	3397	3395	~ 450
Q	3396	3398	~ 450
R	3397	3398	~ 450
S	3396	3399	~ 450
T	3397	3399	~ 450
U	9483	3394	~ 450
V	9483	3395	~ 450
W	9483	3398	~ 450
X	9483	3399	~ 450
Y	9483	0066	~ 450
Z	9483	3472	~ 1200
AA	9483	9487	~ 1200
BA	9483	0064	~ 1500

3.1.7.3 Identifizierung der Gene der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus *Marasmius scorodoni* aus einer λ cDNA-Bank

3.1.7.3.1 Herstellung einer λ cDNA-Bank von *Marasmius scorodoni*

Im Rahmen der Diplomarbeit von Borchers (2004) wurde eine λ cDNA-Bank von *Marasmius scorodoni* erstellt. Zu diesem Zweck wurde eine *Marasmius*-Kultur angezogen, am Tag der höchsten Aktivität geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Nach der Überprüfung der Reinheit und der Konzentration der RNA diente diese als Template für die cDNA-Synthese mittels RT-PCR und nachfolgender LD-PCR. Die auf diese Weise gewonnene cDNA von *M. scorodoni* wurde in den λ TriplEx2TM-Vektor ligiert. Aus diesem Ligationsansatz und einem Verpackungsextrakt entstand die gewünschte Phagenbank mit einem Titer von $1,39 \times 10^6$ pfu/mL. Anschließend wurde die Phagen-Bank amplifiziert. Titer und Transformationseffizienz der amplifizierten MSC-Bank wurden kontrolliert. Der Titer betrug $\sim 1-1,5 \times 10^9$ pfu/mL.

Für die Gewinnung von MSC λ cDNA erfolgte eine Phagenpropagation und die anschließende Isolierung der λ cDNA.

3.1.7.3.2 Gradienten-PCRs mit λ cDNA als Template

Mit der MSC- λ cDNA als Template wurden die in Tab. 3-8 aufgeführten PCRs durchgeführt. Die eingesetzte Template-Menge wurde empirisch ermittelt. Für die präparierte MSC- λ cDNA erwies sich für den analytischen Ansatz 1 μ L einer 1:20 – 1:100 Verdünnung als sinnvoll. Mit Hilfe eines Gradienten-Cyclers wurden die Hybridisierungstemperaturen ermittelt, die auf eine spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten schließen ließen. Im Anschluss daran wurden präparative PCRs zur Fragment-Gewinnung durchgeführt. War die Fragmentkonzentration im ersten Durchlauf zu gering, wurde das Produkt der ersten PCR als Template in einer zweiten PCR eingesetzt. Bei der direkten Sequenzierung der PCR-Produkte traten Überlagerungen, die z. T. auf die Anwesenheit verschiedener DNA-Stücke schließen ließen, auf. Aus diesem Grund wurden alle Fragmente zwischenkloniert. Die Ligation erfolgte entweder in den pCR[®]2.1-TOPO-Vektor (vgl. 5.4.1) oder den pCR[®]2.1-Vektor (vgl. 5.4.2). Als Wirtstamm kam der Organismus *E. coli* TOP10F' zum Einsatz. Positive Klone wurden über das Blau/Weiß-Screening (vgl. 2.19.3.3) identifiziert. Jeweils fünf von ihnen wurden gepickt und mittels PCR auf die

3 Ergebnisse

Anwesenheit des Inserts getestet. Zwei von den positiv getesteten Kolonien wurden in 5-mL-ÜNs angezogen, die Plasmide isoliert und zur Sequenzierung gegeben.

Eine Serie von Primer-Kombination erbrachte auch bei niedrigen Hybridisierungstemperaturen keine spezifischen Fragmente. Diese Ansätze wurden nicht weiter verfolgt. Alle weiteren Kombinationen (PCR I, II, III, B, D, E, G, u, Y) lieferten Amplifikate, z. T. aber nicht mit der erwarteten Größe. Ungeachtet der Größe wurden sämtliche spezifisch angereicherten PCR-Produkte zwischenkloniert und sequenziert. Keine der Sequenzierungen erbrachte eine Homologie zu den Peroxidasen aus *Geotrichum candidum*, *Polyporaceae sp.* oder der Phenoloxidase aus *Termitomyces albuminosus*.

3.1.7.4 Identifizierung des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms MsP1 aus *Marasmius scorodoni* aus cDNA

3.1.7.4.1 Synthese von *Marasmius-scorodoni*-cDNA

Die RNA wurde am Tag der höchsten β,β -Carotin-spaltenden Enzymaktivität aus dem Mycel isoliert. Der Erfolg der RNA-Isolierung wurde mittels FA-Gelelektrophorese (vgl. 2.21.1) überprüft (Abb. 3-29a). Auf Grund der Tatsache, dass die mRNA nur 3% der cytoplasmatischen RNA ausmacht, war diese auf dem FA-Gel nicht sichtbar. Das Verhältnis zwischen der 18S-rRNA und der 25S-rRNA gab jedoch Aufschluss über den Erfolg der RNA-Isolierung. Die Bande der 25S-rRNA sollte ungefähr doppelt so intensiv sein, wie die der 18S-rRNA. Dies war bei beiden Präparationen der Fall, wodurch der Erfolg der Isolierung bestätigt wurde.

Die Konzentration der beiden RNA-Chargen wurde photometrisch ermittelt (vgl. 2.21.2)., zu diesem Zweck wurde die RNA 1:100 mit Wasser verdünnt.

Tab. 3-9: Konzentration der MSC RNA

Präparation	E ₂₆₀ (1:100)	Konzentration	Gesamt-RNA
1	0,048	192 µg/mL	9,6 µg
2	0,038	152 µg/mL	7,6 µg

3 Ergebnisse

Mit der isolierten RNA als Template wurde mit Hilfe des SMART PCR cDNA Library Construction Kit die cDNA synthetisiert (vgl. 2.22). Für die Erststrangsynthese wurde ~ 0,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zur Amplifikation des Erststranges schloss sich eine long distance PCR an (Abb. 3-28).

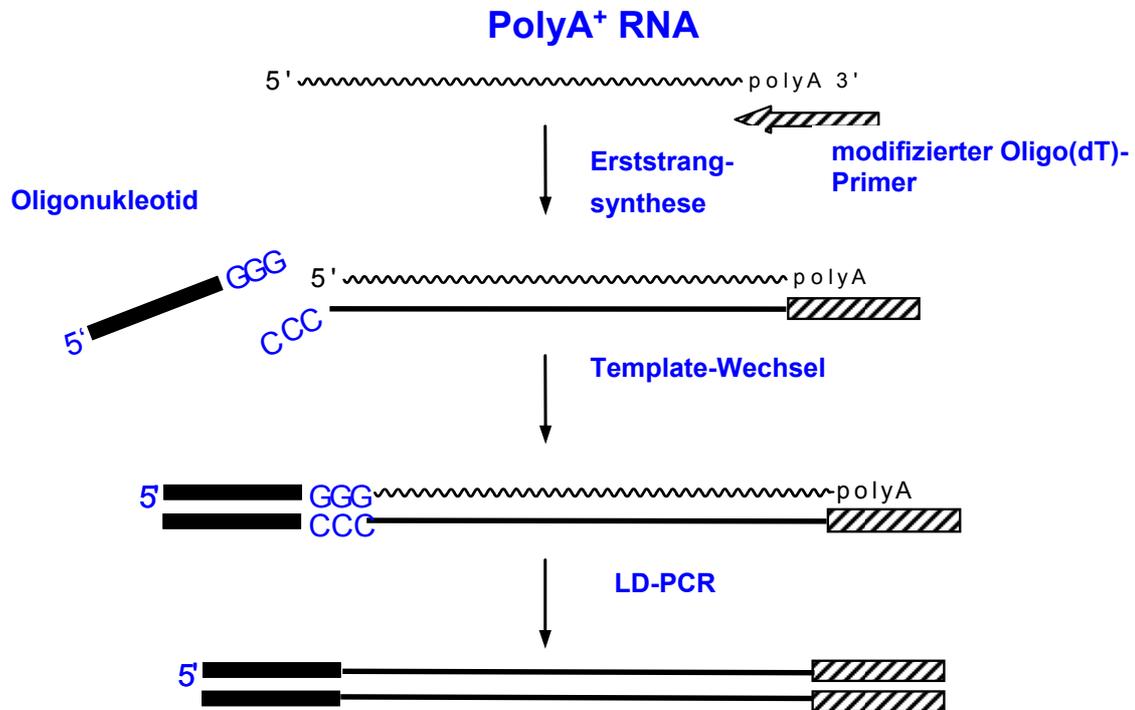


Abb. 3-28: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese (Smart PCR cDNA Construction Kit User Manual, modifiziert)

Der Erfolg der cDNA-Synthese wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 3-29b).

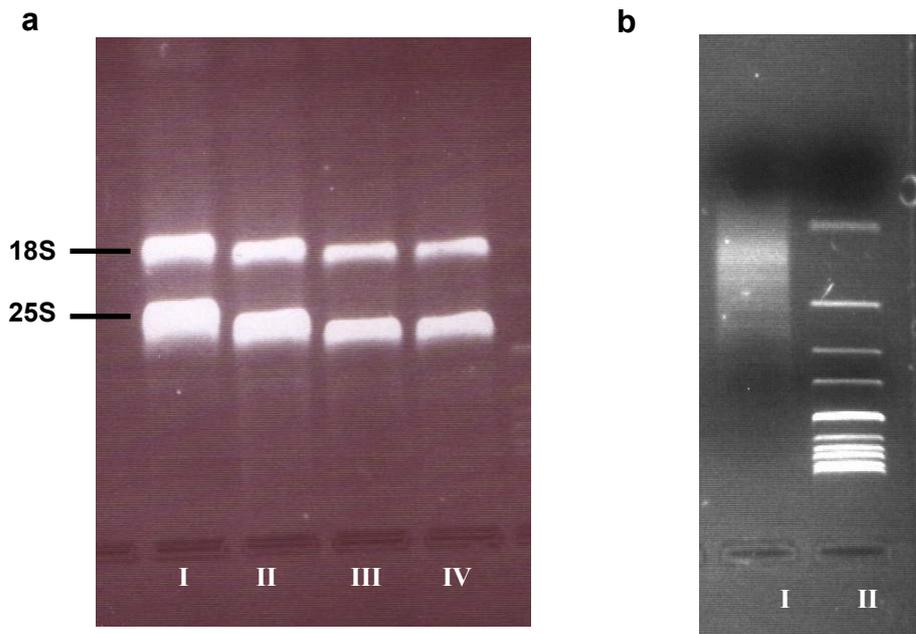


Abb. 3-29: a) Gesamt-RNA, isoliert aus *M. scorodoni*:

I+II: Je 9 μ L Präparation 1 bzw. 2

III+IV : Je 6 μ L Präparation 1 bzw. 2

b) Synthetisierte cDNA aus *M. scorodoni*:

I: 5 μ L cDNA von MSC

II: 0,5 μ L 1 kb DNA-Leiter (NEB)

3.1.7.4.2 Identifizierung des cC-Fragmentes des MsP1-Gens

Mit der MSC cDNA als Template wurden vorerst die PCR-Ansätze cC, cA, cB, cY, cH, cK, cU und cV¹⁶ durchgeführt. Die eingesetzte Template-Menge wurde empirisch ermittelt. Für die Gradienten-PCR (analytischer Ansatz) erwies sich 0,1 μ L Template als sinnvoll. Die Hybridisierungstemperatur betrug 50 °C +/- 10 °C. Die Ansätze cB, cY, cC und cU wiesen DNA-Fragmente auf, die spezifisch amplifiziert werden konnten und im erwarteten Größenbereich lagen. Im Anschluss daran wurden präparative PCRs zur Fragment-Gewinnung durchgeführt. Da die Fragment-Konzentration im ersten Durchlauf zu gering war, wurde das Produkt der ersten PCR in einer zweiten eingesetzt. Die PCR-Fragmente wurden in den pCR[®]2.1-Vektor (vgl. 2.19.3.2) zwischenkloniert. Als Wirtstamm kam der Organismus *E. coli* TOP10F[']

¹⁶ Das kleine „c“ symbolisiert bei diesen Ansätzen das zu Grunde liegende Template. Es bedeutet, dass MSC-cDNA zum Einsatz kam. Die Bedeutung des Großbuchstabens kommt der Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zu und ist Tab. 3-8 zu entnehmen.

3 Ergebnisse

zum Einsatz. Positive Klone wurden über das Blau/Weiß-Screening identifiziert. Jeweils fünf von ihnen wurden gepickt, mittels PCR auf die Anwesenheit des Inserts getestet. Zwei von den positiv getesteten Kolonien wurden in 5-mL-ÜNs angezogen, die Plasmide wurden isoliert und zur Sequenzierung gegeben.

Der PCR-Ansatz cC (Primerkombination 9485/9484) lieferte das erste Teilstück des MsP1-Gens. Die DNA-Sequenz (Abb. 3-30) zeigte erstmalig die von den Peptid-Fragmenten bekannte Homologie zu den Sequenzen der DyP aus *Geotrichum candidum*, der Peroxidase aus *Polyporaceae sp.* und einer peroxidabhängigen Phenoloxidase (TAP) aus *Termitomyces albuminosus*.

a.)

```
AAAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGCCTATCAGTCTAATATCCAGAAACGGA  
TTCGTATTCTTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATC  
GGTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCGATGCCCCAACACGCCTCGTGTGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAAC  
GCTACGAGCACCATCGAAATTGATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGCGAATACT
```

b.)

```
GGGCCAGAGGTTACCGACGCTGAAAAAGCGTCAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCG  
TTTGTGGCCTATCAGTCTAATATCCAGAAGGATTCGTATTCTTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCT  
TCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCGATGCCCCAACACGC  
CTCGTGTGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAATTGATATCGATTTTCGTAGTTTCTC  
GTGGAGG
```

Abb. 3-30: DNA-Sequenz des cC-Fragmentes des MsP1-Gens aus *Marasnius scorodonius*. a.) Vorwärts-Sequenzierung. b.) Rückwärts-Sequenzierung

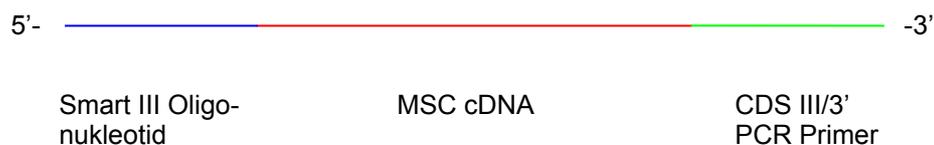
Die dem cC-Fragment zu Grunde liegenden Primer basierten auf den Peptid-Fragmenten 4/5 (Abb. 3-27). Die homologen Sequenzen aus *Polyporaceae sp.* und *Termitomyces albuminosus* wurden übereinander gelegt und lieferten für beide Primer die Nukleotidfolge.

3 Ergebnisse

Ein weiteres Teilstück des MsP1-Gens lieferte der PCR-Ansatz cB (Primerkombination 9483/9485). Der Primer 9483 ging auf das Peptid 1 (Abb. 3-27) zurück. Auch in diesem Fall wurden die homologen Sequenzen aus den Organismen *Polyporaceae sp.* und *Termitomyces albuminosus* als Grundlage für die Ableitung der Nukleotidfolge verwendet. Die Sequenzen der cB-Fragmente sind dem Anhang 5.1 zu entnehmen.

3.1.7.4.3 Ableitung neuer Primer auf Basis des cC-Fragmentes

Mit Kenntnis des cC-Fragmentes und später auch mit weiteren Fragmenten für MsP1 konnten spezifische Primer generiert werden. Bei der Generierung der Primer wurde ausgenutzt, dass bei Verwendung des SMART PCR cDNA Library Construction Kits während der Erststrangsynthese auf jeder Seite der cDNA ein Adapterstück mit bekannter Sequenz angebaut wurde (Abb. 3-31).



Smart III Oligonukleotid:

5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGG-3'

CDS III/3' PCR Primer:

5' -ATTCTAGAGCCGAGGCGGCCGACATG-d (T)₃₀N₋₁N-3'

Abb. 3-31: Schematische Darstellung der cDNA nach der Erststrangsynthese

Um den Start- und den Endpunkt des Zielgens ermitteln zu können, wurden die PCR-Bedingungen so gewählt, dass jeweils ein Primer an der Adapterstelle band und der zweite innerhalb des MsP1-Gens lag. Die neuen Primerkombinationen sind der Tab. 3-10 zu entnehmen, die den Primern zu Grunde liegenden Sequenzen Tab. 3-7.

3 Ergebnisse

Tab. 3-10: Primerkombinationen nebst der erwarteten Fragmentgröße

Name des PCR-Produktes	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Erwartete Produktgröße [bp]
CA	8444e	7378d	~ 1500 bp
DA	8444e	7375d	~ 1500 bp
EA	8444e	7376d	~ 1500 bp
FA	7377d	1473	~ 300-400 bp
GA	8444e	8132d	~ 300-400 bp
HA	8132d	1473	~ 300-400 bp

3.1.7.4.4 Identifizierung des MsP1-cDNA-Sequenz

Die PCR-Ansätze, die zum Erfolg führten bzw. einen Beitrag zur Aufklärung der MsP1-cDNA-Sequenz lieferten, sind nebst der erforderlichen Hybridisierungstemperatur der Tab. 3-11 zu entnehmen. Zum Teil traten bei den Gradienten-PCRs bei unterschiedlichen Temperaturen verschieden große DNA-Fragmente auf, die spezifisch angereichert werden konnten. In diesem Fall wurde allen interessanten Anlagerungstemperaturen nachgegangen. Ansätze mit gleicher Zusammensetzung, aber mit unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen, wurden zusätzlich mit römischen Zahlen durchnummeriert, damit eine eindeutige Zuordnung möglich war.

3 Ergebnisse

Tab. 3-11: Zur cDNA-Sequenz MsP1s führende PCR-Ansätze nebst Hybridisierungstemperaturen

Name des PCR-Produktes ¹⁷	Primerkombination	Fragmentgröße [bp]	Hybridisierungstemperatur [°C]
cC	9484/9485	~ 300	48
cBII	9483/9485	~ 1000/1300	50,7
cCAI	7378/8444	~ 750/1500	59,8
cEAI	7376/8444	~ 750/1500	55,8
cGA	8131/8444	~ 600	53,7
cHA	8132/1473	~ 450/500	63

Nach dem Zusammensetzen der einzelnen Sequenzen der Fragmente ergab sich die Struktur der cDNA MsP1s aus *M. scorodoni* (Abb. 3-32). Die mRNA wies direkt vor dem Startcodon nur noch zwei Nukleotide (ag) auf. Für den 3'-nichtcodierenden Bereich wurden drei verschiedene Sequenzen ermittelt, die sich hinsichtlich ihrer Länge bis zum Poly-A-Schwanz unterschieden (Abb. 3-33). Die kürzere Variante war bis zum Poly-A-Schwanz 63 Nukleotide lang und zeigte über die ersten 61 Nukleotide 100% Übereinstimmung zu den langen Varianten. Der lange 3'-nichtcodierende Bereich erstreckte sich über 127 bzw. 141 Nukleotide.

¹⁷ In dieser Tabelle werden namentlich nur die PCR-Fragmente erwähnt, deren Nukleotidfolge einen Beitrag zur Sequenzaufklärung MsP1-cDNA lieferten.

3 Ergebnisse

1 MKLFSASVFAAIVASHYASATAHIRAPNVKPRRTNSLLITPPQQPPLPS
1 aacttggtgaggactgtgagcaagcagacaaaatccaacccccccct
tattcccttccttcgaacccccatgccatacggcactttccaacctcc
ggtttccttttccttctgagtcctgctggaggacatggttctagtgtat

50 AQQAASASSSAGLNLTDIQGDILIGMKKNKELFFFSVTDAATFKAKLG
148 gccggagtaaggtacagacggacagaaaaagcttttagaggatagacg
caaccgcccggcgtatcatagatttgtaaaaattttgtcaccctacatg
tagtatctcttcgctccctgtttgccgggcaacccctcccattcgtgga

99 SDILGLITSTDQLLANDTQPVTAVNVAFSSTGLKALGITDDLKDPVFEA
295 tgacgcaatagcccagaccgaggaggtaagcagtgaaaggcagcgtgg
cattggtcccaattcaacactcctatctcgcgtactgtcaataacttac
ccttaacacctgattttgtcgtccctctctccgagtcattggttccgc

148 GMLSNAVSDLSDPGTGNWVPGFVGTSVHGVFLLASDTIDNVNTELANIQ
442 gacaaggagtagcgagatgcgtggaagcggcctccgtgaagagaagcgaac
gttgactgatgacgcgagtcggtgctgtagtttccactaatacatcata
agcccagccgctagcctgctgtccctttctcatagcctctaccggccca

197 TILNGSITEIHRLQGAARPGDQQGHEHFGFMDGISNPAVDGFTPPAEIR
589 aatagtaagaccccgggcccggcgcgctgtaggaaacggggtaccggaa
cttagctcatagtagccgcgaaagaaatgtagtgacctagtccccatg
ctgtcgcggtttgaagtactcgattaccacgtactcgcttatatagaaa

246 PGQALIPPGIMLLGEANDTFQNDRPPWAKDGSFLVFRQMQRAPPEFNKE
736 cgcgtaccgaaccgggagatcagccctgaggttcgtccaccgcgtaat
cgacttccgttttgacaactaaagccgcaagcttttgataagccataat
taatatggttcgtcagacctgttttggcattcctcctagagcgcgcccgc

295 LQDHALNMPNMTSEQGADLLGARIVGRWKSGAPIDLTPLVDDPVLADN
883 ccgcaacaaaatgcccggcgggaaggctaaggcagcactggcgtggga
taaactatcatccaagcattgcgttgggaggcctatccttaacttccaa
gatcttcggtgacgacttcttcgtaaagatttttcctggctcaggttct

344 QRNNNFDFSDATNQTRCPFSAHIRKANPRGDLGGINKFPNQHIIRAGIP
1030 ccaaatggttgaacactcttgacagaccggcggaaatcaccaacggac
agaaatataccaacggctccatgacacggatggtaatacaattgcgtc
gatcccccttcgctgatctctttccgctgccttgtttacacacacagatg

3 Ergebnisse

```
393 YGPEVTDAEKASNSSSTDP SLERGLAFVAYQSNIQNGFVFLQKNWVDNT
1177 tgcggagggagtaataagcacgcgcgtggtctaacagtgtccaatggaa
    agcatcacaaccagcgcacgtaggtcttcaacataagttttaagtaac
    tacatcctaagatctctcttggttggtgctgttcgcacactagtgtttg

442 NFFRPGTGVDPLIGTNSRNSGTDAPNTPRVVSGLDPN NATSTIEIDIDE
1324 attccgagggccagaatcaagaggcaaccggagtgcaagaaaagagagt
    attgcgcgtacttgacagaggcaccaccggttggtacaaccgctatata
    tccaccttattoctatctctcctcccgttccccggtttctgccattctc

491 VVSRGGEYFFSPSLSAIRTVLSV
1471 ggtcggggttttctctgaaagctg
    ttcgggaattccctcctgcttct
    atttacaccgcattgcgtgtac
```

Abb. 3-32: MsP1-Protein- und cDNA-Sequenz vom Start- bis zum Stopcodon. Grün: N-Terminus des reifen Proteins; Rot: potentielle N-Glykosylierungsstellen; Blau: potentielle O-Glykosylierungsstellen

a.)

```
TAGTGTATTGCATTACTCGGACAGCTTAATTATGGGAATTTATCTTAGAAACTCGGGCTTCG
-PolyA
```

b.)

```
TAGTGCATTGCATTACTCGGACAGCTTAATTATGGGAATTTATCTTAGAACTCGGGCTTCAT
CAGACCTTCGTTGAGACCTTTAACAGGGTGACAAGACCTAATTTTATCCGTTTCGGTGCTCA
ATCACAATA
```

b1) G-PolyA

b2) CACAATAGTTACCCC-PolyA

Abb. 3-33: a) Kurzer 3'-nichtcodierender Bereich der MsP1-cDNA. b) Langer 3'-nichtcodierender Bereich der MsP1cDNA mit zwei verschiedenen Enden

Die mittels RT-PCR erhaltene cDNA des MsP1-Gens war folglich je nach 3'-nichtcodierenden Bereich 1604 bzw. 1668 bzw. 1682 bp lang. Sie enthielt einen

3 Ergebnisse

offenen Leserahmen von 1539 bp Länge. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz ist der Abb. 3-32 zu entnehmen. Das native Protein besteht aus 513 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 54,9 kDa. Das prozessierte Protein besteht aus 458 Aminosäuren bei einem berechneten Molekulargewicht von 49,1 kDa. Der N-Terminus des gereiften Proteins (Abb. 3-32) wurde durch Edman-Abbau ermittelt (vgl. 3.1.5.3.2).

Die Proteinsequenz von MsP1 enthält 8 potentielle N-Glykosylierungsstellen und eine O-Glykosylierungsstellen an Position 468.¹⁸

Eine Homologiesuche mittels WU-Blastp ergab eine 48%ige Homologie sowohl zu der Peroxidase (DyP) aus *Geotrichum candidum* als auch zu einer peroxid-abhängigen Phenoloxidase (TAP) aus *Termitomyces albuminosus*. Eine 47%ige Homologie wurde zu einer Peroxidase aus *Polyporaceae sp.* gefunden. Ein Vergleich dieser Sequenzen offenbarte, dass sämtliche Sequenzen einige hochkonservierte Bereiche beinhalten (Abb. 4-1).

3.1.7.5 Identifizierung des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms MsP1 aus *Marasmius scorodoni* aus genomischer DNA

Parallel zu den Arbeiten mit der cDNA kam genomische DNA aus *Marasmius scorodoni* (vgl. 2.23) als Template für die PCRs zum Einsatz. Es konnten erste Fragmente amplifiziert werden. Da diese Arbeiten zeitgleich zu den Arbeiten mit der cDNA als Template verliefen und diese sofort erfolgreich waren, wurde der Ansatz mit der genomischen DNA nicht weiter verfolgt.

¹⁸ Die Glykosylierungsstellen wurden mit dem NetNGlyc 1.0 Servers des Centers for Biological Sequenzanalysis CBS, Technical University Denmark ermittelt.

3.2 Identifizierung und Überexpression der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*

3.2.1 Charakterisierung einer polyvalenten Peroxidase auf molekularbiologischer Ebene

3.2.1.1 Ableitung der Primer

Ursprünglich von dem β,β -Carotin-spaltenden Enzym aus *Lepista irina* ausgehend (vgl. 1.4.1) wurden anhand von Homologievergleichen mit publizierten Gensequenzen (Tab. 3-12) Primer zur Suche einer Carotinoid-Dioxygenase abgeleitet. Hoch konservierte Bereiche lieferten die Basis für die Entwicklung dieser Primer (Tab. 3-13, Teil I).

Tab. 3-12: Für die Primerableitung berücksichtigte Dioxygenasen

Organismus	Enzym	EMBL-Eintrag
<i>Phaseolus vulgaris</i>	9,10-9',10'-Dioxygenase CCD1	AY 029525
<i>Phaseolus vulgaris</i>	9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenase	AF 190462
<i>Persea americana</i>	9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenase	AF 224672
Maus	β,β -Carotin-9',10'-Dioxygenase	MMU 290392
Mensch	β,β -Carotin-9',10'-Dioxygenase	HSA 290393
Zebrafisch	β,β -Carotin-9',10'-Dioxygenase	DRE 290391
Huhn	Homolog zu β,β -Carotin-9',10'-Dioxygenase	BI 392488
Mais	9-cis-Epoxy-carotinoid-Dioxygenase	ZMU95953

Die Isolierung und Ansequenzierung des Zielenzym (Langhoff, 2002) lieferte ein 20 AS langes Teilstück (LFPGTADQNQEQSPLQGELR) als Basis für eine erneute Primerableitung. Datenbankrecherchen (WU-blastp) ergaben eine 76%ige Homologie zu zwei polyvalenten Peroxidasen aus *Pleurotus eryngii* VPL1 und VPL2. Die Gensequenz dieser beiden Isoenzyme stellte die Grundlage dieser Primerableitung dar (Tab. 3-14).

3 Ergebnisse

Tab. 3-14: Primer für die Identifizierung des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms aus *Pleurotus*. Teil I: Primerableitung auf Grund des Homologievergleiches zwischen Dioxygenasen. Teil II: Primerableitung auf Grund der Homologie des Zielproteins zur polyvalenten Peroxidasen aus *Pleurotus eryngii*

Primer (Nummer/Name)	Sequenz	Schmelz- temperatur [°C]
1500 M / 9,10-Diox r 2	5'>CCA T (ACT)T CC(AG) TCA AAC CA(AG) TG<3'	58,9
0065 E / Lambda fw1	5'>CGG GAA TTC GGC CAT TAT<3'	54
2352 M / 9,10-Diox fw1	5'>CA(CT) TGG TTT GA(CT) GGA (AGT) AT GG<3'	58,5
0064 E / Lambda r1	5'>TGC ATA AGC TTG CTC GAG TCT<3'	62
6071 E / Lambda fw2	5'>CGC GCC ATT GTG TTG GTA<3'	56
6072 M / Mais rev1	5'>CTC (GT)GT GAT GGC (AG)AA GTC<3'	56
6073 M / Phaseolus fw1	5'>GAC TT(CT) GCC ATC AC(AC) GAG<3'	60
peoxid Lipiv rev, 0690 D	5'>AGC AGT GCC TGG GAA GAG T<3'	60
peoxid Lipiv fw, 0691 D	5'>CCC CAT TGC AAG GAG AGA T< 3'	58
peroxid lipis Mitte fw, 3721 E	5'>CTC GTG CCA GAG CCT TTT<3'	56
peroxid lipis Mitte rev, 3722 E	5'>GGT TCT GAA TCT TCG GTT GG<3'	60

3.2.1.2 Herstellung einer λ cDNA-Bank von *Pleurotus eryngii*

In Vorarbeiten wurde eine λ cDNA-Bank von *Pleurotus eryngii* hergestellt. Die Arbeiten verliefen analog zur Herstellung der λ cDNA-Bank von *M. scorodonius* (vgl. 3.17.3.1). Der Titer lag bei $\sim 6,5 \times 10^9$ pfu/mL (Peters, persönliche Mitteilung). Für die Gewinnung der *Pleurotus*- λ cDNA erfolgte eine Phagenpropagation und die anschließende Isolierung der λ cDNA.

3.2.1.3 Identifizierung des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms aus *Pleurotus eryngii* aus einer λ cDNA-Bank

Als Template für die PCR-Ansätze diente die λ cDNA des Pilzstammes. Ein Primer (Lambda fw1, fw2 oder r1) war jeweils spezifisch für die Sequenz des λ TriplEx2TM-Vektors, der andere Primer band innerhalb der Ziel-cDNA. Primerkombinationen mit „Dioxygenase-Primern“ verliefen erfolglos.

Die beiden Primerkombinationen (PCR I+II), die auf der ESI-MS/MS-Sequenz des Zielenzym gründeten, ergaben PCR-Fragmente mit der gesuchten Sequenz

3 Ergebnisse

(vgl. 5.2). Ausgehend von den ersten beiden Sequenzen wurden Primer für einen weiteren PCR-Ansatz abgeleitet (Tab. 3-14, 3-15). Eine Übersicht über die Lage der einzelnen PCR-Fragmente, die zur Aufklärung der Struktur der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* führten, ist Abb. 3-34 zu entnehmen.

Tab. 3-15: Zur cDNA-Sequenzaufklärung der polyvalenten Peroxidase führende PCR-Ansätze nebst Hybridisierungstemperaturen

Name des PCR-Produktes	Primerkombination	Hybridisierungstemperatur [°C]
PCR I	6071/0690	56
PCR II	0691/0064	56
PCR IV	3721/3722	58

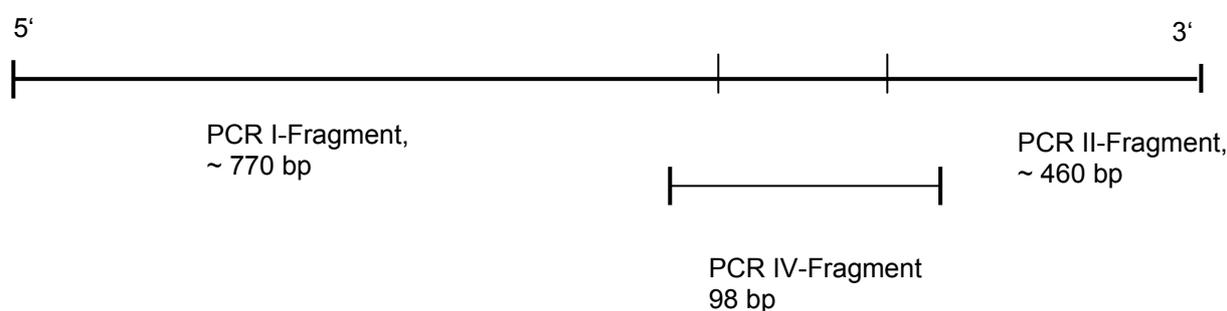


Abb. 3-34: Übersicht über die Lage der PCR-Fragmente der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*

Die mittels RT-PCR erhaltene cDNA der polyvalenten Peroxidase (VPL3) ist 1274 bp lang und enthält einen offenen Leserahmen von 1086 bp Länge. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz ist Abb. 3-35 zu entnehmen. Das native Protein besteht aus 361 Aminosäuren lang und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 37,6 kDa. Das prozessierte Protein besteht aus 331 Aminosäuren und verfügt über ein theoretisches Molekulargewicht von 34,6 kDa. Der N-Terminus des gereiften Proteins (Abb. 3-35) wurde durch Edman-Abbau ermittelt (Langhoff, 2002). Ein Homologievergleich (WU-blastp) zeigte, das VPL3 eine 98%ige

3 Ergebnisse

Identität zu den Enzymen VPL1 und VPL2 aus *Pleurotus ernygioi* ATCC 90787 (=IJM A169) und eine 96%ige Identität zu *Pleurotus sapidus* (EMBL: AM039632) aufwies.

```
1 MSFKTLSALALALGAAVQFASAAVPLVQKRAATCADGRTTANAACCVLFP
1 attaactgcgcgcggggctgagggccgcacgatgggcaagaggttgctc
tctactcctctctgcctatcgctcttaagccgcaggcccaccggtttc
gtcggcctcgtgcccccggtttgtccgacatcccaccattatctgcc

50 ILDDIQENLFDGAQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTLGGGGADGSI IAF
148 acggacgactgggctggggcgctcctatcgagttcatggggggtaagt
ttaataaattagcaggaataactgtctaactgtccctggggcagcttct
cctccaaccctcgttaagacgcttgcctactctttacaaatctcccgc

99 DTIETNFPANAGIDEIVSAQKPFVAKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPPG
295 gaagaatcgaggaggagagcactggacaatgggactggggggatcgg
actacatccacgtaattgcaacttcaaaccgattatcgctgtcagcgg
cctgttccttctaccctggacgtacccccctattcctacccttt

148 VRIPFFLGRPDAVAASPDHLVPEPFDSVDTILARMGDAGFS PVEVWLL
442 gaactttgccccgggctgcgcgctgtggaacgaaggggtacgggggtcc
tgtctttggcactcccccaattcactactacttctgtagcgtgctattgtt
cgttccgctcgtcggccgcccaggtttttccttcagtcacctccgttgcg

197 ASHSIAAADKVDPSPGTPFDSTPGVFDSQFFIETQLKGKLFPGTADNK
589 gtctaggggaggctacgactgtacgggtgtcttagaccagactcgaggaa
ccactccaataacctgcctaccggttacatttacatagattcgccaaa
tgctctccgctcagtttagactaccattttaccagatacaccacttccg

246 GEAQSPLQGEIRLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSK
736 gggctctcggaacctgcttgagccagtgctctagaaccaactggaata
gacacctagatgtacaattcgacaccgagacttaaacataagtcctca
aacatagaagcgtgctcggtagcgtctaggcgtccaggtgctcttcggg

295 MALLGQDKTKLIDCSDVIPTPPALVGAAHL PAGFSLSDVEQACAETFPF
883 agccgcgaaatagttggacaccgcggggctcgggttcagggcggtgactc
tcttgaaacattagcattcccccttgccatccgtctgataacgcacctc
gtttcacgcagctttttcccttctcagccgggattttctagagccgctct
```

3 Ergebnisse

```
344 ALTADPGPVTSVPPVPGS
1030 gcagggcgcgatgccgcgt
      ctccacgctcctcctcgc
      ttttcacaactctcctag
```

Abb. 3-35: Protein- und Gensequenz der polyvalenten Peroxidase (VPL3) aus *Pleurotus eryngii* vom Start- bis zum Stopcodon. Grün: Startpunkt des reifen Proteins; Rot: potentielle N-Glykosylierungsstelle; Orange: Basenaustausch bei ZI.37 (Position 4: a gegen t, Position 672: c gegen t); Gelb: Basenaustausch bei ZII.b (a gegen g)

a)

```
GGATCCGGCCATTATGGCCGGGGAAGATCCCCAGTCTTACAACCCACTGCA
```

b)

```
ATGCTTCGATACCTGAATATGCTCGTTCTGCTGCGCTGAATTTCCAACCTTTTGCCATTGGGT
CTGTATTTCGATTCTAGATGTTTGTGATATCAACTGTGTATAAATGATCTTTTGAAATATACT
TTTTTCTGCGGAG-PolyA-Schwanz
```

Abb. 3-36: a) 5'-nichtcodierender Bereich der Peroxidase-cDNA. b) 3'-nichtcodierender Bereich der cDNA der polyvalenten Peroxidase

3.2.2 Expression der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* in *Pichia pastoris*

3.2.2.1 Die Expressionsvektoren

Für die Expression der polyvalenten Peroxidase kamen zwei verschiedene Shuttle-Vektoren pPIC3,5K und pPIC9K (Invitrogen) (vgl. 5.4.4 bzw. 5.4.5) zum Einsatz, die sowohl in *E. coli* als auch in *Pichia pastoris* Verwendung finden können. Beiden Vektoren gemeinsam ist, dass sie unter Kontrolle des starken Promotors der Alkoholoxidase 1 (AOX1) stehen. Ferner weisen beide Plasmide eine Ampicillin- und Kanamycinresistenz auf. Die Ampicillinresistenz ermöglicht die Selektion in *E. coli*. Das bakterielle Kanamycin-Resistenzgen (*kan*-Gen des Transposons Tn903) verleiht dem *Pichia*-Stamm nach Integration des Vektors ins Genom eine Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin-418. Die Kanamycin-Resistenz kann über einen gewissen

3 Ergebnisse

Bereich zur Selektion von Klonen mit multiplen Insertionen verwendet werden (Scorer et al., 1994). Durch die Verwendung des Histidin-defizienten Stamm *Pichia pastoris* GS115 (Genotyp *his4*) kann das Histidinol-Dehydrogenase-Gen (*HIS4*-Gen) der Plasmide als Selektionsmarker nach der Transformation in *P. pastoris* dienen (Cregg et al., 1985).

Im Gegensatz zu pPIC3,5K weist pPIC9K einen sogenannten α -Faktor auf (vgl. 5.4.4 bzw. 5.4.5), der für die Sekretion des Zielproteins ins Medium verantwortlich ist. Bei diesem Sekretionssignal handelt es sich um die α -Faktor-Preprosignalsequenz der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2.2.1.1 Herstellung der Expressionsvektoren

Es wurden drei verschiedene Konstrukte hergestellt, die sich durch die An- bzw. Abwesenheit der vektor- bzw. zielenzymeigenen Exportsignale unterscheiden. In das Plasmid pPIC3,5K sollte die Gensequenz mit Exportsignal einkloniert werden. Das Plasmid pPIC9K sollte die Peroxidase-cDNA mit und ohne Exportsignal beherbergen. Die wesentlichen Charakteristika der gebildeten Plasmide sind Tab. 3-15 zu entnehmen.

Tab. 3-15: Charakteristika der konstruierten Vektoren

Name des Vektors	Charakteristika der Konstrukte
pPIC3,5K+A1 α	Vektor ohne Exportsignal mit Peroxidase-Gen mit Exportsignal
pPIC9K+A1aohne α	Vektor mit Exportsignal mit Peroxidase-Gen ohne Exportsignal
pPIC9K+A1 α	Vektor mit Exportsignal mit Peroxidase-Gen mit Exportsignal

Das cDNA der polyvalenten Peroxidase sollte über die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme SnaB I und Avr II in die Vektoren einkloniert werden. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Fragmente mittels PCR hergestellt. Die *Pleurotus*

3 Ergebnisse

eryngii λ CDNA-Bank diene als Template. Die Restriktionsschnittstellen wurden über die abgeleiteten Primer (Tab. 3-16) den Zielfragmenten angefügt.

Tab. 3-16: Primer zur Bildung der Gensequenzen der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* zur Überexpression in *Pichia pastoris*

Primer (Nummer/Name)	Sequenz	Schmelz- temperatur [°C]
3448E/ 1. α A1a fw	5'>ATG GCA ACT TGC GCC GAC<3'	47,5
3449D/ 1. α A1a rev	5'>CGA GCA TAT TCA GGT ATC GAA GCA T<3'	50,9
3446E/ 2. α A1a fw	5'>CCT ACG TAA CAA TGG CAA CTT GCG CCG AC<3'	59,2
3447E/ 2. α A1a rev	5'>GCC CTA GGC GAG CAT ATT CAG GTA TCG AAG CAT<3'	60,6
7873D2/ pPIC35K III fw	5'>GGC CCT ACG TAA CAA TGT CTT TCA AGA CGC TCT<3'	59,3
0724D/ pPIC359II rev	5'>TAT CCT AGG CGA AGC ATT TAC GAT CCA<3'	78

Das Fragment A1 α wurde durch eine Primerkombination (Tab. 3-17) gebildet, in der die Restriktionsschnittstellen sofort angefügt wurden. Da die Ausbeute der ersten PCR gering war, wurde das PCR-Produkt der ersten PCR als Template für eine 2. PCR eingesetzt, die unter denselben Bedingungen lief.

Das Fragment A1 α ohne α wurde hingegen durch zwei verschiedene Primerkombinationen gebildet (Tab. 3-17). In einer ersten PCR wurde das Zielfragment als solches amplifiziert. Das PCR-Produkt der 1. wurde als Template für die 2. PCR eingesetzt. In dieser 2. PCR wurden der Gensequenz über die Primer die Restriktionsschnittstellen angefügt.

3 Ergebnisse

Tab. 3-17: PCR-Ansätze zur Bildung der Gensequenzen der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* zur Überexpression in *Pichia pastoris*

Name des PCR-Produktes	Primerkombination	Hybridisierungstemperatur [°C]
1. A1aohne α	3448/3449	63,5
2. A1aohne α	3446/3447	60
A1a α	7873/0724	48,5

Die PCR-Produkte der 2. PCR wurden direkt in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor ligiert und in *E. coli* TOP10 F' zwischenkloniert (vgl. 2.19.3.1). Die Stammbezeichnung ist Tab. 3-18 zu entnehmen. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB_{amp}-Agarplatten (vgl. 2.4.5).

Tab. 3-18: 1. Zwischenklonierungsstämme

Stammbezeichnung	Charakterisierung
ZIb	<i>E. coli</i> TOP10 F' + pCR [®] 2.1-TOPO [®] + A1a α
ZIIb	<i>E. coli</i> TOP10 F'+ pCR [®] 2.1-TOPO [®] + A1aohne α
K35II.a	<i>E. coli</i> TOP10 F' + pPIC3,5K + A1a α
K9I.b	<i>E. coli</i> TOP10 F' + pPIC9K + A1aohne α
K9II.a	<i>E. coli</i> TOP10 F' + pPIC9K + A1a α

Es wurden verschiedene Transformanten gepickt, Übernachtskulturen angezogen und aus diesen die Plasmide isoliert. Die einklonierte Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert und sequenziert.

Der Klon ZIb.37 (mit Fragment A1a α) wies einen Basenaustausch an Position 672 auf (Abb. 3-35), der zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz führte. Ein Basenaustausch an Position 4 führt dagegen an Position 2 des Exportsignals zu einem Aminosäureaustausch (Serin gegen Threonin). Da sich die Aminosäuren in ihrer Polarität und Struktur wenig unterscheiden (vgl. 4.2.2.2), wurde dieser Klon

3 Ergebnisse

trotzdem für die weiteren Arbeiten herangezogen. Der Klon ZIIb.2 (mit Fragment A1aohne α) wies einen Basenaustausch an Position 690 auf, der ebenfalls nicht zu einer Änderung der Proteinsequenz führte (Abb. 3-35). Beide Klone dienten als Ausgangspunkt für alle weiteren Arbeiten.

Die Plasmide der Zwischenklonierungsvektoren ZIb.37 und ZIIb.2 wurden isoliert. Die Zielfragmente wurden mittels Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen Avr II und SnaB I unter Verwendung des Puffers NEB4 in Anwesenheit von 100 μ g/mL BSA herausgeschnitten. Da Avr II nicht hitzeinaktivierbar war, erfolgte der Abbruch des Restriktionsverdau durch Reinigung der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese. Nach der Gel-Elution erfolgte die Abschätzung der Konzentration der Fragmente für einen effizienten Einsatz in der Ligation über ein analytisches Agarosegel statt (vgl. 2.18.1).

Die nativen *Pichia*-Vektoren wurden zur Vermehrung in *E. coli* TOP10F' transformiert. Aus Übernachtskulturen wurden die Plasmide im analytischem Maßstab isoliert (vgl. 2.18.4.1). Im Anschluss erfolgte der 1. Restriktionsverdau mit dem Enzym SnaB I unter Verwendung des Puffers NEB4 in Anwesenheit von 100 μ g/mL BSA (vgl. 2.18.6). Nach einer Hitzeinaktivierung (vgl. 2.18.7) erfolgte der 2. Restriktionsverdau mit Avr II. Dieses Restriktionsenzym zeigte auch im NEB4-Puffer 100%ige Aktivität, so dass kein Pufferwechsel vorgenommen werden musste. Da Avr II nicht hitzeinaktivierbar war, erfolgte der Abbruch eines analytischen Restriktionsverdau durch Aufreinigung der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese. Das geschnittene Plasmid wurde mit dem NucleoSpin[®]Extract 2 in 1 Kit (Macherey-Nagel) isoliert.

Die Zielfragmente wurden gemäß Tab. 3-18 in die entsprechenden *Pichia*-Vektoren ligiert. Das Molverhältnis Fragment/Plasmid betrug 5/1.

Zur Vektorvermehrung wurden die Konstrukte in *E. coli* TOP10F' transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB_{amp}-Agarplatten (vgl. 2.4.5). Die Klone wurden mittels PCR auf die Anwesenheit der Ligase kontrolliert.

3.2.2.2 Transformation und Integration der Vektoren ins *Pichia pastoris*-Genom

Für die Produktion der polyvalenten Peroxidase in *Pichia pastoris* war die Integration der konstruierten Vektoren ins Hefegenom erforderlich. Zu diesem Zweck wurden die Plasmide vor der Transformation linearisiert. Die Integration kann innerhalb der Promotorsequenz oder aber auch innerhalb der Terminationsregion der Transkription stattfinden.

Die Linearisierung fand im Falle dieser Arbeit über die Sac I Restriktionsschnittstelle, die sich in der AOX1-Promotorsequenz befand (vgl. 5.4.4 bzw. 5.4.5) statt. Über homologe Rekombination wurden die Vektoren ins *Pichia*-Genom integriert.

3.2.2.2.1 Transformation von *Pichia pastoris* nach Spheroblastierung

Die Bildung der Spheroblasten verlief nach 2.19.5.3 erfolgreich. Die Vitalität der Spheroblasten wurde durch Wachstum auf RDHB-Platten gemäß 2.19.5.4 kontrolliert. Obwohl die Spheroblasten die erforderliche Vitalität aufwiesen, verlief die Transformation nach Spheroblastierung erfolglos. Der entscheidende Schritt war der Zusatz der PEG/CaT-Lösung zum Transformationsansatz. Durch den Zusatz dieser Lösung trat eine nicht näher bestimmbare Fällungsreaktion auf. Trotz allem wurde gemäß dem Protokoll fortgefahren. Es konnten allerdings keine Transformanten erzeugt werden. Da der Zusatz der PEG/CaT-Lösung wiederholt problematisch war, wurde eine andere Art der Transformation durchgeführt.

3.2.2.2.2 Transformation von *Pichia pastoris* durch Elektroporation

Die Elektroporation der *Pichia pastoris* GS115 Zellen verlief gemäß 2.19.6 sehr erfolgreich. Es entstand eine Vielzahl von Transformanten, die die Plasmide durch Rekombination in ihr Genom aufnahmen. Durch die Ausplattierung auf MD-Platten erfolgte eine erste Selektion. Da dieses Nährmedium kein Histidin enthielt, der eingesetzte Stamm aber histidinauxotroph war, konnten diese Stämme nur wachsen, wenn nach der Transformation durch Rekombination die Auxotrophie komplementiert wurde.

3 Ergebnisse

3.2.2.3 Selektion auf mehrfache Vektorinsertionen

Ausgehend von den Masterplatten erfolgte ein Screening auf Mehrfachinsertionen. Für sämtliche Stämme *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1 α , *Pichia pastoris* GS115 + pPIC3,5K + A1 α und *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1 α ohne α konnten mehrere Kolonien identifiziert werden, die verschiedenen ausgeprägte Resistenzen gegen Geneticin aufwiesen. Z. T. wurden zwei Screening-Durchgänge durchgeführt. Wichen die Ergebnisse der zwei Screening-Durchläufe etwas von einander ab, so wurde das schlechtere Ergebnis als Endergebnis dargestellt. Die Screening-Tabellen sind dem Anhang (5.3) zu entnehmen.

Tab. 3-19: Ergebnisse des Geneticin-Screenings mit dem Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1 α

Geneticin-Konzentration [mg/mL]	Kolonie
0,25	17, 32, 40
0,5	22, 44
1	18
1,5	36
2	4
3	2

Tab. 3-20: Ergebnis des Geneticin-Screenings mit dem Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC3,5K + A1 α

Geneticin-Konzentration [mg/mL]	Kolonie
0,25	1, 3
0,5	22
0,75	2, 12
2	4
3	9

3 Ergebnisse

Tab. 3-21: Ergebnis des Geneticin-Screenings mit dem Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1aohnea

Geneticin-Konzentration [mg/mL]	Kolonie
0,25	5, 18
0,5	4, 25
0,75	31, 52 ¹⁹
1,75	3

3.2.2.4 PCR-Screening der *Pichia*-Stämme

Abschließend wurde ein PCR-Screening (vgl. 2.18.3.3) durchgeführt, um den direkten Beweis zu erbringen, dass die Zielsequenzen tatsächlich ins *Pichia*-Genom integriert wurden. Es fanden die von Invitrogen entwickelten Primer (Tab. 3-22) Verwendung. Diese Primer binden an beiden *Pichia*-Vektoren. Im Falle des Plasmids pPIC9K befindet sich die Bindungsstelle für den Vorwärts-Primer vor dem Exportsignal.

Tab. 3-22: Primer für in Insert-Nachweis innerhalb der *Pichia*-Vektoren

Primer (Nummer/Name)	Sequenz	Hybridisierungstemp- peratur [°C]
3494D/ AOX1 seq fw	5'>GAC TGG TTC CAA TGG ACA AGC<3'	55
3495D/ AOX1 seq rev	5'>GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC<3'	55

Diesem Screening wurden die Kolonien unterzogen, die für die weiteren Arbeiten eine interessante Anzahl an Insertionen aufwiesen. In sämtlichen getesteten Kolonien konnte das entsprechende Insert nachgewiesen werden (Abb. 37-39).

¹⁹ Bei der zweiten Screening-Runde wurde der Stamm nicht auf die Platten mit den niedrigsten beiden Konzentrationen aufgetragen. Da dieses Screening jedoch doppelt durchgeführt wurde und noch Wachstum auf den höheren Geneticin-Konzentrationen erfolgte, erfolgte in Falle des zweiten Screenings die Annahme, dass der Stamm auch auf den beiden fehlenden Platten gewachsen wäre. Dies konnte bereits einmal gezeigt werden.

3 Ergebnisse

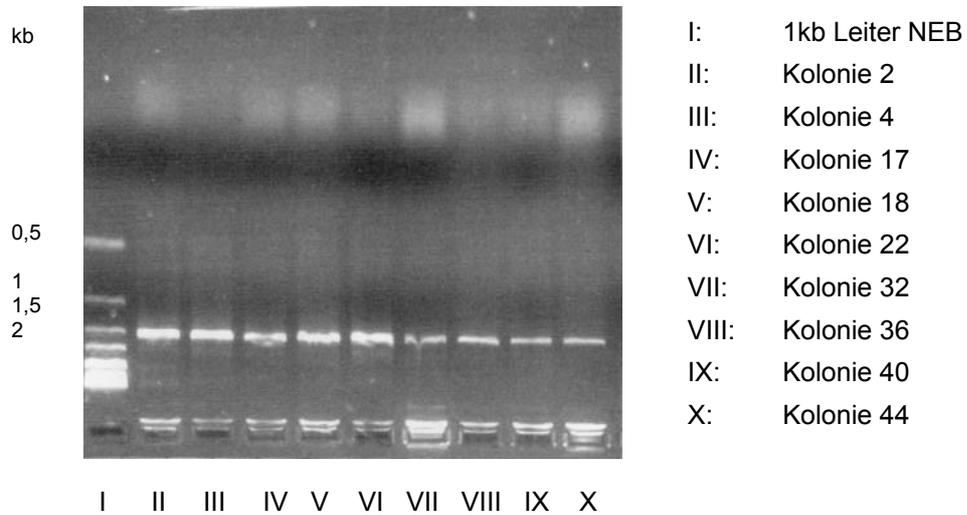


Abb. 3-37: Analytisches Kontroll-Gel des PCR-Screenings des Stammes *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1 α

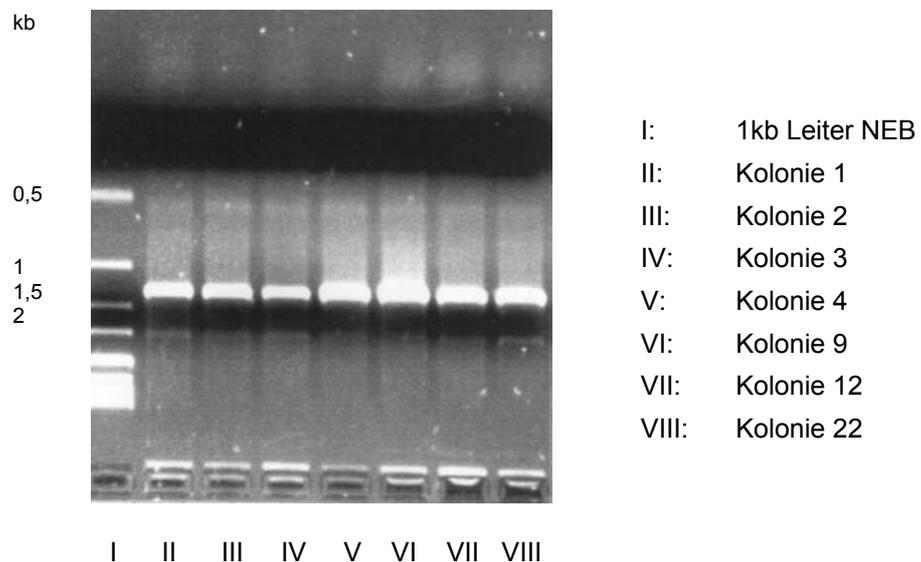


Abb. 3-38: Analytisches Kontroll-Gel des PCR-Screenings des Stammes *Pichia pastoris* GS115 + pPIC3,5K + A1 α

3 Ergebnisse

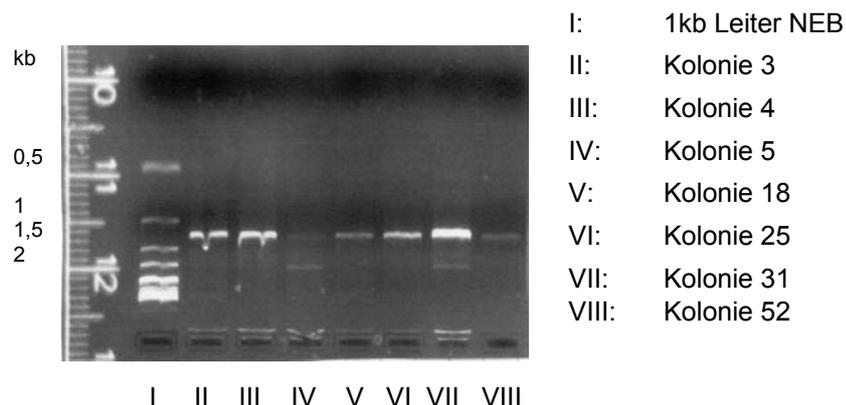


Abb. 3-39: Analytisches Kontroll-Gel des PCR-Screenings des Stammes *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1aohne α

Exemplarisch wurde für jeden Stamm das Insert einer Kolonie sequenziert, um den direkten Beweis für die Anwesenheit der Inserts zu erbringen. Zu diesem Zweck wurden die mittels PCR amplifizierten Fragmente (Primer s. Tab. 3-23) in den pCR[®]2.1-Vektor ligiert und aus diesem Vektor heraus sequenziert. Durch diese Sequenzierung konnten alle unter 3.2.2.1.1 erwähnten Ergebnisse bestätigt werden. Die Sequenzen sind dem Anhang unter 5.2.2 zu entnehmen.

3.2.3 Testung des Antikörpers gegen die polyvalente Peroxidase

Zum Nachweis des gebildeten Enzyms in den anschließenden Schüttelversuchen sollten polyklonale Antikörper gegen die polyvalenten Peroxidasen aus *Pleurotus eryngii* eingesetzt werden. Zur Positivkontrolle wurden *P. eryngii*-Kulturen angezogen und zum Zeitpunkt der maximalen β,β -Carotin-spaltenden Aktivität geerntet. Die Aktivität wurde mit dem von Langhoff (2002) entwickelten Enzymtest detektiert (vgl. 2.16.1.6). Der Kulturüberstand wurde mittels Ultrafiltration (Centricon-Plus-80) konzentriert, mittels Ionenaustauschchromatographie (DEAE) gereinigt und die aktiven Fraktionen mittels Vivacell-15R-Einheiten konzentriert. Ein 12%ige SDS-Gele wurde Coomassie-gefärbt, ein weiteres Gel einem Western-Blot zugeführt.

3 Ergebnisse

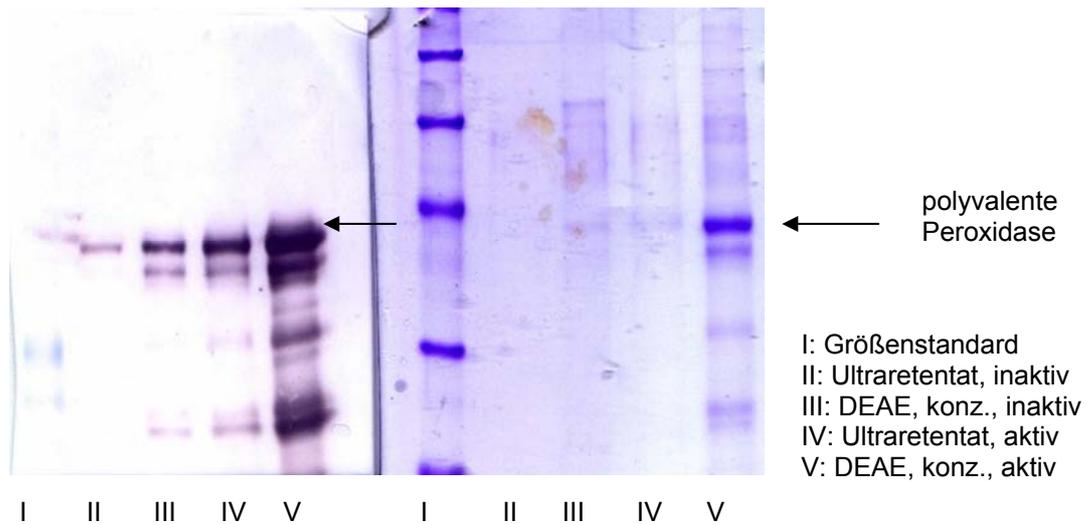


Abb. 3-40: Western-Blot und Coomassie-Gel der partiell gereinigten polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*

Mittels Antikörper wurden sowohl aktive als auch inaktivierte polyvalente Peroxidase detektiert. Kreuzbindungen zu weiteren Proteinen wurden beobachtet (vgl. 4.2.2.4).

In Nachfolgearbeiten kann das Zielenzym folglich sowohl mittels Aktivitätstest als auch mittels Western-Blot detektiert werden.

4 Diskussion

4.1 Die β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus *Marasmius scorodonius* CBS 137.83

4.1.1 Der Stamm *Marasmius scorodonius* CBS 137.83

Marasmius scorodonius (Abb. 4-1), im volkstümlichen Namen auch Knoblauchschildling genannt, ist ein kleiner essbarer Pilz (Hutdurchmesser 2-2,5 cm), der auf Grund seines intensiven Geschmacks nach Knoblauch bevorzugt als Würzpilz Verwendung findet. Er ist auf Ästen und Zweigen sowie an Stubben von Laub- und Nadelholz wie beispielsweise Buche, Eiche und Fichte anzufinden.



Abb. 4-1: *Marasmius scorodonius* (www.pilzepilze.de, Aufnahme v. 27.05.2003, Georg Müller)

Aus Vorarbeiten von Langhoff (2002) standen zur Isolierung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme neben *Marasmius* noch die Pilze *Ischnoderma benzoinum* und *Trametes versicolor* zur Verfügung (Tab. 1-1). Da die Zielenzyme ggf. in der Lebensmittelproduktion Verwendung finden sollen, fiel die Wahl auf einen Speisepilz.

Ferner waren die Kulturüberstände von *T. versicolor* und *I. benzoinum* hochviskos (Langhoff, persönliche Mitteilung), was die Isolierung der Exo-Enzyme erschwert.

4.1.2 Erste Charakterisierung der β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus *Marasmius scorodoni*

Um den Erfolg der Reinigung der Zielenzyme verfolgen zu können, war die Entwicklung eines stabilen Enzymassays erforderlich. Als Basis für diese Arbeiten wurde der von Langhoff (2002) modifizierte und auf Ben Aziz et al. (1971) zurückgehende Enzymtest genutzt. Voruntersuchungen ergaben, dass dieser Test auch für die Enzyme aus *Marasmius scorodoni* anwendbar war. Zwei wichtige Bedingungen für ein stabiles und reproduzierbares Testsystem waren erfüllt (Suelter, 1990): Über einen definierten Zeitraum nahm die Extinktion linear ab und Enzymkonzentration (Abb. 3-2) und Aktivität waren proportional zueinander (Abb. 3-3).

In Analogie zu den Arbeiten von Langhoff (2002) wurden die ersten Enzymtests in einem Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffer durchgeführt. Ein optimaler pH-Wert von 5 (Abb. 3-6) wurde ermittelt. Da ein pH-Wert von 5 im optimalen Pufferbereich des NaAc-Puffers aber nur am Randbereich der Pufferwirkung des Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffers lag, wurde NaAc-Puffer ebenfalls für Enzymtests herangezogen.

Im Gegensatz zum Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffer konnte für den NaAc-Puffer kein exakter optimaler pH-Wert (Abb. 3-7), sondern ein pH-Plateau ausgemacht werden. Das anfänglich unerwartete Ergebnis ließ sich mit der Kenntnis, dass es sich bei den β,β -Carotin-spaltenden Enzymen aus *Marasmius scorodoni* um mindestens zwei handelt, erklären. Die unterschiedliche Intensität des pH-Plateaus bei mehrfacher Ermittlung war auf die Verwendung unterschiedlicher Probenchargen zurückzuführen. Innerhalb dieser Chargen wurden die Enzyme vermutlich mit verschieden hohem Niveau exprimiert.

Ebenfalls mit der Anwesenheit von mindestens zwei β,β -Carotin-spaltenden Enzymen lassen sich die beiden reproduzierbaren Maxima (14,7 mM/ 30,6 mM;

4 Diskussion

39,2 mM/ 81,2 mM; Abb. 3-5) bei der Ermittlung der optimalen Pufferkonzentration des Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffers erklären.

Die Ermittlung der pH-Optima in beiden Puffern offenbarte ferner, dass die Zielenzyme über einen größeren Bereich (pH 3,5-6) über 50% der Aktivität, die unter optimalen Bedingungen erzielt werden konnte, aufwiesen. Dies bedeutete für die Entwicklung der Reinigungsstrategie, dass die Fraktionen der verschiedenen Chromatographieschritte für eine schnelle Analyse der unterschiedlichen Reinigungsversuche nicht umgepuffert werden mussten.

Mit derselben Intention wurde der Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Enzymaktivität (Abb. 3-10) untersucht. Da die Aktivität des Ultraretentats bei einer NaCl-Konzentration von 0,25 M den höchsten Betrag aufwies und selbst bei Anwesenheit von 1M NaCl die Aktivität immer noch etwas höher lag als ohne NaCl-Zusatz, erforderte auch der Einsatz von NaCl-haltigen Puffern kein Entsalzen der zu testenden Fraktionen, was ein wesentlich effizienteres Arbeiten ermöglichte.

Für die Handhabung des Kulturüberstandes bzw. Ultraretentats waren Kenntnisse über die Enzymstabilität erforderlich. Die Enzymstabilität im Kulturüberstand war bei Raumtemperatur gering (Abb. 3-9). Bei einer Temperatur von 20 °C lag die Aktivität nach 2 h unter 50%. Die geringe Enzymstabilität lässt sich möglicherweise mit der Anwesenheit von Peptidasen erklären. Kürzlich wurde das Sekretom von *Pleurotus sapidus* untersucht. Hierbei wurden verschiedene Peptidasen identifiziert (Zorn et al., 2005). Ähnliches ist für das Sekretom von *M. scorodoni* zu vermuten. Ferner könnten sich im Kulturüberstand störende Bestandteile befinden, die zu oxidativen Prozessen führen, die die Enzyme irreversibel schädigen.

Die Entscheidung für eine geeignete Säule für die Ionenaustauschchromatographie konnte durch die Kenntnis des pI erleichtert werden. In Vorversuchen mit stark konzentriertem Kulturüberstand konnten erste Hinweise über die Lage des pI (3,8-4) gewonnen werden. Anhand dieser Informationen wurde die Entscheidung getroffen, mit Anionentauschern zu arbeiten.

Die Enzymaktivität wurde vergleichend in beiden optimierten Puffersystemen gemessen, wobei im NaAc-Puffer höhere Aktivität detektiert wurde. Ferner wurden die Zielenzyme bei Verwendung des NaAc-Puffers fester an die IEC-Säule gebunden (vgl. 4.1.3), was für den Erfolg der Reinigung unabdingbar war. Der NaAc-Puffer war darüber hinaus gegenüber mikrobiellen Kontaminationen wesentlich stabiler als der Citronensäure/Na₂HPO₄-Puffer. Alle weiteren Versuche wurden deshalb im Natriumacetatpuffer durchgeführt.

4.1.3 Konzentrieren der β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus Kulturüberständen von *Marasmius scorodoni*

4.1.3.1 Ammoniumsulfat- bzw. Polyethylenglykol-Präzipitation

Die Ammoniumsulfat-Fällung stellt eine einfache, schonende und preisgünstige Möglichkeit dar, eine Proteinlösung zu konzentrieren bzw. erste Fremdproteine durch eine fraktionierte Fällung zu eliminieren (Cooper, 1980; Lottspeich et al., 1998). Obwohl diese Methode weltweit mit großem Erfolg durchgeführt wird und die Proteinkonzentration des Kulturüberstandes im geforderten Bereich von 0,01-2% lag (Lottspeich et al., 1998), war es nicht möglich, die Zielproteine unter weitgehendem Aktivitätserhalt zu konzentrieren; in den (NH₄)₂SO₄-Pellets wurden lediglich max. 30% der Ausgangsaktivität detektiert. Die Ausgangsaktivität der polyvalente Peroxidase VPL3 aus *Pleurotus eryngii* wurde zu 60% im (NH₄)₂SO₄-Pellet detektiert (Langhoff, 2002). Dieser Fällungstyp wurde wegen des 40%igen Verlustes und der geringen spezifischen Aktivität der Probe ebenfalls nicht weiter verfolgt (Langhoff, 2002).

Im Verlauf der Fällung der *Marasmius*-Enzyme entstand ein weißes, aufschwimmendes Pellet, bei dem es sich um denaturierte Proteine gehandelt haben könnte. Ein Grund für die Denaturierung kann in einer zu hohen Dehydratationsgeschwindigkeit liegen (Cooper, 1980). In diesem Fall hätte die Zeit der Fällung verlängert werden müssen. Dieser Fragestellung wurde innerhalb dieser Arbeit nicht nachgegangen, da eine Anforderung an die Reinigungsstrategie und damit auch an die Präzipitation war, diese so kurz und schonend wie möglich zu gestalten.

Als Alternative zur Ammoniumsulfat-Fällung wurde eine PEG-Fällung durchgeführt. Bei der PEG-Präzipitation traten zwar keine Anzeichen von Denaturierung auf, trotzdem betrug die Wiederfindung im PEG-Pellet nur 0,8%. Insgesamt wurde ~ 64% der Aktivität zerstört. Für diesen Fällungstyp konnten für die Peroxidasen der Klasse II keine Vergleichsdaten ermittelt werden. Eine extrazelluläre Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus* konnte allerdings mit nur 10,5%igem Verlust mittels Aceton präzipitiert werden (Kang et al., 1999).

Auf Grund der beiden erfolglos durchgeführten Fällungsarten wurden unterschiedliche, kommerziell erhältliche Konzentratoren eingesetzt, um den Kulturüberstand zu konzentrieren.

4.1.3.2 Konzentrierung mittels verschiedener, kommerzieller Konzentratoren

Anfänglich wurde lediglich für das Konzentrieren des Kulturüberstandes Centricon-Plus-80-Einheiten, die ein Konzentrieren unter weitgehendem Aktivitätserhalt erlaubten, verwendet. Dasselbe galt auch für die Ultrafree-4-Centrifugal-Einheiten, mit denen die ersten IEC-Fractionen aufkonzentriert wurden. Mit den gleichen Konzentratoren wurde die VPL3 aus *P. eryngii* mit einem Verlust von 16% konzentriert (Langhoff, 2002). Im Verlauf der Arbeiten wurden die Membranen modifiziert (Millipore, tech. Service, persönliche Mitteilung), was zu Aktivitätsverlusten während der Konzentrierung der *Marasmius*-Enzyme führte.²⁰ Aus diesem Grund wurden auch Vivacell-70-Einheiten für die Arbeiten herangezogen. Die Verluste wiesen bei beiden Einheiten dieselbe Größenordnung auf. Die Centricons ließen sich im Gegensatz zu den Vivacell-Einheiten gut reinigen und damit mehrfach wiederverwenden, was zu einer erheblichen Kostensenkung führte. Aus diesem Grund wurden für mittlere Volumina Centricon-Plus-80-Einheiten verwendet.

Im Verlauf der Arbeiten standen neuartige Konzentratoren der Firma Vivascience zur Verfügung, die es erlaubten, große Kulturvolumina bis hin zu mehreren Litern zu konzentrieren. Diese sogenannten Vivaflow-Einheiten ermöglichten ein Konzentrieren großer Volumina in kurzer Zeit unter geringen Aktivitätsverlusten (15%). Auf Grund der Ausstattung mit einer Hydrosart-Membran waren die Verluste

²⁰ Für VPL3 aus *P. eryngii* liegen keine Vergleichsdaten vor, da zu diesem Zeitpunkt die Arbeiten bereits abgeschlossen waren.

4 Diskussion

bei dieser Einheit geringer als bei den Vivacell-70-Einheiten, die mit einer Polyethersulfon-Membran ausgestattet waren.

Da die Vivacell-15R-Einheiten ebenfalls mit einer Hydrosart-Membran bestückt waren, ermöglichten auch diese Einheiten eine Konzentrierung mit geringen Aktivitätsverlusten (< 15%). Im Gegensatz zu den Ultrafree-Einheiten (4 mL Fassungsvermögen) betrug das Fassungsvermögen 15 mL, was sich für das Aufkonzentrieren der unterschiedlichen Chromatographieschritte als hilfreich erwies. Bei stark verdünnten Lösungen konnten durch zweimaliges Befüllen bis zu 20 mL mit einer Einheit konzentriert werden, was exakt den Arbeitsanforderungen entsprach. Aus diesen Gründen fanden für die Konzentrierung der einzelnen Chromatographieschritte Vivacell-15R-Einheiten Verwendung.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Konzentratoren konnten keine weiteren Referenzdaten bzgl. der Konzentrierung der Peroxidasen der Klasse II ermittelt werden. Das Enzym DyP aus *Geotrichum candidum* wurde mittels einer Ultrafiltrationseinheit mit YM-10-Membran (Amicon Grace Japan) unter starker Aktivitätszunahme konzentriert (Kim et al., 1999). Die Autoren erklären den starken Aktivitätsanstieg durch die Abtrennung von Inhibitoren mit einem Molekulargewicht < 10 kDa. Die Phenoloxidase aus *Termitomyces albuminosus* wurde ebenso wie das MnP-LiP-Hybridisozym aus *Bjerkandera* sp. BOS55 (Mester et al., 1998) mit Ultrafiltrationseinheiten mit PM-10-Membran (Amicon) konzentriert (Johjima et al., 2003). Der Konzentrierungsschritt wurde nicht in die TAP-Bilanzierung aufgenommen. Da aber nach nur einem chromatographischen Schritt ein Aktivitätsverlust von 43% vorlag (Johjima et al., 2003), ist zu vermuten, dass der Konzentrierungsschritt anteilig zu diesem Verlust beigetragen hat. Das Hybridisozym aus *Bjerkandera* sp. wurde mit einer Aktivitätszunahme von 32% konzentriert (Mester et al., 1998). Auf Grund der unterschiedlichen Ergebnisse wird deutlich, dass für jedes Protein empirisch zu ermitteln ist, welche der Filtrationseinheiten die am besten geeignete ist.

4.1.4 Reinigung der β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus *Marasmius scorodonius*

4.1.4.1 Ionenaustauschchromatographie

Bei der Reinigung der β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus *Marasmius scorodonius* wurde die Ionenaustauschchromatographie an den Anfang gestellt. Die IEC bietet die Möglichkeit, die Säule mit einem großen Probenvolumen, das das Säulenvolumen um ein Mehrfaches übersteigt, zu beladen (Rehm, 2002). Ferner handelt es sich bei den Ionenaustauschermaterialien um relativ unempfindliche Materialien, die leicht zu reinigen und zu regenerieren sind. Dies ist vor allem bei Kulturüberständen von Pilzen, die zahlreiche Komponenten enthalten, von Bedeutung.

Anfänglich wurde ein schwacher und ein starker Anionenaustauscher im Vergleich verwendet (vgl. 3.1.4.1.1). In beiden Fällen stellte eine Erhöhung der Ionenkonzentration, nicht aber die Änderung des pH-Wertes, die einzige Möglichkeit zur Elution der Zielproteine dar. Da der Hauptteil der Enzyme an die Q-Sepharose-Säule band und nur wenig beim Beladen der Säule direkt durch diese hindurch lief, wurde dieses Säulenmaterial für alle weiteren Arbeiten herangezogen.

Die Bilanzierung dieser Testreinigungen ergab eine Steigerung der Aktivität von 100% auf 126% für den DEAE-Lauf und für den Q-Sepharose-Lauf eine Steigerung auf 122% (vgl. 3.1.4.1.1). Ein ähnliches Phänomen ist von der Reinigung der Peroxidase DyP aus *Geotrichum candidum* Dec1 (Kim et al., 1999) beschrieben worden. Die Erhöhung der Aktivität durch die IEC lässt sich mit der Eliminierung von Proteinen und/oder anderen Bestandteilen des Ultraretentats erklären, die einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität ausübten.

Beim Scale up dieses Reinigungsschrittes trat eine Erhöhung der Enzymaktivität (>100%) nach dem Aufkonzentrieren der aktiven Fraktionen nicht mehr auf (vgl. 3.1.4.1.2), da in der Zwischenzeit die Membran-Zusammensetzung der Filtrationseinheiten der Firma Millipore geändert wurde (vgl. 4.1.2.2). Der pH-Wert der Puffer wurde während des Scale-ups auf 6 erhöht, da die Proteine bei einem pH-Wert von 5 während der Elutionsphase bei geringer NaCl-Konzentration sofort komplett von der Säule eluiert wurden. Durch die pH-Werterhöhung konnten die Bindungs- und Elutionsverhältnisse verbessert werden.

4.1.4.2 Gelfiltrationschromatographie

Als zweiter Reinigungsschritt wurde eine GFC durchgeführt. Es kam Superdex-200-Material zum Einsatz, weil dieses einen Trennbereich von 10-600 kDa aufweist und die vermutete Molekülgröße des Zielproteins innerhalb dieses Bereiches liegen sollte. Da bei der GFC die Moleküle nur auf Grund ihrer Größe getrennt werden, hat die Anwesenheit höherer Salzkonzentrationen keinen Einfluss auf die Art und Schärfe der Trennung. Aus diesem Grund mussten die Proben der IEC vor der weiteren Reinigung nicht entsalzt werden. Die GFC findet auch zum Entsalzen von Proben Verwendung (Lottspeich et al., 1998).

4.1.4.3 Kombinierte Aufreinigung

Die β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus *Marasmius scorodoni* sollten in einem möglichst einfachem Verfahren zügig gereinigt werden. Deshalb wurde versucht, alle Reinigungsschritte in einem einzigen Puffer durchzuführen. Ein derartiges Vorgehen hat den Vorteil, dass zeitaufwendige Umpufferungsschritte, die in den meisten Fällen mit einem Aktivitätsverlust einhergehen, umgangen werden. Für die Enzyme DyP bzw. TAP, die die höchste Homologie zu den β,β -Carotin-abbauenden Enzymen aus *Marasmius scorodoni* aufweisen, wurden lediglich Reinigungsstrategien entwickelt (Kim et al., 1999; Jojima et al., 2003), die Pufferwechsel beinhalteten. In dieser Arbeit gelang es, sämtliche Arbeiten in einem einzigen Puffer durchzuführen, der ebenfalls direkt für das Monitoring der Enzymaktivität verwendet werden konnte.

Bereits durch den ersten Chromatographieschritt konnte 97% des Fremdproteins abgetrennt werden. Bei TAP wurden 95 % (Jojima et al., 2003), bei der DyP lediglich 65% (Kim et al., 1999) der Begleitproteine abgetrennt. Durch die sich anschließende GFC konnten die Enzyme MsP1 und MsP2 bei einer Gesamtausbeute von mindestens 50% vollständig gereinigt werden. Auch die Peroxidase DyP aus *Geotrichum candidum* Dec1 wurde durch zwei gekoppelte Chromatographieschritte gereinigt, allerdings mit einer Ausbeute von lediglich 20%. Das Enzym TAP aus *Termitomyces albuminosus* wurde unter nahezu vollständigem Aktivitätsverlust mittels dreier chromatographischer Schritte gereinigt (Jojima et al., 2003). Lediglich 0,01% der Ausgangsaktivität waren nach der dritten Reinigungsstufe noch nachweisbar.

Die einzelnen aktiven GFC-Fractionen wurden getrennt voneinander konzentriert und mittels SDS-Gel-Elektrophorese analysiert. Dieses Vorgehen offenbarte, dass der Pilz *M. scorodoni* zwei verschiedene β,β -Carotin-spaltende Enzyme produziert. Mit diesem Wissen kann das anfänglich als ungewöhnlich betrachtete Aktivitätsprofil des 2-mL-IEC-Laufs (Abb. 3-12) erklärt werden. Die beiden Aktivitätsmaxima werden von den beiden Enzymen MsP1 und MsP2 hervorgerufen. Ein getrenntes Konzentrieren und Reinigen der ersten drei aktiven IEC-Fractionen trüge zur Klärung der Frage bei, welches der beiden Enzyme zuerst von der Säule eluiert.

4.1.4.4 Enzymreinigung im großtechnischen Maßstab

Zukünftige Ziele werden die Überexpression der Enzyme MsP1 und MsP2 und die Produktion im industriellen Maßstab sein. Die in dieser Arbeit entwickelte Reinigungsstrategie ließe sich prinzipiell einem Scale-up unterziehen. Um größere Kulturvolumina zu konzentrieren, ist es möglich mehrere Vivaflow-Einheiten hintereinander zu schalten. Nachteilig sind die damit verbundenen hohen Kosten. In der Zwischenzeit wurde ein Verfahren entwickelt, bestimmte Enzyme durch den Zusatz eines Detergenz zu zerschäumen und dadurch sowohl partiell zureinigen als auch anzureichern. Diese Methode wurde erfolgreich für die extrazelluläre Lipasen aus *Pleurotus sapidus* angewandt (Linke et al., 2005). Erste Vorversuche ergaben, dass 20% von MsP1 und MsP2 unter Zusatz von CTAB zerschäumt werden können (D. Linke, persönliche Mitteilung). Bisher ist diese Zerschäumung nicht optimiert worden, so dass wesentlich höhere Ausbeuten zu erwarten sind. Die Kosten für dieses Verfahren sind äußerst gering. Die Zerschäumung müsste nach der Optimierung einem Scale up unterzogen und mit einem Kationentauscher das CTAB im Batch-Verfahren entfernt werden. Im Anschluss würde die IEC folgen.

4.1.5 Identifizierung und Charakterisierung der β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus *Marasmius scorodoni*

4.1.5.1 Das Enzym MsP1

Eisen-Peroxidasen werden auf Grund ihrer Struktur und anhand von Sequenz-Homologien in zwei verschiedene Superfamilien eingeteilt (Welinder et al., 1992; English et al., 1995). Bei der ersten Superfamilie handelt es sich um die Pflanzen-

4 Diskussion

TAP	KGFG---EPLPGQAFIDPGIILVGRANDTVTT-RPAWALDGSFLAFRKLKQLVPEFHKYT	288
poly	PGFG---TPFPGQAVVDSGVI FAGRTNDPVTN-RPSWALDGSFLVFRKLKQLVPEFHKWT	287
DyP	TGWET--TVFPGQAVVPPGIILTGRDGDGT--RPSWALDGSFMAFRHFQQKVPEFNAYT	290
MsP1	DGFTPPAEIRPGQALIPPGIMLLGEANDTFQNDRPPWAKDGSFLVFRQMQRRAPEFNKFL	295
	***** * * * ** ** ***** ** * **	
TAP	LDNALQ-NQSGNLSTEEGALLLGSRMFGRWNSGAPIDLTPDVDDPALGNDPNRNNNFNYI	347
poly	LDNALQ-NQAGNLTVEEGALLLGSRMFGRWNSGAPIDLTPDVDDPTLGNDPQRNNDNFNYI	346
DyP	LANAIPANSAGNLTQQEGAEFLGARMFGRWKSGAPIDLAPTADDPALGADPQRNNDNFYS	350
MsP1	QDHALN---MPNMTSEQADLLGARIVGRWKSGAPIDLTPLVDDPVLAAADNQRNNDNFDFS	352
	* ** ** * *** ***** * *** * * ** *	
TAP	HPGEDPATDQSRCPFTAHIRKTNPRDLESQNLIPeffHAIRAGTPYGPEVSYAESSSNTT	407
poly	HPGEDLTtDETRCPFTAHVrKTNPRDLEAQGLIPDLFHAIRAGTPYGPEVTDaESNSNTT	406
DyP	----DTLTDETRCPFGAHVrKTNPR--QDLGGPVDTFHAMRSSIpyGPETSDaELASGVT	404
MsP1	-----DATNQTRCPFSAHIRKANPRGDLGGINKFPNQHIIRAGIPYGPEVTDaEKASNSS	407
	**** ** * ** * * ***** ** *	
TAP	QID----RGLAFVEYQSNISNGFRFQQVNWANNKFPFNKSISEpGLDPVIGQDK-----	458
poly	SID----RGLAFVEYQSVISNGFRFQQLNWANNANFPFNKSEP-LGLDPVIGQG-----	455
DyP	AQD----RGLLFVEYQSIIGNGFRFQQINWANNANFPFSKpIT-PGIEPIIGQT-----	453
MsP1	STDPSLERGLAFVAYQSNIQNGFVFLQKNWVDNTNF-FR---PGTGVDPLIGTNSRNSGT	463
	* *** ** ** * ** * * * * * * * * * * **	
TAP	---GANRITtGLNPLNVSESLsIP-DFIVSNGGEYFFAPsITsIVETLAA	504
poly	-----TRQTFGLDPRNASDSLtIP-QIIISNGGEYFFSPsITALVEHFGA	499
DyP	----TPRTVGGLDPLNQNETFTVP-LFVIPKGGEYFFLPSISALtATIAA	498
MsP1	DAPNTPRVVSGLDPNNATStIEIDIDFVVSrGGEYFFSPSLsAIRTVLSV	513
	**** * ***** *	

Abb. 4-2: Vergleich der Aminosäuresequenzen einer peroxidabhängigen Phenoloxidase (TAP) aus *Termitomyces albuminosus*, einer Peroxidase (DyP) aus *Geotrichum candidum*, einer Peroxidase (poly) aus *Polyporaceae* sp. und MsP1 aus *Marasmius scorodonius*: *: konservierte Aminosäuren; Blau: Histidin-Rest, der bei den klassischen Fe-Peroxidasen an der Häm-Bindung beteiligt ist; Grün: konservierte Histidin-Reste; Rot: an der Häm-Bindung beteiligter Asparaginsäure-Rest; Orange: konservierter Cystein-Rest; Pink: N-Terminus des prozessierten Proteins

Das Enzym MsP1 aus *Marasmius scorodonius* ist auf Grund seiner Homologie (48%) zu DyP ebenfalls dieser Peroxidase-Familie zuzuordnen. Charakteristisch für die Mitglieder der DyP-ähnlichen Familie ist, dass sie nicht über die zwei konservierten Histidin-Reste und einen konservierten Arginin-Rest verfügen, die für sonstige Eisen-

4 Diskussion

Peroxidasen typisch sind (Poulos et al., 1980 bzw. 1993; Bosshard et al., 1984, Sugano et al., 1999). Sugano et al., 1999 und 2000 postulierten, dass wenigstens einer der beiden konservierten Histidin-Reste an Position 174 vorhanden sei, der bei den anderen Peroxidasen für die Eisen-Bindung erforderlich ist²¹. MsP1 weist an Position 175²² ebenfalls einen Histidin-Rest auf (Abb. 4-2, blau). Allerdings besitzen weder TAP noch die Peroxidase aus *Polyporaceae* sp. einen entsprechenden Histidin-Rest, stattdessen besitzen alle 4 Enzyme 4 konservierte Histidin-Reste (Abb. 4-2). Sämtliche Histidin-Reste liegen in konservierten Bereichen, so dass zu vermuten ist, dass diese Regionen für die Funktionalität der Enzyme entscheidend sind.

Die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des heterolog in *A. oryzae* überexprimierten und deglykosylierten DyPs ergab, dass der Histidinrest 164²³ und der Asparaginsäurerest 278 an der Häm-Bindung beteiligt sind (Sato et al., 2004). Bei dem Histidinrest 164 handelt es sich um den ersten konservierten Histidinrest der vier homologen Enzyme (Abb. 4-1, grün), ebenso ist der Asparaginsäurerest (rot) in allen vier Proteinen konserviert. In Anbetracht der Tatsache, dass alle vier Enzyme der Familie der DyP-ähnlichen Peroxidasen angehören und untereinander über größere strukturelle Homologien verfügen, jedoch keine Homologien zu anderen Mitgliedern der Klasse II aufweisen, ist davon auszugehen, dass die Häm-Binderegion innerhalb dieser Familie homolog ist und die oben genannten Aminosäurereste an der Häm-Bindung der jeweiligen Enzyme geteilt sind. Genaue Erkenntnisse kann eine Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse MsP1s erbringen.

Homologievergleiche zwischen MsP1 und „klassischen“ Vertretern der Pilz-Peroxidasen wie der Lignin-Peroxidasen (LiP) (Spadaro et al., 1992) und Mangan-Peroxidasen (MnP) aus *P. chrysosporium* (Stewart et al., 1996) und einer Peroxidase aus *Arthromyces ramosus* (Sawai-Hatanaka et al., 1995) offenbarten keine Homologien. Gleiches wird von TAP berichtet (Johjima et al., 2003). MsP1 besitzt weder die charakteristischen acht Cysteinreste der LiP, die über vier Disulfidbrücken zur Stabilisierung der Struktur der LiPs beitragen, noch weist es die zehn Cysteinreste der MnP auf (Conesa et al., 2002; Matrinez et al., 2002). In MsP1 ist

²¹ Die Zählung der Aminosäuren erfolgte in diesen beiden Artikeln ausgehend vom nativen Protein.

²² Grundlage der Zählung war das native Protein.

²³ Grundlage dieser Zählung bildete das reife Protein.

4 Diskussion

lediglich ein Cystein-Rest zu finden, der in der Familie der Dyp-ähnlichen Peroxidasen konserviert ist (Abb. 4-1, orange). MsP1 verfügt weder über den für LiP konservierten Tryptophan-Rest, der für die Oxidation von Veratrylalkohol und anderen aromatischen Substraten essentiell ist (Blodig et al., 1998; Choinowski et al., 1999), noch über die zwei Ca^{2+} -Bindestellen, welche für die Funktionalität von extrazellulären Peroxidasen charakteristisch sind (Conesa et al., 2002; Martinez et al., 2002). Die für MnP klassische Mn^{2+} -Bindungsstelle ist ebenfalls nicht vorhanden (Kishi et al., 1996; Whitwam, et al., 1997; Sundaramoorthy et al., 1997).

Bei dem β,β -Carotin-abbauenden Enzym MsP1 aus *Marasmius scorodonius* handelt es sich um ein Exoprotein. Das native Protein ist 513 Aminosäuren, das reife Protein 458 Aminosäuren lang. D. h., MsP1 verfügt über ein 55 Aminosäuren langes Exportsignal (Abb. 4-2). Das Signalpeptid von DyP besteht aus 56 (Sugano et al., 2000), das TAP-Signalpeptid aus 55 Aminosäuren (Johjima et al., 2003) (Abb. 4-2).²⁴

Eine Sequenzanalyse mittels InterProScan (EBI) bzw. SignalP 3.0 (CBS) offenbarte eine potentielle Schnittstelle für eine Signalpeptidase zwischen Aminosäure 20/21. Eine klassische Schnittstelle war zwischen Position 55/56 nicht auffindbar. Ähnliches wird von DyP berichtet. Die potentielle Schnittstelle für die Signalpeptidase befindet sich zwischen Aminosäure 22/23 (Sugano et al., 2000). Dasselbe Ergebnis ergab die Recherche mittels SignalP 3.0 für die homologen Enzyme aus *T. albuminosus* und *Polyporaceae* sp.. Allen Enzymen ist gemeinsam, dass direkt vor dem N-Terminus des reifen Proteins keine bekannte Signalpeptidase-Schnittstelle auffindbar ist.

Wahrscheinlich werden die reifen Enzyme zweimal prozessiert, bis sie ihre endgültige Form erreichen. Vermutlich ist der Anfang des Exportsignals bis zur Signalpeptidase-Schnittstelle für den Transfer in das endoplasmatische Retikulum (ER) verantwortlich, wo er nach dem Transfer durch eine Signalpeptidase entfernt wird (Nelson et al., 2002). Innerhalb des ERs erfolgt die Faltung und N-Glykosylierung der Proteine (Nelson et al., 2002). Nach dem Transport zum Golgi-Apparat erfolgt innerhalb des Golgi-Apparates die O-Glykosylierung. Die Enzyme werden in Transportvesikel verpackt und aus der Zelle geschleust. Sugano et al.,

²⁴ Über das homologe Protein aus *Polyporaceae* sp. können dies bezüglich keine Angaben gemacht werden, da über diese Peroxidase lediglich ein Datenbank-Eintrag (EMBL) unter U77073 existiert, aber keine weiteren Veröffentlichungen vorgenommen wurden.

4 Diskussion

2002 exprimierten die Peroxidase DyP heterolog in *Aspergillus oryzae* über. Obwohl *G. candidum* und *A. oryzae* verschiedenen Gattungen angehören, erfolgte die sekundäre Prozessierung des Proteins, was für die Autoren den Schluss nahe legte, dass für die sekundäre Reifung der DyP Peroxidase kein spezifisches Enzym verantwortlich ist, sondern das die Peroxidase für die abschließende Reifung selbst verantwortlich ist. Für diese Hypothese gibt es allerdings bis zu dem heutigen Zeitpunkt keine experimentellen Belege. Vergleichbares wäre auf Grund der Ähnlichkeit bzgl. der strukturellen Zusammensetzung der Exportsignale von TAP, DyP, MsP1 und der Peroxidase aus *Polyporaceae* sp. zu folgern. Andererseits könnten die Exportsignale pilzspezifische Schnittstellen beinhalten, die bisher noch unbekannt sind. Die heterologe Überexpression von MsP1 soll zukünftig weitere Erkenntnisse zu dieser Thematik liefern. In diesem Zusammenhang könnte über „site-directed mutagenesis“ untersucht werden, welche der Aminosäuren des Exportsignals zwingend für den zweiten Prozessierungsschritt erforderlich sind.

Das Enzym MsP1 weist strukturelle Charakteristika von Sekretionsproteinen auf (Kreil, 1981; Nelson et al., 2002). Die Signalsequenz besitzt am N-terminalen Ende eine hydrophobe Region (AS 8-14), die allerdings 2 Aminosäuren unter der typischen Länge ist (Kreil, 1981). Vor der hydrophoben Region befindet sich auf Position 2 ein positiv geladener Lysinrest. Kurz vor der Schnittstelle der Signalpeptidase befindet sich ein relativ polarer Bereich, der auch die klassischen Alanin-Moleküle beherbergt.

Innerhalb des reifen MsP1-Proteins sind wie in TAP acht potentielle N-Glykosylierungstellen (N-X-T bzw. N-X-S) und eine potentielle O-Glykosylierungsstelle vorhanden (Abb. 3-32) (Johjima et al., 2003). Unter Verwendung des NetNGlyc 1.0 Servers des CBS²⁵ wurden auch für die Peroxidase aus *Polyporaceae* sp. acht potentielle N-Glykosylierungstellen ermittelt. An Position 45 des Proteins befindet sich darüber hinaus eine potentielle O-Glykosylierungsstelle (NetOGlyc 3.1 Server, CBS). Diese Glykosylierungsstelle findet sich allerdings noch innerhalb der potentiellen Signalsequenz. In DyP konnten lediglich drei potentielle N- und mehrere potentielle O-Glykosylierungsstellen identifiziert werden (Sugano et al., 1999). Sugano et al., 1999 nahmen einen Sequenzvergleich zur Peroxidase aus *Polyporaceae* sp. vor und fanden diese drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen in

²⁵ Dieses Programm dient zur Vorhersage von N-Glykosylierungsstellen in Humanproteinen.

4 Diskussion

beiden Organismen. Hieraus folgerten sie, dass diese N-Glykosylierungsstellen für die allgemeine Funktion der beiden Peroxidasen essentiell seien. Weitere Analysen dieses Arbeitskreises ergaben jedoch, dass der Grad der Glykosylierung keinen Einfluss auf die Enzymaktivität ausübt. In verschiedenen Experimenten wiesen glykosylierte und deglykosylierte Enzyme die gleiche Enzymaktivität auf (Sato et al., 2004). Ein Vergleich der Lage der N-Glykosylierungsstellen von MsP1 mit denen der anderen 3 homologen Enzyme ergab, dass die 4., 5., 7. und 8. Stelle auch in TAP (Abb. 3-32) und die 5., 7. und 8. Position in der Peroxidase aus *Polyporaceae* sp. vorhanden ist. Lediglich die 5. Position ist in allen vier Enzymen vorhanden. Interessant ist ebenfalls, dass sich die Verteilung der Glykosylierungsstellen innerhalb des DyP-Proteins deutlich von der der anderen Enzyme unterscheidet. Da die Lage der Glykosylierungsstellen innerhalb der homologen Proteine variiert, scheint diese keinen Einfluss auf die Enzymaktivität auszuüben. Im Gegenteil, da für DyP bereits gezeigt wurde, dass der Grad der Glykosylierung keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität ausübt (Sato et al., 2004), ist zu vermuten, dass dies für die homologen Proteine dieser Enzymfamilie ebenso zutrifft. Für die Ligninperoxidase (LiPH2, LiPH8) und die Manganperoxidase (MnPH4) aus *Phanerochaete chrysosporium* sowie für etliche weitere Enzyme ist es ebenfalls sehr wahrscheinlich, dass die Glykosylierung keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität ausübt (Nie et al., 1999; Lis et al., 1993). Bekannt ist, dass die Glykosylierung charakteristisch für Sekretionsproteine ist (Lis et al., 1993). Ebenso dient die Glykosylierung als Signal für den intrazellulären Transport (Rehm, 2002). Ferner schützen Glykosylierungen vor proteolytischem Verdau und tragen zur Stabilität bei (Lis et al., 1993; Rehm, 2002). Da die Glykosylierung ein sehr komplexer Vorgang ist und von den verschiedensten Faktoren, wie Species, Alter, Zustand des Organismus u. a. (Lis et al., 1993; Kobata, 1992) abhängig ist, sind umfangreiche Arbeiten zur Erklärung der Funktion der Glykosylierung von MsP1 erforderlich.

Mittels SDS-Gelelektrophorese wurde für MsP1 ein Molekulargewicht von 75 kDa, mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde ein Gewicht von 64,2 kDa detektiert. Über GFC unter Verwendung einer Superdex-200-Säule wurde ein Molekulargewicht von 150 kDa ermittelt. Die übersetzte Aminosäuresequenz des reifen Proteins entspricht einem theoretischen Molekulargewicht von 49,1 kDa. Ein hoher Glykosylierungsgrad von MsP1 könnte für die große Differenz zwischen dem

4 Diskussion

berechneten und dem mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmten Molekulargewicht verantwortlich sein. Mit einem hypothetischen Glykosylierungsgrad von ~ 23% ist MsP1 innerhalb der DyP ähnlichen Familie das Protein mit einem mittleren Glykosylierungsgrad. Natives DyP trägt ~ 17% (w/w) Saccharide (Sugano et al., 1999), TAP enthält je nach Art der Größenermittlung (SDS-PAGE bzw. GFC) zwischen 15 und 28% (w/w) Kohlenhydrate.²⁶

Ungewöhnlich, sowohl für die Familie der DyP-ähnlichen Enzyme, als auch für die Klasse II der Eisen-Enzyme insgesamt, ist die Tatsache, dass es sich bei dem nativen MsP1 Enzym um ein Dimer handelt. Nur so lassen sich die unterschiedlichen Molekulargewichte erklären. Unter denaturierenden Bedingungen migriert das Protein auf dem SDS-Gel als Monomer mit einer Größe von 75 kDa. Unter nativen Bedingungen eluiert das Enzym jedoch als Dimer von der GFC-Säule mit einem Gewicht von 150 kDa. Lediglich für eine extrazelluläre Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus* (Kang et al., 1993) wurde Gleiches berichtet. Mittels SDS-PAGE weist dieses Enzym ein Molekulargewicht von ~ 72 kDa und über GFC ein Gewicht von ~ 140 kDa bei einem Saccharid-Gehalt von 41% (w/w) auf. Bei diesem Enzym handelt es sich nach Welinder (1992) ebenso wie bei MsP1 um ein Klasse II Enzym. TAP und DyP liegen hingegen als Monomere vor. Insgesamt weist das MsP1-Monomer innerhalb der Familie der DyP-ähnlichen Enzyme ein mittleres Molekulargewicht (64,2 kDa) auf. DyP besitzt ein Molekulargewicht von 60 kDa und TAP ein Molekulargewicht von 67 kDa.

Die Differenz zwischen dem Molekulargewicht des Monomers und des Dimers (SDS-Gelelektrophorese, GFC) und dem mittels MALDI-TOF bestimmten Gewicht könnte dadurch zu Stande kommen, dass glykosylierte Proteine während der SDS-Gelelektrophorese z. T. atypisch laufen. Dies kann durch Zuckerreste, die kein SDS binden und somit das Ladungs- zu Masseverhältnis der SDS-Komplexe verändern, verursacht werden (Rehm, 2002). Verfügt das Dimer nicht über die optimale Kugelform, so kann auch dies einen Einfluss auf das Laufverhalten während der GFC ausüben.

²⁶ Der Saccharidgehalt wurde auf Grund der Daten von Johjima et al., 2003 ermittelt.

4 Diskussion

MsP1 weist einen pI von 3,7, DyP einen pI von 3,8 auf (Kim et al., 1999). Obwohl MsP1 auf dem SDS-Gel eine homogene Bande bildete, zeigten sich auf dem IEF-Gel schwache Nebenbanden in direkter Nähe zur Hauptbande (Abb. 3-17, 3-20), die auch β,β -Carotin-spaltende Aktivitäten aufwiesen. Dieses Phänomen lässt sich mit dem hohen Glykosylierungsgrad des Enzyms erklären. Einerseits variiert die Zusammensetzung der Zuckerketten s. o. (Lis et al., 1993; Kobata, 1992), andererseits können die Zuckerreste auf Grund ihrer Größe Ladungen abschirmen, was in beiden Fällen zu einer leichten Änderung des pIs führen kann.

Untersuchungen zur Fragestellung, ob es sich bei MsP1 ebenfalls um ein Eisen-Enzym handelt, wurden bisher in Ermangelung an weiterem Probenmaterial nicht durchgeführt. Auf Grund der vorhandenen Homologien ist die Anwesenheit von Eisen zu vermuten.

4.1.5.2 Das Enzym MsP2

Das zweite β,β -Carotin-spaltende Enzym aus *Marasmius scorodoni* MsP2 weist unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) ein Molekulargewicht von 55 kDa und unter nativen Bedingungen (GFC) ein Gewicht von 120 kDa auf, d. h. auch dieses Enzym liegt im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der DyP-ähnlichen Familie in der Funktionsform als Dimer vor. Eine MALDI-TOF-Analyse ergab für das Monomer ein Molekulargewicht von 52,4 kDa. In diesem Fall konnte das Molekulargewicht mittels SDS-Gelelektrophorese nahezu exakt ermittelt werden. Die Differenz zwischen dem Gewicht des Monomers und des Dimers könnte ebenfalls mit der Abweichung des Dimers von der optimalen sphärischen Form erklärt werden. Evtl. nehmen auch die Zuckerreste einen größeren Raum ein, so dass das Enzym früher von der Säule eluiert.

Der pI der Hauptbande von MsP2 beträgt 3,5. MsP2 verhielt sich während SDS- und IEF- Gelelektrophorese wie MsP1. Während auf dem SDS-Gel eine homogene Bande erschien (Abb. 3-17), zeigten sich auf dem IEF-Gel (Abb. 3-20) neben der Hauptbande auch schwächere Nebenbanden. Die stärkste Nebenbande wies einen pI von 3,4 und zeigte ebenfalls β,β -Carotin-spaltende Aktivität. Die verschiedenen pIs lassen sich einerseits wie bei MsP1 mit verschiedenen Glykosylierungsmustern,

4 Diskussion

andererseits mit der Existenz von Isoenzymen erklären. Bei der Identifizierung der cDNA-Sequenz von MsP2 traten mindestens zwei verschiedene Sequenzen auf, die sich in 9 Aminosäuren unterschieden (Hülsdau, 2006).

Im NaAc-Puffer wurden zwei pH-Optima im Bereich von pH 4 und 5 reproduzierbar ermittelt. Die verschiedenen pH-Optima lassen sich mit Konformationsänderungen erklären. Wechselnde pH-Werte können einen Einfluss auf die sterische Ausrichtung der Zuckerketten im Raum ausüben. Eventuell wird bei einem pH-Wert von 4,5 das aktive Zentrum durch Zuckerreste partiell blockiert, so dass es zum Abfall der Aktivität kommt. Bei einem pH-Wert von 5 könnte sich hingegen die räumliche Anordnung der Saccharide ändern, so dass das aktive Zentrum wieder frei zugänglich wird. Ferner könnte der pH-Wert einen Einfluss auf die Bildung bzw. den Zusammenhalt des Dimers ausüben. Röntgenstrukturanalysen könnten helfen, diese Fragestellungen zu klären. Insgesamt gesehen verfügt MsP2 über eine große Toleranz gegenüber wechselnden pH-Werten. Die Aktivität betrug bei allen getesteten pH-Werten > 80%.

Sowohl durch den Zusatz von H₂O₂, als auch durch den Zusatz von NaCl konnte eine Steigerung der Enzymaktivität herbeigeführt werden. Für nachfolgende Umsetzungen unter Einsatz verschiedener Substrate sollten diese Kenntnisse berücksichtigt werden. So ist z. B. von der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* bekannt, dass diese in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen (pH-Wert, Mn-An- oder Abwesenheit, usw.) unterschiedliche Reaktionen katalysiert (Ruiz-Duenas et al., 1999 c). Dies könnte bei MsP2 ebenfalls der Fall sein.

Sowohl die Edman-Sequenz des Proteins MsP2, als auch die Peptide 2, 3, 4 und 5 weisen mindestens 50% Homologie zu MsP1 auf. Das Peptid 1 unterscheidet sich nur in 1 Aminosäure von der Sequenz MsP1s. Auf Grund dieser Homologien ist zu vermuten, dass MsP2 ebenfalls der DyP-ähnlichen Familie angehört. Die Sekretion mehrerer Peroxidasen einer Peroxidase-Familie bzw. mehrerer Familien ist für Pilze nicht ungewöhnlich. So besitzt *Phanerochaete chrysosporium* mindestens zehn Gene für Lignin-Peroxidasen und drei Gene für Mangan-Peroxidasen (Conesa et al., 2002; Martinez et al., 2002). *Pleurotus eryngii* produziert drei polyvalente Peroxidasen (VPL1-3) mit hoher Homologie (Ruiz-Duenas et al., 1999c; vgl. 3.2.1.3

4 Diskussion

bzw. 4.2.1) und *Trametes versicolor* mindestens zwei Lignin-Peroxidasen (Johansson et al., 1996).

Eisenhaltige Proteine werden in 3 Gruppen eingeteilt (Bertini et al., 2001). Die erste Gruppe wird von Proteinen mit Häm-gebundenen Eisen, wie Cytochromen, Globinen, Katalasen, Peroxidasen und Oxigenasen gebildet. Proteine mit FeS-Clustern (Fe_xS_y) bilden die zweite Gruppe. Ihr gehören die Ferredoxine, Transferasen und Dehydrogenasen an. Die dritte Gruppe wird von den nicht-Häm Proteinen gebildet, dazu gehören vorwiegend Lipoxygenasen, Dioxygenasen, Hydrolasen und Ribonucleotid-Reduktasen.

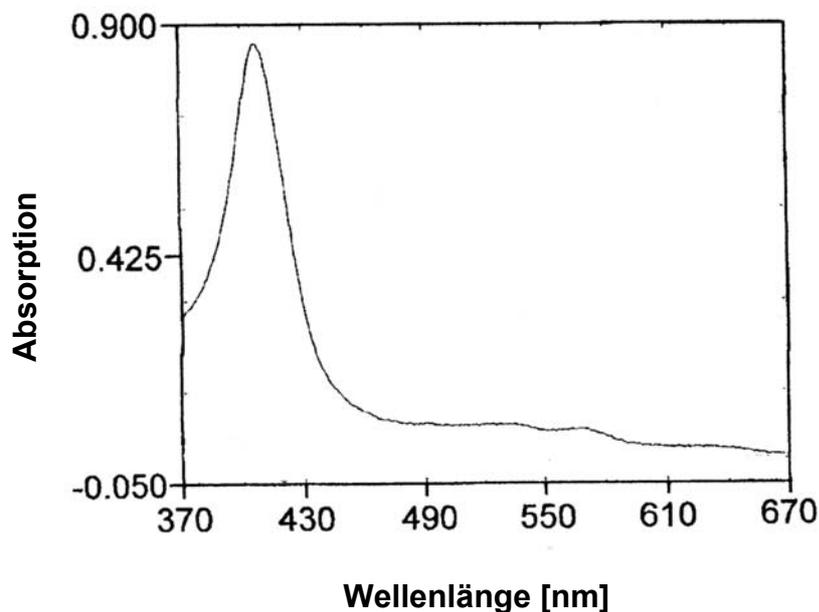


Abb. 4-3: UV/VIS-Spektrum einer Linoleatdiolsynthase aus *Gaeumannomyces graminis* (Su et al., 1998; modifiziert)

Häm-Proteine wie z. B. eine Linoleatdiolsynthase aus *Gaeumannomyces graminis* (Su et al., 1998) zeigen ein deutliches Absorptionsmaximum im Bereich von 406 nm, die sogenannte Soret-Bande (Lottspeich et al., 1998). Ferner treten kleinere Maxima im Bereich von 520 nm und 565 nm auf (Lottspeich et al., 1998; Su et al., 1998). Für die Linoleat-diol-synthase wird von einem weiteren kleinen Maximum im Bereich von 630 nm berichtet (Abb. 4-3) (Su et al., 1998). Dieses ist jedoch z. B. nicht beim Cytochrom c aus dem Pferdeherz vorhanden (Lottspeich et al., 1998).

4 Diskussion

Abb. 4-4 zeigt das Absorptionsspektrum eines Proteins mit 2Fe-2S-Cluster. Die oxidierte Form zeigt Maxima bei 414 nm und 458 nm und ein breites Maximum mit einer Schulter im Bereich 322 nm und 337 nm (Jung et al., 1999). Bei der reduzierten Form ist die Absorption im sichtbaren Bereich reduziert. Ein sehr starker Anstieg der Absorption ist im Bereich von 390 nm zu verzeichnen. Im Bereich von 545 nm tritt ein neues lokales Maximum auf.

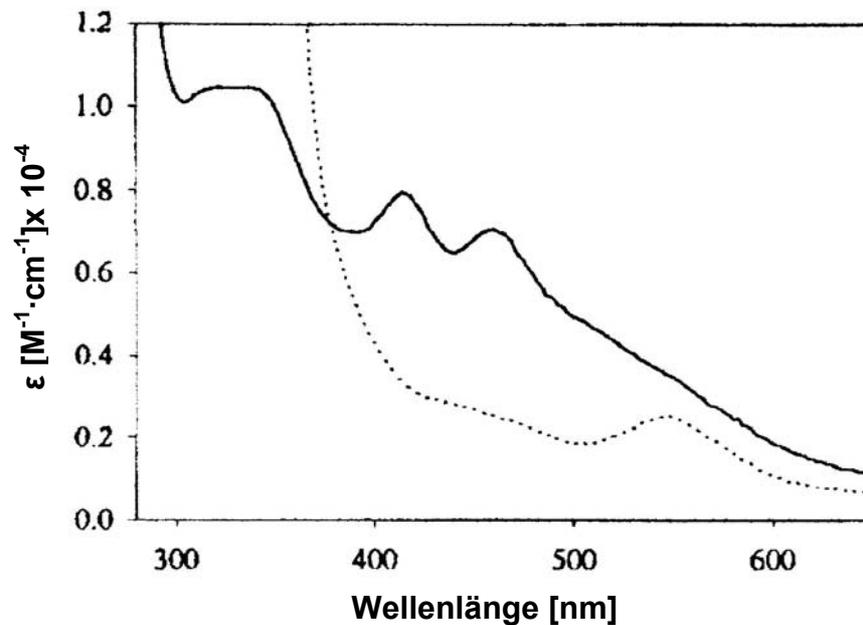


Abb. 4-4: UV/VIS-Spektrum des Ferredoxins IV (FdIV) aus *Azotobacter vinelandii*; durchgezogene Linie: Luft oxidiert; gestrichelte Linie: reduziert mit 2 mM Natriumdithionit (Jung et al., 1999, modifiziert)

Die Eisensuperoxiddismutase (FeSOD) des Cyanobakteriums *Nostoc* PCC 7120 zeigt ein lokales Maximum von 350 nm (Abb. 4-5). Dieses Absorptionsmaximum wird durch ein Fe(III)-Ion hervorgerufen. Durch Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) geht die Absorption bei 350 nm komplett verloren (Regelberger et al., 2004). Die Absorption bei 280 nm wird durch aromatische Aminosäuren hervorgerufen.

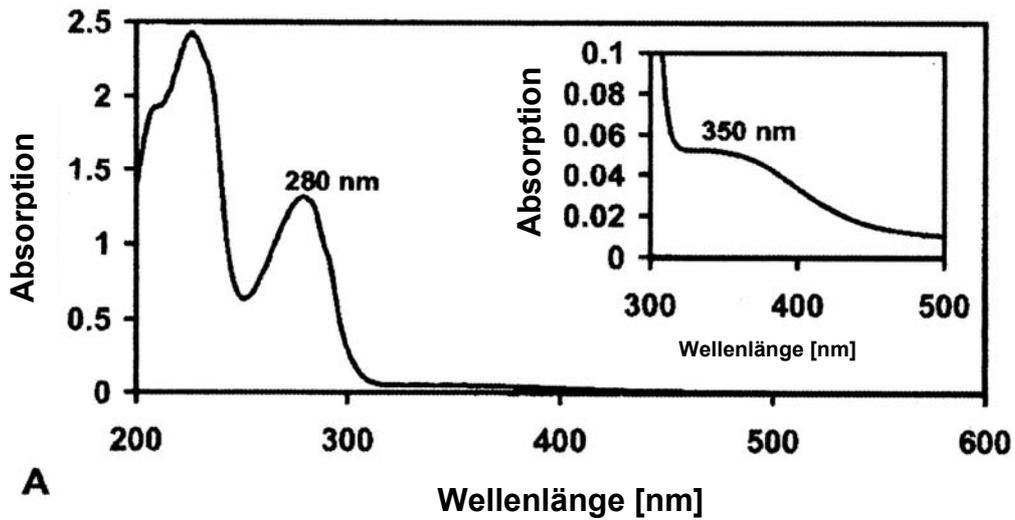


Abb. 4-5: UV/VIS-Spektrum einer Eisensuperoxiddismutase aus *Nostoc* PCC 7120 (Regelsberger et al., 2004, modifiziert)

Ein Vergleich des UV/VIS-Spektrums von MsP2 (Abb. 3-25) mit den oben aufgeführten Spektren zeigt deutliche Übereinstimmung mit den Spektren der Proteine mit Häm-gebundenen Eisen (Abb. 4-3, Abb. 4-6). Es zeigt die klassische Soret-Bande bei 405 nm und darüber hinaus ein Maximum im Bereich von 510 nm. Das Spektrum besitzt große Ähnlichkeit mit dem UV/VIS-Spektrum der DyP aus *Geotrichum candidum*. Lediglich das kleinste Maximum bei 640 nm ist wie beim Cytochrom c abwesend (Abb. 4-6).

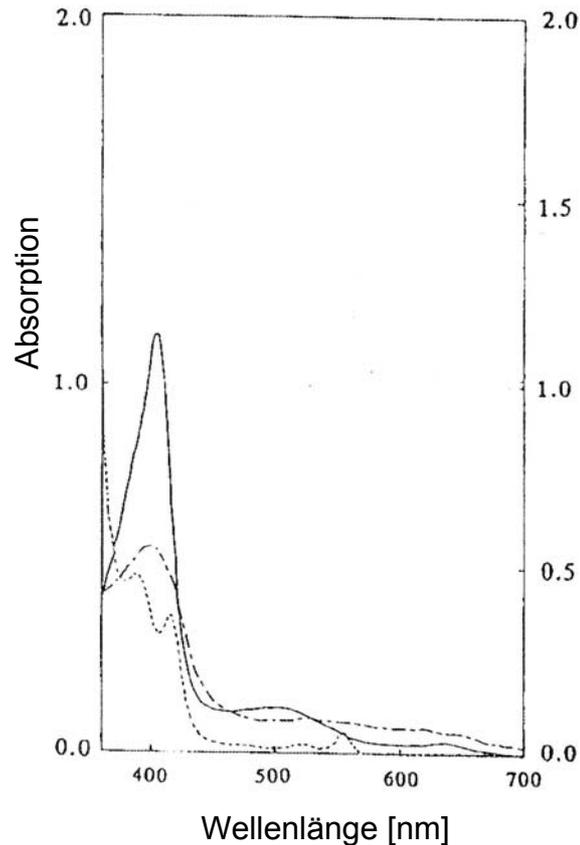


Abb. 4-6: UV/VIS-Spektrum von DyP aus *Geotrichum candidum*; durchgezogene Linie: natives DyP; (.....): reduziertes DyP; (-.-.-.): oxidiertes DyP (Kim et al., 1999, modifiziert)

Auf Grund der guten Übereinstimmung des MsP2-, des Linoleatdiolsynthase- bzw. Dyp-UV/VIS-Spektrums (Abb. 4-6) ist davon auszugehen, dass es sich bei F19 ebenfalls um ein Protein mit Häm-gebundenen Eisen handelt.

4.2 Die polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*

4.2.1 Identifizierung der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* auf molekularbiologischer Ebene

Bei Arbeitsaufnahme waren keine Sequenzinformationen über das β,β -Carotin-spaltende Enzym aus „*Lepista irina*“ vorhanden (vgl. 1.4.1). Für Pilze wurden bis zu diesem Zeitpunkt noch keine carotinoidspaltenden Enzyme beschrieben. Auf Grund der Arbeiten zu carotinoidspaltenden Enzymen aus Pflanzen und Tieren (vgl. 1.2 bzw. 1.3) wurde das Auffinden einer Dioxygenase erwartet. Alle aus Homologievergleichen verschiedener Dioxygenasen abgeleiteten Primer und die daraus resultierenden PCRs verliefen erfolglos. Erst die Kenntnis einer ESI-MS/MS-

4 Diskussion

Sequenz von 20 Aminosäuren, die eine 76%ige Homologie zu den VPLs aus *Pleurotus eryngii* ATCC 90787 (=IJM A169) aufwies, ermöglichte die Charakterisierung der polyvalenten Peroxidase auf cDNA-Ebene (Abb. 3-35).

Ein Sequenzvergleich zwischen der deduzierten Aminosäuresequenz der polyvalenten Peroxidase und der ESI-MS/MS-Sequenz ergab genau wie der Sequenzvergleich dieses Fragmentes mit den Proteinen VPL1 und VPL2 aus *Pleurotus eryngii* eine 76%ige Homologie (Abb. 4-7). Die Abweichungen zwischen der ESI-MS/MS-Sequenz und der deduzierten Sequenz lassen sich einerseits mit Messungenauigkeiten während der ESI-MS/MS-Messung erklären. Andererseits könnten die Abweichungen zwischen der ESI-MS/MS-Sequenz und der deduzierten Sequenz einen Hinweis darauf geben, dass nicht nur drei, sondern vier verschiedene VPLs vorliegen, wobei die vierte noch zu identifizieren wäre.

ESI-MS/MS-Fragment	1 LFPGTADQNQE-QSPLQELR 20
	***** * ***** *
VPL	237 LFPGTADNKGEAQSPLQGEIR 257

Abb. 4-7: Homologievergleich zwischen dem ESI-MS/MS-Fragment und der übersetzten Sequenz aus der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*

Für die These der Messungenauigkeit spricht, dass bei Homologievergleichen zwischen der hier ermittelten VPL3-Sequenz und den bekannten Proteinen VPL1 und VPL2 aus *Pleurotus eryngii* eine 98%ige Identität und eine 96%ige Identität zu einer potentiellen polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* (EMBL: AM039632) gefunden wurde (Abb. 4-8). Ferner liegt zwischen den Enzymen VPL1, 2 und 3 für den ESI-MS/MS-Bereich 100% Identität vor.

Das zwischen der hier beschriebenen polyvalenten Peroxidase VPL3 und den bereits charakterisierten Peroxidasen VPL1 und VPL2 (Ruiz-Duenaz, et al., 1999c) bzgl. der Gesamtsequenz keine 100%ige Homologie besteht, lässt sich zum einem mit stammspezifischen Unterschieden erklären. Die von Ruiz-Duenaz et al. beschrieben VPLs entstammen dem Stamm *Pleurotus eryngii* ATCC 90787 (=IJM A169). Der in dieser Arbeit verwendete Stamm wurde von der CBS nicht näher identifiziert, so dass zu vermuten ist, dass zwei verschiedene *Pleurotus eryngii* Stämme zur Charakterisierung und Identifizierung der polyvalenten Peroxidasen Verwendung

4 Diskussion

fanden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass der *Pleurotus*-Stamm nicht nur zwei, sondern drei bzw. vier polyvalente Peroxidasen aufweist. Wie bereits unter 4.1.4.1 diskutiert, tritt bei den Basidiomyceten eine Vielzahl von Stämmen auf, die mehrere Peroxidasen einer Familie mit hoher Identität beherbergen. Auf Grund der hohen Homologie ist eine Charakterisierung und Identifizierung der einzelnen Enzyme bzw. Gene sehr schwierig (Pease et al., 1991; Stewart et al., 1996). Die Frage, ob drei bzw. vier Peroxidasen oder zwei verschiedene Stämme vorlagen, lässt sich abschließend nur durch eine komplette Genomanalyse oder eine nähere Identifizierung des in dieser Arbeit verwendeten Stammes klären.

4 Diskussion

VPL2	MSFKTLSALALALGAAVQFASAAVPLVQKRATCDDGRTTANAACCILFPILDDIQENLFD	60
VPL1	MSFKTLSALALALGAAVQFASAAVPLVQKRATCADGRTTANAACCVLFPILDDIQENLFD	60
VPL3	MSFKTLSALALALGAAVQFASAAVPLVQKRATCADGRTTANAACCILFPILDDIQENLFD	60
VPLps	MSFKTLSALVLAALGAAVQFTSAAVPRVQKRATCADGRTTANAACCVLFPILDDIQENLFD	60

VPL2	GAQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTLGGGGADGSI IAFDTIETNFPANAGIDEIVSAQKP	120
VPL1	GAQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTLGGGGADGSI IAFDTIETNFPANAGIDEIVSAQKP	120
VPL3	GAQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTLGGGGADGSI IAFDTIETNFPANAGIDEIVSAQKP	120
VPLps	GGQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTLGGGGADGSI ITFDTIETVFPANAGIDEIVSAQKP	120
	* *****	
VPL2	FVAKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPGGVRI PFFLGRPDVAASPDHLVPEPFDSVDSILA	180
VPL1	FVAKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPGGVRI PFFLGRPDVAASPDHLVPEPFDSVDSILA	180
VPL3	FVAKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPGGVRI PFFLGRPDVAASPDHLVPEPFDSVDTILA	180
VPLps	FVAKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPGGVRI PFFLGRPDVAASPDHLVPEPFDSVDTILA	180

VPL2	RMGDAGFSPVEVVWLLASHSIAAADKVDPSIPGTPFDSTPGVFDSQFFIETQLKGR	240
VPL1	RMSDAGFSPVEVVWLLASHSIAAADKVDPSIPGTPFDSTPGVFDSQFFIETQLKGR	240
VPL3	RMGDAGFSPVEVVWLLASHSIAAADKVDPSIPGTPFDSTPGVFDSQFFIETQLKGR	240
VPLps	RMGDAGFSAVEVVWLLASHSIAAADLVDPSIPGTPFDSTPGVFDSQFFIETQLKGR	240
	** *****	
VPL2	TADNKGEAQSPHQEIRLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSKMALLGQ	300
VPL1	TADNKGEAQSPHQEIRLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSKMALLGQ	300
VPL3	TADNKGEAQSPHQEIRLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSKMALLGQ	300
VPLps	TPDNKGEVQSPHQEIRLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSKMALLGQ	300
	* *****	
VPL2	DKTKLIDCSDVIPTPPALVGAAHLPAGFSLSDVEQACAATPPFPALTADPGPVTSVPPVPG	360
VPL1	DKTKLIDCSDVIPTPPALVGAAHLPAGFSLSDVEQACAATPPFPALTADPGPVTSVPPVPG	360
VPL3	DKTKLIDCSDVIPTPPALVGAAHLPAGFSLSDVEQACAETPPFPALTADPGPVTSVPPVPG	360
VPLps	DKSKLIDCSDVIPTPPALVGAAHLPAGFSLSDVEQACAETPPFPALTADPGPVTSVPPVPG	360
	** *****	
VPL2	S	361
VPL1	S	361
VPL3	S	361
VPLps	S	361
	*	

Abb. 4-8: Vergleich der Aminosäuresequenzen der polyvalenten Peroxidasen VPL1 und VPL2 aus *Pleurotus eryngii*, der in dieser Arbeit identifizierten Peroxidase VPL3 und einer polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* VPLps; Blau: Bereich der ESI-MS/MS-Sequenz

4.2.2 Überexpression der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*

4.2.2.1 Wahl eines geeigneten Expressionssystems

Es wurden mehrere Versuche unternommen, die polyvalenten Peroxidasen VPL1 und VPL2 aus *Pleurotus eryngii* überzuexprimieren. Die Überexpression von VPL2 in *E. coli* verlief erfolglos. Das Protein konnte zwar über Immuno-Blotting nachgewiesen werden, allerdings war keine Enzymaktivität nachweisbar (Ruiz-Duenaz et al.,

4 Diskussion

1999b). *Aspergillus nidulans* fungierte als ein weiterer Expressionsstamm für die Überexpression von VPL2. Aktives Protein mit ähnlichen Charakteristika wie das native Enzym wurde gebildet (Ruiz-Duenaz et al., 1999b), jedoch in geringerer Menge als im Wildtyp (Martinez et al., 1996; Ruiz-Duenaz et al., 1999b). Ruiz-Duenaz et al. schlugen als alternative Expressionssysteme die Stämme *Aspergillus oryzae* oder *Pichia pastoris* vor. Die Idee, VPL2 in *Aspergillus oryzae* zu exprimieren, basierte auf Resultaten von Stewart et al., 1996, die eine Mangan-Peroxidase (MnP1) aus *Phanerochaete chrysosporium* in *A. oryzae* exprimierten. Auch in diesem Fall war die Produktion des rekombinanten Enzyms nicht höher als im nativen Stamm (Stewart et al., 1996). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der heterologen Expression der Mangan-Peroxidase (H4) desselben Organismus in Insektenzellen mittels des Baculovirus Expressionssystems erzielt (Pease et al., 1991). Neben der geringen Ausbeute ist dieses Expressionssystem sehr teuer. Die Lignin-Peroxidase H8 und die Mangan-Peroxidase MnP1 (= H4) aus *Phanerochaete chrysosporium* wurden im homologen System überexprimiert. Es wurde zwar rekombinantes Enzym detektiert, die Ausbeute war jedoch nicht höher als im Wildtyp-Stamm (Mayfield et al., 1994; Solleweijn Gelpke et al., 1999). Die Lignin-Peroxidase H8 und die Mangan-Peroxidase H4 aus *Phanerochaete chrysosporium* wurden ferner in *Aspergillus niger* exprimiert. Während die Überexpression von MnP H4 mit einem höheren Betrag als der Wildtyp-Stamm gelang, wurde lediglich inaktives LiP H8 gebildet (Conesa et al., 2000).

Die Expression von Pilz-Peroxidasen in *E. coli*, als schnelles und effizientes Expressionssystem, führte bislang nicht zu einem positiven Ergebnis. Zum einen wurden die gebildeten Proteine sofort in die schwer zugänglichen „inclusion bodies“ verpackt, zum anderen fehlen klassische eukaryontische Enzyme, die z. B. für den *in-vivo*-Einbau von Metall-Ionen oder die Glykosylierung von Proteinen verantwortlich sind, so dass die sezernierten Enzyme häufig inaktiv sind (Conesa et al., 2002; Martinez et al., 2002).

Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde *E. coli* für die vorliegende Arbeit als Expressionssystem ausgeschlossen. Die verschiedenen *Aspergillus*-Stämme ermöglichten zwar die Bildung rekombinanten Proteins, jedoch mit Ausnahme von MnP H4 in *Aspergillus niger* nur in geringen Mengen. Da die polyvalenten

4 Diskussion

Peroxidasen aus *Pleurotus eryngii* eine höhere Homologie zu den LiPs als zu den MnPs aus *Phanerochaete chrysosporium* aufweisen und die LiP H8 in *A. niger* ebenfalls nicht erfolgreich gebildet wurde, wurde auch dieser Stamm als Expressionssystem ausgeschlossen. Stattdessen sollte die Hefe *Pichia pastoris* als Expressionssystem zum Einsatz kommen.

Das Expressionssystem *Pichia pastoris* führt verschiedene eukaryontische posttranslationale Modifikationen wie Faltung, Disulfidbrücken-Bildung, Glykosylierung aus. Einige eisenhaltige Enzyme (z. B. Stickoxid-Synthasen und Stickstoff-Reduktasen) wurden bereits erfolgreich überexprimiert, was zeigt, dass der Eisen-Einbau in diese Proteine erfolgreich von Statten geht (Mertens et al., 2000; Gachhui et al., 1996). Im Gegensatz zu anderen höheren eukaryontischen Expressionssystemen ist das *Pichia*-System einfacher handzuhaben und weniger kostenintensiv. *P. pastoris* weist daneben eine kurze Generationszeit (2-4h) auf (Higgins et al., 1998). Ferner ist es in einer großen Vielfalt, sowohl was die Expressionsstämme als auch die -vektoren betrifft, kommerziell zu erwerben (www.invitrogen.com). Auch ließen sich etliche Proteine in mehreren g/L herstellen (Higgins et al., 1998).

4.2.2.2 Herstellung der verschiedenen Expressionsstämme

Ein Vergleich verschiedener Expressionsstudien zeigte, dass sich nicht alle Vektoren für die Überexpression definierter Proteine gleichermaßen eigneten. So ließ sich das HIV-1-Hüllprotein (ENV) mittels des Vektors pPIC3 im Zellinneren mit einer Ausbeute von 1,25 g/L Zellkultur herstellen (Scorer et al., 1993). Die Verwendung des Vektors pPIC9 mit Sekretionssignal führte hingegen zu hyperglykosyliertem Protein, das z. T. proteolytisch gespalten wurde. Andere Proteine konnten sehr erfolgreich ins Medium sezerniert werden. So wurde z. B. die Invertase aus *S. cerevisiae* mit einer Menge von 2,5 g/L Zellkultur erfolgreich ins Medium abgegeben (Tschopp, et al., 1987).

Einige Proteine wurden effizienter mit dem proteineigenen Exportsignal ins Medium abgegeben, wie z. B. die Laccase aus dem Basidiomyceten *Fome lignosus* (Liu et al., 2003) und aus *Trametes versicolor* (Jonsson, et al., 1997).

4 Diskussion

Um den o. g. Erkenntnissen Rechnung zu tragen, kamen zwei verschiedene Vektoren, pPIC3,5K und pPIC9K, für die intra- und extrazelluläre Expression zum Einsatz. Es wurden drei verschiedene Konstrukte (Tab. 3-16) hergestellt. Ein weiterer Grund für die Wahl der Vektoren war, dass sie eine Transformation mittels Spheroblastierung ermöglichen sollten (s. u.). Vektoren mit Zeocin- oder Blasticidinresistenz sind für diese Transformationsform nicht geeignet. Als Expressionsstamm wurde der Stamm *Pichia pastoris* GS115 gewählt (Higgins et al., 1998), der bezüglich der Gene *AOX1* und *AOX2* den Wildtyp-Phänotyp aufweist.

Die Konstrukte mit der kompletten cDNA der polyvalenten Peroxidase einschließlich des Exportsignals weisen an Position 4 der Gensequenz innerhalb des Exportsignals einen Fehler auf, der zu einem Austausch der Aminosäure führt (Abb. 3-35). Serin wurde gegen Threonin ausgetauscht. Bei beiden handelt es sich um polare und ungeladene Aminosäuren, die sich durch einen Methyl-Rest voneinander unterscheiden.

Es ist nicht zu erwarten, dass dieser Austausch einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Exportsignals ausübt. Ferner erbrachte ein Homologievergleich mittels WU-Blast2, dass z. B. die Mangan-Peroxidasen aus *Pleurotus ostreatus* (UNIPROT: Q12332_PLEOS) und *P. pulmonarius* (UNIPROT: Q2VT17_9AGAR), die 68% bzw. 69% Identität zu VPL3 aufweisen, an Position 2 des Exportsignals ebenfalls einen Threoninrest aufweisen. Die einzige Auswirkung, die dieser Austausch haben könnte wäre, dass die polyvalente Peroxidase nicht ins Medium sezerniert wird, sondern in der Zelle verbleibt. Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Aspekte und auf Grund der Tatsache, dass bereits eine Vielzahl von Klonen ohne Erfolg auf eine fehlerfreie Sequenz gescreent wurden, wurde der konservierte Aminosäureaustausch akzeptiert, da die Wahrscheinlichkeit eines inaktiven Exportsignals gering ist.

Es existieren 4 verschiedene Methoden zur Transformation von *Pichia pastoris*. Die sogenannte LiCl- und PEG1000-Methode weisen die schlechtesten Transformationsraten mit 10^2 bzw. 10^3 Transformanten pro μg Konstrukt auf (Higgins et al., 1998). Die Elektroporation und Spheroblastierung sind mit 10^5 Transformanten pro μg Konstrukt gleichermaßen erfolgreich (Higgins et al., 1998). Die Transformation

sollte mittels Spheroblastierung erfolgen. Den schwierigsten Schritt bei der Transformation der Spheroblasten stellt die Zugabe der PEG/CaT-Lösung zum Transformationsansatz dar (Higgins et al., 1998). In zwei Anläufen konnte dieser Schritt nicht erfolgreich durchgeführt werden. Um schnellst möglich zum Ziel zu gelangen, wurde auf eine Optimierung der Spheroblastierung verzichtet und stattdessen eine Elektroporation durchgeführt. Diese Methode konnte zügig den Gegebenheiten angepasst und mit großer Transformationseffizienz ausgeführt werden.

4.2.2.3 Selektion auf mehrfache Vektorinsertionen

Bei der Transformation von *Pichia pastoris* entstehen zu einem geringen Prozentsatz Transformanten mit Mehrfachinsertionen (Higgins et al., 1998). In seltenen Fällen hat die Anzahl der Insertionen keinen Einfluss auf die Proteinexpression, was z. B. für die Expression eines Antigens gegen Hepatitis B gezeigt werden konnte (Cregg et al., 1987). In vielen Fällen führt jedoch eine höhere Zahl an Insertionen zu einer gesteigerten Expression des Zielproteins. So konnten 12 g/L Zellkultur an Tetanus Toxin-Fragment C durch Verwendung eines *Pichia*-Stammes mit 14 Insertionen produziert werden (Clare et al., 1991). Das rekombinante Protein Pertaktin (P69) aus *Bordetella pertussis* konnte ebenfalls in *Pichia* erfolgreich überexprimiert werden. Ein Stamm mit 19 Insertionen führte zur Bildung von mehr als 3 g/L Zellkultur (Romanos et al., 1991). Während bei der intrazellulären Expression der Anstieg der Proteinexpression in der Regel mit einer steigenden Anzahl an Insertionen einher geht (Clare et al., 1991), ist diese Abhängigkeit bei einer extrazellulären Expression nicht immer gegeben (Higgins et al., 1998). Selbst wenn das mRNA-Level hoch ist, kann es z. B. zur Bildung von Sekundär-Strukturen der mRNA kommen; ferner können die sekretierten Proteine instabil sein (Higgins et al., 1998).

Pichia-pastoris-Stämme, die eine Einzelkopie eines Vektors mit Geneticin-Resistenz (G418) ins Genom integriert haben, weisen eine G418-Resistenz von 0,25 mg/mL auf (Scorer et al., 1994). Mehrfachkopien erhöhen die Resistenz von 0,5 mg/mL (1-2 Kopien) auf bis zu 4 mg/mL (7-12) G418. Dies gilt für die Stämme GS115, KM71, SMD1168 (Schimpf, 2002). Ein einfaches und schnelles Verfahren zur Identifizierung von Transformanten mit Mehrfachinsertionen ist das in dieser Arbeit durchgeführte Screening (vgl. 2.20; 3.2.2.3), in dem die Transformanten auf Agar-

Platten mit steigender Geneticin-Konzentration aufgetragen wurden. Dieses Verfahren verläuft jedoch nur semiquantitativ, da das Screening-Ergebnis mit von der Anzahl der aufgetragenen Zellen abhängig ist (Invitrogen, Instruction Manual). Um die Ergebnisse zu verbessern, wurden die einzelnen positiv getesteten Stämme nochmals auf eine G418-Platte mit derselben Konzentration übertragen. Ein weiteres Problem dieses Verfahrens, für das es noch keine Erklärung gibt, ist, dass Screening-Ergebnisse verschiedener Experimente untereinander schwer vergleichbar sind (Higgins et al., 1998). Eine Identifizierung von sogenannten „Jackpot-Klonen“ mit >12 Inserts ist nicht möglich. Obwohl dieses Verfahren keine endgültige Aussage über die direkte Anzahl an Insertionen ermöglicht, erlaubt es einen semiquantitativen Vergleich der Transformanten untereinander. Die genaue Anzahl an Insertionen lässt sich nur mittels Southern-Blot-Analyse ermitteln. Diese Analyse ist jedoch zeitaufwendiger und mit höheren Kosten verbunden und ermöglicht nur einen geringen Durchsatz. In Folge dessen sollten nach ersten Schüttelversuchen nur relevante Stämme auf genaue Insertzahl untersucht werden.

Das Geneticin-Screening wurde für alle 3 Stämme erfolgreich durchgeführt. Für jeden Stamm konnten Transformanten mit unterschiedlicher Insertzahl ermittelt werden. Die höchste G418-Resistenz wiesen die Stämme *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1α und *Pichia pastoris* GS115 + pPIC3,5K + A1α mit 3 mg/mL auf.

4.2.2.4 Monitoring der Überexpression der polyvalente Peroxidase

Aktives Protein kann über den für die polyvalente Peroxidase entwickelten Enzymtest (2.16.1.6) detektiert werden. Mittels Western-Blot ist auch inaktives Protein nachgewiesbar. Durch die partielle Aufreinigung der polyvalenten Peroxidase aus dem institutseigenen *Pleurotus-eryngii*-Stamm und den anschließenden Western-Blot (Abb. 3-40) konnte gezeigt werden, dass der Antikörper an das Zielprotein bindet.

Bei diesem Western-Blot wurde deutlich, dass der Antikörper auch an Proteine mit geringerem Molekulargewicht als die polyvalente Peroxidase band. Ein Vergleich zwischen dem Western-Blot und dem SDS-Gel zeigte jedoch, dass der Antikörper an keine Proteine mit höherem Molekulargewicht bindet (Abb. 3-40, Spur I+II, 3.2.3).

Pleurotus eryngii bildet mindestens fünf Peroxidasen (Ruiz-Duenas, et al., 1999). Neben VPL1+2 existiert eine Peroxidase PS1, die 73% Identität zu den beiden polyvalenten Peroxidasen aufweist (Camarero et al., 2000). Möglicherweise werden auch Ligninperoxidasen oder Manganperoxidasen von *Pleurotus* gebildet, die bisher noch nicht identifiziert wurden. VPL1+2 zeigen 58-60% Identität zu den Ligninperoxidasen und 55% Identität zu den Manganperoxidasen aus *Phanerochaete chrysosporium* (Ruiz-Duenas et al., 1999). Ähnliche Homologien sind zu den entsprechenden Enzymen aus dem eigenen Organismus zu erwarten. Da es sich bei dem Antikörper gegen VPL1+2 um einen polyklonalen Antikörper handelt, sind auf Grund der höheren Homologie Kreuzreaktionen zu den oben aufgeführten Peroxidasen denkbar. Das Molekulargewicht dieser Enzyme bewegt sich in der Größenordnung von 35-46 kDa (Gu et al., 2003; Johansson et al., 1996; Camarero et al., 2000).

Bei den kleineren detektierten Fragmenten kann es sich um Abbauprodukte der polyvalenten Peroxidase handeln. Diese könnten während des Kochens mit dem SDS-Probenauftragspuffer gebildet worden sein (Kowit et al., 1982).

Die Anwesenheit weiterer Peroxidasen mit hoher Homologie zu VPL3 ist in den *Pichia*-Kulturen jedoch nicht zu erwarten, so dass der Antikörper zur Detektion rekombinanten Enzyms herangezogen werden kann.

4.3 Die β,β -Carotin-spaltenden Enzyme aus Basidiomyceten

Sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich wurden carotinoidabbauende Enzyme identifiziert und charakterisiert (vgl. 1.2 und 1.3). In jüngster Zeit wurde zusätzlich zu den 9,10-Dioxygenasen aus *Arabidopsis thaliana* eine Vielzahl weiterer CCD-Proteine mit ähnlichen Eigenschaften gefunden z. B. aus dem Krokus (Bouvier et al., 2003), Tomate (Simkin et al., 2004a), Petunie (Simkin et al., 2004b), *Suaeda salsa* (Cao et al. 2005) und dem Wein (Mathieu et al., 2005). Der Einsatz dieser Dioxygenasen führte zur Bildung verschiedener, wirtschaftlich relevanter norisoprenoider Verbindungen (Schwartz et al., 2001). Durch die Herstellung transgener Tomaten-Pflanzen, die eine reduzierte Expression der Gene *LeCCD1A* und *LeCCD1B* zeigten, konnte *in vivo* der direkte Beweis erbracht werden, dass die

Enzyme LeCCD1A und LeCCD1B durch Carotinoid-Spaltung für die Bildung von β -Ionon und Geranylaceton verantwortlich sind (Simkin et al., 2004a). Ähnliches konnte durch die Generierung transgener Petunien-Pflanzen für die Bildung von β -Ionon durch das Protein PhCCD1 gezeigt werden (Simkin et al., 2004b).

Ausgehend von dem damaligen Erkenntnisstand wurde für die in dieser Arbeit untersuchten β,β -Carotin-abbauenden Enzymen aus der Klasse der Basidiomyceten angenommen, dass es sich ebenfalls um Dioxygenasen handelt.

Interessanterweise wurde für die Spezies *Marasmius scorodonius* erstmalig eine relativ kleine, wenig beschriebene Enzymklasse, die der Dyp-ähnlichen Peroxidasen, identifiziert, die für den Abbau von β,β -Carotin verantwortlich ist. Selbst innerhalb der Familie der Dyp-ähnlichen Peroxidasen ist das Enzym MsP1 einzigartig, da es innerhalb dieser Familie das bisher einzig beschriebene ist, welches als Dimer auftritt. Auch wenn sich in jüngster Zeit herausstellte, dass es sich bei dem von der CBS erhaltenen *Lepista-irina*-Stamm um *Pleurotus eryngii* handelt, wird aus den vorangegangenen Arbeiten (Langhoff, 2002; Veddeler, 2004) deutlich, dass polyvalente Peroxidasen ebenfalls zum Abbau von Carotinoiden unter Bildung norisoprenoider Verbindungen befähigt sind. Bei beiden beschriebenen Enzymarten handelt es sich um Exo-Enzyme, die im Vergleich zu den tierischen und pflanzlichen Dioxygenasen leicht zugänglich sind. Die Tatsache, dass die Untersuchung von zwei verschiedenen Basidiomyceten zum Auffinden von zwei Enzymklassen führte, die bisher nicht für den Carotinoidabbau beschrieben wurden, offenbart das große Potential der Basidiomyceten für den Carotinoidabbau und die damit einhergehende Aromastoffproduktion.

4.4 Ausblick

Die β,β -Carotin-spaltenden Enzym MsP1 und MsP2 aus *Marasmius scorodonius* wurden isoliert und charakterisiert. Während für MsP1 (diese Arbeit) und MsP2 (Hülsdau, 2006) die cDNA-Sequenz bereits ermittelt wurde, steht dies für die genomische DNA noch aus.

4 Diskussion

Bisher wurde lediglich der β,β -Carotin-Abbau und die daraus resultierende Produktbildung betrachtet. Es sollen verschiedene weitere Carotinoide, wie Neoxanthin, Lycopin, Zeaxanthin, Lutein, Cryptoxanthin oder Capsanthin mit Hilfe der Enzyme umgesetzt werden. Es sollte in diesem Zusammenhang getestet werden, ob der pH-Wert oder die Anwesenheit von H_2O_2 Einfluss auf die Produktbildung nehmen, wie es z. B. für die polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* gezeigt wurde (Ruiz-Duenas, et al., 1999). Ferner könnten MsP1 und MsP2 sowohl getrennt voneinander als auch gemeinsam für die Umsetzungen eingesetzt werden. Es könnte untersucht werden, ob die Enzyme die Carotinoide direkt umsetzen. Im Falle der MnP wird Mn^{2+} zu Mn^{3+} oxidiert, welches als starkes Oxidationsmittel einen wichtigen Beitrag zum Ligninabbau liefert (Martinez, 2002; Conesa, 2002). Derartige Mediatoren könnten auch für MsP1 und MsP2 erforderlich sein.

Um für umfassende weitere Studien genügend Material zur Verfügung zu haben, sollen beide Enzyme in *Pichia pastoris* überexprimiert werden. Bei MsP1 und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch bei MsP2 (s.o.) handelt es sich um Mitglieder einer kleinen, wenig bekannten Enzymfamilie, von denen sie sich trotz 49%iger Homologie (für MsP1) z. B. durch das Auftreten als Dimer deutlich unterscheiden. Eine Röntgen-Kristallstrukturanalyse beider Enzyme könnte näheren Aufschluss über Struktur (z. B. Anordnung des Dimers, Fe-Bindung) und Mechanismus dieser neuartigen Enzyme liefern. Die für die Funktionalität erforderlichen Aminosäuren könnten nach der Etablierung eines Expressionssystems durch „site-directed“ Mutagenesestudien ermittelt werden. In diesem Zusammenhang wäre die Frage nach der Funktion der vier konservierten Histidin-Reste zu klären. Ferner steht die Frage im Raum, ob der Histidinrest 221 und der Asparaginsäurerest 336²⁷ tatsächlich an der Häm-Bindung beteiligt sind (vgl. 4.1.5.1).

Von MsP1 sind verschiedene UV/VIS-Spektren aufzunehmen (natives, oxidiertes und reduziertes Protein), um zu untersuchen, ob es sich ebenfalls um ein Protein mit Häm-gebundenem Eisen handelt. In diesem Zuge sollte vom oxidierten und reduzierten MsP2 das UV/VIS-Spektrum aufgenommen werden, um weitere Beweise

²⁷ Die Zählung geht von der F16-Struktur mit Exportsignal aus.

4 Diskussion

für das Häm-gebundene Eisen zu erhalten und Vergleiche zum DyP aus *Geotrichum candidum* zu ermöglichen.

Nach der Identifizierung der β,β -Carotin-spaltenden, polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* wurden zur Produktion des rekombinanten Enzyms drei verschiedene *P. pastoris*-Stämme konstruiert und Transformanten mit unterschiedlicher Insertzahl ermittelt. Es sollen Schüttelversuche mit den verschiedenen Stämmen unter Verwendung von Transformanten mit unterschiedlicher Insertzahl durchgeführt werden. Nach der Identifizierung der Stämme mit der besten Produktbildung sollte über Southern-Blot-Analyse die genaue Anzahl an Insertionen bestimmt werden. Im Anschluss sollte zur Verbesserung der Ausbeute eine Optimierung der Anzuchtbedingungen (z. B. Induktion, Medium, pH, O₂-Eintrag) erfolgen. Zur großtechnischen Darstellung des Enzyms sollte ein „Scale up“ erfolgen.

5 Anhang

5.1 Sequenzdaten von MsP1 aus *Marasmius scorodonius*

5.1.1 cEAll.2-M13-RP1

CGAGCTCGGATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGCAGTGGTATCAA
CGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGGGTGCCTGGGTTTGTTCGGTACCAGTGTTTCATGGCGTT
TTCCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCTGGCCAATATCCAAACCAT
TTTGAACGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTCTGCAAGGAGCGGCTCGACCCGGTGACCAGC
AAGGTCATGAACACTTCGGATTCATGGATGGAATCAGTAACCCGGCCGTTGATGGATTTACA
CCTCCAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCGCCTGGTATCATGCTTCTCGGAGA
GGCAAACGACACTTTTTCAGAATGATCGTCTCCGTGGGCCAAAGATGGTTCCTTCTTGTCT
TCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCACGCTCTTAAC
ATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGATTGTAGGACGATG
GAAAAGTGGTGTCTCTATTGACCTCACTCCGTTGGTCGATGACCCAGTGTTGGCTGCTGACA
ATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTTTCTCT
GCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTGGGGTATTAATAAATTCCCAAACC

5.1.2 cEAll.3-M13-FP1

GGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGA
ATTCGCCCTTGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGGATCTTTCTTTGGTT
ATTCGAGTCAGATGAAGCTTTTTTCTGCCTCCGTTTTTGTCTGCTATCGTCGCTAGTCACTA
TGCGTCAGCGACTGCCACATCAGGGCTCCCAATGTGAAGCCAAGGAGGACAACTCACTTC
TGATTACTCCCCCTCAACAGCTCCGCTTCCATCTGCTCAACAGGCTGCAAGTGCCTCTAGC
AGTGCTGGCTTGAATCTCACCGACATTCAGGGTGATATTCTGATCGGCATGAAGAAGAACAA
GGAECTATTCTTCTTCTTCAGTGTACCGACGCAGCTACTTTCAAGGCTAAGCTGGGATCCG
ACATTCTTGGACTAATCACATCCACCGATCAGCTACTTGCTAATGATACTCAGCTGTCAG
GCTGTCAACGTCGTTTTCTCTAGCACTGGCCTCAAGGCATTGGGTATCACAGATGATCTGAA
GGATCCTGTCTTCGAGGCGGGAATGCTCAGCAACGCAGTGAGCGACTTGAGCGATCCAGGGA
CCGGCAATTGGGTCCCTGGGTTTGTTCGGCACCGAGTGTTTCATGGCGTTTTCTACTTGCATCG
GACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCTGGCCAACATCCAAACCATTTTGAATGGCTCGAT

5.1.3 cEAll.3-M13-RP1

GATCGTCTCCGTGGGCCAAAGATGGTTCCTTCTTGTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGC
GCCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCACGCTCTTAACATGCCGAATATGACATCCGAGC
AAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGATTGTAGGACGATGGAAAAGTGGTGTCTCTATTGAC
CTCACTCCGTTGGTTCGATGACCCAGTGTTGGCTGCTGACAATCAGCGAAATAACAACCTCGA
CTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTTTCTCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACC
CGCGCGGCGATCTTGGGGGTATTAATAAATTCCCAAACCAACACATAATCCGAGCGGGAATT
CCGTATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAAAAGCGTCAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAG
TCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTTGTGGCCTATCAGTCTAATATCCAGAACGGATTTCGTATTCC

TTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTC
ATCGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCGATGCCCCAACACGCCTCGTGTGTCAGCGG
CTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAATTGATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTG
GAGGCGAATACTTAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTA

5.1.4 cBII.1-M13-RP1

GCCAAAGATGGTTCCTTCCTTGTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAA
GTTCCCTGCAAGATCACGCTCTTAACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCC
TTGGTGCCAGGATTGTAGGACGATGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTC
GATGACCCAGTGTGGCTGCTGACAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGACGCCAC
GAATCAGACACGTTGCCCTTTCTCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTG
GGGTATTAATAAATTCCCAAACCAACACATAATCCGAGCGGGAATTCCGTATGGACCCGAA
GTTACCGACGCTGAAAAGCGTCAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCT
GGGTTTTGTGGCCTATCAGTCTAATATCCAGAACGGATTTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGG
TTGATAATACGAATTTCTTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCT
CGTAACAGTGGCACCGATGCCCCAACACGCCTCGTGTGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAA
CGCTACGAGCACCATCGAAATTGATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGCGAATACTTTT
TCTCTCCNTCTCTAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGGGATCCGAGCTCG
ACCACT

5.1.5 cCAI.3-M13-FP1

TGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
GCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCC
TTGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCCT
GCAAGATCACGCTCTTAACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTG
CCAGGATTGTAGGACGATGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTTCGATGAC
CCAGTGTGGCTGCTGACAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCA
GACACATTGCCCTTTCTCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTGGGGGTA
TTAATAAATTCCCAAACCAACACATAATCCGAGCGGGAATTCCGTATGGACCCGAAGTTACC
GACGCTGAAAAGCGTCAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTT
TGTGGCCTATCAGTCTAATATCCAGAACGGATTTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATA
ATACGAATTTCTTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAAAGGGCGAAT
TCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTTCGCCC

5.1.6 cCAI.3-M13-RP1

CTGGTTCGAGCTGGATCCCTAGTAACGGCCGCCAGTTGTGCTGGAATTCGCCCTTGCAGTGGT
ATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCCTGCAAGATCAC
GCTCTTAACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGATTGT
AGGACGATGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTTCGATGACCCAGTGTGG

CTGCTGACAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACATTGC
CCTTTCTCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTGGGGGTATTAATAAATT
CCCAAACCAACACATAATCCGAGCGGGAATTCGGTATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAA
AAGCGTCAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGCCTAT
CAGTCTAATATCCAGAACGGATTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTT
CTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAAAGGGCGAATTCTGCAGATA
TCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGT
CGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACC
CAACTT

5.1.7 cBIIa.1-M13-FP

GTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCCTGCAAGATCACGCTCT
TAACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGATTGTAGGAC
GATGGAAAAGTGGTGTCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTTCGATGACCCAGTGTGGCTGCT
GACAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTTT
CTCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTGGGGGTATTAATAAATTCCCAA
ACCAACACATAATCCGAGCGGGAATTCATATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAAAGCG
TCAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGCCTATCAGTC
TAATATCCAGAACGGATTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTCC
GACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCGATGCC
CCCAACACGCCTCGTGTGCTCAGCGGCTTGGGTCCCAATAACGCTACGAGCACCATCGAAAT
TGATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGCGAATACTTCTTCTCGCCCTCTCTAAGCCGAA
TTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATCGCCN
NTAGAT

5.1.8 cBIIa.1-M13-RP

GACTGGNCGAGCTCGGATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGGTTGGC
ATGAAGAAGAACAAGGAATATCTTCTTCTTTCAGTGTACCGACGCAGCTACTTTCAAGGC
TAAGCTGGGATCCGACATTCCTTGGACTAATCACATCCACCGATCAGCTACTTGCTAATGATA
CTCAGCCTGTACGGCTGTCAACGTCGCTTTCTCTAGCACTGGCCTCAAGGCATTGGGTATC
ACAGATGATCTGAAGGATCCTGTCTTCGAGGCCGGAATGCTCAGCAACGCAGTGAGCGACTT
GAGCGATCCAGGACCGCAATTGGGTCCCTGGGTTTGTGAGCACCAGTGTTCATGGCGTTT
TCCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAGCACCGAGCTGGCCAACATCCAAACCATT
TTGAATGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTTTTACAAGGGGAGGCTCGACCCGGTGACCAGCA
AGGTCACGAACACTTTGGATTCATGGATGGAATCAGTAACCCGGCCGTTGATGGATTTACAC
CTCCAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCGCGCTGGTATCATGCTTCTCGGAGAG
GCAAACGACACTTTTCGGAATGATCGTCCCCCGTGGGCCAAAGATGGTTCCCTTCTCGTCTT
CCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCCTGCAAGATCACGCTCTTAACA
TGCCGA

5.1.9 cBIIa.2-M13-FP

CTTCCGTCAAATGCAACGGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCACGCTCTTA
ACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGATTGTAGGACGA
TGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACCCCGTTGGTCGATGACCCAGTGTTGGCTGCTGA
CAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTTTCT
CTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTGGGGGTATTAATAAATTCCCAAAC
CAACACATAATCCGAGCGGGAATTCCGTATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAAAAGCGTC
AAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGCCTATCAGTCTA
ATATCCAGAACGGATTTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTCCGA
CCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCCTCGTAACAGTGGCACCAGTGCCCC
CAACACGCCTCGTGTCTGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAATTG
ATATCGATTTCTGTAGTTTCTCGTGGAGGCGAATACTTCTTCTCGCCCTCTCTAAGCCGAATT
CTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCN
NNNNTT

5.1.10 cBIIa.2-M13-RP

GACTGGNCGAGCTCGGATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGACATTT
TGGTGGGCATGAAGAAGAACAAGGAATTCCTTCTTCTTTCAGTGTACCCGACGCAGCTACT
TTCAAGGCTAAGCTGGGATCCGACATTCTTGGACTAATCACATCCACCGATCAGCTACTTGC
TAATGATACTCAGCCTGTCACGGCTGTCAACGTCGCTTTCTCTAGCACTGGCCTCAAGGCAT
TGGGTATCACAGATGATCTGAAGGATCCTGTCTTCGAGGCCGGAATGCTCAGCAACGCAGTG
AGCGACTTGAGCGATCCAGGGACCGCAATTGGGTCCCTGGGTTTGTGGCACCAGTGTTCA
TGGCGTTTTCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCTGGCCAACATCT
AAACCATTTTGAATGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTTTACAAGGGGAGGCTCGACCCGGT
GACCAGCAAGGTCACGAACACTTTGGATTTCATGGATGGAATCAGTAACCCGGCCGTTGATGG
ATTTACACCTCCAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCCGCCTGGTATCATGCTTC
TCGGAGAGGCAAACGACACTTTTCAGAATGATTGTCTCCGTGGGCCAAAGATGGTTCCCTTC
CTTGTCTTCCGTCAAATGCAACGGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCACGC
TCTTAA

5.1.11 cBIIa.3-M13-FP

GTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCACGCTCT
TAACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGATTGTAGGAC
GATGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTCGATGACCCAGTGTTGGCTGCT
GACAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTTT
CTCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTGGGGGTATTAATAAATTCCCAA
ACCAACACATAATCCGAGCGGGAATTCCGTATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAAAAGCG
TCAAGTAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGCCTATCAGTC
TAATATCCAGAACGGATTTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTCC
GACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCCTCGTAACAGTGGCACCAGTGCC

CCCAACACGCCTCGTGTGTCGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAAT
TGATATCGATTTCTAGTTTCTCGTGGAGGCGAATACTTCTTCTCTCCATCTCTAAGCCGAA
TTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATCGCCC
NNGGAT

5.1.12 cBIIa.3-M13-RP

AACTNGNCGAGCTCGGATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGACATTT
TGGTTGGCATGAAGAAGAACAAGGAAGTATTCTTCTTCTTTCAGTGTACCCGACGCAGCTACT
TTCAAGGCTAAGCTGGGATCCGACATTCTTGGACTAATCACATCCACCGATCAGCTACTTGC
TAATGATACTCAGCCTGTCACGGCTGTCAACGTCGCTTTCTCTAGCACTGGCCTCAAGGCAT
TGGGTATCACAGATGATCTGAAGGATCCTGTCTTTCGAGGCCGGAATGCTCAGCAACGCAGTG
AGCGACTTGAGCGATCCAGGGACCGGCAATTGGGTCCCTGGGTTTGTTCGGCACCAGTGTTC
TGGCGTTTTCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCTGGCCAACATCC
AAACCATTTTGAATGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTTTACAAGGGGAGGCTCGACCCGGT
GACCAGCAAGGTCACGAACACTTTGGATTTCATGGATGGAATCAGTAACCCGGCCGTTGATGG
ATTTACACCTCCAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCCGCCTGGTATCATGCTTC
TCGGAGAGGCCAAACGACACTTTTCAGAATGATCGTCTCCTCCGTGGGCCAAAGATGGTTCCTTC
CTTGTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCACGC
TCTTAA

5.1.13 cBIIa.4-M13-FP

TCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCACGCTCTT
AACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGATTGTAGGACG
ATGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTTCGATGACCCAGTGTGGCTGCTG
ACAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTTTC
TCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTGGGGTATTAATAAATTCTCAA
CCAACACATAATCCGAGCGGGAATTCCGTATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAAAGCGT
CAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGCCTATCAGTCT
AATATCCAGAACGGATTTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTCCG
ACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCCTCGTAACAGTGGCACCGATGCC
CCAACACGCCTCGTGTGTCGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAAT
GATATCGATTTCTAGTTTCTCGTGGAGGCGAATACTTCTTCTTCCCTCTCTAAGCCGAAT
TCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCN
NNGGAT

5.1.14 cBIIa.4-M13-RP

NAACTGGTNCGAGCTCGGATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGATAT
TTTGGTTGGCATGAAGAAGAACAAGGAAGTATTCTTCTTCTTTCAGTGTACCCGACGCAGCTA
CTTTCAAGGCTAAGCTGGGATCCGACATTCTTGGACTAATCACATCCACCGATCAGCTACTT

GCTAATGATACTCAGCCTGTCACGGCTGTCAACGTCGCTTTCTCTAGCACTGGCCTCAAGGC
ATTGGGTATCACAGGTGATCTGAAGGATCCTGTCTTCGAGGCCGGAATGCTCAGCAACGCAG
TGAGCGACTTGAGCGATCCAGGGACCGGCAATTGGGTCCCTGGGTTTGTTCGGCACCAGTGTT
CATGGCGTTTTCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCTGGCCAACAT
CCAAACCATTTTGAATGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTTTACAAGGGGAGGCTCGACCCG
GTGACCAGCAAGGTCACGAACACTTTGGATTTCATGGATGGAATCAGTAACCCGGCCGTTGAT
GGATTTACACCTCCAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCCGCCTGGTATCATGCT
TCTCGGAGAGGCAAACGACACTTTTCAGAATGATCGTCCTCCGTGGGCCAAAGATGGTTCCT
TCCTTGTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCAC
GCTCTT

5.1.15 cBIIa.5-M13-FP

TCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCACGCTCTT
AACATGCCGAATATGACATCTGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGATTGTAGGACG
ATGAAAAGTGGTGCTCCTATTGGCCTCACTCCGTTGGTCGATGACCCAGTGTTGGCTGCTG
ACAATCAGCGAAATAACAACACTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTTTC
TCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTGGGGGTATTAATAAATTCCCAA
CCAACACATAATCCGAGCGGGAATTCCGTATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAAAAGCGT
TAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCAGGCGCTTGTGGCCTATCAGTCT
AATATCCAGAACGGATTTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTCCG
ACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCGATGCC
CCAACACGCCTCGTGTCTGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAAT
GATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGCGAATACTTTTTCTTTCCCTCTCTAAGCCGAAT
TCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCCGCC
NNGGAT

5.1.16 cBIIa.5-M13-RP

GACTGNCGAGCTCGGATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGACATTTT
TGTGGGCATGAAGAAGAACAAGGAACTATTCTTCTTCTTTCAGTGTACCCGACGCAGCTACTT
TCAAGGCTAAGCTGGGATCCGACATTCTTGGACTAATCACATCCACCGATCAGCTACTTGCT
AATGATACTCAGCCTGTCACGGCTGTCAACGTCGCTTTCTCTAGCACTGGCCTCAAGGCATT
GGGTATCACAGATGATCTGAAGGATCCTGTCTTCGAGGCCGGAATGCTCAGCAACGCAGTGA
GCGACTTGAGCGATCCAGGGACCGGCAATTGGGTCCCTGGGTTTGTTCGGCACCAGTGTTTCAT
GGCGTTTTCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCTGGCCAACATCCA
AACCATTTTGAATGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTTTACAAGGGGAGGCTCGACCCGGTG
ACCAGCAAGGTCACGAACACTTTGGATTTCATGGATGGAATCAGTAACCCGGCCGTTGATGGA
TTTACACCTCCAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCCGCCTGGTATCATGCTTCT
CGGAGAGGCAAACGACACTTTTCAGAATGATCGTCCTCCGTGGGCCAAAGATGGTTCCTTCC
TTGTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCACGCT
CTTAAC

5.1.17 cHA1.2-M13-FP

AGNAANNTANGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGA
TATCTGCAGAATTCGCCCTTCAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGC
GTTTGTGGCCTATCAGTCTAATATCCAGAACGGATTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTG
ATAATACGAATTTCTTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGT
AACAGTGGCACCGATGCCCCAACACGCCTCGTGTGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGC
TACGAGCACCATCGAAATTGATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGAGAATACTTCTTCT
CGCCCTCACTTTCTGCGATCAGGACTGTGCTTTCAGTCTAGTGTATTGCATTACTCGGACAG
CTTAATTATGGGAATTTATCTTAGAACTCGGGCTTCGPolyA

5.1.18 cHA1.2-M13-RP

GGNGNGTCCATTNNCCATTTCAGGNTGNGCAANTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTTT
TCGNTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCC
AGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTAT
AGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAG
AATTCGCCCTTCAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGC
CTATCAGTCTAATATCCAGAACGGATTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGA
ATTTCTTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGC
ACCGATGCCCCAACACGCCTCGTGTGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCAC
CATCGAAATTGATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGAGAATACTTCTTCTCGCCCTCAC
TTTCTGCGATCAGGACTGTGCTTTCAGTCTAGTGTATTGCATTACTCGGACAGCTTAATTAT
GGGAATTTATCTTAGAACTCGGGCTTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACATGT
CGGCCGCTCGGCCTAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGGNTCCNGCNCG
NACCA

5.1.19 cHA2.2-M13-FP

AGAANCNNGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATAT
CTGCAGAATTCGCCCTTCAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGT
TTGTGGCCTATCAGTCTAATATCCAGAACGGATTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGAT
AATACGAATTTCTTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAA
CAGTGGCACCGATGCCCCAACACGCCTCGTGTGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTA
CGAGCACCATCGAAATTGATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGAGAATACTTCTTCTCG
CCCTCACTTTCTGCGATCAGGACTGTGCTTTCAGTCTAGTGTATTGCATTACTCGGACAGCT
TAATTATGGGAATTTATCTTAGAACTCGGGCTTCATCAGACCTTCGTTGAGACCTTTAACAG
GGTGACAAGACCTAATTTTATCCGTTTCGGTGTCAATGAAAAAAAAANANANNAAAAAAAAA
AAAAAACATGTCGGCCGCTCGGCCTAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTA
GTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGNAATCATGGNCANANCTGTTTCTGTGTGAAA
TTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAANCATAAAGTGTAAGCCTGGG
GTGCCTA

5.1.20 cHA2.2-M13-RP

GCCAGCTGGNGAAAGGGGGATGTGNTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCC
CAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACNCACTATAGGGCGAATT
GGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATTTGCAGAATTCGCCCT
TCAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTNTGGAGCGTGGTNTGGCGTTTGTGGCCTATCAGTT
TAATATCCAGAACGGATTCGTATTCCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTCC
GACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCGATGCC
CCCAACACGCCTCGTGTGCTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAAT
TGATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGAGAATACTTNTTCTCGCCCTCACTTTCTGCGA
TCAGGACTGTGCTTTCAGTCTAGTGTATTGCATTANTCGGACAGCTTAATTATGGGAATTTA
TCTTAGAACTCGGGCTTCATCAGACCTTCGTTGAGACCTTTAACATGGGTGACAAGACCTAA
TTTTNTCCGNTTCGGTGCTCNATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACATGTCGG
CCGCCTCGGCCTAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGGNTCCNGCNCGNAC
NAGNTN

5.1.21 cHA2.1-M13-FP

ATNTANGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATC
TGCAGAATTCGCCCTTCAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTT
TGTGGCCTATCAGTCTAATATCCAGAACGGATTCGTATTCCCTTCAAAGAATTGGGTTGATA
ATACGAATTTCTTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAAC
AGTGGCACCGATGCCCCAACACGCCTCGTGTGCTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTAC
GAGCACCATCGAAATTGATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGAGAATACTTCTTCTCGC
CCTCACTTTCTGCGATCAGGACTGTGCTTTCAGTCTAGTGCATTGCATTACTCGGACAGCTT
AATTATGGGAATTTATCTTAGAACTCGGGCTTCATCAGACCTTCGTTGAGACCTTTAACAGG
GTGACAAGACCTAATTTTATCCGTTTCGGTGCTCAATCACAATAGTTACCCCAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA ACTTGTGGCCGCCTCGGCCTAAGGGCGAATTCAGCACA
CTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
TGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATA
AAGTGT

5.1.22 cHA2.1-M13-RP

GGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGT
AAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGC
ATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTCAAATAGCTCTAGC
ACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGCCTATCAGTCTAATATCCAGAACGG
ATTCGTATTCCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTCCGACCCGGCACTGGTG
TAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCGATGCCCCAACACGCCTCGT
GTCGTGAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAATTGATATCGATTTTCGT
AGTTTCTCGTGGAGGAGAATACTTCTTCTCGCCCTCACTTTCTGCGATCAGGACTGTGCTTT
CAGTCTAGTGCATTGCATTACTCGGACAGCTTAATTATGGGAATTTATCTTAGAACTCGGGC

TTCATCAGACCTTCGTTGAGACCTTTAACCAGGGTGACAAGACCTAATTTTATCCGTTTCGG
TGCTCAATCACAATAGTTACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACATGTC
GGCCGCTCGGCCTAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGGATCCGAGCTCG
ACCACT

5.1.23 cGA1.1-M13-FP

AATAAGGGCGAATGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTG
CAGAATTCGCCCTTGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGAGATGAAGCTT
TTTTCTGCCTCCGTTTTTGTGCTATCGTCGCTAGTCACTATGCGTCAGCGACTGCCACAT
CAGGGCTCCCAATGTGAAGCCAAGGAGGACAACTCACTTCTGATTACTCCCCCTCAACAGC
CTCCGCTTCCATCTGCTCAACAGGCTGCAAGTGCCTCTAGCAGTGTGGCTTGAATCTCACC
GACATTCAGGGTGATATTCTGATCGGCATGAAGAAGAACAAGGAACTATTCTTCTTCTTCAG
TGTCACCGACGCAGCTACTTTCAAGGCTAAGCTGGGATCCGACATTCTTGGACTAATCACAT
CCACCGATCAGCTACTTGCTAATGATACTCAGCCTGTCACGGCTGTCAACGTCGTTTTCTCT
AGCACTGGCCTCAAGGCATTGGGTATCACAGATGATCTGAAGGATCCTGTCTTCGAGGCCGG
AATGCTCAGCAACGCAGTGAGCGACTTGAGCGATCCAGGGACCGGCAATTGGGTCCCTGGGT
TTGTCCGCACCAGTGTTTCATGGCGTTTTTCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAAC
ACCGAGCTGGCCAACATCCAAACCATTTTGAATGAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCC
GTTACTANTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTTCATANCTGTTTTCTG
TGTGAAANTGTTATCCGCTCACAATTCCAC

5.1.24 cGA1.1-M13-RP

CTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGCAGTG
GTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGAGATGAAGCTTTTTTCTGCCTCCGTTTTTGC
TGCTATCGTCGCTAGTCACTATGCGTCAGCGACTGCCACATCAGGGCTCCCAATGTGAAGC
CAAGGAGGACAACTCACTTCTGATTACTCCCCCTCAACAGCCTCCGCTTCCATCTGCTCAA
CAGGCTGCAAGTGCCTCTAGCAGTGTGGCTTGAATCTCACCGACATTCAGGGTGATATTCT
GATCGGCATGAAGAAGAACAAGGAACTATTCTTCTTCTTTCAGTGTACCGACGCAGCTACTT
TCAAGGCTAAGCTGGGATCCGACATTCTTGGACTAATCACATCCACCGATCAGCTACTTGCT
AATGATACTCAGCCTGTCACGGCTGTCAACGTCGTTTTCTCTAGCACTGGCCTCAAGGCATT
GGGTATCACAGATGATCTGAAGGATCCTGTCTTCGAGGCCGGAATGCTCAGCAACGCAGTGA
GCGACTTGAGCGATCCAGGGACCGGCAATTGGGTCCCTGGGTTTTGTCCGCACCAGTGTTTCAT
GGCGTTTTTCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCTGGCCAACATCCA
AACCATTTTGAATGAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGATCCGAGCTC
GNCNAG

5.1.25 cGA1.2-M13-FP

AGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGNCCGCTTCCAGTCGGGAAACAGGGCGAAT
TGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCC

TTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGCCGGGGGTCAGTCCTCCATCTTTCTTTGGTTATT
CGAGTCAGATGAAGCTTTTTTCTGCCTCCGTTTTTGTGCTATCGTCGCTAGTCACTATGCG
TCAGCGACTGCCACATCAGGGCTCCCAATGTGAAGCCAAGGAGGACAACTCACTTCTGAT
TACTCCCCCTCAACAGCCTCCGCTTCCATCTGCTCAACAGGCTGCAAGTGCCTCTAGCAGTG
CTGGCTTGAATCTCACCGACATTCAGGGTGATATTCTGATCGGCATGAAGAAGAACAAGGAA
CTATTCTTCTTCTTTCAGTGTACCGACGCAGCTACTTTCAAGGCTAAGCTGGGATCCGACAT
TCTTGACTAATCACATCCACCGATCAGCTACTTGCTAATGATACTCAGCCTGTCACGGCTG
TCAACGTCGCTTTCTCTAGCACTGGCCTCAAGGCATTGGGTATCACAGATGATCTGAAGGAT
CCTGTCTTCGAGGCCGGAATGCTCAGCAACGCAGTGAGCGACTTGAGCGATCCAGGGACCGG
CAATTGGGTGCTGGGTTTGTGCGCACCAAGTGTTCATGGCGTTTTCTACTTGATCGGACA
CCATTGACAATGTAAACACCGAGCTGGCCAACATCCAAACCATTTTGAATGAAGGGCGAATT
CCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGCGGTAATCATG
GTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCG
GAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGCTGTCNTGCCANCTGCATNANGAA
TCGGCNANNNCNCGGGGAAAG

5.1.26 cGA1.2-M13-RP

NNNGAATTNNNCNNNGGTATNAANGCAGAGTGGNCATTANGNCGGGGGTTCAGTCNTCCATNT
TTNTTTGGTTATTNGAGTCAGATGAAGCTTTTTTCTGCCTCCGTTTTTGTGCTATCGTCGC
TAGTCACTATGCGTCAGCGACTGCCACATCAGGGCTCCCAATGTGAAGCCAAGGAGGACAA
ACTCACTTCTGATTACTCCCCCTCAACAGCCTCCGCTTCCATCTGCTCAACAGGCTGCAAGT
GCCTCTAGCAGTGCTGGCTTGAATCTCACCGACATTCAGGGTGATATTCTGATCGGCATGAA
GAAGAACAAGGAATATTCTTCTTCTTTCAGTGTACCGACGCAGCTACTTTCAAGGCTAAGC
TGGGATCCGACATTTCTTGACTAATCACATCCACCGATCAGCTACTTGCTAATGATACTCAG
CCTGTACAGGCTGTCAACGTCGCTTTCTCTAGCACTGGCCTCAAGGCATTGGGTATCACAGA
TGATCTGAAGGATCCTGTCTTCGAGGCCGGAATGCTCAGCAACGCAGTGAGCGACTTGAGCG
ATCCAGGGACCGCAATTGGGTGCTGGGTTTGTGCGCACCAAGTGTTCATGGCGTTTTCTTA
CTTGATCGGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCTGGCCAACATCCAAACCATTTTGA
TGAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGGATCCGAGCTCGNACNGT

5.1.27 cEAll.3-M13-FP (long distance)

AGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAG
AATTCGCCCTTGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGGATCTTTCTTTGGT
TATTCGAGTCAGATGAAGCTTTTTTCTGCCTCCGTTTTTGTGCTATCGTCGCTAGTCACT
ATGCGTCAGCGACTGCCACATCAGGGCTCCCAATGTGAAGCCAAGGAGGACAACTCACTT
CTGATTACTCCCCCTCAACAGCCTCCGCTTCCATCTGCTCAACAGGCTGCAAGTGCCTCTAG
CAGTGCTGGCTTGAATCTCACCGACATTCAGGGTGATATTCTGATCGGCATGAAGAAGAACA
AGGAACTATTCTTCTTCTTTCAGTGTACCGACGCAGCTACTTTCAAGGCTAAGCTGGGATCC
GACATTCTTGACTAATCACATCCACCGATCAGCTACTTGCTAATGATACTCAGCCTGTCAC
GGCTGTCAACGTCGCTTTCTCTAGCACTGGCCTCAAGGCATTGGGTATCACAGATGATCTGA

AGGATCCTGTCTTCGAGGCCGGAATGCTCAGCAACGCAGTGAGCGACTTGAGCGATCCAGGG
ACCGGCAATTGGGTCCCTGGGTTTGTTCGGCACCAGTGTTTCATGGCGTTTTCTACTTGCATC
GGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCTGGCCAACATCCAAACCATTTTGAATGGCTCGA
TCACGGAGATTCATCGTTTACAAGGGGAGGCTCGACCCGGTGACCAGCAAGGTCACGAACAC
TTTGGATTCATGGATGGAATCAGTAACCCGGCCGTTGATGGATTTACACCTCCAGCGGAAAT
AAGACCTGGACAAGCTTTAATTCCGCCTGGTATCATGCTTCTCGGAGAG

5.1.28 cEAll.3-M13-RP (long distance)

CTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGcTGGCCAACATCCAAACCATTTG
AATGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTTTACAAGGGGAGGCTCGACCCGGTGACCAGCAAGG
TCACGAACACTTTGGATTCATGGATGGAATCAGTAACCCGGCCGTTGATGGATTTACACCTC
CAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCCGCCTGGTATCATGCTTCTCGGAGAGGCA
AACGACACTTTTCAGAATGATCGTCCCTCCGTGGGCCAAAGATGGTTCCTTCCTTGTCTTCCG
TCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCACGCTCTTAACATGC
CGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGATTGTAGGACGATGGAAA
AGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTTCGATGACCCAGTGTGGCTGCTGACAATCA
GCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTTTCTCTGCTC
ATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTGGGGGTATTAATAAATTCCAAACCAACAC
ATAATCCGAGCGGGAATTCGGTATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAAAAGCGTCAAATAG
CTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGCCTATCAGTCTAATATCC
AGAACGGATTTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTCCGACCCGGC
ACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCAGTGCACCCCAACAC
GCCTCGTGTTCGTACGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAATTGATATCG
ATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGCGAATACTTAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTT
ACTAGTGATCCAGCTCGACCAGTC

5.1.29 cBII.2-M13-FP (long distance)

GGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAA
TTCGCCCTTGACATTTTGGTGGGCATGAAGAAGAACAAGGAACTATTCTTCTTCTTCAGTGT
CACCGACGCAGCTACTTTCAAGGCTAAGCTGGGATCCGACATTCTTGAACATAATCACATCGA
CCAATCAGTTACTCGCCGTCGCCACTCAGCCTATCACGGCTGTCAACGTCGTTTTCTCTAGC
ACTGGCCTCAAGGCATTGGGTATCACAGATGATCTGAAGGATCCTGTCTTCGAGGCCGGAAT
GCTCAGCAACGCAGTGAGCGACTTGAGCGATCCAGGGACCGGCAATTGGGTCCCTGGGTTTG
TCGGCACCAGTGTTTCATGGCGTTTTCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACC
GAGCTGGCCAACATCCAAACCATTTTGAATGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTTTACAAGG
GGAGGCTCGACCCGGTGACCAGCAAGGTCACGAACACTTTGGATTCATGGATGGAATCAGTA
ACCCGGCCGTTGATGGATTTACACCTCCAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCCG
CCTGGTATCATGCTTCTCGGAGAGGCAAACGACACTTTTTCAGAATGATCGTCCCTCCGTGGGC
CAAAGATGGTTCCTTCCTTGTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGT
TCCTGCAAGATCACGCTCTTAACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTT

GGTGCCAGGATTGTAGGACGATGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTTCGA
TGACCCAGTGTTGNCTGCTGAC

5.1.30 cBII.2-M13-RP (long distance)

GGAGAGGCAAACGACACTTTTCAGAATGATCGTCCTCCGTGGGCCAAAGATGGTTCCTTCCT
TGTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCCTGCAAGATCACGCTC
TTAACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGATTGTAGGA
CGATGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTCGATGACCCAGTGTTGGCTGC
TGACAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTCTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTT
TCTCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTGGGGGTATCAATAAATTCCTCA
AACCAACACATAATCCGAGCGGGAATTCCGTATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAAAAGC
GTCAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGCCTATCAGT
CTAATATCCAGAACGGATTTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTC
CGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCGATGC
CCCCAACACGCCTCGTGTGTCGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAA
TTGATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAAGCGAATACTTCTTCTCGCCCTCTCTAAGGGCG
AATTCCAGCACAACCTGGCGGCCGTTACTAGGGATCCGAGCTCGACCACT

5.1.31 cBII.3-M13-FP (long distance)

GGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAA
TTCGCCCTTGACATTTTGGTGGGCATGAAGAAGAACAAGGAACTATTCTCCTTCTTCAGTGT
CACCGACGCAGCTACTTTCAAGGCTAAGCTGGGATCCGACATTCTTGGACTAATCATATCCA
CCGATCAGCTACTTGCTAATGATACTCAGCCTGTCACGGCTGTCAACGTCGTTTTCTCTAGC
ACTGGCCTCAAGGCATTGGGTATCACAGATGATCTGAAGGATCCTGTCTTCGAGGCCGGAAT
GCTCAGCAACGCAGTGGGCGACTTGAGCGATCCAGGGACCGCAATTGGGTCCCTGGGTTTG
TCGGCACCAGTGTTTCATGGCGTTTTCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACC
GAGCTGGCCAACATCCAAACCATTTTGAATGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTTTACAAGG
GGAGGCTCGACCCGGTGACCAGCAAGGTCACGAACACTTTGGATTTCATGGATGGAATCAGTA
ACCCGGCCGTTGATGGATTTACACCTCCAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCCG
CCTGGTATCATGCTTCTCGGAGAGGCAAACGACACTTTTCAGAATGATCGTCCTCCGTGGGC
CAAAGATGGTTCCTTCTTGTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGT
TCCTGCAAGATCACGCTCTTAACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTT
GGTGCCAGGATTGTAGGACGATGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTTCGA
TGACCCAGTGTTGGCTGCTGACAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGAC

5.1.32 cBII.3-M13-RP

ACGCAGTGGGGGACTGAGCGATCCAGGGACCGCAATGGGTTCCCTNGGTTTGTTCGGCACCAG
TGTTTCATGGCGTTTTCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCTGGCCA
ACATCCAAACCATTTTGAATGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTTTACAAGGGGAGGCTCGA

CCCGGTGACCAGCAAGGTCACGAACACTTTGGATTTCATGGATGGAATCAGTAACCCGGCCGT
TGATGGATTTACACCTCCAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCCGCCTGGTATCA
TGCTTCTCGGAGAGGCAAACGACACTTTTCAGAATGATCGTCCTCCGTGGGCCAAAGATGGT
TCCTTCCTTGTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCCGAGTTCAACAAGTTCTGCAAGA
TCACGCTCTTAACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGA
TTGTAGGACGATGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTCGATGACCCAGTG
TTGGCTGCTGACAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACAG
TTGCCCTTTCTCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTTGGGGGTATTAATA
AATTCCCAAACCAACACATAATCCGAGCGGGAATTCCGTATGGACCCGAAGTTACCGACGCT
GAAAAAGCGTCAAATAGCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGC
CTATCAGTCTAATATCCAGAACGGATTTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGA
ATTTCTTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGC
ACCGATGCCCCCAACACGCCTCGTGTCTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCAC
CATCGAAATTGATATCGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGCGAATATTTCTTCTCGCCCTCTC
TAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCG

5.2 Sequenzdaten der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*

5.2.1 Sequenzdaten zur Identifizierung der polyvalenten Peroxidase

5.2.1.1 PCR I fw

CGGGATCCGGCCATTATGGCCGGGGAAGATCCCCAGTCTTACAACCCACTGCAATGTCTTTC
AAGACGCTCTCCGCTCTCGCGCTTGCGCTCGGCGCCGCGTCCAGTTCGCAGTGCTGCTGTG
CCTCTCGTCCAGAAACGCGCAACTTGCGCCGACGGACGCACCACCGCAAATGCTGCATGTTG
CGTTCTGTTCCCCATCCTCGATGACATCCAAGAAAACCTCTTCGACGGTGCCCAGTGTGGAG
AAGAGGTACACGAGTCCCTTCGTTTGACTTTCCACGATGCAATCGGTTTCTCTCTACTTTA
GGCGGAGGAGGAGCTGACGGTTCATCATCGCGTTCGACACCATTGAGACTAATTTCCCCGC
CAATGCTGGCATCGATGAAATCGTCAGCGCTCAGAAGCCATTCGTGGCTAAACACAACATCT
CCGCCGGCGACTTCATTCAATTTGCTGGCGCCGTTGGAGTCTCCAACCTGCCCTGGTGGTGTC
AGGATTCCTTTCTTCTTGGGTGCGCCGGATGCCGTGGCGGCCCTCCCCGGACCACCTCGTGCC
AGAGCCTTTTGATTCTGTTGACACCATTCTTGCCAGAATGGGTGACGCAGGCTTCAGTCCCG
TCGAGGTTGTTTGGCTCCTGGCTTCGCACTCCATTGCCGCTGCCGACAAGGTTGACCCATCG
ATTCCTGGAACGCCATTCGATTCNACCCCNAGTTTTTGGATCTCAATTCTTCATCGAACCCA
CTTAAAGGAACTNNTTCNANGGNCNN

5.2.1.2 PCR I rev

GGAGCTGACGGTTCATCATCGCGTTCGACACCATTGAGACTAATTTCCCCGCCAATGCTGG
CATCGATGAAATCGTCAGCGCTCAGAAGCCATTCGTGGCTAAACACAACATCTCCGCCGGCG
ACTTCATTCAATTTGCTGGCGCCGTTGGAGTCTCCAACCTGCCCTGGTGGTGTGAGGATTCCT
TTCTTCTTGGGTGCGCCGGATGCCGTGGCGGCCCTCCCCGGACCACCTCGTGCCAGAGCCTTT

TGATTCTGTTGACACCAATTCTTGCCAGAATGGGTGACGCAGGCTTCAGTCCCGTCGAGGTTG
TTTGGCTCCTGGCTTCGCACTCCATTGCCGCTGCCGACAAGGTTGACCCATCGATTCTGGA
ACGCCATTGATTCAACCCCCGGAGTTTTTGATTNTCAATTCTTCATAGAAACGCAAGNAAA
GCAAA

5.2.1.3 PCR II fw

GCTTCAGTCCGATCACTTGTGGCTAGAGACCCCCAGACTGCCTGTGAATGGCAGTCCATGG
TTAACAACCAACCGAAGATTCAGAACCGTTTCGCTGCTACCATGTGCAAGATGGCTCTTCTT
GGCCAAGACAAGACCAAATTGATTGACTGTTCTGATGTTATCCCCACCCCTCCTGCCCTTGT
CGGAGCGGCCCACTTGCCGGCGGGATTTTCTCTTAGCGATGTAGAGCAAGCGTGCGCCGAGA
CCCCTTCCCTGCTCTTACTGCTGACCCAGGCCAGTAACCTCTGTCCCTCCCGTCCCTGGA
TCGTAAATGCTTCGATACCTGAATATGCTCGTTCCTGCTGCGCTGAATTTCCAACCTTTTGCCA
TTGGGTCTGTATTCGATTCTAGATGTTGTGATATCAACTGTGTATAAATGATCTTTTGAAA
TATACTTTTTTCTGCGGAGNAAAAAAAAAAN

5.2.1.4 PCR IV fw

TTCTTGCCAGAATGGGTGACGCAGGCTTCAGTCCCGTCGAGGTTGTTTGGCTCCTGGCTTCG
CACTCCATTGCCGCTGCCGACAAGGTTGACCCATCGATTCTGGAACGCCATTGATTCAAC
CCCCGGAGTTTTTGATTCTCAATTCTTCATCGAAACGCAACTTAAAGGCAAACCTTCCCAG
GCACTGCTGACAACAAGGGAGAAGCCCAATCTCCATTGCAAGGAGAGATCAGGCTTCAGTCC
GATCACTTGTGGCTAGAGACCCCCAGACTGCCTGTGAATGGCAGTCCATGGTTAACAACCA
ACCGAAGATTCAGGAACCANNNNCGGNNCACCCCCCCCCCCCCANCGCNCNCNTCNCNCNC
CCNCCANAGCCCANNNNCACCCCTANACNNCCCCCACTCCTCCNCGCCNCCNCCCCC
CCCCNNCNCNNCCCAACANCCCGAAACNGCANNANCCACCCCNACCACACCNCNCNNNAA
NCCNCCGCCCCCNCANCTATNNCCCCANCCACCCNNCNCACNACCCTCCNCCNCCCCC
NNANCCGCCTAACNCCCCCNCNATCCACCTNNACCCCCCCCCCNCNNNNNNNCNCNN
CCNNCNCACNCNGCCNTCGCCNCCNANNNTCNCCNNGCCCCCNCNCCNCCNCCNNA
CCCTCCNCCNANCCCCCNCNCCGNCNCCCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCN
CANNCGCCNCCNCCCTCNCNNTCNCNNTCNCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCN
NCCNNTACACNCCACANNCCACAC

5.2.1.5 PCR IV rev

NGGGGGNGAGAGGGNGNNGGCGGGGGGGGNNTNNGGGGGGTGGGGGTGCGTTGTTTNG
TGGNGNGNGGNGNTGCGGGAGNATNNNGGGAGGGGGGNGGNGNGNGNGTNTGGGGGGG
AGGGNNGGGGNNNGGNGGTNGGNGTNGGTGGGGGCGNNTGGNNGNNGGTANNGGNGGGGNG
ANAGNGGNGGANNNGNGGGGGGNGGGATGGTGGGTGTGGNNGGGGGGTGNGNGTGGNGGTGGN
ANGAGTTGGGGGGNGGGGNGNNGGGGGGTGGGNGNGGGGGAGGGTGTGGGGGNGNGGGTAG
GGGAGNTGGNNTGNGGTGGNNGGGGGGNGAGGGGTGGGNGGGGGGGGGGGGGGGGGCGTT
NNNTGGGGGGCGGGGGGNTGGGGTGGGGCGGGGGGNGGGGNGGGGGGNGTGGGNGGGGGN

GGGGGNGGGGGGGGGGGTGTGGNNGNGNGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGNANG
NGGGGGTCTCGTGCCAGAGCCTTTTATTCTGTTGACACCATTCTTGCCAGAATGGGTGACG
CAGGCTTCAGTCCCGTCGAGGTTGTTTGGCTCCTGGCTTCGCACTCCATTGCCGCTGCCGAC
AAGGTTGACCCATCGATTCTGGAACGCCATTTCGATTCAACCCCGGAGTTTTTATTCTCA
ATTCTTCATCGAAACGCAACTTAAAGGCAAACCTTCCCAGGCACTGCTGACAACAAGGGAG
AAGCCCAATCTCCATTGCAAGGAGAGATCAGGCTTCAGTCCGATCACTTGTGGCTAGAGACC
CCCAGGCTGCCTGTGAATGGCAGTCCAG

5.2.2 Kontrollsequenzierung

5.2.2.1 Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC3,5K + A1 α , Vorwärts-Sequenzierung

GACTGGNCGAGCTGGATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGACTGG
TTCCAATTGACAAGCTTTTATTGATTTTAACGACTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAA
ACAACATAATTATTCGAAGGATCCTACGTAACAATGACTTTCAAGACGCTCTCCGCTCTCG
CGCTTGCGCTCGGCGCCCGTCCAGTTCGCGAGTGTGCTGTGCCTCTCGTCCAGAAAC
GCGCAACTTGCGCCGACGGACGCACCACCGCAAATGCTGCATGTTGCGTTCGTTCCTCA
TCCTCGATGACATCCAAGAAAACCTCTTCGACGGTGGCCAGTGTGGAGAAGAGGTACACG
AGTCCCTTCGTTTACTTTCCACGATGCAATCGGTTTCTCTCCTACTTTAGGCGGAGGAG
GAGCTGACGGTTCATCATCGCGTTCGACACCATTGAGACTAATTTCCCGCCAATGCTG
GCATCGATGAAATCGTCAGCGCTCAGAAGCCATTTCGTGGCTAAACACAACATCTCCGCCG
GCGACTTCATTCAATTTGCTGGCGCCGTTGGAGTCTCCAACCTGCCCTGGTGGTGTGAGGA
TTCCTTTCTTCTTGGGTGCCCCGGATGCCGTGGCGGCCTCCCCGGACCACCTCGTGCCAG
AGCCTTTTATTCTGTTGACACCATTCTTGCCAGAATGGGTGACGCAGGCTTCAGTCCCG
TCGAGGTTGTTTGGCTCCTGGCTTCGCACT

5.2.2.2 Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC3,5K + A1 α , Rückwärts-Sequenzierung

ATGGGTGACGCAGGCTTCAGTCCCGTCGAGGTTGTTTGGCTCCTGGCTTCGCACTCCATT
GCCGCTGCCGACAAGGTTGACCCATCGATTCTGGAACGCCATTTCGATTCAACCCCGGA
GTTTTTATTCTCAATTCTTCATCGAAACACAACCTTAAAGGCAAACCTTCCCAGGCACT
GCTGACAACAAGGGAGAAGCCCAATCTCCATTGCAAGGAGAGATCAGGCTTCAGTCCGAT
CACTTGTGGCTAGAGACCCCGACTGCCTGTGAATGGCAGTCCATGGTTAACAACCAA
CCGAAGATTCAGAACCGTTTCGCTGCTACCATGTGCAAGATGGCTCTTCTTGGCCAAGAC
AAGACCAAATTGATTGACTGTTCTGATGTTATCCCCACCCCTCCTGCCCTTGTGGAGCG
GCCACTTGCCGGCGGGATTTTCTCTTAGCGATGTAGAGCAAGCGTGCGCCGAGACCCCT
TTCCCTGCTCTTACTGCTGACCCAGGCCAGTAACCTCTGTCCCTCCCGTCCCTGGATCG
TAAATGCTTCGCCTAGGGCGGCCGGAATTAATTCGCCCTTAGACATGACTGTTCTCAGT
TCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGA
ATGCCATTTGCAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGC
ATCTAGAGGGCCCAATTCGCCNNNAGATNN

5.2.2.3 Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1 α ohne α , Kolonie 3, Vorwärts-Sequenzierung

GACTGGTNCGAGCTGGATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGACT
GGTTCCAATTGACAAGCTTTTGGATTTTAACGACTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAA
AAACAACATAATTATTCGAAGGATCCTACGTAACAATGGCAACTTGCGCCGACGGACGCAC
CACCGCAAATGCTGCATGTTGCGTTCCTGTTCCCCATCCTCGATGACATCCAAGAAAACCT
CTTCGACGGTGCCAGTGTGGAGAAGAGGTACACGAGTCCCTTCGTTTGACTTTCCACGA
TGCAATCGTTTTCTCTCCTACTTTAGGCGGAGGAGGAGCTGACGGTTCATCATCGCGTT
CGACACCATTGAGACTAATTTCCCCGCCAATGCTGGCATCGATGAAATCGTCAGCGCTCA
GAAGCCATTTCGTGGCTAAACACAACATCTCCGCCGGCGACTTCATTCAATTTGCTGGCGC
CGTTGGAGTCTCCAACCTGCCCTGGTGGTGTGTCAGGATTCTTTCTTCTTGGGTGCGCCGGA
TGCCGTGGCGGCCTCCCCGGACCACCTCGTGCCAGAGCCTTTTGATTCTGTTGACACCAT
TCTTGCCAGAATGGGTGACGCAGGCTTCAGTCCCGTCGAGGTTGTTTGGCTCCTGGCTTC
GCACTCCATTGCCGCTGCCGACAAGGTTGACCCATCGATTCTGGAACGCCATTCGATTC
AACCCCCGGAGTTTTTGGACTCTCAATTCTT

5.2.2.4 Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1 α ohne α , Kolonie 3, Rückwärts-Sequenzierung

TTCAGTCCCGTCGAGGTTGTTTGGCTCCTGGCTTCGCACTCCATTGCCGCTGCCGACAAG
GTTGACCATCGATTCTGGAACGCCATTTCGATTCAACCCCCGGAGTTTTTGGACTCTCAA
TTCTTCATCGAAACACAACCTTAAAGGCAAACCTTCCCAGGCACTGCTGACAACAAGGGA
GAAGCCCAATCTCCATTGCAAGGAGAGATCAGGCTTCAGTCCGATCACTTGTGGCTAGA
GACCCCCAGACTGCCTGTGAATGGCAGTCCATGGTTAACAACCAACCGAAGATTCAGAAC
CGTTTCGCTGCTACCATGTGCAAGATGGCTCTTCTTGGCCAAGACAAGACCAAATTGATT
GACTGTTCTGATGTTATCCCCACCCCTCCTGCCCTTGTGCGAGCGGCCACTTGCCGGCG
GGATTTTCTCTTAGCGATGTAGAGCAAGCGTGCGCCGAGACCCCTTCCCTGCTCTTACT
GCTGACCCAGGCCAGTAACCTCTGTCCCTCCCGTCCCTGGATCGTAAATGCTTCGATAC
CTGAATATGCTCGCCTAGGGCGGCCGGAATTAATTCGCCTTAGACATGACTGTTCTCA
GTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCA
GAATGCCATTTGCAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCA
TGCATCTAGAGGGCCCAATCGCCNNANAT

5.2.2.5 Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1 α , Kolonie 2, Vorwärts-Sequenzierung

GACTGGTTCGAGCTGGATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGACTG
GTTCCAATTGACAAGCTTTTGGATTTTAACGACTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAA
AACAACTAATTATTCGAAGGATCCAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAGTTT
TATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGG
CACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTG

CTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTG
CCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTACG
TAACAATGACTTTCAAGACGCTCTCCGCTCTCGCGCTTGCCTCGGCGCCGCCGTCCAGT
TCGCGAGTGCTGCTGTGCCTCTCGTCCAGAAACGCGCAACTTGCCTCGACGGACGCACCA
CCGCAAATGCTGCATGTTGCGTCTGTTCCCATCCTCGATGACATCCAAGAAAACCTCT
TCGACGGTGCCCGAGTGTGGAGAAGAGGTACACGAGTCCCTTCGTTTGACTTTCCACGATG
CAATCGGTTTCTCTCCTACTTTAGGCGGAGGAGGAGCTGACGGTTCATCATCGCGTTCG
ACACCATTGAGACTAATTTCCCGCCAATG

5.2.2.6 Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1aohne α , Kolonie 2, Rückwärts-Sequenzierung

GGGTGACGCAGGCTTCAGTCCCCTCGAGGTTGTTTGGCTCCTGGCTTCGCACTCCATTGC
CGCTGCCGACAAGGTTGACCCATCGATTCCCTGGAACGCCATTCGATTCAACCCCGGAGT
TTTTGATTCTCAATTCTTCATCGAAACACAACCTTAAAGGCAAACCTTTCCAGGCACTGC
TGACAACAAGGGAGAAGCCCAATCTCCATTGCAAGGAGAGATCAGGCTTCAGTCCGATCA
CTTGTGGCTAGAGACCCCGACTGCCTGTGAATGGCAGTCCATGGTTAACAACCAACC
GAAGATTCAGAACCGTTTCGCTGCTACCATGTGCAAGATGGCTCTTCTTGGCCAAGACAA
GACCAAATTGATTGACTGTTCTGATGTTATCCCCACCCCTCCTGCCCTTGTCGGAGCGGC
CCACTTGCCGGCGGGATTTTCTCTTAGCGATGTAGAGCAAGCGTGCCTCGAGACCCCTTT
CCCTGCTCTTACTGCTGACCCAGGCCAGTAACCTCTGTCCCTCCCGTCCCTGGATCGTA
AATGCTTCGCCTAGGGCGGCCGGAATTAATTCGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTC
AAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAAT
GCCATTTGCAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCA
TCTAGAGGGCCCAATTCGCCCNNNNATTC

5.3 Selektion auf mehrfache Vektorinsertionen (Screening-Tabellen)

5.3.1 Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1a α

5 Anhang

5.3.1.1 Screening I, 1. Ausstrich

Klon	0,25 [mg/mL]	0,5 [mg/mL]	0,75 [mg/mL]	1 [mg/mL]	1,5 [mg/ml]	1,75 [mg/mL]	2 [mg/mL]	3 [mg/mL]	4 [mg/ml]
1	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+/-	-	+	+	-
3	+	-	+	+	-	-	+	-	-
4	+	+	+	+	+	-	+	-	-
5	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
6	+	-	+	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	+	-	-
8	+	-	+	-	-	-	-	-	-
9	+	-	+	+/-	+/-	-	+/-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-
12	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+/-	-	+	-	-	-	-	-
15	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	+/-	-	+	-	+/-
19	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	-	-	+/-	-	-	--	-	-
21	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
22	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
23	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-
25	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
26	+	-	+	+	+/-	-	-	-	-
27	+	-	-	-	+	-	-	-	-
28	+	-	+	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	+/-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-
31	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
32	+	-	-	+	-	-	-	-	-
33	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
34	+	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-
36	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-	-
37	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-
38	+	-	-	-	-	-	-	-	-
39	+	-	-	-	-	--	-	-	-
40	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	+	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-
42	+/-	+	-	+/-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	+	-	-	+	+/-	+/-	-	-	-
45	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
47	+/-	-	+	-	-	-	-	-	-

5 Anhang

5.3.1.2 Screening I, 2. Ausstrich

Klon	0,25 [mg/mL]	0,5 [mg/mL]	0,75 [mg/mL]	1 [mg/mL]	1,5 [mg/ml]	1,75 [mg/mL]	2 [mg/mL]	3 [mg/mL]	4 [mg/ml]
1	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	-	+	+	-
3	+	-	+	+	+/-	-	+/-	-	-
4	+	+	+	+	+	-	+	-	-
5	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	+	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	-	+	-	-	-	-	-	-
9	+	-	+	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
15	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	+/-	-	-	-	+/-
19	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-	-	--	-	-
21	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	+	-	-	-	-	-	-	-
23	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-
25	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	-	+	-	+/-	-	-	-	-
27	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	+	-	+	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
32	+	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	-	-	-	-	-	-	-	-
34	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-
36	+	+	+	+	+	-	-	-	-
37	+	-	+/-	-	-	-	-	-	+/-
38	+	-	-	-	-	-	-	-	-
39	+/-	-	-	-	-	--	-	-	-
40	+	-	-	-	-	-	-	-	-
41	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-
42	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	+	+	-	-	+	-	-	-	-
45	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	+	-	-	-	-	-	-	-	-
47	+	-	+	-	-	-	-	-	-

5 Anhang

5.3.2 Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC3,5K + A1α

5.3.2.1 Screening I, 1. Ausstrich

Klon	0,25 [mg/mL]	0,5 [mg/mL]	0,75 [mg/mL]	1 [mg/mL]	1,5 [mg/mL]	1,75 [mg/mL]	2 [mg/mL]	3 [mg/ml]	4 [mg/mL]
1	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
2	+	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
3	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	-
5	+	+	+	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-
6	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-
8	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	-	+/-	+/-	-
10	+	-	+	+	+/-	-	+	-	-
11	+	-	+	-	-	-	+/-	-	-
12	+	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-
13	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
14	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+/-	+	+	+	+/-	+	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-	-	+/-
18	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
19	+	-	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-
20	+	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-	-
21	+	+	+	+	+/-	-	+	-	-
22	+	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
23	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-

5 Anhang

5.3.2.2 Screening I, 2. Ausstrich

Klon	0,25 [mg/mL]	0,5 [mg/mL]	0,75 [mg/mL]	1 [mg/mL]	1,5 [mg/mL]	1,75 [mg/mL]	2 [mg/mL]	3 [mg/ml]	4 [mg/mL]
1	+	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-
2	+	+	+	+/-	+/-	-	+	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+/-
5	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-
6	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+
10	+	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
11	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-
13	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-
17	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-
19	+/-	+	+/-	+/-	+	-	-	-	-
20	+	+/-	+	-	-	-	+/-	-	-
21	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	+/-	-	-	+	-	-	-	-
23	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-

5 Anhang

5.3.2.3 Screening II, 1. Ausstrich

Klon	0,25 [mg/mL]	0,5 [mg/mL]	0,75 [mg/mL]	1 [mg/mL]	1,5 [mg/mL]	1,75 [mg/mL]	2 [mg/mL]	3 [mg/mL]	4 [mg/mL]
1	+	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
2	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-
3	+	-	+/-	-	+/-	-	-	-	+/-
4	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+	-
5	+	+	+	-	+	+/-	-	+/-	-
6	+/-	+/-	+	-	-	-	-	+/-	-
7	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	+	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
11	+	+/-	+	-	+/-	+/-	+/-	-	-
12	+	+	-	-	+/-	-	+/-	-	-
13	+	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-
14	+	-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	-	-	+	+	-	-
17	+	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
18	+	-	+/-	-	+/-	+	+/-	+/-	-
19	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
20	+	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-
21	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-
22	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
23	+	+/-	-	-	-	+/-	+/-	-	-

5 Anhang

5.3.2.4 Screening II, 2. Ausstrich

Klon	0,25 [mg/mL]	0,5 [mg/mL]	0,75 [mg/mL]	1 [mg/mL]	1,5 [mg/mL]	1,75 [mg/mL]	2 [mg/mL]	3 [mg/ml]	4 [mg/mL]
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+/-	+	-	+	-	-	-	-
3	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	-
5	+	+	+	-	+	+/-	-	-	-
6	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-
7	+/-	+--	-	-	-	-	-	-	-
8	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-	-	-
12	+	+	+	-	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+/-	-	-	-	+/-	-	-
17	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-
18	+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
19	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
20	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-
21	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-
22	+	+	-	-	-	-	-	-	-
23	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-

5 Anhang

5.3.3 Stamm *Pichia pastoris* GS115 + pPIC9K + A1aohneα

5.3.3.1 Screening I, 1. Ausstrich

Klon	0,25 [mg/mL]	0,5 [mg/mL]	0,75 [mg/mL]	1 [mg/mL]	1,5 [mg/ml]	1,75 [mg/mL]	2 [mg/mL]	3 [mg/mL]	4 [mg/ml]
1	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-	-	+/-
2	+	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-
3	+	+	+	+/-	+	-	+/-	+	+/-
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	-
8	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-	-	-
12	+	+/-	+	-	+/-	-	-	-	-
13	+	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
14	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	-
21	+	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-
22	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-
23	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
26	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-
27	+	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	-
28	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-
29	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	+	+	+	-	+/-	+/-	-	-	-
32	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-
33	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-
34	+	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-
35	+	+/-	+	-	-	-	+/-	-	-
36	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
37	+	+-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-
38	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
39	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
40	+	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-
41	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-
42	+	-	+/-	-	-	-	-	-	+/-
43	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-
44	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
45	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-

5 Anhang

46	+	+	-	-	-	+/-	-	-	-
47	+	+	+/-	+	+/-	+	-	-	-
48	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
49	+	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	-
50	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	+	-	+	-	+/-	-	-	-	-
52	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-

5.3.3.2 Screening I, 2. Ausstrich

Klon	0,25 [mg/mL]	0,5 [mg/mL]	0,75 [mg/mL]	1 [mg/mL]	1,5 [mg/ml]	1,75 [mg/mL]	2 [mg/mL]	3 [mg/mL]	4 [mg/ml]
1	+	+	+	-	+	+	+	-	+
2	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	-	-	+/-	-	-	-	-
8	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+/-	-	+	+/-	-	-	-
12	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-	-	-	-	-
15	-	+	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-	-	-	-
19	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-
23	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	+	+	-	-	-	-	-	-
26	+	+/-	+	-	-	-	-	-	-
27	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
29	+	-	+	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5 Anhang

31	+	+	+	-	+	+	-	+/-	-
32	+	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	+	-	-	-	-	-	-	-
34	+	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	+	+	-	-	-	-	-	-
36	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
37	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
38	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
39	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
40	+	+/-	+	-	-	-	-	-	-
41	+	+	+	-	-	-	-	-	-
42	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
43	+	+	+	-	-	-	-	-	-
44	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-
45	+	-	-	-	-	-	-	-	-
46	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
47	+	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-
48	+	-	-	-	-	-	-	-	-
49	+	+	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	+	-	+	-	-	-	-	-	-
52	+	+	+	+	-	+/-	-	-	-

5.3.3.3 Screening II, 1. Ausstrich

Klon	0,25 [mg/mL]	0,5 [mg/mL]	0,75 [mg/mL]	1 [mg/mL]	1,5 [mg/ml]	1,75 [mg/mL]	2 [mg/mL]	3 [mg/mL]	4 [mg/ml]
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+/-	+	-	+/-	+	+	-	+/-
3	+	+/-	+	-	+/-	+	-	-	-
4	+	+/-	+	-	+	+/-	-	-	-
5	+	+/-	+	-	+/-	-	+/-	-	-
6	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-
8	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-
9	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-	-
11	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	-	-
12	+	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	-
13	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-	+/-
14	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-	-	+/-
15	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	+/-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-
18	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	-	-	+/-	-	-	-	+/-
20	+	+	+/-	+	+	-	-	-	+/-

5 Anhang

21	+	+	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+/--
22	+	+	+/-	+/-	+	+	-	-	+/--
23	+	+	+	+/-	+	+/--	+/-	+/-	+/--
24	+/-	+	-	+/-	-	+/--	-	-	+/--
25	+	+	+/-	--	-	+/-	-	-	+/--
26	+	+	+	-	+/-	-	-	+	+/--
27	+	+	+	-	+/-	-	-	-	+/--
28	+	+	+/-	-	-	+	-	-	+/--
29	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-
30	+	-	-	-	-	-	-	-	+/--
31	+	+	+	-	+/-	-	-	-	+/--
32	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-	-	+/--
33	+	+	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+/-
34	+	+	+/-	-	-	+	-	-	+/--
35	+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	+/--
36	+	-	+/-	+/-	+/--	+/-	-	-	+/--
37	+	+	+/-	+	-	+/-	+/-	-	+/--
38	+	+	+/-	-	+/--	-	-	-	+/--
39	+	+	+/-	+	+/	+/-	+/-	-	+/--
40	+	+	+/-	-	+/-	+	+	-	+/--
41	+	+	+	+	+/--	+/-	+/-	+/-	-
42	+	+	+	-	-	-	-	-	-
43	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/--	+/--	-	-
44	+	-	+/-	+	-	+/--	+/--	-	+/-
45	+	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+
46	+	+/-	+/-	+/-	+/--	-	-	-	-
47	+	+/-	+	+	-	-	+/-	-	+/--
48	+	+/-	+/-	+/--	-	+/--	-	-	+/--
49	+	+	+	+	+/--	+7--	-	-	-
50	+	-	-	-	-	-	-	-	-
51	+	+	+/-	-	+/-	+	+	+	+
52	nicht ausgestr.	nicht ausgestr.	+	+/--	-	+/-	+/-	-	-

5 Anhang

5.3.3.4 Screening II, 2. Ausstrich

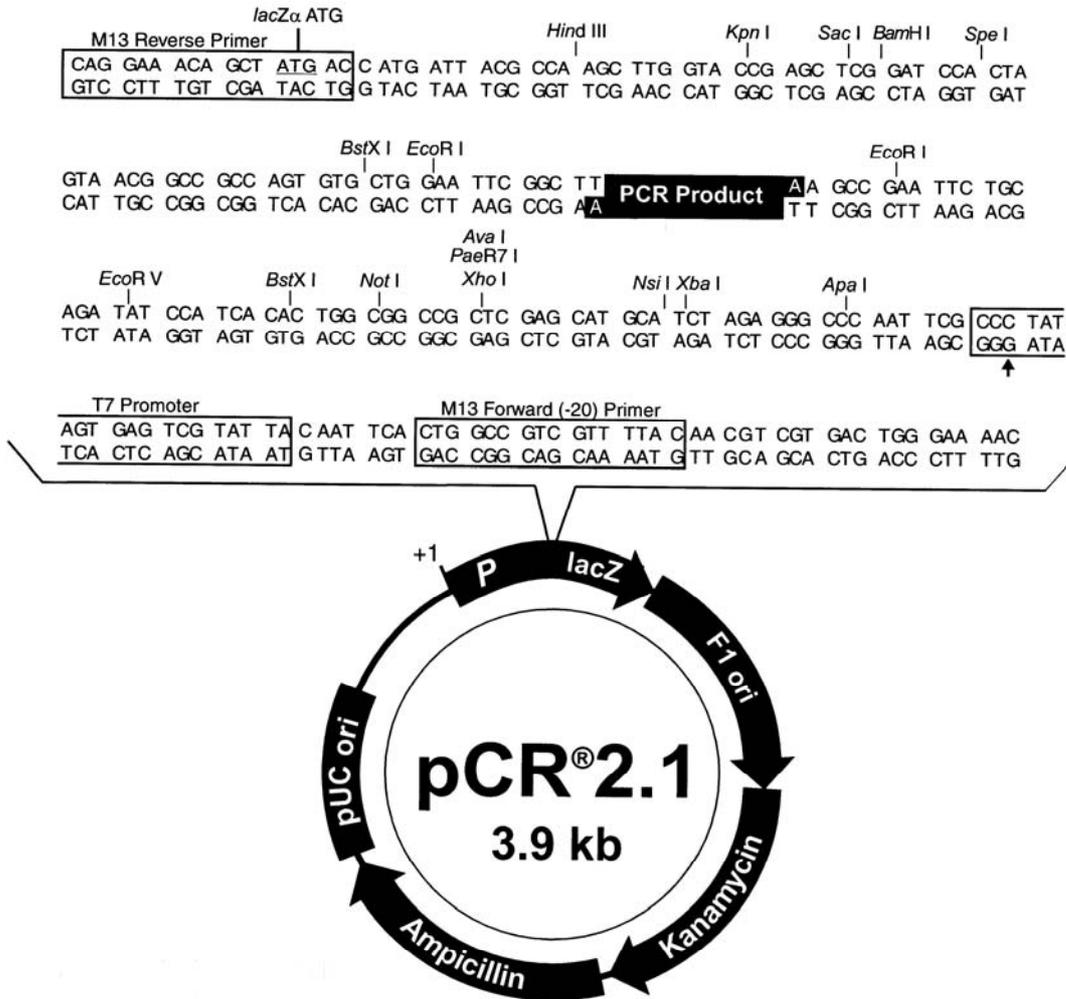
Klon	0,25 [mg/mL]	0,5 [mg/mL]	0,75 [mg/mL]	1 [mg/mL]	1,5 [mg/ml]	1,75 [mg/mL]	2 [mg/mL]	3 [mg/mL]	4 [mg/ml]
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+/-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-
8	+	-	-	+	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
12	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
13	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
14	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
18	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+	-	-	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-	-	-	-
23	+	+	-	-	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	+/-	+	-	-	-	-	-	-
27	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
29	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	+	+	+	-	+/-	-	-	-	-
32	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
34	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
35	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
36	+	-	-	-	-	-	-	-	-
37	+	-	-	-	-	-	-	-	-
38	+	-	-	-	-	-	-	-	-
39	+	-	-	-	-	-	-	-	-
40	+	-	-	-	-	-	-	-	-
41	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
42	+	-	-	-	-	-	-	-	-
43	+	+	-	-	-	-	-	-	-
44	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-
45	+	-	-	-	-	-	-	-	-

5 Anhang

46	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
47	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-
48	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
49	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	+	+	+	-	-	-	-	-	-
52	nicht aus- gestrichen	nicht aus- gestrichen	+	-	-	-	-	-	-

5.4 Vektorkarten

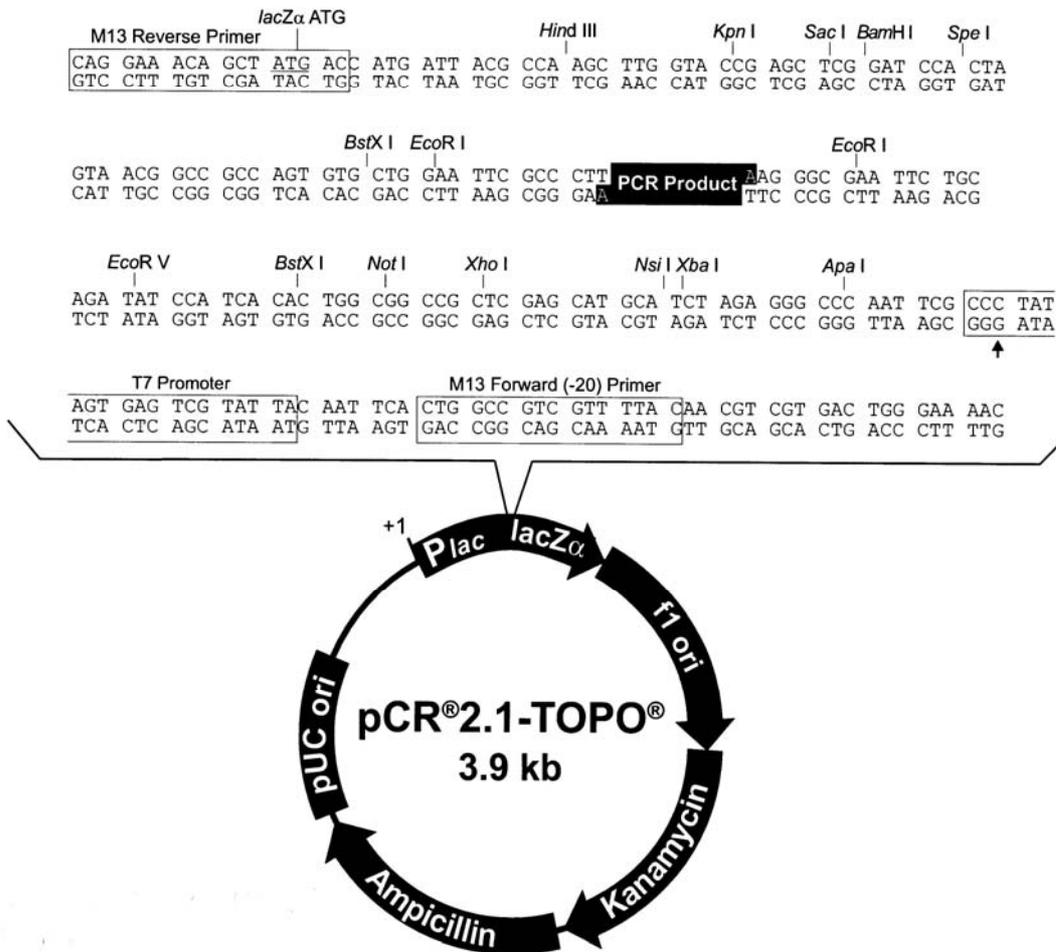
5.4.1 pCR[®]2.1 (Version V), Vektorkarte (Invitrogen, Instruction Manual, modifiziert)



pCR[®]2.1 (Version V): 3929 Nukleotide

LacZα Gen: Nukleotid 1-545
M13-Rückwärts-Primer-Bindungsstelle: Nukleotid 205-221
T7-Promotor: Nukleotid 362-381
M13 (-20) Vorwärts-Bindungsstelle: Nukleotid 389-404
f1 Origin: Nukleotid 546-983
Kanamycin-Resistenzgen ORF: Nukleotid 1317-2111
Ampicillin-Resistenzgen ORF: Nukleotid 2129-2989
pUC Origin: 3134-3807

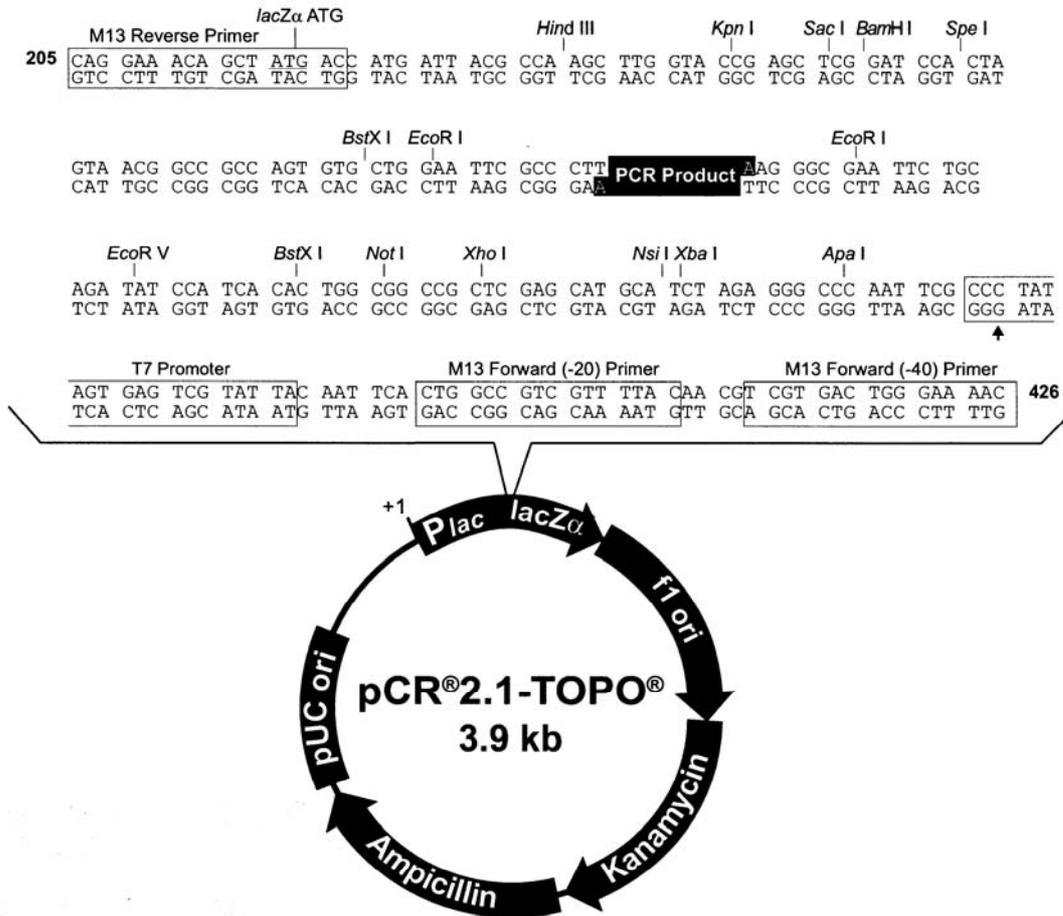
5.4.2 pCR[®]2.1-TOPO, Version R, Vektorkarte (Invitrogen, Instruction Manual, modifiziert)



pCR[®]2.1-TOPO, Version R: 3931 Nukleotide

- LacZ α Gen: Nukleotid 1-547
- M13-Rückwärts-Primer-Bindungsstelle: Nukleotid 205-221
- Multiple Cloning Site: Nukleotid 234-357
- T7-Promotor/Primer-Bindungsstelle: Nukleotid 364-383
- M13 Vorwärts(-20) -Bindungsstelle: Nukleotid 391-406
- f1 Origin: Nukleotid 548-985
- Kanamycin-Resistenzgen ORF: Nukleotid 1319-2113
- Ampicillin-Resistenzgen ORF: Nukleotid 2131-2991
- pUC Origin: 3136-3809

5.4.3 pCR[®]2.1-TOPO, Version M, Vektorkarte (Invitrogen, Instruction Manual, modifiziert)

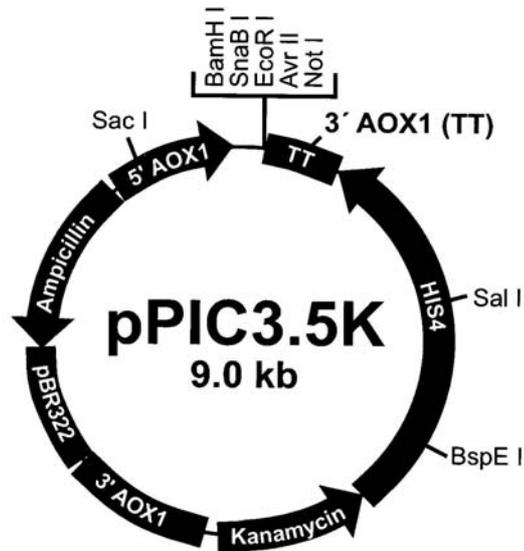


pCR[®]2.1-TOPO, Version M: 3908 Nukleotide

- LacZ α Gen: Nukleotid 1-571
- M13-Rückwärts-Primer-Bindungsstelle: Nukleotid 205-221
- Multiple Cloning Site: Nukleotid 234-357
- T7-Promotor/Primer-Bindungsstelle: Nukleotid 364-383
- M13 Vorwärts(-20) -Bindungsstelle: Nukleotid 389-404
- M13 Vorwärts(-40)-Bindungsstelle: Nukleotid 411-426
- f1 Origin: Nukleotid 548-962
- Kanamycin-Resistenzgen ORF: Nukleotid 1296-2090
- Ampicillin-Resistenzgen ORF: Nukleotid 2108-2968
- pUC Origin: 3113-3786

5.4.4 pPIC3,5K, Vektorkarte (a) und Multiple Cloning Site (b) (Invitrogen, Instruction Manual, modifiziert)

a)



pPIC3,5K: 9004 Nukleotide

- 5'-AOX1-Promotor-Fragment: Nukleotid 1-937
- 5'-AOX1-Primer-Bindungsstelle: Nukleotid 855-875
- Multiple Cloning Site: Nukleotid 938-968
- 3'-AOX1-Primer-Bindungsstelle: Nukleotid 1055-1075
- 3'-AOX1 Transkriptionstermination (TT): Nukleotid 981-1314
- HIS4 ORF: Nukleotid 4242-1708
- Kanamycin-Resistenzgen: Nukleotid 5471-4656
- 3'-AOX1-Fragment: Nukleotid 5850-6607
- pBR322 Origin: Nukleotid 7689-7016
- Ampicillin-Resistenzgen: 8694-7834

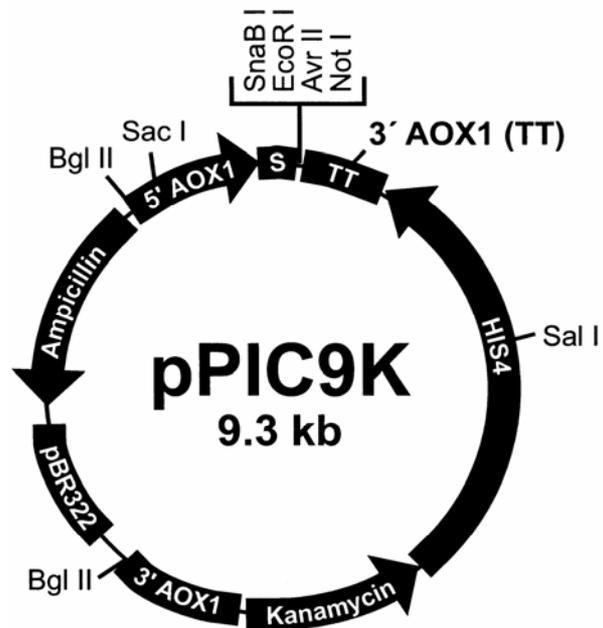
b)

```

      AOX1 mRNA 5' end (824)
      ↓
822 TTATCATCAT TATTAGCTTA CTTTCATAAT TGCGACTGGT TCCAATTGAC
      ───────────┬────────── 5' AOX1 Primer Site (855-875)
872 AAGCTTTTGA TTTTAACGAC TTTTAACGAC AACTTGAGAA GATCAAAAAA
      ───────────┬──────────
      BamHI  SnaBI  EcoRI  AvrII  NotI
892 CAACTAATTA TTCGAAGGAT CCTACGTAGA ATTCCCTAGG GCGGCCGCGA
      ───────────┬──────────
897 ATTAATTCGC CTTAGACATG ACTGTTCTC AGTTCAAGTT GGGCACTTAC
      ───────────┬──────────
      ───────────┬────────── 3' AOX1 Primer Site (1055-1075)
1022 GAGAAGACCG GTCTTGCTAG ATTCTAATCA AGAGGATGTC AGAATGCCAT
      ───────────┬──────────
1072 TTGCCTGAGA GATGCAGGCT TCATTTTTGA TACTTTTTTA TTTGTAACCT
      ───────────┬──────────
      AOX1 mRNA 3' end (1146)
      ↓
1122 ATATAGTATA GGATTTTTTT TGTCATTTTG TTTCTTC
    
```

5.4.5 pPIC9K, Vektorkarte (a) und Multiple Cloning Site (b) (Invitrogen, Instruction Manual, modifiziert)

a)



pPIC9K: 9276 Nukleotide

- 5'-AOX1-Promotor-Fragment: Nukleotid 1-948
- 5'-AOX1-Primer-Bindungsstelle: Nukleotid 855-875
- α -Faktor-Sekretionssignal: Nukleotid 949-1218
- α -Faktor-Primer-Bindungsstelle: 1152-1172
- Multiple Cloning Site: Nukleotid 1216-1241
- 3'-AOX1-Primer-Bindungsstelle: Nukleotid 1327-1347
- 3'-AOX1 Transkriptionstermination (TT): Nukleotid 1253-1586
- HIS4 ORF: Nukleotid 4514-1980
- Kanamycin-Resistenzgen: Nukleotid 5743-4928
- 3'-AOX1-Fragment: Nukleotid 6122-6879
- pBR322 Origin: Nukleotid 7961-7288
- Ampicillin-Resistenzgen: 8966-8106

5 Anhang

b)

```

      AOX1 mRNA 5'end (824)                                5' AOX1 primer site (855-875)
82  TTATCATCAT TATTAGCTTA CTTTCATAAT TGCGACTGGT TCCAATTGAC
87  AAGCTTTTGA TTTTAACGAC TTTTAACGAC AACTTGAGAA GATCAAAAAA
      Start (949)      α-Factor Signal Sequence
92  CAACTAATTA TTCGAAGGAT CCAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT
      Met Arg Phe Pro Ser Ile

96  TTT ACT GCA GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT
      Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala

100 CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG
      Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro

105 GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
      Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

109 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG
      Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly
      α-Factor primer site (1152-1172)
113 TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA
      Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys
      Kex2 signal cleavage                               Sna BI
117 GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT TAC
      Glu Glu Gly Val Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Tyr
      Eco RI      Apr II      Not I      Ste13 signal cleavage
121 GTA GAA TTC CCT AGG GCG GCC GCG AAT TAA TTCGCCTTAG
      Val Glu Phe Pro Arg Ala Ala Ala Asn ***

125 ACATGACTGT TCCTCAGTTC AAGTTGGGCA CTTACGAGAA GACCGGTCTT
      3' AOX 1 primer site (1327-1347)
130 GCTAGATTCT AATCAAGAGG ATGTCAGAAT GCCATTTGCC TGAGAGATGC
135 AGGCTTCATT TTTGATACTT TTTTATTTGT AACCTATATA GTATAGGATT
      ↓ AOX1 mRNA 3' end (1418)
140 TTTTTTGTCA
  
```

6 Literatur

Armstrong, G. A.: Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale, *Annual Reviews Microbiologie*, 51, 629-659 (1997)

Aziz, S., Wu, Z., Robinson, D. S.: Potato lipoxygenase catalysed co-oxidation of β -carotene, *Food Chemistry*, 64, 227-230 (1999)

Baldwin, E. A., Scott, J. W., Shewmaker, C. K., Schuch, W.: Flavor Trivia and Tomato Aroma: Biochemistry and Possible Mechanisms for control of Important Aroma Components, *Hortscience*, Vol. 35 (6), 1012-1022 (2000)

Bartley, G.E., Scolnik, P.A.: cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 25718-25721 (1993)

Ben Aziz, A., Grossman, S., Ascarelli, I., Budowski, P.: Carotene-bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method, *Phytochemistry* 10:1445-1445 (1971)

Bertini, I., Sigel, A., Sigel, H.: Handbook on Metalloproteins, Marcel Dekker Inc., New York (2001)

Blodig, W., Doyle, W. A., Smith, A. T., Winterhalter, K., Choinowski, T. H., Piontek, K.: Autocatalytic formation of hydroxy group at C β of Trp 171 in lignin Peroxidase, *Biochemistry*, 37, 8832-8838 (1998)

Blum, H., Beier, H., Gross, H. J.: Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 8, 93-99 (1988)

Borchers, S.: Das Exoproteom von *Pleurotus sapidus* und *Marasmius scorodonius*, Diplomarbeit, Universität Hannover (2004)

Bosser, A., Papporey, E., Belin, J.-M.: A Simple Way of (\pm)-Dihydroactinidiolide from β -Ionone Related to the Enzymic Co-oxidation of β -Carotene in Aqueous Solution, *Biotechnology Progress*, 11, 689-692, (1995)

Bosshard, H. R., Banziger, J., Hasler, T., Poulos, T. L.: The cytochrome c peroxidase peroxidase peroxidase-cytochrome c electron transfer complex. The role of histidine residues, *Journal of Biological Chemistry*, 259, 5683-5690 (1984)

Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J., Camara, B.: Oxidative Remodeling of Chromoplast Carotenoids: Identification of the Carotenoid dioxygenase CsCCD and

CsZCD Genes Involved in Crocus Secondary Metabolite Biogenesis, *The Plant Cell*, Vol. 15, 47-62 (2003)

Bricout, J., Viani, R., Müggler-Chevan, R., Marion, J. P., Raymond, D., Egli, R. H.: Sur la composition de l'arome de the noir II, *Helv. Chim Acta*, 50, 1517-1522 (1967)

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H.: Carotenoids, Volume 1A: Isolation and Analysis, Birkhäuser Verlag, Berlin, (1995)

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H.: Carotenoids, Volume 3: Biosynthesis and Metabolism, Birkhäuser Verlag, Berlin, (1998)

Burbidge A., Grieve T. M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D. R., Taylor, I. B.: Characterisation of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with the maize VP14, *Plant Journal*, 17, 427-431 (1999)

Burton, G. W.: Antioxidant action of carotenoids, Symposium: Biological actions of carotenoids, 109-111 (1989)

Buttery, R. G., Seifert, R. M., Guadagni, D. G., Ling, L. C.: Characterisation of additional volatile components of tomato, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 19, 524-529 (1971)

Camarero, S., Ruiz-Duenas, F. J., Sarkar, S., Martinez, M. J., Martinez, T.: The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases, *FEMS Microbiology Letters*, 191, 37-43 (2000)

Cao, Y., Guo, X.-L., Zhang, Q., Cao, Y.-X., Zhang, H.: Isolation and characterization of carotenoid cleavage dioxygenase gene in halophyte *Suaeda salsa*, *Plant Growth Regulation*, 46, 61-67 (2005)

Chernys, J. T., Zeevaart, J. A. D.: Characterization of the 9-Cis-Epoxy-carotenoid Dioxygenase Gene Family and the Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis in Avocado, *Plant Physiology*, Vol. 124, 434-353 (2000)

Choinowski, T. H., Blodig, W., Winterhalter, K., Piontek, K.: The crystal structure of lignin peroxidase at 1,7 Å resolution reveals a hydroxyl group on the C_β of tryptophan 171: a novel radical site formed during redox cycle, *Journal of Molecular Biology*, 286, 809-827 (1999)

Clare, J. J., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Sreekrishna, K., Romanos, M. A.: High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene, *Bio/Technology*, 9 (5), 455-460 (1991)

Conesa, A., van den Hondel, C. A. M. J. J., Punt, P. J.: Studies on the Production of Fungal Peroxidases in *Aspergillus niger*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 7, 3016-3023 (2000)

Conesa, A., Punt, P. J., van den Hondel, C. A. M. J. J.: Fungal peroxidase: molecular aspects and applications, *Journal of Biotechnology*, 93, 143-158 (2002)

Cooper, T.G.: *Biochemische Arbeitsmethoden*, Walter de Gruyter, Berlin (1981)

Christensen, T., Woeldike, H., Boel, E., Mortensen, S. B., Hjortshoej, K., Thim, L., Hansen, M. T.: High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*, *Bio/Technology*, Vol. 6, 1419-1422 (1988)

Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W. S., Buckholz, R. G., Madden, K. R., Kellaris, P. A., Davies, G. R., Smiley, B. L., Cruze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G., Thill, G. P.: High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Bio/Technology* 5, 479-485 (1987)

Demole, E., Engisst, P., Säuberli, U., Stoll, M., sz. Kovatz, E.: Structure et synthese de la damascenone (trimethyl-2,6,6-trans-crotonyl-cyclohexadiene-1,3) constituant odorant de l'essence de Rose Bulgare, *Helvetica Chimica Acta*, 53, 541-543 (1970)

Devery, J., Milborrow, B. V.: Beta-carotene-15,15'-dioxygenase (EC 1.13.11.21) isolation reaction mechanism and an improved assay procedure, *British Journal of Nutrition*, 72 (3), 397-414 (1994)

Diekmann, H., Metz, H.: *Grundlagen und Praxis der Biotechnologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1991)

Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W.: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Research* 16: 6127-6245, (1988)

During, A., Nagao, A., Hoshino, C., Terao, J.: Assay of β -Carotene-15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase high pressure liquid chromatography, *Analytical Biochemistry*, 241, 199-205 (1996)

- Duszka, C., Grolier, P., Azim, E. M., Alexandre-Gouabau, M. C., Borel, P., Azias-Braesco V.:** Rat intestinal β -carotene-dioxygenase activity is located primarily in the cytosol of mature jejunal enterocytes, *Journal of Nutrition*, 126, 2550-2556 (1996)
- English, A. M., Tsaprailis, G.:** Catalytic structure-function relationships in heme peroxidase, *Advances in Inorganic Chemistry*, 43, 79-125 (1995)
- Enzell, C.:** Biodegradation of carotenoids - an important route to aroma compounds, *Pure und Applied Chemistry*, Vol. 57, No. 5, 693-700 (1985)
- Feron, G., Bonnarme, P., Durand, A.:** Prospects for the microbial production of food flavors, *Trends Food Science Technology*, 7, 285-293 (1996)
- Fidge, N. H., Smith, F. R., Goodman, D. S.:** Vitamin A and carotenoids, *Biochemistry Journal*, 114, 689-694 (1969)
- Gachhui, R., Presta, A., Bently, D. F., Abu-Soud, H. M., McArthur, R., Brudvig, G., Ghosh, D. K., Stuehr, D. J.:** Characterization of the Reductase Domain of Rat Neuronal Nitric Oxide Synthase Generated in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271, No. 34, 20594-20602 (1996)
- Goodman, D. S., Blomstand, R., Werner, B., Huang, H. S., Shiratori, T.:** The Intestinal Absorption and Metabolism of Vitamin A and β -Carotene in Man, *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 45, No. 10, 1615-1623 (1966a)
- Goodman, D. S., Huang H. S., Shiratori, T.:** Mechanism of the biosynthesis of vitamin A from β -carotene, *Journal of Biological Chemistry*, 241, 1929-1932 (1966b)
- Goodman, D. S., Huang H. S., Kanai, M., Shiratori, T.:** The enzymatic conversion of all-trans β -Carotene into retinal, *Journal of Biological Chemistry*, 242, 3543-3554 (1967)
- Gu, L., Lajoie, C., Kelly, C.:** Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* Manganese Peroxidase Gene in the Yeast *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Prog.*, 19, 1403-1409 (2003)
- Haas, L. W., Bohn, R. M.:** U.S. patent 1957-333-1957-337 (1934)
- Higgins, D. R., Cregg, J. M.:** *Pichia* Protocols: Methods in Molecular Biology, Vol. 103, Humana Press, Totowa, New Jersey (1998)
- Hoffman, W.:** Ionone und Damascone, Seifen, Öle, Fette, Wachse 104, 5, 127-131 (1978)

Hülsdau, B.: Dissertation, Universität Hannover, in Vorbereitung (2006)

Invitrogen: life technologies: Instruction Manual: Multi-copy *Pichia* Expression Kit, Version F 010302, 25-0170

Isoe, S., Heyeon, S. B., Ichikawa, H., Katsumura, S., Sakan, T.: The synthesis of actinidiolide, dihydroactinidiolide and actinidiol, *Tetrahedron Letters*, 53, 5561-5564 (1968)

Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.: A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea, *Plant Physiology*, Vol. 123, 553-562 (2000)

Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.: Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*, *The Plant Journal*, 27 (4), 325-333 (2001)

Johansson, T., Nyman, P. O.: A Cluster of genes encoding major isoenzymes of Lignin peroxidase and manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*, *Gene*, 170 (1), 31-38 (1996)

Johjima, T., Ohkuma, M., Kudo, T.: Isolation and cDNA cloning of novel hydrogen peroxidase-dependent phenol oxidase from the basidiomycete *Termitomyces albuminosus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 220-225 (2003)

Jonsson, L. J., Saloheimo, M., Penttila, M.: Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*, *Current Genetics*, 32 (6), 425-430 (1997)

Jüttner, F., Höflacher, B.: Evidence of β -carotene 7,8 (7',8') oxygenase (β -cyclocitral, crocetin diol generating) in *Microcystis*, *Archives of Microbiology*, 141, 337-343 (1985)

Jung, Y-S., Gao-Sheridan, H. S., Chrstiansen, J., Dean, D. R., Burges, B. K.: Purification and Biophysical Characterization of a New [2Fe-2S] Ferredoxin from *Azotobacter vinelandii*, a Putative [Fe-S] Cluster Assembly/Repair Protein, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, No. 45, 32402-32410 (1999)

Kang, S.-O., Shin, K.-S., Han, Y.-H., Youn, H.-D., Hah, Y. C.: Purification and characterisation of an extracellular peroxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1163, 158-164 (1993)

Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J. M., Vogt, K., Lederer, M. O., Breithaupt, D. E., von Lintig, J.: Identification and Characterization of a Mammalian Enzyme Catalyzing the Asymmetric Oxidative Cleavage of Provitamin A, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 17, 14110-14116 (2001)

Kim, S. J., Shoda, M.: Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 3: 1029-1035 (1999)

Kishi, K., Kusters-van Someren, Mayfield, M. B., Sun, J., Loehr, T. M, Gold, M H.: Characterization of manganese(II) binding site mutants of manganese peroxidase, *Biochemistry*, 35, 8986-8994 (1996)

Kowit, J., D., Maloney, J.: Protein cleavage by boiling in sodium dodecyl sulphate prior to electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, vol. 123 (1), 86-93 (1982)

Kreil, G.: Transfer of proteins across membranes, *Annual Reviews of Biochemistry* 50, 317-348 (1981)

LAB TOOLS, Tabellen für das Labor, Merck, W.280011/1200

Lakshmanan, M. R., Chansang, H., Olson, J. A.: Purification and properties of carotene 15,15'-dioxygenase of rabbit intestine, *Journal of Lipid Research*, Vol. 13, 477-482 (1972)

Langhoff, S.: Carotinoid abbauende Enzymaktivitäten aus Mikroorganismen, Dissertation, Universität Hannover (2002)

Larrondo, L. F., Lobos, S., Stewart, P., Cullen, D., Vicuna, R.: Isoenzyme Multiplicity and Characterization of Recombinant Manganese Peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 5, 2070-2075 (2001)

Larsen, M., Poll, L.: Odor threshold of some important aroma compounds in raspberries, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 191: 129-131 (1990)

Linke, D., Zorn, H., Gerken, B., Parlar, H., Berger, R. G.: Foam Fractionation of Exo-lipases from Growing *Pleurotus sapidus*, *Lipids*, Vol. 40, No. 3, 1-5 (2005)

Von Lintig, J., Volgt, K.: Filling the Gap in Vitamin A Research, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 16, 11915-11920 (2000)

Von Lintig, J., Wyss, A.: Minireview: Molecular Analysis of Vitamin A Formation: Cloning and Characterization of β -Carotene 15,15'-Dioxygenases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 385, No. 1, 47-52 (2001)

Lis, H., Sharon, N.: Protein glycosylation. Structural and functional aspects, *European Journal of Biochemistry*, 218 (1), 1-27 (1993)

Liu, W., Chao, Y., Liu, S., Bao, H., Qian, S.: Molecular cloning and characterization of the laccase gene from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia pastoris*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63 (2), 174-181 (2003)

Lottspeich, F., Zorbas, H.: Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin (1998)

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275 (1951)

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J.: Brock Mikrobiologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin (2001)

Martinez, A. T. : Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases, *Enzyme and Microbial Technology* 30, 425-444 (2002)

Martinez, M. J., Ruiz-Duenas, F. J., Guillen, F., Martinez, A. T. : Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*, *European Journal of Biochemistry*, 237, 424-432 (1996)

Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., Gunata, Z.: A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation, *Journal of Experimental Botany*, 56, 2721-2731 (2005)

Mayfield, M. R., Kishi, K., Alic, M., Gold, M. H.: Homologous Expression of Recombinant Manganese Peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, No.12, 4303-4309 (1994)

Mertens, J. A., Shiraishi, N., Campbell, W. H.: Recombinant Expression of Molybdenum Redutase Fragments of Plant Nitrate Reductase at High Levels in *Pichia pastoris*, *Plant Physiology*, Vol. 123, 743-756 (2000)

Mester, T., Field, J. A.: Characterization of a Novel Manganese Peroxidase-Lignin Peroxidase Hybrid Isozyme Produced by *Bjerkandera* Species Strain BOS55 in the Absence of Manganese, *The Journal of Biological Chemistry*, 15412-15417 (1998)

- Mikhlin, E. D., Radina, V. P., Dmitrovskii, A. A., Blinkova, L. P., Butova, L. G.:** Antifungal and antimicrobial activity of β -ionone and vitamin A derivatives, Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 19, 155-173 (1983)
- Müggler-Chevan, R., Viani, R., Bricout, J., Marion, J. P., Mechtler, H., Raymond, D., Egli, R. H.:** Sur la composition de l'arome de the noir III, Helvetica Chimica Acta, 52, 549 (1969)
- Neill, S. J., Burnett, E. C., Desikan, R., Hancock, J. T.:** Cloning of a wilt-responsive cDNA from *Arabidopsis thaliana* suspension culture cDNA library that encodes a putative 9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase, Journal of Experimental Botany, 49, 1893-1894 (1998)
- Nelson, D. L., Cox, M. M.:** Lehninger Principles of Biochemistry, Worth Publishers, New York, 2002, 3. Auflage
- Nie, G., Reading, N. S., Aust, S. D.:** Relative stability of recombinant versus native peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 365 (2), 328-334 (1999)
- Ohloff, G.:** Importance of minor compounds in flavors and fragrances, Perfumer and Flavorist, 3, 11-15 (1978)
- Ohloff, G.:** Scent and fragrances, Springer Verlag, Berlin (1994)
- Paik, J., During, A., Harrison, E. H., Mendelsohn, C. L., Lai, K., Blaner, W. S.:** Expression and Characterization of a Murine Enzyme Able to Cleave β -Carotene, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 34, 32160-32168 (2001)
- Pease, E. A., Aust, S. D., Tien, M.:** Heterologous expression of active manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* using the baculovirus expression system, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 179, No. 2, 897-903 (1991)
- Penzlin, H.:** Lehrbuch der Tierphysiologie, 6. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena/ Stuttgart (1996)
- Peterson, Gary, L.:** Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall, Analytical Biochemistry, 100, 201-220 (1979)
- Poulos, T. L., Kraut, J.:** The stereochemistry of peroxidase catalysis, Journal of Biological Chemistry, 255, 8199-8205 (1980)

Poulos, T. L., Edwards, S. L., Wariishi, H., Gold, M. H.: Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 4429-4440 (1993)

Redmond, T. M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Gantt, E., Cunningham, Jr., F. X.: Identification, Expression, and Substrate Specificity of a Mammalian β -Carotene 15,15'-Dioxygenase, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 9, 6560-6565 (2001)

Regelsberger, G., Laaha, U., Dietmann, D., Rüker, F., Canini, A., Grilli-Caiola, M., Furtmüller, P. G., Jakopitsch, C., Peschek, G. A., Obinger, C.: The Iron Superoxide Dismutase from the Filamentous Cyanobacterium *Nostoc* PCC 4120, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 43, 44384-44393 (2004)

Rehm, H.: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin (2002)

Richter, G.: *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*, 6. Auflage, Thieme, Stuttgart (1997)

Rodriguez-Bustamante, E., Maldonado-Robledo, G., Ortiz, M. A., Diaz-Avalos, C., Sanchez, S.: Bioconversion of Lutein using microbial mixture-maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 174-182 (2005)

Romanos, M. A., Clare, J. J., Bessly, K. M., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Makoff, A. J., Dougan, G., Fairweather, N. F., Charles, I. G.: Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties, *Vaccine*, 9 (12), 901-906 (1991)

Ruiz-Duenas, F. J., Martinez, M. J., Martinez, A. T.: Heterologous Expression of *Pleurotus eryngii* Peroxidase confirms Its Ability to Oxidize Mn^{2+} and Different Aromatic Substrates, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 10, 4705-4707 (1999b)

Ruiz-Duenas, F. J., Martinez, M. J., Martinez, A. T.: Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*, *Molecular Microbiology*, 31 (1), 223-235 (1999c)

Qin, X., Zeevart, J. A. D.: The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is a key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean, *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 96, 15354-15361 (1999)

- Sambrook, J., Russell, D. W.:** Molecular cloning, A Laboratory Manual, 3 Vol., Cold Spring Harbour Laboratory Press (2001)
- Sanchez-Contreras, A., Jimenez, M., Sanchez, S.:** Bioconversion of lutein to products with aroma, Applied of Microbiology and Biotechnology, 54, 528-534 (2000)
- Sakan, T., Isoe, S., Hyeon, S. B.:** The structure of actinidiolide, dihydro-actinidiolide and actinidiol, Tetrahedron Letters, 1623 (1967)
- Sato, T., Hara, S., Matsui, T., Sasaki, G., Saijo, S., Ganbe, T., Tanaka, N., Sugano, Y., Shoda, M.:** A unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, from *Thanatephorus cucumeris* Dec1: heterologous expression, crystallization and preliminary X-ray analysis, Acta Crystallography, D60, 149-152 (2004)
- Sawai-Hatanaka, H. T., Ashikari, T., Tanaka, Y., Asada, Y., Nakayama, T., Minakata, H., Kunishima, N., Yamada, H., Shibano, Y., Amachi, T.:** Cloning, sequencing, and heterologous expression of a gene coding for *Athromyces ramosus* peroxidase, Applied and Environmental Microbiology, 65, 1221-1228 (1995)
- Schiltz, P.:** Acton inhibitrice de la β -ionone au cours du développement de *Peronospora tabacina*, Ann. Tabac., 11, 207-216 (1974)
- Schrimpf, G.:** Gentechnische Methoden, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin (2002)
- Schwartz, S. H., Qin, X., Zeevart, J. A. D.:** Characterization of a Novel Carotenoid Cleavage Dioxygenase from Plants, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 27, 25208-25211, (2001)
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A. D., McCarty, D. R.:** Specific Oxidative cleavage of Carotenoids by VP14 of Maize, Science, Vol. 276, 1872-1874 (1997)
- Scorer, C. A., Buckholz, R. G., Clare, J. J., Romanos, M. A.:** The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the Methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, Gene 136, 111-119 (1993)
- Scorer, C. A., Clare, J. J., McCombie, W. R., Romanos, M. A., Sreekrishna, K.:** Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression, Bio/Technology, 12, 181-184 (1994)
- Simkin, A. J., Schwartz, S. H., Auldrige, M., Taylor, M. G., Klee, H. J.:** The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the

flavor volatiles β -ionone pseudoionone, and geranylacetone, *The Plant Journal*, 40, 882-892 (2004a)

Simkin, A. J., Underwood, B. A., Auldridge, M., Loucas, H. M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D. G., Klee, H. J.: Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers, *Plant Physiology*, 136, 3504-3514 (2004b)

Sollewijn Gelpke, M., D., Mayfield-Gambill, M., Lin Cereghino, G. L., Gold, M. H.: Homologous Expression of Recombinant Lignin Peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 4, 1670-1674 (1999)

Spadaro, J. T., Gold, M. H., Renganathan, V.: Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2397-2401 (1992)

Steglich, W., Fugmann, B., Lang-Fugmann, S.: Römpp Lexikon, Naturstoffchemie, Thieme Verlag, Stuttgart (1997)

Stewart, P., Whitwam, R. E. Kersten, P. J., Cullen, D., Tien, M.: Efficient Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* Manganese Peroxidase Gene in *Aspergillus oryzae*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 3, 860-864 (1996)

Su, C., Sahlin, M., Oliw, E. H.: A Protein Radical and Ferryl Intermediates Are Generated by Linoleate Diol Synthase, a Ferric Hemeprotein with Dioxygenase and Hydroperoxide Isomerase Activities, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, No. 33, 20744-20751 (1998)

Sugano, Y., Ishii, Y., Shoda, M.: Role of H164 in a unique dye-decolorizing heme peroxidase DyP, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322 (1), 126-132 (2004)

Sugano, Y., Nakano, R., Sasaki, K., Shoda, M.: Efficient Heterologous Expression in *Aspergillus oryzae* of a Unique Dye-Decolorizing Peroxidase, Dyp, of *Geotrichum candidum* Dec1, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 4, 1754-1758 (2000)

Sugano, Y., Sasaki, K., Shoda, M.: cDNA Cloning and Genetic Analysis of a Novel Decolorizing Enzyme, Peroxidase Gene *dyp* from *Geotrichum candidum* Dec 1, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 87, No. 4, 411-417 (1999)

- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M. H., Poulos, T. L.:** Crystal structures of substrate binding site mutants of manganese peroxidase, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 17574-7580 (1997)
- Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W., Grinna, L.:** High-Level Secretion of Glycolysated Invertase in the Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*, *Bio/Technology*, 5, 1305-1308 (1997)
- Utama, I. M. S., Wills, R. B. H., Ben-Yehoshua, S., Kuek, C.:** In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganism, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 6371-6377 (2002)
- Veddeler, B.:** Biotransformation terpenoider Substrate mit Mikroorganismen, Dissertation, Universität Hannover (2004)
- Verdoes, J.C., Misawa, N., van Ooyen, A. J. J.:** Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Biotechnologie and Bioengineering*, Vol. 63, 750-755 (1999)
- Wang, X. D., Tang, G. W., Fox, J. G., Krinsky, N. I., Russel, R. M.:** Enzymatic Conversion of β -Carotene into β -Apo-carotenals and Retinoids by Human, Monkey, Ferret, and Rat Tissues, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 285, No. 1, 8-16 (1991)
- Welinder, K.:** Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases, *Current Opinion in Structural Biology*, 2, 388-393 (1992)
- Whitwam, R. E., Brown, K. R., Musick, M., Natan, M. J., Tien, M.:** Mutagenesis of Mn^{2+} -binding site of manganese peroxidase affects oxidation of Mn^{2+} by both compound I and compound II, *Biochemistry*, 36, 9766-9773 (1997)
- Winterhalter, P.:** Carotenoid-Derived Aroma Compounds: Biogenetic and Biotechnological Aspects, American Chemical Society, Symposium Series 637, 295-308 (1996)
- Winterhalter, P., Rouseff, R.:** Carotenoid-Derived Aroma Compounds: An Introduction, American Chemical Society, Symposium Series 802, 1-17 (2002)
- Wu, Z., Robinson, D. S., Hughes, R. K., Casey, R., Hardy, D., West, S. I.:** Co-oxidation of β -Carotene Catalyzed by Soybean and Recombinant Pea Lipoxygenases, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 4899-4906 (1999)
- Wyss, A., Wirtz, G., Woggon, W.-D., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Bachmann, H., Hunziker, W.:** Cloning and Expression of β, β -Carotene 15,15'-

Dioxygenase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271, 334-336 (2000)

Yan, W., Jang, G. F., Esumi, N., Chang, J., Kerrigan, M., Campochiaro, P., Palczewski, K., Zack, D. J.: Cloning and characterisation of a human β,β -Carotene-15,15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium, *Genomics*, 72, 193-202 (2001)

Zorn, H., Peters, T., Nimtz, M., Berger, R. G.: The secretom of *Pleurotus sapidus*, *Proteomics*, 5, 4832-4838 (2005)

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Scheibner
Vorname: Manuela
Geburtsdatum: 08.06.1969
Geburtsort: Marne

Bildungsweg

1979 - 1989 Besuch des Gymnasiums Brunsbüttel, Brunsbüttel

Oktober 1989 Beginn des Studiums des höheren Lehramtes an der Universität Hannover

Januar 1996 Erstes Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien mit den Fächern Biologie und Chemie; Thema der Examensarbeit:
„Interaktion zwischen Kontrollsystemen der Aminosäurebiosynthesen und anderen Synthesen“

05/1996 – 10/1996 Erziehungsurlaub

November 1996 Beginn des Referendariats in Hannover am Studienseminar I

Oktober 1998 2. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien

Beruflicher Werdegang

11/1999 - 12/1999 Wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover

7 Lebenslauf

01/2000 – 08/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Mikrobiologie,
Universität Hannover

09/2001 – 05/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für
Lebensmittelchemie, Universität Hannover