

Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung neuartiger Oxidoreduktasen aus Basidiomyceten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Lebensmittelchemikerin **Katharina Schmidt**

2016

Dekan: Prof. Dr. V. Wissemann

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Zorn
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Göttlich
Institut für Organische Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, September 2016

Katharina Schmidt

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben!

Professor Dr. Holger Zorn danke ich herzlich für die Bereitstellung des vielseitigen Forschungsthemas, die wissenschaftliche Betreuung, den gewährten Freiraum während der Bearbeitung sowie für seine Geduld und Motivation. Professor Dr. Richard Göttlich danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Professor Dr. Bernd Smarsly und Professor Dr. Gerd Hamscher danke ich für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Besonderer Dank gilt außerdem Dr. Marco Fraatz und Juniorprofessor Dr. Martin Rühl für die gute Zusammenarbeit, die wissenschaftlichen Gespräche sowie für alle wertvollen Anregungen und Tipps während der Zeit im Labor.

Ebenso bedanke ich mich bei ARTES Biotechnology GmbH (Langenfeld) für die heterologe Expression in *Hansenula polymorpha*; insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr. Manfred Suckow für die gute Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch. Der Firma DSM (Delft) danke ich für die heterologe Expression in *Aspergillus niger* und die Bereitstellung des enzymhaltigen Kulturüberstandes.

Herrn Dr. Till von Graberg und Herrn Martin von der Lehr (AG Prof. Dr. Smarsly, Physikalisch-Chemisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen) danke ich für die Bereitstellung der Silica-Monolithen sowie für die Durchführung der Stickstoff-Tiefemperatur-Adsorptionsmessung. Großer Dank gilt außerdem Professor Dr. Peter Friedhoff und Dr. Wolfgang Wende (Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen) für die hilfreichen Ratschläge.

Bei allen Mitarbeitern und Ehemaligen des Institutes für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie bedanke ich mich für das freundschaftliche Miteinander, die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die kurzweiligen Fortbildungen. Besonders zu erwähnen sind dabei meine Büro- und Laborpartner Alexander Heuger, Andrea Bosse, Christiane Lauber, Johanna Rost, Katrin Kunkel, Stephanie Riemer und Vanessa Kleofas. Herzlichsten Dank für den tollen Zusammenhalt, die vielen hilfreichen Diskussionen, das Korrekturlesen und vor allem für die gemeinsamen Stunden auch außerhalb des Labors.

Mein größter und herzlichster Dank gilt meiner Familie und Freunden. Meinen Eltern Gudrun und Dietmar, meinen Schwestern Constanze und Christiane, meinem Schwager Sascha sowie meinen Neffen Fabian und Lukas – vielen Dank für Euren Glauben an mich, die stetige Unterstützung, das Korrekturlesen sowie für Euren Rückhalt in allen Lebenslagen. Meinen Freunden danke ich ebenfalls für das sorgfältige Lesen meiner Arbeit und für die Zerstreung und Aufmunterung, wenn es mal nötig war. Jochen danke ich für seine unerschütterliche Ruhe, seine Geduld und großartige Unterstützung – vielen Dank!

Veröffentlichungen

Publikationen

Schmidt K, Fraatz MA, Riemer SJL, Zelena K, Linke D, Berger RG, Zorn H (2011) Biochemical and molecular biological characterization of a novel oxygenase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. In: Hofmann TH, Meyerhoff W, Schieberle P (Hrsg.) Advances and challenges in flavor chemistry & biology, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München, S. 235-241

Schmidt K, Kunkel K, Szweda R, Portz A, Fraatz MA, Zorn H (2013) Biotechnological production of norisoprenoid aroma compounds. In: Winterhalter P, Eberle SE (Hrsg.) Carotenoid Cleavage Products, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington DC, S. 157-168

Szweda RT, Schmidt K, Zorn H (2013) Bleaching of colored whey and milk by a multiple enzyme system. Eur Food Res Technol 237:377-384

Tagungsbeiträge

Schmidt K, Kalthoff L, Fraatz MA, Riemer SJL, Berger RG, Zorn H (2010) Charakterisierung einer neuartigen Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*. Lebensmittelchemie 65:32

Pretzel J, Fritz-Wolf K, Schmidt K, Szweda R, Stumpf M, Rahlfs S, Zorn H, Becker K (2012) Crystallization and mutagenesis of *Mycetinis scorodoni* peroxidase-1. 5th GGL Conference in Life Sciences, S. 156

Vorträge

Schmidt K (2013) Molekulare Charakterisierung einer rekombinanten DyP-Typ-Peroxidase. Regionalverbandstagung Südwest, Karlsruhe, 19./20.03.2013.

Zusammenfassung

Die native Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*, welche die selektive allylische Oxidation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton katalysiert, wurde proteinbiochemisch charakterisiert. Das Enzym liegt intrazellulär vor und weist ein Molekulargewicht von 76 kDa und einen pI von 5,81 auf. Die Oxygenase wurde hinsichtlich der Stabilität in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer und verschiedenen Zellaufschlusstechniken untersucht. Die höchste Produktkonzentration an (+)-Nootkaton wurde durch den Aufschluss mittels Rührwerkskugelmühle erzielt. Sowohl die Transformationsaktivität als auch das Proteinbandenmuster des PSA-Myzels wurden mit der Aktivität und dem Bandenmuster des Fruchtkörpers verglichen. Des Weiteren wurden die Aktivitäten der Enzyme aus *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii* gegenüber (+)-Valencen und deren Proteinbandenmuster untersucht und verglichen. Die cDNA der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurde in Vorarbeiten isoliert und von ARTES Biotechnology GmbH heterolog in *Hansenula polymorpha* exprimiert. Die kodierende Gesamtsequenz des Enzyms wurde dabei jedoch nicht vollständig isoliert. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die cDNA-Sequenz der Oxygenase erneut isoliert und das Enzym heterolog exprimiert. Die höchsten Homologien auf Basis der Aminosäuresequenz wurden zu einer postulierten Lipoxxygenase aus *Pleurotus ostreatus* nachgewiesen. Bei der heterologen Expression durch ARTES Biotechnology GmbH wurde lösliches aber inaktives Enzym erhalten. Deswegen wurde die rekombinante Oxygenase mittels iFOLD[®] Protein Refolding System-Kit rückgefaltet; trotz Proteinrückfaltung wurde kein aktives Enzym erhalten.

Mittels *Real-time*-PCR wurde die Untersuchung der Expression der Oxygenase in den Seitlingen *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii* vorgenommen. Als Proben-Templates wurden die cDNA-Erststränge (ss) von *P. sapidus*, *P. eryngii* und *P. ostreatus* der unterschiedlichen Kulturstage eingesetzt. Die Anzahl der Transkripte der Oxygenase in dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* betrug von 25 bis 71 Kopien ng⁻¹ cDNA(ss). Die Anzahl in *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus ostreatus* lag wesentlich niedriger. Die erfolgreiche Amplifizierung der repräsentativen Fragmente der Oxygenase wurde durch die Sequenzierung der Nukleotidsequenz überprüft und bestätigt.

Die rekombinante Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodoni* wurde bei der Firma DSM in *Aspergillus niger* erfolgreich überexprimiert und ist die erste heterolog exprimierte DyP-Typ-Peroxidase aus der Familie der Schwindlingsverwandten. Um MsP1 von dem Kulturüberstand abzutrennen, wurde eine geeignete Reinigungsmethode mittels FLPC entwickelt. Die gereinigte DyP-Typ-Peroxidase wurde proteinbiochemisch charakterisiert und deren kinetische Parameter für unterschiedlichste Substrate bestimmt. Das aktive Enzym liegt im Gegensatz zu anderen DyP-Typ-Peroxidasen als Dimer vor. MsP1 weist eine hohe Thermostabilität auf. Das pH-Profil des Enzyms zeigte, abhängig von den eingesetzten Substraten, Aktivitätsmaxima zwischen pH 2,5 und 4,5 und ist vergleichbar mit den pH-Profilen anderer DyP-Typ-Peroxidasen. Neben dem Einfluss von Wasserstoffperoxid wurde auch der Einfluss von Sauerstoff auf die Enzymaktivität von MsP1 unter-

sucht. MsP1 oxidiert β -Carotin auch in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid, wobei die Enzymaktivität durch die Zugabe von H_2O_2 signifikant gesteigert werden kann. Des Weiteren wurde die Enzymaktivität gegenüber β -Carotin durch die Anreicherung des Reaktionspuffers mit Sauerstoff um den Faktor 2,3 gesteigert. Dies deutet darauf hin, dass MsP1 neben der Peroxidase- auch eine Oxidasefunktion aufweist. Das ermittelte Substratspektrum des Enzyms umfasste neben natürlichen Farbstoffen und dem charakteristischen DyP-Typ-Substrat auch bekannte Substrate für polyvalente Peroxidasen und Mangan- bzw. Ligninperoxidasen. Die Fähigkeit von MsP1, Mn^{2+} zu oxidieren, ist außergewöhnlich und wurde bisher nur für eine weitere DyP-Typ-Peroxidase aus Pilzen beschrieben.

Zur Rückgewinnung von MsP1 aus technischen Prozessen wurde reines MsP1 mit Hilfe kovalenter chemischer Bindungen an Oberflächen von Silica-Monolithen und Polystyrolkugeln immobilisiert. Zum einen erfolgte die Immobilisierung mit Glutardialdehyd als homobifunktionalem *Cross-Linker*; zum anderen durch eine chemische Aktivierung der Oberflächengruppen mit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) und anschließender Ausbildung stabiler Amidbindungen. Mit Hilfe von Glutardialdehyd wurden zwar geringe Mengen des gereinigten MsP1 an die verwendeten Silica-Monolithen immobilisiert; jedoch führte die anschließende Reduktion der Schiffschen Base mittels Natriumborhydrid zu einer Inaktivierung des Enzyms. Mit Hilfe von EDC und NHS wurde aktives MsP1 erfolgreich an Silica-Monolithen und Polystyrol-Kugeln immobilisiert. Von diesen Materialien wurde die Wiederverwendbarkeit sowie die Lagerstabilität überprüft. Weiterhin wurden sie zur Bleichung von Molke eingesetzt. Immobilisiertes MsP1 bleichte sowohl den durch Annattozusatz gefärbten Natriumacetat-Puffer, als auch die gefärbte Molke innerhalb von 12 Stunden. Das Resultat der Bleichung war vergleichbar mit dem Resultat der Bleichung durch nicht immobilisiertes, aktives Enzym.

Abstract

The native oxygenase from *Pleurotus sapidus*, which catalyses the selective allylic oxidation of (+)-valencene to (+)-nootkatone, was biochemically characterised. The enzyme, which exists intracellularly, has a molecular mass of 76 kDa and a pI of 5.81. The stability of the oxygenase was examined in matters of storage duration and different cell disruption techniques. The highest product concentration of (+)-nootkatone was achieved by using an agitator bead mill. Both, the transformation activity and the protein pattern of the PSA mycelium were compared with the activity and protein pattern of the fruiting body. In addition, the enzyme activities of *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* towards (+)-valencene as well as their protein patterns were examined and compared. The cDNA of the oxygenase was isolated in a previous study and heterologously expressed in *Hansenula polymorpha* by ARTES Biotechnology GmbH. However, in the previous study the entire coding sequence of the enzyme was not fully isolated. Therefore, the cDNA of the oxygenase was isolated again and the enzyme was heterologously expressed a second time. The highest homologies on the basis of the amino acid sequence were detected with a postulated lipooxygenase from *Pleurotus ostreatus*. From the heterologous expression performed by ARTES Biotechnology GmbH, a soluble but inactive enzyme was obtained. Due to that, the recombinant oxygenase was refolded by means of an iFOLD[®] Protein Refolding System-Kit. However, despite refolding, no active enzyme could be obtained.

The expressions of the oxygenases from *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* were studied by means of *Real-time*-PCR. The cDNA-first-strand (ss) of *P. sapidus*, *P. eryngii* and *P. ostreatus* of the different culture days were used as templates. The number of transcripts of the oxygenase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* amounted to values between 25 and 71 copies ng⁻¹ cDNA(ss). However, the numbers in *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus* were considerably lower. The successful amplification of the representative fragments of the oxygenase was proven and confirmed by sequencing of the nucleotide sequence.

The recombinant peroxidase MsP1 from *Mycetinis scorodoni* was successfully overexpressed in *Aspergillus niger* by DSM and is the first heterologously expressed DyP-type peroxidase from the *Pleurotus* species. In order to separate MsP1 from the supernatant, an appropriate purification method by means of FPLC was developed. The purified DyP-type peroxidase was biochemically characterised and the kinetic parameters for different substrates were determined. In contrary to other DyP-type peroxidases, the active enzyme MsP1 is a dimer which showed a high thermostability. Depending on the substrate, the pH profile showed maximum activities in the range of pH 2.5 to 4.5 and is therefore comparable with pH profiles of other DyP-type peroxidases. Additional to the influence of hydrogen peroxide the influence of oxygen on the enzyme activity of MsP1 was investigated. MsP1 oxidises β -carotene even in absence of hydrogen peroxide, whereby the enzyme activity can be raised significantly by the addition of H₂O₂. Furthermore, the enzyme activity towards β -carotene was increased by the factor of 2.3 by enriching the reaction buffer with

oxygen. This indicates a possible oxidase function in addition to the peroxidase function. The identified substrate spectrum includes known substrates for versatile peroxidases, manganese peroxidases and lignin peroxidases besides natural colouring agents and characteristic DyP-type substrates. The ability of MsP1 to oxidise Mn^{2+} is exceptional and was reported for only one other fungal DyP-type peroxidase.

To recover MsP1 from technical processes, the enzyme was immobilised onto the surfaces of silica monoliths and polystyrene balls. The immobilisation was achieved by glutaraldehyde used as homobifunctional cross linker as well as by chemical activation of the surface groups by 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS), followed by the formation of stable amide bonds. By means of glutaraldehyde, small amounts of MsP1 were immobilised on the silica monoliths. However, the subsequent reduction of the Schiff base using sodium borohydride led to an inactivation of the enzyme. By the help of EDC and NHS active MsP1 was successfully immobilised on silica monoliths and polystyrene balls. These materials were tested with regard to their reusability and storage stability; additionally, they were used to bleach whey. In summary, immobilised MsP1 bleached sodium acetate buffer coloured by annatto, as well as coloured whey within 12 hours. The result of the bleaching was comparable to the result of the bleaching by non-immobilised active enzyme.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Alternative Verfahren zu gängigen chemischen Prozessen	1
1.1.1 Biotechnologischer Einsatz von Basidiomyceten	3
1.2 Zielsetzung	6
2 Material und Methoden	7
Material	7
2.1 Enzyme	7
2.2 Mikroorganismen	8
2.3 Materialien zur Immobilisierung	8
2.3.1 Silica-Monolithe	9
2.3.2 Polystyrol-Kugeln	10
2.4 Molekularbiologische und biochemische Materialien	11
2.4.1 Antikörper	11
2.4.2 <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC)-Säulen	11
2.4.3 Größenstandards	12
2.4.4 Kits	12
2.4.5 Oligonukleotide	13
2.4.6 Verwendeter Vektor	14
2.4.7 Sonstige verwendete Materialien	14
2.5 Chemikalien	15
2.5.1 Referenzverbindungen und Substrate	15
2.5.2 Sonstige Chemikalien und Lösungsmittel	16
2.5.3 Gase	18
2.6 Geräte	19
2.7 Bioinformatiksoftware und Datenbanken	20
Methoden	22
2.8 Kultivierung von Basidiomyceten	22
2.8.1 SNL-H-Medium	22

2.8.2	SNL-H-Agar	22
2.8.3	Spurenelementlösung	22
2.8.4	Stammhaltung	22
2.8.5	Vorkultur	23
2.8.6	Hauptkultur	23
2.8.7	Probennahme	23
2.8.8	Kulturernte	23
2.9	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	23
2.9.1	LB-Medium	23
2.9.2	Ampicillin-Stammlösung	24
2.9.3	LB _{amp} -Medium	24
2.9.4	LB _{amp} -Agar	24
2.9.5	Stammhaltung	24
2.9.6	Übernachtskultur	24
2.9.7	Glycerol-Stock	24
2.10	Kultivierung von <i>Hansenula polymorpha</i>	25
2.10.1	YPD-Medium	25
2.10.2	YPG-Medium für die Expression	25
2.10.3	YPD-Agar	25
2.10.4	Stammhaltung	25
2.10.5	Übernachtskultur	25
2.10.6	Hauptkultur	25
2.10.7	Kulturernte und Zellaufschluss	26
2.11	Zellaufschlüsse von Basidiomyceten	26
2.11.1	Gefriertrocknung	26
2.11.1.1	Präparation des Lyophilisates für die SDS-PAGE	26
2.11.1.2	Präparation für die Transformation von (+)-Valencen	27
2.11.2	Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff	27
2.11.2.1	Zellaufschluss für die SDS-PAGE	27
2.11.2.2	Zellaufschluss für die Transformation von (+)-Valencen	27
2.11.2.3	Zellaufschluss von Fruchtkörpern	27
2.11.3	Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax	27
2.11.3.1	Zellaufschluss für die SDS-PAGE	27
2.11.3.2	Zellaufschluss für die Transformation von (+)-Valencen	27
2.11.4	Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle	28
2.12	Bestimmung der Kulturparameter von Basidiomyceten	28
2.12.1	Bestimmung der Biofeuchtmasse	28
2.12.2	Bestimmung der Trockenmasse	28

2.13 Proteinbiochemische Arbeiten	29
2.13.1 Konzentrierung und Umpufferung	29
2.13.2 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)	29
2.13.2.1 Vorversuche zur Zweistufenreinigung	29
2.13.2.2 <i>Scale up</i> der Zweistufenreinigung mittels IEX	31
2.13.2.3 Gelfiltrationschromatographie (GFC)	33
2.13.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.13.3.1 Proteinquantifizierung nach Bradford	34
2.13.3.2 Photometrische Proteinquantifizierung	35
2.13.4 UV/Vis-Spektroskopie	35
2.13.5 Bestimmung der Reinheitszahl	35
2.13.6 Ermittlung der Kristallstruktur von MsP1	35
Enzymassays	35
2.13.7 Transformation von (+)-Valencen	36
2.13.7.1 Bestimmung des Response-Faktors von (+)-Nootkaton	37
2.13.7.2 Transformation mit Lyophilisaten von <i>Pleurotus sapidus</i>	37
2.13.7.3 Transformation von Pilzmyzel und Fruchtkörpern	37
2.13.7.4 Transformation nach isoelektrischer Fokussierung	37
2.13.7.5 Transformation mit rekombinanter Oxygenase	38
2.13.7.6 Chemikalienblindwert und Negativkontrolle	38
2.13.8 Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität	38
2.13.9 Photometrische Enzymassays zur Messung der Aktivität von MsP1	40
2.13.9.1 Verwendete Puffer und Lösungen	40
2.13.9.2 Übersicht der verwendeten Assays	42
2.13.9.3 Bestimmung des optimalen Puffers und pH-Wertes	44
2.13.9.4 Bestimmung der optimalen Pufferkonzentration	44
2.13.9.5 Temperaturoptimum	45
2.13.9.6 Variation der Wasserstoffperoxidkonzentration	45
2.13.9.7 Anreicherung und Abreicherung von Sauerstoff	45
2.13.9.8 Untersuchung der Enzymstabilität	46
2.13.9.9 Salztoleranz	46
2.13.9.10 Einfluss von Mangansulfat	47
2.13.9.11 Oxidation von Mangan(II)-Ionen	47
2.13.9.12 Umsetzung von Adlerol	48
2.13.10 Enzymkinetik	48
2.13.11 Rückfaltung der rekombinanten Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	49
2.14 Elektrophorese-Techniken	50
2.14.1 Agarose-Gelelektrophorese	50

2.14.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.14.2.1	Molekulargewicht	52
2.14.3	Halbnative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
2.14.4	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
2.14.5	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	54
2.14.5.1	Analytische IEF	54
2.14.5.2	Präparative IEF	54
2.14.6	Western Blot	55
2.14.6.1	Immunodetektion, Entwicklung und Dokumentation	56
2.15	Dot Blot	56
2.16	Färbungen	57
2.16.1	Coomassiefärbung	57
2.16.2	Kolloidale Coomassiefärbung	57
2.16.3	Aktivitätsfärbung mit ABTS	58
2.16.4	Färbung für Häm- und Metallenzyme (Hämfärbung)	58
2.17	Molekularbiologische Arbeiten	59
2.17.1	Primerableitung	59
2.17.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	59
2.17.3	Isolierung genomischer DNA	59
2.17.4	RNA-Isolierung	60
2.17.4.1	Überprüfung der RNA-Qualität	60
2.17.5	cDNA-Synthese	60
2.17.5.1	Erststrangsynthese durch reverse Transkription	60
2.17.5.2	Gegenstrangsynthese	61
2.17.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	62
2.17.6.1	PCR	62
2.17.6.2	Analytische PCR	63
2.17.6.3	Präparative PCR	63
2.17.6.4	Kolonie-PCR	64
2.17.6.5	<i>Real-time</i> -PCR	65
2.17.7	DNA-Fragmentisolierung	66
2.17.8	Klonierung	66
2.17.8.1	Ligation mittels TA-Cloning	66
2.17.8.2	Transformation in <i>E. coli</i>	66
2.17.8.3	Blau/Weiß-Screening	67
2.17.8.4	Plasmidisolierung	67
2.17.9	DNA-Sequenzierung	67
2.17.9.1	Sequenzierung von Plasmid-DNA	68

2.17.9.2 Sequenzierung von DNA-Fragmenten	68
2.17.10 Heterologe Expression	68
2.18 Immobilisierung von MsP1	69
2.18.1 Immobilisierung mit Glutardialdehyd	69
2.18.2 Immobilisierung mit EDC und NHS	70
2.18.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	71
2.18.4 Elementaranalyse	71
2.18.5 Messung der Aktivität von immobilisiertem MsP1	72
2.18.6 Wiederverwendbarkeit	72
2.18.7 Lagerstabilität	72
2.18.8 Stickstoff-Tieftemperatur-Adsorptionsmessung	72
2.18.9 Bleichung von Molke	73
2.19 Sterilisation und Entsorgungshinweise	74
2.19.1 Sterilisation von Arbeitsmaterialien	74
2.19.2 Sterilisation und Entsorgung von S1-Abfällen	74
2.19.3 Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien	74
3 Ergebnisse	75
3.1 Proteinbiochemische Charakterisierung einer Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	75
3.1.1 Validierung des Western Blots	75
3.1.1.1 Reaktion des polyklonalen Antikörpers	75
3.1.1.2 Kontrollen	76
3.1.1.3 Untersuchung der Reproduzierbarkeit des Western Blots	78
3.1.2 Biotransformation des Sesquiterpens (+)-Valencen	80
3.1.2.1 Bestimmung des Response-Faktors von (+)-Nootkaton	80
3.1.3 Transformationsaktivität der Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	81
3.1.3.1 Einfluss von Zusätzen auf die Transformationsaktivität	83
3.1.4 Vergleich verschiedener Zellaufschlussvarianten	84
3.1.5 Einfluss der Lagerungsdauer und -temperatur	86
3.1.6 Vergleich von Myzel und Fruchtkörper	87
3.1.7 Vergleich verschiedener Arten aus der Gattung der Seitlinge	88
3.1.8 Vergleich der nativen und heterolog exprimierten Oxygenasen	89
3.1.9 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI)	91
3.2 Molekularbiologische Identifizierung von Basidiomyceten	92
3.2.1 Molekularbiologische Identifizierung der Stämme 1020, 8264, 8266	92
3.3 Molekularbiologische Charakterisierung der Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	96
3.3.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>Pleurotus sapidus</i>	96
3.3.1.1 Primerableitung	96
3.3.1.2 Präparative PCR und Isolierung von DNA-Fragmenten	99

3.3.2	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	101
3.3.3	Amplifizierung und Isolierung der cDNA der Oxygenase mit N-Terminus . .	102
3.3.4	Berechnung eines Strukturmodells	106
3.4	Heterologe Expression der Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	106
3.4.1	Nachweis der Aktivität	106
3.4.2	Rückfaltung der rekombinanten Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	107
3.5	Untersuchung der Expression einer Oxygenase mittels <i>Real-time-PCR</i>	110
3.5.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>P. ostreatus</i> und <i>P. eryngii</i>	110
3.5.1.1	Präparative PCR und Isolierung von DNA-Fragmenten	110
3.5.1.2	Synthese der Standards für die <i>Real-time-PCR</i>	114
3.5.2	Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur der Primer	115
3.5.3	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	116
3.5.4	Untersuchung der Expression der Oxygenase mittels <i>Real-time-PCR</i>	117
3.6	Reinigung der in <i>Aspergillus niger</i> überexprimierten Peroxidase MsP1	124
3.6.1	Enzymreinigung - Vorversuche	124
3.6.2	Messung der Enzymaktivität	125
3.6.2.1	Nachweis der Linearität und Reproduzierbarkeit	126
3.6.3	Einfluss von Natriumchlorid auf die Aktivität von MsP1	128
3.6.4	Lagerstabilität der gereinigten und konzentrierten Enzymlösung	129
3.6.5	UV/Vis-Spektrum	130
3.6.6	Enzymreinigung - <i>Scale up</i>	131
3.7	Proteinbiochemische Charakterisierung der rekombinanten Peroxidase MsP1	135
3.7.1	Proteinquantifizierung der gereinigten MsP1-Lösung	135
3.7.2	Bestimmung des Molekulargewichtes von MsP1	135
3.7.3	Bestimmung des isoeletrischen Punktes von MsP1	137
3.7.4	Bestimmung des optimalen Puffers und pH-Wertes	137
3.7.5	Variation der Pufferkonzentration	140
3.7.6	Temperaturoptimum der rekombinanten Peroxidase MsP1	141
3.7.7	Einfluss von Wasserstoffperoxid	141
3.7.7.1	H ₂ O ₂ -Konzentration der β -Carotin-Stammlösung	143
3.7.8	Einfluss von Sauerstoff auf die Aktivität von MsP1	143
3.7.9	Untersuchung der Enzymstabilität unter Assaybedingungen	144
3.7.9.1	Lösungsmitteltoleranz	144
3.7.9.2	Puffer- und pH-Wert-Stabilität	145
3.7.9.3	Temperaturstabilität	147
3.7.10	Ermittlung des Substratspektrums von MsP1	148
3.7.11	Enzymkinetik	150
3.7.12	Einfluss von Mangansulfat	153

3.7.12.1	Oxidation von Mangan(II)-Ionen	153
3.7.13	Umsatz von Adlerol	154
3.8	Berechnung eines Strukturmodells für MsP1	155
3.9	Immobilisierung der gereinigten rekombinanten Peroxidase MsP1	158
3.9.1	Immobilisierung mit Glutardialdehyd	158
3.9.2	Immobilisierung mit EDC und NHS	159
3.9.2.1	Wiederverwendbarkeit von immobilisiertem MsP1	160
3.9.2.2	Lagerstabilität von immobilisiertem MsP1	161
3.9.2.3	Charakterisierung der porösen Silica-Materialien	162
3.9.2.4	Bleichung von Molke mit immobilisiertem MsP1	164
4	Diskussion	165
4.1	Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	165
4.1.1	Biochemischer Nachweis mittels polyklonalem Antikörper	168
4.1.2	Transformationsaktivität der Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	169
4.1.3	Vergleich verschiedener Zellaufschlussvarianten	169
4.1.4	Einfluss der Lagerdauer und -temperatur	170
4.1.5	Vergleich von Myzel und Fruchtkörper	170
4.1.6	Vergleich der nativen und heterolog exprimierten Oxygenasen	171
4.1.7	Modell- und Sequenzanalyse der Oxygenase	172
4.1.7.1	Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI)	174
4.1.8	Heterologe Expression der Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	174
4.1.9	Rückfaltung der rekombinanten Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	175
4.2	Untersuchung der Expression einer Oxygenase mittels <i>Real-time-PCR</i>	178
4.2.1	Fragment- und Primerauswahl	179
4.2.2	Synthese der Standards und der Proben-Templates	180
4.2.3	Untersuchung der Expression der Oxygenase mittels <i>Real-time-PCR</i>	180
4.3	Peroxidase MsP1 aus <i>Mycetinis scorodoni</i>	182
4.3.1	Heterologe Expression der rekombinanten Peroxidase MsP1	184
4.3.1.1	Enzymreinigung - Vorversuche und <i>Scale up</i>	184
4.3.1.2	UV/Vis-Spektrum und Reinheitszahl	186
4.3.2	Bestimmung des Molekulargewichtes & Glykosylierungsgrades	186
4.3.3	Bestimmung des isoelektrischen Punktes	188
4.3.4	Temperaturoptimum und -stabilität	189
4.3.5	Bestimmung des optimalen Puffersystems	190
4.3.6	Lösungsmitteltoleranz	191
4.3.7	Modell- und Sequenzanalyse der DyP-Typ-Peroxidase MsP1	192
4.3.7.1	Berechnung eines Strukturmodells für MsP1	194
4.3.7.2	Katalysemechanismus und Substratoxidationsstellen	195

4.3.8	Ermittlung der Kristallstruktur von MsP1	202
4.3.9	Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Enzymaktivität	203
4.3.10	Einfluss von Sauerstoff auf die Enzymaktivität	204
4.3.11	Ermittlung des Substratspektrums und der kinetischen Parameter	205
4.4	Immobilisierung der gereinigten rekombinanten Peroxidase MsP1	209
4.4.1	Immobilisierung mit Glutardialdehyd	213
4.4.2	Immobilisierung mit EDC und NHS	214
4.4.2.1	Wiederverwendbarkeit und Lagerstabilität	218
4.4.3	Bleichung von Molke mit immobilisiertem MsP1	218
5	Ausblick	221
6	Literatur	223
7	Anhang	241
7.1	Herstellungsverfahren der Silica-Monolithen und Funktionalisierung	241
7.1.1	Herstellungsverfahren	241
7.1.2	Funktionalisierung	242
7.1.3	Elementaranalyse	242
7.2	Größenstandards	243
7.3	Vektorkarte, pCR[®] 2.1-TOPO[®]-Vektor	245

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
ALS	<i>Automatic Liquid Sampler</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APTMS	3-Aminopropyltrimethoxysilan
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
cDNA	komplementäre DNA
CHES	2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
COCI	<i>Coprinopsis cinerea</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
d	Tage
Da	Dalton
dATP	2'Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	2'Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'Desoxythymidin-5'-triphosphat
DyP	dye decolorizing peroxidases (Farbstoff-entfärbende Peroxidase)
EBI	European Bioinformatics Institute
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>

ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FF	<i>fast flow</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GC	Gaschromatographie
GFC	Gelfiltrationschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
LB	Luria Bertani
LD	<i>Long Distance</i>
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
MAPTMS	N-Methyl-3-aminopropyltrimethoxysilan
MCS	multiple Klonierungsstelle („multiple cloning site“)
MEK	Methylethylketon
mind.	mindestens
MOPS	3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MsP1	Peroxidase aus <i>Mycetinis scorodonius</i> (<i>Mycetinis scorodonius</i> Peroxidase 1)
MWCO	Molekulargewichtsgrenze
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PER	<i>Pleurotus eryngii</i>
POS	<i>Pleurotus ostreatus</i>
PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PVDF	Polyvinylidenfluorid

RBlack 5	RBlack 5
RBlue 5	Reactive Blue 5
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RZ	Reinheitszahl
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNL	Standardnährlösung
SNL-H	Standardnährlösung mit Hefeextrakt
spez.	spezifisch
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Trockenmasse
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	C,C,C-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton [®]	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglycol
Tween [®] 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
Tween [®] 80	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat
U	Enzymeinheit („unit“)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)
VA	Veratrylalkohol
VE	vollentsalzt
verd.	verdünnt
VP	<i>Versatile Peroxidase</i> (polyvalente Peroxidase)
w/v	Masse pro Volumen (bei Prozentangaben)
X-β-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
DMSO	Dimethylsulfoxid
p. a.	zur Analyse (<i>pro analysi</i>)

Die Abkürzung der Aminosäuren entspricht dem internationalen Ein- oder Dreibuchstabencode. Eine Zahl hinter der Aminosäure kennzeichnet ihre Position innerhalb der Proteinsequenz.

1 Einleitung

1.1 Alternative Verfahren zu gängigen chemischen Prozessen

Das Interesse an biotechnologischen Verfahren für den Einsatz in industriellen Produktionsprozessen ist in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Die Gründe dafür liegen in vielfältigen Vorteilen gegenüber herkömmlichen Verfahren wie beispielsweise (Buchholz und Kasche 1997):

- neue Reaktionsmöglichkeiten und Produkte
- weniger Produktionsschritte
- geringerer Energieverbrauch
- Reduktion der Schadstoffemission
- Einsparung von Rohstoffen

Die sogenannte „Weiße Biotechnologie“¹ liefert mit der Biokatalyse durch die Nutzung von lebenden Zellen und Enzymen umweltfreundliche und nachhaltige Alternativverfahren zu den gängigen chemischen Prozessen (Frazetto 2003). Für die industrielle Herstellung liegt das Potential der Biokatalyse in der Entwicklung neuer Prozesse mit hochspezifischen Stoffumwandlungen. Diese arbeiten sowohl energie- als auch ressourcensparend² und minimieren dabei die Erzeugung nicht verwertbarer Abfallstoffe (Buchholz und Kasche 1997; Braun *et al.* 2006).

In der Textilproduktion sind viele Prozesse (Stoffveredelung, Färben), unabhängig davon ob es sich um die Herstellung und Verarbeitung von Kunst- oder Naturfasern (Baumwolle, Wolle, Seide) handelt, durch einen hohen Energieverbrauch und häufig durch eine Gewässerbelastung gekennzeichnet. Diesen ökologischen Problemen soll mit neu entwickelten Verfahren, die beispielsweise auf der enzymatischen Behandlung von Rohstoffen mit Oxidasen/Peroxidasen beruhen, wirkungsvoll entgegengetreten werden (Heiden und Erb 2003).

¹Weiße steht für das langfristige Ziel, im industriellen Herstellungsprozess keine Schad- und Abfallstoffe entstehen zu lassen.

²Nutzung nachwachsender Rohstoffe und vermarktbarer Wertstoffe aus Abfall- und Reststoffen.

Von besonderem Interesse ist auch die effiziente Nutzung nachwachsender Rohstoffe mittels Biorefinerietechnologien. Im Gegensatz zu den endlichen fossilen Rohstoffen werden nachwachsende Rohstoffe wie Holz und Stroh kontinuierlich in nahezu unerschöpflichen Mengen produziert und stellen somit eine der ergiebigsten natürlichen Ressourcen dar. Nach Schätzungen werden jährlich ca. 140 Billionen Tonnen Biomasse von Pflanzen produziert (Steinbüchel 2006).

Lignocellulosen bilden die Zellwand verholzter Pflanzen und bestehen aus den Hauptkomponenten Lignin, Hemicellulose und Cellulose, die ein komplexes, robustes und teilweise kristallines Netzwerk³ bilden. Ein direkter biotechnologischer Abbauprozess von Lignocellulose zu nützlichen Werkstoffen bzw. Biokraftstoff ist bis jetzt noch nicht möglich (Bouws *et al.* 2008).

Die komplexe Struktur des Lignins⁴ entsteht durch die verschiedenen Verknüpfungsmöglichkeiten der drei Grundbausteine Coniferyl-, Sinapyl- und Cumarylalkohol (Sarkanen und Ludwig 1971). Der heterogene Aufbau des Lignins stellt für die meisten Mikroorganismen eine Barriere dar (Hofrichter und Steinbüchel 2001). Durch oxidativen Abbau des Lignins könnten die für die Herstellung einer Vielzahl an Polymeren und Feinchemikalien geeigneten Phenylpropaneinheiten gewonnen werden.

Über eine enzymatische Hydrolyse der Cellulose- und Hemicellulosebestandteile können vor allem Cellulose und Glucose gewonnen werden. Diese können entweder direkt in der biotechnologischen Industrie eingesetzt werden, oder als Produktionsplattform zum Beispiel für Bioethanol und Ethylacetat dienen (Braun *et al.* 2006).

Neben altbekannten Fermentationsverfahren wie der Weinherstellung werden in der Lebensmittelindustrie Biokatalysatoren unter anderem zum Klären von Fruchtsäften, zur Stabilisierung von Schäumen und zur Stärkeverzuckerung eingesetzt. Weiterhin werden Biokatalysatoren für die Herstellung von Aromen verwendet. Aromen finden in der Lebensmittel-, Kosmetik- und Parfümindustrie sowie bei der Herstellung von Wasch- und Reinigungsmitteln vielseitige Verwendung. Ein großer Teil der verwendeten Aromen wird durch chemische Synthese gewonnen, da der stetig wachsende Bedarf nicht durch die natürliche Gewinnung aus Pflanzenteilen gedeckt werden kann (Cheetham 2001; Scragg 2007). Hinzu kommt, dass die Gewinnung mit traditionellen Verfahren häufig unwirtschaftlich ist, da die Qualität des Pflanzenmaterials durch wechselnde klimatische Gegebenheiten jährlich schwankt. Außerdem führen Missernten aufgrund von schlechtem Wetter oder Schädlingsbefall zu einer Erhöhung der Kosten.

³ Polysaccharide formen Cellulose- oder Hemicellulosemicrofasern, die dicht gepackt zwischen Ligninschichten liegen.

⁴ Lignin ist ein dreidimensionales Netzwerk aus Phenylpropaneinheiten, die teilweise am Phenylring mono- oder dimethoxyliert und am Propanrest mit Hydroxygruppen substituiert sind. Dadurch ergibt sich eine Vielzahl an Untereinheiten, die wiederum auf unterschiedliche Weise durch Ether- und C-C-Bindungen miteinander verknüpft sind (Martínez *et al.* 2005).

Alternative Synthesewege natürlicher Aromastoffe gewinnen für die Industrie zunehmend an Bedeutung, da der Endverbraucher „natürliche Aromastoffe“ gegenüber chemisch synthetisierten Aromastoffen bevorzugt.

Gemäß Art. 3 Abs. 2 lit. c der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 handelt es sich um einen „natürlichen Aromastoff“, wenn er „durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ausgangsstoffen gewonnen wird. Natürliche Aromastoffe sind Stoffe, die natürlich vorkommen und in der Natur nachgewiesen wurden.“ Biotechnologisch erzeugte Aromastoffe dürfen demnach als „natürliche Aromastoffe“ deklariert werden, was einen Vorteil gegenüber chemosynthetisch hergestellten Aromastoffen darstellt.

Die Bereitstellung ausreichender Mengen an Biokatalysatoren für den Einsatz in biotechnologischen Produktionsverfahren scheitert jedoch vielfach noch daran, dass die benötigten Enzyme nicht in ausreichender Menge aus den Wildtypstämmen isoliert werden können. Daher ist die Entwicklung effizienter Expressionssysteme in mesophilen Wirtsorganismen von besonderer Relevanz, um die Biokatalysatoren für Umwelt und Gesellschaft verfügbar zu machen (Heiden und Erb 2003).

1.1.1 Biotechnologischer Einsatz von Basidiomyceten

Zum Phylum der Basidiomyceten (Ständerpilze) gehören ca. 30 000 Arten (Kirk *et al.* 2008) zu denen fast alle Speisepilze zählen. Sie besitzen ein einzigartiges Enzymsystem mit einem hohen Anwendungspotential in der Weißen Biotechnologie.

Aufgrund der komplexen Substrate wie Holz und terpenreiche Biopolymere produzieren Basidiomyceten eine eindrucksvolle Auswahl an unterschiedlichsten Enzymen – einschließlich Hydrolasen (Pérez *et al.* 2002) und Oxidoreduktasen (Scheibner *et al.* 2008). Die häufig extrazellulären Enzyme weisen dabei eine außergewöhnliche Stabilität auf (Jacobs und Callewaert 2009). Zudem sind Basidiomyceten in der Lage, zahlreiche nachwachsende Rohstoffe als Kohlenstoffquelle und als Substrate in Transformationsreaktionen zu nutzen (Bouws *et al.* 2008).

Unter den Basidiomyceten gehören Weiß- und Braunfäulepilze zu den wenigen Organismen, die die polymeren Substanzen der Lignocellulose abbauen und somit für den Pilz nutzbar machen können (Müller und Loeffler 1992).

Während die Braunfäulepilze in erster Linie Cellulose und Hemicellulose zersetzen, bauen Weißfäulepilze primär Hemicellulose und Lignin ab (Eriksson *et al.* 1990; Zabel und Morrell 1992; Schwarze *et al.* 2000). Der Ligninabbau kann dabei simultan mit dem Abbau von Hemicellulose und Cellulose oder davor stattfinden (Otjen und Blanchette 1986). Im Sekretom des Weißfäulepilzes *Pleurotus sapidus*, wurde eine Vielzahl an Enzymen identifiziert, die dem Lignocellulose-Abbau dienen. Zu ihnen zählen unter anderem Cellulasen, Hemicellulasen, Peptidasen, Esterasen, Laccasen und insbesondere Peroxidasen (Zorn *et al.* 2005).

Die am Abbau beteiligten Peroxidasen sind vor allem Lignin- und Manganperoxidasen (Martínez *et al.* 2005). Zusätzlich besitzen einige Pilze, die zur Gattung der *Pleuroten* oder *Bjerkandera* gehören, eine dritte Art von Peroxidasen.

Diese Enzyme werden als polyvalente Peroxidasen⁵ bezeichnet und kombinieren die katalytischen Eigenschaften von Mangan- und Ligninperoxidasen (Martínez *et al.* 1996; Mester und Field 1998).

Die heterogene Zusammensetzung des Lignins führt dazu, dass die lignolytischen Enzyme eine geringe Substratspezifität besitzen. Daher können Laccasen und Peroxidasen für den Abbau von Umweltkontaminanten wie polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen im Erdboden oder von Azofarbstoffen in Industrieabwässern eingesetzt werden (Baldrian *et al.* 2000; Levin *et al.* 2005).

Während lignolytische Enzyme aus Weißfäulepilzen in der papierverarbeitenden Industrie bereits seit langem technologisch genutzt werden und eine Vielzahl von Patentschriften vorliegen (Scott und Akhtar 2001), ist das Potential dieser Enzyme zur Produktion hochwertiger Lebensmittelinhaltsstoffe wenig untersucht.

Die Spaltung von Carotinoiden ist für die Riechstoffindustrie von Interesse, da Carotinoide Vorstufen von Aromastoffen wie beispielsweise von α - und β -Ionon, Geraniol und β -Damascenon darstellen (Winterhalter 1996; Winterhalter und Rouseff 2002). Weiterhin spielt der Abbau von Carotinoiden bei der Bleichung von Lebensmitteln eine Rolle.

Aus dem Kulturüberstand des Weißfäulepilzes *Mycetinis scorodonius* (Knoblauchschwinding), wurde das Enzym MsP1 isoliert, das β -Carotin zu flüchtigen Verbindungen abzubauen vermag (Zorn *et al.* 2003a). MsP1 wurde, aufgrund von Sequenzhomologien zu der Peroxidase DyP (*dye decolorizing peroxidases*) aus dem Basidiomyceten *Bjerkandera adusta*, der neuen Peroxidase-Familie der DyP-Typ-Enzyme zugeordnet (Scheibner 2006). Die Peroxidase zeigt keine Sequenzhomologien zu Lignin-, Mangan- bzw. polyvalenten Peroxidasen. Obwohl die Sekretion der Peroxidase durch Zusatz von Lignin und verschiedenen Lignocellulosen stark induziert wird (Hülsdau 2007), ist der Beitrag des Enzyms zum Abbau von Lignocellulose noch nicht abschließend geklärt (Linde *et al.* 2015b).

Die Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodonius* wurde in *Aspergillus niger* überexprimiert und wird industriell als „MaxiBright™“ zur Entfärbung von Molke aus dem Käseprozess eingesetzt. Der enzymatische Prozess ersetzt dabei das herkömmliche Verfahren der chemischen Bleichung, wodurch die Denaturierung von Molkeproteinen und die Bildung von Fehlparfums vermieden werden.

⁵versatile Peroxidasen (VP)

Unter den Aromastoffen bilden Terpenkohlenwasserstoffe und ihre Oxidationsprodukte - die Terpenoide - eine bedeutende Gruppe. Mono- und Sesquiterpenoide sind häufig die Schlüsselaromastoffe pflanzlicher etherischer Öle und wichtige Aromastoffe für Lebensmittel, Parfüms und andere Kosmetika. Dabei zeigen vor allem die einfach oxidierten Verbindungen eine große Vielfalt an Geruchseindrücken, wohingegen reine Terpenkohlenwasserstoffe eher unauffällige, weniger bedeutende Geruchsqualitäten aufweisen (Ohloff 1994).

Eine neuartige Oxygenase aus dem Weißfäulepilz *P. sapidus* katalysiert die selektive allylische Oxidation (Oxyfunktionalisierung) des Sesquiterpenkohlenwasserstoffs (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton (Kaspera 2004; Fraatz *et al.* 2009b; Abb. 1.1).

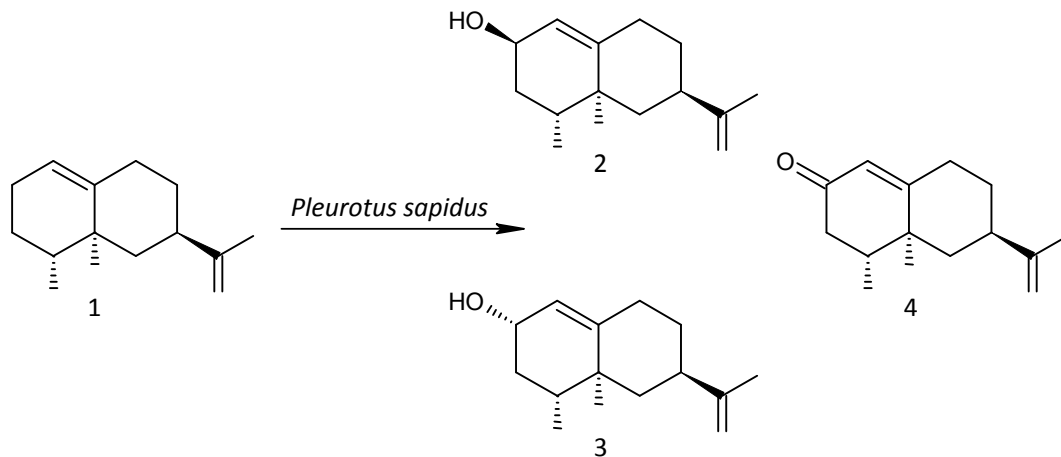


Abbildung 1.1: Biotransformation von (+)-Valencen (1) zu α -Nootkatol (2), β -Nootkatol (3) und (+)-Nootkaton (4) mit Myzel von *P. sapidus*.

Nach Limonen und Myrcen ist Valencen einer der Hauptbestandteile von Essenzölen der Valencia Orangen (*Citrus sinensis*) und fällt als Neben- bzw. Abfallprodukt bei der Herstellung von Orangensaft im Tonnenmaßstab an. Im Öl überreifer Früchte, wurden bis zu 1,5% Valencen nachgewiesen (Moshonas und Shaw 1979).

(+)-Nootkaton⁶ ist ein begehrter Aromastoff der Grapefruit und wird als Riech- und Duftstoff in der Kosmetik- und Arzneimittelindustrie sowie zur Aromatisierung von Lebensmitteln verwendet. Das synthetische Isomer (-)-Nootkaton weist im Gegensatz zu (+)-Nootkaton nur einen holzig würzigen Geruch auf, und der Geruchsschwellenwert ist in wässrigen Medien um den Faktor 1.000 höher (Haring *et al.* 1972; Fisher und Scott 1997).

⁶(+)-Nootkaton besitzt einen leicht bitteren Geschmack und einen extrem niedrigen sensorischen Schwellenwert von etwa $1 \mu\text{g L}^{-1}$ in Wasser (Ohloff 1994).

Weiterhin wurden einige pharmakologische Wirkungen von (+)-Nootkaton beschrieben. Beispielsweise hemmt (+)-Nootkaton die Aktivität der Acetylcholinesterase (Miyazawa *et al.* 1997; Miyazawa *et al.* 2001) und die Aktivität der Cytochrom-P450-Monooxygenase (CYP450; Tassaneeyakul *et al.* 2000). Des Weiteren kann (+)-Nootkaton als Insektizid gegen Larven der *Drosophila melanogaster* oder Termiten (*Coptotermes formosanus*) eingesetzt werden (Zhu *et al.* 2001; Miyazawa *et al.* 2000).

Aufgrund der geringen Akkumulation von (+)-Nootkaton in Pflanzen ist dessen extraktive Gewinnung nicht wirtschaftlich. Der industrielle Bedarf wird nahezu ausschließlich durch Chemosynthese gedeckt, bei der oft umweltbelastende Reagenzien, Katalysatoren und Lösungsmittel zum Einsatz kommen (Hunter und Brogden 1965).

Die enzymatische Synthese von (+)-Nootkaton mit Hilfe der Oxygenase aus *P. sapidus* ermöglicht die biotechnologische Gewinnung des natürlichen Aromastoffes. Bislang wurde jedoch noch kein biotechnologisches Verfahren zur Produktion von (+)-Nootkaton im industriellen Maßstab etabliert.

Die Peptidsequenzen der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wiesen Homologien zu putativen Lipooxygenasen verschiedener Asco- und Basidiomyceten auf und die kodierende cDNA wurde kloniert (Fraatz *et al.* 2009b). Weiterhin wurde die rekombinante Oxygenase aus *P. sapidus* in *Hansenula polymorpha* exprimiert (Riemer 2010).

1.2 Zielsetzung

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der biochemischen und molekularbiologischen Charakterisierung zweier neuartiger Oxidoreduktasen aus Basidiomyceten.

Zum einen sollte die native Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*, welche die selektive allylische Oxidation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton katalysiert, proteinbiochemisch charakterisiert werden. Dazu wurde das Enzym hinsichtlich der Stabilität in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer und verschiedenen Zellaufschlusstechniken untersucht. Weiterhin wurde die Expression der Oxygenase in verschiedenen Seitlingen mittels *Real-time*-PCR verglichen. Auch ein Vergleich zwischen der nativen Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* und der rekombinanten Oxygenase sollte erfolgen. Da die rekombinante Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* keine Aktivität gegenüber (+)-Valencen zeigte, sollte ausgehend von vorangegangenen Arbeiten (Riemer 2010) die kodierende cDNA-Sequenz der Oxygenase erneut isoliert und das Enzym heterolog in *Hansenula polymorpha* exprimiert werden. Zum anderen sollte die in *Aspergillus niger* überexprimierte rekombinante Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodoni* proteinbiochemisch charakterisiert werden. Dazu sollte das rekombinante Enzym mittels FPLC gereinigt werden und anschließend das Substratspektrum, die charakteristischen Optima und die kinetischen Parameter (K_m) und (k_{cat}) bestimmt werden. Weiterhin sollte das gereinigte MsP1 für einen besseren industriellen Einsatz an verschiedenen Materialien immobilisiert und dessen Anwendung gezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Enzyme

Die rekombinante Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodonius* wurde von der niederländischen Firma DSM (Delft) in *Aspergillus niger* überexprimiert. Der enzymhaltige Kulturüberstand wurde für die Untersuchungen von dieser Firma zur Verfügung gestellt.

Die rekombinante Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurde von der Firma ARTES Biotechnology GmbH (Langenfeld) in *Hansenula polymorpha* exprimiert. Von dieser Firma wurden der enzymhaltige Gesamtzellextrakt und das Zellpellet sowie nicht aufgeschlossene Zellpellets und Glycerolkulturen zur Verfügung gestellt.

Bei der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) wurde als Positivkontrolle für den Lipoxygenaseassay (s. 2.13.8) eine Lipoxygenase aus der Sojabohne (für die Biochemie, > 50 000 U mg⁻¹) erworben.

Für molekularbiologische Arbeiten wie die cDNA-Synthese, die DNA-Isolierung oder die *Real-time*-PCR wurden DNA- und RNA-modifizierende Enzyme eingesetzt (Tab. 2.1).

Tabelle 2.1: Verwendete DNA- und RNA-modifizierende Enzyme

Enzym	Verwendung	Hersteller
Advantage™ 2 LD-Polymerase-Mix	cDNA-Synthese	Clontech Laboratories, Inc., Saint-Germain-en-Laye
HotStarTaq-Polymerase	PCR	Qiagen GmbH, Hilden
SuperScript Reverse Transkriptase II	cDNA-Synthese	Invitrogen GmbH, Darmstadt
SuperScript Reverse Transkriptase III	cDNA-Synthese	Invitrogen
RNase H	DNA-Isolierung	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Sso Advantage™ 2 SYBR® Green Supermix ⁷	<i>Real time</i> -PCR	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RNase H	<i>Real time</i> -PCR	Invitrogen

⁷enthält die Sso7d-fusion Polymerase

2.2 Mikroorganismen

Tabelle 2.2: Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Stamm-Nr.	Abkürzung	Herkunft
<i>Pleurotus eryngii</i>	8264	PER	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1020	POS	DSMZ
<i>Pleurotus sapidus</i> ⁸	8266	PSA	DSMZ
<i>Coprinopsis cinerea</i>	C29-2	COCI	Friedrich-Schiller-Universität, Jena
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	<i>E. coli</i>	Invitrogen
<i>Hansenula polymorpha</i>	—	<i>H. polymorpha</i>	ARTES

2.3 Materialien zur Immobilisierung

Die Fixierung von MsP1 erfolgte an zwei verschiedene Materialien (Abb. 2.1), die in den folgenden Kapiteln (s. 2.3.1 und 2.3.2) beschrieben werden.



Abbildung 2.1: Materialien, die zur Immobilisierung von MsP1 verwendet wurden: (a): Bruchstücke des funktionalisierten Silica-Monolithen; (b): funktionalisierte Polystyrol-Kugeln in 300-facher Vergrößerung (kleines Bild)

⁸Die in der Arbeit verwendeten Fruchtkörper des Basidiomyceten PSA wurden von Frau Dr. Ina Schüttmann (AG Prof. Dr. Zorn, Institut für Lebensmittelchemie und -biotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

2.3.1 Silica-Monolithe

Die verwendeten Silica-Monolithen wurden von Herrn Till von Graberg (AG Prof. Dr. Smarsly, Physikalisch-Chemisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. Die Monolithe wurden mit verschiedenen reaktiven Gruppen funktionalisiert (Tab. 2.3). Ihre Herstellung sowie Funktionalisierung sind im Anhang (s. 7.1) dargestellt.

Tabelle 2.3: Verwendete Silica-Monolithen

Abkürzung	Beschreibung
Blind-SiO ₂	reines Silica ohne Funktionalisierung
AP-SiO ₂	Silica funktionalisiert mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS)
MAP-SiO ₂	Silica funktionalisiert mit N-Methyl-3-aminopropyltrimethoxysilan (MAPTMS) ⁹
BSMAP-SiO ₂	Silica funktionalisiert mit N-Methyl-3-aminopropyltrimethoxysilan (MAPTMS) und Bernsteinsäureanhydrid

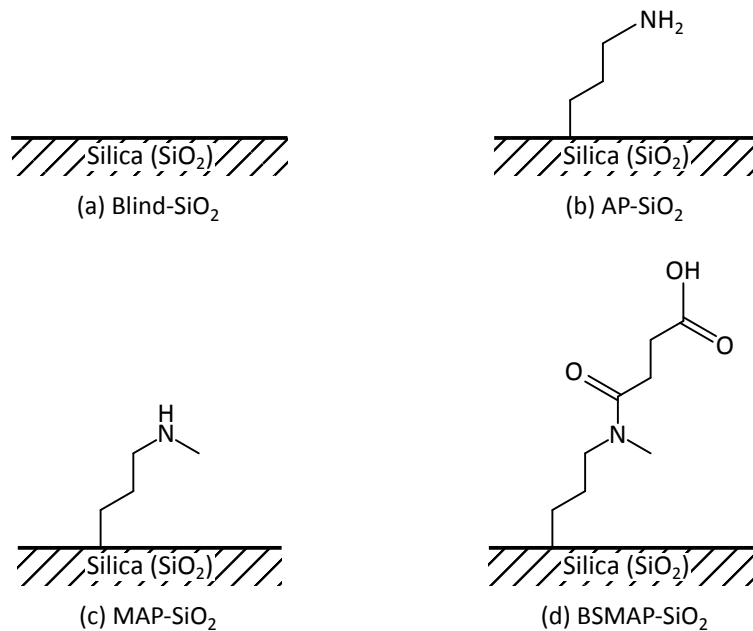


Abbildung 2.2: Darstellung der verschiedenen reaktiven Gruppen auf den Silica-Oberflächen

⁹wurde für die Funktionalisierung mit Bernsteinsäureanhydrid hergestellt

2.3.2 Polystyrol-Kugeln

Die reaktiven Polystyrol-Kugeln wurden von der Firma Rapp Polymere GmbH in Tübingen bezogen (Tab. 2.4).

Tabelle 2.4: Verwendete Polystyrol-Kugeln

Abkürzung	Beschreibung	Bindungskapazität in mmol g ⁻¹	Partikelgröße in µm
Carboxy-PS(I) ¹⁰	Carboxypolystyrol	1,55	250–315
Carboxy-PS(II) ¹⁰	Carboxypolystyrol	1,12	400–450
BSAM-PS(I) ¹⁰	Aminomethylpolystyrol acyliert mit Bernsteinsäure	1,02	250–315
BSAM-PS(II) ¹⁰	Aminomethylpolystyrol acyliert mit Bernsteinsäure	0,94	400–450

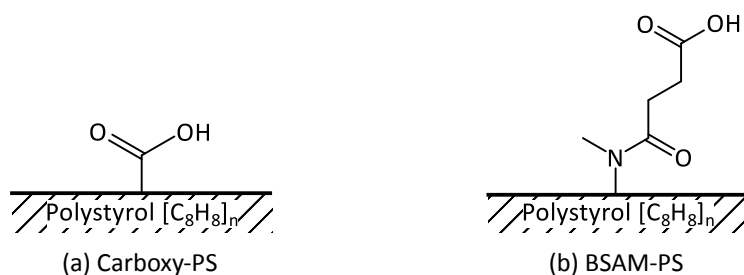


Abbildung 2.3: Darstellung der verschiedenen reaktiven Gruppen auf den Polystyrol-Oberflächen

¹⁰ Die Verwendung von (I) bzw. (II) erfolgte zur Unterscheidung der Polystyrol-Kugeln mit gleichen Oberflächengruppen jedoch unterschiedlichen Bindungskapazitäten und Partikelgrößen

2.4 Molekularbiologische und biochemische Materialien

2.4.1 Antikörper

Die Aminosäuresequenz CQDAQYYPDDASVAGD wurde in vorherigen Arbeiten (Riemer 2010) als Antigen determinante für die Produktion polyklonaler Antikörper gegen die Oxygenase aus PSA ausgewählt. Die Synthese des Peptids und die Produktion der Antikörper¹¹ in Kaninchen wurden von der Firma BioGenes GmbH in Berlin durchgeführt.

Das Präimmenserum der Kaninchen und das zur Produktion der Antikörper eingesetzte Peptid¹² wurden ebenfalls von dieser Firma bezogen.

Von Merck KGaA in Darmstadt stammte der Antikörper Ziege anti-Kaninchen IgG konjugiert mit einer Peroxidase.

Der Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper konjugiert mit einer alkalischen Phosphatase wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH in Steinheim erworben.

2.4.2 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-Säulen

Alle Säulen inklusive Zubehör wurden von GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, erworben (Tab. 2.5).

Tabelle 2.5: Verwendete FPLC-Säulen und Zubehör

Säule/Zubehör	Funktion
Superdex 200 10/300 GL	Gelfiltration
HiPrep DEAE-FF 16/10-Fertigsäule	schwacher Anionentauscher
Q-Sepharose-High-Performance-Säulenmaterial (Q-HP)	Anionentauscher
XK 26/20 Column	Leersäule
Packingreservoir RK 16/26	Säulenpackhilfe
HiTrap™ IEX Selection Kit 1 mL Testsäulen	
HiTrap DEAE-FF-Säule	schwacher Anionentauscher
HiTrap Q-FF-Säule	starker Anionentauscher

¹¹anti-CQDAQYYPDDASVAGD-amid IgG

¹²konjugiert an Rinderserumalbumin (BSA)

2.4.3 Größenstandards

Tabelle 2.6: Verwendete Größenstandards ¹³

Proteingrößenstandard	Hersteller
PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Abb. 7.4a)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Abb. 7.3b)	Fermentas
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Abb. 7.3a)	Fermentas
SERVA Native Marker Liquid Mix (Abb. 7.4b)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
IEF Marker 3-10, Liquid Mix (Abb. 7.5)	Serva
DNA-Größenstandard	Hersteller
100 bp-DNA-Leiter extended (Abb. 7.2b)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
1 kbp DNA-Leiter (Abb. 7.2a)	Carl Roth

2.4.4 Kits

Tabelle 2.7: Verwendete Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
RNeasy® Plant Mini Kit	RNA-Isolierung	Qiagen
Nucleo Spin® Plasmid Kit	Plasmid-Isolierung	Macherey-Nagel
Nucleo Spin® Extrakt II Kit	DNA-Extraktion	Macherey-Nagel
Nucleo Spin® Plant II Kit	DNA-Isolierung	Macherey-Nagel
SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	Erststrangsynthese	Clontech
TOPO TA Cloning® Kit ¹⁴	Klonierung	Invitrogen
Serva Gel™ N Native Starter Kit	native PAGE	Serva
PEROXsay™ Assay	H ₂ O ₂ -Konzentration	G-Biosciences, St. Louis
Protein Molecular Weight Standards	Gelfiltrationschromatographie	Serva
Novagen® iFOLD® Protein Refolding System 2	Proteinrückfaltung	Merck KGaA, Darmstadt

¹³Abbildungen der verwendeten Standards sind im Anhang (s. 7.2) dargestellt.

¹⁴Das TOPO TA Cloning® Kit enthält den pCR® 2.1-TOPO®-Vektor und One Shot® TOP 10 chemisch kompetente Zellen.

2.4.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide stammen von der Firma Eurofins MWG GmbH in Ebersberg. Die aufgeführten Schmelztemperaturen wurden nach der $2^\circ\text{C} + 4^\circ\text{C}$ -Regel berechnet:

$$T_M = n \cdot [\text{GC}] \cdot 4^\circ\text{C} + n \cdot [\text{AT}] \cdot 2^\circ\text{C} \quad (1)$$

n : Anzahl der Basen

Tabelle 2.8: Verwendete Oligonukleotide mit interner Nummer, Name, Sequenz und Schmelztemperatur (T_m)

Nummer	Name	Sequenz	T_m
<i>Transcribed Spacer Region (ITS-Region)</i>			
1473	ITS4	5' >TCCTCCGCTTATTGATATGC<3'	58 °C
1474	ITS5	5' >GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG<3'	58 °C
Kolonie-PCR			
1110	M13for	5' >GTAAAACGACGGCCAG<3'	50 °C
1111	M13rev	5' >CAGGAACAGCTATGAC<3'	50 °C
Isolierung genomischer DNA			
3608	loxgenrev1 56	5' >TCAAATTACAATCGCATTTGC<3'	56 °C
6719	loxgenfor2 54	5' >TCCACAACACTACGCCTATG<3'	54 °C
3607	loxgenfor4 58	5' >TCGAGCACACTACGTCCG<3'	58 °C
5234	revloxFr1 58	5' >AGGCCTGAATTTGCGTATCT<3'	58 °C
cDNA-Synthese			
6559	SMART 2 oligo	5' >AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG<3'	94 °C
7916A8	3'SMART CDS 2A	5' >AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(TTT) ₁₀ VN<3'	134 °C
6561	5'PCR Primer 2A	5' >AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT<3'	68 °C
6203	loxgenfor5 54	5' >ATGAATGGAAGACAGGGG<3'	50 °C
6204	loxgenfor6 56	5' >ATGTCTCGGAACTCTCG<3'	56 °C
3879	loxforges 58	5' >CTGATGAGGAGCTGTTTAACG<3'	62 °C
3880	loxrevges 58	5' >CAGGATACGGTGATGAATGC<3'	60 °C
3608	loxgenrev1 56	5' >TCAAATTACAATCGCATTTGC<3'	56 °C
0257	loxgenfor15 54	5' >CTCCCCTACTGTATCTTG<3'	54 °C
Real-time PCR			
0257	loxgenfor15 56	5' >CACCGCCGTCAACTACC<3'	56 °C
0258	loxgenrev5 56	5' >CGTTTGGCATTGAGAGGG<3'	56 °C
0259	forloxFr1 58	5' >ATTCCACAACACTACGCCTATG<3'	58 °C
0260	revloxFr1 58	5' >AGGCCTGAATTTGCGTATCT<3'	58 °C
3608	loxgenrev1 56	5' >TCAAATTACAATCGCATTTGC<3'	56 °C
6719	loxgenfor2	5' >TATAAATTGACTCCCTACAGC<3'	58 °C

2.4.6 Verwendeter Vektor

Der Vektor pCR[®] 2.1-TOPO zur TA-Klonierung wurde von der Firma Life Technologies GmbH in Darmstadt bezogen (s. 7.3). Die zugehörige Vektorkarte ist im Anhang dargestellt (s. 7.3). Der TOPO TA-Vektor ist ein hoch effizienter Klonierungsvektor, da dieser an beiden überstehenden Desoxythymidinresten mit einer Topoisomerase I kovalent verknüpft ist, welche die Ligation des Inserts in den Vektor katalysiert (Shuman 1994). Bei Zugabe von DNA-Fragmenten mit überhängenden 3'-Desoxyadenosin-Resten werden diese Reste mit den komplementären 3'-Desoxythymidin-Überhängen des Vektors unter Freisetzung der Topoisomerase verknüpft.

2.4.7 Sonstige verwendete Materialien

Tabelle 2.9: Sonstige verwendete Materialien

Material/Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
Western und Dot Blot		
Fotopapier	BioMax XAR Film	Kodak, Rodgau
Chemilumineszenzreagenz	Immobilon™ Western	EMD Millipore, Billerica
Filterpapier	Blottingpapier	Whatman GmbH, Dassel
PVDF-Membran	Roti [®] -PVDF	Carl Roth
Entwicklungsreagenz	Sigma Fast™ BCIP [®] /NBT	Sigma-Aldrich
analytische und präparative IEF		
Fertiggele	Serva Gel™ IEF 3-10	Serva
Auftragspuffer	IEF sample buffer 2x	Serva
Laufpuffer	Serva Gel™ IEF Running Buffer Kit	Serva
IEF-Laufpuffer	Bio-Lyte 3/10 Ampholyte 40%	Bio-Rad
IEF-Laufpuffer	Bio-Lyte 5/7 Ampholyte 40%	Bio-Rad

2.5 Chemikalien

2.5.1 Referenzverbindungen und Substrate

Tabelle 2.10: Verwendete Referenzverbindungen und Substrate

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
(+)-Nootkaton	> 99%	Sigma-Aldrich
(+)-Nootkaton	crystalline 98%	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe
(+)-Valencen	95%	DöhlerGruppe, Darmstadt
1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1,3-diol (Adlerol)	97%	ABCR Dr. Braunagel GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin-6-sulfonsäure)-diammonium-salz (ABTS)	—	AppliChem GmbH, Darmstadt
2,6-Dimethoxyphenol	≥97%	Sigma-Aldrich
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	≥99%	Sigma-Aldrich
Annattolösung (wässrig, alkalischer Extrakt)	-	Ruth GmbH & Co. KG, Bochum
β-Carotin	≥97,0%, purum	Sigma-Aldrich
Bixin	≥90,0%	Molekula Limited, Gillingham
Guajacol	—	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	p. a.	AppliChem
Reactive Black 5 (RBlack 5)	Dye content 55% (w/w)	Sigma-Aldrich
Reactive Blue 5 (RBlue 5)	Dye content 100% (w/w)	— ¹⁵
Thymol	ROTICHROM® GC	Carl Roth
Veratrylalkohol	≥97%	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid	purum, p. a.; ≥30% (RT)	Sigma-Aldrich
Thyroglobulin	f.d. Gelfiltrationschromatographie	Sigma-Aldrich

¹⁵Das in der Arbeit verwendeten Reactive Blue 5 wurde von Frau Prof. Dr. Christiane Liers (IHI Zittau) zur Verfügung gestellt.

2.5.2 Sonstige Chemikalien und Lösungsmittel

Tabelle 2.11: Verwendete sonstige Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Aceton	ROTISOLV [®] HPLC	Carl Roth
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung, Rotiphorese [®] Gel 40	40% in Wasser; 37,5:1	Carl Roth
Agar-Agar Kobe I	reinst	Carl Roth
Aluminiumsulfat-Hydrat	—	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat	f. d. Molekularbiologie	AppliChem
Ammoniumsulfat	≥99,5%, p. a., ACS, ISO	Carl Roth
Ampicillin, Natriumsalz	99%	Carl Roth
L-Arginin	≥99%, Zellkulturqualität	Carl Roth
L-Asparagin-Monohydrat	f. d. Zellkultur	AppliChem
Bacto [™] -Pepton	—	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bradford-Reagenz Roti-Nanoquant [®]	5x Konzentrat	Carl Roth
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galacto- pyranosid (X- β -gal)	>99%, f. d. Biochemie	Carl Roth
Bromphenolblau Natrium-Salz	f. d. Elektrophorese	Carl Roth
2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure (CHES)	PUFFERAN [®] , ≥99%	Carl Roth
Cholsäure Natriumsalz	≥98%, f. d. Biochemie	Carl Roth
Citronensäure	>99,5%, Ph. Eur.	Carl Roth
Coomassie Blue G 250	—	AppliChem
Coomassie Blue R 250	—	AppliChem
D-(+)-Glucose-Monohydrat	f. d. Mikrobiologie	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	p. a.	AppliChem
Dinatriumtartrat-Dihydrat	≥99%, p. a.	Carl Roth
Diethylether	Rotipuran [®] ≥99,5% p. a.	Carl Roth
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl- carbodiimidhydrochlorid (EDC)	≥99,0% (AT)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Rotipuran [®] ≥99,8%, p. a.	Carl Roth
Dithiothreitol	f. d. Molekularbiologie	AppliChem
Desoxynucleosidtriphosphat (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	≥98%, lyophilisiert	Carl Roth
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	p. a.	AppliChem
Essigsäure	Rotipuran [®] , 100%, p. a.	Carl Roth
Ethanol	≥99,5%, Ph. Eur., reinst	Carl Roth
Ethidiumbromid	1% (1 mg mL ⁻¹) Stammlösung	Carl Roth

(Fortsetzung)

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Ethylacetat	min. 98%	AppliChem
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA)	p. a.	AppliChem
Glutardialdehyd	~50%	Carl Roth
L-Glutathion oxidiert	≥98%, für die Biochemie	Carl Roth
L-Glutathion reduziert	≥98%, für die Biochemie	Carl Roth
Glycerol	>99,5%, f. d. Fluoreszenzmikroskopie	Merck
Glycin	≥99%, p. a.	Carl Roth
Guanidiniumchlorid	99,5%	Carl Roth
Hefeextrakt	Molecular Genetics Powder	Fisher Scientific
n-Hexan	min. 97%	VWR
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	98%	Sigma-Aldrich
Isopropanol	≥99,8%, p. a.	Carl Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	>99%, f. d. Biochemie	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	≥99%, p. a., ACS	Carl Roth
Kaliumhydroxid	≥85%, p. a., in Plätzchen	Carl Roth
Kupfersulfat-Pentahydrat	p. a.	AppliChem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	min. 99,5%, f. d. Molekularbiologie	AppliChem
β-Mercaptoethanol	99%, p. a.	
Methanol	min. 99,8%, HPLC Gradient Grade	VWR International GmbH, Darmstadt
Methanol	Rotipuran® ≥99,9%, p. a., ACS, ISO	Carl Roth
Milchpulver	Blotting Grade	Carl Roth
3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure (MOPS)	für d. Molekularbiologie	AppliChem
Natriumacetat	wasserfrei, p. a., ACS	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Natriumborhydrid	gepulvert, zur Analyse	AppliChem
Natriumcarbonat	≥99%, wasserfrei	Carl Roth
Natriumchlorid	reinst Ph. Eur.	AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Ph. Eur.	Merck
Natriumhydrogencarbonat	≥99,5%, p. a., ACS, ISO	Carl Roth
Natriumhydroxid	>99%, p. a.	Carl Roth
Natriumsulfat	wasserfrei, ≥99%	Fisher Scientific
Natronlauge	Rotipuran® ≥32%, p. a.	Carl Roth
n-Pentan	≥99%	Fisher Scientific

(Fortsetzung)

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Phosphorsäure	Rotipuran® ≥85%, p. a., ACS, ISO	Carl Roth
Polyethylenglykol (PEG3350)	BioUltra 3,350	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	>98%, f. d. Molekularbiologie	Carl Roth
Schwefelsäure	Rotipuran® ≥95%, p. a., ISO	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	min. 99%	AppliChem
Trichloressigsäure	p. a., >10%	Carl Roth
C,C,C-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS-Base)	Pufferan® ≥99,3%, Buffer Grade	Carl Roth
TRIS-Hydrochlorid	Pufferan® ≥99%	Carl Roth
Triton® X-100	reinst	Carl Roth
Tween® 20	Ph. Eur.	Carl Roth
Tween® 80	Ph. Eur.	Carl Roth
Zinksulfat-Heptahydrat	p. a.	AppliChem

2.5.3 Gase

Tabelle 2.12: Verwendete Gase

Gas	Qualität	Lieferant
Helium	5.0	Praxair, Düsseldorf
Sauerstoff	2.5	Praxair
Stickstoff	5.0	Praxair
Wasserstoff	5.0	Praxair
Sauerstoff	4.0	Praxair

2.6 Geräte

Hier nicht aufgeführte Geräte werden in den jeweiligen Methoden spezifiziert. Standardgeräte eines molekularbiologischen und biochemischen Labors, wie zum Beispiel Pipetten oder Vortexer, wurden nicht aufgelistet.

Tabelle 2.13: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Laboklav 160 MSL	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle
Autoklav	Laboklav 25 B	SHP
Brutschrank	IPP 5000	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach
Dispergiergerät	T 25 digital Ultra-Turrax®	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Feuchtebestimmer	MA 35	Sartorius AG, Göttingen
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LD plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
Gelscanner	Bio 5000 MICROTEK	Serva
Geldokumentation	DeVision G	Decon Sience Tec, Hohengandern
Gelelektrophoresekammer	Mini-Protean® Tetra System	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue Mini S	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
HPLC-Detektor	L-4200 UV-VIS Detektor	Merck Hitachi, Darmstadt
HPLC-Pumpe	L6200 A UV-VIS Intelligent Pump	Merck Hitachi
präparative IEF	Rotofor® Cell	Bio-Rad
IEF-Gelelektrophoresekammer	multiphor II	GE Healthcare
Inkubationsschüttler	Multitron Version 2	Infors GmbH, Einsbach
Kälte-Umwälzthermostat	Minichiller®	Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg
Kühl-Thermo-Mixer	MKR 13	HLC Bio Tech, Bovenden
Magnetrührer	RH basic 2	IKA®
Nanophotometer	NanoPhotometer™ Pearl	Implen GmbH, München
PCR-Cycler	AlphaSC	Analytik Jena
PCR-Werkbank	PCR-Workstation	Peqlab
Mikroplattenleser	Biotek Synergy 2	BioTek Germany, Friedrichshall
Rührwerkskugelmühle	Dyno®-Mill Research Lab	Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik, MuttENZ
Real time-PCR Detektionssystem	CFX Connect®	Bio-Rad

(Fortsetzung)

Gerät	Modell	Hersteller
Rotationsverdampfer Pumpe	VP 2 autovac/Pump MD 10 VARIO	VWR International GmbH, Darmstadt
Rotationsverdampfer Vakuum-Controller	CVC 3000	VWR
Rotationsverdampfer Wasserbad Schüttler	HB 10 basic gyro-rocker SSL3	VWR Bibby Scientific Limited, Staffordshire
Spannungsquelle	Power Supply EV231	Peqlab
Spannungsquelle	Power Supply EV262	Peqlab
Spektralphotometer	Specord 50	Analytik Jena
Sterile Werkbank	HERAsafe KS 18	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham
Tischzentrifuge	Allegra® X-15R Benchtop Zentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Tischzentrifuge	Microfuge® 22R Microcentrifuge	Beckman Coulter
Ultratiefkühlschrank	Forma 900 Series	Thermo Fisher
Western Blot-Dokumentation	VersaDoc Imaging System 4000 MP	Bio-Rad
pH-Meter	Seven Easy	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Reinstwasser-Anlage	Sartorius arium 611VF	Sartorius

2.7 Bioinformatiksoftware und Datenbanken

Siehe Tabelle 2.14.

Tabelle 2.14: Bioinformatiksoftware und Datenbanken

Name	Funktion	Referenz	Internetadresse
Programme			
Chimera	Molekül-Modellierungssystem	Pettersen <i>et al.</i> (2004)	www.cgl.ucsf.edu/chimera
Chromas Lite 2.01	Sequenzbearbeitung	—	technelysium.com.au
CLC Sequence viewer 6	Sequenzvergleiche	—	www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer
Cn3D 4.1	3D-Modell Bearbeitung	Wang <i>et al.</i> (2000)	www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml
Graphpad	Datenanalyse und -visualisierung	—	www.graphpad.com
OriginPro 8.5G	Datenanalyse und -visualisierung	—	www.originlab.com
Datenbanken			
BRENDA	Enzymdatenbank	Schomburg <i>et al.</i> (2002)	www.brenda-enzymes.org
Transeq	Übersetzung DNA → Protein	—	www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq
NetNGlyc 1.0 Server	N-Glykosylierungstellen	Gupta <i>et al.</i> (2004)	www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
NetOGlyc 3.1 Server	O-Glykosylierungstellen	Julenius <i>et al.</i> (2005)	www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/
ClustalW2 ¹⁶	Sequenzvergleiche	Thompson <i>et al.</i> (1994); Larkin <i>et al.</i> (2007)	www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2
ClustalOmega	Sequenzvergleiche	Sievers <i>et al.</i> (2011)	www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo
EMBL-EBI FASTA Nucleic acids	DNA-Datenbank	Pearson (1990)	www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html
EMBL-EBI FASTA Protein	Proteindatenbank	Pearson (1990)	www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta
EMBL-EBI WU-BLAST Nucleic acids	DNA-Datenbank	Altschul <i>et al.</i> (1997)	www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wtblast/nucleotide.html
EMBL-EBI WU-BLAST Protein	Proteindatenbank	Altschul <i>et al.</i> (1997)	www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wtblast
NCBI BLAST	Datenbank	Zhang <i>et al.</i> (2000)	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
PCR Primer Design; Oligo Property Scan	Primerkonstruktion	—	www.eurofins.de
ExpAsy Prosite	Proteindomänen, Proteinfamilien	Hulo <i>et al.</i> (2006); Gasteiger <i>et al.</i> (2005)	prosite.expasy.org
MotifSCAN (SIB)	Proteindomänen, Proteinfamilien	Pagni <i>et al.</i> (2007)	myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan
InterProScan (EMBL-EBI)	Proteindomänen, Proteinfamilien	Quevillon <i>et al.</i> (2005)	www.ebi.ac.uk/interpro/
CDD (NCBI)	Proteindomänen, Proteinfamilien	Marchler-Bauer <i>et al.</i> (2009)	www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
Pfam	Domänensuche	Punta <i>et al.</i> (2012)	pfam.sanger.ac.uk/
ExpAsy SWISS-MODEL	3D-Modell-Berechnung	Arnold <i>et al.</i> (2006); Gasteiger <i>et al.</i> (2005)	swissmodel.expasy.org
ExpAsy ProtParam Tool	Proteinparameterberechnung	Gasteiger <i>et al.</i> (2005); Pace <i>et al.</i> (1995)	web.expasy.org/protparam
JGI BLAST, PC15 v2.0	Genomprojekt <i>Pleurotus ostreatus</i>	Grigoriev <i>et al.</i> (2012)	genome.jgi.doe.gov/PleospC15_2
Konvertierung: Gewicht – Mol	Umwrechnung Gewicht - Mol für Proteine	—	http://molbiol.ru/ger/scripts/01_04.html

¹⁶wird nicht weiterentwickelt

2.8 Kultivierung von Basidiomyceten

2.8.1 SNL-H-Medium¹⁷

D-(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (s. 2.8.3)	1 mL L ⁻¹

Der pH-Wert des Nährmediums wurde mit 1 M NaOH auf 6,0 eingestellt. Anschließend wurde dieses in Erlenmeyerkolben überführt, mit Cellulosestopfen und Aluminiumfolie verschlossen und bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

2.8.2 SNL-H-Agar¹⁷

Für die Plattenkultivierung wurden dem SNL-H-Medium (s. 2.8.1) zusätzlich 15,0 g L⁻¹ Agar-Agar hinzugefügt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

2.8.3 Spurenelementlösung

Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	80 mg L ⁻¹
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	90 mg L ⁻¹
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	30 mg L ⁻¹
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	5 mg L ⁻¹
EDTA	400 mg L ⁻¹

2.8.4 Stammhaltung

Die SNL-H-Agarplatten (s. 2.8.2) wurden jeweils mit einem ca. 1 cm² großen, mit Myzel bewachsenen Stück einer SNL-H-Agarplatte der verwendeten Stämme angeimpft. Die Platten wurden mit Parafilm[®] verschlossen und im Brutschrank bei 24 °C kultiviert (Taubert *et al.* 2000). Die bewachsenen Platten wurden bei 4 °C gelagert.

¹⁷modifiziert nach Sprecher (1959) bzw. Sprecher und Hanssen (1982)

2.8.5 Vorkultur

Für die Vorkulturen wurden 100 mL SNL-H-Medium (s. 2.8.1) in einen 250 mL Enghals-Erlenmeyerkolben überführt. Das Medium wurde mit einem ca. 1 cm² Stück von der jeweiligen Stammplatte (s. 2.8.4) inokuliert, indem das Agarstückchen mittels Ultra-Turrax (9800 U min⁻¹, 15 s) homogenisiert wurde. Die Kulturen wurden für 4 Tage unter Lichtausschluss (24 °C, 150 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm) inkubiert.

2.8.6 Hauptkultur

Für die Hauptkulturen wurden 200 mL SNL-H-Medium (s. 2.8.1) in einen 500 mL Enghals-Erlenmeyerkolben überführt. Die entsprechende Vorkultur (s. 2.8.5) wurde mittels Ultra-Turrax homogenisiert (9800 U min⁻¹, 15 s). Das Hauptkulturnährmedium wurde mit 20 mL des Homogenisats (10% des Hauptkulturmediums) steril inokuliert und anschließend für 4-8 Tage unter Lichtausschluss (24 °C, 150 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm) inkubiert.

2.8.7 Probennahme

Für die Isolierung der genomischen DNA (s. 2.17.3) sowie der Gesamt-RNA (s. 2.17.4) wurden der Hauptkultur (s. 2.8.6) an jedem Tag steril Proben entnommen. Dafür wurde jeweils 1 mL der Submerskultur entnommen und zentrifugiert (14 000 U min⁻¹, 21 920×g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend abgetrennt und verworfen. Das Myzel wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.8.8 Kultureernte

Zur Abtrennung des Myzels vom Kulturüberstand wurden die Kulturen durch ein Stofftuch filtriert. Das Myzel wurde dreimal mit VE-Wasser gewaschen und anschließend bei -20 °C eingefroren.

2.9 Kultivierung von *Escherichia coli*

2.9.1 LB-Medium

Trypton	10,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5,0 g L ⁻¹
Natriumchlorid	10,0 g L ⁻¹

Das Nährmedium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

2.9.2 Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin 100 mg L^{-1}

Die Ampicillin-Stammlösung wurde steril filtriert, aliquotiert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.9.3 LB_{amp}-Medium

LB-Medium (s. 2.9.1) 1 L

Ampicillin-Stammlösung (s. 2.9.2) 1 mL

Die Ampicillin-Stammlösung wurde direkt vor der Verwendung in das autoklavierte LB-Medium gegeben.

2.9.4 LB_{amp}-Agar

Für die Plattenkultivierung wurden dem LB-Medium (s. 2.9.1) zusätzlich $15,0 \text{ g L}^{-1}$ Agar-Agar hinzugefügt und bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min autoklaviert. Vor dem Gießen der Agar-Platten wurde in den auf $50 \text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlten LB-Agar 1 mL L^{-1} Ampicillin-Stammlösung (s. 2.9.2) gegeben. Die Platten wurden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.9.5 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte für Stämme mit Vektor auf LB_{amp}-Agarplatten (s. 2.9.4). Die Platten wurden nach der Inkubation ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, über Nacht) bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.9.6 Übernachtskultur

3 mL LB_{amp}-Medium (s. 2.9.3) wurden im 15 mL Falcon™ Tube mit einer einzelnen Kolonie von einer LB_{amp}-Agarplatte (s. 2.9.4) angeimpft. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 225 U min^{-1}).

2.9.7 Glycerol-Stock

Zur Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurden Glycerol-Stocks angelegt. Dazu wurden 600 mL einer frischen Übernachtskultur (s. 2.9.6) mit 400 mL sterilem 50%igem Glycerol vermischt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.10 Kultivierung von *Hansenula polymorpha*

2.10.1 YPD-Medium

Hefeextrakt	10,0 g L ⁻¹
Bacto™ Pepton	20,0 g L ⁻¹
D-(+)-Glucose-Monohydrat	22,0 g L ⁻¹

Das Nährmedium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

2.10.2 YPG-Medium für die Expression

Hefeextrakt	10,0 g L ⁻¹
Bacto™ Pepton	20,0 g L ⁻¹
Glycerol	20,0 g L ⁻¹

Das Nährmedium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

2.10.3 YPD-Agar

Für die Plattenkultivierung wurden dem YPD-Medium (s. 2.10.1) zusätzlich 15,0 g L⁻¹ Agar-Agar hinzugefügt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

2.10.4 Stammhaltung

Die Stammhaltung der methylotrophen Hefe *Hansenula polymorpha* erfolgte auf YPD-Agarplatten (s. 2.10.3). Die Platten wurden 1-2 Tage bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.10.5 Übernachtkultur

Die Anzucht erfolgte in 3 mL YPD-Medium (s. 2.10.1) in einem 15 mL Falcon™ Tube unter Lichtausschluss (16–20 h, 37 °C, 180 U min⁻¹, 45° Neigungswinkel). Die Übernachtkultur wurde dazu mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers mit einer Hefekolonie von einer YPD-Platte (s. 2.10.3) angeimpft.

2.10.6 Hauptkultur

Die Anzucht und Induktion der Expression erfolgte in 3 mL YPG-Medium (s. 2.10.2) in einem 15 mL Falcon™ Tube unter Lichtausschluss (2 Tage, 37 °C, 180 U min⁻¹, 45° Neigungswinkel). Dazu wurde die Hauptkultur mit 200 µL der dicht gewachsenen Übernachtkultur (s. 2.10.5) steril inokuliert.

2.10.7 Kulturernte und Zellaufschluss

Am Ende der Kultivierung wurde die OD_{600} der Kulturbrühe bestimmt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4000 U min^{-1} , $3720\times g$, 10 min) und in soviel Aufschlusspuffer (50 mM TRIS-HCl pH 7,5) resuspendiert, dass die Zellsuspension eine OD_{600} von 30 aufwies. In ein 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 500 μL Zellsuspension auf das gleiche Volumen Glasperlen (\varnothing 0,25–0,5 mm, Carl Roth) gegeben und 15 mal 30 s mittels Vortexer aufgeschlossen (Schrimpf *et al.* 2007). Nach Zugabe von weiteren 500 μL Aufschlusspuffer wurde 15 mal 15 s gevortext. Der Überstand wurde nach Absinken der Glasperlen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als Gesamtzellextrakt bezeichnet. Der Zellaufschluss erfolgte unter ständiger Kühlung auf Eis.

2.11 Zellaufschlüsse von Basidiomyceten

Die Zellaufschlüsse wurden sowohl mit geerntetem Myzel (s. 2.8.8) als auch mit Fruchtkörpern (s. 2.2) von Basidiomyceten mit folgendem Puffer durchgeführt:

50 mM TRIS-HCl-Puffer

TRIS-HCl $7,88\text{ g L}^{-1}$

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7,5 eingestellt.

2.11.1 Gefriertrocknung

10 g frisch geerntetes Pilzmyzel wurden in ein 200 mL Kristallisierschälchen eingewogen, mit Aluminiumfolie abgedeckt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingeforen. Die Lyophilisierung erfolgte für 2-4 Tage ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ Eiskondensatortemperatur, 0,63 mbar). Das erhaltene Lyophilisat wurde ausgewogen, mit einem Glasstab zerkleinert, in sterile 50 mL Falcon™ Tubes überführt und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (Fraatz 2007).

2.11.1.1 Präparation des Lyophilisates für die SDS-PAGE

50 mg Lyophilisat wurden mit 0,5 mL 50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5 versetzt, für 15 min in horizontaler Lage rehydratisiert (150 U min^{-1} , $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, Auslenkung 25 mm) und anschließend zentrifugiert (15 min, $14\ 000\text{ U min}^{-1}$, $18\ 000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). 100 μL Überstand wurden mit 200 μL TRIS-HCl-Puffer verdünnt und als Probe zur SDS-PAGE (s. 2.14.2) eingesetzt.

2.11.1.2 Präparation des Lyophilisates für die Transformation von (+)-Valencen

Zur Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7.2) wurde das durch Gefriertrocknung erhaltene Lyophilisat direkt eingesetzt.

2.11.2 Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff

2.11.2.1 Zellaufschluss für die SDS-PAGE

1 g geerntetes Pilzmyzel wurde in einen vorgekühlten Mörser eingewogen, mit flüssigem Stickstoff durch Zermahlen aufgeschlossen und in 1 mL TRIS-HCl-Puffer resuspendiert. Das aufgeschlossene Myzel wurde als Probe zur SDS-PAGE (s. 2.14.2) eingesetzt.

2.11.2.2 Zellaufschluss für die Transformation von (+)-Valencen

Dieser Aufschluss erfolgte analog zum Zellaufschluss für die SDS-PAGE (s. 2.11.2.1), jedoch wurden 3 g Myzel eingesetzt und in 6 mL TRIS-HCl-Puffer aufgenommen. Das aufgeschlossene Myzel wurde zur Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7.3) eingesetzt.

2.11.2.3 Zellaufschluss von Fruchtkörpern des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus*

Der Aufschluss von Fruchtkörpern wurde analog zum Zellaufschluss für die SDS-PAGE (s. 2.11.2.1) durchgeführt. 3 g Fruchtkörper wurden zum Aufschluss eingesetzt und anschließend in 6 mL Puffer resuspendiert. Die aufgeschlossenen Fruchtkörper wurden zur Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7.3) und als Probe zur SDS-PAGE (s. 2.14.2) eingesetzt.

2.11.3 Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax

2.11.3.1 Zellaufschluss für die SDS-PAGE

3 g Pilzmyzel wurden in ein 50 mL Falcon™ Tube eingewogen, mit 3 mL TRIS-HCl-Puffer versetzt und mittels Ultra-Turrax (15 600 U min⁻¹, 5 min) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Das aufgeschlossene Myzel wurde als Probe zur SDS-PAGE (s. 2.14.2) eingesetzt.

2.11.3.2 Zellaufschluss für die Transformation von (+)-Valencen

Der Aufschluss erfolgte analog zum Zellaufschluss für die SDS-PAGE (s. 2.11.3.1), jedoch wurden 3 g Myzel eingesetzt und mit 6 mL Puffer resuspendiert. Das aufgeschlossene Myzel wurde zur Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7.3) eingesetzt.

2.11.4 Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle

50 g Pilzmyzel wurden mit 100 mL TRIS-HCl-Puffer versetzt und mittels Ultra-Turrax unter Eiskühlung homogenisiert (14 min, 15 600 U min⁻¹). Die Pilzsuspension wurde in der Rührwerkskugelmühle kontinuierlich zirkulierend aufgeschlossen (insgesamt 20 min). Alle 5 min wurden 4 mL Probe in Eppendorf Cups (2 mL) abgefüllt. Der Aufschluss verlief mit 55 mL Mahlperlen (\varnothing 0,75 mm, 2000 U min⁻¹) unter ständiger Kühlung. Die erhaltenen Proben wurden anschließend direkt als Probe zur SDS-PAGE (s. 2.14.2) und zur Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7.3) eingesetzt.

2.12 Bestimmung der Kulturparameter von Basidiomyceten

2.12.1 Bestimmung der Biofeuchtmasse

Die Bestimmung der Biofeuchtmasse erfolgte gravimetrisch. Ca. 20 g frisch geerntetes Pilzmyzel (s. 2.8.8) wurden in ein Falcon™ Tube (50 mL) eingewogen, zentrifugiert (10 min, 4000 U min⁻¹, 3720×g, 4 °C) und der Kulturüberstand entfernt. Die Zellmasse wurde dreimal mit je 25 mL VE-Wasser gewaschen und anschließend ausgewogen.

2.12.2 Bestimmung der Trockenmasse

Die Trockenmasse wurde mit Hilfe eines Feuchtebestimmers (Tab. 2.13) aus der gewaschenen Zellmasse (s. 2.12.1) ermittelt. Dazu wurden ca. 0,2 g Biofeuchtmasse mittels Feuchtebestimmer (105 °C) getrocknet und die Trockenmasse bzw. der Wassergehalt gravimetrisch bestimmt. Die Bestimmung der Trockenmasse von Fruchtkörpern und Lyophilisat erfolgte analog dazu.

2.13 Proteinbiochemische Arbeiten

2.13.1 Konzentrierung und Umpufferung

Für Konzentrierung und Umpufferung von Volumina bis 200 mL wurden je nach Probenvolumen Macrosep[®]-, Microsep[™]- oder Nanosep[®]-Zentrifugationseinheiten (Pall GmbH, Dreieich) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Sie wurden vor der ersten Verwendung dreimal mit VE-Wasser gespült und zentrifugiert (4500 U min^{-1} , $4270 \times g$, 4 °C).

2.13.2 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Zur Proteinreinigung bzw. Ermittlung des Molekulargewichts wurden folgende Geräte eingesetzt (Tab. 2.15).

Tabelle 2.15: Verwendete Geräte

	Ionenaustauschchromatographie	Gelfiltrationschromatographie
Gerät:	BioLogic DuoFlow (Bio-Rad)	Merck Hitachi s. 2.6 (Darmstadt)
Detektion:	Extinktionsmessung bei 280 nm	Extinktionsmessung bei 280 nm
Fraktionssammler:	BioLogic BioFrac fraction collector (Bio-Rad)	—
Datenaufnahme:	BioLogic DuoFlow Version 5.10 (Bio-Rad)	Clarity™ Version 3.0.6.589 (Firma DataApex, Prag)

2.13.2.1 Vorversuche zur Zweistufenreinigung unter Verwendung der Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Die in vorangegangenen Arbeiten (Scheibner 2006; Hülsdau 2007) etablierten Reinigungen von MsP1 aus *Mycetinis scorodonius* wurden auf das rekombinante MsP1 (s. 2.1) übertragen und dahingehend modifiziert, dass die 2. Reinigungsstufe ebenfalls mittels Ionenaustauschchromatographie erfolgte. Für die Übertragung und Optimierung der Reinigungsstrategie wurden Testsäulen aus dem HiTrap IEX Selection Kit (Tab. 2.5) verwendet. Zur Zweistufenreinigung wurde ein schwacher Anionentauscher als 1. Reinigungsstufe (Tab. 2.16) mit einem starken Anionentauscher als 2. Reinigungsstufe kombiniert (Tab. 2.17). Das Säulenvolumen betrug 1 mL, die Bindungskapazität jeweils 40 mg mL^{-1} . Die Säulen wurden mit einer Flussrate von 1 mL min^{-1} betrieben. Die Beladung der Säulen erfolgte mit Hilfe einer 2 mL Probenaufgabeschleife. Während des gesamten Laufes wurden unter Einsatz des Fraktionssammlers 1 mL Fraktionen gesammelt. Der Nachweis des Zielproteins in den gesammelten Fraktionen sowie die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mittels ABTS- und Bradford-Assay (s. 2.13.9.2 und 2.13.3.1).

Tabelle 2.16: Parameter der 1. Reinigungsstufe des Vorversuchs

Säule	HiTrap DEAE-FF
Säulenmaterial	DEAE Sepharose Fast Flow (schwacher Anionenaustauscher)
Säulenvolumen	1 mL
Probenschleife	2 mL
Flussrate	1 mL min ⁻¹
Fraktionsgröße	1 mL (von 3–43 mL)
Startpuffer	50 mM Natriumacetat pH 6,0 (Pumpe A)
Elutionspuffer	50 mM Natriumacetat pH 6,0 + 1 M NaCl (Pumpe B)
Probe	MsP1-haltiger Kulturüberstand von <i>A. niger</i> (s. 2.1); konzentriert und umgepuffert auf den Startpuffer (s. 2.13.1)

Methode:

1. UV-Lampe an
2. Autozero
3. Startpuffer (1,0 mL)
4. Injektion der Probe (2,0 mL); Spülen der Probenschleife mit Startpuffer (2,0 mL)
5. Startpuffer (12,0 mL)
6. Linearer Gradient über 2,0 mL von 0% zu 10% Elutionspuffer
7. 10% Elutionspuffer (20,6 mL)
8. Linearer Gradient über 4,4 mL von 10% zu 100% Elutionspuffer
9. 100% Elutionspuffer (10 mL)
10. Linearer Gradient über 10 mL von 100% zu 0% Elutionspuffer

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und auf den Startpuffer der 2. Reinigungsstufe umgepuffert (s. 2.13.1). Anschließend erfolgte die 2. Reinigungsstufe (Tab. 2.17).

Tabelle 2.17: Parameter der 2. Reinigungsstufe des Vorversuchs

Säule	HiTrap Q-FF
Säulenmaterial	Q Sepharose Fast Flow (starker Anionenaustauscher)
Säulenvolumen	1 mL
Probenschleife	2 mL
Flussrate	1 mL min ⁻¹
Fraktionsgröße	1 mL (von 3–43 mL)
Startpuffer	50 mM Natriumacetat pH 6,0 (Pumpe A)
Elutionspuffer	50 mM Natriumacetat pH 6,0 + 1 M NaCl (Pumpe B)

Die Abfolge der Methode war analog zur 1. Reinigungsstufe. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und auf 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 umgepuffert (s. 2.13.1). Das gereinigte MsP1 wurde aliquotiert, mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.13.2.2 Scale up der Zweistufenreinigung mittels IEX

Um größere Mengen des rekombinanten Enzyms zu reinigen, wurde eine Maßstabsvergrößerung vorgenommen, bei der die Beladung der Säule über das Umschaltventil an Pumpe A (Position 4) erfolgte. Die 2. Reinigungsstufe wurde dahingehend verändert, dass eine selbstgepackte Säule mit Säulenmaterial höherer Trennleistung (Q-HP) verwendet wurde. Die Flussrate wurde auf 3 mL min^{-1} erhöht (Tab. 2.18). Während des gesamten Laufes wurden unter Einsatz des Fraktionssammlers Fraktionen unterschiedlicher Volumina gesammelt. Der Nachweis des Zielproteins in den gesammelten Fraktionen sowie die Messung der Konzentration erfolgte mittels ABTS- und Bradford-Assay (s. 2.13.3.1 und 2.13.9.2).

Tabelle 2.18: Parameter der 1. Reinigungsstufe des *Scale up*

Säule	HiPrep DEAE-FF 16/10 (Tab. 2.5)
Säulenmaterial	DEAE Sepharose Fast Flow (schwacher Anionenaustauscher)
Säulenvolumen	20 mL
Bindungskapazität	110 mg mL^{-1}
Probenaufgabe	über Pumpe A (Position 4)
Flussrate	3 mL min^{-1}
Fraktionsgröße	4 mL (von 80–380 mL)
Startpuffer	50 mM Natriumacetat pH 6,0 (Pumpe A, Position 2)
Elutionspuffer	50 mM Natriumacetat pH 6,0 + 1 M NaCl (Pumpe B)
Reinigungspuffer	50 mM Natriumacetat pH 6,0 + 2 M NaCl (Pumpe A, Position 3)
Probe	MsP1-haltiger Kulturüberstand von <i>A. niger</i> (s. 2.1); konzentriert und umgepuffert auf den Startpuffer (s. 2.13.1)

Methode:

1. UV-Lampe an
2. Autozero
3. Startpuffer (2,0 mL)
4. Injektion der Probe (6,0 mL)
5. Startpuffer (85,0 mL)
6. Linearer Gradient über 40,0 mL von 0% zu 10% Elutionspuffer
7. 10% Elutionspuffer (165,0 mL)
8. Linearer Gradient über 88,0 mL von 10% zu 100% Elutionspuffer
9. 100% Elutionspuffer (54,0 mL)
10. Linearer Gradient über 40,0 mL von 0% zu 100% Reinigungspuffer
11. Linearer Gradient über 60,0 mL von 0% zu 100% Startpuffer

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und auf den Startpuffer der 2. Reinigungsstufe umgepuffert (s. 2.13.1). Anschließend erfolgte die 2. Reinigungsstufe (Tab. 2.19).

Tabelle 2.19: Parameter der 2. Reinigungsstufe des *Scale up*

Säule	selbstgepackte XK 26/20 Column (Tab. 2.5)
Säulenmaterial	Q-Sepharose-High-Performance (starker Anionenaustauscher)
Säulenvolumen	20 mL
Bindungskapazität	0,14–0,20 mmol mL ⁻¹
Probenaufgabe	über Pumpe A (Position 4)
Flussrate	3 mL min ⁻¹
Fraktionsgröße	2 mL (von 79–89 mL), 1,5 mL (von 89–248 mL)
Startpuffer	50 mM Natriumacetat pH 6,0 (Pumpe A (Position 2))
Elutionspuffer	50 mM Natriumacetat pH 6,0 + 1 M NaCl (Pumpe B)
Reinigungspuffer	50 mM Natriumacetat pH 6,0 + 2 M NaCl (Pumpe A (Position 3))

Die Abfolge der Methode war analog zur 1. Reinigungsstufe. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und auf 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 umgepuffert (s. 2.13.1). Das gereinigte MsP1 wurde aliquotiert, mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert. Ein Teil des gereinigten MsP1 wurde auf Reinstwasser umgepuffert, nach 2.11.1 gefriergetrocknet und als Standard für die Proteinquantifizierung (s. 2.13.3) eingesetzt. Alle folgenden Messungen, wie die Bestimmung der Optima und der kinetischen Parameter oder die Immobilisierung, wurden mit dem reinen Enzym vorgenommen.

2.13.2.3 Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Die GFC wurde für die Bestimmung des nativen Molekulargewichts der gereinigten Peroxidase MsP1 eingesetzt (Tab. 2.20).

Tabelle 2.20: Parameter der Bestimmung des Molekulargewichts

Säule	Superdex 200 10/300 (Tab. 2.5)
Säulenmaterial	Superdex 200 (Trennbereich 10–600 kDa)
Säulenvolumen	24 mL
Probenschleife	200 μL
Flussrate	0,5 mL min^{-1}
Elutionspuffer	50 mM Natriumacetat pH 3,5 + 100 mM NaCl
Probe	gereinigtes MsP1 (s. 2.13.2.2) 1:100 mit Elutionspuffer verdünnt

Methode:

1. UV-Lampe an
2. Autozero
3. Injektion der Probe
4. Elutionspuffer (25,0 mL)

Für die Bestimmung des Molekulargewichts wurden die folgenden Proteinmolekulargewichtsstandards (s. 2.4.4 und 2.5.1) jeweils im Elutionspuffer gelöst und injiziert (Tab. 2.21).

Tabelle 2.21: Verwendete Proteinmolekulargewichtsstandards, Konzentrationen, Molekulargewichte und die eingesetzten Mengen

Standard	Konzentration in mg mL^{-1}	Molekulargewicht in kDa	eingesetzte Menge in μL
Thyroglobulin	4	669,0 / 1338,0	50
Apoferritin	1,7	443,0	50
Ovalbumin	1,7	42,8 / 85,6	50
Rinderserumalbumin (BSA)	3,6	66,5 / 133,0	50
Carboanhydrase	1,7	29,0	50
Cytochrom c	2,0	12,4	50

Die Retentionskoeffizienten K_{av} der Standardproteine wurde mittels folgender Gleichung berechnet:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (2)$$

- K_{av} : Retentionskoeffizient
 V_e : Elutionsvolumen des Referenzproteins in mL
 V_0 : Ausschlussvolumen in mL
 V_t : Gesamtvolumen der Säule mL

Die ermittelten Retentionskoeffizienten wurden gegen die Logarithmen der Molekulargewichte aufgetragen und eine Kalibriergerade mittels linearer Regression erstellt. Die Bestimmung des Ausschlussvolumens erfolgte mit dem Standardprotein Thyroglobulin, da ein Teil dieses Proteins als Dimer (Molekulargewicht: 1338 kDa) von der Säule eluiert. Dieses Molekulargewicht liegt außerhalb des Trennbereichs der Säule, so dass das Elutionsvolumen des Dimers dem Ausschlussvolumen der Superdex 200-Säule entspricht (Scheibner 2006).

2.13.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.13.3.1 Proteinquantifizierung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die kommerziell erhältliche Lösung Roti-Nanoquant verwendet, die auf einer Modifikation der Proteinbestimmung nach Bradford 1976 beruht. 50 µl Probe wurden mit 200 µl Arbeitslösung Roti-Nanoquant (1:5-Verdünnung des Roti-Nanoquant-5x-Konzentrats mit Reinstwasser) versetzt und gemischt. Die Extinktionen wurden bei 590 nm und 450 nm gegen Wasser als Referenz bestimmt. Die Regressionsgerade wurde durch Auftragung des Quotienten der Extinktionen_{590 nm/450 nm} von BSA-Standardlösungen in Reinstwasser (0–200 µg mL⁻¹) gegen den Proteingehalt erhalten. Proteinquantifizierungen des Enzyms MsP1 erfolgten mit einer Standardlösung aus gefriergetrocknetem MsP1 (s. 2.13.2.2). Für Proben, die Natriumacetat-Puffer enthielten (s. 2.13.9.1), wurde für die BSA-Standardlösungen und für die MsP1-Standardlösungen statt Reinstwasser ebenfalls dieser Puffer verwendet.

2.13.3.2 Photometrische Proteinquantifizierung

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde die Absorption bei 280 nm photometrisch gemessen. Dafür wurden 2 µL Proteinlösung in einem NanoPhotometer™ (Tab. 2.13) analysiert. Mit Hilfe des Lambert–Beerschen Gesetzes wurde die Konzentration des Proteins mit folgender Gleichung berechnet:

$$E_{280} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3)$$

E_{280} : Extinktion

ε : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

c : Konzentration in mol L^{-1}

d : Schichtdicke in cm

Dabei wurde der molare Extinktionskoeffizient mit dem bioinformatischen ProtParam Tool des *Expert Protein Analysis Systems* (ExPASy)¹⁸ bestimmt (Tab. 2.14). Für MsP1 wurde ein molarer dekadischer Extinktionskoeffizient $\varepsilon = 53\,065 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 280 nm berechnet.

2.13.4 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren von MsP1 wurden im Bereich von 250 bis 550 nm sowohl in Wasser als auch in 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 aufgenommen.

2.13.5 Bestimmung der Reinheitszahl

Die Bestimmung der Reinheitszahl (RZ) erfolgte nach Theorell und Maehly (1950) durch die Messung der Extinktion bei den Wellenlängen 280 nm und 406 nm¹⁹ und die anschließende Bildung des Quotienten der Extinktionen (Gleichung 3).

Dafür wurden 2 µL Proteinlösung in einem NanoPhotometer™ Pearl (Tab. 2.13) analysiert.

$$RZ = \frac{E_{406}}{E_{280}} \quad (4)$$

2.13.6 Ermittlung der Kristallstruktur von MsP1

Das gereinigte MsP1 wurde zur Kristallisation und anschließender Röntgenstrukturanalyse an den Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Becker (Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen) gegeben.

¹⁸Schweizer Institut für Bioinformatik (SIB)

¹⁹Absorptionsmaxima des rekombinanten MsP1 siehe 3.6.5

2.13.7 Transformation von (+)-Valencen

Die Identifizierung und anschließende Quantifizierung des Transformationsproduktes (+)-Nootkaton erfolgte mittels Gaschromatographie (GC) (Tab. 2.22 und Tab. 2.23).

Tabelle 2.22: Parameter des Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID-ALS) mit polarer Trennsäule

Gaschromatograph	Agilent 7890A (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen)
Injektor	7683B Series Injector (split/splitless) (Agilent Technologies), 250 °C
Detektion	Flammenionisationsdetektor (FID), 250 °C, H ₂ 40 mL min ⁻¹ , Luft 400 mL min ⁻¹ , N ₂ 25 mL min ⁻¹
Trennsäule	HP-Innowax, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Agilent Technologies J&W Scientific)
Injektionsvolumen	1,0 µL
Trärgas	H ₂ , Fluss: 2,0 mL min ⁻¹ (konstant)
Datenaufnahme	Chemstation B.04.01 (Agilent Technologies)
Temperaturprogramm	100 °C (2 min), 5 °C min ⁻¹ auf 150 °C (0 min), 3 °C min ⁻¹ auf 200 °C (0 min), 30 °C min ⁻¹ auf 235 °C (10 min)

Tabelle 2.23: Parameter des Gaschromatographen mit massenselektivem Detektor (GC-MS)

Gaschromatograph	Agilent Technologies 7890A GC System
Injektor	cold on-column
Trennsäule	J&W Scientific HP Innowax, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Detektor	Agilent 5975C MSD Triple-Axis-Detektor
Trärgas	He, Fluss 1,2 mL min ⁻¹ (konstant)
Temperaturen	Ionenquelle: 220 °C, Interface: 240 °C, Quadrupol: 150 °C
Ionisation	Elektronenstoßionisation
Massenbereich m/z	33-300
Datenaufnahme	MSD Chemstation E.02.00.493
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 240 °C (11 min)

2.13.7.1 Bestimmung des Response-Faktors von (+)-Nootkaton

Zur Ermittlung des Response-Faktors wurden drei Standardlösungen von (+)-Nootkaton angesetzt; Thymol diente dabei als Interner Standard (IS).

Die Konzentrationen der Standardlösungen an (+)-Nootkaton betragen $75 \mu\text{g mL}^{-1}$, $37,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $18,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ jeweils mit $45,07 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thymol gelöst in Pentan/Diethylether (1:1,12 v/v). Die Messung erfolgte mittels GC-FID-ALS jeweils in Dreifachbestimmung (Tab. 2.22).

Berechnung des Response-Faktors R_f :

$$R_f = \frac{M_A \cdot A_{IS}}{M_{IS} \cdot A_A} \quad (5)$$

M_A : Masse Analyt in mg

M_{IS} : Masse Interner Standard in mg

A_A : Peakfläche Analyt in pA s

A_{IS} : Peakfläche Interner Standard in pA s

2.13.7.2 Transformation mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus*

Die Transformation von (+)-Valencen wurde in Schraubdeckelgläschen (4 mL) in horizontaler Lage durchgeführt (150 U min^{-1} , $16 \text{ }^\circ\text{C}$, 16 h). Diese wurde durch Zugabe von $2 \mu\text{L}$ (+)-Valencen ($8,20 \mu\text{mol}$) zu 50 mg Lyophilisat (s. 2.11.1 und 2.11.1.2) in 1,5 mL 50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5 gestartet. Für die Extraktion wurden die Proben direkt in dem verwendeten Schraubdeckelgläschen (4 mL) mit $100 \mu\text{L}$ internem Standard (750 mg L^{-1} Thymol in Pentan/Diethylether, 1:1,12 v/v) und 2 mL Pentan/Diethylether (1:1,12; v/v) versetzt. Anschließend wurde 30 s gevortext, 10 min horizontal geschüttelt (150 U min^{-1}), die organische Phase nach Zentrifugation (10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 4000 U min^{-1} , $3720 \times g$) über Natriumsulfat getrocknet und gaschromatographisch untersucht (Fraatz 2007).

2.13.7.3 Transformation mit aufgeschlossenem Pilzmyzel und Fruchtkörpern

Die Transformation von (+)-Valencen mit aufgeschlossenem Pilzmyzel und Fruchtkörpern erfolgte analog zur Transformation mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* (s. 2.13.7.2). Dazu wurden 1,5 mL Pilzsuspension (s. 2.11) in einem 4 mL Glasvial mit $2 \mu\text{L}$ (+)-Valencen ($8,2 \mu\text{mol}$) versetzt.

2.13.7.4 Transformation nach isoelektrischer Fokussierung

In einem Schraubdeckelgläschen (4 mL) wurden 1,5 mL Probenlösung aus den einzelnen Fraktionen (s. 2.14.5.2) mit 0,02 g Natriumcholat sowie $2 \mu\text{L}$ (+)-Valencen versetzt. Die weiteren Schritte erfolgten analog zur Transformation mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* (s. 2.13.7.2).

2.13.7.5 Transformation mit der rekombinanten Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

Für den Transformationsansatz wurden 50 µL Gesamtzellextrakt bzw. Zellpellet (s. 2.1 und 2.10.7), 3 mg Natriumcholat, 11 mM Eisen(III)-chlorid, 2 µL (+)-Valencen sowie 1,45 mL 50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5 in einem Schraubdeckelgläschen (4 mL) gemischt und inkubiert (16 Stunden, 24 °C, 150 U min⁻¹). Die Positivkontrolle setzte sich aus 50 mg Lyophilisat von *Pleurotus sapidus*, 1,5 mL 50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5, 3 mg Natriumcholat und 2 µL (+)-Valencen zusammen. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zur Transformation mit Lyophilisaten von PSA (s. 2.13.7.2).

2.13.7.6 Chemikalienblindwert und Negativkontrolle

Der chemische Blindwert und die Negativkontrolle wurden analog zu den jeweiligen Transformationsversuchen (s. 2.13.7.2 und 2.13.7.5) parallel durchgeführt. Bei dem chemischen Blindwert wurde lediglich auf die Zugabe der entsprechenden Probenlösung (z. B. Lyophilisat, Pilzsuspension, Gesamtzellextrakt) verzichtet; die Probenlösung wurde durch das entsprechende Volumen des verwendeten Puffers ersetzt. Bei der Negativkontrolle wurde die entsprechende Probenlösung durch Hitzebehandlung (10 min, 100 °C) inaktiviert und anschließend zur Transformation eingesetzt.

2.13.8 Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität

Die Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität basiert auf Messung der Extinktion von konjugierten Dienen, die während der Inkubation von Linolsäure mit Lipoxygenasen gebildet werden. Der Assay wurde nach Daglia *et al.* (2005) bei einer Wellenlänge von 234 nm durchgeführt. Der enzymhaltige Gesamtzellextrakt von *Hansenula polymorpha* (s. 2.1 und 2.10.7) wurde vor der Messung mit 2 mg Natriumcholat versetzt, dreimal 15 s gevortext und anschließend zentrifugiert (2 min, 4 °C, 14 000 U min⁻¹, 14 565 × g). Als Positivkontrolle wurde eine Lipoxygenase (s. 2.1) mit einer Aktivität von 100 U mL⁻¹ in 50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5 verwendet. Als Vergleichsprobe wurden 50 mg Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* (s. 2.11.1) mit 3 mg Natriumcholat in 1,5 mL 50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5 rehydratisiert (15 min, 24 °C, 150 U min⁻¹) und anschließend zentrifugiert (4000 U min⁻¹, 3720 × g, 10 min). Der verdünnte Überstand (1:10, 50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5) wurde daraufhin im Enzymassay eingesetzt (Riemer 2010).

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Substrat-Stammlösung

Linolsäure	19 μL
0,01% (v/v) Tween [®] 20	20 μL
Reinstwasser	5 mL
1 M NaOH	500 μL

Substrat-Arbeitslösung

Substrat-Stammlösung	110 μL
50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5	ad 4 mL

Referenz

0,01% (v/v) Tween [®] 20	20 μL
Reinstwasser	5,019 mL
1 M NaOH	500 μL

50 μL Probenlösung wurden in einer Quarzküvette für 3 min im temperierbaren Küvettenhalter des Photometers (Tab. 2.13, Software WinAspect 2.2.1.0) auf 25 °C vorgewärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 950 μL Substrat-Arbeitslösung gestartet und die Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 234 nm über einen Zeitraum von 10 min verfolgt. Die mögliche Bildung von Hydroperoxiden während der Inkubation ohne Enzymzugabe wurde durch die Messung der Blindprobe ermittelt und vom Messergebnis der Probe subtrahiert. Die Blindprobe setzte sich aus 50 μL 50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5 und 950 μL Substrat-Arbeitslösung zusammen. Alle Messungen von Proben und Blindproben erfolgten gegen die Referenz.

Die Lipoxygenaseaktivität A in $\text{U L}^{-1} \text{ } ^{20}$ wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$A = \frac{\dot{E}_{234} \cdot V_g}{V_p \cdot d \cdot \varepsilon} \cdot 10^6 \quad (6)$$

\dot{E}_{234} :	Extinktionsänderung in min^{-1}
V_g :	Gesamtvolumen in der Küvette in mL
V_p :	Probenvolumen in mL
d :	Schichtdicke der Küvette 1 cm
ε_{234} :	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von Linolsäurehydroperoxiden in 25 000 $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

²⁰1 U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$

2.13.9 Photometrische Enzymassays zur Messung der Aktivität von MsP1

2.13.9.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffer nach McIlvaine (1921)

Für die Herstellung des Puffers wurden eine 0,1 M Citronensäure- und eine 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung verwendet. Je nach gewünschtem pH-Wert des Puffers wurden die beiden Lösungen zu unterschiedlichen Anteilen gemischt. Aus dem Mischungsverhältnis ergeben sich die Konzentrationen an Citronensäure und an Dinatriumhydrogenphosphat in den resultierenden Pufferlösungen (Tab. 2.24). Bei Bedarf wurde die Konzentration der Pufferlösung durch Verdünnen mit Wasser eingestellt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde dieser Puffer als McIlvaine-Puffer bezeichnet.

Tabelle 2.24: Citronensäure/Phosphat-Puffer

pH	Citronensäure (0,1 M)		Na_2HPO_4 (0,2 M)	
	Volumen in mL	Konzentration in mM	Volumen in mL	Konzentration in mM
2,2	98,80	99	1,20	2
2,5	92,25	92	7,75	16
3,0	80,30	80	19,70	39
3,5	70,20	70	29,80	60
4,0	62,00	62	38,00	76
4,5	55,05	55	44,95	90
5,0	49,00	49	51,00	102
5,5	43,45	43	56,55	113

Citronensäure/ K_2HPO_4 -Puffer

Die Herstellung dieses Puffers erfolgte analog zu der des McIlvaine-Puffers; anstelle der Dinatriumhydrogenphosphatlösung (0,2 M) wurde jedoch eine Dikaliumhydrogenphosphatlösung (0,2 M) verwendet. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde dieser Puffer als K-McIlvaine-Puffer bezeichnet.

Natriumacetat-Puffer

Für die Herstellung des Puffers wurden 1 M Essigsäure- und 1 M Natriumacetatlösung verwendet. Je nach gewünschtem pH-Wert des Puffers wurden die beiden Lösungen zu unterschiedlichen Anteilen gemischt. Die Konzentration der Pufferlösung wurde anschließend durch Verdünnen mit Wasser eingestellt.

Kaliumacetat-Puffer

Die Herstellung dieses Puffers erfolgte analog zu der des Natriumacetat-Puffers; anstelle der 1 M Natriumacetatlösung wurde jedoch eine 1 M Kaliumacetatlösung verwendet.

Natriumtartrat-Puffer

Für die Herstellung des 100 mM Natriumtartrat-Puffers wurden 100 mM Weinsäure- und 100 mM Natriumtartratlösung verwendet. Je nach gewünschtem pH-Wert des Puffers wurden die beiden Lösungen zu unterschiedlichen Anteilen gemischt.

HCl/Glycin-Puffer

Für die Herstellung des 100 mM HCl/Glycin-Puffers wurden 100 mM Glycin-, 100 mM Natriumchlorid- und 100 mM Salzsäurelösung verwendet. Je nach gewünschtem pH-Wert des Puffers wurden die beiden Lösungen (Lösung A: 100 mM Glycin- und 100 mM Natriumchloridlösung; Lösung B: 100 mM Salzsäurelösung) zu unterschiedlichen Anteilen gemischt.

Wässrige β -Carotin-Stammlösung

5 mg β -Carotin und 0,5 g Tween[®] 80 wurden in einem 250 mL Rundkolben in Dichlormethan gelöst. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer weitgehend entfernt (40 °C, 250 U min⁻¹, 800 mbar, 20 min). Zum Rückstand wurden 30 mL Reinstwasser gegeben. Reste von Dichlormethan wurden am Rotationsverdampfer (40 °C, 250 U min⁻¹, von 800 auf 200 mbar in 200 mbar Schritten, jede Stufe 15 min) und im N₂-Strom entfernt. Die Emulsion wurde in einen 50 mL Messkolben filtriert und mit Reinstwasser bis zur Marke aufgefüllt. Bei Lagerung im Dunkeln bei max. 4 °C war die Emulsion ca. 1 Woche haltbar (Scheibner 2006).

Wässrige Bixin-Stammlösung

Für die Bixinlösung wurden 15 mg Bixin und 0,5 g Tween[®] 80 verwendet. Die Herstellung der Lösung erfolgte analog zur Herstellung der β -Carotinlösung.

Weitere Substratstammlösungen

Alle weiteren eingesetzten Substratstammlösungen sind mit Abkürzung, Konzentration und dem Lösungsmittel in der Tab. 2.25 aufgeführt.

Tabelle 2.25: Sonstige eingesetzte Substratlösungen

Substrat	Abkürzung	Konzentration in μM	gelöst in
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz	ABTS	2000	Reinstwasser
Annatto (wässrig, alkalischer Extrakt)	—	64	Reinstwasser
Reactive Black 5	RBlack 5	100	Reinstwasser
Reactive Blue 5	RBlue 5	500	Reinstwasser
Veratrylalkohol	VA	12 500	Ethanol
2,6-Dimethoxyphenol	DMP	5000	Ethanol
Mangansulfat	MnSO_4	20 000	Reinstwasser
1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-propan-1,3-diol	Adlerol	160 000	Ethanol
Guajakol	—	20 000	Ethanol
Wasserstoffperoxid ²¹	H_2O_2	1400	Reinstwasser

2.13.9.2 Übersicht der verwendeten Assays, allgemeines Pipettierschema und Berechnung der Enzymaktivität

Die Enzymassays²² wurden entweder mit enzymhaltigen Kulturüberstand von *Aspergillus niger* oder mit gereinigtem MsP1 durchgeführt. Als Puffer wurde 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 eingesetzt, der gegebenenfalls durch spätere Messungen bzw. Optimierungen (s. 2.13.9.3) den verschiedenen Substraten angepasst wurde. In Anlehnung an Tien und Kirk (1988) wurde der VA-Assay mit 100 mM Natriumtartrat-Puffer bei pH 2,5 durchgeführt.

²¹Die Konzentration wurde nach Messung der optimalen H_2O_2 -Konz. auf 500 μM herabgesetzt.

²²Die Assays wurden in den folgenden Kapiteln nach den eingesetzten Substraten bezeichnet.

Die Endkonzentration des Substrates im Reaktionsansatz des verwendeten Assays, der molare dekadische Extinktionskoeffizient der Messgröße und die jeweils verwendete Wellenlänge sind in Tabelle 2.26 aufgeführt.

Tabelle 2.26: Parameter der verwendeten Enzymassays: verwendetes Substrat und dessen Konzentration im Reaktionsansatz des Assays (Endkonz.), Messgröße und deren molarer dekadischer Extinktionskoeffizient, Wellenlänge, Referenz (modifiziert)

Substrat	Endkonz. in μM	Messgröße	Extinktionskoeff. in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Wellenlänge in nm	Referenz
ABTS	500,0	ABTS- Radikalkation	36 000	420	nach Eggert <i>et al.</i> (1996)
β -Carotin	24,5	β -Carotin	95 000	450	nach Ben Aziz <i>et al.</i> (1971)
Bixin	16,5	Bixin	136 100	465	nach Hülsdau (2007)
Annatto	16,0	Norbixin ²³	108 400	452	nach Scotter <i>et al.</i> (1998)
VA	1250,0	Veratrumaldehyd	9300	310	nach Tien und Kirk (1988)
DMP	500,0	2,2',6,6'-Tetra- methoxydibenzo- 1,1'-dichinon	27 500 ²⁴	469	nach Saparrat <i>et al.</i> (2002)
Guajakol	2000,0	Tetraguajakol ²⁵	26 600	470	nach Chance und Maehly (1955)
RBlack 5	25,0	Reactive Black 5	37 200	598	nach Sugano <i>et al.</i> (2006)
RBlue 5	125,0	Reactive Blue 5	8000	600	nach Sugano <i>et al.</i> (2006)

Das allgemeine Pipettierschema (Tab. 2.27) wurde für alle Assays verwendet. Die Messung der Extinktion erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mittels Mikroplattenleser (Tab. 2.13, Software Gen5 1.07).

Tabelle 2.27: Allgemeines Pipettierschema

	ABTS-, β -Carotin-, Bixin-, Annatto-, RBlack/Blue 5-Assay		VA-, DMP-, Guajakol-Assay	
	mit H_2O_2	ohne H_2O_2	mit H_2O_2	ohne H_2O_2
Probe	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL
Puffer	80 μL	80 μL	110 μL	110 μL
Substrat	50 μL	50 μL	20 μL	20 μL
H_2O_2	50 μL	—	50 μL	—
H_2O	—	50 μL	—	50 μL
Gesamtvolumen	200 μL			

²³Die verwendete Annattolösung wurde durch alkalisch wässrige Extraktion erhalten. Hauptbestandteil: Natriumsalz des Norbixins

²⁴Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von 2,6-Dimethoxyphenol.

²⁵Auf Grund der Stöchiometrie des Substrates (Edukt) zur Messgröße (Produkt) von 4:1 wurde bei der Berechnung der Enzymaktivität der Faktor 4 einbezogen.

Die Reaktion wurde entweder durch Zugabe des Substrates oder durch Zugabe von H_2O_2 gestartet. Die Extinktion wurde anschließend über einen Zeitraum von 10 min bei den entsprechenden Wellenlängen (Tab. 2.26) gemessen. Als Proben wurden konzentrierter Kulturüberstand (s. 2.1 und 2.13.1) und gereinigtes MsP1 (s. 2.13.2.2) eingesetzt. Die Konzentration der Proben wurden den entsprechenden Assays angepasst, sodass die Extinktionsänderung \dot{E}_λ $0,015\text{--}0,150\text{ min}^{-1}$ betrug. Zusätzlich wurden Kontrollen gemessen, bei denen die Enzymlösung (Probe) entweder durch Puffer oder durch desaktiviertes Enzym (abgekochte Probenlösung) ersetzt wurde.

Die Enzymaktivität A wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$A = \frac{\dot{E}_\lambda \cdot V_g}{V_p \cdot d \cdot \varepsilon} \cdot 10^6 \cdot F \quad (7)$$

- A : Enzymaktivität in U L^{-1} ²⁶
 \dot{E}_λ : Extinktionsänderung in min^{-1}
 V_g : Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes in μL
 V_p : Probevolumen in μL
 d : Schichtdicke $0,64\text{ cm}$ ²⁷
 F : Verdünnungsfaktor
 ε : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient in $\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$

2.13.9.3 Bestimmung des optimalen Puffers und pH-Wertes

Für die Bestimmung des optimalen Puffers und pH-Wertes wurde gereinigtes MsP1 (s. 2.13.2.2) mit verschiedenen Pufferlösungen (s. 2.13.9.1) verdünnt. Die Aktivität des Enzyms wurde in den entsprechenden Puffern verfolgt (s. 2.13.9.2).

2.13.9.4 Bestimmung der optimalen Pufferkonzentration

Reines MsP1 (s. 2.13.2.2) wurde mit Pufferlösungen unterschiedlicher Konzentrationen (s. 2.13.9.1) verdünnt. Die Enzymaktivität wurde mittels Assays (s. 2.13.9.2) in den entsprechenden Puffern gemessen.

²⁶ $1\text{ U} = 1\ \mu\text{mol min}^{-1}$

²⁷ Der Lichtweg in einer Vertiefung der 96er *Well*-Platte betrug bei einem Gesamtvolumen von $200\ \mu\text{L}$ $0,64\text{ cm}$.

2.13.9.5 Temperaturoptimum

Die Bestimmung des Temperaturoptimums von MsP1 erfolgte am vortemperierten Photometer (Tab. 2.13) mit vortemperierten Pufferlösungen. Die Messung wurde durch Zugabe von β -Carotin- bzw. ABTS-Lösung gestartet (Tab. 2.25). Aufgrund der eingesetzten Küvetten wich das Pipettierschema vom allgemeinen Pipettierschema der Enzymassays (Tab. 2.27) am Mikroplattenleser ab (Tab. 2.28).

Tabelle 2.28: Pipettierschema

	ABTS-Assay	β -Carotin-Assay
Probe	25,0 μ L	100 μ L
Puffer	100,0 μ L	950 μ L
Substrat	62,5 μ L	100 μ L
H ₂ O ₂	50 μ L	50 μ L
Gesamtvolumen	250 μ L	1200 μ L

2.13.9.6 Variation der Wasserstoffperoxidkonzentration

Zur Untersuchung des Wasserstoffperoxid-Einflusses auf die Enzymaktivität und zur Bestimmung der optimalen Wasserstoffperoxidkonzentration wurden dem Reaktionsansatz verschiedene Konzentrationen an Wasserstoffperoxid (Endkonzentration: 0–1,25 mM) zugesetzt. Dazu wurden entsprechende H₂O₂-Stammlösungen angesetzt (0–5 mM). Die Enzymaktivität von MsP1 wurde mittels ABTS- bzw. β -Carotin-Assay (s. 2.13.9.2) untersucht.

2.13.9.7 Anreicherung und Abreicherung von Sauerstoff

Durch 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 (100 mL) wurde mit einer Kerzenfritte mit der Porengröße 3 (16–40 μ m) Sauerstoff geleitet (Dauer: zweimal 15 min). Der so behandelte Puffer wurde zur Messung des ABTS- und β -Carotin-Assays (s. 2.13.9.2) mit gereinigtem MsP1 (2.13.2.2) ohne Zusatz von H₂O₂ (Tab. 2.27) eingesetzt. Zur Abreicherung des Sauerstoffs wurden 100 mL 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 für 1 h im Ultraschallbad entgast. Anschließend wurde der Kopfraum mit Stickstoff gesättigt. Der so behandelte Puffer wurde ebenfalls zur Messung der Enzymaktivität mittels ABTS- und β -Carotin-Assays mit gereinigtem MsP1 ohne Zusatz von H₂O₂ eingesetzt.

2.13.9.8 Untersuchung der Enzymstabilität

Die Untersuchung der Enzymstabilität wurde mit reinem MsP1 (s. 2.13.2.2) durchgeführt. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte mittels ABTS-Assay (s. 2.13.9.2).

Lagerstabilität der konzentrierten Enzymlösung

Zur Bestimmung der Lagerstabilität wurde die gereinigte Enzymlösung unverdünnt bei 4 °C, -20 °C und bei -80 °C für 10 Tage gelagert. Für die Lagerung bei -20 °C und -80 °C wurde das Enzym mittels flüssigen Stickstoff schockgefroren, um ein schnelles Einfrieren ohne Kristallbildung zu gewährleisten. Die Messung der Aktivität erfolgte mittels ABTS-Assay an den Tagen 1, 2, 5 und 10.

pH- und Lösungsmitteltoleranz unter Assaybedingungen

MsP1 wurden in entsprechenden Puffern bzw. 30%igem Ethanol vorverdünnt und bei 4 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden gelagert. Für die Messung der Enzymaktivität mittels ABTS-Assay wurden die Vorverdünnungen mit dem Messpuffer (300 mM Natriumacetatpuffer pH 3,0) nochmals verdünnt.

Temperaturstabilität unter Assaybedingungen

Die Enzymlösungen wurden mit 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0 vorverdünnt und bei 0 °C, 24 °C, 40 °C und 55 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden gelagert. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte nach Verdünnung mit 300 mM Natriumacetatpuffer pH 3,0 (Messpuffer) bei 30 °C mittels ABTS-Assay.

2.13.9.9 Salztoleranz

Die Messung der Aktivität von konzentriertem Kulturüberstand und reinem MSP1 mittels ABTS-Assay (s. 2.13.9.2) wurde bei 30 °C in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0 durchgeführt. Die Pufferlösung enthielt unterschiedliche Konzentrationen an NaCl (0–1 M).

2.13.9.10 Einfluss von Mangansulfat

Für die Untersuchung des Einflusses von Mangan(II)-sulfat auf die Enzymaktivität von gereinigtem MsP1 (2.13.2.2) gegenüber dem Substrat 2,6-Dimethoxyphenol wurden der Messlösung unterschiedliche Mengen an MnSO_4 zugesetzt (Wariishi *et al.* 1992). Die Messung der Enzymaktivität erfolgte mittels DMP-Assay (s. 2.13.9.2); abweichend wurden folgende Lösungen verwendet:

Stammlösungen von H_2O_2 und MnSO_4 in Wasser

H_2O_2	konstant 0,4 mM
MnSO_4	0–4 mM
Reinstwasser	ad 5 mL

Im Reaktionsansatz des Assays wurden anstelle des Wasserstoffperoxides 50 μL dieser Stammlösungen eingesetzt, sodass die Endkonzentration von H_2O_2 im Assay konstant 0,1 mM und die Endkonzentration von MnSO_4 0–1 mM betrug.

2.13.9.11 Oxidation von Mangan(II)-Ionen

Die Oxidation von Mangan(II)-Ionen (Mn^{2+}) durch MsP1 erfolgte nach Wariishi *et al.* 1992 in 100 mM Natriumtartrat-Puffer pH 4,5 (s. 2.13.9.1). Die Bildung von Mangan(III)-tartrat wurde über einen Zeitraum von 10 min mittels Photometer (Tab. 2.13) bei einer Wellenlänge von 290 nm und 30 °C gemessen. Gereinigtes MsP1, eine 0,4 mM Wasserstoffperoxidlösung (wässrig) und eine 20 mM Mangansulfatlösung (wässrig) wurden nach folgendem Pipettierschema zur Messung eingesetzt:

Tabelle 2.29: Pipettierschema

	Volumen	Endkonzentration
MsP1	5 μL	283 nM
Puffer	245 μL	49 mM
Substrat (MnSO_4)	25 μL	1 mM
H_2O_2	125 μL	100 μM
H_2O	100 μL	—
	500 μL	

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach Formel 7. Die Schichtdicke der UV-Küvette des Photometers betrug 1 cm und der molare dekadische Extinktionskoeffizient des Mangan(III)-tartrates 2860 $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.13.9.12 Umsetzung von Adlerol

Die Umsetzung von Adlerol durch MsP1 erfolgte in 100 mM Natriumtartrat-Puffer pH 2,5 und wurde über einen Zeitraum von 10 min mittels Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von 310 nm und 30 °C gemessen. Neben der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 310 nm wurde das UV/Vis-Spektrum eines Reaktionsansatzes vor und nach der Umsetzung mit MsP1 mittels Photometer aufgenommen (Liers *et al.* 2010). Das gereinigte MsP1, eine 0,5 mM Wasserstoffperoxidlösung (wässrig) und eine 160 mM Adlerollösung (ethanolisch) wurden nach folgendem Pipettierschema zur Messung eingesetzt:

Tabelle 2.30: Pipettierschema

	Volumen		Endkonzentration
	Mikroplattenleser	Photometer	
MsP1	20 µL	100 µL	28 nM
Puffer	110 µL	550 µL	55 mM
Substrat (Adlerol)	20 µL	100 µL	16 mM
H ₂ O ₂	50 µL	250 µL	125 µM
	200 µL	1000 µL	

2.13.10 Enzymkinetik

Die Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) und die katalytischen Konstanten (k_{cat}) des gereinigten MsP1 (s. 2.13.2.2) wurden für die Substrate ABTS, β -Carotin, Bixin, Annatto, Veratrylalkohol, DMP, Guajakol, Reactive Black 5 und Reactive Blue 5 untersucht. Dazu wurde die Anfangsgeschwindigkeit des enzymatischen Umsatzes (Reaktionsgeschwindigkeit) bei konstanter Enzymkonzentration, nicht limitierendem Überschuss an Wasserstoffperoxid und variierender Substratkonzentration gemessen. Die Reaktionsgeschwindigkeit (v) wurde direkt linear gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Mit Hilfe der Software OriginPro 8.5G (Tab. 2.14) wurde eine Hyperbel an die Messpunkte angepasst, sodass sich die enzymkinetischen Parameter (K_m , v_{max}) direkt aus der Sättigungshyperbel ablesen ließen. Die katalytische Konstante k_{cat} wurde mit folgender Formel berechnet:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{c_{Enzym}} \quad (8)$$

k_{cat} : katalytische Konstante in s^{-1}

V_{max} : maximale Umsatzgeschwindigkeit in $\mu M s^{-1}$

c_{Enzym} : Enzymkonzentration in μM

Die Durchführung der Assays erfolgte nach 2.13.9.2. Die Messung der kinetischen Parameter von MsP1 wurde zeitgleich mit unterschiedlichen Mengen an Wasserstoffperoxid durchgeführt, um die Konzentration zu ermitteln, bei der die Umsetzung unabhängig vom Wasserstoffperoxid verläuft. Die Parameter der Messungen sind in Tabelle 2.31 aufgeführt.

Tabelle 2.31: Parameter der Enzymkinetik ²⁸: Substrat und dessen Endkonzentration im Reaktionsansatz (Substratkonz.), Endkonzentration von MsP1, Endkonzentration von H₂O₂, Messtemperatur (Temp.) und der verwendete Puffer

Substrat	Substratkonz. in μM	Enzymkonz. in nM	H ₂ O ₂ -Konz. in μM	Temp. in $^{\circ}\text{C}$	Puffer
ABTS	1-1000	0,05	125	55	300 mM Natriumacetat pH 3,0
β -Carotin	12-36	3,53	125	30	50 mM Natriumacetat pH 3,5
Bixin	8-25	1,13	125	30	50 mM Natriumacetat pH 3,5
Annatto (Norbixin)	8-25	0,81	125	30	50 mM Natriumacetat pH 6,0
Veratrylalkohol	500-60000	28,27	250	55	100 mM Natriumtartrat pH 2,5
2,6-Dimethoxyphenol	10-3000	0,28	250	55	50 mM Natriumacetat pH 3,5
Guajakol	15-4100	1,13	250	55	50 mM Natriumacetat pH 3,5
Reactive Blue 5	1-630	1,41	125	55	50 mM Natriumacetat pH 4,5
Reactive Black 5	1-100	5,65	125	55	50 mM Natriumacetat pH 4,5

2.13.11 Rückfaltung der rekombinanten Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* mittels iFOLD[®] Protein Refolding System-Kit

Die Kultivierung von *Hansenula polymorpha* erfolgte gemäß 2.10. Nach Anzucht und Induktion der Expression wurden die Hefezellen geerntet, aufgeschlossen (s. 2.10.7) und der erhaltene Gesamtzellextrakt zentrifugiert ($14\,000\text{ U min}^{-1}$, $21\,920\times g$, 2 min, 4°C). Die lösliche Fraktion (auch bezeichnet als löslicher Zellextrakt) wurde zur Proteinrückfaltung mittels iFOLD[®] Protein Refolding System-Kit eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Tab. 2.7). Abweichend zu den Angaben wurde dem löslichen Zellextrakt nach der Denaturierung 6,4 mM Eisen(III)-chlorid hinzugefügt bevor dieser zur Rückfaltung eingesetzt wurde. Nach der Rückfaltung wurden die Renaturierungspuffer mit enthaltenem Gesamtzellextrakt ohne eine weitere Zugabe von Eisen(III)-chlorid zur Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7.5) eingesetzt. Chemikalienblindwerte und Negativkontrollen wurden nach 2.13.7.6 durchgeführt.

²⁸Weitere Parameter der Assays - wie der molare dekadische Extinktionskoeffizient und die Wellenlänge - sind in Tabelle 2.26 aufgeführt.

2.14 Elektrophorese-Techniken

Die Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen erfolgte unter Anwendung elektrophoretischer Verfahren (Hames und Rickwood 1990). Die analytische und präparative Trennung von Nukleinsäuren erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (detailliert beschrieben von Southern 1979 und McDonell *et al.* 1977); die Auftrennung von Proteinen hingegen mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Creighton 1997; Laemmli 1970).

2.14.1 Agarose-Gelelektrophorese

Folgende Lösungen wurden für die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt:

50x TAE-Puffer

TRIS	242,0 g L ⁻¹
Essigsäure, konz.	57,1 mL L ⁻¹
0,5 M EDTA, pH 8	100,0 mL L ⁻¹

Der 50x TAE-Puffer wurde vor der Verwendung 1:50 mit VE-Wasser verdünnt (1x TAE-Puffer).

6x Auftragspuffer²⁹

Bromphenolblau	25 mg
Xylencyanol	25 mg
Glycerol	3 mL
VE-Wasser	ad 10 mL

In Abhängigkeit der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit unterschiedlicher Konzentration verwendet. 1,2–2%ige Agarosegele kamen für Fragmente <2 kb zum Einsatz, 0,8–1,1%ige Gele für Fragmente >2 kb. Die Agarose wurde in 1x-TAE-Puffer (kleine Gele: 56 mL, große Gele 168 mL) suspendiert und bis zum vollständigen Lösen in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wurde die Agaroselösung mit 0,1 µL mL⁻¹ Ethidiumbromidlösung (1%ig) versetzt und anschließend in die Gelvorrichtung mit darüber hängendem Kamm gegossen. Mit CoralLoad PCR-Puffer versetzte PCR-Proben wurden direkt auf das Gel aufgetragen, sonstige PCR-Proben wurden vor der Auftragung im Verhältnis 5:1 (Probe/Puffer) mit dem 6x Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte je nach Gelgröße bei 80–130 V, indem die Gelvorrichtung horizontal in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer gehängt wurde. Die Fragmentgrößen wurden anhand eines Größenstandards (s. 2.4.3) abgeschätzt. Die Geldokumentation erfolgte mit Hilfe eines Gerätes der Firma Decon Science Tec (Tab. 2.13, UV-Transilluminator (312 nm), Kamera, Software DeVision G Vers. 2.0).

²⁹(Sambrook und Russell 2001)

2.14.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde unter denaturierenden Bedingungen mit dem PerfectBlue Twin S-System von Peqlab bzw. Mini-Protean[®] Tetra System von BioRad Laboratories GmbH und den folgenden Lösungen durchgeführt (modifiziert nach Laemmli 1970).

Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS-Lösung)

APS	400 g
Reinstwasser <i>ad</i>	1 L

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

4x Lower-TRIS

TRIS-Base	181,7 g
SDS	4,0 g
Reinstwasser	<i>ad</i> 1 L
Einstellen auf pH 8,8 mit 1 M NaOH	

4x Upper-TRIS

TRIS-Base	60,55 g
SDS	4,00 g
Reinstwasser	<i>ad</i> 1 L
Einstellen auf pH 6,8 mit 1 M NaOH	

10x Laufpuffer

TRIS-Base	30,2 g
Glycin	144,2 g
SDS	10,0 g
VE-Wasser	<i>ad</i> 1 L

Der 10x Laufpuffer wurde vor der Verwendung 1:10 mit VE-Wasser verdünnt (1x Laufpuffer).

2,5x Auftragspuffer³⁰

1 M TRIS-HCl, pH 6,8	1,0 mL
20%ige SDS-Lösung (w/v)	2,0 mL
Bromphenolblau	20 mg
Glycerol	2,3 mL
VE-Wasser	<i>ad</i> 8,0 mL

³⁰(Sambrook und Russell 2001)

Die Gesamtkonzentration von Acrylamid und Bisacrylamid betrug im Trenngel 12% und im Sammelgel 6% (Tab. 2.32). Die Konzentration von Bisacrylamid in der Gesamtkonzentration (Crosslinker-Konzentration) betrug 2,6%.

Tabelle 2.32: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel 12%	Sammelgel 6%
Reinstwasser	2,7 mL	1,8 mL
Lower-TRIS	1,5 mL	—
Upper-TRIS	—	750,0 μ L
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	1,8 mL	450,0 μ L
APS-Lösung	15,0 μ L	10,0 μ L
TEMED	7,5 μ L	4,0 μ L

Durchführung:

30 μ L Probe wurden mit 24 μ L Probenauftragspuffer versetzt, 10 min gekocht und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 6 μ L einer 1 M DTT-Lösung wurden - abhängig vom Proteingehalt der Probe - 1–30 μ L in eine Geltasche (Proteinmenge 5 μ g pro Tasche) gegeben. Die Pufferkammer wurde mit 1x Laufpuffer gefüllt, sodass die Geltaschen vollständig mit Puffer bedeckt waren. Nach der Beladung betrug die Stromstärke zur Fokussierung der Proben konstant 10 mA pro Gel. Nach dem Übergang der Proben vom Sammelgel ins Trenngel wurde die Stromstärke bis zum Ende der Elektrophorese auf konstant 20 mA pro Gel erhöht. Sobald das Bromphenolblau des Probenauftragspuffers aus dem Gel hinauslief, wurde Elektrophorese beendet. Anschließend wurde das SDS-Gel zur Detektion der getrennten Proteinbanden mittels Färbung (s. 2.16) oder für den Western Blot (s. 2.14.6) eingesetzt.

2.14.2.1 Molekulargewicht

Die Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE erfolgte anhand eines Proteinstandards (5 μ L, s. 2.4.3). Die Logarithmen der Molekulargewichte der Standardproteine wurden gegen ihre Laufstrecke aufgetragen. Anhand der Regressionsgeraden wurde das Molekulargewicht der Zielproteine ermittelt.

2.14.3 Halbnative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die halbnative SDS-PAGE wurde nach 2.14.2 mit den folgenden Änderungen durchgeführt:

- Zubereitung 10x Laufpuffer und Probenauftragspuffer mit der Hälfte an SDS (5 g L^{-1} SDS bzw. 1 mL SDS-Lösung (20%ig))
- Probenvorbereitung ohne Aufkochen und Zusatz von DTT-Lösung
- 15 mU Enzymaktivität pro Tasche Probenbeladung für Gele mit anschließender Aktivitätsfärbung
- Elektrophorese bei 4°C

Nach der Elektrophorese wurde das Gel - analog zur SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen - zur Färbung (s. 2.16) eingesetzt.

2.14.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Polyacrylamid-Fertiggele (s. 2.4.4, Acrylamidkonzentration 3–12%, Quervernetzerkonzentration 2,6%, 1 mm Schichtdicke) verwendet. Die Vorbereitung der nativen Gele und die Durchführung der PAGE erfolgte gemäß Herstellerangaben. Auf das Gel wurden pro Tasche $5 \mu\text{g}$ Protein bzw. 15 mU Aktivität aufgetragen.

Elektrophoresebedingungen:

1. 4°C , 50 V, 10 min – Fokussierung
2. 4°C , 200 V, 2 h – Trennung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zur Färbung (s. 2.16) eingesetzt.

2.14.5 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

2.14.5.1 Analytische IEF

Für die isoelektrische Fokussierung wurden Polyacrylamid-Fertiggele mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH 3-10) und einer Schichtdicke von 150 µm verwendet (s. 2.4.7). Die Vorbereitung der IEF-Gele erfolgte gemäß Herstellerangaben. Auf das Gel wurden pro Tasche 5 µg Protein bzw. 15 mU Aktivität aufgetragen.

Elektrophoresebedingungen:

1. 4 °C, 500 V, 1 h – Entsalzung
2. 4 °C, 2000 V, 2,5 h – Trennung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zur Färbung (s. 2.16) eingesetzt.

Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI)

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde in eine Proben tasche des IEF-Geles ein Proteinstandard (5 µL, s. 2.4.3) geladen. Die isoelektrischen Punkte der Standardproteine wurden gegen ihre Laufstrecke aufgetragen. Mit Hilfe der daraus resultierenden Regressionsgeraden wurden die isoelektrischen Punkte der Zielproteine abgeschätzt.

2.14.5.2 Präparative IEF

Die präparative isoelektrische Fokussierung wurde mittels Rotofor® Cell von Biorad durchgeführt. Die Vorbereitung der IEF-Kammer und die Durchführung der Fokussierung erfolgten gemäß Herstellerangaben.

Elektrophoresebedingungen:

- 4 °C, 15 W
- Ende, sobald die Spannung für 30 min konstant blieb

Probenvorbereitung:

1 mL aufgeschlossenes Pilzmyzel (hergestellt nach 2.11.2.1) wurde mit 58 mL Reinstwasser und 3 mL Ampholytlösung (pH 3-10 oder pH 5-7) versetzt und in die Probenkammer (58 mL) gefüllt. Die erhaltenen Fraktionen wurden nach Bestimmung des pH-Wertes zum Dot Blot (s. 2.15) und zur Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7.4) eingesetzt.

2.14.6 Western Blot

Nach erfolgter SDS-PAGE (s. 2.14.2) wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel mittels Tank-Elektroblotter auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen.

Folgende Lösungen wurden dafür verwendet:

10x Wet Blot Laufpuffer

Glycin	144,13 g
TRIS-Base	30,29 g
VE-Wasser	<i>ad 1 L</i>

1x Wet Blot Laufpuffer

10x Wet Blot Laufpuffer	100 mL
MeOH	50 mL
VE-Wasser	<i>ad 1 L</i>

10x TBS-Puffer

TRIS-HCl	78,80 g
Natriumchlorid	87,66 g
Reinstwasser	<i>ad 1 L</i>
Einstellen auf pH 7,5 mit 1 M NaOH	

1x TBST-Puffer

10x TBS-Puffer	100 mL
Tween® 20	1 mL
Reinstwasser	<i>ad 1 L</i>

5%iges Milchpulver in TBST-Puffer

Milchpulver	50 g
1x TBST-Puffer	<i>ad 1 L</i>

Für den Western Blot wurden die PVDF-Membran und das Blottingpapier auf SDS-Gelgröße zugeschnitten. Die Membran wurde 5 min mit MeOH aktiviert und anschließend mit dem Blottingpapier in dem Wet Blot Laufpuffer (1x) äquilibriert. Der Blot erfolgte für eine Stunde bei einer Spannung von 100 V. Anschließend wurde die Membran über Nacht in TBST-Puffer mit 5% Milchpulver bei 4 °C inkubiert, um die freien Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren und somit ein unspezifisches Binden der Antikörper an die Membran zu verhindern.

2.14.6.1 Immunodetektion, Entwicklung und Dokumentation

Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit dem primären Antikörper Kaninchen anti-CQDAQYY-PDDASVAGD-amid IgG (s. 2.4.1) (2 h, 1:10 000 mit 5%igem Milchpulver in TBST-Puffer). Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer (10 min) erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper (1 h, 1:15 000 in TBST-Puffer).

Für die Detektion mit einem Chemolumineszenz-Reagenz wurde der Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper konjugiert mit einer Peroxidase (s. 2.4.1) verwendet; für die Detektion mit dem Chromogen 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) hingegen wurde der Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper konjugiert mit einer alkalischen Phosphatase (s. 2.4.1) eingesetzt. Nach erneutem Waschen mit TBST-Puffer (dreimal, 10 min) erfolgte die Entwicklung der Membran und deren Dokumentation mit zwei unterschiedlichen Varianten.

Variante 1: Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper konjugiert mit einer Peroxidase

Die PVDF-Membran wurde mit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat inkubiert (2 min, je 1 mL Luminol- und Peroxidaselösung). Die Dokumentation erfolgte mittels Fotofilm und einer Entwicklermaschine (Tab. 2.13, Canon Deutschland GmbH, Krefeld; VersaDoc Imaging System 4000 MP, Biorad) innerhalb von 30 min.

Variante 2: Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper konjugiert mit einer alkalischen Phosphatase

Für die Entwicklung wurde eine Sigma Fast™ BCIP®/NBT-Tablette in 10 mL VE-Wasser gelöst und die PVDF-Membran mit dieser Lösung inkubiert (10 min, unter Lichtausschluss). Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgt durch die Entstehung blauvioletter Präzipitate. Zur Dokumentation wurde die Membran eingescannt.

2.15 Dot Blot

Der Dot Blot stellt eine vereinfachte Version des Western Blots dar, in der einzig die Anwesenheit von Proteinen untersucht werden kann. Das Molekulargewicht der Proteine wird dabei nicht erfasst.

Durchführung:

Auf die aktivierte PVDF-Membran (5 min mit MeOH) wurden die Probelösungen der einzelnen Fraktionen (erhalten nach 2.14.5.2) unverdünnt punktförmig aufgetragen und die Membran zur Blockierung der noch freien Bindungsstellen in 5%-igem Milchpulver in TBST-Puffer inkubiert (4 °C, über Nacht). Detektion, Entwicklung und Dokumentation der Membran erfolgten analog zum Western Blot (s. 2.14.6.1).

2.16 Färbungen

Vor jeder Färbung wurden die Gele dreimal mit heißem Wasser oder bei Aktivitätsfärbungen mit entsprechendem Puffer gewaschen (5 min, unter Schütteln 30 U min^{-1}).

2.16.1 Coomassiefärbung

Nach der Elektrophorese wurden die auf dem Gel befindlichen Proteine für 1 h unter leichtem Schütteln in einer Lösung aus 40% Ethanol, 10% konz. Essigsäure und 290 mg L^{-1} Coomassie® Brilliant Blue R 250 fixiert und gefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund mit einer Lösung aus 25% Ethanol und 8% konz. Essigsäure entfärbt. Das gefärbte Gel wurde zur Dokumentation eingescannt.

2.16.2 Kolloidale Coomassiefärbung

Für die Färbung mit kolloidalem Coomassie wurde folgende Lösung verwendet:

Coomassie® Brilliant Blue G 250	$1,0 \text{ g L}^{-1}$
Ethanol (v/v)	10,0%
Aluminiumsulfat	$50,0 \text{ g L}^{-1}$
Phosphorsäure (85%ige) (v/v)	2,0%

Die Chemikalien wurden in der obigen Reihenfolge zusammengegeben, über Nacht unter Lichtausschluss gerührt und anschließend filtriert. Die Lagerung erfolgte ebenfalls im Dunkeln.

Durchführung:

Das Gel wurde unter leichtem Schütteln mit kolloidaler Coomassielösung inkubiert bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Coomassie® Brilliant Blue lagert sich hierbei an die basischen Seitenketten von Aminosäuren an und färbt so die Proteine. Anschließend wurde der Hintergrund mit Reinstwasser entfärbt und das Gel zur Dokumentation eingescannt.

2.16.3 Aktivitätsfärbung mit ABTS

Diese Färbung wurde bei halb-nativen (s. 2.14.3) bzw. nativen Polyacrylamidgelen (s. 2.14.4) und bei Gelen nach isoelektrischer Fokussierung (s. 2.14.5.1) angewendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 5 min unter leichtem Schütteln mit einer 5 mM ABTS-Lösung in 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 3,5) inkubiert. Anschließend wurde 3%iges H₂O₂ (Endkonzentration 0,35 mM) zugegeben. Nach Waschen mit Reinstwasser wurde das Gel zur Dokumentation eingescannt.

2.16.4 Färbung für Häm- und Metallenzyme (Hämfärbung)

Die Hämfärbung (modifiziert nach Thomas *et al.* 1976 und Henne *et al.* 2001) wurde bei halb-nativen (s. 2.14.3) bzw. nativen Polyacrylamidgelen (s. 2.14.4) und bei Gelen nach isoelektrischer Fokussierung (s. 2.14.5.1) angewendet. Weiterhin wurde die Färbung für den Nachweis des Zentralatoms Eisen im Gesamtzellextrakt von *Hansenula polymorpha* verwendet.

Für die Hämfärbung wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung I	6,3 mM methanolische TMB-Lösung
Lösung II	250 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,0
Lösung III (Färbelösung)	Lösung I/Lösung II (3/7 v/v)

Lösung I und II wurden jeweils kurz vor der Verwendung hergestellt.

Durchführung:

- Das Gel wurde in Lösung III inkubiert (1 h, im Dunkeln). Anschließend wurde 30%iges H₂O₂ (Endkonzentration 30 mM) zugegeben und für 1 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Reinstwasser wurde das Gel zur Dokumentation eingescannt.
- Der Gesamtzellextrakt wurde in eine Küvette pipettiert und mit Lösung III inkubiert (30 min, im Dunkeln). Anschließend wurde 30%iges H₂O₂ (Endkonzentration 30 mM) zugegeben und für 1 min inkubiert.

2.17 Molekularbiologische Arbeiten

2.17.1 Primerableitung

Die Auswahl und das Ableiten der verwendeten Primer (s. 2.4.5) wurde auf Grund der hohen Sequenzhomologie von *Pleurotus sapidus* zu *Pleurotus ostreatus* anhand der Gensequenz des Proteins aus dem Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* vorgenommen, der im Rahmen eines Genomprojekts untersucht wurde. Die entsprechenden Sequenzen wurden publiziert (*The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute* (DOE-JGI), Tab. 2.14, PC15 v2.0).

2.17.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration in Lösungen erfolgte durch die Messung der Extinktion E bei 260 nm, 280 nm und 320 nm (Sambrook und Russell 2001) mittels Nanophotometer™ Pearl. Über die Extinktion bei 260 nm kann der Nukleinsäuregehalt bestimmt werden³¹. Über den Quotienten der Extinktion bei 260 nm und 280 nm kann die Reinheit der Lösung bestimmt werden. Liegt eine reine DNA-Lösung vor, so hat der Quotient E_{260}/E_{280} einen Wert von 1,8. Liegt hingegen eine reine RNA-Lösung vor, so liegt der Wert bei 2,0. Die Bestimmung der Extinktion bei 320 nm dient der Trübungsmessung.

2.17.3 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mittels Nucleo Spin® Plant II Kit (Tab. 2.7). 100 mg Myzel von *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii* des Kulturtages 4 (s. 2.8.7) wurden mit flüssigem Stickstoff gefroren und unter Zugabe von 400 µL PL1-Puffer gemörsert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden gemäß Handbuch (Ausgabe Dezember 2010/Rev.05) durchgeführt. Die DNA-haltige Lösung wurde nach der Bestimmung der Konzentration (s. 2.17.2) aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die genomische DNA wurde zur Amplifizierung bestimmter Sequenzbereiche mittels Polymerasekettenreaktion eingesetzt (s. 2.17.6.1).

³¹ 1 E_{260} -Einheit entspricht 50 ng µL⁻¹ dsDNA, 40 ng µL⁻¹ ssRNA oder 33 ng µL⁻¹ ssDNA (Schrimpf *et al.* 2007)

2.17.4 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy[®] Plant Mini Kits (Tab. 2.7) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden je 100 mg Myzel vom PSA, PER und POS der Kulturtage 2-6 (s. 2.8.7) in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff zermahlen und in 450 μ L RLT-Puffer³² aufgenommen. Die weiteren Arbeitsschritte wurden nach Anleitung des Handbuchs (04/2006) durchgeführt. Nach der Messung der Konzentrationen (s. 2.17.2) wurde die RNA-haltige Lösung aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.17.4.1 Überprüfung der RNA-Qualität

Für die Überprüfung der Qualität der isolierten Gesamt-RNA (s. 2.17.4) wurden 10 μ L RNA-haltige Lösung für 2 Stunden auf Eis bzw. bei 42 °C belassen. Anschließend wurden diese mit 6 \times Auftragspuffer (2 μ L) versetzt, auf ein 1%igem Agarosegel aufgetragen und mittels Agarose-Elektrophorese getrennt (s. 2.14.1).

2.17.5 cDNA-Synthese

2.17.5.1 Erststrangsynthese durch reverse Transkription

Die Erststrangsynthese wurde mittels SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Tab. 2.7, Protokoll PT3041-1, Version PR762287) mit 3 μ L RNA (s. 2.17.4) durchgeführt (Abb. 2.4). Unter Verwendung des 3'SMART CDS 2A-Primers (Oligo(dT)-Primer), welcher an das Poly-A-Ende eukaryontischer mRNA bindet, wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (Borson *et al.* 1992). Abweichend vom Protokoll wurde die SuperScript II bzw. SuperScript III reverse Transkriptase (Tab. 2.1) mit dem dazugehörigen Arbeitspuffer verwendet. Zusätzlich wurde zur Erststrangsynthese anstelle des 3'SMART CDS 2A-Primers der spezifische Primer revloxFr1 58 (Tab. 2.8) eingesetzt. Der Erststrang der Gesamt-cDNA(ss) wurde für die Gegenstrangsynthese oder - nach Abbau der RNA durch RNase H (gemäß Herstellerangaben) - als Proben-template für die *Real-time*-PCR eingesetzt (s. 2.17.6.5).

³² 450 μ L RLT-Puffer wurden zuvor mit 4,5 μ L β -Mercaptoethanol versetzt.

2.17.5.2 Gegenstrangsynthese

Die Synthese des Gegenstrangs durch den Primer 5'PCR Primer 2A (Tab. 2.8) und die anschließende Amplifizierung der cDNA-Bibliothek mittels Long-Distance-PCR (LD-PCR) (Abb. 2.4) erfolgte mittels SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Tab. 2.7). Abweichend vom Protokoll wurden zusätzlich Ansätze durchgeführt, bei denen die Synthese des Gegenstranges durch spezifischen Primer (Tab. 2.8) erfolgte. Die cDNA wurde nach der Bestimmung der Konzentration (s. 2.17.2) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

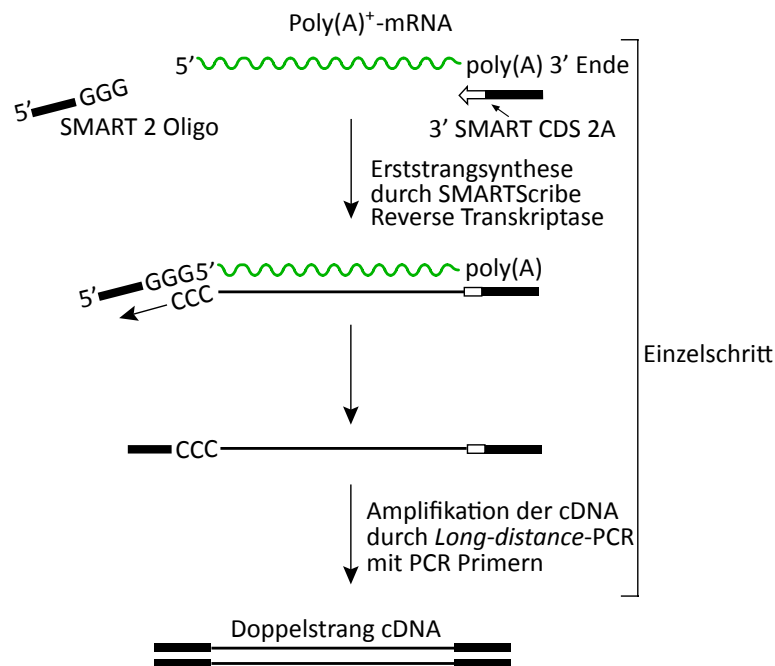


Abbildung 2.4: Reverse Transkription zur Herstellung einer cDNA-Bank (BD Clontech): bei der Erststrangsynthese bindet der 3'SMART CDS 2A-Primer an das Poly(A)-Ende der mRNA, die Reverse Transkriptase polymerisiert die DNA-Kopie der mRNA. Die Bindung des Primers 5'PCR Primer 2A (nach Bildung der Bindungsstelle durch den Primer SMART 2 oligo) ermöglichte die anschließende exponentielle Amplifizierung der Gesamt-cDNA. (Bildquelle: *SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual*, Januar 2012, Clontech, modifiziert)

Cyclerprogramm

Lid: 105 °C

95 °C 1 min

20 Zyklen (3. Kulturtag PSA) bzw. 22 Zyklen (4. Kulturtag PSA)

95 °C 15 s

65 °C³³ 30 s

68 °C 6 min

³³50 °C bei den Ansätzen mit spezifischen Primern

2.17.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.17.6.1 PCR

Die Amplifizierung gewünschter DNA-Abschnitte zwischen zwei Oligonukleotidprimern erfolgte mittels PCR. Die Primer wurden so kombiniert, dass die Schmelztemperatur (T_m) maximal um 2 °C variierte.

Die Berechnung der Schmelztemperaturen erfolgte anhand der 2 °C + 4 °C-Regel:

$$T_M = n \cdot [\text{GC}] \cdot 4^\circ\text{C} + n \cdot [\text{AT}] \cdot 2^\circ\text{C} \quad (9)$$

n : Anzahl der Basen

Die Elongationszeit wurde an die zu erwartende Fragmentlänge angepasst³⁴. Die einzelnen Bestandteile (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) der eingesetzten dNTPs wurden zu gleichen Anteilen (10 mM) zusammenpipettiert. Der dNTP-Mix wurde in 20 µL-Portionen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

PCR-Ansatz

Template	variabel (50–100 ng)
dNTPs (je 10 mM)	0,60 µL
10x CoralLoad PCR-Puffer	3,00 µL
Primer for (10 µM)	1,20 µL
Primer rev (10 µM)	1,20 µL
HotStarTaq Plus (5 U µL ⁻¹)	0,15 µL
Reinstwasser	ad 30,00 µL

Cyclerprogramm

Lid:	105 °C
95 °C	5 min
40 Zyklen:	
95 °C	60 s
<i>x</i> - 5 °C ³⁵	60 s
72 °C	30–110 s
72 °C	5 min
4 °C	halten

³⁴ Geschwindigkeit der Taq: 1000 bp /min

³⁵ x = Niedrigste Schmelztemperaturen der Primer in °C

2.17.6.2 Analytische PCR

Die Analytische PCR wurde zur Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur von Primern in einem Gradienten-Cycler (BioRad Laboratories GmbH, Tab. 2.13, CFX Manager™ Software Version 3.0) durchgeführt. Der Temperaturgradient wurde auf die berechneten Schmelztemperaturen (T_m) der Primer (Formel 9) angepasst.

PCR-Ansatz analog zu 2.17.6.1

Cyclerprogramm

95 °C	5 min
40 Zyklen:	
95 °C	1 min
8-stufiger Gradient	1 min (bei 62,0 °C, ..., 52,7 °C, 50,0 °C)
72 °C	15 s
72 °C	5 min
4 °C	halten

2.17.6.3 Präparative PCR

Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen wurde eine präparative PCR durchgeführt. Dazu wurde der PCR-Ansatz von 30 μL auf 100 μL vergrößert. Die erhaltene DNA wurde nach der Fragmentisolierung (s. 2.17.7) direkt zur Sequenzierung³⁶ (s. 2.17.9) eingesetzt.

PCR-Ansatz

Template	variabel (50–100 ng)
dNTPs (je 10 mM)	2,0 μL
10x CoralLoad PCR-Puffer	10,0 μL
Primer for (10 μM)	4,0 μL
Primer rev (10 μM)	4,0 μL
HotStarTaq Plus (5 U μL^{-1})	0,5 μL
Reinstwasser	<i>ad</i> 100,0 μL

³⁶ohne vorheriger Klonierung

Cyclerprogramm

Lid:	105 °C
95 °C	5 min
40 Zyklen:	
95 °C	60 s
$x - 5$ °C	60 s
72 °C	30–110 s
72 °C	5 min
4 °C	halten

x = Niedrigste der Schmelztemperaturen der Primer (°C)

2.17.6.4 Kolonie-PCR

Nach Ligation eines Fragmentes (s. 2.17.7) in den TA-Vektor (s. 2.17.8.1) und Transformation in *E. coli* (s. 2.17.8.2) wurde die Insertion des Vektors in die Zellen mittels Kolonie-PCR überprüft. Die PCR erfolgte mit M13-Primern (s. 2.8) und einer an die Amplifikatlänge von Fragment und M13-Flankierung angepassten Elongationszeit. Als Template wurden Zellen von *E. coli* aus einer einzelnen Kolonie „gepickt“ und im PCR-Ansatz suspendiert.

PCR-Ansatz

Template Zellen von <i>E. coli</i>	
dNTPs (je 10 mM)	0,4 µL
10x CoralLoad PCR-Puffer	2,0 µL
M13-Primer for (10 µM)	1,0 µL
M13-Primer rev (10 µM)	1,0 µL
HotStarTaq Plus (5 U µL ⁻¹)	0,2 µL
Reinstwasser <i>ad</i>	<i>ad</i> 20,0 µL

Cyclerprogramm

Lid:	105 °C
95 °C	5 min
40 Zyklen:	
95 °C	1 min
45 °C	1 min
72 °C	1–2 min
72 °C	5 min
4 °C	halten

2.17.6.5 *Real-time-PCR*

Der quantitative Nachweis von Transkripten der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurde mittels *Real-time-PCR* durchgeführt. Bei der *Real-time-PCR* wird die Produktakkumulation in Echtzeit verfolgt; die exponentielle Phase der Reaktion wird für die Quantifizierung der Templatemenge genutzt (Wilhelm 2003a). Die Messung der Produktzunahme geschieht anhand von Fluoreszenzlicht, welches in Abhängigkeit der Produktmenge generiert wird (Heid *et al.* 1996; Higuchi *et al.* 1993). Eine Möglichkeit zur Generierung produktabhängiger Fluoreszenz bieten dsDNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe. Der heute üblicherweise verwendete dsDNA-sensitive Farbstoff ist SYBR Green I; ein unsymmetrischer Cyaninfarbstoff. Der Farbstoff interkaliert nicht, sondern bindet weitgehend sequenzunspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA. Das in der kleinen Furche gebundene SYBR-Green I fluoresziert nach Anregung mit Blaulicht (480 nm) etwa 1000mal stärker als der freie Farbstoff, weshalb SYBR Green I sehr gut geeignet ist, die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte in der *Real-time-PCR* sichtbar zu machen (Morrison *et al.* 1998).

Zusammensetzung einer *Real-time-PCR*-Reaktion mit dem Sso Advantage™ 2 SYBR® Green Supermix (SYBR Green, Tab. 2.1) und das verwendete Cycloerprogramm:

<i>Real-time-PCR-Ansatz (25 µL)</i>	Proben	Standards
Nucleasefreies Wasser	3,4 µL	8,4 µL
cDNA (ss)	10,0 µL	-
DNA (ds)	-	5,0 µL
Primer rev	0,8 µL	0,8 µL
Primer for	0,8 µL	0,8 µL
SYBR Green	10,0 µL	10,0 µL

Cycloerprogramm:

95 °C	3 min
40 Zyklen:	
95 °C	10 s
52,7 °C bzw. 54,0 °C	30 s
+ Plate Read	
Meltcurve:	65–95 °C in 0,5 °C Schritten für jeweils 5 s
+ Plate Read	

2.17.7 DNA-Fragmentisolierung

Die PCR-Amplifikate (s. 2.17.6) wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt und relevante DNA-Fragmente aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des Nucleo Spin[®] Extrakt II Kit (Tab. 2.7) nach Herstellerangaben (Handbuch Januar 2011, Rev. 11). Für die Elution wurden 30 µL Reinstwasser verwendet. Nach der Messung der Konzentrationen (s. 2.17.2) wurde die DNA-haltige Lösung aliquotiert und bei -20 °C gelagert bzw. direkt weiter verwendet (s. 2.17.9.2, 2.17.8).

2.17.8 Klonierung

2.17.8.1 Ligation mittels TA-Cloning

Die Ligation von isolierten DNA-Fragmenten (s. 2.17.7) in den pCR[®] 2.1-TOPO-Vektor (s. 2.4.6) erfolgte mittels TA Cloning Kit (Tab. 2.7).

Ligationsansatz

DNA-Fragment	0,5–4,0 µL
Salzlösung	1 µL
steriles Wasser	ad 5 µL
pCR [®] 2.1-TOPO Vektor	1 µL

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur stengelassen oder über Nacht bei -20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* (s. 2.17.8.2).

2.17.8.2 Transformation in *E. coli*

50 µL chemisch kompetente Zellen (*E. coli* One Shot[®] TOP 10-Zellen, s. 2.4.4) wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 2 µL eines Ligationsansatzes vermischt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock, der die Aufnahme der Plasmid-DNA ermöglicht, erfolgte im Wasserbad für 2 min bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen sofort auf Eis (5 min) gestellt. Um die auf dem Plasmid vorhandene Antibiotikaresistenz auszubilden, wurde zu den Zellen 150 µL LB-Medium (s. 2.9.1) gegeben und im Schüttler inkubiert (1 h, 37 °C, 225 U min⁻¹). 170 µL dieses Transformationsansatzes wurden auf einer mit X-β-Gal (40 µL) und IPTG (40 µL) bestrichenen LBamp-Platte (s. 2.9.4) ausplattiert und ein Blau/Weiß-Screening (s. 2.17.8.3) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C über Nacht.

2.17.8.3 Blau/Weiß-Screening

Verwendete Lösungen:

X- β -Gal-Lösung

X- β -Gal 40 mg mL^{-1} in DMF

Die Lösung wurde aliquotiert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

IPTG-Lösung

IPTG 100 mM in Reinstwasser

Die Lösung wurde aliquotiert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Das Blau/Weiß-Screening diente zur Identifizierung positiver Transformanten. Zu diesem Zweck wurden LB_{amp}-Platten (s. 2.9.4) mit $40 \text{ }\mu\text{L}$ IPTG- und $40 \text{ }\mu\text{L}$ X- β -Gal-Lösung versetzt. Die transformierten Zellen (s. 2.17.8.2) wurden auf diesen Platten ausplattiert und über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Der verwendete Vektor enthielt den lac-Promotor und das Reportergen β -Galaktosidase (lacZ α) mit der darin liegenden multiplen Klonierungsstelle (MCS). Die verwendeten Wirtsbakterien enthielten das LacZ α M15-Gen. Beinhaltet das Plasmid ein Insert in der multiplen Klonierungsstelle, so ist das LacZ'-Gen unterbrochen und das N-terminale-Fragment der Galaktosidase kann nicht exprimiert werden. Derartige Stämme weisen keine β -Galaktosidaseaktivität auf und bleiben bei Wachstum auf IPTG und X- β -Gal weiß. Stämme mit β -Galaktosidaseaktivität wachsen in Gegenwart von IPTG und X- β -Gal blau, da aus dem farblosen Substrat X- β -Gal der blaue Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo entsteht.

2.17.8.4 Plasmidisolierung

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Übernachtskulturen (s. 2.9.6) erfolgte mittels Nucleo Spin[®] Plasmid Kit (s. 2.4.4) und nach Herstellerprotokoll (September 2007, Rev. 04). Für die Elution der Plasmid-DNA wurden $60 \text{ }\mu\text{L}$ Reinstwasser verwendet.

2.17.9 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung benötigte Gehalte an Plasmid-DNA:

- 75 ng bei $300 - 1000 \text{ bp}$
- 150 ng $> 1000 \text{ bp}$

2.17.9.1 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von jeweils 15 µL der isolierten Plasmid-DNA (s. 2.17.8.4) wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt und erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Chromas Lite 2.01 (Tab. 2.14), mit dessen Hilfe die Vektorsequenzen entfernt wurden. Anschließend wurde eine Datenbankrecherche beim European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) mittels BLAST- und FASTA-Algorithmus durchgeführt, ebenso wie ein Abgleich mit dem Genomprojekt vom *Pleurotus ostreatus* (Tab. 2.14).

2.17.9.2 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von isolierten DNA-Fragmenten (s. 2.17.7) erfolgte analog zur Sequenzierung von Plasmid-DNA (s. 2.17.9.1). Abweichend wurden 15 µL Probe (bestehend aus 13,5 µL DNA-Fragment versetzt mit 1,5 µL spezifischen Primern) sequenziert.

2.17.10 Heterologe Expression

Die Klonierung der Oxygenase (s. 2.1) in den Expressionsvektor pFPMT6His sowie das Produkt-screening von *Hansenula polymorpha*-Transformanten wurde von Artes Biotechnology durchgeführt.

2.18 Immobilisierung von MsP1

Reines MsP1 (s. 2.13.2.2) wurde mit Hilfe kovalenter chemischer Bindungen an Oberflächen verschiedener Materialien immobilisiert.

2.18.1 Immobilisierung mit Glutardialdehyd

Für die Immobilisierung mit Glutardialdehyd wurden folgende Silica-Monolithen (s. 2.3.1, Abb. 2.2) und Lösungen eingesetzt:

Silica-Monolithe (Abkürzungen siehe Tab. 2.3)

Blind-SiO ₂	20 mg
AP-SiO ₂	20 mg

Die Monolithe wurden für die Immobilisierung mit einem Mörser fein zerrieben.

Phosphat-Puffer

Für die Herstellung des Puffers wurden 1 M Kaliumdihydrogenphosphat- und 1 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung verwendet. Je nach gewünschtem pH-Wert des Puffers wurden die beiden Lösungen zu unterschiedlichen Anteilen gemischt. Die Konzentration der Pufferlösung wurde anschließend durch Verdünnen mit Wasser eingestellt (LAB TOOLS, Tabellen für das Labor; Merck, W.280011 03/10).

5%-ige Glutardialdehydlösung

50%-ige Glutardialdehydlösung	1 mL
200 mM Phosphatpuffer pH 7	<i>ad</i> 10 mL

Die Lösung wurde direkt vor Gebrauch hergestellt.

Natriumborhydridlösung

NaBH ₄	40 mg
Puffer (pH 10)	<i>ad</i> 20 mL

Die Lösung wurde direkt vor Gebrauch hergestellt.

MsP1-Lösung

3 µg mL⁻¹ MsP1 in 100 mM Phosphatpuffer pH 7

Durchführung:

20 mg des Silica-Monolithen wurden in 15 mL Falcon™ Tubes eingewogen, mit 2 mL 5%-iger Glutardialdehyd-Lösung überschichtet und unter Schütteln inkubiert (3 h, 300 U min⁻¹, RT). Anschließend wurden die Silicapartikel abzentrifugiert (4150 U min⁻¹, 4000×g, 4 °C, 5 min), dreimal mit 10 mL Reinstwasser gewaschen (15 min, 300 U min⁻¹, RT) und der Überstand verworfen. 1 mL MsP1-Lösung wurde zu den Silicapartikeln gegeben, inkubiert (2 h, 300 U min⁻¹, 27 °C) und zentrifugiert (5 min, 4150 U min⁻¹, 4000×g, 4 °C). Der Überstand wurde entnommen und für spätere Messungen der Aktivität und Proteinkonzentration (s. 2.18.5 und 2.18.3) bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend wurden die Partikel dreimal mit 10 mL Reinstwasser bzw. 100 mM Phosphat-Puffer pH 7,0 gewaschen (15 min, 300 U min⁻¹, 27 °C) und zentrifugiert (4150 U min⁻¹, 4000×g, 4 °C, 5 min); die Waschüberstände wurden ebenfalls bei 4 °C gelagert. Ein Teil der Silicapartikel wurde mit Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,0) überlagert und bei 4 °C für anschließende Messungen aufbewahrt. Der andere Teil wurde vor der Lagerung mit 2,5 mL einer Natriumborhydridlösung überschichtet und inkubiert (30 min, 300 U min⁻¹, 27 °C). Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert (5 min, 4150 U min⁻¹, 4000×g, 4 °C), der Überstand verworfen und die Silicapartikel dreimal mit 10 mL Reinstwasser gewaschen (15 min, 300 U min⁻¹, 27 °C). Die Partikel wurden mit wenig 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

2.18.2 Immobilisierung mit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid und N-Hydroxysuccinimid

Für die Immobilisierung wurden folgende Silica-Monolithen (s. 2.3.1, Abb. 2.2), Polystyrol-Kugeln (s. 2.3.2, Abb. 2.3) und Lösungen eingesetzt:

Silica-Monolithe und Polystyrol-Kugeln (Abkürzungen und Bedeutung von (I) bzw. (II) siehe Tab. 2.3 und 2.4)

Blind-SiO ₂	230 mg
BSMAP-SiO ₂	230 mg
BSAM-PS(I)	1 g
BSAM-PS(II)	1 g
Carboxy-PS(I)	1 g
Carboxy-PS(II)	1 g

Die Monolithe wurden für die Immobilisierung fein zerrieben.

50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5

Die Herstellung erfolgte gemäß 2.13.9.1.

425 mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC)

EDC	2,04 g
Reinstwasser	ad 25,0 mL

Die Lösung wurde vor Gebrauch 15 min gerührt.

425 mM N-Hydroxysuccinimid-Lösung (NHS)

NHS	1,22 mg
Reinstwasser	ad 25,0 mL

Die Lösung wurde vor Gebrauch 15 min gerührt und mit 4 M NaOH auf den pH-Wert 6 eingestellt.

Durchführung:

1 g Polystyrolkugeln bzw. 230 mg Silica-Monolith wurden in 15 mL Falcon™ Tubes eingewogen und mit 10 mL Reinstwasser gewaschen (1 min vortexen). Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert (8 °C, 20 min, 4750 U min⁻¹, 5250×g) und der Überstand verworfen. Die gereinigten Polystyrolpartikel wurden mit 2 mL Reinstwasser und jeweils 4 mL EDC- und NHS-Lösung überschichtet, die Silicapartikel mit 1 mL Reinstwasser und jeweils 2 mL EDC- und NHS-Lösung. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 6 eingestellt und die Partikel anschließend für 30 min unter Schütteln inkubiert (RT, 30 U min⁻¹). Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren (8 °C, 20 min, 4750 U min⁻¹, 5250×g) verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit 10 mL Reinstwasser und anschließendem Zentrifugieren (8 °C, 20 min, 4750 U min⁻¹, 5250×g) wurden die aktivierten Partikel in 5 mL Reinstwasser aufgenommen, mit 150 µL gereinigtem Msp1 versetzt und für 12 Stunden inkubiert (4 °C, 30 U min⁻¹). Die Partikel wurden zentrifugiert (8 °C, 20 min, 4750 U min⁻¹, 5250×g), der Überstand für spätere Messungen der Aktivität und der Proteinkonzentration aufgehoben und die Partikel dreimal mit Reinstwasser gewaschen (15 min, 30 U min⁻¹, RT). Nach jedem Waschschriff wurden die Proben erneut zentrifugiert (8 °C, 20 min, 4750 U min⁻¹, 5250×g) und die Waschüberstände aufbewahrt. Die Partikel wurden mit wenig 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 3,5) aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

2.18.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Immobilisierungs- und Waschlösungen erfolgte nach 2.13.3.1.

2.18.4 Elementaranalyse

Die Elementaranalyse der Polystyrolkugeln und der Silica-Monolithen wurden im Institut für organische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen mittels CHN-Analysator (Thermo FlashEA - 1112 Series) durchgeführt.

2.18.5 Messung der Aktivität von immobilisiertem MsP1

Die geringen Mengen an 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 wurden mittels Filterpapier entfernt. Anschließend wurden die trockenen Partikel in eine Küvette eingewogen und zur Messung der Aktivität mittels ABTS-Assay eingesetzt (Tab. 2.33).

Tabelle 2.33: Pipettierschema

	Polystyrolkugeln	Silica-Monolithe
Partikel	15–60 mg	15–60 mg
300 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,0	500 µL	1214 µL
ABTS (2 mM)	100 µL	243 µL
H ₂ O ₂ (875 µM)	100 µL	243 µL
Gesamtvolumen	700 µL	1700 µL

Die Messung erfolgte am Photometer (55 °C, 420 nm, 10 Minuten, ständige Durchmischung). Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung 7 berechnet.

2.18.6 Wiederverwendbarkeit

Die Aktivität von immobilisiertem MsP1 (an Partikeln) wurde 20 mal mittels ABTS-Assay (s. 2.18.5) untersucht. Nach einer Messung wurden die Partikel dreimal mit 300 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,0 gewaschen und erneut zur Messung der Aktivität eingesetzt.

2.18.7 Lagerstabilität

Das immobilisierte MsP1 wurde bei 4 °C gelagert und an den Tagen 1, 2, 5 und 10 mittels ABTS-Assay (s. 2.18.5) vermessen.

2.18.8 Stickstoff-Tiefemperatur-Adsorptionsmessung

Mit den Silica-Monolithen Blind-SiO₂ und BSMAP-SiO₂ wurde vor und nach der Immobilisierung mit MsP1 von Herrn Martin von der Lehr (AG Prof. Dr. Smarsly, Physikalisch-Chemisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen) eine Stickstoff-Tiefemperatur-Adsorptionsmessung durchgeführt. Zur Messung wurde eine automatische Gas-Adsorptions-Station (Autosorb-6, Quantachrome Corporation, Boynton Beach, USA) verwendet, welche Standardcharakterisierungen von nanostrukturierten Materialien mittels Stickstoff-Adsorptionsisothermen bei 77 K ermöglicht.

Die Mess-Software erlaubt die standardmäßigen Datenreduktionsalgorithmen wie Brunauer-Emmett-Teller (BET) sowie die *non-local density functional theory* (NLDFT) für typische Porengeometrien. Die Silica-Monolithen wurden dazu nach Evakuierung (120 °C, 12 h) in Glasröhrchen durch flüssigen Stickstoff auf einer Messtemperatur von 77 K gehalten.

2.18.9 Bleichung von Molke

Die Bleichung von gefärbter Molke erfolgte mit immobilisiertem MsP1. Dazu wurden folgende Lösungen verwendet:

reine Molke ohne Zusatz

handelsübliche, gekaufte Sauermolke

gefärbte Molke

handelsübliche Sauermolke	50 mL
Reinstwasser	50 mL
Annattolösung (wässrig, alkalischer Extrakt)	200 µL

gefärbter Puffer

50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5	100 mL
Annattolösung (wässrig, alkalischer Extrakt)	250 µL

Ansatz der Bleichung:

Probe ³⁷	9,375 mL
immobilisierte Partikel	50 mg ³⁸ bzw. 500 mg ³⁹
H ₂ O ₂ (2 mM)	625 µL
Gesamtvolumen	10 mL

Die Bleichung der gefärbten Molke und des gefärbten Natriumacetat-Puffers erfolgte unter Schütteln für 12 h (30°C, 300 U min⁻¹). Nach 3 sowie 12 Stunden wurde die Bleichung der Proben dokumentiert. Auf die gleiche Weise wurden Blindwerte (Ansatz ohne immobilisierte Partikel), Negativkontrollen (Ansatz mit deaktivierten Partikeln) und Positivkontrollen (Ansatz mit gereinigtem MsP1) angesetzt und dokumentiert.

³⁷ Als Probe wurde die reine Molke, die gefärbte Molke oder der gefärbte Natriumacetat-Puffer eingesetzt

³⁸ MsP1-BSMAP-SiO₂

³⁹ MsP1-BSAM-PS(I)

2.19 Sterilisation und Entsorgungshinweise

2.19.1 Sterilisation von Arbeitsmaterialien

Alle zu sterilisierenden Medien, Lösungen und Geräte wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden durch Sterilfilter (Porendurchmesser 0,22 µm) steril filtriert. Nicht-autoklavierbare Arbeitsgeräte wurden über Nacht in Ethanol (70%) eingelegt und anschließend unter der sterilen Werkbank getrocknet.

2.19.2 Sterilisation und Entsorgung von S1-Abfällen

Sowohl feste als auch flüssige S1-Abfälle wurden für 40 min bei 120 °C autoklaviert. Autoklavierbare Kulturen wurden anschließend filtriert und in das Laborabwasser gegeben; feste Bestandteile wurden in den Laborabfall überführt.

2.19.3 Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien

Die zu entsorgenden Lösungsmittel wurde durch das verwendete Aufarbeitsverfahren (Mikroextraktion) sowie durch die weitestgehende Wiederverwendung nach destillativer Aufarbeitung auf ein Minimum reduziert. Nicht wieder verwendbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

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

Silber- und Ethidumbromid-haltige Abfälle wurden getrennt gesammelt. Die Lösungsmittel wurden ebenso wie andere Sonderabfälle und die Chemikalienreste der zentralen Entsorgungseinrichtung der Justus-Liebig-Universität Gießen zugeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinbiochemische Charakterisierung einer Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

3.1.1 Validierung des Western Blots

Der Nachweis einer Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* (PSA) erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot. Für die Produktion des dafür benötigten polyklonalen Antikörpers (s. 2.4.1) wurde die Aminosäuresequenz CQDAQYYPDDASVAGD als Antigen determinante ausgewählt (Riemer 2010). Ein nach Herstellerangaben durchgeführter ELISA-Test ergab einen IgG-Titer von 1:200 000. Im Folgenden wurden unspezifische Bindungen des polyklonalen Antikörpers mit Hilfe von Kontrollen sowie die Reproduzierbarkeit und Korrelation zwischen Konzentration und Signalintensität (Proteinbanden) des Western Blots untersucht.

3.1.1.1 Reaktion des polyklonalen Antikörpers mit einer Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

Zum Nachweis wann der polyklonale Antikörper an die Oxygenase bindet - ob im nativen oder denaturierenden Zustand des Enzyms -, wurde sowohl mit Proteinextrakten aus Myzel als auch aus dem Lyophilisat von PSA eine denaturierende (s. 2.14.2) und eine halbnative SDS-PAGE (s. 2.14.3) mit anschließendem Western Blot (s. 2.14.6) durchgeführt. Frisch geerntetes Myzel von *Pleurotus sapidus* (s. 2.8.8) wurde aufgeschlossen (s. 2.11.2.1) und der erhaltene Proteinextrakt zur denaturierenden bzw. halbnativen SDS-PAGE verwendet. Lyophilisat von PSA (s. 2.11.1) wurde nach 2.11.1.1 aufgearbeitet. Der erhaltene Überstand wurde ebenfalls als Probe zur SDS-PAGE eingesetzt. Der polyklonale Antikörper band nur unter denaturierenden Bedingungen an die Oxygenase aus frischem Myzel von PSA. Eine Proteinbande mit einem berechneten Molekulargewicht (s. 2.14.2.1) von 76 kDa wurde detektiert (Abb. 3.1). Unter nativen Bedingungen war keine Proteinbande zu erkennen. Bei dem Lyophilisat von PSA hingegen wurden unter denaturierenden Bedingungen Banden mit einem kalkuliertem Molekulargewicht von 76 kDa und 55 kDa detektiert. Unter nativen Bedingungen wies das Lyophilisat eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 55 kDa auf.

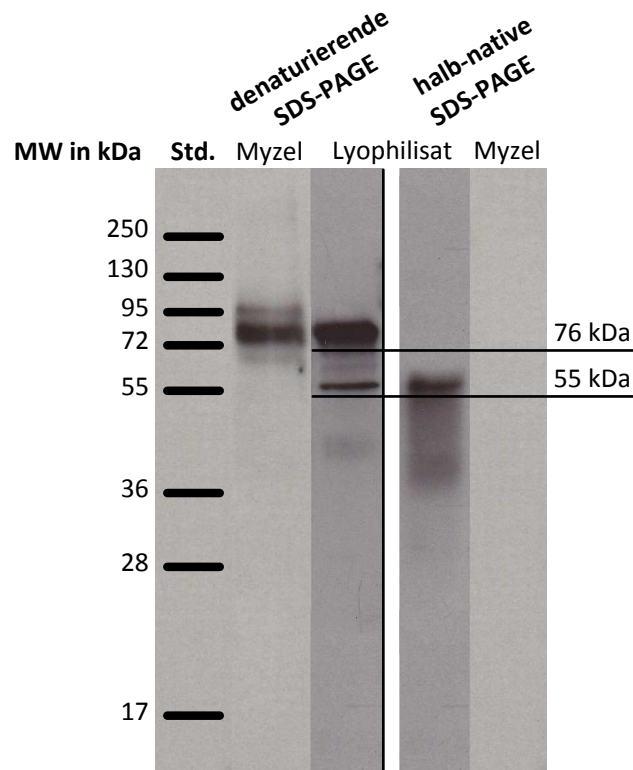


Abbildung 3.1: Vergleich des Proteinbandenmusters einer denaturierenden und einer halbnativen SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot (zusammengefügte Abbildung): MW: Molekulargewicht; Std.: Standard (5 μ L) (Abb. 7.3b); Myzel: frisch geerntetes und aufgeschlossenes Myzel von *Pleurotus sapidus* (6,5 μ L); Lyophilisat: Überstand des Lyophilisates (30 μ L); denaturierend bzw. nativ gibt die Bedingungen der vorangegangenen SDS-PAGE an

3.1.1.2 Kontrollen

Kreuzreaktionen des Antikörpers wurden mittels SDS-PAGE (s. 2.14.2) und anschließendem Western Blot (s. 2.14.6) untersucht. Als Proben wurden sowohl Myzel von *Pleurotus sapidus*⁴⁰ und von *Coprinopsis cinerea* (COCI)⁴¹, als auch Zellen von *Hansenula polymorpha* (*H. polymorpha*)⁴¹, wässrige Lösungen von Rinderserumalbumin (BSA)⁴¹ und von CQDAQYYPDDASVAGD-BSA⁴⁰ (s. 2.4.1) eingesetzt. Die rekombinante Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurde in *H. polymorpha* exprimiert (Riemer 2010). Aus diesem Grund dienten diese Hefezellen als Negativkontrollen. *Coprinopsis cinerea* (zugehörig zu der Gattung Psathyrellaceae) wurde, da er nicht zu der Gattung der Seitlinge zählt, neben BSA ebenfalls als Negativkontrolle verwendet. Dazu wurde frisch geerntetes Myzel von PSA und COCI (s. 2.8.8) aufgeschlossen (s. 2.11.2.1) und als Probe zur denaturierenden SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot eingesetzt. Zellen von *H. polymorpha* wurden nach 2.10.7 geerntet, aufgeschlossen und ebenfalls zur SDS-PAGE eingesetzt.

⁴⁰ Positivkontrollen

⁴¹ Negativkontrollen

Weiterhin dienten als Proben eine wässrige BSA-Lösung ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$) und eine wässrige CQDA-QYYPDDASVAGD-BSA-Lösung ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$) (Abb. 3.2).

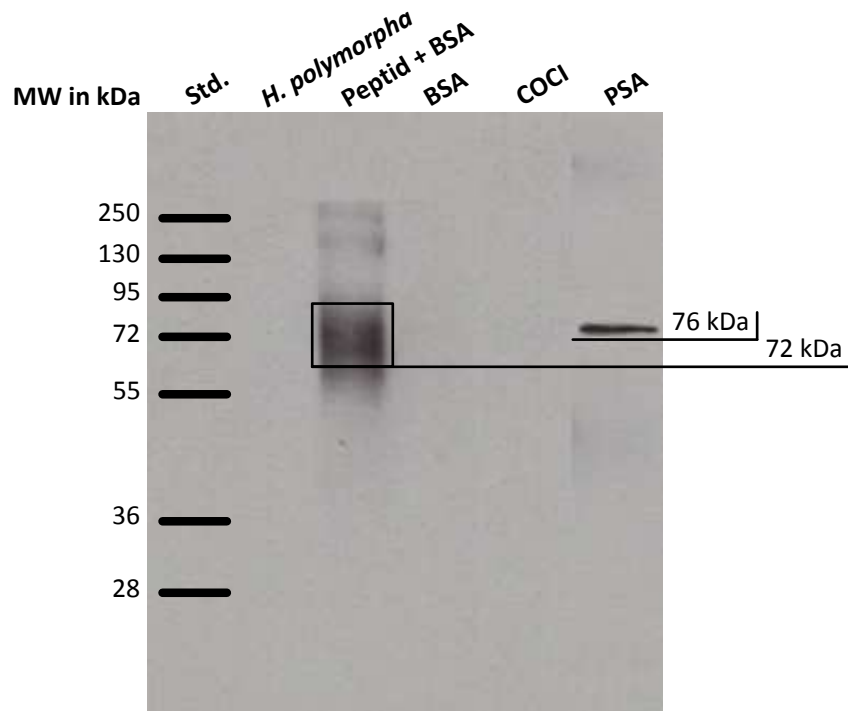


Abbildung 3.2: Western Blot der Kontrollen: MW: Molekulargewicht; Std.: Standard ($5 \mu\text{L}$) (Abb. 7.3b); *H. polymorpha*: frisch geerntete und aufgeschlossene Zellen von *Hansenula polymorpha* ($30 \mu\text{L}$) Negativkontrolle; Peptid + BSA: wässrige CQDAQYYPDDASVAGD-BSA-Lösung ($5 \mu\text{L}$) Positivkontrolle; BSA: wässrige BSA-Lösung ($30 \mu\text{L}$) Negativkontrolle; COCl: frisch geerntetes und aufgeschlossenes Myzel von *Coprinopsis cinerea* ($30 \mu\text{L}$) Negativkontrolle; PSA: frisch geerntetes und aufgeschlossenes Myzel von *Pleurotus sapidus* ($6,5 \mu\text{L}$) Positivkontrolle

Der polyklonale Antikörper wies keine unspezifischen Bindungen an Fremdproteine auf, da lediglich bei den Positivkontrollen (Myzel von *Pleurotus sapidus*; CQDAQYYPDDASVAGD-BSA-Lösung) charakteristische Proteinbanden detektiert wurden. CQDAQYYPDDASVAGD-BSA wies eine Bande mit einem ermittelten Molekulargewicht von 72 kDa ⁴² auf. Bei dem Myzel von PSA wurde eine Bande mit dem Molekulargewicht von 76 kDa detektiert.

⁴²Das Molekulargewicht von BSA entspricht 66 kDa .

3.1.1.3 Untersuchung der Reproduzierbarkeit des Western Blots

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit des Western Blots und der Konzentrationsabhängigkeit des erhaltenen Bandensignals wurden mit Myzel und Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* eine SDS-PAGE (s. 2.14.2) und anschließend ein Western Blot (s. 2.14.6) durchgeführt. Frisch geerntetes Myzel von PSA (s. 2.8.8) wurde aufgeschlossen (s. 2.11.2.1) und als Probe zur denaturierenden SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot eingesetzt. Das aufgeschlossene Myzel wurde in Fünffachbestimmung auf das SDS-Gel aufgetragen.

Die Banden der aufgetragenen Proben bzw. deren Signalstärken zeigten keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.3).

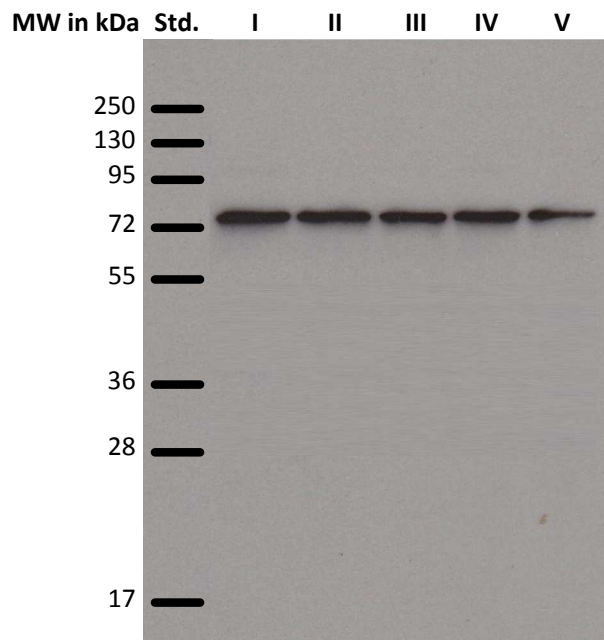


Abbildung 3.3: Western Blot einer Fünffachbestimmung zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit: MW: Molekulargewicht; Std.: Standard (5 μ L); I-V: aufgeschlossenes Myzel von PSA (6,5 μ L)

Lyophilisat von PSA (s. 2.11.1) wurde nach 2.11.1.1 aufgearbeitet. Der erhaltene Überstand wurde gemäß 2.13.1 konzentriert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen als Probe zur SDS-PAGE eingesetzt.

Die Signalstärke der Proteinbande korrelierte mit der Verdünnung der jeweiligen Probe (Abb. 3.4).

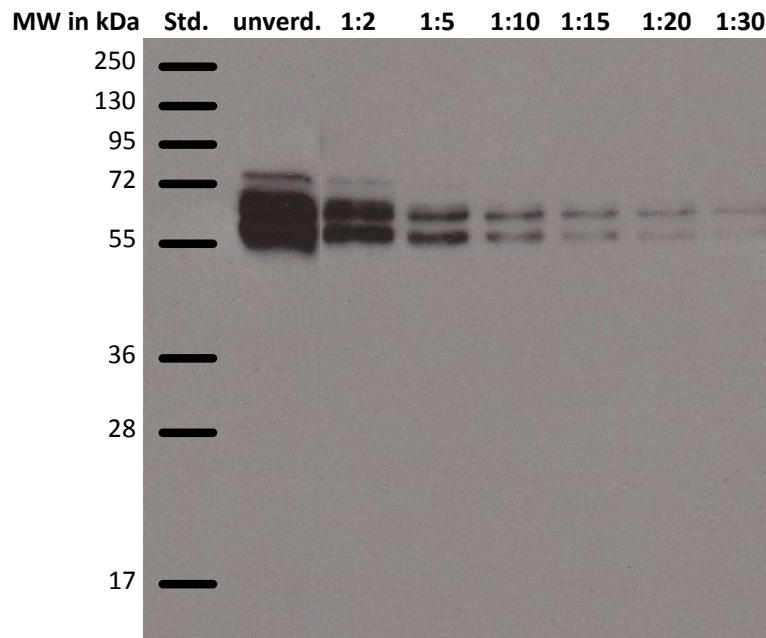


Abbildung 3.4: Western Blot von Proben verschiedener Verdünnungen zur Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit des erhaltenen Bandensignals: MW: Molekulargewicht; Std.: Standard (5 μ L) (Abb. 7.3b); unverd.-1:30: Verdünnung des konzentrierten Überstandes vom Lyophilisat (30 μ L)

Da keine Kreuzreaktionen des Antikörpers nachgewiesen wurden und die Reproduzierbarkeit des Western Blots sowie die Konzentrationsabhängigkeit des Bandensignals gegeben war, erfolgte der Nachweis der Oxygenase aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* mittels SDS-PAGE und Western-Blot.

3.1.2 Biotransformation des Sesquiterpens (+)-Valencen

Die Transformation von (+)-Valencen und die Extraktion der gebildeten Transformationsprodukte wurden nach Fraatz 2007 durchgeführt (s. 2.13.7). Der Extrakt wurde anschließend gaschromatographisch analysiert (Abb. 3.5). Die Identifizierung von (+)-Nootkaton erfolgte mittels GC-FID-ALS (Tab. 2.22) und GC-MS (Tab. 2.23) über den Vergleich mit Standardsubstanzen und den Datenbankvergleich der Massenspektren. Über den internen Standard Thymol wurden die Gehalte des Transformationsproduktes (+)-Nootkaton ermittelt (GC-FID-ALS).

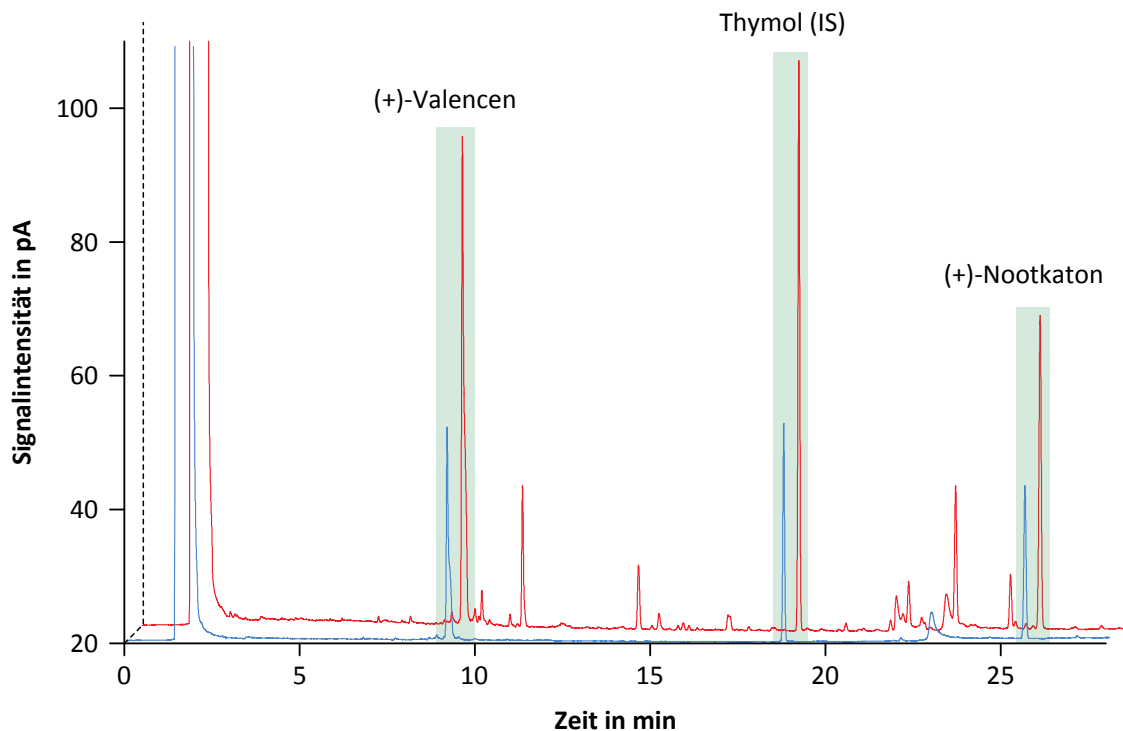


Abbildung 3.5: Gegenüberstellung zweier GC-Chromatogramme: —: Chromatogramm eines Standardgemisches aus (+)-Valencen, Thymol (IS, Interne Standard) und (+)-Nootkaton; —: Chromatogramm der Biotransformation von (+)-Valencen mit Lyophilisat von *Pleurotus sapidus*; ■: kennzeichnet die Peaks von (+)-Valencen, Thymol (IS) und (+)-Nootkaton

3.1.2.1 Bestimmung des Response-Faktors von (+)-Nootkaton

Zur Ermittlung des Response-Faktors wurden drei Standardlösungen von (+)-Nootkaton mit Thymol als internem Standard (IS) nach 2.13.7.1 angesetzt. Die Messung erfolgte mittels GC-FID-ALS (Tab. 2.22) jeweils in Dreifachbestimmung.

Der Response-Faktor von (+)-Nootkaton betrug $1,017 \pm 0,016$.

3.1.3 Transformationsaktivität der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

Die Transformationsaktivität der Oxygenase aus PSA gegenüber (+)-Valencen wurde über den Kulturverlauf des Basidiomyceten gaschromatographisch und mittels Western Blot untersucht. Dazu wurden an jedem Kulturtag steril Proben entnommen, gefriergetrocknet (2.11.1) und zur Transformation (s. 2.13.7.2) bzw. SDS-PAGE (s. 2.14.2) mit anschließendem Western Blot (s. 2.14.6) eingesetzt.

Die Transformationsaktivität der Oxygenase gegenüber (+)-Valencen erreichte am vierten Tag ein Maximum (Abb. 3.6). Die Produktkonzentration an (+)-Nootkaton betrug $3,6 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ TM}$. Die Biotransformationen von (+)-Valencen durch Myzel der anderen Kulturtage ergaben 11–36% geringere (+)-Nootkatongehalte.

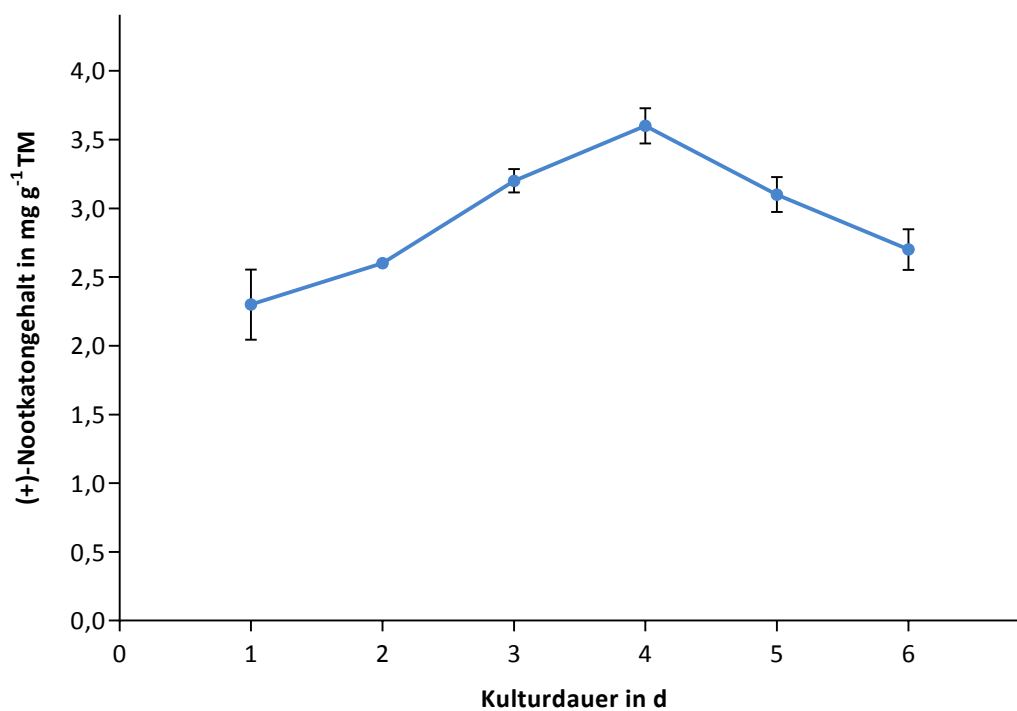


Abbildung 3.6: Transformationsaktivität der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* gegenüber (+)-Valencen über den Kulturverlauf: —●— : Gehalt des Biotransformationsproduktes (+)-Nootkaton in mg g^{-1} Trockenmasse (TM)

Die Konzentration der Oxygenase aus PSA war ebenfalls am vierten Kulturtag am höchsten. Die aufgetragenen Proben zeigten ein Proteinbandenmuster mit ermittelten Molekulargewichten von 76 kDa, 65 kDa und 55 kDa (Abb. 3.7).

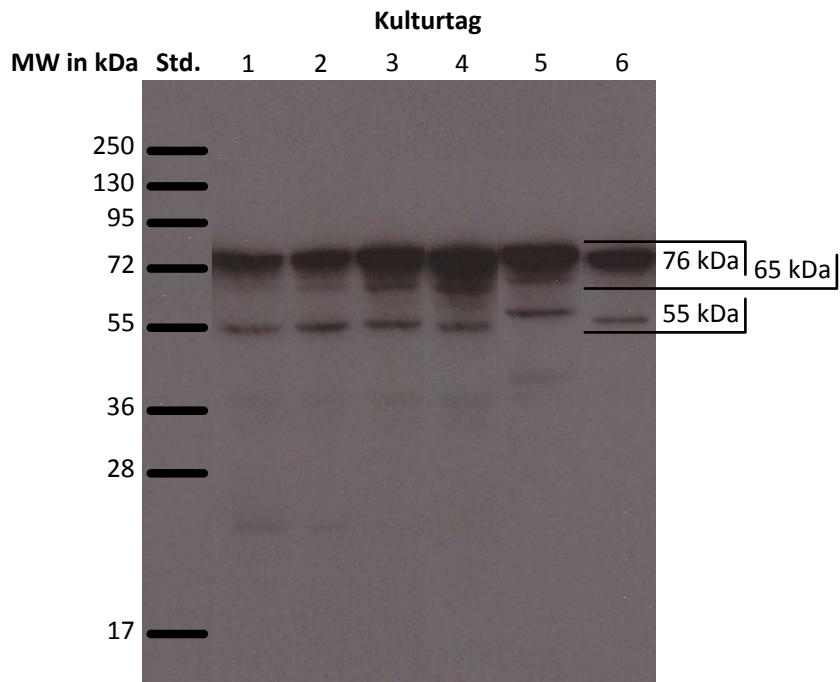


Abbildung 3.7: Western Blot der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* über den Kulturverlauf: MW: Molekulargewicht; Std.: Standard (5 μ L) (Abb. 7.3b); 1-6: Überstand vom Lyophilisat der Kulturtage 1-6 (30 μ L)

3.1.3.1 Einfluss von Zusätzen auf die Transformationsaktivität

Der Proteinaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; 1 mM), sowie Natriumchlorid (NaCl; 150 mM) und der Emulgator Tween[®] 20 (0,1%) wurden dem Transformationspuffer vor der Umsetzung von (+)-Valencen mit PSA-Lyophilisat zugesetzt (s. 2.13.7.2) und deren Einfluss auf die Enzymaktivität beobachtet (Abb. 3.8).

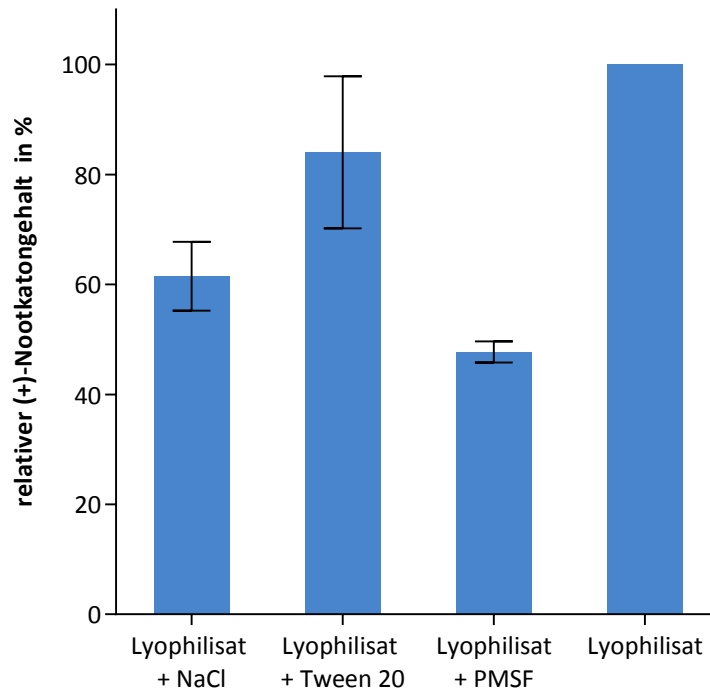


Abbildung 3.8: Einfluss von Zusätzen auf die Produktkonzentration von (+)-Nootkaton: Transformation von (+)-Valencen mit PSA-Lyophilisat unter Zusatz von PMSF, NaCl und Tween[®] 20

Die Aktivität wurde durch die Zusätze von PMSF, NaCl und Tween[®] 20 um 16–53% vermindert. Weiterhin verschlechterte der Zusatz des Emulgators Tween[®] 20 die Reproduzierbarkeit von Mehrfachbestimmungen.

3.1.4 Vergleich verschiedener Zellaufschlussvarianten

Zur Untersuchung der Stabilität der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurde Pilzmyzel unterschiedlichen Zellaufschlüssen (s. 2.11) unterworfen und anschließend zur denaturierenden SDS-PAGE (s. 2.14.2), Western Blot (s. 2.14.6) und Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7) eingesetzt. Neben frischem Pilzmyzel dienten sowohl mehrfach eingefrorenes Myzel, welches gemäß 2.11.2 aufgeschlossen wurde, als auch konzentrierter Überstand (s. 2.11.1.1 und 2.13.1) als Proben für die SDS-PAGE.

Frisches Pilzmyzel wies nach den Zellaufschlüssen mittels flüssigem Stickstoff, Ultra-Turrax oder Rührwerkskugelmühle nur eine Proteinbande mit einem ermitteltem Molekulargewicht von 76 kDa auf (Abb. 3.9). Durch die Verlängerung der Zellaufschlussdauer mittels Rührwerkskugelmühle trat keine Veränderung des Bandenmusters auf (ohne Abbildung). Mehrfach eingefrorenes und mittels flüssigem Stickstoff aufgeschlossenes Myzel zeigte ein Bandenmuster mit Molekulargewichten von 60–76 kDa. Bei dem Überstand von lyophilisiertem PSA wurden Proteinbanden mit Molekulargewichten von 54 kDa, 66 kDa, 68 kDa und 76 kDa detektiert. Durch Konzentrierung des Überstandes veränderte sich das Bandenmuster dahingehend, dass stark ausgeprägte Banden mit Molekulargewichten zwischen 54–68 kDa erhalten wurden.

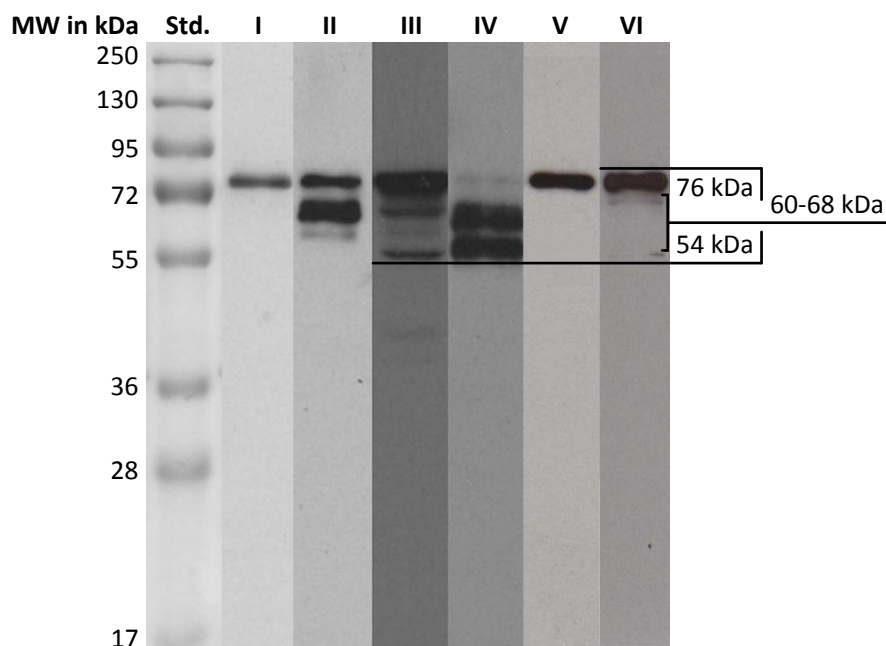


Abbildung 3.9: Western Blot verschiedener Zellaufschlüsse und Probenvorbereitungen des Myzels von PSA (zusammengefügte Abbildung): MW: Molekulargewicht; Std.: Standard (5 μ L) (Abb. 7.3b); I: frisch geerntetes und mittels flüssigem Stickstoff aufgeschlossenes Myzel (6,5 μ L); II: mehrfach eingefrorenes und mittels flüssigem Stickstoff aufgeschlossenes Myzel (6,5 μ L); III: unverdünnter Überstand des Lyophilisates (30 μ L); IV: konzentrierter Überstand des Lyophilisates (6,5 μ L); V: frisch geerntetes und mittels Ultra-Turrax aufgeschlossenes Myzel (6,5 μ L); VI: frisch geerntetes und mittels Rührwerkskugelmühle (Aufschlussdauer 5 min) aufgeschlossenes Myzel (6,5 μ L)

Die höchste Produktkonzentration wurde durch den Aufschluss mittels Rührwerkskugelmühle mit einer Aufschlussdauer von 5 min erzielt (Abb. 3.10). Der (+)-Nootkatongehalt betrug $21,8 \pm 1,1 \text{ mg g}^{-1}$ Trockenmasse (TM). Aus einer Verlängerung der Aufschlussdauer auf 10–20 min resultierte eine Abnahme der Ausbeute an (+)-Nootkaton um 24%. Die Aufschlüsse mittels flüssigem Stickstoff und Ultra-Turrax erbrachten 31% bzw. 39% niedrigere Gehalte an (+)-Nootkaton. Bei der Biotransformation mit lyophilisiertem Pilzmyzel wurden 84% niedrigere (+)-Nootkatongehalte ermittelt und somit die niedrigste Produktausbeute erzielt.

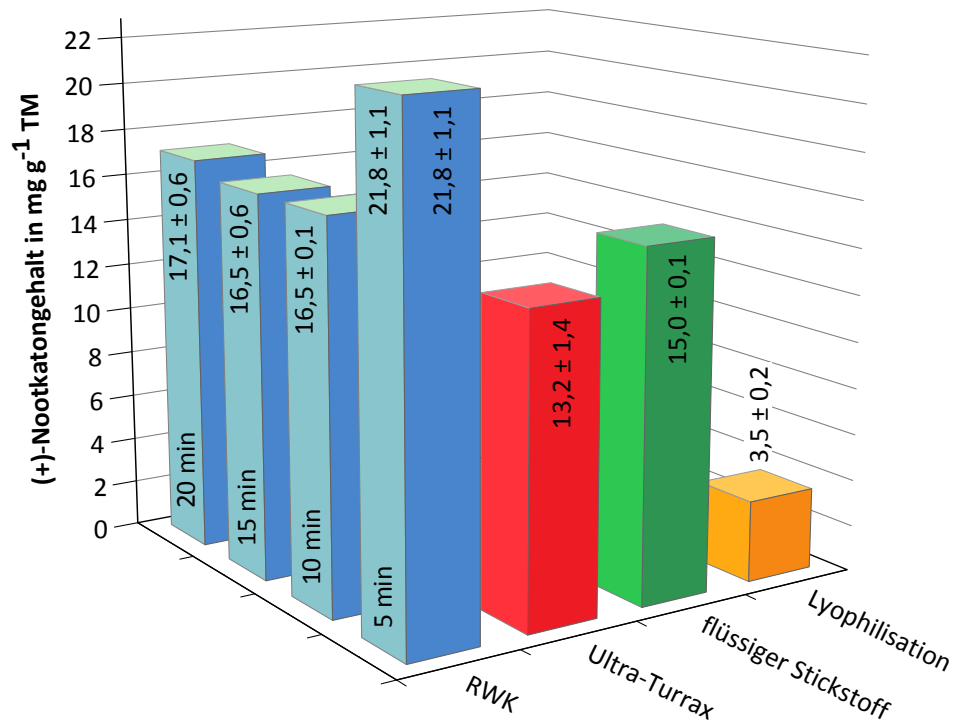


Abbildung 3.10: Biotransformation von (+)-Valencen mit Pilzmyzel von *Pleurotus sapidus* nach verschiedenen Aufschlüssen: ■: Aufschluss mittels Rührwerkskugelmühle (RWK, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min: Aufschlussdauer in Minuten); ■: Aufschluss mittels Ultra-Turrax; ■: Aufschluss mittels flüssigem Stickstoff; ■: Gefriertrocknung; die Gehalte an (+)-Nootkaton sind in mg g^{-1} Trockenmasse (TM) angegeben

3.1.5 Einfluss der Lagerdauer und -temperatur auf die Transformationsaktivität und das Proteinbandenmuster

PSA-Myzel (s. 2.8.8) wurde für 21 Tage bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, anschließend mittels flüssigem Stickstoff aufgeschossen (s. 2.11.2) und zur Biotransformation (s. 2.13.7.3) sowie zur SDS-PAGE (s. 2.14.2) und Western Blot (s. 2.14.6) eingesetzt (Abb. 3.11).

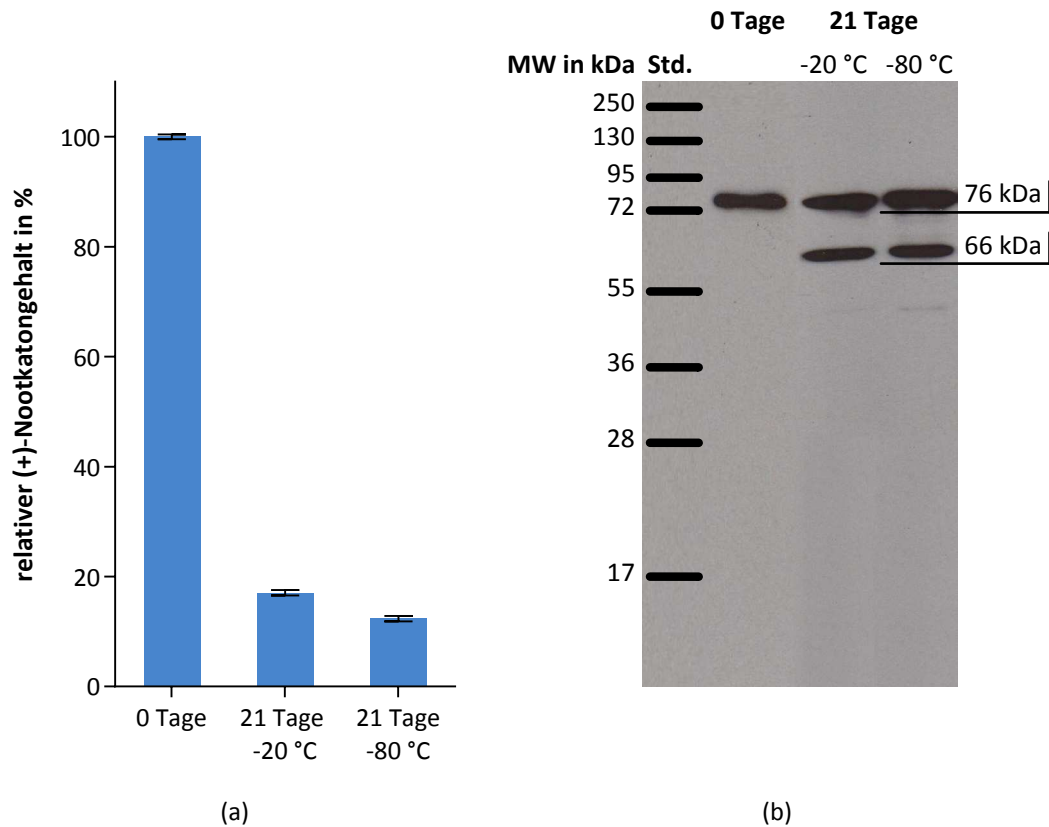


Abbildung 3.11: Einfluss der Lagerdauer und -temperatur auf die Produktausbeute von (+)-Nootkaton und das Bandenmuster der Oxygenase: (a): Transformation von (+)-Valencen mit aufgeschlossenem PSA-Myzel nach 21 Tagen Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; (b): Western Blot des PSA-Myzels nach 21 Tagen Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Nach einer Lagerung von 21 Tagen wurde eine verminderte Aktivität nachgewiesen. Der Gehalt an (+)-Nootkaton betrug im Vergleich zu einer Transformation von (+)-Valencen durch frisches Pilzmyzel lediglich 12–17%. Das Bandenmuster unterschied sich dahingehend, dass bei dem gelagerten Pilzmyzel neben der Proteinbande mit einem ermitteltem Molekulargewicht von 76 kDa eine weitere Bande mit 66 kDa detektiert wurde. Die unterschiedlichen Lagertemperaturen hatten den gleichen Einfluss auf die Transformationsaktivität und das Proteinbandenmuster der Oxygenase.

3.1.6 Vergleich von Myzel und Fruchtkörper

Sowohl die Transformationsaktivität als auch das Proteinbandenmuster des Myzels wurde mit der Aktivität und den Proteinbandenmuster des Fruchtkörpers verglichen. Dazu wurde Myzel von PSA nach 2.11.2 aufgeschlossen und zur Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7.3) sowie zur denaturierenden SDS-PAGE (s. 2.14.2) und Western Blot (s. 2.14.6) eingesetzt (Abb. 3.12). PSA-Fruchtkörper (Tab. 2.2) wurden gemäß 2.11.2.3 aufgeschlossen und auf gleiche Weise untersucht. Nach 2.12.2 wurden Trockenmassen des Pilzmyzels und des Fruchtkörpers von $3,1 \pm 0,3 \text{ g (100 g)}^{-1}$ Myzel bzw. $19,5 \pm 0,4 \text{ g (100 g)}^{-1}$ Fruchtkörper bestimmt.

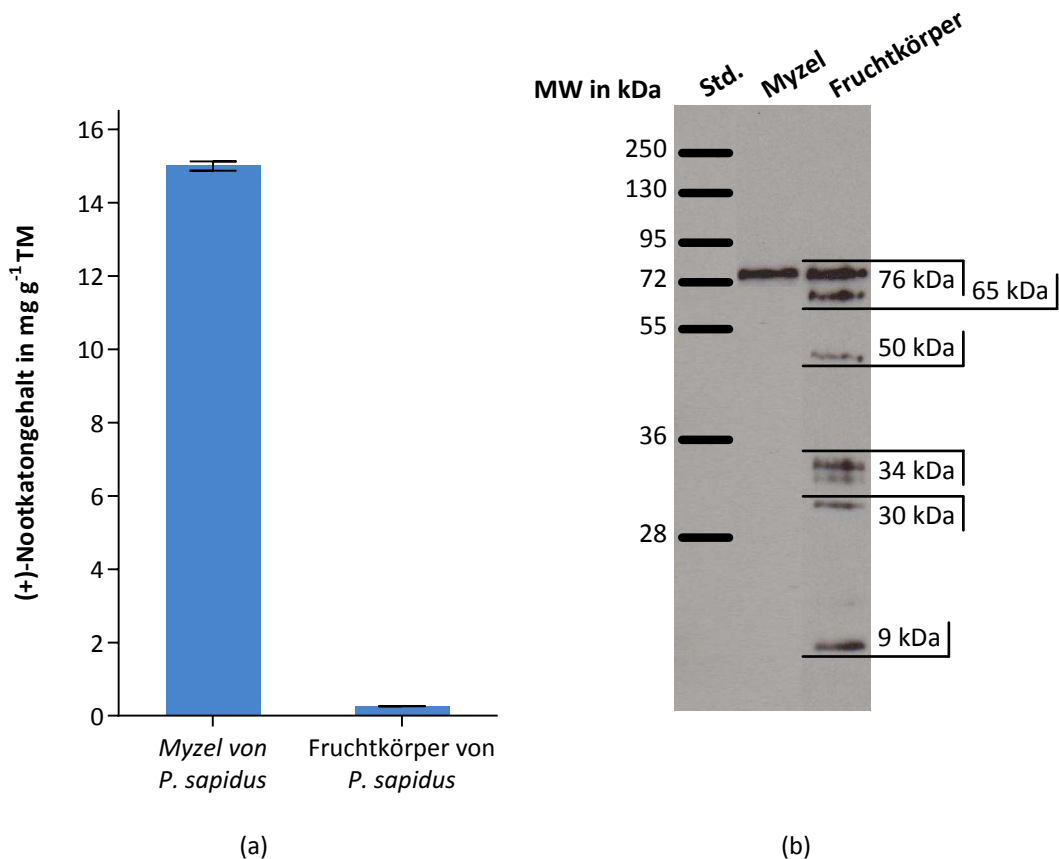


Abbildung 3.12: Vergleich zwischen PSA-Myzel und Fruchtkörper: (a): Transformation von (+)-Valencen mit aufgeschlossenem PSA-Myzel und Fruchtkörper; die Gehalte an (+)-Nootkaton sind in mg g^{-1} Trockenmasse (TM) angegeben; (b): Western Blot mit aufgeschlossenem PSA-Myzel und aufgeschlossenen Fruchtkörpern

Der Gehalt an (+)-Nootkaton betrug bei der Transformation von (+)-Valencen mit Myzel von *Pleurotus sapidus* $15,0 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$ Trockenmasse (TM). Die Produktkonzentration der Transformation mit PSA-Fruchtkörper fiel 98% niedriger aus. Auch das Bandenmuster des Fruchtkörpers unterschied sich signifikant von dem Proteinbandenmuster des Myzels. Bei dem aufgeschlossenem Fruchtkörper wurden Banden mit Molekulargewichten von 9–76 kDa detektiert.

3.1.7 Vergleich verschiedener Arten aus der Gattung der Seitlinge

Die Aktivität der Enzyme aus *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus ostreatus* (POS) und *Pleurotus eryngii* (PER) gegenüber (+)-Valencen und deren Proteinbandenmuster wurden untersucht und verglichen. Dazu wurde Pilzmyzel von PSA, POS und PER nach 2.11.2 aufgeschlossen und zur Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7.3) sowie zur denaturierenden SDS-PAGE (s. 2.14.2) und Western Blot (s. 2.14.6) eingesetzt.

Gemäß 2.12.2 wurden Trockenmassen des Pilzmyzels von $3,1 \pm 0,3 \text{ g (100 g)}^{-1}$ PSA-Myzel, $3,3 \pm 0,5 \text{ g (100 g)}^{-1}$ POS-Myzel und $2,8 \pm 0,2 \text{ g (100 g)}^{-1}$ PER-Myzel bestimmt.

Der Gehalt an (+)-Nootkaton betrug bei der Transformation von (+)-Valencen mit Myzel von *Pleurotus sapidus* $15,0 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$ Trockenmasse (TM) (Abb. 3.13). Durch den Einsatz von Pilzmyzel des *Pleurotus ostreatus* bzw. *Pleurotus eryngii* verringerte sich die Produktkonzentration an (+)-Nootkaton um 92% bzw. 82%.

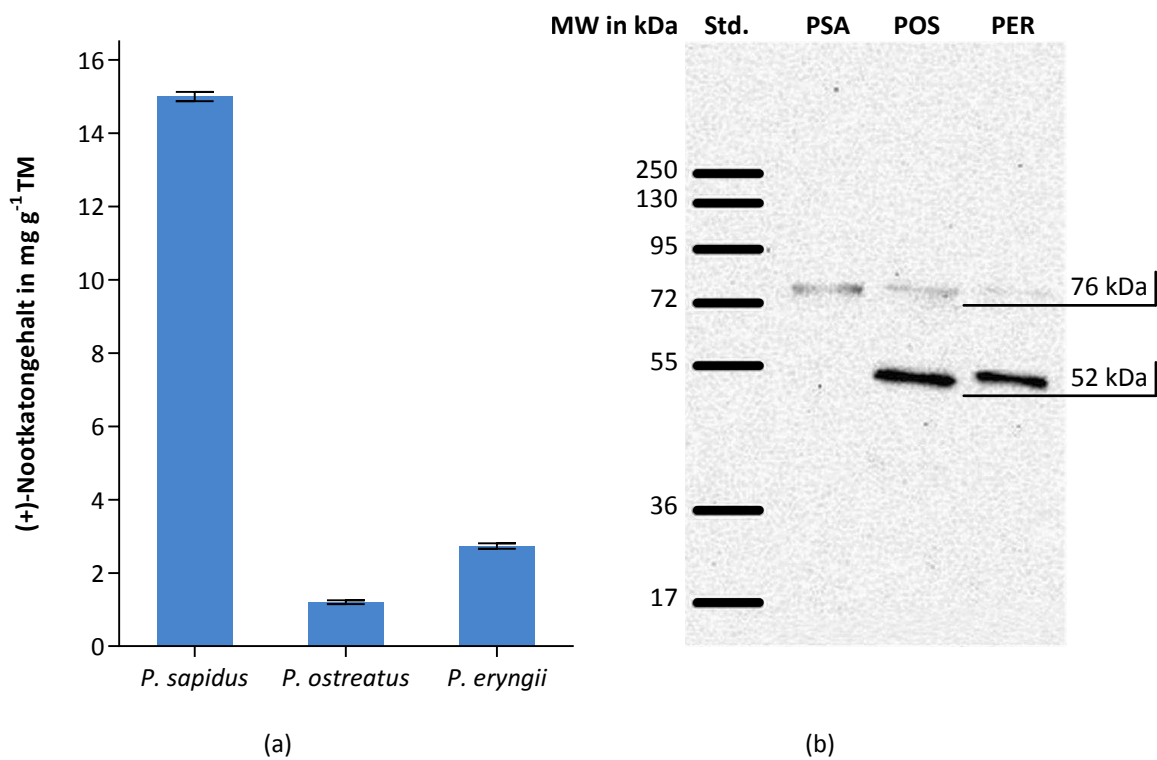


Abbildung 3.13: Vergleich verschiedener Arten aus der Gattung der Seitlinge: (a): Transformation von (+)-Valencen mit aufgeschlossenem PSA-Myzel, POS-Myzel und PER-Myzel, die Gehalte an (+)-Nootkaton sind in mg g^{-1} Trockenmasse (TM) angegeben; (b): Western Blot des PSA-, POS- und PER-Myzels

Die Änderung der Kultivierungsdauer der Pilze POS und PER erhöhte deren Aktivität gegenüber (+)-Nootkaton nicht (Tab. 3.1). Die Kultivierungsdauer der Vor- und der Hauptkultur erfolgte in Abhängigkeit der Zunahme an Biomasse.

Tabelle 3.1: (+)-Nootkatongehalte in mg g^{-1} Trockenmasse (TM) nach Umsetzung von (+)-Valencen mit Myzel von *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii* bei unterschiedlichen Kultivierungsdauern; VK: Vorkultur; HK: Hauptkultur

	Kultivierungsdauer	(+)-Nootkatongehalt in mg g^{-1} TM
<i>Pleurotus ostreatus</i>	4 Tage VK, 4 Tage HK	$1,2 \pm 0,1$
	6 Tage VK, 4 Tage HK	$0,3 \pm 0,0$
	9 Tage VK, 5 Tage HK	$0,5 \pm 0,0$
<i>Pleurotus eryngii</i>	4 Tage VK, 4 Tage HK	$2,7 \pm 0,1$
	6 Tage VK, 2 Tage HK	$0,3 \pm 0,0$
	7 Tage VK, 3 Tage HK	$0,7 \pm 0,1$

Sowohl *Pleurotus ostreatus* als auch *Pleurotus eryngii* wiesen Proteinbanden mit ermittelten Molekulargewichten von 52 und 76 kDa auf. Die Bande mit einem Molekulargewicht von 52 kDa wurde im Gegensatz zur Bande mit einem Gewicht von 76 kDa durch ein eindeutiges Signal detektiert. Durch die Veränderung der Kultivierungsdauer nahm die Signalstärke der Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 76 kDa ab bis hin zum gänzlichen Fehlen dieser Bande (ohne Abbildung). Der Proteinextrakt aus *Pleurotus sapidus* wies eine Hauptbande mit einem Molekulargewicht von 76 kDa auf.

3.1.8 Vergleich der nativen Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* und der in *Hansenula polymorpha* heterolog exprimierten Oxygenase

Die cDNA der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurde von Frau Dr. Stephanie Riemer (Institut für Lebensmittelchemie und -biotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) isoliert und von ARTES Biotechnology heterolog in *H. polymorpha* exprimiert (Riemer 2010). Sowohl das Molekulargewicht der rekombinanten Oxygenase, als auch deren Biotransformationsaktivität gegenüber (+)-Valencen wurden mit der Oxygenase aus PSA verglichen. Dazu wurden Zellen von *H. polymorpha* nach 2.10.7 geerntet, aufgeschlossen und zur denaturierenden SDS-PAGE (s. 2.14.2) mit anschließendem Western Blot (s. 2.14.6) und zur Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7.5) eingesetzt. Weiterhin diente frisch geerntetes und aufgeschlossenes Myzel von PSA (s. 2.8.8 und 2.11.2.1) als Probe für die SDS-PAGE und die Biotransformation (s. 2.13.7.3).

Die detektierte Proteinbande des Pilzmyzels hatte ein ermitteltes Molekulargewicht von 76 kDa (Abb. 3.14). Die rekombinante Oxygenase hingegen wies ein Molekulargewicht von 42 kDa auf, welches mit dem berechneten Molekulargewicht von 44 kDa (Riemer 2010) übereinstimmt. Weiterhin zeigte die heterolog exprimierte Oxygenase in *H. polymorpha* keinerlei Transformationsaktivität gegenüber dem Sesquiterpen (+)-Valencen. Aus diesen Gründen wurde die Untersuchung der Oxygenase aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* durch die Gewinnung von cDNA und anschließender heterologer Expression abermals aufgenommen (s. 3.3).

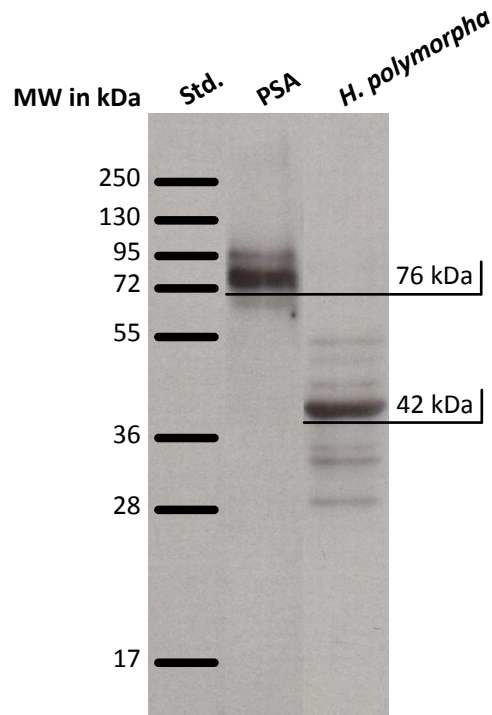


Abbildung 3.14: Western Blot der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* im Vergleich zur rekombinanten Oxygenase aus *Hansenula polymorpha*: MW: Molekulargewicht; Std.: Standard (5 μ L) (Abb. 7.3b); PSA: aufgearbeitetes Myzel von PSA (6,5 μ L); *H. polymorpha*: aufgearbeitete Zellen von *Hansenula polymorpha* (30 μ L)

3.1.9 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI)

Gesamtzellextrakt von *Pleurotus sapidus* (s. 2.11.2.1) wurde einer isoelektrischen Fokussierung unterworfen (s. 2.14.5.2). Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Oxygenase aus PSA wurden die erhaltenen Fraktionen sowohl zum Dot Blot (s. 2.15) als auch zur Biotransformation des Sesquiterpens (+)-Valencen (s. 2.13.7.4) eingesetzt.

Gemäß 2.12.2 wurde eine Trockenmasse des eingesetzten Pilzmyzels von $2,8 \pm 0,2 \text{ g (100 g)}^{-1}$ Myzel bestimmt. Des Weiteren wurden die pH-Werte der einzelnen Fraktionen gemessen.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte Anfangs mit einer Ampholytlösung mit einem pH-Bereich von 3-10, wodurch der pI zwischen 5,43–6,40 eingegrenzt wurde (ohne Abbildung). Anschließend erfolgte die isoelektrische Fokussierung erneut mit einer Ampholytlösung des pH-Bereiches 5-7. Der Dot Blot zeigte lediglich bei der Fraktion 12 ein Signal (Abb. 3.15).

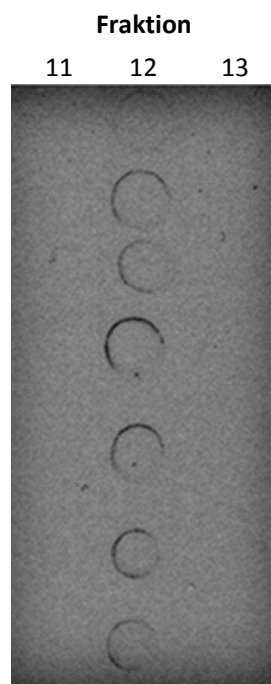


Abbildung 3.15: Dot Blot der Fraktionen nach isoelektrischer Fokussierung: 11, 12, 13: Fraktion 11, 12, 13; die anderen Fraktionen zeigten ebenfalls kein Signal und wurden aus diesem Grund nicht dargestellt

Die Auswertung der Transformation bestätigte das Ergebnis des Dot Blots. Die höchste Konzentration an (+)-Nootkaton wurde mit Fraktion 12 erzielt (Tab. 3.2). Die Messung des pH-Wertes dieser Fraktion ergab einen isoelektrischen Punkt der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* von 5,81.

Tabelle 3.2: pH-Werte der einzelnen Fraktionen sowie die - bei der Transformation erlangte - Konzentration an (+)-Nootkaton in mg g^{-1} Trockenmasse (TM); A5-7: Ampholytlösung mit dem pH-Bereich von 5-7; ■ kennzeichnet Fraktion 12

Fraktion	pH-Wert A5-7	(+)-Nootkatongehalt in mg g^{-1} TM	Fraktion	pH-Wert A5-7	(+)-Nootkatongehalt mg g^{-1} TM
1	3,39	1,0	11	5,62	0,0
2	4,37	1,9	12	5,81	7,5
3	4,61	1,9	13	5,93	1,2
4	4,72	1,4	14	6,09	0,7
5	4,94	0,7	15	6,23	1,2
6	4,97	1,7	16	6,43	1,0
7	5,21	0,0	17	6,50	1,9
8	5,37	1,0	18	6,74	1,7
9	5,43	0,7	19	6,93	1,0
10	5,52	0,0	20	7,19	0,7

3.2 Molekularbiologische Identifizierung von Basidiomyceten

Die Stämme 1020, 8264 und 8266 (DSMZ) wurden in der institutseigenen Stammsammlung als *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus sapidus* geführt. Zur Kontrolle der Spezies erfolgte eine molekularbiologische Identifizierung der genannten Stämme.

3.2.1 Molekularbiologische Identifizierung der Stämme 1020, 8264 und 8266

Zur molekularbiologischen Identifizierung der Stämme 1020, 8264 und 8266 wurden nach White *et al.* 1990 aus genomischer DNA (s. 2.17.3) mit den Primern ITS4 und ITS5 (Tab. 2.8) die ITS1- und ITS2-Region (*Internal Transcribed Spacer Region*; Tab. 3.3), einschließlich der 5,8S rDNA, amplifiziert (s. 2.17.6.3; Abb. 3.16 und 3.17 und 3.18).

Tabelle 3.3: Größe der amplifizierten und sequenzierten Fragmente

Stammnummer	Institutseigene Bezeichnung	Fragmentgröße in bp
1020	<i>P. ostreatus</i>	138
8264	<i>P. eryngii</i>	710
8266	<i>P. sapidus</i>	712

Ein Datenbankvergleich (NCBI-BLAST, Tab. 2.14 und EMBL-EBI, Wu-BLAST bzw. FASTA, Tab. 2.14) der ITS-Sequenzen ergab eine Homologie des Stammes 1020 von 98% zu vier verschiedenen *Pleurotus ostreatus* Stämmen (Tab. 3.4).

```
GCACCGAAAT GCGATAAGTA ATGTGAATTG CATAATTCAG TGAATCATCG AATCTTTGAA CGCACCTTGC 70
GCCCTTGGT ATTCCGAGGG GCATGCCTGT TTGAGTGTC TAAATTCTC AAACACT 129
```

Abbildung 3.16: Sequenzausschnitt der 5,8S rDNA mit flankierendem ITS-Bereich aus dem Basidiomyceten 1020 (DSMZ)

Tabelle 3.4: Auswahl der verschiedenen *Pleurotus ostreatus*-Stämme aus dem Datenbankvergleich mit EMBL-EBI FASTA

Zugriffsnummer	Organismus	Homologie in %	E-Wert
FN391586	<i>Pleurotus ostreatus</i> culture collection ZIM:76 für 5,8S und ITS2 (partial)	98,4	3,6 ⁻³³
AF139969	<i>Pleurotus ostreatus</i> für 5,8S und ITS2	98,4	3,6 ⁻³³
FN391587	<i>Pleurotus ostreatus</i> culture collection ZZN:PIAB für 5,8S, ITS1 und ITS2 (partial)	98,4	3,7 ⁻³³
EU520142	<i>Pleurotus ostreatus</i> isolate NW420 für 5,8S, ITS1 und ITS2	98,4	3,7 ⁻³³

Durch den Vergleich der ITS-Sequenzen wurde der Stamm 8264 mit einer Homologie von 99% zu fünf verschiedenen *Pleurotus eryngii*-Stämmen (Tab. 3.5) zugeordnet.

TTTTTCCTCC	GGCTATTGAT	ATGCTTAAGT	TCAGCGGGTA	GTCCTACTTG	ATTTGAGGTC	AAATTGTCAA	70
ATTGTCCTTG	CGGACGGTTA	GAGAGCCAAA	CTCTATTCAT	GCGTGCTATT	GATGAGTGAT	AATTATCACA	140
TCATGCGCAG	AGGCAATGAG	AAGTCCTGCT	AATGCATTTA	AGAGGAGCCG	ACCTGTCAAG	GCCAGCAGCC	210
CCCAACAATC	CAAACATCAC	AATTGGAAAA	ACCAGAGTGA	GTTTGAGAAT	TTAATGACAC	TCAAACAGGC	280
ATGCCCTCG	GAATACCAAG	GGGCGCAAGG	TGCGTTCAAA	GATTCGATGA	TTCACTGAAT	TCTGCAATTC	350
ACATTACTTA	TCGCATTTTC	CTGCGTTCTT	CATCGATGCG	AGAGCCAAGA	GATCCGTTGT	TGAAAGTTGT	420
ATTATGTTTT	ATAGGCACAA	GGCCCTTTAA	ATGACATTTC	TAGACATACA	TTTGGGGTGT	TATAAGTAAA	490
TAGACTGCGT	AGTCACACCG	AGACGTTTAC	ATCCCAGCAA	ACCAAGTCTA	ACGACTTGAG	AGACGACTTC	560
ACAGATCTAT	CAAAAGTTCA	CAGGTGGTTG	AAAGACTAGT	GAAGCGTGCA	CATGCCCTTA	GAGGCCAGCA	630
ACAATCCAT	AGTGAATTCA	TTAATGATCC	TTCCGCAGGT	TCACCTACGG	AAACCTTGTT	ACGATTTTTT	700
ACTTCCAAC	770						

Abbildung 3.17: Sequenz der 5,8S rDNA mit flankierendem ITS-Bereich aus dem Basidiomyceten 8264 (DSMZ, Braunschweig)

Tabelle 3.5: Auswahl der verschiedenen *Pleurotus eryngii*-Stämme aus dem Datenbankvergleich mit EMBL-EBI FASTA

Zugriffsnummer	Organismus	Homologie in %	E-Wert
HM561986	<i>Pleurotus eryngii</i> isolate PEC1 für 5,8S, ITS1 und ITS2	99,6	2,2 ⁻²⁰²
HM561985	<i>Pleurotus eryngii</i> isolate PET1 für 5,8S, ITS1 und ITS2	99,6	2,2 ⁻²⁰²
DQ333235	<i>Pleurotus eryngii</i> clone 2 für 5,8S, ITS1 und ITS2	98,7	4,5 ⁻²⁰²
FJ379275	<i>Pleurotus eryngii</i> strain X-102 für 5,8S, ITS1 und ITS2	99,4	1,5 ⁻¹⁹⁹
EU424299	<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i> strain für 5,8S, ITS1 und ITS2	99,1	5,4 ⁻¹⁹⁹

Ein Datenbankvergleich der ITS-Sequenzen ergab eine Übereinstimmung des Stammes 8266 von 97% zu zwei verschiedenen *Pleurotus sapidus* Stämmen (Tab. 3.6).

```

TCTTGAAAG TAAAAAGTCG TAACAAGGTT TCCGTAGGTG AACCTGCGGA AGGATCATT ATGAATTCAC 70
TATGGAGTTG TTGCTGGCCT CTAGGGGCAT GTGCACGCTT CACTAGTCTT TCAACCACCT GTGAACTTTT 140
GATAGATCTG TGAAGTCGTC CTTCAAGTCG TCAGACTTGG TTTGCTGGGA TTTAAACGTC TCGGTGTGAC 210
AACGCAGTCT ATTTACTTAA CACACCCCAA ATGTATGTCT ACGAATGTCA TTTAATGGGC CTTGTGCCTA 280
TAAACCATAA TACAACCTTC AACAACGGAT CTCTTGGCTC TCGCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG 350
ATAAGTAATG TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAAT CTTTGAACGC ACCTTGCGCC CCTTGGTATT 420
CCGAGGGGCA TGCCTGTTTG AGTGTCAATTA AATTCTCAAA CTCACATTTG GTTTTTCCAT CTGTGATGTT 490
TGGATTGTTG GGGGTTGCTG GCTGTAACAA GTCGGCTCCT CTTAAATGCA TTAGCAGGAC TTCTCATTGC 560
CTCTGCGCAT GATGTGATAA TTATCACTCA TCAATAGCAC GCATGAATAG AGTCCAGCTC TCTAATCGTC 630
CGCAAGGACA ATTTGACAAT TTGACCTCAA ATCAGGTAGG ACTACCCGCT GAACCTAAGC ATATCAAAAC 700
GGGGAAGAAA CG 712

```

Abbildung 3.18: Sequenz der 5,8S rDNA mit flankierendem ITS-Bereich aus dem Basidiomyceten 8266 (DSMZ, Braunschweig)

Tabelle 3.6: Auswahl der verschiedenen *Pleurotus sapidus*-Stämme aus dem Datenbankvergleich mit EMBL-EBI FASTA

Zugriffsnummer	Organismus	Homologie in %	E-Wert
AY540327	<i>Pleurotus sapidus</i> strain S047 für 5,8S, ITS1 und ITS2	97,6	4,5 ⁻¹⁹³
FJ810181	<i>Pleurotus sapidus</i> strain dd08093 für 5,8S, ITS1 und ITS2	97,4	5,6 ⁻¹⁹²

3.3 Molekularbiologische Charakterisierung der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

Die Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* ist ein intrazelluläres Enzym, dessen Charakterisierung durch Isolierung der cDNA und anschließender heterologer Expression erfolgte. Durch die Gewinnung sowohl über Affinitätschromatographie mit Hilfe des spezifischen Antikörpers als auch mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung wurden keine ausreichenden Mengen der Oxygenase erhalten, um nach tryptischem Verdau eine *de novo*-Sequenzierung mittels ESI-MS/MS vornehmen zu können. Weiterhin reichten die Mengen nicht aus, um eine proteinbiochemische Charakterisierung der Oxygenase vorzunehmen.

3.3.1 Isolierung genomischer DNA aus *Pleurotus sapidus*

Die Isolierung der Gesamt-DNA erfolgte nach 2.17.3. Die Konzentration betrug $7,8 \pm 0,2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

3.3.1.1 Primerableitung

In vorangegangenen Arbeiten (Riemer 2010) wurde ein Teil der cDNA der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* (1191 bp) ermittelt und unter der Zugriffsnummer FM200795 bei EMBL-EBI veröffentlicht (Abb. 3.19).

ATGCGGTACG	GCTGTGCGGC	GGTTGCATTA	TTCTACCTTA	CAGCAATGGG	AAAGCTGCAC	CCTTTGGCCA	70
TCATCCCGA	CTACAAAGGC	AGCATGGCCG	CTTCGGTCAC	CATCTTCAAC	AAACGTACCA	ATCCATTAGA	140
CATATCCGTG	AATCAGGCTA	ACGACTGGCC	ATGGCGCTAC	GCCAAGACAT	GCGTCCTTTC	TTCGGATTGG	210
GCCCTCCACG	AGATGATCAT	CCATCTTAAC	AACACCCATC	TTGTGGAAGA	AGCAGTCATC	GTGGCGGCAC	280
AGCGCAAAC	GTCCCCTTCA	CACATCGTGT	TCCGGCTTTT	GGAACCACAT	TGGGTTGTCA	CATTGTCCCT	350
CAATGCACTT	GCGCGCAGCG	TCCTTATCCC	CGAAGTCATC	GTTCCCTATAG	CTGGCTTCAG	TGCTCCTCAT	420
ATCTTCCAAT	TCATCCGCGA	ATCATTCACC	AACCTCGACT	GGAAGAGCCT	CTACGTCCCA	GCGGACTTGG	490
AGTCACGTGG	TTTCCCCGTC	GACCAACTCA	ACTCGCCGAA	ATTCCACAAC	TACGCCTATG	CCAGGGATAT	560
CAACGATATG	TGGACAACCT	TGAAGAAGTT	TGTATCGTCC	GTTCTGCAGG	ATGCCCAATA	TTACCCGGAT	630
GATGCCTCGG	TAGCTGGAGA	TACGCAAATT	CAGGCCTGGT	GTGATGAGAT	GCGGTCGGGG	ATGGGTGCCG	700
GGATGACAAA	CTTCCCAGAG	TCGATCACAA	CAGTGGACGA	TCTGGTCAAC	ATGGTCACAA	TGTGCATCCA	770
CATCGCTGCG	CCTCAGCACA	CCGCCGTCAA	CTACCTTCAG	CAATACTATC	AGACCTTCGT	CTCCAACAAG	840
CCATCAGCAT	TATTCTCGCC	ACTCCCGACC	TCGATTGCTC	AACTTCAGAA	ATACACCGAA	AGCGACCTGA	910
TGGCAGCTCT	CCCTCTCAAT	GCCAAACGCC	AGTGGTACT	CATGGCACAG	ATCCCGTATT	TGCTTTCCAT	980
GCAAGTCCAA	GAAGACGAAA	ATATCGTGAC	CTATGCTGCT	AATGCATCAA	CTGATAAAGA	TCCCATCATC	1050
GCGAGCGCTG	GTAGGCAGTT	AGCTGCCGAT	TTGAAGAAAC	TCGCTGCGGT	ATTTTGGGTG	AATAGCGCTC	1120
AGTTAGATGA	TCAGAACACC	CCATACGATG	TCCTGGCACC	CGAGCAACTC	GCAAATGCGA	TTGTAATTTG	1190
A 1191							

Abbildung 3.19: cDNA-Sequenz der Oxygenase aus PSA mit der Datenbankzugriffsnummer FM200795

Das anhand der cDNA übersetzte Protein (Abb. 3.20) umfasste 396 Aminosäuren und hatte ein berechnetes Molekulargewicht von 44 kDa (Fraatz *et al.* 2009a).

```
MRYGCAAVLFLYLTAMGKLLHPLAIIIPDYKGSMAASVTIFNKRTNPLDISVNQANDWPWRYAKTCVLSSDWALHEMIHLLNN  
THLVEEAVIVAAQRKLSPSHIVFRLLLEPHWVVTLSLNALARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIRESFTNFDWKSLYVPAD  
LESRGFPVDQLNSPKFHNYAYARDINDMWTTLLKKFVSSVLQDAQYYPDDASVAGDTQIQAWCEMRSGMGAGMTNFPESIT  
TVDDLVMVTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQTFVSNKPSALFSP LPTSIAQLQKYTESDLMAALPLNAKRWLLMAQIPYL  
LSMQVQEDENIVTYAANASTDKDPIIASAGRQLAADLKKLAAVFLVNSAQLDDQNTPYDVLAPEQLANAIVI*
```

Abbildung 3.20: Proteinsequenz der Oxygenase aus PSA mit der Datenbankzugriffsnummer FM200795

Mit der bisher angenommenen cDNA-Sequenz der Oxygenase wurde ein Abgleich mit dem Genom des *Pleurotus ostreatus* (Genomprojekt PC15 v2.0, JGI BLAST, Tab. 2.14) vorgenommen. Dadurch wurde ein Sequenzbereich identifiziert (scaffold_05:1025166-1027727, ProteinID: 1056091), der dem C-terminalen Bereich einer mutmaßlichen Lipoxygenase zugeordnet war. Der Vergleich dieser beiden Nukleotidsequenzen (EMBL-EBI, ClustalW2, Tab. 2.14) ergab eine Übereinstimmung von 88% (Abb. 3.21). Die kodierende DNA der mutmaßlichen Lipoxygenase vom POS umfasste 1986 bp (übersetzt 661 Aminosäuren) und somit 795 bp mehr als die bisher angenommene cDNA-Sequenz der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*. Basierend auf der erhaltenen Nukleotidsequenz wurden Primer abgeleitet (s. 2.4.5), die zur Amplifizierung der genomischen DNA-Sequenz der Oxygenase verwendet wurden (Abb. 3.21).

POS 1056091	CGATCGAGA	TCGAGCACACTACGTCGG	CTCAAATGTATAGTCATTGCTGTATCAAGGTCACCTGTGCACTGCCT	75
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	TGACGTGTTTCTTGCGCACCGGTGTCGAATTC	CAAGGAACCAACGACACATTTGGTGAATGGAAGACAGGGTGATT	150	
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	ACGCTAGATAGCAACATTGGGATGGTGACGGT	CGGTGGTGACACATTTGCCGCTTGCTCTTCTGGGGTGC	225	
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CATAGTGCTGCAGGGATGTCTCAGGA	AACCTCTCGCAGTCGTCGGTAGGGTTAGGTAAACATTACCGTGGGGTCC	300	
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	TATAAATTGACTCTCTACAGCA	ATG AACACGACAAGAAACCCCCACCGCATCTTGACATCGTCGGCACAAGTAC	375	
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	AATGGTCCACAACGTATCTTTATCGTCACGCAAGGCTTTGCACAATGTACACCTGCCGTACATGGTCCAAACGACC	450		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CAAGCCGACTGGCTACAACGTTGCCCTCAAGAATGCTGCTGAAGGCTACGACAAGGCGAGACGAAT	GTACGTTGC	525	
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	ATAGACTTGCCCGTTTGAATACTTTGACTGAGTACCGCGTTGCTTGCTTAG	GGTTGCATGGCTCTATGACATTGC	600	
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	AGACTATGAGTCATCTGTTCCCAAACCTTCAGCCTCCAACAAAAGACCGACAATACACTTGGGA	ACTCTCCGA	675	
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CGAATTCCTCCCCATCTCGCCATCGTTCCTCTGACCAAGCTGTATCTGCCCATCAATCTTCAGCCCGGTGCG	750		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CCTGGCACAAACGCTGTTGATTATGAGCAGCCTTTGGTACGATGACCACACCGAGCTTGCCCCAGGCCCGGAGCA	825		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	AAACACGATGCAGAAGTTAACTGAGTGGAAATCAAGAGAGGCATAGAGACCAGGGTTGGATCGTCAAGGACATGTT	900		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CAACGCACCAAACATTGGGTTGAGGAATGATTGGTTTACCAGCAGAGGTTTTTGCCCAGCAATCTTTACTGGCCC	975		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	GAATCCAACGACAATCACCTCGCGAACGATACGTGGTGTCCGTCATTACCGCAGAGGCCAAAAGCTCAGAAACAA	1050		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CGCCAAGATGCTTGCTCTGTTGCGGATCAGCTCCTCAAACCTATTCTACGTCAGGACTTCAGCGACTTCCGAGC	1125		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	GCATATGGGAGCGAAGCCTGATGAGGAGTTGTTCAACGACTCAGATGGTGCTATGCGATATGGTTGCGCGGCGGT	1200		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CGCGTTGTTCTACCTTACACCGCGGGGAAGCTCCACCTTTGGCCATCATTCTGACTACAAAAGGCAGCATGGC	1275		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CGCCTCAGTCACCATTTTCAACAAACGCATGATCCGTTAGACATGACTGTGAATCAGGCTAACGATTGGCCATG	1350		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CGCTTCGGTCACCATCTTCAACAAACGTACCAATCCATTAGACATATCCGTGAATCAGGCTAACGCATGGCCATG	1425		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	GCGCTATGCCAAGACATGCGTCTTTCTTGGGATTGGGCCCTCCACGAGATGATCATCCATCTTAAACAATACGCA	1480		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	TCTTGTAGAAGAGGCGCTCATCGTGGCGGCACAGCGCAAACTTCCCTTACACATCGTCTTCAGGCTCTTAGA	1500		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	TCTTGTGGGAAGAACGAGTCACTCGTGGCGGCACAGCGCAAACTTCCCTTACACATCGTCTTCAGGCTCTTAGA	1575		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	ACCACACTGGGTGTTACGCTATCCCTCAATGCACTTGGCGCAGCGTCCCTATTCCCGAGGTATCGTCCCAT	1650		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	AGCTGGCTTCAGTGCTCCTCATATCTTCAAATTCATCCGCGAATCATTACCAACTTCGACTGGAAGAGCCTCTA	1725		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CGTCCCGGGGACCTAGAATCCCGGGTTCCTCAATAGACCAACTAACAGCCCGAAGT	TCCACAATTACGCTTA	1780	
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	TGCTTAGGGATATCAACGATATGTGGACAACCTTGAAGAAGTTTGTATCGTCCGTTCTGCAGGATGCCAAATTA	1800		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CCCGGACGATGCTCGGTGGCTCGGGATACCCAAATTCAGGCCCTGGTGTGATGAGATGCGGCTGGGATGGGTGC	1875		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CCGGATGATGCCCTCGGTAGCTGG	AGATACGCAAAATTCAGGCCCT	1950	
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CGGGATGACAAATTTCCCGAGTGCATCACAACAGTGGACGATCTGGTCAACATGGTACAATGTGCATCCACAT	2025		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CGCGGCGCTCAGCACACCGCCGCTCAACTACCTTCAACAATACTATCAGACCTTCGTACCCAAACAGCCATCAGC	2100		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	ACTATTTCTGCCACTCCCGAAGTCGATTGCCAACTTCAGAAGTACACGGAAAGCGACTTGATGGCAGCTCTCCC	2175		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	TCTCAATGCCAAACGCTCAATGGCTACTCATGGCACAGATCCCATATCTGCTTTCCATGCAAGTCCAGGAGGACGA	2250		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	AAACATTTGTGACCTATGCGCTAACGCATCAACGGATAAGGACCTATCATCGCGAGCGCTGGTAGGCAGCTGGC	2325		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	TGCCGATCTGAAGAACTCGCGCGGTATTTTGGCAAAATAGCTCTCAGTTGGATGACCAGAACACACCATACGA	2380		
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	CGTCTTGCACCCGAACAACCTTGCAAAGGCAATTGTAATT	TGA GAGATATTTACT	2380	
PSA FM200795	-----	-----	-----	-
POS 1056091	TGTCCTGGCACCCGAGCAACTC	GCAAAATGCGATTGTAATT	TGA	1191

Abbildung 3.21: Vergleich der Nukleotidsequenz einer mutmaßlichen Lipoxigenase aus *Pleurotus ostreatus* (Genomprojekt PC15 v2.0; ProteinID: 1056091) mit der cDNA der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* (Zugriffsnummer FM200795): ■: kennzeichnet das laut Datenbank enthaltene Intron; **CCAGG** überlappender Sequenzbereich (bei der Amplifizierung durch die Primer); **[ATG: Start- und TGA]:** Stopcodon der Lipoxigenase und der cDNA der Oxygenase; **█**: Primerbindungsstelle des *forward*-Primers 3607 (s. 2.4.5) im Bereich der *non-coding exon region (untranslated region(UTR))*; **█**: Primerbindungsstelle des *reverse*-Primers 5234; **█**: Primerbindungsstelle des *forward*-Primers 6719; **█**: Primerbindungsstelle des *reverse*-Primers 3608; Primerpaare 3607/5234 und 6719/3608

3.3.1.2 Präparative PCR und Isolierung von DNA-Fragmenten

Mittels präparativer PCR (s. 2.17.6.3) mit den Primerkombinationen 3607/5234 und 6719/3608 (Tab. 2.8) wurden Fragmente mit 1834 bp und 659 bp amplifiziert (Abb. 3.22). Die Hybridisierungstemperatur betrug 53 °C bzw. 50 °C und die Elongationszeit 115 s bzw. 45 s.

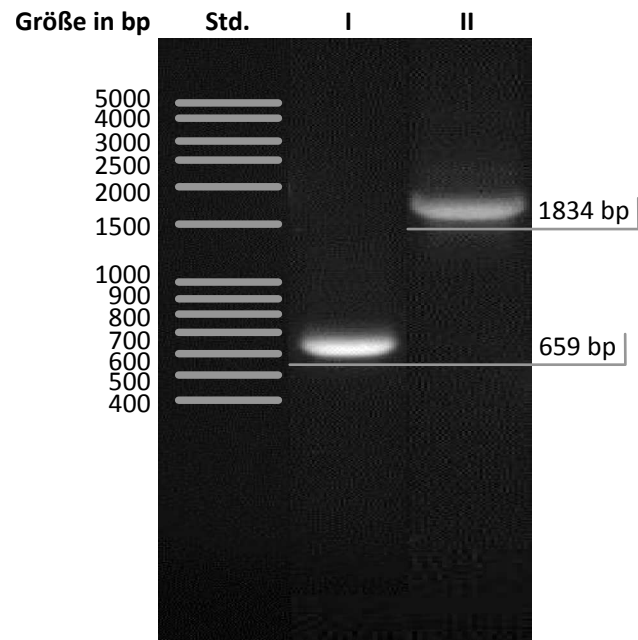


Abbildung 3.22: 1,2%iges Agarosegel mit amplifizierten DNA-Fragmenten: Std.: Standard (20 μ L) (Abb. 7.2b); I: erstes Fragment mit 659 bp; II: zweites Fragment mit 1834 bp

Die PCR-Produkte wurden isoliert (s. 2.17.7), sequenziert (s. 2.17.9.2) und die überlappenden DNA-Sequenzen anschließend zusammengefügt (Abb. 3.23).

TCGAGCACAC	TACGTCCGCT	CAAAACCTAC	AGTCATTGCT	AAATCAAGGT	CACCTGTGCA	CCGCCTTGAC	70
GTGTTTCTTG	CGCGCCGGCG	CTGAATTCCA	AGGAACAAAC	GACACATCGA	TGAATGGAAG	ACAGGGGAAT	140
TACGTACAGAT	CGCAACTTA	AGTTGGTGAC	GGTCGGTGGT	GCACACTGGC	CGTTTGCTCT	TCTGGGGTGC	210
AAACACCGGA	GTGCTGCAGG	GATGTCTCGG	GAACTCTCGC	AGTCGTCCGT	AGGGGTTAGG	TAAACATCCA	280
CCACAGTGTC	CTATAAATTG	ACTCTCTACA	AGG TTC GACA	CGATAACAAA	CTCCCCTACT	GTATCTTGAC	350
ATCGTCAGCA	CAAGTGCAAT	GGTCCACAAC	ATATCGTTGT	CGTCGCGCAA	GGCTTTGCAC	AATGTGCATT	420
TGCCATACAT	GGTCCAATTG	CCCAAGCCGA	CCGGCTACAA	CGTCGCCCTC	AAGAACGCTG	CTGAAGGTTA	490
CGACAAGGCG	AGGCGAATGT	ACGTTGAATA	GACTTGTTTC	TCTGTCAGAA	TCCTTTGACT	GAGTAGCCTG	560
TTGCTTGCTT	TAGGGTTGCG	TGGCTCTATG	ACATTGCAGA	TTATGAATCC	TCTATTCCCC	AAACCTTCAC	630
GCTCCAACAA	AAGACCGACA	AATATACTTG	GGAGCTATCC	GATAACTTCC	CTCCCCACCT	CGCTGTCGTT	700
CCCCAGATC	AATCCGTCTC	CGCGCCGTCG	ATTTTCAGCC	CTGTGCGCCT	CGCCCAAACA	CTGTTGATTA	770
TGAGTAGCCT	TTGGTACGAC	GATCACACCG	ACCTCGCCCC	AGGCCCCGAG	CAAAACACTA	TGCAGAAGTT	840
GACTCAGTGG	AATCAGGAGA	GGCATAAAGA	CCAGGGATGG	TTAATCAAGG	ACATGTTCAA	TGCACCGAAC	910
ATTGGGTAA	GGAATGATTG	GTACACCGAC	GAGGTTTTTCG	CGCAGCAATT	CTTTACTGGC	CCGAATTCAA	980
CGACAATCAC	GCTTGCAAGT	GATGTGTGGT	TGACAGCATT	CACAAGCGAG	GCCAAGGCTC	AGGGGAAGGA	1050
CAAAGTGATC	GCTCTCTTCG	AATCGGCTCC	TCCAACCTCC	TTCTACGTTT	AGGACTTCAG	CGATTTCCGC	1120
AGGCGTATGG	GGGCGAAACC	TGATGAGGAG	CTGTTAACG	ACTCAGACGG	TGCCATGCGG	TACGGCTGTG	1190
CGGCGGTTGC	ATTATTCTAC	CTTACAGCAA	TGGGAAAGCT	GCACCCTTTG	GCCATCATCC	CCGACTACAA	1260
AGGCAGCATG	GCCGCTTCGG	TCACCATCTT	CAACAAACGT	ACCAATCCAT	TAGACATATC	CGTGAATCAG	1330
GCTAACGACT	GGCCATGGCG	CTACGCCAAG	ACATGCGTCC	TTTCTTCGGA	TTGGGCCCTC	CACGAGATGA	1400
TCATCCATCT	TAACAACACC	CATCTTGTGG	AAGAAGCAGT	CATCGTGGCG	GCACAGCGCA	AACTGTCCCC	1470
TTCACACATC	GTGTTCCGGC	TTTTGGAACC	ACATTGGGTT	GTCACATTGT	CCCTCAATGC	ACTTGCGCGC	1540
AGCGTCCTTA	TTCCCGAAGT	CATCGTTCCT	ATAGCTGGCT	TCAGTGCTCC	TCATATCTTC	CAATTCATCC	1610
GCGAATCATT	CACCAACTTC	GACTIONAAGA	GCCTCTACGT	CCCAGCGGAC	TTGGAGTCAC	GAGGTTTCCC	1680
GGTAGACCAA	CTCAACTCGC	CGAAATTCCA	CAACTACGCC	TATGCCAGGG	ATATCAACGA	TATGTGGACA	1750
ACCTTGAAGA	AGTTTGTATC	GTCCGTTCTG	CAGGATGCC	AATATTACCC	GGATGATGCC	TCGGTAGCTG	1820
GAGATACGCA	AATTCAGGCC	TGGTGTGATG	AGATGCGGTC	GGGGATGGGT	GCCGGGATGA	CAAACTTCCC	1890
AGAGTCGATC	ACAACAGTGG	ACGATCTGGT	CAACATGGTC	ACAATGTGCA	TCCACATCGC	TGCGCCTCAG	1960
CACACCGCCG	TCAACTACCT	TCAGCAATAC	TATCAGACCT	TCGTCCCCAA	CAAGCCATCA	GCATTATTCT	2030
CGCCACTCCC	GACCTCGATT	GCTCAACTTC	AGAAATACAC	CGAAAGCGAC	CTGATGGCAG	CTCTCCCTCT	2100
CAATGCCAAA	CGCCAGTGGT	TACTCATGGC	ACAGATCCCG	TATTTGCTTT	CCATGCAAGT	CCAAGAAGAC	2170
GAAAATATCG	TGACCTATGC	TGCTAATGCA	TCAACTGATA	AAGATCCCAT	CATCGCGAGC	GCTGGTAGGC	2240
AGTTAGCTGC	CGATTTGAAG	AAACTCGCTG	CGGTATTTTT	GGTGAATAGC	GCTCAGTTAG	ATGATCAGAA	2310
CACCCCATAC	GATGTCCTGG	CACCCGAGCA	ACTCGCAAT	GCGATTGTAA	TT TGA	2365	

Abbildung 3.23: Nukleotidsequenz des zusammengesetzten DNA-Fragments aus *Pleurotus sapidus*; ■: Basentriplet, das dem Startcodon (ATG; Abb. 3.21) in der Sequenz des *Pleurotus ostreatus* (Genomprojekt PC15 v2.0; ProteinID: 1056091) und somit dem Beginn der mutmaßlichen Lipoxygenase entspricht; ■: Stopcodon

Das erhaltene DNA-Fragment aus *Pleurotus sapidus* umfasste 2430 bp und wies eine 95%ige Übereinstimmung zu dem identifizierten Sequenzbereich aus dem Genom von *Pleurotus ostreatus* (mutmaßliche Lipoxygenase, ProteinID: 1056091) auf. Weiterhin ergab der Vergleich der Nukleotidsequenzen, dass anstelle des mutmaßlichen Startcodons (ATG) ein Basentriplet TTC vorlag.

Basierend auf der erhaltenen Nukleotidsequenz wurden zur Amplifizierung der kodierenden Sequenz der Oxygenase Primer abgeleitet. Bei der Auswahl dieser wurde darauf geachtet, dass das amplifizierte Produkt sowohl das mutmaßliche Start- als auch das Stopcodon der Oxygenase enthielt.

3.3.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die höchste Produktkonzentration der Transformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton wurde mit Myzel von *Pleurotus sapidus* erzielt, dessen Ernte am 4. Kulturtag erfolgte (s. 3.1.3). Aus diesem Grund wurde die Gesamt-RNA aus dem Myzel des 3. und 4. Kulturtages isoliert (s. 2.17.4) und mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.17.4.1) analysiert (Abb. 3.24).

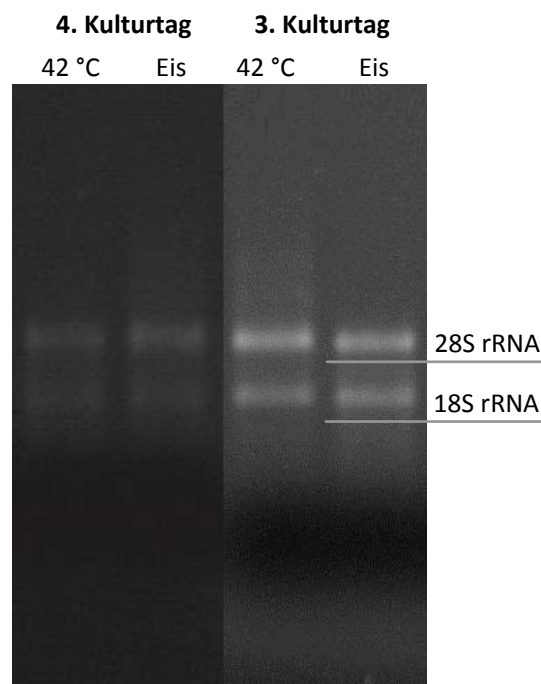


Abbildung 3.24: 1,1%iges Agarosegel mit Gesamt-RNA aus *Pleurotus sapidus* vom 3. bzw. 4. Kulturtag (zusammengefügte Abbildung): Eis: vor der Elektrophorese 2 Stunden auf Eis gelagert; 42 °C: vor der Elektrophorese 2 Stunden bei 42 °C gelagert

Das Agarosegel zeigte ausgeprägte Banden der 18S und 28S rRNA und somit eine intakte RNA. Bei einer vollkommen degradierten RNA hingegen wäre lediglich ein schwacher „Schmier“ zu erkennen (Accerbi *et al.* 2010). Die Gesamt-RNA diente der Synthese des Erststranges (s. 2.17.5.1), der anschließend in einer LD-PCR zur Synthese des Gegenstranges (s. 2.17.5.2) und somit zur Amplifizierung der cDNA-Bibliothek eingesetzt wurde (ohne Abbildung).

Mittels Nanophotometer (Tab. 2.13) wurde eine cDNA-Konzentration von $581,1 \pm 10,8 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ bestimmt.

3.3.3 Amplifizierung und Isolierung der cDNA der Oxygenase mit N-Terminus

Für die Amplifizierung der cDNA-Sequenz der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurden spezifische Primer verwendet (Tab. 2.8), die ausgehend von der genomischen DNA der Oxygenase abgeleitet wurden. Mittels PCR (s. 2.17.6.1) mit der Primerkombination 0257/3608 (Tab. 2.8) wurde eine Sequenz der Oxygenase mit 1953 bp amplifiziert (Abb. 3.25 und Abb. 3.26). Die Hybridisierungstemperatur betrug 50 °C und die Elongationszeit 120 s. Das PCR-Produkt wurde isoliert (s. 2.17.7), in den pCR® 2.1-TOPO Vektor (s. 2.4.6) zwischenkloniert (s. 2.17.8) und anschließend sequenziert (s. 2.17.9.2).

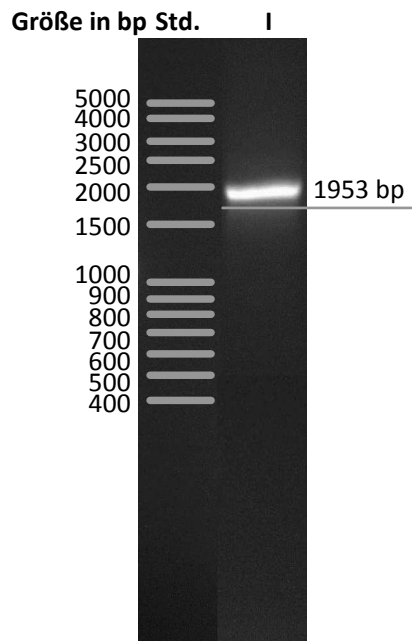


Abbildung 3.25: 1,2%iges Agarosegel mit amplifizierter cDNA: Std.: Standard (20 µL) (Abb. 7.2b); I: cDNA der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* mit 1953 bp

Im Vergleich zur cDNA aus vorangegangenen Arbeiten wurden durch die erneute Amplifizierung der cDNA-Sequenz mit spezifischen Primern zusätzliche 765 bp isoliert (Abb. 3.27). Jedoch wurde kein Startcodon identifiziert.

CTT	GACATCG	TCGGCACAAG	TACAATGGTC	CACAACATAT	CGTTGTCGTC	GCGCAAGGCT	TTGCACAATG	70
TGCATTTGCC	ATACATGGTC	CAATTGCCCA	AGCCGACCGG	CTACAACGTC	GCCCTCAAGA	ACGCTGCTGA	140	
AGGTTACGAC	AAGGCGAGGC	GAATGGTTGC	GTGGCTCTAT	GACATTGCAG	ATTATGAATC	CTCTATTCCC	210	
CAAACCTTCA	CGCTCCAACA	AAAGACCGAC	AAATATACTT	GGGAGCTATC	CGATAACTTC	CCTCCCCACC	280	
TCGCTGTCGT	TCCCCAGAT	CAATCCGTCT	CCGCGCCGTC	GATCTTCAGC	CCTGTGCGCC	TCGCCCAAAC	350	
ACTGTTGATT	ATGAGTAGCC	TTTGGTACGA	CGATCACACC	GACCTCGCCC	CAGGCCCCGA	GCAAAAACACT	420	
ATGCAGAAGT	TGACTCAGTG	GAATCAGGAG	AGGCATAAAG	ACCAGGGATG	GTTAATCAAG	GACATGTTCA	490	
ATGCACCGAA	CATTGGGTTA	AGGAATGATT	GGTACACCGA	CGAGGTTTTT	GCGCAGCAAT	TCTTTACTGG	560	
CCCGAATTCA	ACGACAATCA	CGCTTGCAAG	TGATGTGTGG	TTGACAGCAT	TCACAAGCGA	GGCCAAGGCT	630	
CAGGGGAAGG	ACAAAGTGAT	CGCTCTCTTC	GAATCGGCTC	CTCCCAACTC	CTTCTACGTT	CAGGACTTCA	700	
GCGATTTCCG	CAGGCGTATG	GGGGCGAAAC	CTGATGAGGA	GCTGTTTAAC	GACTCAGACG	GTGCCATGCG	770	
GTACGGCTGT	GCGGCGGTTG	CATTATTCTA	CCTTACAGCA	ATGGGAAAGC	TGCACCCTTT	GGCCATCATC	840	
CCCGACTACA	AAGGCAGCAT	GGCCGCTTCG	GTCACCATCT	TCAACAAACG	TACCAATCCA	TTAGACATAT	910	
CCGTGAATCA	GGCTAACGAC	TGGCCATGGC	GCTACGCCAA	GACATGCGTC	CTTTCTTCGG	ATTGGGCCCT	980	
CCACGAGATG	ATCATCCATC	TTAACAACAC	CCATCTTGTG	GAAGAAGCAG	TCATCGTGGC	GGCAGACGCG	1050	
AAACTGTCCC	CTTCACACAT	CGTGTTCCGG	CTTTTGAAC	CACATTGGGT	TGTACATTG	TCCCTCAATG	1120	
CACTTGCGCG	CAGCGTCTT	ATCCCCGAAG	TCATCGTTCC	TATAGCTGGC	TTCAGTGCTC	CTCATATCTT	1190	
CCAATTCATC	CGCGAATCAT	TCACCAACTT	CGACTGGAAG	AGCCTCTACG	TCCCAGCGGA	CTTGGAGTCA	1260	
CGTGGTTTCC	CCGTCGACCA	ACTCAACTCG	CCGAAATTCC	ACAACACTACG	CTATGCCAGG	GATATCAACG	1330	
ATATGTGGAC	AACCTTGAAG	AAGTTTGTAT	CGTCCGTTCT	GCAGGATGCC	CAATATTACC	CGGATGATGC	1400	
CTCGGTAGCT	GGAGATACGC	AAATTCAGGC	CTGGTGTGAT	GAGATGCGGT	CGGGGATGGG	TGCCGGGATG	1470	
ACAAACTTCC	CAGAGTCGAT	CACAACAGTG	GACGATCTGG	TCAACATGGT	CACAATGTGC	ATCCACATCG	1540	
CTGCGCCTCA	GCACACCGCC	GTCAACTACC	TTCAGCAATA	CTATCAGACC	TTCGTCCCCA	ACAAGCCATC	1610	
AGCATTATTC	TCGCCACTCC	CGACCTCGAT	TGCTCAACTT	CAGAAATACA	CCGAAAGCGA	CCTGATGGCA	1680	
GCTCTCCCTC	TCAATGCCAA	ACGCCAGTGG	TTACTCATGG	CACAGATCCC	GTATTTGCTT	TCCATGCAAG	1750	
TCCAAGAAGA	CGAAAATATC	GTGACCTATG	CTGCTAATGC	ATCAACTGAT	AAAGATCCCA	TCATCGCGAG	1820	
CGCTGGTAGG	CAGTTAGCTG	CCGATTTGAA	GAAACTCGCT	GCGGTATTTT	TGGTGAATAG	CGCTCAGTTA	1890	
GATGATCAGA	ACACCCATA	CGATGTCCTG	GCACCCGAGC	AACTCGCAA	TGCGATTGTA	ATTTGA	1956	

Abbildung 3.26: Nukleotidsequenz des amplifizierten cDNA-Fragments aus *Pleurotus sapidus*; ■: bislang kein Startcodon (ATG) identifiziert

Die so erhaltene Aminosäuresequenz der Oxygenase wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. Berger (Institut für Lebensmittelchemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover) veröffentlicht (Schmidt *et al.* 2011).

Der Abgleich dieser Aminosäuresequenz der Oxygenase aus PSA mit der vorläufigen Sequenz aus vorangegangenen Arbeiten (Zugriffsnummer FM200795) ergab eine Übereinstimmung von 99,8%. Die Sequenzen unterschieden sich lediglich in einer Aminosäure (Ser_{278/525} → Pro) (Abb. 3.27). Der Vergleich der übersetzten Aminosäuresequenz der mutmaßlichen Lipxygenase aus dem Genom des *Pleurotus ostreatus* mit der erhaltenen Sequenz der Oxygenase ergab eine Übereinstimmung von 94%. Im Vergleich fehlten lediglich 10 Aminosäuren inklusive des mutmaßlichen ATG am N-Terminus der Sequenz (Abb. 3.27).

Ergebnisse

POS 1056091	MNTTRNPPPHLDIVGTSTMVHNVSLSRRKALHNVHLPYMVQRPKPTGYNVALKN	54
Oxygenase	-----LDIVGTSTMVHNISLSRRKALHNVHLPYMVQLPKPTGYNVALKN	44
PSA FM200795	-----	-
POS 1056091	AAEGYDKARRMVAWLYDIADYESSVPQTFFSLQQKTDKYTWELSDFFPPHLAIVP	108
Oxygenase	AAEGYDKARRMVAWLYDIADYESSIPQTFTLQQKTDKYTWELSDNFPPHLAVVP	98
PSA FM200795	-----	-
POS 1056091	SDQAVSAPSI FSPVRLAQTLLIMSSLWYDDHTELAPGPEQNTMQKLTQWNQERH	162
Oxygenase	PDQSVSAPSI FSPVRLAQTLLIMSSLWYDDHTDLAPGPEQNTMQKLTQWNQERH	152
PSA FM200795	-----	-
POS 1056091	RDQGWIVKDMFNAPNIGLRNDWFTDEVFAQQFFFTGPNPTTITLANDTWSAFTD	216
Oxygenase	KDQGWLIKDMFNAPNIGLRNDWYFTDEVFAQQFFFTGPNSTTITLASDVWLTAFST	206
PSA FM200795	-----	-
POS 1056091	EAKAQNNAKMLALFGSAPPNSFYVQDFSDFRARMGAKPDEELFNDSGDGAMRYGC	270
Oxygenase	EAKAQGKDKVIALFESAPPNSFYVQDFSDFRRRMGAKPDEELFNDSGDGAMRYGC	260
PSA FM200795	-----MRYGC	5
POS 1056091	AAVALFYLTAPAGKLHPLAIIIPDYKGSMAASVTIFNKRTDPLDMTVNQANDWPWR	324
Oxygenase	AAVALFYLTAMGKLHPLAIIIPDYKGSMAASVTIFNKRTNPLDISVNQANDWPWR	314
PSA FM200795	AAVALFYLTAMGKLHPLAIIIPDYKGSMAASVTIFNKRTNPLDISVNQANDWPWR	59
POS 1056091	YAKTCVLSDDWALHEMIIHLNNTHLVEEAVIVAAQRKLSPSHIVFRLLLEPHWVV	378
Oxygenase	YAKTCVLSDDWALHEMIIHLNNTHLVEEAVIVAAQRKLSPSHIVFRLLLEPHWVV	368
PSA FM200795	YAKTCVLSDDWALHEMIIHLNNTHLVEEAVIVAAQRKLSPSHIVFRLLLEPHWVV	113
POS 1056091	TLSLNLARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIRGSFTNFDWKS LYVPADLESRG	432
Oxygenase	TLSLNLARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIRESTNFDWKS LYVPADLESRG	422
PSA FM200795	TLSLNLARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIRESTNFDWKS LYVPADLESRG	167
POS 1056091	FPIDQLNSPKFHNYAYARDINDMWTTLKKFVSSVLQDAQYYPDDASVAADTQIQ	486
Oxygenase	FPVDQLNSPKFHNYAYARDINDMWTTLKKFVSSVLQDAQYYPDDASVAGDTQIQ	476
PSA FM200795	FPVDQLNSPKFHNYAYARDINDMWTTLKKFVSSVLQDAQYYPDDASVAGDTQIQ	221
POS 1056091	AWCDEMRS GMGAGMTNFPESITTVDDLVMVTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQT	540
Oxygenase	AWCDEMRS GMGAGMTNFPESITTVDDLVMVTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQT	530
PSA FM200795	AWCDEMRS GMGAGMTNFPESITTVDDLVMVTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQT	275
POS 1056091	FVPNKPSALFSP LPKSIAQLQKYTESDLMAALPLNAKRQWLLMAQIPYLLSMQV	594
Oxygenase	FVPNKPSALFSP LPTSIAQLQKYTESDLMAALPLNAKRQWLLMAQIPYLLSMQV	584
PSA FM200795	FVSNKPSALFSP LPTSIAQLQKYTESDLMAALPLNAKRQWLLMAQIPYLLSMQV	329
POS 1056091	QEDENIVTYAANASTDKDPIIASAGRQLAADLKKLAAVFLANSSQLDDQNTPYD	648
Oxygenase	QEDENIVTYAANASTDKDPIIASAGRQLAADLKKLAAVFLVNSAQLDDQNTPYD	638
PSA FM200795	QEDENIVTYAANASTDKDPIIASAGRQLAADLKKLAAVFLVNSAQLDDQNTPYD	383
POS 1056091	VLAPEQLAKAIVI * 662	
Oxygenase	VLAPEQLANAIVI * 652	
PSA FM200795	VLAPEQLANAIVI * 397	

Abbildung 3.27: Vergleich der Aminosäuresequenz einer mutmaßlichen Lipxygenase aus *Pleurotus ostreatus* (1056091) mit der bisher angenommenen Sequenz der Oxygenase (FM200795) und der neu erhaltenen Aminosäuresequenz der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* (Oxygenase): ■: kennzeichnet den Aminosäurenunterschied; ■: fehlende 10 Aminosäuren inklusive des mutmaßlichen ATG; ■: identifizierte Start-Aminosäure (M)

In anschließenden Arbeiten sollten die fehlenden Aminosäuren an die vorhandene Sequenz synthetisiert werden. Weiterhin sollte das Startcodon durch erneute Amplifizierung der cDNA erhalten werden. Jedoch wurde auf diese Weise kein Startcodon ermittelt.

Aus diesem Grund wurde die Nukleotidsequenz des amplifizierten cDNA-Fragments (Abb. 3.26) mit nichtkodierenden Konsensussequenzen nach Kozak (1984) verglichen. Dieser Vergleich ergab eine Übereinstimmung des Sequenzbereiches ACAATGG mit der Sequenz A[C/A][A/C]ATG[G/T]. Dies wies darauf hin, dass es sich bei dem an Position 9 befindlichen M (Abb. 3.23) um die Start-Aminosäure handelte (Zelena *et al.* 2012). Die fehlende Sequenz war Teil der *noncoding exon region* (*untranslated region* (UTR)).

Die Gesamtsequenz der cDNA der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* umfasst somit 1929 bp (übersetzt 643 Aminosäuren) (Abb. 3.28). Das Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 72,3 kDa und einen theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 5,33 (ExPASy ProtParam Tool; Tab. 2.14).

```

LDIVGTSTMVHNISLSSRKALHNVHLPYMQVLPKPTGYNVALKNAEAGYDKARRMVAWLYDIADYESSIPQFTFLQQKTDK
YTWELSDNFPPHLAVPPDQSVSAPSIFSPVRLAQTLLIMSSLWYDDHTDLAPGPEQNTMQKLTQWNQERHKDQGWLKDM
FNAPNIGLRNDWYTDEVFAQQFFTGPNSTTITLASDVWLTAFTSEAKAQGKDKVIALFESAPPNSFYVQDFSDFRRRMGAK
PDEELFNDSGAMRYGCAAVLFYLTAMGKLHPLAIPDYKGSMAASVTIFNKRTNPLDISVNDQANDWPWRYAKTCVLSDD
WALHEMIITHLNTHLVEEAVIVAAQRKLSPSHIVFRLLLEPHWVVTLSLNLARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIREST
NFDWKSLYVPADLESRGFPVDQLNSPKFHNYAYARDINDMWTTLKKFVSSVLQDAQYYPDDASVAGDTQIQAWCDEMRSKM
GAGMTNFPESITTVDDLVMVMTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQTFVPNKPSALFSPLPISIAQLQKYTESDLMAALPLNAK
RQWLLMAQIPYLLSMQVQEDENIVTYAANASTDKDPIIASAGRQLAADLKKLAAVFLVNSAQLDDQNTPYDVLAPQLANA
IVT*

```

Abbildung 3.28: Aminosäuresequenz der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*: LDIVGTST: *noncoding exon region*; **fett**: sichere Identifizierung der Peptidsequenz; ■: potentielle Eisenbindung, ■: potentielle N-Glykosylierungsstelle; ■: potentielle O-Glykosylierungsstelle

In der Aminosäuresequenz sind einige Peptidsequenzen, die in vorangegangenen Arbeiten (Fraatz 2007) durch *de novo* Sequenzierung nach tryptischem Verdau mittels ESI-MS/MS erhalten worden sind, vollständig oder zum Teil enthalten. Die Oxygenase besitzt je eine potentielle N- bzw. O-Glykosylierungsstelle (NetNGly 1.0, NetOGly 3.1; Tab. 2.14).

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* und der Sequenz der Lipoxygenase-1 aus *Glycine max* (PDB-ID 1YGE) wurden 4 Aminosäuren identifiziert, die potentiell in die Bindung des Eisens involviert sind (Minor *et al.* 1993).

Die höchsten Homologien auf Basis der Aminosäuresequenz wurden zu einer postulierten Lipoxygenase aus *Pleurotus ostreatus* (98%), einer Lipoxygenase aus *Pleurotus sajor-caju* (98%), einer Lipoxygenase aus *Pleurotus dryinus* (94%) sowie zu einer mutmaßlichen Lipoxygenase aus *Aspergillus fumigatus* (49%) gefunden (WU-BLAST; Tab. 2.14).

3.3.4 Berechnung eines Strukturmodells

Die Aminosäuresequenz der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* und die Röntgenkristallstruktur der Lipoxygenase-1 aus der Sojabohne (*Glycine max*, PDB-ID 1YGE) wurden miteinander verglichen und ergaben eine Homologie von 15% (ohne Abbildung). Aufgrund der geringen Übereinstimmung der Sequenzen konnte mit Hilfe von SWISS-MODEL (Arnold *et al.* 2006) kein Strukturmodell berechnet werden. Auch andere Lipoxygenasen, deren Kristallstrukturen bekannt sind, wiesen keine höhere Homologie zur Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* auf.

3.4 Heterologe Expression der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

Die heterologe Expression der Oxygenase (lox) wurde von der Firma ARTES Biotechnology durchgeführt. Als Expressionsorganismus diente die Hefe *Hansenula polymorpha* (Uracil-auxotropher Wirtstamm RB11). Die cDNA-Sequenz der Oxygenase wurde an die Codon Usage der Hefe angepasst (Genart) und enthielt einen C-terminalen His-Tag. Für die intrazelluläre Expression wurde ein Expressionsplasmid auf der Basis von pFPMT121 generiert. Ein restriktionspositives Expressionsplasmid wurde einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen, um die Sequenz des Inserts zu verifizieren. Für Stammgenerierungen wurden 24 Uracil-prototrophe Transformantenkolonien ausgewählt. Das Screening auf positive Transformanten wurde mittels Western Blot nach denaturierender SDS-PAGE unter Verwendung des Antiserums gegen die Oxygenase durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurde der entsprechende Vektor ohne Insert (Mock) in den Expressionsstamm transformiert. Das Genkonstrukt lox in *Hansenula polymorpha* führte zur Synthese eines löslichen Proteins von 73 kDa, das dem homolog exprimierten Protein entspricht (ohne Abbildung).

3.4.1 Nachweis der Aktivität

Von den zahlreichen lox6His-Transformanten wurden besonders produktive Einzelstämme ausgewählt und sowohl auf die Transformationsaktivität von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton (s. 2.13.7.5) als auch auf Lipoxygenaseaktivität (s. 2.13.8) getestet. Bei beiden Enzymassays wurde keine Aktivität nachgewiesen; auch Zusätze von Eisen bzw. abgekochtem Lyophilisat und Natriumcholat riefen keine Aktivität hervor. Der Nachweis des Zentralatoms Eisen erfolgte nach 2.16.4. Das Eisen wurde durch eine eindeutige Blaufärbung nachgewiesen (Abb. 3.29).



Abbildung 3.29: Nachweis des Zentralatoms Eisen mittels Färbung für Häm- und Metallenzyme (Häm-färbung)

3.4.2 Rückfaltung der rekombinanten Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* mittels iFOLD® Protein Refolding System-Kit

Die Rückfaltung der rekombinanten Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* erfolgte mittels iFOLD® Protein Refolding System-Kit gemäß 2.13.11.

Dazu erfolgte die Kultivierung von *Hansenula polymorpha* gemäß 2.10. Nach Anzucht und Induktion der Expression wurden die Hefezellen geerntet, aufgeschlossen (s. 2.10.7) und der erhaltene Gesamtzellextrakt zentrifugiert ($14\,000\text{ U min}^{-1}$, $21\,920\times g$, 2 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die heterologe Expression der Oxygenase in *Hansenula polymorpha* und der Aufschluss der Hefezellen wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot überprüft (Abb. 3.30).

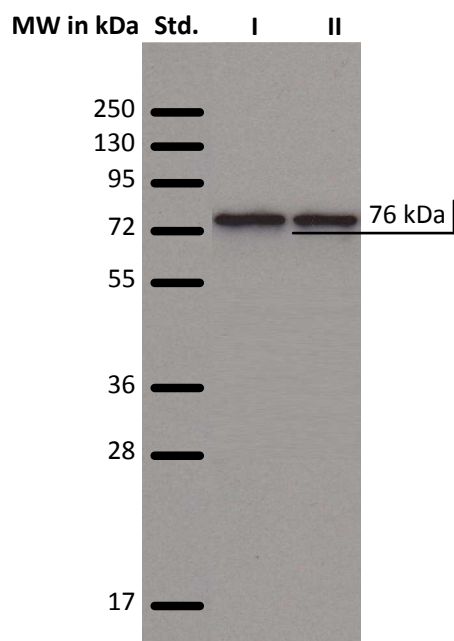


Abbildung 3.30: Western Blot zur Überprüfung der heterologen Expression der rekombinanten Oxygenase in *Hansenula polymorpha* und des Zellaufschlusses der Hefezellen: MW: Molekulargewicht; Std.: Standard (5 μL) (Abb. 7.3b); I: geerntete Hefezellen; II: durch Aufschluss der Hefezellen und anschließender Zentrifugation des Gesamtzellextraktes erhaltener löslicher Zellextrakt (Überstand) (30 μL)

Sowohl die heterologe Expression der Oxygenase in *Hansenula polymorpha*, als auch der Aufschluss der Hefezellen waren erfolgreich. Gemäß 2.13.3 wurde eine Proteinkonzentration des löslichen Zellextraktes von 3 mg mL^{-1} bestimmt.

Der erhaltene lösliche Zellextrakt wurde zur Proteinrückfaltung mittels iFOLD® Protein Refolding System-Kit (Tab. 2.7) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Abweichend zu den Angaben wurde dem Zellextrakt nach der Denaturierung $6,4\text{ mM}$ Eisen(III)-chlorid hinzugefügt, bevor dieser zur Rückfaltung eingesetzt wurde (Abb. 3.31).

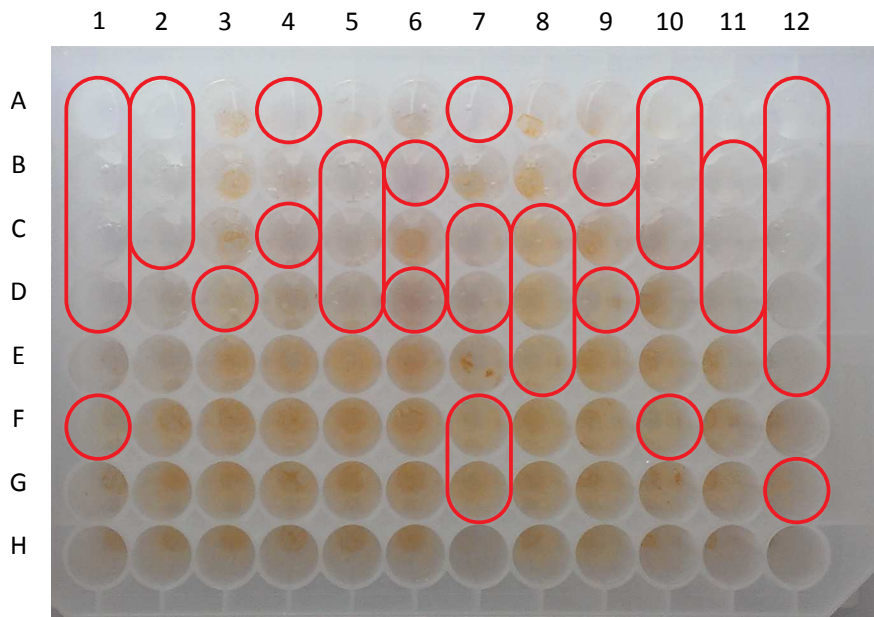


Abbildung 3.31: iFOLD® 96-well Platte: Abbildung der iFOLD® -Matrix nach der Renaturierung der im Zellextrakt enthaltenen rekombinanten Oxygenase; A-H und 1-12: Bezeichnung der einzelnen wells; ○: markiert die wells, die nach der Rückfaltung klaren Renaturierungspuffer enthielten.

In 39 wells der iFOLD® 96-well Platte lagen nach der Rückfaltung klare Renaturierungspuffer vor. In den restlichen wells war ein Niederschlag zu erkennen, der auf präzipitiertes Enzym schließen ließ. Die 39 klaren Renaturierungspuffer, in denen lösliches Enzym vermutet wurde, wurden zur Transformation von (+)-Valencen (s. 2.13.7.5) eingesetzt. Lediglich in 4 der 39 untersuchten Transformationen wurde (+)-Nootkaton nachgewiesen:

1. well B1: 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 mit 0,5 M L-Arginin, 1 mM oxidiertem L-Glutathion, 9 mM reduziertem L-Glutathion, 24 mM Natriumchlorid und 1 mM Kaliumchlorid
2. well D11: 50 mM CHES-Puffer pH 9,0 mit 0,5 M Dimethylbenzylammoniumpropansulfonat, 1 mM oxidiertem L-Glutathion, 9 mM reduziertem L-Glutathion, 24 mM Natriumchlorid und 1 mM Kaliumchlorid
3. well C12: 50 mM CHES-Puffer pH 9,0 mit 10 mM Methyl- β -D-cyclodextrin, 4 mM oxidiertem L-Glutathion, 6 mM reduziertem L-Glutathion, 24 mM Natriumchlorid und 1 mM Kaliumchlorid
4. well E12: 50 mM CHES-Puffer pH 9,0 mit 0,06% Polyethylenglykol (PEG3350), 4 mM oxidiertem L-Glutathion, 6 mM reduziertem L-Glutathion, 24 mM Natriumchlorid und 1 mM Kaliumchlorid

Die höchsten (+)-Nootkatongehalte wurden bei den Biotransformationen mit den enzymhaltigen Renaturierungspuffern 1 (*well* B1) und 4 (*well* D11) nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde die Rückfaltung der rekombinanten Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* mit diesen beiden Renaturierungspuffern wiederholt. Die Aktivität der renaturierten Oxygenase gegenüber (+)-Valencen wurde anschließend erneut überprüft und mit den entsprechenden Chemikalienblindwerten und Negativkontrollen (s. 2.13.7.6) verglichen (Abb. 3.32, am Beispiel des Renaturierungspuffers 1 (MOPS-Puffer, *well* B1) gezeigt).

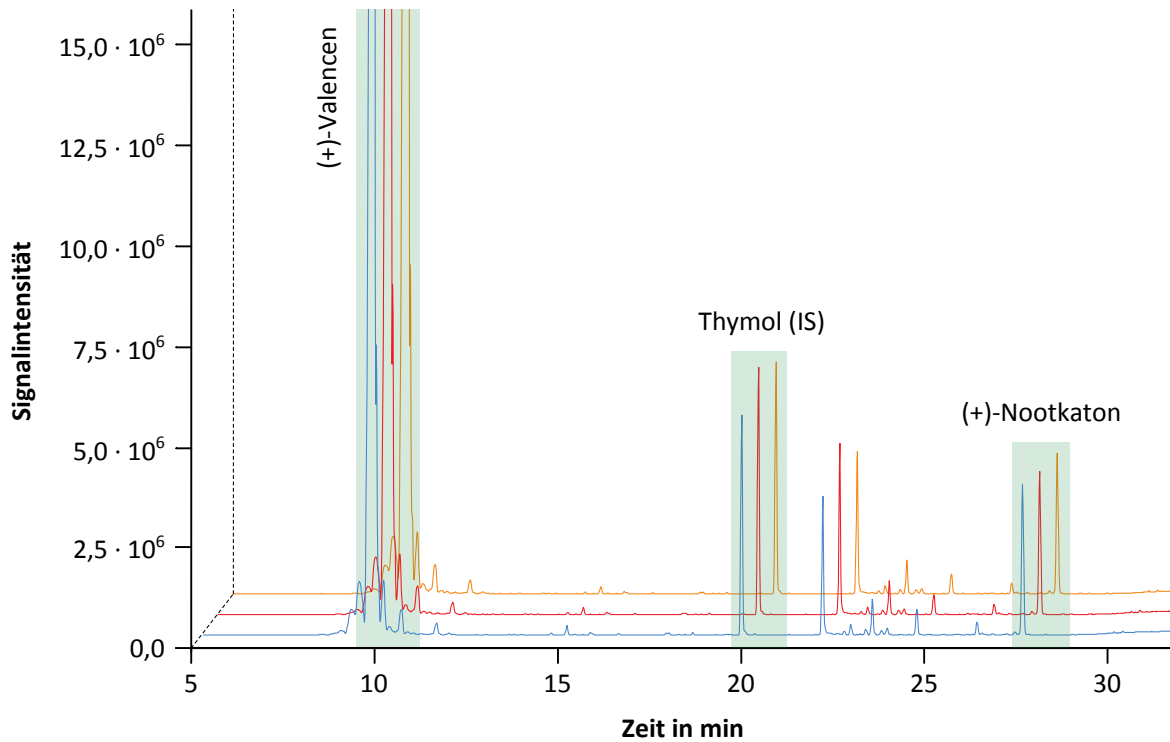


Abbildung 3.32: Gegenüberstellung dreier GC-MS-Chromatogramme: —: Chromatogramm der Biotransformation von (+)-Valencen mit enzymhaltigem Renaturierungspuffer 1; —: Chromatogramm der Biotransformation von (+)-Valencen mit Renaturierungspuffer 1 ohne Zusatz von Zellextrakt (Chemikalienblindwert), —: Chromatogramm der Biotransformation von (+)-Valencen mit inaktiviertem enzymhaltigen Renaturierungspuffer 1 (Negativkontrolle); ■ kennzeichnet die Peaks von (+)-Valencen, Thymol (IS) und (+)-Nootkaton

Auch nach der Proteinrückfaltung mittels iFOLD[®] Protein Refolding System-Kit wies die rekombinante Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* keine Aktivität gegenüber (+)-Valencen auf.

3.5 Untersuchung der Expression der Oxygenase in Seitlingen mittels *Real-time-PCR*

3.5.1 Isolierung genomischer DNA aus *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii*

Die Isolierung der Gesamt-DNA erfolgte nach 2.17.3. Die Konzentration betrug $7,3 \pm 0,2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ bei *Pleurotus ostreatus* und $10,8 \pm 0,4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ bei *Pleurotus eryngii*.

3.5.1.1 Präparative PCR und Isolierung von DNA-Fragmenten

Mittels präparativer PCR (s. 2.17.6.3) mit den Primerkombinationen 6719/0260 und 0259/3608 (Tab. 2.8) wurden Fragmente mit 1543 bp und 661 bp amplifiziert (Abb. 3.33). Die Hybridisierungstemperatur betrug 51°C und die Elongationszeit 100 s bzw. 45 s. Die PCR-Produkte wurden isoliert (s. 2.17.7), sequenziert (s. 2.17.9.2) und die überlappenden DNA-Sequenzen anschließend zusammengefügt.

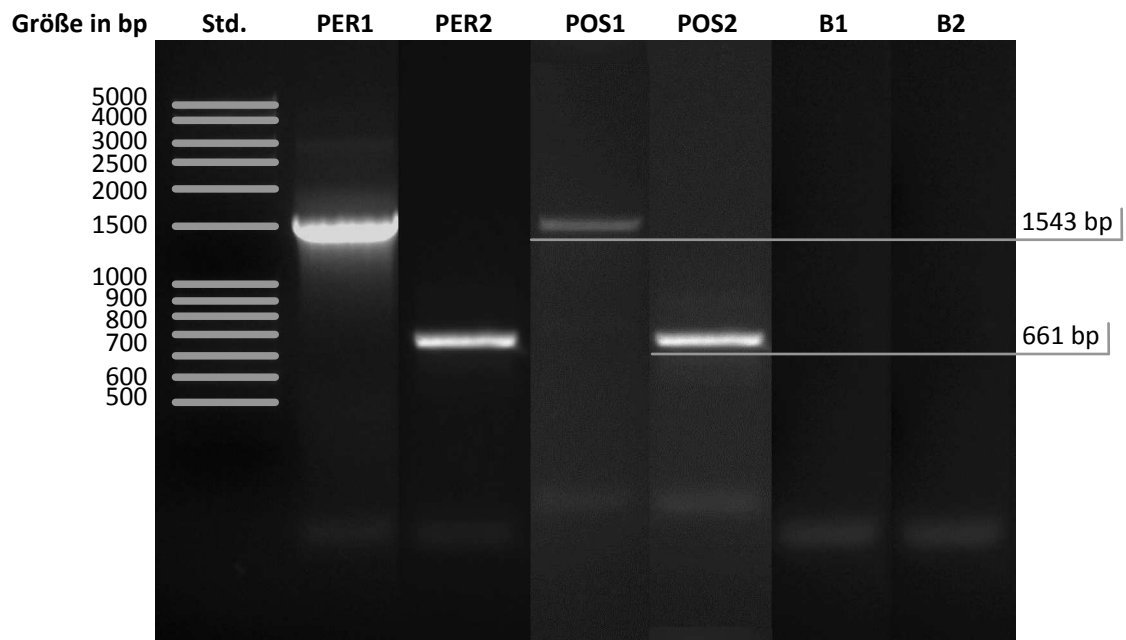


Abbildung 3.33: 1,2%iges Agarosegel mit amplifizierten DNA-Fragmenten (zusammengefügte Abbildung): Std.: Standard (20 μL) (Abb. 7.2b); PER1 bzw. PER2: erstes bzw. zweites Fragment der genomischen DNA aus *Pleurotus eryngii* mit 1543 bp bzw. 661 bp; POS1 bzw. POS2: erstes bzw. zweites Fragment der genomischen DNA aus *Pleurotus ostreatus* mit 1543 bp bzw. 661 bp; B1 bzw. B2: Blindwert (Wasser als Template) der Primerkombination 6719/0260 bzw. 0259/3608

Die zusammengeführten DNA-Sequenzen aus *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus ostreatus* umfassten jeweils 2042 bp (Abb. 3.34 und 3.35).

Die Nukleotidsequenz der genomischen DNA aus *Pleurotus sapidus* (Abb. 3.23) wurde sowohl mit der genomischen DNA aus *Pleurotus eryngii*, als auch mit der Sequenz aus *Pleurotus ostreatus* verglichen (EMBL-EBI, ClustalW2, Tab. 2.14). Die Sequenzen von PER und PSA wiesen eine Homologie von 86% auf, PER und POS 94% und die Sequenzen von PSA und POS 86%.

GCGTCAAGTA	CTCCCCACTA	TATCTTGACA	TCGTCAGCAC	AAGCACAATG	GTCCTTAACG	CATCTTTGTC	70
GTCGCGCAAG	GCTTTGCATA	ATGTACACCT	GCCGTACATG	GTTCAACGAC	CCAAGCCGAC	CGGCTACAAC	140
GTTGCCCTCA	AGAACGCCGC	TGAAGGCTAC	GACAAGGCGA	GACGAATGTG	CGTTGCATAA	ACTTACCCCC	210
GTCCGAACCA	TTTGACTGAG	TAACGCGTTG	CTTGCTTAGG	GTTGCATGGC	TCTATGACAT	TGCAGATTAT	280
GAGTCGTCGA	TTCTCAAAC	CTTCAGCCTC	CAACAAAAGA	CCGACAAATA	CACTTGGGAA	CTCTCCGACG	350
AATTCCTCC	CCATCTCGCC	GTCGTTCCCG	CTGACCAAGC	AGTGTCTGCC	CCATCAATCT	TCAGCCGAGT	420
ACGCCTAGCA	CAAACGTTGT	TGATTATGAG	CAGCCTTTGG	TACGACGACC	ATACCGAGCT	CGCCCCAGGC	490
CCCGAGCAA	ACACGATGCA	GAAGTAACT	GAGTGGAATC	AGGAGAGGCA	TAGAGATCAG	GGTTGGATCG	560
TCAAGGACAT	GTTCAACGCA	CCGAACATTG	GGTTGAGGAA	TGATTGGTTT	ACCGACGAGG	TTTTTGCTCA	630
GCAGTTCTTT	ACTGGCCCAA	ATCCAACGAC	AATCACGCTC	GCGAACGATA	CGTGGGTGTC	AGCATTTACG	700
GGCGAGGCAA	AAGCTCAGAA	CAACGCCAAG	ATGCTTGGTC	TGTTGGAATC	AGCCCCTCCA	AACTCATTCT	770
ACGTCCAGGA	CTTCAGCGAC	TTCCGAGCGC	GTATGGGAGC	GAAGCCTGAT	GAGGAATTGT	TTAACGACTC	840
AGATGGTGCT	ATGCGATATG	GTTGCGCGTC	GGTCGCGTTG	TTCTACCTTA	CGTCGGAGGG	GAAGCTCCAT	910
CCTTTGGCCA	TCATCCCCGA	CTACAAAGGC	AGCATGGCCG	CCTCAGTCAC	CATTTTCAAC	AAACGCACTG	980
ATCCGTCGGA	GCGGACTGTG	AATCAGGCTA	ACGATTGGCC	ATGGCGCTAC	GCCAAAACAT	GCGTCTTTTC	1050
TTCGGATTGG	GCCCTCCACG	AGATGATTAT	CCATCTTAAC	AATACGCATC	TTGTAGAAGA	AGCGGTCATC	1120
GTGGCGGCAC	AGCGCAAAC	TTCCCTTCA	CACATCGTGT	TCAGGCTCTT	AGAACCACAC	TGGGTCGTTA	1190
CGTTATCCCT	CAATGCGCTT	GCGCGCAGCG	TCCTCATTCC	CGAAGTCATC	GTCCCATAG	CTGGCTTCAG	1260
CGCTCCTCAC	ATTTTCCAAT	TCATCCGTGG	GTCATTTACC	AACTTTGACT	GGAAGAGCCT	CTACGTCCCA	1330
GCGGACCTGG	AATCCCGCGG	TTTCCCAATA	GACCAACTTA	ACAGCCGAAA	ATTCCACCAA	TACGCCTATG	1400
CCAGGGATAT	CAACGACATG	TGGACGACGC	TGAAGAAGTT	TGTGTCGTCC	GTTTTGCAGG	ACGCGCAGTA	1470
TTACCCGGAT	GATGCCTCGG	TGGCTGCGGA	TACGCAAATT	CAGGCCTGGT	GCGATGAAAT	GCGGTCTGGG	1540
ATGGGTGCCG	GGATGACAAA	TTTCCCCGAG	TCGATCACGA	CGGTGGACGA	CTTGGTTAAC	ATGGTCACAA	1610
TGTGCATCCA	CATCGCGGCG	CCTCAGCACA	CCGCCGTCAA	CTACCTTCAA	CAATACTATC	AGACCTTTGT	1680
ACCCAACAAA	CCATCGGCAT	TATTCTCGCC	ACTCCCGAAG	TCGATTGCC	AACTTCAGAA	ATACACGGAA	1750
AGCGACTTGA	TGGCAGCTCT	CCCCCTGAAT	GCCAAACGTC	AATGGCTACT	CATGGCCCAG	ATCCCATATC	1820
TGCTTTCCAT	GCAAGTCCAG	GAGGATGAAA	ACATTGTGAC	CTATGCAGCT	AACGCATCAA	CGGACAAGGA	1890
TCCTATCATT	GCGAGCGCTG	GTAGGCAGTT	GGCTGCCGAT	TTGAAGAAAC	TTGCCGCGGT	ATTTTTGGCG	1960
AATAGCTCTC	AGCTGGATGA	CCAGAACACG	CCATACGACG	TCCTTGACC	CGAACAACTC	GCAAATGCGA	2030
TGGTAATTTG	AA	2042					

Abbildung 3.34: Nukleotidsequenz der zusammengeführten DNA-Sequenz aus *Pleurotus eryngii*

GGTTACGGTA	CTCCCCGCG	CATCTTGACA	TCGTCAGCAC	AAGCACAATG	GTCCTCAACG	TATCTTTATC	70
GTCACGCAAG	GCTTTGCACA	ATGTACACCT	GCCGTACATG	GTCCAACGAC	CCAAGCCGAC	TGGCTACAAC	140
GTTGCCCTCA	AGAACGCTGC	TGAAGGCTAC	GACAAGGCGA	GACGCATGTA	CGTTGCATAG	ACTTACTCCC	210
GCCTGAATAC	TCTAACTGAT	TAATGTGTTG	CTCGCTTAGG	GTTGCGTGGC	TCTATGACAT	TGCAGACTAC	280
GAGTCATCTG	TCCCCAAAC	CTTCAGCCTC	CAACAAAAGA	CCGACAAATA	CACTTGGGAA	CTCTCCGACG	350
AGTTCCCTCC	CCATCTCGCC	ATCGTTCCCT	CTGACCAAGC	TGTCTCTGCC	CCATCGATCT	TCAGCCCGGT	420
GCGCCTGGCA	CAAACGCTGT	TGATTATGAG	CAGCCTTTGG	TACGATGACC	ATACCGAGCT	TGCCCCAGGC	490
CCCGAGCAAA	ACACGATGCA	GAAGTAACT	GAGTGGAAATC	AGGAGAGGCA	TAGAGATCAA	GGTTGGATCG	560
TCAAGGACAT	GTTCAACGCA	CCGAACATTG	GGTTGAGGAA	TGATTGGTTT	ACCGACGAGG	TTTTTGCCCA	630
GCAGTCTTT	ACTGGCCCGA	ATCCAACGAC	AATCACGCTC	GCGAACGATA	CGTGGGTGTC	AGCATTTACG	700
GGCGAGGCAA	AAGCTCAGAA	CAACGCCAAG	ATGCTTGCTC	TGTTGCGATC	AGCCCCTCCA	AACTCATTAT	770
ACGTCCAGGA	CTTCAGCGAC	TTCCGAGCGC	GTATGGGAGC	GAAGCCTGAT	GAGGAGTTGT	TCAACGACTC	840
AGATGGTGCT	ATGCGATATG	GTTGCGCGGC	GGTCGCGTTG	TTCTACCTTA	CAGCGGTGGG	AAAGCTCCAC	910
CCTTTGGCCA	TCATCCCTGA	CTACAAAGGC	AGCATGGCCG	CCTCAGTCAC	CATTTTCAAC	AAACGCACTG	980
ACCCGTTGGA	CATAACTGTG	AATCAGGCTA	ACGATTGGCC	GTGGCGCTAC	GCCAAGACCT	GCGTCTTTC	1050
TTCGGATTGG	GCCCTCCACG	AGATGATCAT	CCATCTTAACT	AATACACATC	TTGTAGAAGA	AGCGGTCATC	1120
GTGGCAGCAC	AGCGCAAAC	TTCCCCTTCA	CACATCGTGT	TCAGGCTCCT	AGAACCACAC	TGGGTGCTTA	1190
CTCTATCCCT	CAATGCACTT	GCGCGCAGCG	TCCTCATTCC	CGAAGTCATC	GTCCCATAG	CCGGCTTCCAG	1260
CGCACCTCAC	ATTTTCCAAT	TCATCCGTGG	ATCATTTACC	AACTTTGACT	GGAAGAGCCT	CTACGTCCCA	1330
GCGGACCTGG	AATCCCGCGG	CTTCCCAATA	GACCAACTTA	ACAGCCCTCA	TTCCACAAC	ACGCCTATGC	1400
TAGGGATATC	AACGACATGT	GGACGACGCT	GAAGAAGTTT	GTGTCGTCG	TCTTGCAGGA	CGCGCAGTAT	1470
TACCCAGATG	ATGCTCGGT	GGCTGCGGAT	ACGCAAATTC	AAGCCTGGTG	CGATGAGATG	CGGTCTGGGA	1540
TGGGTGCCGG	GATGAAAAAT	TTCCCCGAGT	CGATCACGAC	AGTGGATGAC	CTGGTCAACA	TGGTGACAAT	1610
GTGCATCCAC	ATCGCGGCGC	CTCAGCACAC	CGCCGTCAAC	TACCTTCAAC	AATACTATCA	GACCTTCGTA	1680
CCAAACAAAC	CATCGGCACT	ATTCTCGCCA	CTCCGAAGT	CGATTGCCCA	ACTTCAGAAA	TACACGGAAA	1750
GCGACCTGAT	GCGGCTCTC	CCCCTCAATG	CCAAACGTCA	ATGGCTACTC	ATGGCACAGA	TCCCATATCT	1820
GCTTTCCATG	CAAGTCCAGG	AGGACGAAAA	CATCGTGACC	TATGCCGCCA	ACGCATCAAC	GGATAAGGAT	1890
CCTATCATCG	CGAGCGCTGG	TAGGCAGTTG	GCTGCCGATT	TGAAGAAACT	CGCCGCGGTA	TTTTTGCGGA	1960
ATAGCTCTCA	GTTGGATGAC	CAGAACACAC	CATACGACGT	CCTTGCACCC	GAACAACCTCG	CAAATGCGAT	2030
TGTAATTGA	AT	2042					

Abbildung 3.35: Nukleotidsequenz der zusammengeführten DNA-Sequenz aus *Pleurotus ostreatus*

Basierend auf den erhaltenen Nukleotidsequenzen aus *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus ostreatus* wurde ein Bereich der Sequenz ausgewählt, der zur Synthese der Standards für die *Real-time-PCR* eingesetzt wurde (Abb. 3.36). Weiterhin wurden zur Untersuchung der Expression der Oxygenase mittels *Real-time-PCR* Primer abgeleitet. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass die Zielsequenz 75–150 bp betrug, der G/C-Gehalt in einem Bereich von 50–60% lag, keine Dimerbildungen auftraten und die Schmelztemperaturen nahezu gleich waren.

POS	ATTCCACAAC TACGCCTATG	CTAGGGATATCAACGACATGTGGACGACGCTGAA	54	
PER	ATTCCACAAC TACGCCTATG	CCAGGGATATCAACGACATGTGGACGACGCTGAA	54	
PSA	ATTCCACAAC TACGCCTATG	CCAGGGATATCAACGATATGTGGACAACCTTGAA	54	

POS	GAAGTTTGTGTCGTC	CGTCCGTTTGCAGGACGCGCAGTATTACCCAGATGATGCCTC	108	
PER	GAAGTTTGTGTCGTC	CGTCCGTTTGCAGGACGCGCAGTATTACCCGGATGATGCCTC	108	
PSA	GAAGTTTGTATCGTC	CGTCCGTTCTGCAGGATGCCCAATATTACCCGGATGATGCCTC	108	

POS	GGTGGCTGC	¹ GGATACGCAAATTCAGGCCT	GGTGCATGAGATGCGGTCTGGGAT	162
PER	GGTGGCTGC	GGATACGCAAATTCAGGCCT	GGTGCATGAAATGCGGTCTGGGAT	162
PSA	GGTAGCTGG	AGATACGCAAATTCAGGCCT	GGTGTGATGAGATGCGGTCTGGGAT	162

POS	GGGTGCCGGGATGAAAA	TTTCCCAGAGTCGATCACGACAGTGGATGACCTGGT	216	
PER	GGGTGCCGGGATGACAAA	TTTCCCAGAGTCGATCACGACGGTGGACGACTTGGT	216	
PSA	GGGTGCCGGGATGACAAA	CTCCAGAGTCGATCACAACAGTGGACGATCTGGT	216	

POS	CAACATGGTGACAATGTGC	ATCCACATCGCGGCGCCTCAGCA	CACCGCCGTCAA	270
PER	TAACATGGTCACAATGTGC	ATCCACATCGCGGCGCCTCAGCA	CACCGCCGTCAA	270
PSA	CAACATGGTCACAATGTGC	ATCCACATCGCTGCGCCTCAGCA	CACCGCCGTCAA	270

POS	CTACC	TTCAACAATACTATCAGACCTTCGTACCAAACAACCATCGGCATTATT	324	
PER	CTACC	TTCAACAATACTATCAGACCTTTGTACCAAACAACCATCGGCATTATT	324	
PSA	CTACC	TTCAGCAATACTATCAGACCTTCGTCCCCAACAAGCCATCAGCATTATT	324	

POS	CTCGCCACTCCC	GAAAGTCGATTGCCCAACTTCAGAAATACACGGAAAGCGACTT	378	
PER	CTCGCCACTCCC	GAAAGTCGATTGCCCAACTTCAGAAATACACGGAAAGCGACTT	378	
PSA	CTCGCCACTCCC	GACCTCGATTGCTCAACTTCAGAAATACACCGAAAGCGACTT	378	

POS	GATGGCGGCTCT	CCCTCTCAATGCCAAACG	TCAATGGCTACTCATGGCACAGAT	432
PER	GATGGCAGCTCT	CCCTCTGAATGCCAAACG	TCAATGGCTACTCATGGCCAGAT	432
PSA	GATGGCAGCTCT	CCCTCTCAATGCCAAACG	CCAGTGGTTACTCATGGCACAGAT	432

POS	CCCATATCTGCTTTCCAT	GCAAGTCCAGGAGGACGAAAACATCGTGACCTATGC	486	
PER	CCCATATCTGCTTTCCAT	GCAAGTCCAGGAGGATGAAAACATCGTGACCTATGC	486	
PSA	CCCGTATTTGCTTTCCAT	GCAAGTCCAAGAAGACGAAAATATCGTGACCTATGC	486	

POS	CGCCAACGCATCAACGGATA	AAGGATCCTATCATCGCGAGCGCTGGTAGGCAGTT	540	
PER	AGCTAACGCATCAACGGACA	AAGGATCCTATCATTGCGAGCGCTGGTAGGCAGTT	540	
PSA	TGCTAATGCATCAACTGATA	AAGATCCCATCATCGCGAGCGCTGGTAGGCAGTT	540	

POS	GGCTGCCGATTTGAAGAA	ACTCGCCGCGGTATTTTTGGCGAATAGCTCTCAGTT	594	
PER	GGCTGCCGATTTGAAGAA	ACTTGC CGCGGTATTTTTGGCGAATAGCTCTCAGCT	594	
PSA	AGCTGCCGATTTGAAGAA	ACTCGCTGCGGTATTTTTGGTGAATAGCGCTCAGTT	594	

POS	GGATGACCAGAACACACC	ATACGACGTCCTTGCACCCGAACAACCTC	GCAAATGC	648
PER	GGATGACCAGAACACGCC	ATACGACGTCCTTGCACCCGAACAACCTC	GCAAATGC	648
PSA	AGATGATCAGAACACCC	CATACGATGTCCTGGCACCCGAGCAACTC	GCAAATGC	648

POS	GATTGTAATTTGA		661	
PER	GATTGGTAATTTGA		661	
PSA	GATTGTAATTTGA		661	

Abbildung 3.36: Vergleich des ausgewählten Nukleotidsequenzbereiches der genomischen DNA aus *Pleurotus ostreatus* mit dem Sequenzbereich aus *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus sapidus*: ■: Primerbindungsstelle des *forward*-Primers 0259 (s. 2.4.5); ■₁: Primerbindungsstelle des *reverse*-Primers 0260; ■: Primerbindungsstelle des *forward*-Primers 0257; ■: Primerbindungsstelle des *reverse*-Primers 0258; ■₂: Primerbindungsstelle des *reverse*-Primers 3608; Primerpaare 0259/0260, 0259/3608 und 0257/0258

3.5.1.2 Synthese der Standards für die *Real-time-PCR*

Die Synthese der Standards für die *Real-time-PCR* erfolgte mittels präparativer PCR (s. 2.17.6.3). Dabei wurde die Gesamt-DNA der Basidiomyceten PSA, POS und PER als Template eingesetzt.

Mit der Primerkombination 0259/3608 (Tab. 2.8) wurden Fragmente mit 661 bp amplifiziert (Abb. 3.37). Die Hybridisierungstemperatur betrug 53 °C und die Elongationszeit 45 s. Die PCR-Produkte wurden isoliert (s. 2.17.7) und sequenziert (s. 2.17.9.2). Die erfolgreiche Synthese der Standards wurde durch die Sequenzierung der Nukleotidsequenz überprüft und bestätigt.

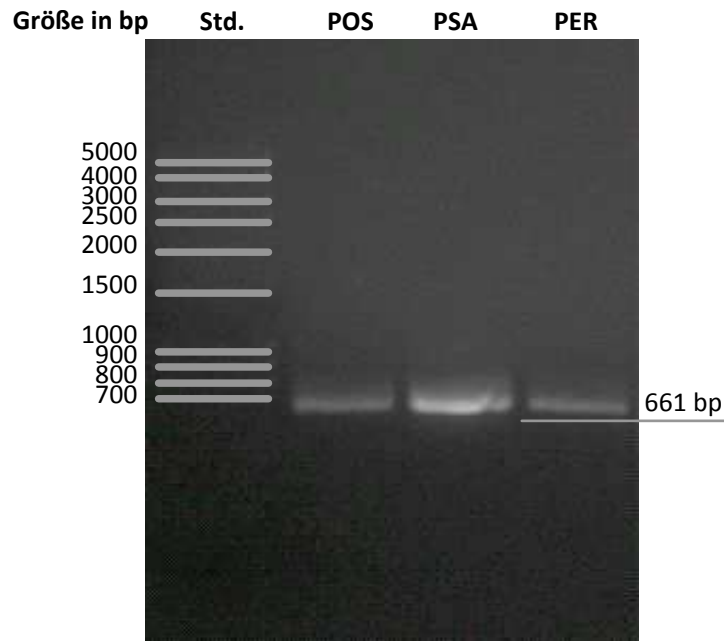


Abbildung 3.37: 1,2%iges Agarosegel mit amplifizierten DNA-Fragmenten: Std.: Standard (20 µL) (Abb. 7.2b); POS: DNA-Fragment aus *Pleurotus ostreatus* mit 661 bp; PSA: DNA-Fragment aus *Pleurotus sapidus* mit 661 bp; PER: DNA-Fragment aus *Pleurotus ostreatus* mit 661 bp

3.5.2 Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur der Primer

Um die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen zu verringern, wurden die optimalen Hybridisierungstemperaturen der Primer, die in der *Real-time*-PCR eingesetzt wurden, nach 2.17.6.2 ermittelt. Die zuvor synthetisierten Standards (s. 3.5.1.2) dienten dabei als Matrize.

Mit den Primerkombinationen 0259/0260 und 0257/0258 (Tab. 2.8) wurden Fragmente mit 97 bp bzw. 115 bp amplifiziert. Die optimale Hybridisierungstemperatur beider Primerkombinationen betrug bei allen Standards 52,7 °C (Abb. 3.38; Darstellung nur einer Primerkombination). Diese Temperatur wurde demzufolge in der *Real-time*-PCR für die Standards und die entsprechenden Proben verwendet.

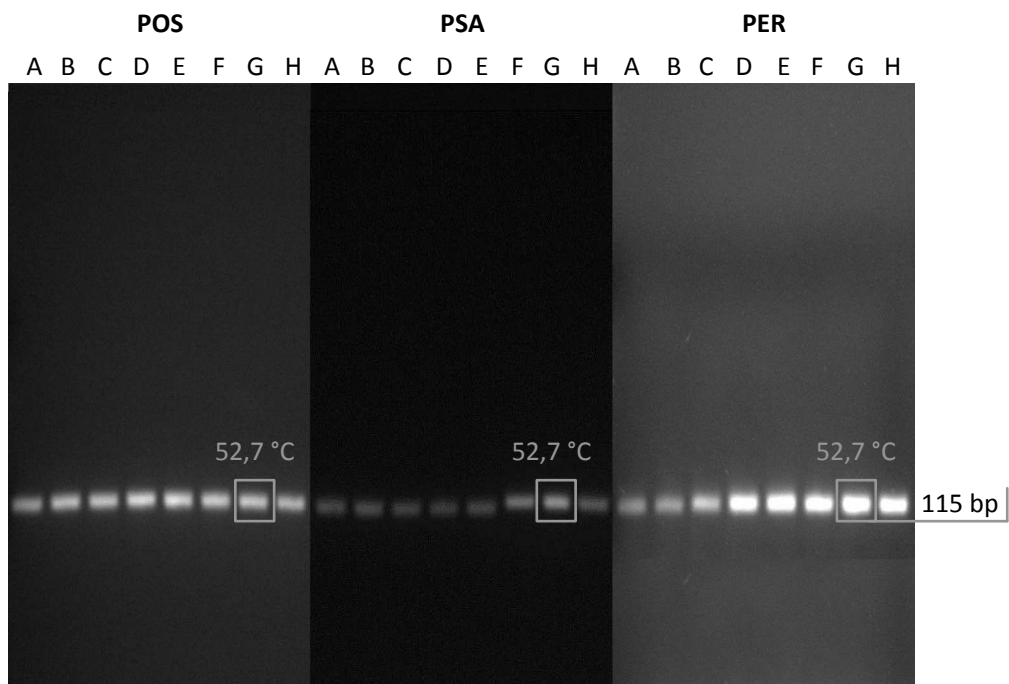


Abbildung 3.38: 2%iges Agarosegel mit amplifizierten DNA-Fragmenten zur Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur der Primer (zusammengefügte Abbildung): POS: DNA-Fragment aus *Pleurotus ostreatus* mit 115 bp; PSA: DNA-Fragment aus *Pleurotus sapidus* mit 115 bp; PER: DNA-Fragment aus *Pleurotus ostreatus* mit 115 bp; A: 62,0 °C; B: 60,0 °C; C: 58,8 °C; D: 57,5 °C; E: 55,9 °C; F: 54,0 °C; G: 52,7 °C; H: 50,0 °C

3.5.3 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Gesamt-RNA von PSA, POS und PER wurde aus dem am 2., 4. und 6. Kulturtag geernteten Myzel isoliert (s. 2.17.4) und mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.17.4.1) analysiert (Abb. 3.39).

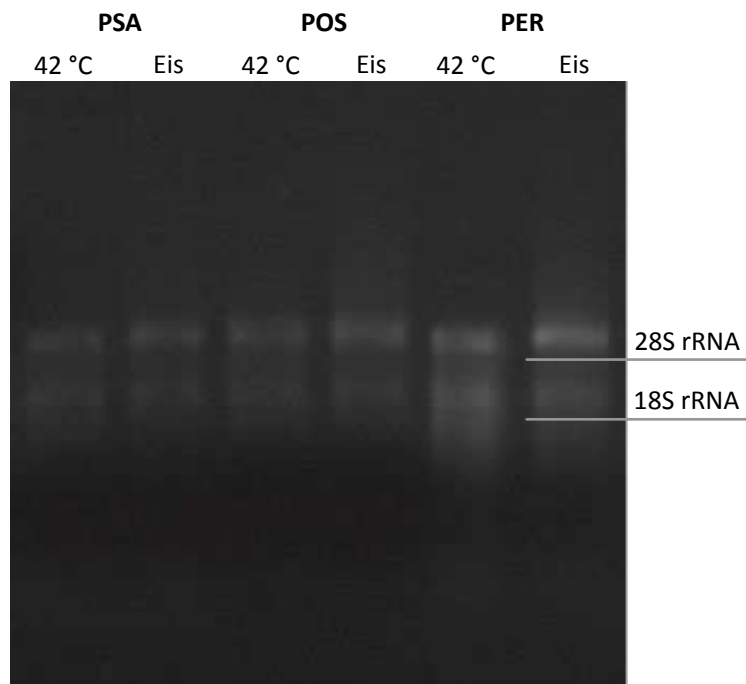


Abbildung 3.39: 1,1%iges Agarosegel mit Gesamt-RNA aus PSA, POS und PER vom 2. Kulturtag: Eis: vor der Elektrophorese 2 Stunden auf Eis gelagert; 42 °C: vor der Elektrophorese 2 Stunden bei 42 °C gelagert

Die jeweilige Gesamt-RNA diente als Matrize für die Synthese des Erststranges (s. 2.17.5.1), der nach Abbau der RNA durch RNase H (gemäß Herstellerangaben) anschließend als Template in einer *Real-time-PCR* (s. 2.17.6.5) eingesetzt wurde.

Die Konzentrationen der isolierten mRNA und des Erststranges der cDNA sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Die RNA-Isolierung und die Synthese des cDNA-Erststranges erfolgten in Doppelbestimmung.

Tabelle 3.7: Konzentrationen der mRNA und des cDNA-Erststranges (*single strand* (ss) nach Abbau der RNA durch RNase H) von PSA, POS und PER, die an den verschiedenen Kulturtagen isoliert bzw. synthetisiert wurden

Kulturtag	mRNA-Konzentration in ng μL^{-1}			cDNA-Konzentration (ss) in ng μL^{-1}		
	PSA	POS	PER	PSA	POS	PER
erste Doppelbestimmung						
2	56,2	29,5	113,0	1382	1403	1141
4	35,3	21,3	125,0	1079	1078	1408
6	66,4	50,9	116,0	959	926	1109
zweite Doppelbestimmung						
2	107,1	44,9	94,8	929	1114	1595
4	80,3	87,3	145,1	954	1078	1050
6	32,1	156,6	127,0	1552	908	997

3.5.4 Untersuchung der Expression der Oxygenase mittels *Real-time-PCR*

Der quantitative Nachweis von Transkripten der Oxygenase in verschiedenen *Pleurotus*-Spezies wurde mittels *Real-time-PCR* (s. 2.17.6.5) in Vierfachbestimmung⁴³ durchgeführt. Mit Hilfe der Standards (s. 3.5.1.2) wurden dekadische Verdünnungsreihen hergestellt, die anschließend als Template eingesetzt wurden. Als Probenemplates wurden die cDNA-Erststränge (ss) von *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus ostreatus* der unterschiedlichen Kulturtage eingesetzt (s. 3.5.3).

⁴³Jeweils eine Doppelbestimmung der beiden synthetisierten Erststrängen der cDNA.

Mittels *Real-time-PCR* wurden repräsentative Fragmente der Oxygenase mit einer Größe von 97 bp (Primer 0259/0260) bzw. 115 bp (Primer 0257/0258) vergleichend amplifiziert und die Ct-Werte ermittelt.

Der Ct-Wert (*threshold cycle*) ist der Schnittpunkt der sigmoidalen Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert (*threshold*) und beschreibt den Zyklus, an dem die erste signifikante Fluoreszenzzunahme detektierbar ist. Der Wert ist direkt abhängig von der Kopienzahl des Transkriptes im Reaktionsansatz.

Im Falle einer Reaktionseffizienz der PCR von 100% verdoppelt sich die DNA-Produktmenge mit jedem Zyklus und analog dazu das Fluoreszenzsignal (angegeben in *relative fluorescence units* (RFU)) (Abb. 3.40; exemplarisch am PSA-Standard dargestellt).

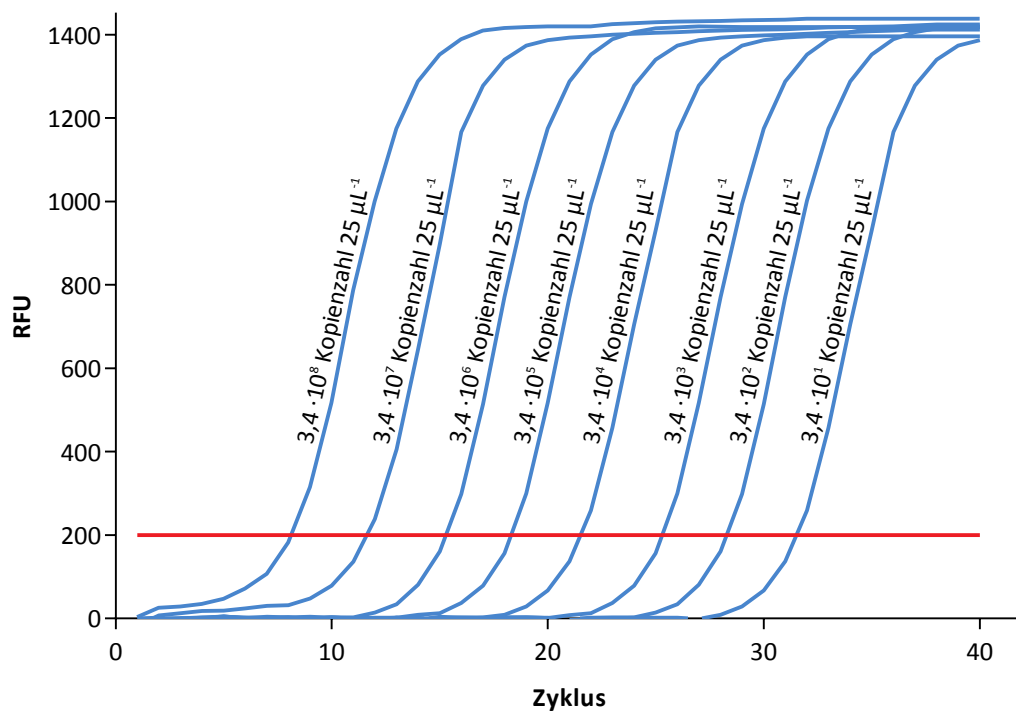


Abbildung 3.40: —: Amplifikationskurven der PSA-Standardverdünnungsserie mit der Primerkombination 0259/0260; —: *threshold* (10-fache der Standardabweichung der *Baseline*)

Die Standardkurven wurden anschließend durch die Auftragung des Logarithmus der Template-Kopienzahl gegen den ermittelten Ct-Wert und anschließender linearer Regression erhalten (Abb. 3.41).

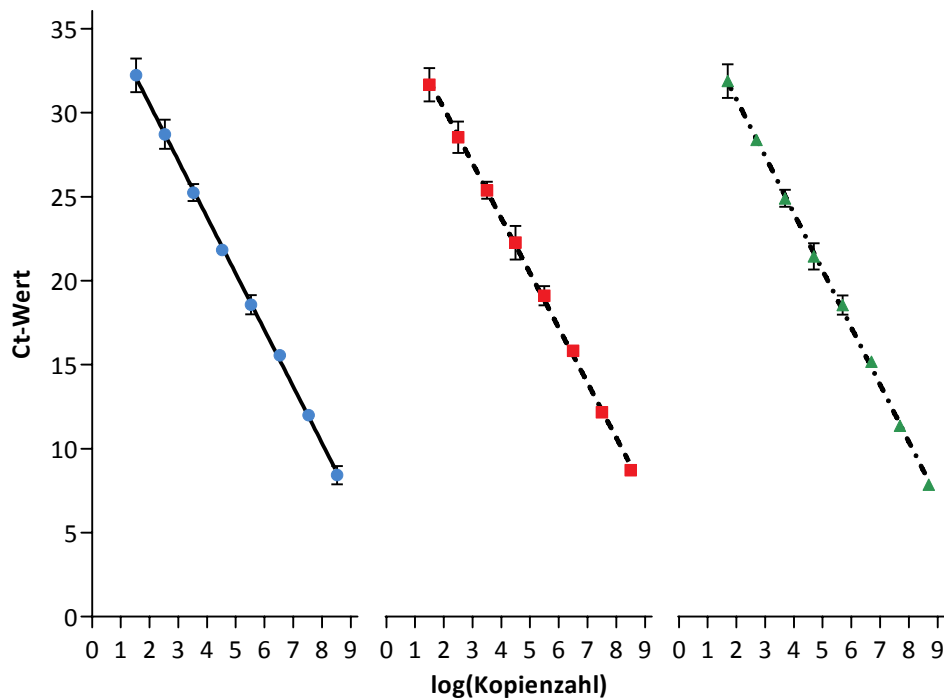
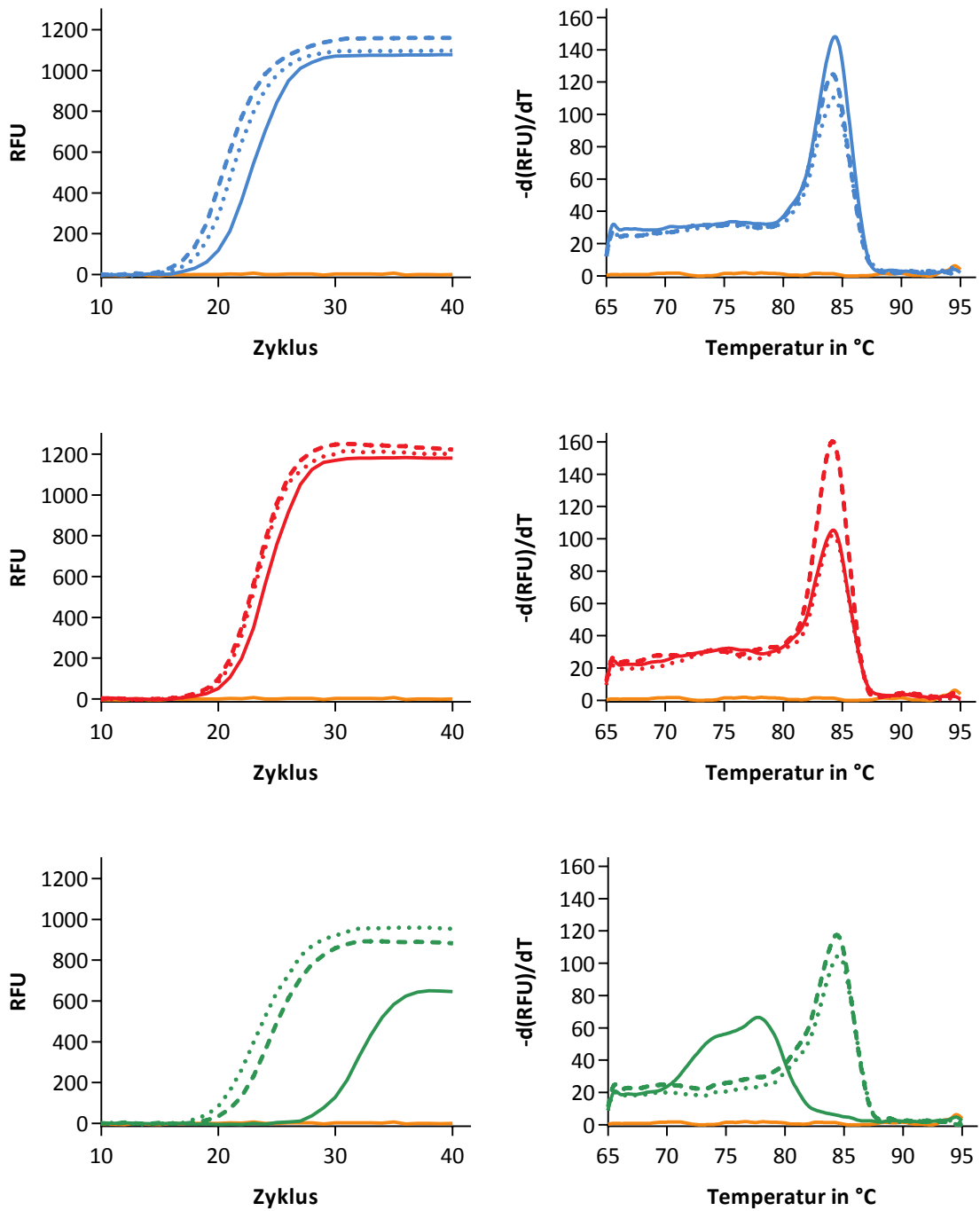


Abbildung 3.41: Kalibriergeraden der Standardverdünnungsserien:

- : Kalibriergerade des PSA-Standards mit der Primerkombination 0259/0260,
 $y = -3,363 \cdot x + 37,24$, $R^2 = 0,9996$, Effizienz = 102%
- : Kalibriergerade des POS-Standards mit der Primerkombination 0257/0258,
 $y = -3,265 \cdot x + 36,78$, $R^2 = 0,9992$, Effizienz = 99%
- ▲- : Kalibriergerade des PER-Standards mit der Primerkombination 0259/0260,
 $y = -3,398 \cdot x + 37,60$, $R^2 = 0,9994$, Effizienz = 103%

Die Reaktionseffizienzen der *Real-time*-PCR lagen zwischen 96–103%. Von den zwei Primerkombinationen wurde die Kombination mit der höchsten Effizienz und dem größten R^2 zur Amplifizierung der Fragmente der Oxygenase mittels *Real-time*-PCR verwendet (Abb. 3.42; exemplarisch an einer Einfachbestimmung dargestellt).



(a) Amplifikationskurven der cDNA-Fragmente

(b) Schmelzkurvenanalyse

Abbildung 3.42: Amplifikationskurven und entsprechende Schmelzkurvenanalysen der Proben:

- Blau: Proben aus *Pleurotus sapidus*
- Rot: Proben aus *Pleurotus ostreatus*
- Grün: Proben aus *Pleurotus eryngii*
- : cDNA-Erststrang vom 2. Kulturtag
- - -: cDNA-Erststrang vom 4. Kulturtag
- · · ·: cDNA-Erststrang vom 6. Kulturtag
- : Blindwert (Wasser als Template)

Die mittels *Real-time*-PCR bestimmten Ct-Werte und Schmelztemperaturen sind in der folgenden Tabelle (Tab. 3.8) dargestellt.

Tabelle 3.8: Gemittelte Ct-Werte und Schmelztemperaturen der Proben aus den Basidiomyceten *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus sapidus* und *Pleurotus ostreatus*

Kulturtag	Ct-Werte			Schmelztemperatur in °C		
	PSA	POS	PER	PSA	POS	PER
erste Doppelbestimmung						
2	18,6	22,3	31,0	84,0	84,0	77,5
4	17,5	20,9	22,5	84,5	84,5	84,5
6	18,5	21,1	21,2	84,0	84,5	84,5
zweite Doppelbestimmung						
2	19,2	22,6	31,0	84,0	84,0	77,0
4	17,6	20,9	22,9	85,0	85,0	84,5
6	17,8	21,1	21,1	84,5	85,5	85,0

Bei der Vervielfältigung des cDNA-Fragments der Matrize des 2. Kulturtages aus *Pleurotus eryngii*, wurden Ct-Werte von 30,95 und 31,02 ermittelt. Die Ct-Werte der Matrizen vom 4. und 6. Kulturtag hingegen betragen 22,48 und 22,91 bzw. 21,21 und 21,14.

Die Schmelzkurvenanalyse ermöglicht die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten (Wilhelm und Pingoud 2003b).

Die Schmelztemperatur der PCR-Produkte der Matrizen-DNA aus PER vom 2. Kulturtag lag mit 74 °C bzw. 77,5 °C wesentlich niedriger, als die der anderen Kulturtage. Aufgrund dessen wurde von einer Bildung unspezifischer PCR-Produkte ausgegangen.

Die Proben der Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* und *Pleurotus ostreatus* wiesen keine unspezifischen PCR-Produkte auf.

Anhand der ermittelten Ct-Werte und den entsprechenden Formeln der linearen Regression (Abb. 3.41) wurde die Anzahl der Transkripte der Oxygenase erhalten (Abb. 3.43; Mittelwert aller *Real-time*-PCR-Reaktionen).

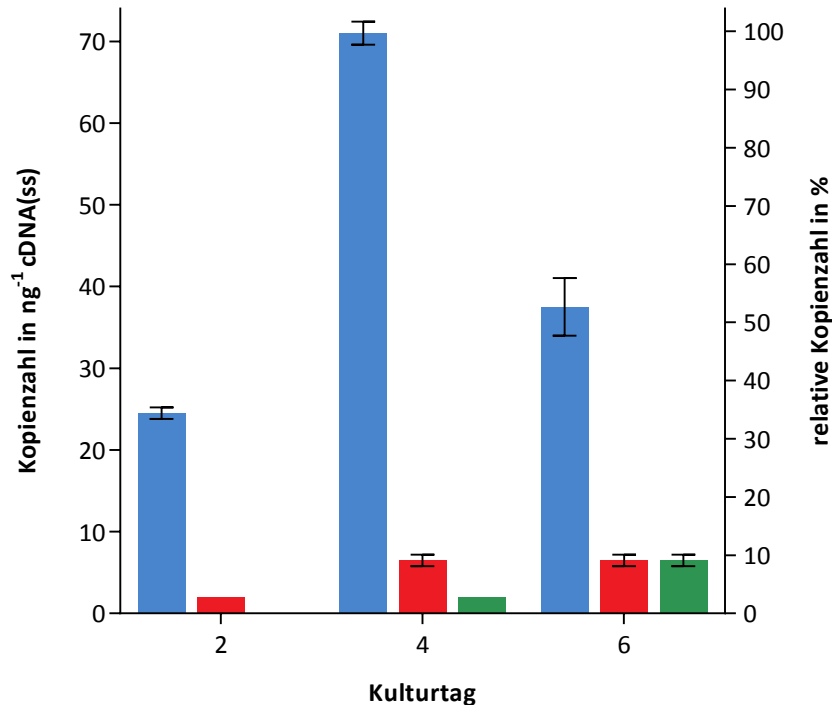


Abbildung 3.43: Anzahl der Transkripte der Oxygenase in Kopienzahl ng^{-1} cDNA(ss) in *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus sapidus* an verschiedenen Kulturtagen: ■: Anzahl der Transkripte in PSA ; ■: Anzahl der Transkripte in POS; ■: Anzahl der Transkripte in PER

Die Anzahl der Transkripte der Oxygenase in dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* betrug von 25–71 Kopien ng^{-1} cDNA(ss). Die Anzahl der Transkripte in *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus ostreatus* lag bis zu 90% niedriger.

Mit 71 Kopien ng^{-1} cDNA(ss) wurden am 4. Kulturtag die meisten Transkripte im PSA nachgewiesen. POS hingegen enthielt sowohl am 4. als auch am 6. Kulturtag die meisten Transkripte der Oxygenase; PER am 6. Kulturtag.

Am 2. Kulturtag war die Anzahl der Transkripte im *Pleurotus eryngii* auf Grund von unspezifischen PCR-Produkten nicht nachweisbar.

Die Proben der *Real-time*-PCR wurden nach der Amplifizierung auf ein 2%iges Agarosegel (s. 2.14.1) aufgetragen (Abb. 3.44), isoliert (s. 2.17.7) und sequenziert (s. 2.17.9.2).

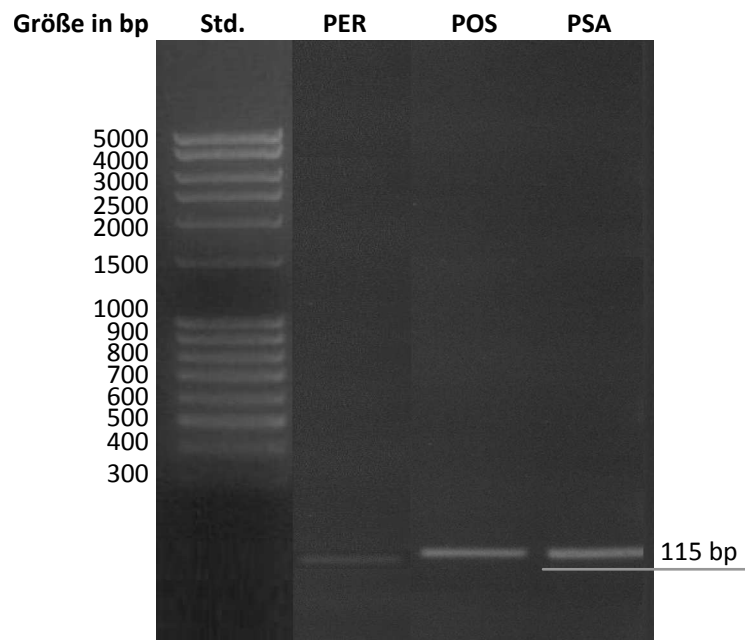


Abbildung 3.44: 2%iges Agarosegel mit DNA-Fragmenten aus *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii* vom 4. Kulturtag (zusammengefügte Abbildung): Std.: Standard (20 μ L) (Abb. 7.2b); PER: DNA-Fragment aus *Pleurotus ostreatus* mit 97 bp; POS: DNA-Fragment aus *Pleurotus ostreatus* mit 115 bp; PSA: DNA-Fragment aus *Pleurotus sapidus* mit 115 bp

Die erfolgreiche Amplifizierung der repräsentativen Fragmente der Oxygenase (97 bp bzw. 115 bp) wurde durch die Sequenzierung der Nukleotidsequenz überprüft und bestätigt.

3.6 Reinigung der in *Aspergillus niger* überexprimierten Peroxidase MsP1

Die rekombinante Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodonius* wurde bei der niederländischen Firma DSM (Delft) in *Aspergillus niger* überexprimiert. Der enzymhaltige Kulturüberstand wurde für Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Da dieser Kulturüberstand neben dem überexprimierten MsP1 noch andere Proteine und Substanzen - wie Medienbestandteile - enthielt, wurde MsP1 für dessen proteinbiochemische Charakterisierung gereinigt.

3.6.1 Enzymreinigung - Vorversuche

Die Konzentrierung des zur Verfügung gestellten Kulturüberstandes erfolgte nach 2.13.1. Für die anschließende Etablierung und Optimierung der Reinigungsstrategie der rekombinanten Peroxidase MsP1 wurden Testsäulen aus dem HiTrap IEX und HiTrap HIC Selection Kit (Tab. 2.5) verwendet.

Die Anwendung einer Gelfiltrationschromatographie (GFC) wurde untersucht; jedoch wurde diese Chromatographie auf Grund der niedrigen Kapazität der Säulen, deren Empfindlichkeit gegenüber zu hohen Drücken und auf Grund des hohen Zeitaufwandes (niedrige Flussraten) nicht angewendet.

Bei der Verwendung von Säulen mit hydrophobem Packungsmaterial (*hydrophobic interaction chromatography* (HIC)) wurde - trotz verschiedenster pH-Werte und Säulen - keine Bindung von MsP1 und somit keine Reinigung erzielt. Deshalb wurde eine Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (IEX) vorgenommen. Aufbauend auf vorherigen Arbeiten (Scheibner 2006) wurde der Fokus bei der Auswahl der Säulen auf Anionentauscher gelegt.

Ein Reinigungsschritt mittels Anionentauscher reichte jedoch nicht aus, um Fremdproteine abzutrennen. Somit erfolgte die Reinigung von MsP1 mittels Kombination zweier Anionentauscher (s. 2.13.2.1). Zum Einsatz kamen eine DEAE-FF-Säule als schwacher Anionentauscher und eine Q-FF-Säule als starker Anionentauscher. Der konzentrierte Kulturüberstand wurde dabei in Anlehnung an die Arbeiten von Scheibner (2006) mit einem 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 6,0 auf die Säulen aufgetragen. Durch die Änderung der Pufferkonzentrationen und des pH-Wertes des Start- bzw. Elutionspuffers wurde keine Verbesserung der Trennleistung erzielt.

Das Zielprotein wurde anschließend durch die Zugabe von 1 M NaCl zum Elutionspuffer (50 mM Natriumacetat-Puffer pH 6,0 + 1 M NaCl) von der Säule eluiert. Eine große Herausforderung bei der Reinigung war die Abtrennung von Fremdproteinen mit ähnlichem Molekulargewicht und pI. Anhand von Testläufen mit verschiedenen Salzgradienten wurde der Gradient ermittelt, durch den die Abtrennung von Fremdproteinen erfolgte.

Der Nachweis des Zielproteins in den gesammelten Fraktionen sowie die Messung der Proteinkonzentration erfolgten mittels ABTS- und Bradford-Assay (s. 2.13.9.2 und 2.13.3.1) (ohne Abbildung). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und auf 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 umgepuffert (s. 2.13.1).

Die Proteinkonzentration der gereinigten und konzentrierten Enzymlösung betrug $5,95 \pm 0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ und die Aktivität $642\,600 \pm 7381 \text{ U L}^{-1}$. Weiterhin wurde durch die Reinigung eine Anreicherung um den Faktor 3,10 erzielt.

Neben dem Enzymtest wurde die Reinigung mittels halbnativer SDS-PAGE kontrolliert und bestätigt (Abb. 3.45).



Abbildung 3.45: Elektrophoretische Analyse der Reinigung von MsP1: I: konzentrierter Kulturüberstand von *Aspergillus niger*; II konzentrierte Q-FF-Fractionen mit Zielprotein (nach dem 1. und 2. Reinigungsschritt)

Vor dem Scale-up der Reinigungsstrategie wurden mit dem gereinigten Enzym einzelne Analysen durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgendem beschrieben werden.

3.6.2 Messung der Enzymaktivität

Zur Proteinreinigung und zur Enzymcharakterisierung wurden schnelle und zuverlässige Assays zur Messung der Enzymaktivität benötigt. Dafür dienten zum einen der von Ben Aziz *et al.* (1971) entwickelte und von Langhoff (2002) und Scheibner (2006) modifizierte Enzymtest (s. 2.13.9.2) und zum anderen der ABTS-Assay nach Eggert *et al.* (1996) (s. 2.13.9.2).

Beide Enzymtests wurden für die Anwendung am Mikroplattenleser (Tab. 2.13) angepasst. Die enzymhaltige Probelösung wurde entweder mit einer wässrigen β -Carotin-Lösung (s. 2.13.9.1) oder mit einer ABTS-Lösung (Tab. 2.25) versetzt und die Extinktionsabnahme bei 450 nm bzw. -zunahme bei 420 nm nach Zugabe von Wasserstoffperoxid photometrisch verfolgt⁴⁴ (s. 2.13.9.2).

3.6.2.1 Nachweis der Linearität und Reproduzierbarkeit der Enzymtests

Um die Enzymaktivität quantitativ bestimmen zu können, muss die Extinktionsabnahme bzw. -zunahme über einen gewissen Zeitraum linear sein. Bei entsprechend verdünnten Proben war dies für mindestens 10 min der Fall (Abb. 3.46).

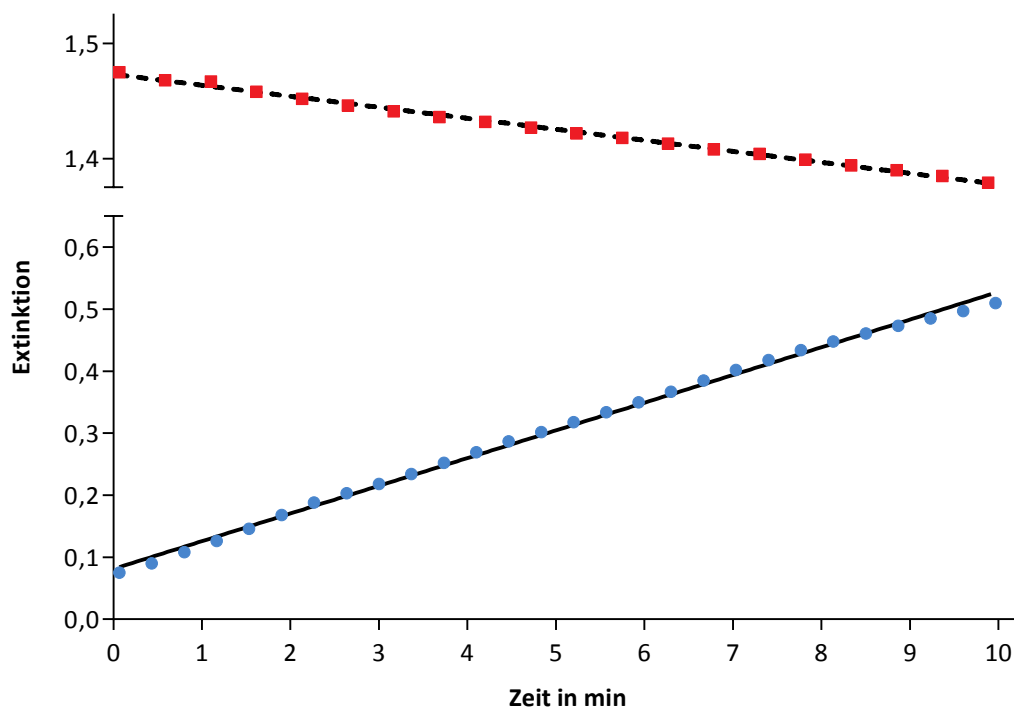


Abbildung 3.46: Extinktionsänderung über einen Zeitraum von 10 min während des Enzymtests mit gereinigtem

MSP1: \blacksquare : Extinktionsabnahme bei 450 nm während des β -Carotin-Assays,

$$y = -0,009570 \cdot x + 1,473, R^2 = 0,9972$$

\bullet : Extinktionszunahme bei 420 nm während des ABTS-Assays,

$$y = 0,04468 \cdot x + 0,08116, R^2 = 0,9974$$

⁴⁴Anfängliche Messungen der Enzymaktivität wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Scheibner (2006) mit 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 bei 30 °C unter Zugabe von 350 μ M H₂O₂ durchgeführt. Nach weiterführender Charakterisierung des Proteins wurden sowohl der Arbeitspuffer, die Temperatur als auch die Konzentration an Wasserstoffperoxid angepasst (s. 3.7.4 und 3.7.5 und 3.7.6 und 3.7.7).

Darüber hinaus muss der Enzymtest eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Proteinkonzentration zeigen (Suelter 1990). Zu diesem Zweck wurden die Assays mit unterschiedlichen Volumina der gereinigten Enzymlösung nach 2.13.9.2 durchgeführt. Es wurde ein Konzentrationsbereich ermittelt, in dem die Enzymkonzentration und die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zueinander sind (Abb. 3.47).

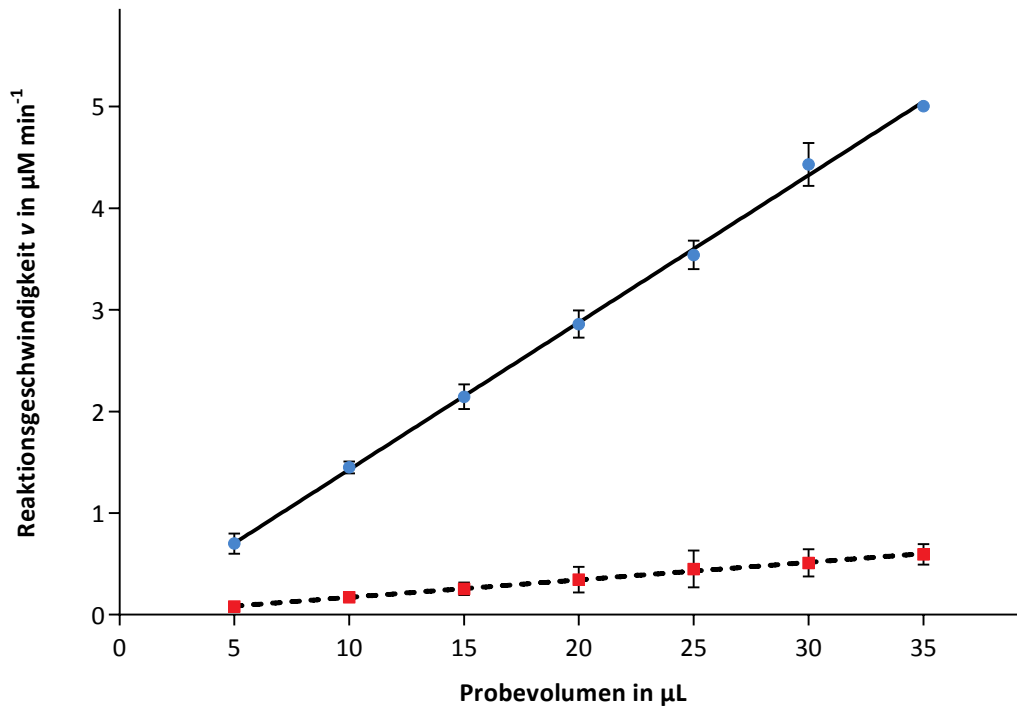


Abbildung 3.47: Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit v in $\mu\text{M min}^{-1}$ der enzymkatalysierten Reaktion als Funktion des Volumens der Enzymprobe (gereinigtes MsP1 in μL):

—●— : ABTS-Assay, $y = 0,1448 \cdot x - 0,0200$, $R^2 = 0,9988$

-■- : β -Carotin-Assay, $y = 0,01721 \cdot x - 0,0007143$, $R^2 = 0,9973$

Für alle weiteren mit gereinigtem MsP1 durchgeführten Enzymassays wurden ebenfalls die Linearität und Reproduzierbarkeit überprüft und nachgewiesen (ohne Abbildung).

3.6.3 Einfluss von Natriumchlorid auf die Aktivität von MsP1

Um zu überprüfen, ob der Einsatz von Natriumchlorid-haltigen Pufferlösungen während der Reinigung einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat, wurden für den ABTS-Assay Pufferlösungen mit 0 – 1 M NaCl eingesetzt (s. 2.13.9.9).

Als Proben für die Überprüfung der Salztoleranz dienten sowohl der konzentrierte Kulturüberstand (s. 2.13.1), als auch die gereinigte Enzymlösung (Abb. 3.48; exemplarisch am gereinigtem Enzym dargestellt).

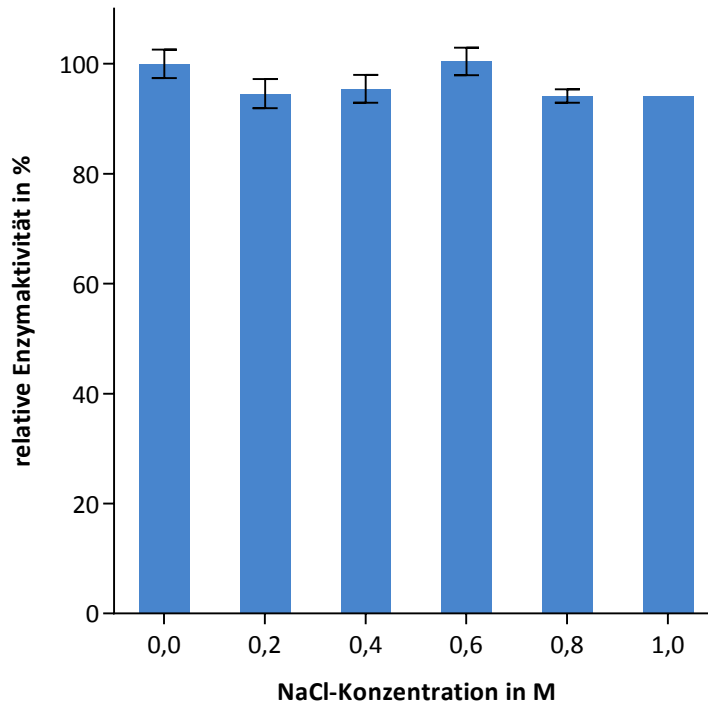


Abbildung 3.48: Relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des Puffers in M

Die Salzkonzentration hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des Kulturüberstandes oder auf die Aktivität des gereinigten Enzyms.

3.6.4 Lagerstabilität der gereinigten und konzentrierten Enzymlösung

Die gereinigte und konzentrierte MsP1-Lösung sollte über einen längeren Zeitraum ohne Aktivitätsverlust gelagert werden. Aus diesem Grund wurde die Lösung aliquotiert und deren Lagerstabilität bei 4 °C, -20 °C und bei -80 °C für 10 Tage gemäß 2.13.9.8 untersucht (Abb. 3.49).

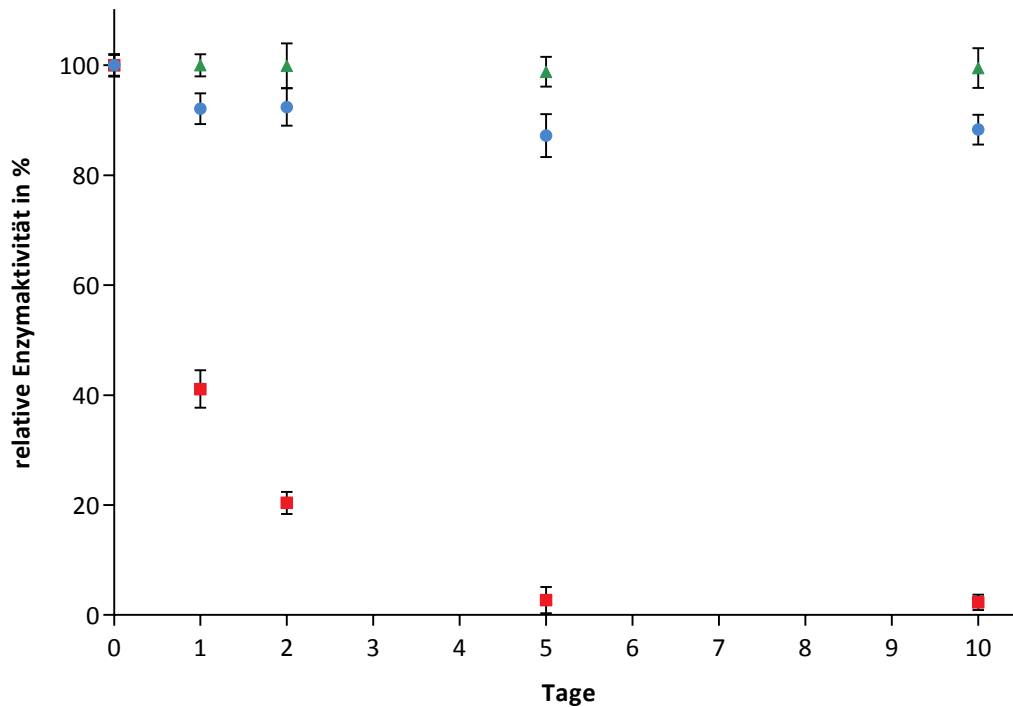


Abbildung 3.49: Relative Enzymaktivität der gereinigten MsP1-Lösung in Abhängigkeit der Lagerdauer und -temperatur: ●: Lagerstabilität bei 4 °C; ■: Lagerstabilität bei -20 °C; ▲: Lagerstabilität bei -80 °C

Die Aktivität von MsP1 war bei -80 °C über Tage konstant, unabhängig davon ob das Enzym erstmalig oder bereits mehrfach aufgetaut wurde (ohne Abbildung). Bei 4 °C betrug die Aktivität nach einer Lagerdauer von 10 Tagen 88,3%. Bei -20 °C präzipitierte das Enzym, so dass bei dieser Temperatur keine Lagerstabilität gegeben war.

Die gereinigte Enzymlösung wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.6.5 UV/Vis-Spektrum

Das UV/Vis-Spektrum von gereinigtem MsP1 wurde im Bereich von 250 bis 550 nm aufgenommen (s. 2.13.4). Das Spektrum zeigt neben einem Absorptionsmaximum bei 280 nm eine deutliche Absorption der Soret-Bande bei 406 nm (Abb.3.50).

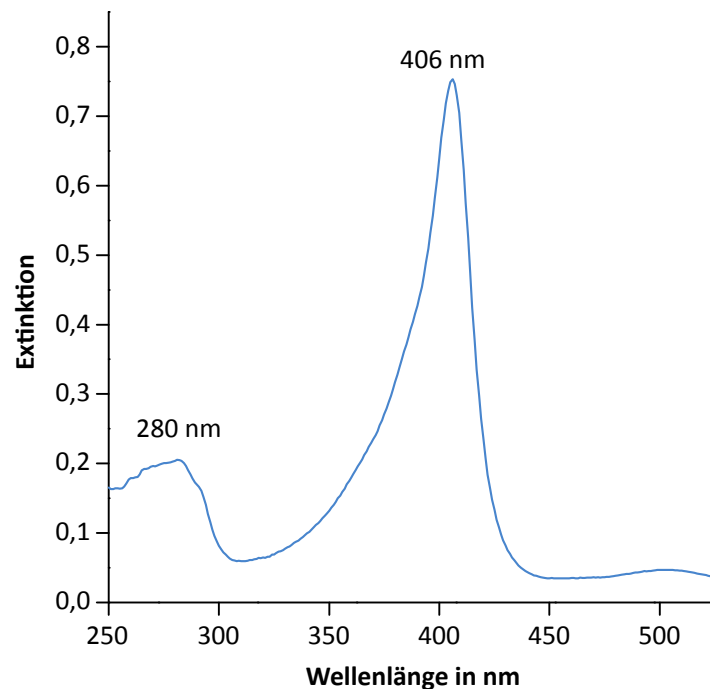


Abbildung 3.50: UV/Vis-Spektrum von gereinigtem MsP1

3.6.6 Enzymreinigung - *Scale up*

Um größere Mengen des rekombinanten Zielenzym MsP1 zu reinigen, die für die Charakterisierung benötigt wurden, wurde eine Maßstabsvergrößerung vorgenommen.

Die Beladung der Säule erfolgte dabei über das Umschaltventil an Pumpe A (s. 2.13.2.2). Als Säulen wurden eine präparative DEAE-FF-Säule mit einem Volumen von 20 mL und eine Q-Sepharose-High-Performance-Säule⁴⁵ ebenfalls mit einem Volumen von 20 mL verwendet (Tab. 2.5). Die Elution erfolgte durch einen Salzgradienten, der an die Säulengröße angepasst wurde.

Zunächst wurde der Kulturüberstand mittels Ultrafiltration (Macrosep[®]-Zentrifugationseinheiten; s. 2.13.1) um den Faktor 2 konzentriert. Der Aktivitätsverlust betrug dabei 26,4% (Tab. 3.9). Anschließend wurde der konzentrierte Kulturüberstand über die DEAE-Säule als erste Stufe gereinigt (Abb. 3.51 (a)).

Die höchste Aktivität wurde in den Fraktionen des ersten Hauptpeaks nachgewiesen. Diese Fraktionen (9-21) mehrerer Läufe wurden gepoolt, mittels Microsep[™]-Zentrifugationseinheiten konzentriert bzw. auf den Startpuffer umgepuffert und auf die Q-HP-Säule als zweite Reinigungsstufe aufgetragen (Abb. 3.51 (b)).

Die höchsten Aktivitäten waren über die Fraktionen eines Hauptpeaks und zweier kleinerer Peaks verteilt. Die aktiven Fraktionen der drei Peaks (Peak 1: Fraktion 44-55; Peak 2: Fraktion 56-63; Peak 3: Fraktion 64-73) mehrerer Läufe wurden getrennt gepoolt, mittels Microsep[™]-Zentrifugationseinheiten konzentriert und auf 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 umgepuffert. Die konzentrierten Enzymlösungen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die Enzymlösung, die durch die Vereinigung der Fraktionen des Peaks 1 erhalten wurde, war die reinste Enzymlösung mit der höchsten Aktivität. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Messungen mit dieser Lösung⁴⁶ durchgeführt.

Die Maßstabsvergrößerung beeinflusste die Trennleistung nicht.

⁴⁵selbstgepackte Säule mit Säulenmaterial höherer Trennleistung (Q-HP-Säule) als bei den Vortests (Q-FF-Säule)

⁴⁶Spätere Bezeichnungen: MsP1-Lösung bzw. Enzymlösung

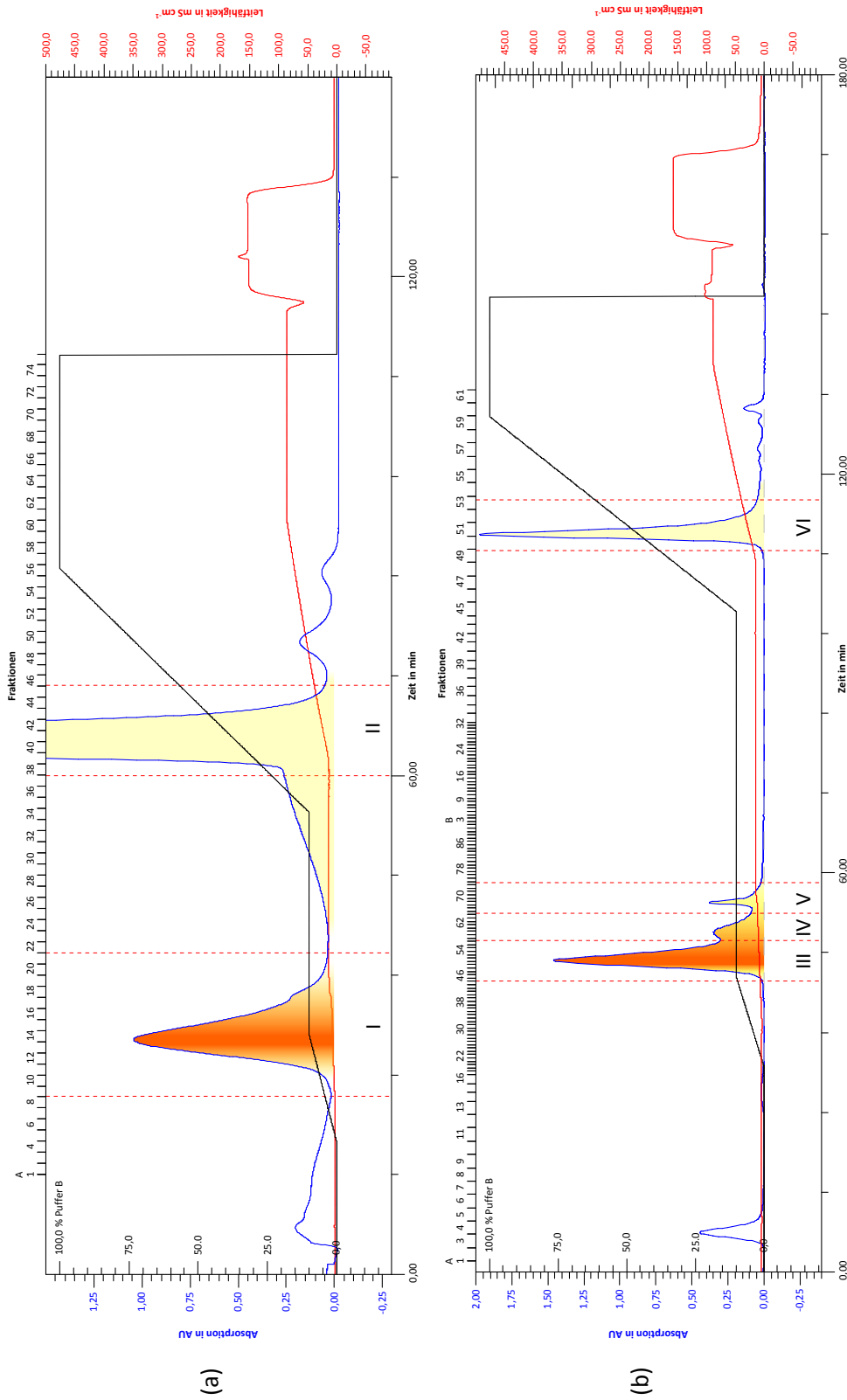


Abbildung 3.51: (a): FPLC-Chromatogramm der Reinigung von MsP1 mittels DEAE-FF-Säule; (b): FPLC-Chromatogramm der Reinigung von MsP1 mittels Q-HP-Säule; —: UV-Absorption in AU bei 280 nm; —: Leitfähigkeit in (mS cm⁻¹); —: Konzentration des Puffers B in %; ---: vereinigte Fraktionen; ■: Verteilung der Enzymaktivität; I: Fraktionen, die vereinigt zur zweiten Reinigungsstufe eingesetzt wurden; II: Fremdprotein; III: vereinigte Fraktionen des Peaks 1; IV: vereinigte Fraktionen des Peaks 2; V: vereinigte Fraktionen des Peaks 3; VI: Fremdprotein

Der Erfolg der Reinigung wurde sowohl mittels einer SDS-PAGE (s. 2.14.2), als auch durch eine halbnative SDS-PAGE (s. 2.14.3) überprüft (Abb. 3.52).

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde das Gel mit colloidalem Coomassie gefärbt (s. 2.16.2). Das halbnative SDS-Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese geteilt. Eine Gelhälfte wurde ebenfalls mit colloidalem Coomassie gefärbt, die andere Hälfte wurde einer Aktivitätsfärbung mit ABTS unterworfen (s. 2.16.3).

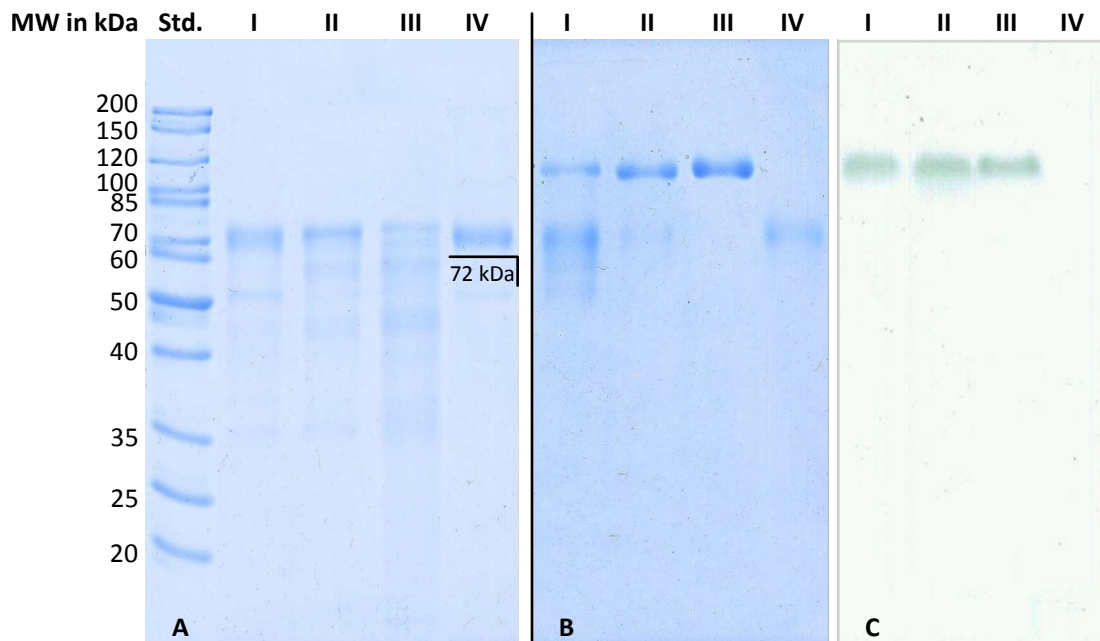


Abbildung 3.52: Elektrophoretische Analyse der Reinigung von Msp1: I: konz. Kulturüberstand von *Aspergillus niger*; II: konz. DEAE-Fractionen mit Zielprotein (nach dem 1. Reinigungsschritt); III: konz. Q-HP-Fractionen des Peak 1 mit Zielprotein (nach dem 1. und 2. Reinigungsschritt); IV: abgetrenntes Fremdprotein (FPLC-Fraktion VI); A: colloidal Coomassiefärbung eines SDS-Polyacrylamidgels (denaturierend), MW: Molekulargewicht, Std.: Standard (5 μ L), (Abb. 7.4a); B: colloidal Coomassiefärbung eines halbnativen SDS-Polyacrylamidgels; C: Aktivitätsfärbung eines halbnativen SDS-Polyacrylamidgels mit ABTS

Mittels halbnativer SDS-PAGE (Abb. 3.52, Gel B und C) wurde die vollständige Trennung der im Kulturüberstand enthaltenen Proteine gezeigt.

Beim konzentrierten Kulturüberstand (I) wurden zwei Proteinbanden mit verschiedenen Molekulargewichten detektiert. Die Bande mit dem kleineren Molekulargewicht zeigte - im Gegensatz zu der anderen Proteinbande - keine Reaktion gegenüber ABTS.

Das inaktive Protein wurde durch die Reinigung erfolgreich abgetrennt. Nach der 1. Reinigungsstufe (II) war die inaktive Proteinbande nur schwach zu erkennen. Die vereinten aktiven Q-HP-Fractionen (III) wiesen einzig das aktive Zielprotein Msp1 auf.

Unter denaturierenden Bedingungen (Abb. 3.52, Gel A) wies das gereinigte MsP1 (III) ein ermitteltes Molekulargewicht (s. 2.14.2.1) von 72 kDa auf. Weiterhin wurde ein Abbau des gereinigten Zielenzyms (III) durch das Auftreten weiterer Banden gezeigt.

Für das abgetrennte inaktive Protein (IV) wurde ebenfalls ein Molekulargewicht von 72 kDa kalkuliert.

Bei einer Anreicherung von 3,85 betrug der Anteil des gereinigten Proteins am Gesamtprotein des Kulturüberstandes 4,8% (Tab. 3.9). Die Wiederfindung der Anfangsaktivität betrug 18,3%. Die Reinheitszahl (RZ) (s. 2.13.5) wurde von 0,3 auf 3,2 gesteigert.

Tabelle 3.9: Bilanzierung einer zweistufigen Reinigung der rekombinanten Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodoni*s

Probe	Proteingehalt			Aktivität			spez. Aktivität in U mg ⁻¹	Anreicherung	RZ
	in mg mL ⁻¹	in mg	in %	in U L ⁻¹	in U	in %			
Kulturüberstand	22,89	2517,90	100,0	785 880	86 447	100,0	34	1,00	0,3
konz. Kulturüberstand	48,79	1854,02	73,6	1 885 416	71 646	82,9	38	1,12	0,3
konz. DEAE-FF	17,10	239,40	9,5	1 656 251	23 188	26,8	96	2,82	0,9
konz. Q-HP Peak 1	8,01	120,15	4,8	1 052 083	15 781	18,3	131	3,85	3,2
konz. Q-HP Peak 2	4,59	45,90	1,8	516 204	5162	6,0	113	3,32	2,9
konz. Q-HP Peak 3	2,11	10,55	0,4	121 759	608	0,7	58	1,71	1,0

Die gereinigte MsP1-Lösung (vereinte aktive Q-HP-Fractionen des Peaks 1 (III)) wurde für alle folgenden Untersuchungen eingesetzt.

3.7 Proteinbiochemische Charakterisierung der rekombinanten Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodoni*

3.7.1 Proteinquantifizierung der gereinigten MsP1-Lösung mittels Absorptionsmessung

Nach 2.13.3.2 wurde eine Proteinkonzentration von $56,53 \pm 0,38 \mu\text{mol L}^{-1}$ der gereinigten MsP1-Lösung ermittelt. Umgerechnet ergibt dies einen Proteingehalt von $8,20 \pm 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ (Konvertierung: Gewicht – Mol; Tab. 2.14).

3.7.2 Bestimmung des Molekulargewichtes von MsP1

Das Molekulargewicht des rekombinanten MsP1 wurde mittels nativer PAGE (s. 2.14.4) und Gel-filtrationschromatographie (GFC) (s. 2.13.2.3) bestimmt.

Das Polyacrylamid-Fertiggel wurde nach der Elektrophorese in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde mit colloidalem Coomassie (s. 2.16.2) gefärbt, wodurch für MsP1 ein ermitteltes Molekulargewicht (s. 2.14.2.1) von 142 kDa bestimmt wurde (Abb. 3.53). Die Aktivitätsfärbung der anderen Hälfte mit ABTS (s. 2.16.3) bestätigte das Ergebnis und identifizierte das Enzym als Zielenzym.

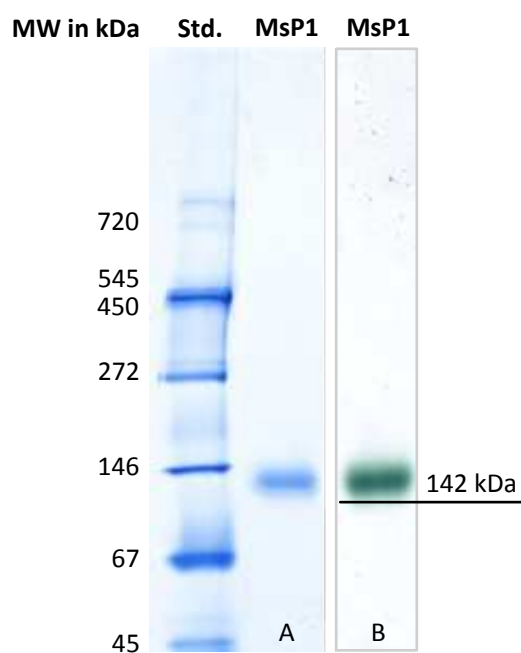


Abbildung 3.53: Elektrophoretische Analyse des Molekulargewichtes von MsP1 mittels nativer PAGE: MsP1: gereinigte MsP1-Lösung; A: colloidal Coomassiefärbung eines Polyacrylamid-Fertiggels, MW: Molekulargewicht, Std.: Standard (7,5 μL), (Abb. 7.4b); B: Aktivitätsfärbung eines Polyacrylamid-Fertiggels mit ABTS

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes von MsP1 mittels Gelfiltrationschromatographie wurde die gereinigte Enzymlösung auf eine Superdex 200-Säule aufgetragen und chromatographisch getrennt (Abb. 3.54 (a)).

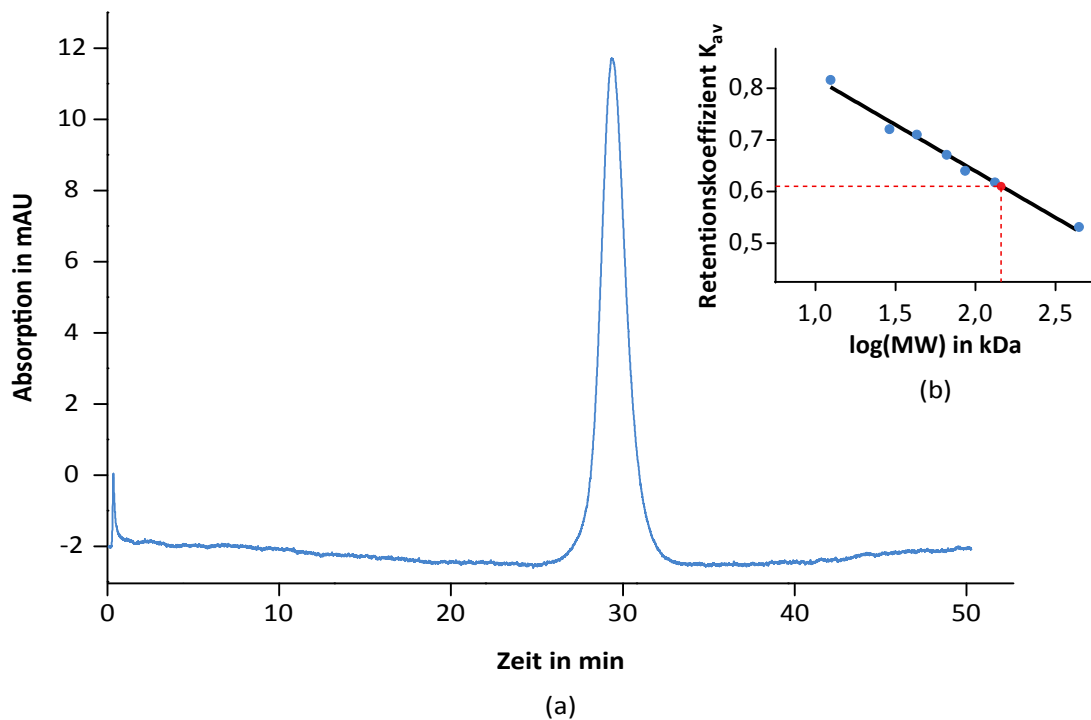


Abbildung 3.54: (a): —: FPLC-Chromatogramm der Bestimmung des Molekulargewichtes (MW) von MsP1 mittels Superdex 200-Säule
 (b): —●— : Kalibriergerade der Gelfiltrationssäule Superdex 200
 $y = -0,1797 \cdot x + 0,9987, R^2 = 0,9867$
 ●: MsP1

Das FPLC-Chromatogramm zeigte lediglich einen diskreten Peak, wodurch die Reinheit der Enzymlösung abermals bestätigt wurde. Nach Kalibrierung der Gelfiltrationssäule (Abb. 3.54 (b)) wurde für MsP1 - unter den nicht denaturierenden Bedingungen der GFC - ein Molekulargewicht von 145 kDa berechnet.

3.7.3 Bestimmung des isoeletrischen Punktes von MsP1

Mit dem gereinigten MsP1 wurde eine isoelektrische Fokussierung (s. 2.14.5.1) durchgeführt. Das Polyacrylamid-Fertiggel wurde nach der Fokussierung in drei Teile geteilt.

Ein Teil wurde mit colloidal Coomassie (s. 2.16.2) gefärbt, wodurch eine Bande mit einem isoelektrischen Punkt von 3,7 detektiert wurde (Abb. 3.55). Die Aktivitätsfärbung des zweiten Teils mit ABTS (s. 2.16.3) bestätigte, dass es sich um das aktive Zielenzym handelte. Durch die spezifische Färbung für Häm- und Metallenzyme (s. 2.16.4) des letzten Teils, wurde das aktive Enzym zusätzlich als Hämenzym identifiziert.

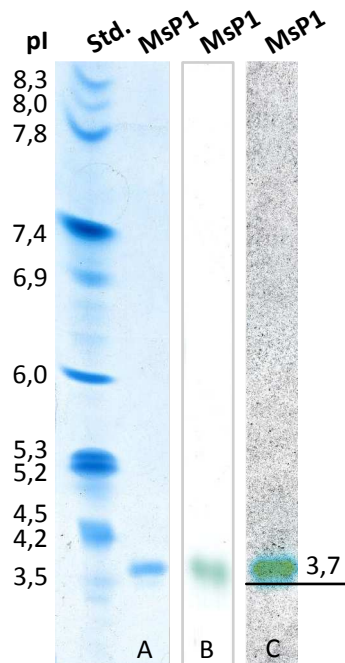


Abbildung 3.55: Isoelektrische Fokussierung der gereinigten Enzymlösung: MsP1: gereinigte Enzymlösung; A: colloidal Coomassiefärbung eines Polyacrylamid-Fertiggels, Std.: Standard (5 μ L), (Abb. 7.5) B: Aktivitätsfärbung eines Polyacrylamid-Fertiggels mit ABTS C: Färbung eines Polyacrylamid-Fertiggels mittels spezifischer Färbung für Häm- und Metallenzyme

3.7.4 Bestimmung des optimalen Puffers und pH-Wertes der Umsetzung von ABTS und β -Carotin

Die Bestimmung des optimalen Puffers und pH-Wertes der Umsetzung von ABTS und β -Carotin erfolgte mit gereinigtem MsP1. Die Aktivität wurde in den entsprechenden Puffern bei einer Temperatur von 30 °C untersucht (s. 2.13.9.3).

Die eingesetzten Puffer waren:

- McIlvaine-Puffer (s. 2.13.9.1)
- K-McIlvaine-Puffer
- HCl/Glycin-Puffer (100 mM)
- Kaliumacetat-Puffer (50 mM)
- Natriumacetat-Puffer (50 mM)
- Natriumtartrat-Puffer (100 mM)

Der pH-Wert der Pufferlösungen variierte zwischen pH 2,0 und 5,5⁴⁷.

Die Enzymaktivität von MsP1 gegenüber ABTS war in einem Natriumacetat-Puffer pH 3,0 maximal (Abb. 3.56). Alle weiteren Messungen des ABTS-Assays erfolgten in diesem Puffer und bei diesem pH-Wert.

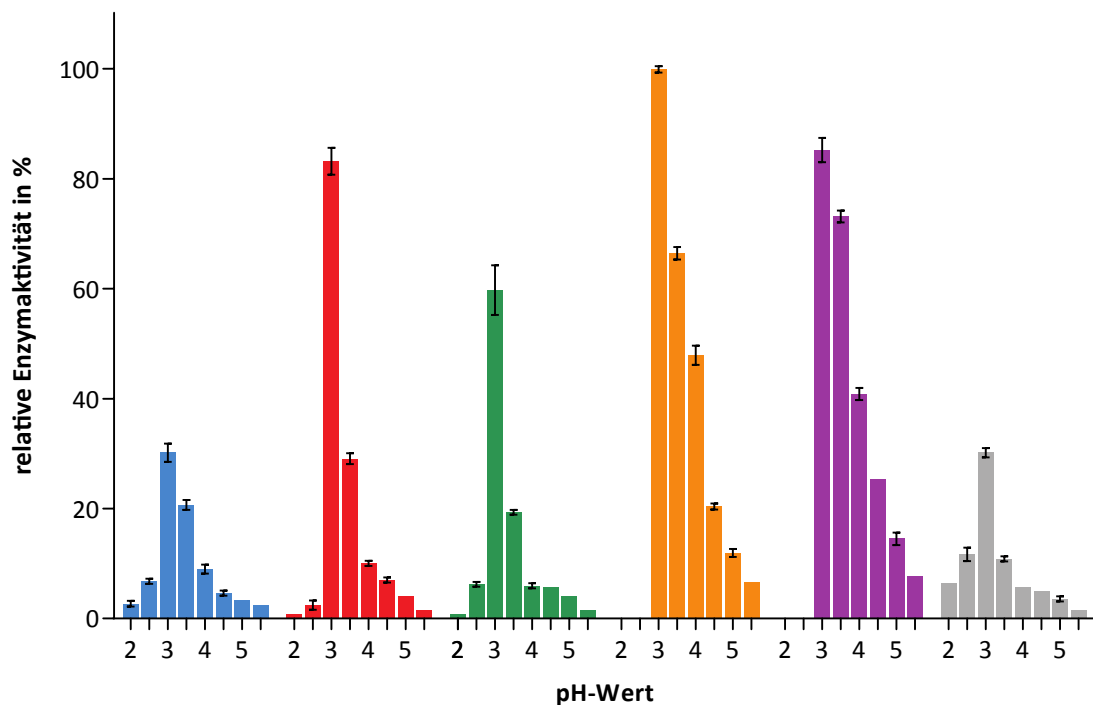


Abbildung 3.56: Relative Enzymaktivität von MsP1 gegenüber ABTS in Abhängigkeit der Puffer und des pH-Wertes: ■: HCl/Glycin-Puffer ■: K-McIlvaine-Puffer ■: McIlvaine-Puffer ■: 50 mM Natriumacetat-Puffer ■: 50 mM Kaliumacetat-Puffer ■: 100 mM Natriumtartrat-Puffer

⁴⁷Bei dem 50 mM Kaliumacetat-Puffer und dem 50 mM Natriumacetat-Puffer wurden nur pH-Werte von 3,0 bis 5,5 erreicht.

Da die Aktivität von MsP1 gegenüber ABTS in McIlvaine-Puffer und 50 mM Kaliumacetat-Puffer geringer war als in K-McIlvaine-Puffer und 50 mM Natriumacetat-Puffer, wurden der McIlvaine-Puffer und 50 mM Kaliumacetat-Puffer beim β -Carotin-Assay nicht eingesetzt.

Die Enzymaktivität von MsP1 gegenüber β -Carotin war in einem Natriumacetat-Puffer pH 3,5 am höchsten (Abb. 3.57). Alle weiteren Messungen mit β -Carotin wurden in diesem Puffer und bei diesem pH-Wert durchgeführt.

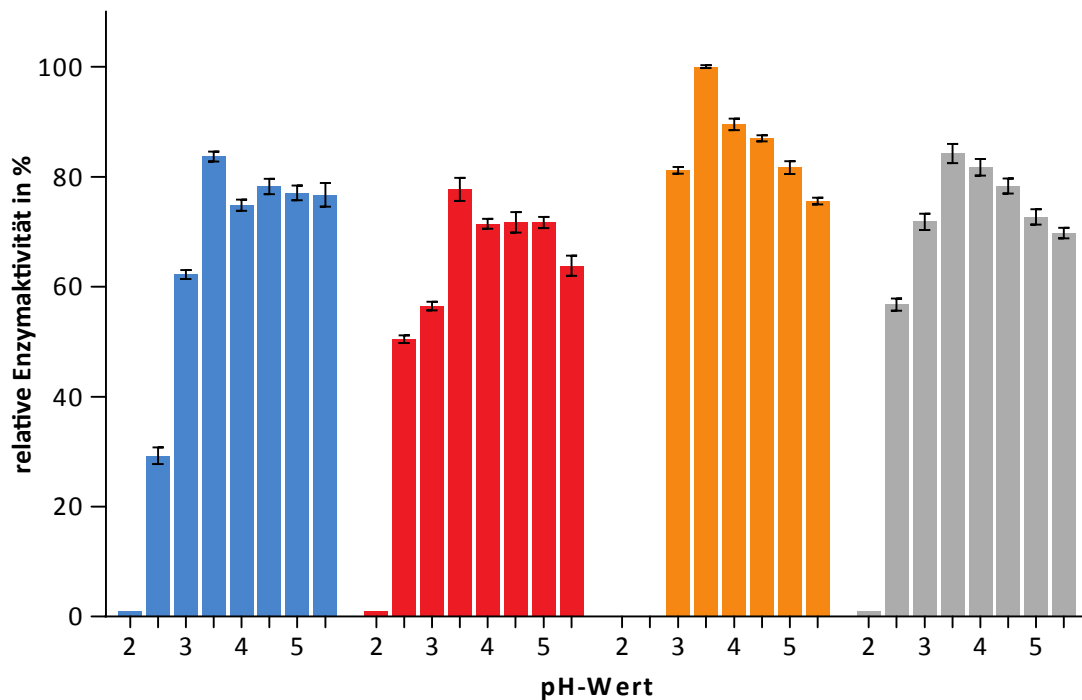


Abbildung 3.57: Relative Enzymaktivität von MsP1 gegenüber β -Carotin in Abhängigkeit der Puffer und des pH-Wertes: ■ HCl/Glycin-Puffer ■ K-McIlvaine-Puffer ■ 50 mM Natriumacetat-Puffer ■ 100 mM Natriumtartrat-Puffer

3.7.5 Variation der Pufferkonzentration

Um den Einfluss der Pufferstärke auf die Enzymaktivität zu ermitteln, wurden die Enzymassays (s. 2.13.9.2) mit Natriumacetat-Puffer mit unterschiedlichen Pufferkonzentrationen durchgeführt. Dazu wurde die gereinigte Enzymlösung mit dem entsprechenden Puffer versetzt und die Enzymaktivität bei 30 °C gemessen (s. 2.13.9.4).

Die höchste Enzymaktivität gegenüber ABTS wurde mit einer Pufferkonzentration von 300 mM (Abb. 3.58) erreicht.

Die höchste Umsatzrate von β -Carotin hingegen wurde mit einer Pufferkonzentration von 50 mM erzielt.

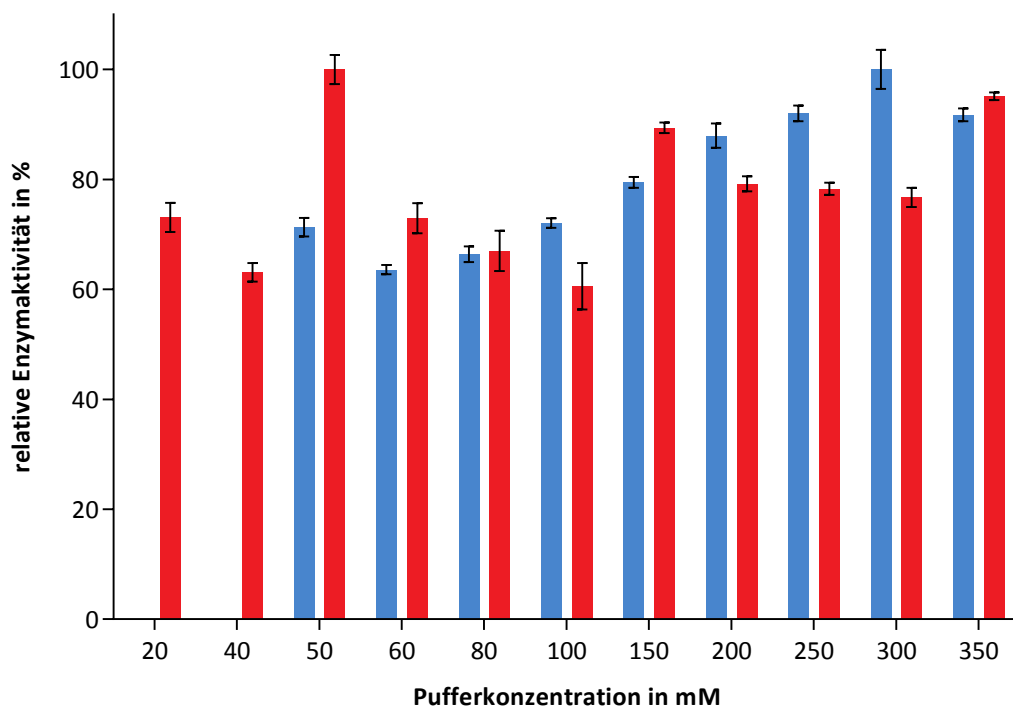


Abbildung 3.58: Relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des Natriumacetat-Puffers in mM: ■: Konzentration des Natriumacetat-Puffers pH 3,0 bei der Umsetzung von ABTS
■: Konzentration des Natriumacetat-Puffers pH 3,5 bei der Umsetzung von β -Carotin

Auf Grund der Änderung der Pufferstärke des Natriumacetat-Puffers von 50 mM auf 300 mM erfolgte eine weitere Untersuchung des pH-Optimums für die Umsetzung von ABTS durch MsP1. pH-Werte von 2,6–3,6 des 300 mM Natriumacetat-Puffers wurden überprüft. Dabei stellte sich abermals pH 3,0 als Optimum heraus.

3.7.6 Temperaturoptimum der rekombinanten Peroxidase MsP1

Die Untersuchung des Temperaturoptimums von MsP1 (s. 2.13.9.5) erfolgte mit reiner Enzym-Lösung unter Verwendung von 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 bzw. 300 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,0 (s. 3.7.4 und 3.7.5). Die verwendeten Lösungen wurden jeweils bei der entsprechenden Temperatur vorgewärmt und anschließend für die Bestimmung der Enzymaktivität mittels ABTS- und β -Carotin-Assay eingesetzt (Abb. 3.59).

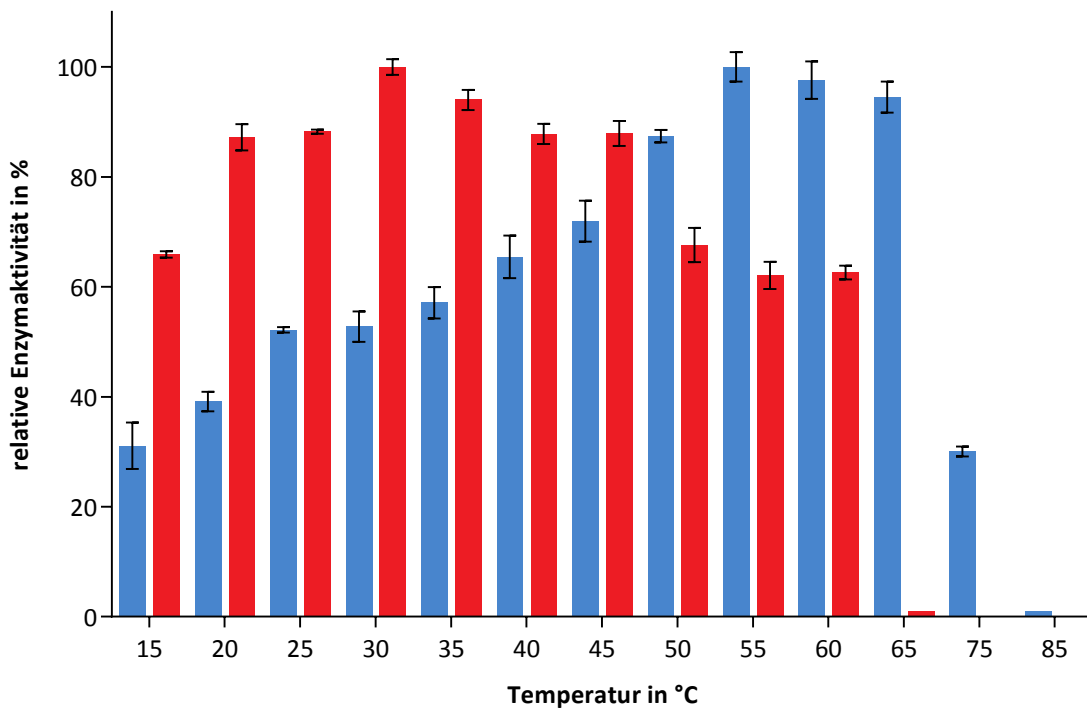


Abbildung 3.59: Relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur in °C: ■ ABTS-Assay ■ β -Carotin-Assay

Mittels ABTS-Assay wurde für MsP1 ein Temperaturoptimum von 55 °C bestimmt. In Folge dessen wurden alle weiteren Messungen bei dieser Temperaturen durchgeführt.

Für die Umsetzung von β -Carotin hingegen stellte sich 30 °C als die optimale Temperatur heraus, sodass alle weiteren Umsetzungen von β -Carotin bei dieser Temperatur erfolgten.

3.7.7 Einfluss von Wasserstoffperoxid

Sowohl der ABTS-Assay, als auch der β -Carotin-Assay wurden mit gereinigter Enzymlösung unter Zugabe von verschiedenen Mengen an H_2O_2 (0–1250,0 μ M; Konzentration im Assay) durchgeführt (s. 2.13.9.6).

Die Konzentration von β -Carotin betrug $24 \mu\text{M}$ im Assay und die Konzentration von MsP1 $3,53 \text{ nM}$. Beim ABTS-Assay wurden $500 \mu\text{M}$ ABTS und $0,14 \text{ nM}$ MsP1 eingesetzt.

Die Umsetzung beider Substrate durch MsP1 erfolgte ohne Wasserstoffperoxid (Abb. 3.60). Im Vergleich zu einem Ansatz ohne H_2O_2 -Zusatz wurde die Enzymaktivität durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid jedoch signifikant gesteigert. Der Zusatz von $125 \mu\text{M}$ H_2O_2 ergab die höchste Aktivität (90% bzw. 75% mehr als ohne Wasserstoffperoxid), weswegen bei folgenden Versuchen - unter gleichbleibenden Bedingungen - diese Konzentration an Wasserstoffperoxid beibehalten wurde.

Ab einer Konzentration von $350 \mu\text{M}$ hemmte H_2O_2 das Enzym. Da die optimale Konzentration an Wasserstoffperoxid von der Enzym- und der Substratkonzentration abhängt, wurde bei einer Änderung dieser Parameter die optimale Wasserstoffperoxidkonzentration erneut bestimmt. Auch die Messung der kinetischen Parameter erfolgte unter Zusatz von verschiedenen Mengen an Wasserstoffperoxid, um diejenige zu ermitteln, bei der die Enzymreaktion unabhängig von H_2O_2 verläuft (s. 2.13.10 und 3.7.11).

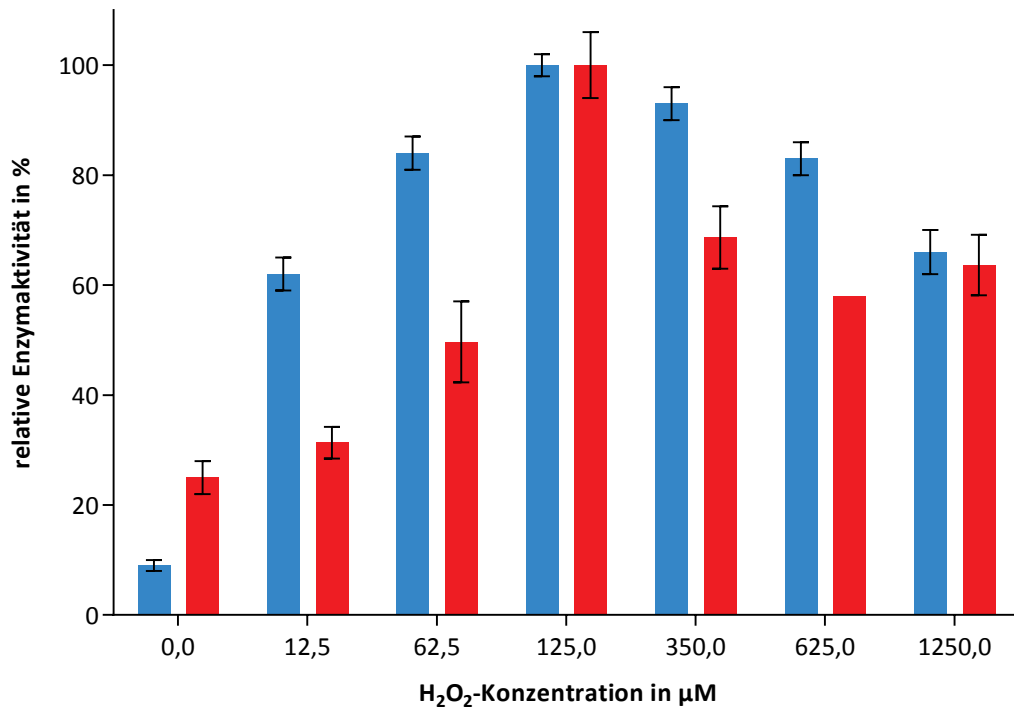


Abbildung 3.60: Relative Enzymaktivität von MsP1 in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration in μM :
■: β -Carotin-Assay mit $24 \mu\text{M}$ β -Carotin und $3,53 \text{ nM}$ MsP1
■: ABTS-Assay $500 \mu\text{M}$ ABTS und $0,14 \text{ nM}$ MsP1

3.7.7.1 H₂O₂-Konzentration der β -Carotin-Stammlösung

Tween[®] 80 kann geringe Mengen an Peroxiden enthalten. Bei der Herstellung der β -Carotin-Stammlösung (s. 2.13.9.1) wurde Tween[®] 80 als Emulgator hinzugesetzt, so dass auch die Stammlösung geringe Mengen an Peroxiden beinhalten könnte.

Aus diesem Grund wurde die H₂O₂-Konzentration der β -Carotin-Stammlösung mittels PEROXsay™-Assay (Tab. 2.7) gemäß Herstelleranweisungen zu $143 \pm 18 \mu\text{M}$ bestimmt. Durch den Einsatz der Stammlösung enthielt der Reaktionsansatz des Assays $3,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ Wasserstoffperoxid.

3.7.8 Einfluss von Sauerstoff auf die Aktivität von MsP1

Der Einflusses von Sauerstoff auf die Aktivität von MsP1 gegenüber β -Carotin wurde untersucht. Dazu wurden der β -Carotin-Assay (s. 2.13.9.2) ohne weiteren Zusatz⁴⁸ von Wasserstoffperoxid mit O₂-angereichertem bzw. O₂-abgereichertem Puffer im Vergleich zu unbehandeltem Puffer gemäß 2.13.9.7 durchgeführt (Abb. 3.61).

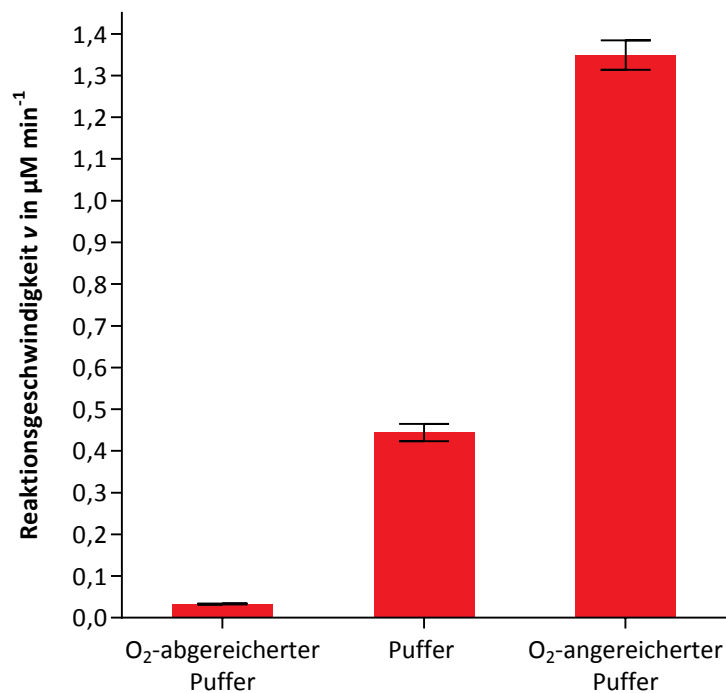


Abbildung 3.61: Reaktionsgeschwindigkeit v in $\mu\text{M min}^{-1}$ der Umsetzung von β -Carotin durch MsP1 in Abhängigkeit der Menge an Sauerstoff

Die Enzymaktivität gegenüber β -Carotin wurde durch die Anreicherung von Sauerstoff um den Faktor 2,3 gesteigert. Dagegen führte die Abreicherung von Sauerstoff zu einem fast vollständigen Verlust der Aktivität.

⁴⁸Durch den Einsatz der β -Carotin-Stammlösung enthielt der Reaktionsansatz des Assays $3,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ Wasserstoffperoxid (s. 3.7.7.1).

3.7.9 Untersuchung der Enzymstabilität unter Assaybedingungen

Für den technischen Einsatz von MsP1 wurden dessen Stabilität unter verschiedenen Reaktionsbedingungen überprüft (s. 2.13.9.8). Die Enzymkonzentration entsprach dabei der im Assay eingesetzten Konzentration.

3.7.9.1 Lösungsmitteltoleranz

Gereinigtes Enzym wurde in 30%igem Ethanol (in Wasser bzw. Puffer) verdünnt und bei 4 °C gelagert. Nach 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h wurde die Enzymlösung mit Messpuffer (300 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,0) abermals verdünnt und deren Aktivität mittels ABTS-Assay bestimmt (Abb. 3.62).

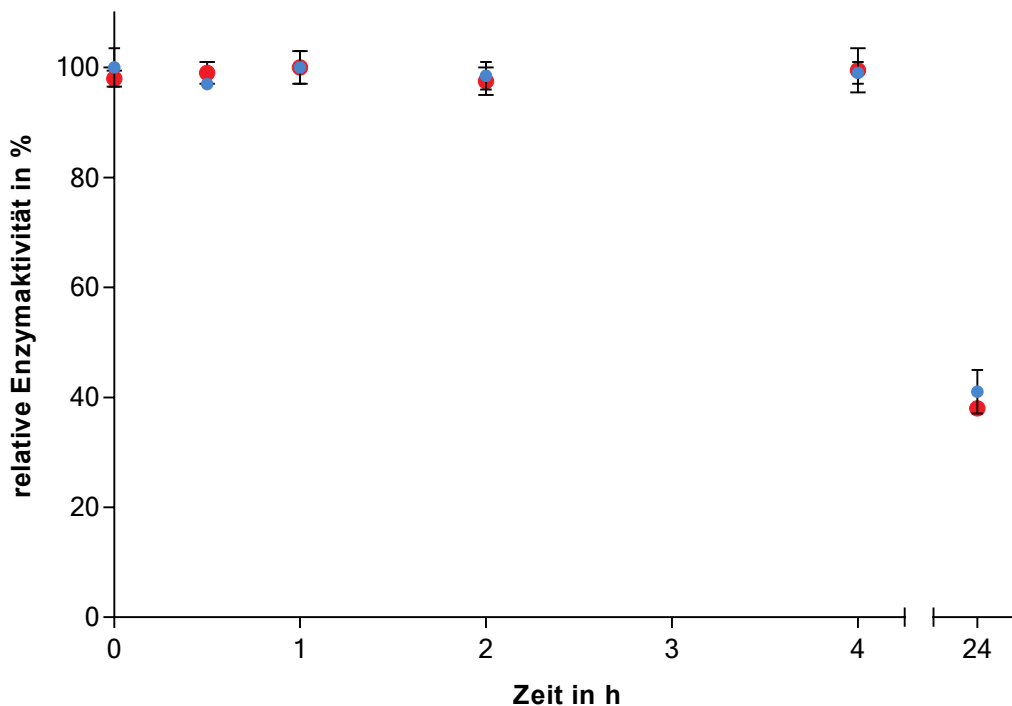


Abbildung 3.62: Relative Enzymaktivität von MsP1 gegenüber ABTS in Abhängigkeit der Lagerdauer in Ethanol (in Wasser bzw. Puffer): ●: 30%iger Ethanol in 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 3,5)
●: 30%iger Ethanol in Wasser

Nach 4 h war keine Abnahme der Aktivität zu verzeichnen; nach 24 h wurde ein Aktivitätsverlust von 60% gemessen.

3.7.9.2 Puffer- und pH-Wert-Stabilität

MsP1 wurde sowohl in Natriumacetat-Puffer als auch in McIlvaine-Puffer verdünnt und bei 4 °C gelagert. Der pH-Wert der Pufferlösungen variierte zwischen pH 2,0 und 5,5 bzw. 6,0. Nach 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h wurde die Enzymlösung mit Messpuffer (300 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,0) verdünnt und deren Enzymaktivität mittels ABTS-Assay bestimmt (Abb. 3.63).

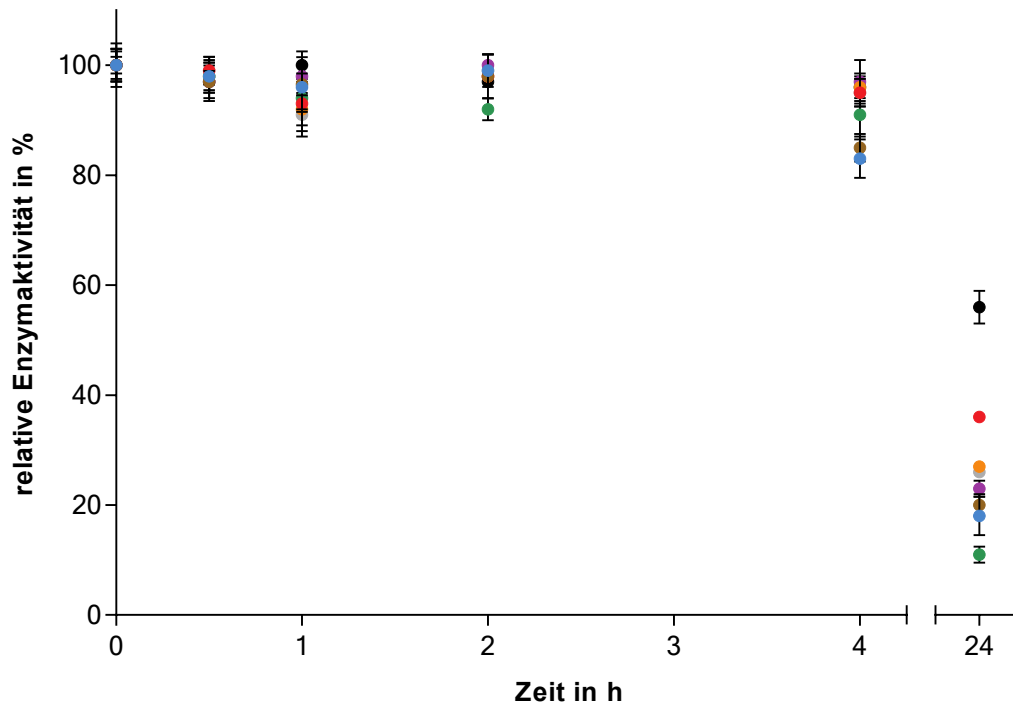


Abbildung 3.63: Relative Enzymaktivität von MsP1 gegenüber ABTS in Abhängigkeit der Lagerdauer in Natriumacetat-Puffer: ●: pH 3,0 (300 mM) ●: pH 3,0 (50 mM) ●: pH 3,5 (50 mM)
 ●: pH 4,0 (50 mM) ●: pH 4,5 (50 mM) ●: pH 5,0 (50 mM)
 ●: pH 5,5 (50 mM) ●: pH 6,0 (50 mM)

Während der Lagerung in Natriumacetat-Puffer war die Enzymaktivität über 4 h nahezu konstant; nach 24 h wurde ein signifikanter Aktivitätsverlust von bis zu 90% gemessen .

Bei der Lagerung in McIlvaine-Puffer hingegen nahm die Enzymaktivität schon nach 30 min ab. Besonders bei pH-Werten über 4,0 wurde ein hoher Aktivitätsverlust von MsP1 gegenüber ABTS verzeichnet (Abb. 3.64).

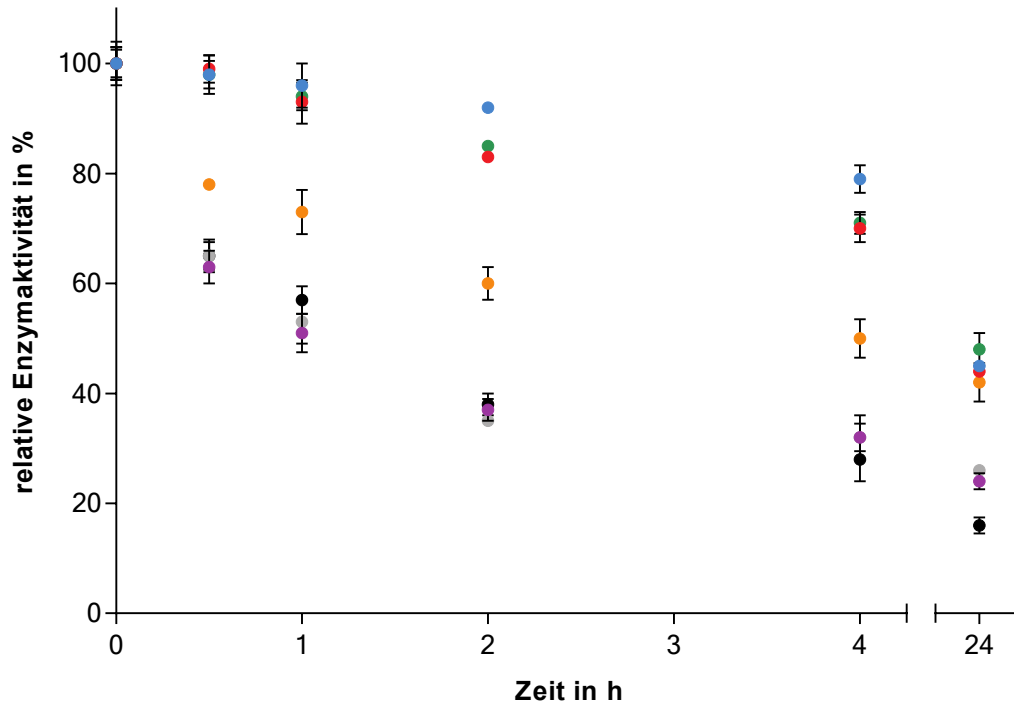


Abbildung 3.64: Relative Enzymaktivität von MsP1 gegenüber ABTS in Abhängigkeit der Lagerdauer in McIlvaine-Puffer: ●: pH 2,5 ●: pH 3,0 ●: pH 3,5 ●: pH 4,0 ●: pH 4,5 ●: pH 5,0 ●: pH 5,5

3.7.9.3 Temperaturstabilität

Gereinigtes MsP1 wurden mit 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0 verdünnt und bei 0 °C, 24 °C, 40 °C und 55 °C gelagert. Nach 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h wurde die Enzymlösung mit Messpuffer (300 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,0) verdünnt und deren Enzymaktivität mittels ABTS-Assay bestimmt.

Nach 24 h wurde eine Abnahme der Aktivität von 50–70% gemessen (Abb. 3.65).

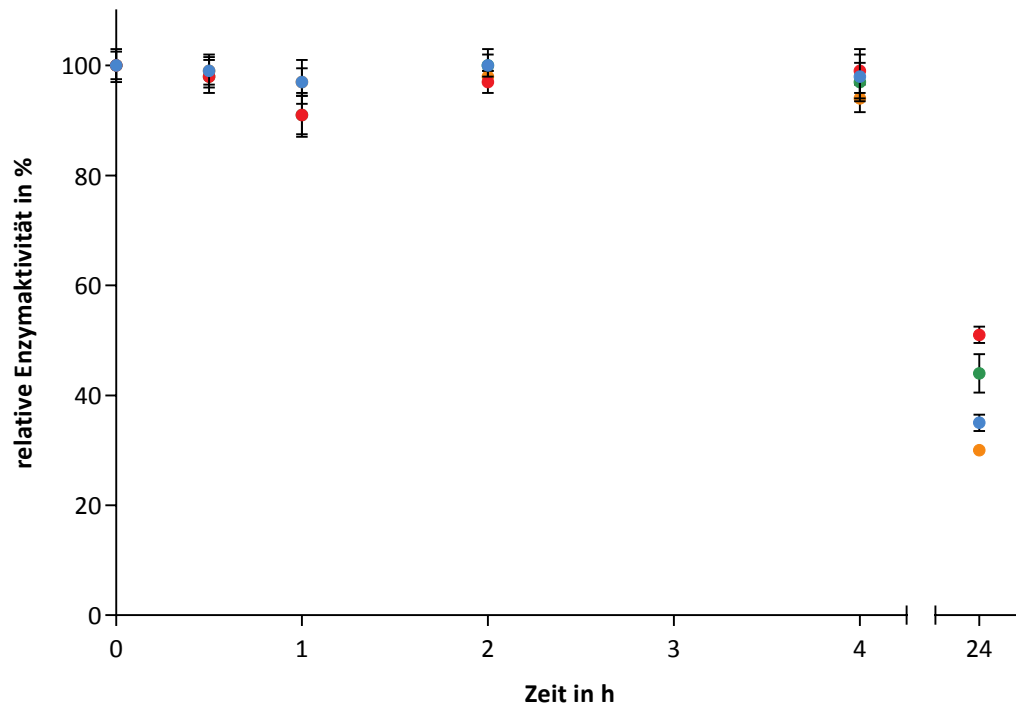


Abbildung 3.65: Relative Enzymaktivität von MsP1 gegenüber ABTS in Abhängigkeit der Lagerdauer bei verschiedenen Temperaturen: ●: 0 °C ●: 24 °C ●: 40 °C ●: 55 °C

3.7.10 Ermittlung des Substratspektrums von MsP1

Neben ABTS und dem natürlichen Farbstoff β -Carotin wurden weitere Substrate (Tab. 3.10) zur Umsetzung mit MsP1 eingesetzt (s. 2.13.9.2), um dessen Substratspektrum zu ermitteln.

Tabelle 3.10: Verwendete Substrate und deren Beschreibung

Substrate	Beschreibung
Bixin	natürlicher Farbstoff (Xanthophyll)
Annatto bzw. Norbixin	natürlicher Farbstoff (Xanthophyll)
Reactive Blue 5	charakteristisches DyP-Typ-Substrat (Anthrachinonfarbstoff)
Reactive Black 5	spezifisches Substrat für polyvalente Peroxidase (VP) (Azofarbstoff)
Guajakol	typisches Substrat für Mangan- bzw. Ligninperoxidasen ⁴⁹ (Phenolderivat)
2,6-Dimethoxyphenol	typisches Substrat für Mangan- bzw. Ligninperoxidasen (Phenolderivat)
Veratrylalkohol	typisches Substrat für Mangan- bzw. Ligninperoxidasen (nicht-phenolischer Aromat)

Alle aufgeführten Substrate wurden mit Hilfe von MsP1 nach Zusatz von 125 μ M Wasserstoffperoxid umgesetzt. Somit umfasst das Substratspektrum von MsP1 neben natürlichen Farbstoffen und dem charakteristischen DyP-Typ-Substrat auch bekannte Substrate für polyvalente Peroxidasen und Mangan- bzw. Ligninperoxidasen.

Für eine maximale Umsetzung dieser Substrate wurden die optimalen Puffer und pH-Werte nach 2.13.9.3 bestimmt (Tab. 3.11).

Tabelle 3.11: Optimale Puffer und pH-Werte der Umsetzung der einzelnen Substrate durch MsP1

Substrat	Pufferstärke	Puffer	pH-Wert
Bixin	50 mM	Natriumacetat-Puffer	3,5
Annatto	50 mM	Natriumacetat-Puffer	6,0
Reactive Blue 5	50 mM	Natriumacetat-Puffer	4,5
Reactive Black 5	50 mM	Natriumacetat-Puffer	4,5
Guajakol	50 mM	Natriumacetat-Puffer	3,5
2,6-Dimethoxyphenol	50 mM	Natriumacetat-Puffer	3,5
Veratrylalkohol	100 mM	Natriumtartrat-Puffer	2,5

Anschließend wurden die kinetischen Parameter von gereinigtem MsP1 für einzelne Substrate bestimmt (s. 3.7.11).

⁴⁹Guajakol, 2,6-Dimethoxyphenol und Veratrylalkohol stellen Modellsubstrate für Monolignol-Bausteine dar.

Für β -Carotin, Bixin, Annatto und Reactive Black 5 wurden diese nicht ermittelt, da auf Grund der hohen Eigenabsorption nur geringe Mengen der Farbstoffe zur photometrischen Messung eingesetzt werden konnten. Diese Mengen reichten nicht aus, um in die Substratsättigung zu gelangen. Auch bei Veratrylalkohol wurde die Substratsättigung nach Zugabe von 60 000 μM nicht erlangt, sodass von einer Bestimmung der kinetischen Parameter von MsP1 für das Substrat Veratrylalkohol ebenfalls abgesehen wurde.

Anstelle der kinetischen Parameter sind die ermittelten Aktivitäten von MsP1 gegenüber den Substraten (s. 2.13.9.2) in folgender Tabelle (Tab. 3.12) dargestellt.

Tabelle 3.12: Ermittelte Aktivität von MsP1 gegenüber verschiedenen Substraten

Substrat	Substratkonzentration in μM	Aktivität in U L^{-1}	spezifische Aktivität in U mg^{-1}
β -Carotin ⁵⁰	24,5	5263	0,65
Bixin ⁵⁰	16,5	17450	2,15
Annatto ⁵¹	16,0	57513	7,09
Reactive Black 5	25,0	32342	3,99
Veratrylalkohol	1250,0	5175	0,64
Veratrylalkohol	60000,0	67204	8,29

Da die Messungen der Aktivität von MsP1 gegenüber den aufgeführten Substraten nicht in der Substratsättigung erfolgten, konnten keine Aussagen darüber getroffen werden, welche der Substrate schneller bzw. effizienter umgesetzt wurden.

⁵⁰ auch ohne Zusatz von H_2O_2 wurde ein signifikanter Abbau dieser Substrate nachgewiesen

⁵¹ ohne Zusatz von H_2O_2 wurde ein schwacher Abbau des Substrates beobachtet

3.7.11 Enzymkinetik

Die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und die katalytische Konstante (k_{cat}) des gereinigten MsP1 (s. 2.13.2.2) wurden für die Substrate ABTS, 2,6-Dimethoxyphenol, Guajakol und Reactive Blue 5 bestimmt (s. 2.13.10).

Dazu wurde die Anfangsgeschwindigkeit des enzymatischen Umsatzes (Reaktionsgeschwindigkeit) bei konstanter Enzymkonzentration, nicht limitierendem Überschuss an Wasserstoffperoxid und variierender Substratkonzentration gemessen.

Die Reaktionsgeschwindigkeit (v) wurde direkt linear gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Cornish-Bowden-Diagramme, Abb. 3.66). Mit Hilfe der Software OriginPro 8.5G (Tab. 2.14) wurde eine Hyperbel⁵² an die Messpunkte angepasst, sodass sich die enzymkinetischen Parameter (K_m , v_{max}) direkt aus der Sättigungshyperbel ablesen ließen (Tab. 3.13).

Tabelle 3.13: Ermittelte kinetische Parameter des gereinigten MsP1 für die Substrate ABTS, DMP, Guajakol und Reactive Blue 5

Substrat	pH	Enzymkonzentration in nM	K_m in μM	k_{cat} in s^{-1}	k_{cat}/K_m in $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$	v_{max} in $\mu\text{M} \text{s}^{-1}$
ABTS	3,0	0,05	15,8	1000	$6,3 \times 10^7$	0,05
DMP	3,5	0,28	79,0	214	$2,7 \times 10^6$	0,06
Guajakol	3,5	1,13	145,5	204	$1,4 \times 10^6$	0,23
Reactive Blue 5	4,5	1,41	32,6	241	$7,4 \times 10^6$	0,34

Gereinigtes MsP1 wies die höchste Affinität zu dem Substrat ABTS auf und setzte dieses mit einer hohen Wechselzahl von 1000 s^{-1} am effizientesten um (katalytische Effizienz: $6,3 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$). Reactive Blue 5 als charakteristisches DyP-Typ-Substrat wurde mit einer katalytischen Effizienz von $7,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$ umgesetzt. Die niedrigste Affinität zeigte MsP1 zu Guajakol und setzte dieses mit der geringsten Wechselzahl von 204 s^{-1} (katalytische Effizienz: $1,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$) um.

⁵² anhand der Michaelis-Menten-Gleichung

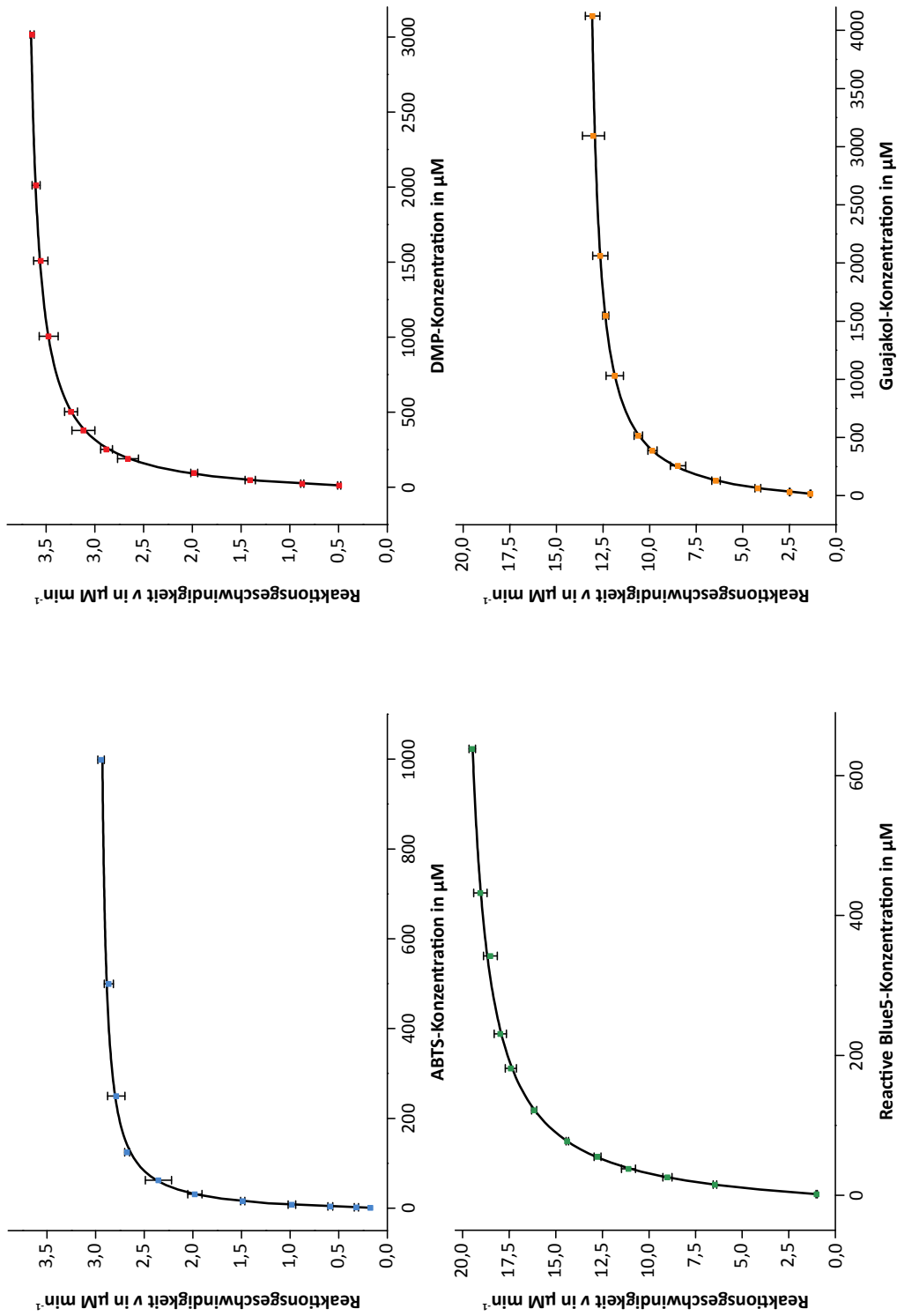


Abbildung 3.66: Lineare Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeiten in $\mu\text{M min}^{-1}$ der enzymatischen Umsetzung verschiedener Substrate durch MsP1 gegen die entsprechende Substratkonzentration in μM :

- : Messpunkte der Umsetzung von ABTS + angepasste Hyperbel
- : Messpunkte der Umsetzung von DMP + angepasste Hyperbel
- : Messpunkte der Umsetzung von RBlue 5 + angepasste Hyperbel
- : Messpunkte der Umsetzung von Guajakol + angepasste Hyperbel

Die Messung der kinetischen Parameter von MsP1 erfolgte zeitgleich mit unterschiedlichen Mengen an Wasserstoffperoxid, um die Konzentration zu ermitteln, bei der die Umsetzung unabhängig von Wasserstoffperoxid verläuft (Abb. 3.67, exemplarisch am Substrat ABTS gezeigt).

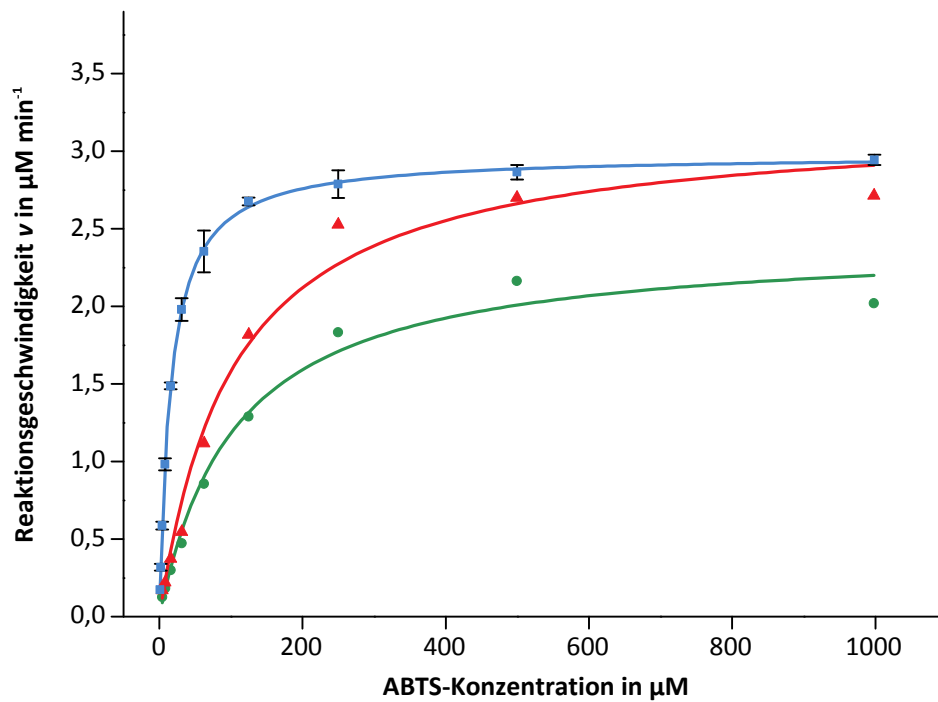


Abbildung 3.67: Lineare Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeiten in $\mu\text{M min}^{-1}$ der enzymatischen Umsetzung von ABTS gegen die Substratkonzentration in μM :

- + —: Messpunkte der Umsetzung mit 125 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + angepasste Hyperbel
- ▲ + —: Messpunkte der Umsetzung mit 250 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + angepasste Hyperbel
- + —: Messpunkte der Umsetzung mit 62,5 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + angepasste Hyperbel

Maximale Anfangsgeschwindigkeiten des Umsatzes von ABTS wurden bei einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 125 μM erhalten. Sowohl niedrigere (62,5 μM), als auch höhere Konzentrationen (250 μM) an Wasserstoffperoxid limitierten den Umsatz von ABTS und verringerten dadurch die Anfangsgeschwindigkeit.

3.7.12 Einfluss von Mangansulfat

Der Einfluss von Mangan(II)-sulfat auf die Enzymaktivität von reinem MsP1 gegenüber dem Substrat 2,6-Dimethoxyphenol wurde überprüft (s. 2.13.9.10). Dazu wurden dem DMP-Assay neben Wasserstoffperoxid unterschiedliche Mengen an MnSO_4 zugesetzt (Abb. 3.68).

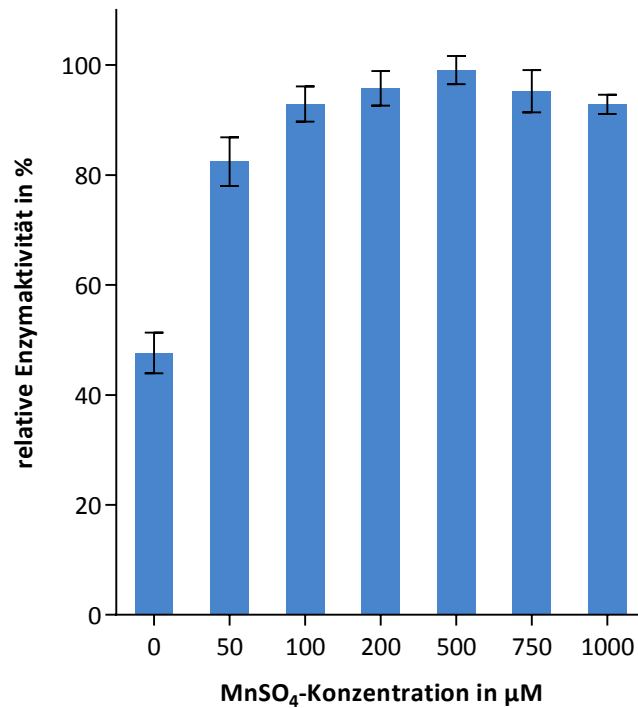


Abbildung 3.68: Relative Enzymaktivität von MsP1 gegenüber dem Substrat DMP nach Zusatz von MnSO_4 in μM

Die Enzymaktivität wurde durch den Zusatz von Mangansulfat deutlich gesteigert. Ab einer Konzentration $100 \mu\text{M}$ MnSO_4 war keine signifikante Steigerung mehr möglich.

3.7.12.1 Oxidation von Mangan(II)-Ionen

Nachdem die Aktivität von MsP1 gegenüber dem Substrat 2,6-Dimethoxyphenol durch den Zusatz von Mangansulfat gesteigert werden konnte, wurde die Oxidation von Mangan(II)-ionen (Mn^{2+}) durch MsP1 in 100 mM Natriumtartrat-Puffer (pH 4,5) überprüft (s. 2.13.9.11).

Die Aktivität von MsP1 gegenüber Mangan(II)-Ionen (1 mM) betrug 2603 U L^{-1} bzw. $0,32 \text{ U mg}^{-1}$.

3.7.13 Umsatz von Adlerol

Adlerol, welches die Hauptstruktur von Guajacyl-Lignin-Baueinheiten darstellt, wurde ebenfalls als Substrat für die Umsetzung mit MsP1 eingesetzt (s. 2.13.9.12).

Zum einen wurde der Umsatz von Adlerol durch die Messung von UV/Vis-Spektren verfolgt, zum anderen durch die Messung der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 310 nm über 10 min mittels Plattenreader (Tab. 2.13).

Das UV/Vis-Spektrum des Reaktionsansatzes mit inaktiviertem MsP1 zeigte lediglich ein Maximum von 270–295 nm. Bei einem Ansatz mit aktivem MsP1 hingegen wurde zusätzlich ein Maximum bei 310 nm gemessen (Abb. 3.69 (a)).

Weiterhin wurde eine Exktinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 310 nm in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration an aktivem Enzym gemessen (Abb. 3.69 (b)).

Demzufolge setzt MsP1 neben Modells substraten für Monolignol-Bausteine auch Adlerol um.

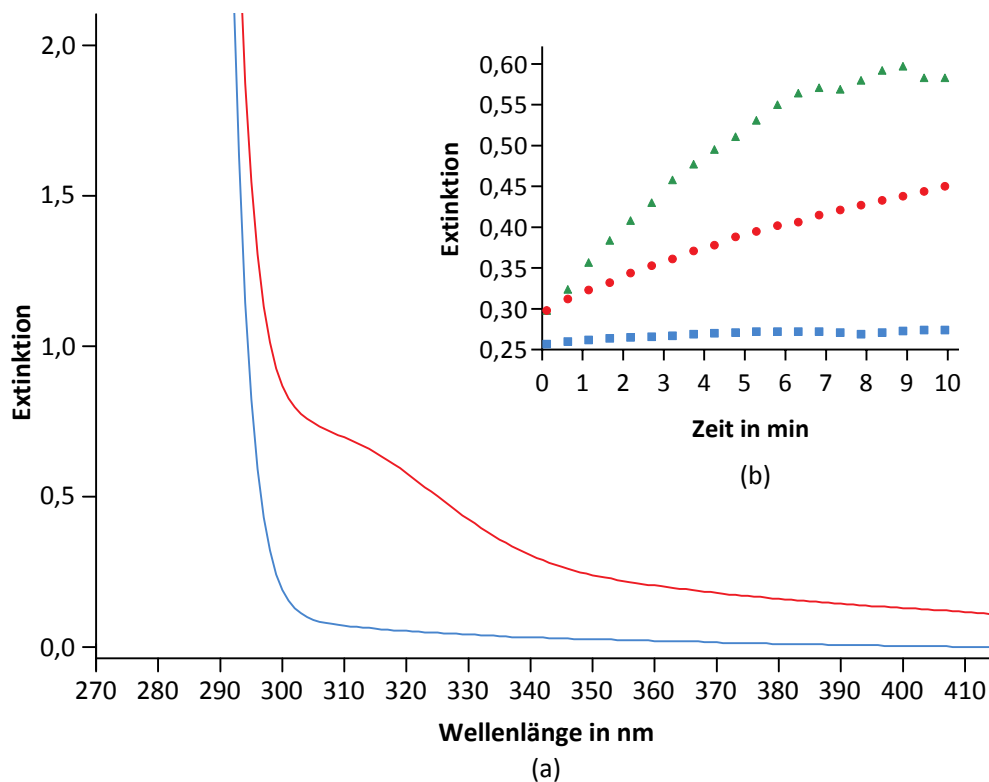


Abbildung 3.69: (a): UV/Vis-Spektren des Reaktionsansatzes der Umsetzung von Adlerol durch MsP1:

—: Reaktionsansatz mit inaktiviertem MsP1

—: Reaktionsansatz mit aktivem MsP1

(b): Extinktionsänderung der Reaktionsansätze bei einer Wellenlänge von 310 nm über den Zeitraum von 10 min:

■: Reaktionsansatz mit inaktiviertem MsP1

●: Reaktionsansatz mit aktivem MsP1 (28,27 nM)

▲: Reaktionsansatz mit aktivem MsP1 (56,53 nM)

3.8 Berechnung eines Strukturmodells für MsP1

Die Aminosäuresequenzen von MsP1 und einer *dye-decolorizing* Peroxidase aus *Bjerkandera adusta*⁵³ (BadDyP) (PDB-ID 3AFV) wurden miteinander verglichen (EMBL-EBI, ClustalW2, Tab. 2.14) und ergaben eine Homologie von 51% (Abb. 3.70).

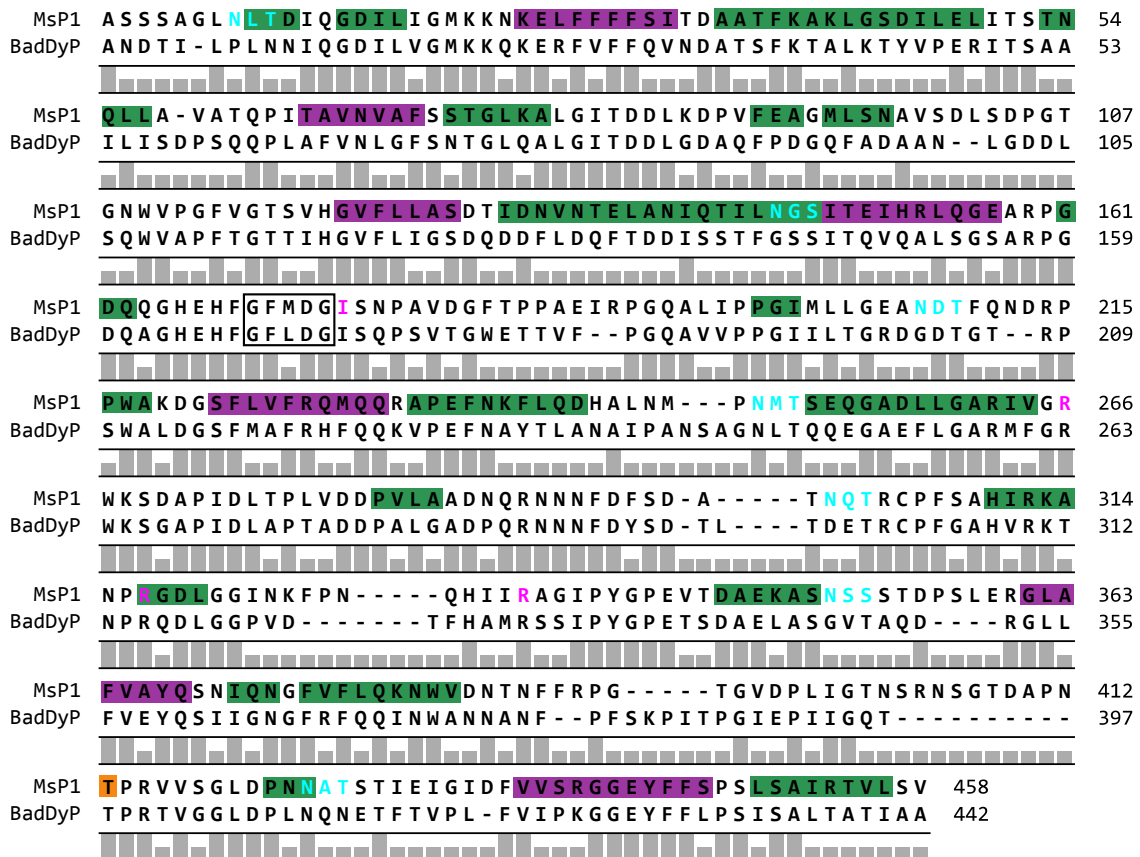


Abbildung 3.70: Vergleich der Aminosäuresequenzen von MsP1 und einer *dye-decolorizing* Peroxidase aus *Bjerkandera adusta* (BadDyP) (PDB-ID 3AFV): ■: β -Faltblattstrukturen; ■: α -Helices; ■: potentielle O-Glykosylierungsstelle; ■: potentielle N-Glykosylierungsstellen; ■: potentiell an der Bindung der prosthetischen Gruppe Häm beteiligt durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Propansäureresten des Porphyringerüsts; ■: GxxDG-Motiv

In der Sequenz wurde neben konservierten Resten, die an der Bindung der prosthetischen Gruppe beteiligt sind (Strittmatter *et al.* 2013), das unter allen Mitgliedern der DyP-Typ-Peroxidase-Familie konservierte Strukturmotiv GxxDG identifiziert (Sugano 2009). Weiterhin wurde mit Hilfe der Programme NetNGly 1.0 (Gupta *et al.* 2004, Tab. 2.14) und NetOGly 3.1 (Julenius *et al.* 2005, Tab. 2.14) die Aminosäuresequenz auf das Vorhandensein von Glykosylierungsstellen untersucht. MsP1 weist sieben potentielle N- und eine potentielle O-Glykosylierungsstelle auf.

⁵³Der Stamm wurde in der Vergangenheit ursprünglich als *Geotrichum candidum* Dec 1 bezeichnet; später fälschlicherweise als *Thanatephorus cucumeris*

Mit dem Programm SWISS-MODEL (Arnold *et al.* 2006, Tab. 2.14) wurde ein Strukturmodell von MsP1 in Homologie zur Röntgenkristallstruktur der *dye-decolorizing* Peroxidase aus *Bjerkandera adusta* (BadDyP) (PDB-ID 3AFV) berechnet. Die Strukturen wiesen eine Homologie von 48% auf (Abb. 3.71), wodurch von einer ähnlichen Faltung beider Proteine ausgegangen werden konnte.

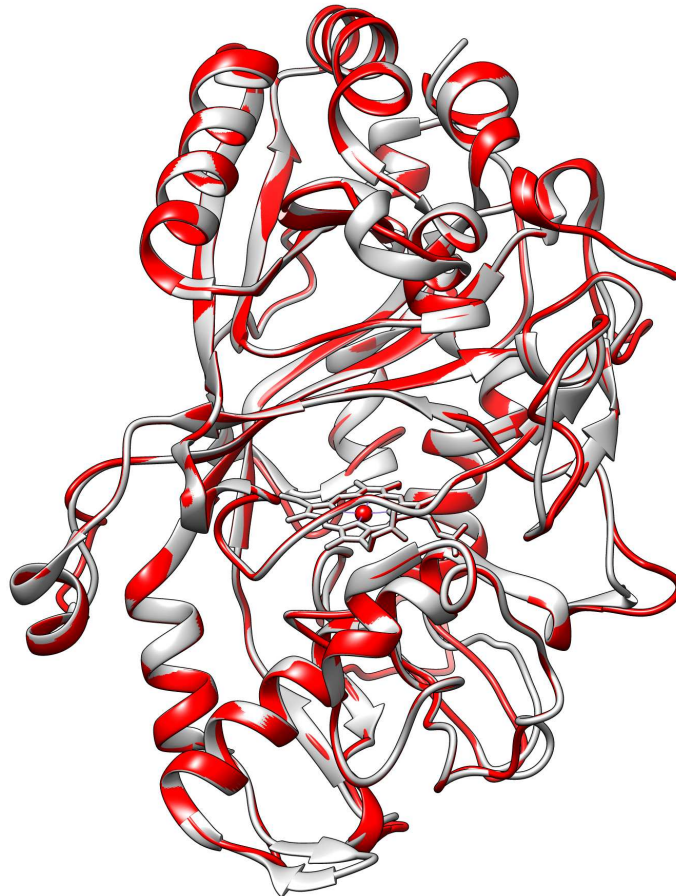


Abbildung 3.71: Homologie des berechneten Strukturmodells von MsP1 und der Röntgenkristallstruktur der *dye-decolorizing* Peroxidase aus *Bjerkandera adusta* (BadDyP) (PDB-ID 3AFV): ■: BadDyP; ■: MsP1

Die berechnete 3D-Struktur der DyP-Typ Peroxidase MsP1 wurde mit Chimera (Tab. 2.14) visualisiert (Abb. 3.72).

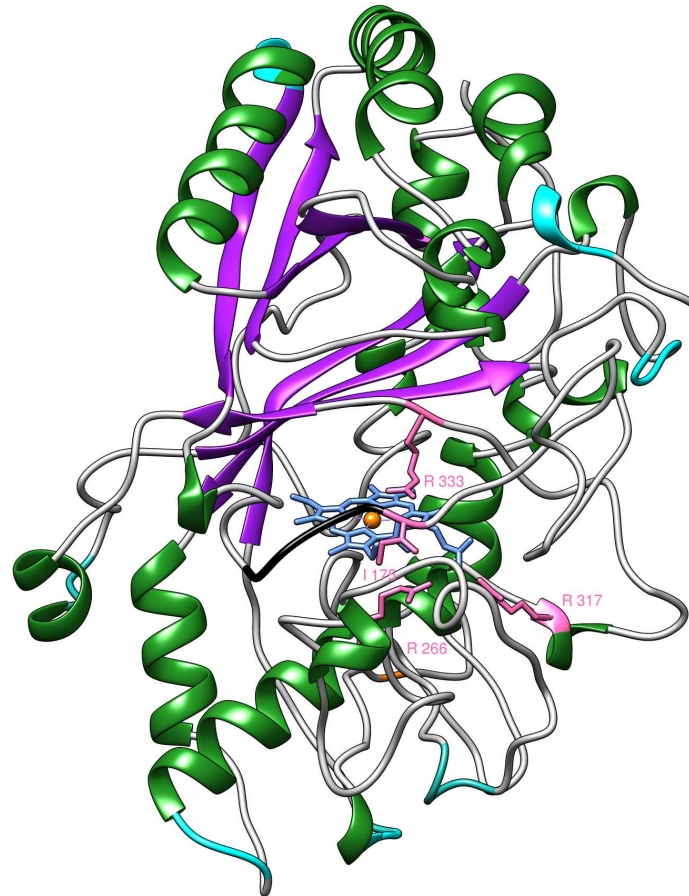







Abbildung 3.72: 3D-Proteinstrukturmodell von MsP1 basierend auf der Struktur einer *dye-decolorizing* Peroxidase aus *Bjerkandera adusta* (BadDyP) (PDB-ID 3AFV), modelliert mit SWISS-MODEL:

 : β -Faltblattstrukturen

 : α -Helices

 : prosthetische Gruppe Häm mit einem Eisenion als Zentralatom

 : potentielle N-Glykosylierungsstellen

 : potentielle O-Glykosylierungsstelle

 : GxxDG-Motiv

I175, R266, R317, R333: potentiell an der Bindung der prosthetischen Gruppe Häm beteiligt durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Propansäureresten des Porphyringerüsts

Das berechnete Strukturmodell weist 21 α -Helices und 7 β -Faltblattstrukturen auf. Weiterhin verfügt es über zwei Domänen (eine proximal gelegene N-terminale Domäne und eine distal gelegene C-terminale Domäne), die das zentrale Häm umschließen. Beide Domänen besitzen eine viersträngige anti-parallele β -Faltblattstruktur, die zwischen α -Helices in einer Ferredoxin-ähnlichen Faltung liegt. Beide β -Faltblattstrukturen bilden gemeinsam ein β -barrel, welches das Häm flankiert.

3.9 Immobilisierung der gereinigten rekombinanten Peroxidase MsP1

Zur Rückgewinnung von MsP1 aus technischen Prozessen wurde reines MsP1 mit Hilfe kovalenter chemischer Bindungen an Oberflächen verschiedener Materialien immobilisiert.

Zum einen erfolgte die Immobilisierung mit Glutardialdehyd als homobifunktionalem *Cross-Linker*; zum anderen durch eine chemische Aktivierung der Oberflächengruppen mit N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) und anschließender Ausbildung stabiler Amidbindungen.

3.9.1 Immobilisierung mit Glutardialdehyd

Die Strategie zur Immobilisierung von MsP1 mit Glutardialdehyd basiert auf der Interaktion zwischen Aminen und Aldehyden. Beide funktionellen Gruppen reagieren zu einer Schiffschen Base. Durch Reduktion entsteht ein sekundäres Amin. Die Immobilisierung von MsP1 mit dem *Cross-Linker* Glutardialdehyd erfolgte nach 2.18.1 mit folgenden Partikeln:

- Blind-SiO₂ (s. 2.3.1)
- AP-SiO₂

Mit Hilfe von Glutardialdehyd wurden geringe Mengen des gereinigten MsP1 an die verwendeten Silica-Monolithen immobilisiert.

Jedoch führte die Reaktion mit Glutardialdehyd mit anschließender Reduktion der Schiffschen Base zu einer Inaktivierung des Enzyms, da keine Aktivität des kovalent gebundenen MsP1 gegenüber dem Substrat ABTS nachgewiesen wurde.

Aus diesem Grund wurde diese Immobilisierungsstrategie nicht weiter verfolgt.

3.9.2 Immobilisierung mit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid und N-Hydroxysuccinimid

Die Immobilisierung mit Hilfe von EDC und NHS stellt eine der gängigsten Strategien zur Kopp- lung von Aminen bzw. Aminogruppen an carboxylterminierte Monolagen auf der Oberfläche von Materialien dar.

Die Immobilisierung von MsP1 mit EDC und NHS erfolgte nach 2.18.2 mit folgenden Partikeln:

- Blind-SiO₂ (s. 2.3.1)
- BSMAP-SiO₂
- BSAM-PS(I)⁵⁴ (s. 2.3.2)
- BSAM-PS(II)⁵⁴
- Carboxy-PS(I)⁵⁴
- Carboxy-PS(II)⁵⁴

Die Bestimmung des Gehaltes an gebundenem MsP1 erfolgte nach 2.18.3 bzw. 2.18.4 (Tab. 3.14). Weiterhin wurde die Aktivität des immobilisierten MsP1 gegenüber ABTS (s. 2.18.5) untersucht (Tab. 3.14).

Tabelle 3.14: Bilanzierung einer Immobilisierung der gereinigten rekombinanten Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodoni*

Probe	Protein			spezifische Aktivität		Aktivität
	in mg	in %	g kg ⁻¹ Material	in mU mg ⁻¹	in %	in U kg ⁻¹ Material
Enzymlösung	1,22	100	—	367000	100	—
Blind-SiO ₂	0,43	35	1,81	53	<0,1	102
BSMAP-SiO ₂	0,86	70	3,67	1473	0,4	6270
BSAM-PS(I)	0,39	32	0,39	1479	0,4	575
BSAM-PS(II)	0,30	25	0,29	454	0,1	128
Carboxy-PS(I)	0,43	35	0,39	730	0,2	281
Carboxy-PS(II)	0,33	28	0,32	971	0,3	305

Mit Hilfe von EDC und NHS wurde MsP1 aktiv an Silica-Monolithen und Polystyrol-Kugeln immo- bilisiert. Von der Bindungskapazität wurden <0,1% ausgenutzt.

⁵⁴Polystyrol-Kugeln mit teilweise gleichen Oberflächengruppen jedoch unterschiedlichen Bindungskapazitäten (s. 2.3.2): BSAM-PS(I): 1,02 mmol g⁻¹; BSAM-PS(II): 0,94 mmol g⁻¹; Carboxy-PS(I): 1,55 mmol g⁻¹; Carboxy-PS(II): 1,12 mmol g⁻¹

Folgende Materialien wiesen neben der höchsten Proteinmenge gleichzeitig den niedrigsten Aktivitätsverlust auf:

- BSMAP-SiO₂
- BSAM-PS(I)

Von diesen Materialien wurde die Wiederverwendbarkeit sowie die Lagerstabilität (s. 2.18.6 und 2.18.7) überprüft. Weiterhin wurden sie zur Bleichung von Molke eingesetzt (s. 2.18.9).

3.9.2.1 Wiederverwendbarkeit von immobilisiertem MsP1

Die Aktivität des immobilisierten MsP1 wurde 20 mal mittels ABTS-Assay (s. 2.18.5) überprüft. Nach einer Messung wurden die Materialien dreimal mit 300 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,0 gewaschen und erneut zur Messung der Aktivität eingesetzt (Abb. 3.73).

Die Aktivität des immobilisierten MsP1 an BSAM-PS(I) war während den Wiederholungen annähernd konstant. Bei dem Umsatz von ABTS mit MsP1 immobilisiert an BSMAP-SiO₂ wurde eine höhere Anfangsaktivität gemessen; jedoch trat während den ersten Wiederholungen ein Aktivitätsverlust von 70% auf.

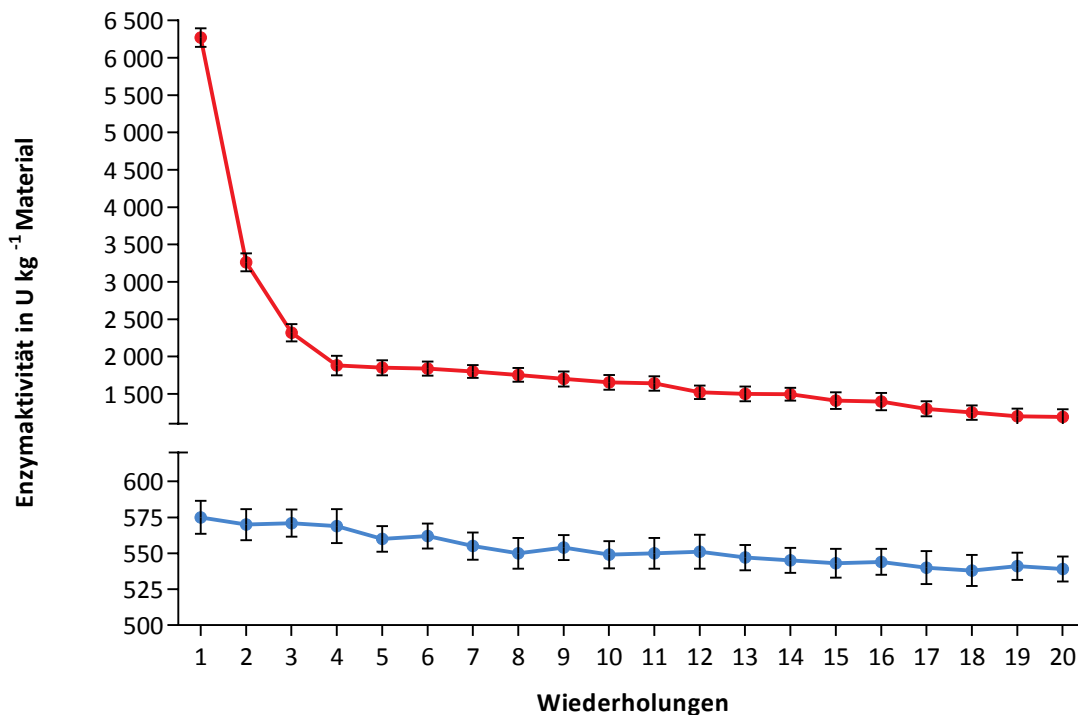


Abbildung 3.73: Aktivität in U kg⁻¹ Material des immobilisierten MsP1 gegenüber ABTS in Abhängigkeit der Wiederholungen des Enzymassays: —●— : MsP1 immobilisiert an BSAM-PS(I)
—●— : MsP1 immobilisiert an BSMAP-SiO₂

3.9.2.2 Lagerstabilität von immobilisiertem MsP1

MsP1 immobilisiert an BSAM-PS_(I) bzw. BSMAP-SiO₂ wurde bei 4 °C gelagert. Die Aktivität des immobilisierten MsP1 wurde nach 1, 2, 5 und 10 Tagen mittels ABTS-Assay (2.18.5) überprüft (Abb. 3.74).

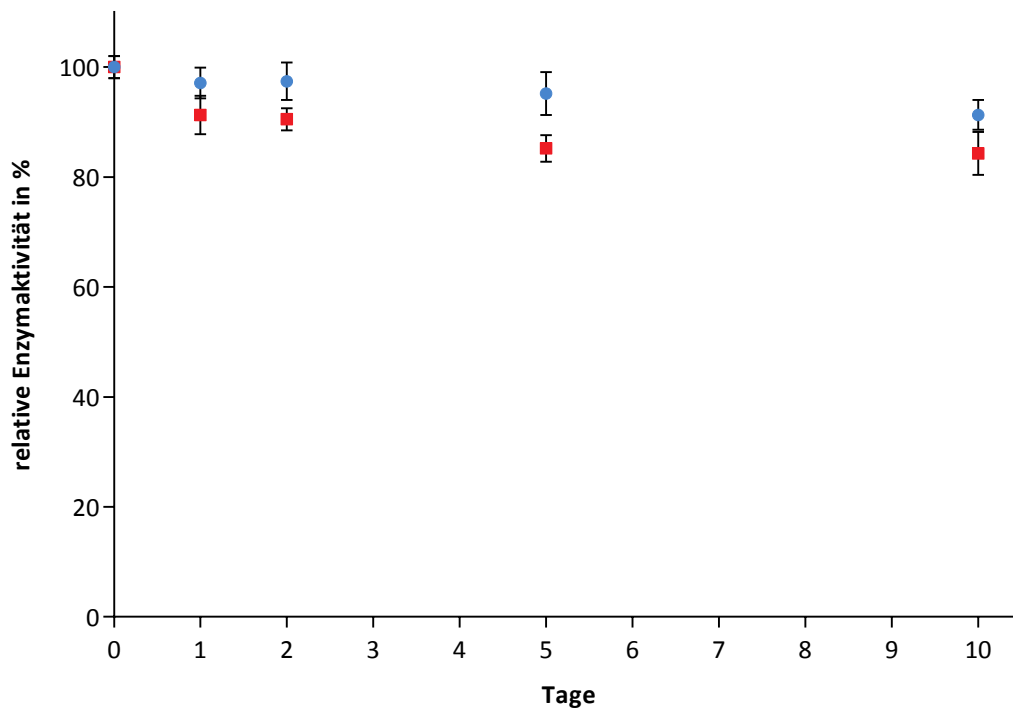


Abbildung 3.74: Spezifische Aktivität in % des immobilisierten MsP1 gegenüber ABTS in Abhängigkeit der Lagerdauer bei 4 °C: ●: MsP1 immobilisiert an BSAM-PS_(I)
■: MsP1 immobilisiert an BSMAP-SiO₂

Die Aktivität des an BSAM-PS_(I) immobilisierten MsP1 wies nach der Lagerung keinen signifikanten Unterschied zur direkten Aktivitätsmessung auf. Die Aktivität des immobilisierten MsP1 an BSMAP-SiO₂ betrug nach 10 Tagen 85%.

Eine Lagerung des immobilisierten MsP1 bei 4 °C war somit möglich.

3.9.2.3 Charakterisierung der porösen Silica-Materialien

Zur Charakterisierung mittels Stickstoff-Tiefemperatur-Adsorptionsmessung (s. 2.18.8) wurden folgende Materialien eingesetzt:

- Blind-SiO₂: reines Silica ohne Funktionalisierung (s. 2.3.1)
- MsP1-Blind-SiO₂: reines Silica ohne Funktionalisierung nach Immobilisierung mit MsP1
- BSMAP-SiO₂: Silica funktionalisiert mit MAPTMS und Bernsteinsäureanhydrid
- MsP1-BSMAP-SiO₂: Silica funktionalisiert mit MAPTMS und Bernsteinsäureanhydrid nach Immobilisierung mit MsP1

Anhand der mittels Stickstoff-Tiefemperatur-Adsorptionsmessung erhaltenen Adsorptionsisothermen (Abb. 3.75 (a)) wurden die spezifischen Oberflächen der porösen Materialien bestimmt (Tab. 3.15).

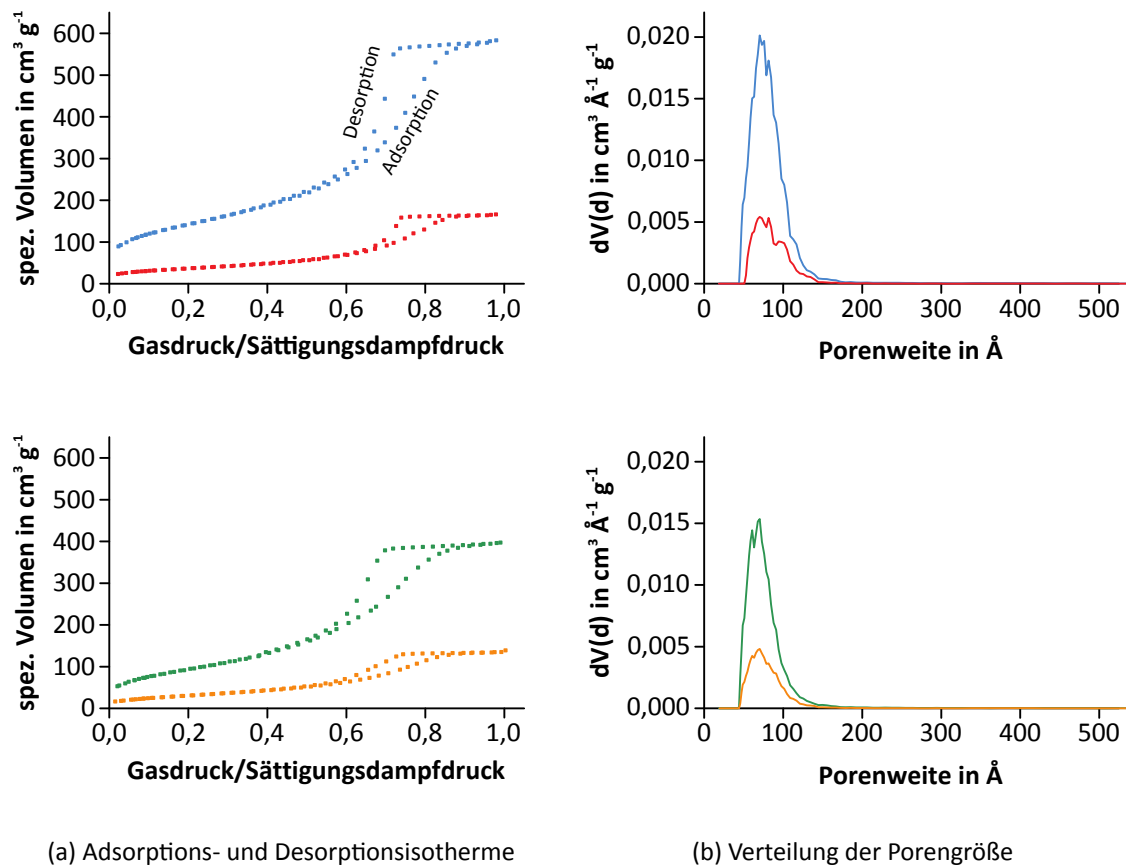
Auf der Grundlage zylindrischer Poren und anhand des *non-local density functional theory* (NLDFT)-Adsorptionszweig-Modells wurden sowohl das Porenvolumen als auch der mittlere Porendurchmesser berechnet.

Weiterhin wurde durch die Anwendung der BJH-Methode nach Barret, Joyner und Halenda auf den Desorptionszweig (Abb. 3.75 (a)) die Porengrößenverteilung erhalten (Abb. 3.75 (b)).

Tabelle 3.15: Spezifische Oberfläche, Porenvolumen und Porendurchmesser_{gemittelt} der Materialien vor und nach Immobilisierung mit MsP1

Material	spezifische Oberfläche in m ² g ⁻¹	Porenvolumen ⁵⁵ in cm ³ g ⁻¹	Porendurchmesser _{gemittelt} ⁵⁵ in nm
Blind-SiO ₂	510	0,88	7,3
MsP1-Blind-SiO ₂	127	0,27	7,3
BSMAP-SiO ₂	356	0,59	7,3
MsP1-BSMAP-SiO ₂	122	0,20	7,3

⁵⁵Berechnungen erfolgten auf der Grundlage zylindrischer Poren; *non-local density functional theory* (NLDFT)-Adsorptionszweig-Modell



(a) Adsorptions- und Desorptionsisotherme

(b) Verteilung der Porengröße

Abbildung 3.75: Charakterisierung der Materialien mittels Stickstoff-Tieftemperatur-Adsorptionsmessung:

—: Blind-SiO₂; —: MsP1-Blind-SiO₂ —: BSMAP-SiO₂; —: MsP1-BMAP-SiO₂

Funktionalisiertes Silica (BSMAP-SiO₂) wies sowohl eine geringere spezifische Oberfläche als auch ein geringeres Porenvolumen als das nicht funktionalisierte Silica (Blind-SiO₂) auf.

Die Immobilisierung von MsP1 an die Materialien führte zu einer weiteren Abnahme der spezifischen Oberfläche und des Porenvolumens.

Alle untersuchten Materialien wiesen einen mittleren Porendurchmesser von 7,3 nm auf, wodurch diese Poren als Mesoporen klassifiziert wurden.

Aus der Verteilung der mittleren Porengröße vor und nach der Immobilisierung war zu erkennen, dass die Immobilisierung zu einer Abnahme der Gesamt-Mesoporosität führt.

3.9.2.4 Bleichung von Molke mit immobilisiertem MsP1

Die Bleichung der mit Annatto gefärbten Molke und des gefärbten 50 mM Natriumacetat-Puffers pH 3,5 erfolgte mit immobilisiertem MsP1 (an BSAM-PS₍₁₎ bzw. BSMAP-SiO₂) nach 2.18.9.

Zur Kontrolle wurden ein Blindwert (Ansatz ohne immobilisierte Partikel), eine Negativkontrolle (Ansatz mit inaktivierten Partikeln) und eine Positivkontrolle (Ansatz mit gereinigtem, nicht immobilisiertem MsP1) auf die gleiche Weise angesetzt und vermessen (Abb. 3.76; exemplarisch mit MsP1 immobilisiert an BSAM-PS₍₁₎ gezeigt).

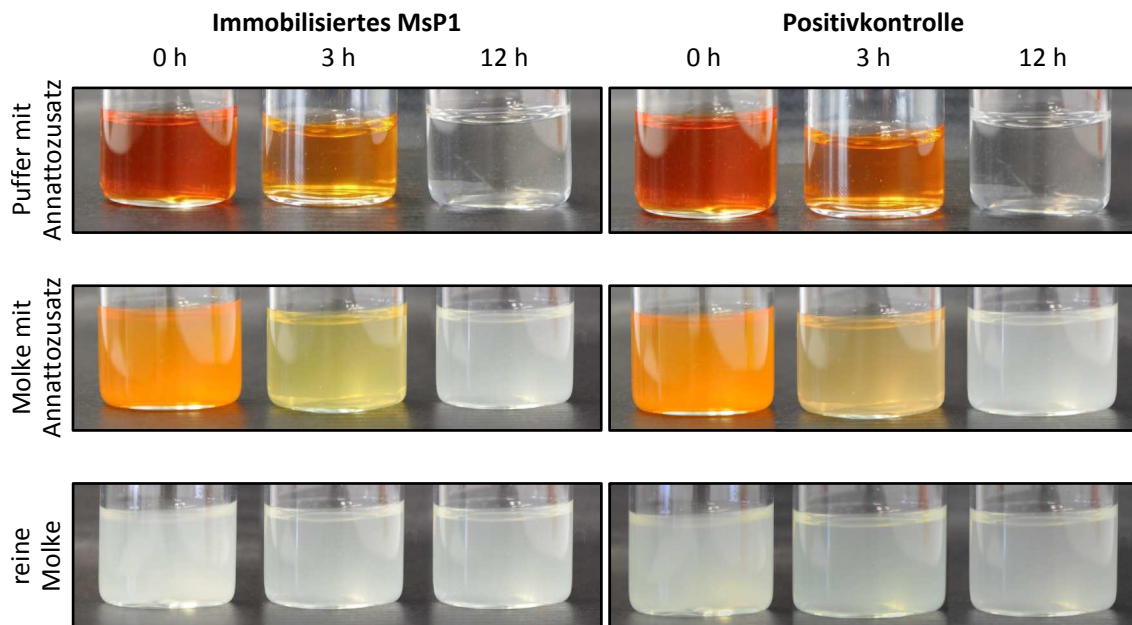


Abbildung 3.76: Bleichung von gefärbter Molke und gefärbtem 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 mit immobilisiertem MsP1 (an BSAM-PS₍₁₎) über 12 Stunden und mit gereinigtem, nicht immobilisiertem MsP1 (Positivkontrolle)

Immobilisiertes MsP1 an BSAM-PS₍₁₎ bzw. BSMAP-SiO₂ bleichte sowohl den durch Annattozusatz gefärbten 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5, als auch die gefärbte Molke innerhalb von 12 Stunden vergleichbar zur Positivkontrolle. Dabei war kein Unterschied zwischen den eingesetzten Materialien zu erkennen.

Reine Molke ohne Zusatz von Annatto wies keine signifikante Veränderung innerhalb der 12 Stunden auf.

4 Diskussion

4.1 Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

Pleurotus sapidus gehört zu der Familie der *Pleurotaceae* (Seitlinge) und ist ein naher Verwandter des Austernseitlings *Pleurotus ostreatus* und des braunen Kräuterseitlings *Pleurotus eryngii*, die als schmackhafte Speisepilze bekannt sind. Dieser Ständerpilz wächst in der Natur auf Laub- und Nadelholz, lässt sich aber auch gut submers kultivieren (Bouws 2007). Im Sekretom des Weißfäulepilzes *Pleurotus sapidus*, wurde eine Vielzahl an Enzymen identifiziert, die dem Lignocellulose-Abbau dienen. Zu ihnen zählen unter anderem Cellulasen, Hemicellulasen, Peptidasen, Esterasen, Laccasen und insbesondere Peroxidasen (Zorn *et al.* 2005).

Ein weiteres Enzym aus dem Weißfäulepilz *P. sapidus* katalysiert die selektive allylische Oxidation des Sesquiterpenkohlenwasserstoffs (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton (Kaspera 2004; Fraatz *et al.* 2009b), eine Schlüsselkomponente des Grapefruitaromas. (+)-Nootkaton ist ein begehrter Aromastoff und wird als Riech- und Duftstoff in der Kosmetik- und Arzneimittelindustrie sowie zur Aromatisierung von Lebensmitteln verwendet. Aufgrund dessen geringer Akkumulation in Pflanzen wird der industrielle Bedarf nahezu ausschließlich durch Chemosynthese gedeckt, bei der oft umweltbelastende Reagenzien, Katalysatoren und Lösungsmittel zum Einsatz kommen (Hunter und Brogden 1965; Fraatz *et al.* 2009a).

Die Biotransformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton wurde bereits mit Ganzzellsystemen bzw. Zellextrakten aus Bakterien, Pflanzen und Pilzen, als auch mit isolierten Enzymen (Oxidoreduktasen, EC 1) untersucht. Die Oxidation von Valencen durch ungesättigte Fettsäurehydroperoxide, die *in situ* durch Lipoxygenasen synthetisiert worden sind, wurde 1998 patentiert und lieferte Nootkatonausbeuten von bis zu 60 g kg⁻¹ Reaktionsmedium (Muller *et al.* 1998). Eine Umsetzung von (+)-Valencen durch pflanzliche Suspensionskulturen ist zwar möglich (Sakamaki *et al.* 2005), jedoch ist die Art der Kulturführung im Vergleich zur niedrigen Produktausbeute langwierig und kostenintensiv (Fraatz *et al.* 2009a). Die enzymatische Synthese von (+)-Nootkaton mit Hilfe der Oxygenase aus *P. sapidus* hingegen ermöglicht die biotechnologische Gewinnung des natürlichen Aromastoffes. Die Transformation von (+)-Valencen mit frischem bzw. gefriergetrocknetem Myzel des Speisepilzes *Pleurotus sapidus* erzielte hohe Konzentrationen an (+)-Nootkaton (Fraatz *et al.* 2009a). Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym wurde gereinigt und nach tryptischem Verdau *de novo* sequenziert (Fraatz 2007).

Einige der ermittelten Peptidsequenzen der Oxygenase wiesen Homologien zu putativen Lipoxygenasen verschiedener Asco- und Basidiomyceten auf und die kodierende cDNA wurde kloniert (Fraatz *et al.* 2009b).

Üblicherweise setzen Lipoxygenasen Substrate mit (Z,Z)-Penta-1,4-dien-Struktur zu den korrespondierenden Hydroperoxiden um (Prigge *et al.* 1997); als Zwischenprodukte werden mesomeriestabilisierte⁵⁶ Pentadienylradikale gebildet (Abb. 4.1).

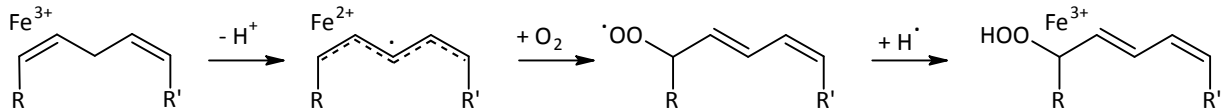


Abbildung 4.1: Mesomeriestabilisierter Mechanismus der – von Lipoxygenasen katalysierten – Bildung von Hydroperoxiden (modifiziert nach Prigge *et al.* (1997))

Von Corey und Nagata (1987) wurde ein weiterer Reaktionsmechanismus dargelegt. Bei diesem katalysiert das Eisen(III)-Ion der Lipoxygenase die Deprotonierung des Substrats, indem es eine direkte Bindung⁵⁷ mit dem resultierenden Carbanion eingeht. Anschließend wird molekularer Sauerstoff eingeführt und das Hydroperoxid gebildet (Abb. 4.2). Eine entsprechende (Z,Z)-Penta-1,4-dien-Struktur wird für diesen Schritt prinzipiell nicht benötigt.

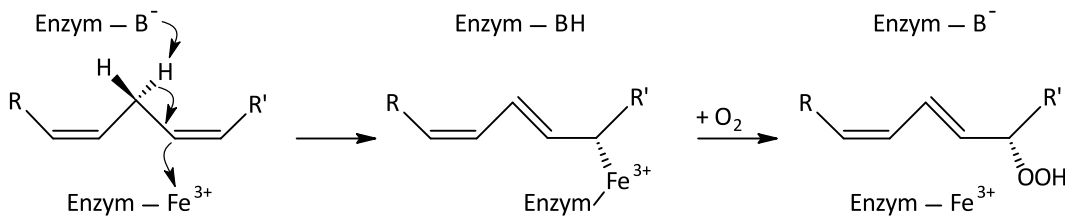


Abbildung 4.2: Organo-Eisen-Mechanismus von Lipoxygenasen (modifiziert nach Corey und Nagata (1987))

Fraatz (2007) vermutet bei der Biotransformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton durch *Pleurotus sapidus* eine allylische Oxidation (in Analogie zu Abb. 4.2). Durch eine Schenck-Umlagerung und anschließende Oxidation wäre die Bildung von (+)-Nootkaton möglich. Der Reaktionsmechanismus sollte demzufolge allylische Hydroperoxide als Intermediate aufweisen. Krügener *et al.* (2010) isolierten aus dem Transformationsansatz die sekundären Valencen-Hydroperoxide (Abb. 4.3; 3 und 3'). Anhand der isolierten Hydroperoxide und der Homologie der partiellen Peptidsequenzen zu Lipoxygenasen wird das Enzym als lipoxygenase-ähnlich vermutet (Krügener *et al.* 2010).

⁵⁶ Ausbildung eines delokalisierten Π -Elektronensystems

⁵⁷ elektrophile Addition

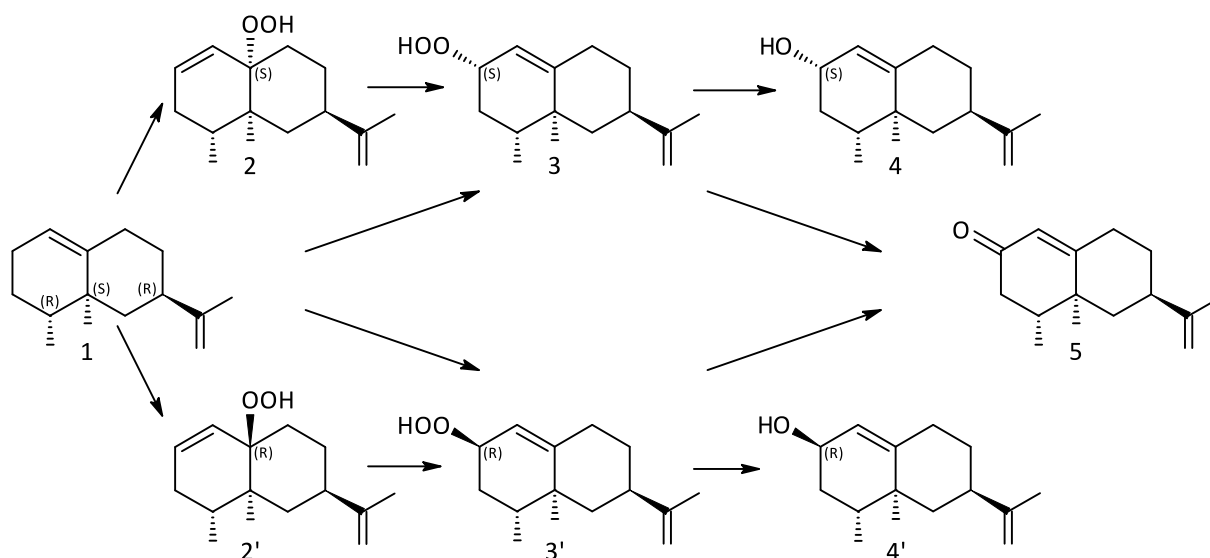


Abbildung 4.3: Biotransformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton durch eine Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* (modifiziert nach Krügener *et al.* 2010): 1: (+)-Valencen; 2: tertiäres (+)-Valencen-(S)-hydroperoxid; 2': tertiäres (+)-Valencen-(R)-hydroperoxid; 3: sekundäres (+)-Valencen-(S)-hydroperoxid; 3': sekundäres (+)-Valencen-(R)-hydroperoxid; 4: β -Nootkatol; 4': α -Nootkatol; 5: (+)-Nootkaton

Lipoxygenasen (LOX) sind monomere nichthämeisenhaltige Dioxygenasen (Linoleat: Sauerstoff-Oxidoreduktase, EC 1.13.11.12). Sie katalysieren den regio- und stereospezifischen Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die mindestens eine (Z,Z)-Penta-1,4-dien-Struktur aufweisen, unter Bildung von Hydroperoxidverbindungen (Brash 1999). Diese Eigenschaft wird als ausschlaggebendes Kriterium zur Klassifizierung von Lipoxygenasen eingesetzt (Tasaki *et al.* 2013).

LOX finden sich in einer Großzahl von Organismen; unter anderem in Bakterien, Pflanzen und Säugetieren (Kühn und Thiele 1999; Oliw 2002; Liavonchanka und Feussner 2006). Sie formen hoch reaktive konjugierte Fettsäurehydroperoxide. Diese Reaktion spielt eine wichtige Rolle als initialer Schritt bei der Biosynthese einer großen Anzahl verschiedenster Produkte (Plagemann *et al.* 2013). In Pflanzen haben diese Hydroperoxide Funktionen in der Wundheilung und der Abwehr von Pathogenen (Gardner 1991). Typische Substrate bei Pflanzen sind Linol- und Linolensäure (Liavonchanka und Feussner 2006).

Bei Säugetieren wird überwiegend Arachidonsäure umgesetzt (Funk 2001). Dadurch werden Hydroperoxyeicosatetraensäuren gebildet, die als Vorstufe von Leukotrienen und Lipoxinen dienen. Diese fungieren als kritisches Signalmolekül in einer Reihe von Erkrankungen (Samuelsson *et al.* 1987; Kühn *et al.* 2002; Serhan 2004; Hamerman 2005).

Darüber hinaus ist die Bildung aromaaktiver Komponenten wie unter anderem Aldehyde, Ketone und Alkohole aus ungesättigten Fettsäurehydroperoxiden in Früchten und Gemüse bekannt (Filippovich *et al.* 2001). Seit geraumer Zeit wird vermutet, dass Lipoxygenasen in Pilzen an der Biosynthese von charakteristischen Pilzaromakomponenten wie Oct-1-en-3-ol beteiligt sind.

Bisher gibt es jedoch keine Beweise, die den Ursprung von C₈-Verbindungen in der Reaktion einer LOX zeigen (Kuribayashi *et al.* 2002; Brodhun und Feussner 2011).

Vorangegangene Studien beschreiben Lipoxygenaseaktivität in Extrakten verschiedener Pilzspezies unter anderem aus *Thermomyces lanuginosus*, *Geotrichium candidum*, *Fusarium proliferatum*, *Gaeumannomyces graminis* und *Pleurotus ostreatus* (Perraud *et al.* 1999; Li *et al.* 2001; Bisakowski *et al.* 1998; Su und Oliw 1998; Kuribayashi *et al.* 2002; Tasaki *et al.* 2013). Einige dieser LOX wurden gereinigt und partiell charakterisiert.

4.1.1 Biochemischer Nachweis mittels polyklonalem Antikörper

Der Nachweis der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* (PSA) erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot. Für die Produktion des dafür benötigten polyklonalen Antikörpers wurde die Aminosäuresequenz CQDAQYYPDDASVAGD auf der Oberfläche des Enzyms als Antigen determinante ausgewählt (Riemer 2010). Die Oxygenase wurde mit einem Molekulargewicht von 76 kDa selektiv nachgewiesen (Abb. 3.1).

Mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers wurde jedoch nur das denaturierte Enzym detektiert. Unter nativen Bedingungen war keine Proteinbande zu erkennen (Abb. 3.1). Demnach befindet sich die ausgewählte Antigen determinante nicht wie vermutet auf der Oberfläche des Proteins. Auf Grund dessen wurde der spezifische Nachweis der Oxygenase im Folgenden ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Bei dem PSA-Lyophilisat hingegen wurde auch unter nativen Bedingungen eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 55 kDa nachgewiesen (Abb. 3.1). Vermutlich gelangte die Antigen determinante infolge des Abbaus des Proteins hervorgerufen durch die Lyophilisation (s. 3.1.4, 4.1.3) an die Oberfläche, wodurch eine Entfaltung mittels Denaturierungsreagenzien und Hitze nicht mehr nötig war.

Anhand von Kontrollen wurde nachgewiesen, dass der polyklonale Antikörper keine unspezifischen Bindungen mit Fremdproteinen eingeht (Abb. 3.2). Lediglich die Positivkontrollen zeigten charakteristische Proteinbanden. Mit Hilfe von Mehrfachbestimmungen wurde die Reproduzierbarkeit des Western Blots (Abb. 3.3) gezeigt. Zudem korrelierte die Signalstärke der Proteinbande mit dem Gehalt des Enzyms in der jeweiligen Probe (Abb. 3.4). Infolgedessen war neben dem Nachweis der Oxygenase auch eine Abschätzung bzw. Vergleich des Gehaltes anhand der Stärke des Bandensignals möglich.

Zusätzlich erfolgte der Aktivitätsnachweis der Oxygenase durch die Biotransformation des Sesquiterpens (+)-Valencen nach Fraatz (2007). Über den internen Standard Thymol wurden die Gehalte des Transformationsproduktes (+)-Nootkaton ermittelt (Abb. 3.5). Im Folgenden wurden mittels Western Blot und Biotransformation sowohl das Vorhandensein der Oxygenase, als auch deren Aktivität (Transformationsaktivität) überprüft und verglichen.

4.1.2 Transformationsaktivität der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

Die Transformationsaktivität der Oxygenase aus PSA gegenüber (+)-Valencen wurde über den Kulturverlauf des Basidiomyceten gaschromatographisch untersucht und erreichte am vierten Tag ein Maximum (Abb. 3.6). Das Aktivitätsmaximum ist durch den Gehalt der Oxygenase aus PSA zu erklären, der am vierten Kulturtag ebenfalls am höchsten war (Abb. 3.7). Auf Grund dessen wurde das Pilzmyzel für alle weiteren Untersuchungen am vierten Tag geerntet, um so den höchsten Gehalt des Enzyms zu erhalten.

4.1.3 Vergleich verschiedener Zellaufschlussvarianten

Der Kulturüberstand einer Submerskultur von PSA zeigte weder eine Proteinbande der Oxygenase noch Transformationsaktivität gegenüber (+)-Valencen (ohne Abbildung). Demzufolge handelt es sich bei der Oxygenase um ein intrazelluläres Enzym. Auch bei Lipoxygenasen handelt es sich um intrazelluläre Enzyme (Andreou und Feussner 2009). Aus diesem Grund wurden verschiedene Zellaufschlüsse bezüglich der Ausbeute und der Stabilität der Oxygenase miteinander verglichen (Abb. 3.9). Frisches Pilzmyzel wies nach den Zellaufschlüssen mittels flüssigem Stickstoff, Ultra-Turrax oder Rührwerkskugelmühle nur eine Proteinbande mit einem ermitteltem Molekulargewicht von 76 kDa auf. Durch die Verlängerung der Zellaufschlussdauer mittels Rührwerkskugelmühle trat keine Veränderung des Bandenmusters auf (ohne Abbildung). Mehrfach eingefrorenes und mittels flüssigem Stickstoff aufgeschlossenes Myzel zeigte ein Bandenmuster mit Molekulargewichten von 60–76 kDa. Bei dem Überstand von lyophilisiertem PSA wurden Proteinbanden mit Molekulargewichten von 54 kDa, 66 kDa, 68 kDa und 76 kDa detektiert. Durch Konzentrierung des Überstandes veränderte sich das Bandenmuster dahingehend, dass stark ausgeprägte Banden mit Molekulargewichten zwischen 54–68 kDa erhalten wurden. Demzufolge wird bei Lyophilisation, Konzentrierung mit Hilfe von Nanosep[®]-Zentrifugationseinheiten oder mehrfachem Auftauen ein Abbau des Enzyms durch Proteinasen induziert (Schmidt *et al.* 2011). Riemer (2010) zeigte, dass die Oxygenase keine Glykosylierung aufweist, was für intrazelluläre Enzyme nicht ungewöhnlich ist. Die Glykosylierung ist charakteristisch für sekretierte Enzyme; sie schützt die Enzyme vor Proteolyse, erhöht ihre Wasserlöslichkeit und Stabilität (Lis und Sharon 1993, Sugano *et al.* 2000, Rehm 2002, Varki *et al.* 2009)

Die höchste Produktkonzentration an (+)-Nootkaton wurde durch den Aufschluss mittels Rührwerkskugelmühle mit einer Aufschlussdauer von 5 min erzielt (Abb. 3.10). Der (+)-Nootkatongehalt betrug $21,8 \pm 1,1 \text{ mg g}^{-1}$ Trockenmasse (TM). Aus einer Verlängerung der Aufschlussdauer auf 10–20 min resultierte eine Abnahme der Ausbeute an (+)-Nootkaton um 24%. Die Aufschlüsse mittels flüssigem Stickstoff und Ultra-Turrax erbrachten 31% bzw. 39% niedrigere Gehalte an (+)-Nootkaton. Bei der Biotransformation mit lyophilisiertem Pilzmyzel wurden 84% niedrigere (+)-Nootkatongehalte ermittelt und somit die niedrigste Produktausbeute erzielt. Vergleicht man die Produktausbeute der Transformation mit dem ermittelten Proteinbandenmuster der Oxyge-

nase, ist zu erkennen, dass die Ausbeute an (+)-Nootkaton mit dem Abbau der Oxygenase korreliert. Demzufolge wird das Enzym beim Abbau inaktiviert.

Die C-terminale Domäne, die die katalytisch aktiven Aminosäuren beinhaltet, weist bei Lipoxygenasen häufig große Homologien auf (Minor *et al.* 1993). Die Funktion der kleineren N-terminalen Domäne hingegen, die fest mit der C-terminalen Domäne verbunden ist, ist noch nicht vollständig verstanden (Maccarrone *et al.* 2001). Sowohl bei der Substratbindung (Brash 1999) als auch bei der Proteinfaltung werden Einflüsse vermutet (Sudharshan und Rao 1997). Maccarrone *et al.* (2001) vermuten, dass es sich bei der N-Domäne der Lipoxygenase-1 aus der Sojabohne um einen Inhibitor der katalytischen Aktivität und der Membranbindefähigkeit handelt; die Entfernung der N-Domäne vom nativen Enzym resultierte in keiner Aktivitätsminderung, sondern in einer Aktivitätssteigerung. Dennoch führte die Expression verkürzter Gene (verkürzter N-Terminus) der Lipoxygenase-1 zu inaktivem Enzym (Steczko *et al.* 1991). Demzufolge sind die am N-Terminus lokalisierten Aminosäuren vermutlich essentiell für die passende Faltung des Enzyms.

Fraatz (2007) zeigte während der chromatischen Reinigung mittels FPLC ebenfalls einen Abbau der Oxygenase. Auch in dieser Arbeit wurden, weder über Affinitätschromatographie mit Hilfe des spezifischen Antikörpers noch mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung, ausreichende Mengen der vollständigen und aktiven Oxygenase aus dem Myzel des *Pleurotus sapidus* isoliert, um nach tryptischem Verdau eine *de novo*-Sequenzierung vornehmen zu können.

4.1.4 Einfluss der Lagerdauer und -temperatur

Frisch geerntetes PSA-Myzel wurde für 21 Tage bei -20 °C bzw. -80 °C eingefroren. Nach der Lagerung wurde eine verminderte Aktivität nachgewiesen. Der Gehalt an (+)-Nootkaton betrug im Vergleich zu einer Transformation von (+)-Valencen durch frisches Pilzmyzel lediglich 12–17%. Das Bandenmuster unterschied sich dahingehend, dass bei dem gelagerten Pilzmyzel neben der Proteinbande mit einem ermitteltem Molekulargewicht von 76 kDa eine weitere Bande mit einem Molekulargewicht von 66 kDa detektiert wurde. Beim Einfrieren des Pilzmyzels entstehen Eiskristalle, die Zellwände beschädigen können. Bei der anschließenden Lagerung wird vermutlich durch proteolytische Enzyme ein Abbau des Enzyms induziert, wodurch dieses inaktiviert wird.

4.1.5 Vergleich von Myzel und Fruchtkörper

Sowohl die Transformationsaktivität als auch das Proteinbandenmuster des PSA-Myzels wurden mit der Aktivität und dem Bandenmuster des Fruchtkörpers verglichen. Dabei zeigte sich, dass sich das Proteinbandenmuster des Fruchtkörpers signifikant von dem Proteinbandenmuster des Myzels unterscheidet. Anstatt einer Bande mit einem Molekulargewicht von 76 kDa, wurden bei dem aufgeschlossenen Fruchtkörper Banden mit Molekulargewichten von 9–76 kDa detektiert (Abb. 3.12 (b)). Sowohl das Pilzmyzel als auch der Fruchtkörper wurden mit Hilfe von flüssigem

Stickstoff und anschließendem Mörsern aufgeschlossen. Da das aufgeschlossene Pilzmyzel nur eine konkrete Proteinbande aufwies, wurde der Abbau nicht durch den Zellaufschluss induziert. Fruchtkörper gehören zu den komplexesten Strukturen, die ein Pilz bilden kann. Die Bildung dieser Fruchtkörper wird durch Umweltfaktoren, Sexualhormone und den Ernährungszustand beeinflusst (Braus *et al.* 2002). Die Pilzgewebe der Fruchtkörper entstehen über einen drastischen Umbau des Organismus, bei dem die Hyphe als morphologisches Grundelement jedoch erhalten bleibt (Hershko und Ciechanover 1998). Die Fruchtkörperbildung benötigt verschiedene spezialisierte Zellen wie beispielsweise die Zellen, die die resistente Fruchtkörperwand ausbilden, in deren Inneren die Sporenbildung erfolgt. Da diese spezialisierten Zellen eine andere Proteinzusammensetzung als die Hyphe haben, erfordert der Umbau eine Neusynthese bzw. einen Abbau von nicht mehr benötigten Proteinen. Dieser Abbau von Proteinen zu Aminosäuren findet in der Vakuole und im Proteasom von Pilzen statt.

Der Gehalt an (+)-Nootkaton betrug bei der Transformation von (+)-Valencen mit Myzel von *Pleurotus sapidus* $15,0 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$ Trockenmasse (TM) (Abb. 3.12 (a)). Die Produktkonzentration der Transformation mit PSA-Fruchtkörper fiel 98% niedriger aus. Das Vorkommen der Oxygenase im Fruchtkörper wurde durch die Detektion der Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 76 kDa gezeigt. Die Verringerung der Aktivität der Oxygenase gegenüber (+)-Valencen ist auf den Abbau des Enzyms zurückzuführen. Tasaki *et al.* (2013) untersuchte die Expression einer Lipoxygenase aus *Pleurotus ostreatus* (PoLOX1) in Fruchtkörpern anhand der mRNA mittels Northern Blot und zeigten, dass in den Pilzstielen das relative mRNA-Level höher ist als in den Kappen.

4.1.6 Vergleich der nativen Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* und der in *Hansenula polymorpha* heterolog exprimierten Oxygenase

Die cDNA der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurde in Vorarbeiten (Riemer 2010) isoliert und von ARTES Biotechnology heterolog in *H. polymorpha* exprimiert. Weiterhin wurde mit Hilfe von SWISS-MODEL (Arnold *et al.* 2006) ein Strukturmodell des Enzyms berechnet⁵⁸, anhand dessen die exponierte Aminosäuresequenz CQDAQYYPDDASVAGD als Antigen determinante für die Produktion polyklonaler Antikörper ausgewählt wurde.

Sowohl das Molekulargewicht der rekombinanten Oxygenase, als auch deren Biotransformationsaktivität gegenüber (+)-Valencen wurden mit der nativen Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* verglichen. Dabei wies die native Oxygenase ein Molekulargewicht von 76 kDa (Abb. 3.14) auf. Für die rekombinante Oxygenase hingegen wurde ein Molekulargewicht von 42 kDa ermittelt, welches mit dem berechneten Gewicht von 44 kDa (Riemer 2010) übereinstimmt. Somit wurde die codierende Gesamtsequenz der Oxygenase nicht vollständig isoliert und infolgedessen das Strukturmodell falsch berechnet. Dadurch befindet sich die Antigen determinante nicht wie vermutet

⁵⁸ anhand eines Sequenzvergleiches zwischen der übersetzten Aminosäuresequenz der Oxygenase und der Röntgenkristallstruktur der Lipoxygenase-1 aus der Sojabohne (*Glycine max*, PDB-ID 1YGE)

exponiert auf der Oberfläche des Enzyms (s. 4.1.1). Ferner zeigte die heterolog exprimierte Oxygenase – vermeintlich auf Grund einer inkorrekten Proteinfaltung – keinerlei Transformationsaktivität gegenüber dem Sesquiterpen (+)-Valencen.

Demzufolge wurde die Untersuchung der Oxygenase aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* durch die Gewinnung von cDNA und anschließender heterologer Expression abermals aufgenommen (s. 3.3, 3.4).

4.1.7 Modell- und Sequenzanalyse der Oxygenase

Die klonierte cDNA der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* hat eine Größe von 1929 Basenpaaren, die ein Protein aus 643 Aminosäuren codiert (Abb. 3.28). Das Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 72,3 kDa und entspricht damit dem über SDS-PAGE bestimmten Molekulargewicht von 76 kDa (Abb. 3.1). In der Aminosäuresequenz sind einige Peptidsequenzen, die in vorangegangenen Arbeiten (Fraatz 2007) durch *de novo* Sequenzierung nach tryptischem Verdau mittels ESI-MS/MS erhalten worden sind, vollständig oder zum Teil enthalten.

Die höchsten Homologien auf Basis der Aminosäuresequenz wurden zu einer postulierten Lipoxygenase aus *Pleurotus ostreatus* (98%), einer Lipoxygenase aus *Pleurotus sajor-caju* (98%), einer Lipoxygenase aus *Pleurotus dryinus* (94%) sowie zu einer mutmaßlichen Lipoxygenase aus *Aspergillus fumigatus* (49%) gefunden.

Aufgrund intensiver Untersuchungen von Andreou und Feussner 2009 und der vorliegenden aufgeklärten Röntgenkristallstruktur (Minor *et al.* 1993) fungiert die Lipoxygenase-1 aus *Glycine max* (PDB-ID 1YGE) als Modellenzym für die Familie der Lipoxygenasen. Mit 839 Aminosäuren handelt es sich um ein deutlich größeres Protein als die Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*. Der Vergleich der Aminosäuresequenz der Oxygenase und der Röntgenkristallstruktur der Lipoxygenase-1 ergab eine Homologie von 15%. Aufgrund der geringen Übereinstimmung der Sequenzen konnte mit Hilfe von SWISS-MODEL (Arnold *et al.* 2006) kein Strukturmodell berechnet werden. Auch andere Lipoxygenasen, deren Kristallstrukturen bekannt sind, wiesen keine höhere Homologie zur Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* auf. Auch wenn Lipoxygenasen aus Pflanzen und Tieren eine geringe Übereinstimmung bezüglich ihrer Aminosäuresequenzen aufweisen, sind die strukturellen Merkmale⁵⁹ hoch konserviert (Kühn *et al.* 2005).

Lipoxygenasen bestehen aus einem Polypeptidstrang mit zwei Domänen; einer kleinen N-terminalen Domäne und einer größeren C-terminalen Domäne (Kühn *et al.* 2005; Mei *et al.* 2008). Die N-terminale Domäne bildet ein β -Barrel, das aus zwei Faltblättern mit jeweils 4 Strängen besteht. Diese Domäne spielt möglicherweise eine Rolle bei der Interaktion des Enzyms mit biologischen Membranen (Bateman und Sandford 2016; Hammarberg *et al.* 2000), da sie sich wie ein Membrananker verhält (Abb. 4.4).

⁵⁹Tertiärstruktur des Enzyms sowie Positionen der Aminosäuren, die an der Bindung des Eisens im katalytischen Zentrum beteiligt sind

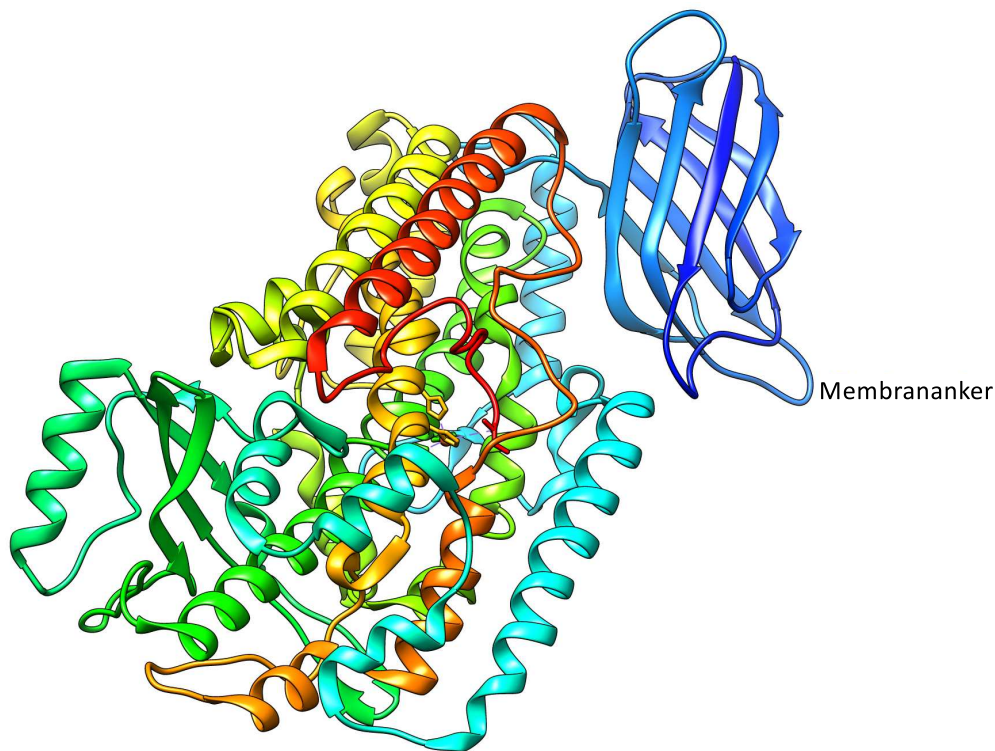


Abbildung 4.4: Modell einer 15S-Lipoxygenase aus Kaninchen (PDB-ID 2P0M) mit dem erwähnten Membrananker (Choi *et al.* 2008)

Die C-terminale Domäne ist die katalytische Domäne und besteht hauptsächlich aus α -Helices⁶⁰. Sie beinhaltet die Aminosäuren, die essentiell für die Katalyse, Eisenbindung und Substratpositionierung sind (Kühn *et al.* 2005). Die Imidazolringe der drei Histidinreste H499, H504, H690 und die Carboxylgruppe des terminalen Isoleucin I839 binden den Co-Faktor Eisen (Minor *et al.* 1996; Andreou und Feussner 2009). Nach Prigge *et al.* (1997) ist eine Beteiligung des in Lipoxygenasen hoch konservierten Aminosäurerestes Asparagin N694 und eines Wassermoleküls an der Eisenkomplexierung während des katalytischen Zyklus möglich, trotz eines Abstandes von 3,3 Å zum Eisen. Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* und der Sequenz der Lipoxygenase-1 aus *Glycine max* wurden 4 Aminosäuren identifiziert, die den genannten Aminosäuren entsprechen (H325, H330, H510, N514 und I643) (Abb. 3.28). Die Oxygenase besitzt je eine potentielle N- bzw. O-Glykosylierungsstelle. Riemer (2010) zeigte jedoch durch Deglykosylierungsversuche mit Endoglykosidase H, dass die Oxygenase nicht glykosyliert ist. Auch bei der Lipoxygenase-1 liegt vermutlich keine Glykosylierung vor (Minor *et al.* 1996).

⁶⁰23 α -Helices und 8 β -Faltblätter

4.1.7.1 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI)

Proteinextrakt von *Pleurotus sapidus* wurde einer isoelektrischen Fokussierung unterworfen. Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Oxygenase aus PSA wurden die erhaltenen Fraktionen sowohl zum Dot Blot (Abb. 3.15) als auch zur Biotransformation des Sesquiterpens (+)-Valencen (Tab. 3.2) eingesetzt. Die Messung des pH-Wertes der Fraktion, die sowohl eine Reaktion beim Dot Blot als auch Aktivität gegenüber (+)-Valencen zeigten, ergab einen isoelektrischen Punkt (pI) der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* von 5,81. Der anhand der Sequenz berechnete theoretische isoelektrische Punkt der Oxygenase liegt bei 5,33; der theoretische pI der Lipoxygenase-1 aus der Sojabohne bei 5,96. Experimentell bestimmte isoelektrische Punkte sind in der Literatur für Lipoxygenasen (13S-Lipoxygenasen) aus Pflanzen oder Ständerpilzen nicht beschrieben.

4.1.8 Heterologe Expression der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

Zur Produktion ausreichender Mengen an Oxygenase⁶¹ wurde ein eukaryotischer Expressionswirt verwendet: die Hefe *Ogataea angusta* auch bekannt als *Hansenula polymorpha*.

Die heterologe Expression wurde von dem Unternehmen ARTES Biotechnology in einem Uracil-auxotrophen Wirtsstamm RB11 durchgeführt. Die Wahl des Wirtes ist direkt von den Eigenschaften des Zielproteins abhängig (Spadiut *et al.* 2010). *Hansenula polymorpha* ist eine methylotrophe Hefeart und auf Grund der Thermotoleranz und der Bildung von hohen Zelldichten während der Kultivierung ein vielversprechender Expressionsorganismus (Gellissen *et al.* 2005). Ebenso wie *Pleurotus sapidus* ist die Hefe ein Eukaryont und besitzt die Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation wie zum Beispiel der Glykosylierung von Proteinen (Irzykowska und Waśkiewicz 2014; Daly und Hearn 2005). Durch die Expression in diesem Wirt wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, lösliches und – auf Grund der korrekten Faltung – aktives Protein zu erhalten.

Die cDNA-Sequenz der Oxygenase wurde an die Codon Usage der Hefe angepasst und enthielt einen C-terminalen His-Tag. Für die intrazelluläre Expression wurde ein Expressionsplasmid auf der Basis von pFPMT121 generiert. Ein restriktionspositives Expressionsplasmid wurde einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen, um die Sequenz des Inserts zu verifizieren. Für Stammgenerierungen wurden 24 Uracil-prototrophe Transformantenkolonien ausgewählt. Das Screening auf positive Transformanten wurde mittels Western Blot nach denaturierender SDS-PAGE unter Verwendung des Antiserums gegen die Oxygenase durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurde der entsprechende Vektor ohne Insert in den Expressionsstamm transformiert. Das Genkonstrukt lox in *Hansenula polymorpha* führte zur Synthese eines löslichen Proteins von 73 kDa (Abb. 3.30), das dem homolog exprimierten Protein entspricht. Von den zahlreichen lox6His-Transformanten wurden besonders produktive Einzelstämme ausgewählt und sowohl auf die Transformationsaktivität von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton als auch auf Lipoxygenaseaktivität getestet. Bei beiden Enzymassays wurde keine Aktivität nachgewiesen; auch Zusätze von Eisen bzw. abgekochtem

⁶¹für eine proteinbiochemische Charakterisierung dieser

Lyophilisat und Natriumcholat riefen keine Aktivität hervor. Das Zentralatom Eisen wurde durch eine eindeutige Färbung für Häm- und Metallenzyme nachgewiesen (Abb. 3.29). Die nicht vorhandene Aktivität deutet – trotz löslichem Enzym – auf eine nicht korrekte Faltung der Oxygenase durch den Wirtsorganismus hin.

Parallel zu dieser Arbeit wurde im Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. Berger (Institut für Lebensmittelchemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover) die heterologe Expression der Oxygenase in *Escherchia coli* vorgenommen. Die in *E. coli* exprimierte Oxygenase lag jedoch intrazellulär in Einschlusskörpern – sogenannten *inclusion bodies* – vor (Zelena *et al.* 2012). Dabei handelt es sich um große Aggregate falsch gefalteter Proteine bzw. Faltungsintermediate, die sich im Cytoplasma oder auch vereinzelt im Periplasma ablagern (Bowden *et al.* 1991). Um der Bildung von *inclusion bodies* entgegenzuwirken und lösliches Enzym zu erhalten, wurde die Expression bei niedrigen Temperaturen unter der Kontrolle des Kälteschock-Promotors *cspA* vorgenommen. Ferner erfolgte eine Koexpression mit Chaperonen, wodurch geringe Mengen des löslichen und aktiven Enzyms produziert wurden (Zelena *et al.* 2012). Plagemann *et al.* (2013) überprüfte die Substratspezifität des aktiven Enzyms gegenüber Lipoxygenasesubstraten und verglich die Reaktionsprodukte mit denen der Lipoxygenase-1 aus der Sojabohne. Dadurch wurde die Oxygenase aus PSA als 13S-Lipoxygenase (EC 1.13.11.12) identifiziert.

4.1.9 Rückfaltung der rekombinanten Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* mittels iFOLD® Protein Refolding System-Kit

Die Proteinfaltung ist ein reversibler und spontaner Prozess, der sehr schnell erfolgt (zumeist innerhalb von Sekunden) (Radford 2000; Dill *et al.* 2008). Einfache Berechnungen deuteten darauf hin, dass es schon bei kleinen Proteinen (100 Aminosäuren) über eine Milliarde Jahre dauern würde den nativen Zustand zu erreichen, wenn alle Möglichkeiten der Faltung ausprobiert werden müssten (Radford 2000; Dobson 2003). Dies lässt darauf schließen, dass es einen spezifischen Ablauf für die Faltung von Proteinen geben muss (Radford 2000). Neuere Erkenntnisse ergaben, dass es nicht nur einen spezifischen Faltungsablauf gibt. Der Prozess wird besser durch eine mehrdimensionale „Energiewand“ bzw. einen sogenannten „Faltungstrichter“ beschrieben (Abb. 4.5), der die Energiezustände des Proteins während der Faltung wiedergibt (Radford 2000). Während der Faltung gelangt das Enzym von einer thermodynamisch ungünstigen Konformation über eine Vielzahl an Zwischenprodukten (Intermediate) zu einer thermodynamisch stabilen Konformation (Dill *et al.* 2008).

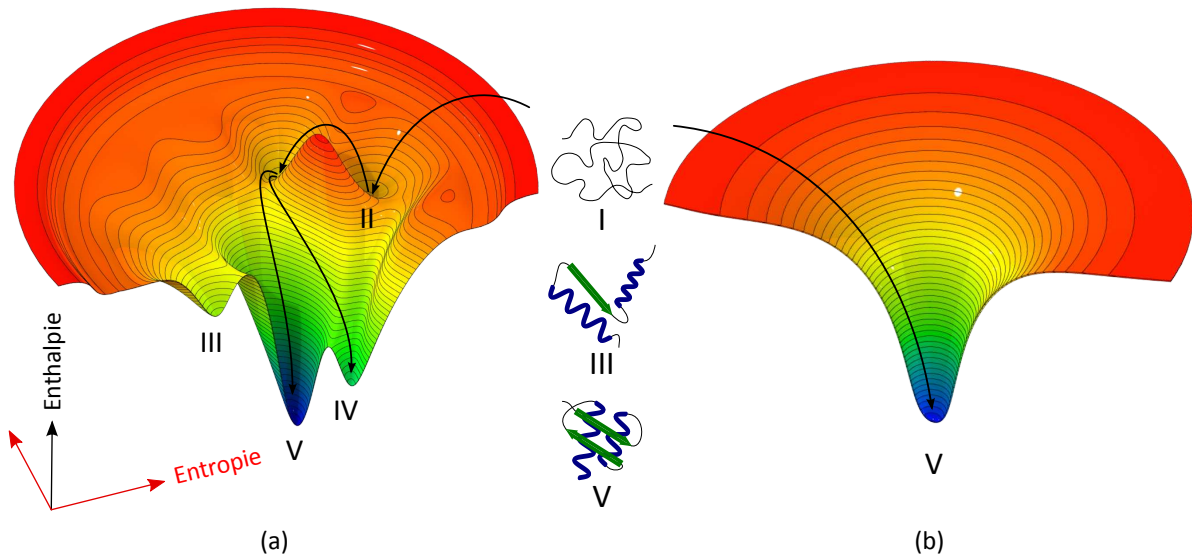


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung von möglichen „Faltungstrichtern“: (a) Denaturierte Moleküle (I) an der oberen Öffnung des Trichters gelangen in den nativen Zustand (energieärmste Konformation) auf einer Vielzahl von verschiedenen Routen. Dabei werden bei Faltungsprozessen großer Proteine mit mehreren Domänen stabile Übergangszustände (lokale Enthalpieminima), sogenannte Faltungsintermediate (II, III), erreicht. Einige dieser lokalen Minima können als kinetische Fallen fungieren, in denen das Enzym in einer falschen Konformation (IV) verbleibt und somit inaktiv ist. (b) „Faltungstrichter“ mit glatter Oberfläche stellen Prozesse dar, in denen Proteine die Faltung ohne Intermediate durchlaufen und somit nur zwei Konformationen bilden (I, V). Solche Faltungsprozesse durchlaufen meist sehr kleine Proteine (<100 Aminosäuren) (Radford 2000 und Dill *et al.* 2008).

Bei der heterologen Expression der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* in dem Wirtsorganismus *Hansenula polymorpha* wurde lösliches aber inaktives Enzym erhalten. Deswegen wurde die rekombinante Oxygenase mittels iFOLD[®] Protein Refolding System-Kit rückgefaltet. Da es keine allgemeine Strategie zur Rückfaltung von Proteinen gibt, ist das Rückfaltungsverfahren meist zeitaufwändig und ohne Gewähr, dass das Enzym seine aktive Konformation erlangt. Des Weiteren fallen die Ausbeuten an aktivem Protein häufig sehr gering aus (Sørensen und Mortensen 2005). Das iFOLD[®]-Kit bietet die Möglichkeit, viele verschiedene Puffer zu testen. Die Auswahl der Puffer beruht auf einer umfassenden Literaturrecherche von erfolgreichen Proteinrückfaltungsexperimenten mit Hilfe der *REFOLD database* (Chow *et al.* 2006). Die Renaturierung des Enzyms erfolgt durch die blitzartige Verdünnung in verschiedenen Renaturierungspuffern, die in einer 96-well Mikrotiterplatte vorliegen.

Die heterologe Expression der Oxygenase in *Hansenula polymorpha* und der Aufschluss der Hefezellen wurden vor der Rückfaltung mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot überprüft (Abb. 3.30). Sowohl die heterologe Expression der Oxygenase, als auch der Aufschluss der Hefezellen waren erfolgreich. Der erhaltene lösliche Zellextrakt wurde zur Proteinrückfaltung mittels iFOLD[®] Protein Refolding System-Kit eingesetzt (Abb. 3.31). Dem Zellextrakt wurde nach der Denaturierung zusätzlich Eisen(III)-chlorid hinzugefügt, um während der Rückfaltung einen

Einbau des Zentralatoms zu gewährleisten. In 39 *wells* der iFOLD[®] 96-*well* Platte lagen nach der Rückfaltung klare Renaturierungspuffer vor. In den restlichen *wells* war ein Niederschlag zu erkennen, der auf präzipitiertes Enzym schließen ließ. Die 39 klaren Renaturierungspuffer, in denen lösliches Enzym vermutet wurde, wurden zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt. Lediglich in 4 der 39 untersuchten Transformationen wurde (+)-Nootkaton nachgewiesen. Bei den Puffern handelte es sich um MOPS-Puffer (pH 7,0) und CHES-Puffer (pH 9,0) mit verschiedenen Zusätzen (Faltungszusätze) wie beispielsweise L-Arginin, L-Glutathion, Natriumchlorid oder Dimethylbenzylammoniumpropansulfonat. Die Faltungszusätze wirken stabilisierend auf die renaturierten Proteine, in dem sie die Faltung verbessern⁶² oder Aggregationen vermindern⁶³ (Alibolandi und Mirzahoseini 2011; Tsumoto *et al.* 2003).

- Durch die Verwendung thioalbasierter Redoxpuffer (oxidiertes L-Glutathion, reduziertes L-Glutathion, DTT) werden einerseits Disulfidbrücken gebildet; andererseits können aus falsch gebildeten Disulfidbindungen neue, native Disulfidbrückenbindungen gebildet werden (Wang *et al.* 2010).
- Die Ausbeute der Renaturierung kann durch den Zusatz von Salzen verbessert werden, indem sie die Löslichkeit des Proteins erhöhen (Tanford 1961).

Um falsch-positive Aktivitätsmessungen auszuschließen, wurde die Rückfaltung der rekombinanten Oxygenase mit den vielversprechendsten Renaturierungspuffern im größeren Maßstab wiederholt. Die Aktivität der renaturierten Oxygenase gegenüber (+)-Valencen wurde mit den entsprechenden Chemikalienblindwerten und Negativkontrollen verglichen (Abb. 3.32). Die geringen Mengen an gebildeten (+)-Nootkaton wurden auch in den Chemikalienblindwerten und Negativkontrollen nachgewiesen, so dass eine enzymatische Bildung von (+)-Nootkaton ausgeschlossen werden konnte. Demzufolge wies die rekombinante Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* auch nach der Proteinrückfaltung mittels iFOLD[®] Protein Refolding System-Kit keine Aktivität gegenüber (+)-Valencen auf.

⁶² stärken die Protein-Protein-Interaktionen

⁶³ dekrementieren die Interaktion von Seitenketten der Intermediate

4.2 Untersuchung der Expression der Oxygenase in Seitlingen mittels *Real-time-PCR*

Der Vergleich der neu erhaltenen Aminosäuresequenz der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* mit der übersetzten Aminosäuresequenz der mutmaßlichen Lipoxygenase aus dem Genom des *Pleurotus ostreatus* ergab eine Übereinstimmung von 94% (Abb. 3.27). Aus diesem Grund wurde die Aktivität der Enzyme aus PSA und POS gegenüber (+)-Valencen und deren Proteinbandenmuster untersucht und verglichen (Abb. 3.13). Auch *Pleurotus eryngii*, ein weiterer Vertreter der Seitlinge, wurde zum Vergleich herangezogen.

Der Proteinextrakt aus *Pleurotus sapidus* wies eine Hauptbande mit einem Molekulargewicht von 76 kDa (s. 4.1.1) auf. Mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers konnten in den Extrakten von *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii* ebenfalls Proteinbanden selektiv detektiert werden. Sowohl PER als auch POS wiesen Proteinbanden mit ermittelten Molekulargewichten von 52 und 76 kDa auf, was das Vorhandensein einer Oxygenase vermuten lässt.

Die Produktkonzentration an (+)-Nootkaton verringerte sich bei dem Einsatz von Pilzmyzel des *Pleurotus ostreatus* bzw. *Pleurotus eryngii* im Vergleich zu der Transformation von (+)-Valencen mit Myzel von *Pleurotus sapidus* jedoch drastisch. Die Proteinbande von 52 kDa lässt auf einen Abbau des Enzyms schließen. Sowohl das Pilzmyzel von PSA als auch das Myzel von POS und PER wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff und anschließendem Mörsern aufgeschlossen. Da das aufgeschlossene Pilzmyzel von *Pleurotus sapidus* nur eine konkrete Proteinbande aufwies, wurde der Abbau vermutlich nicht durch den Zellaufschluss induziert. Die Änderung der Kultivierungsdauer von POS und PER hatte kaum Einfluss auf die Aktivität (Tab. 3.1). Infolgedessen wurde eine Untersuchung der Expression der Oxygenase in den erwähnten Seitlingen mittels *Real-time-PCR* vorgenommen.

Bei der *Real-time-PCR* wird die Produktakkumulation in Echtzeit verfolgt; die exponentielle Phase der Reaktion wird für die Quantifizierung der Templatmenge genutzt (Wilhelm 2003a). Die Messung der Produktzunahme geschieht dabei störungsfrei anhand von Fluoreszenzlicht, das in Abhängigkeit der Produktmenge generiert wird (Wilhelm und Pingoud 2003b; Heid *et al.* 1996). Durch die Quantifizierung mittels *Real-time-PCR* können z. B. Aussagen über die Transkriptionsrate bestimmter Gene gemacht werden (Pfaffl 2001).

Zwei Quantifizierungsmöglichkeiten stehen zur Auswahl:

- absolute Quantifizierung, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe definierter Template-mengen⁶⁴ durchgeführt wird
- relative Quantifizierung, bei der die Expression eines Zielgens auf einen internen Standard⁶⁵ bezogen wird

In dieser Arbeit wurde die absolute Quantifizierung der initialen Template-Kopienzahlen zur Untersuchung der Transkriptionsrate der Oxygenase in verschiedenen *Pleurotus*-Spezies durchgeführt. Zur Detektion wurde der dsDNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I – ein unsymmetrischer Cyaninfarbstoff – verwendet. Der Farbstoff bindet weitgehend sequenzunspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA. Der gebundene Farbstoff fluoresziert nach Anregung etwa tausendfach stärker als der freie Farbstoff (Wilhelm und Pingoud 2003b). Somit ist dieser sehr gut geeignet, um die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte sichtbar zu machen. Ein weitere Möglichkeit zur Detektion wäre die Verwendung fluorophormarkierter Oligonukleotide als Sonden, die auf der Zielsequenz hybridisieren. Auf diese Weise lassen sich PCR-Produkte auch sequenzspezifisch detektieren. Registriert wird dabei entweder die produktabhängige Abnahme der Löschung einer Reporter-Fluoreszenz oder die Zunahme des Resonanzenergietransfers von einem Donor- auf einen Akzeptorfluorophor (Wilhelm und Pingoud 2003b).

4.2.1 Fragment- und Primerauswahl

Mittels präparativer PCR wurden DNA-Fragmente mit 1543 bp und 661 bp amplifiziert (Abb. 3.33). Die PCR-Produkte wurden isoliert, sequenziert und anschließend die überlappenden DNA-Sequenzen zusammengefügt. Die zusammengefügteten DNA-Sequenzen aus *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus ostreatus* umfassten jeweils 2042 bp (Abb. 3.34 und 3.35). Diese Nukleotidsequenzen geben den für die Oxygenase zuständigen Gen-Abschnitt wieder. Beim Vergleich wiesen die Sequenzen von PER und PSA eine Homologie von 86% auf; PER und POS 94% und die Sequenzen von PSA und POS 86%.

Basierend auf den erhaltenen Nukleotidsequenzen wurde ein Bereich (Fragment mit 661 bp) der Sequenz ausgewählt, der zur Synthese der Standards für die *Real-time*-PCR eingesetzt wurde (Abb. 3.36). Weiterhin wurden passende Primer abgeleitet. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass die Zielsequenz 75–150 bp betrug, der G/C-Gehalt in einem Bereich von 50–60% lag, keine Dimerbildungen auftraten und die Schmelztemperaturen nahezu gleich waren.

⁶⁴beispielsweise synthetisierte DNA

⁶⁵ribosomale Untereinheiten oder andere „Haushaltsgene“

4.2.2 Synthese der Standards und der Proben-Templates

Die Synthese der Standards für die *Real-time*-PCR erfolgte mittels präparativer PCR. Dabei wurde die Gesamt-DNA der Basidiomyceten PSA, POS und PER als Template eingesetzt. Die erfolgreiche Synthese der Standards (Fragment mit 661 bp) wurde durch die Sequenzierung der Nukleotidsequenz überprüft und bestätigt. Um die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen zu verringern, wurden die optimalen Hybridisierungstemperaturen der Primer, die in der *Real-time*-PCR eingesetzt wurden, ermittelt. Die zuvor synthetisierten Standards dienten dabei als Matrize. Mit den Primerkombinationen wurden Fragmente mit 97 bp bzw. 115 bp amplifiziert. Die optimale Hybridisierungstemperatur beider Primerkombinationen betrug bei allen Standards 52,7 °C (Abb. 3.38). Diese Temperatur wurde demzufolge in der *Real-time*-PCR für die Standards und die entsprechenden Proben verwendet.

Die Gesamt-RNA von PSA, POS und PER wurde aus dem am 2., 4. und 6. Kulturtag geernteten Myzel isoliert. Die jeweilige Gesamt-RNA diente als Matrize für die Synthese des Erststranges, der nach Abbau der RNA durch RNase H anschließend als Template in der *Real-time*-PCR eingesetzt wurde.

4.2.3 Untersuchung der Expression der Oxygenase mittels *Real-time*-PCR

Der quantitative Nachweis von Transkripten der Oxygenase in verschiedenen *Pleurotus*-Spezies erfolgte in Vierfachbestimmung. Mit Hilfe der Standards wurden dekadische Verdünnungsreihen hergestellt, die anschließend als Template eingesetzt und unter identischen Bedingungen wie die Proben amplifiziert wurden. Als Proben-Templates wurden – wie oben beschrieben – die cDNA-Erststränge (ss) von *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus ostreatus* der unterschiedlichen Kulturtage eingesetzt.

Die Reaktionseffizienzen der *Real-time*-PCR lagen zwischen 96–103%. Im Falle einer Reaktionseffizienz der PCR von 100% verdoppelt sich die DNA-Produktmenge mit jedem Zyklus und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Demzufolge sollte für eine genaue Quantifizierung die Reaktionseffizienz zwischen 90–110% liegen. Von den zwei Primerkombinationen wurde die Kombination mit der höchsten Effizienz und dem größten R^2 zur Amplifizierung der Fragmente der Oxygenase mittels *Real-time*-PCR verwendet (Abb. 3.42).

Die Schmelzkurvenanalyse ermöglicht die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten (Wilhelm und Pingoud 2003b). Die Schmelztemperatur der PCR-Produkte der Matrizen-DNA aus PER vom 2. Kulturtag lag mit 74 °C bzw. 77,5 °C wesentlich niedriger, als die der anderen Kulturtage (Tab. 3.8). Aufgrund dessen wurde von einer Bildung unspezifischer PCR-Produkte ausgegangen. Die Proben der Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* und *Pleurotus ostreatus* wiesen keine unspezifischen PCR-Produkte auf. Die Anzahl der Transkripte der Oxygenase in dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* betrug von 25 bis 71 Kopien ng^{-1} cDNA(ss). Die Anzahl in *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus ostreatus* lag wesentlich niedriger.

Mit 71 Kopien ng^{-1} cDNA(ss) wurden am 4. Kulturtag die meisten Transkripte im PSA nachgewiesen. POS hingegen enthielt sowohl am 4. als auch am 6. Kulturtag die meisten Transkripte der Oxygenase; PER am 6. Kulturtag. Am 2. Kulturtag lagen in dem Basidiomyceten *Pleurotus eryngii* vermutlich keine Transkripte der Oxygenase vor, wodurch unspezifischen PCR-Produkte gebildet wurden.

Die Proben der *Real-time*-PCR wurden nach der Amplifizierung auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen (Abb. 3.44), isoliert und sequenziert. Die erfolgreiche Amplifizierung der repräsentativen Fragmente der Oxygenase wurde durch die Sequenzierung der Nukleotidsequenz überprüft und bestätigt. Somit wurde die Transkriptionsrate der Oxygenase in verschiedenen *Pleurotus*-Spezies mittels *Real-time*-PCR erfolgreich dargestellt. Die geringeren Aktivitäten der Pilzmyzelien von POS und PER gegenüber (+)-Valencen im Vergleich zu dem Myzel von PSA lassen sich anhand der niedrigeren Transkription der Oxygenase erklären.

4.3 Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodonius*

Der echte Knoblauchschwinding *Mycetinis scorodonius* gehört zu der Familie der Schwindlingsverwandten und ist ein kleiner Speisepilz, der auf Grund seines intensiven Geschmacks nach Knoblauch bevorzugt als Würzpilz Verwendung findet. Dieser Ständerpilz ist in der Natur auf Ästen und Zweigen oder liegenden Stämmen von Laub- und Nadelhölzern zu finden.

In einem *Screening* von mehr als 50 Pilzen zeigte sich, dass *Mycetinis scorodonius* in der Lage ist β -Carotin zu spalten (Zorn *et al.* 2003a). Die Spaltung von Carotinoiden ist für die Riechstoffindustrie von Interesse, da Carotinoide Vorstufen von Aromastoffen wie beispielsweise von α - und β -Ionon, Geraniol und β -Damascenon darstellen (Winterhalter 1996; Winterhalter und Rouseff 2002). Weiterhin spielt der Abbau von Carotinoiden bei der Bleichung von Lebensmitteln eine Rolle. Aus dem Kulturüberstand des Weißfäulepilzes *Mycetinis scorodonius*, wurden die Enzyme MsP1 und MsP2 isoliert, die β -Carotin zu flüchtigen Verbindungen abzubauen vermögen (Zorn *et al.* 2003a). Beide Enzyme wurden, aufgrund von Sequenzhomologien zu der Peroxidase DyP (*dye decolorizing peroxidases*, farbstoffentfärbende Peroxidase) aus dem Basidiomyceten *Bjerkandera adusta*⁶⁶, der Peroxidase-Familie der DyP-Typ-Enzymen zugeordnet (Scheibner 2006).

Die DyP aus *B. adusta* wird als klassische DyP bzw. BadDyP bezeichnet und ist das erste Enzym dieser neuen Peroxidase-Familie. BadDyP wurde vor ca. 17 Jahren von Kim und Shoda (1999a) aus dem Pilz isoliert und charakterisiert; erste Anzeichen für die Existenz dieser einzigartigen Peroxidasen fanden Kim *et al.* (1995) schon einige Jahre zuvor. Heute zählt die BadDyP zu den am besten charakterisierten Mitglieder der Familie der DyP-Typ-Peroxidasen.

Peroxidasen (EC 1.11.1.X) repräsentieren eine große Familie von Oxidoreduktasen, die typischerweise Peroxide als Elektronenakzeptor nutzen, um die Oxidation von Substraten zu katalysieren. Die überwiegende Mehrheit dieser Enzyme enthalten ein Häm als prosthetische Gruppe (Banci 1997) und sind im Tier- sowie Pflanzenreich weit verbreitet. Dyp-Typ-Peroxidasen zählen zu der Klasse der Häm-Peroxidasen, die anhand von strukturellen und funktionellen Eigenschaften sowie Sequenzhomologien üblicherweise in zwei Superfamilien klassifiziert werden (Welinder *et al.* 1992; Morgenstern *et al.* 2008): die Pflanzen-Peroxidasen und die tierischen Peroxidasen.

Die Superfamilie der Pflanzen-Peroxidasen umfassen die Häm-Peroxidasen aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien (Morgenstern *et al.* 2008).

⁶⁶Der Stamm wurde in der Vergangenheit ursprünglich als *Geotrichum candidum* Dec 1 bezeichnet; später fälschlicherweise als *Thanatephorus cucumeris*

Diese Superfamilie wird zusätzlich in drei verschiedene Klassen unterteilt (Welinder *et al.* 1992; Caruso *et al.* 2001):

- der **Klasse I** werden die intrazellulären Peroxidasen zugeordnet, welche nicht dem sekretorischen Stoffwechselweg angehören
- **Klasse II** besteht aus Peroxidasen, welche dem sekretorischen Stoffwechselweg angehören und von Pilzen gebildet werden
- in **Klasse III** werden alle pflanzlichen Peroxidasen des sekretorischen Stoffwechselweges zusammengefasst

Nach Welinder *et al.* (1992) zeichnet sich die Klasse II durch eine große Heterogenität aus. Typische Vertreter dieser Klasse sind die Familien der Lignin-Peroxidasen (LiP), Mangan-Peroxidasen (MnP) und versatilen Peroxidasen (VP) (Martínez 2002; Lundell *et al.* 2010).

Die Dyp-Typ-Peroxidasen wurden anfänglich auch der Klasse II der Superfamilie der Pflanzen-Peroxidasen zugeordnet. Sie bilden mittlerweile eine eigene Superfamilie (EC 1.11.1.19), da sie sich von den anderen Klasse II-Peroxidasen durch spezifische Merkmale unterscheiden. Neben den Dyp-Typ-Peroxidasen aus Basidiomyceten wurden inzwischen auch diverse aus Bakterien beschrieben (Hofrichter *et al.* 2010). Aus diesem Grund werden Dyp-Typ-Peroxidasen wiederum in phylogenetische Untergruppen A, B, C und D, entsprechend PeroxiBase⁶⁷, unterteilt (Colpa *et al.* 2013; Fawal *et al.* 2013). Dabei bestehen die Gruppen A-C vorwiegend aus bakteriellen Enzymen; die Gruppe D hingegen beinhaltet Enzyme aus Pilzen (Yoshida und Sugano 2015). Bislang wurden 7 Dyp-Typ-Peroxidasen aus Pilzen und 11 aus Bakterien gereinigt und charakterisiert (Linde *et al.* 2015b); MsP1 ist die erste aus der Familie der Schwindlingsverwandten. Für die zwei Enzyme BadDyP aus *Bjerkandera adusta* und AauDyP aus *Auricularia auricula-judae* wurden Kristallstrukturen ermittelt und umfassend untersucht (Kim und Shoda 1999a; Sugano *et al.* 2007; Yoshida *et al.* 2012; Liers *et al.* 2013b; Strittmatter *et al.* 2013; Liers *et al.* 2013a).

Bei den holzverarbeitenden Basidiomyceten kommen DyP-Gene deutlich häufiger in den sequenzierten Genomen von Weißfäulepilzen als in denen von Braunfäulepilzen vor (Floudas *et al.* 2012). Diese Tatsache – neben der Fähigkeit nicht-phenolische Ligninmodellsubstrate abzubauen (Liers *et al.* 2013b) – lässt einen möglichen Beitrag am Ligninabbau vermuten (Linde *et al.* 2015a). Ihre natürliche Funktion ist jedoch nach wie vor unklar (Yoshida und Sugano 2015). Kaur *et al.* (2010) berichten, dass die Transkription einer putativen DyP-Typ-Peroxidase aus *Halobacterium salinarum* durch oxidativen Stress induziert wird. Auf Grund der niedrigen Aktivität gegenüber Substraten mit hohem Redoxpotential ist nach Linde *et al.* (2015b) ein signifikanter Beitrag von DyP-Typ-Peroxidasen zum Ligninabbau unwahrscheinlich. Der oxidative Abbau von phenolischen Resten und die nachfolgenden Modifikationen lignin-basierter organischer Bausteine sind die wahrscheinlichsten Beiträge von DyP-Typ-Peroxidasen und anderen Peroxidasen mit niedrigem Redoxpotential zum Ligninmetabolismus (Linde *et al.* 2015b).

⁶⁷eine Peroxidase-Datenbank

4.3.1 Heterologe Expression der rekombinanten Peroxidase MsP1 in *Aspergillus niger*

Die rekombinante Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodoni* wurde bei der niederländischen Firma DSM (Delft) in *Aspergillus niger* erfolgreich überexprimiert und ist die erste heterolog exprimierte DyP-Typ-Peroxidase aus der Familie der Schwindlingsverwandten. Der Kulturüberstand enthielt durch Sekretion große Mengen an aktivem Enzym. Da dieser Kulturüberstand neben dem überexprimierten MsP1 noch andere Proteine und Substanzen – wie Medienbestandteile – enthielt, wurde für MsP1 eine geeignete Reinigungsmethode etabliert (s. 3.6.1, 3.6.6).

Die klassische DyP aus *Bjerkandera adusta*⁶⁸ (BadDyP) wurde in *Aspergillus oryzae* heterolog überexprimiert (rBadDyP), wodurch ebenfalls große Mengen an Enzym produziert werden konnten. Die Enzymlösung der heterolog exprimierten rBadDyP zeigte nach der Reinigung eine 42-fach höhere Aktivität gegenüber dem Substrat Reaktive Blue 5 ($8,0 \times 10^2 \text{ U L}^{-1}$) als die Enzymlösung der nativen BadDyP (Sugano *et al.* 2000).

Ein Vergleich zwischen der gereinigten heterolog exprimierten Peroxidase MsP1 und der nativen Peroxidase aus *Mycetinis scorodoni* gegenüber dem Substrat Reaktive Blue 5 ist nicht erfolgt. Jedoch zeigte MsP1 eine wesentlich höhere Aktivität gegenüber Reaktive Blue 5 ($8,2 \times 10^5 \text{ U L}^{-1}$) als rBadDyP. Demzufolge ist der Wirtsorganismus *Aspergillus niger* ideal zur Produktion hoher Mengen an aktivem MsP1 geeignet.

Die DyP-Typ-Peroxidase aus *Auricularia auricula-judae* (AauDyP) wurde in *Escherichia coli* erfolgreich überexprimiert. Die Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten der rekombinanten AauDyP unterschied sich im Vergleich zum nativen Enzym nicht (Linde *et al.* 2014).

4.3.1.1 Enzymreinigung - Vorversuche und *Scale up*

Der enzymhaltige Kulturüberstand von *Aspergillus niger* wurde mittels Macrosep[®]-Zentrifugationseinheiten vor der Reinigung mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa konzentriert. Dadurch wurden Proteine (Molekülmasse <10 kDa) und niedermolekulare Medienbestandteile, die im Kulturüberstand enthalten waren, abgetrennt und das Zielenzym MsP1 durch Volumenreduktion konzentriert. In Vorversuchen wurde anschließend die Anwendung einer Gelfiltrationschromatographie (GFC) untersucht; jedoch wurde diese Chromatographie auf Grund der niedrigen Kapazität der Säulen, deren Empfindlichkeit gegenüber zu hohen Drücken und auf Grund des hohen Zeitaufwandes (niedrige Flussraten) nicht angewendet. Bei der Verwendung von Säulen mit hydrophobem Packungsmaterial (HIC) wurde – trotz verschiedenster pH-Werte und Säulen – keine Bindung von MsP1 und somit keine Reinigung erzielt. Deshalb wurde eine Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (IEX) vorgenommen. Ein großer Vorteil der IEX-Säulen ist, dass auf diese große Probenvolumina aufgetragen werden können, die das Säulenvolumen um ein Mehrfaches übersteigen (Rehm 2002). Des Weiteren sind Ionenaustauschermaterialien relativ unempfindliche Materialien, die leicht zu reinigen und zu regenerieren sind.

⁶⁸ursprünglich als *Geotrichum candidum* Dec 1 bezeichnet

Aufbauend auf vorherigen Arbeiten (Scheibner 2006) wurde der Fokus bei der Auswahl der Säulen auf Anionentauscher gelegt. Ein Reinigungsschritt mittels Anionentauscher reichte jedoch nicht aus, um Fremdproteine vollständig abzutrennen. Somit erfolgte die Reinigung von MsP1 mittels einer Kombination zweier Anionentauscher. Zum Einsatz kamen eine DEAE-FF-Säule als schwacher Anionentauscher und eine Q-FF-Säule als starker Anionentauscher. Der konzentrierte Kulturüberstand wurde dabei in Anlehnung an die Arbeiten von Scheibner (2006) mit einem 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 6,0 auf die Säulen aufgetragen. Da für MsP1 aus *Mycetinis scorodoni* ein pI von 3,7 ermittelt worden ist (Scheibner 2006), wurde davon ausgegangen, dass die rekombinante Peroxidase einen ähnlichen pI aufweist. Bei der Verwendung von Anionentauschern sollte der pH-Wert des Startpuffers etwa eine pH-Einheit über dem pI des Zielenzymes liegen. Dadurch wird gewährleistet, dass das Zielenzym negativ geladen ist und an die Säule bindet, während Proteine mit einem höheren pI nicht gebunden werden. Die Kapazität der Säule wird so für das Zielenzym erhöht.

Da die Zugabe von NaCl zu keiner Inhibition der Enzymaktivität führte (Abb. 3.48), wurde das Zielprotein anschließend durch einen NaCl-Gradienten von der Säule eluiert. Eine große Herausforderung bei der Reinigung war die Abtrennung von Fremdproteinen mit ähnlichem Molekulargewicht und pI, welche sich als Bande unterhalb des Zielproteins zeigten (Abb. 3.52 B). Aus diesem Grund wurde anhand von Testläufen mit verschiedenen Salzgradienten der Gradient ermittelt, durch den die vollständige Abtrennung von Fremdproteinen erfolgte (Abb. 3.45).

Um größere Mengen des rekombinanten Zielenzym MsP1 zu reinigen, die für die Charakterisierung benötigt wurden, wurde eine Maßstabsvergrößerung vorgenommen. Die Beladung der Säule erfolgte dabei direkt über das Umschaltventil an Pumpe A. Als Säulen wurden eine präparative DEAE-FF-Säule (erste Reinigungsstufe) und eine Q-Sepharose-High-Performance-Säule (Q-HP, zweite Reinigungsstufe) verwendet. Die Elution erfolgte durch einen Salzgradienten, der an die Säulengröße angepasst wurde (Abb. 3.51). Durch den Einsatz der Q-HP-Säule, deren Säulenmaterial eine höhere Trennleistung aufweist als das Material der Q-FF-Säule aus den Vorversuchen, und durch die Anpassung des Salzgradienten an die Säulengröße, wurde bei der Maßstabsvergrößerung die gleiche Trennleistung erreicht wie bei den Vorversuchen (Abb. 3.52).

Der Kulturüberstand wurde bei dem *Scale up* mittels Ultrafiltration um den Faktor 2 konzentriert. Der Aktivitätsverlust betrug dabei 26,4% (Tab. 3.9). Mittels halbnativer SDS-PAGE (Abb. 3.52, Gel B und C) wurde die vollständige Trennung der im Kulturüberstand enthaltenen Proteine gezeigt. Die vereinten aktiven Q-HP-Fraktionen wiesen einzig das aktive Zielprotein MsP1 auf. Bei einer Anreicherung um das 3,85-fache betrug der Anteil des gereinigten Proteins am Gesamtprotein des Kulturüberstandes 4,8% (Tab. 3.9). Die Wiederfindung der Anfangsaktivität betrug 18,3%.

Die gereinigte Enzymlösung wurde aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, da unter diesen Bedingungen kein Aktivitätsverlust von MsP1 zu verzeichnen war (Abb. 3.49), unabhängig davon ob das Enzym erstmalig oder bereits mehrfach aufgetaut wurde.

Mit Hilfe der Reinigung wurden inaktive Fremdproteine mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 72 kDa erfolgreich abgetrennt (Abb. 3.52).

4.3.1.2 UV/Vis-Spektrum und Reinheitszahl

Das UV/Vis-Spektrum der gereinigten rekombinanten Peroxidase MsP1 zeigte neben einem Absorptionsmaximum bei 280 nm eine deutliche Absorption der Soret-Bande bei 406 nm und ein kleines Maximum bei 510 nm (Abb. 3.50). Häm-Proteine zeigen eine intensive Absorptionsbande bei ca. 400 nm (Soret-Bande), sowie zwei schwächere Banden bei ca. 530 und 550 nm, die durch das Porphyringerüst des Häms hervorgerufen werden (Lottspeich und Zorbas 2006). Neben DyP-Typ-Peroxidasen enthalten sowohl Mangan- als auch Ligninperoxidasen ein Häm als prosthetische Gruppe. Gold *et al.* (1989) beschrieben für diese Peroxidasen Absorptionsmaxima bei ca. 407, 502 und 632 nm. Die gemessenen Absorptionsmaxima zeigen, dass bei der Produktion von aktivem MsP1 mit Hilfe des Wirtsstammes *Aspergillus niger* kein exogenes Häm erforderlich ist. Die Reinheitszahl (RZ) der gereinigten Enzymlösung wurde nach Theorell und Maehly (1950) bestimmt und so – zusätzlich zur SDS-PAGE – die Effizienz der Reinigung überprüft. Die Reinheitszahl ist der Quotient aus den gemessenen Extinktionen bei den Wellenlängen 406 nm⁶⁹ (Soret-Bande) und 280 nm⁷⁰. Das Maximum bei 280 nm wird dabei durch absorbierende Reste bestimmter Aminosäuren (wie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) des Enzyms hervorgerufen. Die Reinheitszahl wurde durch die Reinigung von 0,3⁷¹ auf 3,2⁷² gesteigert, wodurch eine überaus erfolgreiche Abtrennung von Fremdenproteinen gezeigt wurde. Diese ist vergleichbar mit der für die Meerrettichperoxidase (HRP) beschriebene RZ von 3,1 (Nakane und Kawaoi 1974). Liers *et al.* (2013a) hingegen beschrieben für die DyP-Typ-Peroxidase rMscDyP⁷³ eine Reinheitszahl von 0,6, was auf eine unvollständige Reinigung dieser hinweist.

4.3.2 Bestimmung des Molekulargewichtes, der nativen Konformation des Enzyms und des Glykosylierungsgrades

Unter denaturierenden Bedingungen wurde für die rekombinante Peroxidase MsP1 ein Molekulargewicht von 72 kDa ermittelt (Abb. 3.52). Diese molare Masse liegt etwas über den molaren Massen anderer DyP-Typ-Peroxidasen, die typischerweise eine Molekülmasse von 40-67 kDa (bezogen auf ein Monomer) aufweisen (Hofrichter *et al.* 2010). Nach Kim und Shoda (1999a) hat die klassische DyP (BadDyP) ein Molekulargewicht von 60 kDa.

⁶⁹ spiegelt den Gehalt von Häm wider

⁷⁰ spiegelt den Proteingehalt wider

⁷¹ Kulturüberstand von *Aspergillus niger*

⁷² gereinigte Lösung der rekombinanten DyP-Type-Peroxidase MsP1

⁷³ alternative Bezeichnung für MsP1; ebenfalls gereinigt aus dem Kulturüberstand von *Aspergillus niger* (DSM, Delft)

Verglichen mit dem anhand der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht von 55 kDa, liegt das experimentell bestimmte Molekulargewicht (72 kDa) von MsP1 deutlich höher. Da es sich bei MsP1 um ein extrazelluläres Enzym handelt (Scheibner *et al.* 2008), ist vermutlich der Glykosylierungsgrad des Enzyms für diesen Unterschied verantwortlich. Die Glykosylierung ist charakteristisch für sekretierte Enzyme und schützt diese vor Proteolyse, erhöht ihre Wasserlöslichkeit und Stabilität und kann die Faltung des Proteins beeinflussen (Lis und Sharon 1993; Sugano *et al.* 2000; Rehm 2002; Varki *et al.* 2009). Allerdings scheint die Enzymaktivität unabhängig vom Glykosidierungsgrad zu sein, was anhand der klassischen DyP (BadDyP) gezeigt wurde (Sugano *et al.* 2000; Sugano *et al.* 2004). Auch bei einer Manganperoxidase (MnPH4) und zwei Ligninperoxidasen (LiPH2 und LiPH8) aus *P. chrysosporium* und anderen Enzymen hat die Glykosylierung keinen Effekt auf die Enzymaktivität (Nie *et al.* 1999; Lis und Sharon 1993).

Mit Hilfe von NetNGly 1.0 und NetOGly 3.1 wurden für die Peroxidase sieben potentielle N- und eine potentielle O-Glykosylierungsstelle ermittelt (Abb. 3.70, Abb. 3.72). Für die AauDyP wurden nur vier potentielle Glykosylierungsstellen ermittelt, von denen drei tatsächlich glykosyliert vorlagen (Strittmatter *et al.* 2013). Die Differenz der molaren Massen entspricht einem theoretischen Kohlenhydratgehalt von ca. 24%; die Gehalte anderer DyP-Typ-Peroxidasen liegen zwischen 9–31% (Hofrichter *et al.* 2010). Obwohl die Glykosylierung eines Enzyms von dem Expressionsorganismus abhängt, ist der berechnete Kohlenhydratgehalt des rekombinanten MsP1 aus *Aspergillus niger* (ca. 24%) vergleichbar mit dem des nativen Enzyms aus *Mycetinis scorodonius* (ca. 23%) (Scheibner 2006).

Das Molekulargewicht wurde zusätzlich unter nicht denaturierenden Bedingungen mittels nativer PAGE und Gelfiltrationschromatographie (GFC) untersucht. Dabei wurde für MsP1 ein Molekulargewicht von 142 kDa (native PAGE, Abb. 3.53) bzw. 145 kDa (GFC, Abb. 3.54) bestimmt. Dies entspricht dem doppelten Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen und deutet daraufhin, dass MsP1 als Quartärstruktur ein Dimer bildet. Für das native Enzym aus *Mycetinis scorodonius* wurde Gleiches beschrieben (Scheibner 2006).

Die klassische DyP (BadDyP) liegt als Monomer vor; für andere DyP-Typ-Peroxidasen hingegen werden eine Vielfalt⁷⁴ an höheren Quartärstrukturen berichtet (Sugano 2009). Sowohl Zubieta *et al.* (2007a) als auch Sugano (2009) vermuten, dass Sequenzinsertionen Einfluss auf die Quartärstruktur von Enzymen haben. Zubieta *et al.* (2007a) zeigten anhand von TyrA (Dimer) und BadDyP (Monomer)⁷⁵, dass Insertionen Änderungen in der dreidimensionalen Struktur der Enzyme hervorrufen, die vermutlich die Bildung von Dimeren verhindern bzw. die Bildung von Monomeren begünstigen. Sugano (2009) zeigte ebenfalls, dass die klassische DyP (BadDyP) Insertionen in der Aminosäuresequenz aufweist, die anderen DyP-Typ-Peroxidasen (Oligomere) fehlen. Jedoch weisen die Peroxidasen MsP1 und MsP2 aus *Mycetinis scorodonius*, die nachweislich als Dimere vorliegen (Scheibner *et al.* 2008), diese Insertionen auf. Aus diesem Grund beeinflusst die Sequen-

⁷⁴ von Dimere bis hin zu Hexameren

⁷⁵ durch Vergleiche der Aminosäuresequenzen sowie Sekundär- und Tertiärstrukturen

zinsertion nicht zwingend die Bildung der Quartärstruktur.

Im Gel (native PAGE) wurde MsP1 mittels Aktivitätsfärbung eindeutig nachgewiesen und identifiziert (Abb. 3.53B). Dies zeigt, dass die rekombinante Peroxidase MsP1 als Dimer vorliegt und in dieser nativen Form katalytisch aktiv ist. Daraufhin wurde die Aktivität des Monomers untersucht. Dazu wurde MsP1 sowohl mit SDS, als auch mit Harnstoff und Guanidiniumchlorid⁷⁶ behandelt, was zu einem vollständigen Verlust der Aktivität führte. Der Aktivitätsverlust wurde entweder durch die Denaturierung des Monomers oder durch die Trennung des Dimers in die Untereinheiten hervorgerufen.

Die Reinigung von MsP1 wurde sowohl mit denaturierender PAGE als auch mit halbnativer PAGE überprüft. Dabei zeigte sich, dass durch die Reinigung ein Fremdprotein mit einem Molekulargewicht von 72 kDa abgetrennt wurde. Dieses zeigte im Gel im Gegensatz zu MsP1 keinerlei Aktivität gegenüber ABTS (Abb. 3.52). Die Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und eine Sequenzanalyse⁷⁷ durchgeführt, um zu prüfen, ob es sich bei dem Protein tatsächlich um Fremdprotein handelt oder lediglich um das inaktive Monomer von MsP1. Diese Analyse brachte jedoch kein eindeutiges Ergebnis. Abschließend ist nicht geklärt, ob das Monomer von MsP1 katalytische Aktivität zeigt und ob bei der Reinigung lediglich dieses Monomer anstelle von Fremdproteinen abgetrennt wurde.

4.3.3 Bestimmung des isoeletrischen Punktes

Nach Hofrichter *et al.* (2010) weisen DyP-Typ-Peroxidasen typischerweise einen isoelektrischen Punkt im sauren Bereich (3,5-4,3) auf. Der experimentell bestimmte pI von MsP1 liegt ebenfalls in diesem Bereich (3,7; Abb. 3.55); der aus der Sequenz berechnete pI hingegen liegt bei 5,7. Die Bindung von Oligosacchariden an der Proteinoberfläche nimmt vermutlich Einfluss auf den pI, da die Glykosylierung an geladenen Aminosäuren erfolgt. Des Weiteren können die gebundenen Kohlenhydrate Ladungen auf der Oberfläche abdecken. Nach Johansson *et al.* (1993) können unterschiedliche Glykosylierungsmuster⁷⁸, die neben dem Grad der Glykosylierung vom Expressionsorganismus abhängen, Änderungen im pI hervorrufen. Trotz des unterschiedlichen Expressionsorganismus wurde für das native Enzym aus *Mycetinis scorodoni* auch ein pI von 3,7 ermittelt (Scheibner 2006).

⁷⁶Die Behandlungen mit Harnstoff und Guanidiniumchlorid wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Annika Kauschat durchgeführt.

⁷⁷im Ergebnisteil nicht aufgeführt

⁷⁸Art der Kohlenhydrate

4.3.4 Temperaturoptimum und -stabilität

MsP1 zeigte über einen Temperaturbereich von 50–65 °C eine hohe Aktivität; das Temperaturoptimum liegt jedoch bei 55 °C (Abb. 3.59). Das Optimum ist vergleichbar mit dem der AauDyP (Linde *et al.* 2014). Das Temperaturoptimum der klassischen DyP aus *Bjerkandera adusta* (BadDyP) hingegen liegt bei 30 °C (Kim und Shoda 1999a). Die Aktivität von MsP1 nahm erst ab einer Temperatur >65 °C rapide ab. Dies wurde ebenfalls in vorherigen Arbeiten beschrieben und ist mit der kontinuierlichen Entfaltung des Enzyms bei diesen Temperaturen zu erklären (Pühse *et al.* 2009). Auch AauDyp, PosDyP4⁷⁹ und IlaDyP wiesen bei Temperaturen zwischen 60–65 °C noch Aktivität auf (Linde *et al.* 2014; Fernández-Fueyo *et al.* 2015; Salvachúa *et al.* 2013); die meisten anderen Peroxidasen aus Basidiomyceten jedoch zeigen bei diesen hohen Temperaturen keine Aktivität mehr (Fernández-Fueyo *et al.* 2014).

Des Weiteren wurde die Stabilität von MsP1 in Abhängigkeit der Temperatur unter Reaktionsbedingungen untersucht (Abb. 3.65). Dazu wurde das rekombinante Enzym mit 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0 verdünnt und bei 0 °C, 24 °C, 40 °C und 55 °C für 24 h gelagert. Bei allen Temperaturen war MsP1 über einen Zeitraum von 4 h aktiv. Lediglich nach 24 h war eine Abnahme der Aktivität von 50–70% zu verzeichnen. Diese außerordentliche Thermostabilität ist mit dem hohen Kohlenhydratgehalt (24%) des Proteins zu erklären. Sugano *et al.* (2000, 2004) zeigten, dass die Enzymaktivität unabhängig vom Grad der Glykosylierung ist; die Thermostabilität hingegen wird durch den Glykosylierungsgrad beeinflusst. Insbesondere O-Glykosylierungen scheinen einen Einfluss auf die Thermostabilität von Enzymen zu haben (Lis und Sharon 1993; Nie *et al.* 1999). Für die native BadDyP und die rekombinante rBadDyP wurden ähnliche Thermostabilitäten gezeigt. Nach 2 h besaßen beide – sowohl bei 40 °C als auch bei 50 °C – noch 93% ihrer Ausgangsaktivität (Kim und Shoda 1999a).

Das Temperaturoptimum von MsP1 wurde mit Hilfe von zwei Substraten untersucht; sowohl ABTS als auch β -Carotin kamen zum Einsatz. Im β -Carotin-Assay zeigte MsP1 ein Optimum bei 30 °C (Abb. 3.59). Bei der Umsetzung der Xanthophylle Bixin und Annatto (Norbixin) zeigte die Peroxidase ebenfalls dieses Temperaturoptimum. Der Unterschied zu dem vorher beschriebenen Temperaturoptimum des Enzyms ist mit der geringeren Thermostabilitäten der natürlichen Farbstoffe β -Carotin, Bixin und Annatto zu erklären. Das Temperaturoptimum eines Enzyms ist unabhängig vom Substrat und gibt die Temperatur wieder, bei der das Enzym am effizientesten arbeitet. Sind die eingesetzten Substrate bei dieser Temperatur jedoch nicht stabil, verschiebt sich das Temperaturoptimum. Alle weiteren Substrate (Tab. 3.10) zeigten eine ausreichende Thermostabilität, so dass deren Umsetzung bei 55 °C erfolgte.

⁷⁹Isoenzym der PosDyP nach Fernández-Fueyo *et al.* 2015

4.3.5 Bestimmung des optimalen Puffersystems

Für die Umsetzung verschiedener Substrate mit MsP1 wurde dessen Aktivität in verschiedenen Puffersystemen untersucht:

- Citronensäure/ Na_2HPO_4 -Puffer nach McIlvaine (Zorn *et al.* 2003a)
- HCl/Glycin-Puffer
- Natriumacetat-Puffer (Scheibner 2006)
- Natriumtartrat-Puffer (Liers *et al.* 2010)

Um den Einfluss unterschiedlicher Salze zu betrachten, kamen zusätzlich ein Kaliumacetat-Puffer und ein Citronensäure/ K_2HPO_4 -Puffer zum Einsatz. Als Substrate wurden sowohl ABTS, als auch β -Carotin verwendet.

Die höchste Aktivität von MsP1 wurde in dem Natriumacetat-Puffer nachgewiesen, sowohl gegenüber dem Substrat ABTS als auch gegenüber β -Carotin (Abb. 3.56, 3.57). Die geringsten Aktivitäten wurden in dem HCl/Glycin-Puffer und dem Natriumtartrat-Puffer detektiert. Die Verwendung von Kalium- anstatt von Natriumsalzen hatte keine signifikante Auswirkung auf die Enzymaktivität. Infolgedessen wurden alle weiteren Untersuchungen im Natriumacetat-Puffer vorgenommen.

Weiterhin wurde die Stabilität von MsP1 in Abhängigkeit des Puffersystems unter Reaktionsbedingungen untersucht (Abb. 3.63, 3.64). Dazu wurde MsP1 sowohl in Natriumacetat-Puffer, als auch in McIlvaine-Puffer verdünnt und bei 4 °C gelagert. Die pH-Werte der Pufferlösungen variierten zwischen pH 2,0 und 5,5 bzw. 6,0. Während der Lagerung in Natriumacetat-Puffer war die Enzymaktivität über 4 h nahezu konstant; erst nach 24 h wurde ein signifikanter Aktivitätsverlust gemessen. Die höchste Stabilität zeigte MsP1 bei einem pH-Wert von 5,0; nach 24 h besaß MsP1 noch über 50% seiner Ausgangsaktivität. Bei der Lagerung in McIlvaine-Puffer hingegen nahm die Enzymaktivität schon nach 30 min ab. Besonders bei pH-Werten über 4,0 wurde ein hoher Aktivitätsverlust von MsP1 gegenüber ABTS verzeichnet. Vermutlich inaktivieren Bestandteile des McIlvaine-Puffers das Enzym.

Die Stabilität bei hohen pH-Werten (\geq pH 6) wird in der Literatur auch für andere DyP-Typ-Peroxidasen beschrieben (Fernández-Fueyo *et al.* 2015; Linde *et al.* 2014); die Stabilität bei geringen pH-Werten (\leq pH 2) nur für Einzelne (Liers *et al.* 2013b; Fernández-Fueyo *et al.* 2015).

Das pH-Profil von MsP1 zeigte, abhängig von den eingesetzten Substraten, Aktivitätsmaxima zwischen pH 2,5 und 4,5 (Tab. 4.1) und ist vergleichbar mit den pH-Profilen anderer DyP-Typ-Peroxidasen (PosDyP und AauDyP pH 3-4,5; Fernández-Fueyo *et al.* 2015; Linde *et al.* 2014). Eine Ausnahme dabei bildete das Substrat Annatto, für dessen Abbau ein pH-Optimum von 6,0 bestimmt wurde. Für das Substrat ABTS zeigte das pH-Profil ein eindeutiges Maximum bei pH 3,0 (Abb. 3.56). Für β -Carotin hingegen wurde über den gesamten pH-Bereich eine hohe Enzymaktivität gemessen; dennoch wurde ein Optimum bei einem pH-Wert von 3,5 detektiert (Abb. 3.57). Für die Umsetzung von Veratrylalkohol zeigte MsP1 ein pH-Optimum im sauren Bereich (2,5).

Liers *et al.* (2013b) beschreibt für die Umsetzung der Substrate Veratrylalkohol und Adlerol mit der Peroxidase AauDyP vergleichbare pH-Optima (pH 1,4-2,5). Auch das pH-Optimum für die Oxidation phenolischer Substrate ist entsprechend der in der Literatur aufgeführten Werte (pH 3,5-4,5; Liers *et al.* 2013b; Fernández-Fueyo *et al.* 2015).

Tabelle 4.1: Optimale Puffer und pH-Werte der Umsetzung der einzelnen Substrate durch MsP1

Substrat	Pufferstärke	Puffer	pH-Wert
Veratrylalkohol	100 mM	Natriumtartrat-Puffer	2,5
ABTS	300 mM	Natriumacetat-Puffer	3,0
β -Carotin	50 mM	Natriumacetat-Puffer	3,5
Bixin	50 mM	Natriumacetat-Puffer	3,5
Guajakol	50 mM	Natriumacetat-Puffer	3,5
2,6-Dimethoxyphenol	50 mM	Natriumacetat-Puffer	3,5
Reactive Blue 5	50 mM	Natriumacetat-Puffer	4,5
Reactive Black 5	50 mM	Natriumacetat-Puffer	4,5
Annatto	50 mM	Natriumacetat-Puffer	6,0

Lignin-, Mangan- und versatile Peroxidasen aus Pilzen (lignolytische Peroxidasen) weisen die höchste Aktivität im sauren Milieu auf (pH 1,5-5,0) (Camarero *et al.* 1999; Liers *et al.* 2010). Nach Liers *et al.* (2010) könnte eine hohe Stabilität unter sauren Bedingungen Voraussetzung für die Oxidation nicht-phenolischer Ligninstrukturen sein.

Abschließend wurde die Aktivität von MsP1 in Abhängigkeit der Pufferstärke untersucht. Die rekombinante Peroxidase MsP1 zeigte über einen großen Molaritätsbereich eine hohe Aktivität (Abb. 3.58). Diese Stabilität gegenüber Salzen bzw. der geringe Einfluss der Pufferstärke auf die Enzymaktivität wurde auch schon bei der Zugabe von Natriumchlorid beobachtet, die ebenfalls zu keiner Inhibition der Enzymaktivität führte (Abb. 3.48). Die Pufferkonzentrationen des verwendeten Natriumacetat-Puffers, bei denen die höchsten Aktivitäten von MsP1 gegenüber verschiedenen Substraten gemessen wurden, sind neben den pH-Optima in Tabelle 4.1 aufgeführt.

4.3.6 Lösungsmitteltoleranz

Die Toleranz von MsP1 gegenüber 30%igem Ethanol (in Wasser bzw. Puffer) wurde überprüft (Abb. 3.62). Nach 4 h war keine Abnahme der Aktivität zu verzeichnen; nach 24 h wurde ein Aktivitätsverlust von 60% gemessen. Somit sorgt der hohe Glykosylierungsgrad auch bei dem Einsatz von 30%igem Ethanol für eine Stabilisierung des Enzyms. Dies ist besonders für die Umsetzung von Ligninmodellsubstanzen von großem Vorteil, da diese in Lösungsmitteln gelöst werden. Weiterhin sind dadurch Einsätze bei der Verwertung von Reststoffströmen unter Verwendung von Lösungsmitteln denkbar.

4.3.7 Modell- und Sequenzanalyse der DyP-Typ-Peroxidase MsP1

Zur Identifizierung von katalytisch aktiven Aminosäureresten und konservierten Motiven, wurde die Aminosäuresequenz von MsP1 mit den Sequenzen verschiedener DyP-Typ-Peroxidasen verglichen und Homologien herausgearbeitet (Abb. 4.6). Die Zählung beim Vergleich der Aminosäuren erfolgte ausgehend vom reifen Protein.

In der Sequenz wurde neben konservierten Resten, die an der Bindung der prosthetischen Gruppe beteiligt sind (Strittmatter *et al.* 2013), das unter allen Mitgliedern der DyP-Typ-Peroxidase-Familie konservierte Strukturmotiv GxxDG identifiziert (Sugano 2009). Nach Sugano *et al.* (2007) spielen die distalen Reste D171 und R329 sowie der proximale Rest H308 der Häm-Umgebung eine essentielle Rolle für die Katalyse (Abb. 4.8; s. 4.3.7.2). Anhand des *Alignment* zeigte sich, dass die genannten Reste hoch konserviert sind. Bei MsP1 liegen diese an den Positionen D173, R333 und H310. Das proximal gelegene Glutamat E391 ist ebenfalls in die Katalyse involviert (Sugano *et al.* 2007). Bei AauDyP, PosDyP und MsP1 übernimmt jedoch ein Aspartatrest diese Funktion; bei MsP1 hat dieser Rest die Position 396. Nach Strittmatter *et al.* (2013) sind die Reste I170, A171, R255, R332, R332 und mehrere Wassermoleküle an der Koordination der prosthetischen Gruppe Häm durch Ausbildung von Wasserstoffrückenbindungen mit den Propansäureresten des Porphyringerüsts beteiligt. MsP1 zeigt ebenfalls vier dieser Reste: I175, R266, R317 und R333; der Alaninrest A171 ist durch ein Serin S176 ersetzt.

H164 und H166 (BadDyP) sind in vielen Sequenzen von DyP-Typ-Peroxidasen konserviert und werden als möglicher Häm-Ligand diskutiert (z.B. proximales Histidin) (Sugano 2009). In der Sequenz von MsP1 liegen sie an den Positionen 166 und 168. Nach Sugano *et al.* (2004) ist H166 für die Peroxidaseaktivität nicht von Bedeutung. H164 hingegen wurde ursprünglich als das proximale Histidin postuliert (Sato *et al.* 2004). Weiterführende Strukturanalysen ergaben jedoch, dass dieser Rest kein Ligand des Häms ist (Sugano *et al.* 2007). Sugano *et al.* (2004) zeigten, dass bei einem Austausch von H164 durch A164 sowohl die Aktivität, als auch die Häm-Bindung verloren gehen. Nach Faraco *et al.* (2007) deuten die Ergebnisse des Austausches auf eine Verringerung der Proteinstabilität und der Häm-Binde-Affinität hin. Nach Sugano (2009) spielt H164 eine wichtige Rolle für die Proteinfaltung oder die Häm-Bindung. In der Sequenz der DyP aus *Pleurotus ostreatus* ist H164 jedoch nicht konserviert; an dieser Stelle befindet sich ein Lysinrest (K). Dieser Austausch wird ebenfalls bei weiteren Vertretern der Dyp-Typ-Familie beschrieben (Faraco *et al.* 2007). Folglich ist die Funktion des Histidins H164 nicht abschließend geklärt.

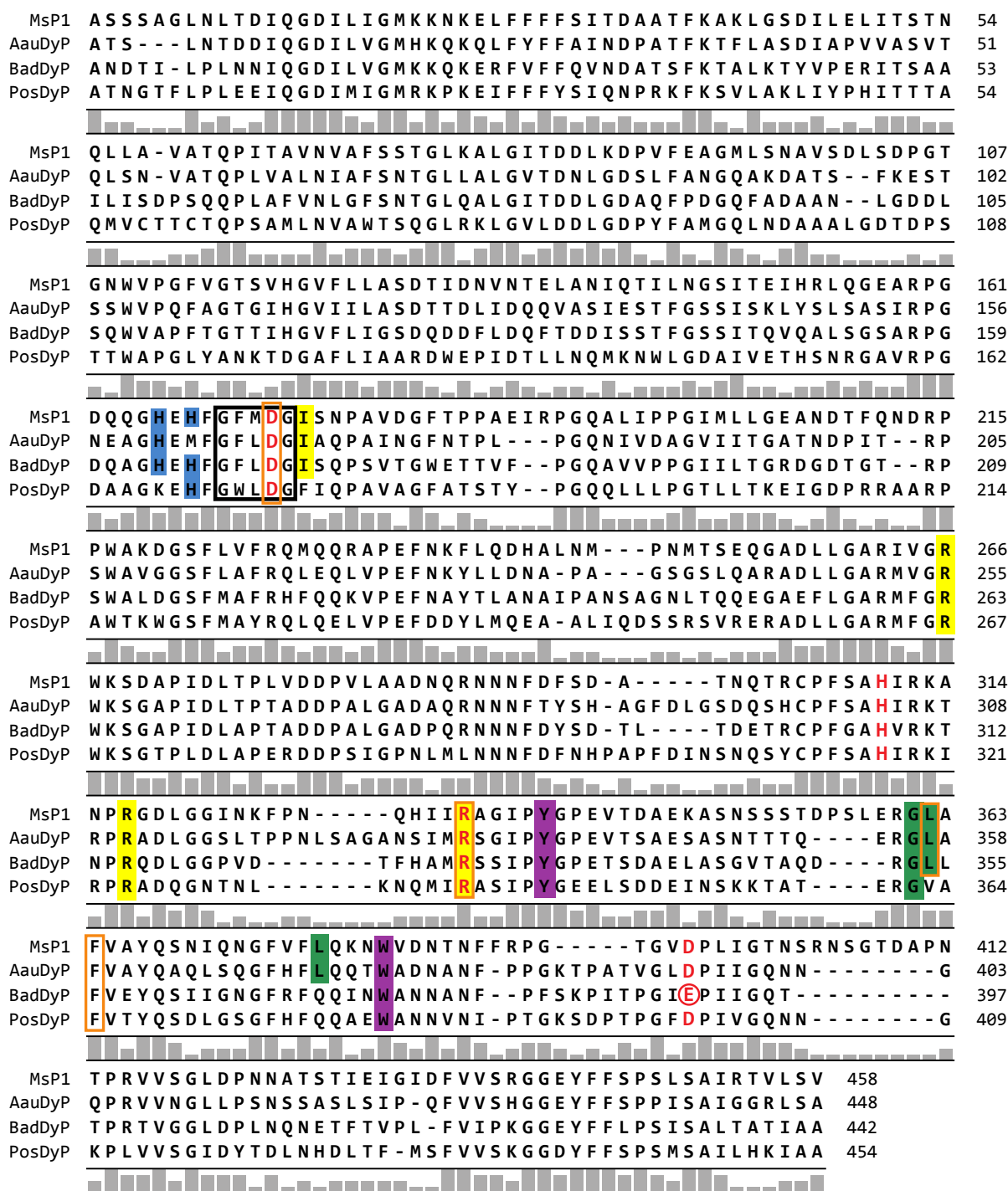


Abbildung 4.6: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener DyP-TyP-Peroxidasen aus *M. scorodoni* (MsP1, NCBI BOBK71), *A. auricula-judae* (AauDyP, NCBI AFJ79723), *B. adusta* (BadDyP, NCBI BAA77283, PDB-ID 3AFV) und *P. ostreatus* (PosDyP, NCBI CAK55151): vollständige ■: konservierte Aminosäuren; □: das charakteristische GxxDG-Motiv; ■: konservierte Histidin-Reste (H166 und H168); D173, H310, R333, D396: katalytisch aktive Aminosäuren; ○: E391; □: Reste der H₂O₂-Bindetasche; ■: potentiell an der Bindung der prosthetischen Gruppe Häm beteiligt durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Propansäureresten des Porphyringerüsts; ■: oberflächenexponierte Aminosäuren eines möglichen long range electron transfer (LRET); ■: am potentiellen LRET beteiligte Aminosäuren

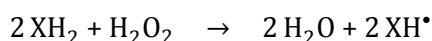
Die Manganbindestelle (bestehend aus drei Aminosäuren (Glu, Glu, Asp) und einem Propionat der Hämgruppe), die MnP und VP aufweisen (Ruiz-Dueñas *et al.* 2009; Banci *et al.* 2003), sind in der Sequenz von MsP1 nicht aufzufinden. Anhand der Kristallstruktur von AauDyP wurden Reste identifiziert (D84, L366, S367), die in Verbindung mit Wassermolekülen K^+ binden (Strittmatter *et al.* 2015). Die Bindestelle ist nicht vergleichbar mit der Stelle, die von Mn-bindenden DyP-Typ-Peroxidasen aus Bakterien berichtet wird. Dennoch wurde gezeigt, dass DyP-Typ-Peroxidasen aus Pilzen in der Lage sind Metallionen zu binden (Strittmatter *et al.* 2015). In der Sequenz von MsP1 sind die genannten Reste nicht konserviert. Nach Brown *et al.* (2012) wird die Mn-Bindestelle in einer bakteriellen DyP-Typ-Peroxidase durch die Reste E258, E273 und E284 gebildet. Auch diese Reste sind in der Sequenz von MsP1 nicht nachzuweisen.

4.3.7.1 Berechnung eines Strukturmodells für MsP1

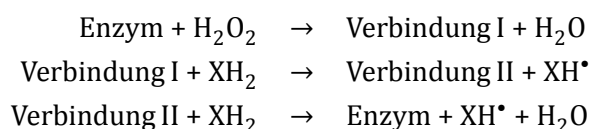
Mittels Röntgenstrukturanalyse wurden bisher zwei Strukturen von DyP-Typ-Peroxidasen aus Pilzen aufgeklärt: zum einen die der klassischen DyP aus *Bjerkandera adusta* (BadDyP; PDB-Code 3AFV) und zum anderen die Struktur einer DyP aus *Auricularia auricula-judae* (AauDyP; PDB-Code 4AU9). Mit dem Programm SWISS-MODEL wurde ein Strukturmodell von MsP1 in Homologie zur Röntgenkristallstruktur der BadDyP berechnet. Die Strukturen wiesen eine Homologie von 48% auf (Abb. 3.71), wodurch von einer ähnlichen Faltung beider Proteine ausgegangen werden konnte (Dill *et al.* 2008). Die berechnete 3D-Struktur der DyP-Typ Peroxidase MsP1 wurde mit Chimera visualisiert (Abb. 3.72). Das berechnete Strukturmodell weist 21 α -Helices und 7 β -Faltblattstrukturen auf. Weiterhin verfügt es über zwei Domänen, die das zentrale Häm umschließen: eine proximal gelegene N-terminale Domäne mit dem proximalen Histidin und eine distal gelegene C-terminale Domäne mit dem konservierten Arginin- und Aspartatrest. Beide Domänen besitzen eine viersträngige anti-parallele β -Faltblattstruktur, die zwischen α -Helices in einer Ferredoxin-ähnlichen Faltung liegt. Beide β -Faltblattstrukturen bilden gemeinsam das charakteristische β -barrel, welches das Häm flankiert. Dieses Motiv wurde bisher für keine andere Peroxidase beschrieben (Sugano *et al.* 2007; Zubieta *et al.* 2007b; Zubieta *et al.* 2007a). DyP-Typ-Peroxidasen unterscheiden sich somit stark von den klassischen Häm-Peroxidasen, die eine sehr α -helix-reiche Struktur aufweisen (Strittmatter *et al.* 2013).

4.3.7.2 Katalysemechanismus und Substratoxidationsstellen

Peroxidasen (EC 1.11.1) nutzen meist Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor, um die Oxidation unterschiedlichster Substrate zu katalysieren (Reaktionsgleichung 1 und 2). Der vermutete Reaktionsmechanismus von DyP-Typ-Peroxidasen aus Pilzen ist teilweise äquivalent zum Mechanismus anderer Peroxidasen (Verbindung I äquivalent); unterscheidet sich aber auch in wesentlichen Punkten (Sugano *et al.* 2007; Strittmatter *et al.* 2013). Beispielsweise wurde der Mechanismus der Bildung von Verbindung I um eine Konformationsänderung eines distalen Aspartatrestes erweitert (Yoshida *et al.* 2011). Des Weiteren wurde Verbindung II bisher für DyP-Typ-Peroxidasen nicht nachgewiesen (Hofrichter *et al.* 2010; Sugano *et al.* 2007).



Reaktionsgleichung 1: Enzymatische Oxidation von Substraten unter Verwendung von H_2O_2 als Elektronenakzeptor; XH_2 : Substratmolekül; XH^\bullet : korrespondierendes Substratradikal



Reaktionsgleichung 2: Typischer Katalysezyklus von Peroxidasen (Enzym) (Sugano 2009); Verbindung I: $(\text{Fe}^{4+}=\text{O})\text{Por}^{\bullet+}$; Verbindung II: $(\text{Fe}^{4+}=\text{O})\text{Por}$; XH_2 : Substratmolekül; XH^\bullet : korrespondierendes Substratradikal

Das als Co-Faktor benötigte Wasserstoffperoxid erreicht über einen trichterförmigen, größtenteils hydrophoben Kanal (*substrate access channel*) die kleine zylindrische H_2O_2 -Bindetasche, die bei der BadDyP von den Resten D171, R329, L354 und F356 gebildet wird (Sugano *et al.* 2007; Strittmatter *et al.* 2013). In der Aminosäuresequenz von MsP1 wurden diese Reste auch nachgewiesen (D173, R333, L362 und F364) (Abb. 4.7).

Die einzigartige Wasserstoffperoxid-Bindestelle von DyP-Typ-Peroxidasen unterscheidet sich von anderen Peroxidasen (Faraco *et al.* 2007). Die Neuordnung des Protons von H_2O_2 erfolgt über ein distales Aspartat (BadDyP D171; MsP1 D173; basischer Aminosäurerest); bei anderen Peroxidasen hingegen durch ein Histidin (Strittmatter *et al.* 2013). Das Aspart in der Häm-Höhle ist ein strukturelles Merkmal, das DyP-Typ-Peroxidasen mit bakteriellen Katalase-Peroxidasen gemeinsam haben (Liers *et al.* 2013b; Zámocký *et al.* 2009).

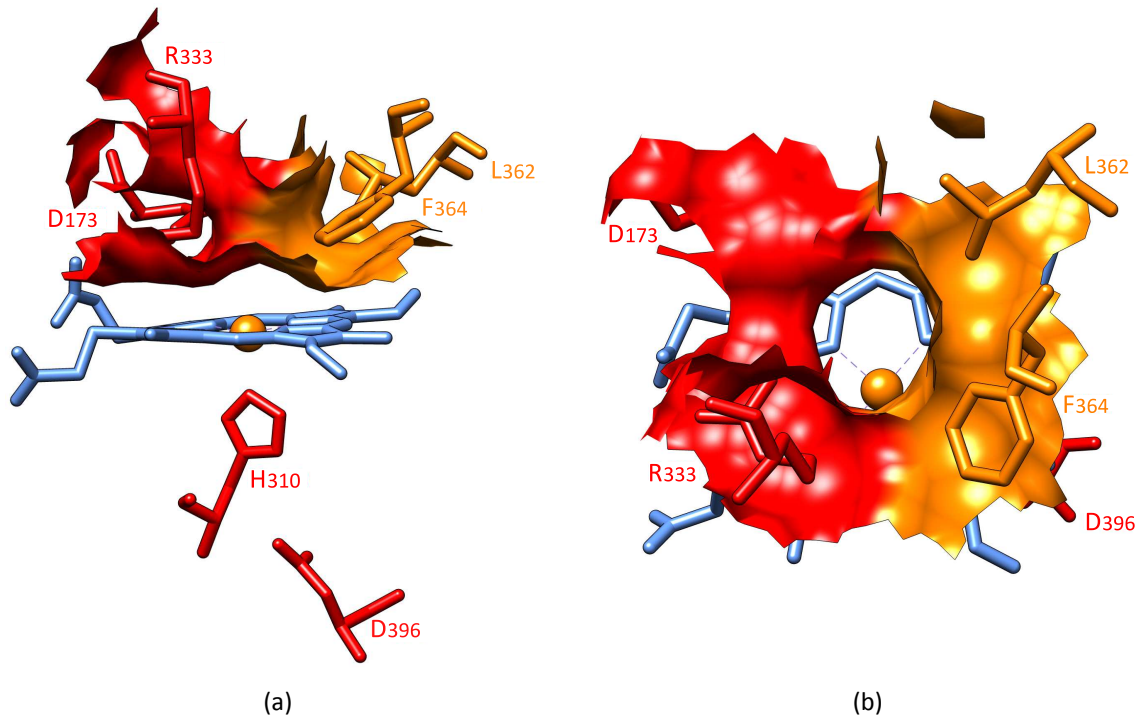



Abbildung 4.7: Darstellung der H₂O₂-Bindetasche von MsP1 (modifiziert nach Liers *et al.* 2013b); (a) und (b) stellen dabei verschiedene Ansichten dar: : prosthetische Gruppe Häm; D173, R333, L362, F364: an der Bildung der H₂O₂-Bindetasche beteiligte Reste; D173, H310, R333, D396: katalytisch aktive proximale und distale Reste der Häm-Umgebung

Nach Sugano *et al.* (2007) nimmt das Aspartat D171 (MsP1 D173) während der Katalyse ein Proton vom Sauerstoffatom des Wasserstoffperoxides auf und überträgt es auf das andere Sauerstoffatom, wodurch die O–O-Bindung heterolytisch gespalten und Wasser freigesetzt wird (Abb. 4.8). Dabei wird ein Elektron vom Eisen (Fe³⁺ wird zu Fe⁴⁺ oxidiert) und ein zweites vom Porphyrinring auf den verbleibenden Sauerstoff übertragen, wodurch die sogenannte Verbindung I der klassischen Peroxidasen (Porphyrin-Kation-Radikal mit einem Fe⁴⁺-Oxo-Intermediat) entsteht. Um das Proton von H₂O₂ aufnehmen zu können, ändert das Aspartat in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Position seiner Seitenkette hin zum Häm-Molekül. Nach der Bildung von Verbindung I schwingt die Seitenkette wieder in seine Ausgangsposition zurück (Yoshida *et al.* 2011). Nach Strittmatter *et al.* (2013) kann nur durch diese Konformationsänderung Verbindung I gebildet werden.

Der Argininrest (BadDyp R329; MsP1 R333) ist für die Katalyse ebenfalls essentiell (Strittmatter *et al.* 2013). Das Arginin nimmt nicht direkt am Prozess der Neuordnung teil, sondern koordiniert H₂O₂ durch Wasserstoffbrückenbindungen an der sechsten Koordinationsstelle des Fe³⁺ und stabilisiert anschließend die Verbindung I (Ladungsstabilisator). Das proximale Glutamat E391 der BadDyP bildet Wasserstoffbrückenbindungen zum fünften Ligand (BadDyP H308; MsP1 H310) des Häms aus und stabilisiert damit das Fe³⁺ und Fe⁴⁺. Dieser proximale Rest ist in den anderen DyP-

Typ-Peroxidasen durch ein Aspartat (MsP1 D396) ausgetauscht (Abb. 4.6).

Der Ausgangsoxidationszustand des Zentralatoms (Fe^{3+}) des Häms wird anschließend durch die schrittweise Aufnahme von zwei Elektronen von Substratmolekülen wieder hergestellt. Die dabei entstehende Verbindung II wurde für die DyP-Typ-Peroxidasen bisher nicht nachgewiesen; jedoch veröffentlichten Liers *et al.* (2013a) erste Informationen über einen zur Verbindung II möglicherweise vergleichbaren reaktiven Enzymzustand (DyP-Intermediat).

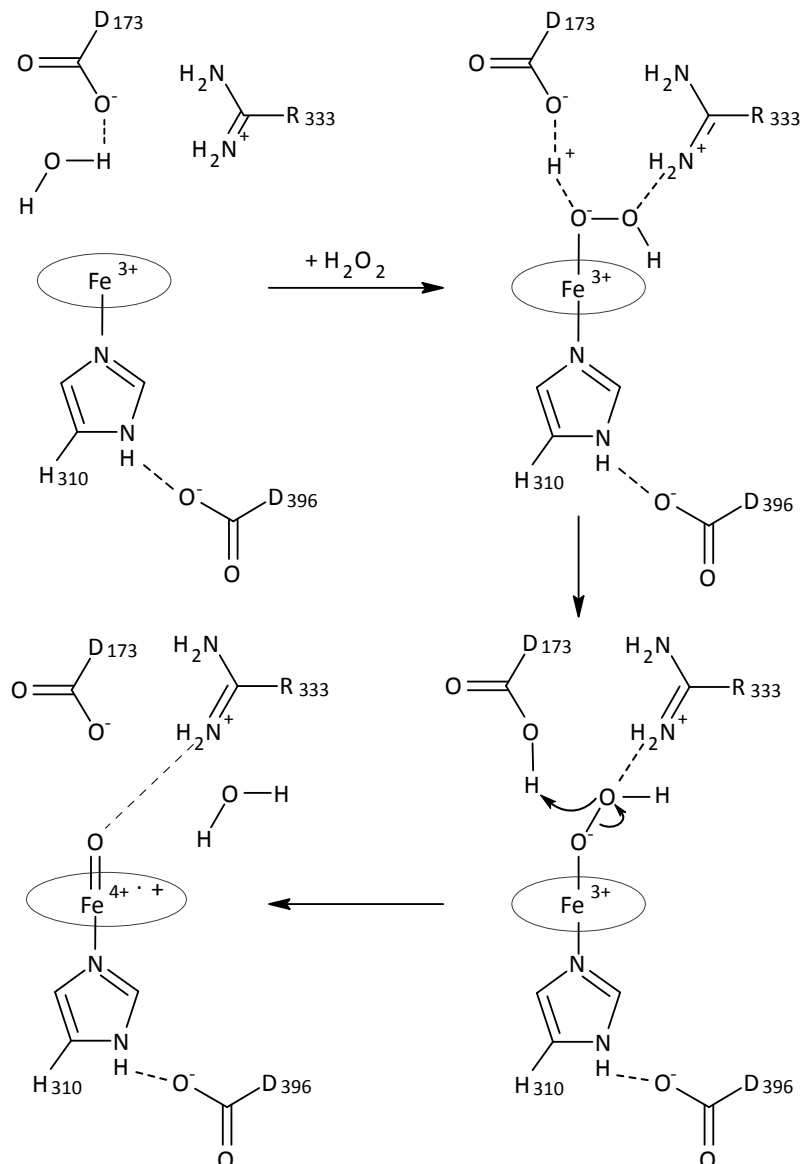


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung des Katalysemechanismus von MsP1 (modifiziert nach Sugano *et al.* 2007)

Nach Strittmatter *et al.* (2013) verändert der Schwingmechanismus vom Aspartat zusätzlich die Größe der Öffnung des Häm-Zugangskanals, so dass auch größere Moleküle als H_2O_2 (beispielsweise kleine organische Komponenten) passieren könnten. Somit würde das Aspartat als *gatekeeper* dienen, wodurch das Enzym in der Lage wäre, Substrate direkt in der Hämkavität zu oxidieren (Strittmatter *et al.* 2013). Berechnungen zeigten, dass Moleküle der Größe von Guajakol knapp in den Häm-Zugangskanal passen; jedoch ist der Großteil der Substrate von DyP-Typ-Peroxidasen beträchtlich größer als Guajakol (Strittmatter *et al.* 2013). Aus diesem Grund vermuten die Autoren oberflächenexponierte Substratinteraktionsstellen.

Durch Kristallisationsstudien von BadDyP mit dem Substrat 2,6-Dimethoxyphenol (DMP; ähnliche Größe wie Guajakol) identifizierten Yoshida *et al.* (2012) eine mögliche Substratbindestelle. DMP befand sich in einem zweiten Kanal in der Nähe des Häms und bildete Wasserstoffbrückenbindungen zu der Aminosäure N313, Wassermolekülen an der distalen Seite des Häms und dem Propionat aus (Abb. 4.9). Dieses Wasserstoffbrückennetzwerk war essentiell für den Elektronentransfer vom Substrat zum Häm.

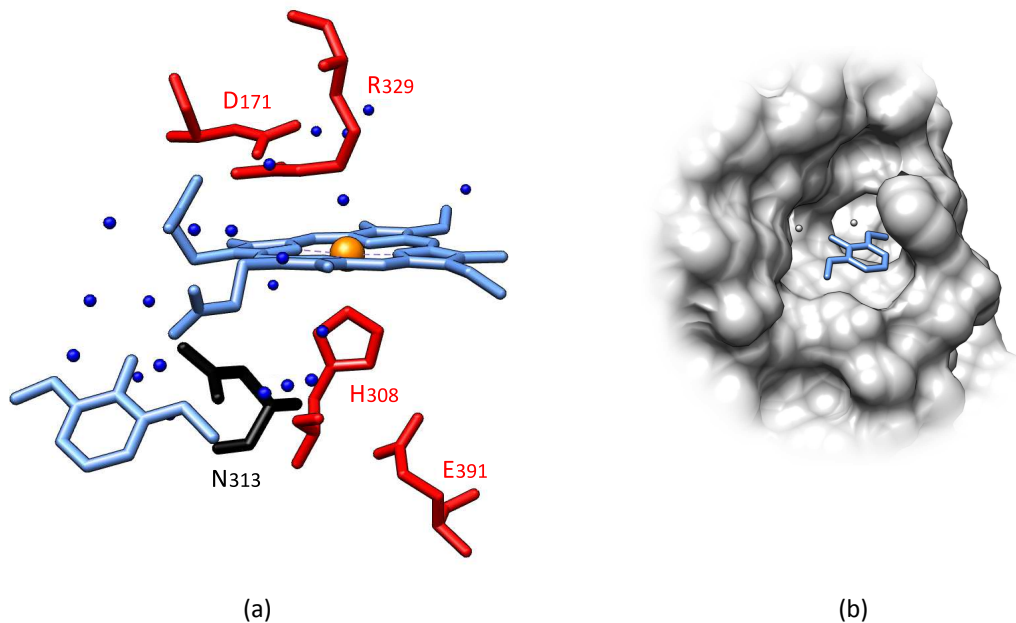


Abbildung 4.9: Darstellung der Substratbindetasche der BadDyP für DMP (modifiziert nach Yoshida *et al.* 2012)
 (a): Darstellung der Häm-Umgebung von BadDyP: : DMP-Molekül; : Wassermoleküle; : prosthetische Gruppe Häm; **D171, H308, R329** und **E391**: katalytisch aktive proximale und distale Reste der Häm-Umgebung; **N313**: am Elektronentransfer beteiligt
 (b): Ausschnitt der Proteinoberfläche von BadDyP, der die Substratbindetasche für DMP zeigt: : Proteinoberfläche; : DMP-Molekül

Allerdings sind diese Aminosäuren unter den verglichenen DyP-Typ Peroxidasen nicht konserviert (Abb. 4.6). Des Weiteren weist die Oberfläche von MsP1 keinen frei zugänglichen Kanal für 2,6-Dimethoxyphenol auf (Abb. 4.10). Auch bei der AauDyP ist dieser Kanal nicht vorhanden, da er durch eine Schleife verdeckt wird (Linde *et al.* 2015a).

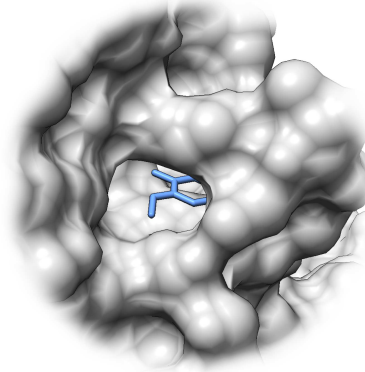




Abbildung 4.10: Darstellung der vergleichbaren Substratbindetasche für DMP bei MsP1 (modifiziert nach Yoshida *et al.* 2012): : Ausschnitt der Proteinoberfläche von MsP1; : DMP-Molekül

In weiterführenden Studien identifizierten Strittmatter *et al.* (2013, 2015) bei der DyP-Typ-Peroxidase AauDyP zwei Arten von Substratinteraktionsstellen. Strittmatter *et al.* (2015) zeigten, dass Azolderivate die sechste Koordinationsstelle des Häm der AauDyP besetzen können. Sie bewiesen damit die Fähigkeit von DyP-Typ-Peroxidasen, kleine organische Moleküle in der Häm-Tasche zu binden.

Diese Fähigkeit hängt direkt mit der Form des Häm-Kanals (*heme access channel*) zusammen. Bezogen auf die Dimension weist AauDyP einen ähnlichen Kanal wie Cytochrome P450 und unspezifische Peroxygenasen (UPOs) auf, die die direkte Oxidation von Substraten am Häm katalysieren. Die Form des Häm-Zugangskanals der AauDyP, insbesondere bezogen auf die Größe und Lage zum Häm, gleicht größtenteils der unspezifische Peroxygenasen aus *Agrocybe aegerita* (AaeUPO). Beide zeigen Zugangskanäle, die annähernd rechtwinklig zur Ebene der prosthetischen Gruppe stehen. Jedoch zeigt die AauDyP im Vergleich zur AaeUPO eine Verengung des Kanals, einen sogenannten „Flaschenhals“. Ligninperoxidasen und versatile Peroxidasen weisen hingegen kurze, spitz zulaufende und seitlich gelegene Zugangskanäle mit kleinen Bindetaschen auf. Dadurch sind sie nicht in der Lage größere Moleküle als Wasserstoffperoxid in der Häm-Tasche zu binden. AauDyP und AaeUPO haben dafür hingegen genügend Platz.

Weiterhin besitzen DyP-Typ-Peroxidasen und UPOs funktional identische Säure-Base-Paare bestehend aus dem Guanidinrest eines Arginins und der Carboxylatgruppe eines Aspartats oder Glutamats (Strittmatter *et al.* 2015). Infolgedessen würde es die Autoren nicht überraschen, wenn die Funktionalität der AauDyP durch eine Erweiterung des „Flaschenhalses“ des Häm-Kanals durch Mutation zu einer Peroxygenase hin verändert werden würde.

Die zweite Art von Substratinteraktionsstellen sind oberflächenexponierte redoxaktive Aminosäuren, die auch andere Häm-Peroxidasen wie Lignin- und versatile Peroxidasen aufweisen (Strittmatter *et al.* 2015).

Liers *et al.* (2013a) und Strittmatter *et al.* (2013) identifizierten potentielle *long range electron transfers* (LRET-Übertragungswege) bei der DyP-Typ-Peroxidase aus *Auricularia auricula-judae*. Dabei interagieren die Substrate mit oberflächenexponierten Bindestellen (lösungsmittel-exponierte Substratbindestellen) und Elektronen werden durch einen Langstreckentransfer von der Oberfläche bis hin zum Häm übertragen. Elektronenreiche aromatische Aminosäuren wie Tryptophan und Tyrosin an der Proteinoberfläche dienen dabei als Oxidationsstellen. Saure Seitenketten (AauDyp E354; MsP1 E359) in deren Umgebung stabilisieren die entstehenden Radikationen (Strittmatter *et al.* 2013).

Um die Substrate an der oberflächenexponierten Oxidationsstelle zu halten und einen effizienten Elektronentransfer zu gewährleisten, gehen Strittmatter *et al.* (2015) von einem Sulfat/Sulfonat-„Anker“-Motiv aus; alle Farbstoffe, die von DyP-Typ-Peroxidasen umgesetzt werden, weisen mindestens eine Sulfat- oder Sulfonatgruppe auf. Die Aminosäuren, die bei AauDyp als „Anker“-Motiv identifiziert wurden, sind nicht konserviert (Abb. 4.6). Demzufolge stellen sie keine universelle Substratbindestelle dar. Dennoch können mit Sulfat- sowie Sulfonatgruppen ausgezeichnet Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Aus diesem Grund vermuten Strittmatter *et al.* (2015), dass auch andere DyP-Typ-Peroxidasen die Substrate auf diese Weise an der Oxidationsstelle fixieren.

Auf der Oberfläche der AauDyp wurden sieben Tyrosine und vier Tryptophane identifiziert; der Mittelwert bei DyP-Typ-Peroxidasen aus Basidiomyceten liegt bei 8,8 Tyrosin- und 5,7 Tryptophanresten pro Proteinmolekül (Linde *et al.* 2015b). Ein LRET-Übertragungsweg bei der AauDyp verläuft vom Y337⁸⁰, das bei DyP-Typ-Peroxidasen aus Pilzen und Bakterien hoch konserviert ist, über L357 zum Häm (Liers *et al.* 2013a, Strittmatter *et al.* 2013, Linde *et al.* 2014, Strittmatter *et al.* 2015, Linde *et al.* 2015a). MsP1 weist diesen möglichen LRET-Übertragungsweg (Y338 über G361 und L362 zum Häm) ebenfalls auf (Abb. 4.11).

⁸⁰Zählung ausgehen vom reifen Protein

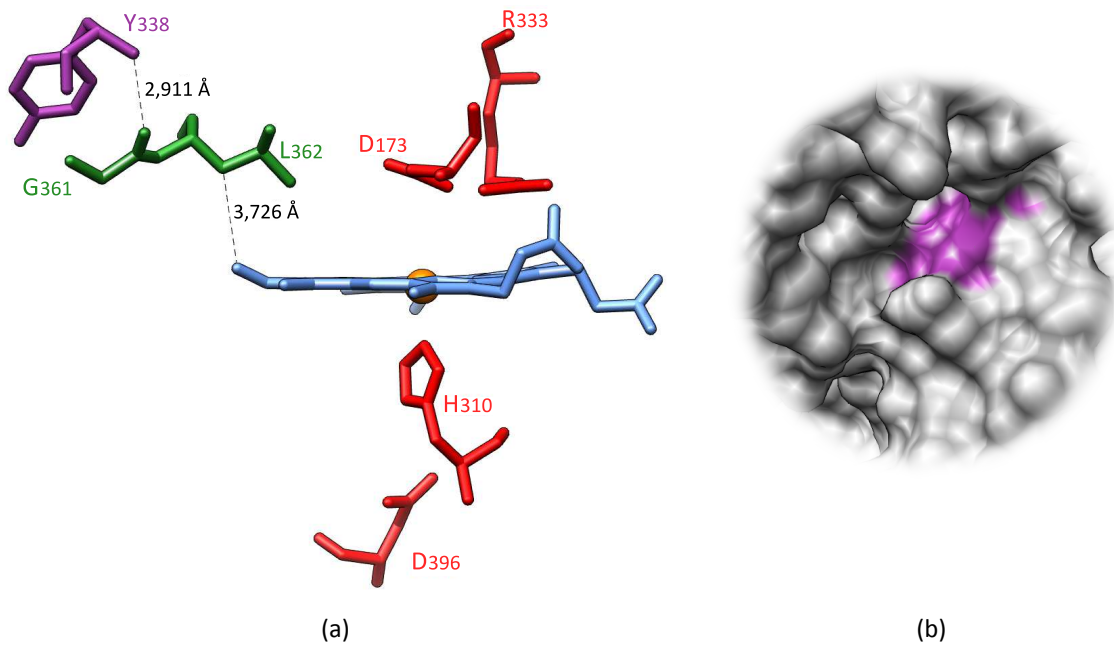



Abbildung 4.11: Darstellung des möglichen LRET-Übertragungsweges bei MsP1 (modifiziert nach Liers *et al.* 2013a)

- (a): : prosthetische Gruppe Häm; **D173**, **H310**, **R333** und **D396**: katalytisch aktive proximale und distale Reste der Häm-Umgebung; **Y338**, **G361** und **L362**: am LRET beteiligte Aminosäuren
 (b): Ausschnitt der Proteinoberfläche von MsP1; lila markiert ist dabei die oberflächenexponierte Aminosäure **Y338**

Ein weiterer, kurzer Elektronentransfer verläuft bei der AauDyp über das Tryptophan W377 über Threonin T308 zum Häm (Liers *et al.* 2013a, Strittmatter *et al.* 2013, Linde *et al.* 2014, Strittmatter *et al.* 2015, Linde *et al.* 2015a). MsP1 weist diesen möglichen kurzen LRET-Übertragungsweg (W382 über L378 zum Häm) ebenfalls auf (Abb. 4.12). Jedoch ist bei MsP1 das Threonin gegen ein Leucin ausgetauscht.

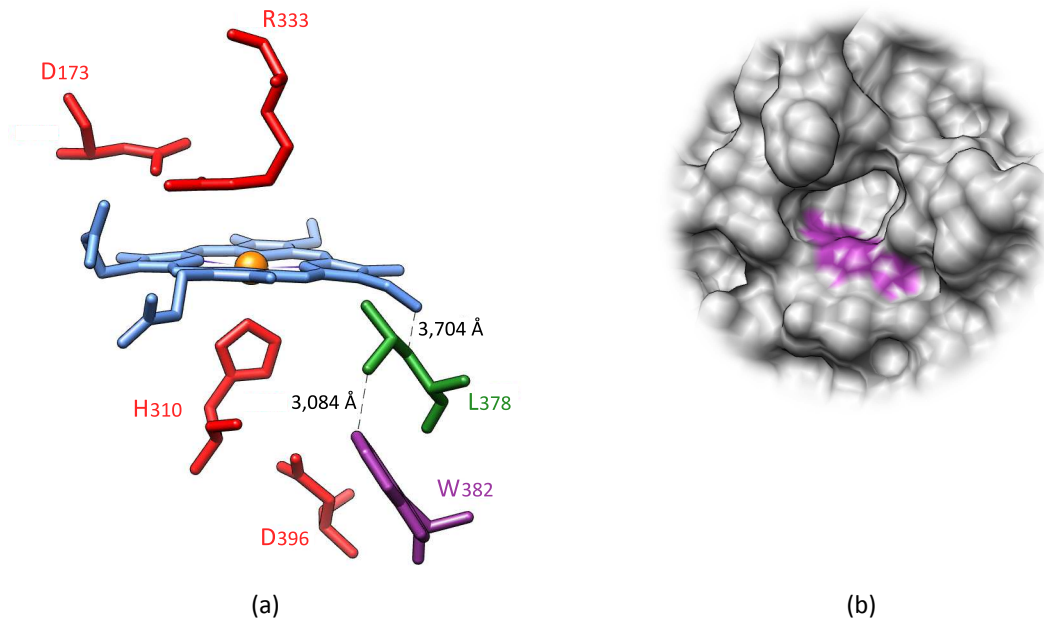


Abbildung 4.12: Darstellung des möglichen kurzen LRET-Übertragungsweges bei MsP1 (modifiziert nach Liers *et al.* 2013a)

- (a): : prosthetische Gruppe Häm; **D173**, **H310**, **R333** und **D396**: katalytisch aktive proximale und distale Reste der Häm-Umgebung; **W382** und **L378**: am LRET beteiligte Aminosäuren
 (b): Ausschnitt der Proteinoberfläche von MsP1; lila markiert ist dabei die oberflächenexponierte Aminosäure **W382**

Linde *et al.* (2015a) zeigten, dass der bevorzugte LRET-Übertragungsweg bei der Aminosäure Tryptophan W377 beginnt. Andere LRET - wie beispielsweise der über die Aminosäure Y338 - haben nur einen geringen Anteil an der Katalyse.

4.3.8 Ermittlung der Kristallstruktur von MsP1

Das gereinigte MsP1 wurde zur Kristallisation und anschließender Röntgenstrukturanalyse an den Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Becker (Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen) gegeben. Die Kristallisation war erfolgreich und die Untersuchung der 3-dimensionalen Struktur von MsP1 mittels Röntgenstrukturanalyse erfolgte. Anhand von Vergleichen mit anderen DyP-Typ-Peroxidasen wurden Aminosäurereste nahe dem aktiven Zentrum herausgesucht, die möglicherweise eine hydrophobe Tasche bilden und die Enzymaktivität regulieren. Mit Hilfe von Mutagenesestudien sollen die Funktionen dieser Aminosäurereste bei der Umsetzung von β -Carotin und ABTS gezeigt werden (Pretzel *et al.* 2012).

4.3.9 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Enzymaktivität

Alle Häm-Peroxidasen werden bei Abwesenheit reduzierender Substrate von Wasserstoffperoxid deaktiviert (Linde *et al.* 2014); die Toleranz von Peroxidasen gegenüber H_2O_2 ist jedoch unterschiedlich hoch (Khosraneh *et al.* 2007; Gil-Rodríguez *et al.* 2008). Nach Valderrama und Vazquez-Duhalt (2005) ist die Deaktivierung des Enzyms durch Peroxide auf den Verlust der Eisenkoordination, die Destruktion des Häms oder auf die Bildung von Proteinaggregaten zurückzuführen. Arnao *et al.* (1990b) beschreiben eine „Selbstmord-Inaktivierung“ von klassischen Peroxidasen durch Wasserstoffperoxid.

Aber auch in Gegenwart reduzierender Substrate werden Peroxidasen durch H_2O_2 deaktiviert. Arnao *et al.* (1990a) untersuchten dazu die Inaktivierung einer Meerrettichperoxidase durch Wasserstoffperoxid in Gegenwart reduzierender Substrate und die mögliche Schutzfunktion dieser Substrate. Baynton *et al.* (1994) untersuchten die Kinetik der Inaktivierung der Meerrettichperoxidase durch H_2O_2 in Anwesenheit von Phenolen.

Sowohl der ABTS-Assay, als auch der β -Carotin-Assay wurden mit MsP1 unter Zugabe von verschiedenen Mengen an H_2O_2 durchgeführt. Bei einem Zusatz von 0,125 mM H_2O_2 war die Peroxidaseaktivität von MsP1 gegenüber den Substraten am höchsten. Sowohl niedrigere, als auch höhere Konzentrationen an Wasserstoffperoxid limitierten den Umsatz von ABTS und β -Carotin (Abb. 3.60, 3.67). Bei einem zu großen Überschuss an Wasserstoffperoxid wird die Peroxidase gehemmt; bei einer zu niedrigen Konzentration an H_2O_2 hingegen ist nicht genügend Wasserstoffperoxid vorhanden, um die maximale Aktivität zu erreichen. Für die Umsetzung der anderen untersuchten Substrate wurden entsprechende Ergebnisse erhalten.

Nach Dequaire *et al.* (2002) hängt der Grad der Inhibierung von der Wasserstoffperoxidkonzentration ab. Bei sehr hohen H_2O_2 -Konzentrationen bzw. einem zu großen Überschuss an H_2O_2 im Vergleich zum Substrat tritt eine irreversible Inaktivierung des Enzyms auf. Dabei reagiert vermehrt H_2O_2 anstelle des Substrates mit Verbindung I (Reaktionsgleichung 2) zu einer inaktiven Verdo-Häm-Form des Proteins. Bei der reversiblen Inhibierung reagiert H_2O_2 mit Verbindung II (Reaktionsgleichung 2) zu einer sogenannten Oxyperoxidase-Form des Enzyms (Verbindung III; Struktur ähnlich zu Oxyhämoglobin). Durch verschiedene Elektronendonatoren kann Verbindung III wieder zu Verbindung I reduziert werden, wodurch das Enzym im katalytischen Zyklus verbleibt. Die unterschiedlichen Elektronendonatoren reduzieren Verbindung III jedoch verschieden effizient. Abhängig vom pH-Wert und der Temperatur konvertiert Verbindung III allerdings auch durch spontanen Zerfall in den Grundzustand des Enzyms zurück (Dequaire *et al.* 2002). Ob die Inaktivierung von DyP-Typ-Peroxidasen durch H_2O_2 auf gleiche Weise verläuft, ist noch nicht geklärt. Um einen Überschuss an Wasserstoffperoxid zu vermeiden, werden Peroxidasen in der Natur durch andere Enzyme, wie beispielsweise Arylalkohloxidasen, mit dem Cofaktor versorgt.

Kim und Shoda (1999a) zeigten, dass die Toleranz der BadDyP gegenüber Wasserstoffperoxid vom Substrat und der Konzentration des Enzyms abhängen. Wasserstoffperoxid (Co-Substrat) und Substrat konkurrieren miteinander um die Bindung am Enzym, wodurch die K_m -Werte des Enzyms zu beiden Substraten eine Rolle bei der Inhibierung spielen dürften. Dies wurde ebenfalls für MsP1 gezeigt. Folglich wurden für die Umsetzung aller Substrate durch MsP1 die optimalen Wasserstoffperoxid- und Enzymkonzentrationen bestimmt.

4.3.10 Einfluss von Sauerstoff auf die Enzymaktivität

MsP1 oxidiert β -Carotin auch in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid, wobei die Enzymaktivität durch die Zugabe von H_2O_2 signifikant gesteigert werden kann (Abb. 3.60). Dies wurde von Scheibner (2006) auch für das native Enzym MsP1 aus *Mycetinis scorodoni* gezeigt.

Der Reaktionsansatz des Enzym-Assays kann durch den Zusatz der β -Carotin-Substratlösung und dem darin enthaltenen Emulgator Tween[®] 80 zwar geringe Mengen an Wasserstoffperoxid enthalten (s. 3.7.7.1), jedoch wäre der Umsatz von β -Carotin durch MsP1 schon nach kurzer Zeit durch das Aufbrauchen des vorhandenen H_2O_2 beendet gewesen. Die Reaktion verlief hingegen über eine Dauer von nahezu einer Stunde.

Des Weiteren wurde die Enzymaktivität gegenüber β -Carotin durch die Anreicherung des Reaktionspuffers mit Sauerstoff um den Faktor 2,3 gesteigert (Abb. 3.61). Dahingegen führte die Entgasung des Puffers und somit die Abreicherung von Sauerstoff zu einem fast vollständigen Verlust der Aktivität. Demzufolge ist die Oxidation von β -Carotin durch MsP1 direkt vom Gehalt an Sauerstoff in Form von O_2 abhängig. Brown *et al.* (2012) beschreiben eine H_2O_2 -unabhängige oxidative Decarboxylierung von 4-Methoxymandelsäure durch eine DyP-Typ-Peroxidase aus *Amycolatopsis* sp. in Gegenwart von Sauerstoff. Die Oxidasefunktion der DyP-Typ-Peroxidase aus dem Lignin-reaktiven Bakterium ist zusätzlich abhängig von Mn^{2+} . Nach den Autoren reicht die Zugabe von Mn^{2+} jedoch nicht aus, um das Fe^{3+} des Häms zu Fe^{2+} reduzieren, welches klassischerweise mit dem Sauerstoff reagieren würde. Nach Brown *et al.* (2012) ist somit ein komplexer Katalysemechanismus notwendig, wie er auch schon für andere Peroxidasen beschrieben worden ist (Yamazaki und Piette 1963; Paszczyński *et al.* 1986). Die Umsetzung von β -Carotin durch MsP1 in Gegenwart von Sauerstoff verläuft hingegen ohne den Zusatz von Mn^{2+} .

Adak *et al.* (1998) beschreiben für eine Meerrettichperoxidase den Mechanismus der Oxidation von Epinephrin ohne Zusatz von Wasserstoffperoxid unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff. Nach den Autoren wird das Fe^{3+} des Häms zunächst zu Fe^{2+} unter Bildung eines Substratradikals reduziert. Das Fe^{2+} -Enzym reagiert anschließend mit molekularem Sauerstoff unter Bildung von Verbindung III. Diese Verbindung wird unter Bildung eines Hyperoxids $O_2^{\bullet-}$ wieder zum nativen Enzym oxidiert. Das entstandene $O_2^{\bullet-}$ reagiert mit dem Substratradikal unter Bildung von Wasserstoffperoxid, welches anschließend für die Durchführung der üblichen Peroxidasereaktion verwendet werden kann. Phenole wie beispielsweise Guajacol weisen hohe Standardpotentiale

von etwa 900 mV (gegen NWE) auf und können von der Meerrettichperoxidase nur in Gegenwart von Wasserstoffperoxid umgesetzt werden (Adak *et al.* 1998; Hauser und Olsen 1998). Das Standardpotential von Epinephrin hingegen liegt bei etwa 150-300 mV (gegen NWE). Adak *et al.* (1998) führen die Fähigkeit der Meerrettichperoxidase Epinephrin durch molekularen Sauerstoff zu oxidieren auf das vergleichsweise niedrige Standardpotential des Substrates zurück.

Nach Martin *et al.* (1999) liegt das Standardpotential für eine Ein-Elektronen-Oxidation von β -Carotin bei 650-780 mV (gegen NWE) und somit nur knapp unter den Standardpotentialen von Phenolen. Somit kann der O_2 -abhängige Abbau von β -Carotin durch MsP1 nicht einzig durch das Standardpotential des Substrates erklärt werden. Jedoch weisen DyP-Typ-Peroxidasen mehrere Oxidationsstellen auf, sowohl auf der Proteinoberfläche, als auch nahe des aktiven Zentrums. Vermutlich bindet β -Carotin auf Grund seiner Struktur an einer anderen Oxidationsstelle als Phenole. Auch wenn der Katalysemechanismus der Oxidasefunktion von DyP-Typ-Peroxidasen noch nicht geklärt ist, erweitert diese Funktion deren Substratspektrum und ermöglicht die Reaktion mit komplexeren Substraten (Brown *et al.* 2012).

4.3.11 Ermittlung des Substratspektrums und der kinetischen Parameter

Die vier Peroxidasefamilien (DyP-Typ-Peroxidasen (DyPs), Manganperoxidasen (MnPs), Ligninperoxidasen (LiPs) und versatile Peroxidasen (VPs)) unterscheiden sich in ihren katalytischen Eigenschaften, auch wenn sie alle ABTS, einen Farbstoff mit niedrigem Redoxpotential, effizient oxidieren können (Fernández-Fueyo *et al.* 2015). Um die katalytischen Eigenschaften von MsP1 mit anderen DyP-Typ-Peroxidasen und lignolytischen Peroxidasen (LiP, VP, MnP) zu vergleichen, wurden unterschiedlichste Substrate umgesetzt (Tab. 3.10) und die katalytischen Konstanten bestimmt (Tab. 3.12, Tab. 3.13).

MsP1 wies die höchste Affinität ($K_m = 15,8 \mu\text{M}$) zu dem Substrat ABTS auf und setzte dieses mit einer katalytischen Effizienz von $6,3 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ um. Diese ist 3,5-fach höher als die katalytischen Effizienz der AauDyP ($1,8 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; Linde *et al.* (2014)) und sogar 8-fach höher als die der DyP-Typ-Peroxidase aus *Irpex lacteus* ($8,0 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; Salvachúa *et al.* (2013)). Die Affinität von MsP1 zu ABTS ist vergleichbar zur der Affinität einer versatilen Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus* (Pleos-VP2: $K_m = 12,0 \mu\text{M}$); dennoch liegt die katal. Effizienz der VP nur bei $7,2 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Fernández-Fueyo *et al.* 2015). Linde *et al.* (2014) beschreiben ebenfalls, dass die katalytische Effizienz der DyP-Typ-Peroxidasen für ABTS gleich oder sogar höher ist als die anderer lignolytischer Peroxidasen aus Pilzen, eingeschlossen LiPs aus *P. chrysosporium* und *C. subvermispora*, VPs aus *P. eryngii* und *P. ostreatus*, sowie MnPs aus *P. ostreatus*.

Reactive Blue 5 wurde von MsP1 mit einer Affinität von $32,6 \mu\text{M}$ gebunden und mit einer katalytischen Effizienz von $7,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ umgesetzt. Reactive Blue 5 ist ein Anthrachinonfarbstoff und wird als ein charakteristisches Substrat für DyP-Typ-Peroxidasen beschrieben (Kim *et al.* 1995). Die ermittelten katalytischen Konstanten sind vergleichbar zu denen von anderen in der

Literatur beschrieben DyP-Typ-Peroxidasen (BadDyP: $K_m = 54,0 \mu\text{M}$, Effizienz = $4,8 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, Kim und Shoda (1999a); AauDyP: $K_m = 23,0 \mu\text{M}$, Effizienz = $5,0 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, Liers *et al.* (2010)). Nach Liers *et al.* (2013b) ist Reactive Blue 5 kein exklusives Substrat von DyP-Typ-Peroxidasen und laut den Autoren scheint dessen Umsetzung nicht mit dem Redoxpotential des Enzyms zu korrelieren. So zeigt eine Peroxidase aus *C. cinerea* (CiP) mit niedrigem Redoxpotential eine überraschend hohe spezifische Aktivität (151 U mg^{-1}) gegenüber Reactive Blue 5; wohingegen die spezifischen Aktivitäten lignolytischer Peroxidasen (BadVP und PchLiP) gegenüber dem Farbstoff vergleichsweise gering sind (15 U mg^{-1} , 3 U mg^{-1}) (Liers *et al.* 2013b).

Neben dem Anthrachinonfarbstoff Reactive Blue 5 setzt MsP1 auch die natürlichen Farbstoffe β -Carotin, Bixin und Norbixin (als wässrig-alkalischer Annattoextrakt) um. Für die Umsetzung von Norbixin durch MsP1 wurde ein wässrig-alkalischer Annattoextrakt verwendet, der als Hauptbestandteil das Natriumsalz des Norbixins enthält. Für β -Carotin und die beiden Xanthophylle Bixin und Norbixin konnten die kinetischen Parameter nicht ermittelt werden, da auf Grund der hohen Eigenabsorption nur geringe Mengen der Farbstoffe zur photometrischen Messung eingesetzt werden konnten. Diese Mengen reichten nicht aus, um in die Substratsättigung zu gelangen. MsP1 weist bei annähernd gleichen Substratkonzentrationen (Norbixin $16 \mu\text{M}$, Bixin $16,5 \mu\text{M}$) für Norbixin eine wesentlich höhere spezifische Aktivität im Vergleich zu Bixin auf (Tab. 3.12). Die spezifische Aktivität von MsP1 gegenüber dem natürlichen Farbstoff β -Carotin ist im Vergleich zu den Xanthophyllen am geringsten (Tab. 3.12). Auch wenn die Substratsättigung nicht erreicht werden konnte, wurden die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten der Umsetzungen der Farbstoffe gegen deren Substratkonzentration aufgetragen. Dabei ergaben sich sigmoidale Verläufe der Sättigungskurven. Linde *et al.* (2014) zeigen für die Umsetzung von Reactive Blue 19 ebenfalls einen sigmoidalen Verlauf der Kinetik. Nach den Autoren tritt dieser durch die gleichzeitige Oxidation des Substrates an zwei Oxidationsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten und Wechselzahlen auf. Auch eine versatile Peroxidase aus *P. eryngii* oxidiert einige Phenole und Farbstoffe (beispielsweise DMP und ABTS) gleichzeitig an unterschiedlichen Oxidationsstellen mit niedriger und hoher Affinität zum Substrat (Ruiz-Dueñas *et al.* 2009). Die Oxidationsstellen sind zum einen auf der Proteinoberfläche und zum anderen im Häm-Zugangskanal lokalisiert (Morales *et al.* 2012).

DyP-Typ-Peroxidasen benötigen im Gegensatz zu LiP und MnP keine Redoxmediatoren, um die Oxidation von phenolischen Substraten zu katalysieren (Liers *et al.* 2013a). In diesem Zusammenhang ähneln sie den versatilen Peroxidasen, die unabhängig von Redoxmediatoren eine hohe Aktivität gegenüber Phenolen zeigen (Martínez *et al.* 1996). MsP1 setzt sowohl 2,6-Dimethoxyphenol (DMP), als auch Guajakol effizient um, im Gegensatz zur klassischen DyP-Typ-Peroxidase aus *B. adusta*, die die Oxidation von DMP und Guajakol kaum katalysiert (Sugano *et al.* 2000). Bei diesen Phenolderivaten handelt es sich um typische Substrate für Mangan- bzw. Ligninperoxidasen. Die spezifischen Aktivitäten von MsP1 für diese Substrate lagen bei 70 U mg^{-1} (Guajakol) bzw. 73 U mg^{-1} (DMP) und sind somit vergleichbar mit spezifischen Aktivitäten anderer DyP-Typ-Per-

oxidasen (31–278 U mg⁻¹; Liers *et al.* (2013a)) und etwas geringer als die spezifischen Aktivitäten phenoloxidierender Peroxidasen (Peroxidase aus *C. cinerea* (CiP) und *Glycine max* (SBP); spezifische Aktivitäten 92 U mg⁻¹ (SBP) und 169 U mg⁻¹ (CiP); Liers *et al.* (2013a)). MsP1 wies eine signifikant höhere Affinität zu dem Substrat DMP (zweifach substituiertes Phenol; $K_m = 79,0 \mu\text{M}$) als zu dem Substrat Guajakol (einfach substituiertes Phenol; $K_m = 145,5 \mu\text{M}$) auf. Die Wechselzahlen beider Umsetzungen waren jedoch miteinander vergleichbar (DMP: $k_{\text{cat}} = 214 \text{ s}^{-1}$; Guajakol: $k_{\text{cat}} = 204 \text{ s}^{-1}$). Die Wechselzahlen anderer DyP-Typ-Peroxidasen für die Umsetzung von DMP sind hingegen kleiner als die von MsP1 (IlaDyP: $k_{\text{cat}} = 70 \text{ s}^{-1}$ Salvachúa *et al.* (2013); AauDyP: $k_{\text{cat}} = 70 \text{ s}^{-1}$ Liers *et al.* (2010)). Auch Manganperoxidasen, Ligninperoxidasen und versatile Peroxidasen weisen niedrigere Wechselzahlen gegenüber dem Substrat DMP auf (BadMnP: $k_{\text{cat}} = 70 \text{ s}^{-1}$ Wang *et al.* (2002); LiP: $k_{\text{cat}} = 27 \text{ s}^{-1}$ Ward *et al.* (2003); VP aus *Pleurotus eryngii* für DMP ohne Mn(II): $k_{\text{cat}} = 3 \text{ s}^{-1}$ Camarero *et al.* (1999); BadVP: $k_{\text{cat}} = 2,3 \text{ s}^{-1}$ Mester und Field (1998)). Die katalytische Effizienz von MsP1 für die Oxidation von 2,6-Dimethoxyphenol ($2,7 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) ist vergleichbar mit einer DyP-Typ-Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus* (Pleos-DyP4 (Isoenzym): katalytische Effizienz = $2,12 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; Fernández-Fueyo *et al.* (2015)).

Isoenzyme einer MnP aus *Pleurotus ostreatus* sind in der Lage, phenolische Substrate auch in Abwesenheit des Redoxmediators Mn²⁺ zu oxidieren; jedoch verläuft die Oxidation wesentlich schneller in Gegenwart von Mn²⁺ (Giardina *et al.* 2000). Auch für andere Manganperoxidasen wurde eine Mangan-unabhängige Oxidation berichtet (MnP aus *P. pulmonarius*, *P. eryngii* und aus *B. adusta* (Martínez *et al.* 1996; Camarero *et al.* 1996; Camarero *et al.* 1999; Mester und Field 1998)). Die Aktivität von MsP1 gegenüber dem Substrat DMP wurde ebenfalls durch den Zusatz von Mangansulfat (Mn²⁺) signifikant gesteigert. Auf Grund dieser Steigerung wurde die direkte Oxidation von Mn²⁺ zu Mn³⁺ durch MsP1 überprüft. Die Aktivität von MsP1 gegenüber Mn²⁺ betrug 2603 U L⁻¹ bzw. 0,32 U mg⁻¹. Die Fähigkeit von MsP1, Mn²⁺ zu oxidieren, ist außergewöhnlich und wurde bisher nur für eine weitere DyP-Typ-Peroxidase aus Pilzen beschrieben (Isoenzym einer DyP-Typ-Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus* Pleos-DyP4; Fernández-Fueyo *et al.* (2015)). Hingegen wurde von vier DyP-Typ-Peroxidasen aus Bakterien berichtet, die in der Lage sind Mn²⁺ zu oxidieren; deren Wechselzahl (k_{cat}) ist jedoch geringer als die von MnPs und VPs (Fernández-Fueyo *et al.* 2015). Für MnPs und VPs sind die spezifischen Bindestellen für Mn²⁺ (bestehend aus drei Aminosäuren (Glu, Glu, Asp) und einem Propionat der Hämgruppe) charakterisiert (Ruiz-Dueñas *et al.* 2009; Banci *et al.* 2003). Auch für DyP-Typ-Peroxidasen aus Bakterien wurden Kristallstrukturen mit Manganbindestellen beschrieben (Singh *et al.* 2013; Brown *et al.* 2012). Diese spezifischen Bindestellen sind in der Sequenz von MsP1 - genauso wie in den Sequenzen anderer DyP-Typ-Peroxidasen (Liers *et al.* 2013b) - nicht aufzufinden (s. 4.3.7); dennoch ist die DyP-Typ-Peroxidase MsP1 in der Lage Mn²⁺ zu Mn³⁺ zu oxidieren. Demzufolge muss MsP1 andere Bindestellen für Mn²⁺ aufweisen.

MsP1 setzt zusätzlich den Azofarbstoff Reactive Black 5 um. Der Farbstoff besitzt ein hohes Redoxpotential und ist ein typisches Substrat für versatile Peroxidasen (VP) (Camarero *et al.* 1999;

Heinfling *et al.* 1998). Auch andere DyP-Typ-Peroxidasen oxidieren den Azofarbstoff; jedoch setzt beispielsweise AauDyP Reactive Black 5 mit einer 2,8-6,8-fach geringeren katalytischen Effizienz als LiPs aus *C. subvermispota* und VPs aus *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus ostreatus* um (Linde *et al.* 2014). Für Reactive Black 5 konnten die kinetischen Parameter nicht ermittelt werden, da auf Grund der hohen Eigenabsorption nur geringe Mengen des Farbstoffes zur photometrischen Messung eingesetzt werden konnten. Diese reichten nicht aus, um in die Substratsättigung zu gelangen. Auch wenn die katalytischen Konstanten für die Oxidation von Reactive Black 5 nicht ermittelt werden konnten, zeigte die Umsetzung des Farbstoffes, dass MsP1 sich katalytische Eigenschaften mit versatilen Peroxidasen teilt (Oxidation von Reactive Black 5 und von Mn^{2+}).

Neben phenolischen Substraten setzte MsP1 auch Veratrylalkohol, ein nicht-phenolisches Modellsubstrat, um. Veratrylalkohol ist ein typisches Substrat der LiP und wird nicht von allen DyP-Typ-Peroxidasen umgesetzt (Sugano *et al.* 2007). Da die Umsetzung nur langsam verlief, wurde die Substratsättigung auch nach Zugabe von 60 000 μM Veratrylalkohol nicht erlangt, sodass von einer Bestimmung der kinetischen Parameter von MsP1 für das Substrat Veratrylalkohol abgesehen wurde. Auch AauDyP setzt Veratrylalkohol mit einer sehr geringen Affinität um (Linde *et al.* 2014). MsP1 oxidierte Adlerol, ein nicht-phenolisches β -O-4 Ligninmodell dimer ohne Zusatz von Redoxmediatoren. Bei dem Abbau von Adlerol durch DyP-Typ-Peroxidasen wird Veratrylalkohol gebildet, was generell deren Fähigkeit zur Spaltung von C_{α} - C_{β} -Ethern indiziert (Liers *et al.* 2013b). Die Umsetzung von Adlerol durch MsP1 erfolgte nur langsam. Nach Liers *et al.* (2013b) sind die spezifischen Aktivitäten der untersuchten DyP-Typ-Peroxidasen gegenüber Adlerol im besten Fall 10-fach geringer als die spezifische Aktivität von PchLiP gegenüber dem Substrat.

Die natürliche Funktion von DyP-Typ-Peroxidasen aus Pilzen ist weiterhin ungeklärt (Liers *et al.* 2013b). Wegen ihrer Vielseitigkeit könnten sie sowohl an der Umwandlung von Lignocellulosen und anderen Polymeren, als auch an unspezifischen Abwehr- und Entgiftungsreaktionen beteiligt sein (Liers *et al.* 2013b). Auch wenn einige DyP-Typ-Peroxidasen aus Pilzen in der Lage sind Veratrylalkohol und nicht-phenolische Ligninmodell dimere zu oxidieren (Liers *et al.* 2010; Liers *et al.* 2013b; Linde *et al.* 2014), ist ihre Aktivität zu gering, um eine relevante Rolle in dem initialen Abbau von Lignin-Polymeren in der Natur zu spielen (Linde *et al.* 2015b).

DyP-Typ-Peroxidasen sind möglicherweise Teil eines alternativen/synergetischen biokatalytischen Systems zur Oxidation von Hoch-Redoxpotential-Substraten, wie sie beispielsweise im Lignin gefunden werden (Liers *et al.* 2013b). In diesem Zusammenhang kooperieren DyP-Typ-Peroxidasen möglicherweise mit Manganperoxidasen und ersetzen die selten vorliegenden Ligninperoxidasen (Liers *et al.* 2013b).

4.4 Immobilisierung der gereinigten rekombinanten Peroxidase MsP1

Die Immobilisierung von Proteinen ist für biotechnologische Anwendungen von besonderem Interesse (Hartmeier 1986). Die Fixierung kann entweder durch Bindung von Proteinen an Trägermolekülen bzw. funktionalisierten Oberflächen oder durch Einschluss – zum Beispiel in bestimmten Polymermatrices – erfolgen. Solche immobilisierten Enzyme lassen sich mitsamt ihrer Trägermaterialien leicht von der Reaktionslösung trennen und mehrfach verwenden (Hanefeld *et al.* 2009); auch eine kontinuierliche Prozessführung wird dadurch ermöglicht (Mateo *et al.* 2007). Lange bevor die Immobilisierungstechniken als solche bekannt waren, wurden bereits immobilisierte Biokatalysatoren in der Praxis eingesetzt. Um 1815 konnte man mit dem sogenannten „Fesselverfahren“ von Johann Sebastian Schützenbach⁸¹, bei dem sich die benötigten aeroben Essigbakterien an einem schwimmenden Trägermaterial wie Buchholzspäne ansiedeln und festheften, effizienter Essig herstellen. 1969 wurde erstmals ein trägergebundenes Enzym im technischen Maßstab eingesetzt (Chibata *et al.* 1972).

Neben der Rückführung des Katalysators kann durch Immobilisierung die Stabilität und Toleranz von Enzymen gegenüber denaturierenden Faktoren wie z.B. extremen pH-Werten und Temperaturen sowie hohen Substratkonzentrationen und verschiedenen Lösungsmitteln erhöht werden (Hanefeld *et al.* 2009; Mateo *et al.* 2007). Des Weiteren ist eine Modifizierung der Substratspezifität, Enantioselektivität und Reaktivität möglich (Hanefeld *et al.* 2009). Allerdings kann die Aktivität im Vergleich zum freien Enzym abnehmen. Um die natürliche Funktionalität der Proteine für biotechnologische Applikationen zu erhalten, sollte die Immobilisierung nicht zu Strukturänderungen oder Denaturierungseffekten führen. Weiterhin dürfen die katalytisch aktiven Bereiche oder Bindedomänen nicht blockiert werden. Die Wahl einer geeigneten Immobilisierungstechnik wird dabei im Wesentlichen von den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Protein und Oberfläche bestimmt; eine generelle Methode zur Immobilisierung von Enzyme gibt es jedoch nicht (Hanefeld *et al.* 2009). Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Immobilisierungsstrategien für Proteine aller Art entwickelt. Die am häufigsten verwendeten Techniken können in fünf Kategorien eingeteilt werden (Hanefeld *et al.* 2009):

- nicht-kovalente Adsorption⁸²
- Immobilisierung durch Ionenbindung⁸³
- kovalente Bindung (Fixierung)
- Vernetzung der Enzyme untereinander (*Cross-Linking*)
- Einschluss in polymere Gele oder Kapseln

⁸¹ Schnellessig- und Schützenbachverfahren (Generatorverfahren)

⁸² hydrophobe Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Kräfte), hydrophile Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen)

⁸³ elektrostatische Wechselwirkungen

Alle erwähnten Techniken weisen Vor- und Nachteile auf. Somit hängt die Wahl einer geeigneten Immobilisierungsstrategie maßgeblich von den spezifischen Anforderungen ab und muss für jede Anwendung neu getroffen werden; zu berücksichtigen sind dabei Faktoren wie Bindungsstärke, Bindungsspezifität, Bindungskinetik, Reversibilität, Abstand von der Oberfläche und die Oberflächenorientierung (Hanefeld *et al.* 2009). Die Vorteile der Immobilisierungstechnik mittels Ionenbindung bzw. Adsorption⁸⁴ sind die einfache Durchführbarkeit und die Beibehaltung der Proteinkonformation. Sowohl durch Temperatur- und pH-Wertschwankungen als auch durch Änderungen in der Substrat- und Ionenkonzentration, können die so gebundenen Enzyme jedoch leicht wieder desorbiert bzw. abgetrennt werden (Hartmeier 1986, Hanefeld *et al.* 2009).

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Immobilisierung von Msp1 durch kovalente Bindung, da sich diese Technik für eine langzeitstabile Fixierung eignet und unabhängig vom pH-Wert und Art des Lösungsmittels ist.

Kovalente Immobilisierungsstrategie:

Bei der kovalenten Bindung von Enzymen an Oberflächen von Trägermaterialien kommt es zur Ausbildung gemeinsamer Elektronenpaare, weswegen diese Methode als stabilste Immobilisierungstechnik gilt. Dabei reagieren frei zugängliche funktionelle Gruppen exponiert liegender Aminosäuren mit modifizierten Oberflächen oder *Linker*-Molekülen. Die kovalente Immobilisierung bietet – gegenüber der Adsorption bzw. Ionenbindung aber auch gegenüber dem Einschluss von Enzymen – den Vorteil einer irreversiblen Bindung (Rusmini *et al.* 2007; Hanefeld *et al.* 2009). Auf Grund des Vorkommens identischer funktioneller Gruppen kommt es jedoch meist zu einer zufälligen Orientierung der Enzyme an der Oberfläche des Trägermaterials; nur mit Hilfe spezieller Maskierungsreaktionen lassen sich auch gerichtete Immobilisierungen realisieren (Rao *et al.* 1998).

Um die Funktionalität des Proteins zu bewahren, darf die Immobilisierung nicht über Aminosäuren erfolgen, die für die Aktivität des Proteins nötig sind bzw. in der Bindungsdomäne liegen. Hermanson (1996) und Rusmini *et al.* (2007) beschreiben eine Vielzahl von kovalenten Reaktionsmechanismen. Tabelle 4.2 gibt eine Übersicht über die benötigten Oberflächenfunktionalisierungen und die funktionellen Gruppen exponiert liegender Aminosäuren, die für eine kovalente Immobilisierung in Betracht kommen (Rusmini *et al.* 2007). Aufgrund ihrer Reaktivität eignen sich besonders Thiol- und Aminogruppen für die kovalente Immobilisierung.

⁸⁴durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen

Tabelle 4.2: Übersicht funktioneller Gruppen und Oberflächenfunktionalisierungen

Seitengruppe	Aminosäure	Oberflächenfunktionalisierung
-NH ₂	Lys, Arg, Asn, Gln	Carboxylgruppe Aktiver Ester (NHS) Aldehyd Epoxid
-SH	Cys	Maleimid Pyridyl/Succinimid Disulfid
-COOH	Asp, Glu	Amin
-OH	Ser, Thr	Epoxid

Die kovalente Immobilisierung kann grundsätzlich auf zwei Arten erfolgen:

- Immobilisierung an modifizierten Oberflächen von Trägermaterialien ohne Verwendung von *Linker*-Molekülen
- Immobilisierung unter Verwendung von *Linker*-Molekülen

Unter dem Begriff „zero-length“ *Cross-Linking* versteht man die Immobilisierung eines Proteins an eine Oberfläche ohne Verwendung von *Linker*-Molekülen. Sind Oberflächenfunktionalität und funktionelle Proteingruppe nicht kompatibel, werden bifunktionelle *Cross-Linker*-Moleküle als Kopplungsreagenzien eingesetzt. Tragen die *Linker*-Moleküle zwei gleiche funktionelle Gruppen, spricht man von homobifunktionalem *Cross-Linking*; bei zwei unterschiedlichen funktionellen Gruppen hingegen von heterobifunktionalem *Cross-Linking*. Durch die Vielzahl unterschiedlicher *Cross-Linker*-Moleküle (*Spacer*)⁸⁵ lassen sich beliebige funktionelle Gruppen verknüpfen (Hermanson 1996). Weiterhin wird mit Hilfe von *Spacern* ein für die biologische Funktion des Enzyms notwendiger Abstand gewährleistet. Mit zunehmender *Spacer*-Länge steigt die Beweglichkeit des gekoppelten Proteins und die Bindung eines Substrates wird verbessert; gleichzeitig nimmt die Stabilität des immobilisierten Enzyms jedoch ab (Hanefeld *et al.* 2009).

Zur Rückgewinnung von Msp1 aus technischen Prozessen wurde reines Msp1 mit Hilfe kovalenter chemischer Bindungen an Oberflächen verschiedener Materialien immobilisiert. Zum einen erfolgte die Immobilisierung mit Glutaraldehyd als homobifunktionalem *Cross-Linker*; zum anderen durch eine chemische Aktivierung der Oberflächengruppen mit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) und anschließender Ausbildung stabiler Amidbindungen.

⁸⁵ aliphatische, aliphatisch-aromatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, Heterozyklen oder Polyether

Als Materialien wurden zum einen poröse Silica-Monolithen und zum anderen Polystyrol-Kugeln mit einer glatten Oberfläche verwendet. Die Silica-Monolithen wurden direkt an der Justus-Liebig-Universität Gießen hergestellt und können generell in verschiedenen Formen angefertigt werden. Die Monolithen wurden mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS) bzw. N-Methyl-3-aminopropyltrimethoxysilan (MAPTMS) funktionalisiert, um die benötigten reaktiven Gruppen auf der Oberfläche zu erhalten (Abb. 4.13).

Die mit MAPTMS funktionalisierten Monolithen wurden zusätzlich mit einer wässrigen Bernsteinsäureanhydridlösung inkubiert, um die *Spacer*-Länge zu vergrößern und um eine reaktive Carboxygruppe auf der Oberfläche zu erhalten. Mittels Stickstoff-Tieftemperatur-Adsorptionsmessung wurde die erfolgreiche Funktionalisierung der Monolithen mit MAPTMS und Bernsteinsäureanhydrid gezeigt (Abb. 3.75). Sowohl die spezifische Oberfläche, als auch das Porenvolumen nahmen bei BSMAP-SiO₂ im Vergleich zu den nicht funktionalisierten Monolithen (Blind-SiO₂) ab (Tab. 3.15). Dies lässt darauf schließen, dass sich auf der Oberfläche der Poren reaktive *Spacer* gebildet haben. Weiterhin zeigte sich anhand des Porendurchmessers_{gemittelt}, dass die Monolithen Mesoporen aufwiesen. Auf Grund dieser Poren besitzen die Monolithen im Vergleich zu nicht porösen Materialien gleicher Größe eine vielfach größere Oberfläche.

Die Polystyrol-Kugeln wurden von der Firma Rapp Polymere GmbH bezogen. Das Material wurde zum Vergleich in verschiedenen Partikelgrößen, mit unterschiedlichen Bindungskapazitäten und variierenden *Spacer*-Längen verwendet (Tab. 2.4). Als reaktive Gruppe wiesen alle Kugeln eine Carboxygruppe auf (Abb. 4.13). In Tabelle 4.3 sind die verwendeten Materialien aufgeführt; im Folgenden werden nur noch die Abkürzungen der Materialien genannt.

Tabelle 4.3: Verwendete Materialien

Abkürzung	Beschreibung
Blind-SiO ₂	reines Silica ohne Funktionalisierung
AP-SiO ₂	Silica funktionalisiert mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS)
MAP-SiO ₂	Silica funktionalisiert mit N-Methyl-3-aminopropyltrimethoxysilan (MAPTMS)
BSMAP-SiO ₂	Silica funktionalisiert mit N-Methyl-3-aminopropyltrimethoxysilan (MAPTMS) und Bernsteinsäureanhydrid
Carboxy-PS	Carboxypolystyrol
BSAM-PS	Aminomethylpolystyrol acyliert mit Bernsteinsäure

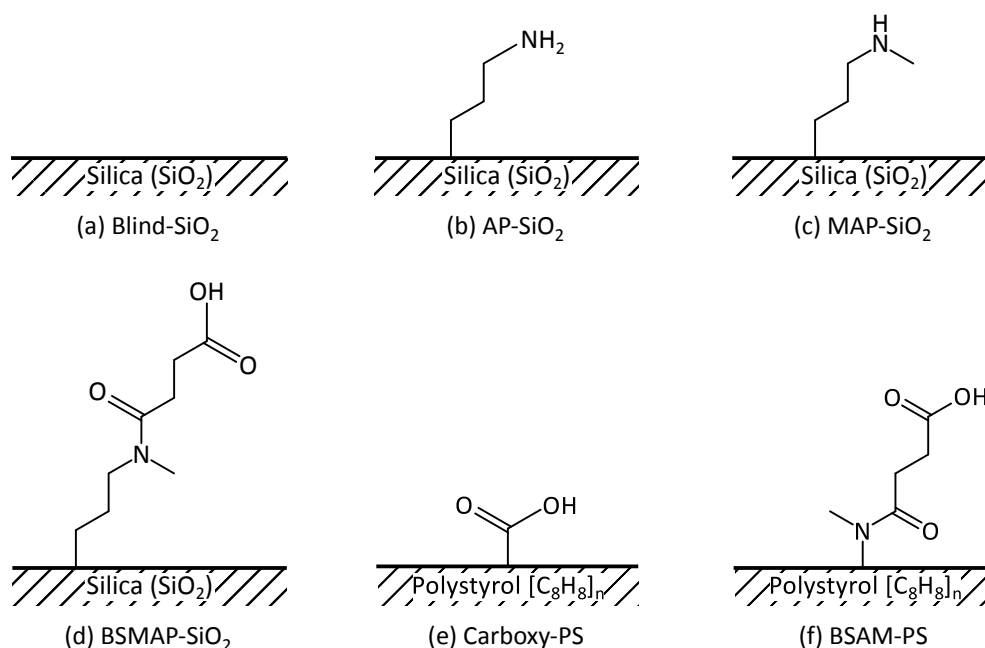


Abbildung 4.13: Darstellung der verschiedenen reaktiven Gruppen auf den Polystyrol- und Silica-Oberflächen: zur Immobilisierung mit Glutaraldehyd wurden Blind-SiO₂ (a) und AP-SiO₂ (b) eingesetzt; MAP-SiO₂ (c) wurde ausschließlich für die weitere Funktionalisierung mit Bernsteinsäureanhydrid verwendet; zur Immobilisierung mit EDC und NHS wurden sowohl die Monolithen Blind-SiO₂ (a) und BSMAP-SiO₂ (d) als auch die Kugeln Carboxy-PS (e) und BSAM-PS (f) eingesetzt

4.4.1 Immobilisierung mit Glutaraldehyd als homobifunktionalem *Spacer*

Die Strategie zur Immobilisierung von MsP1 mit Glutaraldehyd basiert auf der Interaktion zwischen Aminen und Aldehyden. Nach Walt und Agayn (1994) ist Glutaraldehyd das mit Abstand am häufigsten verwendete bifunktionelle Reagenz zum Quervernetzen von Proteinen untereinander. In dieser Arbeit wurde Glutaraldehyd jedoch als homobifunktionaler *Cross-Linker* zur Kopplung von MsP1 an die Oberflächen der Silica-Monolithen verwendet. Beide funktionellen Gruppen⁸⁶ reagieren zu einer Schiffschen Base. Durch Reduktion mit Natriumborhydrid entsteht ein sekundäres Amin (Betancor *et al.* 2006) (Abb. 4.14).

⁸⁶Amino- und Carbonylgruppe

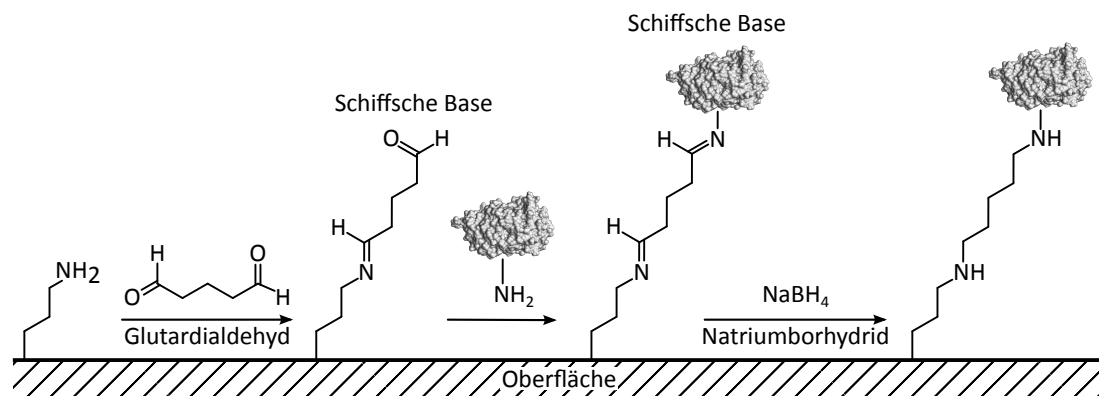




Abbildung 4.14: Reaktionsschema zur kovalenten Immobilisierung von MsP1 mit Glutardialdehyd als *Spacer*:
: MsP1 mit frei zugänglicher NH₂-Gruppe; : Oberfläche der Silica-Monolithen ebenfalls mit einer reaktiven NH₂-Gruppe

Mit Hilfe des *Spacers* Glutardialdehyd wurden nur geringe Mengen der gereinigten rekombinanten Peroxidase MsP1 an die verwendeten AP-SiO₂-Monolithen immobilisiert. Jedoch führte die anschließende Reduktion der Schiffschen Base mittels Natriumborhydrid zu einer Inaktivierung des Enzyms, so dass keinerlei Aktivität des kovalent gebundenen MsP1 gegenüber dem Substrat ABTS nachgewiesen wurde. Nach Walt und Agayn (1994) kann der Einsatz von Natriumborhydrid bei Enzymen, die Disulfidbrückenbindungen enthalten, zu Konformationsänderungen führen und damit zum Verlust der Aktivität. Aus diesem Grund wurde diese Immobilisierungsstrategie nicht weiter verfolgt.

4.4.2 Immobilisierung mit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS)

Die Immobilisierung mit Hilfe von N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) stellt eine der gängigsten Strategien zur Kopplung von Enzymen an Oberflächen von Materialien dar (Delvaux und Demoustier-Champagne 2003). Nach Jones *et al.* (1989) verläuft die Kopplungsreaktion von Aminogruppen an carboxylterminierten *Spacern* mit Hilfe von EDC und NHS spezifisch, schnell und nahezu quantitativ.

Bei der Reaktion werden zuerst die Carboxygruppen der *Spacer* mit EDC und NHS chemisch aktiviert (Abb. 4.15). Nach der Aktivierung können Proteine direkt in wässriger Lösung zugegeben werden, wodurch der nucleophile Angriff einer frei zugänglichen Aminogruppe (Oberfläche des Proteins) zur Kopplung durch Ausbildung stabiler Amidbindungen führt (Johnsson *et al.* 1991).

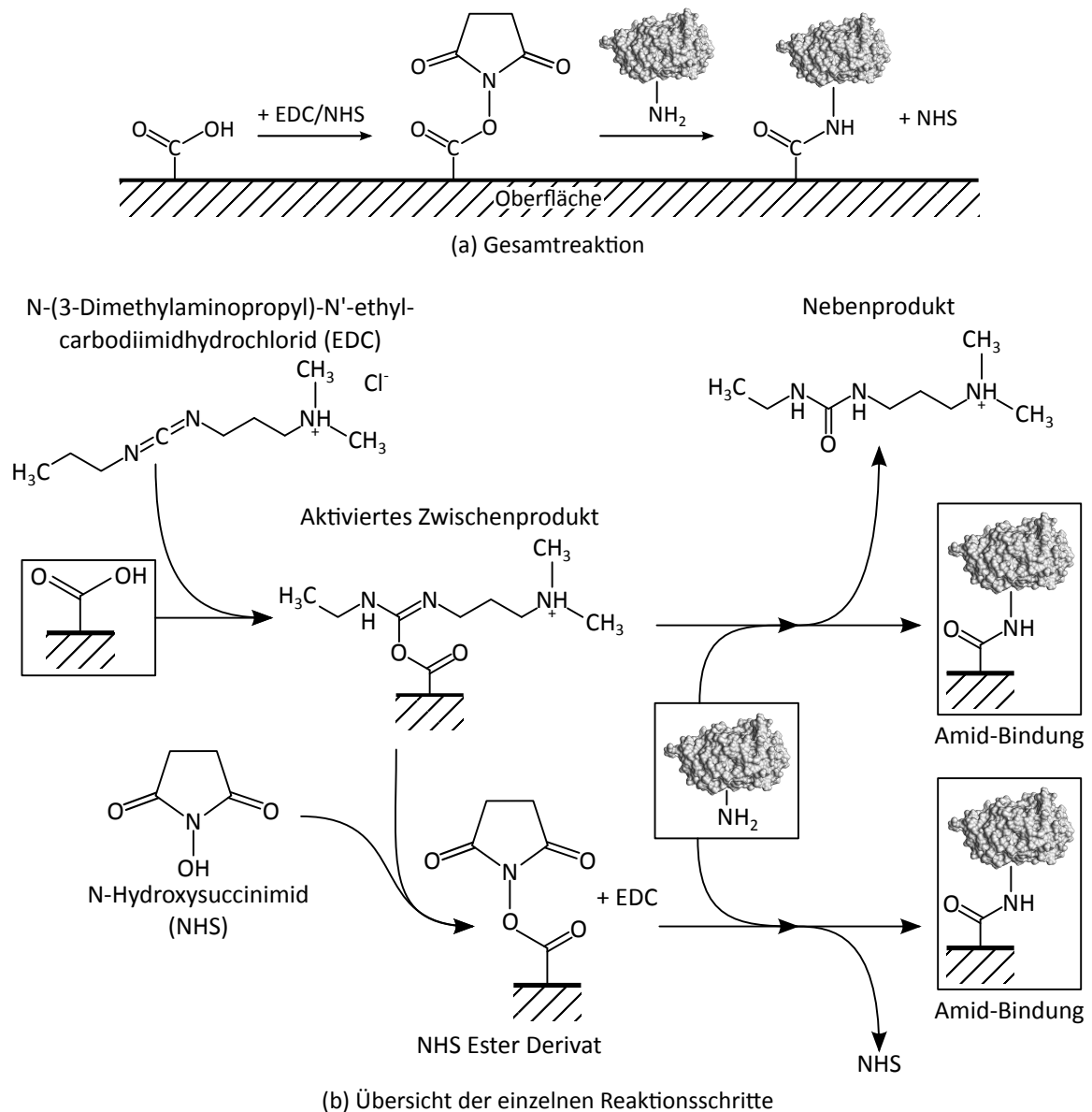


Abbildung 4.15: Reaktionsmechanismus der Immobilisierung von Enzymen an carboxylterminiertem *Spacer* auf der Oberfläche von Materialien mit Hilfe von EDC und NHS (Patel *et al.* 1997): : MsP1; : Oberfläche der Materialien

Die Aktivierung der Oberflächengruppen könnte ebenfalls nur mit EDC erfolgen; jedoch wird die Effizienz der Kopplungsreaktion durch den zusätzlichen Reaktionsschritt mit NHS deutlich gesteigert (Patel *et al.* 1997).

Ein großer Vorteil der Immobilisierungsstrategie mit EDC und NHS ist, dass die Zugabe des Enzyms erst nach der Aktivierung der Oberflächengruppen erfolgt, nachdem die überschüssigen Aktivierungsreagenzien durch Waschen entfernt worden sind. Anschließend erfolgt die Kopplung des Enzyms unter milden Bedingungen im wässrigen Milieu. Die kovalente Immobilisierung ist in

der Regel mit dem Einsatz relativ „harter“ Kopplungsreagenzien verbunden, wodurch häufig ein drastischer Eingriff in die native Konformation des Proteins erfolgen und damit ein Verlust der biologischen Funktion auftreten kann (Hartmeier 1986).

Die Immobilisierung von MsP1 mit EDC und NHS erfolgte mit folgenden Partikeln:

- Blind-SiO₂
- BSMAP-SiO₂
- BSAM-PS
- Carboxy-PS

Mit Hilfe von EDC und NHS wurde MsP1 als erste DyP-Typ-Peroxidase aktiv an Silica-Monolithen und Polystyrol-Kugeln immobilisiert.

Die größte Proteindichte und somit die höchste Aktivität bezogen auf das Material wies MsP1-BSMAP-SiO₂ auf (Tab. 3.14). Auf Grund der vorhandenen Mesoporen weisen die Monolithen eine vielfach größere Oberfläche als die Polystyrol-Kugeln auf, wodurch mehr MsP1 gebunden werden kann. Weiterhin kann das Enzym zusätzlich in die Poren diffundieren und sich dort einlagern ohne an der Oberfläche kovalent gebunden zu sein. Dies wird durch die Blind-SiO₂-Monolithen bestätigt, die – trotz nicht vorhandener aktiver Gruppen auf der Oberfläche – nach der Inkubation mit MsP1 geringe Aktivität gegenüber ABTS aufwies. Mittels Stickstoff-Tiefemperatur-Adsorptionsmessung zeigte sich, dass die Immobilisierung zu einer weiteren Abnahme⁸⁷ der spezifischen Oberfläche und des Porenvolumens führte (Tab. 3.15). Weiterhin war aus der Verteilung der mittleren Porengröße vor und nach der Immobilisierung zu erkennen, dass die Immobilisierung zu einer Abnahme der Gesamt-Mesoporosität führte (Abb. 3.75). Dies bestätigt die Vermutung, dass sich MsP1 zusätzlich in den Poren der Silica-Monolithen einlagert.

Die verwendeten Polystyrol-Kugeln unterschieden sich hinsichtlich der Partikelgröße, der Bindungskapazität und der *Spacer*-Länge (Tab. 2.4). Alle drei Faktoren können Einfluss auf die Immobilisierung haben; sowohl auf die Proteindichte, als auch auf die Aktivität des gebundenen Enzyms. Bei den Polystyrolkugeln zeigte sich, dass bei variierender Bindungskapazitäten geringe Unterschiede in der Proteindichte zu erkennen waren (Tab. 3.14). Wenn man von einer Bindung pro Enzym ausgeht, wurden nur <0,1% der Bindungskapazität ausgenutzt. Jedoch können auch Mehrfachbindungen auftreten, so dass der Grad der Ausschöpfung der Kapazität nicht eindeutig geklärt ist. Gründe für eine niedrige Auslastung der Bindungskapazität sind sterische Hinderungen bei der Kopplung des Dimers MsP1 auf Grund der Partikelgröße oder *Spacer*-Länge.

Die höchste Aktivität zeigten die Polystyrol-Kugeln MsP1-BSAM-PS mit der kleineren Partikelgröße, höheren Bindungskapazität und dem längeren *Spacer*. Dies ist zum einen durch die relativ hohe Proteindichte und zum anderen durch die freiere Beweglichkeit des Enzyms auf Grund der *Spacer*-Länge zu erklären. Somit wurde anhand der spezifischen Aktivität gezeigt, dass eine grö-

⁸⁷ zusätzlich zu der Abnahme durch die Funktionalisierung der Monolithen

ßere *Spacer*-Länge für die Beibehaltung der Funktionalität von Msp1 wichtig ist .

Die spezifischen Aktivitäten von Msp1 immobilisiert an BSMAP-SiO₂ und an BSAM-PS sind vergleichbar. Jedoch ist ein hoher Verlust der spezifischen Aktivität im Vergleich zum freien Enzym zu verzeichnen (Tab. 3.14). Die Aktivität gegenüber ABTS beträgt dennoch bis zu 6270 U kg⁻¹ Material. Ein häufiges Problem bei der Immobilisierung von Proteinen ist der teilweise oder vollständige Verlust der Proteinaktivität, der viele Gründe haben kann (Hanefeld *et al.* 2009). Da bei der kovalenten Immobilisierung die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche zufällig erfolgt, kann das aktive Zentrum für das Substrat blockiert oder die Beweglichkeit des Enzyms stark eingeschränkt sein. Auf der Proteinoberfläche befinden sich eine Vielzahl freier Aminogruppen. Welche und wie viele davon die Oberflächenreaktion eingehen, ist nicht kontrollierbar. Gerade bei Dimeren können mehrere Bindungen an der Oberfläche erfolgen, die zwar die Stabilität des Dimeres erhöhen aber auch dessen Beweglichkeit enorm einschränken können (Hanefeld *et al.* 2009; Koch-Schmidt und Mosbach 1977b).

Insbesondere bei starren Trägern muss mit Veränderungen der Tertiärstruktur (Konformationsänderungen), Einschränkungen der Beweglichkeit der Proteinsegmente untereinander und Denaturierungseffekten gerechnet werden (Wittmann *et al.* 2001). Die Veränderungen sind dabei umso ausgeprägter, je höher die Belegungsdichte der Matrixoberfläche ist (Buchholz 1989). Bei den Monolithen erhöhen die Poren zwar die Oberfläche des Materials an der das Enzym gebunden werden kann; jedoch können diese Poren durch einen kleinen Durchmesser auch den Zugang des Substrates zum Enzym verlangsamen bzw. verhindern.

Folgende Materialien wiesen neben der höchsten Proteinmenge gleichzeitig den niedrigsten Aktivitätsverlust auf:

- BSMAP-SiO₂
- BSAM-PS

Aus diesem Grund wurde deren Wiederverwendbarkeit sowie Lagerstabilität überprüft. Des Weiteren wurden sie als Anwendungsbeispiel zur Bleichung von Molke eingesetzt.

4.4.2.1 Wiederverwendbarkeit und Lagerstabilität

Für die Anwendung in industriellen Prozessen ist der wiederholte Einsatz des Biokatalysators – neben einer kontinuierlichen Prozessführung mit hoher Biokatalysatordichte – ein sehr wichtiges Kriterium (Hartmeier 1986). Aus diesem Grund wurde sowohl die Wiederverwendbarkeit als auch die Lagerstabilität des immobilisierten MsP1 untersucht.

Die Aktivität des immobilisierten MsP1 an BSAM-PS war während den Wiederholungen annähernd konstant. Bei dem Umsatz von ABTS mit MsP1 immobilisiert an BSMAP-SiO₂ wurde eine höhere Anfangsaktivität gemessen; jedoch trat während den ersten Wiederholungen ein Aktivitätsverlust von 70% auf (Abb. 3.73). Der Aktivitätsverlust wird durch das Auswaschen des nicht kovalent gebundenen Enzyms aus den Poren hervorgerufen. Nachdem das gesamte nicht kovalent gebundene Enzym ausgewaschen war, blieb die Aktivität ebenfalls konstant. Somit kann das immobilisierte MsP1 nach gründlichem Waschen der Partikel ohne Aktivitätsverlust mehrfach eingesetzt werden.

Die Aktivität des an BSAM-PS immobilisierten MsP1 wies nach der Lagerung keinen signifikanten Unterschied zur direkten Aktivitätsmessung auf. Die Aktivität des immobilisierten MsP1 an BSMAP-SiO₂ betrug nach 10 Tagen 85% (Abb. 3.74). Eine Lagerung des immobilisierten MsP1 bei 4 °C ist somit möglich.

4.4.3 Bleichung von Molke mit immobilisiertem MsP1

Zur Intensivierung der Farbe von Käse wie beispielsweise Cheddar und Gouda werden Farbstoffe wie Annatto (E 160b) und β -Carotin (E 160a) eingesetzt, die bei der Käseherstellung zu 15–20% in der Molke verbleiben, wodurch deren kommerzielle Nutzung erschwert wird (Szweda *et al.* 2013). Die Bleichung dieser Molke erfolgt in der Industrie chemisch durch Zusatz von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bzw. Benzoylperoxid und unter Hitzeeinwirkung (McDonough *et al.* 1968). Alternativ wird „MaxiBright“⁸⁸ zur Entfärbung von Molke aus dem Käsereiprozess eingesetzt. Der enzymatische Prozess ersetzt dabei das herkömmliche Verfahren der chemischen Bleichung, wodurch die Denaturierung von Molkeproteinen und die Bildung von Fehlparfums vermieden werden (Croissant *et al.* 2009; Listiyani *et al.* 2011).

Durch die Immobilisierung von MsP1 kann das Enzym bei der industriellen enzymatischen Bleichung mehrfach eingesetzt bzw. eine kontinuierliche Bleichung über gepackte Säulen⁸⁹ ermöglicht werden. Aus diesem Grund wurde als Anwendungsbeispiel die Bleichung von Molke gewählt. Dazu wurden sowohl Molke als auch 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 mit Annatto gefärbt. Die Bleichung der gefärbten Molke und des gefärbten Natriumacetat-Puffers erfolgte anschließend mit immobilisiertem MsP1 (an BSAM-PS bzw. BSMAP-SiO₂) (Abb. 3.76). Zur Kontrolle wurden

⁸⁸Unter diesem Namen wird industriell das in *Aspergillus niger* überexprimiert MsP1 aus *Mycetinis scorodoni* vertrieben.

⁸⁹Füllmaterial immobilisiert mit MsP1

ein Blindwert, eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle auf die gleiche Weise angesetzt und vermessen.

Immobilisiertes MsP1 an BSAM-PS bzw. BSMAP-SiO₂ bleichte sowohl den durch Annattozusatz gefärbten Natriumacetat-Puffer, als auch die gefärbte Molke innerhalb von 12 Stunden vergleichbar zur Positivkontrolle. Dabei war kein Unterschied zwischen den eingesetzten Materialien zu erkennen. Reine Molke ohne Zusatz von Annatto wies keine signifikante Veränderung innerhalb der 12 Stunden auf. Somit wurde immobilisiertes MsP1 erfolgreich zur Bleichung von Molke eingesetzt. Im Resultat gibt es keinen Unterschied zum nicht immobilisierten Enzym, jedoch liegt der klare Vorteil in der Wiederverwendbarkeit des immobilisierten MsP1, welche im industriellen Einsatz zur Kosten- und Prozessoptimierung von hohem Interesse ist.

5 Ausblick

Die Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurde in *Hansenula polymorpha* überexprimiert. Das lösliche Enzym wurde durch Zellaufschluss in den Überstand überführt und zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt. Jedoch zeigte die Oxygenase keine Aktivität gegenüber dem Substrat. Mittels erster Rückfaltungsversuche mit verschiedenen Puffersystemen wurde kein aktives Enzym erhalten. In anschließenden Arbeiten sollten mit Hilfe weiterer iFOLD[®] Protein Refolding System-Kits geeignete Rückfaltungsbedingungen für dieses Enzyms gefunden werden.

Des Weiteren könnten noch andere Expressionssysteme zur Produktion der Oxygenase untersucht werden. Da mit Hilfe der heterologen Expression in *Hansenula polymorpha* lösliches aber inaktives Enzym produziert wurde, sollte eine homologe Expression in Betracht gezogen werden. Eine heterologe Expression in einem anderen Basidiomyceten wie *Coprinopsis cinerea* könnte sich ebenfalls als sinnvoll erweisen. Wird dadurch aktives Enzym erhalten, sollte das rekombinante Enzym biochemisch und katalytisch charakterisiert werden. Beispielsweise sollten kinetische Untersuchungen mit lipoxygenase-spezifischen Substraten durchgeführt werden. Eine Kristallisierung des Enzyms mit anschließender Röntgenstrukturanalyse könnte Aufschluss über den außergewöhnlichen Reaktionsmechanismus geben.

Sowohl *Pleurotus eryngii*, als auch *Pleurotus ostreatus*, sind in der Lage (+)-Valencen umzusetzen. Im Vergleich zur Transformation mit *Pleurotus sapidus* war die Produktkonzentration an (+)-Nootkaton jedoch wesentlich geringer. Anhand von *Real-time*-PCR-Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei beiden Organismen eine deutlich niedrigere Transkriptionsrate der cDNA der Oxygenase vorlag. Mit Induktionsversuchen sollte deswegen die Produktion der Oxygenase gesteigert werden, um diese ebenfalls zur Synthese von (+)-Nootkaton einsetzen zu können. Weiterhin wird die Maßstabsvergrößerung der Transformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton mit Hilfe des *Pleurotus sapidus* bis zu 100 L angestrebt.

Die DyP-Typ-Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodoni* wurde in *Aspergillus niger* überexprimiert, wodurch große Mengen an aktivem Enzym in den Kulturüberstand sekretiert wurden. MsP1 wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich gereinigt und umfassend charakterisiert. Weiterhin wurden Kristallisierungen des Enzyms⁹⁰ mit anschließenden Röntgenstrukturanalysen vorgenommen. Anhand der Kristallstruktur sollte der einzigartige Reaktionsmechanismus sowie die Bindestellen einzelner Substrate wie beispielsweise für Mn²⁺ geklärt werden.

⁹⁰auch in Verbindung mit dem Substrat

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die Peroxidase MsP1 in der Lage den natürlichen Farbstoff β -Carotin auch ohne Zusatz von Wasserstoffperoxid in Gegenwart von molekularem Sauerstoff umzusetzen. Der Mechanismus dieser Umsetzung ist bislang noch nicht geklärt.

MsP1 wurde aktiv an verschiedene Materialien immobilisiert. Dabei verringerte sich die spezifische Aktivität im Vergleich zu dem freien Enzym. Aus diesem Grund sollten Optimierungen vorgenommen werden. Sowohl die *Spacer*-Länge, Partikelgröße und Beladung der Partikel könnten verändert werden. Des Weiteren sollten anhand der Kristallstruktur MsP1 gezielt immobilisiert werden, um eine Blockierung des aktiven Zentrums und der Substratbindestellen zu vermeiden. Neben der kovalenten Immobilisierung könnte MsP1 in polymere Gele oder Kapseln eingeschlossen werden. Ein Einschluss in die Silica-Monolithen wäre ebenfalls denkbar. Dazu müssten die vorhandenen Mesoporen nach Einlagerung des Enzyms erneut mit porösem Silica beschichtet und damit verschlossen werden; ohne jedoch die Diffusion des Substrates zu verhindern. Damit würde ein Auswaschen des Proteins verhindert werden und eine kontinuierliche Bleichung von Molke über Silica-Monolith-Säulen wäre denkbar.

Immobilisiertes MsP1 wurde erfolgreich zur Bleichung der Molke eingesetzt. Zusätzlich sollte ein H_2O_2 -produzierendes Enzym immobilisiert werden, wodurch der bisher benötigte externe Zusatz von Wasserstoffperoxid bei der enzymatischen Bleichung gänzlich entfallen würde.

6 Literatur

Accerbi M, Schmidt SA, Paoli E, Park S, Jeong DH, Green PJ (2010) Methods for isolation of total RNA to recover miRNAs and other small RNAs from diverse species. In: Meyers BC, Green PJ (Hrsg.) *Plant MicroRNAs*. Humana Press, New York, S. 31–50

Adak S, Bandyopadhyay U, Bandyopadhyay D, Banerjee RK (1998) Mechanism of horseradish peroxidase catalyzed epinephrine oxidation: obligatory role of endogenous O_2^- and H_2O_2 . *Biochemistry* 37:16922–16933

Alibolandi M, Mirzahoseini H (2011) Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochem Res Int* 2011:6 pages

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402

Andreou A, Feussner I (2009) Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. *Phytochem* 70:1504–1510

Arnao MB, Acosta M, del Río JA, García-Cánovas F (1990a) Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochim Biophys Acta* 1038:85–89

Arnao MB, Acosta M, del Río JA, Varón R, García-Cánovas F (1990b) A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1041:43–47

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195–201

Baldrian P, in der Wische C, Gabriel J, Nerud F, Zadrzil F (2000) Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Appl Environ Microbiol* 66:2471–2478

Banci L (1997) Structural properties of peroxidases. *J Biotechnol* 53:253–263

Banci L, Camarero S, Martínez AT, Martínez MJ, Pérez-Boada M, Pierattelli R, Ruiz-Dueñas FJ (2003) NMR study of manganese(II) binding by a new versatile peroxidase from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii*. *J Biol Inorg Chem* 8:751–760

Bateman A, Sandford R (2016) The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Curr Biol* 9:R588–R590

- Baynton KJ, Bewtra JK, Biswas N, Taylor KE** (1994) Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Biochim Biophys Acta* 1206:272–278
- Ben Aziz A, Grossman S, Ascarelli I, Budowski P** (1971) Carotene-bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method. *Phytochemistry* 10:1445–1452
- Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora-Ortiz Cesar Mateo G, Fernández-Lafuente R, Guisán JM** (2006) Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb Tech* 39:877–882
- Bisakowski B, Kermasha S, Spinnler E** (1998) Characterization of purified lipoxygenase extracts from *Fusarium proliferatum*. *J Agric Food Chem* 46:2382–2388
- Borson ND, Salo WL, Drewes LR** (1992) A lock-docking oligo(dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *PCR Methods Appl* 2:144–148
- Bouws H, Wattenberg A, Zorn H** (2008) Fungal secretomes – nature's toolbox for white biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:381–388
- Bouws H** (2007) Molekularbiologische Charakterisierung neuartiger Enzyme aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus*. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Bowden GA, Paredes AM, Georgiou G** (1991) Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 9:725–730
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brash AR** (1999) Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 274:23679–23682
- Braun M, Teichert O, Zweck A** (2006) Biokatalyse in der industriellen Produktion. Fakten und Potentiale zur weißen Biotechnologie. http://www.vdi.de/fileadmin/vdi_de/redakteur_dateien/kfibt_dateien/Biokatalyse-UEbersichtsstudie.pdf. Letzter Zugriff am 06. 09. 2016.
- Braus GH, Krappmann S, Eckert SE** (2002) Sexual development in ascomycetes fruit body. In: Osiewacz HD (Hrsg.) *Molecular biology of fungal development*, CRC Press, London, S. 215–244
- Brodhun F, Feussner I** (2011) Oxylipins in fungi. *FEBS J* 278:1047–1063
- Brown ME, Barros T, Chang MCY** (2012) Identification and characterization of a multifunctional dye peroxidase from a lignin-reactive bacterium. *ACS Chem Biol* 7:2074–2081
- Buchholz K, Kasche V** (1997) *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*. VCH Verlag, Weinheim
- Buchholz K** (1989) Immobilisierte Enzyme – Kinetik, Wirkungsgrad und Anwendung. *Chem Ing Tech* 61:611–620
- Camarero S, Bockle B, Martínez MJ, Martínez AT** (1996) Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Appl Environ Microb* 62:1070–1072

- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT** (1999) Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J Biol Chem* 274:10324–10330
- Caruso C, Chilosi G, Leonardi L, Bertini L, Magro P, Buonocore V, Caporale C** (2001) A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochem* 58:743–750
- Chance B, Maehly A** (1955) Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick PS, Kaplan ON (Hrsg.) *Methods in enzymology*, Bd. 2 : Preparation and assay of enzymes. Academic Press, New York, S. 764–775
- Cheetham PSJ** (2001) Natural sources of flavours. In: Taylor AJ, Linforth RST (Hrsg.) *Food flavour technology*, Blackwell Publishing, Oxford, S. 20
- Chibata I, Tosa T, Sato T, Mori T, Matsuo Y** (1972) Preparation and industrial application of immobilized aminoacylases. In: Terui G (Hrsg.) *Fermentation technology today*, Society of Fermentation Technology, Osaka, Japan, S. 383–389
- Choi J, Chon JK, Kim S, Shin W** (2008) Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins Struct Funct Bioinf* 70:1023–1032
- Chow MKM, Amin AA, Fulton KF, Fernando T, Kamau L, Batty C, Louca M, Ho S, Whisstock JC, Bottomley SP, Buckle AM** (2006) The REFOLD database: a tool for the optimization of protein expression and refolding. *Nucleic Acids Res* 34:D207–D212
- Colpa DI, Fraaije MW, Bloois E** (2013) DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:1–7
- Corey EJ, Nagata R** (1987) Evidence in favor of an organoiron-mediated pathway for lipoxygenation of fatty acids by soybean lipoxygenase. *J Am Chem Soc* 109:8107–8108
- Creighton TE** (1997) *Protein structure: A practical approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford
- Croissant AE, Kang EJ, Campbell RE, Bastian E, Drake MA** (2009) The effect of bleaching agent on the flavor of liquid whey and whey protein concentrate. *J Dairy Sci* 92:5917–5927
- Daglia M, Aceti C, Giorgetti S, Papetti A, Gazzani G** (2005) Purification and characterization of soluble *Cichorium intybus* var. *silvestre* lipoxygenase. *J Agric Food Chem* 53:6448–6454
- Daly R, Hearn MTW** (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* 18:119–138
- Delvaux M, Demoustier-Champagne S** (2003) Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors. *Biosens Bioelectron* 18:943–951
- Dequaire M, Limoges B, Moiroux J, Savéant JM** (2002) Mediated electrochemistry of horseradish peroxidase. *Catalysis and Inhibition*. *J Am Chem Soc* 124:240–253

- Dill KA, Ozkan SB, Shell MS, Weikl TR** (2008) The protein folding problem. *Annu Rev Biophys* 37:289–316
- Dobson CM** (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* 426:884–890
- Eggert C, Temp U, Eriksson KE** (1996) The ligninolytic system of the white-rot fungus *Pyrenopeziza cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62:1151–1158
- Eriksson KE, Blanchette RA, Ander P** (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer, Berlin
- Faraco V, Piscitelli A, Sannia G, Giardina P** (2007) Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus*. *World J Microbiol Biotechnol* 23:889–893
- Fawal N, Li Q, Savelli B, Brette M, Passaia G, Fabre M, Mathé C, Dunand C** (2013) PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. *Nucleic Acids Res* 41:D441–D444
- Fernández-Fueyo E, Linde D, Almendral D, López-Lucendo MF, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT** (2015) Description of the first fungal dye-decolorizing peroxidase oxidizing manganese(II). *Appl Microbiol Biotechnol* 99:8927–8942
- Fernández-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Romero A, Hammel KE, Medrano FJ, Martínez AT** (2014) Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnol Biofuels* 7:1–23
- Filippovich SY, Rybakov YA, Afanasieva T, Bachurina G, Lukina G, Ezhova I, Nosova A, Artjushkina T, Sineokii S, Kritskii M** (2001) Characterization of lipoxygenase from fungi of the genus *Mortierella*. *Appl Biochem Microbiol* 37:473–479
- Fisher C, Scott TR** (1997) Food flavours: biology and chemistry. Royal Society of Chemistry, Information Services, Cambridge
- Floudas D et al.** (2012) The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336:1715–1719
- Fraatz MA** (2007) Enzymatische Oxidation von Mono- und Sesquiterpenen. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Fraatz MA, Berger RG, Zorn H** (2009a) Nootkatone - a biotechnological challenge. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:35–41
- Fraatz MA, Riemer SJL, Stöber R, Kaspera R, Nimitz M, Berger RG, Zorn H** (2009b) A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *J Mol Catal B: Enzym* 61:202–207
- Frazetto G** (2003) White biotechnology. *EMBO Rep* 4:835–837

- Funk CD** (2001) Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871–1875
- Gardner HW** (1991) Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *BBA-Lipid Lipid Met* 1084:221–239
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD** (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM (Hrsg.) *The proteomics protocols handbook*, Humana Press, Totowa, S. 571–607
- Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, Cregg JM, Berardi E, Veenhuis M, van der Klei I** (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – a comparison. *FEMS Yeast Res* 5:1079–1096
- Giardina P, Palmieri G, Fontanella B, Riviaccio V, Sannia G** (2000) Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch Biochem Biophys* 376:171–179
- Gil-Rodríguez P, Ferreira-Batista C, Vázquez-Duhalt R, Valderrama B** (2008) A novel heme peroxidase from *Raphanus sativus* intrinsically resistant to hydrogen peroxide. *Eng Life Sci* 8:286–296
- Gold MH, Wariishi H, Valli K** (1989) Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In: Whitaker JR, Sonnet PE (Hrsg.) *Biocatalysis in agricultural biotechnology*, American Chemical Society, Washington DC, S. 127–140
- Grigoriev IV, Nordberg H, Shabalov I, Aerts A, Cantor M, Goodstein D, Kuo A, Minovitsky S, Nikitin R, Ohm RA, Otilar R, Poliakov A, Ratnere I, Riley R, Smirnova T, Rokhsar D, Dubchak I** (2012) The genome portal of the department of energy joint genome institute. *Nucleic Acids Res* 40:D26–D32
- Gupta R, Jung E, Brunak S** (2004) Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *In preparation*
- Hamerman D** (2005) Osteoporosis and atherosclerosis: biological linkages and the emergence of dual-purpose therapies. *QJM Int J Med* 98:467–484
- Hames BD, Rickwood D** (1990) *Gel electrophoresis of proteins*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford
- Hammarberg T, Provost P, Persson B, Rådmark O** (2000) The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem* 275:38787–38793
- Hanefeld U, Gardossi L, Magner E** (2009) Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev* 38:453–468

- Haring HG, Rijkens F, Boelens H, van der Gen A** (1972) Olfactory studies on enantiomeric eremophilane sesquiterpenoids. *J Agric Food Chem* 20:1018–1021
- Hartmeier W** (1986) Immobilisierte Biokatalysatoren. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Hauser MJB, Olsen LF** (1998) The role of naturally occurring phenols in inducing oscillations in the peroxidase–oxidase reaction. *Biochem* 37:2458–2469
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM** (1996) *Real-time* quantitative PCR. *Genome Research* 6:986–994
- Heiden S, Erb R** (2003) Transkript Biotechnologie Nachrichten-Magazin. Sonderheft Nachhaltige Biokatalyse, Deutsche Stiftung Umwelt
- Heinfling A, Ruiz-Duenas FJ, Martínez MJ, Bergbauer M, Szewzyk U, Martínez AT** (1998) A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett (FEBS Letters)* 428:141–146
- Henne KR, Kunze KL, Zheng YM, Christmas P, Soberman RJ, Rettie AE** (2001) Covalent linkage of prosthetic heme to CYP4 family P450 enzymes. *Biochemistry* 40:12925–12931
- Hermanson GT** (1996) Bioconjugate techniques. Academic Press, San Diego
- Hershko A, Ciechanover A** (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425–479
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R** (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat Biotech* 11:1026–1030
- Hofrichter M, Steinbüchel A** (2001) Biopolymers. Wiley-VCH, Weinheim
- Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T** (2010) New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:871–897
- Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Pagni M, Sigrist CJA** (2006) The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* 34:D227–D230
- Hülsdau B** (2007) Oxidativer Abbau von Carotinoiden durch Pilzenzyme. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Hunter GLK, Brogden Jr. WB** (1965) Conversion of valencene to nootkatone. *J Food Sci* 30:876–878
- Irzykowska L, Waśkiewicz A** (2014) *Hansenula*: Biology and applications. In: Tortorello ML, Batt CA (Hrsg.) *Encyclopedia of food microbiology* (second edition), Academic Press, Oxford, S. 121–124
- Jacobs PP, Callewaert N** (2009) N-glycosylation engineering of biopharmaceutical expression systems. *Curr Mol Med* 9:774–800
- Johansson T, Welinder KG, Nyman PO** (1993) Isozymes of lignin peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: II. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. *Arch Biochem Biophys* 300:57–62

- Johnsson B, Löfås S, Lindquist G** (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* 198:268–277
- Jones G, Edmundson H, Spencer L, Gale J, Saul A** (1989) The use of maleimidocaproyloxysuccinimide to prepare malarial peptide carrier immunogens immunogenicity of the linking region. *J Immunol Methods* 123:211–216
- Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S** (2005) Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiol* 15:153–164
- Kaspera R** (2004) Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen zu aromaaktiven Terpenoiden durch selektive Biokatalyse. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Kaur A, Van PT, Busch CR, Robinson CK, Pan M, Pang WL, Reiss DJ, DiRuggiero J, Baliga NS** (2010) Coordination of frontline defense mechanisms under severe oxidative stress. *Mol Syst Biol* 6:393
- Khosraneh M, Mahmoudi A, Rahimi H, Nazari K, Moosavi-Movahedi AA** (2007) Suicide-peroxide inactivation of microperoxidase-11: a kinetic study. *J Enzyme Inhib Med Chem* 22:677–684
- Kim SJ, Shoda M** (1999a) Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Appl Environ Microbiol* 65:1029–1035
- Kim SJ, Ishikawa K, Hirai M, Shoda M** (1995) Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. *J Ferment Bioeng* 79:601–607
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA** (2008) Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. CAB International, Wallingford
- Koch-Schmidt AC, Mosbach K** (1977b) Studies on conformation of soluble and immobilized enzymes using differential scanning calorimetry. 2. Specific activity and thermal stability of enzymes bound weakly and strongly to sepharose CL 4B. *Biochem* 16:2105–2109
- Kozak M** (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12:857–872
- Krügener S, Krings U, Zorn H, Berger RG** (2010) A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation. *Bioresour Technol* 101:457–462
- Kühn H, Saam J, Eibach S, Holzhütter HG, Ivanov I, Walther M** (2005) Structural biology of mammalian lipoxygenases: Enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure. *Biochem Biophys Res Commun* 338:93–101
- Kühn H, Thiele BJ** (1999) The diversity of the lipoxygenase family. *FEBS Lett* 449:7–11

- Kühn H, Walther M, Kuban RJ** (2002) Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases: Structure, function, and biological implications. *Prostag Oth Lipid M* 68–69:263–290
- Kuribayashi T, Kaise H, Uno C, Hara T, Hayakawa T, Joh T** (2002) Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *J Agric Food Chem* 50:1247–1253
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Langhoff S** (2002) Carotinoid abbauende Enzymaktivitäten aus Mikroorganismen. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG** (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948
- Levin L, Forchiassin F, Viale A** (2005) Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Proc Biochem* 40:1381–1387
- Li DC, Lui ZW, Lu J** (2001) Purification and characterization of lipoxygenase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycol Res* 105:190–194
- Liavonchanka A, Feussner I** (2006) Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol* 163:348–357
- Liers C, Aranda E, Strittmatter E, Piontek K, Plattner DA, Zorn H, Ullrich R, Hofrichter M** (2013a) Phenol oxidation by DyP-type peroxidases in comparison to fungal and plant peroxidases. *J Mol Catal B: Enzym* 103:41–46
- Liers C, Bobeth C, Pecyna M, Ullrich R, Hofrichter M** (2010) DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1869–1879
- Liers C, Pecyna MJ, Kellner H, Worrich A, Zorn H, Steffen KT, Hofrichter M, Ullrich R** (2013b) Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5839–5849
- Linde D, Coscolín C, Liers C, Hofrichter M, Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ** (2014) Heterologous expression and physicochemical characterization of a fungal dye-decolorizing peroxidase from *Auricularia auricula-judae*. *Protein Expres Purif* 103:28–37
- Linde D, Pogni R, Cañellas M, Lucas F, Guallar V, Baratto MC, Sinicropi A, Sáez-Jiménez V, Coscolín C, Romero A, Medrano FJ, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT** (2015a) Catalytic surface radical in dye-decolorizing peroxidase: a computational, spectroscopic and site-directed mutagenesis study. *Biochem J* 466:253–262

- Linde D, Ruiz-Dueñas FJ, Fernández-Fueyo E, Guallar V, Hammel KE, Pogni R, Martínez AT** (2015b) Basidiomycete DyPs: Genomic diversity, structural–functional aspects, reaction mechanism and environmental significance. *Arch Biochem Biophys* 574:66–74
- Lis H, Sharon N** (1993) Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 218:1–27
- Listiyani MAD, Campbell RE, Miracle RE, Barbano DM, Gerard PD, Drake MA** (2011) Effect of temperature and bleaching agent on bleaching of liquid cheddar whey. *J Dairy Sci* 95:36–49
- Lottspeich F, Zorbas H** (2006) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Lundell TK, Mäkelä MR, Hildén K** (2010) Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. *J Basic Microbiol* 50:5–20
- Maccarrone M, Salucci ML, Zadelhoff G van, Malatesta F, Veldink G, Vliegthart JF, Finazzi-Agro A** (2001) Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability. *Biochem* 40:6819–6827
- Marchler-Bauer A et al.** (2009) CDD: specific functional annotation with the conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 37:D205–D210
- Martin H, Ruck C, Schmidt M, Sell S, Beutner S, Mayer B, Walsh R et al.** (1999) Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. *Pure Appl Chem* 71:2253–2262
- Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Duenas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillen FMMJ, Gutierrez A, del Rio JC** (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8:195–204
- Martínez AT** (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb Technol* 30:425–444
- Martínez MJ, Ruiz-Duenas FJ, Guillen F, Martínez AT** (1996) Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 237:424–432
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R** (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Tech* 40:1451–1463
- McDonnell MW, Simon MN, Studier FW** (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* 110:119–146
- McDonough FE, Hargrove RE, Tittsler RP** (1968) Decolorization of annatto in cheddar cheese whey. *J Dairy Sci* 51:471–472
- McIlvaine TC** (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem* 49:183–186

- Mei G, Venere AD, Nicolai E, Angelucci CB, Ivanov I, Sabatucci A, Dainese E, Kuhn H, Mac-carrone M** (2008) Structural properties of plant and mammalian lipoxygenases. Temperature-dependent conformational alterations and membrane binding ability. *Biochem* 47:9234–9242
- Mester T, Field JA** (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* Species strain BOS55 in the absence of manganese. *J Biol Chem* 273:15412–15417
- Minor W, Steczko J, Bolin JT, Otwinowski Z, Axelrod B** (1993) Crystallographic determination of the active site iron and its ligands in soybean lipoxygenase L-1. *Biochem* 32:6320–6323
- Minor W, Steczko J, Stec B, Otwinowski Z, Bolin JT, Walter R, Axelrod B** (1996) Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochem* 35:10687–10701
- Miyazawa M, Nakamura Y, Ishikawa Y** (2000) Insecticidal sesquiterpene from *Alpinia oxyphylla* against *Drosophila melanogaster*. *J Agric Food Chem* 48:3639–3641
- Miyazawa M, Tougo H, Ishihara M** (2001) Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oil from *Citrus paradisi*. *Nat Prod Lett* 15:205–210
- Miyazawa M, Watanabe H, Kameoka H** (1997) Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton. *J Agric Food Chem* 45:677–679
- Morales M, Mate MJ, Romero A, Martínez MJ, Martínez ÁT, Ruiz-Dueñas FJ** (2012) Two oxidation sites for low redox potential substrates: a directed mutagenesis, kinetic, and crystallographic study on *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase. *J Biol Chem* 287:41053–41067
- Morgenstern I, Klopman S, Hibbett DS** (2008) Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the Agaricomycetes. *J Mol Evol* 66:243–257
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT** (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24:954–962
- Moshonas MG, Shaw PE** (1979) Composition of essence oil from overripe oranges. *J Agric Food Chem* 27:1337–1339
- Muller B, Dean C, Schmidt C, Kuhn J** (1998) Process for the preparation of nootkatone. US Patent US5847226.
- Müller E, Loeffler W** (1992) Mykologie. Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Nakane PK, Kawaoi A** (1974) Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* 22:1084–1091
- Nie G, Reading NS, Aust SD** (1999) Relative stability of recombinant versus native peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 365:328–334
- Ohloff G** (1994) Scent and fragrances: The fascination of odors and their chemical perspectives. Springer, Berlin

- Oliw EH** (2002) Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:313–323
- Otjen L, Blanchette RA** (1986) A discussion of microstructural changes in wood during decomposition by white-rot basidiomycetes. *Can J Bot* 64:905–911
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T** (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4:2411–2423
- Pagni M, Ioannidis V, Cerutti L, Zahn-Zabal M, Jongeneel CV, Hau J, Martin O, Kuznetsov D, Falquet L** (2007) MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res* 35:W433–W437
- Paszczyński A, Huynh VB, Crawford R** (1986) Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 244:750–765
- Patel N, Davies MC, Hartshorne M, Heaton RJ, Roberts CJ, Tandler SJB, Williams PM** (1997) Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* 13:6485–6490
- Pearson WR** (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol* 183:63–98
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de La Rubia T, Martínez J** (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *Int Microbiol* 5:53–63
- Perraud X, Kermasha S, Bisakowski B** (1999) Characterization of a lipoxygenase extract from *Geotrichum candidum*. *Process Biochem* 34:819–827
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE** (2004) UCSF Chimera — A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 29:2002–2007
- Plagemann I, Zelena K, Arendt P, Ringel PD, Krings U, Berger RG** (2013) LOX_{Psa1}, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *J Mol Catal B: Enzym* 87:99–104
- Pretzel J, Fritz-Wolf K, Schmidt K, Szweda R, Stumpf M, Rahlfs S, Zorn H, Becker K** (2012) Crystallization and mutagenesis of *Mycetinis scorodoni* Peroxidase-1. In: Rojas-Macías M, Subramaniam S, Selvakumar B (Hrsg.) 5th GGL Conference on Life Sciences, Abstract book, International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences, Gießen, S. 156
- Prigge S, Boyington J, Faig M, Doctor K, Gaffney B, Amzel L** (1997) Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie* 79:629–636
- Pühse M, Szweda RT, Ma Y, Jeworrek C, Winter R, Zorn H** (2009) *Marasmius scorodoni* extracellular dimeric peroxidase — Exploring its temperature and pressure stability. *Biochim Biophys Acta* 1794:1091–1098

- Punta M, Cogill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Bournnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD** (2012) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 40:D290–D301
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R** (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 33:W116–W120
- Radford SE** (2000) Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* 25:611–618
- Rao SV, Anderson KW, Bachas LG** (1998) Oriented immobilization of proteins. *Microchim Acta* 128:127–143
- Rehm H** (2002) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Riemer SJL** (2010) *Molekulare Charakterisierung neuartiger Biokatalysatoren aus Basidiomyceten*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, García E, Miki Y, Martínez MJ, Martínez AT** (2009) Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J Exp Bot* 60:441–452
- Rusmini F, Zhong Z, Feijen J** (2007) Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* 8:1775–1789
- Sakamaki H, Itoh Ki, Taniai T, Kitanaka S, Takagi Y, Chai W, Horiuchi CA** (2005) Biotransformation of valencene by cultured cells of *Gynostemma pentaphyllum*. *J Mol Catal B: Enzym* 32:103–106
- Salvachúa D, Prieto A, Martínez ÁT, Martínez MJ** (2013) Characterization of a novel Dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Appl Environ Microbiol* 79:4316–4324
- Sambrook J, Russell DW** (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Samuelsson B, Dahlen S, Lindgren J, Rouzer C, Serhan C** (1987) Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237:1171–1176
- Saparrat MCN, Guillen F, Arambarri AM, Martínez AT, Martínez MJ** (2002) Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white-rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl Environ Microbiol* 68:1534–1540
- Sarkanen K, Ludwig C** (1971) *Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley Interscience, New York
- Sato T, Hara S, Matsui T, Sasaki G, Saijo S, Ganbe T, Tanaka N, Sugano Y, Shoda M** (2004) A unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1: heterologous expression, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallogr Sect D: Biol Crystallogr* 60:149–152

- Scheibner M** (2006) Identifizierung und Charakterisierung carotinoidabbauender Enzyme aus Basidiomyceten. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Scheibner M, Hülsdau B, Zelena K, Nitz M, Boer L, Berger RG, Zorn H** (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodoni* degrade β -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1241–1250
- Schmidt K, Fraatz MA, Riemer SJL, Zelena K, Linke D, Berger RG, Zorn H** (2011) A novel oxygenase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* oxidizes valencene to nootkatone. In: Hofmann T, Meyerhof W, Schieberle P (Hrsg.) *Advances and challenges in flavor chemistry & biology*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München, S. 235–241
- Schomburg I, Chang A, Schomburg D** (2002) BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Res* 30:47–49
- Schrumpf G et al.** (2007) *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Arbeiten*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Schwarze FW, Engels J, Mattheck C** (2000) *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer, Berlin
- Scott GM, Akhtar M** (2001) Biotechnological applications of lignin-degrading fungi (white-rot fungi). In: Hofrichter M, Steinbüchel A (Hrsg.) *Lignin, humic substances and coal*, Wiley-VCH, Weinheim, S. 181–207
- Scotter MJ, Wilson LA, Appleton GP, Castle L** (1998) Analysis of Annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J Agric and Food Chem* 46:1031–1038
- Scragg AH** (2007) The production of flavours by plant cell cultures. In: Berger RG (Hrsg.) *Flavours and fragrances*, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 599–600
- Serhan CN** (2004) Clues for new therapeutics in osteoporosis and periodontal disease: New roles for lipoxygenases? *Expert Opin Ther Tar* 8:643–652
- Shuman S** (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using *Vaccinia* DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269:32678–32684
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG** (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539
- Singh R, Grigg JC, Qin W, Kadla JF, Murphy MEP, Eltis LD** (2013) Improved manganese-oxidizing activity of DypB, a peroxidase from a lignolytic bacterium. *ACS Chem Biol* 8:700–706
- Sørensen HP, Mortensen KK** (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4:1–8
- Southern E** (1979) Gel electrophoresis of restriction fragments. In: Wu R (Hrsg.) *Methods in enzymology*, Bd. 68 : Recombinant DNA. Academic Press, New York, S. 152–176

- Spadiut O, Posch G, Ludwig R, Haltrich D, Peterbauer CK** (2010) Evaluation of different expression systems for the heterologous expression of pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor* in *E. coli*. *Microbial Cell Factories* 9:1–9
- Sprecher E** (1959) Über die Guttation bei Pilzen. *Planta* 53:565–574
- Sprecher E, Hanssen HP** (1982) Influence of strain specificity and culture conditions on terpene production by fungi. *Planta Med* 44:41–43
- Steczko J, Donoho GA, Dixon JE, Sugimoto T, Axelrod B** (1991) Effect of ethanol and low-temperature culture on expression of soybean lipoxygenase L-1 in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif* 2:221–227
- Steinbüchel A** (2006) Nachwachsende Rohstoffe für die Weiße Biotechnologie. In: Heiden S, Zinke H (Hrsg.) *Weiße Biotechnologie — Industrie im Aufbruch*, Biocom AG, Berlin, S. 76–91
- Strittmatter E, Liers C, Ullrich R, Wachter S, Hofrichter M, Plattner DA, Piontek K** (2013) First crystal structure of a fungal high-redox potential dye-decolorizing peroxidase: Substrate interaction sites and long-range electron transfer. *J Biol Chem* 288:4095–4102
- Strittmatter E, Serrer K, Liers C, Ullrich R, Hofrichter M, Piontek K, Schleicher E, Plattner DA** (2015) The toolbox of *Auricularia auricula-judae* dye-decolorizing peroxidase – Identification of three new potential substrate-interaction sites. *Arch Biochem Biophys* 574:75–85
- Su C, Ollivier EH** (1998) Manganese lipoxygenase: purification and characterization. *J Biol Chem* 273:13072–13079
- Sudharshan E, Rao AA** (1997) Rapid method to separate the domains of soybean lipoxygenase-1: identification of the interdomain interactions. *FEBS Lett* 406:184–188
- Suelter CH** (1990) *Experimentelle Enzymologie. Grundlagen für die Laborpraxis*. Fischer-Verlag, Stuttgart
- Sugano Y** (2009) DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell Mol Life Sci* 66:1387–1403
- Sugano Y, Nakano R, Sasaki K, Shoda M** (2000) Efficient heterologous expression in *Aspergillus oryzae* of a unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, of *Geotrichum candidum* Dec 1. *Appl Environ Microbiol* 66:1754–1758
- Sugano Y, Ishii Y, Shoda M** (2004) Role of H164 in a unique dye-decolorizing heme peroxidase DyP. *Biochem Biophys Res Commun* 322:126–132
- Sugano Y, Matsushima Y, Shoda M** (2006) Complete decolorization of the anthraquinone dye Reactive Blue 5 by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:862–871
- Sugano Y, Muramatsu R, Ichiyanagi A, Sato T, Shoda M** (2007) DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family. ASP171 replaces the distal histidine of classical peroxidases. *J Biol Chem* 282:36652–36658

- Szweda RT, Schmidt K, Zorn H** (2013) Bleaching of colored whey and milk by a multiple-enzyme system. *Eur Food Res Technol* 237:377–384
- Tanford C** (1961) *Physical chemistry of macromolecules*. John Wiley & Sons Inc., New York
- Tasaki Y, Toyama S, Kuribayashi T, Joh T** (2013) Molecular characterization of a lipoxygenase from the basidiomycete mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:38–45
- Tassaneeyakul W, Guo L-Q, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y** (2000) Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys* 378:356–363
- Taubert J, Krings U, Berger RG** (2000) A comparative study on the disintegration of filamentous fungi. *J Microbiol Methods* 42:225–232
- Theorell H, Maehly AC** (1950) Synthetic peroxidases. *Acta Chem Scand* 4:422–434
- Thomas PE, Ryan D, Levin W** (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome *P*-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 75:168–176
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Tien M, Kirk TK** (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: Wood WA, Kellogg ST (Hrsg.) *Methods in enzymology*, Bd. 161 : Biomass part b: lignin, pectin, and chitin. Academic Press, New York, S. 238–249
- Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T** (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression Purif* 28:1–8
- Valderrama B, Vazquez-Duhalt R** (2005) Electron-balance during the oxidative self-inactivation of cytochrome c. *J Mol Catal B: Enzym* 35:41–44
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME** (2009) *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Walt DR, Agayn VI** (1994) The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends Anal Chem* 13:425–430
- Wang SSS, Hung YT, Lin YC** (2010) Kinetic studies of the oxidation of glutathione in protein refolding buffer. *Bioprocess Biosyst Eng* 33:277–286
- Wang Y, Geer LY, Chappay C, Kans JA, Bryant SH** (2000) Cn3D: sequence and structure views for Entrez. *Trends Biochem Sci* 25:300–301
- Wang Y, Vazquez-Duhalt R, Pickard MA** (2002) Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Curr Microbiol* 45:77–87

Ward G, Hadar Y, Bilkis I, Dosoretz CG (2003) Mechanistic features of lignin peroxidase-catalyzed oxidation of substituted phenols and 1,2-dimethoxyarenes. *J Biol Chem* 278:39726–39734

Wariishi H, Valli K, Gold MH (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J Biol Chem* 267:23688–23695

Welinder KG, Mauro JM, Nørskov-Lauritsen L (1992) Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochem Soc Trans* 20:337–340

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Hrsg.) *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, S. 315–322

Wilhelm J (2003a) Entwicklung *Real-time*-PCR-basierter Methoden für die moderne DNA-Analytik. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

Wilhelm J, Pingoud A (2003b) *Real-time* polymerase chain reaction. *ChemBioChem* 4:1120–1128

Winterhalter P (1996) Carotenoid-derived aroma compounds: Biogenetic and biotechnological aspects. In: Takeoka GR, Teranishi R, Williams PJ, Kobayashi A (Hrsg.) *Biotechnology for improved foods and flavours*, ACS symposium series 637. American Chemical Society, Washington DC, S. 295–308

Winterhalter P, Rouseff R (2002) Carotenoid-derived aroma compounds: An introduction. In: Winterhalter P, Rouseff R (Hrsg.) *Carotenoid-derived aroma compounds*, ACS symposium series 802. American Chemical Society, Washington DC, S. 1–17

Witemann A, Haupt B, Guo X, Ballauff M (2001) Fixation of proteins onto the surface of functionalized polymer particles. In: Kreysa G (Hrsg.) *DECHEMA Monographien*, Vol. 137. 7th International Workshop on Polymer Reaction Engineering. Wiley-VCH

Yamazaki I, Piette LH (1963) The mechanism of aerobic oxidase reaction catalyzed by peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 77:47–64

Yoshida T, Sugano Y (2015) A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family. *Arch Biochem Biophys* 574:49–55

Yoshida T, Tsuge H, Hisabori T, Sugano Y (2012) Crystal structures of dye-decolorizing peroxidase with ascorbic acid and 2,6-dimethoxyphenol. *FEBS Lett* 586:4351–4356

Yoshida T, Tsuge H, Konno H, Hisabori T, Sugano Y (2011) The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue. *FEBS J* 278:2387–2394

Zabel RA, Morrell JJ (1992) *Wood microbiology: Decay and its prevention*. Academic Press, San Diego

Zámocký M, Furtmüller PG, Bellei M, Battistuzzi G, Stadlmann J, Vlasits J, Obinger C (2009) Intracellular catalase/peroxidase from the phytopathogenic rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: expression analysis and biochemical characterization of the recombinant protein. *Biochem J* 418:443–451

Zelena K, Krings U, Berger RG (2012) Functional expression of a valencene dioxygenase from *Pleurotus sapidus* in *E. coli*. *Bioresour Technol* 108:231–239

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7:203–214

Zhu BCR, Henderson G, Chen F, Maistrello L, Laine R (2001) Nootkatone is a repellent for Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*). *J Chem Ecol* 27:523–531

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

Zorn H, Peters T, Nimitz M, Berger RG (2005) The secretome of *Pleurotus sapidus*. *Proteomics* 5:4832–4838

Zubieta C *et al.* (2007a) Identification and structural characterization of heme binding in a novel dye-decolorizing peroxidase, TyrA. *Proteins* 69:234–243

Zubieta C *et al.* (2007b) Crystal structures of two novel dye-decolorizing peroxidases reveal a beta-barrel fold with a conserved heme-binding motif. *Proteins* 69:223–233

7 Anhang

7.1 Herstellungsverfahren der Silica-Monolithen und Funktionalisierung

Das Herstellungsverfahren und das Verfahren zur Funktionalisierung der Silica-Monolithen wurden von Herrn Till von Graberg (AG Prof. Dr. Smarsly, Physikalisch-Chemisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

7.1.1 Herstellungsverfahren

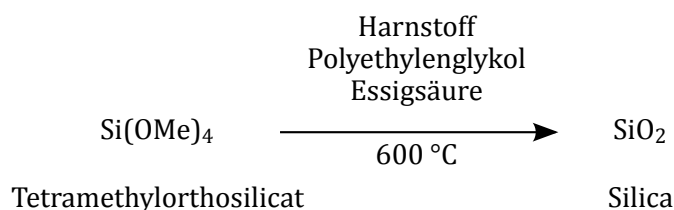


Abbildung 7.1: Reaktionsdarstellung der Synthese von Silica-Monolithen

Reaktionsansatz

Tetramethylorthosilicat	5,6 mL
Harnstoff	0,908 g
0,01 M Essigsäure	10,0 mL
Polyethylenglykol 10 000	1,136 g

Durchführung:

Polyethylenglykol und Harnstoff wurden unter Rühren in 0,01 M Essigsäure gelöst (10–15 min). Anschließend wurde die klare Lösung unter Rühren 20 min im Eisbad gekühlt. Nach Zugabe von Tetramethylorthosilicat wurde die Lösung weitere 20 min im Eisbad gerührt und anschließend durch einen 0,2 µm Spritzenfilter filtriert. Die filtrierte Lösung wurde in ein Zentrifugenröhrchen als Formgeber gefüllt, verschlossen und für 24 h auf 25 °C im Wasserbad temperiert (während der ersten 30–40 min alle 5–10 min schwenken). Das verschlossene Gefäß wurde anschließend von Raumtemperatur innerhalb von 10 h auf 80 °C erhitzt. Nach 4 h bei 80 °C und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Großteil des noch enthaltenen Polyethylenglykols durch dreimaliges

Waschen in Methanol (24 h) extrahiert. Zuletzt wurde der Monolith innerhalb von 10 h auf 600 °C erhitzt und dort für 4 h kalziniert.

7.1.2 Funktionalisierung

Reagenzien

97% 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS)	290 mg
95% N-Methyl-3-aminopropyltrimethoxysilan (MAPTMS)	316 mg
Bernsteinsäureanhydrid	115 mg

Durchführung:

Für die Funktionalisierung wurden 290 mg APTMS bzw. 316 mg MAPTMS in 30 mL Dichlormethan gelöst und die Monolithen mit dieser Lösung imprägniert (6 h). Nach der Imprägnierung wurden die Silica-Monolithen dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Zur Säurefunktionalisierung wurden die mit MAPTMS imprägnierten Monolithen mit einer wässrigen Bernsteinsäureanhydridlösung inkubiert (2 h).

7.1.3 Elementaranalyse

Zur Überprüfung der Funktionalisierung wurden mit den Silica-Monolithen Elementaranalysen vorgenommen. Durch die deutliche Erhöhung des Wasserstoff- und Kohlenstoffanteils wurde von einer erfolgreichen Funktionalisierung mit APTMS, MAPTMS und MAPTMS mit Bernsteinsäureanhydrid ausgegangen.

7.2 Größenstandards

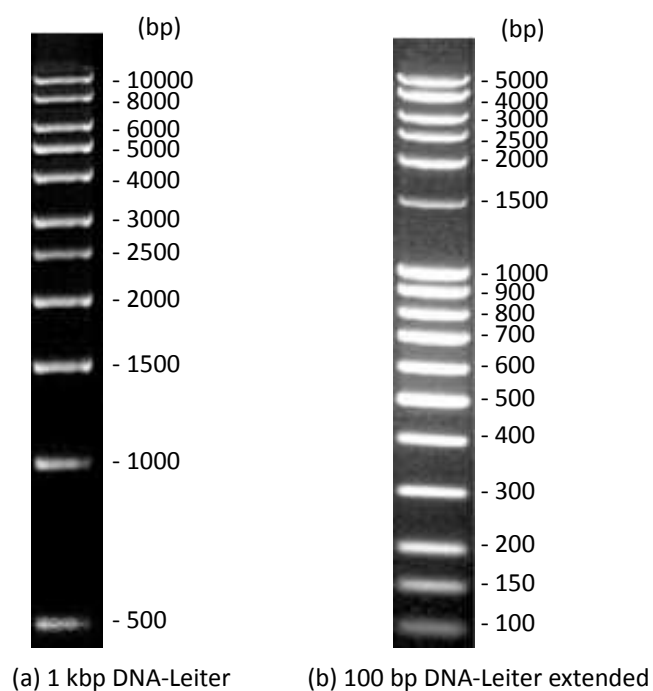


Abbildung 7.2: DNA-Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese (Bildquelle: *Gebrauchsanweisung 1 kbp DNA-Leiter bzw. 100 bp DNA-Leiter extended*, März 2011, Carl Roth, modifiziert)

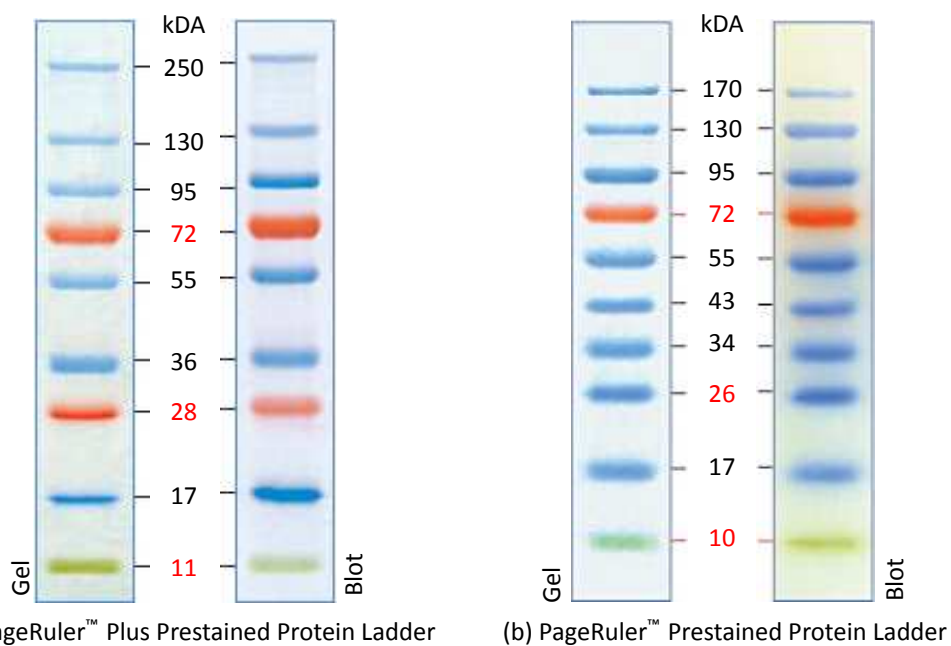


Abbildung 7.3: Proteingrößenstandards für SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot (Bildquelle: *Product Information Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder bzw. PageRuler Prestained Protein Ladder*, 2012, Thermo Fisher, modifiziert)

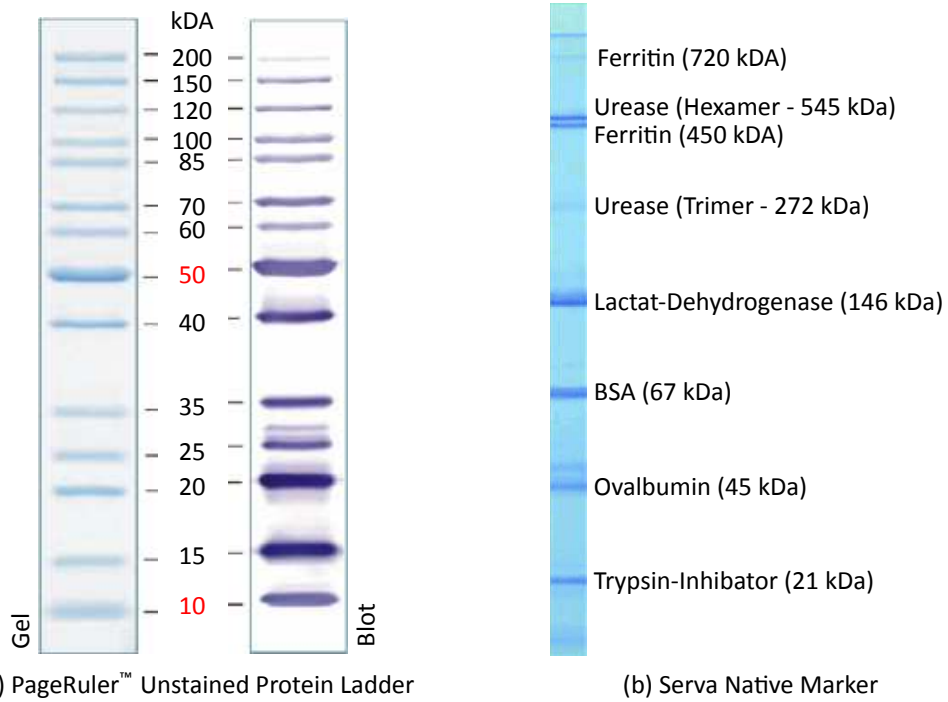


Abbildung 7.4: Proteingrößenstandards für (a) SDS-PAGE ohne anschließendem Western Blot (b) native PAGE (Bildquelle: (a) *Product Information Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder*, 2012, Thermo Fisher, modifiziert (b) *Instruction Manual SERVA Native Marker Liquid Mix for BN/CN*, Version 0609, Serva, modifiziert)

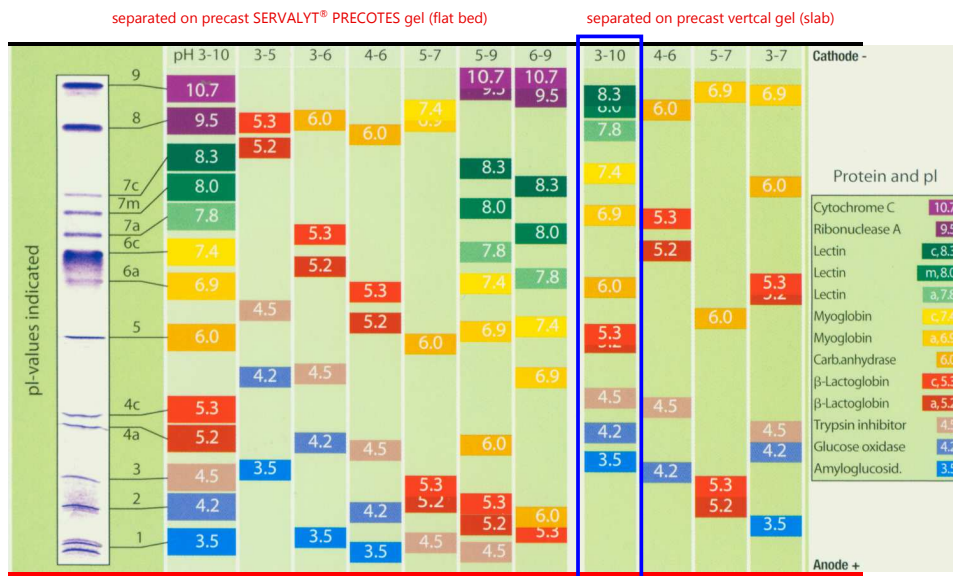


Abbildung 7.5: IEF Marker pH 3-10; Proteingrößenstandard für isoelektrische Fokussierung (Bildquelle: *Manual IEF Markers 3-10, SERVA Liquid Mix*, Invitrogen, modifiziert)

7.3 Vektorkarte, pCR[®] 2.1-TOPO[®]-Vektor

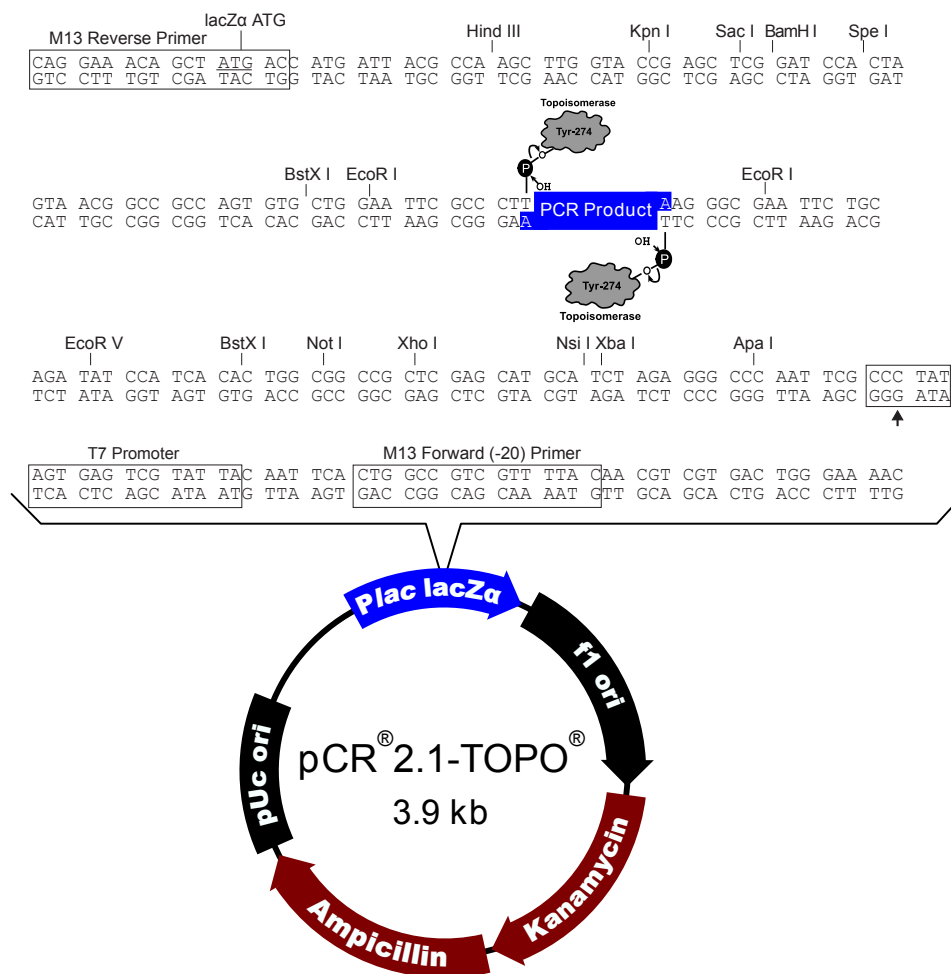


Abbildung 7.6: Vektorkarte des Klonierungsvektors pCR[®] 2.1-TOPO[®]; Plac: lacPromotor, lacZα: β -Galaktosidasegen, Kanamycin: Kanamycinresistenzgen, Ampicillin: Ampicillinresistenz, pUC origin: *high copy*-Replikationsursprung (Bildquelle: *User guide TOPO[®] TA Cloning[®] Kit*, Publikationsnummer 25-0184, Revisionsdatum 13. März 2012, Life Technologies, modifiziert)