

**Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Institut für Lebensmittelchemie und  
Lebensmittelbiotechnologie**

**Das ligninolytische System von *Pleurotus sapidus*:  
Transkriptomanalyse und heterologe Expression einer  
Arylalkoholoxidase.**

**Dissertation**

**zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
Dr. rer. nat.**

**im Fachbereich Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von**

**Dipl.-Biol. Ilya Galperin  
aus Dnepropetrowsk, Ukraine**

**Gießen, 2018**

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Rühl  
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Czermak  
Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie  
Technische Hochschule Mittelhessen

Ich erkläre hiermit: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, 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. 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 zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen,

---

Ilya Galperin

## Danksagung

An dieser Stelle würde ich mich gerne bei allen Menschen bedanken, die mir bei meiner Promotion geholfen haben. In den fünf Jahren sind mir viele Menschen begegnet und ich hoffe, dass ich hier niemanden vergesse.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Rühl, der mir die Möglichkeit gab diese Arbeit anzufertigen und mich dabei exzellent betreute. Ich konnte während der Arbeit immer auf seinen Rat zählen. Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak danke ich dafür, dass er sich bereit erklärt hat ein Gutachter der Dissertation zu sein. Prof. Dr. Rod Snowdon und Prof. Dr. Sylvia Schnell danke ich für den Beitritt zur Prüfungskommission. Außerdem danke ich Prof. Dr. Rod Snowdon und Dr. Christian Obermeier für die Möglichkeit in ihrem Labor die RNA-Sequenzierung durchzuführen.

Prof. Dr. Alexander Goesmann und Oliver Rupp danke ich für die Hilfe bei der bioinformatischen Auswertung meiner Daten.

Allen Mitgliedern des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, konstruktive Diskussionen und Hilfsbereitschaft. Es sind zu viele, dass ich sie hier alle aufzählen könnte, aber ich möchte zumindest Adrian Imami, Marcus Schulze und Marco Binsch nicht unerwähnt lassen. Es war eine schöne Zeit für mich am LCB zu arbeiten und ich habe auch neue Freunde gefunden.

Den Studenten und Studentinnen, die ihre Abschlussarbeiten unter meiner Aufsicht angefertigt haben, danke ich für ihre Mitarbeit. Saskia Waldschmidt danke ich für die Aufnahmen der Pilze.

Bei meiner Familie und meiner Freundin Daria möchte ich für die moralische Unterstützung und Motivation bedanken. Danke dass Ihr an mich geglaubt habt.

# Veröffentlichungen

## Publikationen

Galperin, I, Javeed, A, Luig, H, Lochnit, G, Rühl, M (2016) An aryl-alcohol oxidase of *Pleurotus sapidus*: heterologous expression, characterization, and application in a 2-enzyme system. Appl Microbiol Biotechnol 100(18):8021-8030 DOI:10.1007/s00253-016-7567-8

Galperin I, Rupp O, Goesmann A, Rühl M (2017) RNA-seq reveals differences in expression levels of CAZy genes within cultures of *Pleurotus sapidus*; eingereicht bei BMC Genomics

## Tagungsbeiträge

### Vorträge

Galperin I, Lauber C, Javeed A, Zorn H, Rühl M (2014) Development of a two-enzyme system comprising of an aryl-alcohol oxidase and a dye-decolourising peroxidase. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Dresden, 5.-8. Oktober 2014

### Poster

Galperin I, Rupp O, Goesmann A, Rühl M (2014) The transcriptome of *Pleurotus sapidus*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Dresden, 5.-8. Oktober 2014

## Zusammenfassung

Die meisten Speisepilze gehören zu den Basidiomyceten. Neben ihrer Rolle als Nahrungsquelle haben sie auch ein erhebliches biotechnologisches Potential. Sie sind mit ihren Enzymen in der Lage durch Weiß- und Braunfäule Lignin und Cellulose im toten Holz zu zersetzen. Einige dieser Enzyme werden bereits industriell genutzt und die Pilze sind deswegen von großem wirtschaftlichen und wissenschaftlichen Interesse im Bereich der nachhaltigen Biotechnologie und der Nutzung erneuerbarer Ressourcen.

In dieser Studie wurde das Transkriptom des mit dem Austernseitling *Pleurotus ostreatus* verwandten Weißfäulepilzes *Pleurotus sapidus* mittels RNA-Sequenzierung analysiert. Der Pilz wurde dafür in Submers- und Emerskulturen mit Rapsstroh als Kohlenstoffquelle kultiviert und an vier Zeitpunkten untersucht. Die Sequenzierung ergab 20,58 Millionen *paired-end reads* (2x150 bp lang). Die Transkripte wurden *de novo* assembliert und mittels des Genoms des verwandten *P. ostreatus* annotiert. Von 30.680 Contigs wurden 4.551 an unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung differentiell transkribiert. Der Schwerpunkt der Analyse lag dabei auf Enzymen, wie Peroxidasen, Laccasen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierenden Enzymen, die am Ligninabbau beteiligt sind. Die Änderungen in der Transkription entsprechender Gene wurden bei einigen Genen zusätzlich mittels RT-qPCR validiert. Übereinstimmungen zwischen RNA-Seq und RT-qPCR Ergebnissen wurden vor allem bei stärker transkribierten Genen festgestellt. Zusätzlich wurden mehrere Enzymaktivitätsassays durchgeführt. Die am stärksten transkribierten Peroxidasen waren *vp2*, *vp3* und *mnp3*, die vor allem in Emerskulturen zusammen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierenden Enzymen höhere Transkriptionsraten aufwiesen.

Neben der Transkriptomanalyse von *P. sapidus* wurde der Pilz *Coprinopsis cinerea* mit dem Gen einer Arylalkoholoxidase (AAO) aus *P. sapidus* transformiert. Bei AAO handelt es sich um ein Enzym, das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generiert, das für die Reaktion von Peroxidasen benötigt wird. In *P. sapidus* wurde relativ wenig natives AAO exprimiert. Für die Transformation wurde ein Vektor mit *gpdII*-Promotor und *aao* samt nativer Signalpeptidsequenz mittels homologer Rekombination in *Saccharomyces cerevisiae* erzeugt. Die AAO wurde in *C. cinerea* erfolgreich heterolog exprimiert und sekretiert. Es handelte sich dabei um die erste erfolgreiche rekombinante Produktion einer AAO in einem Basidiomyceten bzw. um die erste heterologe Expression einer Oxidase in *C. cinerea*. Das Enzym wurde gereinigt, und mittels SDS-PAGE, Western Blot und Peptidmassenfingerprint untersucht. Die Glykosylierung, die 11% des Molekulargewichtes betrug, entsprach der Glykosylierung nativer AAOs verwandter Pilze. Die AAO wurde biochemisch charakterisiert indem die Kinetik des Enzyms nach Michaelis-Menten, der isoelektrische Punkt, sowie pH und Temperaturoptima bestimmt wurden. pH-Optimum lag bei pH 5 und pI bei 4,2. Die Enzymkinetik ähnelte der von AAOs aus verwandten

Pilzen. Die AAO aus *P. sapidus* wurde in *C. cinerea* korrekt prozessiert. In einem Zwei-Enzym-Assay wurde eine DyP-Typ Peroxidase von AAO effektiv mit  $H_2O_2$  versorgt. Um die Ausbeute an AAO zu erhöhen, wurden verschiedene Kulturmedien und Kultivierungsbedingungen getestet. Mit dem Einsatz des modifizierten Kjalke-Mediums konnte die Enzymaktivität im Kulturüberstand um das Fünffache gesteigert werden. Die Kultivierung im akustischen Resonanzmischer brachte dagegen keine Vorteile im Vergleich zur Kultivierung in Schüttelkolben oder Bioreaktor. Insgesamt erwies sich *C. cinerea* als eine vielversprechende Plattform für die heterologe Expression pilzlicher Enzyme.

## Abstract

Almost all edible fungi belong taxonomically to basidiomycetes. Besides their value as a food source, they also have a considerable biotechnological potential. They are able to degrade lignin and cellulose in dead wood with their enzymes during processes known as white or brown rot. Some of these enzymes are already used in the industry, but most of this fungal bioresource is still unknown and, thus, of great scientific and economic interest in the area of sustainable biotechnology and renewable resources.

In this study, the transcriptome of *Pleurotus sapidus*, a mushroom related to the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*, was analyzed by means of RNA sequencing. The fungus was cultivated in liquid and solid-state cultures with rapeseed straw as a carbon source. The sequencing resulted in 20.58 Million 150 bp paired-end reads. The transcripts were *de novo* assembled and annotated with the genome of related *P. ostreatus*. Out of 30,680 contigs 4,551 showed an altered transcription pattern during different time-points of cultivation. The main emphasis of the analysis were enzymes, such as peroxidases, laccases and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating enzymes, that are involved in degradation of lignin. The changes in transcription of correspondent genes was additionally validated by means of RT-qPCR for some of the genes detected in the transcriptome. Highly transcribed genes showed similar results in RNA-Seq and RT-qPCR experiments. Whereas the comparability of RNA-Seq and RT-qPCR data was reduced or not possible for genes with a low transcription. Additionally, several enzyme assays were carried out. The highest transcribed peroxidases were *vp2*, *vp3* and *mnp3*, especially in solid-state cultures, where they had high transcription rates, together with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating enzymes.

Besides the analysis of the transcriptome of *P. sapidus*, the fungus *C. cinerea* was transformed with a gene coding for an aryl-alcohol oxidase (AAO) of *P. sapidus*. AAO is an enzyme that produces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> needed for the reaction of peroxidases. *P. ostreatus* expressed a relatively low amount of native AAO. For the transformation, a vector containing *gpdII*-Promotor and *aao* with native signal peptide sequence was created by means of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. The recombinant AAO was successfully expressed and secreted by *C. cinerea*. It was the first recombinant production of an AAO in a basidiomycete or an oxidase in *C. cinerea*. The enzyme was purified and examined via SDS-PAGE, Western Blot and peptide mass fingerprinting. The glycosylation of 11% of the molecular weight corresponded with the glycosylation of native AAO of related mushrooms. AAO was characterized by determination of Michaelis-Menten kinetics with three substrates, isoelectric point, as well as the pH and temperature optima. The pH optimum was pH 5 and pI was 4.2. The enzyme kinetic was similar to kinetics of AAOs from related fungi. AAO was processed



correctly in *C. cinerea*. In a two-enzyme assay, the AAO effectively supplied a dye-decolourising peroxidase with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Different culture media and conditions were evaluated in order to increase the AAO yield in liquid culture of the AAO transformant. The usage of modified Kjalke-Medium lead to a fivefold increase of enzyme activity in supernatant. Cultivation in an acoustic resonance mixing system was not advantageous compared to cultivations in shake flasks or in stirred bioreactors. In total, *C. cinerea* proved itself as a promising platform for heterologous expression of fungal enzymes.

# INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... XIII

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Theoretischer Hintergrund.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Biotechnologie und Biokraftstoffe .....	1
1.1.2. Enzyme aus Pilzen, und deren Einsatzmöglichkeiten in Biotechnologie .....	2
1.1.3. Transkriptomanalyse.....	5
<b>1.2. Ziele .....</b>	<b>6</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Verwendete Geräte.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. Verwendete Materialien .....</b>	<b>9</b>
2.2.1. Chemikalien .....	9
2.2.2. Enzyme .....	12
2.2.3. Kits .....	13
2.2.4. Plasmide .....	13
2.2.5. Primer.....	13
2.2.6. FPLC-Säulen.....	14
2.2.7. Größenstandards .....	15
2.2.8. Filtrationszubehör .....	15
<b>2.3. Verwendete Mikroorganismen .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Stammhaltung und Nährmedien.....</b>	<b>16</b>
2.4.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.4.1.1. LB-Medium .....	16
2.4.2. Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
2.4.2.1. YPDA-Medium.....	16
2.4.2.2. YSDO-Medium .....	17
2.4.3. Kultivierung von <i>Coprinopsis cinerea</i> .....	17
2.4.3.1. YMG/T- Medium .....	18
2.4.3.2. Regenerationsmedium .....	18
2.4.3.3. Minimalmedium .....	19
2.4.3.4. Modifiziertes Kjalke-Medium .....	19
2.4.3.5. Kultivierung im Fermenter .....	19
2.4.3.6. Kultivierung im akustischen Resonanzmischer (ARM) .....	20
2.4.3.7. Bestimmung der Biotrockenmasse von <i>C. cinerea</i> .....	20
2.4.4. Kultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i> .....	20
2.4.4.1. MEA-Medium.....	20
2.4.4.2. SNL-Medium .....	21
2.4.4.3. Flüssigkultur mit Rapsstroh .....	21
2.4.4.4. Festbettkultur mit Rapsstroh .....	22
<b>2.5. Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.5.1. Isolation von DNA und RNA.....	22
2.5.1.1. DNA-Isolation aus Basidiomyceten.....	22
2.5.1.2. DNA-Isolation aus <i>S. cerevisiae</i> .....	22

2.5.1.3.	DNA-Isolation aus <i>E. coli</i> .....	23
2.5.1.4.	DNA-Isolation aus Agarosegelen und PCR-Amplifikaten .....	23
2.5.1.5.	RNA-Isolation .....	23
2.5.2.	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nucleinsäuren .....	23
2.5.2.1.	Kapillar-Gelelektrophorese .....	24
2.5.2.2.	Fluorometrische Quantifizierung .....	24
2.5.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	24
2.5.3.1.	Amplifikation von <i>aao</i> .....	24
2.5.3.2.	Kolonie-PCR .....	25
2.5.3.3.	Agarose-Gelelektrophorese .....	26
2.5.4.	Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) .....	26
2.5.4.1.	Reverse Transkription .....	26
2.5.4.2.	RT-qPCR .....	26
2.5.5.	Verdau mit Restriktionsendonukleasen .....	27
2.5.6.	Transformation .....	28
2.5.6.1.	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	28
2.5.6.2.	Transformation von <i>E. coli</i> .....	28
2.5.6.3.	Transformation von <i>C. cinerea</i> .....	28
2.5.7.	Sequenzierung der <i>aao</i> .....	29
<b>2.6.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>30</b>
2.6.1.	Proteinreinigung mittels <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC) .....	30
2.6.1.1.	Probenvorbereitung für FPLC .....	30
2.6.1.2.	Anionenaustauscher-FPLC .....	30
2.6.1.3.	Größenausschluss-FPLC .....	30
2.6.2.	Proteinextraktion aus Festbettkulturen mit Rapsstroh .....	31
2.6.3.	SDS-PAGE .....	31
2.6.3.1.	Denaturierende SDS-PAGE .....	31
2.6.3.2.	Native SDS-PAGE .....	33
2.6.3.3.	Färbung mit kolloidalem Coomassie .....	33
2.6.4.	Western Blot .....	33
2.6.5.	Isoelektrische Fokussierung (IEF) .....	35
2.6.6.	Enzymassays .....	35
2.6.6.1.	Veratrylalkohol-Assay .....	36
2.6.6.2.	Anisalkohol-Assay .....	36
2.6.6.3.	Benzylalkohol-Assay .....	37
2.6.6.4.	ABTS-Assay .....	37
2.6.6.5.	Phenolrot-Assay .....	37
2.6.6.6.	Reactive Black 5 Assay .....	38
2.6.6.7.	Reactive Blue 5 Assay .....	39
2.6.6.8.	Zwei-Enzym-Assay .....	39
2.6.7.	Bradford-Assay .....	40
2.6.8.	Michaelis-Menten Kinetik .....	40
2.6.9.	pH- und Temperaturoptimum von AAO .....	40
2.6.10.	Massenspektrometrische Analyse .....	41
<b>2.7.</b>	<b>Transkriptomanalyse</b> .....	<b>41</b>
2.7.1.	Erstellung der cDNA Bibliothek aus <i>P. sapidus</i> RNA .....	41
2.7.2.	Sequenzierung der cDNA .....	42
2.7.3.	<i>de novo</i> Assemblierung vom Transkriptom .....	42
2.7.4.	Annotation von Transkripten .....	43
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>44</b>

<b>3.1. Transkriptomanalyse von <i>P. sapidus</i></b> .....	<b>44</b>
3.1.1. Morphologie der Pilze .....	44
3.1.2. Ergebnisse der RNA-Sequenzierung.....	45
3.1.3. Annotation der CAZy Gene.....	47
3.1.4. Ergebnisse der RT-qPCR .....	52
3.1.5. Enzymaktivitäten .....	53
<b>3.2. Heterologe Expression von AAO in <i>C. cinerea</i></b> .....	<b>54</b>
3.2.1. Konstruktion vom Plasmid pYIG1 .....	54
3.2.2. Transformation von <i>C. cinerea</i> mit pYIG1 .....	58
3.2.3. Kultivierung von <i>C. cinerea</i> pYIG1 1-1-5 und AAO-Aktivitätsmessung .....	59
3.2.4. Reinigung der heterolog exprimierten AAO .....	61
3.2.5. Charakterisierung der AAO.....	66
3.2.6. Einsatz von AAO in einem Zwei-Enzym-System.....	70
3.2.7. Kultivierung von <i>C. cinerea</i> pYIG1 1-1-5 im akustischen Resonanzmischer .....	70
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>73</b>
<b>4.1. Transkriptomanalyse von <i>P. sapidus</i></b> .....	<b>74</b>
4.1.1. Annotation der Gene und die Veränderungen in der Transkription.....	77
4.1.2. Vergleich von RNA-Sequenzierung mit RT-qPCR.....	80
4.1.3. Vergleich von Transkriptomdaten mit Enzymaktivitäten.....	84
<b>4.2. Heterologe Expression von AAO in <i>C. cinerea</i></b> .....	<b>85</b>
4.2.1. Stammkonstruktion für die rekombinante Expression von AAO.....	85
4.2.2. Kultivierung von <i>C. cinerea</i> für die optimale AAO Ausbeute .....	86
4.2.3. Reinigung der AAO .....	90
4.2.4. Biochemische Eigenschaften von AAO .....	92
4.2.5. Vergleich der Sequenzen von AAO .....	94
4.2.6. Einsatz von AAO zur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion für die DyP-Peroxidase.....	95
<b>5. FAZIT UND AUSBLICK</b> .....	<b>97</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>99</b>
<b>7. ANHANG</b> .....	<b>111</b>
7.1 Plasmidkarte von pYIG1 .....	111
7.2 AAO-Sequenz .....	112
7.3 Codierende Sequenz von AAO .....	113
7.4 Anionenaustauscher-Chromatographie von AAO.....	115
7.5 KOG-Annotation.....	116
7.6 64 Cluster der differentiell exprimierten Contigs .....	117
7.7 Bilder von <i>C. cinerea</i> pYIG1 1-1-5 bei der Kultivierung im ARM und in Schüttelkolben .	128
<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>130</b>

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
2D	zweidimensional
AA	<i>Auxiliary activity</i>
AS	Aminosäure
AAO	Arylalkoholoxidase
AOX	Alkoholoxidase
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ARM	Akustischer Resonanzmischer
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
bp	Basenpaare
CAZy	<i>Carbohydrate-Active Enzymes</i>
cDNA	komplementäre DNA
COG	<i>Clusters of Orthologous Groups</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
DyP	Dye-decolourising Peroxidase
$\Delta E$	Extinktionsdifferenz
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
EC	Enzymkommission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
F	Verdünnungsfaktor
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
Gbp	Gigabasenpaare
GOX	Glucose-1-Oxidase
h	Stunde
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	Ionenaustauschchromatographie
kDa	Kilodalton
$\lambda$	Wellenlänge [nm]
L	Liter
LiP	Lignin-Peroxidase
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Min	Minute
MnP	Manganperoxidase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure

MW	Molekulargewicht
NCBI	National Center for Biotechnology Information
o-	ortho-
p-	para-
p.a.	pro analysi [für analytische Zwecke]
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFAM	Protein Families Datenbank
pI	isoelektrischer Punkt
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-qPCR	<i>Real-time</i> quantitative Polymerasekettenreaktion
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNL	Standardnährlösung
sp.	Spezies
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TOF	Time-of-flight Detektion
TPM	<i>Transcripts per million</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VP	Versatile Peroxidase

# 1. Einleitung

## 1.1. Theoretischer Hintergrund

### 1.1.1. Biotechnologie und Biokraftstoffe

In der heutigen Zeit spielt die Nutzung erneuerbarer Energie und nachhaltig erzeugter Rohstoffe eine immer größere Rolle. In der chemischen Industrie werden biotechnologische Produktionsprozesse immer verbreiteter. Ein aktuelles Feld der Biotechnologie sind die Biokraftstoffe. Die Nutzung von Biokraftstoffen der ersten Generation wie Bioethanol und Biodiesel als Treibstoff schont zwar die begrenzten Erdölreserven, dabei werden allerdings große Anbauflächen für Zuckerrohr, Mais, Weizen oder Raps benötigt, die sonst der Nahrungsmittelproduktion dienen könnten. Für die Produktion von Biokraftstoffen werden hauptsächlich Zucker und Lipide verwertet und es entstehen als Nebenprodukt große Mengen an lignocellulosehaltiger pflanzlicher Biomasse (Nigam und Singh 2011). Die zweite Generation von Biokraftstoffen, zeichnet sich durch eine bessere und nachhaltigere Verwertung der Ressourcen aus (Naik *et al.* 2010). Sie umfasst Kraftstoffe, die aus nicht essbaren pflanzlichen Produkten hergestellt werden, wie z. B. aus Stroh, das als Nebenprodukt bei der Produktion von Biokraftstoffen der ersten Generation entsteht und teilweise zu Heizzwecken einfach verbrannt wird oder als Dämmmaterial dient. Dadurch wird das Dilemma Kraftstoff vs. Nahrung erheblich reduziert.

Die Reststoffe bestehen zum größten Teil aus Cellulose, Hemicellulose, Pektin und Lignin. Lignin ist nach Cellulose das zweithäufigste Biopolymer auf der Erde. Im Weizenstroh kann der Ligninanteil bei 5-17% liegen, im Maisstroh zwischen 15 und 21% (Buranov und Mazza 2008). Es handelt sich dabei um ein Gemisch aus verschiedenen aromatischen Grundbausteinen wie *p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol, die ein dreidimensionales Netzwerk ausbilden (Dashtban *et al.* 2009). Zusammen mit Hemicellulose und Cellulose bildet Lignin die Lignocellulose, aus der die Zellwände von verholzten Pflanzen bestehen. Seit vielen Jahren wird versucht die Lignocellulose optimal zu verwerten, um z. B. aus der Cellulose Bioethanol herzustellen, aber dies wird durch die Anwesenheit von Lignin erschwert, der als eine undurchlässige Barriere dient (Sánchez 2009). Es gibt mehrere Methoden zur Vorbehandlung von ligninhaltigen Abfällen um ihre Bestandteile, für die Produktion von Biokraftstoffen der zweiten Generation zu trennen. Dazu gehören z. B. die Behandlung mit Säure, um Cellulose zu hydrolysieren; die Zerkleinerung des Materials mittels Dampfexplosion, die eine Trennung der Holzfasern bewirkt und Hemicellulose löslich macht, optional mit der Zugabe von Ammoniak um den Vorgang zu optimieren; oder das Organosolv Prozess zur Hydrolyse von Lignin und Hemicellulose (Sun und Cheng 2002, Aditiya *et al.*

2016). Bei den meisten Verfahren werden hohe Temperaturen und damit viel Energie benötigt. Daneben müssen Chemikalien wie Ammoniak oder Säuren wiederaufbereitet oder neutralisiert werden. Um die Nachhaltigkeit zu verbessern, wird nach biotechnologischen Alternativen gesucht.

### **1.1.2. Enzyme aus Pilzen, und deren Einsatzmöglichkeiten in Biotechnologie**

In der Natur wird totes Holz vor allem durch Pilze abgebaut, die als einzige Gruppe von Organismen über einen kompletten Satz der dafür nötigen Enzyme verfügen. Es handelt sich dabei um höhere Pilze der Abteilung Basidiomycota (Ständerpilze), zu der ca. ein Drittel aller bekannten Pilzarten gehören (Blackwell 2011). Wie auch bei vielen Ascomyceten (Schlauchpilze) handelt es sich dabei um filamentös wachsende Organismen, die Fruchtkörper ausbilden können. Fast alle Speisepilze gehören zu den auch als Basidiomyceten (veraltet für Pilze der Abteilung Basidiomycota) bekannten Pilzen, wie z. B. der Champignon, die Seitlinge, der Pfifferling, der Steinpilz und der Shiitake. Diese Pilze sind in der Lage auf lignocellulosehaltigen Substraten wie Stroh, Holzspänen oder Sägemehl als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, und bieten so neue Verwendungsmöglichkeiten für diese Abfallprodukte. Neben der Verwendung als Nahrungsmittel, haben diese Pilze auch eine biotechnologische Bedeutung als Quelle für langkettige Polysaccharide (z. B.  $\beta$ -Glucane wie Schizophyllan aus dem Spaltblättling *Schizophyllum commune* oder Lentinan aus dem Shiitake) (Franz 1989), Sekundärmetabolite (z. B. das Antibiotikum Pleuromutilin aus *Clitopilus passeckerianus*) (Kavanagh *et al.* 1951), und neuartige Enzyme (z. B. DyP-Typ Peroxidasen) (Scheibner *et al.* 2008), (Erjavec *et al.* 2012). Basidiomyceten können nach der Art und Weise wie sie Lignocellulose abbauen in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Weißfäulepilze und Braunfäulepilze. Bei der Braunfäule werden überwiegend Cellulose und Hemicellulose abgebaut, während das nicht abgebaute Lignin für die Bräunung des Holzes verantwortlich ist. Dagegen wird während der Weißfäule in erster Linie Lignin oder Lignin zusammen mit Cellulose abgebaut (Martínez *et al.* 2005). Eine neuere Studie besagt jedoch, dass es keine scharfe Abgrenzung zwischen den beiden Mechanismen gibt, sondern einen eher fließenden Übergang, weil in einigen Pilzen Merkmale von sowohl der Weiß- als auch der Braunfäule vorkommen. *Botryobasidium botryosum* und *Jaapia argillacea* können Lignin abbauen, ohne die für die Weißfäule-Pilze typischen Klasse II Häm-Peroxidasen zu besitzen, gleichzeitig haben sie die typischen Enzyme wie Cellobiose Dehydrogenasen und lytische Polysaccharid-Monooxygenasen (Riley *et al.* 2014). Einige der an der Weiß- und Braunfäule beteiligten Enzyme sind biotechnologisch interessant.



Laccasen (EC 1.10.3.2) und Peroxidasen (EC 1.11.1.X), werden bereits in der Papier-, Textil und Lebensmittelindustrie genutzt (Rodríguez Couto und Toca Herrera 2006). Zu den Einsatzgebieten von Laccasen gehört die Vorbehandlung von Weinkorken (Suberase®) oder die Verbesserung der Teigeigenschaften (Osma *et al.* 2010). Weitere Verwendungen in der Lebensmittelindustrie sind Verbesserung der Färbung von Tee (M120®, Amano Enzyme Co. Ltd.) oder die Stabilisierung von Bier und anderen Getränken durch Entfernung von molekularem Sauerstoff (Flavourstar®, Novozymes) (Osma *et al.* 2010). In der Papierindustrie werden Laccasen zum Verbessern der Bleichung von Pulpe verwendet (Novozymes® 51003), was zum geringeren Einsatz von Chlor führt (Morozova *et al.* 2007). Eine Laccase (DeniLite®, Novozymes) wird mit einem Mediator Molekül auch zum Bleichen von Textilfarbstoffen eingesetzt (Rodríguez Couto und Toca Herrera 2006). Die Peroxidasen können für die Bleichung von Molke verwendet werden (MaxiBright(R), DSM, Heerlen, Niederlande).

Anders als die Laccasen, können Peroxidasen in mehrere Gruppen aufgeteilt werden: Lignin-Peroxidasen (LiP), Mangan-Peroxidasen (MnP), versatile Peroxidasen (VP) und die DyP-Typ Peroxidasen (DyP). Innerhalb jeder Gruppe gibt es bei den Pilzen meist mehrere Gene, die für verschiedene Isoenzyme codieren. Im Unterschied zu den Klasse II Häm-Peroxidasen, können die DyP-Typ Peroxidasen sowohl natürliche Farbstoffe wie Carotinoide, als auch synthetische wie die in der Textilindustrie genutzten Reactive Blue 5 und Reactive Black 5, abbauen (Scheibner *et al.* 2008, Sugano *et al.* 2009, Sugano 2009, Liers *et al.* 2010). VP verfügt ebenfalls über ein breites Substratspektrum, und könnte für einen industriellen Abbau von Lignin von großem Nutzen sein. Dafür müssen aber noch einige Hindernisse überwunden werden, wie die ausreichende Produktion von VP oder die Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber höheren Wasserstoffperoxid Konzentrationen (Busse und Czermak 2016). Im Unterschied zu Laccasen, benötigen Peroxidasen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für die Reaktion (Liers *et al.* 2013). In der Natur kann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beim basidiomycetalen Abbau von Lignocellulose von einer Reihe von Enzymen, wie der Glucose-1-Oxidase (EC 1.1.3.4), Alkoholoxidase (EC 1.1.3.13) und der Arylalkoholoxidase (AAO) (EC 1.1.3.7) erzeugt werden. Es handelt sich dabei um FAD-abhängige Flavoproteine, die zur Familie der Glycin-Methanol-Cholin- (GMC-) Oxidoreduktasen gehören (Hernández-Ortega *et al.* 2012). Diese Enzyme können intrazellulär aktiv sein, wie die Glucose-1-Oxidase, oder extrazellulär den Ligninabbau unterstützen wie die AAO (Levasseur *et al.* 2013). Ein weiteres H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-erzeugendes Enzym ist die extrazelluläre Glyoxaloxidase (EC 1.2.3.15), die nicht zu GMC-Familie gehört. Bei vielen Pilzen, vor allem den der Gattung *Pleurotus* scheint AAO das wichtigste extrazelluläre Enzym für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion zu sein (Camarero *et al.* 1996, Hernández-Ortega *et al.* 2012). Außer in Basidiomyceten wurde AAO auch im Ascomyceten *Aspergillus terreus* beobachtet, dort lag die AAO allerdings intrazellulär vor (Kumar und Goswami 2006). AAO kann eine Vielzahl primärer aromatischer Alkohole wie Veratrylalkohol, Benzylalkohol, und Anisalkohol zu Aldehyden

oxidieren (Guillen *et al.* 1992, Ferreira *et al.* 2005, Feldman *et al.* 2015). Eine Beispielreaktion ist in der

Abbildung 1.1 dargestellt.

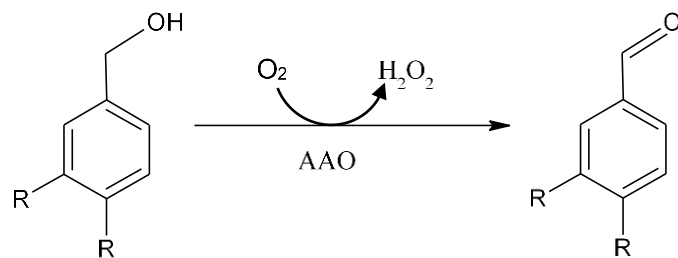


Abbildung 1.1: Oxidation von Veratrylalkohol (R = O-CH<sub>3</sub>) durch die Arylalkoholoxidase.

Es wurden bereits AAO aus verschiedenen Pilzen beschrieben, wie dem *Pleurotus eryngii* (Guillen *et al.* 1992) oder dem *Pleurotus pulmonarius* (Varela *et al.* 2000). Zu der Gattung *Pleurotus* gehört auch *Pleurotus sapidus* (Abbildung 1.2), ein naher Verwandter des Speisepilzes *Pleurotus ostreatus*, auch bekannt als Austernseitling.



Abbildung 1.2: *P. sapidus* als Fruchtkörper (links) und als Submerskultur (rechts). (Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, JLU Gießen)

Dieser Pilz ist in der Lage auf verschiedenen ligninhaltigen Substraten wie Erdnuss- und Kakaoschalen oder Rapsstroh zu wachsen, und so diese preiswerten Nebenströme der Agrarindustrie biotechnologisch verwertbar zu machen (Zorn *et al.* 2005). Bei einer Untersuchung der Laccase-Aktivitäten von 46 Basidiomyceten wies *P. sapidus* die höchste Aktivität auf (Linke *et al.* 2005). Dies deutet auf potentiell gute ligninolytische Eigenschaften. Verglichen zu *P. ostreatus* ist *P. sapidus* noch nicht so intensiv erforscht. Anders als bei den verwandten Seitlingen *P. ostreatus* (Riley *et al.* 2014) und *P. eryngii* (Yang *et al.* 2016), wurde das Genom noch nicht sequenziert. Jedoch wurden bereits Studien am Sekretom mittels 2D-

Elektrophorese durchgeführt und eine Reihe von Enzymen mit biotechnologischen Potential entdeckt (Zorn *et al.* 2005). Dazu gehört z. B. eine Oxygenase, die Valencen in das Grapefruitaroma Nootkaton umwandelt (Fraatz *et al.* 2009). Es war das erste Mal, dass eine Lipoxygenase aus einem Basidiomyceten gereinigt, und ihre Sequenz bestimmt wurde. Ein weiteres Enzym war eine neuartige Feruloylsterase, deren Substratspezifität der von Typ A Feruloylsterasen entsprach, obwohl sie keine signifikante Homologie mit den bis dahin bekannten Feruloylsterasen aufwies (Linke *et al.* 2013). Die Sekretomanalysen zeigten unter anderem Anwesenheit von einer AAO, Proteasen, Lipasen VP und MnP (Zorn *et al.* 2005, Schüttmann 2011).

### 1.1.3. Transkriptomanalyse

Die Sekretomanalyse kann jedoch keinen kompletten Aufschluss über die Proteine eines Organismus geben. Proteine die unter gegebenen Bedingungen nur schwach exprimiert werden, oder nicht sekretiert werden, bleiben unberücksichtigt. Eine Alternative oder Ergänzung zur Analyse des Sekretoms, um neue Proteine und ihre Rolle im Stoffwechsel zu untersuchen, ist die Transkriptomanalyse. Transkriptome von filamentösen Pilzen wurden bereits vielfach untersucht. Die Studien erfolgten anfangs noch mittels *Expressed Sequence Tags* (EST) (Guettler *et al.* 2003, Joh *et al.* 2007). Später wurde auch die Microarray-Technologie eingesetzt, unter anderem bei dem Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* (Vanden Wymelenberg *et al.* 2009, 2010). Diese benötigt allerdings ein Referenzgenom, um ein Chip mit DNA-Sonden herzustellen. Von den Pilzen der Gattung *Pleurotus* wurden bisher nur die Genome von *P. ostreatus* und *P. eryngii* sequenziert (Yang *et al.* 2016, Riley *et al.* 2014, Alfaro *et al.* 2016), dadurch ist eine Nutzung der Microarray-Technologie für eine umfassende Untersuchung des Transkriptoms von *P. sapidus* keine Option. Durch die fallenden Kosten des *next generation sequencing* fand die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) in den letzten Jahren immer mehr Verbreitung. Mit diesem Verfahren lassen sich die Änderungen in der Transkription von Genen unter verschiedenen Bedingungen oder zu verschiedenen Zeitpunkten gut verfolgen. Verglichen mit Array-basierten Methoden hat RNA-Seq den Vorteil, dass sich die Methode auch bei Organismen anwenden lässt, deren Genom noch nicht sequenziert wurde (Wang *et al.* 2009). Die Sequenzierung mit Brückensynthese, die in Geräten von Illumina verwendet wird, entwickelte sich in letzten Jahren zu der am meisten verbreiteten Sequenziermethode (Hachmann 2015). Für ein RNA-Seq Experiment muss zuerst eine cDNA Bibliothek erstellt werden. Dazu wird nach der Gesamt-RNA Extraktion aus der Probe die mRNA isoliert. Diese wird fragmentiert und mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA Fragmente werden mit Adaptersequenzen ligiert. Im letzten Schritt wird die cDNA mittels PCR amplifiziert, wobei die Primer mit den ligierten Adaptern

hybridisieren. Für die Sequenzierung werden die cDNA-Fragmente auf eine Trägerplatte gegeben, wo die Adapter mit den an die Oberfläche der Trägerplatte gebundenen Oligonukleotiden hybridisieren. Die Fragmente werden amplifiziert, so dass auf der Oberfläche aus jedem Fragment ein Cluster von mehreren tausend identischen Sequenzen entsteht. Der Vorgang wird als Brückensynthese bezeichnet, weil die Adapter, die an den oberen Enden der einzelsträngigen Fragmente liegen, dabei mit den Oligonukleotiden an der Oberfläche hybridisieren und die Stränge so einen Bogen bilden. Die anschließende Sequenzierung beruht auf der Synthese des Zweitstrangs mit Nukleotiden die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind. Da die Fragmente in dichten Clustern gebunden sind, lässt sich das Lichtsignal nach jedem Zyklus detektieren. Die Adapter haben außerdem einen kurzen variablen Bereich, der ebenfalls sequenziert wird. Auf diese Weise können die Ergebnisse einzelner Proben nach einer Multiplex-Sequenzierung mit mehreren Proben identifiziert werden. Die Sequenzen, die bei der Sequenzierung entstehen, werden *reads* genannt, und können bei dieser Methode bis zu 300 bp lang sein. Bei einer *paired-end* Sequenzierung werden die Fragmente zuerst von einem und dann von anderem Ende sequenziert, so dass zwei *reads* entstehen, von den bekannt ist, dass sie vom gleichen Fragment stammen (Bentley *et al.* 2008). Die *reads* können entweder *de novo* assembliert oder auf das Genom eines verwandten Organismus gemappt werden (Strickler *et al.* 2012, Ward *et al.* 2012, Grabherr *et al.* 2011). Um die Stärke der Transkription von einzelnen Genen zu quantifizieren und ihre Änderung in verschiedenen Proben zu vergleichen, werden für die Transkripte die TPM-Werte berechnet (*transcripts per million*). Zunächst wird die Anzahl der *reads* pro Transkript durch dessen Länge in kbp geteilt, so entstehen RPK (*reads per kilobase*). Die Summe aller RPKs einer Probe wird durch eine Million geteilt, die erhaltene Zahl ist der Skalierungsfaktor. Um den TPM-Wert für ein bestimmtes Transkript zu erhalten, wird sein RPK-Wert durch den Skalierungsfaktor dividiert. Mit Hilfe dieser neuen Sequenziertechniken wurden bereits Transkriptomome von verschiedenen Pilzen wie *Wolfiporia cocos* (Shu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2016) und *Agrocybe aegerita* (Wang *et al.* 2013) untersucht. Eine Transkriptomstudie von *P. sapidus* wurde bisher noch nicht durchgeführt.

## 1.2. Ziele

Ziel dieser Arbeit war zunächst das Transkriptom von *P. sapidus* in Flüssig- und Festbettkulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten umfassend zu analysieren. Der Schwerpunkt sollte dabei auf der Änderung der Expression von Genen liegen, deren Produkte eine Rolle beim Ligninabbau spielen. Dafür sollten die Transkripte mittels Datenbank-Abgleich bestimmten Genen zugeordnet und auf eine differentielle Transkription überprüft werden. Die Ergebnisse sollten mit einer RT-qPCR von ausgewählten Genen und enzymatischen

Aktivitätsassays verglichen werden. Dadurch sollte ein besseres Verständnis der ligninolytischen Prozesse bei *P. sapidus* erlangt und neue enzymatische Zusammenhänge erkannt werden.

Ein weiteres Ziel war die heterologe Expression des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierenden Enzyms AAO aus *P. sapidus* in *C. cinerea*, mit anschließender Optimierung der Ausbeute und Reinigung mittels chromatographischer Methoden. Die AAO aus *P. sapidus* wurde von Schüttmann (2011) entdeckt. Die cDNA-Sequenz der AAO wurde von Lauber (2015) in *Escherichia coli* kloniert und heterolog exprimiert. Das so exprimierte Enzym war nicht glykosyliert und lag in Form von *inclusion bodies* vor. Somit war eine Rückfaltung notwendig, um eine aktive Form des Enzyms zu erhalten. AAO aus anderen *Pleurotus* Spezies wurden bereits ebenfalls heterolog überexprimiert, darunter in *E. coli* (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (Viña-Gonzalez *et al.* 2015) und *Aspergillus nidulans* (Varela *et al.* 2001). Die Expression in *A. nidulans* lieferte eine geringe Ausbeute an Enzymen. Zu den Nachteilen von *E. coli* als Wirtsorganismus gehören die bereits oben erwähnten *inclusion bodies* und die fehlende Glykosylierung, außerdem ist die Thermostabilität beeinträchtigt, was möglicherweise an der nicht vorhandenen Glykosylierung liegt (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006). In *S. cerevisiae* dagegen, waren die Enzyme hyperglykosyliert. Eine alternative Expressionsmethode wäre das Einbringen der Sequenz in einen ähnlicheren Organismus, der ebenfalls zu höheren Pilzen gehört und dadurch in der Lage ist die Proteine zu glykosylieren und sie in der korrekten Form zu sekretieren. Bisher gab es nur wenige Versuche einer heterologen Expression in Basidiomyceten. Eine der ersten erfolgreichen Transformationen eines Basidiomyceten gelang mit dem Modellorganismus *Coprinopsis cinerea* (Binninger *et al.* 1987). Bei *C. cinerea* handelt es sich um einen Tintling, der in der Natur auf Pferdedung wächst. Im Labor wird dieser Pilz als ein Modellorganismus für die Fruchtkörperentwicklung in Basidiomyceten verwendet (Kües 2000). Das Genom von *C. cinerea* wurde 2010 sequenziert (Stajich *et al.* 2010). Zu den Vorteilen von *C. cinerea* gehören das schnelle Wachstum und die Möglichkeit Sporen zu ernten um sie zu transformieren. In *C. cinerea* wurden bereits mehrere Proteine heterolog exprimiert, darunter das grün fluoreszierende Protein (GFP) (Burns *et al.* 2005), *fungus immunomodulatory protein-Ganoderma sinense* (FIP-gsi) (Han *et al.* 2010), verschiedene Hydrolasen (Kikuchi *et al.* 2004, Cheng *et al.* 2009), eine Peroxidase (Ogawa *et al.* 1998) und eine Laccase (Muraguchi *et al.* 2011), aber es gab bisher keinen Versuch eine AAO in *C. cinerea* oder einem anderen Basidiomyceten rekombinant zu produzieren. Durch die rekombinante Expression der *P. sapidus* AAO in *C. cinerea* sollten neue Erkenntnisse über das Potential der Nutzung von höheren Pilzen im Bereich der Proteinexpression gewonnen werden. Das rekombinante Enzym sollte nach einer Reinigung proteinbiochemisch und enzymkinetisch charakterisiert werden. Außerdem sollte getestet werden, inwieweit die AAO *ex vivo* die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einem Peroxidase-Assay ersetzen kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Verwendung	Gerät	Hersteller
Akustischer Resonanzmischer	RAMbio	Applikon Biotechnology, Foster City, USA
Autoklav	Laboklav 25B	SHP Steriltechnik AG, Detzel
Autoklav	Laboklav 160MSL	SHP Steriltechnik AG, Detzel
Blotting Kammer, Western Blot	PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web™ S	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Brutschrank	Brutschrank INE500	Memert GmbH+Co.KG, Schwabach
Feinwaage	Summit SI 234A	Denver Instrument® GmbH, Göttingen
Fermenter	Labfors 3, 7,5 L	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Fluorometer	Qubit® 2.0	Life Technologies, Carlsbad, USA
FPLC	BioLogic DuoFlow™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
FPLC	NGC Quest™ 10	Bio-Rad Laboratories GmbH
Gasbrenner	Gasprofi 1SCS micro	WLD-TEC GmbH, Göttingen
Gelelektrophoresekammer Agarosegele	PerfectBlue™ Horizontale Minigelsysteme S und L	PEQLAB Biotechnologie
Gelelektrophoresekammer Native SDS-PAGE	Perfect Blue™ Twin S	PEQLAB Biotechnologie
Gelelektrophoresekammer SDS-PAGE	Mini-Protean® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Grobwaage	Acculab Atilon	Acculab, Göttingen
Homogenisierer	IKA ULTRA-TURRAX® T25 digital	IKA-Werke GmbH&Co.KG, Staufen
Inkubationsschüttler	MULTITRON® Version 2 Inkubationsschüttelmaschine	Infors HT
Kapillar-Gelelektrophorese	QIAxcel Advanced	Qiagen, Hilden
Klimaschrank	VT 1415	Vötsch, Balingen
Mikroskop	-	Leitz, Wetzlar
NanoPhotometer	NanoPhotometer™ Pearl	Implen GmbH, München
PCR-Thermocycler	AlphaSC	Analytik Jena AG, Jena
PCR-Thermocycler	CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH
pH-Messgerät	SevenEasy™ pHMeter S20	Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach
Photometer	Specord 50	Analytik Jena
Plattenreader	Synergy™ 2	BioTek Instruments, Inc.

Reinstwasseranlage	Sartorius arium 611VF	Sartorius, Göttingen
RNA-Arbeitsplatz	PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologie
Scanner	Microtek Bio 5000	SERVA, Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Schüttler	Gyro Rocker SSL3	Stuart, Staffordsmire, GB
Schüttler	Mixer Uzusio VTX 3000L	LMS Labratory & Medical Supplies
Schüttler	Orbitron	Infors HP, Bottmingen
Schwingmühle	Schwingmühle MM400	Retsch GmbH, Haan
Sequencer	MiSeq	Illumina, San Diego, USA
Spannungsquelle	PEQLAB PowerSupplies EV231	PEQLAB Biotechnologie
Spannungsquelle	PEQLAB PowerSupplies EV261	PEQLAB Biotechnologie
Strohmühle	POLYMIX® PX-MFC 90 D	Kinematica AG, Luzern, Schweiz
Sterilwerkbank	HERAsafe KS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trockenschrank	Heratherm OGS400	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
UV-Detektion von Gelen	DeVision Dbox	Decon Science Tec GmbH, Hohengandern
Zentrifuge	Allegra® X-15R Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge, 1,5-2 mL	Microfuge® 22R	Beckman Coulter

## 2.2. Verwendete Materialien

### 2.2.1. Chemikalien

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien

Substanz	Firma
ABTS® BioChemica	AppliChem GmbH, Darmstadt
Adeninsulfat ≥98%	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe
di-Ammoniumtartrat	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Inc, St.Louis
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH + CO. KG
Agarose (DNase/RNase free)	Bioline GmbH, Luckenwalde
Ampicillin-Natriumsalz, 99%	Carl Roth GmbH + CO. KG
Anisalkohol 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ammoniumperoxodisulfat [APS]	AppliChem GmbH

L-Asparagine-Monohydrat	AppliChem GmbH
Bacto™-Pepton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + CO. KG
Calciumchlorid-Dihydrat	AppliChem GmbH
Calciumlaktat	Carl Roth GmbH + CO. KG
Coomassie® Brillantblau G-250	AppliChem GmbH
Benzylalkohol ≥99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Beta-Carotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Casein Hydrolysat	Carl Roth GmbH + CO. KG
Dithiothreitol	AppliChem GmbH
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	Carl Roth GmbH + CO. KG
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Essigsäure 96%	Carl Roth GmbH + CO. KG
Ethanol ≥99,5% Ph. Eur. reinst	Carl Roth GmbH + CO. KG
Ethidiumbromidlösung 1%	Carl Roth GmbH + CO. KG
α-D(+)-Glucose-Monohydrat	Carl Roth GmbH + CO. KG
Glycin, >99%	Carl Roth GmbH + CO. KG
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + CO. KG
Hefe-Stickstoff-Basismedium	Becton Dickinson GmbH
Kaliumacetat reinst Ph.Eur.	AppliChem GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + CO. KG
di-Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Alfa Aesar GmbH & Co KG
Lithiumacetat	Chemikalienausgabe, JLU Gießen
Magnesiumsulfat	Fischer Chemicals AG
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	AppliChem GmbH
Maleinsäure, di-Natrium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Malonsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Malzextrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat, 99%	Alfa Aesar GmbH & Co KG
D-Mannitol ≥98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH



Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + CO. KG
Methanol, HPLC Gradient Grade	VWR International GmbH, Darmstadt
Milchpulver, Blotting grade	Carl Roth GmbH + CO. KG
Natriumacetat p.a. Wasserfrei	Carl Roth GmbH + CO. KG
Natriumchlorid >99%	Carl Roth GmbH + CO. KG
Natriumdodecylsulfat [SDS]	Merck KGaA, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	AppliChem GmbH
Natriumhydroxid p.a. 99%	Carl Roth GmbH + CO. KG
Natriumlaktat p.a. 99%	Carl Roth GmbH + CO. KG
Natriumsuccinat p.a. 99%	Carl Roth GmbH + CO. KG
Natriumsulfat	Carl Roth GmbH + CO. KG
Natriumtartrat- Dihydrat	AppliChem GmbH
Opti-4CN™ Diluent	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Opti-4CN™ Substrat	Bio-Rad Laboratories GmbH
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Carl Roth GmbH + CO. KG
Phenolrot	Santa Cruz Biotech, Dallas, USA
o-Phosphorsäure reinst 85%	Carl Roth GmbH + CO. KG
Polyethylenglycol 3350	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Polyethylenglycol 4000	Fischer Chemicals AG, Zürich
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
2-Propanol RotiPuran® ≥99,8%, p.a.	Carl Roth GmbH + CO. KG
Reactive Black 5 55% Dye content	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Reactive Blue 5 100%	Von Prof. Liers, IHI Zittau
Roti®-Nanoquant 5X	Carl Roth GmbH + CO. KG
Rotiphorese® Gel 40	Carl Roth GmbH + CO. KG
Saccharose 99%	Alfa Aesar GmbH & Co KG
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ssDNA aus Lachssperma	AppliChem GmbH
Stärke, löslich	Carl Roth GmbH + CO. KG
TEMED	AppliChem GmbH
Thiaminhydrochlorid	AppliChem GmbH

TRIS-hydrochlorid PUFFERAN® ≥99%	Carl Roth GmbH + CO. KG
TRIS PUFFERAN® ≥99,3%, Buffer Grade	Carl Roth GmbH + CO. KG
Trypton	AppliChem GmbH
L-Tryptophan	AppliChem GmbH
Tween® 80 Ph. Eur.	Carl Roth GmbH + CO. KG
Veratrylalkohol 96%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Wasserstoffperoxid Maßlösung (0,01 M)	AppliChem GmbH
Xylencyanol	Merck KGaA
Zinksulfat-Heptahydrat p.a.	Merck KGaA
Zimtalkohol, 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

### 2.2.2. Enzyme

Tabelle 2.3: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
HotStar HiFidelity DNA Polymerase	Qiagen
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest™ <i>Bam</i> HI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest™ <i>Hpa</i> I	Thermo Fisher Scientific
PNGase F	New England Biolabs, Ipswich, USA
Chitinase aus <i>Streptomyces griseus</i> ≥ 200 U g <sup>-1</sup>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cellulase „Onozuka“ R-10 aus <i>Trichoderma viride</i> , 1U g <sup>-1</sup>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Katalase aus Rinderleber	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

### 2.2.3. Kits

Tabelle 2.4: Verwendete Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Dynabeads® mRNA Purification Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycle)	Illumina
Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel, Weilmünster
QIAxcel DNA High Resolution Kit	Qiagen
QIAxcel RNA QC Kit v2.0	Qiagen
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
SERVAGel™ IEF Starter Kit	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
SERVAGel™ N Native Starter Kit	SERVA Electrophoresis GmbH
TruSeq® Stranded Total RNA Sample Prep Kit	Illumina, San Diego, USA

### 2.2.4. Plasmide

Für die Stammkonstruktion wurden die Plasmide pYSK7 (Kilaru *et al.* 2006) und pCc1001 (Binniger *et al.* 1987) verwendet. Die Plasmidkarte vom fertigen pYIG1 ist im Anhang dargestellt (7.1).

### 2.2.5. Primer

Tabelle 2.5: Primer (Eurofins Genomics, Ebersberg) für die Plasmidkonstruktion und Sequenzierung.

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
gpdII_AAO	CATCTACACACAACAAGCTTATCGCCATGTCGTTTAgTGCActTCGTC
lcc1term_AAO	CTGGCCCTCTGGTCAACTATAATATTATCTACTGATCAGCCTTAATTAGATCA GC
29	CCATCTCCGTTTTCTCCCATC
130	CTGGCCCTCTGGTCAACTATAAT
134	GTCTAGCTCTGTTGCGTGC
135	GATACTGCGGGTTGATGAGTG
136	CACGGCTAATCTCACGTGTTG

Tabelle 2.6: Primer (Biomers, Ulm) für die RT-qPCR.

Gennamen	Primersequenzen Vorwärts/Rückwärts	5'->3', Produktgröße (bp)
<i>gpd3</i> (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)	GCCATCAATGACCCGTTTCATTG/ CCTTCTCCGCGAAGATGTGG	148
<i>βtub</i> (beta-Tubulin)	GTCTTCAAGGTTTCCAGATCACC/ CGTTGTAGGGCTCAACGACAG	168
<i>cyph</i> (Cyclophilin-Typ Peptidyl-Prolyl- cis-trans-Isomerase)	GTATCATCCCGAATTTTCATGTGCC/ CTGTGAGCCATTCGTGTTCCG	170
<i>sar1</i> (GTP-Bindeprotein SAR1)	GGATAGTCTTCCTCGTCGATAG/ GGGTGCATCAATCTTGTTGC	134
<i>phos</i> (Purin-Phosphorylase)	CATCGCAAATCATCGATCGCACC/ GCTCTCCAGCCATTGCACCAATT	125
<i>pep</i> (Peptidase S9)	TGATCCCAGAGGACAAGGACGC/ AAATCTTCCGCGATACGGGTAC	148
<i>mnp1</i> (Manganperoxidase 1)	GTCGCTCAAGCTGTGTCTTTG/ CTTCATGTGCGTCTTCGCCG	154
<i>mnp3</i> (Manganperoxidase 3)	CAACCAAAGGTGGAGGAGGC/ CAAATTGGATGAAGTCGCCAGC	156
<i>mnp6</i> (Manganperoxidase 6)	CTCTCCCAAGCTCTTCCTTC/ CAGCGAATTGAATGAAGTCACCG	181
<i>Lacc9/10</i> (Laccase 9/10)	GGAAACAAGGGCGATAACTTCC/ CATCTGCCACGTAAGTGTG	169
<i>ao</i> (Arylalkoholoxidase)	TGAACACCTTCAGGATCACCC/ GTGGCAAGAGGACCAGTACG	144
<i>dyp4</i> (Dyp-Typ Peroxidase 4)	CCATGAACACTTCGGCTTCC/ GTCTCCATTTTCCTCCTTGCC	172
<i>vp2</i> (Versatile Peroxidase 2)	GCATTAACCAATGCCGGTCAG/ CGAATTGGATGAAGTCGGCAG	172
<i>vp3</i> (Versatile Peroxidase 3)	GCAGGTGATTTGGTTCAATTCGC/ GTCTACGGTATCGAACGGTTC	144

### 2.2.6. FPLC-Säulen

Für die FPLC wurden Säulen von GE Healthcare (Little Chalfont, GB) verwendet. Als schwache Anionenaustauscher-Säule diente eine selbstgepackte XK 26/40, gefüllt mit DEAE Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare). Für die Größenausschlusschromatographie wurden die HiLoad 16/600 Superdex 200 pg und 75 pg benutzt.

## 2.2.7. Größenstandards

Tabelle 2.7: Verwendete Größenstandards für Nucleinsäuren und Proteine

Größenstandard	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
100 bp-DNA-Leiter extended	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
1 kbp DNA-Leiter	Carl Roth GmbH + Co. KG
IEF Marker 3-10	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Gelfiltration Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
QX DNA Size Marker 25-500 bp	Qiagen, Hilden
QX RNA Size Marker 200-6000 nt	Qiagen

## 2.2.8. Filtrationszubehör

Tabelle 2.8: Verwendetes Filtrationszubehör

Name	Hersteller
Ultrasette™ 300K	Pall GmbH, Dreieich
Vivaflow® 200 10 K	Sartorius, Göttingen
Micro-, Macro- und Jumbosep 10 K	Pall
Filterpapier, Grad 1289	Sartorius
Membranfilter RC 58, 0,2 µm	Whatman GmbH, Dassel

## 2.3. Verwendete Mikroorganismen

Tabelle 2.9: Verwendete Mikroorganismen

Organismus	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> One Shot® TOP10	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Coprinopsis cinerea</i> FA2222 ( <i>trp</i> )	Stammnummer 28333, DSMZ, Braunschweig
<i>Pleurotus sapidus</i>	Stammnummer 8266, DSMZ
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RH1385 ( $\Delta$ ura3)	Institut für Molekulare Holzbiotechnologie und Technische Mykologie, Göttingen

## 2.4. Stammhaltung und Nährmedien

Bei der Herstellung der Nährmedien wurde, wenn nicht anders angegeben, doppelt destilliertes Reinstwasser (Sartorius arium 611VF) verwendet.

### 2.4.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Transformation des chemisch kompetenten *Escherichia coli* One Shot® TOP10 Stamms erfolgte nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden zur Regeneration auf LB<sup>Amp</sup>-Platten (2.4.1.1) bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Übertragung der Klone auf Masterplatten. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4 °C, für längere Lagerung wurden die Flüssigkulturen mit 10% Glycerin bei -80 °C eingefroren.

#### 2.4.1.1. LB-Medium

Hefeextrakt	5 g L <sup>-1</sup>
Trypton	10 g L <sup>-1</sup>
NaCl	10 g L <sup>-1</sup>

Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 15 g L<sup>-1</sup> Agar hinzugefügt. LB<sup>Amp</sup> enthielt zusätzlich 100 mg L<sup>-1</sup> Ampicillin. Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

### 2.4.2. Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* RH1385 ist ein Uracil-auxotropher Stamm. Klone die erfolgreich mit pYSK7 transformiert wurden, konnten auf dem YSDO-Selektionsmedium (2.4.2.2) wachsen. Die Platten wurden bei 30 °C kultiviert. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4 °C, für längere Lagerung wurden die Flüssigkulturen mit 10% Glycerin bei -80 °C eingefroren.

#### 2.4.2.1. YPDA-Medium

Hefeextrakt	10 g L <sup>-1</sup>
Bacto-Pepton	20 g L <sup>-1</sup>
Adeninsulfat	30 mg L <sup>-1</sup>
Glucose	20 g L <sup>-1</sup>

Glucose wurde separat autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 20 g L<sup>-1</sup> Agar hinzugefügt. Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

#### 2.4.2.2. YSDO-Medium

Hefe-Stickstoff-Basismedium	1,7 g L <sup>-1</sup>
Ammoniumsulfat	5 g L <sup>-1</sup>
Casein-Hydrolysat	5 g L <sup>-1</sup>
Adeninsulfat	10 mg L <sup>-1</sup>
Tryptophan	10 mg L <sup>-1</sup>

Die Bestandteile wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Glucose wurde separat autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 20 g L<sup>-1</sup> Agar hinzugefügt. Das Medium wurde 20 min bei 121 °C autoklaviert.

#### 2.4.3. Kultivierung von *Coprinopsis cinerea*

*C. cinerea* FA2222 ist ein monokaryotischer, Tryptophan-auxotropher Stamm. Die Auxotrophie kann durch das pCc1001 Plasmid (*trp1*<sup>+</sup>) kompensiert werden. Die Stammhaltung erfolgte auf YMG/T-Agarplatten in einem Brutschrank bei 37 °C. Um eine höhere Luftfeuchtigkeit zu erreichen lagen die Platten in einer Plastikkiste auf feuchten Papiertüchern. Zum Überimpfen wurde ein ca. 0,5 cm<sup>2</sup> kleines Stück Agar mittels Impfnadel ausgestochen und auf eine neue Platte übertragen. Die Lagerung der bewachsenen Platten erfolgte bei 4 °C, für längere Lagerung wurden mit einem Korkbohrer kleine Stücke aus dem Agar rausgeschnitten und mit 10% Glycerin bei -80 °C eingefroren.

Für die Vorkulturen wurde ein ca. 1 cm<sup>2</sup> großes Stück Agar mit aktivem Myzel ausgestochen und in einen 250 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL YMG/T-Medium (Rao und Niederpruem 1969) überführt. Darin wurde es mit einem IKA ULTRA-TURRAX 30 s lang bei 10.000 rpm homogenisiert. Die Vorkulturen wurden 5 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss inkubiert. Die Hauptkulturen wurden ebenfalls in 250 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL Medium kultiviert, als Inokulum dienten dabei 10 mL der homogenisierten Vorkultur. Die Hauptkulturen wurden bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss inkubiert.

#### 2.4.3.1. YMG/T- Medium

Hefeextrakt	4 g L <sup>-1</sup>
Glucose	4 g L <sup>-1</sup>
Malzextrakt	10 g L <sup>-1</sup>

Bei der Kultivierung von untransformiertem *C. cinerea* FA2222 wurden 100 mg L<sup>-1</sup> Tryptophan hinzugegeben. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 10 g L<sup>-1</sup> Agar hinzugefügt. Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

#### 2.4.3.2. Regenerationsmedium

Glucose	5 g L <sup>-1</sup>
Stocklösung A	25 mL L <sup>-1</sup>
Stocklösung B	1 mL L <sup>-1</sup>
Stocklösung C	10 mL L <sup>-1</sup>
L-Asparagin	2 g L <sup>-1</sup>
Lösliche Stärke	5 g L <sup>-1</sup>
Saccharose	172 g L <sup>-1</sup>
Adeninsulfat	50 mg L <sup>-1</sup>

Glucose wurde separat autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 12 g L<sup>-1</sup> Agar hinzugefügt. Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

#### Stocklösung A

Kaliumdihydrogenphosphat	40 g L <sup>-1</sup>
di-Natriumhydrogenphosphat	90 g L <sup>-1</sup>
Natriumsulfat	11,6 g L <sup>-1</sup>
di-Ammoniumtartrat	20 g L <sup>-1</sup>

Zu 1 L Stocklösung A wurden für längere Haltbarkeit 5 mL Chloroform hinzugefügt.

#### Stocklösung B

Thiamin	40 mg L <sup>-1</sup>
---------	-----------------------

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.



## Stocklösung C

Magnesiumsulfat-Heptahydrat      25 g L<sup>-1</sup>

Zu 1 L Stocklösung C wurden 5 mL Chloroform hinzugefügt.

### 2.4.3.3. Minimalmedium

*C. cinerea* Klone, die nach der Transformation auf Platten mit Regenerationsmedium wuchsen, wurden später auf Platten mit Minimalmedium übertragen. Es handelte sich dabei um eine abgewandelte Form des Regenerationsmediums (2.4.3.2).

Glucose	10 g L <sup>-1</sup>
Stocklösung A	25 mL L <sup>-1</sup>
Stocklösung B	1 mL L <sup>-1</sup>
Stocklösung C	10 mL L <sup>-1</sup>
L-Asparagin	2 g L <sup>-1</sup>

Glucose wurde separat autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 12 g L<sup>-1</sup> Agar hinzugefügt. Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

### 2.4.3.4. Modifiziertes Kjalke-Medium

Modifiziertes Kjalke-Medium (Kjalke *et al.* 1992) wurde während der Kultivierung im akustischen Resonanzmischer und der Kultivierung im Fermenter verwendet, um größere Mengen an AAO zu gewinnen.

Glucose	20 g L <sup>-1</sup>
Calciumchlorid-Dihydrat	0,5 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	10 g L <sup>-1</sup>
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	50 mg L <sup>-1</sup>
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g L <sup>-1</sup>

Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Glucose und Calciumchlorid-Dihydrat wurden dabei separat autoklaviert.

### 2.4.3.5. Kultivierung im Fermenter

Die Kultivierung erfolgte in einem Labfors 3 Bioreaktor mit 7,5 L Gesamtvolumen. Als Nährmedium dienten 5 L YMG-Medium oder mod. Kjalke-Medium. Der gesamte Fermenter wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Zum Animpfen des Fermenters wurden 500 mL der homogenisierten Vorkultur eingesetzt. Die Temperatur während der Kultivierung betrug 24 °C

und die Drehzahl des Rotors lag bei 150 rpm. Die Belüftung lag am ersten Tag bei 0,3 L min<sup>-1</sup>, danach wurde sie je nach Schaumbildung auf bis zu 3 L min<sup>-1</sup> erhöht. Parameter wie pH-Wert, Rührerdrehzahl, Begasungsrate und Temperatur wurden kontinuierlich aufgezeichnet.

#### 2.4.3.6. Kultivierung im akustischen Resonanzmischer (ARM)

250 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL mod. Kjalke-Medium wurden mit 10 mL der homogenisierten Vorkulturen von *C. cinerea* pYIG1 1-1-5 (2.4.3) angeimpft. Die Kolben wurden mit Oxympump®-Stopfen verschlossen und bei 3 und 6 g im ARM (RAMbio, Applikon Biotechnology, Foster City, USA) inkubiert. Die Luftfeuchtigkeit war auf 80% eingestellt und die Temperatur betrug 24 bzw. 30 °C. Es wurde täglich ein Kolben für die Bestimmung der Enzymaktivität und die Biotrockenmasse geerntet. Zum Vergleich wurde *C. cinerea* pYIG1 1-1-5 parallel in Erlenmeyerkolben mit Papierstopfen auf einem Orbitalschüttler kultiviert (2.4.3).

#### 2.4.3.7. Bestimmung der Biotrockenmasse von *C. cinerea*

Der Inhalt eines Kolbens wurde auf einen Büchnertrichter mit einem vorher gewogenen Rundfilter gegeben. Das Kulturmedium wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und mit ddH<sub>2</sub>O nachgespült. Bei Kulturen, die älter als 5 Tage alt waren, war es notwendig sie zuerst in 50 mL Zentrifugenröhrchen 10 min lang bei 4.000 g zu zentrifugieren und danach mit etwas ddH<sub>2</sub>O zu waschen, weil die Filter sonst verstopfen. Die Filter wurden im Trockenschrank bei 56 °C getrocknet, bis das Gewicht nicht weiter abnahm. Die Biotrockenmasse entsprach der Differenz zum Gewicht des Filters vor der Prozedur.

### 2.4.4. Kultivierung von *Pleurotus sapidus*

*P. sapidus* wurde auf MEA- und SNL- Agarplatten bei 24 °C kultiviert. Die Flüssigkulturen wuchsen im SNL Medium; die Vor- und Hauptkulturen wurden dabei wie für *C. cinerea* beschrieben (2.4.3) erzeugt und inkubiert, lediglich die Wachstumszeit der Vorkulturen betrug 7 anstatt 5 Tage. Die Lagerung der bewachsenen Platten erfolgte bei 4 °C, für längere Lagerung wurden mit einem Korkbohrer kleine Stücke aus dem Agar rausgeschnitten und mit 10% Glycerin bei -80 °C eingefroren.

#### 2.4.4.1. MEA-Medium

Malzextrakt                    20 g L<sup>-1</sup>

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 20 g L<sup>-1</sup> Agar hinzugefügt. Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

#### 2.4.4.2. SNL-Medium

Glucose	30 g L <sup>-1</sup>
L-Asparagin	4,5 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	3 g L <sup>-1</sup>
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L <sup>-1</sup>
Magnesiumsulfat	0,5 g L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung	1 mL L <sup>-1</sup>

Das Medium wurde auf pH 6,0 eingestellt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

#### Spurenelementlösung

Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	89 mg L <sup>-1</sup>
Zinksulfat-Heptahydrat	90 mg L <sup>-1</sup>
Mangansulfat-Hydrat	30 mg L <sup>-1</sup>
Kupfersulfat-Pentahydrat	5 mg L <sup>-1</sup>
EDTA	400 mg L <sup>-1</sup>

Die Spurenelementlösung wurde sterilfiltriert.

#### 2.4.4.3. Flüssigkultur mit Rapsstroh

Für die Kultivierung von *P. sapidus* mit Rapsstroh wurde ein spezielles Hauptkulturmedium auf Basis des SNL-Mediums verwendet. Rapsstroh wurde mit der Strohmühle POLYMIX® PX-MFC 90 D (Kinematica, Luzern, Schweiz) zerkleinert und mittels Siebung (Edinger, Leinburg) fraktioniert. Dabei wurde nur die Fraktion mit einer Größe zwischen 2-4 mm verwendet.

#### Hauptkulturmedium

Rapsstroh	20 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	2 g L <sup>-1</sup>
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L <sup>-1</sup>
Magnesiumsulfat	0,5 g L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung (2.4.4.2)	1 mL L <sup>-1</sup>

Das Medium wurde auf pH 6,0 eingestellt und separat vom Rapsstroh für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Vom Rapsstroh wurden jeweils 2 g in 250 mL Erlenmeyerkolben eingewogen und autoklaviert, danach wurde 100 mL steriles Medium hinzugefügt. Das Animpfen erfolgte mit

10 mL der homogenisierten Vorkultur. Die Hauptkulturen wurden bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss inkubiert.

#### 2.4.4.4. Festbettkultur mit Rapsstroh

Für die Emerskulturen wurden 250 mL Weithals-Erlenmeyerkolben mit jeweils 7,5 g Rapsstroh verwendet. Die Vorkulturen wurden 7 Tage lang im SNL-Medium kultiviert. Danach wurden sie 1:2 mit Hauptkulturmedium verdünnt, homogenisiert und zum Animpfen der Emerskulturen genutzt. Beim Animpfen wurden 1 mL verdünnte Vorkultur und 1,5 mL Hauptkulturmedium pro 1 g Rapsstroh in die Kolben gegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C unter Lichtausschluss und ohne Schütteln. Alle 14 Tage wurden 7,5 mL steriles ddH<sub>2</sub>O zugegeben, um die Verdunstung zu kompensieren. Nach 63 Tagen wurden die Kolben zwecks Fruktifikation in die Klimakammer VT1415 (Vötsch, Balingen) überführt. Dort wurden sie bei 24 °C, 90% der relativen Luftfeuchtigkeit und einem 12 h Hell-Dunkel-Zyklus inkubiert.

## 2.5. Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1. Isolation von DNA und RNA

#### 2.5.1.1. DNA-Isolation aus Basidiomyceten

Die DNA-Isolation aus Pilzen basierte auf dem Protokoll von Liu *et al.* (2000). Vor dem Beginn wurden die Flüssigkulturen von Pilzen in 50 mL Zentrifugenröhrchen 5 min lang bei 4.700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Myzelpellets wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert, so dass ein feines Pulver entstand. Eine Spatelspitze davon wurde in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 500 µL Lysepuffer (400 mM TRIS-HCl, pH 8; 60 mM EDTA, pH 8; 150 mM NaCl, 1% SDS) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 150 µL 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) hinzugefügt, die Proben wurden gevortext und 1 min bei 14.000 g abzentrifugiert. Die Überstände wurden in ein frisches Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an Isopropanol gemischt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Pellets mit 500 µL 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 50 µL ddH<sub>2</sub>O gelöst und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.5.1.2. DNA-Isolation aus *S. cerevisiae*

Die Hefen wurden über Nacht in einem Reagenzglas mit 5 mL YSDO Medium bei 30 °C und 150 rpm inkubiert, um ausreichend Material zu bekommen. Die weitere Durchführung verlief analog zur DNA-Isolation aus Basidiomyceten (2.5.1.1) mit dem Unterschied, dass die Hefen nicht im flüssigen Stickstoff gemörsert, sondern mittels einer Schwingmühle aufgeschlossen wurden. Dabei wurden die Proben mit Lysepuffer und einer Spatelspitze Glasperlen (Ø 0,25-0,5 mm) versetzt und für 5 min bei 30 Hz aufgeschlossen.

### 2.5.1.3. DNA-Isolation aus *E. coli*

Die Plasmid-Isolation aus den transformierten *E. coli* Klonen wurde mittels Mini-Präparation nach Dörnte und Kües (2012) durchgeführt. Die Klone wurden über Nacht in 3 mL LB-Medium bei 37 °C, 180 rpm in einem Reagenzglas mit ca. 45° Neigung kultiviert. Die Kultur wurde in 2 1,5 mL Reaktionsgefäßen 1 min lang bei 14.000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden in 75 µL TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA; pH 8.0) gelöst und mit 150 µL der alkalischer Lyse-Lösung (0,4 M NaOH, 2% SDS) vermischt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 500 µL der Renaturierungslösung (0,5 NaCl, 1 M Natriumacetat mit pH 4,8) hinzugegeben und die Proben für 20 min bei -20 °C inkubiert. Danach wurden sie bei 14.000 g für 20 min zentrifugiert und die Überstände wurden in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µL Isopropanol gemischt. Nach erneuten 20 min Zentrifugation wurden die Pellets mit 500 µL 70% Ethanol gewaschen, für 5 min bei 14.000 g zentrifugiert, getrocknet, in 50 µL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.5.1.4. DNA-Isolation aus Agarosegelen und PCR-Amplifikaten

Die DNA-Banden mit dem gesuchten Produkt wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Wenn keine Gelelektrophorese erforderlich war, wurde die DNA direkt aus dem Produkt der PCR-Reaktion aufgereinigt. Die DNA wurde mit dem Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel) gemäß der Gebrauchsanleitung des Herstellers isoliert.

### 2.5.1.5. RNA-Isolation

Vor Beginn der Isolation wurden Mörser und Pistill 3 h lang bei 300 °C ausgeglüht. Die frischen Proben wurden in flüssigem Stickstoff mit Hilfe des ausgeglühten Mörsers und Pistills aufgeschlossen. Die Isolation der RNA aus dem gemörserten Proben erfolgte mit dem RNEasy Plant Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Als Puffer wurde RLT-Puffer mit Mercaptoethanol eingesetzt. Bei Proben für die RT-qPCR fand gemäß den Vorgaben des Herstellers zusätzlich ein 15 min langer DNA-Verdau mit DNase statt. Die isolierte RNA und die Reste der Proben, die nicht gemörsert waren, wurden im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

## 2.5.2. Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nucleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA und RNA erfolgte, wenn nicht anders angegeben, photometrisch mit dem NanoPhotometer™ Pearl (Implen). Die Messung erfolgte bei 230, 260 und 260 nm. Nucleinsäuren absorbieren Licht bei 260 nm, die aromatischen Seitenketten der Proteine bei 280 nm. Absorption bei 230 nm steht für Kontamination durch organische Verbindungen wie

Thiocyanate. Bei DNA wurde ein  $A_{260}/A_{280}$  Absorptionsquotient von  $\geq 1,8$  angestrebt, bei RNA  $\geq 2,0$ .

#### 2.5.2.1. Kapillar-Gelelektrophorese

Die Durchführung der Kapillar-Gelelektrophorese erfolgte nach Herstellerangaben mittels QIAxcel Advanced (Qiagen) unter Verwendung des QIAxcel RNA QC Kits v2.0 und des QIAxcel DNA High Resolution Kits. RNA wurde zusammen mit einem 200-6000 Nukleotide langen Größenmarker und dem RNA Alignment Marker aufgetrennt. DNA wurde mit einem 25-500 bp Größenmarker und 15-1000 bp Alignment Marker nach Programm L des Herstellers getrennt.

#### 2.5.2.2. Fluorometrische Quantifizierung

Die richtige Verdünnung der DNA Probe ist sehr wichtig für die optimale Transkriptom-Sequenzierung. Die DNA Konzentration der cDNA-Bibliothek wurde deswegen mittels eines Qubit® 2.0 Fluorometers (Life Technologies) bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.5.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 2.5.3.1. Amplifikation von *aao*

Um die *aao*-Sequenz aus *P. sapidus* zu amplifizieren wurden die Primer *gpdII*\_AAO und *lcc1term*\_AAO. Es handelte sich dabei um Primer mit Überhängen die homolog zu *gpdII*-Promotor- und *lcc1*-Terminatorsequenzen sind. Dadurch war später die homologe Rekombination in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* möglich, mit der die Sequenz in das Plasmid pYSK7 eingebaut wurde. Die optimale Annealing-Temperatur für diese Primer wurde mittels Gradienten-PCR bestimmt. Für die Vektorkonstruktion wurde die HotStar HiFidelity DNA Polymerase verwendet, zu Screening Zwecken wurde die HotStar *Taq* DNA Polymerase eingesetzt. Die PCR-Ansätze hatten ein Volumen von 10 bis 40  $\mu\text{L}$ . Die PCR wurde im AlphaSC Thermocycler (Analytik Jena) durchgeführt. Wenn ein Temperaturgradient im Annealing Schritt benötigt wurde, um die optimale Temperatur zu ermitteln, wurde CFX Connect™ Thermocycler (Bio-Rad) verwendet. Als Negativkontrolle wurde ddH<sub>2</sub>O anstatt DNA-Probe eingesetzt. Eine Standard PCR mit 20  $\mu\text{L}$  Volumen enthielt folgende Reagenzien:

*template* DNA (10-100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ )      1  $\mu\text{L}$

Primer (10 pmol $\mu\text{L}^{-1}$ )	je 0,5 $\mu\text{L}$
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 $\mu\text{L}$
Q-Solution	4 $\mu\text{L}$
5x HiFi Puffer	4 $\mu\text{L}$
DNA Polymerase	0,7 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	8,9 $\mu\text{L}$

Das PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

Erste Denaturierung	95 °C	5 min
<u>35 Zyklen</u>		
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	55 °C	1 min
Elongation	72 °C	3 min
Endelongation	72 °C	5 min
Ende	4 °C	Unbegrenzt

#### 2.5.3.2. Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR wurden die *E. coli* Klone mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in die PCR-Reaktionsgefäße übertragen. Beim Screening von *S. cerevisiae* und *P. sapidus* Klonen musste die DNA zuerst isoliert (2.5.1.1, 2.5.1.2) und entsprechend verdünnt werden. Die Zusammensetzung eines 10  $\mu\text{L}$  Kolonie-PCR Ansatzes sah folgendermaßen aus:

<i>template</i> DNA (10-100 ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	1 $\mu\text{L}$ bei Pilzen, sonst <i>E. coli</i> Zellen
Primer (10 pmol $\mu\text{L}^{-1}$ )	je 0,25 $\mu\text{L}$
dNTP-Mix (10 mM)	0,2 $\mu\text{L}$
Q-Solution	2 $\mu\text{L}$
10x CoralLoad Puffer	1 $\mu\text{L}$
HotStar <i>Taq</i> Polymerase	0,05 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	5,25 bzw 6,25 $\mu\text{L}$

Das PCR-Programm entsprach dabei dem Programm für *aao* (2.5.3.1).

### 2.5.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Amplifikate und der verdauten Plasmide erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurde die Agarose im TAE-Puffer (4,84 g L<sup>-1</sup> TRIS, 1,142 mL L<sup>-1</sup> 100% Essigsäure und 2 mL L<sup>-1</sup> 0,5 M EDTA pH 8) in einer Konzentration von 1% (w/v) bei PCR-Produkten, und 0,75% bei Plasmiden, in einem Mikrowellenofen aufgeköcht, bis sie komplett gelöst war. Die Lösung wurde unter Rühren abgekühlt und mit 0,0001% (v/v) Ethidiumbromid versehen. Als Gelkammern dienten die horizontalen PerfectBlue™ Minigelsysteme S und L (Peqlab). Die kleinere Gelkammer enthielt 56 mL Agarose und die größere 168 mL. Die Elektrophorese verlief 1 h lang bei 80 bzw. 130 V Spannung bei maximaler Stromstärke und Leistung. Die Proben, die nicht bereits CoralLoad Puffer enthielten, wurden mit einem Ladepuffer mit folgender Zusammensetzung versehen:

#### 6x Ladepuffer

Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol	0,25% (w/v)
Glycerol	30% (v/v)

Die Gele wurden nach der Auftrennung in dem DeVision Dbox Geldokumentationssystem unter UV-Licht fotografiert.

## 2.5.4. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

### 2.5.4.1. Reverse Transkription

Nach der Isolation der RNA (2.5.1.5) wurden 10 µL des Eluats für die reverse Transkription mit Hilfe der reversen Transkriptase M-MLV (Invitrogen) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers, mit Zugabe des RNase Inhibitors RNaseOUT™ (Invitrogen). Als Primer dienten die 14 nt langen Anchored Oligo(dT)-Primer (Thermo Fisher Scientific). Nach dem Ende der Synthese des Erststranges wurde die cDNA bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.5.4.2. RT-qPCR

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde mit Hilfe des CFX Connect™ Thermocyclers (Bio-Rad) durchgeführt. Die Messung beruhte auf der Intensitätszunahme der Fluoreszenz des dsDNA-sensitiven Farbstoffs SYBR Green I. 6 *housekeeping* Gene wurden getestet und mittels NormFinder Software (<https://moma.dk/normfinder-software>) analysiert, um eine optimale Kombination an *housekeeping* Genen für die qPCR Auswertung zu erhalten. Basierend auf den Intron/Exon-Strukturen entsprechender Gene im *P. ostreatus* Genom, wurden die Primer



wurden soweit möglich Exon-übergreifend entworfen. Die RT-qPCR-Reaktionen wurden als Triplikate in einem Volumen von 10 µL pro Ansatz durchgeführt, mit einer cDNA Menge, die äquivalent zu 10 ng revers transkribierter RNA war. Außerdem wurde für jedes Primerpaar (Tabelle 2.6) zwei Negativkontrollen verwendet: ddH<sub>2</sub>O und nicht revers-transkribierte RNA statt cDNA. Die Ansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

<i>template</i> cDNA	1 µL
Primer (10 pmol µL <sup>-1</sup> )	je 0,2 µL
Power SYBR® Green PCR Master Mix	5 µL
ddH <sub>2</sub> O	3,6 µL

Das qPCR-Programm bestand aus 45 Zyklen sah folgendermaßen aus:

95 °C	10 min
<u>45 Zyklen</u>	
95 °C	15 s
60 °C	1 min

Auf die RT-qPCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse von 65 bis 95 °C in 0,5 °C Schritten. Die Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus gemessen. Die Ct-Werte wurden basierend auf der Effizienz der Amplifikation manuell korrigiert (Robledo *et al.* 2014). Die weitere Berechnung basierte auf der Methode von Pfaffl (Pfaffl 2001).

### 2.5.5. Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Das Plasmid pYSK7 wurde nach der Isolation aus *E. coli* mit Hilfe der Endonukleasen *Bam*HI und *Hpa*I linearisiert. Dadurch sollten zwei Fragmente mit 827 bp und 10272 bp Länge entstehen. Die Reaktionsansätze bestanden aus:

Plasmid-DNA (2.770 ng µL <sup>-1</sup> )	4 µL
FastDigest Green Buffer 10X	4 µL
Endonukleasen	je 2 µL
ddH <sub>2</sub> O	28 µL

Die Reaktion verlief 15 min lang bei 37 °C, danach wurden die Enzyme für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Das Produkt wurde gelelektrophoretisch in einem 0,75% Agarose-Gel aufgetrennt. Die geschnittenen Plasmide wurden aus dem Gel isoliert (2.5.1.4).

## 2.5.6. Transformation

### 2.5.6.1. Transformation von *S. cerevisiae*

Über Nacht wurde eine *S. cerevisiae* Vorkultur in einem Reagenzglas mit 3 mL YPDA Medium bei 30 °C und 230 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit 2 mL der Vorkultur 50 mL YPDA Medium in 250 mL Erlenmeyerkolben angeimpft und für 5,5 h bei 30 °C und 230 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 1.100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets wurden mit 10 mL ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in 300 µL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Für die Transformation wurden 50 µL der Zellsuspension mit 50 µL ssDNA aus Lachssperma, 1 µg pYSK7 und 80 ng gereinigtem *ao* PCR-Amplifikat in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Danach wurden 272 µL einer Mischung aus 240 µL 50% Polyethylenglycol 3350 und 32 µL 1 M Lithiumacetat hinzugefügt. Die Ansätze wurden durchmischt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen einem 15-minütigen Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Die Zellen wurden zentrifugiert und die Pellets in 200 µL ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die kompletten 200 µL wurden unverdünnt auf YSDO-Platten ausplattiert und 2 bis 3 Tage bei 30 °C inkubiert, bis die Klone sichtbar wurden.

### 2.5.6.2. Transformation von *E. coli*

Der chemisch kompetente *E. coli* Stamm One Shot<sup>®</sup> TOP10 (Invitrogen) wurde basierend auf dem Herstellerprotokoll transformiert. Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und nach der Zugabe von 1,5 µL Plasmid-DNA (75 bis 110 ng), bzw 1 µL pUC19 (10 pg) als Kontrolle für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgten 30 s Hitzeschock bei 42 °C. Nach 2 min auf Eis wurden 250 µL LB-Medium dazupipettiert. Danach wurden die Zellen 1 h lang in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach der Regeneration wurden 20 und 200 µL der Zellen auf LB<sup>Amp</sup> Platten ausplattiert. Von den pUC19 Kontrollen wurden 10 µL mit 90 µL LB-Medium versetzt und ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

### 2.5.6.3. Transformation von *C. cinerea*

Die Transformation von *C. cinerea* erfolgte nach dem Protokoll von Dörnte und Kües (2012). Für eine Transformation wurden Sporen von 4 komplett bewachsenen YMG/T-Platten mit *C. cinerea* geerntet. Dazu wurden sie mit 15 mL sterilem ddH<sub>2</sub>O geflutet und unter Verwendung eines Spatels mit dem Myzel vermischt, so dass die asexuellen Sporen ins Wasser gelangten. Die Sporen wurden vom Myzel getrennt, indem sie durch einen Trichter mit einem sterilen Miracloth Tuch (Porendurchmesser 22-25 µm) in ein 30 mL Sterilin<sup>™</sup> Zentrifugenröhrchen (Sigma-Aldrich) überführt wurden. Darin wurden sie für 5 min bei 2.600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 5 mL frischem MM-Puffer (0,5 M Mannitol, 0,05 M Maleat mit pH 5,5) gewaschen. Die Pellets wurden in 2 mL Enzymlösung aufgenommen und bei 37 °C und 110 rpm 4 bis 6 h inkubiert, bis sich Protoplasten bildeten.

Die Enzymlösung bestand aus 400 mg Cellulase „Onozuka“ R-10 aus *Trichoderma viride* und 10 mg Chitinase aus *Streptomyces griseus*, die in 10 mL MM-Puffer gelöst und sterilfiltriert wurden. Zum Beenden der Protoplastierung wurde zweimal mit 5 mL MMC-Puffer (0,5 M Mannitol, 0,05 M Maleat mit pH 5,5 und 25 mM Calciumchlorid) gewaschen und jeweils für 5 min bei 640 g zentrifugiert. Die Protoplasten wurden abschließend in 300  $\mu$ L MMC-Puffer gelöst und in 50  $\mu$ L Aliquots in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Für die Transformation wurden mindestens 1  $\mu$ g Plasmid mit 12,5  $\mu$ L PEG/CaCl<sub>2</sub>-Lösung zu den Protoplasten gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Die PEG/CaCl<sub>2</sub>-Lösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

Polyethylenglycol 4000	10g
1 M Calciumchlorid	1 ml
1 M TRIS-HCl, pH 7,5	400 $\mu$ L

Das Ganze wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 40 mL aufgefüllt, sterilfiltriert und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Nach der Inkubation auf Eis wurden weitere 500  $\mu$ L PEG/CaCl<sub>2</sub>-Lösung hinzugefügt und die Protoplasten wurden einem 5 min langen Hitzeschock bei Raumtemperatur unterzogen. Nach Zugabe von 1 mL sterilem STC-Puffer (1 M Sorbitol, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM TRIS-HCl mit pH 7,5) wurden jeweils 390  $\mu$ L der Protoplasten-Lösung auf Platten mit Regenerationsmedium gegeben. Die Platten wurden bei 37 °C und unter hoher Luftfeuchtigkeit, erzeugt durch feuchte Tücher in der Plastikkiste, in einem Brutschrank inkubiert. Nach 2 bis 3 Tagen wurden die ersten Klone sichtbar.

### **2.5.7. Sequenzierung der *ao***

Die Sequenzierung wurde im IFZ Sequenzierlabor am Institut für Mikro- und Molekularbiologie (JLU Gießen) mit einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) in Auftrag durchgeführt. Dazu wurden mindestens 800 ng gereinigtes PCR-Amplifikat (2.5.1.4) in einer Konzentration von mindestens 150 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>, zusammen mit den Primern (10 pmol  $\mu$ L<sup>-1</sup>) verwendet. Es wurden die Primer 29, 130, 134, 135 und 136 eingesetzt (Tabelle 2.5). Die Sequenzen wurden mittels der ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) und der GENTle Software (<http://gentle.magnusmanske.de/>) zusammengesetzt.

## 2.6. Proteinbiochemische Methoden

### 2.6.1. Proteinreinigung mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)

Die Reinigung der AAO erfolgte mittels FPLC Systemen von Biorad (BioLogic DuoFlow™ und NGC Quest™ 10). Beide Systeme waren mit einem BioLogic BioFrac Fraktionssammler von Biorad ausgestattet. Die Geräte liefen bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C. Alle verwendeten Puffer wurden mit einem 0,2 µm Membranfilter RC 58 (Whatman) sterilfiltriert und mittels Ultraschall entgast.

#### 2.6.1.1. Probenvorbereitung für FPLC

Die Kulturbrühen wurden zunächst durch einen Büchnertrichter mit Filterpapier abgenutscht, um das Myzel abzutrennen. Der pH-Wert des Überstands wurde auf 7,8 eingestellt und die Lösung für 20 min bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände einer Tangentialflussfiltration unterzogen (Ultrasette™ 300K, Pall). Das Filtrat wurde mittels FPLC weiteren Reinigungsschritten unterzogen.

#### 2.6.1.2. Anionenaustauscher-FPLC

Die Auftrennung erfolgte mit einer selbstgepackten XK 26/40 Säule, gefüllt mit einem schwachen Anionenaustauscher (DEAE Sepharose™ Fast Flow). Als Niedrigsalzpuffer diente 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit pH 7,8; der Hochsalzpuffer war 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit pH 7,8 und 1 M NaCl. Die Säule wurde vorbereitet, indem sie mit 2 Säulenvolumina (SV) ddH<sub>2</sub>O und mit 2 SV Niedrigsalzpuffer gespült wurde. Die Proteine wurden photometrisch bei 280 nm detektiert. Das Eluat wurde in 40 mL großen Fraktionen gesammelt. Die Flussrate wurde so eingestellt, dass der Druck in der Säule maximal 35 psi betrug. Das Programm sah folgendermaßen aus:

Injektion der Probe	500-1000 ml
Niedrigsalzpuffer	2 SV
Linearer Gradient zum Hochsalzpuffer	1,5 SV
Hochsalzpuffer	2 SV
Niedrigsalzpuffer	2 SV

Die gesammelten Fraktionen wurden mit einem Veratrylalkohol-Assay auf ihre AAO Aktivität überprüft (2.6.6.1).

#### 2.6.1.3. Größenausschluss-FPLC

Nach der Anionenaustauscher-Chromatographie wurden die aktiven Fraktionen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit pH 7,8 und 150 mM NaCl umgepuffert und konzentriert. Bei einem

Volumen bis 120 mL wurden dafür Macro- und Jumbosep 10 K Zentrifugaleinheiten (Pall) eingesetzt. Bei höherem Volumen wurde die Vivaflow® 200 10 K Querstrom-Filtrationseinheit (Sartorius) verwendet. Für die Größenausschluss-Chromatographie wurden die Säulen HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (10 bis 600 kDa) und 75 pg (3 bis 70 kDa) (GE Healthcare) verwendet. Die erste Auftrennung erfolgte mit HiLoad 16/600 Superdex 200 pg eine zweite Auftrennung mit HiLoad 16/600 Superdex 75 pg. Die Säulen wurden vorbereitet, indem sie mit 2 Säulenvolumina ddH<sub>2</sub>O und mit 2 SV Elutionspuffer (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit pH 7,8 und 150 mM NaCl) gespült wurden. Die Proteine wurden photometrisch bei 280 nm detektiert. Das Eluat wurde in 5-7 mL großen Fraktionen gesammelt. Die Flussrate wurde so eingestellt, dass der Druck maximal 42 psi betrug. Es wurde folgendes Programm verwendet:

Injektion der Probe	5-10 ml
Elutionspuffer	2 SV

Die Fraktion mit aktiver AAO wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.6.2. Proteinextraktion aus Festbettkulturen mit Rapsstroh**

Um die extrazellulären Enzyme aus Festbettkulturen mit *P. sapidus* zu isolieren, wurden die Kolben mit 37,5 mL Extraktionspuffer (50 mM TRIS, mit 50 mM Malonsäure auf pH 6 eingestellt) geflutet und 1 h lang inkubiert. Danach wurden die Kolben 10 min lang im Ultraschallbad inkubiert und die Überstände wurden 5 min lang bei 17500 g zentrifugiert

### **2.6.3. SDS-PAGE**

#### **2.6.3.1. Denaturierende SDS-PAGE**

Für die Herstellung von Polyacrylamidgelen und die Probenvorbereitung wurden folgende Lösungen verwendet:

#### SDS-Elektrophorese Laufpuffer 10x

TRIS	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1% (w/v)

#### Lower Tris 4 x

TRIS 1,5 M

SDS 0,4% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf 8,8 mit NaOH eingestellt.

#### Upper Tris 4 x

TRIS 0,5 M

SDS 0,4% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf 6,8 mit NaOH eingestellt.

#### Ladepuffer 2,5 x

1 M TRIS-HCl pH 6,8 125 mM

SDS 5% (w/v)

Bromphenolblau 0,25% (w/v)

Glycerol 25% (v/v)

Der SDS-Gelladepuffer wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Die Gele bestanden aus 6% Sammelgel und 12% Trenngel und wurden für die Mini-Protean® Tetra System Gelkammer (Bio-Rad) hergestellt. Die Zusammensetzung der Gele ist in der

Tabelle 2.10 dargestellt.

Tabelle 2.10 Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE

	<b>6% Sammelgel</b>	<b>12% Trenngel</b>
ddH <sub>2</sub> O	1,8 ml	2,7 ml
Lower Tris	-	1,5 ml
Upper Tris	750 µL	-
Rotiphorese® Gel 40	450 µL	1,8 ml
APS 40% (w/v)	10 µL	15 µL
TEMED	4 µL	7,5 µL

Zuerst wurde das Trenngel gegossen, danach wurde es mit Isopropanol überschichtet und 30 min stehen gelassen, bis es auspolymerisiert war. Danach wurde Isopropanol entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Kamm eingesetzt.

Für die denaturierende SDS-PAGE wurden pro Ansatz, wenn nicht anders angegeben, 20 µL Probe mit 8 µL denaturierendem Ladebuffer und 2 µL 1 M DTT versetzt, bei 95 °C 3 min lang erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Für eine N-Deglykosylierung der Proteine wurden die Proben mit 2 µL PNGase F, 2 µL GlycoBuffer 2 (10X) und 2 µL 10% NP-40 (New England Biolabs) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. In die Geltaschen wurden abhängig von der Konzentration 10-30 µL Probe oder 5 µL Protein-Größenmarker pipettiert. Die Gelkammer wurde mit 1 x Laufpuffer gefüllt. Die Stromstärke betrug während der Auftrennung im Sammelgel 10 mA pro Gel bei maximaler Spannung und im Trenngel 20 mA pro Gel. Die Auftrennung lief bis die Bande vom Bromphenolblau bis an den unteren Rand des Gels gelangte. Die Gele wurden mit Reinstwasser gewaschen und angefärbt (2.6.3.3) oder für eine Western Blot Analyse (2.6.4) eingesetzt.

#### 2.6.3.2. Native SDS-PAGE

Die native SDS-PAGE wurde mit gebrauchsfertigen TG PRiME™ 8-16% Gelen (SERVA) und dem SERVAGel™ N Native Starter Kit durchgeführt. Als Gelkammer diente Perfect Blue™ Twin S (Peqlab). Wenn nicht anders angegeben, wurde ohne vorherige Hitzedenaturierung 20 µL der Probe mit 8 µL Ladebuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 4 °C für 10 min bei 50 V und danach für 120 min bei 200 V. Die Gele wurden mit Reinstwasser gewaschen und angefärbt (2.6.3.3).

#### 2.6.3.3. Färbung mit kolloidalem Coomassie

Für die Herstellung der kolloidalen Coomassie-Färbelösung wurden zunächst 50 g Aluminiumsulfat-Hydrat in 500 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst. Danach wurden 100 mL Ethanol und 0,2 g Coomassie G-250 hinzugefügt und bis zum Auflösen gerührt. Danach wurden 23,5 mL 85% Orthophosphorsäure dazugegeben und das Ganze auf 1 L mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Lösung wurde im Dunkeln gelagert.

Die Gele wurden in einer Schale mit der Färbelösung übergossen und über Nacht auf dem Wippschüttler (Gyro Rocker SSL3, Stuart) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gele mit Wasser gewaschen und eingescannt (Microtek Bio 5000, SERVA).

#### 2.6.4. Western Blot

Für die Western Blots wurden folgende Lösungen verwendet:

### Blotting-Puffer 10 x

TRIS            250 mM

Glycin           1,92 M

Die Lösung wurde vor Gebrauch verdünnt und mit 5% (v/v) Methanol versehen.

### TBS 10 x

NaCl            1,5 M

TRIS-HCL      0,5 M

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

### TBS-T 1 x

Verdünnte TBS-Lösung mit 0,1% Tween 20.

Für den Western Blot wurden die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine (2.6.3.1) in einer PerfectBlue™ Web™ S Blotting Kammer (Peglab) vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Carl Roth) übertragen. Die Membran wurde davor auf die Gelgröße zugeschnitten und für 5 min in Methanol aktiviert. Polyacrylamidgele, Filterpapier und die Schwämme wurden 5 min lang im Blotting-Puffer eingelegt. Die Membran wurde beim Aufbau so auf das Gel gelegt, dass keine Luftblasen entstanden. Die Schwämme an beiden Seiten sorgten für den stabilen Halt. Die Kammer wurde mit dem Blotting-Puffer gefüllt und auf 4 °C gekühlt. Das Blotting lief für 1 h bei 100 V. Anschließend wurde die Membran mit 30 mL TBS-T Puffer gewaschen. Die freien Proteinbindestellen auf der Membran wurden blockiert, indem die Membran über Nacht, bei 4 °C in 30 mL 5% Milchpulver-Lösung inkubiert wurde.

Am nächsten Tag wurde die Membran wieder mit TBS-T gewaschen und von Milchresten befreit. Die Detektion von AAO erfolgte mit einem Antikörper (Eurogentec, Seraing, Belgien), der gegen die NQSFNLFNFRDSSEFNA-Sequenz der *P. sapidus* AAO gerichtet ist. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:30 mit 29 mL TBS-T auf die Membran gegeben. Nach 2 h Inkubation auf dem Wippschüttler wurde die Membran dreimal 10 min lang mit 30 mL TBS-T gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:15000 in TBS-T. Es handelte sich dabei um ein Anti-Kaninchen Ziegen-IgG mit konjugierter Meerrettichperoxidase (Merck KGaA, Darmstadt). Nach 1h Inkubation erfolgten wieder 3 Waschschrte mit TBS-T. Um die Antikörper sichtbar zu machen wurde der Immun-Blot® Opti-4CN™ Colorimetric Kit (Bio-Rad) eingesetzt. Das kolorimetrische Färbereagenz wurde durch das Mischen von 9 mL ddH<sub>2</sub>O, 1 mL Opti-4CN Verdünner und 0,2 mL des Substrates 4-Chlor-1-naphthol hergestellt. Die Inkubation wurde gestoppt, indem die



Färbereagenz entfernt und Wasser zugefügt wurde, wenn die Banden deutlich sichtbar wurden.

### 2.6.5. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit gebrauchsfertigen IEF-Gelen pH 3-10 (SERVA) durchgeführt. Pro Tasche wurden 15 µL Probe mit 8 µL Ladepuffer aufgetragen. Als Marker diente der IEF Marker 3-10, Liquid Mix (SERVA). Als Gelkammer diente die auf 4 °C gekühlte Perfect Blue™ Twin S (Peqlab). Die Auftrennung erfolgte nach dem folgenden Programm:

60 min	50 V
60 min	200 V
30 min	500 V

Nach der Auftrennung wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie angefärbt (2.6.3.3).

### 2.6.6. Enzymassays

Die Messungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Der Lichtweg betrug bei 200 µL Gesamtvolumen 0,64 cm und bei 250 µL 0,8 cm. Die Messung erfolgte bei 30 °C, 10 min lang mit einem Intervall von 31 s im Synergy™ 2 Plattenreader (BioTek Instruments). Die Berechnung von Enzymaktivitäten in U L<sup>-1</sup> erfolgte basierend auf folgender Gleichung:

$$U L^{-1} = \frac{\Delta E \cdot V_{gesamt} \cdot F}{V_{Probe} \cdot \epsilon \cdot d} \quad [1]$$

U L<sup>-1</sup> = Enzymaktivität in U L<sup>-1</sup>

ΔE = Extinktionsänderung pro Minute

V<sub>gesamt</sub> = Gesamtvolumen der Reaktion

V<sub>Probe</sub> = Eingesetztes Probenvolumen

d = Schichtdicke

ε = Extinktionskoeffizient

F = Verdünnungsfaktor

### 2.6.6.1. Veratrylalkohol-Assay

Die AAO-Aktivität wurde bei einer Wellenlänge von 310 nm gemessen. Als Substrat diente Veratrylalkohol, das zu Veratrymaldehyd ( $\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) oxidiert wurde. Die Messung erfolgte bei 30 °C, 10 min lang mit einem Intervall von 31 s. Die Zusammensetzung des Veratrylalkohol-Assays ist in Tabelle 2.11 dargestellt.

Tabelle 2.11: Veratrylalkohol-Assay

Volumen	Substanz
50 µL	Probe
100 µL	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5
20 µL	50 mM Veratrylalkohol
30 µL	Katalase (462 U ml <sup>-1</sup> , Sigma)

Katalase und Veratrylalkohol waren im Puffer gelöst. Für die Ermittlung der Michaelis-Menten Kinetik wurde statt Natriumacetat-Puffer 100 mM Natriumphosphatpuffer mit pH 6 eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats gestartet. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung [1] berechnet.

### 2.6.6.2. Anisalkohol-Assay

Die Michaelis-Menten Kinetik mit Anisalkohol als Substrat wurde bei 285 nm gemessen ( $\epsilon_{285} = 16.980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Die Messung erfolgte bei 30 °C, 10 min lang mit einem Intervall von 31 s. Die Zusammensetzung des Anisalkohol-Assays ist in der Tabelle 2.12 dargestellt.

Tabelle 2.12: Anisalkohol-Assay

Volumen	Substanz
50 µL	Probe
100 µL	100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6
20 µL	Anisalkohol mit variabler Konzentration
30 µL	Katalase (462 U ml <sup>-1</sup> )

Die Reaktion wurde durch Zugabe vom Substrat gestartet. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung [1] berechnet.

### 2.6.6.3. Benzylalkohol-Assay

Die Michaelis-Menten Kinetik mit Benzylalkohol als Substrat wurde in einer UV-transparenten Mikrotiterplatte bei 250 nm gemessen ( $\epsilon_{250} = 13800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Die Messung erfolgte bei 30 °C, 10 min lang mit einem Intervall von 31 s. Die Zusammensetzung des Benzylalkohol-Assays ist in der Tabelle 2.13 dargestellt.

Tabelle 2.13: Benzylalkohol-Assay

Volumen	Substanz
50 $\mu\text{L}$	Probe
100 $\mu\text{L}$	100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6
20 $\mu\text{L}$	Benzylalkohol mit variabler Konzentration
30 $\mu\text{L}$	Katalase (462 U $\text{ml}^{-1}$ )

Die Reaktion wurde durch Zugabe vom Substrat gestartet. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung [1] berechnet.

### 2.6.6.4. ABTS-Assay

Die Laccase-Aktivität wurde mittels ABTS-Assay bei 420 nm gemessen ( $\epsilon_{420} = 43200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Die Zusammensetzung des Benzylalkohol-Assays ist in der Tabelle 2.14 dargestellt.

Tabelle 2.14: ABTS-Assay

Volumen	Substanz
20 $\mu\text{L}$	Probe
80 $\mu\text{L}$	150 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5
50 $\mu\text{L}$	2 mM ABTS
50 $\mu\text{L}$	Katalase (370 U $\text{ml}^{-1}$ )

Die Reaktion wurde durch Zugabe vom Substrat gestartet. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung [1] berechnet.

### 2.6.6.5. Phenolrot-Assay

Die Aktivität von Mangan-Peroxidase (MnP) und versatiler Peroxidase (VP) wurde mittels Phenolrot-Assay bei 610 nm ( $\epsilon_{610} = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ermittelt. Die Messung erfolgte in 1,6 mL Küvetten (1 cm Lichtweg) im Specord 50 Photometer (Analytik Jena). Die beiden Assays

unterschieden sich nur durch die Zugabe von Mangansulfat bei MnP Assay. Die Zusammensetzung des Phenolrot-Assays ist in der Tabelle 2.15 dargestellt.

Tabelle 2.15: Phenolrot-Assay

<b>MnP-Assay</b>		<b>VP-Assay</b>	
<b>Volumen</b>	<b>Substanz</b>	<b>Volumen</b>	<b>Substanz</b>
350 µL	Natriumsuccinatpuffer 20 mM, pH 4,5	450 µL	Natriumsuccinatpuffer 20 mM, pH 4,5
100 µL	1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µL	1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
100 µL	250 mM Lactat	100 µL	250 mM Lactat
100 µL	1% Albumin	100 µL	1% Albumin
200 µL	0,05% Phenolrot	200 µL	0,05% Phenolrot
100 µL	1 mM MnSO <sub>4</sub>	50 µL	Probe
50 µL	Probe		

Die Ansätze wurden 5 min bei 32 °C inkubiert, danach wurde die Reaktion mit 40 µL 2 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestoppt und die Ansätze wurden bei 610 nm gemessen. Die MnP-Aktivität wurde ermittelt indem die VP-Aktivität vom Ergebnis des MnP-Assays subtrahiert wurde. Die Enzymaktivitäten wurden nach Gleichung [1] berechnet.

#### 2.6.6.6. Reactive Black 5 Assay

Die Aktivität von versatiler Peroxidase wurde auch mittels Reactive Black 5 Assay ermittelt. Die Messung verlief bei 598 nm ( $\epsilon_{598} = 30000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und 24 °C (Perez-Boada *et al.* 2005). Die Zusammensetzung des Reactive Black 5 Assays ist in der Tabelle 2.16 dargestellt.

Tabelle 2.16: Reactive Black 5 Assay

<b>Volumen</b>	<b>Substanz</b>
50 µL	Probe
100 µL	100 mM Natriumtartrat-Puffer pH 3,5
50 µL	0,5 mM Reactive Black 5
50 µL	0,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Die Reaktion wurde durch Zugabe vom Substrat gestartet. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung [1] berechnet.

### 2.6.6.7. Reactive Blue 5 Assay

Die Aktivität von Dyp-Typ Peroxidase wurde mittels Reactive Blue 5 Assay ermittelt (Sugano *et al.* 2009). Die Messung verlief bei 600 nm ( $\epsilon_{600} = 8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Die Zusammensetzung des Reactive Blue 5 Assays ist in der Tabelle 2.17 dargestellt.

Tabelle 2.17: Reactive Blue 5 Assay

Volumen	Substanz
50 $\mu\text{L}$	Probe
50 $\mu\text{L}$	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5
50 $\mu\text{L}$	600 $\mu\text{M}$ Reactive Blue 5
50 $\mu\text{L}$	0,4 mM $\text{H}_2\text{O}_2$

Die Reaktion wurde durch Zugabe vom Substrat gestartet. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung [1] berechnet.

### 2.6.6.8. Zwei-Enzym-Assay

Beim Zwei-Enzym Assay wurde untersucht wie gut AAO die Reaktion der Dyp-Typ Peroxidase mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  versorgen kann. Dazu wurden beide Assays gemeinsam durchgeführt. Gemessen wurde das Zerfallsprodukt von Reactive Blue 5 bei 600 nm (2.6.6.7). Die Zusammensetzung des Zwei-Enzym-Assays ist in der Tabelle 2.18 dargestellt.

Tabelle 2.18: Zwei-Enzym-Assay mit AAO und DyP-Typ Peroxidase

	Beide Enzyme ohne $\text{H}_2\text{O}_2$	Positivkontrolle mit $\text{H}_2\text{O}_2$ , ohne AAO	Negativkontrolle
AAO	40 $\mu\text{L}$	-	-
Dyp-Typ Peroxidase MsP1	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$
0,1 mM $\text{H}_2\text{O}_2$	-	50 $\mu\text{L}$	-
750 $\mu\text{M}$ Reactive Blue 5 im Puffer	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
5 mM Veratrylalkohol im Puffer	10 $\mu\text{L}$	-	-

Die Messung verlief bei 30 °C mit 31 s Messintervallen in den ersten 20 min, und danach alle 2 min bis die Reaktion gestoppt wurde.

### 2.6.7. Bradford-Assay

Die Proteinkonzentration wurde in einem Bradford-Assay mit Hilfe des Roti<sup>®</sup>-Nanoquant 5X Konzentrats (Carl Roth) ermittelt. Eine Standardreihe aus Rinderserumalbumin in verschiedenen Verdünnungsstufen diente dazu, die exakte Konzentration zu bestimmen. Es wurden jeweils 50 µL der Proben als Triplikate in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und mit 200 µL der 1:5 verdünnten Roti<sup>®</sup>-Nanoquant Lösung versehen. Die Messung erfolgte nach 20 min Inkubation bei 450 und 590 nm. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Kalibriergeraden berechnet, die aus Quotienten der Absorptionen (590nm/450nm) der einzelnen Verdünnungsstufen bestand.

### 2.6.8. Michaelis-Menten Kinetik

Für die Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  und der katalytischen Konstante  $k_{cat}$  wurde die gereinigte AAO im Veratrylalkohol-Assay, Anisalkohol-Assay und Benzylalkohol-Assay (2.6.6.1, 2.6.6.2, 2.6.6.3) eingesetzt. Die Substratkonzentrationen betragen jeweils 50-20000 µM, 10-2000 µM und 100-30000 µM. Die Messungen erfolgten bei 30 °C. Als Puffer diente ein 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH6). Für die Auswertung wurden nur die Messwerte aus den ersten 2 min verwendet. Hanes-Woolf-Diagramm wurde mit Excel Software erstellt, um  $K_m$  und  $V_{max}$  basierend auf folgender Gleichung zu berechnen:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{max}} \times [S] + \frac{K_m}{V_{max}} \quad [2]$$

$V$  = Umsatzgeschwindigkeit

$V_{max}$  = maximale Umsatzgeschwindigkeit

$K_m$  = Michaelis-Menten-Konstante

$S$  = Substratkonzentration

$k_{cat}$  wurde berechnet indem  $V_{max}$  durch die Enzymkonzentration dividiert wurde.

### 2.6.9. pH- und Temperaturoptimum von AAO

Die Ermittlung der pH- und Temperaturoptima der heterolog exprimierten AAO, sowie ihrer Stabilität bei unterschiedlichen Temperaturen, erfolgte basierend auf dem Veratrylalkohol-Assay (2.6.6.1). Für das pH-Optimum wurden im Assay folgende Puffer verwendet: McIlvaine Puffer (pH 2,2-8,0) (McIlvaine, 1921), 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 3,0-6,0) und 100 mM

Natriumphosphat-Puffer (pH 5,0-8,0). Die Stabilität von AAO wurde überprüft indem die Enzyme bei 4, 21, 37 und 50 °C inkubiert wurden und deren verbliebene Aktivität regelmäßig in einem Veratrylalkohol-Assay (2.6.6.1) bei 30 °C bestimmt wurde. Das Temperaturoptimum wurde durch Messungen der AAO-Aktivität bei unterschiedlichen Temperaturen berechnet.

### **2.6.10. Massenspektrometrische Analyse**

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Banden, deren Proteine identifiziert werden sollten, mit einem Skalpell ausgeschnitten und zur Massenpeptidfingerprinting-Analyse an das Biochemische Institut (AG Lochnit) gegeben. Dabei wurden die Proteine zunächst tryptisch verdaut und mit 1% Trifluoressigsäure aus dem Gel eluiert. Die MALDI-TOF-MS wurde mit einem Ultraflex TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) ausgeführt. Das Gerät lief im positiv-Ionen Reflektor-Modus mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure und Methylendiphosphonsäure als Matrix. Es wurden Gesamtspektren aus 200-400 Einzelspektren erhalten. Die Daten wurden mit dem Compass 1.1 Software Packet, bestehend aus FlexControl 2.4, FlexAnalysis 3.0 und BioTools 3.0 prozessiert. Die externe Kalibrierung erfolgte mit einem Peptidstandard (Bruker Daltonics).

Die Proteine wurden mittels einer MASCOT Peptidmassenfingerprint-Suche (<http://www.matrixscience.com>) in der NCBI nr Datenbank (Version 20140811, 47520513 Sequenzen) identifiziert. Es war eine Massentoleranz von 75 ppm erlaubt und die Cystein Carbamidomethylierung, als globale Modifikation und die Oxidation von Methionin, als variable Modifikationen wurden angewandt. Die Suche war auf Pilze limitiert.

## **2.7. Transkriptomanalyse**

### **2.7.1. Erstellung der cDNA Bibliothek aus *P. sapidus* RNA**

*P. sapidus* wurde als Flüssig- und Festbettkultur mit Rapsstroh kultiviert (2.4.4.3, 2.4.4.4). nach 9 Tagen wurden 4 Flüssigkulturen geerntet und vereint. Festbettkulturen wurden nach 21, 56 und 84 Tagen geerntet und jeweils 3 biologische Replikate vereint.

Die Proben wurden in 3h lang bei 300 °C ausgeglühten Mörsern mit flüssigem Stickstoff homogenisiert. Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (2.5.1.5). Das Ergebnis wurde zunächst mittels NanoPhotometer quantifiziert und danach mit Hilfe der QIAxcel Kapillar-Gelelektrophorese (Qiagen) qualitativ und quantitativ untersucht (2.5.2.1).

Für die Erstellung der cDNA-Bibliothek wurde das TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation Kit (Illumina) verwendet. Statt Ribo-Zero Plant (Illumina) wurde Dynabeads® mRNA Purification Kit (Life Technologies) verwendet, um die polyA-mRNA aus der Gesamt-RNA zu isolieren. Die Entfernung der rRNA erfolgte entsprechend der Anleitung, mit jeweils einem Viertel der angegebenen Chemikalienmenge.

Nach der Entfernung der rRNA, wurde die mRNA gereinigt und fragmentiert; die Dauer der RNA-Fragmentierung betrug 4 min. Mit den so generierten RNA-Fragmenten wurde die Synthese des Erst- und Zweitstranges der cDNA durchgeführt. Anschließend wurde die cDNA gereinigt und bis zur weiteren Verwendung am nächsten Tag bei -20 °C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die 3' Enden adenyliert, danach erfolgte die Ligation der Sequenzier-Adapter. So war eine Multiplex Sequenzierung möglich. Es wurden folgende Adapter verwendet: Tag 9 submers – Adapter 2; Tag 21 emers – Adapter 4; Tag 56 emers – Adapter 7; Tag 84 emers – Adapter 16. Die Vorgehensweise bei Ligation richtete sich strikt an das Handbuch. Nach der Ligation und Reinigung wurden die cDNA Fragmente mittels PCR angereichert. Es wurden 15 PCR-Zyklen durchgeführt. Am Ende wurden die Fragmente kapillarelektrophoretisch mittels QIAxcel (Qiagen) auf ihre Länge untersucht (2.5.2.1) (Alignment Marker 15-1000 bp, Size Marker 25-500 bp, Programm L). Außerdem wurden die Proben mittels Qubit (Life Technologies) fluorometrisch (2.5.2.2) quantifiziert.

### **2.7.2. Sequenzierung der cDNA**

Vor der Sequenzierung mussten die Proben normalisiert und gepoolt werden, um in allen Proben eine ähnliche Ausbeute an Daten zu bekommen. Die Proben wurden mit frischem 10 mM Tris-HCL und 0,1% Tween 20 auf 10 nM verdünnt. Danach wurden je 10 µL der Proben zusammen mit 60 µL HT1 Puffer gepoolt, so dass eine Endkonzentration von 4 nM entstand. Für die Sequenzierung wurden 12 pM eingesetzt. Die Sequenzierung wurde mit dem MiSeq Reagent Kit v2 (300 Zyklen, 2x150 bp *paired-end reads*) in einem MiSeq Sequencer (Illumina) durchgeführt.

### **2.7.3. *de novo* Assemblierung vom Transkriptom**

Die Sequenzen (*reads*) aus der Transkriptom Sequenzierung von *P. sapidus* wurden am Institut für Bioinformatik und Systembiologie (AG Goesmann, JLU Gießen) assembliert. Die *reads* wurden zunächst mittels Trimmomatic Software gekürzt, um die Enden die mit geringerer Qualität zu entfernen (Bolger *et al.* 2014). Die Bibliotheken aus allen 4 Zeitpunkten



wurden mit Trinity (Grabherr *et al.* 2011) zusammengefügt und auf eine Ziel *coverage* von 100 normalisiert. Mehrere *de novo* Assemblierungen wurden mit Trinity und Oases (Schulz *et al.* 2012) mit 29 verschiedenen k-mer Längen (19 bis 75) durchgeführt. Proteincodierende Sequenzen (CDS) der Contigs wurden mit TransDecoder (<https://transdecoder.github.io/>) vorausberechnet. Die CDS von allen Assemblierungen wurde translatiert und mit cd-hit geclustert (Li und Godzik 2006). Wenn zwei Proteinsequenzen im globalen Alignment zu 90% oder mehr identisch waren, wurden sie dem gleichen Verbund zugewiesen. Die längste Sequenz in jedem Verbund wurde als die repräsentative Sequenz gewählt. Ein kombiniertes Set aus allen repräsentativen Sequenzen wurde für weitere Analysen verwendet. Die Sequenzen wurden hochgeladen und mittels Sequence Analysis and Management System (SAMS) (Bekel *et al.* 2009) annotiert indem sie mit SWISS-PROT (Boutet *et al.* 2007), KOG (Tatusov *et al.* 2003), KEGG (Ogata *et al.* 1999) und der NCBI Datenbanken abgeglichen wurden.

Um die differentielle Transkription zu untersuchen, wurde mittels RNA-Seq by Expectation-Maximization (RSEM) (Li und Dewey 2011) mit bowtie Version 1 (Langmead *et al.* 2009) die Anzahl der *reads* berechnet. Die differentielle Transkription wurde paarweise mit edgeR (Robinson *et al.* 2010) ( $FDR < 0,001$  und  $|\log_2(\text{FoldChange})| > 2$ ) in allen 6 Kombinationen der 4 Zeitpunkte berechnet. Die Transkriptionswerte von allen Transkripten die in mindestens einem von 6 Tests differentiell transkribiert waren, wurden mittels Trinity auf 64 Cluster verteilt.

#### **2.7.4. Annotation von Transkripten**

Die Contigs wurden gegen die Datenbank für *Carbohydrate-Active Enzymes* (CAZymes) (<http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN/index.php>) geblastet. Contigs, die dabei der für den Ligninabbau wichtigen CAZy-Familie AA (*Auxiliary Activity*) zugewiesen wurden, wurden anschließend manuell annotiert, indem sie mit Sequenzen aus der Genomsequenzierung von *P. ostreatus* Stamm PC15 (Alfaro *et al.* 2016, Riley *et al.* 2014) ([https://genome.jgi.doe.gov/PleosPC15\\_2/PleosPC15\\_2.home.html](https://genome.jgi.doe.gov/PleosPC15_2/PleosPC15_2.home.html)) verglichen wurden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Transkriptomanalyse von *P. sapidus*

##### 3.1.1. Morphologie der Pilze

Die Pellets in der Flüssigkultur von *P. sapidus* sahen am 9. Tag wie kleine, runde Kugeln aus. Die Oberfläche sah, mit bloßem Auge beobachtet, glatt aus. Bei Festbettkulturen (Abbildung 3.1) hat das Myzel nach 21 Tagen das ganze Substrat durchzogen. Danach wurde das Myzel dicker und kondensierter, als Vorstufe zum Ausbilden von Fruchtkörpern. Nach 84 Tagen waren die Fruchtkörper deutlich zu erkennen. Die Pilze hatten die gleiche Morphologie in allen drei biologischen Replikaten, die es für jeden Zeitpunkt gab.

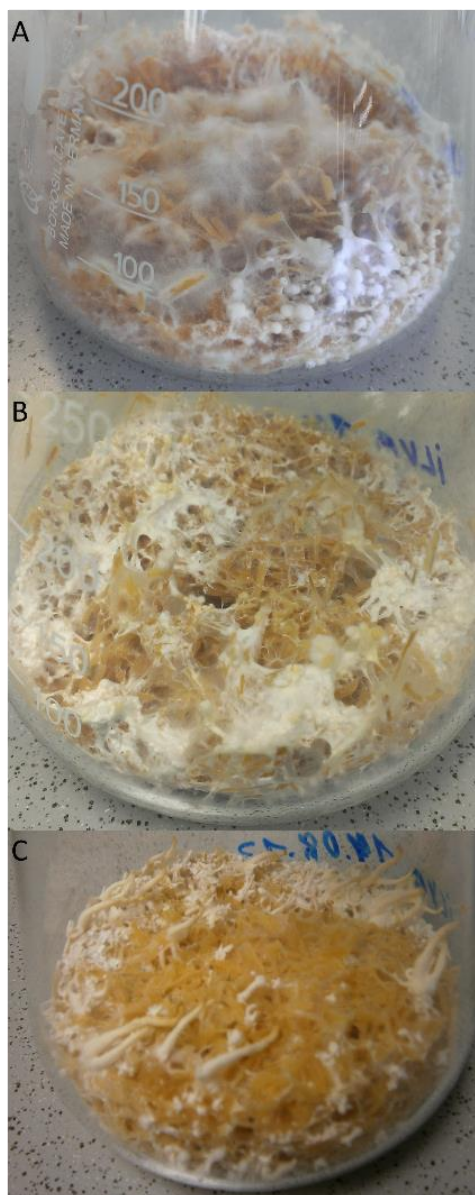


Abbildung 3.1: Festbettkulturen von *P. sapidus* nach (A) 21 Tagen, (B) 56 Tagen, (C) 84 Tagen.

### 3.1.2. Ergebnisse der RNA-Sequenzierung

Die RNA-Seq von allen vier Zeitpunkten ergab insgesamt 20,58 Millionen 150 bp *paired-end reads*. Der MiSeq Sequencer berechnete anhand des Signals, den die Basen während der Sequenzierung erzeugten, die Wahrscheinlichkeit einer falschen Zuordnung der Base. Es handelte sich dabei um ein ähnliches Verfahren wie die Auswertung der Form der Peaks des Elektropherogramms bei der Sanger-Sequenzierung. 92,9% der *reads* hatten eine Qualität von  $\geq Q30$  (=0,1% Fehlerrate oder eine falsche Base von 1000). Das ergibt ca. 5,7 Gbp qualitativ hochwertiger Sequenzen. Die *de novo* Assemblierung der Transkripte resultierte in 30.680 Contigs mit einem Median von 901 bp Länge. Die Verteilung der Längen der Contigs ist in der Abbildung 3.2 dargestellt.

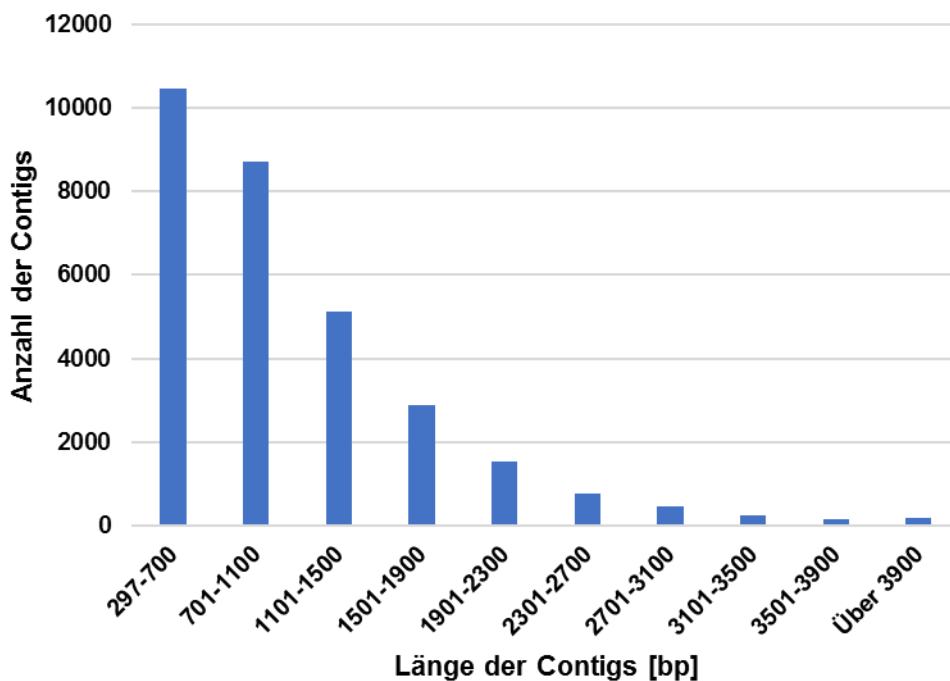


Abbildung 3.2: Verteilung der verschiedenen Längen der Contigs nach der *de novo* Assemblierung.

6.986 (22.8%) der Contigs gehörten zu einer der 25 *Eukaryotic Orthologous Groups* (KOG) Gruppen (Anhang 7.5), einer Eukaryoten-spezifischen Version von *Clusters of Orthologous Groups* (COG) (Tatusov *et al.* 2003). Dabei handelt es sich um eine Datenbank, in der homologe Proteine aus verschiedenen sequenzierten Genomen in funktionelle Kategorien eingeordnet sind. 77,2% aller Contigs konnten keiner Gruppe zugeordnet werden. Die größte Gruppe mit 871 zugeordneten Contigs war die Gruppe R (*“general function prediction only”*), die vorhergesagte Enzyme mit einer generellen biochemischen Aktivität enthält. Gefolgt wurde diese Gruppe von 597 Contigs der Gruppe O (*“Posttranslational modification, protein turnover, chaperones”*), die bei posttranslationalen Modifikationen eine Rolle spielen. Daneben waren

noch 522 Contigs der Gruppe J (*“Translation, ribosomal structure and biogenesis”*), die Enzyme der Translation enthält, 383 Contigs der Gruppe E (*“Amino acid transport and metabolism”*), die für den Aminosäuremetabolismus und -transport verantwortlich sind, und 376 Contigs der Gruppe G (*“Carbohydrate transport and metabolism”*), die für den Kohlehydrathaushalt verantwortlich sind, zugeordnet.

4.551 von 30.680 Contigs (14,8%) wiesen eine differentielle Transkription auf. Anhand des Transkriptionsmusters wurden sie in 64 Cluster aufgeteilt (2.7.3), so dass Contigs mit ähnlichem Muster einen gemeinsamen Cluster bildeten (Abbildung 3.3 und Anhang 7.6). Diese Cluster enthielten zwischen 14 und 186 Contigs.

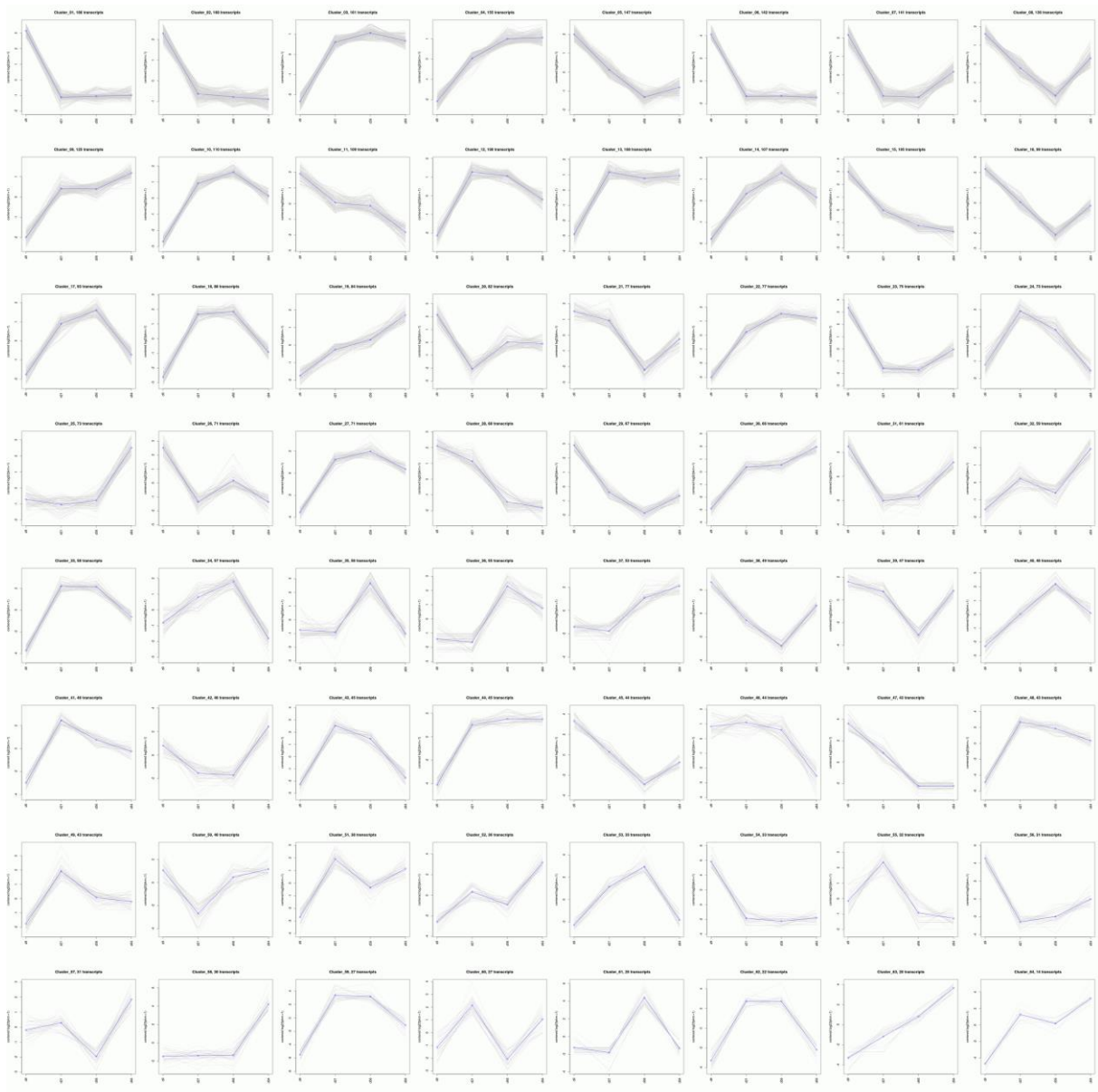


Abbildung 3.3: 4.551 differentiell transkribierte Contigs aufgeteilt auf 64 Cluster. Eine höhere Auflösung der einzelnen Cluster findet sich im Anhang dieser Arbeit unter 7.6.

### 3.1.3. Annotation der CAZy Gene

Ein Abgleich aller 30.680 Contigs gegen die CAZyme Datenbank ergab 2.841 Treffer. Bei Contigs die mehreren CAZy Familien zugeteilt wurden, wurden die Treffer mit den jeweils besten Erwartungswerten (*expected values*, E) ausgewählt. Somit konnten final 1.591 Contigs zu einer von sechs CAZyme Familien zugeordnet werden (Abbildung 3.4, oberstes Kreisdiagramm). Zur weiteren Fokussierung wurden Contigs aussortiert, deren Transkriptionsrate einen definierten Schwellenwert nicht überstieg. Hierzu wurde der TPM-Wert (*transcripts per million*) jedes Contigs herangezogen. Contigs, die nicht wenigstens zu einem Zeitpunkt der Analyse einen Wert von  $\geq 100$  hatten, wurden entfernt. Dadurch reduzierte sich die Anzahl aller CAZyme Contigs auf 197. Von diesen 197 Contigs fanden sich 128 in einem der 64 Cluster wieder (Abbildung 3.4). Somit waren 65% dieser Contigs differentiell transkribiert.

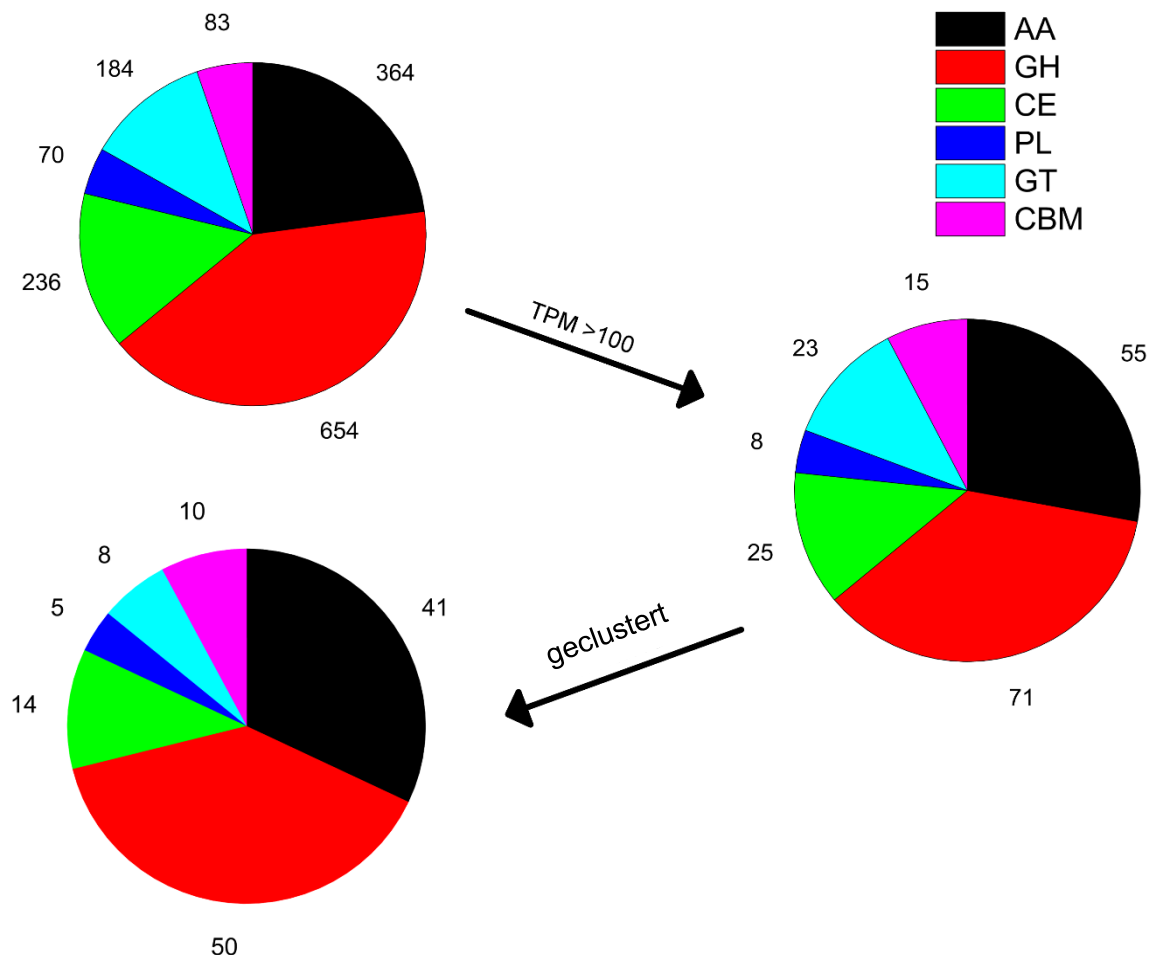


Abbildung 3.4: Verteilung der Contigs, die mutmaßliche CAZy-Enzyme codieren (oberstes Kreisdiagramm) und ein TPM-Wert von mehr als 100 haben (rechtes Kreisdiagramm) sowie Contigs die zusätzlich bei der Analyse der differentiellen Transkription einem der 64 Cluster zugewiesen wurden (unteres Kreisdiagramm). Die Abkürzungen stehen für Enzymgruppen der CAZy Datenbank: *Auxiliary Activity* (AA), *Glycoside Hydrolases* (GH), *Carbohydrate Esterases* (CE), *Polysaccharide Lyases* (PL), *Glycosyltransferases* (GT), *Carbohydrate-binding modules* (CBM).

Die 364 Contigs der *Auxiliary Activity* (AA) Familie wurden zusätzlich manuell annotiert und mit dem annotierten Genom von *P. ostreatus* PC15 verglichen (Tabelle 3.1). Hierdurch verringerte sich ihre Anzahl auf 281. Diese große Diskrepanz ist vor allem durch die hohen Falschzuweisungen im Bereich der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierenden Enzyme (AA3, AA5 und AA7) zu erklären. Im Gegensatz zu den Mehrfachzuweisungen von Contigs zu unterschiedlichen CAZy Familien, wurden in diesen Fall Contigs, die für eine den AA Enzymen ähnliche Proteindomäne codierten, fälschlicherweise der AA-Familie zugewiesen. Nach Annotierung der Contigs zu einzelnen Genen, belief sich ihre Anzahl auf 97; wobei 38 dieser Gene differentiell transkribiert waren. Mit Ausnahme des AA8-Gens wurden aus allen vorhandenen AA-Familien Gene differentiell transkribiert.

Tabelle 3.1: Contigs und ihre AA Unterfamilien. Dargestellt ist jeweils die Anzahl der automatisch zur AA-Familie zugewiesenen Contigs, der Contigs nach manueller Annotation, der differentiell transkribierten Contigs (auch mit TPM <100), aller Gene und der differentiell transkribierten Gene.

Familie	Enzyme	Contigs, insgesamt	Contigs, insgesamt, nach manueller Annotation	Different. transkribierte Contigs	Gene, insgesamt	Gene differentiell transkribiert
AA1_1	Laccase	31	28	3	11 <sup>+</sup>	2
AA1_2	Ferroxidase		2	1	1	1
AA1_3	Laccase-ähnliche Multi-Kupfer-Oxidase		0	0	0	0
AA2	Klasse II Häm-Peroxidase	30	28	11	8	5
AA3_1	Cellobiose Dehydrogenase	134	0	0	0	0
AA3_2	Arylalkoholoxidase (AAO)/ Glucose-1-Oxidase (GOX)		85	18	30	7
AA3_3	Alkoholoxidase (AOX)		26	9	4	3
AA3_4	Pyranose-Oxidase		0	0	0	0
AA4	Vanillylalkohol-Oxidase	3	0	0	0	0
AA5_1	Glyoxaloxidase	64	50	24	14	8
AA6	1,4-Benzochinon-Reduktase	6	6	2	2	2
AA7	Glucooligosaccharid-Oxidase	40	5	2	3	2
AA8	Eisen-Reduktase Domäne	8	3 <sup>*</sup>	0	1 <sup>*</sup>	0
AA9	Lytische Polysaccharid-Monooxygenase	48	48	11	23	8
<b>Gesamtzahl</b>		<b>364</b>	<b>281</b>	<b>81</b>	<b>97</b>	<b>38</b>

<sup>+</sup>*lacc9/lacc10* Gruppe wird als 2 Gene gezählt. Eine genaue Zuordnung anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz der zugehörigen Contigs war aufgrund der Ähnlichkeit nicht eindeutig möglich.  
<sup>\*</sup>Contigs, deren abgeleitete Aminosäure Sequenzen eine Cellobiose Dehydrogenase und Eisen-Reductase Domäne enthielten (AA8 und AA3\_1) wurden der AA8 Unterfamilie zugeordnet.

Um die Veränderungen in der Transkription innerhalb der Contigs der AA Familie besser zu visualisieren, wurde eine Heatmap aller 38 differentiell transkribierten Gene erstellt (Abbildung 3.5).

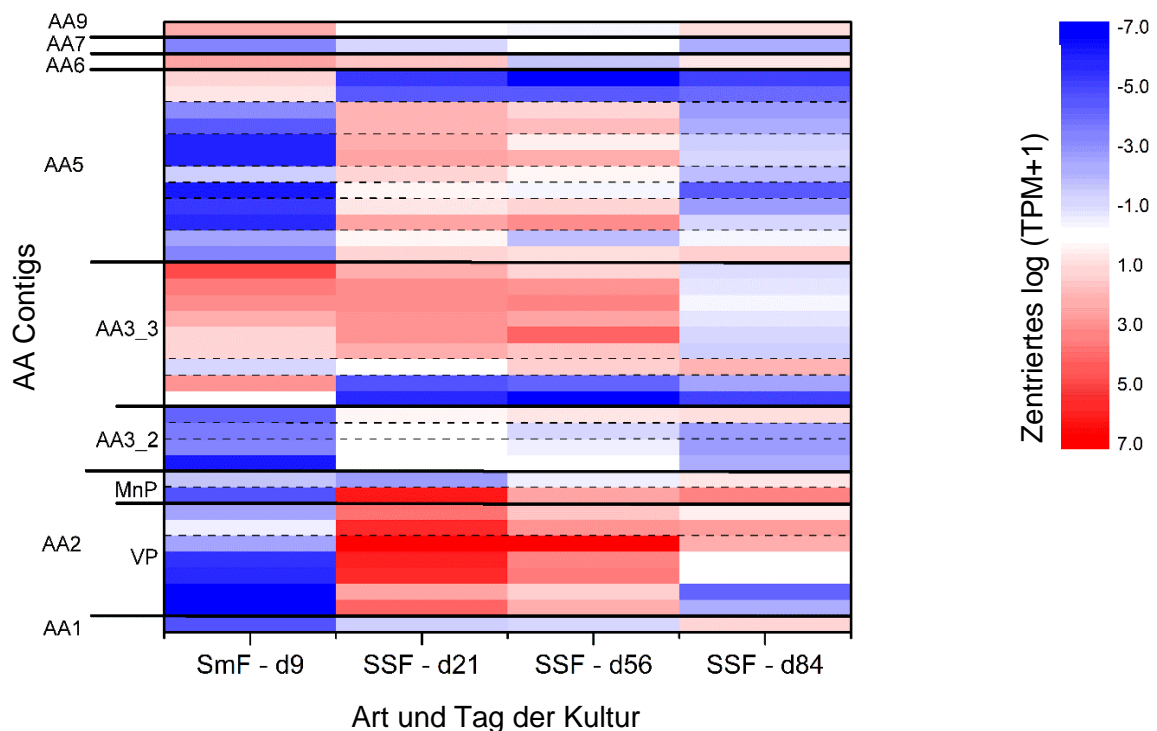


Abbildung 3.5: Heatmap der differentiell transkribierten Contigs der AA-Familie. Dargestellt sind manuell annotierte Contigs die einen TPM >100 hatten und zu differentiell transkribierten Contigs gehörten. Zentriertes log (TPM+1) basiert auf der Differenz der Transkription der einzelnen Contigs zum Median. Rot steht für eine hohe und blau für eine niedrige Transkription. Gestrichelte Linien trennen die Contigs verschiedener Gene innerhalb der gleichen Unterfamilie.

Das zur AA1 zählende *lacc9* ist das einzig differentiell transkribierte Laccase Gen und zeigte einen leichten Anstieg der Transkription über die Zeit mit höheren Transkriptionsraten in den Festbettkulturen. Auch die zur AA2 Familie zählenden Peroxidase Gene wurden in der Festbettkultur stärker transkribiert als in der Submerskultur. Die beiden VP Gene (fünf *vp2* Contigs und zwei *vp3* Contigs) und das MnP Gen *mnp1* zeigten die höchsten TPM-Werte an Tag 21 der Festbettkultur, welche mit fortschreitender Kultivierung abnahmen. Hingegen nahm die Transkription von *mnp3* in der Festbettkultur mit der Zeit zu und erreichte am letzten Tag der Kultur die höchsten TPM-Werte. Die zur Unterfamilie AA3\_2 zählenden AAO und Glucose-1-Oxidasen waren ebenfalls in der Submerskultur weniger stark transkribiert als in der Festbettkultur. Dagegen zeigten die drei zur Unterfamilie AA3\_3 gehörenden Gene, deren abgeleitete Aminosäuresequenz den Proteinen mit den IDs 1067243, 1109402 und 1110004

im Genom von *P. ostreatus* entsprechen, ein unterschiedliches Muster. 1067243 wird in Submerskulturen stärker transkribiert, während 1109402 sich umgekehrt verhält. Die Transkripte von 1110004, zu dem sechs Contigs gehören, wurden in der Submerskultur und am Anfang der Festbettkultur stärker transkribiert und an Tag 84 runterreguliert. Die meisten Contigs der Unterfamilie AA5 waren ähnlich wie die VP an den Tagen 21 und 56 stärker transkribiert als an den anderen Kulturtagen. Lediglich ein Gen (zwei Contigs) der AA5 Familie war in der Submerskultur stärker und in den Emerskulturen schwächer transkribiert. Die Unterfamilien AA6, AA7 und AA9 waren mit je einem Contig repräsentiert. Die 1,4-Benzochinon-Reduktase (AA6) und die lytische Polysaccharid-Monooxygenase (LPMO, AA9) zeigten in der Submerskultur die höchste Transkription, während die Glucosylglycosyltransferase (AA7) eine insgesamt geringere Transkription aufwies, mit einem Maximum an Tag 56 der Festbettkultur.

Zur besseren Veranschaulichung sind die Proportionen der Transkriptmengen von einigen Genen, die in der Tabelle 3.2 einen TPM-Wert >100 hatten und die später einer RT-qPCR Analyse (3.1.4) unterzogen wurden, in der Abbildung 3.6 dargestellt.

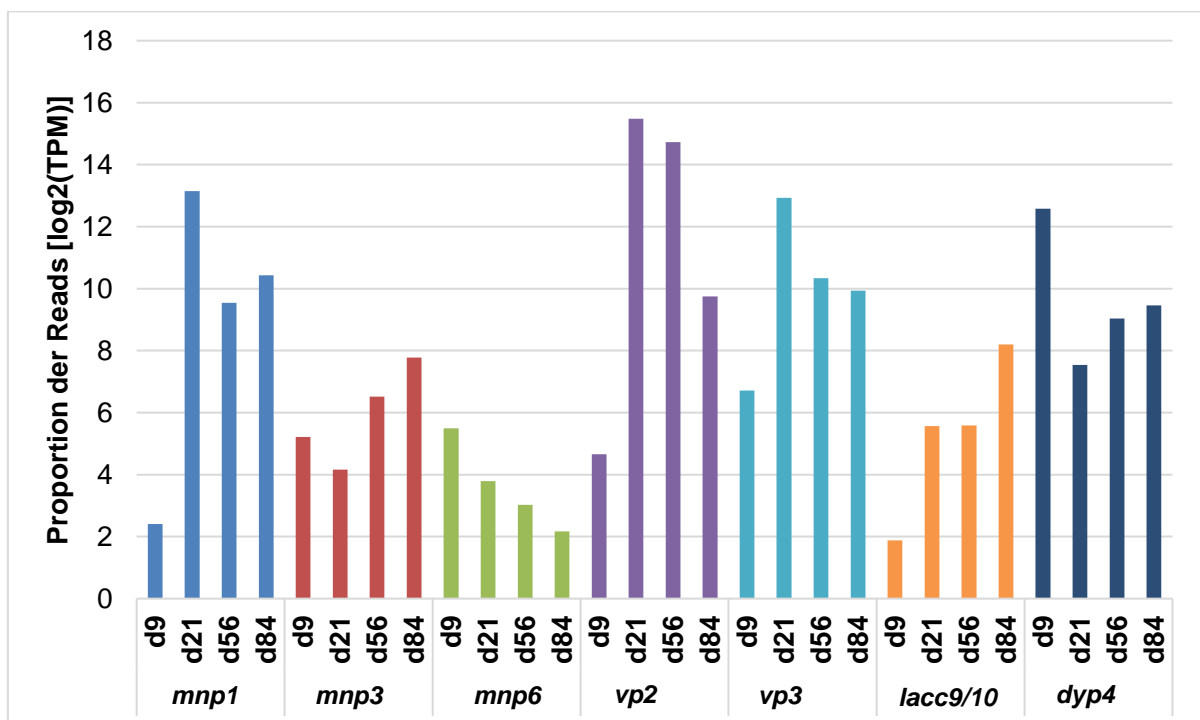


Abbildung 3.6: Ergebnisse der Transkriptomanalyse ausgewählter Peroxidase-Gene und einer Laccase dargestellt als  $\log_2$  (TPM) ausgewählter Gene.

Der größte Teil der Transkripte, die MnP codierten gehörte zu *mnp1*, gefolgt von *mnp3* und *mnp6*. *mnp6* war auch die einzige MnP deren Transkriptionsstärke über die Zeit abfiel. Beide VP wurden an den Tagen 21 und 56 am höchsten transkribiert, wobei die *vp2* wesentlich



stärker transkribiert wurde als *vp3*. An Tag 84, und vor allem an Tag 9, gehörten dagegen mehr Transkripte zu *vp3*. Die Transkription der *lacc9/10* war in Emerskulturen höher als in der Submerskultur. Eine weitere Peroxidase, die möglicherweise im Ligninabbau eine Rolle spielt (Sugano 2009), wies unter den Peroxidasen die höchste Transkriprate in der Submerskultur auf. Diese als *dye-decolourising* oder DyP-Typ Peroxidase (DyP) bezeichnete Peroxidase ist der CAZy Datenbank nicht zugeordnet, weswegen separat nach entsprechenden Contigs gesucht wurde. Es wurden 11 Contigs von vier DyP Genen gefunden (*dyp1* bis *dyp4*). *dyp4* war als einziges Gen differentiell transkribiert und dessen Contigs wiesen teilweise einen TPM-Wert >100 auf. In Emerskulturen von *dyp4* gab es zwar einen Anstieg über die Zeit, aber das Niveau der Submerskultur wurde nicht erreicht (Abbildung 3.6). Addiert man alle TPM-Werte für einzelne Genfamilien, die beim Ligninabbau eine Rolle spielen, so liegt der Fokus in der Festbettkultur auf den AA2 Enzymen VP und MnP (Tabelle 3.2). Dagegen überwiegen in der Submerskultur die Transkripte der DyP Contigs.

Tabelle 3.2: Summierte TPM-Werte aller Contigs der jeweiligen Enzyme.

	<b>AA-Familie</b>	<b>Tag 9</b>	<b>Tag 21</b>	<b>Tag 56</b>	<b>Tag 84</b>
Laccasen	AA1	265	241	225	551
MnP	AA2	155	9.156	930	1.648
VP	AA2	144	53.529	28.434	1.844
AAO	AA3_2	34	7	8	14
GOX	AA3_2	770	970	986	736
AOX	AA3_3	9.275	5.584	6.266	1.589
Glyoxaloxidasen	AA5_1	1.205	5.430	4.404	1.905
DyP	-	6.121	212	549	719

In absoluten Zahlen zeigen die Peroxidasen während der Festbettkultur die höchsten TPM-Werte. Transkripte von VPs nahmen mit der Kulturdauer ab, während MnP-Transkripte zum Schluss der Emerskultur noch einmal anstiegen. Basierend auf den summierten TPM-Werten aller Laccasen waren diese zunächst relativ konstant transkribiert, zeigten an Tag 84 allerdings eine starke Erhöhung. Die Transkripte von AAO wurden dagegen nur in geringen Mengen detektiert. Die ebenfalls zu AA3\_2 gehörenden Glucose-1-Oxidasen, die sich an allen Tagen auf einem ähnlichen Level befanden, hatten wesentlich mehr Transkripte als die AAO. Alkoholoxidasen wiesen in der Submerskultur an Tag 9 die höchste Transkription auf und an Tag 84 in der Emerskultur die niedrigste. Die Transkription von Glyoxaloxidasen, die ebenfalls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzieren, war in Festbettkulturen, an den Tagen 21 und 56 am höchsten. Die Transkription aller DyP-Typ Peroxidasen (Tabelle 3.2) verlief insgesamt ähnlich wie die von *dyp4* (Abbildung 3.6), die die am stärksten transkribierte DyP war.

### 3.1.4. Ergebnisse der RT-qPCR

Eine RT-qPCR wurde für die Gene *mnp1*, *mnp3*, *mnp6*, *vp2*, *vp3*, *aao*, *lacc9/lacc10* und *dyp4* durchgeführt (Tabelle 2.6). Für die Normalisierung wurden sechs *housekeeping* Gene von *P. sapidus* als mögliche Referenzgene untersucht: GTP-Bindeprotein SAR1 (*sar1*), Purin-Phosphorylase (*phos*), Peptidase S9 (*pep*) sowie Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gpd3*), Cyclophilin-Typ Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (*cyph*) und beta-Tubulin (*βtub*) (Castanera *et al.* 2015). Das Programm Normfinder ermittelte die Kombination aus *gpd3* und *phos* mit einem Stabilitätswert von 0,537 als geeignetstes Paar für die Normalisierung der Ergebnisse. Zusätzlich zu den Kulturen aus der Transkriptomanalyse wurden noch die Tage 6 und 9 der Submerskultur untersucht. Die Transkriptraten der Gene wurden in Relation zu Tag 6 der Submerskulturen gesetzt (Abbildung 3.7).

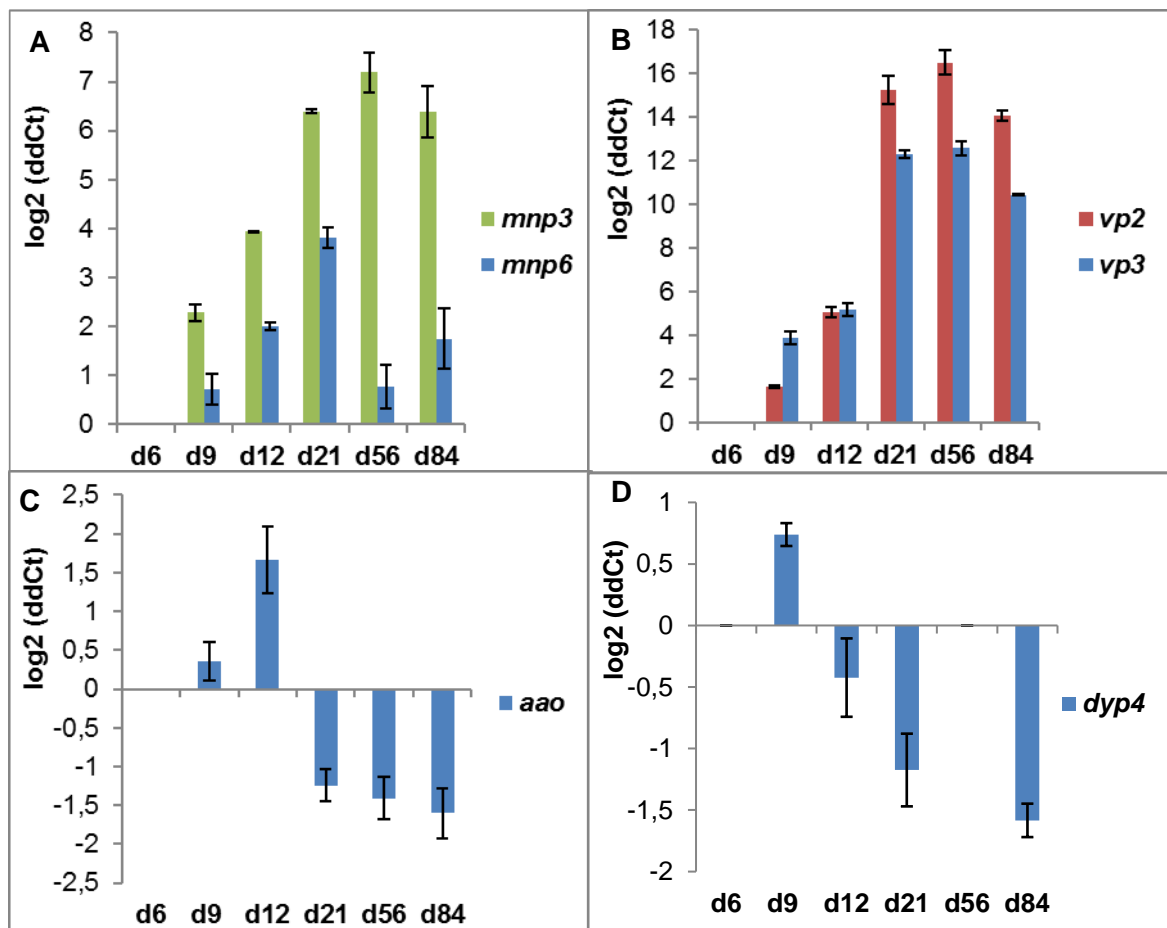


Abbildung 3.7 Änderungen in der Transkription der jeweiligen Gene, gemessen mittels RT-qPCR. Die Änderungen dargestellt als log<sub>2</sub>(ddCt) im Vergleich zu Tag 6; bei d6 bis d9 handelte es sich Submerskulturen und bei d21 bis d84 um Emerskulturen. (A) *mnp3* und *mnp6* (B) *vp2* und *vp3* (C) *aao* (D) *dyp4* (an Tag 56 wurde keine Transkription festgestellt).

Die Transkription der Peroxidasegene *mnp3*, *mnp6*, *vp2*, *vp3* steigt in den Submerskulturen mit der Kultivierungszeit an (Abbildung 3.7). In den Emerskulturen ist die Transkriptionsrate

der Peroxidasegene in Relation zu den *housekeeping* Genen bis auf *mnp6* deutlich höher als in den Submerskulturen (bei *vp2* sogar ca. 1000-fach). *mnp6* zeigt an Tag 21 der Emerskultur die höchste Transkription, die zum Ende der Kultivierung abfällt. Die Transkription der versatilen Peroxidasegene und *mnp3* steigt bis Tag 56 und nimmt zum Ende hin wieder etwas ab. Die *dyp4* als auch die *aao* zeigten dagegen im Vergleich zu Peroxidasen geringere Unterschiede (Abbildung 3.7). Die *aao* Transkription stieg in den Submerskulturen bis Tag 12 an und war in den Emerskulturen insgesamt niedriger als in den Submerskulturen. *dyp4* wies die geringsten Änderungen auf. An Tag 56 der Emerskultur konnte keine Transkription von *dyp4* mit RT-qPCR detektiert werden.

Die Gene *mnp1* und *lacc9/lacc10* sind in der Abbildung 3.7 nicht aufgeführt, da sie mittels RT-qPCR an Tag 6 nicht detektiert wurden. *mnp1* konnte in keiner der analysierten Submerskulturen detektiert werden. In den Emerskulturen nahm die Transkription von *mnp1* an den Tagen 56 und 84 im Vergleich zu Tag 21 ab und betrug nur noch 0,35 und 0,32 der Transkription vom Tag 21. *lacc9/10* lieferte nur an den Tagen 21 und 84 der Emerskultur ein Ergebnis, wobei die Transkriptionsrate an Tag 84 ca. 1,3fach höher war.

### 3.1.5. Enzymaktivitäten

Mit den Überständen aus den Submerskulturen und den Extrakten (2.6.2) aus den Emerskulturen wurden Enzymassays durchgeführt (Abbildung 3.8). MnP waren mit dem Phenolrot-Assay nur in Festbettkulturen nachweisbar und zeigten hier Aktivitäten von ca. 1.300 U L<sup>-1</sup> an Tag 21 und Tag 84 sowie 171 U L<sup>-1</sup> an Tag 56. Die VP zeigten in den Proben der Submerskulturen mit einer maximalen Aktivität von 208 U L<sup>-1</sup> an Tag 9 eine höhere Aktivität als in den Emerskulturen, in denen keine (Tag 21) oder eine geringe Aktivität detektiert wurde. Eine zusätzliche Untersuchung mittels Reactive Black 5 Assay (2.6.6.6), mit einem für VP spezifischen Substrat (Fernández-Fueyo *et al.* 2014b), ergab ebenfalls nur eine sehr geringe Aktivität von ca. 4 U L<sup>-1</sup> an den Tagen 21 und 84, sowie keinerlei Aktivität in den Submerskulturen. Die DyP-Typ Peroxidasen waren in allen Proben aktiv, mit einem Maximum von 13 U L<sup>-1</sup> an Tag 21. Die Laccaseaktivität war in Submerskulturen mit Aktivitäten zwischen 130 und 171 U L<sup>-1</sup> höher als in Emerskulturen mit 9 bis 35 U L<sup>-1</sup>. AAO-Aktivität konnte nur in Flüssigkulturen nachgewiesen werden und lag zwischen 15 und 20 U L<sup>-1</sup>.

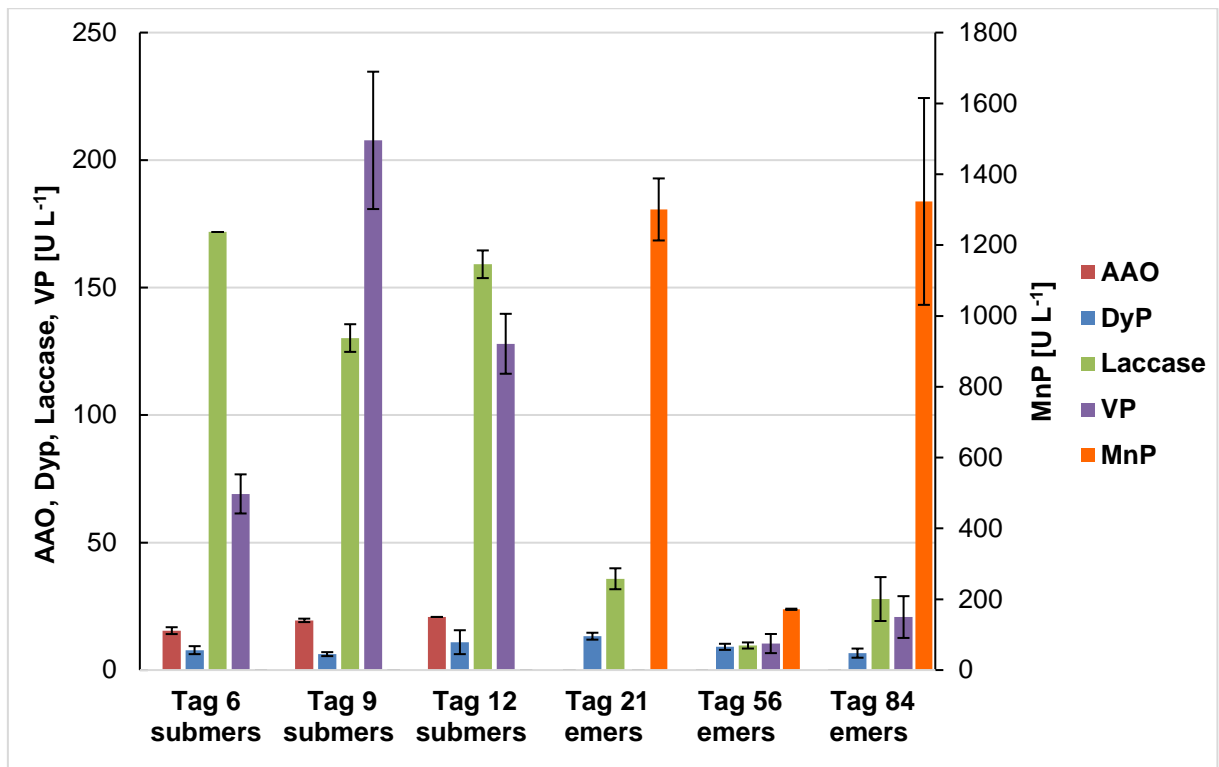


Abbildung 3.8: Enzymaktivitäten in Submers- und Emerskulturen an verschiedenen Tagen.

## 3.2. Heterologe Expression von AAO in *C. cinerea*

### 3.2.1. Konstruktion vom Plasmid pYIG1

Als Grundlage für die Plasmidkonstruktion wurde das 11.099 bp große Plasmid pYSK7 verwendet. Dieses Plasmid wurde bereits für die heterologe Expression von Laccase-Genen in *Coprinopsis cinerea* eingesetzt (Kilaru *et al.* 2006). In pYSK7 wurde die Expression des Gens von Interesse, der Laccase *lcc1*, vom konstitutiven *gpdII* Promotor aus *Agaricus bisporus* gesteuert. pYSK7 enthält außerdem die Replikationsursprung-Sequenzen (ori), die für eine Replikation in *E. coli* und *S. cerevisiae* benötigt werden. Im Zuge dieser Arbeit wurde das Laccase Gen *lcc1* durch die *aao*-Sequenz aus dem Genom von *Pleurotus sapidus* ersetzt.

Der Austausch von *lcc1* im Vektor erfolgte nach dem Prinzip der homologen Rekombination (Abbildung 3.9). Dabei wird mittels PCR eine Sequenz erzeugt, die aus dem Zielgen besteht und von kurzen Sequenzen flankiert ist, die homolog zu den Sequenzen sind, die den Bereich im Plasmid flankieren der ausgetauscht werden soll. Sowohl das linearisierte Plasmid, als auch die Sequenz, die eingebracht werden soll, gelangen mittels Transformation in *S. cerevisiae*.

Durch die DNA-Reparaturmechanismen von *S. cerevisiae* werden die Fragmente an ihren homologen Bereichen wieder zu einem zirkulären Plasmid zusammengefügt.

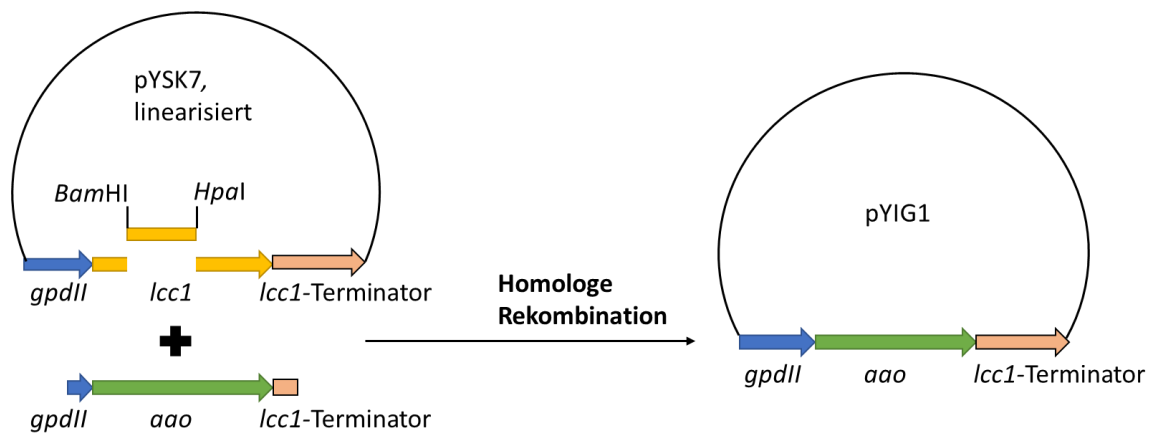


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der homologen Rekombination.

Zunächst musste das Plasmid in linearisierter Form vorliegen, so dass keine Ligation oder Rekombination durch homologe Sequenzen innerhalb des Plasmids (Anhang 7.1) möglich waren. Dafür wurden die Restriktionsendonukleasen *HpaI* und *BamHI* verwendet (2.5.5), mit deren Hilfe ein 827 bp langer Abschnitt in der *lcc1*-Region herausgeschnitten wurde (Abbildung 3.10). Das Plasmidrückgrat von >10 kb wurde mittels Agarosegelelektrophorese vom kleineren Fragment getrennt, ausgeschnitten und aus dem Gel isoliert (2.5.1.4)

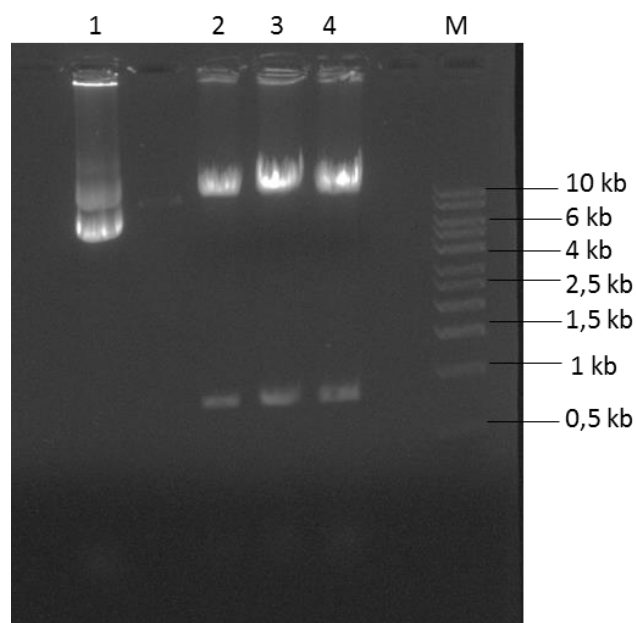


Abbildung 3.10: 0,75% Agarosegel mit dem Plasmid pYSK7. **M**: 1 kbp DNA-Leiter; **1**: unverdaute pYSK7 Kontrolle; **2-4**: mit *HpaI* und *BamHI* verdautes pYSK7.

Damit die homologe Rekombination stattfinden konnte, musste die *aao* von Sequenzen flankiert sein, die zu den Enden des linearisierten pYSK7 Rückgrats homolog waren. Dafür wurden *aao*-Primer mit Überhängen verwendet. Der *forward*-Primer *gpdII\_AAO* überlappte sich mit 26 bp mit dem 5' Ende des *gpdII* Promotors und der *reverse*-Primer *lcc1term\_AAO* überlappte sich mit 28 bp mit dem 3' Ende der *lcc1* Terminator Sequenz. Zusammen mit den Überhängen sollte das Fragment insgesamt 2.513 bp lang sein. Die *aao*-Sequenz wurde mittels PCR aus der genomischen DNA von *P. sapidus* amplifiziert und ergab ein ca. 2.500 bp langes Produkt (Abbildung 3.11).

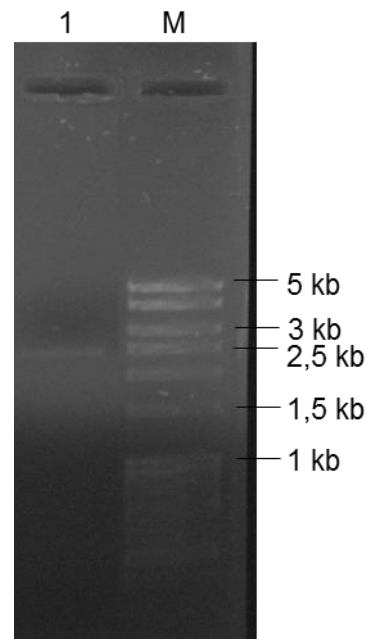


Abbildung 3.11: 1% Agarosegel mit dem *aao*-Amplifikat. **M**: 100 bp DNA-Leiter; **1**: amplifizierte *aao*-Sequenz aus *P. sapidus*.

*S. cerevisiae* RH1385 wurde mit dem linearisierten pYSK7-Fragment und der aus dem Agarosegel isolierten *aao*-Sequenz transformiert. Die Klone, die nach der Transformation auf dem Selektionsmedium (YSDO-Agar ohne Uracil) wuchsen, wurden umplattiert und mittels Kolonie-PCR auf die Anwesenheit von *aao* überprüft (Abbildung 3.12).

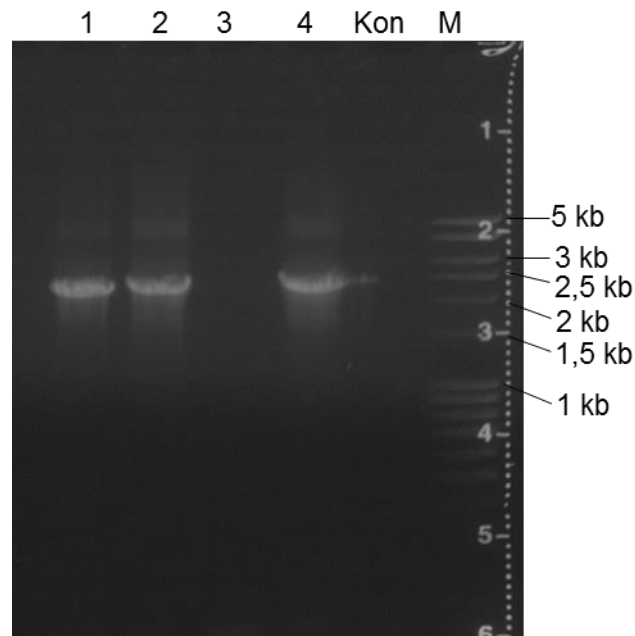


Abbildung 3.12: 1% Agarosegel mit *aao*-Amplifikaten. **M**: 100 bp DNA-Leiter; **1-4**: amplifizierte *aao*-Sequenz aus transformierten *S. cerevisiae* RH1385 Klonen; **Kon**: Negativkontrolle mit ddH<sub>2</sub>O statt DNA.

Auf dem Gelbild (Abbildung 3.12) war in 3 von 4 Proben eine Bande auf der Höhe von ca. 2.500 bp zu sehen. Die Negativkontrolle und die 3. Probe zeigten nichts an. Die pYSK7 Plasmide mit dem *aao*-Insert wurden in pYIG1 umbenannt. Die isolierten Plasmide aus den *S. cerevisiae* Klonen 1 und 4 wurden in *E. coli* transformiert. Da die Plasmide ein Ampicillin Resistenzgen enthalten, wurden die transformierten *E. coli* Bakterien auf LB<sup>Amp</sup>-Agarplatten ausplattiert. Die Klone wurden auf Masterplatten umgesetzt und einer Kolonie-PCR (2.5.3.2) unterzogen (Abbildung 3.13). Alle Klone zeigten eine Bande auf der erwarteten Höhe. Die *E. coli* Klone 1-1 und 4-3 wurden für die weiteren Arbeiten verwendet.

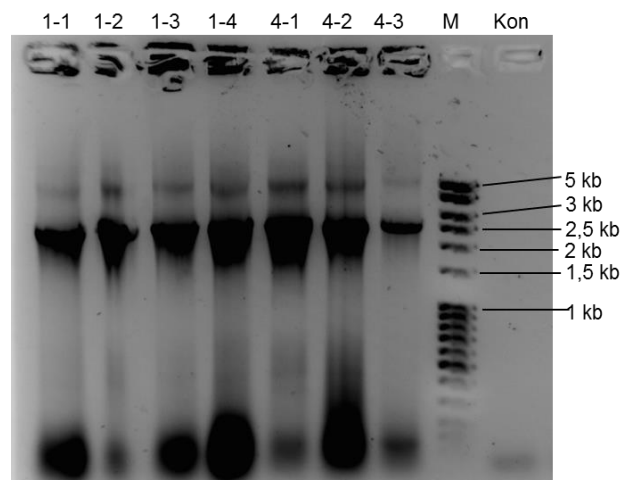


Abbildung 3.13: 1% Agarosegel mit *aao*-Amplifikaten aus transformierten *E. coli*. **M**: 100 bp DNA-Leiter; **Kon**: Negativkontrolle; **1-1 bis 4-3**: *E. coli* Klone. Die 1. Zahl in der Nummerierung ist die Nummer des *S. cerevisiae* Klons aus dem pYIG1 stammte und die 2. Zahl ist die Nummer des *E. coli* Klons.

### 3.2.2. Transformation von *C. cinerea* mit pYIG1

Die Cotransformation von *C. cinerea* erfolgte mit einem der beiden Plasmide, pYIG1 1-1 oder 4-3, die aus *E. coli* isoliert wurden, zusammen mit dem Plasmid pCc1001, das bei erfolgreicher Transformation die Tryptophan Auxotrophie aufheben sollte. Nach 3 bis 4 Tagen wurden die ersten Klone auf den Regenerationsplatten sichtbar. Insgesamt konnten 166 Klone auf sieben Platten gezählt werden, mit 12 bis 44 Klonen pro Platte. Daraus lässt sich eine Transformationseffizienz von 11 bis 21 Klonen pro  $\mu\text{g}$  Plasmid ableiten. Die Klone wurden auf YMG Platten übertragen und mittels PCR auf die Integration der *P. sapidus aao* überprüft. Vier von sechs untersuchten Proben zeigten die bei positiver Transformation zu erwartende Bande bei ca. 2.500 bp (Abbildung 3.14).

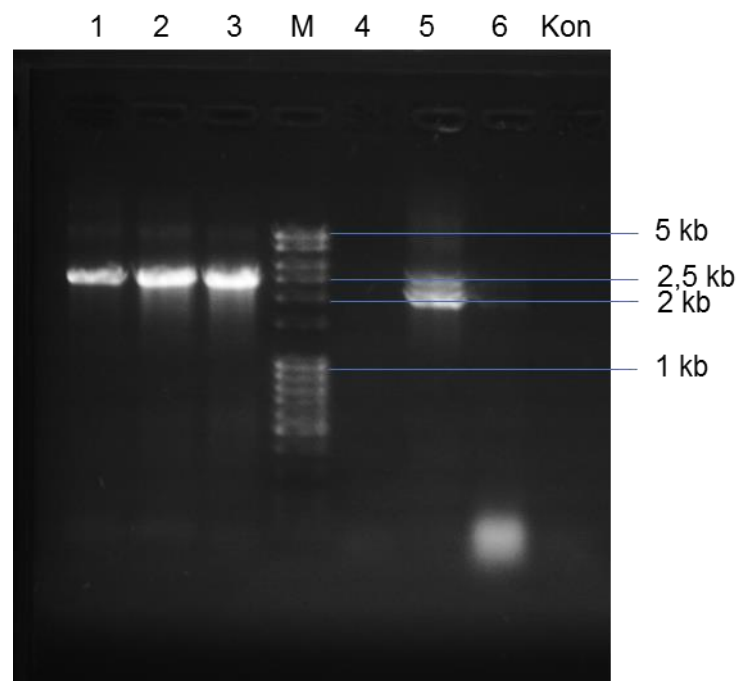


Abbildung 3.14: 1% Agarosegel mit *aao*-Amplifikaten aus transformierten *C. cinerea*. **M**: 100 bp DNA-Leiter; **Kon**: Negativkontrolle; **1**: Klon 1-1-1; **2**: Klon 1-1-2; **3**: Klon 1-1-3; **4**: Klon 4-3-1; **5**: Klon 4-3-2; **6**: Klon 4-3-3. Die 1. Zahl in der Nummerierung ist die Nummer des *S. cerevisiae* Klons aus dem pYIG1 stammte, die 2. Zahl ist die Nummer des *E. coli* Klons und die 3. Zahl ist die Nummer des *C. cinerea* Klons.

Insgesamt wurden 30 *C. cinerea* pYIG1 Klone mittels PCR untersucht, davon waren 15 positiv. 12 Klone wurden in Erlenmeyerkolben im YMG-Medium kultiviert und mittels Veratrylalkohol-Assay auf AAO-Aktivität untersucht. Von den 12 Klonen zeigten sieben eine AAO-Aktivität im Kulturüberstand. Die fünf Klone mit der höchsten Aktivität wurden zusammen mit zwei Kontrollen acht Tage lang kultiviert, um den Klon mit der höchsten AAO-Produktion zu ermitteln (Abbildung 3.15).



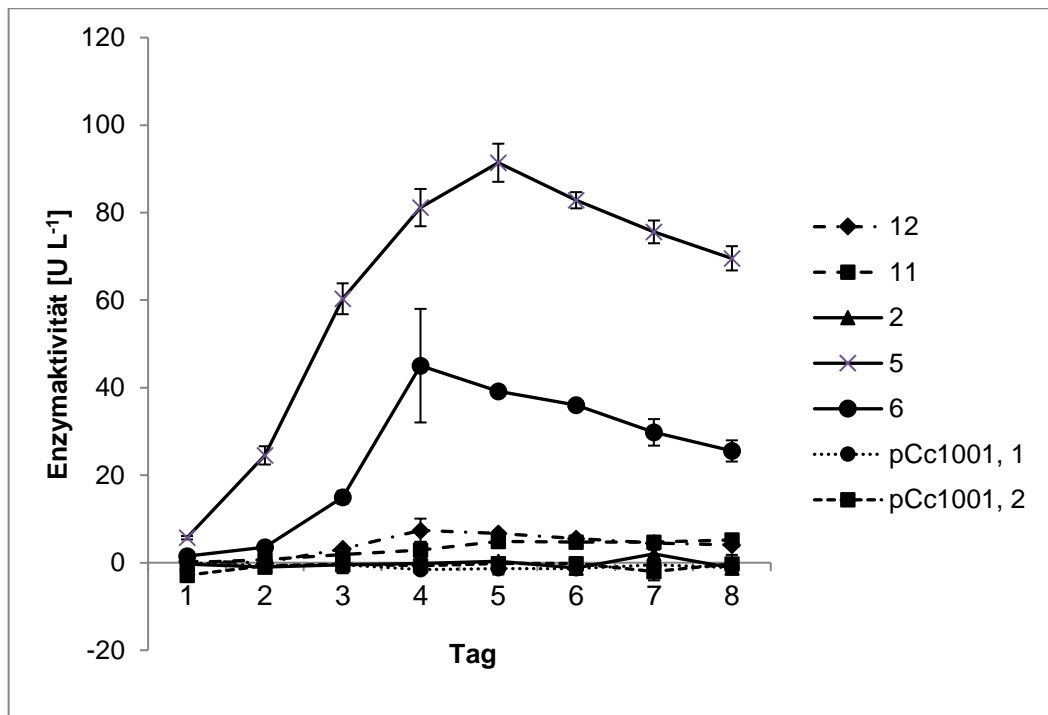


Abbildung 3.15: AAO-Aktivitäten von 5 *C. cinerea* pYIG1 Klonen, und 2 *C. cinerea* Klonen, die nur mit pCc1001 transformiert waren und als Kontrolle dienten.

Die höchste Aktivität erreichte der Klon 1-1-5 mit  $91 \text{ U L}^{-1}$  im Veratrylalkohol-Assay an Tag 5. Die Negativkontrollen zeigten keine Aktivität. Der Klon 1-1-5 wurde für alle weiteren Arbeiten verwendet. In diesem Klon wurde außerdem das heterologe *aao* Gen sequenziert (Anhang 7.2). Anhand von bereits bekannten AAO und der Daten aus dem Transkriptom wurde die Intron/Exon-Struktur hergeleitet. Die genomische Sequenz war 2.459 bp lang und enthielt 13 Exons. Die codierende Sequenz betrug 1.782 bp und codierte ein 593 AA großes Protein (Anhang 7.3). Die Sequenz wurde unter Zugangsnummer KU362924 in GenBank abgelegt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KU362924.1>).

### 3.2.3. Kultivierung von *C. cinerea* pYIG1 1-1-5 und AAO-Aktivitätsmessung

Um ausreichend AAO für eine Reinigung zu gewinnen, wurde *C. cinerea* pYIG1 1-1-5 in einem 7,5 L Bioreaktor kultiviert (2.4.3.5). Bei der ersten Fermentation wurden 5 L YMG-Medium und ein Inokulum von 0,5 L Vorkultur desselben Mediums verwendet. Die Begasungsrate mit Druckluft lag bei 0,3 bis  $0,5 \text{ L min}^{-1}$ . Die Temperatur lag konstant bei  $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Der pH-Wert wurde nicht reguliert und stieg während der Fermentation auf 7,8 an (Abbildung 3.16). Nach fünf Tagen wurde eine AAO-Aktivität von  $125 \text{ U L}^{-1}$  erreicht und der Überstand geerntet.

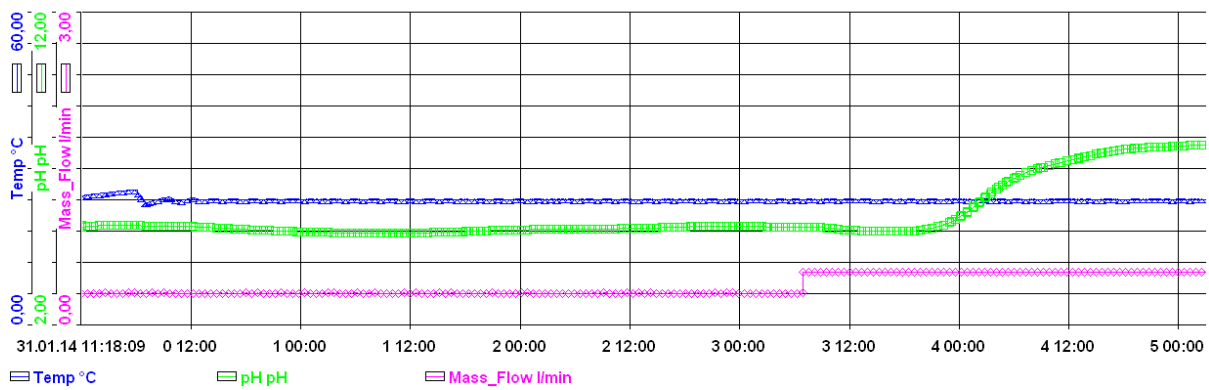


Abbildung 3.16: Verlauf der Fermentation von *C. cinerea* pYIG1 1-1-5 im YMG-Medium.

Neben dem YMG-Medium wurde auch modifiziertes Kjalke-Medium getestet, mit dem Ziel eine möglichst hohe AAO-Aktivität zu erreichen. In Erlenmeyerkolben wurde so eine wesentlich höhere Aktivität von bis zu  $544 \text{ U L}^{-1}$  erzielt (Abbildung 3.29). Dies ist im Vergleich mit den im YMG-Medium gemessenen  $91 \text{ U L}^{-1}$  eine Versechsfachung. Die Fermentation im Bioreaktor wurde daher mit modifiziertem Kjalke-Medium (2.4.3.4) wiederholt (Abbildung 3.17). Die Begasung des Fermenters lag zu Beginn bei  $0,3 \text{ L min}^{-1}$  bis sich größere Myzelpellets ausbildeten. Später wurde die Begasung auf bis zu  $4,5 \text{ L min}^{-1}$  erhöht. Die Kultivierung wurde erst gestoppt als der Anstieg in der Aktivität geringer wurde und die Kurve der Enzymaktivität abflachte.

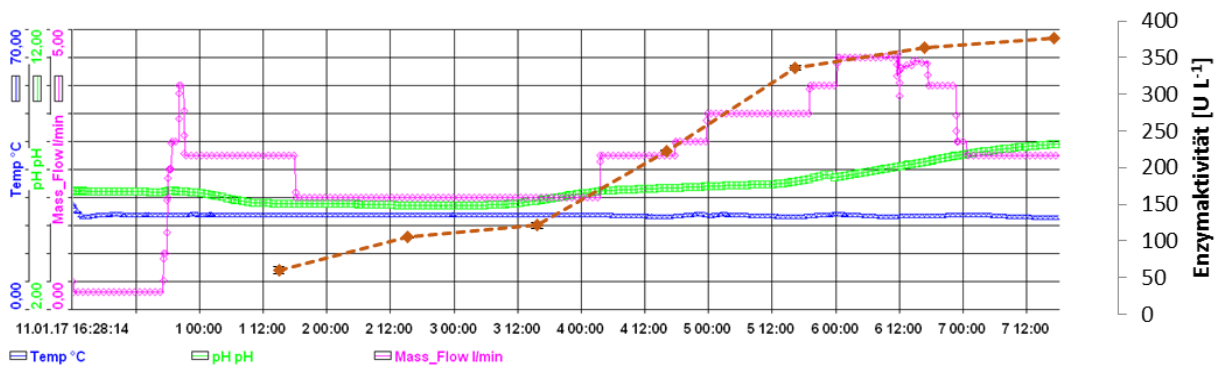


Abbildung 3.17: Verlauf der Fermentation von *C. cinerea* pYIG1 1-1-5 im modifizierten Kjalke-Medium. Die gestrichelte Linie stellt die AAO Aktivität dar.

Der pH-Wert stieg auch bei dieser Fermentation ab dem 4. Tag langsam auf ca. 7,8 an. Die AAO-Aktivität verlief ähnlich einer Wachstumskurve. Einer anfänglich geringen Aktivität folgte ein starker Anstieg zwischen Tag 4 und Tag 6. Nach Tag 6 flacht die Kurve ab und erreicht an Tag 8 eine maximale Aktivität von  $376 \text{ U L}^{-1}$ .

### 3.2.4. Reinigung der heterolog exprimierten AAO

Der Überstand aus der Kultivierung im YMG-Medium wurde nach der Ernte mittels Büchnertrichter abgenutscht, auf pH 7,8 eingestellt und zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde mittels Ultrasette™ 300K Tangentialflussfiltrationseinheit von größeren Proteinen und Agglomeraten getrennt. Das Filtrat wurde mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule konzentriert und vorgereinigt (2.6.1.2)(Anhang 7.4). Die beiden Fraktionen mit der höchsten AAO-Aktivität waren C2 und C3 mit 913 und 779 U L<sup>-1</sup>. Diese Fraktionen wurden gepoolt und mittels Jumbosep 10 K Zentrifugaleinheit für die Größenausschlusschromatographie (Abbildung 3.18) umgepuffert und eingengt.

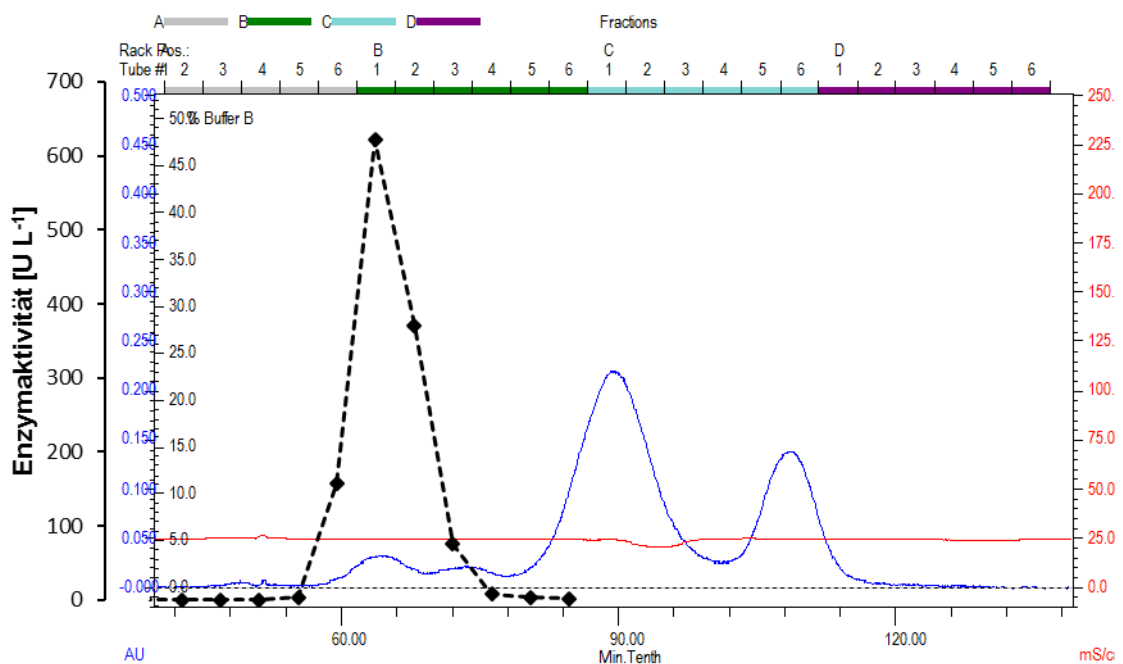


Abbildung 3.18: Größenausschluss-FPLC der Reinigung von AAO mittels der HiLoad 16/600 Superdex 200 µg Säule. Die durchgehende Linie ist die UV-Absorption. Die gestrichelte Linie stellt die AAO Aktivität in den einzelnen Fraktionen dar.

Die Fraktionen B1 und B2 der Größenausschlusschromatographie (Abbildung 3.18) hatten eine Aktivität von 620 und 370 U L<sup>-1</sup>. Sie wurden gepoolt und mittels einer weiteren Größenausschlusschromatographie (HiLoad 16/600 Superdex 75 µg Säule) getrennt (Abbildung 3.19).

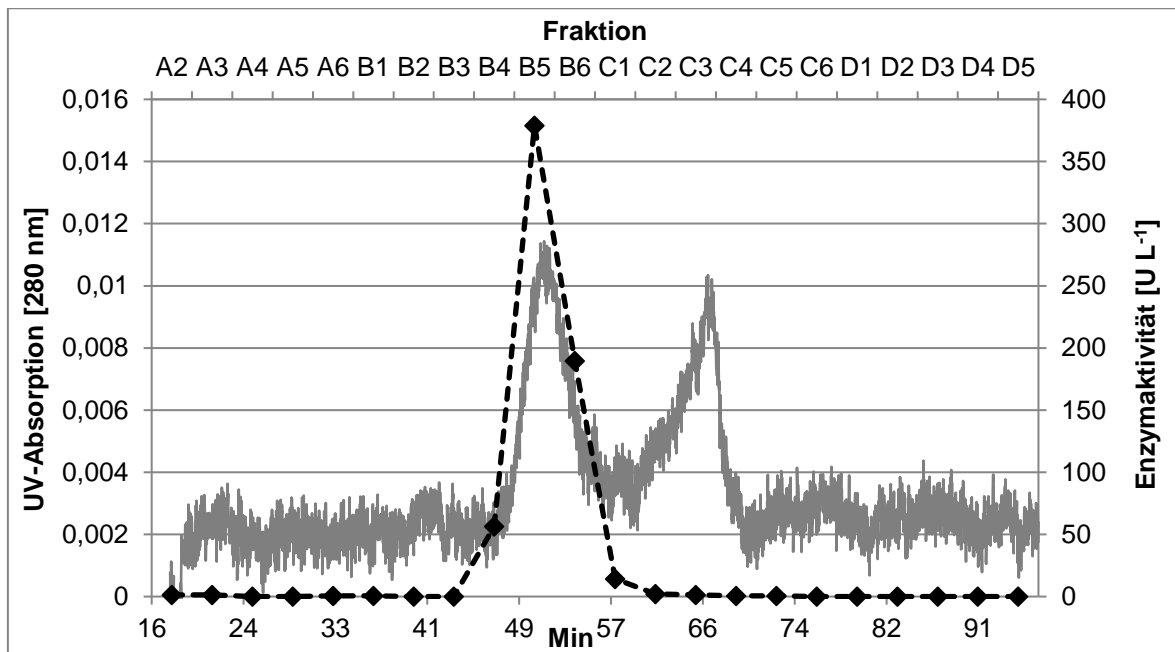


Abbildung 3.19: Ausschnitt aus dem Größenausschluss-Chromatogramm der Reinigung von AAO mittels der HiLoad 16/600 Superdex 75 pg Säule. Die durchgehende Linie ist die UV-Absorption. Die gestrichelte Linie stellt die AAO Aktivität in den einzelnen Fraktionen dar.

Die aktiven Fraktionen B4, B5 und B6 wurden für weitere Untersuchungen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Insgesamt konnte so die spezifische AAO-Aktivität des Kulturüberstands um den Faktor 70 auf ca.  $88\text{ U mg}^{-1}$  gesteigert werden (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Übersicht der einzelnen AAO-Reinigungsschritte.

Reinigungsschritt	Aktivität [U L <sup>-1</sup> ]	Gesamtaktivität [U]	Protein [mg L <sup>-1</sup> ]	Spezifische Aktivität [U mg <sup>-1</sup> ]	Reinigungs- faktor
Überstand	59	47	47,9	1,2	1
Ultrasette 300 K	55,7	46	42,6	1,3	1,06
FPLC DEAE FF	1.149	31	64	18	15
Superdex 200 pg	604	4	8	75,5	61
Superdex 75 pg Fraktion B5	379	3	4,3	88,1	72
Superdex 75 pg Fraktion B6	189	1	2,17	87,1	71

Die Fraktionen B4, B5 und B6 wurden mittels Western Blot (2.6.4), (Abbildung 3.20) und SDS-PAGE (2.6.3.1, 2.6.3.2) (Abbildung 3.21) analysiert, um die Reinheit und den Grad an N-Glykosylierung zu bestimmen. Dabei zeigte der Western Blot einer nativen PAGE für die gereinigten Proben eine einzige Bande zwischen 55 und 70 kDa. Im Überstand und im Filtrat

der *CrossFlow*-Filtration mittels Ultrasette™ 300K, war aufgrund des geringen Mengenanteils der AAO an der Gesamtheit aller Proteine keine Bande detektierbar (Abbildung 3.20).

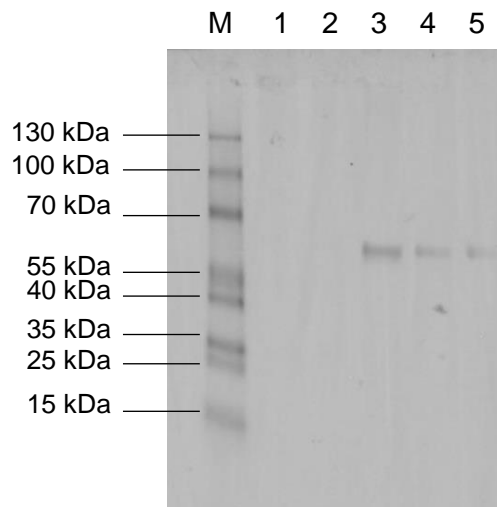


Abbildung 3.20: Western Blot der nativen PAGE von AAO. **1**: Überstand (239 ng Protein); **2**: Probe nach der *Crossflow* Filtration (213 ng Protein); **3**: Nach der Anionenaustauscher-FPLC (256 ng Protein); **4**: Nach der Größenausschluss-FPLC mit Superdex 200 pg Säule (48 ng Protein); **5**: Nach der zweiten Größenausschluss-FPLC mit Superdex 75 pg Säule (136 ng Protein); **M**: PageRuler Prestained Protein Ladder.

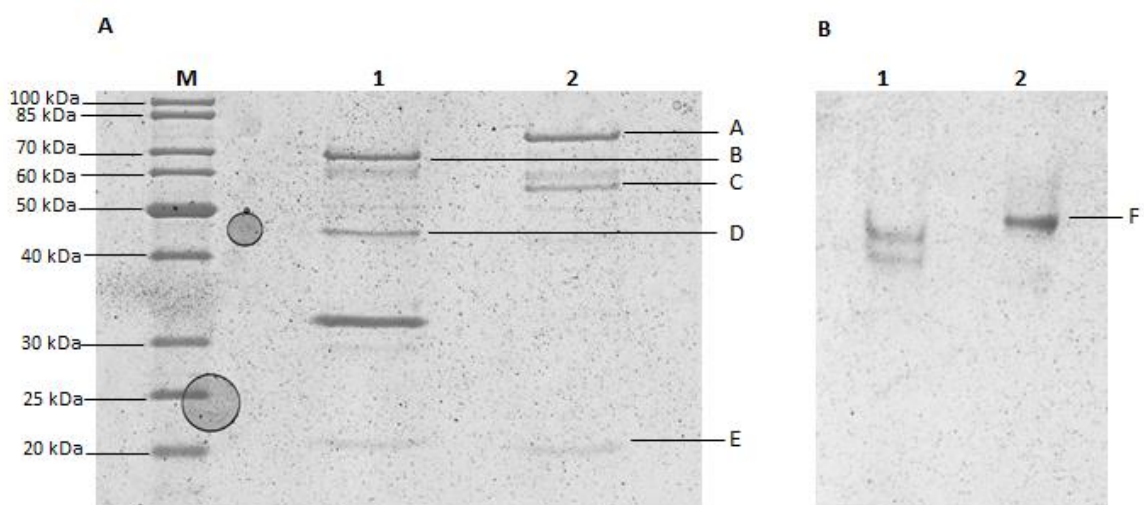


Abbildung 3.21: **(A)** Denaturierende SDS-PAGE von AAO. **1**: mit Deglykosylierung; **2**: ohne Deglykosylierung; **M**: PageRuler Unstained Protein Ladder. **(B)** Native PAGE von AAO. **1**: mit Deglykosylierung; **2**: ohne Deglykosylierung. Pro Tasche wurden ca. 700 ng Protein eingesetzt. Die Banden A bis F wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht (2.6.10).

Die SDS-PAGE zeigte deutliche Unterschiede zwischen deglykosylierten und nicht-deglykosylierten AAO-Proben. Die Banden A und B in den deglykosylierten und nicht-deglykosylierten Proben lagen bei 73 bzw. 65 kDa; Banden C und D bei 58 bzw. 47,5 kDa (Abbildung 3.21(A)). Die ca. 20 kDa große Bande E war sowohl in der deglykosylierten als auch in der nicht-deglykosylierten Probe vorhanden. Die Bande bei ca. 35 kDa stammt von

der eingesetzten PNGase F. Der Unterschied zwischen den Banden A und B deutete auf eine N-Glykosylierung von 11% hin. Auf dem nativen Gel (Abbildung 3.21 (B)) bildete die nicht-deglykosylierte Probe eine leicht höher liegende Bande. Die deglykosylierte Probe enthielt zusätzlich eine kleinere Bande, die aus der PNGase F bestand.

Die Banden A-F wurden aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurden die einzelnen Peptidfragmente mit bekannten AAO-Sequenzen verwandter Pilze abgeglichen. In allen Banden konnten Peptide der *P. sapidus* AAO gefunden werden (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Verteilung der mittels MALDI-TOF-MS gefundenen Peptidfragmente innerhalb der einzelnen Banden der SDS-PAGE und der nativen PAGE von gereinigten AAO-Proben (Abbildung 3.21).

Position	Peptidsequenz	Bande / Sequenzabdeckung					
		A / 37%	B / 39%	C / 24%	D / 21%	E / 24%	F / 35%
1-7	MSFSALR	X	X	X		X	
108 - 124	GRMLGGSSSVHYMVMMR	X	X	X	X	X	X
125 - 132	GSIEDFDR	X	X	X	X	X	X
133 - 152	YAAVTGDDGWNWDNIQQFVR	X	X	X	X		X
234 - 242	SSSSTAYLR	X	X	X	X		X
234 - 247	SSSSTAYLRPAQSR	X	X	X	X		
243 - 260	PAQSRPNLSVLINAQVTK	X	X	X	X		X
248 - 260	PNLSVLINAQVTK	X	X	X	X		
261 - 274	LVNSGTTNGLPAFR			X			
275 - 281	CVEYAER	X	X	X	X		X
282 - 292	EGAPTTTVCAK	X		X	X	X	X
282 - 293	EGAPTTTVCAKK			X		X	
361 - 376	DSSEFNADLDQWTNTR	X	X	X	X		X
377 - 392	TGPLTALIANHLAWLR	X	X	X	X		X
431 - 449	PDTGNFMSVTNALIAPVAR		X				
489 - 501	FLSGQAWADFVIR		X			X	X
489 - 506	FLSGQAWADFVIRPFDAR	X	X			X	X
507 - 521	LSDPTNDAAIESYIR	X	X			X	X
522 - 539	DNANTIFHPVGTASMSPR	X	X			X	X
540 - 551	GASWGVVDPDLK	X	X			X	X
560 - 584	IVDGSILPFAPNAHTQGPIYLVGER	X	X			X	X
585 - 593	GADLIKADQ					X	

Die Peptide aus den größten Banden A und B aus der SDS-PAGE zeigten eine große Übereinstimmung mit der AAO und deckten 37% bzw. 39% der AAO Sequenz ab. Die Peptide der Bande F, die aus dem nativen Gel stammte, deckten 35% der AAO-Sequenz ab und

enthielten Fragmente, die aus allen Bereichen der AAO-Proteinsequenz stammten. Den Banden C und D fehlte der C-Terminus. Die 20 kDa Bande E enthielt Peptidfragmente vom C- und N-Terminus der AAO, aber nur die EGAPTTTTVCAKK Sequenz aus der Mitte des Proteins. Insgesamt deckten die Fragmente 44% der AAO-Sequenz ab.

Eine weitere Fermentation mit mod. Kjalke-Medium resultierte in einer AAO-Aktivität von 332 U L<sup>-1</sup>. Der Überstand wurde nach dem gleichen Schema zunächst mittels Anionenaustauscher-FPLC gereinigt (Anhang 7.4). Die aktiven Fraktionen waren A5 bis B5 mit höchster Aktivität von 1.169 U L<sup>-1</sup> in B1. Danach erfolgte die Größenausschlusschromatographie (Abbildung 3.22) in zwei Durchläufen mit je 5 ml.

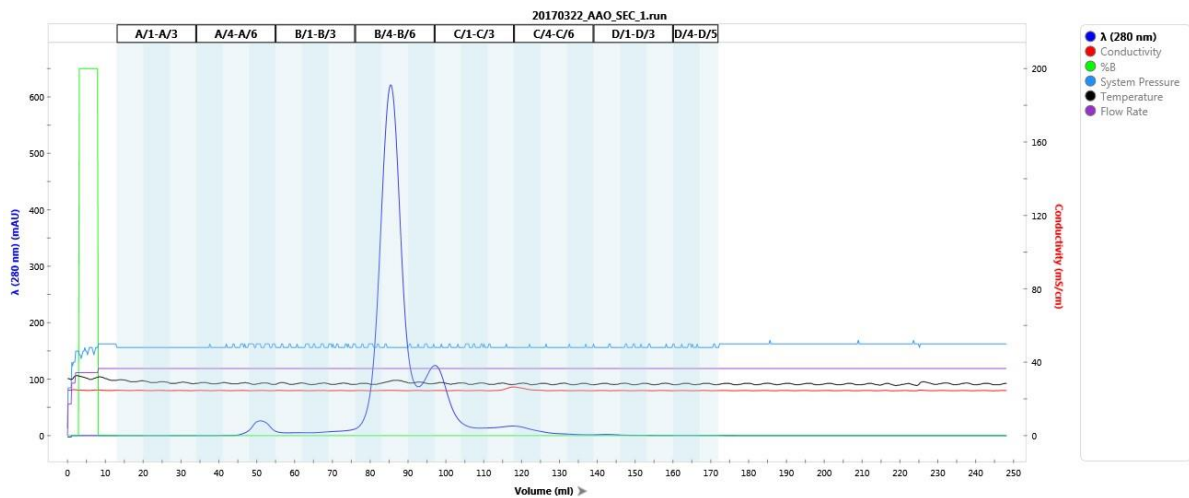


Abbildung 3.22: Größenausschluss-FPLC der Reinigung von AAO mittels der HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule.

Die Fraktion B5 hatte die höchste Aktivität, danach folgte mit großem Abstand B4. Die Fraktionen B5 aus beiden Durchläufen wurden gepoolt und hatten eine Aktivität von 22.849 U L<sup>-1</sup>. Auf eine weitere Größenausschlusschromatographie mittels HiLoad 16/600 Superdex 75 pg Säule wurde verzichtet. Tabelle 3.5 stellt die die AAO-Aktivitäten nach den wichtigsten Reinigungsschritten dar.

Tabelle 3.5: Übersicht der einzelnen AAO-Reinigungsschritte bei einer Aufreinigung mit größerem Volumen

Reinigungsschritt	Aktivität [U L <sup>-1</sup> ]	Gesamtaktivität [U]	Protein [mg L <sup>-1</sup> ]	Spezifische Aktivität [U mg <sup>-1</sup> ]	Reinigungsfaktor
Überstand	332	1.218	69	4,8	1
Ultrasette 300 K	288	907	46	6,3	1
FPLC DEAE FF Gepoolte Fraktionen	532	681	-	-	-
Superdex 200 pg, gepoolte Fraktionen B5	22.849	320	287	79,6	17

Die spezifische Aktivität der Probe nach dem finalen Schritt der 2. Reinigung lag bei 80 U mg<sup>-1</sup>. Die denaturierende SDS-PAGE von den Proben verschiedener Reinigungsschritte zeigt eine deutliche Konzentrierung der rekombinanten AAO mit der erwarteten Größe von 73 kDa (Abbildung 3.23).

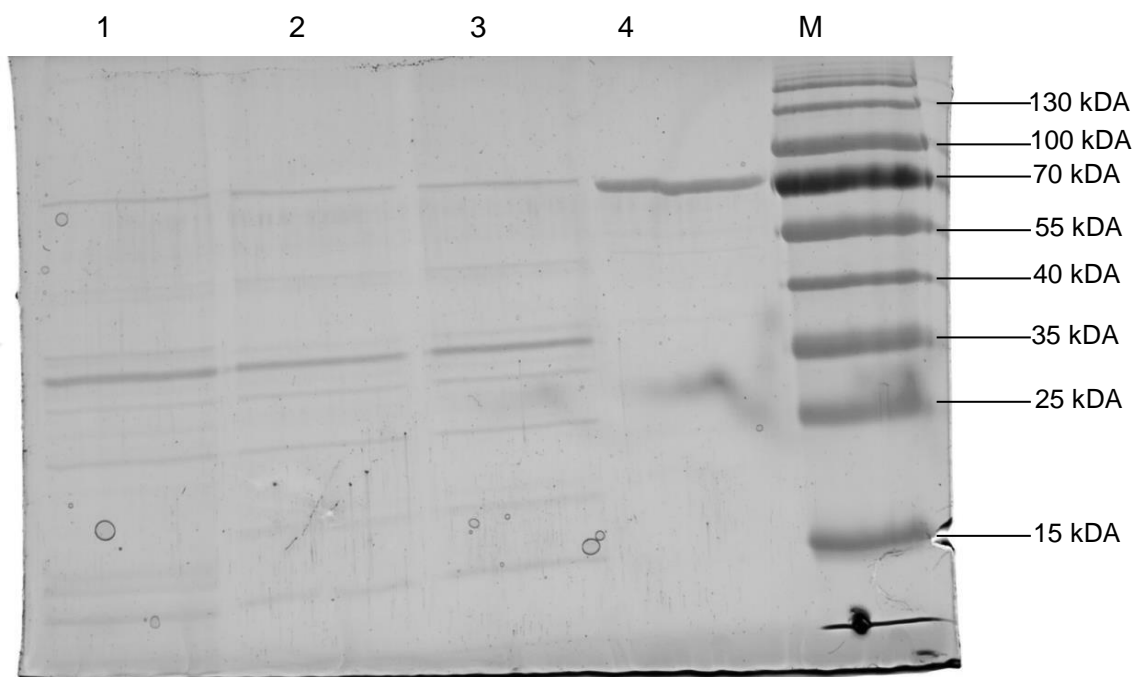


Abbildung 3.23: Denaturierende SDS-PAGE von AAO. In jeder Tasche waren ca. 1500 ng Protein. **1:** Überstand nach der Ernte; **2:** Crossflow Ultrasette Omega 300 K Filtrat; **3:** AAO vor der Anionenaustauscher-FPLC; **4:** AAO Pool aus den Fraktionen B5 nach der HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule; **M:** PageRuler Prestained Protein Ladder.

### 3.2.5. Charakterisierung der AAO

Um den isoelektrischen Punkt der *P. sapidus* AAO zu bestimmen, wurde mit dem reinen Enzym eine isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt. In der IEF zeigte sich für die



gereinigte Probe eine klare Bande, die auf der Höhe der Marker Bande von pH 4,2 lag. Die Vermessung des Gels ergab einen pI von pH 4,14 (Abbildung 3.24).

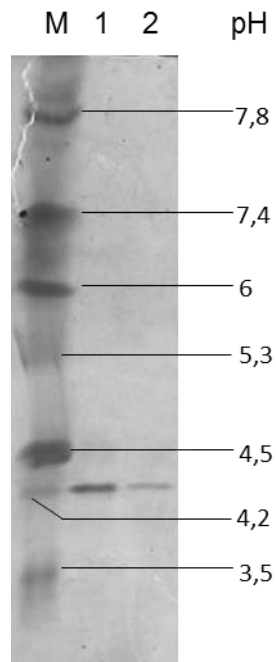


Abbildung 3.24: IEF von AAO. **M**: IEF Marker pH 3-10; **1**: 160 ng AAO; **2**: 24 ng AAO.

Neben der Ermittlung der Proteingröße und des isoelektrischen Punktes wurden auch die Auswirkungen von verschiedenen Temperaturen und pH-Werten auf die AAO untersucht. Die Abbildung 3.25 zeigt die AAO-Aktivität nach der Inkubation bei verschiedenen Temperaturen.

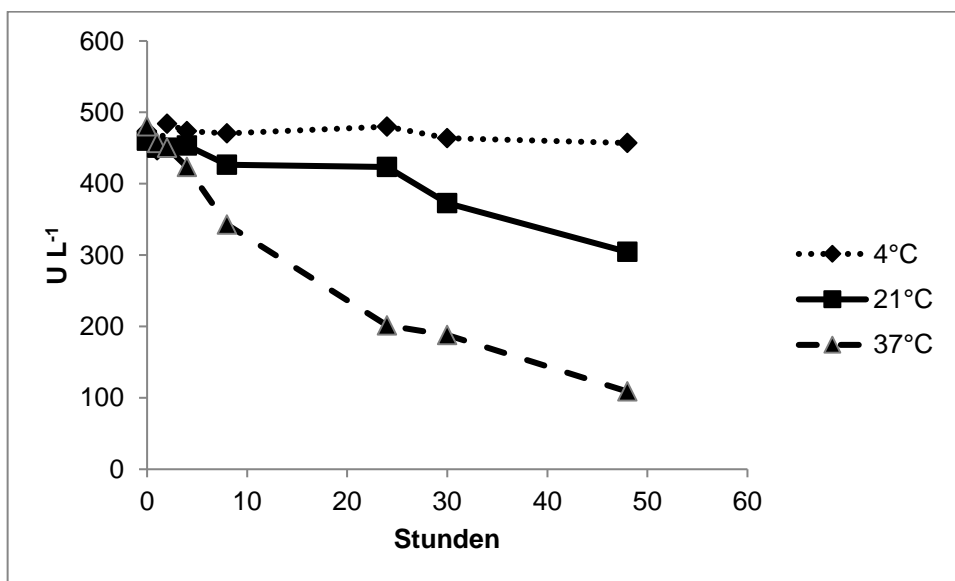


Abbildung 3.25: Auswirkungen verschiedener Lagerungstemperaturen auf die Stabilität der AAO.

Während der Lagerung bei 4 °C blieb die AAO auch nach zwei Tagen weitestgehend aktiv. Bei 21 °C war die Abnahme der Aktivität in den ersten 24 h gering, danach kam es zu einem deutlichen Abfall der Aktivität. Bei 37 °C nahm die Aktivität stetig ab, so dass nach 48 h die Aktivität von 480 auf 109 U L<sup>-1</sup> gefallen war (Abbildung 3.25).

Die AAO war in einem relativ breiten pH-Bereich aktiv. Zwischen pH 3,5 und pH 6 lag die Aktivität immer noch bei mindestens 90% der maximalen Aktivität, die sie bei einem pH-Wert von 5 erreichte (Abbildung 3.26 (A)). Die Inkubation bei 37 °C ergab nach einer Stunde nur eine geringe Abnahme in der Enzymaktivität, wohingegen bei 50 °C schon nach 20 min der Großteil der anfänglichen Aktivität nicht mehr vorhanden war. Die optimale Reaktionstemperatur lag bei 60 °C.

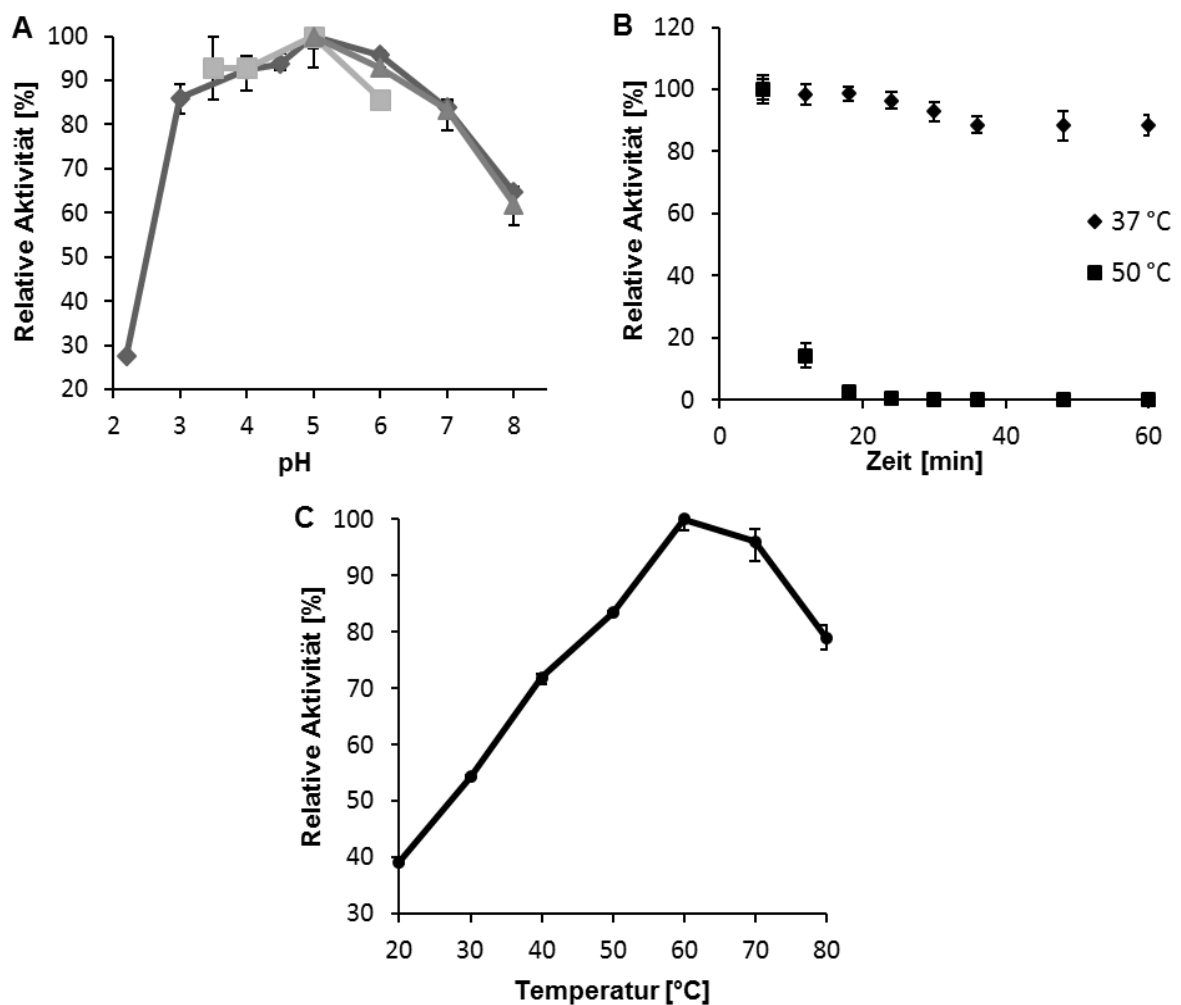


Abbildung 3.26: **(A)** AAO-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert mit folgenden Puffern: McIlvaine Puffer (Rauten), 50 mM Natriumacetat-Puffer (Quadrate) und 100 mM Natriumphosphat-Puffer (Dreiecke) (2.6.9). **(B)** Stabilität der AAO-Aktivität nach der Inkubation bei 37 °C (Quadrate) und 50 °C (Rauten). **(C)** AAO-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen.

Die enzymkinetischen Eigenschaften von AAO wurden mit verschiedenen Substraten

untersucht (Abbildung 3.27). Mit Benzylalkohol als Substrat betrug der  $K_m$ -Wert 784  $\mu\text{M}$ , mit Veratrylalkohol 529  $\mu\text{M}$  und mit Anisalkohol 59  $\mu\text{M}$ . Die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  [ $\text{s}^{-1}$ ] betrug mit Benzylalkohol 38  $\text{s}^{-1}$ , mit Veratrylalkohol 70  $\text{s}^{-1}$  und mit Anisalkohol 203  $\text{s}^{-1}$ . Die Quotienten aus der Wechselzahl dividiert durch den jeweiligen  $K_m$ -Wert betrug 48, 32 und 3.466 [ $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ ].

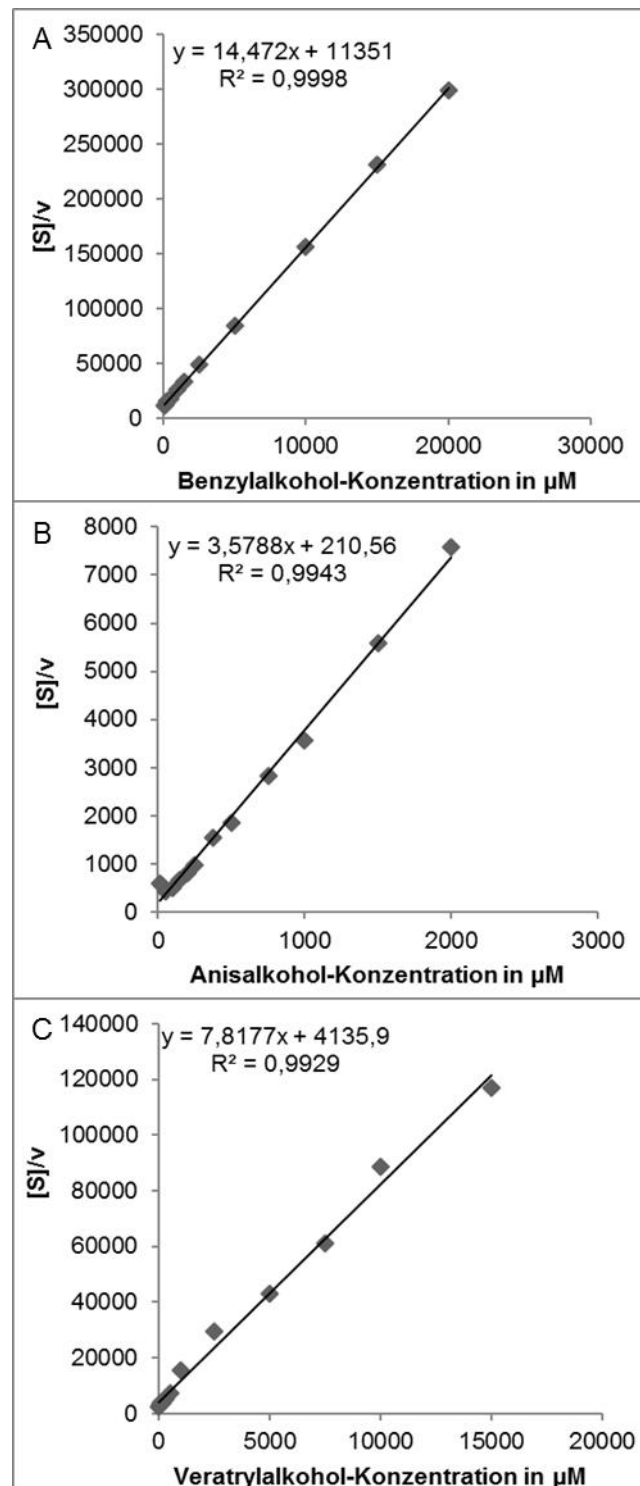


Abbildung 3.27: Hanes-Woolf Diagramme zur Ermittlung der  $K_m$ -Werte von AAO mit verschiedenen Substraten. **(A)** Benzylalkohol. **(B)** Anisalkohol. **(C)** Veratrylalkohol.

### 3.2.6. Einsatz von AAO in einem Zwei-Enzym-System

Als *proof-of-principle* wurde die AAO in einem Enzymsystem eingesetzt, um das für die Peroxidase nötige  $H_2O_2$  zu produzieren. Hierbei oxidiert die AAO Veratrylalkohol zu Veratrumaldehyd unter Freisetzung von  $H_2O_2$ , das von der DyP-Typ Peroxidase zum Abbau des Farbstoffes Reactive Blue 5 verwendet wird (Abbildung 3.28).

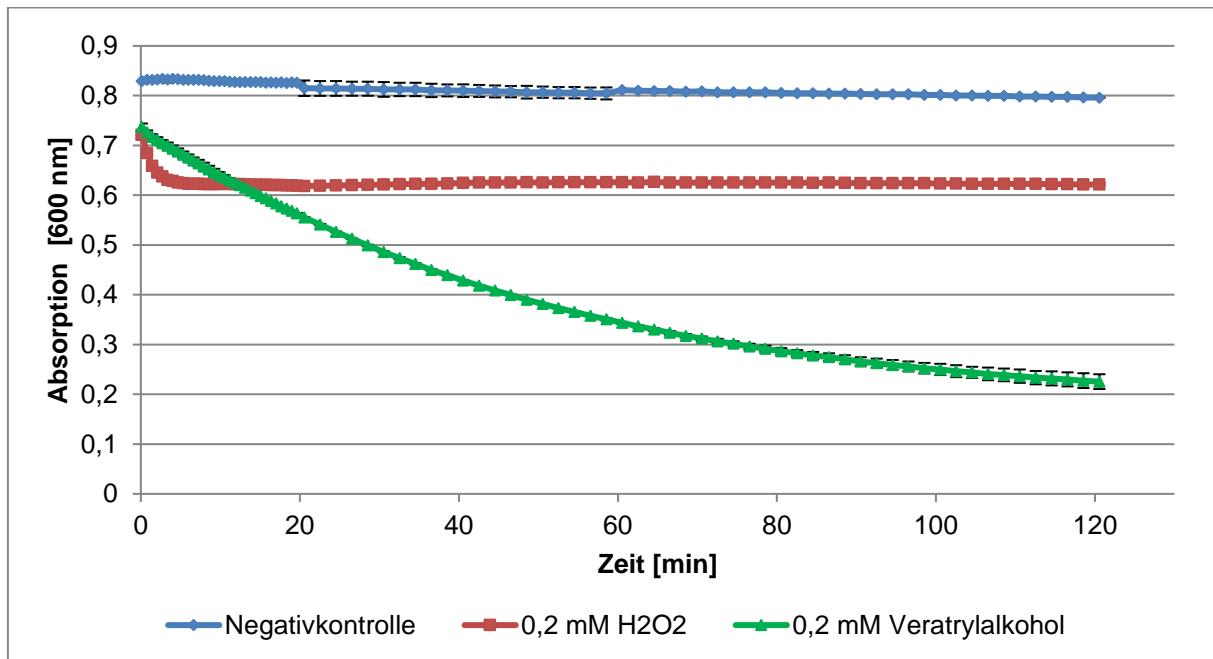


Abbildung 3.28: Abbau von Reactive Blue 5 durch die DyP-Typ Peroxidase MsP1 mit  $200 \mu M H_2O_2$  (Quadrate), Negativkontrolle mit  $H_2O$  (Rauten) oder als Zwei-Enzym-Assay in dem  $H_2O_2$  durch die Umsetzung von  $200 \mu M$  Veratrylalkohol durch heterolog exprimierte AAO erzeugt wird (Dreiecke).

Die Negativkontrolle zeigte eine minimale Veränderung der Absorption. In den Proben mit reinem  $H_2O_2$  und DyP-Typ Peroxidase war in den ersten Minuten ein deutlicher Abbau von RB5 zu sehen. Die Reaktion stoppte allerdings nach weniger als 10 min. In den Proben mit AAO und DyP-Typ Peroxidase wurde RB5 zwar langsamer, aber stetig abgebaut. Der andauernde Abbau von RB5 war in diesen Proben auch nach 2 h noch sichtbar, so dass RB5 mit dem Zweienzymsystem deutlich stärker entfärbt wurde als mit reinem  $H_2O_2$ .

### 3.2.7. Kultivierung von *C. cinerea* pYIG1 1-1-5 im akustischen Resonanzmischer

*C. cinerea* pYIG1 1-1-5 wurde in einem akustischen Resonanzmischer kultiviert, um zu überprüfen ob sich diese Mischtechnik für die Kultivierung von höheren Pilzen eignet, und ob durch diese Art der Kulturführung eine höhere AAO-Produktion erzielt werden kann (2.4.3.6). Zum Vergleich wurden parallel Kulturen mit dem gleichen Volumen an mod. Kjalke-Medium

auf Orbitalschüttlern inkubiert (2.4.3) (Abbildung 3.29). Die Biotrockenmasse von *C. cinerea* ist in der Abbildung 3.30 dargestellt.

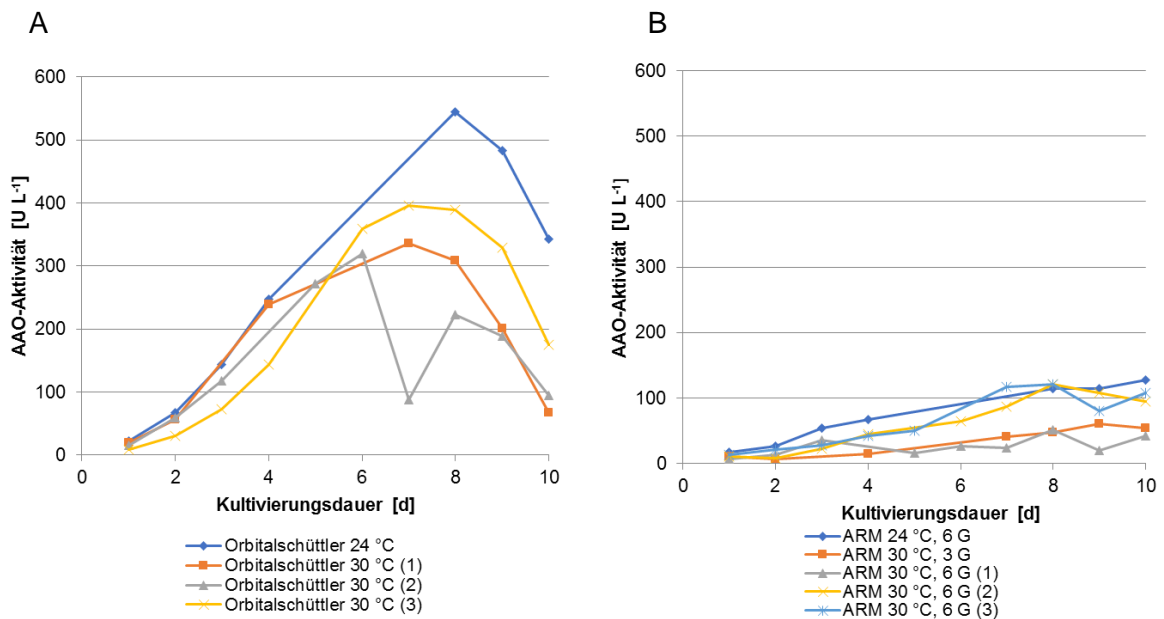


Abbildung 3.29: AAO-Aktivitäten im Überstand von *C. cinerea* pYIG1 1-1-5 während der Kultivierung in **(A)** Erlenmeyerkolben auf dem Orbitalschüttler bei 150 rpm, **(B)** im akustischen Resonanzmischer. In Klammern steht die Nummer der Kultivierungsdurchläufe.

Die höchste AAO-Aktivität im Veratrylalkohol-Assay wurde bei der Kultivierung auf dem Orbitalschüttler zwischen Tag 7 und 8 gemessen. Sie betrug bei 24 °C über 500 U L<sup>-1</sup>. Eine Ausnahme stellte die Kultur des 2. Durchlaufs bei 30 °C dar, in dem die AAO-Aktivität lediglich 87 U L<sup>-1</sup> betrug. Ab Tag 8 nahm die Aktivität wieder ab. Die Kultivierungen im ARM führten im gleichen Zeitraum zu deutlich geringerer Aktivität, die in keiner Kultur 150 U L<sup>-1</sup> erreichte. Im Unterschied zu den Kulturen auf dem Orbitalschüttler war nach Tag 8 noch keine deutliche Abnahme der Aktivität zu sehen.

Die Morphologie des Myzels wies abhängig von der Art der Kultivierung Unterschiede auf. Im Anhang 7.7 sind einige Bilder vom Myzel an verschiedenen Tagen dargestellt (Waldschmidt 2017). Während das Myzel in Schüttelkolben zunehmend eine rundere und gleichmäßigere Pelletform annahm (Abbildung 7.8), blieb es im ARM ungleichmäßig und zerfranst (Abbildung 7.9). Bei längerer Kultivierung kam es auch vor, dass das Myzel zu größeren Pellets und später zu Klumpen aggregierte (Abbildung 7.9 D).

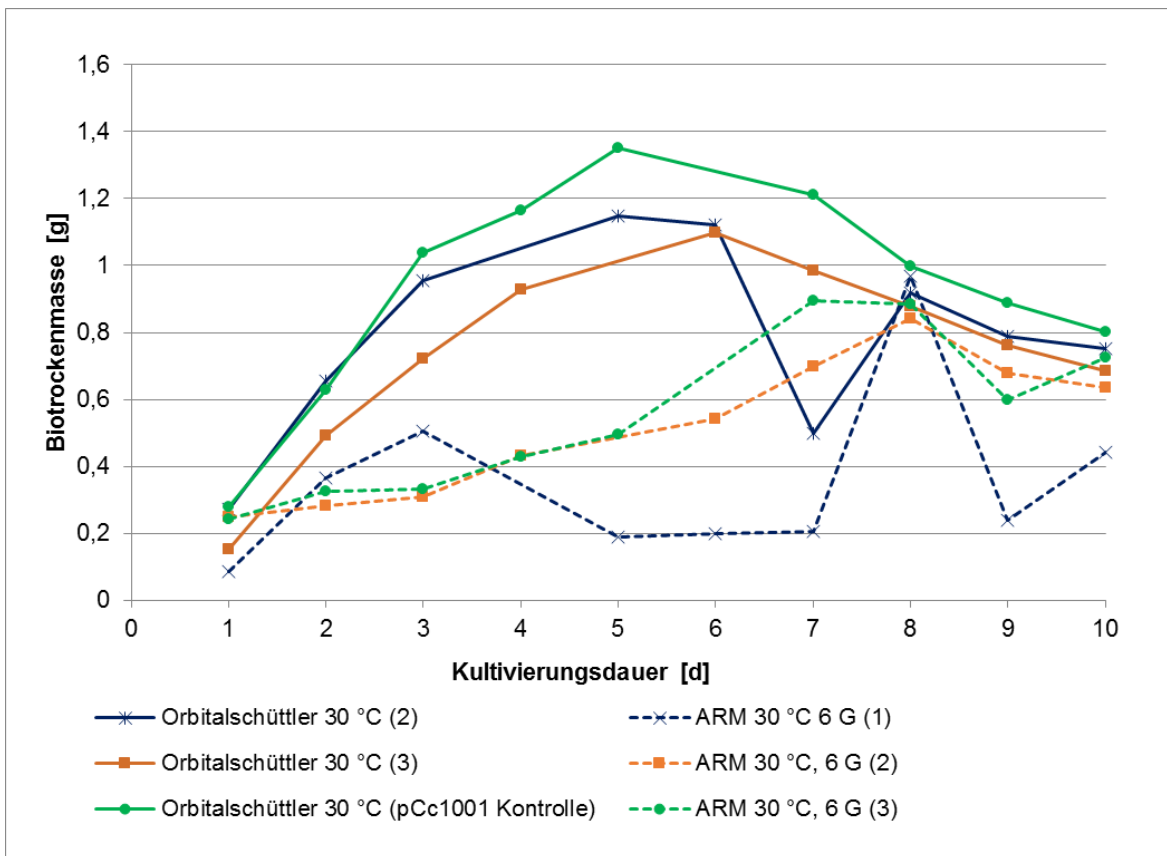


Abbildung 3.30: Biotrockenmasse von *C. cinerea* pYIG1 1-1-5 während der Kultivierung im ARM und auf einem Orbitalschüttler

Die maximale Biotrockenmasse wurde während der Kultivierung auf dem Orbitalschüttler zwischen Tag 5 und 6 gemessen. Die Kontrollkultur mit dem *C. cinerea* Klon der lediglich mit pCc1001 transformiert war, hatte die höchste Biotrockenmasse. Die Kultur vom 2. Durchlauf bei 30 °C hatte an Tag 7 eine besonders niedrige Biotrockenmasse. Es handelte sich um die gleiche Kultur, die am gleichen Tag eine besonders niedrige AAO-Aktivität aufwies. Die Kulturen im ARM entwickelten sich langsamer. Die maximale BTM wurde an den Tagen 7 und 8 beobachtet. Sie blieb jedoch unter 1 g pro Kolben. In beiden Kultivierungsmethoden stieg die Enzymaktivität noch an, nachdem die maximale BTM erreicht war.

## 4. Diskussion

In der Natur spielen Weiß- und Braunfäulepilze eine entscheidende Rolle beim Abbau von lignocellulosehaltigen Materialien. Dank einer Vielzahl von Enzymen können diese Pilze Substrate wie Stroh und Holzspäne, die als Abfälle in verschiedenen Industriezweigen entstehen, verwerten. Die biochemischen Mechanismen dahinter werden seit vielen Jahren untersucht (Martínez *et al.* 2005). Aufgrund ihrer katalytischen Eigenschaften sind die Enzyme der Weißfäulepilze außerdem interessant für verschiedene industrielle Anwendungen wie die Papierherstellung, Verarbeitung bestimmter Lebensmittel oder Abbau von Farbstoffen in Industrieabwässern (Rodríguez Couto und Toca Herrera 2006). Laccasen können die phenolischen Untereinheiten des Lignins direkt oxidieren während Sauerstoff zu Wasser reduziert wird (Martínez *et al.* 2005). Dagegen können Klasse II Häm-Peroxidasen auch nichtphenolische Substrate direkt oxidieren, allerdings benötigen sie dafür  $H_2O_2$  (Hofrichter *et al.* 2010). LiP, MnP und VP wurden unter anderem für die Oxidation von Farbstoffen wie Remazol Brilliant Blau R, Bromphenolblau und Phenolrot eingesetzt (Christian *et al.* 2005, Shrivastava *et al.* 2005). Von den Klasse II Häm-Peroxidasen unterscheiden sich die DyP-Typ Peroxidasen in ihrer Aminosäuresequenz aber auch im Substratspektrum, das auch synthetische Anthrachinon-Farbstoffe mit hohem Redoxpotential umfasst (Kim und Shoda, 1999, Sugano 2009, Hofrichter *et al.* 2010). In der Natur wird das von allen Peroxidasen benötigte  $H_2O_2$  von AAO und Glyoxaloxidasen bereitgestellt. Sowohl AAO als auch Glyoxaloxidasen werden von den Weißfäulepilzen sekretiert und oxidieren außerhalb der Pilzhyphen unter Freisetzung von  $H_2O_2$  Arylalkohole bzw. Aldehyde wie Glyoxal/Methylglyoxal zu den entsprechenden Aldehyden bzw. Glyoxalat/Methylglyoxalat (Camarero *et al.* 1996, Kersten und Kirk 1987, Martinez *et al.* 2005). Der Abbau von Cellulose erfolgt bei Weißfäulepilzen entweder parallel zum oder nach dem Ligninabbau. In beiden Fällen wird die Cellulose zunächst durch Endoglucanasen in Fragmente hydrolysiert. Danach bauen Exoglucanasen die kleineren Celluloseketten von ihren Enden her in das Dissaccharid Cellobiose ab. Am Ende hydrolysiert die  $\beta$ -Glucosidase die  $\beta$ -glycosidische Bindung zwischen den beiden Glucosemonomeren der Cellobiose (Gupta *et al.* 2013).

Weißfäulepilze können diese Enzyme produzieren, und dabei lignocellulosehaltige Abfälle als Substrat nutzen. Parallel würden sie Lignin aufschließen und so Cellulose für weitere Verwendungen wie die Biokraftstoffproduktion freisetzen. Ein Abbau des Lignins in pflanzlicher Biomasse könnte diese außerdem als Futter für Wiederkäuer aufwerten (van Kuijk *et al.* 2015). *P. sapidus* und seine Enzyme wurden bisher nur teilweise erforscht, da nur das Sekretom untersucht wurde, was keine vollständige Information über die möglichen Enzyme, und die Art wie ihre Expression gesteuert wird, liefert. Deswegen beschäftigte sich diese Arbeit mit der

Transkription von Genen, die ligninolytische Enzyme in *P. sapidus* codieren und der heterologen Expression mit anschließender Charakterisierung eines dieser Enzyme.

#### 4.1. Transkriptomanalyse von *P. sapidus*

In der vorliegenden Studie wurde das Transkriptom von *P. sapidus* unter verschiedenen Bedingungen und an verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Der Pilz wurde auf Rapsstroh kultiviert, so dass sein Stoffwechsel sich auf den Abbau von Lignocellulose einstellen sollte. Daneben galt es Unterschiede zwischen der Kultivierung auf Rapsstroh in Flüssig- und Festbettkulturen aufzuzeigen und zu verdeutlichen. Um eine Vergleichbarkeit mit bereits durchgeführten Sekretomanalysen während der Kultivierung von *P. sapidus* auf Rapsstroh herzustellen, orientierten sich die Kultivierungsbedingungen und Tage der Probennahme an vorherigen Arbeiten (Schüttmann 2011). Die Flüssigkulturen enthielten an Tag 9 große Mengen an komplett ausgebildeten, runden Pellets. In Emerskulturen (Abbildung 3.1) hat das feine Myzel nach 21 Tagen das Stroh gerade komplett durchzogen, später, an Tag 56 war das Myzel deutlich dicker. Die Proben die an Tag 84 geerntet wurden, hatten bereits kleine Fruchtkörper gebildet. Diese hatten aber noch nicht die für Seitlinge typische Form erreicht. In der Arbeit von Schüttmann (2011) entwickelten sich die Pilze schneller, nach 56 Tagen waren bereits Fruchtkörper in sehr kleiner Form sichtbar. Möglicherweise wuchsen sie schneller, weil die Kultivierung verglichen zu dieser Studie im zweifachen Maßstab durchgeführt wurde, und sie dadurch auch doppelt so viel Substrat hatten. Eine häufigere Zugabe von Wasser oder eine niedrigere Temperatur als 24 °C hätte das Wachstum von Fruchtkörpern möglicherweise zusätzlich induziert, die Kultivierungstemperatur sollte aber in diesem Experiment bei allen Proben gleich sein. Außerdem wurde für die RNA-Seq Experimente lediglich das Myzel eingesetzt, Fruchtkörper wurden für die Studie nicht verwendet.

Die Sequenzierung in dieser Studie ergab 20,58 Millionen *paired-end reads* (2x150 bp lang) und ca. 5,7 Gbp mit einer Qualität von  $\geq Q30$ , verteilt auf vier Proben. Anders als bei Genomsequenzierungen lässt sich bei einer RNA-Seq nur schwer eine Aussage über die benötigte Sequenziertiefe treffen. Ein bedeutender Anteil der *reads* könnte zu einigen wenigen, besonders stark transkribierten Genen gehören, wodurch die Sequenziertiefe sehr ungleich verteilt wäre. Generell gilt: je mehr *reads* es gibt, desto höher ist die Chance auch die sehr schwach transkribierten Gene zu detektieren (Fang und Cui 2011, Sims *et al.* 2014). Es wurde davon ausgegangen, dass das Genom von *P. sapidus* in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie die Genome von *P. eryngii* (43,8 Mbp) (Yang *et al.* 2016) und *P. ostreatus* (35 Mbp) (Ramirez *et al.* 2011). Deswegen ist eine Sequenziertiefe wie sie bei Experimenten mit Mäusen oder Menschen, die über wesentlich komplexere Genome verfügen,



verwendet wird, nicht nötig gewesen. Die erhaltene Menge an Daten war ausreichend für weitere bioinformatische Analysen. In anderen RNA-Seq Studien mit Basidiomyceten lag die Ausbeute in einem breiten Bereich zwischen 82.386 231 bp *reads* und 266,6 Millionen 90 bp *reads* (Yang *et al.* 2012, Oghenekaro *et al.* 2016). Die sehr unterschiedlichen Sequenziertiefen sind auf die in den Arbeiten jeweils verwendeten Sequenziergeräte und die Anzahl der Sequenzierungen zurückzuführen. Studien, in denen mit Hilfe der Brückensynthese sequenziert wurde, lieferten 1,15 Gbp bis 22,6 Gbp an Sequenzdaten (Tabelle 4.1). Mit der 454 Pyrosequenzierung war die Ausbeute an Daten mit 19 bis 88,8 Mbp deutlich niedriger, was teils am geringeren Durchsatz dieses Systems liegt. In den meisten Publikationen war die generierte Menge an *reads* vergleichbar mit der in dieser Arbeit (Tabelle 4.1). Zu beachten ist aber auch die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit Proben aus vier Zeitpunkten analysiert wurden, während in anderen Studien oft nur eine oder zwei Proben sequenziert wurden, z. B. wenn das Myzel mit dem Fruchtkörper eines Pilzes verglichen wurde (Zhang *et al.* 2016). Bei MacDonald *et al.* (2011) waren es dagegen fünf Proben und bei Oghenekaro *et al.* (2016) sogar sechs. Wenn die gleiche Menge der *reads* auf weniger Proben verteilt ist, dann gibt es dadurch auch eine entsprechend höhere Sequenziertiefe und mehr Informationen über schwach transkribierte Gene.

Tabelle 4.1: Publikationen, die eine Untersuchung des Transkriptoms von Basidiomyceten mittels RNA-Seq beinhalteten.

<b>Organismus</b>	<b>Anzahl und Länge der <i>reads</i></b>	<b>Publikation</b>
<i>P. carnosus</i>	152 Millionen, 2x38 bp lang	(MacDonald <i>et al.</i> 2011)
<i>G. lucidum</i>	6,4 Millionen, 2x90 bp	(Yu <i>et al.</i> 2012)
<i>W. cocos</i>	213 Millionen, -	(Zhang <i>et al.</i> 2016)
<i>W. cocos</i>	78 Millionen, 90 bp	(Shu <i>et al.</i> 2013)
<i>R. microporus</i>	266,6 Millionen, 90 bp	(Oghenekaro <i>et al.</i> 2016)
<i>A. aegerita</i>	14 Millionen, 75 bp	(Wang <i>et al.</i> 2013)
<i>L. edodes</i>	29 Millionen, 2x75 bp	(Zhong <i>et al.</i> 2013)
<i>T. albuminosus</i>	82.396, ø231 bp	(Yang <i>et al.</i> 2012)
<i>P. sanguineus</i>	226.336, ø395 bp	(Rohr <i>et al.</i> 2013)
<i>P. chrysosporium</i>	21,5 Millionen, 2x75 bp	(Wang <i>et al.</i> 2016)
<i>Phlebia sp.</i> MG-60	23,8 Millionen, 2x75 bp	(Wang <i>et al.</i> 2016)
<b><i>P. sapidus</i></b>	<b>20,58 Millionen, 2x150 bp</b>	<b>Diese Arbeit</b>

Bis auf die Arbeiten von Yang *et al.* (2012) und Rohr *et al.* (2013), die die 454 GS FLX Sequencer nutzten, wurden die Studien mit Brückensynthese Sequencern von Illumina durchgeführt.

Bei einer *de novo* Assemblierung von Transkriptomen werden die *reads*, die sich überlappen, zunächst zu zusammenhängenden Fragmenten verbunden, die auch als Contigs bezeichnet werden. Mehrere Contigs, die durch Lücken getrennt sind, werden *scaffolds* genannt. Eine

Assembler-Software versucht aus *scaffolds* möglichst lange, ununterbrochene Sequenzen zu bilden, die nicht mehr erweitert werden können. In der Literatur werden dafür Namen wie *unigenes* verwendet. Für eine funktionelle Charakterisierung der zusammengesetzten Sequenzen werden sie danach i.d.R. mit den Datenbanken wie GO, COG und KEGG abgeglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 30.680 Contigs assembliert. Der Median der Länge lag bei 901 bp und der Mittelwert bei 1.101 bp. Aufgrund von Spleißvarianten und des Fehlens eines Referenzgenoms, wurden in der *de novo* Assemblierung zum Teil mehrere Contigs je Gen erzeugt. So entstanden bis zu 600 Contigs pro Gen bzw. pro sequenziertem Locus, von denen der größte Teil nach der Berechnung der jeweiligen theoretischen Aminosäure-Sequenzen wieder herausgefiltert wurde. Es entstanden insgesamt 7.887 Loci, die mehrere Contigs enthielten, welche vom gleichen Gen stammen sollten. Diese 7.887 Loci sind mit den in anderen Arbeiten als *unigenes* bezeichneten Sequenzen vergleichbar. Allerdings konnte es auch zu einer Fehlzuzuweisung von Contigs zu den Loci kommen, so dass zu viele Contigs dem gleichen Locus zugewiesen wurden, wenn sie von Genen mit ähnlicher Sequenz stammen. Deswegen liegt die tatsächliche Anzahl der gefundenen Gene bei mehr als 7.887. Das wurde später auch während der manuellen Annotation der Contigs, die eine Rolle im Ligninabbau spielen, beobachtet. So wurden in einigen Fällen im selben Locus Contigs aus verschiedenen miteinander verwandten Peroxidasen gefunden, z. B. waren *mnp4* und *mnp6* im gleichen Locus.

Von den 30.680 Contigs konnten 6.986 (22,8%) einer funktionellen Kategorie bei KOG zugewiesen werden (Anhang 7.5). Die Zuzuweisung von ungefähr 1/5 der Contigs scheint für Basidiomyceten normal zu sein. In anderen Studien wurde oft statt der Eukaryoten-spezifischen KOG-Datenbank die COG verwendet. Die Untersuchung des Transkriptoms vom Myzel und Fruchtkörper des Weißfäulepilzes *Ganoderma lucidum* ergab zusammen 12,9 Millionen 90 bp *reads* (1,16 Gbp) (Yu *et al.* 2012). Die *de novo* Assemblierung führte zu 28.210 *unigenes* mit einer Durchschnittslänge von 507 bp. Annotation der *unigenes* mittels COG ergab 5.217 Treffer (18,5%). Die RNA-Seq von *Lentinula edodes* an einem Zeitpunkt ergab 58 Millionen 75 bp *reads* (4,35 Gbp) und 28.923 *unigenes*, die im Schnitt 507 bp lang waren (Zhong *et al.* 2013). Davon konnten 6.203 (21,4%) einer COG Kategorie zugewiesen werden. Die RNA-Seq vom Myzel und Fruchtkörper von *Agrocybe aegerita* ergab zusammen 2,1 Gbp und 36.134 ESTs, von denen 7.624 (21,1%) zu einer COG Kategorie zugewiesen werden konnten (Wang *et al.* 2013). In der Studie von Wang *et al.* (2013) wurde der Ausdruck EST anstatt *unigenes* verwendet, wobei die EST normalerweise für einen kurzen Sequenzabschnitt einer cDNA steht, der ihrer Identifikation dienen kann. Die ESTs waren im Schnitt 663 bp lang. Die Länge der Contigs in dieser Arbeit ist somit größer, als die der *unigenes* in vielen anderen Studien, was vermutlich an Unterschieden in der verwendeten Software lag, oder der besseren

Assemblierung durch die längeren *reads*. Sowohl in den genannten Studien als auch in dieser Arbeit wurden der Kategorie R (*“general function prediction only”*) die meisten Contigs zugeordnet. Die Kategorien J (*“Translation, ribosomal structure and biogenesis”*), G (*“Carbohydrate transport and metabolism”*) und O (*“Posttranslational modification, protein turnover, chaperones”*) gehörten ebenfalls zu den größeren Gruppen. Die Ergebnisse der funktionellen Annotation liegen somit in einem ähnlichen Bereich wie bei anderen Studien mit der *de novo* Assemblierung des Transkriptoms. Eine KOG-Zuweisung von Genen aus Genomanalysen scheint indes effektiver zu sein. Im Genom von *P. eryngii* konnten von 13.805 vorhergesagten Proteinen 4.902 (35,5%) einer KOG Kategorie zugeordnet werden (Yang *et al.* 2016). Im Falle der Genomanalyse von *G. lucidum* waren es mit 29% COG Proteinen deutlich mehr als die 18,5% in der Transkriptomanalyse (Liu *et al.* 2012, Yu *et al.* 2012). Da die Sequenzen in der KOG Datenbank ebenfalls aus Genomen stammen, könnte dies ein Grund für höheren Quoten sein. Möglicherweise funktionierte auch die Assemblierung in diesen Studien besser.

Der Abgleich mit der KOG Datenbank liefert nur einen groben Überblick darüber, welche Rollen im Stoffwechsel die Produkte der einzelnen Contigs haben könnten. Die KOG Annotation ist aber auch deswegen wichtig, weil sie einen Vergleich der *de novo* Assemblierung mit ähnlichen Studien ermöglicht. Die Tatsache, dass die Trefferquote bei anderen Pilzen auf einem ähnlichen Niveau lag, deutet auf eine gute Assemblierung in dieser Arbeit hin. Zur weiteren Funktionsanalyse der Produkte von Contigs hinsichtlich einer bestimmten enzymatischen Aktivität oder der Beteiligung an einem bestimmten Stoffwechselweg, müssen weitere Datenbanken wie die der *Carbohydrate Active Enzymes* (CAZy) oder die MEROPS Datenbank (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) herangezogen werden.

#### **4.1.1. Annotation der Gene und die Veränderungen in der Transkription**

Der Schwerpunkt der Transkriptionsanalyse lag in der Untersuchung von Genen, die für Enzyme codieren, die eine Rolle im Ligninabbau spielen. Zunächst mussten die Contigs des assemblierten Transkriptoms eingegrenzt werden. Dies erfolgte durch den Abgleich mit der CAZy-Datenbank, deren Familie „*Auxiliary Activity*“ (AA) Enzyme enthielt, die am Ligninabbau beteiligt sind (Levasseur *et al.* 2013). 1.591 Contigs (5,2%) gehörten einer der CAZy-Familien an. Davon waren 364 Contigs oder 22,8% differentiell transkribiert. Bei den gesamten Contigs waren dagegen lediglich 4.551 von 30.680 und somit 14,8% differentiell transkribiert. Die Transkriptionsrate der CAZy-Contigs ist somit stärker durch die Kultivierungsbedingungen und die Zeitpunkte der Probennahme beeinflusst als die der anderen Contigs. Die CAZy-Familie mit den meisten zugeordneten Contigs war, wie bei *W. cocos*, *G. lucidum* und *P. eryngii*, die

der Glycosidasen (GH) mit 654 Contigs (41%) (Zhang *et al.* 2016, Yu *et al.* 2012, Yang *et al.* 2016). Der Anteil der Contigs der AA-Familie von 22% (364 Contigs von 1.591, Abbildung 3.4) stieg durch eine Fokussierung auf stark transkribierte Contigs auf 28% (55 mit TPM >100) und erhöhte sich bei den differentiell transkribierten Contigs auf 32% (41 mit TPM >100 und differentiell transkribiert), wobei der Anteil der GH-Familie geringfügig auf 39% sank. Dies verdeutlicht die Bedeutung der AA-Familie für das Wachstum auf lignocellulosehaltigen Substraten. Levasseur *et al.* (2014) verglichen Genome von 20 Weiß- und Braunfäulepilzen, wobei je Genom 12 bis 76 Gene den AA-Unterfamilien zugeordnet wurden. In Weißfäulepilzen sind die Gene der AA-Familie mit 48 bis 76 Vertreter deutlich zahlreicher als in Braunfäulepilzen, die nur 12 bis 35 AA-Gene besitzen. Die Unterfamilie AA2 (Klasse II Häm-Peroxidasen) kam bei Braunfäulepilzen gar nicht vor, was sie zu einem Differenzierungsmerkmal macht. Während der Analyse des Transkriptoms des Braunfäulepilzes *W. cocos* wurden lediglich drei AA-Gene gefunden (Zhang *et al.* 2016). Im Genom vom *P. ostreatus* dagegen wurden 113 Gene der AA-Familie zugeordnet (Riley *et al.* 2014). Bei *P. eryngii* waren es sogar 139 (Yang *et al.* 2016). Laut der neueren Studie von Sista Kameshwar und Qin (2017), in der die Genome von 42 Pilzen verglichen wurden, hatte *P. ostreatus* 114 und *P. eryngii* 115 Gene, die zur AA-Familie gehören. In der gleichen Studie wurden in Braunfäulepilzen zwischen 21 bis 53 Gene aus der AA-Familie gefunden, während es bei Weißfäulepilzen 62 bis 115 waren. Das alles deutet auf eine besonders breite Palette dieser Gene in der Gattung *Pleurotus* hin. Viele dieser Gene wurden auch im Transkriptom von *P. sapidus* gefunden. Nach der manuellen Annotation der AA-Contigs mit Hilfe des Alignments mit dem Genom von dem mit *P. sapidus* verwandten *P. ostreatus* PC15 gehörten nur noch 281 von 364 Contigs zur AA-Familie (auch mit TPM von weniger als 100), diese Contigs waren auf 97 verschiedene Gene zurückzuführen. Davon waren 38 Gene (39%) differentiell transkribiert (Tabelle 3.1), was noch einmal die Rolle von AA bestätigte.

In der Unterfamilie AA1 waren die Contigs der Laccasen LACC2 und LACC9/10 am höchsten transkribiert, wobei im zweiten Fall eine exakte Zuordnung zu LACC9 oder LACC10 nicht möglich war. Dieses Contig war außerdem als einziger differentiell transkribiert. Die Produktion von LACC2 und LACC9/10 wurde bereits bei der Kultivierung von *P. sapidus* auf Erdnußschalen beobachtet (Linke *et al.* 2005). LACC2 entspricht der Laccase mit der Zugriffsnummer Q4VY49 und LACC9/10 der Laccase mit der Zugriffsnummer Q6A1A1. LACC2 wurde auch von Schüttmann (2011) in Kulturüberständen von *P. sapidus* identifiziert. Bei *P. ostreatus* waren *lacc2* und *lacc10* die Gene deren Transkription am stärksten anstieg, wenn in Submerskulturen Ligninabbau induziert wurde (Castanera *et al.* 2012).

In der Unterfamilie AA2 waren von fünf gefundenen MnP und drei VP drei MnP und zwei VP differentiell transkribiert. Es ist auffällig, dass das Transkriptionsmuster von AA2 Contigs (VP und eines der MnP) viel Ähnlichkeit mit den meisten AA5 und einigen AA3 Contigs hatte, deren

Transkription an Tagen 21 und 56 am höchsten war. Zu diesen Familien gehörten Enzyme wie AAO, Glucose-1-Oxidase (GOX), Alkoholoxidase (AOX) und Glyoxaloxidase, die alle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzieren. Im Cluster 59 (Anhang 7.6) waren sieben differentiell transkribierte CAZy-Contigs enthalten, von denen fünf für VP2 und die anderen beiden für potentielle Glyoxaloxidasen codierten. Weitere AA5\_1 und AA3\_2 Contigs befanden sich in Clustern 24, 43 und 62, die alle ein ähnliches Transkriptionsmuster hatten. In einer Studie mit dem Weißfäulepilz *Phanerochaete carnosus* wurde ebenfalls beobachtet, dass die Transkription der Gene, die ligninolytische und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierende Enzyme (MnP, sowie Glyoxal- und Alkoholoxidasen) codierten, sich bei Wachstum auf lignocellulosehaltigen Substraten in Festbettkulturen parallel erhöhte (MacDonald *et al.* 2011). Von der Glyoxaloxidasen wurden dabei wesentlich mehr Transkripte gefunden als von AOX. Ein ähnliches Bild zeichnete sich auch bei der Kultivierung von *P. chrysosporium* auf Fichtenholz ab (Korripally *et al.* 2015). Nach 96 h nach Beginn der Kultivierung war die Transkription von MnP und LiP sowie Glyoxal- und Alkoholoxidasen viel stärker als nach 40 h. Eine Studie mit dem Pilz *Phanerochaete crassa* ergab, dass die Glyoxaloxidase stärker transkribiert wird, wenn MnP induziert wird (Takano *et al.* 2010). Eine AAO- oder AOX-Aktivität wurde bei *P. crassa* nicht festgestellt. Die Autoren kamen in dieser Studie zur Schlussfolgerung, dass die Glyoxaloxidase an der Zellwand von Hyphenspitzen lokalisiert ist, wo sie für MnP, die in Kulturmedium sekretiert wird, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produziert. Außerdem scheinen Glyoxaloxidasen inaktiv zu sein und werden erst durch das Vorhandensein einer Peroxidase aktiviert, wie es für eine gereinigte Glyoxaloxidase gezeigt wurde (Kersten 1990). Des Weiteren wird für eine Reaktion der Glyoxaloxidase Cu<sup>2+</sup> benötigt. Die AOX spielt eine größere Rolle bei Braunfäule-Pilzen. Sie oxidiert Methanol, das bei der Demethoxylierung von Lignin entsteht, und stellt dabei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> her, das bei der Fenton-Reaktion verwendet wird (Daniel *et al.* 2007, Ferreira *et al.* 2015). Bei der Sekretomanalyse von *P. sapidus* in Submerskulturen auf Rapsstroh wurden AAO Glyoxal- und Alkoholoxidase massenspektrometrisch detektiert, aber keine Glucose-1-Oxidase, bei der es sich um ein intrazelluläres Enzym handelt (Hernández-Ortega *et al.* 2012). Das oben erwähnte Zusammenspiel zwischen Peroxidasen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierenden Enzymen fand später Verwendung im Rahmen des Zwei-Enzym-Assays (4.2.6). Dabei wurde eine AAO verwendet. Sie besitzt den Vorteil, dass sie anders als Glyoxaloxidase keine Aktivierung durch eine Peroxidase benötigt, wodurch sie sich für eine biotechnologische Verwendung auch außerhalb des Zwei-Enzym-Assays anbietet.

Die Contigs, die DyP-Typ Peroxidasen codierten waren mit Ausnahme der *dyp4* nur schwach transkribiert. *dyp4* scheint die wichtigste DyP-Typ Peroxidase in *P. sapidus* zu sein. In den Submerskulturen gab es eine deutlich höhere Transkription, die möglicherweise die schwache Transkription der anderen Peroxidasen in der Submerskultur kompensierte. Es wird vermutet, dass diese Enzyme ein Teil eines alternativen biokatalytischen Systems sein könnten das, anders als MnP, nichtphenolische Aromate innerhalb des Lignins direkt oxidiert (Hofrichter *et*

al. 2010). Allerdings wird in neueren Publikationen angezweifelt, dass die DyP-Typ Peroxidasen eine größere Rolle im Ligninabbau spielen könnten (Linde *et al.* 2015, Fernandez-Fueyo *et al.* 2015).

In den früheren Untersuchungen des Sekretoms von *P. sapidus* (Zorn *et al.* 2005, Schüttmann 2011) wurde nur eine begrenzte Anzahl der Proteinspots aus 2D Gelen massenspektrometrisch untersucht und nicht alle davon konnten identifiziert werden. So wurden bei Schüttmann (2011) 22 von 30 untersuchten Proteinspots aus Emerskulturen einem bekannten Protein zugeordnet. Darunter waren Peptidfragmente mit Homologien zu AAO, LACC2 und auch anderen, nicht genauer beschriebenen Laccasen, MnP, VP und mehreren Peptidasen. Bei der Analyse der Submerskulturen wurden 214 Proteinspots ausgewertet, von den 80% zu den Glycosydasen gehörten und 10% unbekannt waren. Verglichen dazu war die Untersuchung des Transkriptom viel umfassender was die Anzahl der möglichen Proteine angeht. So wurden allein in der AA-Familie 97 Gene annotiert. Das liegt auch an zahlreichen Isoenzymen, von den nicht alle mittels MS identifiziert werden konnten, weil sie zu schwach oder gar nicht sekretiert wurden bzw. nur Fragmente der AS-Sequenz bekannt waren. Die Sequenzen der Transkripte könnten in Zukunft von Nutzen sein, wenn z. B. für eine heterologe Expression von einem Protein von dem nur Teile der AS-Sequenz bekannt sind, die entsprechende cDNA isoliert werden soll.

#### **4.1.2. Vergleich von RNA-Sequenzierung mit RT-qPCR**

Die Untersuchung der Transkription ausgewählter Gene mittels RT-qPCR und anschließender Vergleich mit den Ergebnissen aus der Untersuchung des Transkriptom sollte der Validierung der RNA-Seq dienen. Für eine bessere Übersicht sind die Werte aus der RNA-Seq und RT-qPCR in der Abbildung 4.1 gemeinsam dargestellt. Da es sich bei den durch die RT-qPCR generierten Zahlen nur um eine relative Quantifizierung handelt, und die Transkriptionsänderungen nur in Relation zu einer bestimmten Messung dargestellt werden, wurde sowohl bei RT-qPCR als auch RNA-Seq die Probe von Tag 84 als Referenz ausgewählt. Dargestellt ist jeweils wieviel fach höher oder niedriger die Transkription gegenüber Tag 84 ist, an dem die Werte immer 1 betragen. Auf die gleiche Weise wurden schon bei Oghenekaro *et al.* (2016) und Zhang *et al.* (2016) die beiden Methoden miteinander verglichen.

Bei Manganperoxidasen gab es Ähnlichkeiten zwischen RNA-Seq und RT-qPCR. *mnp1* lieferte im Transkriptom in Emerskulturen die höchsten TPM von allen MnP, zeigte in der Flüssigkultur allerdings nur sehr geringe Transkriptionsraten, weswegen sie mittels RT-qPCR in der Flüssigkultur nicht detektiert wurde (Abbildung 4.1 A). Dagegen war in der Emerskultur die Transkription an Tag 21 sowohl mit RNA-Seq als auch RT-qPCR am höchsten und sank

im weiteren Verlauf wieder ab. Das passt auch zu den Ergebnissen der Kultivierung von *P. ostreatus* in einer semi-Festbettkultur von 5 g Substratmischung aus gemahlenem Weizenstroh und Pappelspänen in 35 ml dest. Wasser (Fernández-Fueyo *et al.* 2014a). Dabei wurden weder intra- noch extrazelluläre MnP1 Peptidfragmente detektiert. In Flüssigkulturen von *P. sapidus* mit Erdnusschalen als Substrat wurde nur MnP3 festgestellt (Zorn *et al.* 2005). *mnp3* hatte in Flüssigkulturen mit Rapsstroh zwar eine höhere Transkriptionsrate als *mnp1* und *mnp6*, diese war allerdings auf niedrigem Niveau. Darin unterscheidet sich das Ergebnis von dem in *P. ostreatus*, wo *mnp3* für das wichtigste MnP Isoenzym codiert (Fernández-Fueyo *et al.* 2014a). Mittels RT-qPCR wurde ein Anstieg der Transkription von *mnp3* in Flüssigkultur über die Zeit gemessen, wobei die Transkriptionsraten in der Emerskultur noch höher waren. Bei RNA-Seq wurden an Tag 21 weniger TPM gemessen als an Tag 9, an beiden anderen Tagen stieg die Transkription jedoch ebenfalls an. Castanera *et al.* (2015) haben Transkription von *lacc10* und *mnp3* in *P. ostreatus* in glucosehaltiger Flüssigkultur und in lignocellulosehaltigen Festbett- und semi-Festbettkulturen untersucht. Die höchste Transkription von *mnp3* wurde in semi-Festbettkulturen gemessen. Anders als bei den anderen MnP sank die Transkription von *mnp6* deutlich ab. Das lag möglicherweise daran, dass *mnp6* zwar differentiell transkribierte Contigs hatte, aber mit TPM unter 100 insgesamt sehr schwach transkribiert war. RT-qPCR zeigte dagegen einen Anstieg der Transkription von Tag 6 bis Tag 21. Bei der Untersuchung der MnP von *P. ostreatus* mittels RT-qPCR wurde *mnp6* nur schwach transkribiert und schien eine nachgeordnete Rolle zu spielen (Salame *et al.* 2013).

Sowohl *vp2* als auch *vp3* wurden in Emerskulturen deutlich stärker transkribiert als in Submerskulturen (Abbildung 4.1 B). Das wurde bei beiden Analysemethoden beobachtet. Bei der RT-qPCR Analyse der Flüssigkulturen stieg die Transkriptionsrate für beide Gene zwar über die ganze Dauer an, blieb allerdings weit unter den Werten der Emerskulturen. Anders als bei *P. ostreatus* war nicht *vp1*, sondern *vp2* die am stärksten transkribierte VP (Fernández-Fueyo *et al.* 2014a). Während *vp1* nicht mal TPM-Werte von 100 erreichte, hatte einer der *vp2* Contigs an Tagen 21 und 56 über 20.000, was sie zu dem am stärksten transkribierten CAZY-Gen in dieser Studie macht. In der Arbeit von Schüttmann *et al.* (2014) wurde in *P. sapidus* eine VP induziert und beschrieben, ihre Sequenz bekam die Zugriffsnummer Q4QZ27. Ein Vergleich der AS-Sequenz mit den Proteinen von *P. ostreatus* ergab die größte Homologie mit VP3, bei der es sich um eine in dieser Studie ebenfalls stark transkribierte Peroxidase handelt.

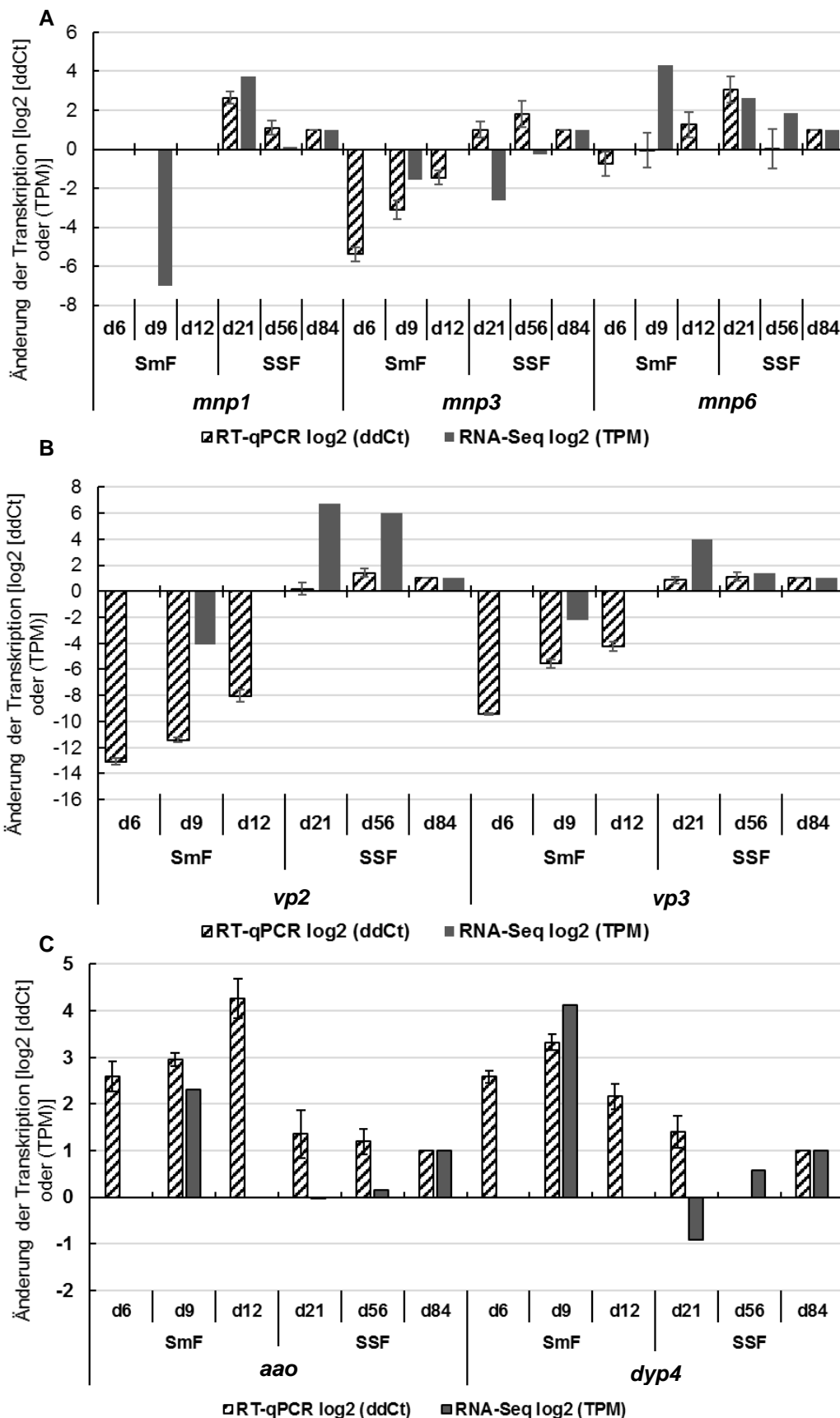


Abbildung 4.1: Vergleich der Änderungen in der Transkription von **(A)** MnP, **(B)** VP, **(C)** AAO und DyP. Verglichen wurden die Ergebnisse aus der RT-qPCR (schraffiert, log<sub>2</sub> (ΔCt)) und der RNA-Seq (gefüllt, log<sub>2</sub> (TPM)) mit der Summe der TPM von allen Contigs des jeweiligen Gens). Bei beiden Analysemethoden wurden die Transkriptionsänderungen in Relation zu Tag 84 dargestellt.



Die RT-qPCR bestätigte die niedrigeren Transkriptionen der *ao* in Emerskulturen (Abbildung 4.1 C). Die Anzahl der *reads* für *ao* war im Transkriptom insgesamt sehr niedrig, wobei in den Emerskulturen die TPM-Werte um mehr als die Hälfte niedriger waren als in der Flüssigkultur (Tabelle 3.2). Im Zuge der Annahme, dass AAO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für die Peroxidasen liefert, wäre es zu erwarten, dass die Transkription in Emerskulturen zusammen mit VP und MnP zunimmt. Daher scheint die durch die hohen Transkriptionsraten der Peroxidasegene benötigte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge nicht durch die AAO zur Verfügung gestellt zu werden. Vermutlich erfüllen die Glyoxal- und/oder Alkoholoxidasen diese Rolle in Emerskulturen. Bei der RNA-Seq hatten diese Gene deutlich höhere Transkriptionsraten (Tabelle 3.2). Vor allem die Glyoxaloxidasen verzeichneten höhere Transkriptionsraten in Festbettkultur als in Flüssigkultur. Bei der Analyse des Sekretoms wurde Glyoxaloxidase allerdings nur in Submerskulturen detektiert (Schüttmann 2011). Die Glucose-1-Oxidase kann ebenfalls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzieren. Da sie aber ein intrazelluläres Enzym ist und noch kein Transportsystem für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beschrieben wurde (Hernández-Ortega *et al.* 2012), ist die Rolle der Glucose-1-Oxidase hier noch unklar. *dyp4* Transkription war bei beiden Messmethoden in Submerskulturen viel höher als in Emerskulturen. Obwohl die Probe von Tag 56 nicht die niedrigste Transkription bei RNA-Seq zeigte, wurde die Transkription in RT-qPCR an diesem Tag nicht gemessen.

*lacc9/10* konnte mittels RT-qPCR nur an den Tagen 21 und 84 detektiert werden, wobei die Transkription an Tag 84 etwas höher war. Die RNA-Seq dagegen detektierte an allen vier Tagen *lacc9/10* Transkripte. Neben *lacc9/10* war *lacc4* die einzige andere differentiell transkribierte Laccase, allerdings mit nur einer geringen Transkription in Emerskulturen. Andere Laccasen, wie die *lacc2*, wurden teils höher transkribiert, allerdings ohne starke Schwankungen zwischen den analysierten Kulturtagen, die eine differentielle Transkription bedeutet hätten. In *P. ostreatus* wurden ebenfalls *lacc2* und *lacc10* als die wichtigsten Laccasen identifiziert (Castanera *et al.* 2012, Castanera *et al.* 2013). Die Transkription war aber in diesen Studien in Submerskulturen höher als in Emerskulturen. Da überwiegend die Peptide von LACC2 in anderen Studien mit *P. sapidus* identifiziert wurden (Linke *et al.* 2005, Schüttmann 2011) handelt es sich vermutlich neben LACC9/10 um die bedeutendste Laccase für *P. sapidus*.

Vermutlich ist die Vergleichbarkeit von RNA-Seq und RT-qPCR bei niedriger Transkription geringer. Zum Beispiel wurde bei der Analyse des Insekten *Blatella germanica* nur bei mRNAs mit mehr als 100 *reads* eine Korrelation zwischen RNA-Seq und RT-qPCR festgestellt (Cristino *et al.* 2011). Ein Vergleich von RNA-Seq und RT-qPCR bei der Untersuchung von fünf Genen in *Phlebia sp.* MG-60 ergab auch eine Korrelation, es handelte sich aber ebenfalls um stark transkribierte Gene (Wang *et al.* 2016).

#### 4.1.3. Vergleich von Transkriptomdaten mit Enzymaktivitäten

Die Messung der Enzymaktivitäten sollte überprüfen, ob es einen messbaren Zusammenhang zwischen der Transkription und der Proteinsekretion gab. Da bei Festbettkulturen die Enzyme zuerst extrahiert werden mussten, können ihre Aktivitäten nur bedingt mit den Aktivitäten in den Flüssigkulturen verglichen werden. Außerdem kann hier mittels Enzymassays nicht zwischen den einzelnen Isoenzymen unterschieden werden.

Die Aktivität der DyP-Typ Peroxidasen (Abbildung 3.8) blieb bei allen Proben auf einem relativ konstanten Niveau, ähnlich wie die Transkription dieser Gene bei der Untersuchung des Transkriptoms mittels RT-qPCR. Es kann keine Aussage getroffen werden, ob in den Submerskulturen viel mehr DyP produziert wurde, so wie es die deutlich höheren TPM-Werte an Tag 9 vermuten lassen, oder ob die gleichbleibende DyP-Aktivität auf der schlechteren Extraktion aus den Emerskulturen resultiert. Die AAO war nur in Flüssigkulturen aktiv, was die niedrigeren Transkriptraten in den Festbettkulturen widerspiegelt. Das unterstützt die Annahme, dass in Festbettkulturen andere Enzyme für die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sorgen. Die Aktivität der Laccasen in Flüssigkultur veränderte sich nur schwach. In Festbettkulturen konnte, anders als bei RNA-Seq, keine Steigerung an Tag 84 verglichen zu Tag 21 festgestellt werden. Die Aktivität war wie auch schon bei MnP an Tag 56 niedriger als an den Tagen 21 und 84. An Tag 56 wurden auch mittels RT-qPCR keine *lacc9/lacc10* Transkripte detektiert.

Mittels Phenolrot-Assay wurden zwar hohe MnP Aktivitäten in Festbettkulturen detektiert, vor allem an den Tagen 21 und 84, aber keine Aktivität in Flüssigkulturen. Das passt auch zu den hohen *mnp1* TPM-Werten in Festbettkulturen und der fehlenden *mnp1* Transkription in Submerskulturen in der RT-qPCR Analyse. *mnp3* wurde in Festbettkulturen ebenfalls viel höher transkribiert als in den Flüssigkulturen. Andererseits wurde nur wenig VP Aktivität in Festbettkulturen gemessen, bzw. gar keine an Tag 21, was im Widerspruch zu sehr hohen TPM-Werten der *vp2* und *vp3* in Festbettkulturen steht. Die Messung mit dem Reactive Black 5 Assay ergab eine schwache Aktivität an den Tagen 21 und 84. Ein Grund dafür könnte die begrenzte Sekretion von VP sein. So wurde z. B. im Sekretom von *P. ostreatus*, keine MnP3 gefunden, obwohl *mnp3* von allen Peroxidase-Genen am stärksten transkribiert war (Fernández-Fueyo *et al.* 2014a). Dieses Enzym wurde lediglich interzellulär detektiert. Eine alternative Erklärung ist der unspezifische Abbau von Reactive Black 5 durch MnP, die in Proben der Tage 21 und 84 sehr aktiv war. Auf der anderen Seite wurde bereits gezeigt, dass die Anwesenheit von Mn<sup>2+</sup> bei VP von *P. sapidus* zu einer verbesserten Oxidation von Substraten führt (Schüttmann *et al.* 2014). Das könnte der Grund für die hohe Aktivität im Phenolrot-Assay mit Mn<sup>2+</sup> in Emerskulturen sein, aber es erklärt nicht, warum es an Tag 21 keine Aktivität ohne Mn<sup>2+</sup> gab. Um die Frage zu lösen müsste eine Untersuchung der

intrazellulären Enzyme durchgeführt werden. Außerdem könnten mit gereinigten MnP und VP ihre Substratspezifitäten und die enzymkinetischen Eigenschaften überprüft werden.

## 4.2. Heterologe Expression von AAO in *C. cinerea*

### 4.2.1. Stammkonstruktion für die rekombinante Expression von AAO

Die Eigenschaft von AAO  $H_2O_2$  zu produzieren, das in einem Zwei-Enzym-Assay von einer Peroxidase verwendet werden könnte, macht dieses Enzym biotechnologisch interessant. Anders als die intrazelluläre Glucose-1-Oxidase, die ebenfalls  $H_2O_2$  produziert, handelt es sich dabei um ein Enzym das in der Natur sekretiert wird. Deswegen wurde in dieser Arbeit die heterologe Expression von AAO in einem geeigneten Wirt angegangen, mit dem Ziel eine kontinuierliche und möglichst hohe Sekretion des Enzyms in das Kulturmedium zu erreichen. Dafür wurde *C. cinerea* FA2222 mit zwei Plasmiden cotransformiert: dem im Rahmen dieser Arbeit konstruierten pYIG1 der die *aao*-Sequenz aus *P. sapidus* trug, und dem pCc1001 (Binnering et al. 1987) mit der *trp1<sup>+</sup>*-Sequenz, die die Tryptophan Auxotrophie von *C. cinerea* FA2222 aufhob. Diese Methode *C. cinerea* zu transformieren wurde schon 1987 etabliert (Binnering et al. 1987). Obwohl die Methode schon 30 Jahre alt ist, gibt es wenige Arbeiten in denen eine heterologe Expression von Proteinen in *C. cinerea* oder anderen Basidiomyceten beschrieben ist. Kilaru *et al.* (2006) nutzten sie um *C. cinerea* mit Laccase-Genen zu transformieren, dabei handelte es sich um homologe Expression. Auch andere Proteine, wie MnP, FIP-gsi (*fungal immunomodulatory protein-Ganoderma sinense*) oder Cellulase wurden mit Hilfe der Cotransformation mit pCc1001 in *C. cinerea* heterolog exprimiert (Ogawa *et al.* 1998, Han *et al.* 2010, Cheng *et al.* 2009). Die Cotransformation wurde auch schon bei *P. chrysosporium* angewandt (Coconi-Linares *et al.* 2015). Die Sequenzen der Zielgene integrieren sich dabei ins Genom des Pilzes und werden bei Zellteilung stabil weitervererbt. Die Integration geschieht allerdings ektopisch, d.h. die Zielgene integrieren sich nicht an einem bestimmten Locus, basierend auf Sequenzhomologien, sondern an verschiedenen Loci und können somit auch mehrfach im Genom vorkommen (Granado *et al.* 1997). Obwohl die Zielgene und die Selektionsmarker bei der Cotransformation auf unterschiedlichen Plasmiden liegen, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass beide Plasmide aufgenommen werden. Es wird dadurch erklärt, dass nur wenige Protoplasten bei der Transformation die DNA gut aufnehmen, und diese nehmen dann oft mehrere Plasmide gleichzeitig auf (Fincham 1989). Auf diese Weise ist die Anzahl der falsch-positiven Klone nach einer Transformation relativ gering.

Zwei Cotransformationen von *C. cinerea* FA2222 mit 5,5 und 6,5  $\mu$ g Plasmid pYIG1 und jeweils 2,5  $\mu$ g pCc1001 resultierten in insgesamt 166 Klonen. Dörnte und Kües (2012) erreichten mit dieser Methode eine höhere Anzahl an Transformanden pro Versuch mit 34 bis 208 Klonen je

1 µg Plasmid. Mehr als 1 µg Plasmid pro Transformation bringt nicht zwangsläufig höhere Transformationsraten (Dörnte und Kües 2012). Die Anzahl der Transformanden kann auch bei gleicher Menge der eingesetzten DNA schwanken, abhängig von der Anzahl der Protoplasten und deren Grad der Protoplastierung. Wichtig dabei war auch, dass es sich um frische Protoplasten handelte. Mit Protoplasten die mit 50% PEG/CaCl<sub>2</sub>-Lösung bei -80 °C gelagert wurden, wurde kein positives Ergebnis erreicht, was darauf zurückzuführen ist, dass die Zellen ohne Zellwand beim Einfrieren besonders leicht beschädigt werden. Granada *et al.* (1997) beobachteten bereits bei Zellen, die mehrere Tage bei 4 °C gelagert wurden, geringere Transformationsraten.

Von 30 *C. cinerea* pYIG1 Klonen, die mittels PCR auf die Anwesenheit von *aao* untersucht wurden zeigten 15 ein positives Resultat (Abbildung 3.14). Das bedeutet, dass obwohl der Selektionsmarker sich auf einem anderen Plasmid befindet, ein beachtlicher Teil der Transformanden beide Plasmide aufnimmt und in das Genom integriert (Fincham 1989). Nicht alle positiv getesteten Klone haben die *aao* auch exprimiert und sekretiert. Von 12 getesteten Klonen in Flüssigkulturen konnte nur bei sieben Klonen AAO-Aktivität mittels Veratrylalkohol-Assay im Medium nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Klone gab es deutliche Unterschiede in der AAO-Aktivität. Während der Klon pYIG1 1-1-5 mit 91 U L<sup>-1</sup> am 5. Tag die höchste Aktivität aufwies, lag sie bei anderen Klonen teilweise unter 10 U L<sup>-1</sup> (Abbildung 3.15). Das lässt sich durch die ektopische Integration ins Genom erklären (Granado *et al.* 1997, Mellon und Casselton 1988). Wahrscheinlich integrierte sich das *aao*-Gen an unterschiedlichen Stellen ins Genom, wodurch die unterschiedliche Umgebung der *aao* und die damit verbundenen Unterschiede in der Lage der regulatorischen Sequenzen die Expression beeinflussten. Außerdem könnte die ektopische Integration die Expression anderer Gene beeinflusst haben, z. B. durch Unterbrechung und damit der Disfunktionalisierung einer Gensequenz (Kilaru *et al.* 2015). Klon 1-1-5 zeigte gegenüber der Kontrolle pCc1001 keine Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit, die theoretisch durch Genunterbrechungen entstanden haben könnten. Des Weiteren ist es bekannt, dass eine ektopische Integration in das Genom des Wirtes mehrmals erfolgen kann und durch eine erhöhte Kopienzahl der *aao*-Sequenz die Expression gesteigert werden könnte. Allerdings ist anders als bei einigen Ascomyceten der Zusammenhang zwischen Kopienzahl und Expressionsstärke bei *C. cinerea* nicht eindeutig erwiesen (Mellon und Casselton 1988).

#### **4.2.2. Kultivierung von *C. cinerea* für die optimale AAO Ausbeute**

Typisch für einen filamentösen Pilz bildete *C. cinerea* sowohl in Schüttelkolben als auch im Rührkesselfermenter mit der Zeit rundliche Pellets. Die genaue Form und Größe der Pellets

hängt generell von Faktoren wie der Schüttelgeschwindigkeit und den daraus entstehenden Scherkräften, der Zusammensetzung des Mediums, der Inokulationskonzentration und der Dauer der Kultivierung ab (Nielsen *et al.* 1995). Größe und Dichte der Pellets kann die Sauerstoffversorgung im Inneren der Pellets beeinflussen, was auch Auswirkungen auf die Produktion und Sekretion von Molekülen hat. Die Produktion von Proteinen und anderen Molekülen hängt bei filamentösen Pilzen deswegen nicht nur mit der Biomassekonzentration zusammen (Gehrig *et al.* 1998). Allerdings wurden in der Vergangenheit diesbezüglich unterschiedliche Beobachtungen gemacht. In einigen Fällen, wie z. B. der Produktion von Penicillin mit Hilfe von *Penicillium chrysogenum* (Nielsen *et al.* 1995) wurden keine Auswirkungen durch die Morphologie der Pellets beobachtet. Andere Studien wiederum zeigen eindeutig, dass die Pelletmorphologie bei vielen Prozessen eine Rolle spielt (Grimm *et al.* 2005, Papagianni 2004). Ganoderinsäure wurde z. B. stärker akkumuliert, wenn die Pellets von *G. lucidum* größer waren, und es zu einer Sauerstofflimitierung im Inneren kam (Fang und Zhong 2002). Ergothionein in *Lentinula edodes* wurde ebenfalls verstärkt produziert, wenn die Schüttelgeschwindigkeit niedriger war und die Pellets dadurch größer wurden (Tepwong *et al.* 2012). In beiden Fällen handelte es sich um Sekundärmetabolite. Bei der heterologen Produktion von Proteinen in einer kontinuierlichen Kultur von *A. niger* wurde beobachtet, dass stärker verzweigte Pellets mit ausreichender O<sub>2</sub>-Versorgung mehr Glucoamylase und Lysozym produzierten (Wongwicharn *et al.* 1999). Eine simple Korrelation zwischen Morphologie und Produktivität kann nicht hergeleitet werden, und muss in jedem einzelnen Fall durch Experimente unter verschiedenen Bedingungen und anschließende Vergleiche evaluiert werden (Grimm *et al.* 2005).

In der Kultivierung von *C. cinerea* pYIG1 1-1-5 wurden zwei Vollmedien und unterschiedliche Bedingungen getestet, um eine möglichst hohe AAO Produktion zu erreichen. Modifiziertes Kjalke-Medium hat verglichen zu YMG eine Glucosekonzentration von 20 statt 4 g L<sup>-1</sup> und eine Hefeextraktkonzentration von 10 statt 4 g L<sup>-1</sup>. So hat der Pilz auch ohne Malzextrakt eine viel größere Kohlenstoffquelle zur Verfügung. In Schüttelkolben wurden so wesentlich höhere AAO-Aktivitäten erreicht (bis zu 544 statt 91 U L<sup>-1</sup>). Bei der ersten Kultivierung im Bioreaktor (Abbildung 3.16) wurde YMG-Medium eingesetzt und mit einer vergleichsweise niedrigen Begasungsrate von max. 0,5 L min<sup>-1</sup> kultiviert. Der pH-Wert blieb die ersten vier Tage mit geringen Schwankungen bei einem pH-Wert von ca. 5, danach stieg er innerhalb von 24 h auf pH 7,8. Bei der zweiten Kultivierung wurde die Begasung so hoch wie möglich gehalten, um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten (bis zu 4,5 L min<sup>-1</sup>). Der limitierende Faktor war dabei die Schaumbildung im Medium. Vor allem zu Beginn der Fermentation bestand die Gefahr, dass durch eine zu starke Begasung das noch feine Myzel mit dem Schaum aus dem Medium ausgezogen wird, anstatt gleichmäßig verteilt zu werden. Der pH-Wert fing auch bei dieser Kultivierung nach vier Tagen an zu steigen, allerdings wesentlich

langsamer. Die Steigung des pH-Wertes während der Kultivierung wurde bereits bei anderen Basidiomyceten beobachtet (Dutton *et al.* 1993). Der Anstieg der AAO-Aktivität fiel zwischen Tag 4 und Tag 6 am höchsten aus (Abbildung 3.17). Durch die Nutzung eines reichhaltigeren Mediums konnte die Kultivierung acht Tage andauern, während die Enzymaktivität weiterhin kontinuierlich anstieg. Die höheren Begasungsraten im Fermenter lieferten allerdings keine höhere AAO-Konzentration, die sich nicht durch die Unterschiede zwischen YMG- und mod. Kjalke-Medium erklären ließe.

Neben der Kultivierung in Schüttelkolben und im Fermenter wurde auch die Kultivierung im akustischen Resonanzmischer (ARM) getestet. Anders als auf einem Orbitalschüttler werden dabei die Kulturen nicht durch kreiselnde Bewegungen, sondern durch Schwingungen vermischt. In Kombination mit speziellen Stopfen, die sich durch die Schwingungen ähnlich wie eine Harmonika zusammenfallen und ausdehnen, wird Luft in die Kolben gepumpt. Im ARM kann so eine verbesserte Sauerstoffversorgung der Kulturen erreicht werden. Die Experimente zeigten aber eine geringere AAO-Aktivität im Vergleich zu Schüttelkolben; die Biotrockenmasse entwickelte sich auch langsamer (3.2.7). Die Form des Myzels unterschied sich von der in Schüttelkolben erheblich. Statt gleichmäßiger, runder Pellets gab es eine Mischung aus kleineren Partikeln und Myzelklumpen unterschiedlicher Form und Größe. Im Laufe der Kultivierung kam es teilweise zur Bildung eines „Myzelkuchens“, der fast die gesamte Biomasse eines Kolbens darstellte. Bei höherer Leistung kam es ab 6 g vor, dass das Medium bis zum Kolbenhals hochspritzte, was dazu führte, dass das Myzel anfang auf der Innenseite des Stopfens zu wachsen. Wahrscheinlich kann die ARM-Technik ihr volles Potential eher bei der Kultivierung von einzelligen Organismen entfalten. Bisher gab es nur wenige Studien zur Kultivierung im ARM und diese befassten sich ausschließlich mit Bakterien (Reynoso-Cereceda *et al.* 2016, Reynoso-Cereceda *et al.* 2017). So war die Produktion von Alginat durch *Azotobacter vinelandii* am höchsten, wenn mit einer ARM-Frequenz von 20 g kultiviert wurde (Reynoso-Cereceda *et al.* 2017).

Ausgehend von einer spezifischen Aktivität der AAO von  $88 \text{ U mg}^{-1}$  betrug die AAO-Konzentration im Fermenter mit mod. Kjalke-Medium ca.  $4,3 \text{ mg L}^{-1}$ . *C. cinerea* wurde in Vergangenheit auch für die Produktion anderer rekombinanter Proteine verwendet. Die Ausbeute ist allerdings nicht in allen Studien angegeben, weil oft keine Reinigung der Proteine, sondern der Nachweis über die Enzymaktivität bzw. nur über den Nachweis der Sequenz im Genom erfolgte (Ogawa *et al.* 1998, Kikuchi *et al.* 2004, Muraguchi *et al.* 2011, Heneghan *et al.* 2009, Cheng *et al.* 2009). Die heterologe Expression des immunomodulatorischen Proteins FIP-gsi aus *Ganoderma sinense* in *C. cinerea* brachte 314 mg pro Kilogramm frisches Myzel. Da die Proteine intrazellulär vorlagen, ist mit dieser Arbeit kein direkter Vergleich der Ausbeuten möglich. Mit den Laccasen, Lcc6, Lcc7 und Lcc5 aus *C. cinerea*, die im selben Organismus rekombinant exprimiert wurden, wurden im mod. Kjalke-Medium viel höhere

Konzentrationen von 28, 27 und 115 mg L<sup>-1</sup> erreicht (Rühl 2009). Somit sind mehr Studien nötig, um die maximale mögliche Proteinausbeute bei heterologer Proteinexpression in *C. cinerea* zu ermitteln.

AAOs wurden bereits in verschiedenen Organismen heterolog exprimiert. In einer Studie wurde *E. coli* als Wirtsorganismus für die Expression von AAO aus *P. eryngii* verwendet. Allerdings erforderte dieses Verfahren auch nach der Optimierung eine mehrtägige Rückfaltung der *inclusion bodies* und große Mengen an Puffer, bevor mit der weiteren Reinigung von AAO begonnen werden konnte. Auf diese Weise konnten 45 mg rückgefaltete AAO pro Liter Kulturmedium gewonnen werden (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006). Der Vorteil der großen Ausbeute an AAO wurde dabei durch die fehlende Glykosylierung des Enzyms verringert. Die Autoren gehen davon aus, dass die mangelnde Glykosylierung die Thermostabilität des Enzyms negativ beeinflusst. Von Artes Biotechnology wurde ein Versuch unternommen, die AAO in der Hefe *Hansenula polymorpha* zu exprimieren. Die Hefe sollte das Enzym in größerer Menge mit posttranslationalen Modifikationen produzieren. Das Enzym wurde jedoch anders als vorgesehen nicht in das Kulturmedium sekretiert. Die niedrige intrazelluläre AAO-Aktivität von ca. 5 U L<sup>-1</sup> deutete darauf hin, dass es zu keiner korrekten Protein-Prozessierung kam (Lauber 2015). Pardo-Planas *et al.* (2017) erwähnen eine Studie in der *P. eryngii* AAO in *S. cerevisiae* exprimiert wurde. Auch da war das Ergebnis mit 1,5 U L<sup>-1</sup> bei 2 mg L<sup>-1</sup> Proteinkonzentration sehr gering. Es gab keinen Verweis auf die Studie, aber möglicherweise war damit die Arbeit von Viña-Gonzalez *et al.* (2015) gemeint, in der eine mutierte *P. eryngii* AAO in *S. cerevisiae* mit einer Konzentration von 2 mg L<sup>-1</sup> exprimiert wurde. Die Enzymaktivität wurde dort allerdings mit Anisalkohol anstatt mit Veratrylalkohol bestimmt.

Eine heterologe Expression von AAO aus *P. eryngii* im Ascomyceten *A. nidulans* führte zur Produktion einer AAO mit einem dem nativen Enzym vergleichbaren Molekulargewicht (Varela *et al.* 2001). Das lässt auf eine korrekte Glykosylierung des rekombinanten Enzyms in *A. nidulans* schließen. Die Enzymaktivität im Überstand des *A. nidulans* Transformanden war mit 400-500 U L<sup>-1</sup> ungefähr 10fach höher als in *P. eryngii*. In einer neueren Studie mit *A. nidulans*, der die AAO des Ascomyceten *Myceliophthora thermophila* heterolog exprimierte, wurde während der Kultivierung in einem Rieselbettreaktor eine Enzymaktivität von 440 U L<sup>-1</sup> erreicht (Pardo-Planas *et al.* 2017). Ein direkter Vergleich ist hier nicht möglich, weil in dem Enzymassay eine 5fach höhere Veratrylalkohol-Konzentration eingesetzt wurde und die Reaktion bei 50 °C ablief. Die gemessene Proteinkonzentration betrug 730 mg L<sup>-1</sup> und bezog sich auf die gesamte Proteinmenge im Überstand und nicht nur auf die AAO, wodurch auch kein Vergleich hinsichtlich der AAO-Ausbeute möglich ist (Pardo-Planas *et al.* 2017).

### 4.2.3. Reinigung der AAO

Die spezifische Aktivität lag am Ende der beiden Reinigungen von AAO bei  $88 \text{ U mg}^{-1}$  (Tabelle 3.3) bzw.  $80 \text{ U mg}^{-1}$  (Tabelle 3.5). Der Unterschied ist nicht sehr hoch und könnte durch die Schäden am Enzym hervorgerufen sein. Guillen *et al.* (1992) erreichten bei der Reinigung einer nativen AAO aus *P. eryngii* eine spezifische Aktivität von  $79,5 \text{ U mg}^{-1}$ . Dieser Wert entspricht somit ungefähr der spezifischen Aktivität der rekombinanten *P. sapidus* AAO in dieser Studie. Bei der heterologen Expression in *E. coli* (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006) wurde die *P. eryngii* AAO nach der Rückfaltung chromatographisch gereinigt. Das Ergebnis war eine etwas höhere spezifische Aktivität von  $96 \text{ U mg}^{-1}$  (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006). Bei der Reinigung der nativen AAO aus *P. pulmonarius* wurde eine noch höhere spezifische Aktivität von  $121,1 \text{ U mg}^{-1}$  erreicht (Varela *et al.* 2000). Bei AAO aus *P. ostreatus* war die spezifische Aktivität deutlich niedriger und lag zwischen  $41,5$  und  $63,6 \text{ U mg}^{-1}$  (Okamoto und Yanase 2002). Eine Alternative zur Chromatographie stellte die Drei-Phasen-Partitionierung dar (Kumar und Rapheal 2011). Diese Methode enthielt zwar viel weniger Arbeitsschritte als die in dieser Arbeit verwendete FPLC-Methode, aber damit wurde auch nur ein Reinigungsfaktor von  $10,2$  erreicht mit lediglich  $1,6 \text{ U mg}^{-1}$  spezifischer Aktivität der *P. ostreatus* AAO. Solche geringen Werte lassen auf eine unvollständige Reinigung oder auf eine Inaktivierung des Enzyms schließen. Die spezifische Aktivität von *P. sapidus* AAO aus dieser Studie war somit auf einem ähnlichen Niveau wie die spezifischen Aktivitäten von AAOs aus *P. eryngii* (sowohl nativ als auch rekombinant), niedriger als die spezifische Aktivität der nativen *P. pulmonarius* AAO und deutlich höher als die spezifische Aktivität der nativen AAO aus *P. ostreatus*. Kleinere Abweichungen könnten auch durch Unterschiede in Puffern bedingt sein.

Anhand des Western Blots konnte die Spezifität der *P. sapidus* AAO nachgewiesen werden, jedoch zeigte die SDS-PAGE (Abbildung 3.21A) neben den zu erwartenden Banden auch schwächere Banden geringerer Größe. Im nativen Gel sowie dem Western Blot gab es dagegen nur eine Bande, bzw. zwei nach einer Deglykosylierung durch PNGaseF (Abbildung 3.21B). Allerdings konnte es nicht ausgeschlossen werden, dass in der nativen PAGE mehrere Peptide mit unterschiedlichem Molekulargewicht nicht voneinander getrennt wurden. Um eine unreine Probe ausschließen zu können, wurden die Banden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Dabei wurde bestätigt, dass es sich bei allen Banden um AAO aus *P. sapidus* handelte (Tabelle 3.4). Die Peptidfragmente deckten dabei ca 44% der 593 AS langen AAO Sequenz ab. Bei kleineren Banden C und D wurden keine Fragmente aus dem C-terminalen Bereich der AAO detektiert, möglicherweise war dieser Bereich abgespalten. Die Bande E, die am weitesten im Gel wanderte und bei ca. 20 kDa lag enthielt Fragmente von beiden Enden des Proteins und einen (EGAPTTTTVCAKK) aus der Mitte. Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für das Auftreten mehrerer Banden in SDS-PAGE und nur



einer Bande im nativen Gel. Möglicherweise waren schwächere Banden im nativen Gel nicht sichtbar. Ein Abbau des Proteins durch Peptidasen würde das Fehlen von Peptiden aus dem Bereich von C-Terminus in einigen der Banden erklären. Allerdings würde es auch die AAO im nativen Gel treffen, vorausgesetzt die native PAGE ist in der Lage Abbauprodukte von AAO zu trennen. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass AAO vor SDS-PAGE nicht gleichmäßig denaturiert wurde und deswegen nicht gleichmäßig im Gel wanderte, was zu mehreren Banden führte. Die SDS-PAGE der AAO, die nach der zweiten Reinigung erhalten wurde (Tabelle 3.5), lieferte ein deutlich besseres Ergebnis und zeigte nur noch eine deutlich sichtbare Bande, bei ca. 73 kDa (Abbildung 3.23, 4. Tasche). Banden darunter sind anders als in den ersten drei Taschen nur noch vage zu erkennen, was eine effektive Reinigung bedeutet. Ein möglicher Grund sind weniger Abbauprodukte der AAO oder dass AAO besser denaturiert war und alle Proteine dadurch gleich schnell wanderten. Die hohe AAO-Konzentration führte auch dazu, dass die Probe vor der SDS-PAGE nicht aufkonzentriert werden musste, und so ein zusätzlicher Arbeitsschritt wegfiel.

Unter den massenspektrometrisch detektierten Peptidfragmenten war auch ein sieben AS langes Fragment des 27 AS langen Signalpeptids. Es handelte sich dabei um die native Sequenz aus *P. sapidus*. Das ist ein Unterschied zum nativen AAO in *P. eryngii*, wo das Signalpeptid abgetrennt wird (Varela *et al.* 1999). In einer Studie über die heterologe Expression von einer Laccase aus *P. ostreatus* in *C. cinerea* kamen die Autoren zur Schlussfolgerung, dass *C. cinerea* das fremde Signalpeptid aus *P. ostreatus* erkennt und schneidet (Muraguchi *et al.* 2011). Ein eindeutiger experimenteller Beweis liegt aber nicht vor. Da das Signalpeptid von AAO nur in 4 von 6 untersuchten Banden (A, B, C und E) detektiert wurde, ist es möglich, dass das Signalpeptid nur in einem kleinen Teil der exprimierten Enzyme ungeschnitten bleibt. Die Differenz zwischen AAO mit und ohne Signalpeptid würde etwas weniger als 3 kDa betragen, ein Unterschied der auf dem Gel kaum sichtbar wäre. Die spezifische Aktivität vom gereinigten AAO liegt in einem ähnlichen Bereich, wie bei den anderen nativen AAOs aus verwandten Pilzen, was dafür spricht, dass es sich um ein korrekt prozessiertes Protein handeln muss, oder dass das Signalpeptid kaum Auswirkungen auf die Aktivität hat.

Western Blot Analyse der nativen PAGE mit dem Antikörper gegen das *P. sapidus* AAO Epitop NQSFNLFDRSSEFNA ergab eine einzige sichtbare Bande (Abbildung 3.20). Das ist ein weiterer Beweis dafür, dass es sich bei den beobachteten Banden um AAO aus *P. sapidus* handelte. Die Banden in den ersten beiden Gelspuren waren nicht sichtbar, weil da die AAO Konzentration noch zu gering war. Ein Teil der Epitop-Sequenz (DSSEFNA) wurde im nativen Gel und allen anderen untersuchten Banden außer Bande E, mittels MS nachgewiesen.

Das Molekulargewicht von AAO lag mit 73 kDa in einem ähnlichen Bereich wie die nativen AAO verwandter Spezies *P. eryngii* und *P. ostreatus* (72,6 und 72 kDa) (Guillen *et al.* 1992, Okamoto und Yanase 2002). Bei *P. pulmonarius* zeigte die SDS-PAGE von AAO ein etwas kleineres MW vom 70,5 kDa an. Bei der heterologen Expression von *P. eryngii* AAO in *A. nidulans* kamen 72,5 kDa heraus (Varela *et al.* 2001). Diese kleinen Unterschiede können auch durch die Methode verursacht sein. Die geringere Höhe der Banden in der Probe die mit PNGase F behandelt wurden (Abbildung 3.21) bedeutet, dass die AAO glykosyliert vorlag. Das theoretische Molekulargewicht von AAO, berechnet basierend auf Aminosäuresequenz plus FAD, liegt bei 64 kDa und passt zu der Bande B, die bei ca. 65 kDa lag. Da die PNGase F nur N-Glykosylierung entfernt, kann zu O-Glykosylierung keine genaue Aussage getroffen werden, außer dass sie wahrscheinlich im viel geringeren Ausmaße vorkommt. Dafür spricht auch, dass die unglykosylierte AAO, die in *E. coli* exprimiert wurde, ein MW von 62 kDa hatte (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006). Die gemessenen 11% N-Glykosylierung liegen nah an den 14%, die mit dem gleichen Verfahren bei AAO von *P. pulmonarius* und *P. eryngii* ermittelt wurden (Varela *et al.* 2000, Varela *et al.* 2001). In einer Studie in der die Bestimmung des Molekulargewichts mittels MS erfolgte, und das MW der unglykosylierten AAO aus in *E. coli* mit der nativen AAO aus *P. eryngii* und der rekombinanten aus *A. nidulans* verglichen wurde, wurde eine Gesamtglykosylierung von 10,5% bzw. 11,4% festgestellt (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006). Diese Werte liegen ebenfalls sehr nahe an der in dieser Studie gemessenen N-Glykosylierung von 11%.

#### 4.2.4. Biochemische Eigenschaften von AAO

Die isoelektrische Fokussierung von AAO (Abbildung 3.24) ergab einen pI von 4,2. Die pI der nativen AAO aus *P. eryngii* und *P. pulmonarius* waren mit 3,8 (Varela *et al.* 2000) und 3,95 (Varela *et al.* 2001) etwas niedriger.

Das gereinigte Enzym konnte ohne große Aktivitätsverluste zwei Tage bei 4 °C gelagert werden (Abbildung 3.25). Bei 21 °C begann nach 24 h bereits eine Abnahme der Aktivität. Bei 37 °C war schon nach wenigen Stunden ein deutlicher Verlust an Aktivität zu sehen und eine Inkubation bei 50 °C zerstörte schon nach 20 min 85% der Aktivität (Abbildung 3.26 B). Im Vergleich zur AAO aus *P. eryngii*, die in *E. coli* und *A. nidulans* exprimiert wurde, zeigte die *P. sapidus* AAO keine verbesserte Hitzestabilität (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006). Das Temperaturoptimum für die *P. sapidus* AAO liegt hingegen bei 60 °C. Diese scheint aber durch die geringe Stabilität bei höheren Temperaturen für eine effiziente Nutzung der AAO nicht sinnvoll (Abbildung 3.26 B und C). Bei der nativen AAO aus *P. ostreatus* lag die optimale Temperatur für die Reaktion bei lediglich 40 °C (Kumar und Rapheal 2011) und der nativen

AAO aus *P. eryngii* bei 55 °C (Guillen *et al.* 1992). Bei der AAO aus *P. chrysosporium* lag das Temperaturoptimum bei 45 °C (Asada *et al.* 1994).

Das pH-Spektrum der *P. sapidus* AAO (Abbildung 3.26 A), in der eine Aktivität von mindestens 80% der maximalen Aktivität vorhanden war, war breiter als bei der rekombinanten *P. eryngii* AAO aus *E. coli*, wo bei einem pH-Wert von 3 nur noch 20% statt mehr als 80% der Aktivität vorhanden war (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006). Das Optimum lag mit pH 5 etwas niedriger als für die AAO aus *P. ostreatus* und *P. eryngii*, die einen optimalen pH-Wert bei 6 bzw. 6 bis 6,5 haben (Kumar und Rapheal 2011, Guillen *et al.* 1990). Die AAO aus *P. chrysosporium* reagierte am schnellsten im pH-Bereich von 6 bis 7 (Asada *et al.* 1994). Ein pH-Optimum im leicht sauren Bereich kann sich als vorteilhaft erweisen, wenn AAO zusammen mit Enzymen eingesetzt wird, dessen Optimum ebenfalls im sauren Bereich liegt, wie z. B. den DyP-Peroxidasen, deren pH Optimum zwischen pH 3 und 4,5 liegt (Liers *et al.* 2013).

Auch bei der Bestimmung der kinetischen Parameter der *P. sapidus* AAO zeigte sich eine starke Ähnlichkeit zu den anderen basidiomycetalen AAOs aus *P. eryngii* und *P. pulmonarius* (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Enzymkinetische Parameter des heterolog exprimierten AAO aus *P. sapidus* im Vergleich zu anderen natürlichen und rekombinanten *Pleurotus* AAO. Die Assay-Bedingungen waren bei allen Experimenten gleich.

	AAO aus <i>P.</i> <i>pulmonarius</i> <sup>a</sup>	AAO aus <i>P.</i> <i>eryngii</i> <sup>b</sup>	<i>P. eryngii</i> AAO exprimiert in <i>E. coli</i> nach Rückfaltung <sup>c</sup>	<i>P. eryngii</i> AAO exprimiert in <i>A. nidulans</i> <sup>c</sup>	<i>P. sapidus</i> AAO exprimiert in <i>E. coli</i> <sup>d</sup>	<i>P. sapidus</i> AAO exprimiert in <i>C. cinerea</i>
<b>Benzylalkohol</b>						
$K_m$ [μM]	n.b.	840	873	758	629	784
$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	n.b.	59	30	32	34	38
$k_{cat} K_m^{-1}$ [s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	n.b.	70	35	47	55	48
<b>Veratrylalkohol</b>						
$K_m$ [μM]	390	410	541	592	270	529
$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	30	143	99	119	98	70
$k_{cat} K_m^{-1}$ [s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	77	349	172	210	361	132
<b>p-Anisalkohol</b>						
$K_m$ [μM]	30	40	37	28	55	59
$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	48	239	134	149	124	203
$k_{cat} K_m^{-1}$ [s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	1615	5970	3870	5230	2808	3466

<sup>a</sup>Varela *et al.* (2000); <sup>b</sup>Guillen *et al.* (1992); <sup>c</sup>Ruiz-Dueñas *et al.* (2006); <sup>d</sup>Lauber (2015) n.b.: nicht bestimmt.

$K_M$ -Wert, Wechselzahl und die daraus berechnete katalytische Effizienz lagen für das jeweils getestete Substrat in einer ähnlichen Größenordnung, wobei die AAO aus *P. pulmonarius* die geringste katalytische Effizienz aufwies. Fast alle rekombinanten AAOs aus *P. eryngii* und die AAO aus *P. sapidus* in dieser Studie zeigten eine etwas geringere katalytische Effizienz als die native AAO aus *P. eryngii*. Die *P. sapidus* AAO, die in *E. coli* exprimiert wurde, war die effizienteste, wenn Veratrylalkohol als Substrat diente. Die AAOs aus anderen Pilzen zeigten teilweise ganz andere katalytische Eigenschaften. Die AAO aus *P. chrysosporium* setzte *p*-Anisalkohol mit der unter den getesteten Substraten geringsten Effizienz um (Asada *et al.* 1994). Bei der AAO aus *Bjerkandera adusta* lagen die  $K_M$ -Werte für Anisalkohol und Veratrylalkohol bei 0,24 und 1,5 mM (Muheim *et al.* 1990).

#### 4.2.5. Vergleich der Sequenzen von AAO

Anhand der Daten aus der DNA-Sequenzierung von *aao* wurde die dazugehörige Proteinsequenz hergeleitet und mit den AAO-Sequenzen verwandter Pilze verglichen (Abbildung 4.2).

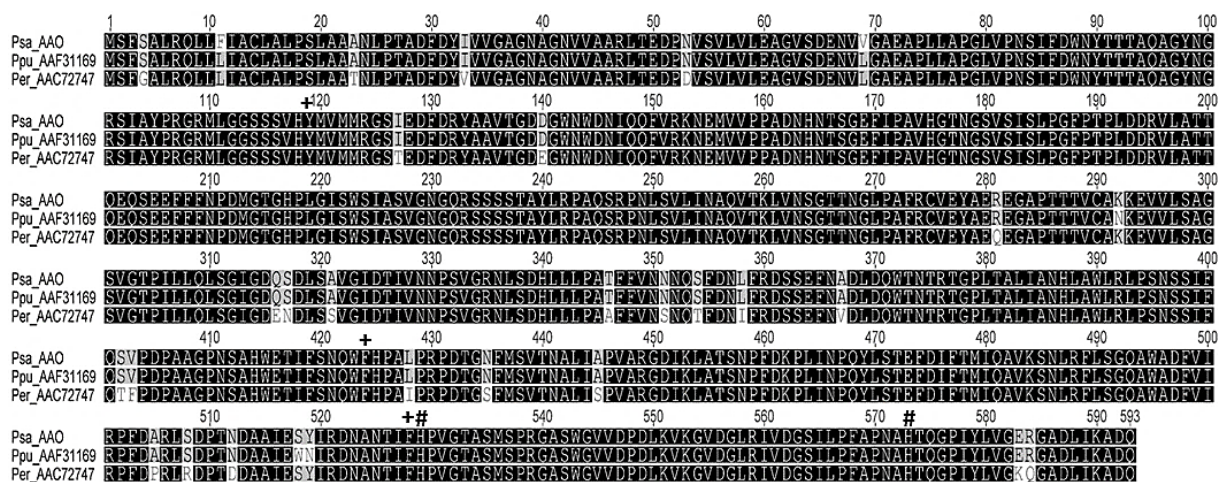


Abbildung 4.2: Vergleich der AAO Sequenzen von *P. sapidus* aus dieser Studie (Psa\_AAO), *P. pulmonarius* (Ppu) (Varela *et al.* 2000) und *P. eryngii* (Per) (Guillen *et al.* 1992). Die Sequenzen sind mit ihren 27 AS langen Signalpeptiden dargestellt. Die an der FAD-Bindung involvierten Histidinreste sind mit Rautezeichen (#) gekennzeichnet. Die aromatischen Aminosäuren, die den Substratkanal formen, sind mit einem Plus markiert (+).

Die Sequenzen waren sich sehr ähnlich, wodurch die vergleichbare Enzymkinetik erklärt werden kann. Die AAO in dieser Studie stimmt zu 99% mit der AAO aus *P. pulmonarius* und zu 95% mit der AAO aus *P. eryngii* überein. Obwohl die Sequenz von *P. sapidus* AAO mehr Ähnlichkeit mit *P. pulmonarius* AAO hatte, als mit *P. eryngii* AAO, gab es hinsichtlich

Enzymkinetik mehr Übereinstimmungen mit der *P. eryngii* AAO. In allen drei Enzymen kommt His529, das für die Redoxreaktion verantwortlich ist, sowie Tyr119, Phe424 und Phe528, die den Eingang zum aktiven Zentrum bilden und für die Substratspezifität des Enzyms sorgen (Fernández *et al.* 2009, Hernández-Ortega *et al.* 2012) vor. Die Reaktion selbst wurde bereits in der Literatur beschrieben und besteht aus zwei Teilreaktionen. Während der reduzierenden Halbreaktion wird das Substrat zum Aldehyd oxidiert, FAD zu FADH<sup>-</sup> reduziert und His529 protoniert. Danach folgt die oxidative Halbreaktion in der Phe528 molekularen Sauerstoff fixiert. O<sub>2</sub> wird dabei durch die Reoxidation von FADH<sup>-</sup> sowie die Aufnahme eines Protons von His529 zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziert (Fernández *et al.* 2009, Hernández-Ortega *et al.* 2012).

#### 4.2.6. Einsatz von AAO zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion für die DyP-Peroxidase

Bei dem Zwei-Enzym-Assay wurde eine DyP-Typ Peroxidase aus dem Pilz *Marasmius scorodonius* eingesetzt (Scheibner *et al.* 2008). Der Einsatz von AAO zur Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anstatt der direkten Zugabe vom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lieferte ein deutlich besseres Ergebnis. Obwohl im Assay mit direkter Zugabe stöchiometrisch genügend H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorhanden war, um RB5 komplett abzubauen, kam die Reaktion nach ca. 10 min zum Erliegen. Der Abbau von Reactive Blue 5 wurde dagegen im Zwei-Enzym-Assay auch noch nach zwei Stunden fortgesetzt. Der Grund dafür ist wahrscheinlich die Hemmung oder Inaktivierung der DyP durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Eine Hemmung wurde bereits bei der DyP aus *Thanatephorus cumcumeris* (neuer Name für *G. candidum*) beobachtet (Kim und Shoda 1999). In einer anderen Studie kam es zur Inaktivierung einer Meerrettichperoxidase durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hernandez-Ruiz *et al.* 2011). Deswegen würde auch eine Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im Assay keine Verbesserung im Abbau von Reactive Blue 5 bringen. Aufgrund der kontinuierlichen Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in niedriger Konzentration durch die AAO trat keine Inhibition auf. Eine alternative Lösung des Problems wäre die langsame Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in einer Menge die keine Inhibition verursachen würde. Peter *et al.* (2014) wandten diese Methode bei der Oxidation von Cyclohexan durch Peroxygenasen in einem Bioreaktor an. Dabei kamen sie zur Schlussfolgerung, dass die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Intervallen effizienter ist, als die kontinuierliche Zugabe. Dieses Verfahren erfordert allerdings eine permanente Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration für die richtige Dosierung und Zeitpunkt der Zugabe. In einer anderen Studie wurde mit der DyP aus *T. cumcumeris*, die in *Aspergillus oryzae* exprimiert wurde, verschiedene Versuche durchgeführt, mit dem Ziel einen möglichst optimalen Abbau des Farbstoffs Remazol Brilliant Blue R mittels DyP zu erreichen. Das effizienteste Verfahren bestand aus kontinuierlicher Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kombiniert mit einer schrittweisen Zugabe des Farbstoffs (Shakeri und Shoda 2007). Eine zunehmende Inaktivierung von DyP durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte aber auch hier nicht vermieden werden. Eine Coexpression von AAO und DyP im gleichen Organismus, könnte zu einer effizienten

Biotransformation von Farbstoffen im Kulturmedium führen. Der Vorteil dabei wäre, dass es dafür weder die Enzyme extrahiert, noch  $\text{H}_2\text{O}_2$  hinzugefügt werden müsste.

## 5. Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal das Transkriptom von *P. sapidus* erfolgreich sequenziert. Die *de novo* Assemblierung ergab zahlreiche Transkripte, die mit Hilfe von Datenbanken und des Genoms des verwandten Pilzes *P. ostreatus* identifiziert und funktionell charakterisiert bzw. annotiert wurden. Der Schwerpunkt lag dabei auf Genen, die eine Rolle im Ligninabbau spielen. Die Unterschiede in der Transkription dieser Gene an verschiedenen Tagen und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen wurde beschrieben und mittels RT-qPCR zusätzlich überprüft. Somit wurde in dieser Arbeit auch erstmalig entsprechende *housekeeping* Gene für *P. sapidus* verifiziert, um Transkripte mittels RT-qPCR zu analysieren. Eines der analysierten Gene (*aa0*) wurde in *C. cinerea* kloniert und dort heterolog exprimiert. *C. cinerea* erwies sich dabei als ein vielversprechender Wirtsorganismus für die Produktion rekombinanter Oxidasen anderer Basidiomyceten. Die rekombinante AAO wurde gereinigt und charakterisiert. Das Enzym wurde außerdem benutzt um eine Peroxidase in einem Zwei-Enzym-Assay mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu versorgen.

Die bei der RNA-Seq generierten Transkriptom-Daten können für weitere Studien verwendet werden. Da zurzeit kein sequenziertes Genom dieses Pilzes zur Verfügung steht, stellt das in dieser Arbeit sequenzierte und zum Teil annotierte Transkriptom die Grundlage für zukünftige Klonierungs- und Genexpressionsstudien mit *P. sapidus* dar. Sollte eine Genomsequenzierung durchgeführt werden, so können die mit Hilfe des Transkriptoms annotierten Contigs bzw. Gene bei der Assemblierung des Genoms verwendet werden (Song *et al.* 2016). Daneben kommt das Transkriptom bereits bei der Aufschlüsselung von Biosynthesewegen von Sekundärmetaboliten bei der Kultivierung von *P. sapidus* auf unterschiedlichen Substraten zum Einsatz. Diese Arbeit liefert somit einen wesentlichen Beitrag nicht nur zur Aufklärung des lignocellulolytischen Potentials von *P. sapidus*, sondern auch zu Forschungsarbeiten, die über das Ziel dieser Arbeit hinausgehen.

Die AAO könnte neben der möglichen Anwendung im Zwei-Enzym-Assay auch so wie andere Alkoholoxidasen als Biosensor für bestimmte Chemikalien genutzt werden (Goswami *et al.* 2013). Das Prinzip dahinter wäre die amperometrische Detektion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das bei der Umsetzung des entsprechenden Substrats durch AAO entstehen würde. Zu diesem Zweck wurde bereits gereinigtes Enzym an die Arbeitsgruppe von Prof. Marco Frasconi der Universität Padua geschickt.

Um eine höhere Proteinausbeute zu erreichen, könnten weitere Medien und Kultivierungsbedingungen für *C. cinerea* ausprobiert werden. Die Auswirkungen der Sauerstoffversorgung auf die Produktion von Enzymen könnten weiter untersucht werden.

In einer aktuellen Studie wird ein *C. cinerea* Promotor beschrieben, mit dem das Fluoreszenzprotein GFP 7-mal stärker exprimiert wurde als mit *gpdII* (Sugano *et al.* 2017). Möglicherweise würde er sich dafür eignen AAO oder andere Enzyme in noch größeren Mengen zu produzieren und somit *C. cinerea* als Produktionsplattform für rekombinante Enzyme weiter zu verbessern. Ein mögliches Enzym wäre die Glyoxaloxidase, die eine ähnliche Rolle wie die AAO spielt. Auch die AAO selbst könnte durch Mutagenese optimiert werden, dazu existieren bereits Studien mit der AAO aus *P. eryngii* (Viña-Gonzalez *et al.* 2015). Dadurch könnten z. B. höhere Aktivität oder Temperaturstabilität erreicht werden. Die DyP-Typ Peroxidase könnte in einem geeigneten Wirtsorganismus zusammen mit AAO coexprimiert und zum Abbau von Farbstoffen oder Lignocellulose verwendet werden.



## 6. Literaturverzeichnis

- Aditiya HB, Mahlia TMI, Chong WT, Nur H, Sebayang AH (2016) Second generation bioethanol production. A critical review. *Renew Sust Energy Rev* 66:631-653
- Alfaro M, Castanera R, Lavín JL, Grigoriev IV, Oguiza JA, Ramírez L, Pisabarro AG (2016) Comparative and transcriptional analysis of the predicted secretome in the lignocellulose-degrading basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Environ microbiol* 18:4710-4726
- Asada Y, Watanabe A, Ohtsu Y, Kuwahara M (1994) Purification and Characterization of an Aryl-alcohol Oxidase from the Lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biosci Biotech Biochem* 59:1339-1341
- Bekel T, Henckel K, Küster H, Meyer F, Mittard Runte V, Neuweger H, Paarmann D, Rupp O, Zakrzewski M, Pühler A, Stoye J, Goesmann A (2009) The Sequence Analysis and Management System -- SAMS-2.0: data management and sequence analysis adapted to changing requirements from traditional sanger sequencing to ultrafast sequencing technologies. *J. Biotechnol.* 140:3-12
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, Boutell JM, Bryant J, Carter RJ, Keira Cheetham R, Cox AJ, Ellis DJ, Flatbush MR, Gormley NA, Humphray SJ, Irving LJ, Karbelashvili MS, Kirk SM, Li H, Liu X, Maisinger KS, Murray LJ, Obradovic B, Ost T, Parkinson ML, Pratt MR, Rasolonjatovo IMJ, Reed MT, Rigatti R, Rodighiero C, Ross MT, Sabot A, Sankar SV, Scally A, Schroth GP, Smith ME, Smith VP, Spiridou A, Torrance PE, Tzonev SS, Vermaas EH, Walter K, Wu X, Zhang L, Alam MD, Anastasi C, Aniebo IC, Bailey DMD, Bancarz IR, Banerjee S, Barbour SG, Baybayan PA, Benoit VA, Benson KF, Bevis C, Black PJ, Boodhun A, Brennan JS, Bridgham JA, Brown RC, Brown AA, Buermann DH, Bundu AA, Burrows JC, Carter NP, Castillo N, Chiara E, Catenazzi M, Chang S, Neil Cooley R, Crake NR, Dada OO, Diakoumakos KD, Dominguez-Fernandez B, Earnshaw DJ, Egbujor UC, Elmore DW, Etchin SS, Ewan MR, Fedurco M, Fraser LJ, Fuentes Fajardo KV, Scott Furey W, George D, Gietzen KJ, Goddard CP, Golda GS, Granieri PA, Green DE, Gustafson DL, Hansen NF, Harnish K, Haudenschild CD, Heyer NI, Hims MM, Ho JT, Horgan AM, Hoschler K, Hurwitz S, Ivanov DV, Johnson MQ, James T, Huw Jones TA, Kang G-D, Kerelska TH, Kersey AD, Khrebtukova I, Kindwall AP, Kingsbury Z, Kokko-Gonzales PI, Kumar A, Laurent MA, Lawley CT, Lee SE, Lee X, Liao AK, Loch JA, Lok M, Luo S, Mammen RM, Martin JW, McCauley PG, McNitt P, Mehta P, Moon KW, Mullens JW, Newington T, Ning Z, Ling Ng B, Novo SM, O'Neill MJ, Osborne MA, Osnowski A, Ostadan O, Paraschos LL, Pickering L, Pike AC, Pike AC, Chris Pinkard D, Pliskin DP, Podhasky J, Quijano VJ, Raczy C, Rae VH, Rawlings SR, Chiva Rodriguez A, Roe PM, Rogers J, Rogert Bacigalupo MC, Romanov N, Romieu A, Roth RK, Rourke NJ, Ruediger ST, Rusman E, Sanches-Kuiper RM, Schenker MR, Seoane JM, Shaw RJ, Shiver MK, Short SW, Sizto NL, Sluis JP, Smith MA, Ernest Sohna Sohna J,

- Spence EJ, Stevens K, Sutton N, Szajkowski L, Tregidgo CL, Turcatti G, Vandevondele S, Verhovsky Y, Virk SM, Wakelin S, Walcott GC, Wang J, Worsley GJ, Yan J, Yau L, Zuerlein M, Rogers J, Mullikin JC, Hurles ME, McCooke NJ, West JS, Oaks FL, Lundberg PL, Klenerman D, Durbin R, Smith AJ (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456:53-59
- Binninger DM, Skrzynia C, Pukkila PJ, Casselton LA (1987) DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *EMBO J* 1987:835-840
- Blackwell M (2011) The fungi. 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* 98:426-438
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114-2120
- Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Schneider M, Bairoch A (2007) UniProtKB/Swiss-Prot. *Methods Mol Biol* 406:89-112
- Buranov AU, Mazza G (2008) Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind Crops Prod* 28:237-259
- Burns C, Gregory KE, Kirby M, Cheung MK, Riquelme M, Elliott TJ, Challen MP, Bailey A, Foster GD (2005) Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns. *Fungal Genet Biol* 42:191-199
- Busse N, Czermak P (2016) Role and Application of Versatile Peroxidase (VP) for Utilizing Lignocellulose in Biorefineries. In: Gupta, V (Hrsg.), *Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass - Biofuel and Biorefinery Technologies Bd. 3*. Springer International Publishing, S. 271-300
- Camarero S, Böckle B, Martínez MJ, Martínez AT (1996) Manganese mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Appl Environ Microbiol* 62:1070-1072
- Castanera R, Perez G, Omarini A, Alfaro M, Pisabarro AG, Faraco V, Amore A, Ramirez L (2012) Transcriptional and Enzymatic Profiling of *Pleurotus ostreatus* Laccase Genes in Submerged and Solid-State Fermentation Cultures. *Appl Environ Microbiol* 78:4037-4045
- Castanera R, Omarini A, Santoyo F, Pérez G, Pisabarro AG, Ramírez L (2013) Non-additive transcriptional profiles underlie dikaryotic superiority in *Pleurotus ostreatus* laccase activity. *PLoS ONE* 8(9): e73282
- Castanera R, Lopez-Varas L, Pisabarro AG, Ramirez L (2015) Validation of Reference Genes for Transcriptional Analyses in *Pleurotus ostreatus* by Using Reverse Transcription-Quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 81:4120-4129
- Cheng S, Yang P, Guo L, Lin J, Lou N (2009) Expression of multi-functional cellulase gene *mfc* in *Coprinus cinereus* under control of different basidiomycete promoters. *Bioresour Technol* 100:4475-4480
- Christian V, Shrivastava R, Shukla D, Modi H, Rajiv B, Vyas M (2005) Mediator role of veratryl alcohol in the lignin peroxidase-catalyzed oxidative decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Enzyme Microb Technol* 36:426-431

- Coconi-Linares N, Ortiz-Vázquez E, Fernández F, Loske AM, Gómez-Lim MA (2015) Recombinant expression of four oxidoreductases in *Phanerochaete chrysosporium* improves degradation of phenolic and non-phenolic substrates. *J Biotech* 209:76-84
- Cristino AS, Tanaka ED, Rubio M, Piulachs M-D, Belles X (2011) Deep sequencing of organ- and stage-specific microRNAs in the evolutionarily basal insect *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *PLoS ONE* 6(4): e19350
- Daniel G, Volc J, Filonova L, Plíhal O, Kubátová E, Halada P (2007) Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brown rot decay of wood. *Appl Environ Microbiol* 73:6241-6253
- Dashtban M, Schraft H, Qin W (2009) Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *Int J Biol Sci* 5:578-595
- Dörnte B, Kües, U (2012) Reliability in Transformation of the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Curr Trends Biotechnol Pharm* 6:340-355
- Dutton MV, Evans CS, Atkey PT, Wood DA (1993) Oxalate production by Basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:5-10
- Erjavec J, Kos J, Ravnikar M, Dre, T, Sabotic J (2012) Proteins of higher fungi – from forest to application. *Trends Biotechnol* 30:259-273
- Fang QH, Zhong JJ (2002) Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol Progr* 18:51-54
- Fang Z, Cui X (2011) Design and validation issues in RNA-seq experiments. *Brief Bioinform* 12(3):280-287
- Feldman D, Kowbel DJ, Glass NL, Yarden O, Hadar Y (2015) Detoxification of 5-hydroxymethylfurfural by the *Pleurotus ostreatus* lignolytic enzymes aryl alcohol oxidase and dehydrogenase. *Biotechnol Biofuels* 8:63
- Fernández IS, Ruíz-Dueñas FJ, Santillana E, Ferreira P, Martínez MJ, Martínez AT, Romero A (2009) Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65:1196-1205
- Fernández-Fueyo E, Castanera R, Ruiz-Dueñas FJ, López-Lucendo MF, Ramírez L, Pisabarro AG, Martínez AT (2014a) Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. *Fungal Genet Biol* 72:150–161
- Fernández-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Romero A, Hammel KE, Medrano FJ, Martínez AT (2014b) Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnol Biofuels* 2014:2-23

- Fernandez-Fueyo E, Linde D, Almendral D, Lopez-Lucendo MF, Ruiz-Duenas FJ, Martinez AT (2015) Description of the first fungal dye-decolorizing peroxidase oxidizing manganese(II). *Appl Microbiol Biotechnol* 99:8927-8942
- Ferreira P, Carro J, Serrano A, Martínez AT (2015) A survey of genes encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing GMC oxidoreductases in 10 Polyporales genomes. *Mycologia* 107:1105-1119
- Ferreira P, Medina M, Guillén F, Martínez MJ, van Berkel WJH, Martínez (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem J* 389:731-738
- Fincham JR (1989) Transformation in fungi. *Microbiol Rev* 53:148-170
- Fraatz MA, Riemer SJL, Stöber R, Kaspera R, Nimitz M, Berger RG, Zorn H (2009) A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *J Mol Catal B: Enzym* 61:202-207
- Franz G (1989) Polysaccharides in Pharmacy: Current Applications and Future Concepts. *Planta Med* 55(6):493-497
- Gehrig I, Bart H-J, Anke T, Germerdonk R (1998) Influence of morphology and rheology on the production characteristics of the basidiomycete *Cyathus striatus*. *Biotechnol. Bioeng.* 59:525-533
- Goswami P, Chinnadayala, SSR, Chakraborty M, Kumar AK, Kakoti A (2013) An overview on alcohol oxidases and their potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4259-4275
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, Di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29:644-652
- Granado JD, Kertesz-Chaloupková K, Aebi M, Kües U (1997) Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. *Mol Gen Genet* 256:28-36
- Grimm LH, Kelly S, Krull R, Hempel DC (2005) Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:375-384
- Guettler S, Jackson EN, Lucchese SA, Honaas L, Green A, Hittinger CT, Tian Y, Lilly WW, Gathman AC (2003) ESTs from the basidiomycete *Schizophyllum commune* grown on nitrogen-replete and nitrogen-limited media. *Fungal Genet Biol* 39:191-198
- Guillen F, Martinez AT, Martinez MH (1990) Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:465-469
- Guillen F, Martinez AT, Martinez MJ (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 209:603-611
- Gupta R, Mehta G, Deswal D, Sharma S, Jain K, Kuhad R, Singh A (2013) Cellulases and their biotechnological applications. In: Kuhad RC, Singh A (Hrsg.) *Biotechnology for environmental management and resource recovery*. Springer India, S. 89-106

- Hachmann A (2015) Wer wie sequenziert. *Nachrichten aus der Chemie* 63:42–43
- Han F, Liu Y, Guo LQ, Zeng XL, Liu ZM, Lin JF (2010) Heterologous expression of the immunomodulatory protein gene from *Ganoderma sinense* in the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *J Appl Microbiol* 109:1838-1844
- Heneghan MN, Porta C, Zhang C, Burton KS, Challen MP, Bailey AM, Foster GD (2009) Characterization of serine proteinase expression in *Agaricus bisporus* and *Coprinopsis cinerea* by using green fluorescent protein and the *A. bisporus* SPR1 promoter. *Appl Environ Microbiol* 75:792-801
- Hernández-Ortega A, Ferreira P, Martínez AT (2012) Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1395-1410
- Hernandez-Ruiz J, Arnao MB, Hiner ANP, Garcia-Canovas F, Acosta M (2001) Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochem J* 354:107-114
- 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
- Joh J-H, Lee S-H, Lee J-S, Kim K-H, Jeong S-J, Youn W-H, Kim N-K, Son E-S, Cho Y-S, Yoo Y-B, Lee C-S, Kim B-G (2007) Isolation of genes expressed during the developmental stages of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, using expressed sequence tags. *FEMS Microbiol Lett* 276:19-25
- Kavanagh F, Hervey A, Robbins W J (1951) Antibiotic substances from basidiomycetes: VIII. *Pleurotus multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus passeckerianus* pilat. *Proc Natl Acad Sci USA* 37:570-574
- Kersten PJ, Kirk TK (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 169:2195-2201
- Kersten PJ (1990) Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*; its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2936-2940
- Kikuchi M, Kitamoto N, Shishido K (2004) Secretory production of *Aspergillus oryzae* xylanase XynF1, *xynF1* cDNA product, in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:728-733
- Kilaru S, Hoegger PJ, Majcherczyk A, Burns C, Shishido K, Bailey A, Foster GD, Kües U (2006) Expression of laccase gene *lcc1* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:200-210
- Kilaru S, Schuster M, Latz M, Das Gupta S, Steinberg N, Fones H, Gurr SJ, Talbot NJ, Steinberg G (2015) A gene locus for targeted ectopic gene integration in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genet Biol* 79:118-124

- Kim, SJ, Shoda, M (1999) Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Appl Environ Microbiol* 65:1029-1035
- Korripally P, Hunt CG, Houtman CJ, Jones DC, Kitin PJ, Cullen D, Hammel KE (2015) Regulation of Gene Expression during the Onset of Lignolytic Oxidation by *Phanerochaete chrysosporium* on Spruce Wood. *Appl Environ Microbiol* 81:7802–7812
- Kjalke M, Andersen MB, Schneider P, Christensen B, Schüle M, Welinder KG (1992) Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Arthromyces ramosus*. *Biochim Biophys Acta* 1120:248-256
- Kües U (2000) Life History and Developmental Processes in the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:316-353
- Kumar AK, Goswami P (2006) Functional characterization of alcohol oxidases from *Aspergillus terreus* MTCC 6324. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:906-911
- Kumar VV, Rapheal VS (2011) Induction and Purification by Three-Phase Partitioning of Aryl Alcohol Oxidase (AAO) from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Biochem Biotechnol* 163:423-432
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 1(3):R25
- Lauber C (2015) Molekulare Charakterisierung lignocellulolytischer Enzyme aus dem Sekretom von *Pleurotus sapidus*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B (2013) Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol Biofuels* 6:41
- Levasseur A, Lomascolo A, Chabro IO, Ruiz-Dueñas FJ, Boukhris-Uzan E, Piumi F, Kües U, Ram AFJ, Murat C, Haon M, Benoit I, Arfi Y, Chevret D, Drula E, Kwon MJ, Gouret P, Lesage-Meessen L, Lombard V, Mariette J, Noirot C, Park J, Patyshakuliyeva A, Sigoillot JC, Wiebenga A, Wösten HAB, Martin F, Coutinho PM, de Vries RP, Martínez AT, Klopp C, Pontarotti P, Henrissat B, Record E. (2014) The genome of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: a basidiomycete model with a versatile arsenal for lignocellulosic biomass breakdown. *BMC Genomics*15:486.
- Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinforma Oxf Engl* 22:1658-1659.
- Li B, Dewey CN, (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12:323.
- 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, Worrlich A, Zorn H, Steffen KT, Hofrichter M, Ullrich R (2013) 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, Ruiz-Dueñas FJ, Fernández-Fueyo E, Guallar V, Hammel KE, Pogni R, Martínez AT (2015) Basidiomycete DyPs. Genomic diversity, structural-functional aspects, reaction mechanism and environmental significance. *Arch Biochem Biophys* 574:66-74
- Linke D, Bouws H, Peters T, Nimtze M, Berger RG, Zorn H (2005) Laccases of *Pleurotus sapidus*. Characterization and cloning. *J Agr Food Chem* 53:9498–9505
- Linke D, Matthes R, Nimtze M, Zorn H, Bunzel M, Berger RG (2013) An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:7241-7251
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J (2000) Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* 38:471
- Liu D, Gong J, Dai W, Kang X, Huang Z, Zhang H-M, Liu W, Le Liu, Ma J, Xia Z, Chen Y, Chen Y, Wang D, Ni P, Guo A-Y, Xiong X (2012) The genome of *Ganoderma lucidum* provides insights into triterpenes biosynthesis and wood degradation corrected. *PLoS ONE* 7(5): e36146
- MacDonald J, Doering M, Canam T, Gong Y, Guttman DS, Campbell MM, Master ER (2011) Transcriptomic Responses of the Softwood-Degrading White-Rot Fungus *Phanerochaete carnosae* during Growth on Coniferous and Deciduous Wood. *Appl Environ Microbiol.* 77:3211-3218
- McIlvaine TC (1921) A buffer solution for colorimetric comparison, *J Biol Chem* 49:183-186
- Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río, JC (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Intl Microbiol* 8:195-204
- Mellon FM, Casselton LA (1988) Transformation as a method of increasing gene copy number and gene expression in the basidiomycete fungus *Coprinus cinereus*. *Curr Genet* 14:451-456
- Morozova OV, Shumakovich GP, Shleev SV, Yaropolov YI (2007) Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl Biochem Microbiol* 43:523–535
- Muraguchi H, Kondoh M, Ito Y, Yanagi SO (2011) Molecular breeding of a novel *Coprinopsis cinerea* strain possessing a heterologous laccase gene, lccK, driven by a constitutive promoter. *Mycoscience* 52:431-435
- Muheim A, Waldner R, Leisola MSA, Fiechter A (1990) An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microb Technol* 12:204-209
- Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK (2010) Production of first and second generation biofuels. A comprehensive review. *Renew Sust Energ Rev* 14:578-597

- Nielsen J, Johansen CL, Jacobsen M, Krabben P, Villadsen J (1995) Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. *Biotechnol Prog* 11:93-98
- Nigam PS, Singh A (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog Energy Combust Sci* 37:52-68
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 27(1):29-34
- Ogawa K, Yamazaki T, Kajiwara S, Watanabe A, Asada Y, Shishido K. (1998) Molecular breeding of the basidiomycete *Coprinus cinereus* strains with high lignin-decolorization and-degradation activities using novel heterologous protein expression vectors. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:285-289
- Oghenekaro AO, Raffaello T, Kovalchuk A, Asiegbu FO (2016) *De novo* transcriptomic assembly and profiling of *Rigidoporus microporus* during saprotrophic growth on rubber wood. *BMC genomics* 17:234
- Okamoto K, Yanase H (2002) Aryl alcohol oxidases from the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* 43:391-395
- Osma JF, Toca-Herrera JL, Rodríguez-Couto S (2010) Uses of laccases in the food industry. *Enzyme Res* 2010:918761
- Papagianni M (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* 22:189-259
- Pardo-Planas O, Prade RA, Müller M, Atiyeh HK, Wilkins MR (2017) Prevention of melanin formation during aryl alcohol oxidase production under growth-limited conditions using an *Aspergillus nidulans* cell factory. *Bioresour Technol* 243:874-882
- Perez-Boada M, Ruiz-Duenas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martinez MJ, Piontek K, Martinez AT (2005) Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J Mol Biol* 354:385-402
- Peter S, Karich A, Ullrich R, Gröbe G, Scheibner K, Hofrichter M (2014) Enzymatic one-pot conversion of cyclohexane into cyclohexanone. Comparison of four fungal peroxygenases. *J Mol Catal B: Enzym* 103:47-51
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): 2002-2007
- Ramírez L, Oguiza JA, Pérez G, Lavín JL, Omarini A, Santoyo F, Alfaro M, Castanera R, Parenti A, Muguerza E, Pisabarro A (2011) Genomics and transcriptomics characterization of genes expressed during postharvest at 4°C by the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Int Microbiol* 14:111-120
- Rao PS, Niederpruem DJ (1969) Carbohydrate Metabolism during morphogenesis of *Coprinus lagopus* (*sensu* Buller). *J. Bacteriol.* 100(3):1222-1228



- Reynoso-Cereceda GI, Garcia-Cabrera RI, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldán MA (2016) Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing. Mass transfer coefficient  $k_L a$  characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. *Biochem Eng J* 105:379-390
- Reynoso-Cereceda GI, Córdova-Aguilar MS, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldán MA (2017) Shaken flasks by resonant acoustic mixing in the biosynthesis of alginate by *Azotobacter vinelandii* with non-Newtonian rheological characteristics. *J Chem Technol Biotechnol* 48:510
- Riley R, Salamov AA, Brown DW, Nagy LG, Floudas D, Held BW, Levasseur A, Lombard V, Morin E, Otilar R, Lindquist EA, Sun H, LaButti KM, Schmutz J, Jabbour D, Luo H, Baker SE, Pisabarro AG, Walton JD, Blanchette RA, Henrissat B, Martin F, Cullen D, Hibbett DS, Grigoriev IV (2014) Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:9923-9928
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139-140
- Robledo D, Hernandez-Urcera J, Cal RM, Pardo BG, Sanchez L, Martinez P, Vinas A (2014) Analysis of qPCR reference gene stability determination methods and a practical approach for efficiency calculation on a turbot (*Scophthalmus maximus*) gonad dataset. *BMC Genomics* 15:648
- Rodríguez Couto S, Toca Herrera, JL (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24:500-513
- Rohr CO, Levin LN, Mentaberry AN, Wirth SA (2013) A first insight into *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126 transcriptome. *PLoS ONE* 8(12): e81033
- Rühl M (2009) Laccases and other ligninolytic enzymes of the basidiomycetes *Coprinopsis cinerea* and *Pleurotus ostreatus*. Dissertation, Universität Göttingen
- Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Martínez MJ, Martínez AT (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique  $H_2O_2$ -producing enzyme. *Protein Expr Purif* 45:191-199
- Salame TM, Knop D, Levinson D, Yarden O, Hadar Y (2013) Redundancy among manganese peroxidases in *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environl Microbiol* 79:2405-2415
- Sánchez C (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Adv* 27:185-194
- Scheibner M, Hülsdau B, Zelena K, Nimitz M, Boer L, Berger RG, Zorn H (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodonius* degrade  $\beta$ -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1241-1250.

- Schulz MH, Zerbino DR, Vingron M, Birney E (2012) Oases: robust *de novo* RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinforma Oxf Engl* 28, 1086-1092
- Schüttmann I (2011) Sekretomanalyse von *Pleurotus sapidus* zum effizienten Aufschluss von Lignocellulosen. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Schüttmann I, Bouws H, Szweda RT, Suckow M, Czermak P, Zorn H (2014) Induction, characterization, and heterologous expression of a carotenoid degrading versatile peroxidase from *Pleurotus sapidus*. *J Mol Catal B: Enzym* 103:79–84
- Shakeri M, Shoda M (2007) Change in turnover capacity of crude recombinant dye-decolorizing peroxidase (rDyP) in batch and fed-batch decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:919–926
- Shrivastava R, Christian V, Vyas BRM (2005) Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes. *Enzyme Microb Technol* 36:333-337
- Shu S, Chen B, Zhou M, Zhao X, Xia H, Wang M (2013) *De Novo* Sequencing and Transcriptome Analysis of *Wolfiporia cocos* to Reveal Genes Related to Biosynthesis of Triterpenoids. *PLoS ONE* 8(8): e71350
- Sims D, Sudbery I, Illott NE, Heger A, Ponting CP (2014) Sequencing depth and coverage. Key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet* 15:121-132
- Sista Kameshwar AK, Qin W (2017) Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. *Mycology* 60:1-13
- Song L, Shankar DS, Florea L (2016) Rascaf. Improving Genome Assembly with RNA Sequencing Data. *Plant Genome* 9(3):1-12
- Stajich JE, Wilke SK, Ahrén D, Au CH, Birren BW, Borodovsky M, Burns C, Canbäck B, Casselton LA, Cheng CK, Deng J, Dietrich FS, Fargo DC, Farman ML, Gathman AC, Goldberg J, Guigó R, Hoegger PJ, Hooker JB, Huggins A, James TY, Kamada T, Kilaru S, Kodira C, Kües U, Kupfer D, Kwan HS, Lomsadze A, Li W, Lilly WW, Ma L-J, Mackey AJ, Manning G, Martin F, Muraguchi H, Natvig DO, Palmerini H, Ramesh MA, Rehmeier CJ, Roe BA, Shenoy N, Stanke M, Ter-Hovhannisyanyan V, Tunlid A, Velagapudi R, Vision TJ, Zeng Q, Zolan ME, Pukkila PJ (2010) Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proc Natl Acad Sci USA* 107:11889-11894
- Strickler SR, Bombarely A, Mueller LA (2012) Designing a transcriptome next-generation sequencing project for a nonmodel plant species. *Am J Bot* 99(2):257-266
- Sugano Y (2009) DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell Mol Life Sci* 66:1387-1403
- Sugano Y, Matsushima Y, Tsuchiya K, Aoki H, Hirai M, Shoda M (2009) Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Biodegradation* 20:433-440

- Sugano SS, Suzuki H, Shimokita E, Chiba H, Noji S, Osakabe Y, Osakabe K (2017) Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, optimized by a high-throughput transformation system. *Sci Rep* 7(1):1260
- Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* 83:1-11
- Takano M, Nakamura M, Yamaguchi M (2010) Glyoxal oxidase supplies hydrogen peroxide at hyphal tips and on hyphal wall to manganese peroxidase of white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694. *J Wood Sci* 56:307-313
- Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, Krylov DM, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, Rao BS, Smirnov S, Sverdlov AV, Vasudevan S, Wolf YI, Yin JJ, Natale DA (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinform* 4:41
- Tepwong P, Giri A, Ohshima T (2012) Effect of mycelial morphology on ergothioneine production during liquid fermentation of *Lentinula edodes*. *Mycoscience* 53:102-112
- van Kuijk SJA, Sonnenberg ASM, Baars JJP, Hendriks WH, Cone JW (2015) Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. *Biotechnol Adv* 33:191-202.
- Vanden Wymelenberg A, Gaskell J, Mozuch M, Kersten P, Sabat G, Martinez D, Cullen D (2009) Transcriptome and secretome analyses of *Phanerochaete chrysosporium* reveal complex patterns of gene expression. *Appl Environ Microbiol* 75:4058-4068
- Vanden Wymelenberg A, Gaskell J, Mozuch M, Sabat G, Ralph J, Skyba O, Mansfield SD, Blanchette RA, Martinez D, Grigoriev I, Kersten PJ, Cullen D (2010) Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 76:3599-3610
- Varela E, Martínez AT, Martínez MJ (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from the fungus *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem J* 341:113-117
- Varela E, Böckle B, Romero A, Martínez AT, Martínez MJ (2000) Biochemical characterization, cDNA cloning and protein crystallization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus pulmonarius*. *Biochim Biophys Acta* 1476:129-138.
- Varela E, Guillen A, Martinez AT, Martinez MJ (2001) Expression of *Pleurotus eryngii* aryl alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1546:107-113
- Viña-Gonzalez J, Gonzalez-Perez D, Ferreira P, Martinez AT, Alcalde M (2015) Focused Directed Evolution of Aryl-Alcohol Oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* by Using Chimeric Signal Peptides. *Appl Environ Microbiol* 81:6451-6462
- Waldschmidt S (2017) Auswirkung der Akustischen Resonanzmischtechnik (ARM) auf die Morphologie filamentöser Pilze. Bachelorarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen

- Wang J, Suzuki T, Dohra H, Takigami S, Kako H, Soga A, Kamei I, Mori T, Kawagishi H, Hirai H (2016) Analysis of ethanol fermentation mechanism of ethanol producing white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60 by RNA-seq. *BMC Genomics* 17:616
- Wang M, Gu B, Huang J, Jiang S, Chen Y, Yin Y, Pan Y, Yu G, Li Y, Wong BHC, Liang Y, Sun H (2013) Transcriptome and proteome exploration to provide a resource for the study of *Agrocybe aegerita*. *PLoS ONE* 8(2): e56686
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57-63
- Ward JA, Ponnala L, Weber CA (2012) Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *Am J Bot* 99:267-276
- Wong CM, Wong KH, Chen XD (2008) Glucose oxidase. Natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiol Biotechnol* 78:927-938
- Wongwicharn A, McNeil B, Harvey LM (1999) Heterologous protein secretion and fungal morphology in chemostat cultures of a recombinant *Aspergillus niger* (B1-DEnzyme Microb Technol 24:489-497
- Yang F, Xu B, Zhao S, Li J, Yang Y, Tang X, Wang F, Peng M, Huang Z (2012) *De novo* sequencing and analysis of the termite mushroom (*Termitomyces albuminosus*) transcriptome to discover putative genes involved in bioactive component biosynthesis. *J Biosci Bioeng* 114:228-231
- Yang R-H, Li Y, Wang Y, Wan J-N, Zhou C-L, Gao Y-N, Mao W-J, Tang L-H, Gong M, Wu Y-Y, Bao D-P (2016) The genome of *Pleurotus eryngii* provides insights into the mechanisms of wood decay. *J Biotechnol* 239:65-67
- Yu, G.J., Wang, M., Huang, J., Yin, Y.L., Chen, Y.J., et al. (2012) Deep Insight into the *Ganoderma lucidum* by Comprehensive Analysis of Its Transcriptome. *PLoS ONE* 7(8): e44031
- Zhang S, Hu B, Wei W, Xiong Y, Zhu W, Peng F, Yu Y, Zheng Y, Chen P (2016) *De Novo* Analysis of *Wolfiporia cocos* Transcriptome to Reveal the Differentially Expressed Carbohydrate-Active Enzymes (CAZymes) Genes During the Early Stage of Sclerotial Growth. *Front Microbiol* 7:83
- Zhong M, Liu B, Wang X, Liu L, Lun Y, Li X, Ning A, Cao J, Huang M (2013) *De novo* characterization of *Lentinula edodes* C<sub>91-3</sub> transcriptome by deep Solexa sequencing. *Biochemical and biophysical research communications* 431:111-115
- Zorn H, Peters T, Nimtz M, Berger RG (2005) The secretome of *Pleurotus sapidus*. *Proteomics* 5:4832-4838

## 7. Anhang

### 7.1 Plasmidkarte von pYIG1

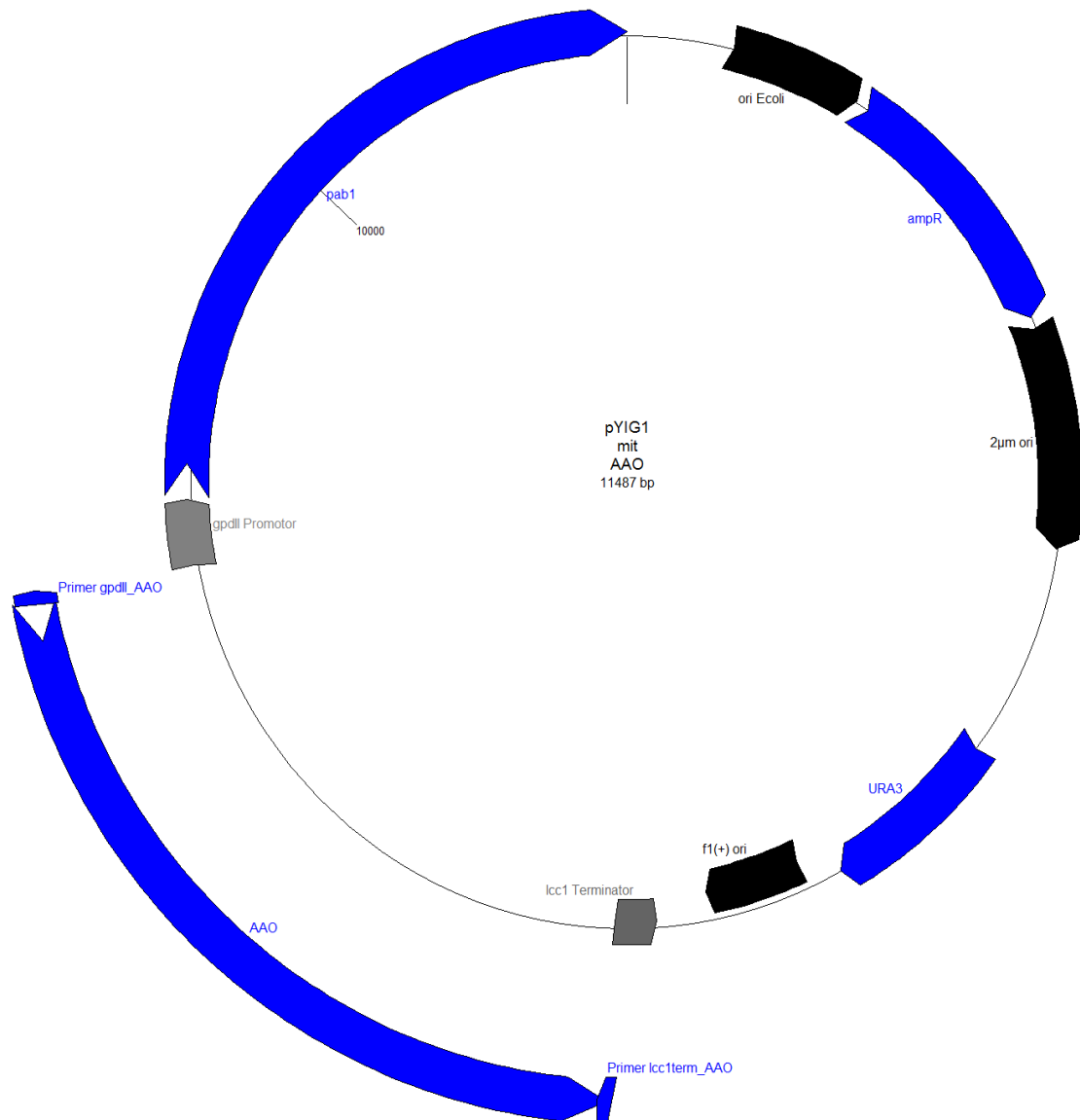


Abbildung 7.1: Plasmidkarte von pYIG1.

## 7.2 AAO-Sequenz

ATGTCGTTTAGTGCACTTCGTCAACTTCTCTTCATCGCTTGCTTGGCTCTGCCATCACTGGC  
GGCCGCTAACCTCCCAACCGCCGATTTTACTACATCGTCGTCGGGGGTGCGTGTCTTTCTC  
CTTGTAATTCGACATCATGCCAATCCATAATTAACAGCGGGGAACGCGGGGAATGTTGTCC  
CTGCACGACTCACGGAGGATCCCAACGTGTCTGTCTTGGTCCTCGAAGCGGGTGTATCGTAA  
GCATATTTAGCGCGTCGCCACCTGATAACAACCAACGAATATTGCTCTCAGAGATGAGAAT  
GTAGTAGGGGCAGAGGCTCCACTTCTTGCGCCCGGACTTGTTCCCTAACTCTATCTTCGACTG  
GAATTACACGACAACAGCTCAAGCTGGGTACAATGGACGGTCCATTGCGTACCCTCGTGGCC  
GTATGCTAGGAGGGTCTAGCTCTGTTCGTGCGTAGAACTCACGAAGTGGGTTAAATGCTACT  
CTTAATGCATCCTTTTGACAGATTACATGGTTATGATGCGCGGTTCGATAGAGGACTTCGAT  
CGCTATGCGGCCGTCCTGCGGATGATGGATGGAACCTGGGACAACATCCAGCAGTTCGTCAG  
GAAGGTAAGTACTTACATTGAATCTTTTACAATCTCATGACACATATACTCATTCTGATTCTATCA  
GAACGAAATGGTCGTGCCCCCTGCTGACAGTGAGCAAGATATTGATGACGCTTGGTCATTGT  
CTAATCTCGTGCCTCAGACCATAATACTTCGGCGAATTTATCCCAGCGGTACATGGGACTA  
ACGGCTCTGTCTCTATTAGCTTGCCAGGCTTCCCTACCCCACTTGATGATCGCGTCTTAGCC  
ACAACTCAGGAGCAAAGCGAAGAGTCTTTTTTAATCCTGACATGGGAACAGGTCATCCTCT  
CGGAATCAGTAGGTGTTCTTAGTATGCTTTGGCTGTGGGTTTAAATGTTATTCTATGCAGGTT  
GGTCAATCGCATCAGTCGGCAACGGTCAACGTAGCAGTCTTCTACTGCCTACTTACGGCCT  
GCCAGTCACGGCCTAATCTCAGCGTGGTATAAATGCTCAAGTGACTAAGCTCGTTAACAG  
CGGAACGACGAACGGCCTACCTGCGTTCGATGTGTAGAGTACGCAGAGCGTGAAGGAGGTC  
AGCATCAATCATGGTACCTCGAATCCGTGCATCTTTTACACATTCTTATACAGCACCAACAA  
CGACTGTTTTGTGCTAAAAAGAAGTCGTTCTTTCCGCGGGATCCGTTGGTACCCCCATCCTT  
CTGCAATTGTCAGGTTGGTCAGATGCATCCACCCGAGAAGCTCGAAGTCATTATATTTCAAC  
TAGGCATCGGTGATCAGAGTGACCTGTGAGCCGTTGGTATCGATACCATCGTCAACAATCCT  
AGCGTAGGCCGAAACCTGTCCGGTGAGTGAAGAGCGCCTGAGAAGCATGCGTCCGTGTGTT  
ACTGACATCATCTGTGAAGACCACTTGCTCCTTCTGCTACGTTCTTCGTCAACAACAATCA  
ATCATTGATAACCTCTTCAGAGACTCGTCCGAGTTC AACGCTGATTTAGATCAGTGGACAA  
ACACTAGAACGGGCCCTCTCACCGCGCTGATTGCTAACCACCTGGCCTGGCTGCGGTTGCCA  
TCGAATTCAAGCATCTTCCAGTCCGTCCCGACCCAGCTGCGGGCCCCAACTCGGCTCATTG  
GGAGACCATCTTCTCGGTAAGTCTATGGCTTGTATTCCCATTCTTGCACACCATGGCTTAT  
TGTGCGAGATTCTGGTAGAACCAATGGTTCATCCAGCTCTCCCTCGTCTGATACTGGTAA  
CTTTATGAGCGTTACAAACGCATTAATTGCTCCCGTGGCCCGTGAGTGCAGTCAACCTTGAT  
CAGTCTGCCGTCCTTAAACCCTGTTATTCTAGGTGGGACATCAAGCTTGCTACGTCCAACC  
CATTGACAAGCCACTCATCAACCCGAGTATCTCTCAACGGAATTCGACATCTTCACCATG  
ATCCAAGCAGTCAAATCCAACCTCCGTTTCTTTCTGGCCAAGCATGGGCAGATTTCTGTTAT  
ACGCCATTGATGCCCGTTGAGCGACCCGACGAACGACGCTGCTATCGAGTCATACATCC  
GAGACAACGCCAACACAATTTTCCACCCAGTAGGAACGGCCAGCATGTCCCCACGCGGAGCT  
TCTTGGGGCGTCGTAGATCCCGATCTCAAGGTCAAAGGTGTGGACGGCCTCAGAATCGTCGA  
TGGGTCTATTTGGTGCGTGTTCCTTTCTGGGCGTTGGCGACGGTTGAAGGGAATGCTAA  
TTTATTGAATCATTCATAGCCCTTCGCGCAAACGCGCACACCCAAGGACCGATATACCTTG  
TAGCGAACGAGGAGCTGATCTAATTAAGGCTGATCAGTAG

Abbildung 7.2: Die Sequenz von AAO aus *P. sapidus*. Die Exon Sequenzen sind fett und unterstrichen.

## 7.3 Codierende Sequenz von AAO

```

1  ATG TCG TTT AGT GCA CTT CGT CAA CTT CTC TTC ATC GCT TGC TTG GCT CTG CCA
1  M  S  F  S  A  L  R  Q  L  L  F  I  A  C  L  A  L  P
55  TCA CTG GCG GCC GCT AAC CTC CCA ACC GCC GAT TTT GAC TAC ATC GTC GTC GGG
19  S  L  A  A  A  N  L  P  T  A  D  F  D  Y  I  V  V  G
109 GCG GGG AAC GCG GGG AAT GTT GTC GCT GCA CGA CTC ACG GAG GAT CCC AAC GTG
37  A  G  N  A  G  N  V  V  A  A  R  L  T  E  D  P  N  V
163 TCT GTC TTG GTC CTC GAA GCG GGT GTA TCA GAT GAG AAT GTA GTA GGG GCA GAG
55  S  V  L  V  L  E  A  G  V  S  D  E  N  V  V  G  A  E
217 GCT CCA CTT CTT GCG CCC GGA CTT GTT CCT AAC TCT ATC TTC GAC TGG AAT TAC
73  A  P  L  L  A  P  G  L  V  P  N  S  I  F  D  W  N  Y
271 ACG ACA ACA GCT CAA GCT GGG TAC AAT GGA CGG TCC ATT GCG TAC CCT CGT GGC
91  T  T  T  A  Q  A  G  Y  N  G  R  S  I  A  Y  P  R  G
325 CGT ATG CTA GGA GGG TCT AGC TCT GTT CAT TAC ATG GTT ATG ATG CGC GGT TCG
109 R  M  L  G  G  S  S  V  H  Y  M  V  M  R  G  S
379 ATA GAG GAC TTC GAT CGC TAT GCG GCC GTC ACT GGC GAT GAT GGA TGG AAC TGG
127 I  E  D  F  D  R  Y  A  A  V  T  G  D  D  G  W  N  W
433 GAC AAC ATC CAG CAG TTC GTC AGG AAG AAC GAA ATG GTC GTG CCC CCT GCT GAC
145 D  N  I  Q  Q  F  V  R  K  N  E  M  V  V  P  P  A  D
487 AAC CAT AAT ACT TCC GGC GAA TTT ATC CCA GCG GTA CAT GGG ACT AAC GGC TCT
163 N  H  N  T  S  G  E  F  I  P  A  V  H  G  T  N  G  S
541 GTC TCT ATT AGC TTG CCA GGC TTC CCT ACC CCA CTT GAT GAT CGC GTC TTA GCC
181 V  S  I  S  L  P  G  F  P  T  P  L  D  D  R  V  L  A
595 ACA ACT CAG GAG CAA AGC GAA GAG TTC TTT TTT AAT CCT GAC ATG GGA ACA GGT
199 T  T  Q  E  Q  S  E  E  F  F  F  N  P  D  M  G  T  G
649 CAT CCT CTC GGA ATC AGT TGG TCA ATC GCA TCA GTC GGC AAC GGT CAA CGT AGC
217 H  P  L  G  I  S  W  S  I  A  S  V  G  N  G  Q  R  S
703 AGT TCT TCT ACT GCC TAC TTA CGG CCT GCC CAG TCA CGG CCT AAT CTC AGC GTG
235 S  S  S  T  A  Y  L  R  P  A  Q  S  R  P  N  L  S  V
757 TTG ATA AAT GCT CAA GTG ACT AAG CTC GTT AAC AGC GGA ACG ACG AAC GGC CTA
253 L  I  N  A  Q  V  T  K  L  V  N  S  G  T  T  N  G  L
811 CCT GCG TTC CGA TGT GTA GAG TAC GCA GAG CGT GAA GGA GCA CCA ACA ACG ACT
271 P  A  F  R  C  V  E  Y  A  E  R  E  G  A  P  T  T  T
865 GTT TGT GCT AAA AAA GAA GTC GTT CTT TCC GCG GGA TCC GTT GGT ACC CCC ATC
289 V  C  A  K  K  E  V  V  L  S  A  G  S  V  G  T  P  I
919 CTT CTG CAA TTG TCA GGC ATC GGT GAT CAG AGT GAC CTG TCA GCC GTT GGT ATC
307 L  L  Q  L  S  G  I  G  D  Q  S  D  L  S  A  V  G  I
973 GAT ACC ATC GTC AAC AAT CCT AGC GTA GGC CGA AAC CTG TCC GAC CAC TTG CTC
325 D  T  I  V  N  N  P  S  V  G  R  N  L  S  D  H  L  L
1027 CTT CCT GCT ACG TTC TTC GTC AAC AAC AAT CAA TCA TTC GAT AAC CTC TTC AGA
343 L  P  A  T  F  F  V  N  N  N  Q  S  F  D  N  L  F  R
1081 GAC TCG TCC GAG TTC AAC GCT GAT TTA GAT CAG TGG ACA AAC ACT AGA ACG GGC
361 D  S  S  E  F  N  A  D  L  D  Q  W  T  N  T  R  T  G
1135 CCT CTC ACC GCG CTG ATT GCT AAC CAC CTG GCC TGG CTG CGG TTG CCA TCG AAT
379 P  L  T  A  L  I  A  N  H  L  A  W  L  R  L  P  S  N
1189 TCA AGC ATC TTC CAG TCC GTC CCG GAC CCA GCT GCG GGC CCC AAC TCG GCT CAT
397 S  S  I  F  Q  S  V  P  D  P  A  A  G  P  N  S  A  H
1243 TGG GAG ACC ATC TTC TCG AAC CAA TGG TTC CAT CCA GCT CTC CCT CGT CCT GAT
415 W  E  T  I  F  S  N  Q  W  F  H  P  A  L  P  R  P  D
1297 ACT GGT AAC TTT ATG AGC GTT ACA AAC GCA TTA ATT GCT CCC GTG GCC CGT GGG
433 T  G  N  F  M  S  V  T  N  A  L  I  A  P  V  A  R  G
1351 GAC ATC AAG CTT GCT ACG TCC AAC CCA TTC GAC AAG CCA CTC ATC AAC CCG CAG
451 D  I  K  L  A  T  S  N  P  F  D  K  P  L  I  N  P  Q
1405 TAT CTC TCA ACG GAA TTC GAC ATC TTC ACC ATG ATC CAA GCA GTC AAA TCC AAC
469 Y  L  S  T  E  F  D  I  F  T  M  I  Q  A  V  K  S  N
1459 CTC CGT TTC CTT TCT GGC CAA GCA TGG GCA GAT TTC GTT ATA CGC CCA TTC GAT
487 L  R  F  L  S  G  Q  A  W  A  D  F  V  I  R  P  F  D
1513 GCC CGT TTG AGC GAC CCG ACG AAC GAC GCT GCT ATC GAG TCA TAC ATC CGA GAC
505 A  R  L  S  D  P  T  N  D  A  A  I  E  S  Y  I  R  D
1567 AAC GCC AAC ACA ATT TTC CAC CCA GTA GGA ACG GCC AGC ATG TCC CCA CGC GGA
523 N  A  N  T  I  F  H  P  V  G  T  A  S  M  S  P  R  G

```

1621	GCT	TCT	TGG	GGC	GTC	GTA	GAT	CCC	GAT	CTC	AAG	GTC	AAA	GGT	GTG	GAC	GGC	CTC
541	A	S	W	G	V	V	D	P	D	L	K	V	K	G	V	D	G	L
1675	AGA	ATC	GTC	GAT	GGG	TCT	ATT	TTG	CCC	TTC	GCG	CCA	AAC	GCG	CAC	ACC	CAA	GGA
559	R	I	V	D	G	S	I	L	P	F	A	P	N	A	H	T	Q	G
1729	CCG	ATA	TAC	CTT	GTA	GGC	GAA	CGA	GGA	GCT	GAT	CTA	ATT	AAG	GCT	GAT	CAG	TAG
577	P	I	Y	L	V	G	E	R	G	A	D	L	I	K	A	D	Q	*

Abbildung 7.3: Die translatierte Sequenz von *P. sapidus* AAO Exons mit der entsprechenden Aminosäuresequenz



## 7.4 Anionenaustauscher-Chromatographie von AAO

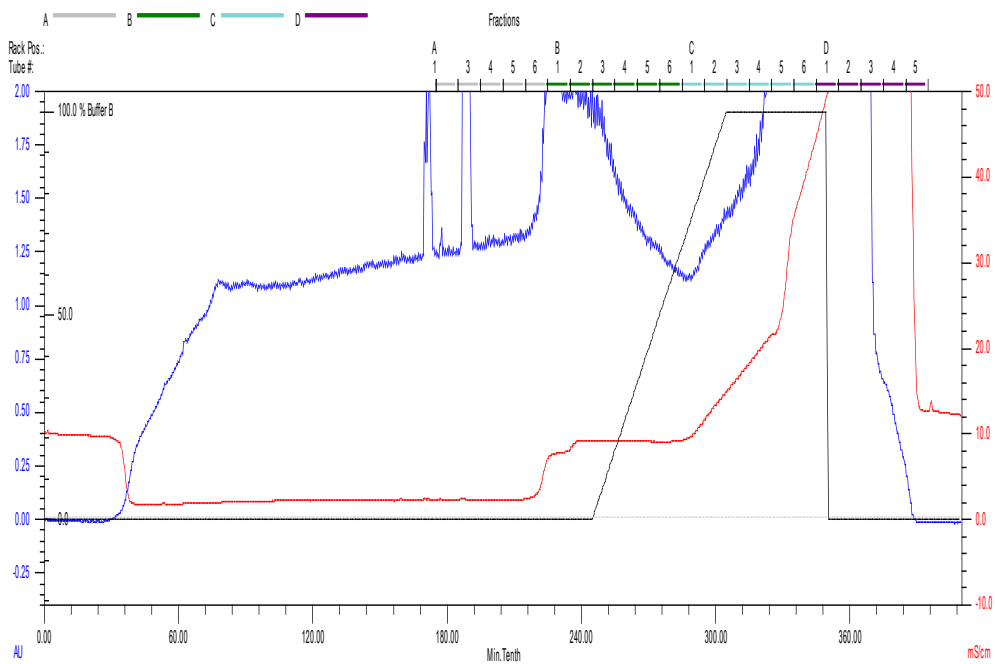


Abbildung 7.4: Anionenaustauscher-FPLC zur Vorreinigung und Konzentrierung von AAO mittels der XK 26/40 Säule mit DEAE Sepharose™ Fast Flow. Die einzelnen Fraktionen hatten ein Volumen von 25 ml.

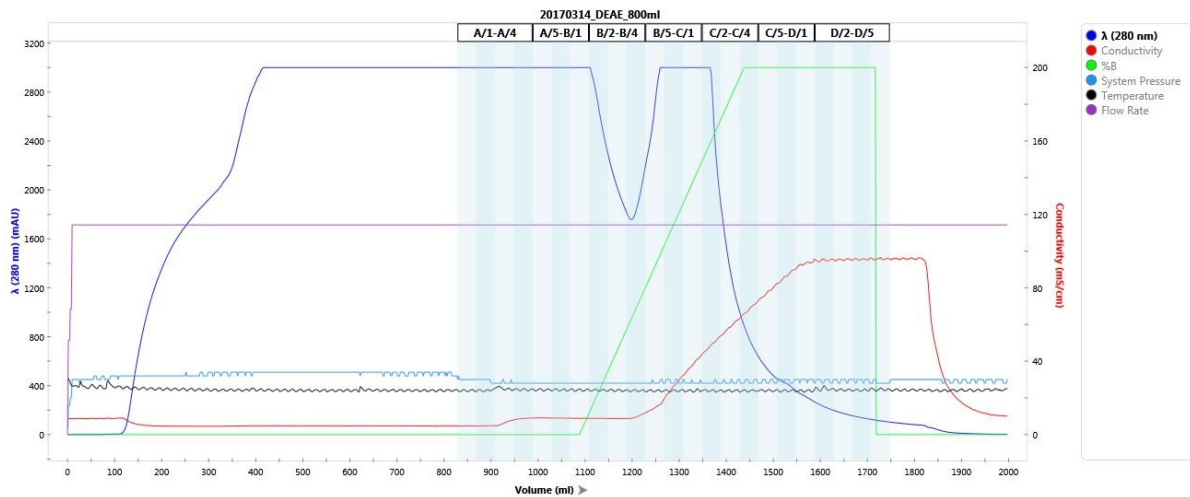
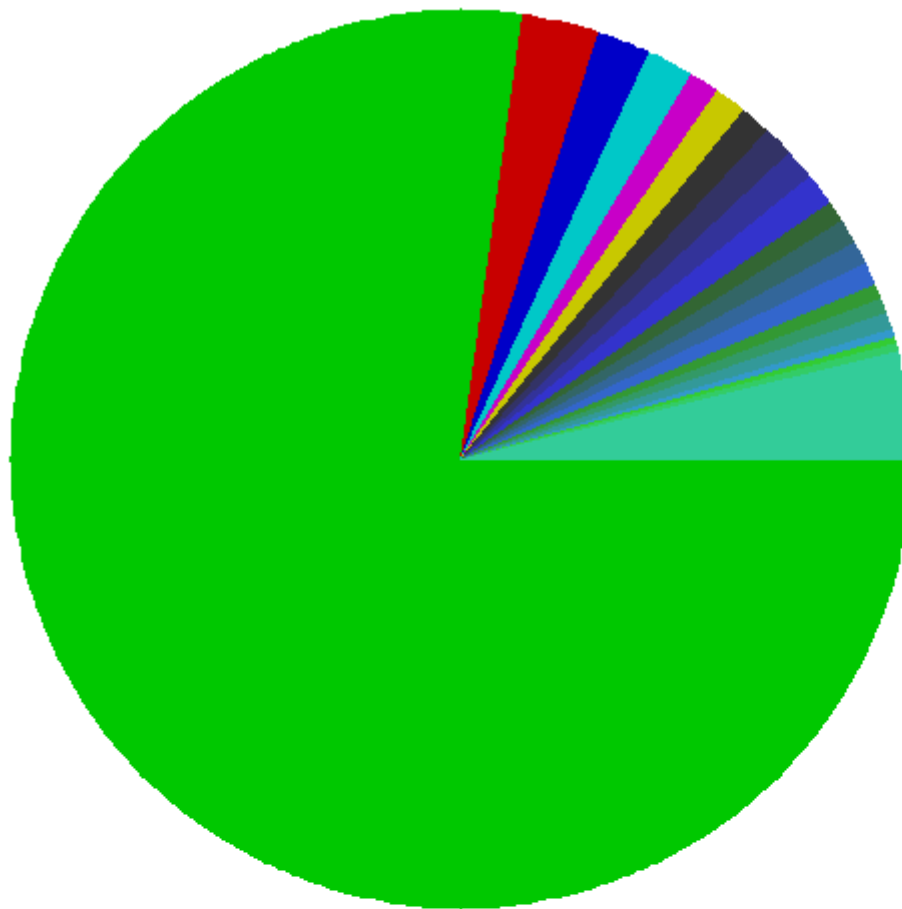


Abbildung 7.5: Anionenaustauscher-FPLC zur Vorreinigung und Konzentrierung von AAO mittels der XK 26/40 Säule mit DEAE Sepharose™ Fast Flow.

## 7.5 KOG-Annotation

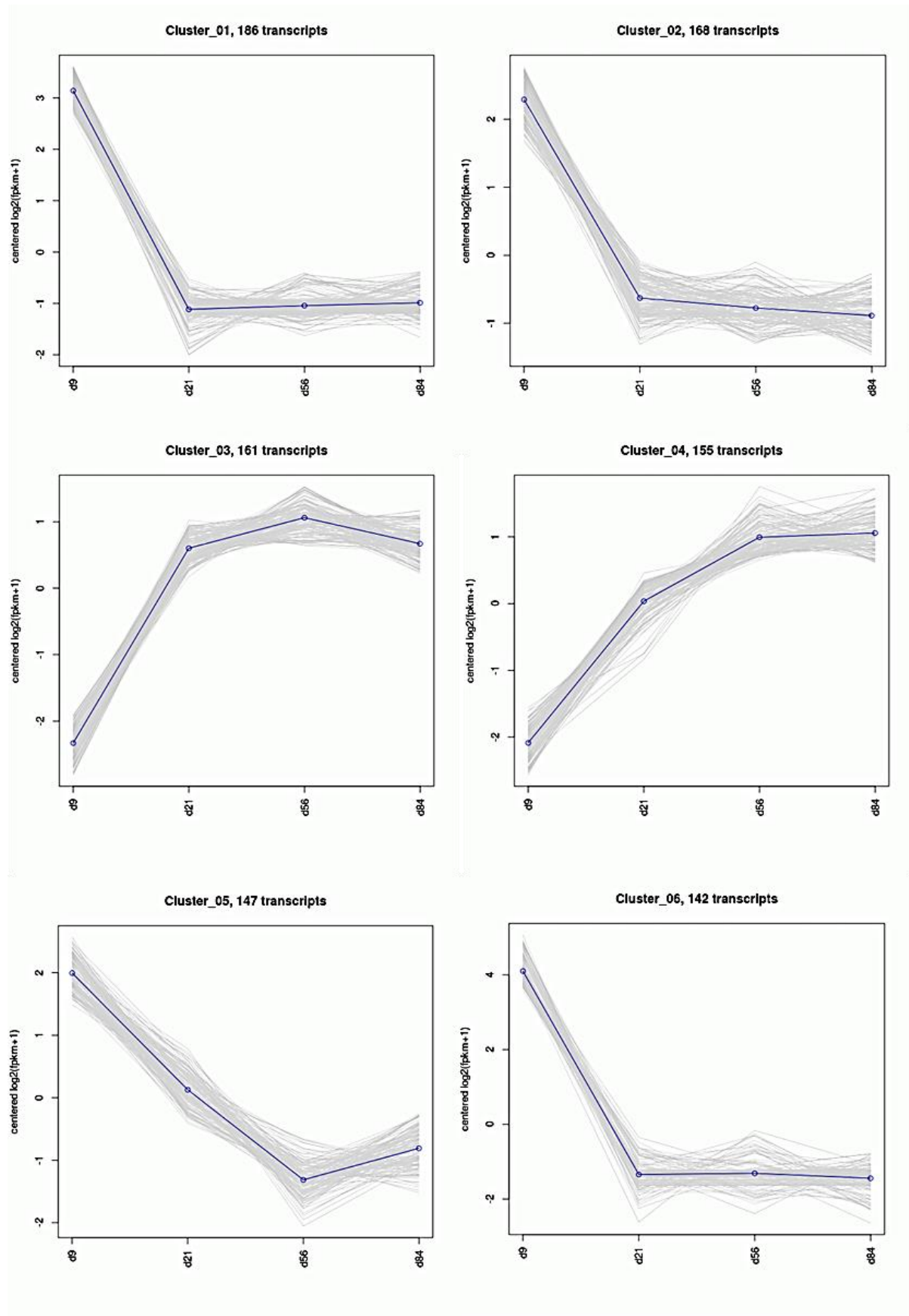


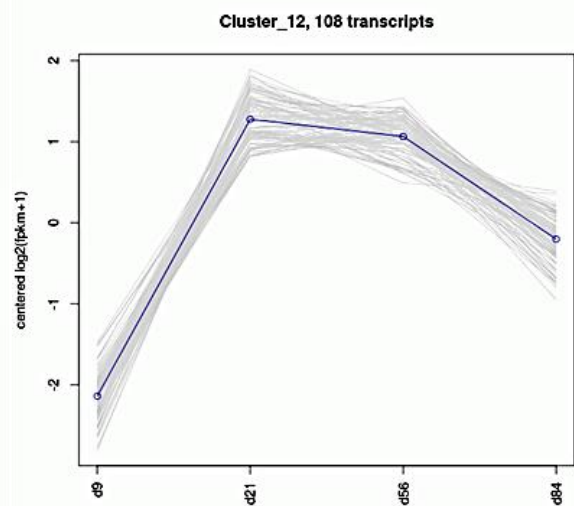
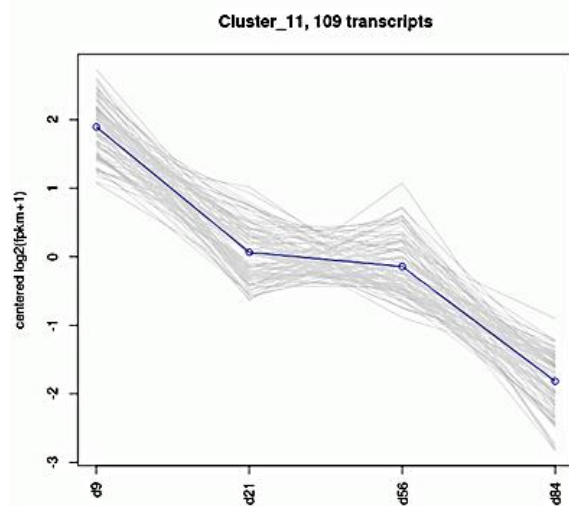
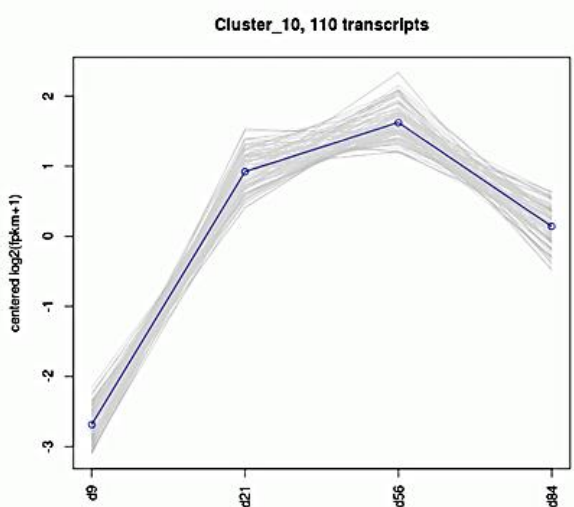
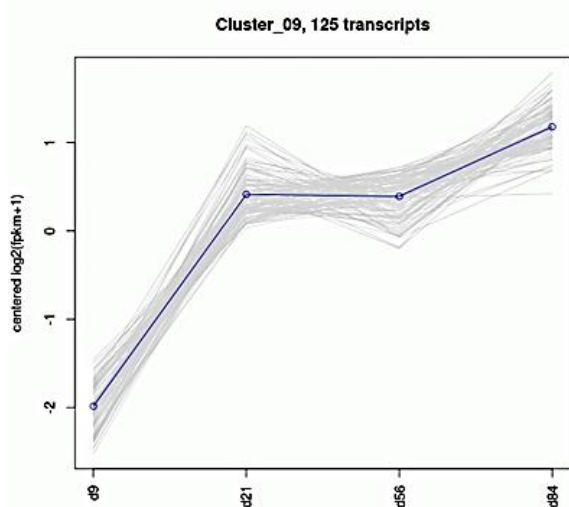
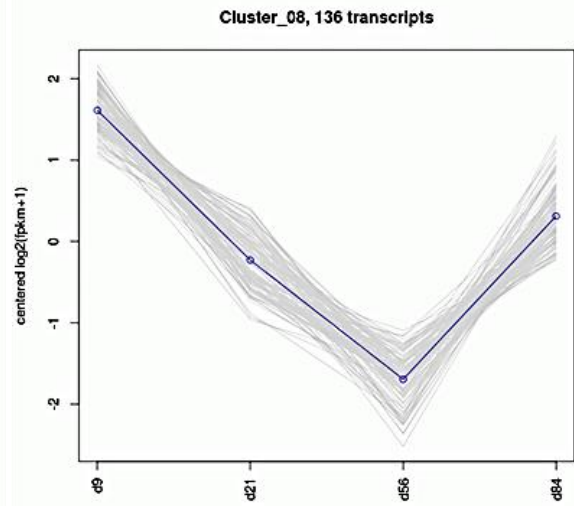
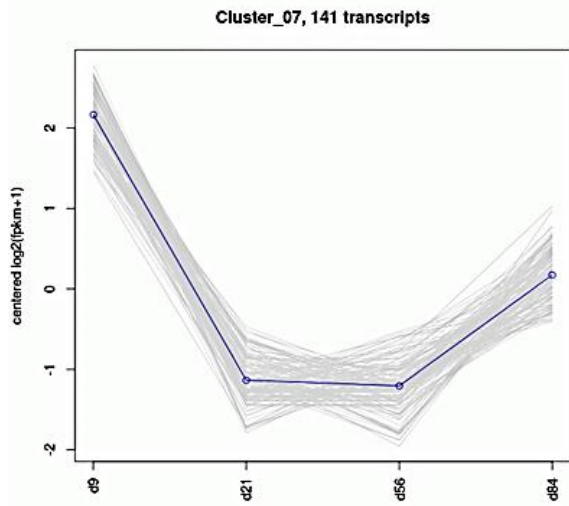
[77.23%; 23694 Isotigs]	X (No functional category)
[2.84%; 871 Isotigs]	R (General function prediction only)
[1.95%; 597 Isotigs]	O (Posttranslational modification, protein turnover, chaperones)
[1.70%; 522 Isotigs]	J (Translation, ribosomal structure and biogenesis)
[1.25%; 383 Isotigs]	E (Amino acid transport and metabolism)
[1.23%; 376 Isotigs]	G (Carbohydrate transport and metabolism)
[1.17%; 360 Isotigs]	C (Energy production and conversion)
[1.17%; 360 Isotigs]	T (Signal transduction mechanisms)
[1.06%; 324 Isotigs]	Q (Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism)
[1.06%; 325 Isotigs]	A (RNA processing and modification)
[0.94%; 287 Isotigs]	S (Function unknown)
[0.92%; 283 Isotigs]	U (Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport)
[0.91%; 280 Isotigs]	I (Lipid transport and metabolism)
[0.75%; 231 Isotigs]	L (Replication, recombination and repair)
[0.63%; 194 Isotigs]	K (Transcription )
[0.52%; 160 Isotigs]	P (Inorganic ion transport and metabolism)
[0.48%; 147 Isotigs]	Z (Cytoskeleton)
[0.39%; 121 Isotigs]	D (Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning)
[0.37%; 113 Isotigs]	H (Coenzyme transport and metabolism)
[0.37%; 112 Isotigs]	F (Nucleotide transport and metabolism)
[3.08%, 938 Isotigs]	101 miscellaneous Funccats

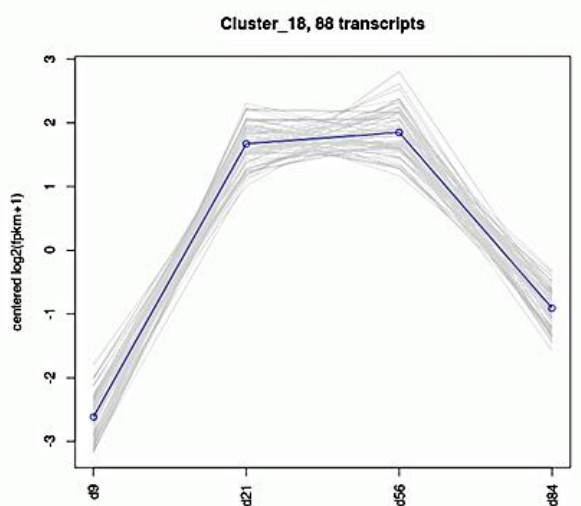
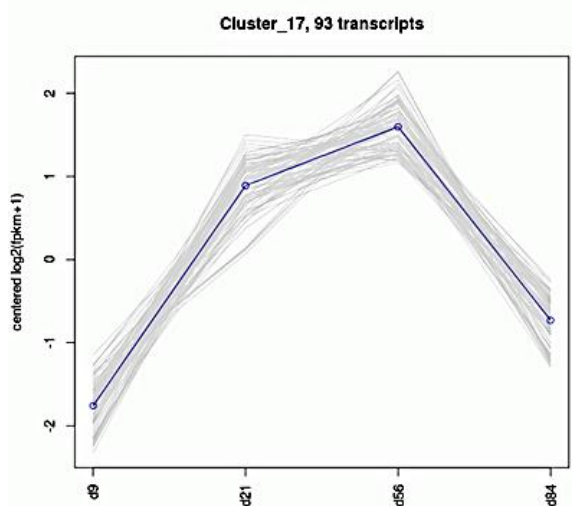
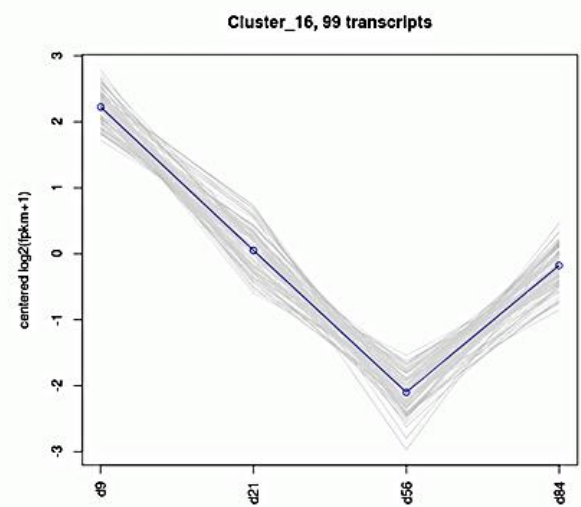
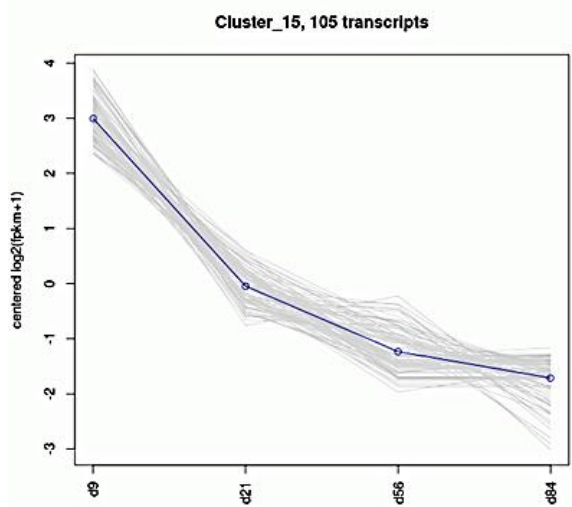
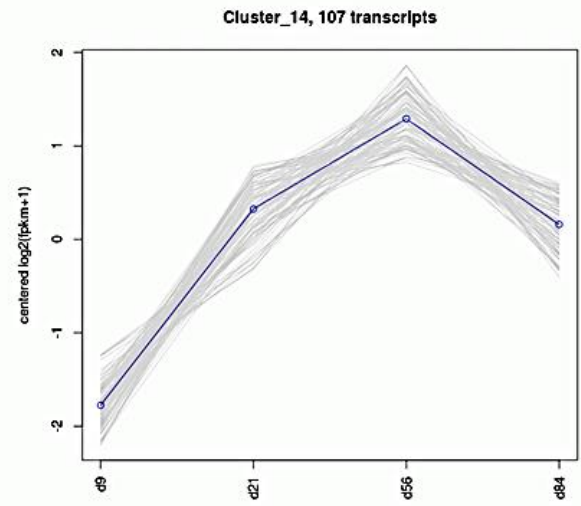
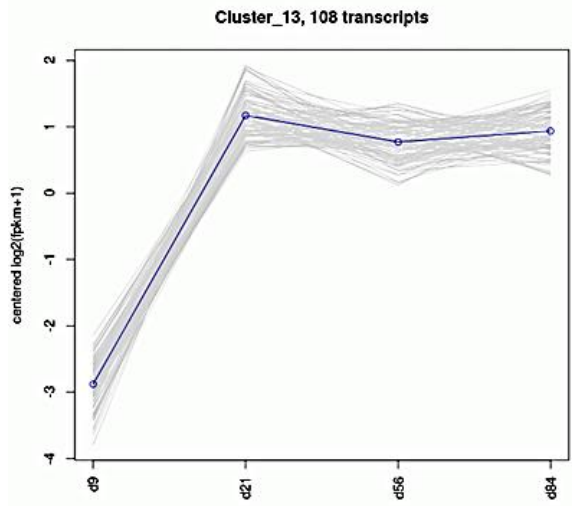
This circle is scaled to 100%

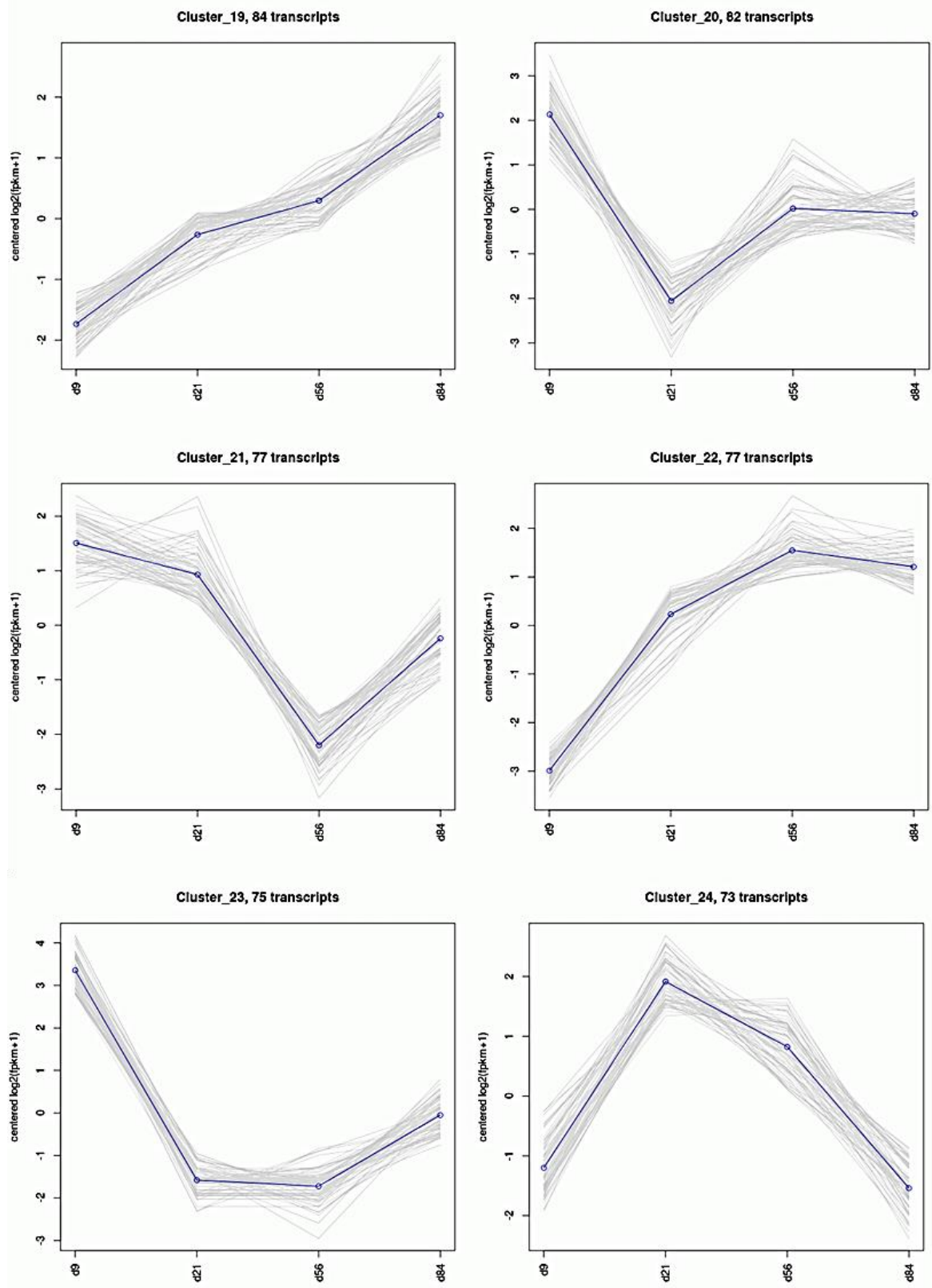
Abbildung 7.6: Die wichtigsten KOG Gruppen der Contigs des Transkriptoms von *P. sapidus*.

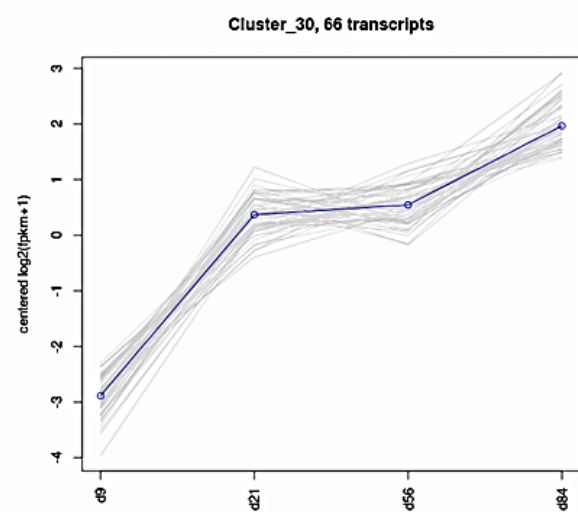
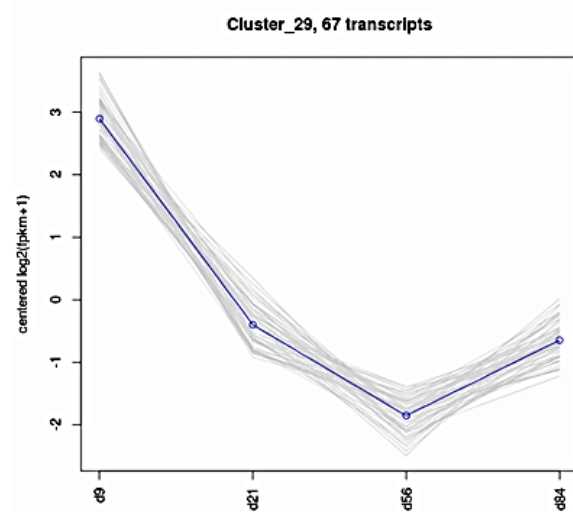
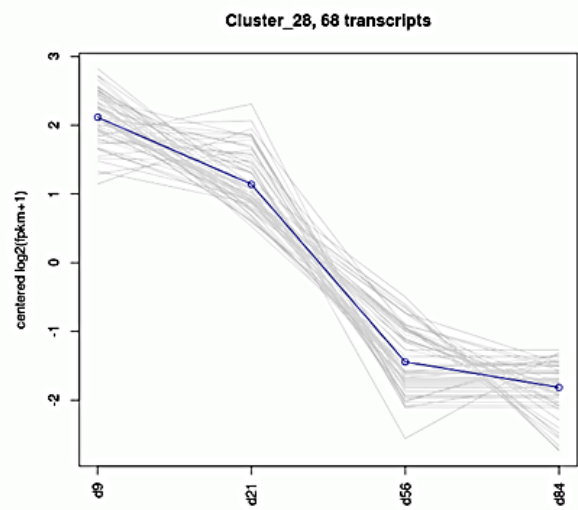
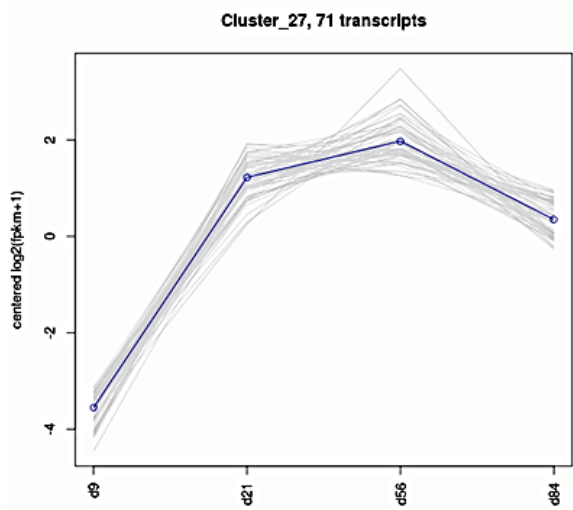
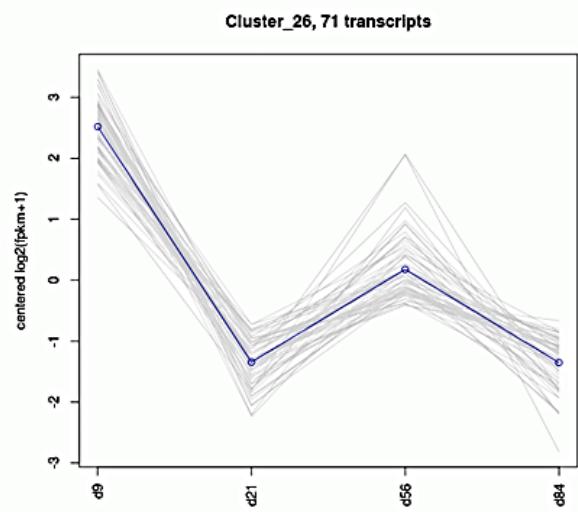
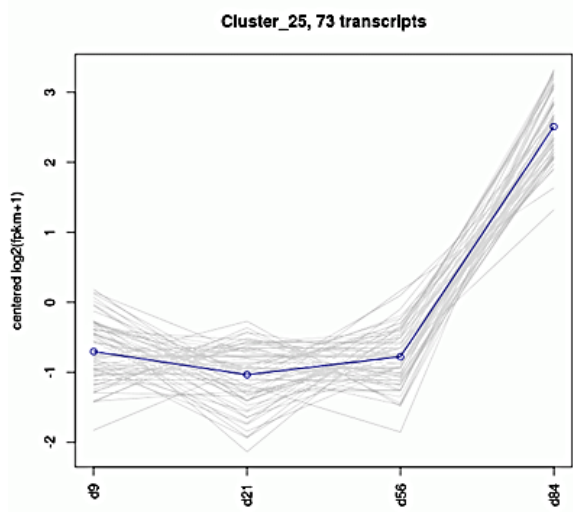
## 7.6 64 Cluster der differentiell exprimierten Contigs

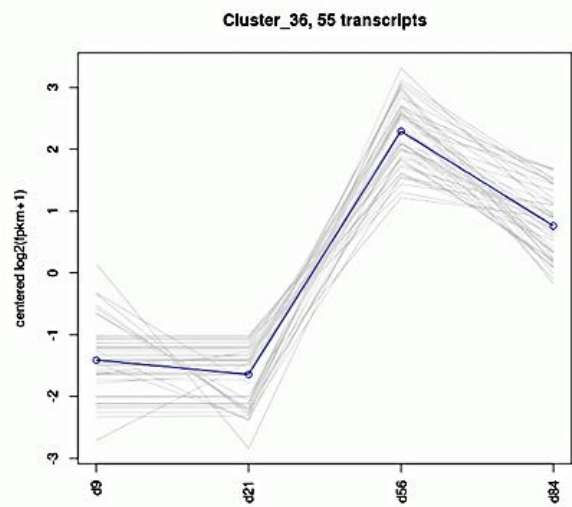
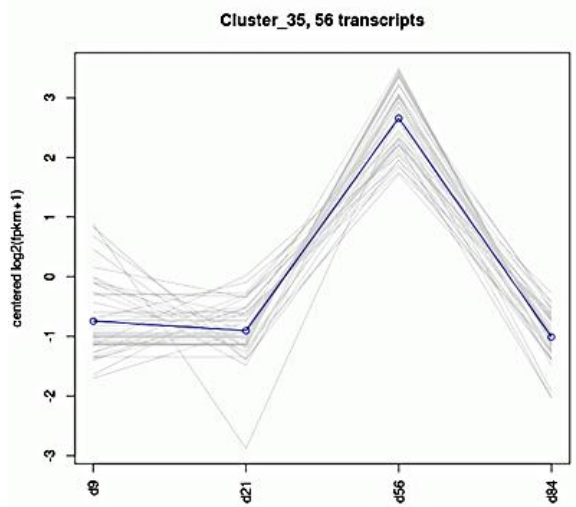
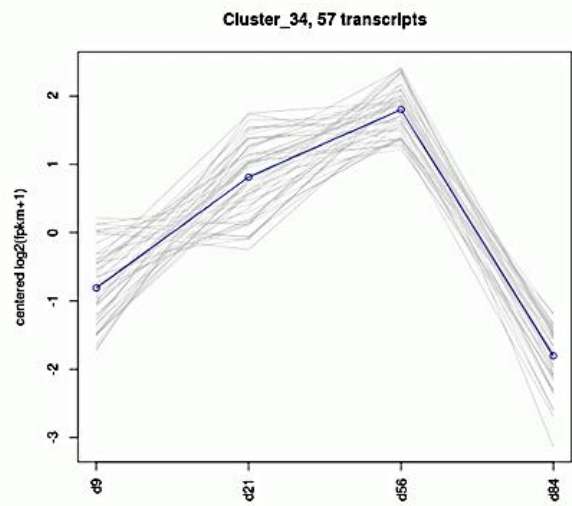
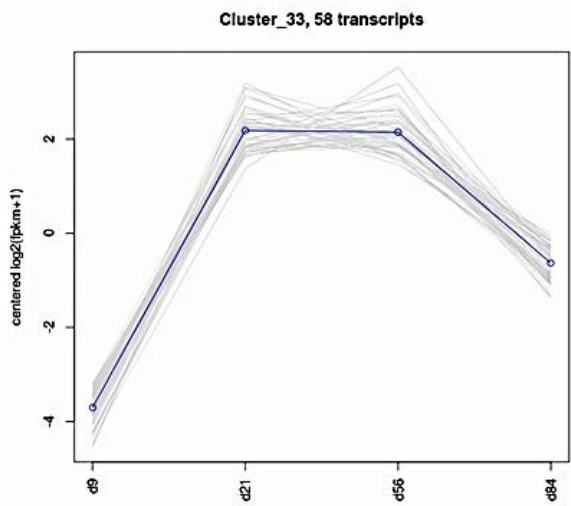
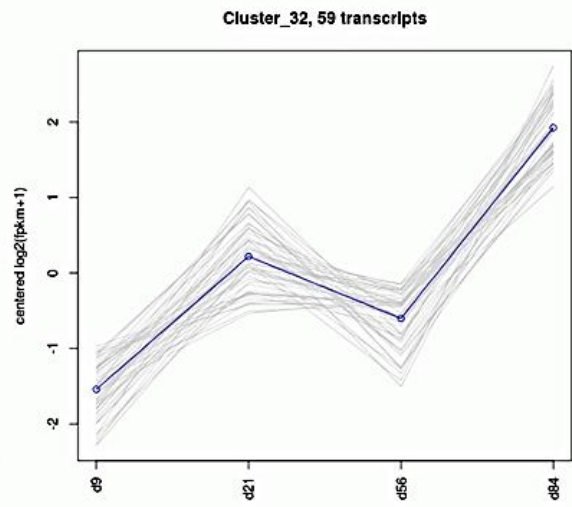
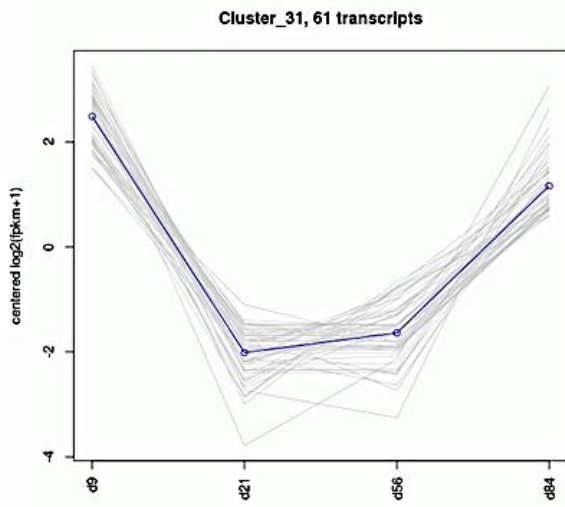




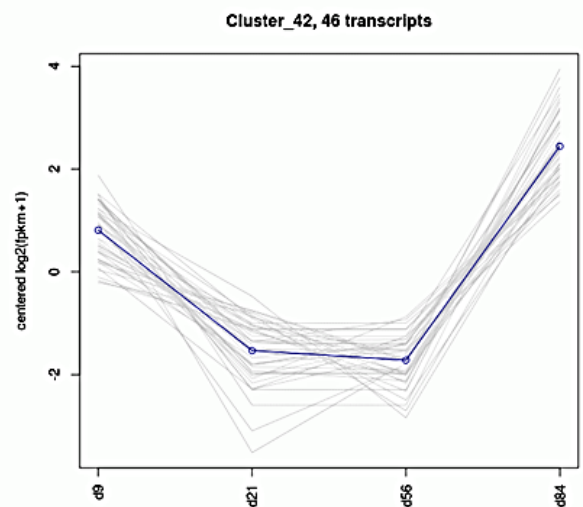
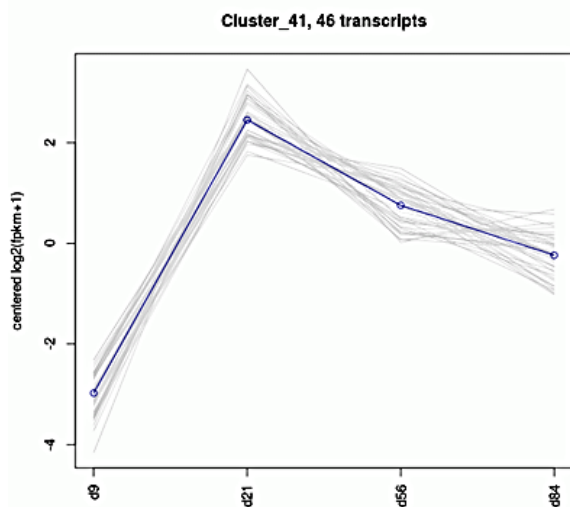
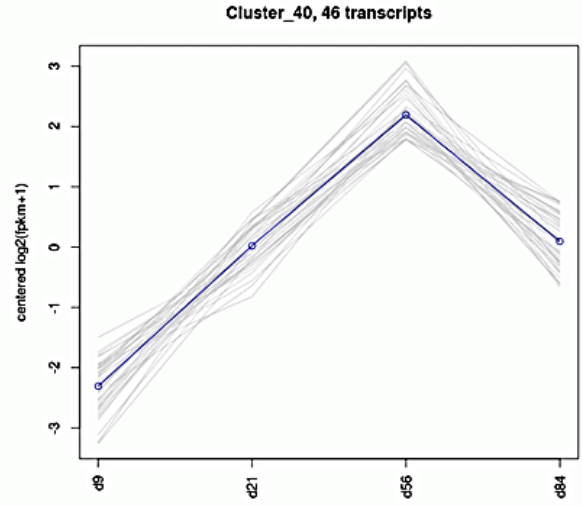
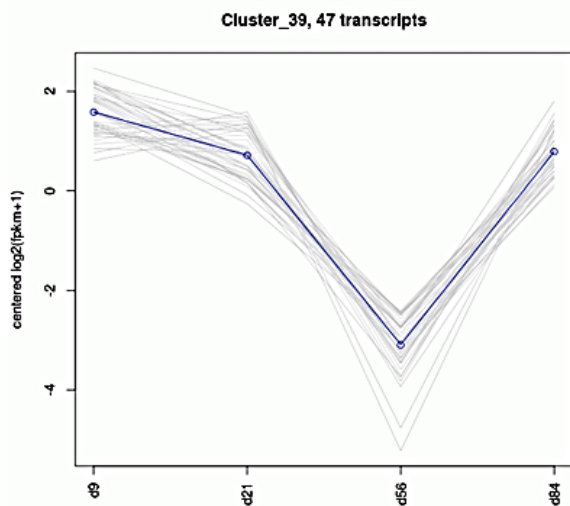
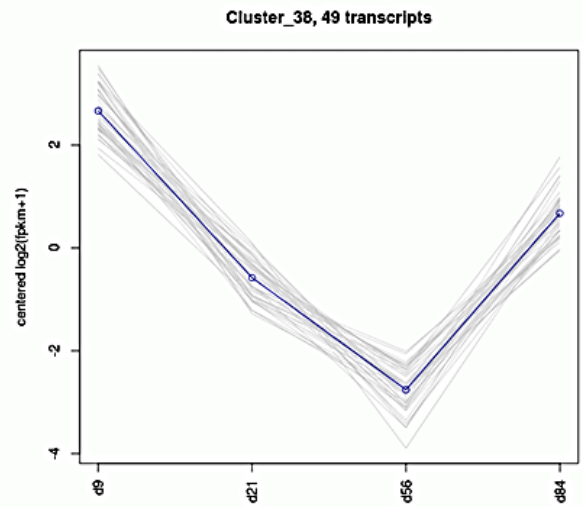
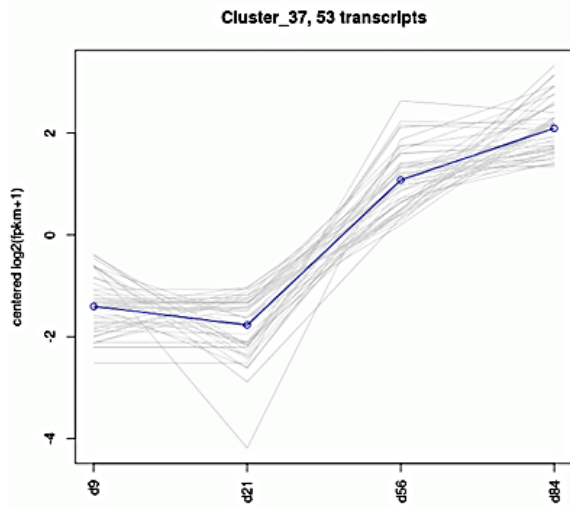


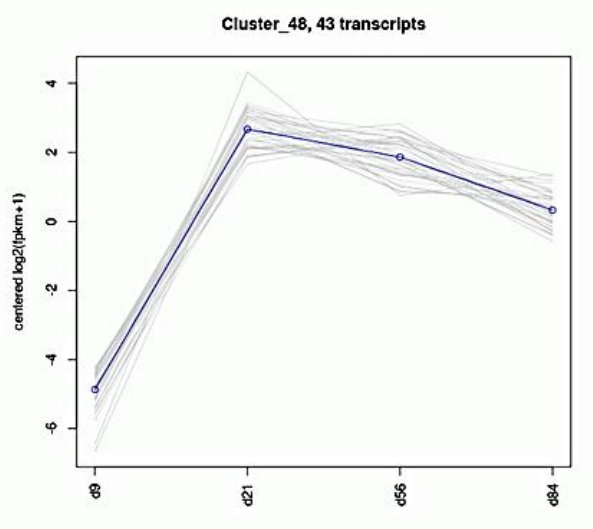
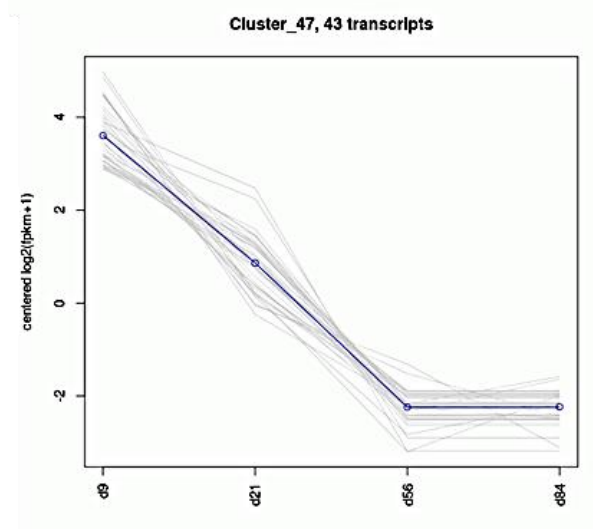
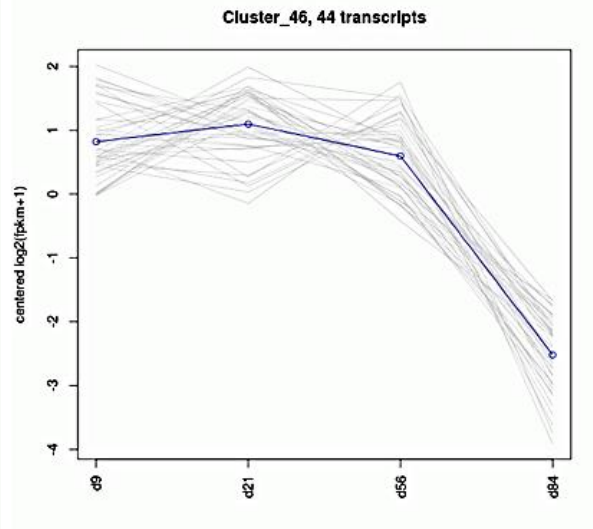
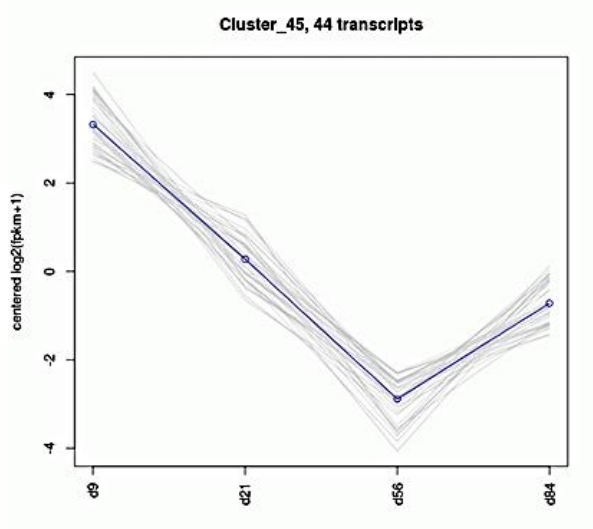
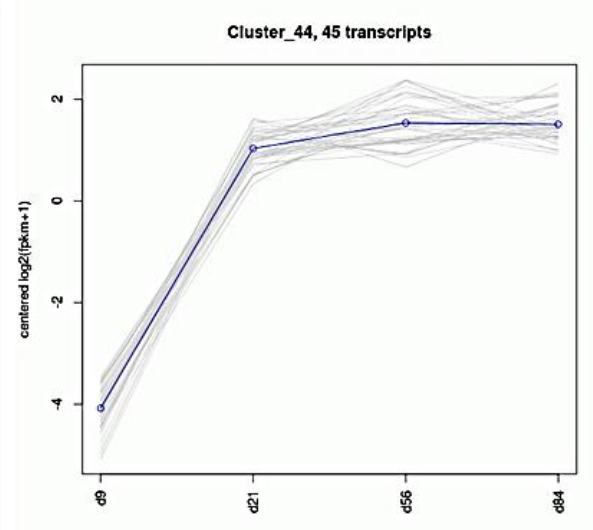
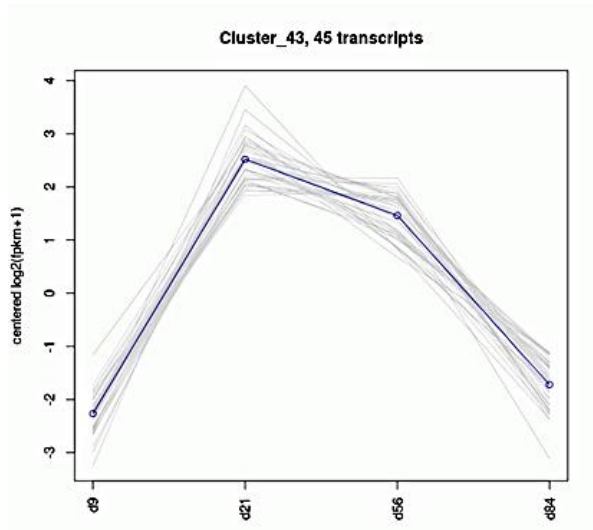


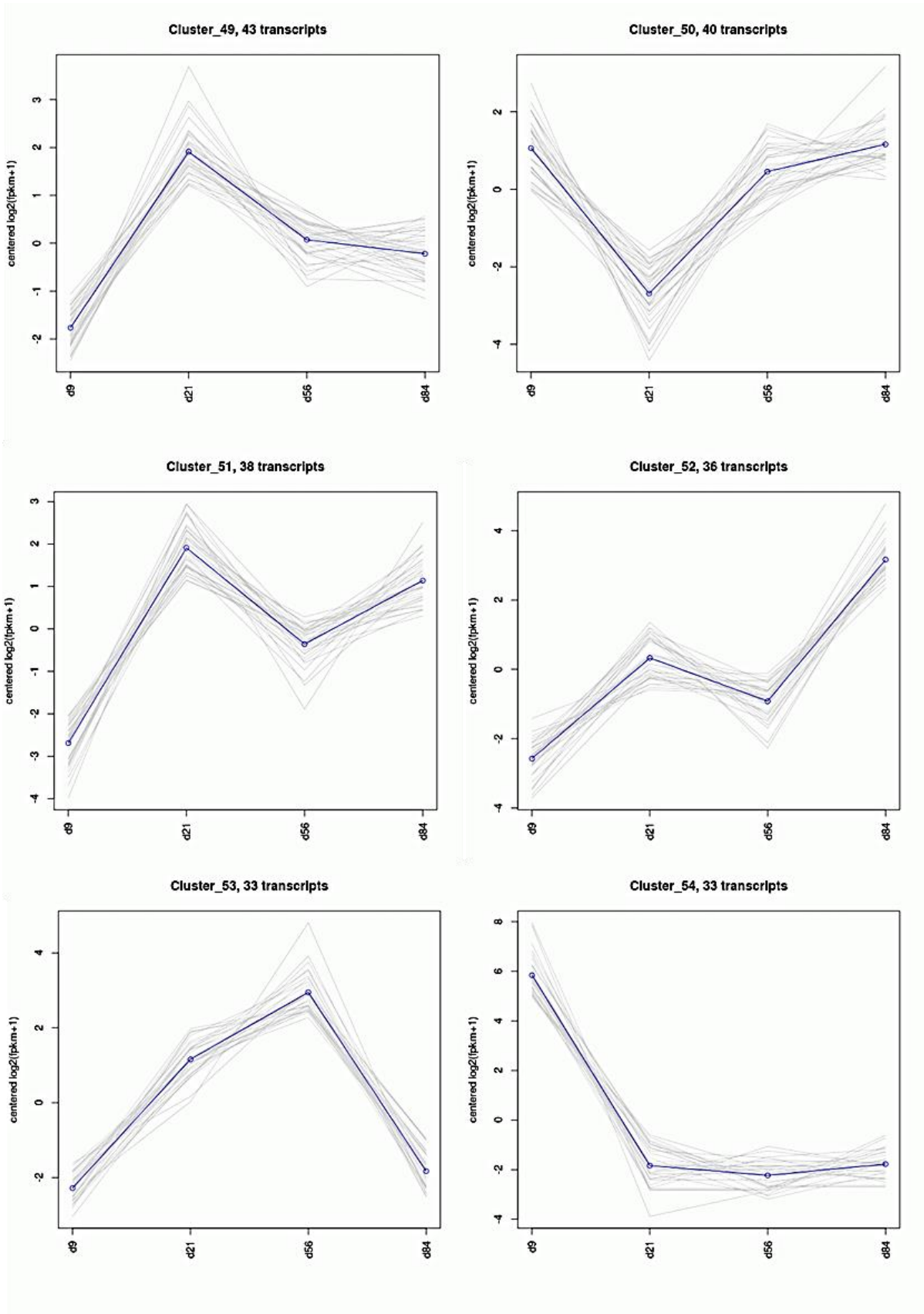


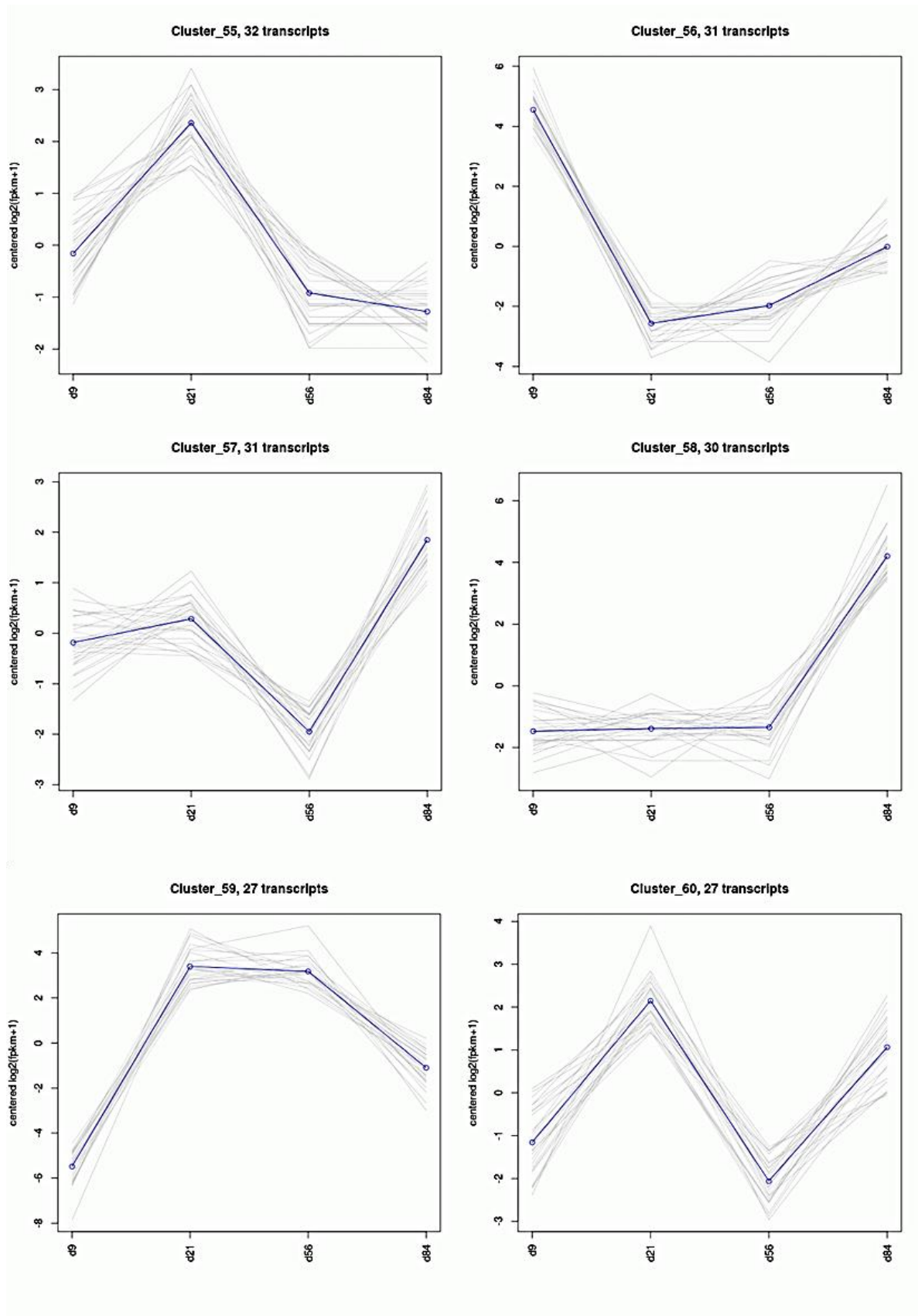












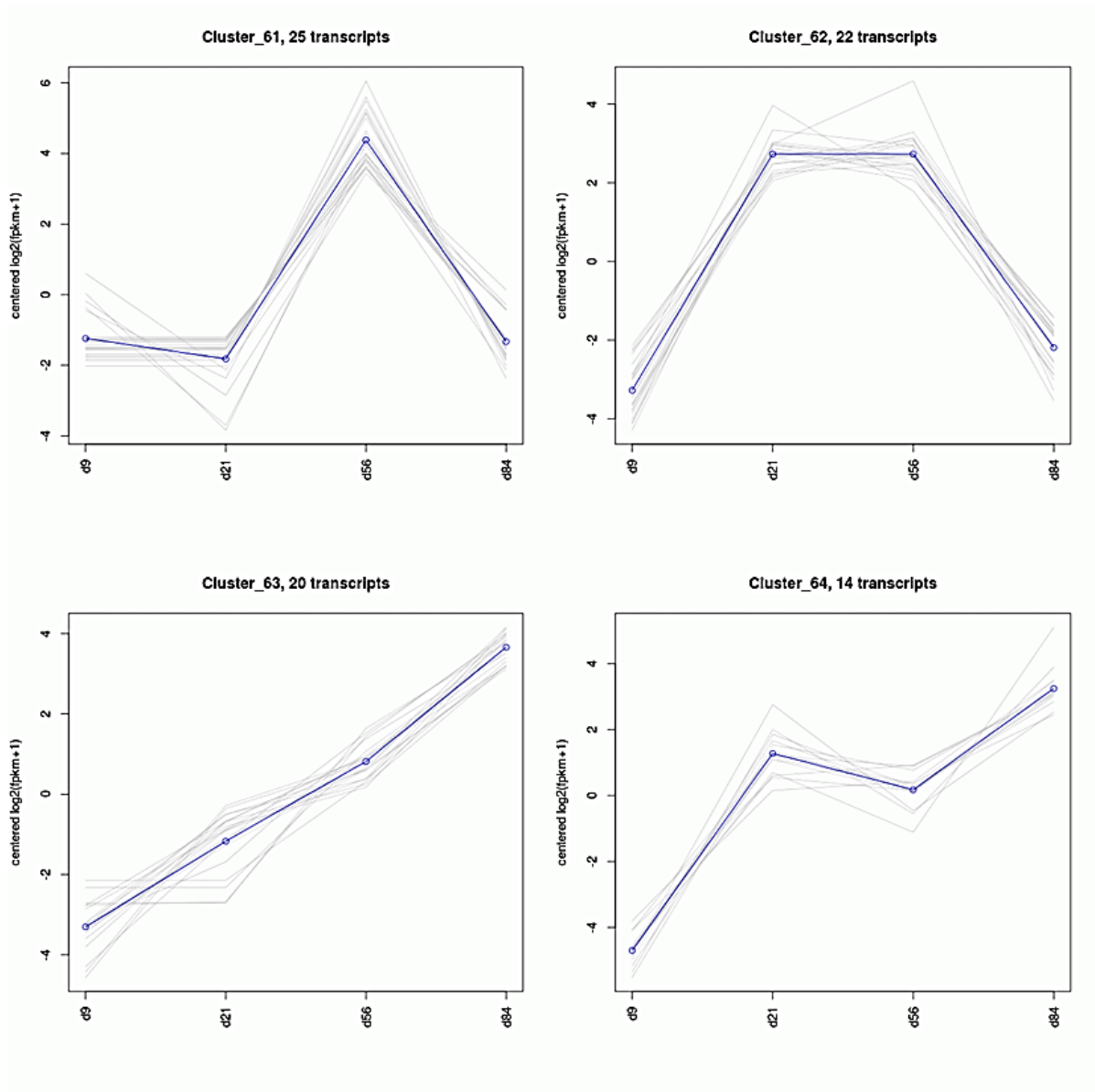


Abbildung 7.7: 64 Cluster der differentiell transkribierten Contigs von *P. sapidus*. Mit *transcripts* sind Contigs gemeint. Dargestellt sind die Änderungen der Transkription an verschiedenen Tagen.

## 7.7 Bilder von *C. cinerea* pYIG1 1-1-5 bei der Kultivierung im ARM und in Schüttelkolben

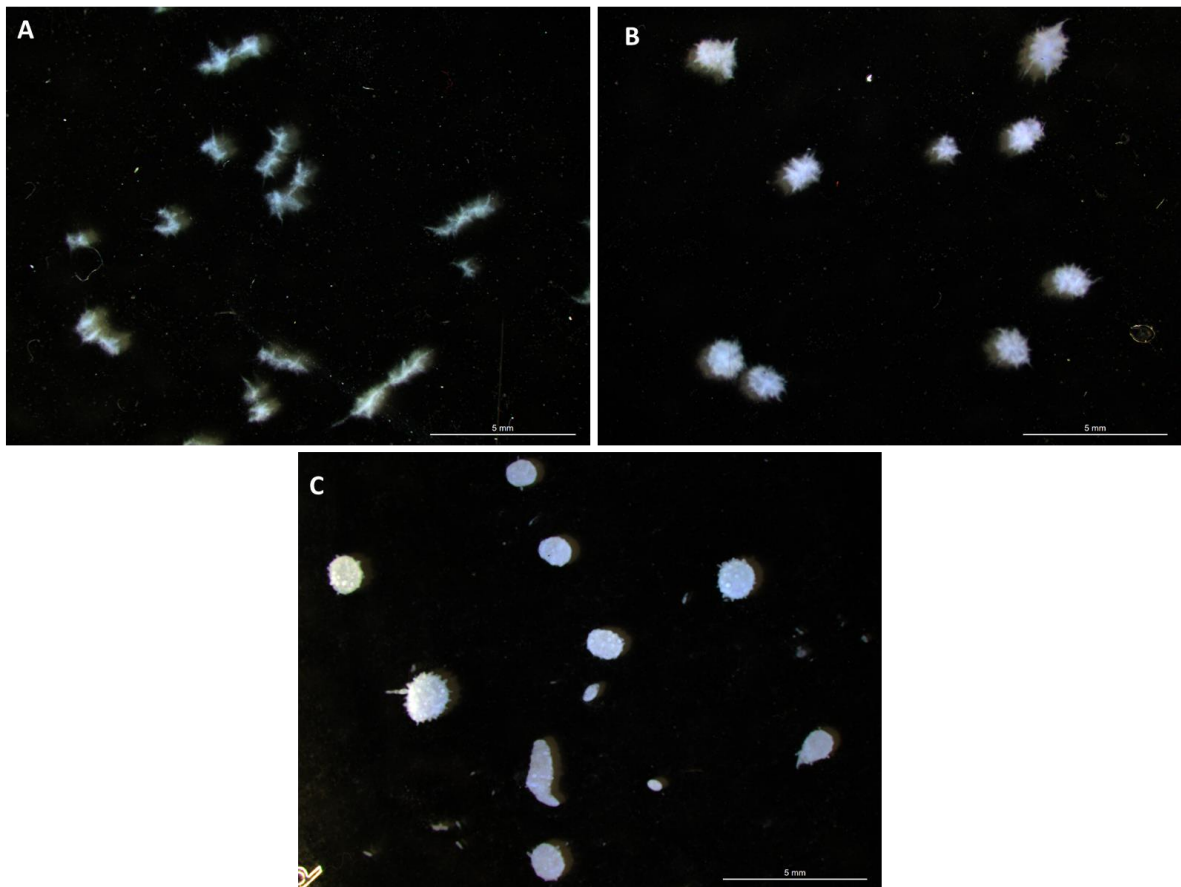


Abbildung 7.8: Mikroskopische Aufnahmen des Myzels von *C. cinerea* pYIG1 während der Kultivierung in Schüttelkolben bei 30 °C und 150 rpm am (A) Tag 1, (B) Tag 2, (C) Tag 6. Die Aufnahmen stammen von Waldschmidt (2017).

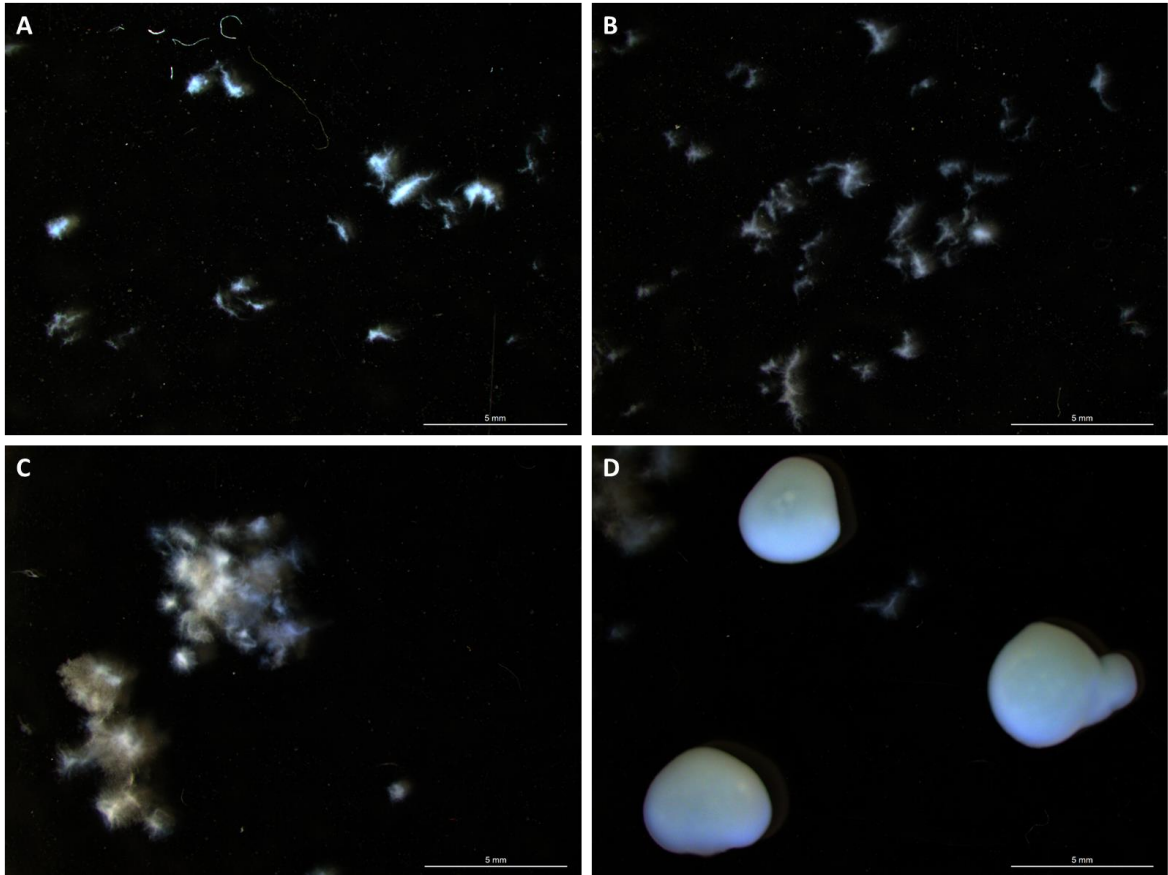


Abbildung 7.9: Mikroskopische Aufnahmen des Myzels von *C. cinerea* pYIG1 während der Kultivierung im ARM bei 30 °C und 6 g am **(A)** Tag 1, **(B)** Tag 3, **(C)** und **(D)** Tag 6. Die Aufnahmen stammen von Waldschmidt (2017).

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungen

Abbildung 1.1: Oxidation von Veratrylalkohol (R = O-CH <sub>3</sub> ) durch die Arylalkoholoxidase. ....	4
Abbildung 1.2: <i>P. sapidus</i> als Fruchtkörper und als Submerskultur .....	4
Abbildung 3.1: Festbettkulturen von <i>P. sapidus</i> .....	44
Abbildung 3.2: Verteilung der verschiedenen Längen der Contigs .....	45
Abbildung 3.3: 4.551 differentiell transkribierte Contigs aufgeteilt auf 64 Cluster .....	46
Abbildung 3.4: Verteilung der Contigs, die mutmaßliche CAZy-Enzyme codieren.....	47
Abbildung 3.5: Heatmap der differentiell transkribierten Contigs der AA-Familie.....	49
Abbildung 3.6: Ergebnisse der Transkriptomanalyse ausgewählter Peroxidase-Gene und einer Laccase. ....	50
Abbildung 3.7 Änderungen in der Transkription der jeweiligen Gene, gemessen mittels RT-qPCR.....	52
Abbildung 3.8: Enzymaktivitäten in Submers- und Emerskulturen.....	54
Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der homologen Rekombination.....	55
Abbildung 3.10: 0,75% Agarosegel mit dem Plasmid pYSK7. ....	55
Abbildung 3.11: 1% Agarosegel mit dem <i>aoa</i> -Amplifikat. ....	56
Abbildung 3.12: 1% Agarosegel mit <i>aoa</i> -Amplifikaten. ....	57
Abbildung 3.13: 1% Agarosegel mit <i>aoa</i> -Amplifikaten aus transformierten <i>E. coli</i> . ....	57
Abbildung 3.14: 1% Agarosegel mit <i>aoa</i> -Amplifikaten aus transformierten <i>C. cinerea</i> .....	58
Abbildung 3.15: AAO-Aktivitäten von 5 <i>C. cinerea</i> pYIG1 Klonen .....	59
Abbildung 3.16: Verlauf der Fermentation von <i>C. cinerea</i> pYIG1 1-1-5 im YMG-Medium. ...	60
Abbildung 3.17: Fermentation von <i>C. cinerea</i> pYIG1 1-1-5 im mod. Kjalke-Medium .....	60
Abbildung 3.18: Größenausschluss-FPLC der Reinigung von AAO .....	61
Abbildung 3.19: Ausschnitt aus dem Größenausschluss-Chromatogramm. ....	62
Abbildung 3.20: Western Blot der nativen PAGE von AAO. ....	63
Abbildung 3.21: <b>(A)</b> Denaturierende SDS-PAGE von AAO <b>(B)</b> Native PAGE von AAO.....	63
Abbildung 3.22: Größenausschluss-FPLC der Reinigung von AAO .....	65
Abbildung 3.23: Denaturierende SDS-PAGE von AAO .....	66
Abbildung 3.24: IEF von AAO .....	67
Abbildung 3.25: Auswirkungen verschiedener Lagerungstemperaturen auf die Stabilität der AAO.....	67
Abbildung 3.27: <b>(A)</b> AAO-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert <b>(B)</b> Stabilität der AAO-Aktivität nach der Inkubation bei 37 und 50 °C. <b>(C)</b> AAO-Aktivität bei versch. Temperaturen. ....	68
Abbildung 3.27: Hanes-Woolf Diagramme zur Ermittlung der K <sub>m</sub> -Werte von AAO.....	69
Abbildung 3.29: Abbau von Reactive Blue 5 durch die DyP-Typ Peroxidase MsP1 .....	70
Abbildung 3.29: AAO-Aktivitäten im Überstand von <i>C. cinerea</i> pYIG1 1-1-5 während der Kultivierung in <b>(A)</b> Orbitalschüttler <b>(B)</b> im akustischen Resonanzmischer .....	71
Abbildung 3.30: Biotrockenmasse von <i>C. cinerea</i> pYIG1 1-1-5.....	72
Abbildung 4.1: Vergleich der Änderungen in der Transkription von <b>(A)</b> MnP, <b>(B)</b> VP, <b>(C)</b> AAO und DyP.....	82
Abbildung 4.2: Vergleich der AAO Sequenzen von <i>P. sapidus</i> .....	94
Abbildung 7.1: Plasmidkarte von pYIG1.....	111
Abbildung 7.2: Die Sequenz von AAO aus <i>P. sapidus</i> . ....	112
Abbildung 7.3: Die translatierte Sequenz von <i>P. sapidus</i> AAO Exons.....	114
Abbildung 7.4: Anionenaustauscher-FPLC zur Vorreinigung und Konzentrierung von AAO mittels der XK 26/40 Säule mit DEAE Sepharose™ Fast Flow. ....	115



Abbildung 7.5: Anionenaustauscher-FPLC zur Vorreinigung und Konzentrierung von AAO mittels der XK 26/40 Säule mit DEAE Sepharose™ Fast Flow. ....	115
Abbildung 7.6: Die wichtigsten KOG Gruppen der Contigs von <i>P. sapidus</i> .....	116
Abbildung 7.7: 64 Cluster der differentiell transkribierten Contigs von <i>P. sapidus</i> . ....	127
Abbildung 7.8: Mikroskopische Aufnahmen des Myzels von <i>C. cinerea</i> pYIG1 während der Kultivierung in Schüttelkolben. ....	128
Abbildung 7.9: Mikroskopische Aufnahmen des Myzels von <i>C. cinerea</i> pYIG1 während der Kultivierung im ARM .....	129

## Tabellen

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte .....	8
Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien.....	9
Tabelle 2.3: Verwendete Enzyme .....	12
Tabelle 2.4: Verwendete Kits .....	13
Tabelle 2.5: Primer für die Plasmidkonstruktion und Sequenzierung.....	13
Tabelle 2.6: Primer für die RT-qPCR. ....	14
Tabelle 2.7: Verwendete Größenstandards für Nucleinsäuren und Proteine .....	15
Tabelle 2.8: Verwendetes Filtrationszubehör .....	15
Tabelle 2.9: Verwendete Mikroorganismen .....	15
Tabelle 2.10 Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE .....	32
Tabelle 2.11: Veratrylalkohol-Assay .....	36
Tabelle 2.12: Anisalkohol-Assay .....	36
Tabelle 2.13: Benzylalkohol-Assay .....	37
Tabelle 2.14: ABTS-Assay .....	37
Tabelle 2.15: Phenolrot-Assay .....	38
Tabelle 2.16: Reactive Black 5 Assay .....	38
Tabelle 2.17: Reactive Blue 5 Assay.....	39
Tabelle 2.18: Zwei-Enzym-Assay mit AAO und DyP-Typ Peroxidase .....	39
Tabelle 3.1: Contigs und ihre AA Unterfamilien.....	48
Tabelle 3.2: Summierte TPM-Werte aller Contigs der jeweiligen Enzyme. ....	51
Tabelle 3.3: Übersicht der einzelnen AAO-Reinigungsschritte. ....	62
Tabelle 3.4: Verteilung der mittels MALDI-TOF-MS gefundenen Peptidfragmente .....	64
Tabelle 3.5: Übersicht der einzelnen AAO-Reinigungsschritte .....	66
Tabelle 4.1: Publikationen, die eine Untersuchung des Transkriptoms von Basidiomyceten mittels RNA-Seq beinhalteten. ....	75
Tabelle 4.2: Enzymkinetische Parameter von AAO .....	93