

Neuartige Enzyme aus Basidiomyceten für technische Anwendungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

Vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus Liebig Universität Gießen

Dipl. Biol. tech. orient. **Falk Christopher Henning Amelung**

2018

Dekan: Prof. Dr. J. Janek

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. S. Schnell

Institut für angewandte Mikrobiologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Erklärung

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

Datum, Ort

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle will ich die Gelegenheit ergreifen, mich bei denen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

Meiner Familie für ihre Unterstützung.

Elke Landrock-Bill (Elektronenmikroskopie), Dr. Björn Lürßen, (Bombenkalorimetrie) und Dr. Manfred Nimtz (Proteinsequenzierung), die mir ihre Expertise in Gebieten zur Verfügung gestellt haben, in denen ich bisher noch keine Erfahrung sammeln konnte.

Dr. Lothar Krieglsteiner, Paul Stamets, Loni Jean Ronnebaum, Dr. Adrienne Stanton und Bronwyn Dee für das zur Verfügung stellen von Bildern der in dieser Arbeit verwendeten Pilze.

Peter Seum unseren Techniker der mithilfe die vielen Praktika erfolgreich und ohne Zwischenfälle über die Bühne zu bringen.

Max Schulze und Jonas Wiesner, die sich bereiterklärten meine Arbeit trotz des Umfangs Korrektur zu lesen.

Julia Henne meinen zuverlässigen, unermüdlichen Hiwi.

Meinen Kollegen, mit denen ich gemeinsam den Aufbau des Instituts stemmte. Ganz speziell Adrian Imami und Florian Prell denen ich freundschaftlich verbunden bin.

Holger Zorn, meinen Doktorvater, für die forschersischen Möglichkeiten, die durch eine gute Ausstattung finanzieller Mittel, einer hervorragenden Laborausstattung und immer neuen Ideen für Projekte erst möglich wurde. Ich weiß aus leidiger Erfahrung, dass dies alles andere als selbstverständlich ist.

Zusammenfassung

Bei einem Screening, welches den Zweck hatte, Enzyme für die Klärung von Weinen und Fruchtsäften zu finden, wurde eine prolylspezifische Endopeptidase entdeckt (PsP A), die von dem Basidiomyceten *Wolfiporia cocos* ausgeschieden wurde. Der Nutzen dieser Enzyme liegt in ihrer Fähigkeit, prolinreiche Proteine wie Casein oder Gluten abzubauen. Gängige Enzyme, die in der Lebensmittelproduktion eingesetzt werden, können dies nur unzureichend bewerkstelligen. Konsequenz daraus ist zum einen ein bitterer Geschmack von Proteinhydrolysaten. Zum anderen ruft Gluten bei Menschen, die an Zöliakie leiden, Beschwerden hervor, die den Konsum dieses in vielen Nahrungsmitteln vorhandenen Proteins unmöglich machen. Es handelt sich bei der gefundenen Peptidase um ein saures Enzym (pI 3,6) mit einem Molekulargewicht von 57 kDa. Seine starke Glycosylierung macht es widerstandsfähig gegen wechselnde Umwelteinflüsse. Die Nucleotidsequenz des klonierten Gens ermöglichte die Einordnung der PsP A als S28.004 Serinpeptidase. Phylogenetische Untersuchungen ergaben, dass die PsP A mit allen weiteren S28-Peptidasen pilzlichen Ursprungs einen eigenen Entwicklungszweig in der Evolution dieser Enzyme darstellt. Dieser entwickelte sich aus einem einzigen Ausgangsenzym und verzweigte in zwei Linien, von denen die eine, zu denen auch die PsP A gehört, Endopeptidasen sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass EndoProTM, eine S28-Peptidase aus *Aspergillus niger*, die von der Firma DSM bereits kommerziell eingesetzt wird, nicht aus einer zur PsP A homologen Entwicklungslinie hervorgegangen ist. Sie unterscheidet sich von dieser so weit, dass eine Patentierung des Enzyms möglich ist.

In Kooperation mit der Firma Süd-Chemie AG (heute Clariant) wurde nach Pilzen gesucht, die fähig sind Lignin in einem von der Firma erzeugten Weizenstrohhydrolysat zu zersetzen. Pilze mit hoher Abbauleistung könnten die restliche, mit Lignin inkrustierte Cellulose bzw. Hemicellulose einer Spaltung in industriell verwertbare Monomere zugänglich machen. Diesbezüglich wurde ein Screening mit 60 Basidiomyceten durchgeführt. Die Pilze *Irpex consors* und *Stereum hirsutum* wurden als die Spezies ermittelt, die die höchste Abbauleistung zeigten. Des Weiteren wurde eine Medienoptimierung durchgeführt, um den Abbau der Lignocellulose durch die Pilze zu steigern. Zudem sollten untersucht werden, ob teure Medienkomponenten, die einen großtechnischen Einsatz verhindert hätten, ersetzt oder weggelassen werden konnten. Am Ende dieses Prozesses bestand das Medium nur noch aus den schwefelsauren Weizenstrohhydrolysat und mineralischen Komponenten. Die Abbauleistung konnte gesteigert werden.

Abstract

In a screening for enzymes for the clarification of wines and fruit juices, a prolyl-specific endopeptidase was discovered (PsP A), which was excreted by the basidiomycete *Wolfiporia cocos*. The benefit of prolyl-specific peptidases is their ability to degrade proline-rich proteins such as casein or gluten. Common enzymes used in food production can do so inadequately. The consequence of this is on the one hand a bitter taste of protein hydrolysates. On the other hand, people suffer from celiac disease are unable to consume gluten-containing food. The identified peptidase is an acidic enzyme (pI 3.6) with a molecular weight of 57 kDa. Its high degree of glycosylation makes it resistant to changing environmental conditions. Bioinformatic analysis of the nucleotide sequence of the cloned gene allowed the classification of PsP A as a member of the S28.004 serine peptidase family. Phylogenetic studies revealed that PsP A, with all other S28 peptidases of fungal origin, represents a distinct evolutionary branch in the evolution of these enzymes. They evolved from a single parent enzyme and branched into two lines, one of which, including PsP A, represents endopeptidases. Furthermore, it has been shown that EndoPro™, a S28 peptidase from *Aspergillus niger*, which is already marketed by DSM, did not originate from a development line homologous to PsP A.

In cooperation with the company Süd-Chemie AG (today Clariant) mushrooms were screened for their ability to decompose lignin in wheat straw hydrolysates produced by the company. Mushrooms efficiently degrading lignin could make the residual lignin encrusted cellulose or hemicellulose accessible to cleavage into industrially useful monomers. Altogether, 60 basidiomycetes were screened and the mushrooms *Irpex consors* and *Stereum hirsutum* were identified as the species that showed the most efficient lignin degradation. Furthermore, a medium optimization was carried out to increase the degradation of lignocellulose by the fungi. In addition, it should be investigated whether expensive media components that could prevent large-scale use could be replaced or omitted. At the end of these processes, the medium consisted only of the wheat straw hydrolysate and mineral components. The degradation rate could be increased.

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2, 2' Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin-6-sulfonsäure) Ammoniumsalz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BME	Basal Medium Eagle
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
ddH ₂ O	double distilled water
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMF	Dimethylformamid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DTT	Dithiothreitol
EBI	European Bioinformatics Institute
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
GFC	Gelfiltrationschromatographie
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JGI	Joint Genome Institute
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
LB	Luria Bertani
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
pNA	<i>para</i> -Nitroanilin
pNP	<i>para</i> -Nitrophenol
pNP- β -D-Glc	<i>para</i> -Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid
RNA	Ribonucleinsäure
RPM	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat Standardnährlösung

SNL	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	C,C,C-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit [$\mu\text{mol min}^{-1}$]
UV	Ultraviolett
verd.	verdünnt
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)
w/v	Masse pro Volumen (bei Prozentangaben)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Z-Gly-Pro-4-pNA	Z-glycyl-L-prolin-4-nitroanilid

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Prolylspezifische Peptidase (PsP A)	1
1.2	Abbau von Lignocellulose	2
2	Material und Methoden	4
2.1	Chemikalien	4
2.2	Geräte	7
2.3	Eingesetzte Organismen	11
2.3.1	Pilze	11
2.3.2	Bakterienstämme	15
2.4	Plasmide.....	15
2.5	Primer.....	17
2.6	Lösungen und Puffer.....	19
2.6.1	Puffer für Agarosegelelektrophorese	19
2.6.2	Lösung für Blau / Weiß-Screening	19
2.6.3	Lösungen und Puffer für SDS-PAGE.....	20
2.6.4	Lösungen zur Färbung von Proteingelen	21
2.6.5	Lösung für das Blotten.....	21
2.6.6	Lösungen für kompetente Zellen	22
2.6.7	Antibiotikastammlösungen	22
2.6.8	Lösungen und Puffer für den β -Glucosidaseassay	23
2.6.9	Lösungen und Puffer für den Esteraseassay	24
2.6.10	Lösungen und Puffer für den Peptidaseassay	24
2.6.11	Lösungen und Puffer für den Laccase/Peroxidaseassay	25
2.6.12	Puffer für die FPLC	25
2.7	Eingesetzte Medien.....	27
2.7.1	Vorkulturmedien für Basidiomyceten.....	27
2.7.2	Hauptkulturmedien für Basidiomyceten.....	29
2.7.3	Medium für das PsP A-Projekt	29
2.7.4	Medien für Lignocelluloseprojekt	30
2.7.5	Medien für Bakterien	32
2.8	Molekularbiologische Werkzeuge	33
2.9	Molekularbiologische Kits.....	34
2.10	Kulturführung Pilze	35
2.10.1	Stammhaltung	35
2.10.2	Vorkultur.....	35
2.10.3	Hauptkultur	35
2.10.4	Fermenter	36
2.10.5	Hauptkultur auf Agarplatten zwecks Screening	36

2.11	Kulturführung Bakterien.....	37
2.11.1	Stammhaltung	37
2.11.2	Vorkultur.....	37
2.11.3	Hauptkultur	37
2.12	Analytik des Lignocellulosesubstrats	37
2.12.1	Ermittlung des pH-Werts	37
2.12.2	Trockenmassenbestimmung.....	38
2.12.3	Fettgehalt (Weibull-Stoldt).....	38
2.12.4	Gesamtstickstoffbestimmung (Kjedahl)	38
2.12.5	Bestimmung des Gehalts reduzierender Zucker (Luff-Schoorl).....	38
2.12.6	Elementaranalyse	38
2.13	Molekularbiologische Arbeiten	38
2.13.1	Agarosegelelektrophorese.....	38
2.13.2	Elution der DNA aus dem Agarosegel	39
2.13.3	Isolierung der Plasmide aus <i>Escherichia coli</i>	39
2.13.4	Isolierung der mRNA.....	39
2.13.5	cDNA-Synthese	39
2.13.6	Primerentwicklung für die Klonierung der PsP A	40
2.13.7	TOPO-Klonierung	41
2.13.8	Restriktionsverdau	41
2.13.9	Ligation.....	42
2.13.10	Transformation.....	42
2.13.11	Blau/Weißscreening.....	42
2.13.12	Erzeugung kompetenter Zellen	43
2.13.13	Anlegen von Kryokulturen von <i>E. coli</i>	43
2.13.14	Genetische Typisierung der Pilze.....	43
2.14	Proteinbiochemische Arbeiten	44
2.14.1	Proteinbestimmung	44
2.14.2	Proteinfällung.....	45
2.14.3	Enzymassays	46
2.14.4	Deglycosylierung	48
2.14.5	Probenkonzentrierung	49
2.14.6	SDS-PAGE	50
2.14.7	Blotten.....	51
2.14.8	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	51
2.14.9	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC)	52
3	Ergebnisse	56
3.1	Identifizierung einer prolylspezifischen Peptidase	56
3.1.1	PsP A-Aktivität im Verlauf einer einwöchigen Kultivierung.....	56
3.1.2	(NH ₄) ₂ SO ₄ - und Ethanol-fällung.....	57
3.1.3	FPLC	60
3.1.4	Bestimmung des isoelektrischen Punkts der PsP A.....	64

3.1.5	N-Deglykosylierung.....	65
3.1.6	Sequenzierung der PsP A.....	65
3.1.7	Isolierung der RNA, Synthese der cDNA und Klonierung der PsP A	66
3.1.8	Primerentwicklung.....	68
3.1.9	Klonierung der PsP A-cDNA	75
3.1.10	Sequenzierung der PsP A-cDNA und deren bioinformatische Auswertung	75
3.2	Lignocelluloseprojekt	91
3.2.1	Substratanalytik	91
3.2.2	Vergleich verschiedener Vorkulturmedien.....	91
3.2.3	Vergleich verschiedener Hauptkulturmedien	94
3.2.4	Erster Screeningschritt.....	96
3.2.5	Zweiter Screeningschritt.....	100
3.2.6	Optimierung der Medien.....	101
3.2.7	Substrat II.....	108
4	Diskussion und Ausblick.....	111
4.1	Prolylspezifische Peptidase.....	111
4.1.1	Einführung	111
4.1.2	Proteinhydrolysate	112
4.1.3	Substrate.....	114
4.1.4	Polyprolylhelix II.....	117
4.1.5	<i>Wolfiporia cocos</i>	118
4.1.6	Isolierung der PsP A	119
4.1.7	Bestimmung des isoelektrischen Punkts.....	120
4.1.8	Prekursorsequenzen	122
4.1.9	Klonierung der PsP A	123
4.1.10	Peptidasefamilien und Clans.....	125
4.1.11	3D-Modell.....	127
4.1.12	Disulfidbrücken	127
4.1.13	SKS-Domäne	135
4.1.14	Glycosylierung.....	135
4.1.15	Die PsP A aus <i>Wolfiporia cocos</i> im Vergleich.....	140
4.2	Lignocelluloseprojekt	172
4.2.1	Holzabbau	172
4.2.2	Laccasen.....	174
4.2.3	Peroxidasen.....	174
4.2.4	Cellolytische Enzyme	175
4.2.5	Vorkulturmedien.....	176
4.2.6	Hauptkulturmedien	177
4.2.7	Screening	179
5	Literaturverzeichnis	184

1 Einleitung

Der Bedarf an hoch selektiv wirkenden, bei milden Bedingungen arbeitenden Katalysatoren führte dazu, dass sich das Interesse unterschiedlicher angewandter Disziplinen auf Enzyme richtete. Schon seit langem werden sie in der Herstellung und Veredelung von Nahrungsmitteln oder beim Gerben von Leder eingesetzt. Ihre Ungiftigkeit und die damit verbundene leichte Entsorgung sowie die Unbedenklichkeit beim Ausbringen in die Umwelt führten zu einer Ausweitung auf andere Bereiche, wie z.B. den Einsatz in Waschmitteln oder bei der Sanierung von Böden und der Anreicherung von Erzen (Bioleeching).

Auf der Suche nach neuen Enzymen für neue Aufgabenstellungen, sowie stabileren und effizienteren Enzymen für bestehende Aufgaben werden weiterhin verschiedenste Organismengruppen nach diesen durchgemustert und für die Biotechnologie erschlossen. Der Gruppe der Basidiomyceten (Ständerpilze), zu denen auch die in dieser Dissertation eingesetzten Pilze gehören, wurde lange Zeit nur am Rande Beachtung geschenkt. Zu Unrecht, denn die von ihnen ausgeschiedenen Enzyme weisen eine hohe Diversität an neuartigen enzymatischen Funktionalitäten auf. Ihre vergleichsweise hohe Stabilität gegenüber verschiedensten Umweltfaktoren, die unter anderem durch einen hohen Glycosylierungsgrad bedingt ist, macht sie für den großtechnischen Einsatz besonders interessant. Die Glycosylierung von Proteinen ist ein zwischen den einzelnen Eukaryotengruppen stark konservierter Prozess, der mehrere Funktionen erfüllt. Neben der Adressierung der Proteine für den intrazellulären Transportprozess dient er der korrekten Faltung im Endoplasmatischen Retikulum und der Vermeidung von Proteinaggregation. In Zusammenhang mit dieser Doktorarbeit ist besonders der Aspekt der mit der Glycosylierung verbundenen erhöhten Stabilität, sowie die mit ihr einhergehende Resistenz gegen einen Abbau durch Peptidase interessant. Biotechnologisch ist diese Modifizierung des Enzyms von hohem Interesse. Die Enzyme haben höhere Haltbarkeit, und vertragen größere Schwankungen bei pH-Wert, Temperatur, Druck und des Salzgehalts des Mediums. Auch Lösungsmittel können zum Teil in höheren Konzentrationen toleriert werden.

1.1 Prolylspezifische Peptidase (PsP A)

Das erste Thema ist lebensmittelbiotechnologischer Natur. Es handelt sich um eine prolylspezifische Peptidase (PsP A), deren Aufgabe die Hydrolyse prolinreicher Proteinsequenzen ist. Es ist eine Fortführung der Forschung auf Basis der Ergebnisse des

DBU Projekts 13164. Dies ist in Zusammenhang mit der Erzeugung von Proteinhydrolysaten zu sehen. Proteinhydrolysate spielen in vielen Bereichen der Lebensmittelherstellung eine Rolle (z.B. Diäten für spezielle Zielgruppen). Säuglinge, alte Menschen, Hochleistungssportler, Allergiker und Menschen mit genetisch bedingten Krankheiten wie z.B. Zölliakie, Phenylketonurie sind unter bestimmten Bedingungen oder dauerhaft auf diese angewiesen. Bei allen spielt der vollständige Aufschluss und die Zusammensetzung eine wichtige Rolle. Zudem können beim Abbau von Proteinen Peptide frei werden, die gesundheitsfördernde Eigenschaften haben. Besonders aus Milch sind solche Eigenschaften bekannt, von denen angenommen werden kann, dass sie kein Zufallsprodukt sondern evolutionär entstanden sind. Für die Lebensmittelindustrie ergeben sich hieraus neue Absatzmöglichkeiten bei den besonders um ihre Gesundheit besorgten Zielgruppen. Wichtigstes Problem bei Hydrolysaten ist der je nach Substrat und eingesetzter Peptidasemischung mehr oder minder bittere Geschmack, der bei den Verbrauchern die Akzeptanz für das Produkt mindert.

Auch in technischer Hinsicht sind Proteinhydrolysate interessant, da sie als Emulgatoren und als Stabilisatoren von Schäumen eingesetzt werden können. Des Weiteren erhöhen sie Viskosität und spielen für Textur und Mundgefühl eine große Rolle.

1.2 Abbau von Lignocellulose

Basidiomyceten sind neben einigen Ascomyceten die einzigen Organismen, die fähig sind Holz abzubauen. Sie spielen damit eine wichtige Rolle bei der Remineralisierung von Biomasse. Dies geschieht im Groben entweder durch Weißfäule, die vom Großteil der holzabbauenden Pilze betrieben wird, oder durch Braunfäule, die von 6% der Holzersetzer genutzt wird. Braunfäuleerreger nutzen sowohl Cellulose als auch Hemicellulose und lassen das Lignin zurück, was namensgebend für die Braunfäule ist. Die dunklen und spröden Reste des Braunfäuleabbaus zeigen den charakteristischen Würfelbruch.

Weißfäuleerreger zerstören das Lignin und hinterlassen ein helle faserige Masse, die auch Mycolholz genannt wird. Sie wurde lange Zeit nur für wenige Anwendungen nutzbar gemacht, wie zum Beispiel für die Herstellung von Bleistiften oder, in feuchtem Zustand, zur Mästung von Vieh in den Tropen.

Ihre Fähigkeit, Lignin abzubauen und die in den verholzten Pflanzenteilen enthaltenen polymeren Zucker freizusetzen, könnte in Zeiten sinkender Ölreserven einen wichtigen Beitrag zur Sicherung der Versorgung mit Treibstoffen und organischen Grundchemikalien leisten. Als Rohstoff sollen, so die Idee, entweder schnellwachsende Pflanzen mit

geringem Nährstoffbedarf oder Biomasse, die in der landwirtschaftlichen Produktion anfällt, dienen.

Hier schließt sich der zweite Teil dieser Dissertation an. Im Rahmen des Projekts Bioraffinerie 2021 sollte schwefelsauer aufgeschlossenes Weizenstroh delignifiziert und sowohl Cellulose als auch Hemicellulose freigesetzt und hydrolysiert werden. Diese sollen unter Zuhilfenahme einer sich anschließenden Fermentation zukünftig als Biokraftstoff Anwendung finden soll.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tab. 2.1: Salze, Lösungsmittel und Verbrauchsmaterialien

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung, Rotiphorese Gel 40	40% in Wasser; 37,5:1	Roth
Aktivkohle pulv. für Entfärbungszwecke		Roth
Aluminiumsulfat-Hydrat	krist.	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	> 98%, p. a.	Appllichem
Ammoniumsulfat	> 99,5%, p. a. ,ACS, ISO	Roth
L-ASPARAGIN-MONOHYDRAT	> 99%, reinst	Appllichem
Borsäure	99,5%, Ph. Eur., USP, BP	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	> 99,5%, p. a.	Appllichem
Citronensäure	> 99,5%, Ph. Eur.	Roth
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	> 98 %, lyophilisiert	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	> 99,5%, p. a.	Appllichem
Dithiothreitol	BioUltra, for molecular biology, ≥99.5% (RT)	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	ROTIPURAN® >99,8%, p.	Roth
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	> 99%, p. a.	Appllichem
Essigsäure	100%, p.a.	Roth
Ethanol	> 99,8%, m. MEK vergällt	Schmidt Chemikalien
Ethanol	> 99,5%, Ph. Eur.	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA)	> 99%, p. a.	Appllichem
D(+)-Glucose-Monohydrat	f. d. Mikrobiologie	Roth
Glycerol	> 98%, Ph. Eur.	Roth
Glycin	> 99%, p. a.	Roth
Isopropanol	> 99,8%, p. a.	Roth
Kaliumchlorid	99-100,5%, Ph. Eur.	Appllichem
Kaliumdihydrogenphosphat	p. a.	Roth
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	> 99%, p. a.	Appllichem

Fortsetzung Tab. 2.1

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	> 99,5%, f. d. Molekularbiologie	Applichem
Magnesiumsulfat-Hydrat	> 99%, getrocknet, reinst	Roth
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	> 99%, p. a.	Applichem
β -Mercaptoethanol	99%, p. a.	Roth
Methanol	ROTISOLV® $\geq 99,9$ %, Pestilyse®	Roth
Natriumacetat	wasserfrei zur Analyse, ACS	Bernd Krate
Natriumcarbonat	> 99%, wasserfrei	Roth
Natriumchlorid	99-100,5%, Ph. Eur.	Applichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Ph. Eur.	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	purum p. a., crystallized >99,0% (T)	Fluka
Natriumhydroxid	> 99%, p. a.	Roth
Natriumsulfat	> 99%, p. a.	Roth
o-Phosphorsäure	ROTIPURAN® >85%, p.a., ACS, ISO	Roth
Salzsäure	> 25%, p. a.	Roth
Schwefelsäure	98%	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	> 99%	Applichem
Trichloressigsäure	> 99,0% (T)	Fluka
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	> 99,3%, buffer grade	Roth
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	> 99%, p. a.	Roth
TWEEN® 80	Ph. Eur.	Roth
Wasserstoffperoxid 30%	purum p.a. >30 RT	Sigma
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	> 99,5%, p. a.	Applichem

Tab. 2.2: Antibiotika

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Ampicillin, Natriumsalz	99%	Roth
Chloramphenicol		Roth
Kanamycinsulfat	> 750 I.E. mg ⁻¹	Roth
Streptomycinsulfat	> 720 I.E. mg ⁻¹ für die Biochemie	Roth
Tetracyclin-Hydrochlorid	> 95% Cellpur®	Roth

Tab. 2.3: Farbstoffe

Chemikalie	Qualität	Hersteller
2, 2'Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin-6-sulfonsäure) Ammoniumsalz (ABTS)	TLC	Appllichem
Bradford-Reagenz, Roti-Nanoquant	5x Konzentrat	Roth
Bromphenolblau, Natriumsalz	f. d. Elektrophorese	Roth
Coomassie Brillantblau G 250	reinst	Appllichem
Coomassie Brillantblau R 250	reinst	Appllichem
4-Nitroanilin	> 99%	Sigma
4-Nitrophenol	> 99%	Sigma
4-Nitrophenylacetat		Sigma
4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid	> 98% TLC	Sigma
Orange G	(C.I. 16230) für die Mikroskopie	Roth
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid (X- β -Gal)	> 99%, f. d. Biochemie	Roth
Xylencyanol	for electrophoresis	Merck
Z-Glycyl-L-prolin-4-nitroanilid (Z-Gly-Pro-4-Nitroanilin)	> 99% TLC	Sigma

Tab. 2.4: Chemikalien mit komplexer, chargenweise schwankender Zusammensetzung

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Agar-Agar Kobe I	reinst	Appllichem
Agarose LE - Biozym		Biozym
Avicel® PH-101	Cotton linters* Cellulose powder	Fluka
Bacto™ Peptone	for use in preparing microbiology culture media	Becton, Dickinson and Co
Basal Medium Eagle (BME)		Sigma
Gluten	~80% Protein	Roth
Hefeextrakt	reinst	Fisher Scientific
Lignocellulosesubstrat I		Südchemie
Lignocellulosesubstrat II		Südchemie
Malzextrakt	for microbiology	Sigma
Pepton aus Soja	f. d. Mikrobiologie	Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	> 98%, f. d. Molekularbiologie	Roth
Stoh, gemahlen		Südchemie

2.2 Geräte

Die im Rahmen der Dissertation verwendeten Geräte, alphabetisch sortiert, mit Angaben zu Modell und Hersteller bzw. Distributor (Tab. 2.5 - Tab. 2.14).

Tab. 2.5: Messgeräte

Gerät	Modell	Firma
Spektralphotometer	Specord 50	Analytik Jena
pH-Meter	SevenEasy pH Mettler	Mettler Toledo
Trockenmassenbestimmung	Moisture Analyser MA35	Satorius
Elementaranalyse	Flash EA 1112 Series	Thermo Electron

Tab. 2.6: Zentrifugen

Gerät	Modell	Firma
Tischzentrifuge	Allegra X-15R	Beckman Coulter
Tischzentrifuge	Microfuge 22R	Beckman Coulter
Zentrifuge	J2-MC	Beckman Coulter

Tab. 2.7: Ultrafiltration

Gerät	Modell	Firma
Pumpe	Masterflex L/S	Lone Parmer
Viva Flow Filtereinheit	VivaFlow 50 30.000 MWCO PES	Satorius

Verbrauchsmaterial	Modell	Firma
Ultrafiltrationseinheiten für einmalige Nutzung	JUMBOSEP 30K DISK	Pall
	Macrosep Advance Centrifugal Device 30K MWCO	Pall
	Microsep Advance Centrifugal Device 30K MWCO	Pall
	Nanosep 10K omega	Pall

Tab. 2.8: FPLC

Gerät	Modell	Firma
FPLC	Biologic Duo Flow	Biorad
Säule	XK 26/40	GE Health Care
IEX-Säulenmaterial	DEAE Sepharose Fast Flow	GE Health Care
HIC-Säulen	HiTrap HIC Selection Kit	GE Health Care
GFC-Säulen	HiLoad 16/60 XK 200 pg	GE Health Care

Tab. 2.9: SDS-PAGE / Western-Blot

Gerät	Modell	Firma
Spannungsquelle	EV231	Peqlab
Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue Twin S	Peqlab
Tank-Elektroblotter	PerfectBlue Web S	Peqlab
Kühlung	Minichiller	Huber

Verbrauchsmaterial	Modell	Firma
Marker		Fermentas
Marker		Thermo
PVDF-Membran		

Tab. 2.10: IEF

Gerät	Modell	Firma
Spannungsquelle	EV262	Peqlab
IEF-Gelelektrophoresekammer	Multiphor II	GE Healthcare
Kühlung	Minichiller	Huber

Verbrauchsmaterial	Modell	Firma
Gel	ServaGe TM IEF 3 - 10	SERVA
Marker	IEF Markers 3-10	SERVA
Probenauftragspuffer	IEF sample buffer	SERVA
Anodenpuffer	IEF anode buffer	SERVA
Kathodenpuffer	IEF cathode buffer	SERVA

Tab. 2.11: PCR

Gerät	Modell	Firma
PCR-Cycler	Alpha SC	Analytik Jena
Verbrauchsmaterial	Modell	Firma
siehe molekularbiologische Werkzeuge Tabelle		

Tab. 2.12: Agarosegelelektrophorese

Gerät	Modell	Firma
Spannungsquelle	EV231	Peqlab
Geldokumentation	DeVision G	Decon Science Tec
Gelkammer	PerfectBlue Mini S	Peqlab
Verbrauchsmaterial	Modell	Firma
Marker	T835.1	Carl Roth

Tab. 2.13: Fermenter

Gerät	Modell	Firma
Fermenter	Labfors 3	Infors HT
Kühlung	Minichiller	Huber

Tab. 2.14: Diverses

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	Laboklav 160	SHP Steriltechnik
Autoklav	Laboklav 25	SHP Steriltechnik
Dispergiergerät	T 25 digital Ultra-Turrax	IKA
Kühl-Thermo-Mixer	MKR 13	HLC BioTech
Gefriertrocknungsanlage	VaCo 2	Zirbus Technology
Inkubator	INE 500	Memmert
Inkubationsschüttler	Multitron 2	Infors HAT
Pipette	0,1-2,5 µL Research	Eppendorf
Pipette	2-20 µL Research	Eppendorf
Pipette	20-200 µL Research	Eppendorf
Pipette	100-1000 µL Research	Eppendorf
Reinstwassersystem	arium 611VF	Sartorius
Sterile Werkbank	HERAsafe KS 18	Thermo Fisher Scientific
Ultratiefkühlschrank	Forma 906	Thermo Fisher Scientific

2.3 Eingesetzte Organismen

2.3.1 Pilze

Wolfiporia cocos wurde für die Arbeiten an der prolylspezifischen Peptidase benutzt. Für das Projekt „Lignocellulose Bioraffinerie“ wurden in Absprache mit der Firma Süd-Chemie AG 60 Pilzarten (50 Stämme + 10 „Reservestämme“ als Ersatz für eventuell nicht oder schlecht wachsende Basidiomyceten) in Kultur genommen (Tab. 2.15).

Tab. 2.15: Die in dieser Dissertation verwendeten Pilzspezies, alphabetisch sortiert, mit Angaben zur Herkunft und zugehöriger Stammsammlungsnummer

Spezies	Stammsammlungsnummer	Anbieter
<i>Abortiporus biennis</i>	676.70	CBS
<i>Armillaria bulbosa</i>	3732	DSMZ
<i>Auricularia auricula-judae</i>	11326	DSMZ
<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	9844	DSMZ
<i>Auricularia mesenterica</i>	6917	DSMZ
<i>Auricularia polytricha</i>	6918	DSMZ
<i>Bjerkandera fumosa</i>	100982	CBS
<i>Ceriporiopsis resinascens</i>	525.92	CBS
<i>Ceriporiopsis rivulosa</i>	434.48	CBS
<i>Coprinus clastophyllus</i>	8306	DSMZ
<i>Coprinus sterquilinus</i>	3341	DSMZ
<i>Cyathus africanus</i>	1593	DSMZ
<i>Dichomitus albidofuscus</i>	321.75	CBS
<i>Dichomitus campestris</i>	793.86	CBS
<i>Dichomitus squalens</i>	9615	DSMZ
<i>Exidia glandulosa</i>	1012	DSMZ
<i>Fistulina hepatica</i>	4987	DSMZ
<i>Ganoderma anullaris</i>	9943	DSMZ
<i>Ganoderma applanatum</i>	3800	DSMZ
<i>Hericium cirrhatum</i>	101412	CBS
<i>Hericium coralloides</i>	107488	CBS
<i>Heterobasidion araucariae</i>	744.94	CBS
<i>Heterobasidion insulare</i>	451.76	CBS
<i>Inonotus dryadeus</i>	8674	DSMZ
<i>Irpex consors</i>	7382	DSMZ
<i>Irpex vellereus</i>	515.92	CBS
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	311.29	CBS
<i>Lentinellus cochleatus var. inolens</i>	913.87	CBS

Fortsetzung Tab. 2.15

Spezies	Stammsammlungsnummer	Anbieter
<i>Lentinus cladopus</i>	8256	DSMZ
<i>Marasmius cohortalis</i>	8257	DSMZ
<i>Meripilus giganteus</i>	8254	DSMZ
<i>Merulius tremellosus</i>	5031	DSMZ
<i>Microporus affinis</i>	105819	CBS
<i>Mycena epipterygia</i>	8733	DSMZ
<i>Nidula niveotomentosa</i>	380.80	CBS
<i>Oudemansiella platyphylla</i>	9224	DSMZ
<i>Panellus serotinus</i>	5204	DSMZ
<i>Phanerochaete tamariciphila</i>	339.95	CBS
<i>Phellinus igniarius</i>	4818	DSMZ
<i>Phlebia subserialis</i>	103253	CBS
<i>Pholiota nameko</i>	6908	DSMZ
<i>Pholiota squarrosa</i>	5127	DSMZ
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	5341	DSMZ
<i>Pleurotus flabellatus</i>	8299	DSMZ
<i>Polyporus squamosus</i>	426.48	CBS
<i>Polyporus tuberaster</i>	442.85	CBS
<i>Polyporus umbellatus</i>	483.72	CBS
<i>Punctularia atropurpurascens</i>	388.66	CBS
<i>Punctularia strigosozonata</i>	702.94	CBS
<i>Pycnoporus coccineus</i>	355.63	CBS
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	3023	DSMZ
<i>Stereum complicatum</i>	5182	DSMZ
<i>Stereum rameale</i>	3570	DSMZ
<i>Stropharia aeruginosa</i>	3374	DSMZ
<i>Termitomyces albuminosus</i>	1625	DSMZ
<i>Termitomyces poonensis</i>	200.90	CBS
<i>Trametes ochracea</i>	8243	DSMZ
<i>Trametes suaveolens</i>	5237	DSMZ
<i>Tyromyces chioneus</i>	5242	DSMZ
<i>Wolfiporia cocos</i>	279,55	CBS

Ausgewählt wurden überwiegend holzzersetzende Pilze, wobei vereinbarungsgemäß Weißfäulepilze oder Pilze, die weißfäuleähnliche Befallssymptome verursachen, bevorzugt wurden (Tab. 2.15). Bei der Auswahl wurde auf eine möglichst hohe biologische Diversität (2 Klassen, 7 Ordnungen, 23 Familien, 38 Gattungen) geachtet (Tab. 2.16), um das biochemische Potential von Basidiomyceten optimal zu nutzen. Aus jeweils einer Gattung wurden, wenn möglich, zwei Spezies gewählt.

Tab. 2.16: kladistische Einordnung der für das Lignocellulose Bioraffinerie Projekt verwendeten Pilze

Klasse	Ordnung	Familie	Gattung	Art		
Agaricomycetes	Agaricomycetes	Nidulariaceae	Cyathus	<i>Cyathus africanus</i>		
			Nidula	<i>Nidula niveotomentosa</i>		
		Strophariaceae	Stropharia	<i>Stropharia aeruginosa</i>		
			Pholiota	<i>Pholiota nameko</i> <i>Pholiota squarrosa</i>		
		Pleurotaceae	Pleurotus	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>		
				<i>Pleurotus flabellatus</i>		
		Physalacriaceae	Armillaria	<i>Armillaria bulbosa</i>		
			Oudemansiella	<i>Oudemansiella platyphylla</i>		
		Psathyrellaceae	Coprinus	<i>Coprinus clastophyllus</i> <i>Coprinus sterquilinus</i>		
		Fistulinaceae	Fistulina	<i>Fistulina hepatica</i>		
		Lyophyllaceae	Termitomyces	<i>Termitomyces albuminosus</i>		
				<i>Termitomyces poonensis</i>		
		Marasmiaceae	Marasmius	<i>Marasmius cohortalis</i>		
		Tricholomataceae	Panellus	<i>Panellus serotinus</i>		
	Mycena		<i>Mycena epipterygia</i>			
	Agaricomycetes	Aphylophorales	Ganodermataceae	Ganoderma	<i>Ganoderma anullaris</i> <i>Ganoderma applanatum</i>	
			Fomitopsidaceae	Ischnoderma	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	
			Phanerochaetaceae	Phanerochaete	<i>Phanerochaete tamariciphila</i>	
				Irpex	<i>Irpex consors</i> <i>Irpex vellereus</i>	
			Meruliaceae	Bjerkandera	<i>Bjerkandera fumosa</i>	
				Ceriporiopsis	<i>Ceriporiopsis rivulosa</i> <i>Ceriporiopsis resinascens</i>	
					Merulius	<i>Merulius tremellosus</i>
			Coriolaceae	Trametes	<i>Trametes ochracea</i> <i>Trametes suaveolens</i>	
					Abortiporus	<i>Abortiporus biennis</i>
					Meripilus	<i>Meripilus giganteus</i>
			Lentinaceae	Lentinus	<i>Lentinus cladopus</i>	
			Polyporaceae	Microporus	<i>Microporus affinis</i> <i>Microporus xanthopus</i>	
					Pycnoporus	<i>Pycnoporus coccineus</i> <i>Pycnoporus sanguineus</i>
				Polyporus	<i>Polyporus squamosus</i> <i>Polyporus tuberaster</i> <i>Polyporus umbellatus</i>	
					Tyromyces	<i>Tyromyces chioneus</i>
Dichomitus				<i>Dichomitus albidofuscus</i> <i>Dichomitus campestris</i> <i>Dichomitus squalens</i>		

Fortsetzung Tab. 2.16

Klasse	Ordnung	Familie	Gattung	Art
Agaricomycetes	Russulales	Bondarzewiaceae	Heterobasidion	<i>Heterobasidion insulare</i> <i>Heterobasidion araucariae</i>
		Auriscalpiaceae	Lentinellus	<i>Lentinellus cochleatus</i>
		Hericiaceae	Hericium	<i>Hericium cirrhatum</i> <i>Hericium coralloides</i>
		Stereaceae	Stereum	<i>Stereum complicatum</i> <i>Stereum rameale</i>
	Hymenochaetales	Hymenochaetaceae	Phellinus	<i>Phellinus igniarius</i>
			Inonotus	<i>Inonotus dryadeus</i>
	Corticiales	Punctulariaceae	Punctularia	<i>Punctularia atropurpurascens</i> <i>Punctularia strigosozonata</i>
		Corticaceae	Phlebia	<i>Phlebia subserialis</i>
	Auriculariales	Auriculariaceae	Auricularia	<i>Auricularia auricula-judae</i> <i>Auricularia fuscosuccinea</i> <i>Auricularia mesenterica</i> <i>Auricularia polytricha</i>
				Exidiaceae

Um bereits in der frühen Projektphase Schwierigkeiten bei einer späteren Patentierung zu vermeiden, war es notwendig, die verfügbare Literatur nach folgenden Punkten zu sichten:

- Die Anzahl der zu einem Pilz verfügbaren Publikationen sollte gering sein
- Das betraf besonders Publikation zum Thema Lignin abbauende Enzyme
- Keine bzw. wenige verfügbare Sequenzen für Gene und Proteine, die den Abbau von Lignin betreffen

Gegebenenfalls wurde auf eine verwandte, weniger gut untersuchte Art ausgewichen. Nach Abschluss des Screenings stellte sich heraus, dass es sich bei dem Pilz *Microporus affinis* um *Podoscypha spec* und bei *Meripilus giganteus* um *Stereum hirsutum* handelte. Dies wurde durch eine ITS-Sequenzierung festgestellt.

2.3.2 Bakterienstämme

Tab. 2.17: Die im Rahmen der Dissertation verwendeten Bakterienstämme, alphabetisch sortiert, mit Angaben zum Genotyp und Hersteller

Stamm	Genotyp	Hersteller
TOP 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
Rosetta 2 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (R _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1</i> <i>sam7 nin5</i>])	Takahara

2.4 Plasmide

Die cDNA der prolylspezifischen Peptidase wurde zuerst in pCR2.1 (Abb. 2.1) zwischenkloniert (Abb. 2.2). Anschließend wurden von ihr PCR-Produkte mit vollständiger Länge (1560 bp) amplifiziert, die als PsP A-pp bezeichnet wurden, da sie die Prekursorsequenz beinhalteten. Es wurden auch solche Amplifikate erzeugt, bei denen die Prekursorsequenz entfernt wurde, was dem nativen Zustand entspricht und die deshalb als PsP A-n (1490 bp) bezeichnet wurden.

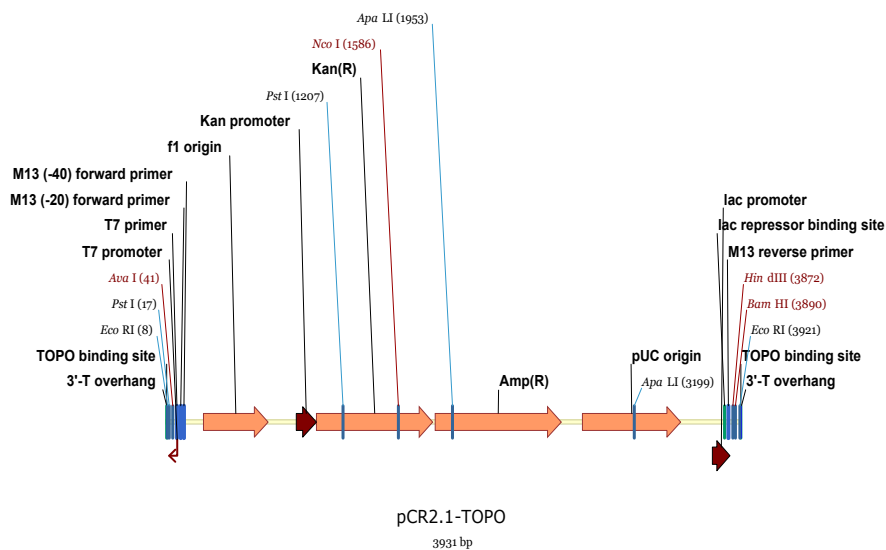


Abb. 2.1: Plasmid pCR2.1 mit Lokalisierung der einzelnen Gene und *Multiple Cloning Site*

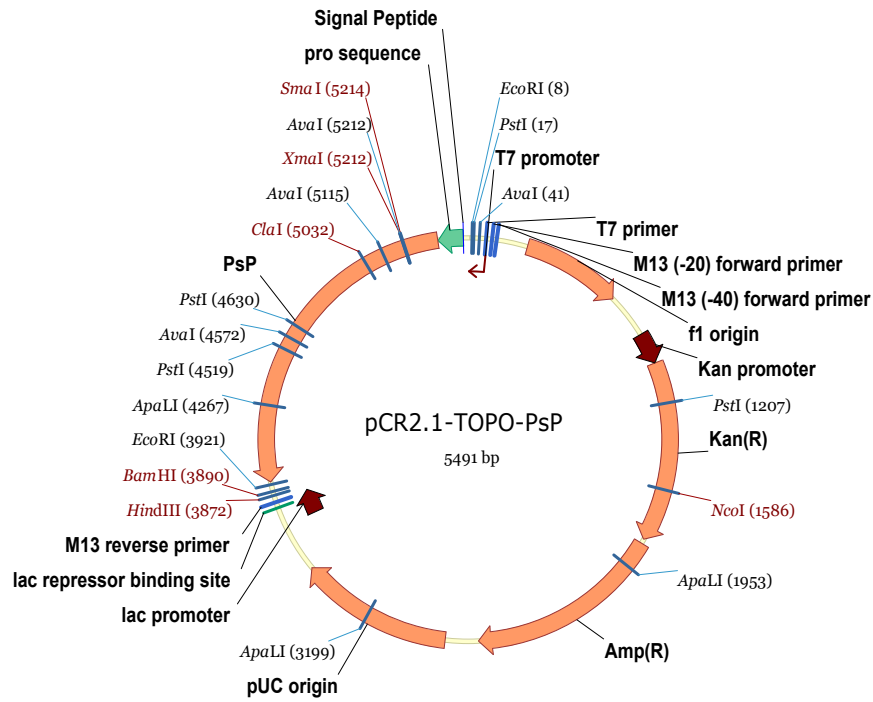


Abb. 2.2: Plasmid pCR2.1-TOPO-PsP A mit Lokalisierung der einzelnen Gene sowie der cDNA der PsP A und *Multiple Cloning Site*

Die PCR-Produkte PsP A-n und PsP A-pp wurden jeweils in die Expressionsvektoren pET15b (Abb. 2.3) und pET25b (Abb. 2.4) inkloniert. pET15b expremiert im Cytoplasma, pET25b in den periplasmatischen Raum.

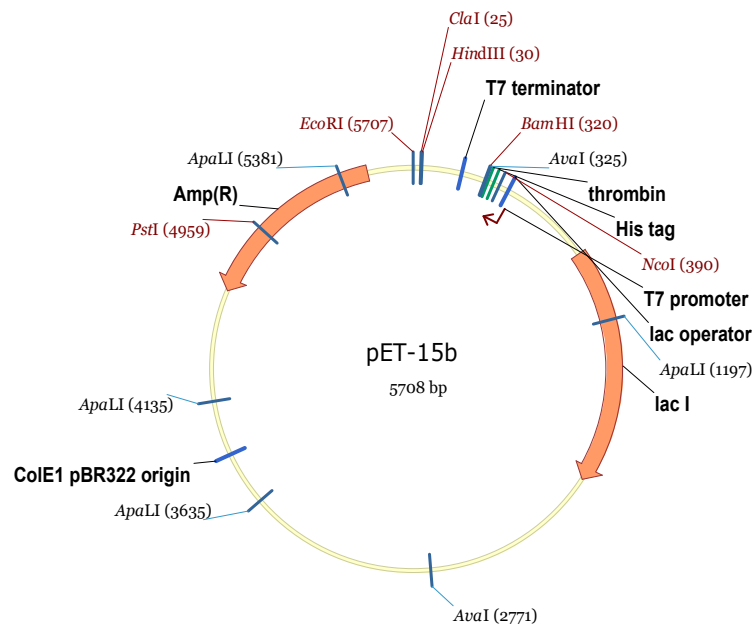


Abb. 2.3: Plasmid pET15b mit Lokalisierung der einzelnen Gene und *Multiple Cloning Site*

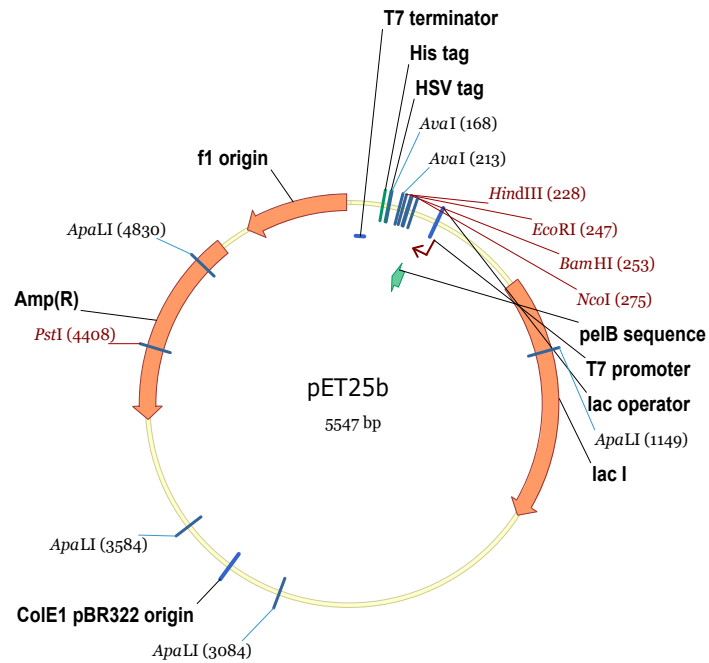


Abb. 2.4: Plasmid pET25b mit Lokalisierung der einzelnen Gene und *Multiple Cloning Site*

2.5 Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Eurofines geliefert und in einer Arbeitskonzentration von 10 pmol eingesetzt (Tab. 2.18). Die eventuelle Bildung von Primerdimeren oder unerwünschter Sekundärstrukturen wurde mit dem von MWG zur Verfügung gestellten Programm MOPS (multifunktionales Oligo Property Scan Tool) überprüft.

Tab. 2.18: Die im Rahmen der Dissertation verwendeten Primer, sortiert nach Anwendungsfeld, mit Nucleotidsequenz, Primerlänge und Schmelztemperatur (T_m)

Anwendungsfeld	Primer	Sequenz	Länge	T_m
cDNA-Synthese	SMART II™ Oligonucleotide	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'	30 bp	70,9 °C
	3' SMART™ CDS Primer II A	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CT(30)V N-3'	57 bp	67,4 °C
	5' PCR Primer II A	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'	23 bp	60,6 °C
Fischen des Gens	PSP A6-for	5'-TAY ACN GAR TTN CCN CCN TTN ACN TAY AC-3'	29 bp	64,6 °C
	PSP A7-rev	5'-AAY AAY GCN ACN CCN GAY CAR GCN C-3'	25 bp	66,3 °C
	PSP A-Anfang 74	5'-ATG GTG TCC TCC AGC CTG GCG GTG AGC TC-3'	29 bp	73,7 °C
	PSP A-Ende 74	5'-TCA TGA CTG CGA CTG CGC GGG GGC CGT-3'	27 bp	74,1 °C
	PSP A-inter-for 64	5'-GAT ACT TTG ACA TTA TTC GCA AGC ACA TGC-3'	30 bp	64,0 °C
	PSP A-intern-rev	5'-GGT GAG GTT CAT GCT GAA CGT CTG CTT-3'	27 bp	66,5 °C
	SMART oligo 66	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC-3'	27 bp	66,5 °C
	SMART CDS 64	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CTT TT-3'	29 bp	63,9 °C
	PSP A-pET15-for	5'-ATA TAT ATC ATA TGA TGG TGT CCT CCA GCC TGG CGG TGA G-3'	40 bp	72,5 °C
	PSP A-pET15-intern-for	5'-ATA TAT ATC ATA TGG GGA CCG AGC TCC CGC CGC-3'	33 bp	72,0 °C
Umklonierung in Expressionsvektor	PSP A-pET15-rev	5'-ATA TAT ATG GAT CCT CTC ATG ACT GCG ACT GCG CGG-3'	36 bp	71,7 °C
	PSP A-pET25-for	5'-ATA TAT ATG GAT CCG ATG GTG TCC TCC AGC CTG GC-3'	35 bp	71,8 °C
	PSP A-pET25-intern-for	5'-ATA TAT ATG GAT CCG GGG ACC GAG CTC CCG C-3'	31 bp	72,1 °C
	PSP A-pET25-rev-2	5'-ATA TAT ATG TCG ACT GAC TGC GAC TGC GCG GGG-3'	33 bp	72,0 °C
molekulare Charakterisierung	ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	20 bp	58,0 °C
	ITS5	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG-3'	21 bp	58,0 °C

2.6 Lösungen und Puffer

2.6.1 Puffer für Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer (Stammlösung, fünffach konzentriert)

Tris-Base	54,0 g L ⁻¹
Borsäure	27,5 g L ⁻¹
EDTA	0,4 g L ⁻¹

Ladepuffer (Stammlösung, fünffach konzentriert)

Glycerol	30,0 g L ⁻¹
EDTA	11,7 g L ⁻¹
Bromphenolblau	0,01 g L ⁻¹
Xylencyanol	0,01 g L ⁻¹
Orange G	0,01 g L ⁻¹

2.6.2 Lösung für Blau / Weiß-Screening

X-Gal-Lösung

X-Gal	400,0 g L ⁻¹
Gelöst in DMF	

2.6.3 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE

Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS-Lösung)

APS 400,0 g L⁻¹

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

Lower-Tris-Puffer (Stammlösung, vierfach konzentriert)

Tris 181,7 g L⁻¹

Natriumdodecylsulfat (SDS) 4,0 g L⁻¹

Eingestellt auf pH 8,8 mit HCl

Upper-Tris-Puffer (Stammlösung, vierfach konzentriert)

Tris 60,6 g L⁻¹

SDS 4,0 g L⁻¹

Eingestellt auf pH 6,8 mit HCl

Laufpuffer (Stammlösung, zehnfach konzentriert)

Tris 30,2 g L⁻¹

Glycin 144,2 g L⁻¹

SDS 10,0 g L⁻¹

Ladepuffer

Tris-HCl	18,7 g L ⁻¹
20%ige SDS-Lösung (w/v)	5,0 g L ⁻¹
Bromphenolblau	2,5 g L ⁻¹
Glycerol	287,5 mL L ⁻¹
Eingestellt auf pH 6,8 mit HCl	

Dithiothreitol-Lösung

Dithiothreitol	154,3 g L ⁻¹
----------------	-------------------------

2.6.4 Lösungen zur Färbung von Proteingelen

Kolloidale Coomassiefärbelösung

Coomassie Blue G250	1,0 g L ⁻¹
Ethanol	100,0 mL L ⁻¹
Al ₂ (SO ₄) ₃	5,0 g L ⁻¹
Phosphorsäure	23,5 mL L ⁻¹
Über Nacht rühren, anschließend abfiltrieren	

2.6.5 Lösung für das Blotten

10x Wet-Blot-Laufpuffer (Stammlösung, zehnfach konzentriert)

Glycin	144,1 g L ⁻¹
Tris	30,3 g L ⁻¹

2.6.6 Lösungen für kompetente Zellen

Lösung 1

CaCl₂ x2 H₂O 14,7 g L⁻¹

Tris-HCl 0,3 g L⁻¹

Einstellen auf pH 7,4 mit NaOH

Autoklavieren (121 °C, 20 min)

Lösung 2

Calciumchlorid-Dihydrat 14,7 g L⁻¹

Tris-HCl 0,3 g L⁻¹

Glycerol 100,0 mL L⁻¹

Einstellen auf pH 7,4 mit NaOH

Autoklavieren (121 °C, 20 min)

2.6.7 Antibiotikastammlösungen

Die Antibiotika wurden als 1000x Stocklösung angesetzt (Tab. 2.19).

Tab. 2.19: Die im Rahmen der Dissertation eingesetzten Antibiotika, alphabetisch sortiert, mit Angaben zu Konzentration in der Arbeitslösung und verwendeten Lösungsmittel

Arbeitskonzentration [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Lösungsmittel
100,0	H ₂ O
34,0	Ethanol
50,0	H ₂ O
50,0	H ₂ O
12,5	Ethanol

2.6.8 Lösungen und Puffer für den β -Glucosidaseassay

50 mM Citratpuffer pH 4,5

Citronensäure 5,4 g L⁻¹

Na₂HPO₄ 7,7 g L⁻¹

Substratlösung

p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid 2,0 g L⁻¹

Gelöst in 50 mM Citratpuffer pH 4,5

Standardlösungen

0 – 5 mM *p*-Nitrophenol 0,14; 0,28; 0,42; 0,56
und 0,70 g L⁻¹

Gelöst in 50 mM Citratpuffer pH 4,5

Stopplösung

EDTA-Dinatriumsalz 0,7 g L⁻¹

Na₂CO₃ 106,0 g L⁻¹

Gelöst in reinst H₂O

2.6.9 Lösungen und Puffer für den Esteraseassay

80 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0

KH₂PO₄ 4,5 g L⁻¹

Na₂HPO₄ 8,4 g L⁻¹

p-Nitrophenylacetat-Lösung

17,5 mM *p*-Nitrophenylacetat 3,2 g L⁻¹

gelöst in Ethanol

Arbeitslösung

p-Nitrophenylacetatlösung 200,0 mL L⁻¹

mit 80 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 ad 100,0 mL

2.6.10 Lösungen und Puffer für den Peptidaseassay

50 mM Citrat-Phosphatpuffer pH 4,0

Citronensäure 6,0 g L⁻¹

Na₂HPO₄ 6,8 g L⁻¹

Z-Gly-Pro-pNA-Lösung

Z-Gly-Pro-pNA 34,0 mg L⁻¹

Gelöst in Methanol

2.6.11 Lösungen und Puffer für den Laccase/Peroxidaseassay

0,05 M Natriumacetat-Puffer, pH-4,5

Natriumacetat 2,3 g L⁻¹

Essigsäure 1,3 g L⁻¹

H₂O₂-Lösung

30%ige H₂O₂

in 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 4,5

Katalase-Lösung

Katalase 100 U L⁻¹

in 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 4,5

ABTS-Lösung

ABTS 0,7 g L⁻¹

in 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 4,5

2.6.12 Puffer für die FPLC

Niedrigsalzpuffer IEX

Natriumacetat 2,2 g L⁻¹

Essigsäure 1,3 mL L⁻¹

anschließend Mikrofiltration des Puffers und Entgasung im Ultraschallbad

Hochsalzpuffer IEX

Natriumacetat	2,2 g L ⁻¹
Essigsäure	1,3 mL L ⁻¹
NaCl	58,4 g L ⁻¹

anschließend Mikrofiltration des Puffers und Entgasung im Ultraschallbad

Niedrigsalzpuffer HIC

Na ₂ HPO ₄	5,8 g L ⁻¹
Citronensäure	7,2 mL L ⁻¹

anschließend Mikrofiltration des Puffers und Entgasung im Ultraschallbad

Hochsalzpuffer HIC

Na ₂ HPO ₄	5,8 g L ⁻¹
Citronensäure	7,2 mL L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14 g L ⁻¹

anschließend Mikrofiltration des Puffers und Entgasung im Ultraschallbad

Niedrigsalzpuffer GFC

Natriumacetat	2,2 g L ⁻¹
Essigsäure	1,3 mL L ⁻¹

anschließend Mikrofiltration des Puffers und Entgasung im Ultraschallbad

Hochsalzpuffer GFC

Natriumacetat	2,2 g L ⁻¹
Essigsäure	1,3 mL L ⁻¹
NaCl	17,5 g L ⁻¹

anschließend Mikrofiltration des Puffers und Entgasung im Ultraschallbad

2.7 Eingesetzte Medien

2.7.1 Vorkulturmedien für Basidiomyceten

Zusammensetzung der Spurenelementlösung

FeCl ₃ x6 H ₂ O	0,080 g L ⁻¹
ZnSO ₄ x7 H ₂ O	0,090 g L ⁻¹
MnSO ₄ x1 H ₂ O	0,030 g L ⁻¹
CuSO ₄ x5 H ₂ O	0,005 g L ⁻¹
EDTA	0,400 g L ⁻¹

Zusammensetzung des SNL-Mediums

Glucose x1 H ₂ O	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0 mL L ⁻¹
Agar Agar (für feste Medien)	15,0 g L ⁻¹
eingestellt auf pH 6,0 mit NaOH	

Zusammensetzung des Malzextraktsojapeptonmediums

Malzextrakt	30,0 g L ⁻¹
Sojapepton	3,0 g L ⁻¹
Agar Agar (für feste Medien)	15,0 g L ⁻¹
eingestellt auf pH 5,6 mit HCl	

Für den unter diesen Bedingungen sehr langsam wachsenden Pilz *Inonotus dryadeus* wurde ein von der DSMZ empfohlenes modifiziertes Malzextraktsojapeptonmedium mit Aktivkohle gewählt.

Zusammensetzung des Malzextraktsojapepton/Aktivkohlemediums

Malzextrakt	30,0 g L ⁻¹
Sojapepton	3,0 g L ⁻¹
Aktivkohle	3,0 g L ⁻¹
Agar Agar (für feste Medien)	15,0 g L ⁻¹
eingestellt auf pH 5,6 mit HCl	

2.7.2 Hauptkulturmedien für Basidiomyceten

Generell wurden Medien bei Raumtemperatur gelagert, um eventuelle Kontaminationen frühzeitig erkennen zu können. Vitaminlösungen wie BME wurden erst bei Gebrauch sterilfiltriert hinzugegeben.

2.7.3 Medium für das PsP A-Projekt

Zusammensetzung des PsP A-Mediums

Glucose	10,0 g L ⁻¹
Gluten	5,4 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
TWEEN® 20	4,0 mL L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0 mL L ⁻¹
eingestellt auf pH 6,0 mit HCl	

2.7.4 Medien für Lignocelluloseprojekt

Basierend auf den Resultaten der chemischen Analyse des von der Firma Süd-Chemie AG gelieferten Substrats und breiten Voruntersuchungen zum Nährstoffbedarf von Basidiomyceten am Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde die Medien für das Screening entwickelt:

Zusammensetzung des Lignocellulose Mediums

Substrat (Süd-Chemie AG)	100,0 g L ⁻¹
Asparaginsäure	10,3 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ x1 H ₂ O	1,0 g L ⁻¹
BME (Sigma)	10,0 mL L ⁻¹
Agar Agar (für feste Medien)	15,0 g L ⁻¹
eingestellt auf pH 6,0 mit HCl	

Um einzelne Enzymaktivitäten zu steigern, wurde das Ausgangsmedium modifiziert. Zudem sollten kostenintensive Bestandteile wenn möglich entfernt und das Medium somit vereinfacht werden.

Zusammensetzung des Lignocellulose-Mediums ohne BME

Substrat (Süd-Chemie AG; feucht)	100,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ x1 H ₂ O	1,0 g L ⁻¹
eingestellt auf pH 6,0 mit HCl	

Zusammensetzung des Lignocellulose-Mediums mit doppelter Substratmenge

Substrat (Süd-Chemie AG; feucht)	200,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ x1 H ₂ O	1,0 g L ⁻¹
BME	10,0 mL L ⁻¹
eingestellt auf pH 6,0 mit HCl	

Zusammensetzung des Stroh-Mediums

Stroh (Süd-Chemie AG; trocken, gemahlen)	25,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ x1 H ₂ O	1,0 g L ⁻¹
BME	10,0 mL L ⁻¹
eingestellt auf pH 6,0 mit HCl	

Zusammensetzung des Lignocellulose Mediums (neu) ohne BME-Lösung

Neues Substrat (Süd-Chemie AG; feucht)	64,5 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ x1 H ₂ O	1,0 g L ⁻¹
eingestellt auf pH 6,0 mit HCl	

Zusammensetzung des neues Substrat / Stroh-Mediums

Neues Substrat (Süd-Chemie AG; feucht)	58,0 g L ⁻¹
Stroh (Süd-Chemie AG; trocken, gemahlen)	2,5 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ x1 H ₂ O	1,0 g L ⁻¹
eingestellt auf pH 6,0 mit HCl	

2.7.5 Medien für Bakterien

Zusammensetzung des LB-Mediums

Hefeextrakt	5,0 g L ⁻¹
Baktopepton	10,0 g L ⁻¹
NaCl	10,0 g L ⁻¹
Agar Agar (für feste Medien)	15,0 g L ⁻¹
eingestellt auf pH 8,0 mit NaOH	

Zusammensetzung des SOC-Mediums

Baktotrypton	20,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5,0 g L ⁻¹
NaCl	0,6 g L ⁻¹
KCl	0,2 g L ⁻¹
MgCl ₂ x6 H ₂ O	2,0 g L ⁻¹
MgSO ₄ x7 H ₂ O	2,5 g L ⁻¹
Glucose x1 H ₂ O	4,0 g L ⁻¹

Je nach Anwendung wurden dem Medium verschiedene Antibiotika als Selektionsmarker zugesetzt (Tab. 2.19). Generell wurden Medien dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Mit Antibiotika versetzte Medien wurden bei 4 °C gelagert.

2.8 Molekularbiologische Werkzeuge

Tab. 2.20: Die im Rahmen der Dissertation verwendeten Restriktionsenzyme, alphabetisch sortiert, mit Angaben zu Schnittstelle und Hersteller bzw. Distributor

Restriktionsenzym	Schnittstelle	Hersteller
Bam H1	G/GATCC	Fermentas
Nde1	CA/TATG	Fermentas
Sal1	G/TCGAC	Fermentas

Tab. 2.21: Die im Rahmen der Dissertation verwendeten molekularbiologischen Werkzeuge, nach Anwendungsfeld sortiert, mit Angaben zu Hersteller bzw. Distributor

Anwendungsfeld	weitere molekularbiologische Werkzeuge	Hersteller
Ligation	T4 DNA Ligase	Invitrogen
PCR	GC-Rich PCR System	Roche
	HotStar HiFidelity Polymerase Kit	QIAGEN
cDNA-Synthese	Advantage® 2 Polymerase Mix	Clontech
	SuperScript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen

2.9 Molekularbiologische Kits

Tab. 2.22: Die im Rahmen der Dissertation verwendeten Kits, sortiert nach Anwendung, mit Angabe des Hersteller bzw. Distributor

Anwendungsfeld	Kit	Hersteller
Isolierung genomischer DNA	NucleoSpin® Pant II Kit	Macherey & Nagel
cDNA-Synthese	Advantage® 2 PCR Kit	Invitrogen
Isolierung der RNA	RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
DNA-Reinigung / Gelelution	NucleoSpin® Extrakt II	Macherey & Nagel
Miniprep	NucleoSpin® Plasmid	Macherey & Nagel
N-Deglycosylierung	PNGase F	New England Biolabs

2.10 Kulturführung Pilze

2.10.1 Stammhaltung

Für die Arbeiten mit einem bestimmten Pilz wurde dieser aus dem Stammsammlungsröhrchen (Schrägagarröhrchen) genommen und mittig auf eine Agarplatte mit SNL- bzw. MEA-Medium gesetzt. Die Platte wurde bei 24 °C unter Lichtausschluss bebrütet bis das Myzel 5 mm vom Rand entfernt war. Dieser Vorgang nahm je nach Spezies vier Tage bis mehrere Wochen in Anspruch. Die Umsetzung des Myzels erfolgte spätestens nach einem Monat. Hierfür wurde vom Rand, der noch frische schnell wachsende Hyphen aufwies, ein kleines Agarstück ausgestochen und auf eine frische Platte übertragen. Die Größe des übertragenen Stücks sollte klein gehalten werden, um möglichst genetisch homogenes Material zu erhalten. Die Kulturplatte wurde für die weitere Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.10.2 Vorkultur

Die Vorkultur (SNL- oder MEA-Medium) wurden mit einem 1 cm² großen, gut mit Myzel bewachsenen Agarblock beimpft. Das Myzel sollte auch hier möglichst vom Rand der Kolonie genommen werden. Anschließend erfolgte die Homogenisierung mittels Ultraturax-Homogenisierer für 30 s bei 10000 rpm. Die Kultivierung dauerte eine Woche und erfolgte unter Schütteln (150 rpm) und Lichtausschluss bei 24 °C.

2.10.3 Hauptkultur

Für die Überimpfung wurde pro Kolben 10% des Füllvolumens der Hauptkultur an Vorkultur zugegeben. Vor der Überimpfung wurde die Vorkultur homogenisiert und gewaschen. Hierbei wurde die Vorkultur in einen 50 mL fassenden Falcontube überführt und bei 1600 bis 2900 g zentrifugiert (je nach Spezies neigte das Myzel dazu entweder zu verkleben oder ein zu lockeres Pellet zu bilden. Im ersten Fall war es nur noch unter großen Schwierigkeiten resuspendierbar, im letzteren wurde beim Dekantieren von Kulturbrühe oder Waschflüssigkeit viel Myzel aus dem Falcontube ausgetragen. Es war deshalb notwendig die Zentrifugationsgeschwindigkeit anzupassen). Die Kulturbrühe wurde verworfen und das Myzel mit sterilem reinst H₂O auf 50 mL aufgefüllt. Nach dem Resuspendieren des Pellets und gleichzeitiger Reinigung des Myzels von an diesem gebundenen Vorkulturresten durch Schütteln, wurde erneut bei 1600 bis 2900 g zentrifugiert. Die Waschflüssigkeit wurde wieder verworfen und dieser Schritt noch drei weitere Male wiederholt. Abschließend wurde das verbleibende Pellet mit der Menge an

sterilem Wasser aufgefüllt, die der Menge an Vorkultur, die Eingangs in den Falcontube gegeben worden war entsprach. Nach Beimpfung der Hauptkultur wurde diese unter Schütteln (150 rpm) bei 24 °C für eine (PsP A-Projekt) bzw. zwei (Lignocelluloseprojekt) Wochen unter Lichtausschluss im entsprechenden Hauptkulturmedium inkubiert.

2.10.4 Fermenter

Wenn Ansätze bis zu 5 L gefahren werden sollten konnte auf einen Fermenter ausgewichen werden. Die Verfahrensweise bei der Überimpfung entsprach der in Punkt 2.10.3 beschriebenen, mit der Abweichung, dass das gewaschene Myzel in einen vorher sterilisierten und abgedichteten Dreihalskolben überführt wurde. Die Verbindung zwischen Dreihalskolben und Fermenter wurde über einen Verbindungsschlauch mit Nadel hergestellt indem unter sterilen Bedingungen ein Septum durchstoßen wurde. Das Myzel wurde anschließend mit steriler Druckluft in den Fermenter gepumpt. Die Kulturführungsparameter waren wie folgt:

Begasungsrate	0,3 L min ⁻¹
Rührertyp	Propellerrührer 2x
Rührerdrehzahl	150 rpm
Temperatur	24 °C

Die Kultur wurde wie oben beschrieben zwei Wochen inkubiert. Um die Kultur dunkel zu halten, wurde der gläserne Fermenter mit Alufolie ummantelt.

2.10.5 Hauptkultur auf Agarplatten zwecks Screening

Die Überimpfung erfolgte hier mit einem Apfelnukleus, mit dem ein rundes Agarstück von 1,6 cm Durchmesser aus der Stammplatte ausgestochen und genau mittig auf die Agarplatte für das Screening überführt wurde. Zudem musste beim Gießen der Agarplatten die Flasche mit dem Medium regelmäßig geschwenkt werden, um ein Absetzen des Substrats (Süd-Chemie AG) zu verhindern und gleichbleibende Substratkonzentrationen in jeder Agarplatte zu erhalten.

2.11 Kulturführung Bakterien

2.11.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf LB-Agarplatten, die je nach Bakterienstamm und Plasmid, mit Antibiotika versetzt waren. Die Kulturplatten wurden maximal einen Monat zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde eine vereinzelte Kolonie gepickt und auf einer neuen Kulturplatte ausgestrichen.

2.11.2 Vorkultur

Sowohl die Vor- als auch die Hauptkultur wurden in LB-Medium durchgeführt. Je nach dem im Bakterium enthaltenen Selektionsmarker wurden dem Medium entsprechende Mengen Antibiotika zugegeben (Tab. 2.19). Das Beimpfen der Vorkultur erfolgte durch Aufnahme einer vereinzelnden Bakterienkolonie von der Agarplatte und Überführung derselben in ein mit 5 mL LB-Medium befülltes Falcontube. Das Falcontube wurde mit nur leicht angeschraubtem Deckel über Nacht bei 225 rpm und 37 °C schräggehend geschüttelt.

2.11.3 Hauptkultur

Die Hauptkulturen wurden in Erlenmeyerkolben unterschiedlichen Volumens (je nach Bedarf) durchgeführt, die mit 40% des maximalen Füllvolumens mit LB-Medium befüllt waren. Wie bei der Vorkultur wurden bei Bedarf verschiedene Antibiotika zugegeben. Bei höherem Sauerstoffbedarf konnte das Füllvolumen reduziert werden bzw. kamen Erlenmeyerkolben mit Schikanen zum Einsatz. Die Beimpfung erfolgte mit 10% Vorkultur mit anschließender Inkubation unter Schütteln bei 225 rpm und 37 °C.

2.12 Analytik des Lignocellulosesubstrats

2.12.1 Ermittlung des pH-Werts

Für die Bestimmung des pH-Werts wurden 100 g L⁻¹ Lignocellulosesubstrat I bzw. 64,5 g L⁻¹ Lignocellulosesubstrat II in destilliertem Wasser aufgeschlämmt und der pH-Wert mit einem pH-Meter ermittelt.

2.12.2 Trockenmassenbestimmung

Die Trockenmassenbestimmung erfolgte mit dem Gerät Moisture Analyser MA35 von der Firma Satorius.

2.12.3 Fettgehalt (Weibull-Stoldt)

Die Bestimmung des Fettgehalts erfolgte nach Weibull-Stoldt (siehe § 64 LFGB, Nr. L 08.00-6).

2.12.4 Gesamtstickstoffbestimmung (Kjedahl)

Die Bestimmung des Stickstoffgehalts erfolgte nach Kjeldahl (siehe §64 LFGB, Nr. L 01.00-10/1).

2.12.5 Bestimmung des Gehalts reduzierender Zucker (Luff-Schoorl)

Die Bestimmung des Zuckergehalts erfolgte nach Luff-Schoorl (siehe §64 LFGB, Nr. L 31.00-11).

2.12.6 Elementaranalyse

Für die Elementaranalysen wurde ein Gerät vom Typ Flash EA 1112 Series (Thermo Electron) eingesetzt. Die Analysen erfolgten bei 900 °C Betriebstemperatur; als Standard diente 4-(N,N-Dimethylamino)benzaldehyd.

2.13 Molekularbiologische Arbeiten

2.13.1 Agarosegelelektrophorese

Ein Volumenprozent Agarose wurde in einer entsprechenden Menge TBE-Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlung der in Puffer gelösten Agarose auf ungefähr 60 °C wurden 0,01% Ethidiumbromid zugegeben und die Mischung in den Gelschlitten gegossen. Nachfolgend wurde das verfestigte Gel in der Gelkammer mit TBE- Puffer überschichtet. Der Auftrag der Proben erfolgte in einer 1:1 Mischung mit Ladepuffer. Die Elektrophorese wurde bei 80 V Spannung betrieben.

2.13.2 Elution der DNA aus dem Agarosegel

Die Elution erfolgte gemäß dem Protokoll des Kits von Machery & Nagel. Das Ergebnis dieses Arbeitsschrittes wurde auf einem 1%igen Agarosegel überprüft.

2.13.3 Isolierung der Plasmide aus *Escherichia coli*

Die Isolierung erfolgte gemäß dem Protokoll des Kits von Machery & Nagel. Das Ergebnis dieses Arbeitsschrittes wurde auf einem 1%igen Agarosegel überprüft.

2.13.4 Isolierung der mRNA

In flüssigem Stickstoff gefrorenes Myzel wurde mit dem Mörser feingemahlen und die RNA mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits isoliert. Die Qualität des Isolats wurde auf einen Agarosegel überprüft. Hierfür wurde 5 µL des RNA-Isolats eine Stunden lang bei 50 °C im Autocycler inkubiert.

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Denaturieren	1	50	3600

Diese Probe wurde zusammen mit nicht inkubierter RNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Abschließend wurde der Gehalt an RNA photometrisch bestimmt.

2.13.5 cDNA-Synthese

Die Einzelstrangsynthese wurde mit der SuperScript® III Reverse Transcriptase unter Verwendung des Primerpaars SMART II oligo/SMARTCDS II A (Tab. 2.18) durchgeführt. Folgendes Schema stellt das Programm für den Autocycler dar:

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Denaturieren	1	42	3600

Die nachfolgende cDNA-Synthese erfolgte mit dem Advantage® 2 PCR Kit. Hierfür wurde der Primer PCR Primer 2A verwendet. Der Autocycler wurde mit dem folgenden Programm betrieben:

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Denaturieren	1	95	480
Denaturieren		95	30
Annealing	30	55	30
Elongation		72	180
Elongation	1	72	300

Die Qualität der cDNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt.

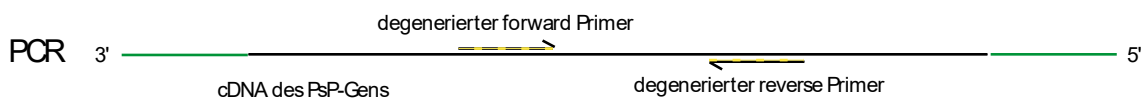
2.13.6 Primerentwicklung für die Klonierung der PsP A

In einen ersten Schritt musste die noch unbekannt cDNA-Sequenz der PsP A ermittelt werden. Hierfür wurde aus den Peptidsequenzergebnissen der isolierten PsP A-Proteinbande Nucleotidsequenzen abgeleitet, die zur Synthese der degenerierten Primer PsP A6 for und PsP A7 rev herangezogen wurden. Für die PCR wurden jeweils die Primerpaare PsP A6 for/SMART2oligo und SMART2oligo/PsP A7 rev benutzt.

Peptidsequenz ... Leu Gly Gly Ser Trp Ala Gly Ala Leu ...

Ableitung der degenerierten

Primer ... YTN GGN GGN WSN TAR GCN GGN GCN YTN ...



Sequenzierung der PCR-Produkte und Ableitung der Primer

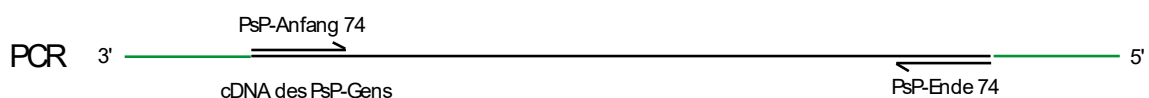


Abb. 2.5: Für die Klonierung der PsP A-cDNA eingesetzte Primer. Mit den degenerierten Primern wurde der erste Sequenzabschnitt amplifiziert. Mit dessen Hilfe wurden nichtdegenerierte Primer entwickelt, die dann mit dem Primer SMART2oligo für die Ermittlung der vollständigen Sequenz eingesetzt wurden.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Mittels NucleoSpin® Extrakt II wurden die PCR-Produkte isoliert und anschließend sequenziert. Aus den so erhaltenen Sequenzen wurden dann die Primer für Anfang (PSP Anfang 74) und Ende (PsP A Ende 74) der PsP A-cDNA erstellt. Aufgrund des hohen GC-Gehalts an den Enden der PsP A-cDNA musste die PCR mit dem GC Rich PCR Kit durchgeführt werden

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Denaturieren	1	95	60
Denaturieren		95	15
Annealing	35	65	30
Elongation		68	120
Elongation	1	68	180

2.13.7 TOPO-Klonierung

Die TOPO-Klonierung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen). Nach abgeschlossener Ligation wurde das Plasmid in TOP10-*Escherichia coli* transformiert.

2.13.8 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsansatz wurde ein zu den eingesetzten Restriktionsenzymen passender Puffer (Bam H1-Puffer von Fermentas für alle Restriktionsenzyme) gewählt und der Ansatz nach folgendem Schema pipetiert.

Ansatz für den Restriktionsverdau

nucleasefreies ddH ₂ O	16 µL
10x Bam H1 Puffer	2 µL
DNA (0,5-1 µg µL ⁻¹)	1 µL
<u>Restriktionsenzym</u>	<u>1 µL</u>
Gesamtvolumen	20 µL

Die Reaktion lief bei 37 °C für 1 – 2 h ab und wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 80 °C für 10 min gestoppt. Das geschnittene Fragment wurde mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt. Die Zielbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert.

2.13.9 Ligation

Für die Ligation wurden geschnittenes Fragment sowie Plasmid im Verhältnis 3:1 in den Ligationsansatz gegeben.

Ligationsansatzes

Plasmid	DNA-Gehalt anpassen
DNA	DNA-Gehalt anpassen
Puffer	1,0 µL
Ligase	1,0 µL
Ad mit ddH ₂ O zu	5,0 µL

Die Ligation wurde bei 14 °C über Nacht durchgeführt.

2.13.10 Transformation

50 µL tiefgefrorene kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Es wurden 2 µL einer plasmidhaltigen Lösung zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der darauffolgende Hitzeschock erfolgte bei 42 °C im Heizblock für 30 – 60 s und eine nachfolgende rasche Abkühlung des Ansatzes auf Eis. Nach Zugabe von 250 µL SOC-Medium folgt eine einstündige Inkubation bei 37 °C unter Schütteln (225 rpm). Um vereinzelte Kolonien zu bekommen, wurden unterschiedliche Mengen des Ansatzes auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert (50 µL und 250 µL). Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.13.11 Blau/Weißscreening

Die Oberfläche von LB-Agarplatten wurde für das Blau / Weiß-Screening mit 40 µL X-Gal-Lösung bestrichen.

2.13.12 Erzeugung kompetenter Zellen

Eine vereinzelte Kolonie eines *E. coli*-Stammes wurde von einer Stammhaltungsplatte (LB-Agar) gepickt und zur Beimpfung einer Vorkultur von 20 mL LB-Medium in einen 100 mL Erlenmeyerkolben eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und unter Schütteln (225 rpm). Die Vorkultur wurde am nächsten Morgen zur Beimpfung der Hauptkultur herangezogen. Je nach verwendetem Stamm wurden zu dem in einem 500 mL-Erlenmeyerkolben vorgelegten LB-Medium (200 mL) bei Bedarf unterschiedliche Antibiotika zugegeben. Die Menge an zugegebener Vorkultur wurde so gewählt, dass in der Hauptkultur eine OD₆₀₀ von 0,05 vorlag. Ab einer OD₆₀₀ von 0,8 – 0,9 wurde die Kulturbrühe in ein steriles Falcontube überführt und 15 min auf Eis gelagert bevor sie bei 2.600 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5% des Ausgangsvolumens an eisgekühlter Lösung 1 (Abschnitt 2.6.6) resuspendiert. Nachfolgend wurde erneut bei 2.600 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit der gleichen Menge eisgekühlter Lösung 2 (Abschnitt 2.6.6) resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in Aliquoten von je 50 µL in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.13.13 Anlegen von Kryokulturen von *E. coli*

Für das Anlegen von Kryokulturen wurden 400 µL steriles 80%iges Glycerol in einem Kryoröhrchen vorgelegt und 1.600 µL einer frischen *E. coli*-Kulturbrühe, bei der sich die Bakterien noch in der Log-Phase befanden, zugegeben und vermischt. Das befüllte Kryoröhrchen wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.13.14 Genetische Typisierung der Pilze

Das Myzel der Pilze wurde im gefrorenen Zustand unter Verwendung von flüssigem Stickstoff in einen Mörser aufgeschlossen. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mittels NucleoSpin® Pant II Kit.

Die Konzentration der genomischen DNA wurde photometrisch bestimmt und folgender Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion zusammenpipetiert. Eingesetzt wurde hierbei das HotStar HiFidelity Polymerase Kit von Qiagen.

Ansatz für eine Polymerasekettenreaktion

ddH ₂ O	20,0 µL
HotStar HiFidelity PCR Puffer	2,5 µL
1,5 mM dNTP	0,5 µL
ITS4	0,5 µL
ITS5	0,5 µL
gen. DNA (1 – 200 ng proReaktionsansatz)	0,5 µL
<u>2,5 U µL⁻¹ HotStar HiFidelity DNA Polymerase</u>	<u>0,5 µL</u>
Gesamtvolumen	25,0 µL

Das folgende Programm wurde für die genetische Typisierung der Pilze (ITS) mittels Polymerasekettenreaktion angewendet:

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Denaturieren	1	95	480
Denaturieren		95	30
Annealing	30	51	30
Elongation		72	60
Elongation	1	72	300

Die PCR-Produkte wurden über Agarosegelelektrophorese und anschließende Gelelektion gereinigt. Die Sequenzierung der erhaltenen Banden wurden mit dem Primer ITS4 von der Firma EUROFINS durchgeführt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von NCBI-BLAST zugeordnet.

2.14 Proteinbiochemische Arbeiten

2.14.1 Proteinbestimmung

Es wurde eine Kalibrierreihe mit BSA gelöst in ddH₂O erstellt, die in 100 ng mL⁻¹ Schritten verlief. Die kommerzielle Bradfordstammlösung wurde durch Verdünnen mit vier Teilen ddH₂O zur Arbeitslösung. Die Messung der Proben sowie der Kalibrierreihe

erfolgte photometrisch bei 450 nm und 590 nm. Dabei wurden 200 µL Probe mit 800 µL Arbeitslösung versetzt. Aus den beiden Messwerten wurde der Quotient gebildet (450 nm/590 nm) und gegen die Konzentration aufgetragen. Eine daraus abgeleitete Kalibriergerade bildete die Basis für die Bestimmung des Proteingehaltes der Proben durch Einsetzen des Quotienten in die Formel der Kalibrierreihe.

2.14.2 Proteinfällung

Fällung mittels Trichloressigsäure (TCA)

72%ige TCA wurde zur Probe gegeben, so dass eine Endkonzentration von 20% erreicht wurde. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis gelagert und das ausgefallene Protein anschließend bei 18.000 g für 30 min in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde mit 400 µL eiskaltem Aceton gewaschen und bei 18.000 g für 10 min erneut pelletiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Das gereinigte Pellet wurde in Lämmli-Puffer aufgenommen und unter Schütteln 15 min bei 65 °C resuspendiert.

Fraktionierte Fällung mittels Ammoniumsulfat

Die Probe wurde in einem ersten Schritt durch eine Ethanol-fällung von niedermolekularen Bestandteilen befreit, die die nachfolgende Ammoniumsulfatfällung bei höheren Konzentrationen (ab circa 35% Sättigung) stören. Hierbei wurde eine Ethanolkonzentration gewählt, bei der das Zielprotein vollständig ausfiel (70%). Das vom Überstand befreite Pellet wurde in 50 mM Na-Acetatpuffer pH 4,6 gelöst.

Die Probe wurde in einem ersten Schritt auf eine Ammoniumsulfatsättigung von 32% eingestellt, bei der das Zielprotein noch nicht ausfiel. Es folgte eine Pelletierung bei 2.600 g für 30 min. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand auf eine Sättigung von 44% gebracht. Nachfolgend wurde bei 2.600 g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 mM Na-Acetatpuffer aufgenommen. Hierfür wurde mit einem heißen Skalpell der untere Teil des Falcontubes kurz über dem Pellet abgetrennt um Verschleppungen von Überstandresten, die sich noch an der Innenwand des Falcontubes befanden, zu vermeiden.

Die Probe wurde anschließend für nachfolgende Schritte per Ultrafiltration (JUMBOSEP 30K DISK, Pall) entsalzt. Die Bestimmung der Sättigung erfolgte über einen Leitfähigkeitsmesser, für den zuvor eine Kalibrierkurve mit Ammoniumsulfatstandards erstellt wurde.

2.14.3 Enzymassays

Die Enzymassays wurden photometrisch durchgeführt. Die Ermittlung der Aktivität erfolgte über die Formel (2.1).

$$A = \frac{V_G \times \Delta E \times F \times 10^6}{V_P \times \varepsilon \times d} \quad (2.1)$$

A:	Enzymaktivität	[U L ⁻¹]
d:	Schichtdicke der Küvette	[cm]
ΔE:	Extinktionsänderung	[min ⁻¹]
F:	Verdünnungsfaktor	[-]
V _P :	Volumen der Probe	[μL]
V _G :	Gesamtvolumen	[μL]
ε:	Extinktionskoeffizient	[L μmol ⁻¹ cm ⁻¹]

β-Glucosidaseassay (pNP-β-D-Glucopyranosid)

Aufgrund der hohen Probenzahl wurde dieser Assay mit dem Plattenreader durchgeführt. Die eingesetzten Lösungen mussten für den Versuch auf jeweils 25 °C vortemperiert werden. Die hierfür benutzten 96-Loch-Platte wurden nach folgendem Pipettierschema befüllt. Die eingesetzten Puffer sind Kapitel 2.6.8 in beschrieben.

Citratpuffer	70,0 μL
Substratlösung	20,0 μL
Enzymlösung/Kulturüberstand	10,0 μL
Inkubation für 10 min bei 25 °C, dann:	
<u>Stopp-Lösung</u>	<u>100,0 μL</u>
Gesamtvolumen	200,0 μL

Die Messung der Extinktion erfolgte bei 405 nm gegen einen Blindwert aus den jeweiligen Überständen ohne Substrat. Die Überstände wurden für die Messung unverdünnt zugegeben. Die Aktivität wurde anhand einer Kalibriergeraden ermittelt (Extinktionskoeffizient *p*-Nitrophenol: $\epsilon_{405\text{nm}/\text{pH } 7,0} = 0,00985 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Esteraseaktivitätsassay

20 μL Probe und 130 μL 80 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 wurden in eine Vertiefung der 96-Loch-Platte pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μL des Substrats *p*-Nitrophenylacetat gestartet und die Extinktion bei 405 nm und 30 °C über einen Zeitraum von 10 min gemessen (Extinktionskoeffizient *p*-Nitrophenol: $\epsilon_{405\text{nm}/\text{pH } 7,0} = 0,00985 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Peptidaseaktivitätsassay (prolylspezifisch)

Die Aktivität wurde photometrisch durch die Hydrolyse des Peptidanalogs Z-gly-pro-pNA bei einer Wellenlänge von 410 nm und einer Temperatur von 40 °C bestimmt (Extinktionskoeffizient *p*-Nitroanilin: $\epsilon_{420\text{nm}/\text{pH } 4,0} = 0,001 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Der Reaktionsansatz beinhaltete 100 μL Probe, 890 μL 50 mM Citrat-Phosphatpuffer pH 4 und 10 μL einer 8 mM Z-gly-pro-pNA-Lösung. Die Kinetik wurde über 10 min verfolgt.

Laccase/Peroxidasassay (ABTS)

2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) diente als Substrat, welches durch Laccasen bzw. durch Peroxidasen umgesetzt wurde. Das Radikalkation wurde bei 40 °C 10 min photometrisch quantifiziert ($\lambda = 420 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{ABTS}^{\bullet+}} = 0,0432 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Um ausschließlich Laccaseaktivität zu bestimmen wurde zum Ansatz zusätzlich Katalase (Sigma Aldrich, isoliert aus Rinderleber) gegeben, um eventuell im Überstand vorhandenes H₂O₂ zu zerstören.

Testansatz für die Bestimmung der Laccaseaktivität

5 U L ⁻¹ Katalase in 0,05 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,5	50,0 µL
1,25 mM ABTS-Lösung	100,0 µL
<u>Kulturüberstand</u>	<u>100,0 µL</u>
Gesamtvolumen	250,0 µL

Die Messung der Peroxidaseaktivität erfolgte unter Zugabe von H₂O₂ und ohne Katalase.

Testansatz für die Bestimmung der Peroxidaseaktivität

30%ige H ₂ O ₂ -Lösung	50,0 µL
1,25 mM ABTS-Lösung	100,0 µL
<u>Kulturüberstand</u>	<u>100,0 µL</u>
Gesamtvolumen	250,0 µL

Da die Messwerte der Peroxidaseaktivität noch Laccaseaktivität beinhalteten wurde zur Berechnung der Messwert der Laccaseaktivität von der Peroxidaseaktivität abgezogen (2.2).

$$A_{\text{Peroxidase}} = A_{\text{gesamt}} - A_{\text{Laccase}} \quad (2.2)$$

2.14.4 Deglycosylierung

Zur Bestimmung des Grads an N-Glycosylierung von PsP A wurden die Oligosaccharide mittels PNGase F (PNGase F ist Teil eines Enzymkits von New England Biolabs, das auch den Denaturierungspuffer, 10x G7-Reaktionspuffer und 10% NP-40 umfasst) von den N-Glycosylierungsstellen abgespalten. PsP A wurde mit Hilfe eines Denaturierungspuffers

bei 95 °C für 4 min denaturiert. Anschließend wurde der Denaturierungsansatz auf Eis gekühlt. Die unten aufgeführten Komponenten für den Deglycosylierungsansatz wurden zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 h. Nach dem Auftragen einer unbehandelten und einer deglycosylierten Probe der PsP A auf ein SDS-PAGE Gel konnte anhand des Massenunterschieds der Grad der N-Glycosylierung berechnet werden.

Denaturierungsansatz

PsP A (3 µg µL ⁻¹)	4 µL
Denaturierungspuffer	1 µL
ddH ₂ O	ad 10 µL

Deglycosylierungsansatz

Denaturierungsansatz	10 µL
10x G7-Reaktionspuffer	2 µL
10% NP-40	2 µL
PNGase F	2 µL
ddH ₂ O	ad 20 µL

2.14.5 Probenkonzentrierung

Der Kulturüberstand wurde von Schwebstoffen mittels Zentrifugation bei 4 °C und 4.700 g befreit. Darauffolgend wurde der Kulturüberstand durch Ultrafiltration (JUMBOSEP 30K DISK, Pall) bei 4 °C und 4.700 g eingeengt. Die Membran der Ultrafiltrationseinheit bestand aus Polyethersulfon, ihre Ausschlussgrenze betrug 10 kDa. Anschließend erfolgte eine weiter Abtrennung von Schwebstoffen in der Probe durch Zentrifugation bei 4 °C und 18.000 g sowie die Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford.

2.14.6 SDS-PAGE

Herstellung des Gels

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde entsprechend dem Protokoll von Laemmli [9] durchgeführt. Verwendet wurden diskontinuierliche Gele mit einem 6%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel. Die Zusammensetzung des Gels ist im Folgenden dargestellt:

	6 %iges Sammelgel	12 %iges Trenngel
ddH ₂ O	1,8 mL	2,7 mL
Upper Tris	0,75 mL	-
Lower Tris	-	1,5 mL
Rotiphorese Gel 40	0,45 mL	1,8 mL
APS	10,0 µL	15,0 µL
TEMED	4,0 µL	7,5 µL

Nach dem Einfüllen der Trenngelmischung zwischen die Glasplatten (4/5 des Volumens) wurde mit Isopropanol überschichtet. Das Gel härtete nach 30 min aus. Das Isopropanol wurde verworfen und das Trenngel mit der Sammelgelmischung bis zum oberen Rand der Glasplatten überschichtet. Abschließend wurden die Kämmen eingeführt, wobei überschüssige Sammelgelmischung verdrängt wurde. Nach einer Aushärtezeit von weiteren 30 min war das Gel einsatzbereit.

Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Proben wurden von diesen je 15 μL mit 13 μL Auftragspuffer und 3 μL DTT-Lösung gemischt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min gekocht.

Elektrophorese

Die fertigen Gele wurden in die entsprechende Elektrophoresevorrichtung eingespannt und die Reservoirs von Anode und Katode mit Laufpuffer gefüllt. Nach der Entfernung der Kämme aus den Geltaschen wurden diese mit Puffer gespült und mit Probe bzw. Proteinmarker befüllt. Vom Start bis zum Erreichen des Trenngels wurde die Elektrophorese mit 10 mA pro Gel betrieben, danach mit 20 mA pro Gel.

Färbung

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Färbung mit Coomassie brilliant blue R250 Färbung (siehe Coomassie Färbung).

2.14.7 Blotten

Der Western Blot wurde als Wet Blot ausgeführt. Die Proteinbande wurde bei einer Spannung von 100 V und einer Transferdauer von 1 h auf eine PVDF-Membran übertragen (Gültekin und Heermann 1988). Die Bande auf der Membran wurde nach Abschluss des Vorgangs mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt und ausgeschnitten.

2.14.8 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die IEF wurde mit den Produkten der Firma SERVA (Puffer, Marker und Gele) nach deren Protokollen durchgeführt. Es wurden jeweils 5 μL Marker, sowie 5 μL Probe aufgetragen. Die Laufstrecke der Standardproteine wurde gegen ihren isoelektrischen Punkt aufgetragen und mit einer daraus abgeleiteten Regressionsgraden der isoelektrische Punkt des Zielproteins bestimmt.

Elektrophoresebedingung:

1 h bei 60 V

1 h bei 200 V

30 min bei 500 V

Die Elektrophorese wurde bei 4 °C durchgeführt

2.14.9 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Zum Einsatz kam eine Säule vom Typ XK 26/40 (Säulenvolumen 130 mL), die mit dem Säulenmaterial Superdex befüllt wurde. Sie wurde bei einer Flussrate von 4 mL min^{-1} und einer Temperatur von $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ betrieben. Der Proteingehalt wurde bei 280 nm mittels UV-Detektion bestimmt. Mit einem Autosampler wurden während des Laufs Fraktionen von je 7 mL gesammelt, die anhand des oben beschriebenen Enzymtest auf die Zielaktivität untersucht wurden. Ein 50 mM Na-Acetatpuffer, $\text{pH } 4,6$ diente als Laufpuffer, die Elution erfolgte durch einen 50 mM Na-Acetatpuffer mit 1 mol L^{-1} NaCl, $\text{pH } 4,6$. Das Programm ist nachfolgend dargestellt:

IEX-Programm

1. Spülen des Systems

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 4,0 mL min⁻¹, Volumen 25 mL, 4 °C)

Pumpe A: 100%, 50 mM Na-Acetatpuffer

Pumpe B: 0%, 50 mM Na-Acetatpuffer + 1 M NaCl

2. Einstellung der UV-Nulllinie

3. Spülen des Systems

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 4,0 mL min⁻¹, Volumen 5 mL, 4 °C)

Pumpe A: 100%, 50 mM Na-Acetatpuffer

Pumpe B: 0%, 50 mM Na-Acetatpuffer + 1 M NaCl

4. Beladung der Säule mit dem Probenmaterial

Probeneinspeisung (Flussgeschwindigkeit 4,0 mL min⁻¹, Volumen 20 mL, 4 °C)

5. Gradient

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 4,0 mL min⁻¹, Volumen 130 mL, 4 °C)

Pumpe A: 100%, 50 mM Na-Acetatpuffer

Pumpe B: 0%, 50 mM Na-Acetatpuffer + 1 M NaCl

6. Gradient

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 4,0 mL min⁻¹, Volumen 1000 mL, 4 °C)

Pumpe A: 82%, 50 mM Na-Acetatpuffer

Pumpe B: 18%, 50 mM Na-Acetatpuffer + 1 M NaCl

7. Gradient

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 4,0 mL min⁻¹, Volumen 260 mL, 4 °C)

Pumpe A: 72%, 50 mM Na-Acetatpuffer

Pumpe B: 28%, 50 mM Na-Acetatpuffer + 1 M NaCl

8. Gradient

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 4,0 mL min⁻¹, Volumen 30 mL, 4 °C)

Pumpe A: 0%, 50 mM Na-Acetatpuffer

Pumpe B: 100%, 50 mM Na-Acetatpuffer + 1 M NaCl

9. Spülen des Systems

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 4,0 mL min⁻¹, Volumen 260 mL, 4 °C)

Pumpe A: 100%, 50 mM Na-Acetatpuffer

Pumpe B: 0%, 50 mM Na-Acetatpuffer + 1 M NaCl

Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Es wurden Säule aus dem HiTrap HIC Selection Kit eingesetzt (Säulenmaterial: Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, Octyl Sepharose 4 Fast Flow, Butyl Sepharose 4 Fast Flow, Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow, Säulenvolumen: 1,0 mL) und bei einer Flussrate von

1 mL min⁻¹ und einer Temperatur von 4 °C betrieben. Der Proteingehalt wurde bei 280 nm mittels UV-Detektion bestimmt. Mit einem Fraktionssammler wurden während des Laufs Fraktionen von je 1 mL gesammelt, die anhand des oben beschriebenen Enzymtest auf die Zielaktivität untersucht wurden. Ein 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer mit 1 mol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ (pH 3,6) diente als Laufpuffer, die Elution erfolgte durch einen 50 mM Na-Acetatpuffer (pH 3,6). Das Programm für den Lauf ist nachfolgend dargestellt:

HIC-Programm

1. Spülen des Systems

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 1,0 mL min⁻¹, Volumen 5 mL, 4 °C)

Pumpe A: 0%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer + 1 M NH₄SO₄

Pumpe B: 100%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer

2. Einstellung der UV-Nulllinie

3. Spülen des Systems

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 1,0 mL min⁻¹, Volumen 1 mL, 4 °C)

Pumpe A: 100%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer + 1 M NH₄SO₄

Pumpe B: 0%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer

4. Beladung der Säule mit dem Probenmaterial

Probeneinspeisung (Flussgeschwindigkeit 1,0 mL min⁻¹, Volumen 2 mL, 4 °C)

5. Gradient

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 1,0 mL min⁻¹, Volumen 2 mL, 4 °C)

Pumpe A: 100%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer + 1 M NH₄SO₄

Pumpe B: 0%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer

6. Gradient

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 1,0 mL min⁻¹, Volumen 20 mL, 4 °C)

Pumpe A: 100%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer + 1 M NH₄SO₄

Pumpe B: 0%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer

7. Gradient

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 1,0 mL min⁻¹, Volumen 10 mL, 4 °C)

Pumpe A: 0%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer + 1 M NH₄SO₄

Pumpe B: 100%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer

8. Spülen des Systems

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 1,0 mL min⁻¹, Volumen 10 mL, 4 °C)

Pumpe A: 0%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer + 1 M NH₄SO₄

Pumpe B: 100%, 50 mM Na-Citrat/HCl-Puffer

Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Es wurde die Säule HiLoad 16/60 XK 200 µg (Säulenmaterial: Superdex 200 prep grade, Säulenvolumen: 120 - 124 mL) bei einer Flussrate von 0,3 mL min⁻¹ und einer Temperatur von 4 °C betrieben. Der Proteingehalt wurde bei 280 nm mittels UV-Detektion bestimmt. Mittels Fraktionssammler wurden während des Laufs Fraktionen von je 7 mL gesammelt, die anhand des oben beschriebenen Enzymtests auf die Zielaktivität untersucht wurden. Ein 50 mM Na-Acetatpuffer mit 300 mM L⁻¹ NaCl, pH 4,6 diente als Laufpuffer. Das Programm für den Lauf ist nachfolgend dargestellt:

GFC-Programm

1. Spülen des Systems

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 0,25 mL min⁻¹, Volumen 25 mL, 4 °C)

Pumpe A: 100%, 50 mM Na-Acetatpuffer

Pumpe B: 0%, 50 mM Na-Acetatpuffer + 0,3 M NaCl

2. Einstellung der UV-Nulllinie

3. Spülen des Systems

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 0,25 mL min⁻¹, Volumen 5 mL, 4 °C)

Pumpe A: 100%, 50 mM Na-Acetatpuffer

Pumpe B: 0%, 50 mM Na-Acetatpuffer + 0,3 M NaCl

4. Beladung der Säule mit dem Probenmaterial

Probeneinspeisung (Flussgeschwindigkeit 0,25 mL min⁻¹, Volumen 1 mL, 4 °C)

5. Probenlauf

Isokratischer Fluss (Flussgeschwindigkeit 0,25 mL min⁻¹, Volumen 130 mL, 4 °C)

Pumpe A: 100%, 50 mM Na-Acetatpuffer

Pumpe B: 0%, 50 mM Na-Acetatpuffer + 0,3 M NaCl

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung einer prolylspezifischen Peptidase

3.1.1 PsP A-Aktivität im Verlauf einer einwöchigen Kultivierung

Für die Isolierung des Enzyms war es notwendig, den Verlauf der Aktivität über die Kultivierungsdauer von zwei Wochen in einem induzierenden Medium (beschriebenes Hauptkulturmedium für PsP) aufzunehmen. Dies diente der Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Beprobung. Die PsP-Aktivität stieg in den ersten fünf Tagen schnell an, um ab dem achten Tag in eine Plateauphase bei ungefähr $2,8 \text{ mU L}^{-1}$ überzugehen. Diese wurde bis zum Ende der Kultivierung nach einer weiteren Woche durchgängig gehalten (Abb. 3.1).

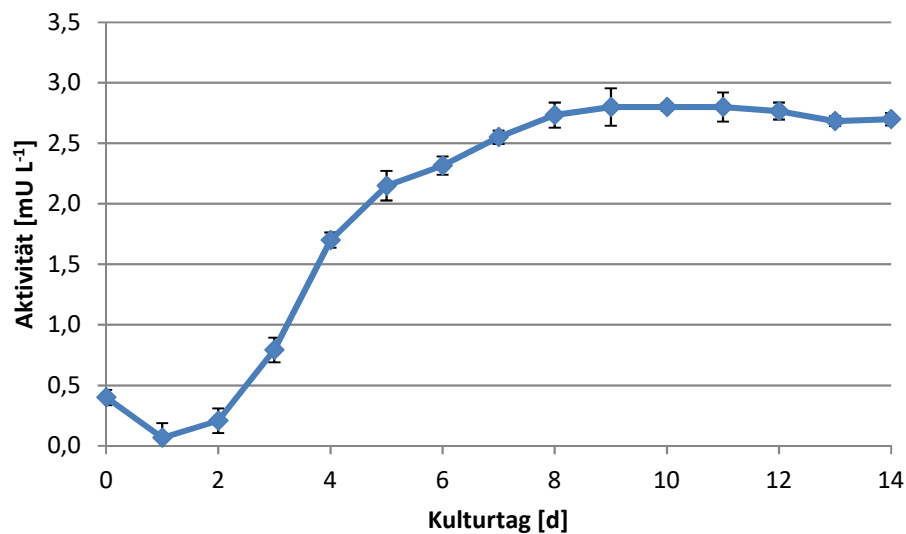


Abb. 3.1: Entwicklung der PsP-Aktivität im Verlauf der Kulturführung

Für die Isolierung der PsP A erwies sich der Zeitraum nach der ersten Woche, in dem die PsP-Aktivität in ein Plateau überging, als geeignet, da hier die maximale Aktivität erreicht wurde. Die mRNA sollte zum Zeitpunkt der höchsten PsP A-Produktion isoliert werden, da ihr Gehalt im Myzel dann maximal ist. Dies war am dritten Kulturtag der Fall, da hier die Steigung der Aktivitätskurve am steilsten und somit die Produktion neuer Enzyme bzw. die Menge an PsP A-mRNA am höchsten war.

3.1.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - und Ethanolfällung

Für die Isolierung der PsP A aus dem Überstand wurden Techniken wie die fraktionierte Fällung und die FPLC eingesetzt. Das Fällungsverhalten der PsP A wurde bei zunehmenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen untersucht. Ausgefälltes Protein wurde durch Zentrifugation abgetrennt und die Aktivität im geklärten Überstand bestimmt. Die Konzentration des Ammoniumsulfats wurde deshalb aus praktischen Gründen in Prozent Sättigung bei 4 °C und nicht in Mol pro Liter angegeben (Abb. 3.2). Die PsP A beginnt bei einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sättigung von ungefähr 28% auszufallen. Dieser Prozess ist bei Erreichen einer Sättigung von 46% weitgehend abgeschlossen.

Allerdings traten bei diesem Vorgang Probleme auf. Bei einer Sättigung von circa 35% setzte sich auf der Flüssigkeitsoberfläche des Überstands eine ölige dunkle Flüssigkeit ab. Diese störte die Fällung und musste entfernt werden (Abb. 3.4a) Die sich auf der Oberfläche der Lösung sammelnde Fraktion konnte weder dekantiert noch mit einer Pipette entfernt werden, da sie bei allen Versuchen sie abzutrennen immer klebrige Rückstände an der Gefäßwand hinterließ. Dies verhinderte eine Trennung der beiden Fraktionen.

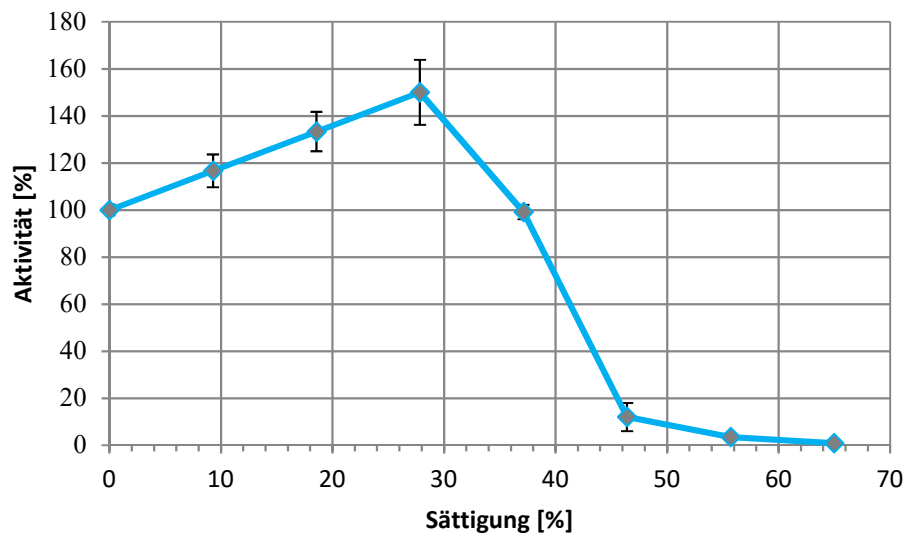


Abb. 3.2: Zur Bestimmung des Sättigungspunktes von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, bei dem ein Großteil der PsP A aus der Lösung ausgefällt worden ist, wurde die Aktivität der PsP A bei zunehmender $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung gemessen

Das Problem konnte mit einer der Ammoniumsulfatfällung vorgeschalteten Ethanolfällung gelöst werden. Hierbei wurde exakt wie bei der Ammoniumsulfatfällung verfahren. Die Aktivität wurde bei steigenden Ethanolkonzentrationen gemessen und jener Punkt

bestimmt an dem ein Großteil aus der Lösung gefällt worden ist. Bei 70 Vol % fällte Ethanol die PsP A vollständig aus (Abb. 3.3).

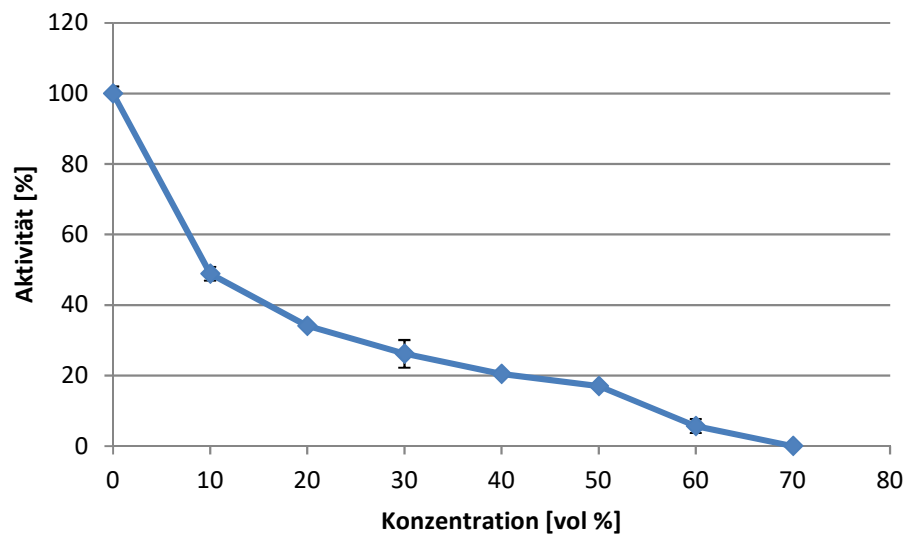


Abb. 3.3: Zur Bestimmung der Konzentration von Ethanol, bei dem ein Großteil der PsP A aus der Lösung ausgefällt worden ist, wurde die Aktivität der PsP A bei zunehmender Ethanol-Konzentration gemessen

Bei dieser Konzentration konnten die Proteine erfolgreich nach ihrer Pelletierung durch Zentrifugation von der öligen Flüssigkeit, die im Überstand verblieben war, abgetrennt werden (Abb. 3.4b)



Abb. 3.4: Überstand nach Fällung mit Ammoniumsulfat. **A** Auf der Flüssigkeitsoberfläche sammelte sich nach Inkubation über Nacht bei 4 °C eine ölige Flüssigkeit, die auch Teile des gefällten Proteins in sich aufnahm und Schwierigkeiten bei der nachfolgenden Pelletierung bereitete. **B** durch eine vorgeschaltete ethanolische Fällung der Proteine aus dem Überstand, und die nachfolgende Resuspendierung derselben in Puffer trat die Schwierigkeit nicht mehr auf.

3.1.3 FPLC

Da es sich bei der PsP A um ein stark glycosyliertes Enzym handelt, konnte die HIC trotz Verwendung von Säulen mit verschiedenen Liganden nicht erfolgreich eingesetzt werden. Der niedrige isoelektrische Punkt der PsP A (3.1.4) schränkte außerdem den Einsatz der IEX ein.

An die Fällung anschließend wurde die von niedermolekularen Bestandteilen befreite Kulturbrühe entsalzt (Ultrafiltration mit einer VIVA-Flow 50, Ausschlussgrenze von 30 kDa). Darauf folgte die Reinigung der PsP A mittels FPLC. Zunächst wurde mit einer Anionenaustauschersäule (IEX) über einen Stufengradienten gereinigt. Die Fraktionen in denen PsP-Aktivität detektiert werden konnte, wurden nach der Reinigung vereinigt (Abb. 3.5), mittels Ultrafiltrationskartuschen konzentriert (Macrosep Advance Centrifugal Device 30K MWCO) und einem weiteren Reinigungsschritt mittels GFC zugeführt. Nach Abschluss des GFC-Laufs wurde die PsP-Aktivität in den einzelnen Fraktionen bestimmt, wobei die maximale Enzymaktivität im dritten Peak detektiert wurde. Für die SDS-PAGE und die IEF wurde lediglich eine Probe aus dem vorderen Bereich dieses Peaks herangezogen (Abb. 3.6), weil hier die Überlappung und damit die Verunreinigung mit Proteinen des vierten Peaks gering gehalten werden konnte.

Pumpe A B

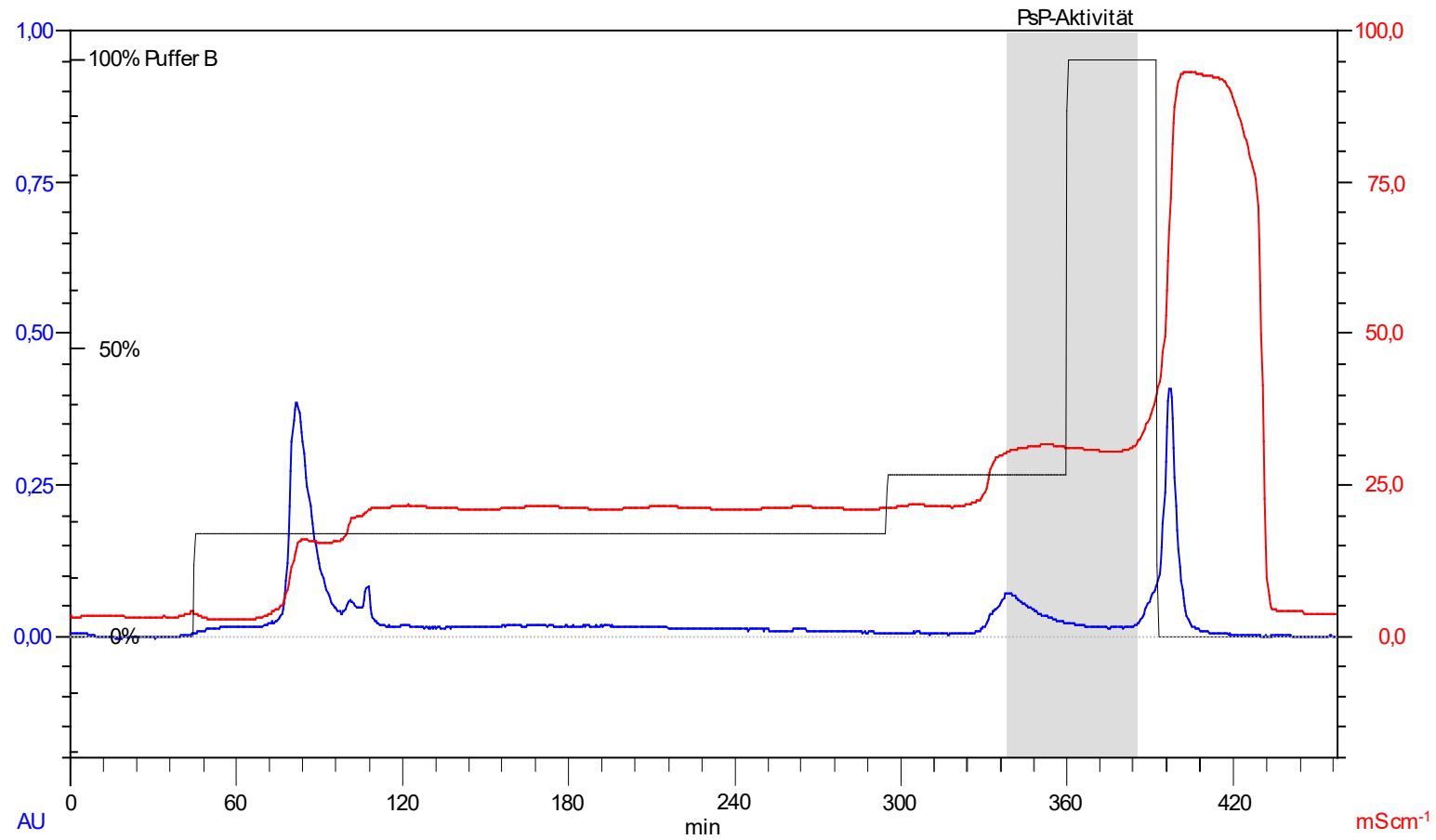


Abb 3.5: IEX-Chromatogramm des Überstands der Kultur von *Wolfiporia cocos* bei einer Flussrate von 4 mL min⁻¹. Laufpuffer war 50 mM Na-Acetatpuffer, pH 4,6, Elutionspuffer war 50 mM Na-Acetatpuffer mit 1 mol L⁻¹ NaCl, pH 4,6. PsP A-Aktivität wurde im grau unterlegten Bereich detektiert

Pumpe A 

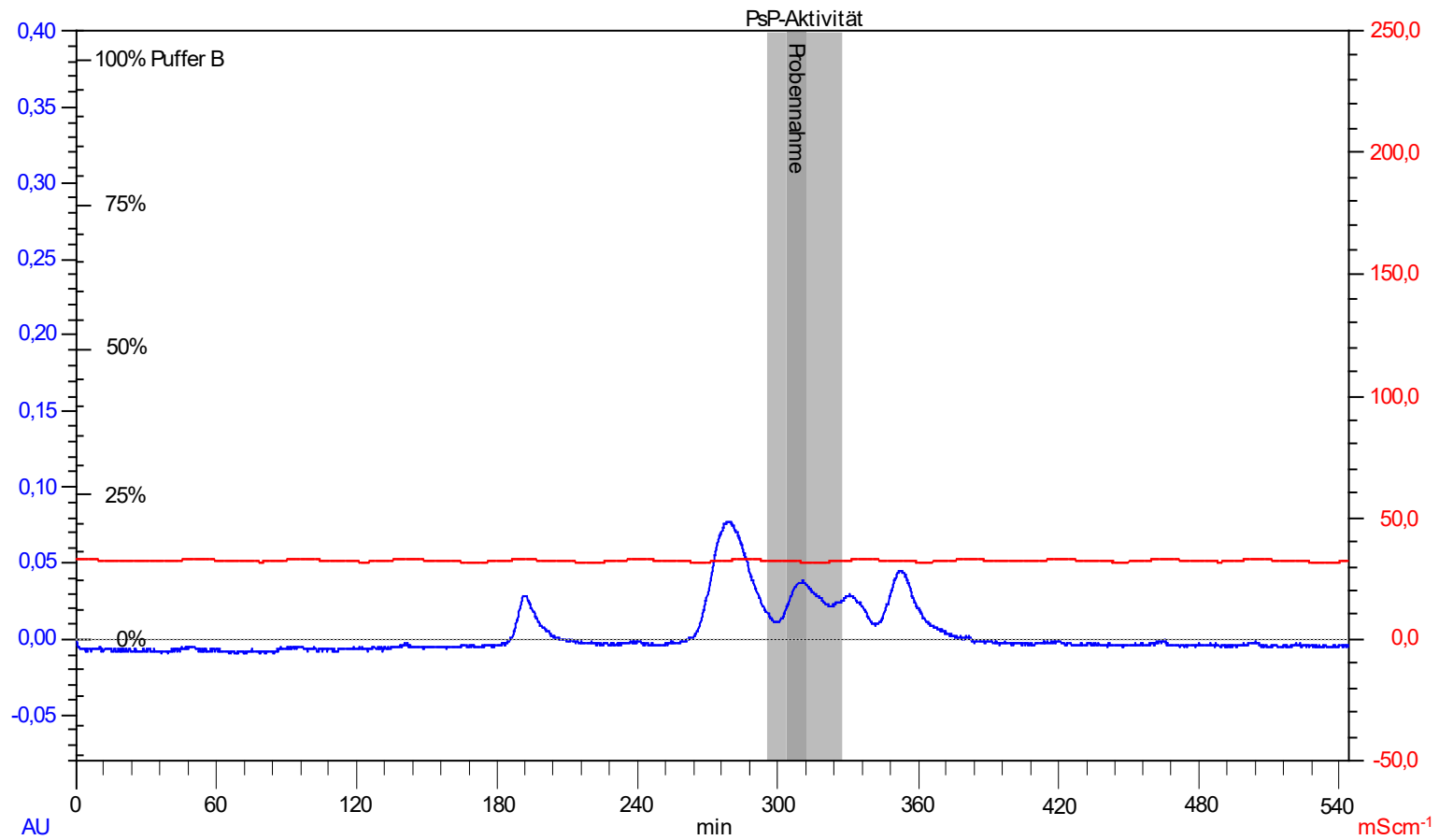


Abb. 3.6: GFC-Chromatogramm des Überstands der Kultur von *Wolfiporia cocos* bei einer Flussrate von 1 mL min⁻¹. Laufpuffer war 50 mM Na Acetatpuffer, pH 4,6. PsP A-Aktivität wurde im grau unterlegten Bereich detektiert. Die Probe für die weiteren Arbeiten wurde aus dem dunkelgrauen Bereich genommen

Die konzentrierten Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte, die die PsP A beinhaltenen, wurden auf ein 12%iges Gel gegeben, um den fortschreitenden Reinigungserfolg zu dokumentieren (Abb. 3.7)

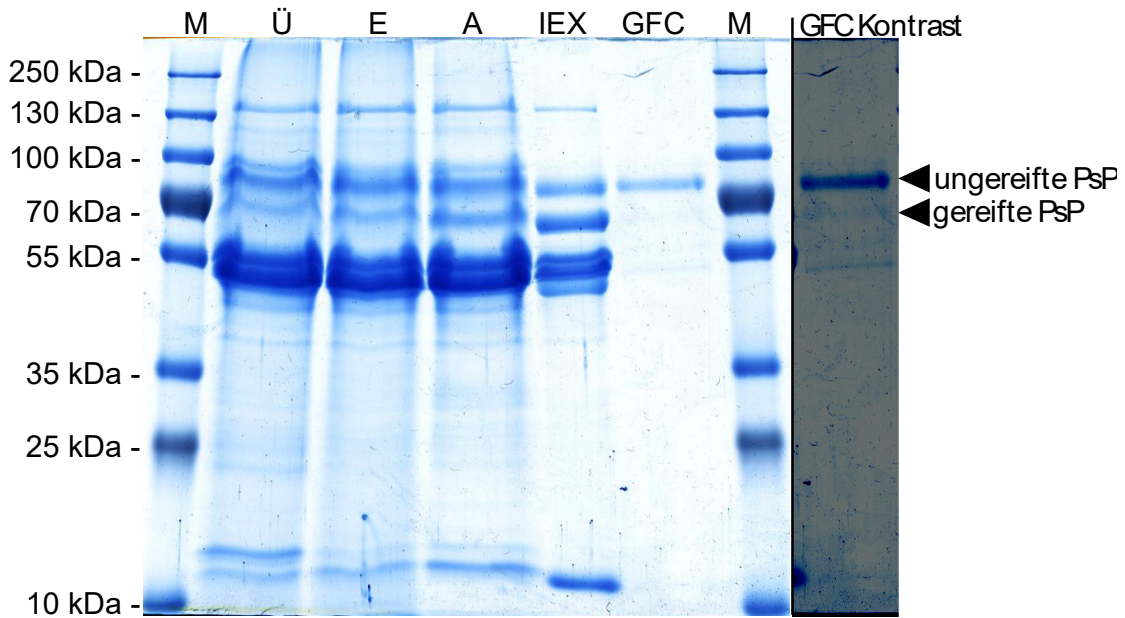


Abb. 3.7: Kontrollgel der einzelnen Schritte zur Isolierung der PsP A. Marker (M), konzentrierter Überstand (Ü), Probe nach der Ethanol-fällung (E), Probe nach der Ammoniumsulfat-fällung (NH_4SO_4) (A), Probe nach der Reinigung mittels IEX (IEX) und nach GFC (GFC). Da die feineren Banden des GFC-Reinigungsschritts nur schwer zu erkennen waren, wurde dieser Bereich noch einmal kopiert und die Banden durch Reduktion der Helligkeit und Erhöhung des Kontrast besser kenntlich gemacht (GFC Kontrast)

Die PsP A konnte größtenteils von den restlichen Proteinen getrennt werden. Das Molekulargewicht der gereiften PsP A (natives Enzym) wurde zu 67 kDa und das des ungerreifen PsP A (Enzym mit Päprosequenz; siehe hierzu Kapitel 4.1.7 Prekursorsequenzen) zu 72 kDa bestimmt. Die Identifizierung beider Formen erfolgte durch die massenspektrometrische Analyse (siehe unten).

Für die massenspektrometrische Analyse wurde die Fraktion des letzten Reinigungsschritts auf zwei Spuren eines 12%igen SDS-Gels aufgetragen. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel geteilt. Mehrere Banden aus der einen Hälfte wurden ausgeschnitten und in einem Exikator getrocknet. Die Banden der anderen Hälfte wurden auf eine PVDF-Membran geblottet. Auch die auf der PVDF-Membran fixierten Proteine wurden nach der Färbung mittels Coomassiefärbelösung ausgeschnitten. Die Banden wurden nachfolgend zur Ermittlung der Aminosäuresequenz der PsP A verwendet.

3.1.4 Bestimmung des isoelektrischen Punkts der PsP A

Ein IEF-Gel wurde mit der gereinigten PsP A und einem Marker beladen. Der isoelektrische Punkt der PsP A wurde zu circa 3,6 bestimmt (Abb. 3.8).

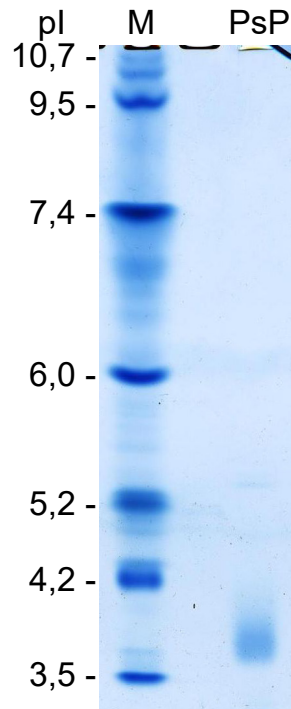


Abb. 3.8: Die isolierte PsP A aufgetragen auf ein IEF-Gel. Es wurden der Marker (M) und die Probe, die die prolylspezifische Peptidase (PsP A) beinhaltete, aufgetragen.

3.1.5 N-Deglykosylierung

Der Grad der N-Glycosylierung wurde mittels der PNGase F von New England Biolabs ermittelt. Hierfür wurde neben den Marker eine mit PNGase F behandelte und eine unbehandelte Probe der PsP A auf ein 12%iges Gel gegeben. Die Bande der behandelten Probe wurde zu 60 kDa bestimmt. Die eingesetzte Probe enthielt die gereifte und die ungeriefte PsP A. Da die ungeriefte Form aufgrund der höheren Menge besser erkennbar ist, beziehen sich die Werte auf sie. Das bedeutet bei einem Molekulargewicht der ungeriefen PsP A von 72 kDa, dass ungefähr 12 kDa auf die N-Glycosylierung entfallen.

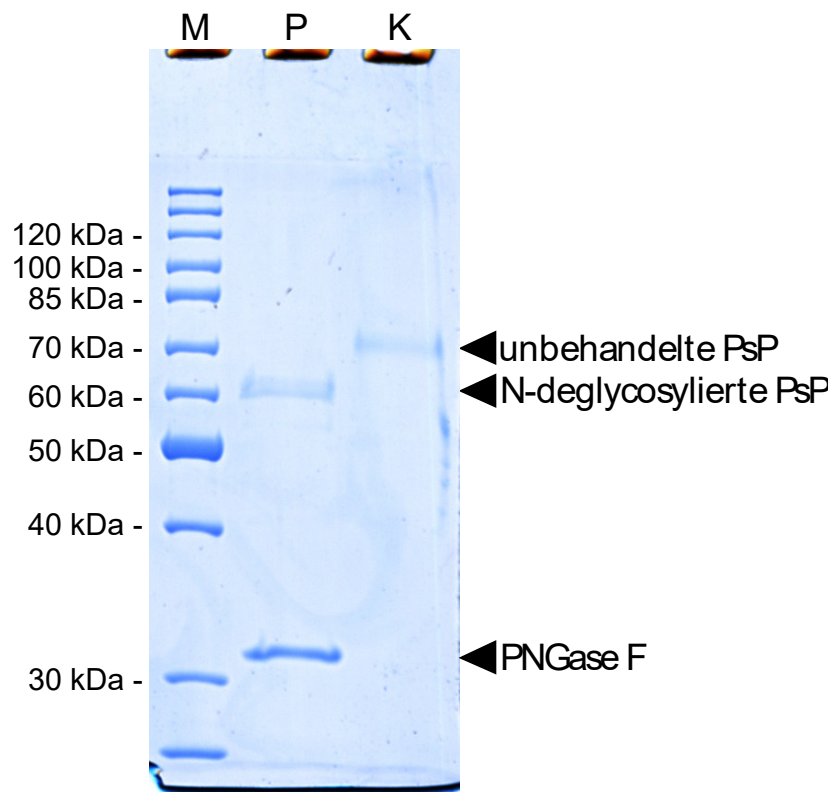


Abb: 3.9: Auf ein 12%iges Gel wurde die Probe der gereinigten PsP A im unbehandelten Zustand als Kontrolle (K) sowie im N-deglycosylierten Zustand, nach der Behandlung mit PNGase F gegeben (P). Des Weiteren wurde ein Marker aufgetragen (M). Deutlich zu sehen ist die Abnahme des Molekulargewichts der PsP A nach der Deglycosylierung.

3.1.6 Sequenzierung der PsP A

Die isolierte PsP A wurde mittels ESI-Tandem-Massenspektrometrie (ausgeschnittene Bande des PAGE-Gels) sowie mittels Edman Abbau (auf PVDF-Membran fixierte Bande) sequenziert. Mit der erstgenannten Technik wurden Peptidfragmente, die durch tryptischen Verdau entstanden und aus dem gesamten Bereich des Proteins stammen konnten,

sequenziert (Peptid 2). Letztere Technik ermöglichte es, den N-Terminus zu bestimmen. Somit konnte die N-terminale Sequenz des gereiften Proteins ermittelt werden (Peptid 1).

Die Aminosäuresequenz von Peptid 2 wurde in der Bachelorarbeit von Frau Linda Herring bestimmt.

Peptid 1 YTELPXLTYTYFDQ

Peptid 2 DPAGSPGNNATPDQAPWVLLGGSYAGALTSFTK

Peptid 1 stellt den N-Terminus des gereiften Enzyms dar und wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation ermittelt. Die sechste Aminosäure von Peptid 1 konnte nicht zweifelsfrei identifiziert werden und wurde durch ein X als Platzhalter ersetzt. Peptid 2 ist ein, wie eine Suchanfrage in MEROPS ergab, enzyminterner Bereich und enthält das stark konservierte Motiv GGSY, das auch den enzymatisch aktiven Serinrest beinhaltet und charakteristisch für die S28-Peptidasefamilie ist.

3.1.7 Isolierung der RNA, Synthese der cDNA und Klonierung der PsP A

RNA-Isolierung

Für die Klonierung der PsP A-cDNA wurde zunächst aus der mRNA von *W. cocos* eine cDNA-Bank angelegt. Zu diesem Zweck wurde Myzel aus einer Hauptkultur am dritten Kultivierungstag entnommen und aufgeschlossen. Mittels RNAeasy Plant Mini Kit wurde Gesamt-RNA isoliert und in Puffer aufgenommen. Eine Probe dieses Gesamt-RNA-Isolats wurde nach zweistündiger Inkubation bei 50 °C mit einer nicht inkubierten Probe desselben Isolats auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Abb. 3.10). Eine RNase-Kontamination konnte ausgeschlossen werden, da die inkubierte Probe keine Unterschiede zur auf Eis gelagerten nichtinkubierten Probe aufwies und klar unterscheidbare Banden zu sehen waren.

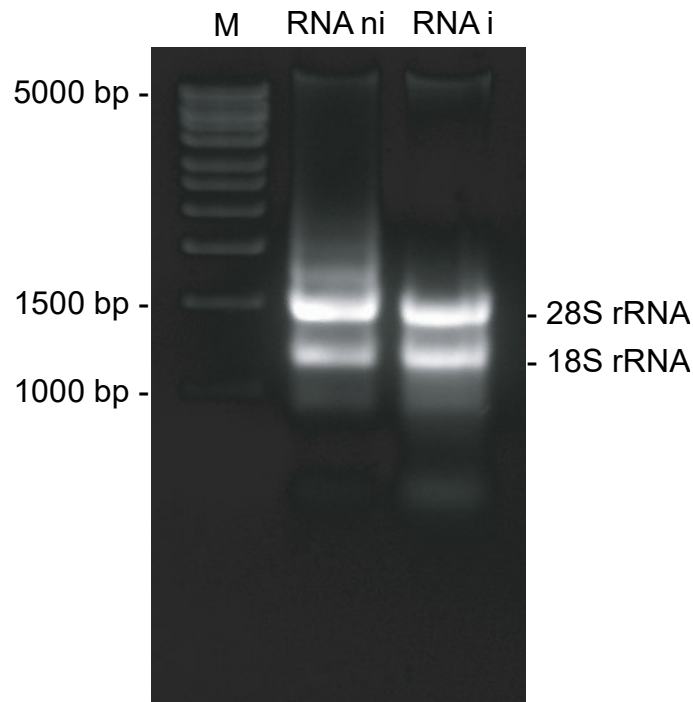


Abb. 3.10: 1%iges Kontrollgel der isolierten Gesamt-RNA. Marker (M), nicht inkubierte RNA (RNA ni), bei 50 °C inkubierte RNA (RNA i)

Des Weiteren wurden die Reinheit der RNA und ihre Quantität photometrisch ermittelt:

$\lambda_{260}/\lambda_{280}$	2,1
Konzentration	0,74 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$

cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA wurden 3,0 μL des Gesamt-RNA-Isolats eingesetzt. Zudem wurden zwei Ansätze mit verschiedenen reversen Transkriptasen (SuperScript® II Reverse Transcriptase und SuperScript® III Reverse Transcriptase) getestet (Abb. 3.11).

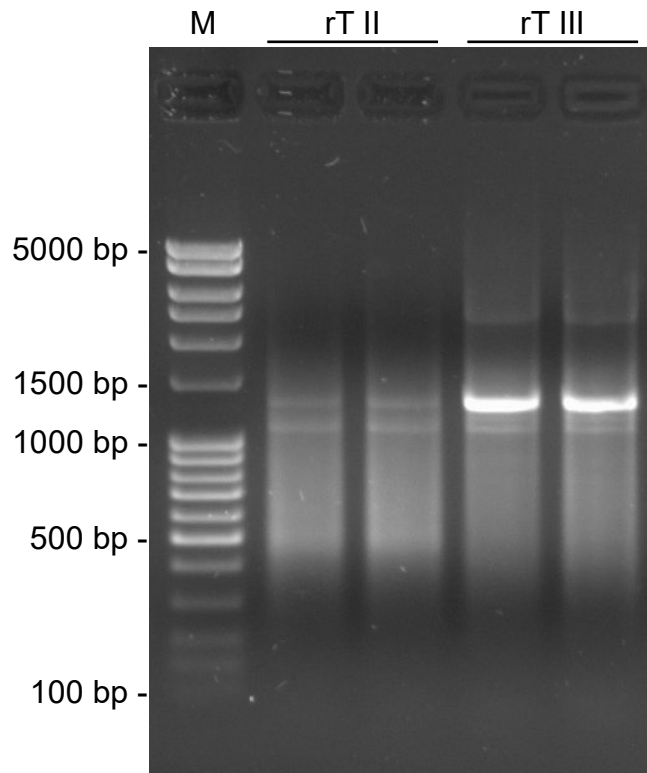


Abb. 3.11: 1%iges Agarosegel der cDNA synthetisiert mit den reversen Transkriptasen SuperScript® II Reverse Transcriptase und SuperScript® III Reverse Transcriptase. Marker (M), cDNA (rT II), cDNA (rT III)

Die SuperScript® III Reverse Transcriptase zeigte eine bessere Umsetzung der mRNA in cDNA. Die Banden waren sowohl besser voneinander abgegrenzt als auch zum Teil wesentlich stärker ausgebildet. Auch waren die Ausbeuten an cDNA im Bereich über 1000 bp, in dem sich auch die cDNA der PsP A befindet, wesentlich höher als bei mit SuperScript® II Reverse Transcriptase synthetisierter cDNA. Für alle nachfolgenden Arbeiten wurde deshalb die mit SuperScript® III Reverse Transcriptase erzeugte cDNA verwendet.

3.1.8 Primerentwicklung

Folgende degenerierte Primer wurden aus den erhaltenen Peptidsequenzen abgeleitet. Die wobbelnden Basen sind folgendermaßen definiert:

N (A, C, G oder T)

B (C, G oder T), **D** (A, G oder T), **H** (A, C oder T), **V** (A, C oder G)

R (A oder G), **Y** (C oder T), **W** (A oder T) und **S** (C oder G).

Aus Peptid 1 abgeleitete degenerierte Sequenz

Y T E L P X L T Y T Y Y F D Q
 TAR ACN GAR YTN CCN NNN YTN ACN TAR ACN TAR TAR TTY GAY CAR

Aus Peptid 2 abgeleitete degenerierte Sequenz

D P A G S P G N N A T P D Q A
 GAY CCN GCN GGN WSN CCN GGN AAY AAY GCA NCN CCN GAY CAR GCN

P W V L L G G S Y A G A L T S
 CCN TGG GTN YTN YTN GGN GGN WSN TAR GCN GGN GCN YTN CAN WSN

F T K

TTY ACN AAR

Ferner wurde mit dem Programm protein-BLAST (Altschul *et al.* 1990) nach homologen Sequenzen zu Peptid 1 und Peptid 2 gesucht, die wie die PsP A von Peptidasen aus Basidiomyceten stammen.

Sowohl die Aminosäure- als auch die Nucleotidsequenzen der neun nächstähnlichen Enzyme wurden im FASTA-Format heruntergeladen. Die Herkunft dieser Sequenzen ist in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Zunächst wurden die gefundenen Aminosäuresequenzen mit den Peptidsequenzen aus der PsP A-Proteinsequenzierung einem Multisequenzalignment unterzogen (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Hierfür wurde das Programm Clustal O verwendet (Larkin *et al.* 2007). Durch das Multisequenzalignment der Aminosäuresequenzen konnten die Positionen der degenerierten Sequenzen exakt festgelegt werden.

Tab. 3.1: Die durch pBLAST-Suche gefundenen S28-Peptidasesequenzen mit den Ursprungsorganismen (Artnamen und Stamm).

Organismus	Stamm	Protein
<i>Postia placenta</i>	Mad-698-R	XP_002472725.1
<i>Schizophyllum commune</i>	H4-8	XP_003036699.1
<i>Schizophyllum commune</i>	H4-8	XP_003038010.1
<i>Serpula lacrymans</i>	S7.3	EGN95063.1
<i>Punctularia strigosozonata</i>	HHB-11173 SS5	EIN10777.1
<i>Agaricus bisporus</i>	JB137-S8	EKM79911.1
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	MF3/22	EJD01632.1
<i>Phanerochaete carnososa</i>	HHB-10118-sp	EKM56517.1
<i>Dichomitus squalens</i>	LYAD-421 SS1	EJF57333.1

Mit den Nucleotidesequenzen und den degenerierten Sequenzen wurde ebenso verfahren. (Abb. 3.14 und Abb. 3.15). Den Multisequenzalignments konnte entnommen werden, welche Abschnitte hohe Konservierung aufweisen und sich für die Primerentwicklung eignen.

Abschließend wurden die wobbelnden Bereiche der degenerierten Sequenzen mit den Informationen aus den Multisequenzalignments (konservierte Abschnitte) auf wenige bzw. wenn möglich auf eine einzige Base eingeschränkt:

>PsP A 6-for

TAY ACN GAR TTN CCN CCN TTN ACN TAY AC

>PsP A 7-rev

AAV AAV GCN ACN CCN GAY CAR GCN

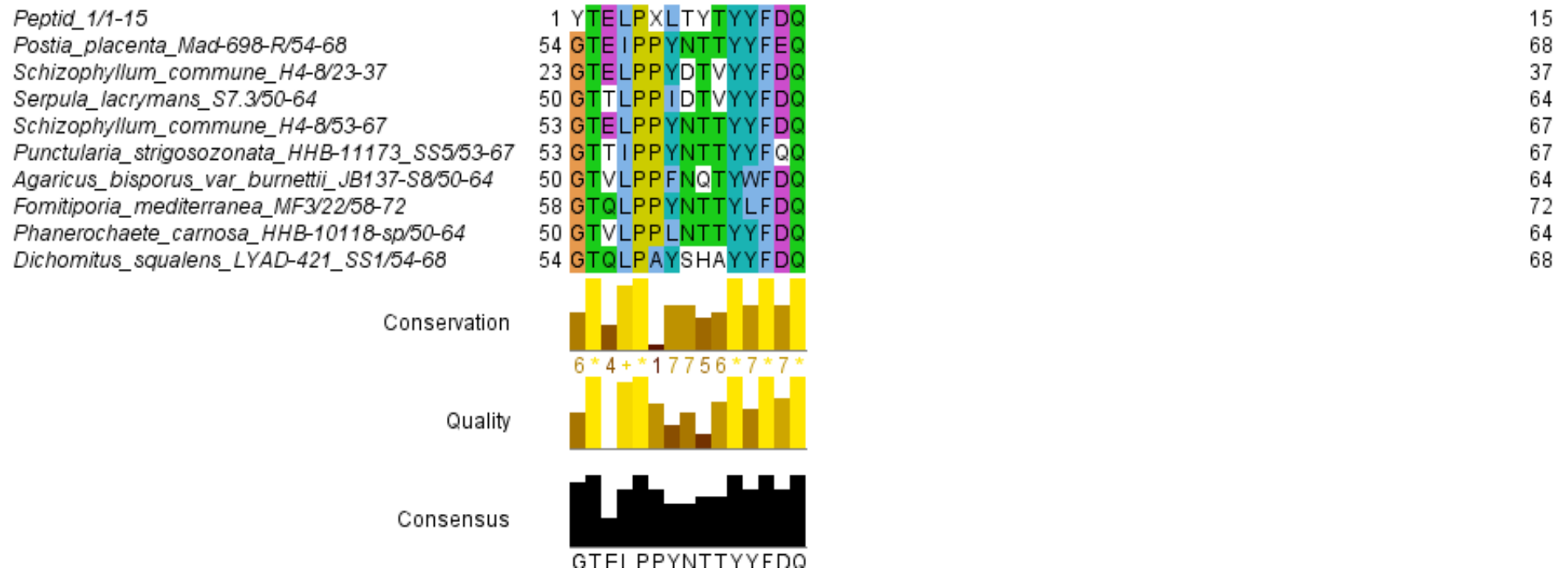


Abb. 3.12: Multisequenzalignment der neun mit BLAST gefundenen Aminosäuresequenzen mit jener von Peptid 1.

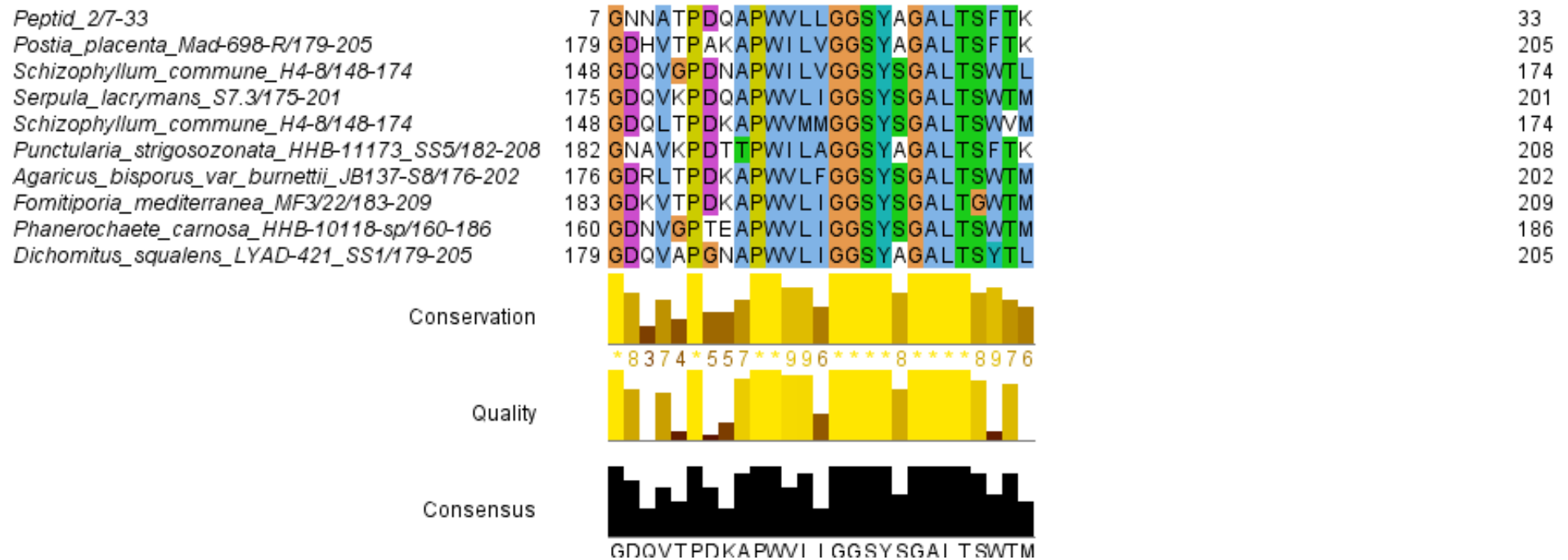


Abb. 3.13: Multisequenzalignment der neun mit BLAST gefundenen Aminosäuresequenzen mit jener von Peptid 2.

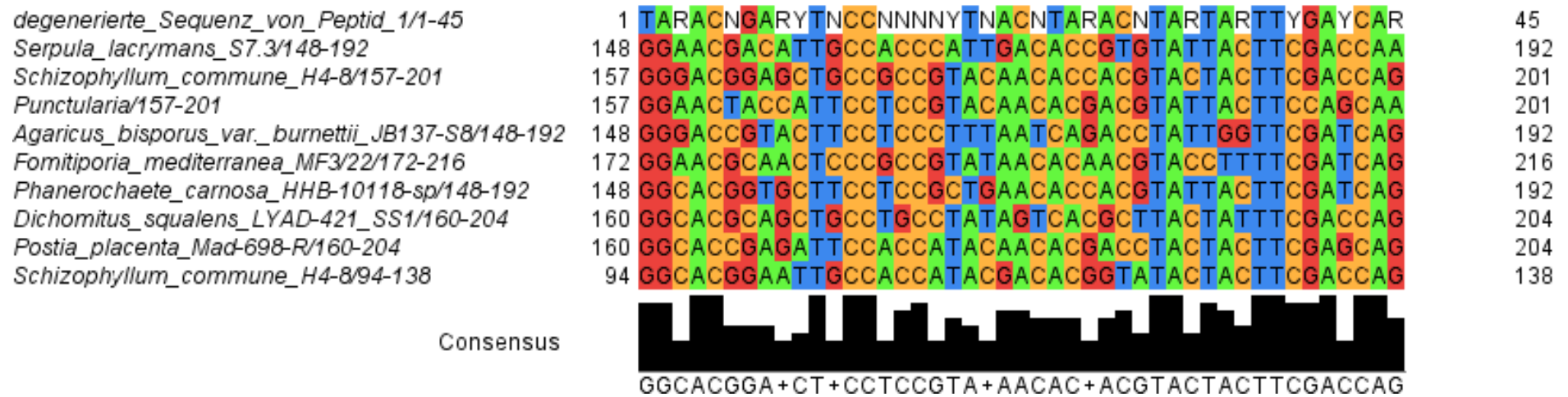


Abb. 3.14: Multisequenzalignment der neun mittels BLAST gefundenen Nucleotidsequenzen mit der aus Peptid 1 abgeleiteten degenerierten Sequenz.

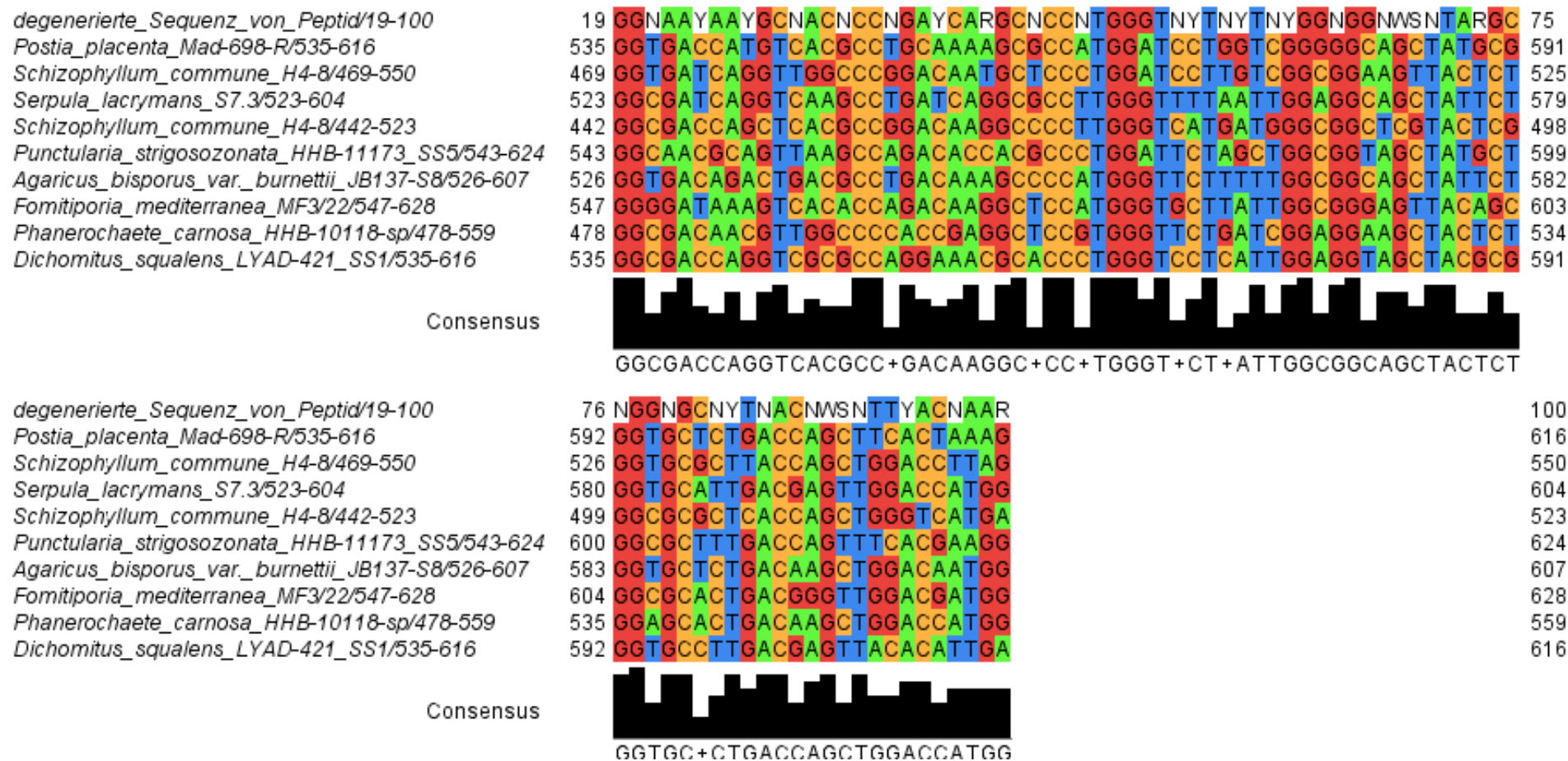


Abb. 3.15: Multisequenzalignment der neun mit BLAST gefundenen Nucleotidsequenzen mit der aus Peptid 2 abgeleiteten degenerierten Sequenz.

3.1.9 Klonierung der PsP A-cDNA

Die PCR-Produkte (PCR-Ansatz mit Primer PsP A6 und PsP A7 sowie der cDNA als Template) wurden komplett auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Mehrere Banden wurden ausgeschnitten, die enthaltenen PCR-Produkte eluiert und mittels TOPO-TA-cloning in den Vector pCR2.1 kloniert. Durch Sequenzierung konnte ein 1300 bp langer Teilbereich der PsP A identifiziert werden, mit dessen Hilfe die nun nicht mehr degenerierten Primer PsP A-Anfang 74 und PsP A-Ende 74 abgeleitet wurden. Trotz dieser Primer konnte nicht die komplette cDNA gewonnen werden. Erst der Einsatz des GC-Rich PCR Kit von Roche ermöglichte die vollständige Isolierung und Klonierung der PsP A-cDNA (Abb. 3.16). Dies hing mit Bereichen hohen GC-Gehalts zusammen, an denen die PCR abbrach.

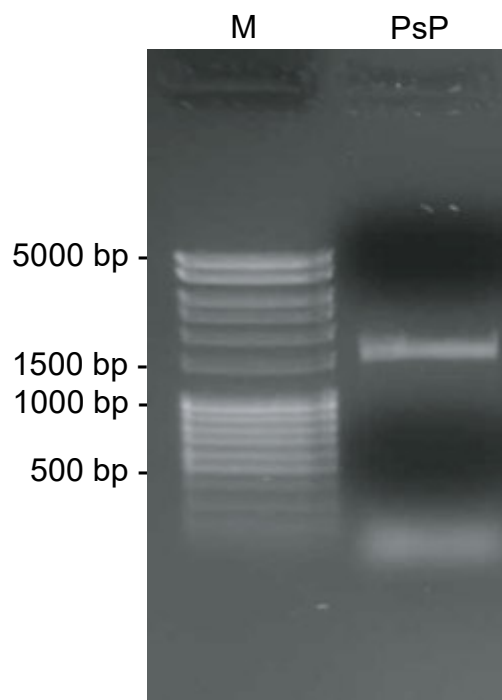


Abb. 3.16: 1%iges Agarosegel geladen mit dem Marker in Spur M und dem PCR-Produkt der vollständigen PsP A.

3.1.10 Sequenzierung der PsP A-cDNA und deren bioinformatische Auswertung

Sequenzierung

Die Bande der mittels PCR amplifizierten PsP A-cDNA positionierte sich in einem 1%igen Agarosegel im Bereich von etwa 1.500 bp (Abb. 3.16). Die sich anschließende Sequenzierung ergab eine Länge von 1.560 bp. Der N-Terminus des nativen Proteins liegt, wie aus der Proteinsequenzierung ersichtlich wurde bei G₁₃₃ bzw. Gly₄₅. Die Nucleotid-

(Abb. 3.17) bzw. die Aminosäuresequenz (Abb. 3.18) wurden mittels bioinformatischer Werkzeuge untersucht.

Primärstruktur

Die Primärstruktur wurde mit Hilfe der Datenbank InterProScan 5.0 (Mulder *et al.* 2003) nach Motiven und Domänen untersucht (Abb. 3.19) Die isolierte Peptidase gehört demnach zur α/β -Hydrolase Superfamilie und lässt sich weiterhin mit MEROPS dem Serinpeptidaseclan SC und spezifischer der Peptidasefamilie S28.004 zuordnen, die durchgängig prolinspezifisch schneidet. Die Aminosäuren S₁₈₆, D₄₄₉ und H₄₇₈ wurden von MEROPS als katalytische Triade der PsP A identifiziert. Außerdem konnte mit InterProScan 5.0 ein Signalpeptid im Bereich der ersten 21 Aminosäuren identifiziert und die Peptidase als nicht cytoplasmatisch bestimmt werden. Die theoretischen Eigenschaften der PsP A wurden aufgrund der Aminosäuresequenz des ungeriffen bzw. des gereiffen Enzyms mit ProtParam berechnet:

mathematisch bestimmter Molekulargewicht des gereiffen Enzyms: 52.914,2 Da

mathematisch bestimmter Molekulargewicht des ungeriffen Enzyms: 57.465,7 Da

mathematisch bestimmter pI des gereiffen Enzyms: 4,18

mathematisch bestimmter pI des ungeriffen Enzyms: 4,29

Daran anschließend wurde von Swiss Model ein Strukturmodell der PsP A auf der Basis einer zu den S28-Peptidasen gehörenden lysosomalen Carboxypeptidase menschlichen Ursprungs erstellt. Deren Kristallstruktur ist unter dem Code 3n2z bei ExPasy hinterlegt. Abb. 3.20 illustriert auf Tafel A jene Bereiche des Strukturmodells, die hinsichtlich ihrer genauen Positionierung unsicher sind (rot). Tafel B zeigt das von SWISS-Model erstellte Diagramm, das die Qualität der Modellbildung zu jeder einzelnen Aminosäure darstellt, indem es die Abweichung von der humanen lysosomalen S28-Serinpetidase ins Verhältnis setzt. Die Bereiche mit der höchsten Abweichung vom durchschnittlichen Kurvenverlauf wurden markiert und entsprechen den rot unterlegten Bereichen in Tafel A. Zudem wies das Modell eine α -Helix auf, die als Artefakt der Berechnung von SWISS-Model angesehen werden kann. Sie besteht aus drei Aminosäuren (Tyr₃₄₂ bis Gln₃₄₄) und ist zwischen der SKS-Domäne (dunkelgrau) und den α -Helices M und N des Adapters lokalisiert (hellbraun). Die Beschreibung der einzelnen Domänen der PsP A ist im

Abschnitt Domänen, Sekundär- und Tertiärstruktur weiter unten erklärt. Der Vergleich mit den Ergebnissen des Programms JPred4 (Drozdetskiy *et al.* 2015), das für die Vorhersage von Sekundärstrukturen verschiedene Algorithmen parallel einsetzt zeigte, wie in Tafel C dargestellt, im entsprechenden Bereich der Peptidkette keine α -Helix.

>PsP A aus *Wolffiporia cocos* CBS 279.55

```

ATGGTGTCTCCAGCCTGGCGGTGAGCTCCTTGCTCGCATTACCTCTGCTCGCCTCGGCC
TGCGCGTCCCTCGCCGCCTGTGATCCAGAAGGTCGATCCCCGCATGCGGGACCCGTCGT
GGATCGGAACGGGACCGAGCTCCCGCCGCTGAACACCACATACTACTTTGACCAGCTCATT
GATCACAACAACCCCAGCCTTGGGACGTTCAAGCAGCGGTACTGGCACACCTGGGAGTTCT
ACGAGCCTGGCGGACCCATCATCATCACGACCCCGGGCGAACAAGATGCTGCTGGTTTTGA
AGGCTTCTCACC AATGCGACAATCGACGGACAGATCGCGCAGCAGAGCGGCGCGACG
ATTGTGCTCGAGCACCGCTACTACGGCTACTCGAACCCGTACAACAACCTCTCGGTGCGGA
GTCTCCAGTACCACACGATTCAGCAGGCGATCGATGACCTCGCCTACTTCGCGTACAATGT
CAAGCTGCCTATGCCTGGCGGCGACAATGTCACGCCGACCAGGCGCCGTGGGTCTGATT
GGCGGTAGCTACGCGGGCGCGCTGACGAGCTTACGAAAGTCAACAAACCAGACGCGTTCT
GGGCTGCGTGGTTCGTCTTCTGGCGTCTGGAGAGCATTGTCAATTAT TGGGGATACTTTGA
CATTATTCGCAAGCACATGCCTCAA AACTGCTCCGCGGACGTGCAAGCCGTGATCGCGCAT
ATCGACGAGGTCTTACAGTCC AATGACACCGACGCGATCAACGAGATCAAGCAGACGTTCA
GCATGAACCTCACCCATCTCGACGACTTCGCCAGCGCCTTGACAGGCCGATTTTCGACTG
GCAGTCGCTGCAGCCGGCGGGCGAGCTGACCGACC TGTGTTCTTCGAGTTCTGCGATGCA
CTCGAGGTGAAGAACGGCGTGAGCGCGGGACCGGAAGGGTGGGGCCTCGACTATGCCCTGC
AGGCCTGGGGCTCGTACTGGAACACGACGTTCTGCCGGAGAAC TGT TATGACCAGACTAT
CGAGGAATGCTCTCGGTACCTATAACGCGAGCGCGCCCTACTACACGGACATTTTCGGTTAAC
AATGCCGAGCGGTCTGGTTTTTGGATTGTC TGCAACCAGATGGGCTTCTTCCAGGATGGCG
CGCCAGAAGGTGACCC TACTATCGTCTCCCGCCTCGTGACTGCTCTCTACAACGAGCGCCA
GTGCACATACTACTTCCCACAGGCGTTCAGCACCCCGCCACGCCCCGCGTCAACGAGACC
AACAAGGCCTACGACGGCTGGTTCGTGCAGTCCGACCGGCTCTTCTTCGGCAACGGAGAGC
GTGACCCGTGGCGCGATGCGACGATCTCCGACGACGGCACGCACTTTGCGAGCACGGCGCA
GCAGCCGATCGCGGTGCGGACGGGTTCCACTGCTCGGACTTGTACACGATCAACGCGCAG
GTGACCCGACGATCGAGGCGGTGCGAGGAGGGCCTTGCTGCGATGGCGGGCTGGCTGG
AGGAGTGGACGGCCCCCGCGCAGTCGCAGTCA TGA

```

Abb. 3.17: Nucleotidsequenz der für die prolylspezifische Peptidase kodierenden cDNA. Farblich unterlegt sind die Prekursorsequenz (grün), der $\alpha\beta$ -Hydrolasefold (hellgrau), die SKS-Domäne (dunkelgrau), die katalytische Triade (rot), das Oxyanionloch (violett), die hydrophobe Tasche (blau), die potentiellen Positionen für die N-Glycosylierung (dunkelgrün) sowie die für die S28-Peptidasen typische, stark konservierte Sequenz GGSY (unterstrichen).

>PsP A aus *Wolfiporia cocos* CBS 279.55

```

MVSSSLAVSSLLALPLLASALRVPRPPVIQKVDPPHAGPVVDRNGTELPPLNTTYYFDQLI
DHNNPSLGTGTFKQRYWHTWEFYEPGGPIIITTPGEQDAAGFEGFLT NATIDGQIAQQQSGAT
IVLEHRYYGYSNPYNLSVASLQYHTIQQAIDDLAYFAYNVKLPMPGGDNVTPDQAPWVLI
GGSYAGALTSFTKVNKPDAFWAAWSSSGVVESIVNYWGYFDIIRKHMPQNC SADVQAVIAH
IDEVFTSNDTDAINEIKQTFSMNLTHLDDFASALTGPIFDWQSLQPAGELTDLSFFEFCD
LEVKNGVSAGPEGWGLDYALQAWGSYWN TTFLPENCYDQTIEECLGTYNASAPYYTDISVN
NAERSWFWIVCNQMGFFQDGAPEGDPTIVSRLVTALYNERQCTYYFPQAFSTPPTPRVNET
NKAYDGWVQSDRLFFGNGERDPWRDATISADGTHFASTAQQPIAVGDGFHCSDLYTINAQ
VDPTIEAVQQEGLAAMAGWLEEWTPAPAQSQSX

```

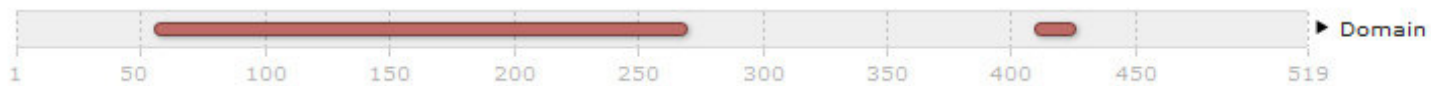
Abb. 3.18: Aminosäuresequenz der prolylspezifischen Peptidase. Farblich unterlegt sind die Prekursorsequenz (grün), der α/β -Hydrolasefold (hellgrau), die SKS-Domäne (dunkelgrau), die katalytische Triade (rot), das Oxyanionloch (violett), die hydrophobe Tasche (blau), die potentiellen Positionen für die N-Glycosylierung (dunkelgrün) sowie die für die S28-Peptidasen typische, stark konservierte Sequenz GGSY (unterstrichen).

Durch Abgleich mit den Daten aus der Publikation von Soisson *et al.* 2010 zur humanen lysosomalen Pro-X-Carboxypeptidase (3n2z) konnten die Positionen der am *oxyanion hole* (Tyr₁₈₇ und Ala₁₈₈) und an der hydrophoben Tasche (Ala₁₉₀, Phe₃₈₂, Trp₄₅₁ und Trp₃₇₂) beteiligten Aminosäuren bestimmt werden. Einige Aminosäuren wichen voneinander ab. Die Position von Ala₁₈₈ in der *Wolfiporia cocos*-PsP A war bei der humanen PCP mit einem Tyrosin besetzt und das Äquivalent zu Ala₁₉₀ war ein Methionin.

Protein family membership

F Peptidase S28 (IPR008758)

Domains and repeats



Detailed signature matches



Abb. 3.19: Ergebnisgraphik der Analyse der PsP A Aminosäuresequenz durch InterProScan 5.0

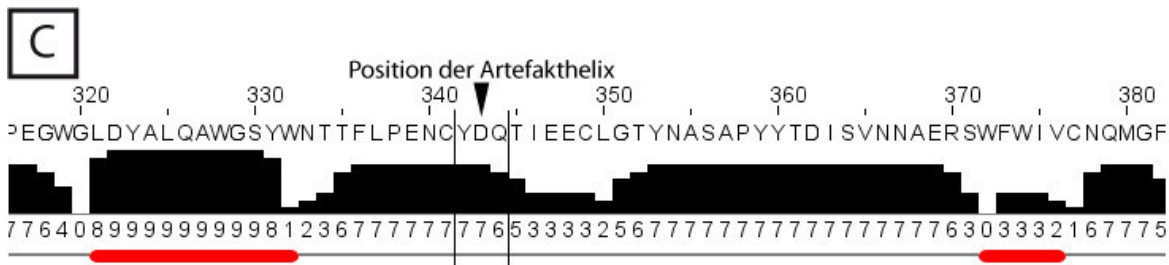
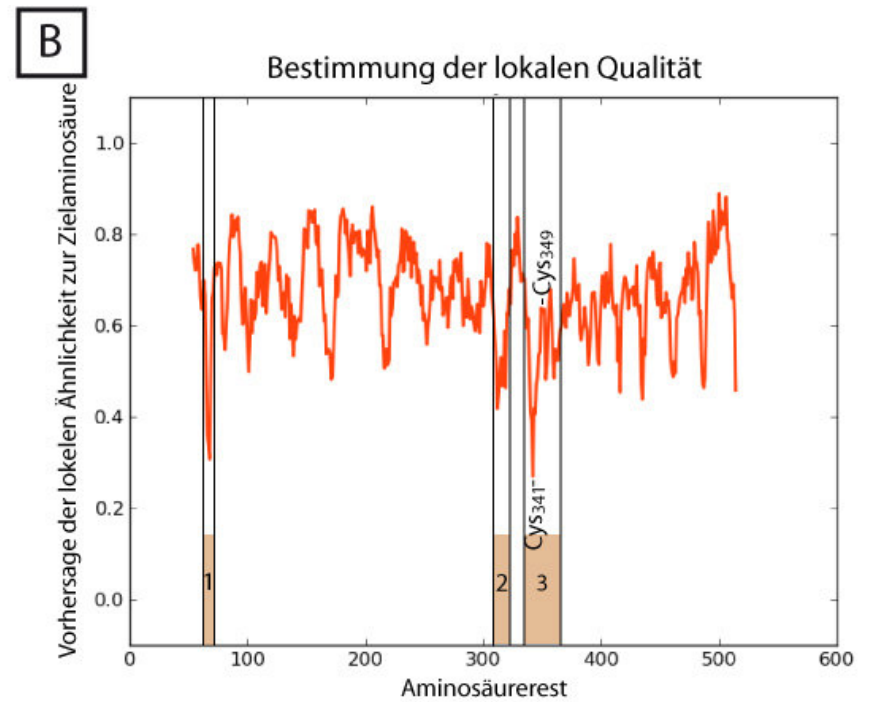
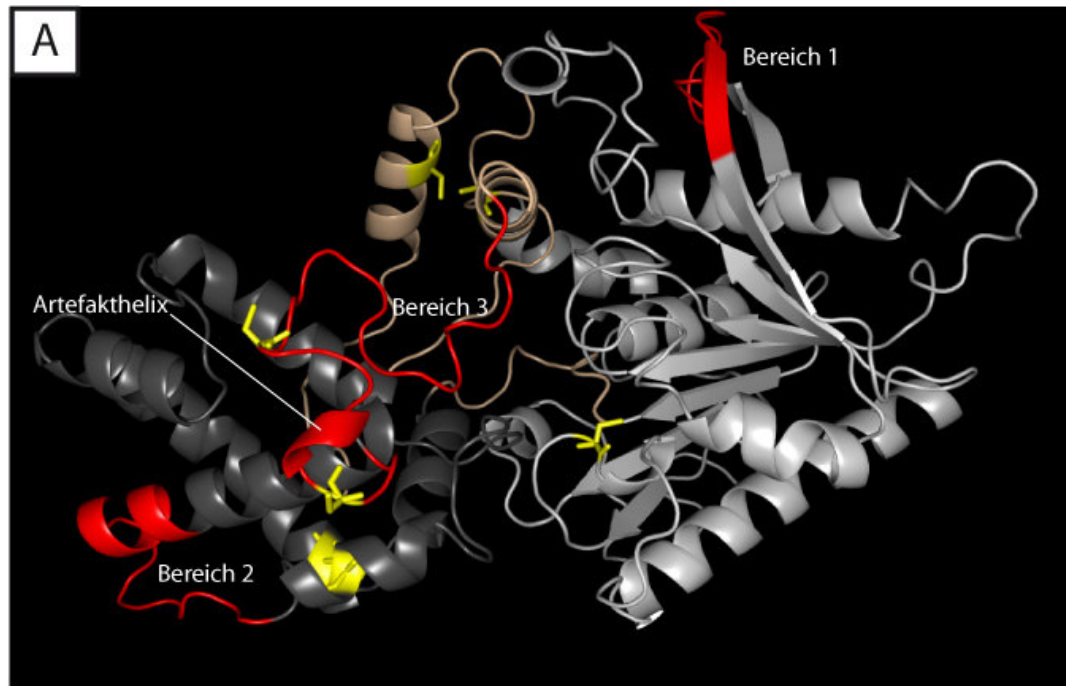


Abb. 3.20: **A:** Das Homologiemodell zeigt die Bereiche 1 bis 3, die mit einer gewissen Unsicherheit behaftet sind (rot). **B:** die entsprechenden Bereiche finden sich im nebenstehenden Diagramm wieder. **C:** Das Homologiemodell beinhaltet auch eine Helix die als Artefakt der Modellbildung angesehen werden kann. Berechnungen mit JPred4 zur Sekundärstruktur zeigen, dass an der entsprechenden Stelle keine Helix sein kann

Domänen, Sekundär- und Tertiärstruktur

Weiterhin konnten die Domänen der PsP A auf gleichem Weg identifiziert werden. Die PsP A besteht aus einer α/β -Hydrolasedomäne (Gly₄₅ – Ser₂₀₉ und Asn₄₂₃ – Gly₅₁₉), die die katalytische Triade trägt. Sie wird durch die Insertion der SKS-Domäne (Asp₂₂₀ – Asn₃₃₆) und zwei Adaptersequenzen (Ser₂₁₀ – Phe₂₁₉ und Thr₃₃₇ – Val₄₂₄) unterbrochen. In der zwischen den beiden Domänen liegenden Spalte sitzt die katalytische Triade (rot) (Schema Abb. 3.21, 3D-Modell Abb. 3.22). Die α/β -Hydrolase besteht aus acht α -Helices (A, B₁, B₂, C – F₁, F₂) und acht β -Faltblättern (1 – 8). Die Insertion der SKS-Domäne liegt zwischen β -Faltblatt 6 und α -Helix D. Die SKS-Domäne besteht aus sechs α -Helices (G - L). Die Helices M und N liegen auf der Adaptersequenz, die die SKS-Domäne mit der α -Helix D aus der α/β -Hydrolasedomäne verbindet. Die katalytisch aktiven Aminosäuren sind auf Loops der α/β -Hydrolase lokalisiert, die ein β -Faltblatt mit einer α -Helix verbinden. Ser₁₈₆ liegt zwischen β -Faltblatt 5 und α -Helix C, Asp₄₄₉ zwischen β -Faltblatt 7 und α -Helix E und His₄₇₈ zwischen β -Faltblatt 8 und α -Helix F₁. Die Aminosäuren Tyr₁₈₇ und Ala₁₈₈, die das *oxyanion hole* bilden, sind Bestandteil der α -Helix C. Auf ihr liegt auch Ala₁₉₀, die erste Aminosäure der hydrophoben Tasche. Die verbleibenden drei sind wie folgt positioniert. Phe₃₈₂ ist auf dem Loop, der die α -Helix M und die α -Helix N verbindet lokalisiert. Trp₃₇₂ ist Bestandteil von α -Helix M und Trp₄₅₁ von α -Helix E.

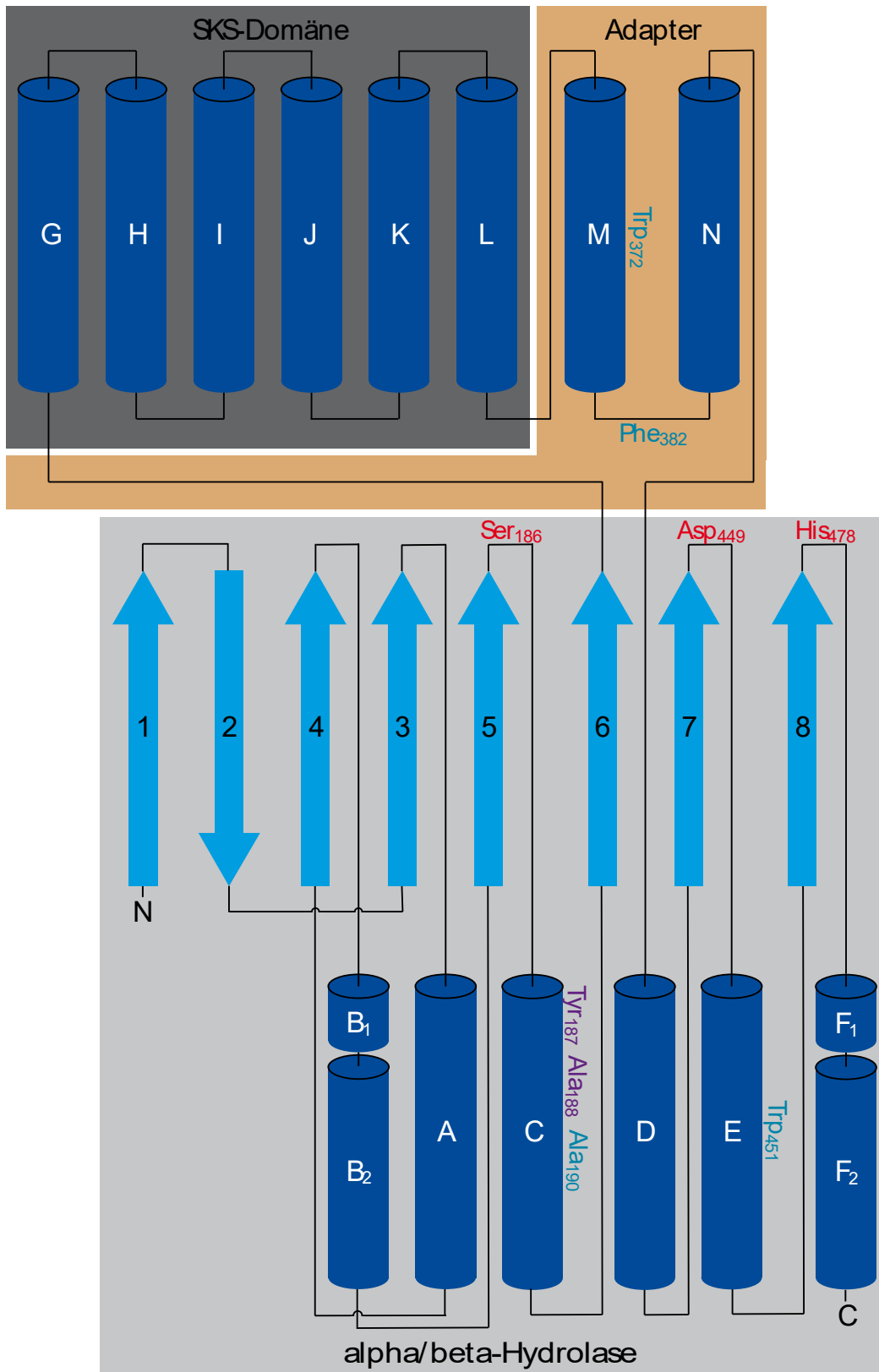


Abb. 3.21: Schematischer Aufbau der PsP A. Die Domänen sind als Felder dargestellt (α/β -Hydrolase als hellgrau, SKS-Domäne als dunkelgrau und Adapterbereich hellbraun). Die Domänen grenzen die zu ihnen gehörenden Strukturen ein (α -Helices als hellblaue Pfeile, β -Faltblatt als dunkelblaue Walzen und Loops als schwarze Linien). Die Aminosäuren der katalytischen Triade (rot), des *oxyanion hole* (violett) und der hydrophoben Tasche (blau) sind an den sie tragenden Strukturen dargestellt

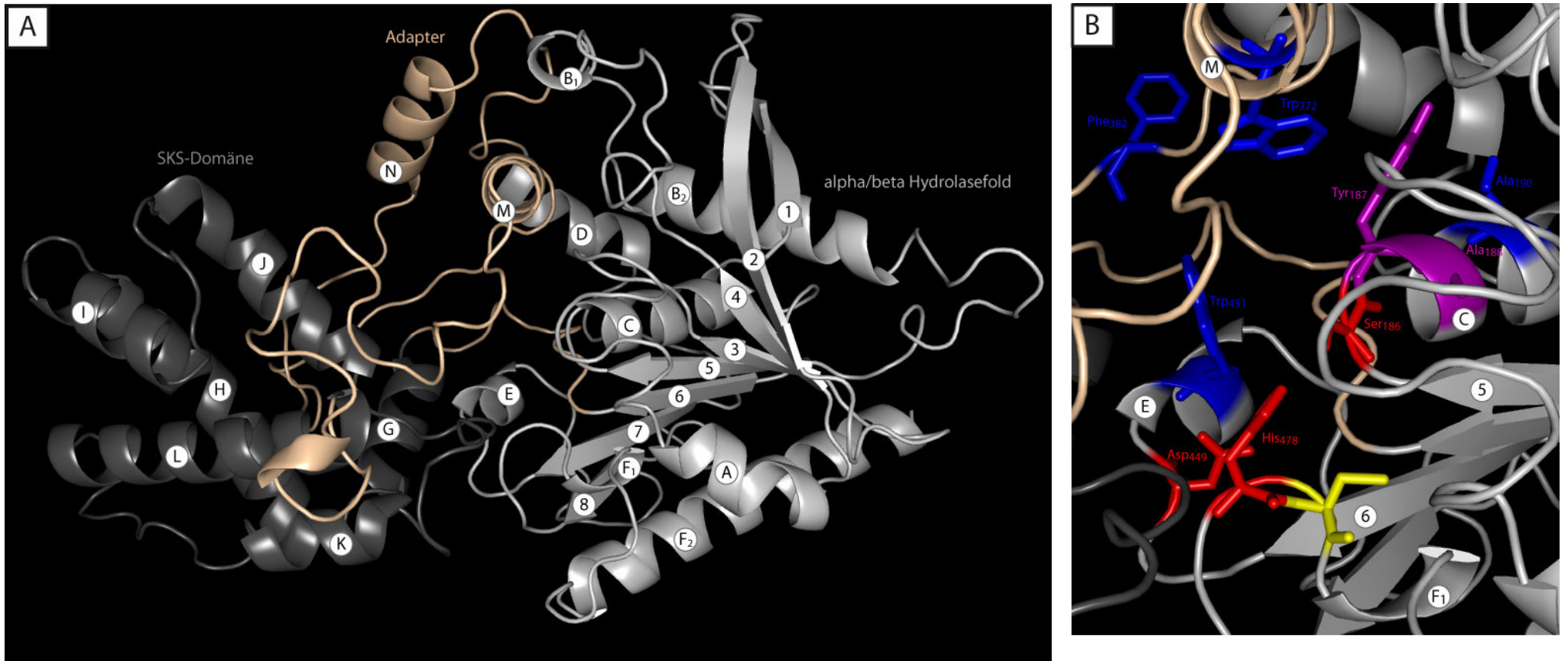


Abb. 3.22: **A:** Bändermodell der PsP A auf der Basis des Homologiemodells. Dargestellt sind der α/β -Hydrolasefold (hellgrau), die SKS-Domäne (dunkelgrau) und die sie verbindende Adaptersequenz (hellbraun). Die α -Helices und β -Faltblätter sind vom N zum C-Terminus durchnummeriert (α -Helices mit Buchstaben, β -Faltblätter mit Zahlen). **B:** Die Aminosäurereste der katalytischen Triade wurden rot, die des *oxyanion hole* violett und die der hydrophoben Tasche blau markiert.

Disulfidbrücken

Um die Positionen der Disulfidbrücken zu bestimmen, wurde ein Multisequenzalignment mit Clustal O durchgeführt. Neben pilzlichen S28-Peptidasen wurden auch Peptidsequenzen tierischen und pflanzlichen Ursprungs sowie die S28.005 des Einzellers *Plasmodiophora brassicae* ins Alignment aufgenommen. Die Auswahl wurde aufgrund folgender Überlegungen getroffen. Zunächst mussten konservierte Cysteinreste in der PsP A aus *Wolfiporia cocos* gefunden werden. Hierfür war ein Vergleich mit Peptidsequenzen anderer Basidiomyceten nötig, da hier die verwandtschaftliche Nähe die entscheidende Rolle spielte. Bei den Sequenzen handelt es sich durchgängig um Daten, die aus Genomprojekten stammen und noch nicht experimentell verifiziert wurden. Bei allen aus Basidiomyceten stammenden Peptidasen konnten sechs konservierte Cysteinreste drei Disulfidbrücken zugeordnet werden, die bei der *Wolfiporia cocos*-PsP A Cys₂₃₄, Cys₃₀₃, Cys₃₄₁, Cys₃₄₉, Cys₃₇₇, Cys₄₀₈, und Cys₄₇₉ entsprechen. Da ein Mangel an experimentellen Arbeiten zu einer pilzlichen S28-Serinpeptidase besteht, die die Position von Schwefelbrücken berücksichtigte, musste hierfür auf Daten menschlichen und tierischen Ursprungs zurückgegriffen werden, welche als hinreichend erforscht gelten. Unter ihnen ist die humane PrCP, die die Basis des in dieser Arbeit erstellten Strukturmodells der PsP A aus *Wolfiporia cocos* bildete. Die Positionen Cys₂₃₄, Cys₃₄₉ und Cys₃₇₇ konnten durch den Abgleich mit den tierischen Sequenzen im Multisequenzalignment als Teil einer Disulfidbrücke bestätigt werden (Anhang, Abb. A.1). Anhand des Computermodells konnten die jeweils korrespondierenden Cysteinreste aufgrund der räumlichen Nähe den drei Disulfidbrücken zugeordnet werden (Abb. 3.23). Es ergaben sich folgende Paarungen: Cys₂₃₄-Cys₃₀₃, Cys₃₄₉-Cys₂₆₄ und Cys₃₇₇-Cys₄₀₈. Hierbei zeigte sich, dass die SKS-Domäne durch eine Disulfidbrücke (Cys₂₃₄ - Cys₃₀₃) stabilisiert wird, die die Helices H und K verbindet. Die beiden anderen Disulfidbrücken befinden sich in einem Loop (Cys₃₄₁ - Cys₃₄₉) bzw. zwischen den Helices M und N des Adapterbereichs (Cys₃₇₇ - Cys₄₀₈).



Abb. 3.23: Darstellung der möglichen Disulfidbrücken der PsP A. **A**, **B** und **C**: Die Graphiken zeigen die drei Cysteinreste Cys₂₃₄, Cys₃₄₉ und Cys₃₇₇, von denen bekannt ist, dass sie Teil einer Disulfidbrücke sind. Aus dem Modell der PsP A wird ersichtlich, dass diese in direkter Nachbarschaft zu den Cysteinresten Cys₃₄₉, Cys₃₇₇ und Cys₄₀₈ stehen. **D**: Cys₄₇₉ ist der einzige Cysteinrest, der aufgrund seiner direkten Nähe zu der katalytisch aktiven Aminosäure His₄₇₈ an keiner Disulfidbrücke beteiligt sein kann

Acetylierung und Glycosylierung

Des Weiteren wurden mögliche Modifikationen wie Acetylierung und N-Glycosylierung mit ihren Positionen in der Primärstruktur durch die Programme NetAcet 1.0 (Kiemer *et al.* 2005) bzw. NetNGlyc 1.0 vorhergesagt. Positionen für O-Glycosylierungsstellen wurden wegen der hohen Abhängigkeit von der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Organismenfamilie und mangels geeigneter Programme für Basidiomyceten nicht vorgenommen. Das Programm NetAcet 1.0 prognostizierte eine Acetylierung an Ser₃. N-Glycosylierungsstellen ließen sich in der Aminosäuresequenz der PsP A mehrfach nachweisen. Mithilfe von NetNGlyc 1.0 konnten zwölf potenzielle Verknüpfungsstellen identifiziert werden. Die Positionen Asn₆₅ und Asn₁₃₄ schieden aus, da sie in der variablen Position des Aminosäuretripletts ein Prolin beinhalteten. Prolin kommt aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften in Sequons nicht vor. Die einzelnen Sequons sind in Abb. 3.24 und Tab. 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2: Gefundene potenzielle N-Glycosylierungsstellen, ihre Positionen und die Wahrscheinlichkeiten der Glycosylierung (in NetNGlyc 1.0 als Potential bezeichnet)

Position	Sequenz	Potential	Jury	N-Glyc	SEQUON
44	NGTE	0.5654	(7/9)	+	ASN-XAA-SER/THR
52	NTTY	0.7261	(9/9)	++	ASN-XAA-SER/THR
64	NNPS	0.5938	(8/9)	+	
107	NATI	0.6807	(9/9)	++	ASN-XAA-SER/THR
137	NNLS	0.6124	(9/9)	++	
138	NLSV	0.6690	(9/9)	++	ASN-XAA-SER/THR
162	NVKL	0.8393	(9/9)	+++	
172	NVTP	0.3943	(7/9)	-	ASN-XAA-SER/THR
198	NKPD	0.6883	(9/9)	++	
218	NYWG	0.7350	(8/9)	+	
233	NCSA	0.5856	(8/9)	+	ASN-XAA-SER/THR
252	NDTD	0.5811	(8/9)	+	ASN-XAA-SER/THR
258	NEIK	0.6943	(9/9)	++	
267	NLTH	0.6418	(9/9)	++	ASN-XAA-SER/THR
310	NGVS	0.5274	(6/9)	+	
333	NTTF	0.4823	(4/9)	-	ASN-XAA-SER/THR
340	NCYD	0.6930	(9/9)	++	
354	NASA	0.6131	(8/9)	+	ASN-XAA-SER/THR
366	NNAE	0.4782	(4/9)	-	
367	NAER	0.3946	(8/9)	-	
378	NQMG	0.5361	(3/9)	+	
404	NERQ	0.5500	(8/9)	+	
425	NETN	0.6514	(9/9)	++	ASN-XAA-SER/THR
428	NKAY	0.4899	(5/9)	-	
445	NGER	0.7087	(9/9)	++	
486	NAQV	0.4911	(6/9)	-	

Um abzuschätzen, ob die Positionen der Sequons bei einem strukturell sehr ähnlichen Enzym von einer Glycosyltransferase erkannt werden und für eine Modifikation zugänglich sind, wurde in der Literatur nach experimentell verifizierten N-Glycosylierungsstellen von S28-Serinproteasen gesucht. Fünf der Sequons konnten als mögliche N-Glycosylierungsstellen bestätigt werden. Die Ergebnisse sind in einer Tabelle zusammengefasst, die den Ursprungsorganismus, den zugehörigen UniProt-Eintrag und die zum Ausgangsenzym äquivalente Aminosäureposition in der *Wolfiporia cocos*-PsP A beinhaltet (Tab. 3.3). Die verwendeten Informationen entstammen den oben verwendeten, für das Multisequenzalignment eingesetzten Datensätzen, sofern sie Angaben über eine N-Glycosylierung beinhalteten.

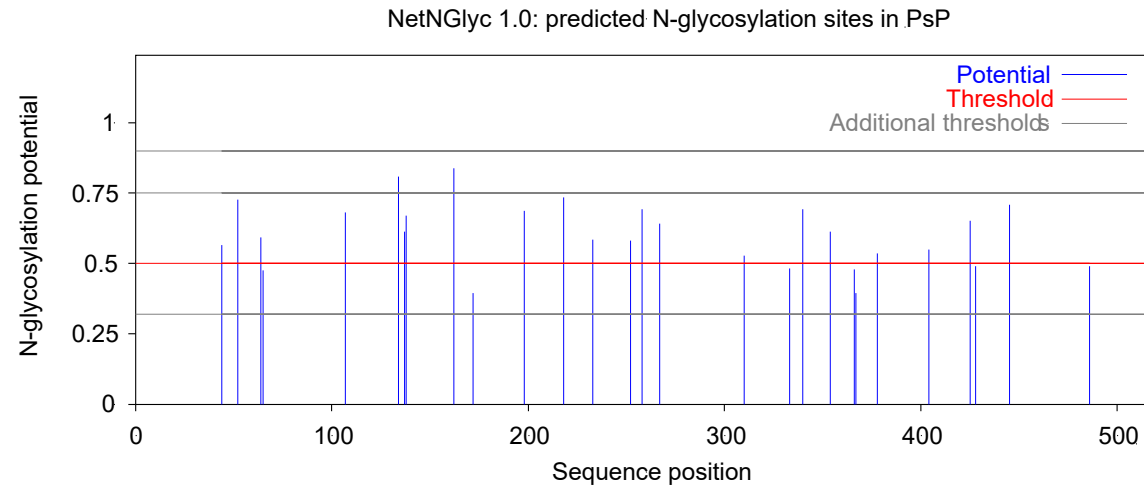


Abb. 3.24: Vorhersage der N-Glycosylierungspositionen in der Aminosäuresequenz durch NetNGlyc 1.0

Tab. 3.3: Verifizierung möglicher N-Glycosylierungsstellen aus dem Vergleich der N-Glycosylierungsstellen der *Wolfiporia cocos*-PsP A mit S28-Serinpeptidasen aus anderen Organismen. Mit Angaben zu Wirtsorganismus, UniProt-Eintrag der entsprechenden S28-Serinpeptidase und der zum Ausgangsenzym äquivalente Aminosäureposition in der *Wolfiporia cocos*-PsP A

Spezies	<i>Homo sapiens</i>		<i>Pongo abelii</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Typ	PCP	TSSP	PCP	PCP	DPP2	PCP	PCP
UniProt-Eintrag	P42785	Q9NQE7	Q5RBU7	Q2TA14	Q9EPB1	Q7TMR0	P34676
bestätigte Position	138	x					x
	172	x					
	233			x			
	333	x	x	x	x	x	x

Zudem wurde in einem Multisequenzalignment nach konservierten Sequons gesucht (Anhang, Abb. A.2). Die Informationen hieraus wurden mit den Ergebnissen von NetNGlyc 1.0 und denen aus dem Abgleich mit anderen S28 Serinpetidasen in einer Tabelle zusammengefasst (Tab. 3.4). Die einzelnen Sequonpositionen werden diesen Ergebnissen gegenübergestellt. Aus der Anzahl der Bestätigungen einer Position durch die unterschiedlichen Untersuchungen kann eine Wahrscheinlichkeit für eine N-Glycosylierung der Position abgeleitet werden. In Abb. 3.25 wurde dies mittels unterschiedlicher Farben für die entsprechenden N-Glycosylierungsstellen dargestellt (einmal bestätigt blau, zweimal bestätigt grün und dreimal bestätigt gelb).

Tab. 3.4: Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den verschiedenen Untersuchungen der Sequons zu den entsprechenden N-Glycosylierungsstellen

Position von Asn	Sequon	NetNGlyc 1.0	konserviert im Alignment	Abgleich mit anderen S28
44	NGTE	x	x	
52	NTTY	x	x	
107	NATI	x	x	
138	NLSV	x	x	x
172	NVTP	x		x
233	NCSA	x	x	x
252	NDTD	x		
267	NLTH	x	x	
333	NTTF	x	x	x
354	NASA	x	x	
425	NETN	x		

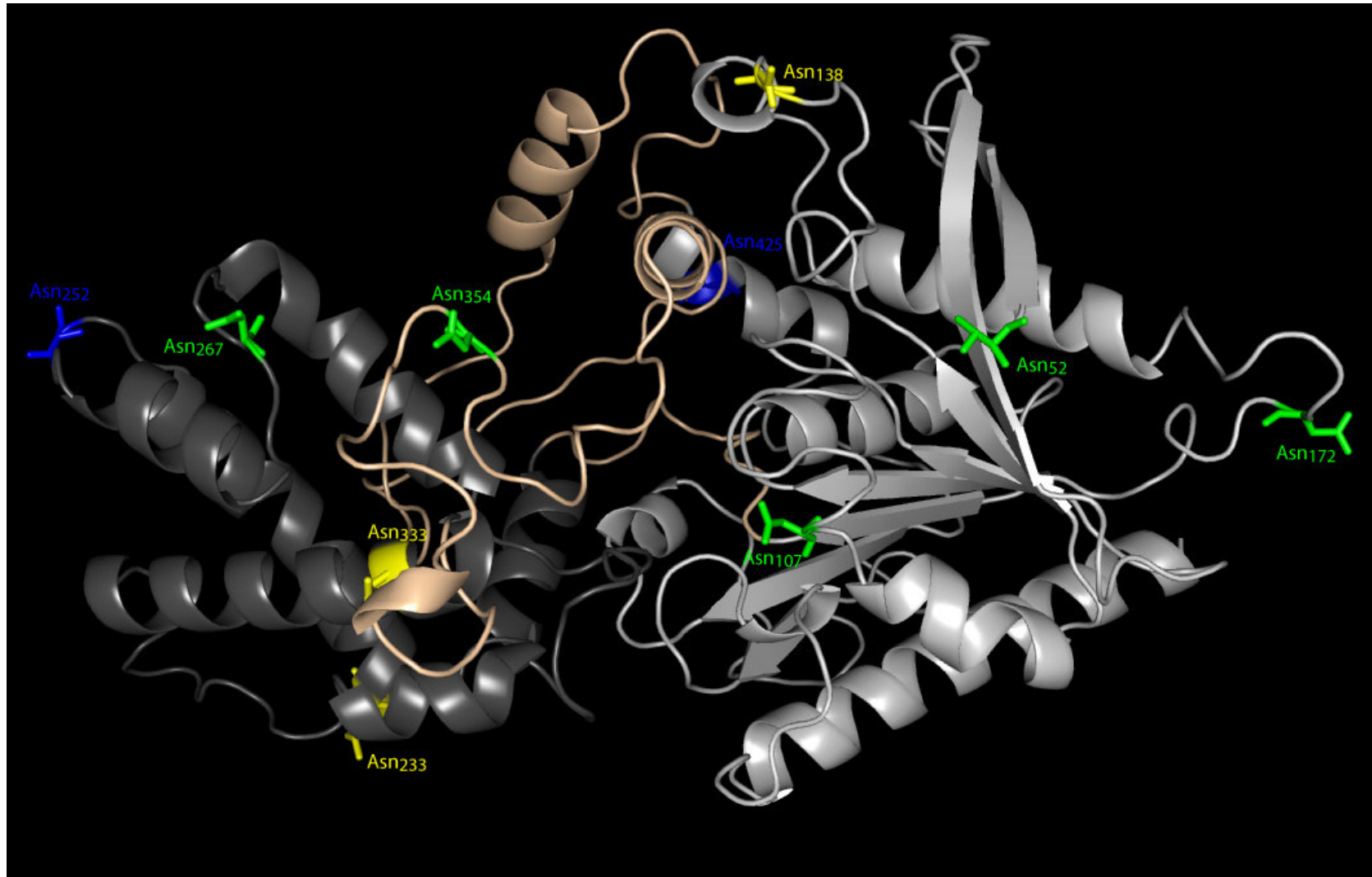


Abb. 3.25: Modell der PsP A auf Basis des Homologiemodells. Die Aminosäurereste, die als potenzielle Bindungsstellen der N-Glycosylierung identifiziert wurden, sind farbig markiert. Die verschiedenen Farben drücken die Wahrscheinlichkeit einer Glycosylierung aus, die auf Basis der Suchergebnisse nach konservierten Sequenzen in einem Multisequenzalignment, der Ergebnisse von NetNGlyc 1.0 und des Abgleichs bekannter Glycosylierungsstellen von anderen S28 Serinpeptidasen ermittelt wurden. Die Wahrscheinlichkeit nimmt von blau über grün nach gelb zu. Asn₄₄, die N-terminale Aminosäure, konnte nicht dargestellt werden, da dieser Bereich von der Kristallstruktur auf der dieses Modell basiert, nicht abgedeckt wird

3.2 Lignocelluloseprojekt

3.2.1 Substratanalytik

Von der Süd-Chemie AG wurden zwei Substrate zu Verfügung gestellt. Nach Angaben des Unternehmens wurde dafür Weizenstroh durch eine heiße, schwefelsaure Hydrolyse aufgeschlossen. Um ein Medium zu entwickeln, das für das Wachstum von Basidiomyceten geeignet ist, wurde eine Gesamtanalyse der gelieferten Substrate durchgeführt. Ziel war es, Art und Menge der enthaltenen Nährstoffe zu bestimmen. Mit dem ersten (nachfolgend Substrat I genannt) erfolgte der Großteil des Screenings. Das zweite Substrat (Substrat II) beruhte auf einer Prozessverbesserung von Seiten der Süd-Chemie AG und ersetzte im Verlauf des Projekts Substrat I. Durch eine effizientere Abtrennung der Hemicellulose war es wesentlich ärmer an Polysacchariden. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tab. 3.5 dargestellt.

Tab. 3.5: Ergebnisse der Elementaranalyse, der Bestimmung der reduzierenden Zucker (Luff-Schoorl), Brennwert, pH-Wert und Trockenmasse der Substrate I und II

		Substrat (I)	Substrat (II)
Elementaranalyse	N	1,40%	0,96%
	C	44,30%	41,40%
	H	5,30%	5,73%
Gesamtzuckergehalt (Luff-Schoorl)		2,4 g 100 g ⁻¹	0,16 g 100 g ⁻¹
Brennwert (Bombenkalorimeter)		18,5 kJ g ⁻¹	21,5 kJ g ⁻¹
pH		4,46	4,03
Trockenmasse		22,2 g 100 g ⁻¹	31,7 g 100 g ⁻¹

Gesamtfett

Der Gesamtfettgehalt für Substrat I wurde nach Weibull-Stoldt ermittelt. Detektiert wurden < 0,01 g 100 g⁻¹ Gesamtlipide. Der Gesamtfettgehalt von Substrat II war vernachlässigbar klein.

3.2.2 Vergleich verschiedener Vorkulturmedien

Da in industriellen Prozessen die Raum-Zeitausbeute eine bedeutende Rolle spielt und die Vorkulturen der Basidiomyceten im Schnitt eine Woche, bei manchen Spezies auch deutlich länger brauchten, wurde alternativ zum SNL-Medium auch Malzextraktmedium für die Kultivierung getestet, um ein schnelleres Wachstum zu erreichen.

Die meisten Pilze bewuchsen die Agarplatten mit Malzextraktmedium schneller als jene mit SNL-Medium. Die Ausnahme bildeten dabei *Fistulina hepatica*, *Polyporus tuberaster* und *Punctularia atropurpurascens*, die SNL als Medium bevorzugten und *Ceriporiopsis rivulosa*, *Coprinus clastophyllus*, *Hericium coralloides*, *Irpex consors*, *Polyporus umbellatus* und *Pycnoporus coccineus*, die auf beiden Medien gleich gut wuchsen (Tab. 3.6) Eine Besonderheit stellte *Inonotus dryadeus* dar, der auf Empfehlung der DSMZ auf einem Malzextraktmedium kultiviert werden musste, das mit Aktivkohle versetzt war. Die von der DSMZ beschriebene Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit war zwar deutlich, aber für einen weiteren Einsatz im Screening nicht ausgeprägt genug.

Tab. 3.6: Vergleich des Myzelwachstums auf SNL- und Malzextraktmedium; mit einem Kreuz gekennzeichnet ist jeweils das Medium, bei welchem das Myzel die Platte zuerst vollständig bewuchs

Art	MEA + Aktivkohle	SNL	MEA	Wachstumsdauer [d]
<i>Abortiporus biennis</i>			x	11
<i>Armillaria bulbosa</i>			x	>60
<i>Auricularia auricula-judae</i>			x	10
<i>Auricularia fuscusuccinea</i>			x	8
<i>Auricularia mesenterica</i>			x	7
<i>Auricularia polytricha</i>			x	7
<i>Bjerkandera fumosa</i>			x	>60
<i>Ceriporiopsis resinascens</i>			x	13
<i>Ceriporiopsis rivulosa</i>		x	x	14
<i>Coprinus clastophyllus</i>		x	x	19
<i>Coprinus sterquilinius</i>			x	17
<i>Cyathus africanus</i>			x	11
<i>Dichomitus albidofuscus</i>			x	8
<i>Dichomitus campestris</i>			x	17
<i>Dichomitus squalens</i>			x	6
<i>Exidia glandulosa</i>			x	14
<i>Fistulina hepatica</i>		x		28
<i>Ganoderma anullaris</i>			x	7
<i>Ganoderma applanatum</i>			x	6
<i>Hericium cirrhatum</i>				>60
<i>Hericium coralloides</i>		x	x	14
<i>Heterobasidion araucariae</i>			x	7
<i>Heterobasidion insulare</i>			x	7
<i>Inonotus dryadeus</i>	x			42
<i>Irpex consors</i>		x	x	4
<i>Irpex vellereus</i>			x	20
<i>Ischnoderma benzoinum</i>			x	6
<i>Lentinellus cochleatus</i>			x	59
<i>Lentinus cladopus</i>			x	6
<i>Marasmius cohortalis</i>			x	6
<i>Meripilus giganteus</i>			x	4
<i>Merulius tremellosus</i>			x	4
<i>Microporus affinis</i>			x	7
<i>Mycena epipterygia</i>			x	>60
<i>Nidula niveotomentosa</i>			x	15
<i>Oudemansiella platyphylla</i>			x	>60
<i>Panellus serotinus</i>			x	8
<i>Phanerochaete tamariciphila</i>			x	13
<i>Phellinus igniarius</i>			x	11
<i>Phlebia subserialis</i>			x	6
<i>Pholiota nameko</i>			x	12

Fortsetzung Tab. 3.6

Art	MEA + Aktivkohle	SNL	MEA	Wachstumsdauer [d]
<i>Pholiota squarrosa</i>			x	17
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>			x	8
<i>Pleurotus flabellatus</i>			x	4
<i>Polyporus squamosus</i>			x	20
<i>Polyporus tuberaster</i>		x		20
<i>Polyporus umbellatus</i>		x	x	7
<i>Punctularia atropurpurascens</i>		x		14
<i>Punctularia strigosozonata</i>			x	8
<i>Pycnoporus coccineus</i>		x	x	8
<i>Pycnoporus sanguineus</i>			x	7
<i>Stereum complicatum</i>			x	4
<i>Stereum rameale</i>			x	4
<i>Stropharia aeruginosa</i>			x	>60
<i>Termitomyces albuminosus</i>			x	5
<i>Termitomyces poonensis</i>			x	>60
<i>Trametes ochracea</i>			x	11
<i>Trametes suaveolens</i>			x	7
<i>Tyromyces chioneus</i>			x	8

Die Anwendung des Malzextraktmedium wie auf der Homepage der DSMZ (Medium 90) empfohlen, bewirkte eine etwas bessere Biomassebildung bei den Pilzen und wurde im Weiteren für alle Vorkulturen genutzt. Jene Pilze, die nach einer zweiwöchigen Inkubation die Agarplatte nicht voll bewachsen hatten, wurden aus dem Screening genommen, da ihr Einsatz für industrielle Zwecke als unwirtschaftlich anzusehen ist.

3.2.3 Vergleich verschiedener Hauptkulturmedien

Ferner wurde das Wachstumsverhalten der Pilze auf verschiedenen Lignocellulosemedien verglichen. Da die Analyse ergab, dass der Stickstoffgehalt des Lignocellulosesubstrats geringer war als in dem üblicherweise eingesetzten Standardhauptkulturmedium, wurden zwei verschiedene Hauptkulturmedien entwickelt, von denen eines mit und eines ohne Zusatz von Asparaginsäure (Stickstoffquelle des Standardhauptkulturmediums) inkubiert wurde.

Für die meisten Pilze im Screening erwiesen sich beide Medien als gute Substrate. Eine schnellere Ausbreitung des Myzels über die Screeningplatten hinweg wurde in den meisten Fällen beim Medium ohne Asparaginsäurezusatz beobachtet (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Vergleich des Myzelwachstums auf Lignocellulosemedien (Substrat I) mit und ohne Aspartat-Supplementierung; mit einem Kreuz gekennzeichnet ist jeweils das Medium, bei welchem das Myzel die Platte schneller vollständig bewuchs. Bei gleich schnellem Wachstum sind beide Spalten mit einem Kreuz markiert.

Art	Lignocellulose-Medium	Lignocellulose-Aspartat-Medium	Wachstumsdauer [d]
<i>Abortiporus biennis</i>	x		7
<i>Armillaria bulbosa</i>	x		41
<i>Auricularia auricula-judae</i>	x		9
<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	x		8
<i>Auricularia mesenterica</i>	x		7
<i>Auricularia polytricha</i>	x	x	6
<i>Bjerkandera fumosa</i>	x		>60
<i>Ceriporiopsis resinascens</i>	x		14
<i>Ceriporiopsis rivulosa</i>	x		6
<i>Coprinus clastophyllus</i>	x		21
<i>Coprinus sterquilinius</i>	x	x	15
<i>Cyathus africanus</i>	x	x	12
<i>Dichomitus albidofuscus</i>	x		9
<i>Dichomitus campestris</i>	x		15
<i>Dichomitus squalens</i>	x	x	7
<i>Exidia glandulosa</i>		x	12
<i>Fistulina hepatica</i>	x		27
<i>Ganoderma anullaris</i>	x		9
<i>Ganoderma applanatum</i>	x		7
<i>Hericium cirrhatum</i>	x		25
<i>Hericium coralloides</i>	x		9
<i>Heterobasidion araucariae</i>	x	x	6
<i>Heterobasidion insulare</i>	x		7
<i>Inonotus dryadeus</i>	x		35
<i>Irpex consors</i>	x	x	4
<i>Irpex vellereus</i>	x		10
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	x		6
<i>Lentinellus cochleatus</i>	x		51
<i>Lentinus cladopus</i>	x		6
<i>Marasmius cohortalis</i>	x	x	5
<i>Meripilus giganteus</i>	x		4
<i>Merulius tremellosus</i>	x		6
<i>Microporus affinis</i>	x		8

Fortsetzung Tab. 3.7

Art	Lignocellulose-Medium	Lignocellulose-Aspartat-Medium	Wachstumsdauer [d]
<i>Mycena epipterygia</i>	x		30
<i>Nidula niveotomentosa</i>	x		16
<i>Oudemansiella platyphylla</i>	x		49
<i>Panellus serotinus</i>	x		9
<i>Phanerochaete tamariciphila</i>	x		14
<i>Phellinus igniarius</i>	x		12
<i>Phlebia subserialis</i>		x	8
<i>Pholiota nameko</i>	x	x	12
<i>Pholiota squarrosa</i>	x		15
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	x	x	6
<i>Pleurotus flabellatus</i>	x	x	5
<i>Polyporus squamosus</i>	x	x	7
<i>Polyporus tuberaster</i>		x	14
<i>Polyporus umbellatus</i>	x		7
<i>Punctularia atropurpurascens</i>		x	9
<i>Punctularia strigosozonata</i>		x	7
<i>Pycnoporus coccineus</i>	x		8
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	x		6
<i>Stereum complicatum</i>	x	x	7
<i>Stereum rameale</i>	x		15
<i>Stropharia aeruginosa</i>		x	55
<i>Termitomyces albuminosus</i>		x	12
<i>Termitomyces poonensis</i>	x		48
<i>Trametes ochracea</i>	x		11
<i>Trametes suaveolens</i>	x		7
<i>Tyromyces chioneus</i>	x		8

3.2.4 Erster Screeningschritt

Anfangs wurde getestet, auf welchem Medium die Pilze überhaupt wachsen, ob sie das Lignin abbauen und wenn sie beide Bedingungen erfüllen, auf welchem Medium das Lignin schneller abgebaut wurde. Anhand einer deutlichen Aufhellung des Kulturmediums (emers auf Agarplatten) war ein Abbau des Lignins bei insgesamt mindestens 27 Pilzen visuell erkennbar (Aufnahmen nach jeweils 60 Tagen). Bei fast allen Pilzen wurde die Aufhellung des Mediums überwiegend in den nicht mit Aspartat supplementierten Kulturen beobachtet. Der Ligninabbau auf mit Aspartat supplementierten Platten erfolgte stark zeitverzögert. Beispielhaft werden die Agarplatten der drei Pilze dargestellt, die aus dem Screening als aussichtsreichste Kandidaten hervorgingen (Abb. 3.26 bis Abb. 3.28).

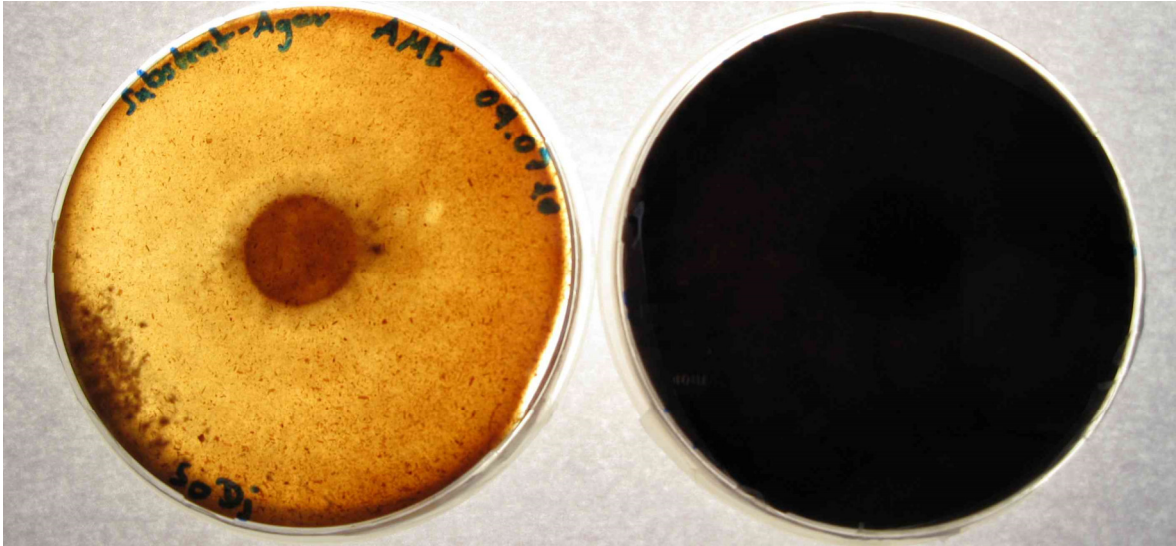


Abb. 3.26: *Auricularia mesenterica* auf Lignocellulosemedium (links) und Lignocellulose supplementiert mit Aspartat (rechts)

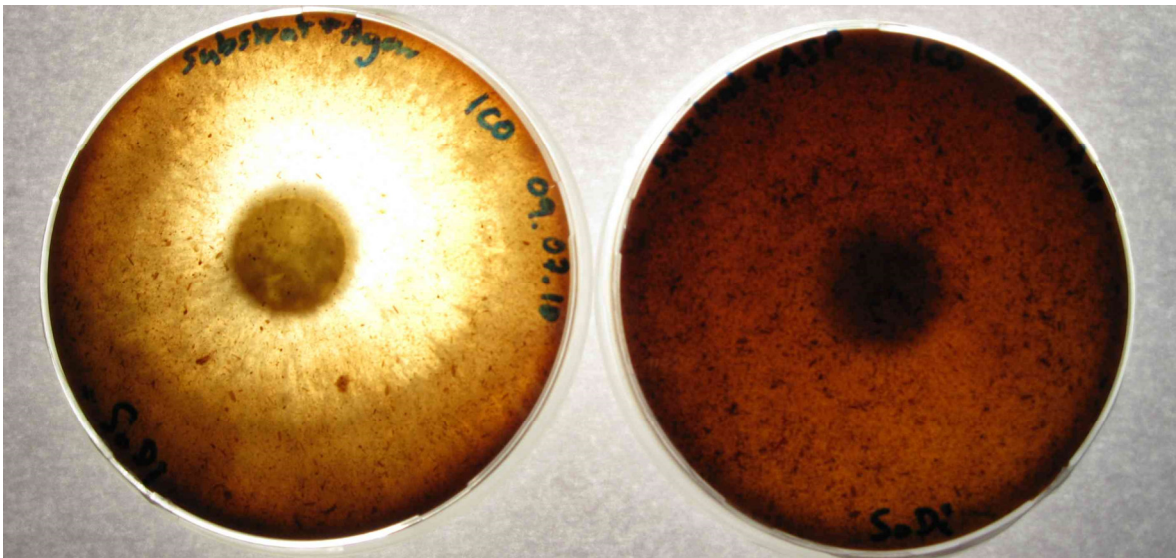


Abb. 3.27: *Irpex consors* auf Lignocellulosemedium (links) und Lignocellulose supplementiert mit Aspartat (rechts)

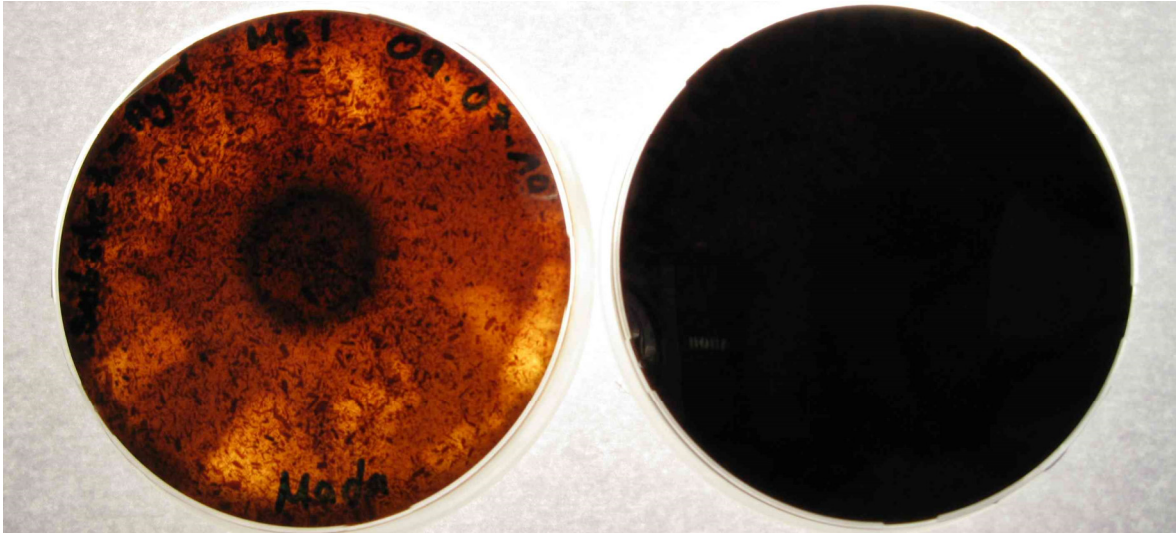


Abb. 3.28: *Stereum hirsutum* auf Lignocellulosemedium (links) und Lignocellulose supplementiert mit Aspartat (rechts)

Für die Auswahl der Spezies für die Submerskultivierung galten folgende Kriterien:

- eine signifikante Aufhellung des Mediums
- schnelleres Wachstum auf nicht mit Aspartat supplementierten Platten
- schnelles Wachstum auf Vorkulturmedien
- schnelles Wachstum auf Hauptkulturmedien

Zu diesem Zweck wurden all jene Spezies aus dem weiteren Screening ausgeschlossen, die Lignin entweder gar nicht abbauten oder dies nur bei Supplementierung des Mediums mit Aspartat bewirkten. Zudem mussten die ausgewählten Pilze sowohl im Vor- als auch im Hauptkulturmedium die Agarplatte innerhalb von zwei Wochen überwachsen haben (Tab. 3.8).

Tab. 3.8: alphabetische Aufstellung der 59 im Screening eingesetzten Pilze gegen die einzelnen Ausschlusskriterien des ersten Screeningschritts. Jene Spezies, die grau hinterlegt sind, wurden in den nächsten Screeningschritt übernommen

Art	baut Lignin schwach bis gar nicht ab	wächst auf allen Medien langsam (>14 d)		muss mit Nährstoffen supplementiert werden um Substrat abzubauen (Baut auf Lig + Asp Lignin ab)
		Vorkultur	Lignocellulose	
<i>Abortiporus biennis</i>				x
<i>Armillaria bulbosa</i>	x		41	
<i>Auricularia auricula-judae</i>	x			
<i>Auricularia fuscosuccinea</i>				
<i>Auricularia mesenterica</i>				
<i>Auricularia polytricha</i>				
<i>Bjerkandera fumosa</i>	x	>60	>60	
<i>Ceriporiopsis resinascens</i>			14	
<i>Ceriporiopsis rivulosa</i>				
<i>Coprinus clastophyllus</i>	x	19	21	
<i>Coprinus sterquilinus</i>	x	17	15	x
<i>Cyathus africanus</i>	x			
<i>Dichomitus albidofuscus</i>				
<i>Dichomitus campestris</i>	x	17	15	
<i>Dichomitus squalens</i>				
<i>Exidia glandulosa</i>	x	14		
<i>Fistulina hepatica</i>	x	28	27	
<i>Ganoderma anullaris</i>	x			
<i>Ganoderma applanatum</i>				
<i>Hericium cirrhatum</i>	x	>60	25	
<i>Hericium coralloides</i>	x	14		
<i>Heterobasidion araucariae</i>				
<i>Heterobasidion insulare</i>				
<i>Inonotus dryadeus</i>	x	42	35	
<i>Irpex consors</i>				
<i>Irpex vellereus</i>				
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	x			
<i>Lentinellus cochleatus</i>	x	59	51	
<i>Lentinus cladopus</i>				
<i>Marasmius cohortalis</i>				
<i>Meripilus giganteus</i>				
<i>Merulius tremellosus</i>				
<i>Microporus affinis</i>				
<i>Mycena epipterygia</i>		>60	30	
<i>Nidula niveotomentosa</i>				
<i>Oudemansiella platyphylla</i>	x	>60	49	
<i>Panellus serotinus</i>	x			x

Fortsetzung Tab. 3.8

Art	baut Lignin schwach bis gar nicht ab	wächst auf allen Medien langsam (>14 d)		muss mit Nährstoffen supplementiert werden um Substrat abzubauen (Baut auf Lig + Asp Lignin ab)
		Vorkultur	Lignocellulose	
<i>Pholiota nameko</i>	x			
<i>Pholiota squarrosa</i>	x	17	15	
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>				
<i>Pleurotus flabellatus</i>				
<i>Polyporus squamosus</i>	x	20		x
<i>Polyporus tuberaster</i>	x	20	14	
<i>Polyporus umbellatus</i>	x			
<i>Punctularia atropurpurascens</i>	x	14		
<i>Punctularia strigosozonata</i>				
<i>Pycnoporus coccineus</i>	x			
<i>Pycnoporus sanguineus</i>				
<i>Stereum complicatum</i>	x			
<i>Stereum rameale</i>	x		15	
<i>Stropharia aeruginosa</i>	x	>60	55	
<i>Termitomyces albuminosus</i>	x			
<i>Termitomyces poonensis</i>	x	>60	48	
<i>Trametes ochracea</i>	x			
<i>Trametes suaveolens</i>				
<i>Tyromyces chioneus</i>				

3.2.5 Zweiter Screeningschritt

Das weitere Screening mit den verbleibenden Spezies erfolgte in Submerskultur. Die Pilze *Nidula niveotomentosa* und *Phanerochaete tamariciphila* zeigten während des vierzehntägigen Untersuchungszeitraums weder Laccase- noch Peroxidaseaktivität.

Als Selektionskriterium wurden primär die lignolytischen Enzymaktivitäten herangezogen. Bei einigen Spezies wurde eine Aufklärung des Submerskulturmediums beobachtet und dieses als weiteres Auswahlkriterium herangezogen (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: lignolytische Enzymaktivitäten in Submerskultur. Die Spezies, die grau hinterlegt sind, wurden in den nächsten Screeningschritt übernommen

Art	Aufklärung des Mediums	hohe Laccaseaktivität, geringe Peroxidaseaktivität	geringe Laccase-Aktivität, hohe Peroxidaseaktivität	geringe Laccaseaktivität, geringe Peroxidaseaktivität
<i>Auricularia fuscusuccinea</i>			x	
<i>Auricularia mesenterica</i>	x		x	
<i>Auricularia polytricha</i>			x	
<i>Ceriporiopsis rivulosa</i>				x
<i>Dichomitus albidofuscus</i>				x
<i>Dichomitus squalens</i>	x	x		
<i>Ganoderma applanatum</i>				x
<i>Heterobasidion araucariae</i>				x
<i>Heterobasidion insulare</i>				x
<i>Irpex consors</i>	x	x		
<i>Irpex vellereus</i>				x
<i>Lentinus cladopus</i>				x
<i>Marasmius cohortalis</i>	x	x		
<i>Meripilus giganteus</i>	x	x		
<i>Merulius tremellosus</i>	x	x		
<i>Microporus affinis</i>	x	x		
<i>Nidula niveotomentosa</i>				x
<i>Phanerochaete tamariciphila</i>				x
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	x	x		
<i>Pleurotus flabellatus</i>	x	x		
<i>Punctularia strigosozonata</i>	x	x		
<i>Pycnoporus sanguineus</i>		x		
<i>Trametes suaveolens</i>				x
<i>Tyromyces chioneus</i>				x

3.2.6 Optimierung der Medien

Ziel der Medienoptimierung war, die Enzymaktivität durch Modifizierung des Mediums zu steigern und zu prüfen, ob der teure Medienbestandteil BME (Vitaminlösung) entbehrlich ist. Für jede Spezies wurden vier Kolben angesetzt. Einer unter Standardbedingungen als Referenz, einer mit doppelter Substratmenge, ein weiterer ohne den Zusatz der BME-Lösung und ein Kolben mit Stroh. Die Ergebnisse werden beispielhaft an *Irpex consors* und *Stereum hirsutum* demonstriert.

BME-Lösung

Aus den Graphen für *Irpex consors* (Abb. 3.29 und Abb. 3.30) und *Stereum hirsutum* (Abb. 3.31 und Abb. 3.32) wird ersichtlich, dass BME keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatte. BME wurde von den Pilzen nicht benötigt und musste in nachfolgenden Kulturen nicht mehr zugegeben werden.

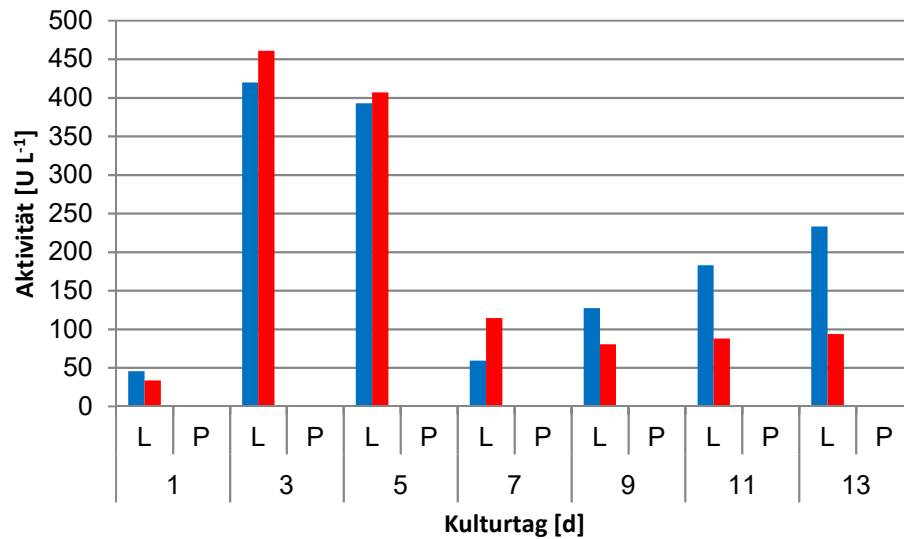


Abb. 3.29: Laccaseaktivität im Kulturüberstand von *Irpex consors* unter Standardbedingungen (blau) und ohne BME-Lösung (rot)

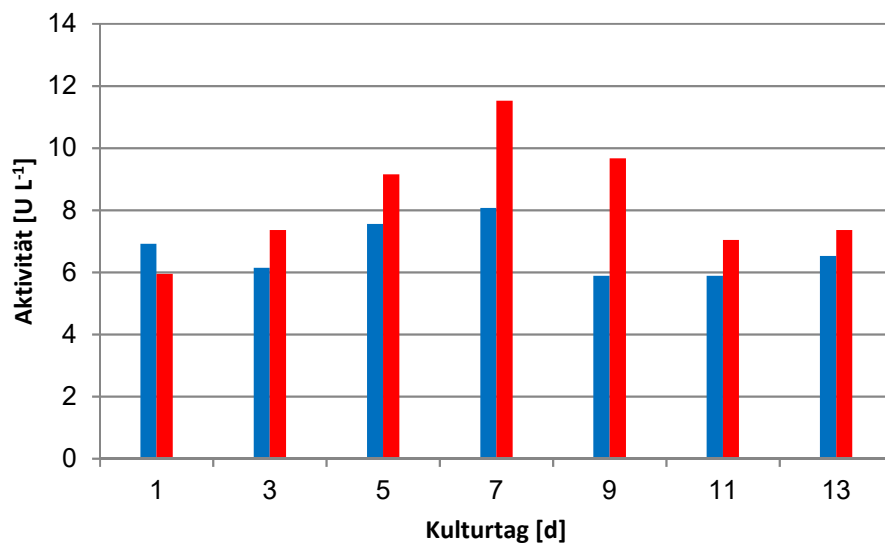


Abb. 3.30: β -Glucosidase-Aktivität im Überstand von *Irpex consors* unter Standardbedingungen (blau) und ohne BME-Lösung (rot)

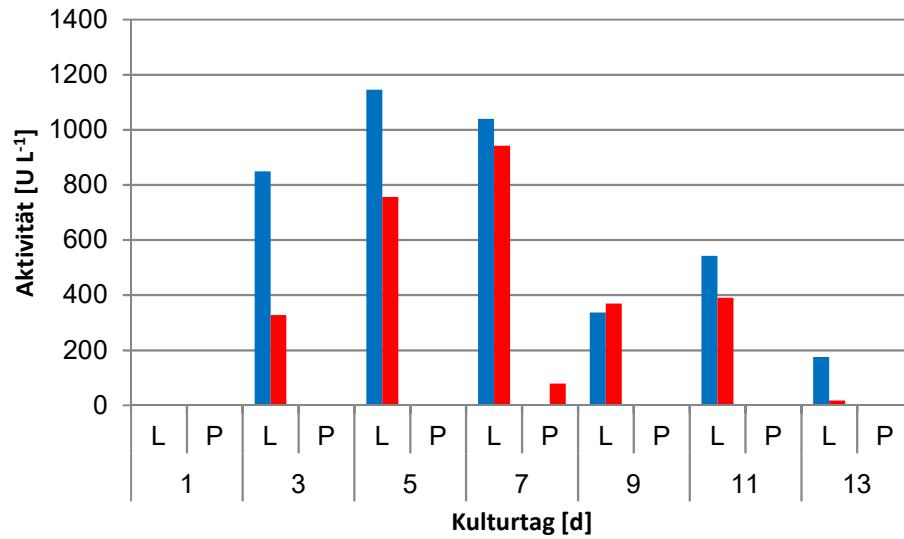


Abb. 3.31: Laccase- und Peroxidaseaktivität im Kulturüberstand von *Stereum hirsutum* unter Standardbedingungen (blau) und ohne BME-Lösung (rot)

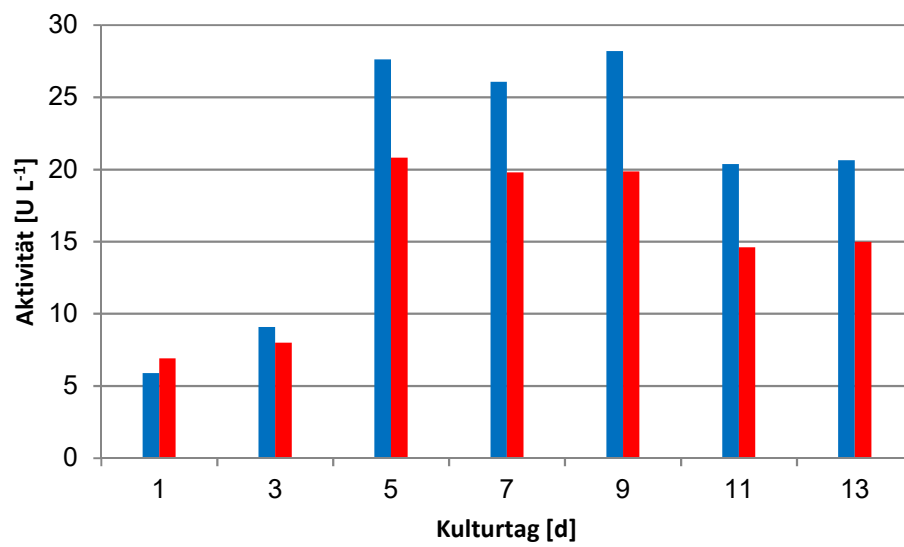


Abb. 3.32: β -Glucosidase-Aktivität im Überstand von *Stereum hirsutum* unter Standardbedingungen (blau) und ohne BME-Lösung (rot)

Stroh

Als Nächstes wurde untersucht, ob die Expression der ligninabbauenden Enzyme durch die Kultivierung mit einem Zusatz von Stroh gesteigert werden kann. Wie aus Abb. 3.33 und Abb. 3.35 ersichtlich wird, fiel die Laccaseaktivität sowohl bei *Irpex consors* als auch bei *Stereum hirsutum* bei einer Kultivierung auf Stroh ab. Die β -Glucosidaseaktivität blieb bei beiden Spezies unbeeinflusst (Abb. 3.34 und Abb. 3.36).

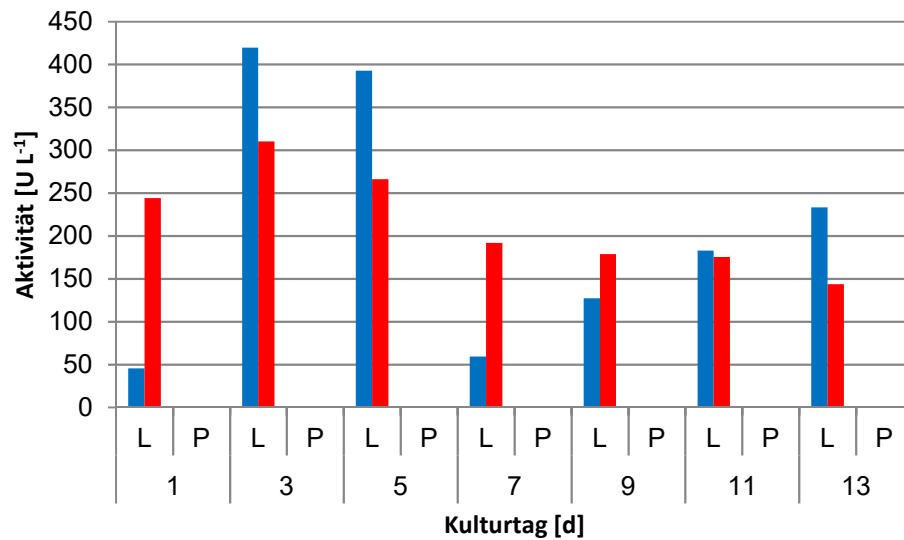


Abb. 3.33: Laccaseaktivität im Kulturüberstand von *Irpex consors* unter Standardbedingungen (blau) und mit Stroh (rot)

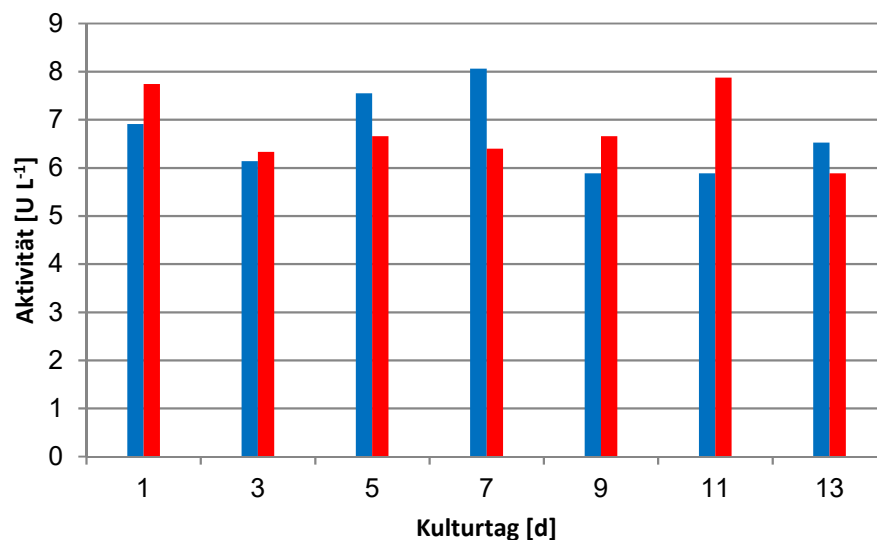


Abb. 3.34: β -Glucosidase-Aktivität im Überstand von *Irpex consors* unter Standardbedingungen (blau), mit Stroh (rot)

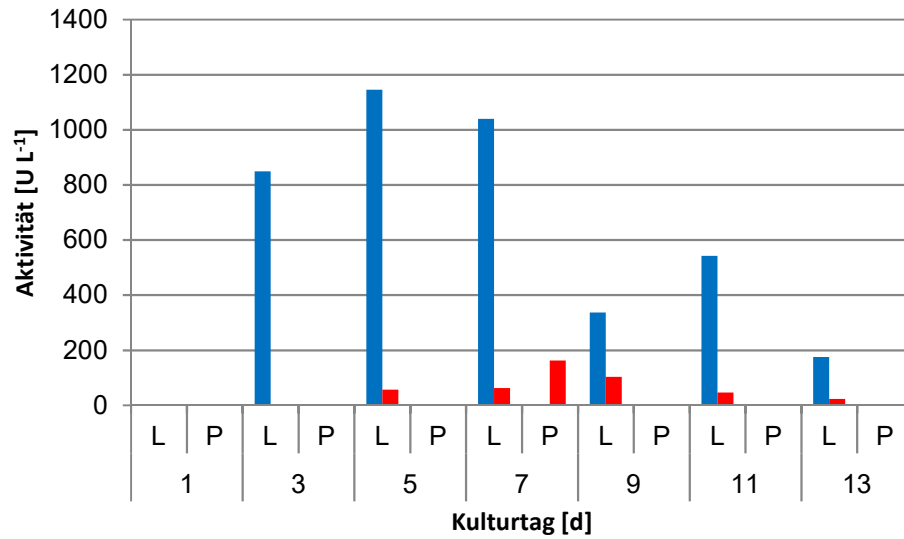


Abb. 3.35: Laccase- und Peroxidaseaktivität im Kulturüberstand von *Sterum hirsutum* unter Standardbedingungen (blau) und mit Stroh (rot)

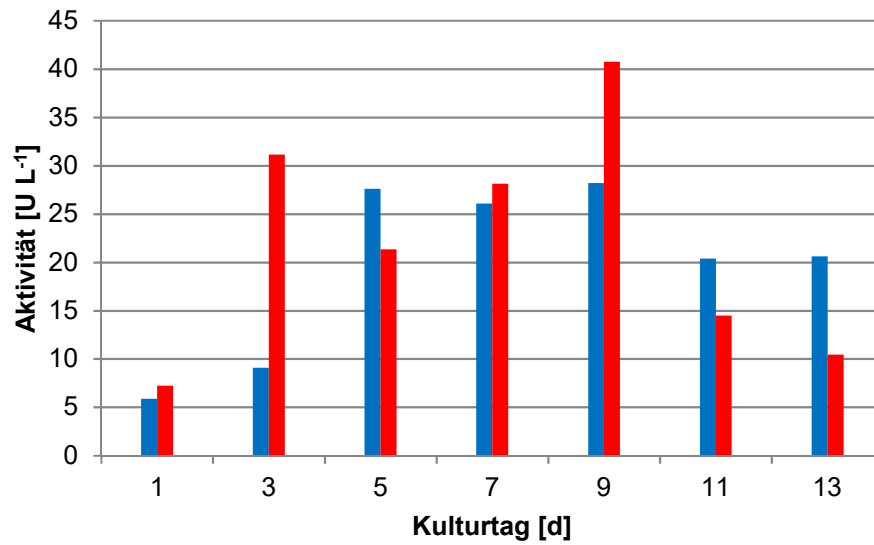


Abb. 3.36: β -Glucosidase-Aktivität im Überstand von *Stereum hirsutum* unter Standardbedingungen (blau), mit Stroh (rot)

Doppelte Substratmenge

Abschließend wurde geprüft, ob die Menge an Substrat I Einfluss auf die Enzymaktivität hat. Die Abbildungen 3.37 bis 3.40 zeigen deutlich, dass die Verdopplung der Substratmenge zu einer signifikanten Steigerung der Laccase- und β -Glucosidaseaktivitäten führte.

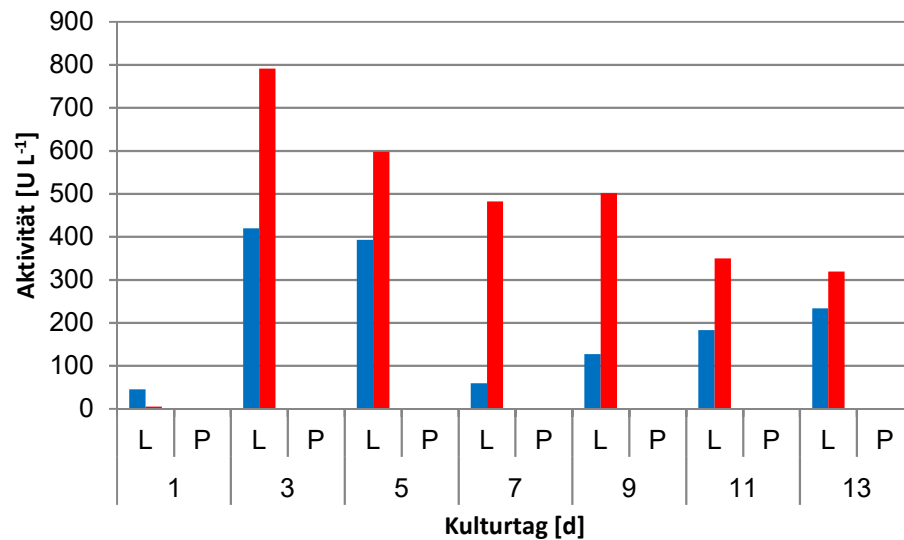


Abb. 3.37: Laccaseaktivität im Kulturüberstand von *Irpex consors* unter Standardbedingungen (blau) und mit doppelter Substratmenge (rot)

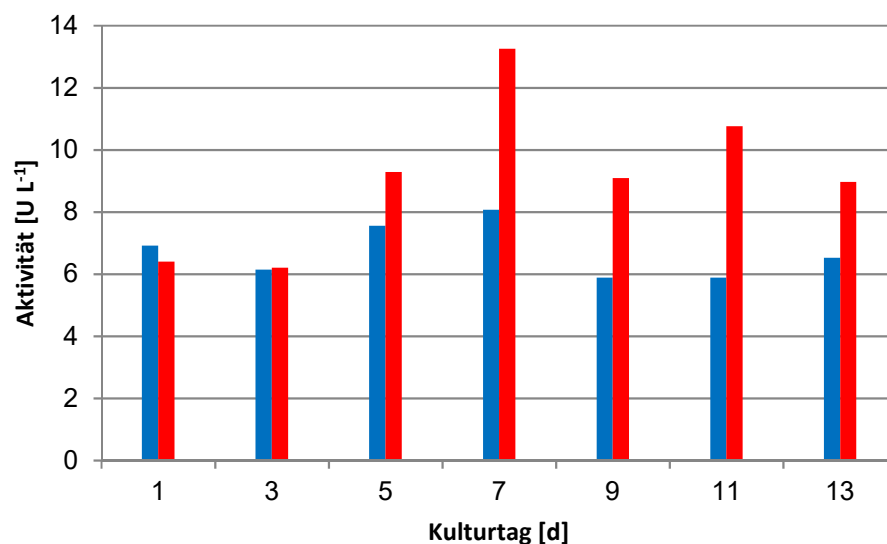


Abb. 3.38: β -Glucosidase-Aktivität im Überstand von *Irpex consors* unter Standardbedingungen (blau), mit doppelter Substratmenge (rot)

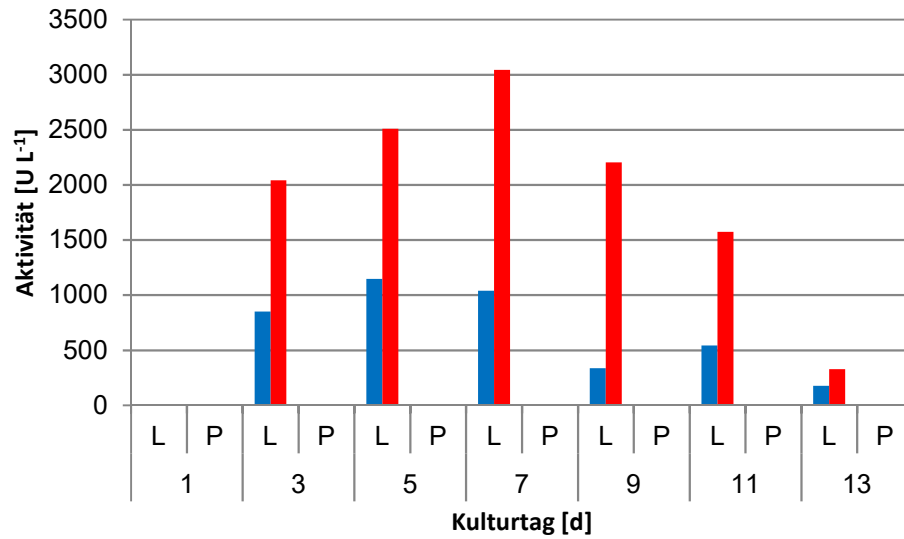


Abb. 3.39: Laccaseaktivität im Kulturüberstand von *Sterum hirsutum* unter Standardbedingungen (blau) und mit doppelter Substratmenge (rot)

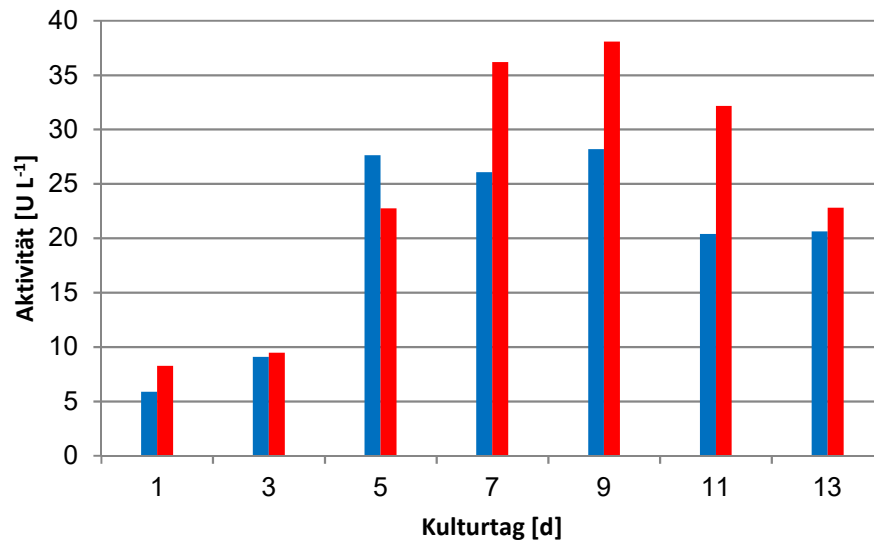


Abb. 3.40: β -Glucosidase-Aktivität im Überstand von *Stereum hirsutum* unter Standardbedingungen (blau), mit doppelter Substratmenge (rot)

3.2.7 Substrat II

Im Verlauf des Projekts wurde von der Süd-Chemie AG ein neues Substrat bereitgestellt, welches sich vom ersten Medium insbesondere durch einen niedrigeren Gehalt an reduzierenden Zuckern (Tab. 3.10) unterschied.

Um dessen Wirkung auf die Pilze zu testen, wurden Kulturen sowohl mit dem alten (Substrat I) als auch mit dem neuen Medium (Substrat-II) erstellt. Zusätzlich wurde ein Medium mit einer Mischung aus 90% Substrat II und 10% gemahlenem Stroh entwickelt. Zwischen den einzelnen Spezies waren teils deutliche Unterschiede im Sekretionsprofil erkennbar. Durch den Einsatz des neuen Lignocellulosesubstrats wurde die β -Glucosidaseaktivität bei den meisten Pilzen nur geringfügig beeinflusst. Die β -Glucosidasesekretion bei *Stereum hirsutum* wurde durch das neue Substrat stark induziert. Der Einfluss des Substratwechsels auf die Laccaseaktivität unterschied sich von Pilz zu Pilz. Die Laccaseaktivitäten von *Irpex consors* und *Stereum hirsutum* stiegen auf dem neuen Lignocellulosesubstrat in Abhängigkeit vom Kulturtag z.T. um mehr als das Zehnfache an, während bei *Marasmius cohortalis*, *Merulius tremellosus*, *Podoscypha spec*, *Pleurotus flabellatus* und *Pycnoporus sanguineus* der umgekehrte Effekt beobachtet wurde. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Wechsel zu Substrat II insgesamt einen Einbruch der Enzymaktivität bei den meisten Pilzen hervorrief.

Tab. 3.10: Einfluss des Lignocellulosesubstrats II bzw. der Mischung aus 90% Lignocellulosesubstrat II und 10% Stroh auf Enzymaktivitäten und Proteingehalte im Überstand im Vergleich zu Lignocellulosesubstrat I

Spezies	Proteingehalt		β -Glucosidaseaktivität		Laccase/POX-Aktivität	
	neues Substrat	90/10	neues Substrat	90/10	neues Substrat	90/10
<i>Auricularia mesenterica</i>	↓	-	-	-	↓	↓
<i>Irpex consors</i>	↓	↓	-	-	↑	↑
<i>Marasmius cohortalis</i>	-	↑	-	-	↓	↓
<i>Stereum hirsutum</i>	-	↑	↑	↑	↑	↑
<i>Merulius tremellosus</i>	↓	-	↓	-	↓	↓
<i>Podoscypha spec</i>	↑	↑	-	-	↓	↓
<i>Pleurotus flabellatus</i>	↓	↑	-	-	↓	↓
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	-	-	-	-	↓	-

Emerskultivierung auf Lignocelluloseagar; Enzyminduktion durch Kohlenhydratzusatz

Da durch die Substratanalytik bekannt war, dass sich das Lignocellulosesubstrat II vor allem im Zuckergehalt vom Lignocellulosesubstrat I unterschied, wurden Agarplatten, die das neue Medium und jeweils einen bestimmten Zucker (Cellobiose, Glucose oder Xylose) enthielten angesetzt. Als Referenz diente jeweils eine nicht supplementierte Agarplatte. Diese Platten wurden mit den Pilzen *Auricularia mesenterica*, *Irpex consors*, *Marasmius cohortalis*, *Stereum hirsutum*, *Merulius tremellosus* und *Podoscypha spec* beimpft und bei 24°C inkubiert. Die Dokumentation des Lignocelluloseabbaus wurde nach einem Monat vorgenommen. Dabei traten in Abhängigkeit von Spezies und Supplementierung deutliche Unterschiede auf (Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Lignocelluloseabbau in Emerskultur mit und ohne Supplementierung des Kulturmediums. (↑) verbesserte Abbauleistung im Vergleich zur Referenz ohne Supplementierung, (-) kein Unterschied, (↓) schlechtere Abbauleistung im Vergleich zur Referenz ohne Supplementierung

	Cellobiose	Glucose	Xylose
<i>Auricularia mesenterica</i>	-	-	+
<i>Irpex consors</i>	-	-	+
<i>Marasmius cohortalis</i>	+/-	+/-	+
<i>Stereum hirsutum</i>	+	+	++
<i>Merulius tremellosus</i>	+/-	-	+/-
<i>Podoscypha spec</i>	+/-	-	-

Es zeigte sich, dass nach Zugabe von Xylose bei den meisten Spezies eine Steigerung der Abbauleistung zu verzeichnen war.

Maßnahmen zur Steigerung der Enzymaktivität auf dem neuen Substrat

Folgende Maßnahmen zur Optimierung der Enzymproduktion wurden erprobt:

- Weglassen des Waschschrilles beim Überimpfen der Vor- in die Hauptkultur. Dadurch wurden verbleibende Nährstoffe aus dem Vorkulturmedium in das Hauptkulturmedium überführt, was dem Pilz das Anwachsen auf dem neuen Substrat erleichtern sollte.
- Induktion der lignolytischen Enzyme bereits im Vorkulturmedium. Hierfür wurden dem Vorkulturmedium 20% der für die Hauptkultur eingesetzten Menge an Lignocellulosesubstrat zugesetzt.

Bei den folgenden Spezies führten die eingesetzten Maßnahmen zu einer signifikanten Steigerung der Abbauleistung:

Irpex consors

Marasmius cohortalis

Merulius tremellosus

Podoscypha spec

Stereum hirsutum

Abschließend wurden *Irpex consors* und *Stereum hirsutum* für weitere Arbeiten ausgewählt, da sie mit den gegebenen Bedingungen am besten zurechtkamen und die höchste Abbauleistung zeigten.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Prolylspezifische Peptidase

4.1.1 Einführung

Für Peptidasen, die fähig sind die Peptidbindungen von Prolinresten zu hydrolysieren (besonders in prolinreichen Sequenzen), gibt es in der Lebensmittelproduktion wichtige Anwendungsfelder, wie das „Debittering“ von Proteinhydrolysaten, die z.B. bei Fleisch- und Gemüsebrühen benötigt werden. Des Weiteren bietet die Hydrolyse von prolinreichen Proteinen wie Gluten, die bei Menschen mit genetisch bedingten Unverträglichkeiten wie z.B. Zöliakie gesundheitliche Probleme hervorrufen, weitere Einsatzmöglichkeiten.

Es gibt eine Vielzahl prolylspezifischer Peptidasen in den verschiedensten Organismengruppen. Dem industriellen Einsatz der meisten dieser Enzyme steht aber ihre hohe Spezifität im Weg. Zum einen ist da ihre sehr hohe Selektivität für bestimmte Substratbindungsstellen zu nennen. Zum anderen wirkt ihre hohe Spezifität für Oligopeptide einer lebensmitteltechnischen Nutzung entgegen. Dies erklärt sich daraus, dass sie hauptsächlich bei der Hydrolyse ganz bestimmter Substrate wie z.B. bei der Aktivierung von Botenstoffen eine Rolle spielen. Hierbei ist wichtig, dass die übrigen Proteine der Zelle nicht von der Aktivität einer PsP geschädigt oder zerstört werden. Nur eine hohe Selektivität kann diesen Schutz gewährleisten. Ihr intrazelluläres Vorkommen und die damit verbundene fehlende Notwendigkeit über eine hohe Toleranz gegenüber Änderungen der Umgebungsbedingungen verfügen zu müssen, macht sie für industrielle Zwecke ebenfalls nur sehr bedingt einsetzbar.

An dieser Stelle bietet es sich an, in einer Organismengruppen nach einem geeigneten Enzym zu suchen, die bisher noch wenig im Fokus industrieller Anwendungen stand. Von Interesse sind Organismen, die Enzyme in das umgebende Medium sekretieren und fähig sind mit diesen eine Vielzahl von Substraten abzubauen. Gerade Pilze bieten hier große Vorteile. Die von ihnen ausgeschiedenen Enzyme sind durch ihre starke Glycosylierung ausgesprochen stabil. Pilze aus der Gruppe der Ascomyceten sind seit langem Quelle technischer Enzyme. Es ist also naheliegend, in der benachbarten Abteilung der Basidiomyceten nach einer prolylspezifischen Peptidase zu suchen, zumal es unter ihnen weit mehr essbare Vertreter gibt, was sie für den Lebensmittelbereich interessant macht.

Mit dem Enzym EndoPro™ gibt es eine PsP A aus *Aspergillus niger*, die als großtechnisches Produkt von der Firma DSM in den Niederlanden zur Erzeugung von

speziellen Diäten für von Zöliakie Betroffene verwendet wird (Edens *et al.* 2005). Das Enzym wird dabei im Gegensatz zu den Produkten nicht vermarktet. Dieser Sachverhalt erklärt auch das Interesse an einem Alternativprodukt.

4.1.2 Proteinhydrolysate

Proteinhydrolysate stellen einen wichtigen Grundstoff in der Lebensmitteltechnologie dar. Sie dienen als Basis von Schäumen, als Emulgatoren oder Nahrung für Personengruppen mit bestimmten Ansprüchen, etwa Krankenhauspatienten (Schmidl *et al.* 1994), Hochleistungssportler (Frøkjær S. 1994; Siemensma und Kunst 1999) oder Säuglinge (Siemensma *et al.* 1993). Aus Untersuchungen weiß man auch, dass die Aufnahme von Peptiden bestimmter Kettenlänge wesentlich effizienter als die Aufnahme der sie bildenden Aminosäuren ist (Grimble G.K. 1994). Auch technisch weisen Proteinhydrolysate einige Vorteile auf. Sie verfügen über eine bessere Löslichkeit, als die Proteine, aus denen sie entstanden sind. Sie sind hitzestabil und damit im Gegensatz zu Proteinen sterilisierbar. Durch das Freilegen von Peptiden, die im Proteininneren verborgen sind, entstehen beim Hydrolysat Funktionalitäten, die das ursprüngliche Protein nicht hatte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Proteinhydrolysate eine Reihe von gesundheitsfördernden Eigenschaften haben können, die man sich für die Herstellung von Lebensmitteln zu Nutze machen möchte.

Es gibt drei Wege, Hydrolysate aus Proteinen herzustellen. Die ersten beiden sind chemischer Natur und basieren auf dem Einsatz von saurer (Dave *et al.* 1991) bzw. basischer Hydrolyse (Kumetat und Beeby 1954; Lenderink J. 1950). Beide Methoden haben diverse Nachteile, beispielsweise die geringe Selektivität, die dazu führt, dass die Proteine mit zunehmender Zeit vollständig zu Aminosäuren abgebaut werden. Hierzu ist anzumerken, dass kurzkettige Peptide besser als Aminosäuren resorbiert werden (Grimble G.K. 1994). Zudem entstehen bei chemischer Hydrolyse unerwünschte Nebenprodukte, die wie z.B. Chlorpropanole (Monochlorpropandiol bzw. Dichlorpropanol) gesundheitsschädlich sind. Bei der basischen Hydrolyse können Aminosäuren wie Cystein, Threonin und Serin zerstört werden (Sternberg und Kim 1977). Zudem kann es zur Racemisierung der Aminosäuren kommen (Vojdani und Whitaker 1994). Die dritte Möglichkeit, Proteinhydrolysate herzustellen, ist der Einsatz von Peptidasen. Dieses Verfahren ist im Vergleich zu den vorgenannten wesentlich schonender, da mildere Bedingungen herrschen und keine Nebenprodukte entstehen. Zudem ermöglicht es die gezieltere Herstellung bestimmter Peptidfraktionen.

Die Herstellung von Proteinhydrolysaten stößt allerdings auf Schwierigkeiten. Für ihre Erzeugung werden weitgehend unspezifische Peptidasen eingesetzt, um Peptide mit geringer Kettenlänge zu erzeugen. Es handelt sich um Exopeptidasen die Proteine

hauptsächlich vom N-Terminus her hydrolysieren. Dabei entstehen Di- bzw. Tripeptide als Endprodukt. Diese spalten das Zielprotein allerdings nur so lange, bis sie auf einen Prolinrest stoßen. Aufgrund seiner besonderen Struktur (Pyrrolidinring) stoppt hier der Abbau und die Bereiche hinter dem Prolinrest werden nicht weiter hydrolysiert. Bei Proteinen mit einem hohen Prolinanteil führt das zu Hydrolysaten mit unzureichendem Hydrolysegrad oder/und unerwünschten Eigenschaften. Geringe Kettenlängen sind bei der Proteinhydrolyse durchaus erwünscht, da Peptide, die über mehr als zwölf Aminosäurereste verfügen, allergenes Potential aufweisen können (Bindels J.G. 1992). Technisch begegnete man diesem Problem bisher durch deren Abtrennung mittels Ultrafiltration des Hydrolysats. Lösungen wie in der Arbeit von O'Cuinn, Fitzgeraldt, Bouchiert und McDonnell sehen den Einsatz einer post-proline dipeptidyl aminopeptidase (PPDA) vor (O'Cuinn *et al.* 1999). Das Schnittverhalten dieser Exopeptidase wird vom vorangehenden Aminosäurerest mitbestimmt. Unter diesen Voraussetzungen ist das Hinzuziehen weiterer Hilfsenzyme unumgänglich. Besonders das Auftreten von zwei oder mehr Prolinresten hintereinander stellt das vorgeschlagene System vor Schwierigkeiten.

Trotz ihrer vielfach positiven Eigenschaften ist ihre Anwendung dadurch begrenzt, dass Peptidfraktionen entstehen, die dem Hydrolysat einen bitteren Geschmack verleihen, der je nach eingesetzter Peptidase unterschiedlich stark ausfällt und die Akzeptanz beim Verbraucher mindert. Aus Experimenten ist bekannt, dass Peptide, die einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren wie Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Prolin, Tryptophan und Tyrosin aufweisen, bitter schmecken (Ney KH 1971). Der bittere Geschmack verstärkt sich, wenn die hydrophoben Aminosäuren in zunehmender Entfernung zum N- bzw. C-Terminus lokalisiert sind (Matoba T, Hata T 1972). Besonders die Anwesenheit von Prolin spielt eine herausragende Rolle bei der Entstehung des bitteren Geschmacks bei Hydrolysaten (Ishibashi N, Ono I, Kato K, Shigenaga T, Shinoda H, Okai H, *et al.* 1988). Dieses Problem wird derzeit noch hauptsächlich durch die Auswahl von substratspezifischen Peptidasemischungen oder das Maskieren des bitteren Geschmacks durch Maßnahmen wie die Zugabe von Polyphosphaten (Behnke und Schalinatus 1975; Roy 1990), sauren Peptiden oder süßen Aminosäuren (Alanin, Serin, sowie die meisten D-Aminosäuren), Magermilch oder Gelatine bzw. verkleisterter Stärke erreicht (Tamura *et al.* 1990). Auch die Anwesenheit von Natriumionen reduziert den bitteren Geschmack (Breslin und Beauchamp 1995) - allerdings um den Preis, dass das Produkt einen salzigen Geschmack aufweist.

Damit ist die Zielrichtung der Proteinhydrolysatherstellung umrissen. Es werden Peptidmischungen gebraucht, die möglichst definierte Hydrolysegrade aufweisen und ein niedriges Aminosäure/Peptidverhältnis erzeugen. Die für die Proteinhydrolysatherstellung eingesetzten Peptidasen sollten weitgehend stabil gegenüber schwankenden Umwelteinflüssen sein und ein pH-Optimum im sauren Bereich haben, da die

entsprechenden lebensmitteltechnologischen Prozesse bevorzugt dort stattfinden. Das Temperaturoptimum sollte insofern auch den Produktionsbedingungen entsprechen. Intakte Proteine sind ohne Hilfe nicht ohne weiteres durch Peptidasen spaltbar. Es muss dazu im Temperaturbereich zwischen 30 °C und 50 °C gearbeitet werden. Durch Steigerung der Temperatur nimmt die Molekularbewegung innerhalb des Proteins zu. Es kommt, so die Modellvorstellung, zu reversiblen partiellen Entfaltungen des Proteins bei denen Teile für den Peptidaseabbau zugänglich werden. Nach diesem Modell wird das Protein bei weiterer Erhöhung der Temperatur denaturiert und aggregiert, was dem enzymatischen Abbau hinderlich wäre.

Interessant ist die PsP A für die lebensmitteltechnische Aufarbeitung von Casein und Gluten. Bei beiden ist der Prolingehalt hoch. Aufgrund ihrer hohen Präsenz in der Lebensmittelherstellung durch den vielfältigen Einsatz von Milch bzw. Weizenmehl liegt auf ihnen ein besonderes Augenmerk.

4.1.3 Substrate

4.1.3.1 Gluten

Als Gluten bezeichnet man die Speicherproteine einiger Getreidearten wie z.B. Weizen, Roggen, Gerste und Hafer. Sie bilden bei der Teigzubereitung (Anteigung) ein dreidimensionales Netzwerk aus und sind für die Elastizität des Teiges verantwortlich, sowie nachfolgend für das Aufgehen des Teiges beim Backen und den Formerhalt des fertigen Gebäcks. Dem Gluten gehören die beiden Osbornfraktionen Prolamine (in Weizen als Gliadine bezeichnet) und Gluteline (in Weizen als Glutenine bezeichnet) an. Viele Mitglieder der Gliadine sind auch als Allergene bekannt.

Die tetraploide bzw. hexaploide Genetik des Kulturweizens, der starke Polymorphismus der entsprechenden Gene, sowie die von Weizenkultivar zu Weizenkultivar unterschiedliche Transkriptionsaktivität der einzelnen Genloci sorgen in den verschiedenen Sorten für Mischungen mit unterschiedlicher Gewichtung der einzelnen Glutenfraktionen, die die Eignung für verschiedene Getreideprodukte bestimmen (Falcão-Rodrigues *et al.* 2005; Khatkar *et al.* 1995; Pedersen und Jørgensen 2007). Glutenine bilden durch intermolekulare Disulfidbrücken große Makromoleküle, die für die Dehnbarkeit der aus ihnen hergestellten Teigwaren verantwortlich sind. Gliadine sind generell unvernetzt und bedingen die Viskosität des Teiges. Allerdings können sie auch Teil eines von Gluteninen gebildeten Makromolekül werden, wobei sie, aufgrund der Einschränkung nur eine Disulfidbrücke ausbilden zu können, für einen Kettenabbruch im entsprechenden Zweig des Makromoleküls sorgen. Das Größenspektrum der Proteine, die unter dem Begriff Gluten zusammengefasst werden, liegt zwischen 35 kDa und 10.000 kDa (Veraverbeke und Delcour 2002; Wrigley 1996).

Glutene werden in die *High Molecular Weight Glutenin Subunits* (HMW GS) (Xu *et al.* 2005) und die *Low Molecular Weight Glutenin Subunits* (LMW GS) (Anjum *et al.* 2007; Wellner *et al.* 2005) eingeteilt. Die flankierenden Sequenzen am N- und C-Terminus der HMW GS werden von einer Folge nichtrepetitiver Aminosäuren gebildet. Dazwischen liegt ein Bereich, der sich aus sich wiederholenden Aminosäuresequenzen aufbaut, die aus einer Aneinanderreihung von Trimeren, Hexameren oder Nonameren bestehen können (Shewry *et al.* 1992). N- und C-Terminus sind im Vergleich zum mittleren Bereich des Proteins beinhalten mehr geladene und hydrophobe Aminosäuren sowie Cysteinreste. Die Cysteinreste dienen dem Aufbau von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken und sind die Basis für die Bildung von Glutenmakromolekülen (Shewry *et al.* 1986). Die repetitiven Bereiche sind im Gegensatz dazu eher hydrophil und werden hauptsächlich aus Prolin, Glutamin, Glutamat und Glycin gebildet.

Gliadine werden in α -, β -, γ - und ω -Gliadine unterteilt. Die Aufteilung ist auf die zurückgelegte Strecke der einzelnen Gliadine im SDS-PAGE zurückzuführen (Banc *et al.* 2009; Wieser 2007). α - und β -Gliadine ähneln sich in ihrer Primärstruktur stark, so dass sie von manchen Autoren auch zusammengefasst werden (Zilić *et al.* 2011). In ihrer Struktur und Aminosäureverteilung stehen sie den γ -Gliadinen nahe. Das Molekulargewicht von α -, β - und γ -Gliadinen liegt in einem Bereich von 31 bis 35 kDa (Fido *et al.* 1997). Sie verfügen über einen hohen Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren (Shewry *et al.* 1986), von denen die Cysteinreste meistens in gerader Anzahl vorkommen. Durch intramolekulare Disulfidbrückenbindungen wird eine globuläre Tertiärstruktur vorgegeben (Hamer und van Vliet 2000). Gliadine, die über eine ungerade Anzahl an Cysteinresten verfügen, können auch kovalente Disulfidbrückenbindungen zu Makromolekülen eingehen und in diesen einen Kettenabbruch bewirken (Muccilli *et al.* 2010). Des Weiteren stehen sie untereinander in schwachen Wechselwirkungen (van der Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen) und sind so an der Viskosität des aus Weizenmehl hergestellten Teiges beteiligt (Wellner *et al.* 2003).

ω -Gliadine verfügen im Gegensatz zu den α -, β - und γ -Gliadinen kaum über schwefelhaltige Aminosäuren und können deshalb keine Disulfidbrückenbindungen ausbilden. Der globuläre Aufbau der α -, β - und γ -Gliadine ist bei ihnen nicht zu finden (Ang *et al.* 2010), ebensowenig kommen sie als Teil der Glutaminmakromoleküle vor. Sie bestehen zu 80% aus den Aminosäuren Prolin, Glutamin und Phenylalanin (Hsia und Anderson 2001). Die in Gliadinen vorkommenden sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat liegen generell zu einem hohen Prozentsatz in ihrer amidierten Form vor (Ewart 1983), was auch mit ihrer Aufgabe als Stickstoffquelle für den Keimling zu tun hat. ω -Gliadine gehören zu den mittelschweren Glutenproteinen und haben ein Molekulargewicht von 44 bis 80 kDa (Shewry *et al.* 1986). Ihre Sequenz wird von einem Signalpeptid am N-Terminus angeführt, gefolgt von einer nichtrepetitiven Sequenz. Eine

weitere bildet den C-Terminus. Der Zwischenbereich wird von repetitiven Hexa- und Heptamersequenzen gebildet. Sowohl die repetitiven Bereiche der Glutenine als auch die der Gliadine bilden das Polyprolinhelix II Motiv aus (s.u.). Im Zusammenhang mit den oben erwähnten Unverträglichkeiten ist festzuhalten, dass ω -Gliadine bei von Zöliakie Betroffenen die entsprechenden Symptome auslösen (Darewicz *et al.* 2008; Molberg *et al.* 2001; Sollid 2000).

4.1.3.2 Casein

Caseine gehören zur Familie der *secreted calcium (phosphate)-binding proteins* (SCPP), die für den Transport von Calciumphosphat in Geweben zuständig sind (Dalglish *et al.* 1989; Kawasaki 2009; Kawasaki und Weiss 2003). Mit ihnen ist es möglich, Calciumphosphat in Konzentrationen in Lösung zu halten, die weit über der Löslichkeitsgrenze liegen. Man findet sie in allen Körperflüssigkeiten wie z.B. Speichel, Blut, Urin und Milch. SCPPs sind ungefaltete Proteine, die hauptsächlich vom Strukturmotiv der Polyprolin II Helix geprägt sind (Holt *et al.* 2009; Kalmar *et al.* 2012). Sie teilen sich in zwei Fraktionen auf, wobei die eine stabile Calciumphosphatcluster bildet und der Speicherung und dem Transport dient. Zu ihr gehören die Caseine. Die andere Fraktion bildet metastabile Calciumphosphatcluster und ist am Aufbau von Zähnen und Knochen beteiligt. Wichtig dabei ist, dass diese Fraktion dafür sorgt, dass Calciumphosphat nicht in weichen Gewebeteilen ausfällt wie etwa im Drüsengewebe der Brust. Gleichzeitig stellt es aber den Aufbau und Erhalt von festen Strukturen wie Zähnen und Knochen sicher.

Casein selbst wird in calciumsensitives Casein, zu denen α_{s1} -Casein, α_{s2} -Casein, und β -Casein gehören, und calciuminsensitives Casein, zu dem κ -Casein gehört, eingeteilt. Alle vier zusammen bilden eine Mizelle wobei α_{s1} -Casein und α_{s2} -Casein vor allem im inneren derselben lokalisiert sind und als Träger des Calciumphosphats dienen. Dies geschieht durch den Aufbau von Calciumphosphatclustern an phosphorylierten Serinresten. Die hohe Anzahl an phosphorylierten Serinresten ermöglicht es α_{s2} -Casein Calciumphosphatcluster zu vernetzen. β -Casein kann durch seine geringere Zahl an phosphorylierten Serinresten nur an einzelne Cluster binden. Es scheint allerdings der Mizelle eine poröse Struktur zu verleihen, die einen schnellen Transport von Molekülen aus der Mizelle heraus oder in sie hinein möglich macht (Dalglish 2011). κ -Casein ist an der Oberfläche der Mizelle lokalisiert (Dalglish *et al.* 1989). Es stabilisiert die Mizelle nach außen, indem es haarartige Peptidketten, sogenannte *C-terminal macropeptides*, die in das umgebene Medium stehen, ausbildet. Diese dienen als Abstandshalter zu anderen Mizellen (Horne 1986; Kruif und Zhulina 1996). Chymosin hydrolysiert diese Domäne zwischen Phe₁₀₅ und Met₁₀₆ und führt so zu einem Aggregieren der Mizellen bei der Käseherstellung. Der genaue Aufbau der Caseinmizelle ist aber bis heute nicht eindeutig geklärt. Die bisherigen

Erkenntnisse beruhen auf einer Vielzahl von Experimenten, die eine Modellvorstellung stützen.

α_{s1} -Casein und β -Casein wirken der Tendenz von α_{s2} -Casein und κ -Casein amyloide Fibrillen zu bilden entgegen (Ecroyd *et al.* 2010; Treweek *et al.* 2011). Diese Tendenz ist bedingt durch die für die Funktion der Caseine essentielle Primärstruktur und das offene Faltungsmuster. Gleichzeitig beeinträchtigt sie aber die Funktionalität der übergeordneten Struktur, der Mizelle, die ein dynamisches offenes Gebilde ist, aus dem sowohl Calciumphosphat als auch, unter gewissen Milieubedingungen, Proteine ein- und ausströmen können. Die Bildung von amyloiden Fibrillen würde zu einer Aggregation der Caseine führen und damit die dynamischen Eigenschaften der Micelle unterbinden. Casein hat die Eigenschaft, Calciumphosphat auch bei steigenden pH-Werten in der Lösung zu stabilisieren. Dies geschieht durch saure Aminosäurereste wie Aspartat, die in direkter Nachbarschaft zu den clusterbildenden Serinresten stehen und so ein saures Mikroklima schaffen.

Wie bei Gluten besteht bei den caseincodierenden Genen ein starker Polymorphismus über die verschiedenen Säugetierarten hinweg. Der Unterschied zwischen den Varianten der einzelnen Caseintypen ist groß genug, um bei einzelnen Personen zu Immunantworten und damit verbunden zu Unverträglichkeiten und Allergien gegenüber Casein zu führen.

4.1.4 Polyprolylhelix II

Die Polyprolin II Helix (PPII) ist neben der α -Helix und dem β -Faltblatt eine weitere Sekundärstruktur. Sie zeichnet sich durch ihre Dreifachsymmetrie aus, bei der je drei Aminosäuren einen Umlauf vollenden. Sie ist eine linksgängige Struktur, deren φ - und ψ -Winkel bei -75° bzw. 145° liegen (Creighton 1983; MacArthur und Thornton 1991).

PPII werden häufig, aber nicht ausschließlich von den namensgebenden prolinreichen Sequenzen gebildet. Es kommen auch solche vor, in denen Prolin kaum oder gar nicht vorhanden ist (Cubellis *et al.* 2005). Aus Experimenten mit Peptiden, die von einer einzigen Aminosäure gebildet werden, weiß man, dass sowohl polare Aminosäuren wie Glutamin, Aspartat und Lysin (Shi *et al.* 2002), als auch die unpolaren Aminosäuren Glycin, Alanin und Leucin diese Struktur ausbilden können (Rucker *et al.* 2003).

Die Stabilisierung der PPII erfolgt nicht durch Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäureresten, sondern, wie verschiedene Experimente nahelegen, durch die Interaktion, die zwischen Aminosäurerest und Wassermolekülen stattfinden (Berisio *et al.* 2000; Kramer *et al.* 1998; Sreerama und Woody 1999) oder durch sterische Hinderung zwischen den Aminosäureresten entstehen (Pappu *et al.* 2000; Pappu und Rose 2002). Dazu gibt es eine Ausnahme. Glutamin bildet mit der Carbonylgruppe des

Peptidrückgrades der vorangehenden Aminosäure eine Wasserstoffbrückenbindung (Stapley und Creamer 1999). Bei Prolin wirkt zusätzlich die sterische Beschränkung der ϕ - und ψ -Winkel durch den Pyrrolidinring stabilisierend. Dies ist auch im Zusammenhang mit der weiter oben erwähnten Häufigkeit der Aminosäuren Prolin und Glutamin in den repetitiven Bereichen von Gluten zu sehen.

Der Aufbau einer PPII hat entscheidende Konsequenzen für ihre Eigenschaften. Da die Aminosäurereste für die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen frei zur Verfügung stehen und nicht der Stabilisierung der Helix dienen müssen, stehen sie für mögliche Wechselwirkungen mit ihrem Umfeld bzw. für Modifikationen wie z.B. der Phosphorylierung zur Verfügung. Die Aminosäurereste der PPII sind im Verhältnis zu denen in anderen Sekundärstrukturen durchschnittlich stärker dem umgebenden Medium ausgesetzt. PPII finden sich aus diesem Grund häufig in Bindungsdomänen, die für Protein-Protein- und Protein-Nucleinsäureinteraktionen zuständig sind (Hicks und Hsu 2004; Kay *et al.* 2000; Siligardi und Drake 1995). Die hohe Selektivität in Verbindung mit den schwachen, schnell zu bildenden und wieder zu lösenden Verbindungen erklärt das häufige Vorkommen von PPIIs in dynamischen Proteinkomplexen, in denen es auf einen schnellen Austausch der Untereinheiten ankommt (Bochicchio und Tamburro 2002). Interessant ist auch, dass PPIIs bei globulären Proteinen hauptsächlich auf der Oberfläche vorkommen. Des Weiteren bilden sie aufgrund ihrer hohen Flexibilität Adaptersequenzen zwischen anderen Strukturelementen wie α -Helix und β -Faltblatt (Adzhubei und Sternberg 1994; Williamson 1994). In filamentösen Proteinen wie Gluteninen, ω -Gliadinen, Titin und Collagen kommt PPII primär wegen der schon beschriebenen Flexibilität und Dehnbarkeit vor.

4.1.5 *Wolfiporia cocos*

Im Rahmen des DBU-Projekts 13164 wurde nach Enzymen für die Getränkeindustrie gesucht. Im Fokus standen Glucosidasen, Peptidasen und Peroxidasen. Bei einem Screening mit diversen essbaren Basidiomyceten fiel die außerordentliche proteolytische Leistung von *Wolfiporia cocos* im Vergleich zu den übrigen im Screening eingesetzten Pilzen auf. *Wolfiporia cocos* ist ein holzbewohnender Pilz der Wälder Asiens und Nordamerikas. Die von ihm gebildeten Sclerotien, die für den Pilz namensgebend wurden, werden von den Ureinwohnern Nordamerikas in Notzeiten als Nahrung eingesetzt (Weber 1929; Wolf 1922). Daneben bedient sich die asiatische Medizin ihrer. Zu diesem Thema existiert eine Arbeit, die einen Weg zur Induktion der Sclerotienbildung für die Großproduktion fand (Kubo *et al.* 2006). Die Essbarkeit eines Organismus ist bei Projekten, die Produkte für die Lebensmittelherstellung zum Ziel haben, essentiell, da davon die Einstufung als unbedenklich abhängt ist (geregelt durch die Qualified Presumption of Safety (QPS)). Dahinter steht der Gedanke, dass bei einem essbaren

Organismus alle seine Teile oder aus ihm gewonnene Produkte auch essbar sein müssen. Diese Einstufung vereinfacht und verkürzt die nachfolgenden Zulassungsverfahren. Die für das Screening eingesetzte Kultur war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht als *Wolfiporia cocos* verifiziert.

4.1.6 Isolierung der PsP A

In der Arbeit von Linda Herring konnte gezeigt werden, dass die Induktion der PsP A mit Casein weniger wirkungsvoll war als mit Gluten, sodass Letzteres für die weiteren Arbeiten im Hauptkulturmedium verwendet wurde. Nachfolgend war es wichtig, einen geeigneten Zeitpunkt für die Probennahme zu bestimmen. Dies betraf sowohl den Zeitpunkt maximaler Proteinkonzentration (maximale PsP A-Aktivität) für die Proteinisolierung als auch den Zeitpunkt an zu dem die mRNA-Konzentration des PsP A-Gens am höchsten war, um die PsP A-cDNA anschließend isolieren zu können.

Über den Zeitraum von einer Woche wurden täglich Proben einer Schüttelkolbenkultur genommen. Die PsP A-Aktivität der Proben wurde bestimmt und die Entwicklung der Enzymaktivität dokumentiert (Abb. 3.1). Die fraktionierte Fällung der PsP A mittels Ammoniumsulfat scheiterte anfangs, da sich bei zunehmender Konzentration nach dem Zentrifugieren eine aufschwimmende Schicht bildete (Abb. 3.4). Die Schicht bestand aus einer Mischung gefällter Proteine und einer öligen Flüssigkeit dunkler Färbung. Bei der öligen Flüssigkeit könnte es sich um niedermolekulare Substanzen handeln, die, wie schon häufiger bei verschiedenen Pilzen beobachtet, von diesen ins Medium ausgeschieden wurden. Die niedermolekularen Substanzen wurden durch eine Fällung mittels organischer Lösungsmittel und anschließender Pelletierung durch Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes von der Proteinfraction getrennt. Durch nachfolgenden Einsatz einer IEX und anschließender GFC gelang es, die PsP A fast vollständig von den übrigen Proteinen zu trennen (Abb. 3.5, Abb. 3.6 und Abb. 3.7). Eingeschränkt wurde die Isolierung durch IEX dadurch, dass neben dem erfolgreichen Einsatz einer Anionenaustauschersäule auch eine anschließende Reinigung mittels Anionenaustauschersäule sinnvoll gewesen wäre. Bedingt durch den niedrigen pI der PsP A, wäre für die eingesetzten Puffer ein pH-Wert unter 3,0 notwendig gewesen. Allerdings wäre bei Reinigungsprozeduren, die länger als wenige Minuten dauern, das Säulenmaterial der Kationenaustauschersäule geschädigt worden (Gebrauchsanweisung von GE-HealthCare). Auch PsP A wäre, wenn sie längerfristig sehr niedrigen pH-Werten ausgesetzt gewesen wäre, denaturiert. Die isolierten Banden, die die PsP A beinhaltete, wurden abschließend sequenziert (Kapitel 3.1.5 Sequenzierung der PsP A).

4.1.7 Bestimmung des isoelektrischen Punkts

Der isoelektrische Punkt liegt mit ungefähr 3,6 im sauren Bereich. Dies verwundert nicht, da die Pilze in ihrem Umfeld häufig ein saures Milieu schaffen. Die Bande auf dem IEF-Gel wirkt sehr breit, obwohl für den Auftrag die gleiche Probe genommen wurde wie für das SDS-PAGE (Abb. 3.7). Trotzdem erwies sich die Bande auf dem IEF-Gel im Vergleich zu jener auf dem SDS-PAGE als weniger klar abgegrenzt (Abb. 3.8). Daraus kann geschlossen werden, dass es verschiedene Isoformen der PSP A gibt, die sich im isoelektrischen Punkt unterscheiden. Da bei der Isolierung keine alternativen S28-Peptidasen zur PsP A gefunden wurden, kommt nur eine abweichende posttranskriptionale Modifikation in Frage. In einer Arbeit zur posttranskriptionalen Modifikation der EndoProTM werden phosphorylierte Oligosaccharidketten, die den *high-mannose type glycan* zugerechnet werden, beschrieben (Sebela, Rehulka, Kabrt, Rehulkov, Ozdian, Raus, Franc, Chmelík *et al.* 2009). Dafür spricht auch, dass das Molekulargewicht, das mittels SDS-PAGE bestimmt wurde, mit 72 kDa höher war als das mittels ProtParam errechnete. Abgesehen davon hat ein Protein an seinen pI die geringste Löslichkeit. Dass dieser mit dem pH-Optimum zusammenfällt, erscheint äußerst unwahrscheinlich. In der Arbeit von Shaw (2001) wird beschrieben, dass der errechnete pI um ± 1 vom experimentel gemessenen abweichen kann. Dies hängt damit zusammen, dass bei der Berechnung der Durchschnitt der pKs-Werte aller im Protein vorkommenden Aminosäuren gebildet wird, wobei die Polypeptidkette in ungefaltetem Zustand vorliegt. Im Protein sind die Bedingungen wesentlich komplexeren in einer dreidimensionalen, gefalteten Struktur überein, in der z.B. einzelne Gruppen auch verdeckt sein können oder sich die Ladungsverhältnisse durch posttranslationale Proteinmodifikationen ändern.

Interessant ist auch der Vergleich mit der EndoProTM, der humanen PCP und DPP2. Die EndoProTM hat einen errechneten pI von 4,3 und liegt somit in einen vergleichbaren Bereich wie die PsP A. Die intrazellulären Peptidasen PCP und DPP2 liegen eher im schwach sauren Bereich. Der niedrigere pI bei PSP A und EndoProTM wird aber nicht durch mehr saure Peptidreste erzeugt. Der prozentuale Anteil der sauren Gruppen liegt für alle betrachteten Enzyme in vergleichbaren Bereichen (berechnetes Molekulargewicht des unmodifizierten Enzyms ohne Prekursorsequenz). Vielmehr geschieht dies durch eine Verringerung des Anteils der basischen Gruppen Arginin und Lysin (Tab. 4.1). Dies ist umso erstaunlicher, als die sauren Aminosäuren durch einen einfachen Vorgang vermehrt werden könnten. Sowohl die basische Aminosäure Lysin als auch die amidierten Aminosäuren Glutamin und Asparagin könnten durch eine einzelne Mutation im Codon in die sauren Formen Asparaginsäure und Glutaminsäure umgewandelt werden. Diese Umwandlung lässt sich bei Proteinen häufig in Bereichen, in denen die sauren Aminosäuren konserviert vorliegen, beobachten. Bei der PsP A und den anderen hier betrachteten S28-Peptidasen kommt dieses Phänomen aber nicht zum tragen, was dadurch

Tab. 4.1: Aufstellung des absoluten wie des relativen Anteils an geladenen Aminosäuren, der Länge der S28-Endopeptidasen in Aminosäureresten, sowie des berechneten pIs und des berechneten Molekulargewichts für die PSP A aus *Wolfiporia cocos* und den Enzymen EndoPro™, der humanen PCP und der humanen DPP2

	Länge gereift [AA]	Berechnetes Molekulargewicht [kDa]	pI [-]	Anzahl der negativ geladenen Gruppen (Asp + Glu)	Anzahl der positiv geladenen Gruppen (Arg + Lys)	negativ geladenen Gruppen (Asp + Glu) [%]	positiv geladenen Gruppen (Arg + Lys) [%]
PSP A	475	52,8	4,17	57	18	12,0	3,8
PSP B	470	52,9	3,96	64	15	13,6	3,2
PSP C	525	58,8	4,78	75	43	14,2	8,1
EndoPro	481	53,8	4,3	58	24	12,1	5,0
Humane PrCP	451	53,8	6,21	43	37	9,5	8,2
humane DPP2	467	51,8	5,57	53	44	11,3	9,4

erklärt werden könnte, dass eine weitere Zunahme der sauren Gruppen negative Folgen für die Stabilität des Proteins haben könnte (z.B. molekulinterne Abstoßungseffekte).

4.1.8 Prekursorsequenzen

Prekursorsequenzen sind N-terminal gelegene Sequenzbereiche, die für die korrekte Faltung, den Transport und andere Aufgaben bei der Reifung des Proteins von Bedeutung sind. Nach Erfüllung ihrer Aufgaben werden sie, während des Reifungsprozesses, vom Protein abgespalten. Sie beinhalten die Signalsequenz, die als Präsequenz bezeichnet wird. Prosequenzen sind häufig als Chaperon an der korrekten Faltung beteiligt. Sie helfen, Disulfidbrückenbindungen richtig zu knüpfen und das aktive Zentrum so lange zu blockieren, bis das Enzym am Wirkungsort eingetroffen ist. Dies hilft, bei Peptidasen die Hydrolyse anderer Proteine zu vermeiden (Eder und Fersht 1995; Shinde und Inouye 2000). Diese Prekursorsequenzen werden den Typ I *Intramolecular Chaperones* zugeordnet, die hauptsächlich am N-Terminus eines Enzyms sitzen (Anderson *et al.* 1999; Cunningham *et al.* 1999). Ihnen gegenüber stehen die Typ II *Intramolecular Chaperones* (Khoshnoodi *et al.* 2006; Sundaramoorthy *et al.* 2002), die am C-Terminus zu finden sind. Ihre Aufgabe besteht darin, Proteine, die Teil von Proteinkomplexen sind, bei deren Bildung zu unterstützen, also als Chaperon für die Quartärstruktur zu wirken.

Das für Furine typische Schnittstellenmotiv konnte von ProP 1.0 (Duckert *et al.* 2004) bei Arg₄₃ identifiziert werden. Dieser Aminosäurerest liegt sehr nah an Gly₄₅, dem experimentell ermittelten N-Terminus der PsP A. Über ein Multisequenzalignment konnte festgestellt werden, dass das Arginin und das es umgebende Motiv bei vielen Basidiomyceten konserviert ist (Abb. 4.1). Welches Enzym hier schneidet konnte nicht ermittelt werden. Ferner ist nicht bekannt warum dieses Motiv bei anderen S28-Peptidasen aus Pilzen, unter anderen bei der PsP C, fehlt. Die PsP C ist eine weitere S28-Peptidase aus *Wolfiporia cocos*. Sie wurde mittels einer BLAST-Suche nach zu PsP A verwandten Peptidasen im Genom von *Wolfiporia cocos* entdeckt. Vermutlich existieren unterschiedliche Peptidasen für die Reifung von extrazellulären Proteinen bzw. für unterschiedliche nichtcytosolische Kompartimente wie z.B. Lysosom. Bei der Prekursorsequenz der PsP A handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Typ I *Intramolecular Chaperone*, das dem Schutz der intrazellulären Proteine dient.

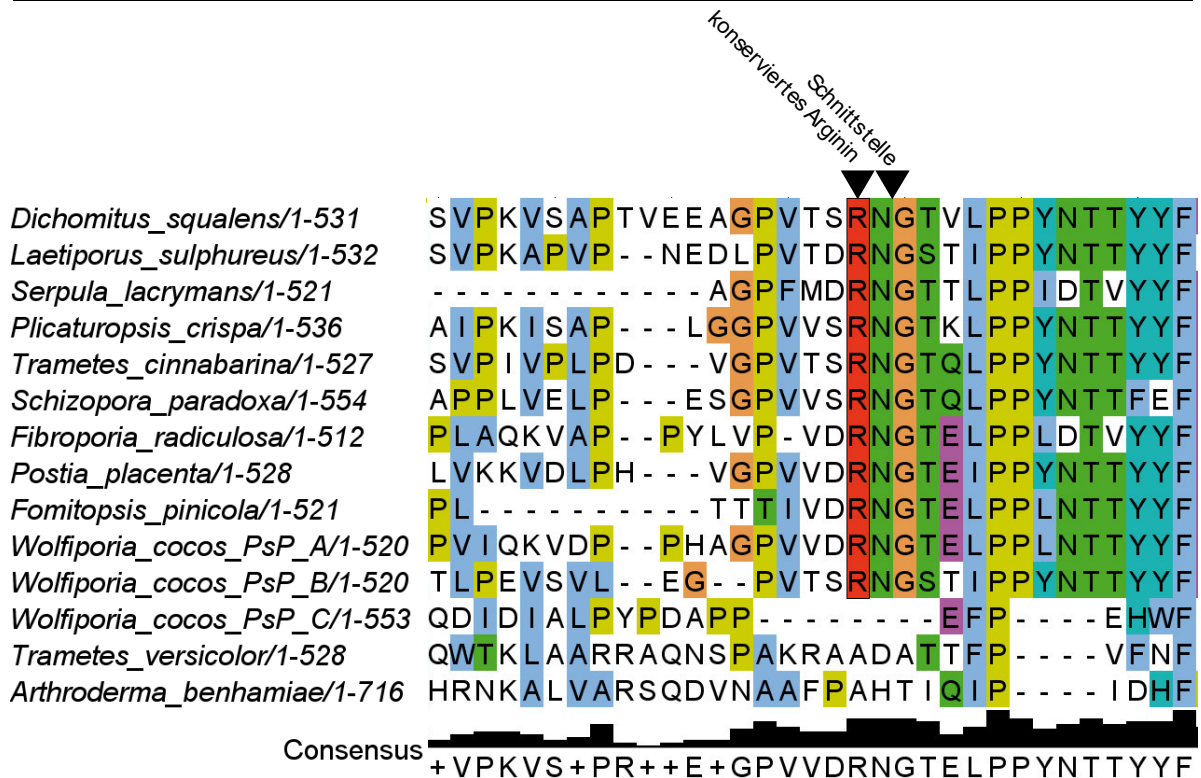


Abb. 4.1: Darstellung des konservierten Arginins, das als Erkennungssequenz für Peptidasen dienen könnte, die die S28-Peptidasen reifen. Hierfür spricht nicht nur der hohe Konservierungsgrad, sondern auch die unmittelbare Nähe zur Schnittstelle zwischen der Prekursorsequenz und dem reifen Enzym. Die Sequenzen der letzten drei Peptidasen gehören einer noch unbenannten Unterfamilie der S28-Peptidasen an und werden von MEROPS vorläufig als S28.UPW eingeordnet. Sie verfügen nicht über diese Schnittstelle. Die übrigen Enzyme gehören alle zur S28.004-Unterfamilie und zu verschiedenen Spezies von Basidiomyceten

4.1.9 Klonierung der PsP A

Bei der Isolierung der cDNA trat die Schwierigkeit auf, dass lange Zeit nur eine 1.128 bp lange Sequenz isoliert werden konnte. Die Bereiche an den 3'- bzw. 5'-Enden ließen sich nicht amplifizieren. Der GC-Gehalt in den isolierten 1.128 bp betrug ca. 58,5%. Da bekannt ist, dass die DNA von Basidiomyceten einen hohen GC-Anteil aufweist, wurde ein DNA-Polymerasemix, der speziell für die Amplifizierung von GC-reicher DNA entwickelt wurde, eingesetzt. Die cDNA konnte hiermit vollständig amplifiziert werden. Es zeigte sich, dass jene Bereiche, an denen die DNA-Synthese abbrach, tatsächlich einen sehr hohen Anteil an GC-Sequenzbereichen aufwiesen. Abb. 4.2 zeigt die cDNA-Sequenz der PsP A. Als Bereich C wird jener Teil der PsP A bezeichnet, der sich ohne Probleme amplifizieren ließ. Flankiert wird er durch die Bereiche B und D an denen die PCR zum Erliegen kam. Beide weisen einen sehr hohen GC-Gehalt auf (Bereich B 80,0% und Bereich D 94,4%). Der GC-Gehalt der beiden Enden, hier als Bereich A und E bezeichnet, liegt niedriger als bei B und D, weist aber einen deutlich höheren GC-Gehalt als Bereich C auf (Bereich A 65,7% und Bereich E 66,9%). Die vollständige cDNA-Sequenz hatte eine Länge von 1.560 bp (Abb. 3.7).

>PsP A aus *Wolfiporia cocos* CBS 279.55

```

ATGGTGTCTCCAGCCTGGCGGTGAGCTCCTTGCTCGCATTACCTCTGCTCGCCTCGGCC
TGGCGTCCCTCGCCCGCCTGTGATCCAGAAGGTCGATCCCCCGCATGCGGGACCCGTCGT
GGATCGGAACGGGACCGAGCTCCCGCCGCTGAACACCACATACTACTTTGACCAGCTCATT
GATCACAACAACCCAGCCTTGGGACGTTCAAGCAGCGGTAAGTGGCACACCTGGGAGTTCT
ACGAGCCTGGCGGACCCATCATCATCACGACCCGGGCGAACAAGATGCTGCTGGTTTTGA
AGGCTTCTCACCAATGCGACAATCGACGGACAGATCGCGCAGCAGCAGAGCGGCGGACG
ATTGTGCTCGAGCACCGCTACTACGGTACTCGAACCCGTACAACAACCTCTCGGTCGCGA
GTCTCCAGTACCACACGATTCAGCAGGCGATCGATGACCTCGCCTACTTCGCGTACAATGT
CAAGCTGCCTATGCCTGGCGGCGACAATGTCACGCCGACCAGGCGCCGTGGGTCCTGATT
GGCGGTAGCTACGCGGGCGCGCTGACGAGCTTACGAAAGTCAACAAACCAGACGCGTTCT
GGGCTGCGTGGTTCGTCTTCTGGCGTTCGTGGAGAGCATTGTCAATTATTGGGGATACTTTGA
CATTATTCGCAAGCACATGCCTCAAACTGCTCCGCGGACGTGCAAGCCGTGATCGCGCAT
ATCGACGAGGTCTTACGTCCAATGACACCGACGCGATCAACGAGATCAAGCAGACGTTCA
GCATGAACCTCACCCATCTCGACGACTTCGCCAGCGCCTTGACAGGCCCGATTTTCGACTG
GCAGTCGCTGCAGCCGGCGGGCGAGCTGACCGACCTGTCGTTCTTCGAGTTCTGCGATGCA
CTCGAGGTGAAGAACGGCGTGAGCGCGGGACCGGAAGGGTGGGGCCTCGACTATGCCCTGC
AGGCTGGGGCTCGTACTGGAACACGACGTTCCCTGCCGGAGAAGTGTATGACCAGACTAT
CGAGGAATGCCTCGGTACCTATAACGCGAGCGCGCCCTACTACACGGACATTTTCGGTTAAC
AATGCCGAGCGGTTCGTGGTTTTGGATTGTCGCAACCAGATGGGCTTCTTCCAGGATGGCG
CGCCAGAAGGTGACCCTACTATCGTCTCCCGCCTCGTGACTGCTCTCTACAACGAGCGCCA
GTGCACATACTACTTCCCACAGGCGTTTCAGCACCCCGCCACGCCCCGGTTC AACGAGACC
AACAAAGGCCTACGACGGCTGGTTCGTGCAGTCCGACCGGCTCTTCTTCGGCAACGGAGAGC
GTGACCCGTGGCGCGATGCGACGATCTCCGACAGACGGCACGCACTTTGCGAGCACGGCGCA
GCAGCCGATCGCGGTCGGCGACGGGTTCCACTGCTCGGACTTGTACACGATCAACGCGCAG
GTCGACCCGACGATCGAGGCGGTGCAGCAGGAGGGCCTTGCTGCGATGGCGGGCTGGCTGG
AGGAGTGGACGGCCCCCGCGCAGTCGCAGTCATGA
    
```

Abb. 4.2: In der cDNA-Sequenz der PsP A sind jene Bereiche an denen die PCR aufgrund des hohen GC-Gehalts stockte in rot und grün dargestellt. Die Sequenz ist in fünf Bereiche unterteilt (A hellgrau, B rot, C weiß, D grün und E dunkelgrau), für die der GC-Gehalt bestimmt wurde. Die gefärbten Bereiche an den beiden Enden weisen einen deutlich höheren GC-Gehalt auf als die ungefärbte Binnensequenz. Durch den Einsatz des GC Rich PCR Kit von Roche konnte die vollständige cDNA-Sequenz der PsP A erhalten werden.

4.1.10 Peptidasefamilien und Clans

Prolylspezifische Peptidasen nehmen im Stoffwechsel von Eukaryoten bei der Reifung von Signalpeptiden eine Schlüsselposition ein. Sie sind meist hochspezifisch, sowohl in Bezug auf die Länge der zu prozessierenden Peptidkette (die meisten dieser Peptidasen schneiden ausschließlich Oligopeptide) als auch in Bezug auf eine sehr spezifische Erkennungssequenz. Die Beschränkung auf kurze Peptide dient hier aller Wahrscheinlichkeit nach dem Schutz der übrigen intrazellulären Proteine vor unerwünschtem Abbau. Dennoch gibt es Vertreter dieser Gruppe, wie zum Beispiel die in dieser Arbeit beschriebene Peptidase, die eine weniger hohe Selektivität aufweisen und damit für die oben beschriebene Aufgabenstellung geeignet sind.

Mit MEROPS (Rawlings *et al.* 2014b) existiert eine Datenbank, in der Sequenzen auf die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Peptidasefamilie hin untersucht werden können. Zudem erhält man eine Einordnung der unbekannt Sequenz in ein System, das Aussagen über evolutionäre Verwandtschaft zu anderen Peptidasefamilien bietet, und den Reaktionsmechanismus sowie die Position der Aminosäuren des aktiven Zentrums beinhaltet. Familien sind in diesem System eine Zusammenfassung von Peptidasen mit nah verwandten Aminosäuresequenzen. Diese können weiter zu Clans vereinigt werden. Zu einem Clan gehören Peptidasen, die sich evolutionär nahestehen. Die Sequenz selbst kann mitunter stark abweichen. Wichtiger sind hier die Anordnung der katalytisch aktiven Aminosäurereste oder das die Peptidase bestimmende Strukturmotiv (Rawlings und Barrett 1993; Rawlings *et al.* 2014a).

Eine Studie auf der Basis von MEROPS stellte die verschiedenen Familien und Clans verschiedenen Organismengruppen gegenüber (Eubakterien, Archäen, niedere Eukaryoten, Hefen, Pflanzen, Urmünder und Neumünder). Dabei zeigte sich erstens, dass mit zunehmender Komplexität der Organismengruppen die Zahl der im Genom enthaltenen Peptidasen anstieg. Von den Archäen über die Eubakterien zu den niederen Eukaryoten stieg die Zahl kontinuierlich an, um bei den Metazoen noch einmal sprunghaft zu zunehmen. Die zweite Feststellung ist, dass es eine Reihe von Enzymfamilien gibt, die in allen Lebensformen auftreten. Jede Organismengruppe hat neben dieser Basisausstattung einen Satz von Peptidasen, die den neuen, mit zunehmendem Organisationsgrad entstandenen Anforderungen und der besetzten ökologischen Nische entsprechen. Diese findet man auch bei evolutionär daraus abgeleiteten Organismengruppen (z.B. Peptidasefamilien von Archäen und Eubakterien in niederen Eukaryoten). Zudem konnte drittens gezeigt werden, dass Familien infolge von neuen Anforderungen entstehen.

Das Aufkommen der S28 Peptidasen ist laut Literatur mit der Entstehung der Eukaryoten verknüpft (Page und Di Cera 2008). In dieser Arbeit wird aber noch gezeigt werden, dass

S28-Peptidasen schon in Bakterien vorhanden sind. Dennoch ist die adaptive Radiation dieser Enzymfamilie erst bei den Eukaryoten zu beobachten. Es lässt sich zeigen, dass die Entwicklung komplexerer Organismen, besonders von Vielzellern, primär an zwei Bedingungen gekoppelt ist. Erstens an die Möglichkeit des alternativen Splicens und zweitens an das Vorhandensein von *intrinsically disordered proteins* (IDPs) und *intrinsically disordered protein regions* (IDPRs). Proteine, die diese unstrukturierten Bereiche beinhalten bzw. komplett unstrukturiert sind, ermöglichen es Aufgaben zu erfüllen, die von Enzymen, die eine klare Organisation aufweisen und dem gängigen Schlüssel/Schloss-Prinzip folgen, nicht erfüllt werden können. Die Erforschung dieser IDPs und IDPRs ist ein noch junges Gebiet. Es lässt sich jetzt schon zeigen, dass diese Proteine allgegenwärtig sind und eine bedeutende Rolle spielen. Sie sind besonders häufig im Bereich der Signaltransduktion und in Enzymkomplexen anzutreffen (Dunker *et al.* 1998; Dunker *et al.* 2001; Tompa 2002; Wright und Dyson 1999; Uversky *et al.* 2000). Wie bereits beschrieben spielt die PP II-Helix in unstrukturierten Proteinen eine entscheidende Rolle. Die Bereitstellung von spezialisierten Peptidasen, die die gezielte Aktivierung, Reifung und den Abbau von unstrukturierten Proteinen ermöglichen werden mit zunehmendem Anteil an unstrukturierten Proteinen im Proteom eines Organismus zu einer Voraussetzung für deren Handhabung.

Nach aktuellem Wissen sind die prolylspezifischen Peptidasen auf die manganabhängigen Metallopeptidasen der Familie M14 und die Serinpeptidasen aus den Familien S9, S10, S28 und S33 beschränkt. Die genannten Familien der Serinpeptidasen gehören alle dem Clan SC (Prolylloigopeptidasen) an. Deren Mitglieder spalten Peptide mit Hilfe einer katalytischen Triade. Interessanterweise ist diese Triade auch in den Peptidasen des Clans PA (bekanntester Vertreter ist das Trypsin) und Clans SB (bekanntester Vertreter ist das Subtilisin) entstanden. Die Aminosäuresequenzen, das Strukturmotiv und die Reihenfolge der katalytisch aktiven Aminosäurereste in der Primärstruktur (Clan SC: Ser, Asp, und His; Clan PA: His, Asp und Ser; Clan SB: Asp, His und Ser) weichen aber von denen in Clan SC ab. Im Gegensatz zu vielen anderen Serinpeptidaseclans gibt es im Clan SC sowohl Endo- als auch Exopeptidasen. Der Grundaufbau von Vertretern dieses Clans besteht aus zwei Domänen, von denen eine von einem α/β -Hydrolasefold gebildet wird, der für die enzymatische Funktionalität verantwortlich ist (neben Peptidasen werden auch Esterasen, Lipasen, Dehalogenasen, Haloperoxidasen, Lyasen, oder Epoxidhydrolasen von diesem Motiv gebildet) (Ollis *et al.* 1992). Die andere Domäne wird durch ein Siebenfaltblattpropellermotiv gebildet, das der Substratselektivität dient.

Anhand der Primärsequenz ließ sich die PSP A durch das Programm MEROPS den S28.004 Serinproteasen zuordnen. Ser₁₈₆, Asp₄₄₉ und His₄₇₈ wurden als die Aminosäuren der katalytischen Triade identifiziert (Abb. 3.17 und Abb. 3.18).

Die Tatsache, dass es sich bei der PsP A nicht um eine Metallopeptidase handelt, hat den Vorteil, dass in den lebensmitteltechnologischen Prozessen auch chelatisierende Substanzen wie z.B. Zitronensäure verwendet werden können, ohne dass das Enzym inhibiert wird. Auch die Zugehörigkeit zu den α/β -Hydrolasen kommt einem industriellen Einsatz entgegen. Der Reaktionsmechanismus ist bekannt und Enzyme mit diesem Faltungsmuster sind im Allgemeinen recht stabil, so dass sie häufig zur Erprobung neuer Techniken im Bereich des *Protein Engineering* genutzt werden. Viele in industriellen Prozessen eingesetzte Hydrolasen gehören zu dieser Gruppe, so dass ein entsprechendes Erfahrungspotential bezüglich der Handhabung und der biotechnologischen Veränderung ihrer Eigenschaften vorliegt (Kazlauskas und Bornscheuer 2009).

4.1.11 3D-Modell

Das Modell, das mit SWISS-Model erstellt wurde, wies eine höhere Übereinstimmung mit der Verteilung der Sekundärstrukturen der humanen PrCP auf als die Modelle, die mit Phyre² erstellt wurden (jeweils im Modus normal und intensiv). Bei Letzterem fehlte das β -Faltblatt 1, die SKS-Domäne hatte sieben statt sechs α -Helices und im Modus intensiv wurde das Modell stark komprimiert dargestellt, so dass Loops den enzymatischen Spalt blockierten. Zudem liegen beim Modell von SWISS-Model die unsicheren Bereiche (Bereiche, bei denen eine größere Unsicherheit über die Position der einzelnen Aminosäuren im Modell besteht) mit Ausnahme des Loops zwischen SKS-Domäne und α -Helix M in für die Funktion des Enzyms nicht relevanten Teilen wie dem Loop zwischen den α -Helices K und L sowie in der Nähe des N-Terminus (Abb. 3.20). Aus dem Strukturmodell der PsP A konnten auch die Position der Domänen und ihr Aufbau abgeleitet werden (Abb. 2.21 und Abb. 3.22).

4.1.12 Disulfidbrücken

Disulfidbrücken sind die zweithäufigste Art der kovalenten Verbindungen in Proteinen. Besonders im extrazellulären Bereich dienen sie dem Schutz des Proteins vor harschen Umweltbedingungen und erschweren den Abbau durch Proteasen. Neben ihrer Rolle als stabilisierendes Element haben Disulfidbrücken auch weitere Aufgaben. Zum einen unterstützen sie den Faltungsvorgang von Proteinen bei deren Bildung. Zum andern helfen Disulfidbrücken, Aggregation zwischen Proteinen zu verhindern. Die hohe Konservierung von Cystin ist für die Bestimmung der Verwandtschaft von Proteinen von großer Bedeutung (Harrison und Sternberg 1996). Besonders bei schwach strukturierten oder unstrukturierten Proteinen kommt ihnen eine besondere Rolle bei der Einordnung zu (Mas *et al.* 2001).

Für die Identifizierung von Disulfidbrücken wurden nach konservierten Cysteinresten

gesucht und die Ergebnisse sowohl mit schon aus der Literatur bekannten Disulfidbrücken abgeglichen, als auch die direkte Nachbarschaft dieser konservierten Cysteinreste zueinander im dafür erstellten Strukturmodell geprüft. Programme zum auffinden von Disulfidbrücken konnten nicht überzeugen und wurden deshalb nicht eingesetzt (DiANNA 1.1 web server, DISULFIND, CYPRED). Diese Programme wurden als erstes mit der Aminosäuresequenz der humane PrCP (S28.001) getestet, deren Disulfidbrücken bereits experimentell bestimmt worden waren (Soisson *et al.* 2010). Keines der Programme erkannte diese richtig. Nicht konservierte Cysteinreste wurden in Disulfidbrücken einbezogen. Cysteinreste, die im Strukturmodell weit auseinander, teils an dem gegenüberliegenden Ende des Enzyms, lagen wurden als Teile ein und derselben Disulfidbrücke erkannt.

Bei der Suche nach konservierten Cysteinresten in einem Multisequenzalignment (Anhang, Abb. A.1), das S28-Peptidasen aus unterschiedlichen Unterfamilien beinhaltet, fiel auf, dass drei der insgesamt sieben Positionen bei allen untersuchten S28-Serinpeptidasen konserviert waren. Zwei von ihnen konnten unterschiedlichen Disulfidbrücken zugeordnet werden. Diese stark konservierten Cysteinreste korrespondierten über die Disulfidbrücke jeweils mit einem Cystein, das von Unterfamilie zu Unterfamilie um wenige Aminosäuren in der Position variiert. Ein weiterer Cysteinrest ist bei verschiedenen S28-Peptidasen tierischen und pilzlichen Ursprungs konserviert. Da er keine Disulfidbrücke bildet, wird auf ihn später eingegangen.

Man kann die Disulfidbrücken in zwei Gruppen unterteilen. Die erste stabilisiert durch die Verknüpfung von strukturbildenden Elementen wie α -Helices oder β -Faltblättern das Grundgerüst des Proteins als Ganzes. Dies betrifft die zwei schon genannten, bei allen S28-Serinpeptidasen vorkommenden Disulfidbrücken. Sie halten jeweils die Helices H und K (Abb. 3.23 Tafel A) bzw. M und N (Abb. 3.23 Tafel C) zusammen. Hier wichen die Positionen des weniger stark konservierten Cysteinrests in den einzelnen Peptidasefamilien nur um ein paar Aminosäurereste voneinander ab. Dies ist auf die Einschränkung zurückzuführen, die diesen Disulfidbrücken einerseits durch ihre Funktion als stabilisierendes Element des Proteingerüsts und andererseits durch die helikale Natur der α -Helix, auf der sie sitzen, auferlegt ist. Die zweite Gruppe von Disulfidbrücken verbindet Loops. Da sie häufig an der Oberfläche des Proteins liegen und als lockere, bewegliche Strukturen vorkommen, liegt die Aufgabe dieser Disulfidbrücken nicht darin, die Proteinstruktur als Ganzes zu stabilisieren. Vielmehr übernehmen sie die Aufgabe, den Loop im lokalen Maßstab zu fixieren, ihm Form zu verleihen und die Bildung von amyloiden Fibrillen zu verhindern. Letzteres kann passieren, wenn zwei Eigenschaften zusammentreffen. Eine hohe intrinsische Tendenz zu aggregieren (Pawar *et al.* 2005) und andererseits eine hohe Wahrscheinlichkeit, exponierte und/oder ungefaltete Konfigurationen zu bilden (Tartaglia *et al.* 2008). Diese Form der Disulfidbrücken variiert

stark in Zahl und Position zwischen den einzelnen Unterfamilien. Bei den Peptidasen der Unterfamilien S28.004 bildet der Loop, der die SKS-Domäne mit der Helix M verbindet, aller Wahrscheinlichkeit nach eine Schleife, die bei der PsP A von der Disulfidbrücke zwischen Cys₃₄₁ und Cys₃₄₉ zusammengehalten wird (Abb. 3.23, Tafel B). Bei S28.001 und S28.002 verbindet der zu Cys₃₄₁ äquivalente Cysteinrest diesen Loop mit jenem, der die Helices I und J verbindet (Abb. 4.3, Tafel A und Abb. 4.4, Tafel A). Die Serinpeptidasefamilien S28.001 und S28.002 bilden jeweils eine weitere Disulfidbrücke aus, die bei der S28.004 nicht vorhanden ist. Die Disulfidbrücke der PCPs verknüpft den Loop, der die α -Helices M und N verbindet, mit jenem, der das β -Faltblatt 6 mit der α -Helix G verbindet (Abb. 4.3, Tafel B). Die Disulfidbrücke der DPP2s bildet eine loopinterne Schleife, die die α -Helices M und N verbindet (Abb. 4.4, Tafel B). Ihnen allen gemeinsam ist, dass sie lange an der Oberfläche liegende Loops strukturieren bzw. stabilisieren.

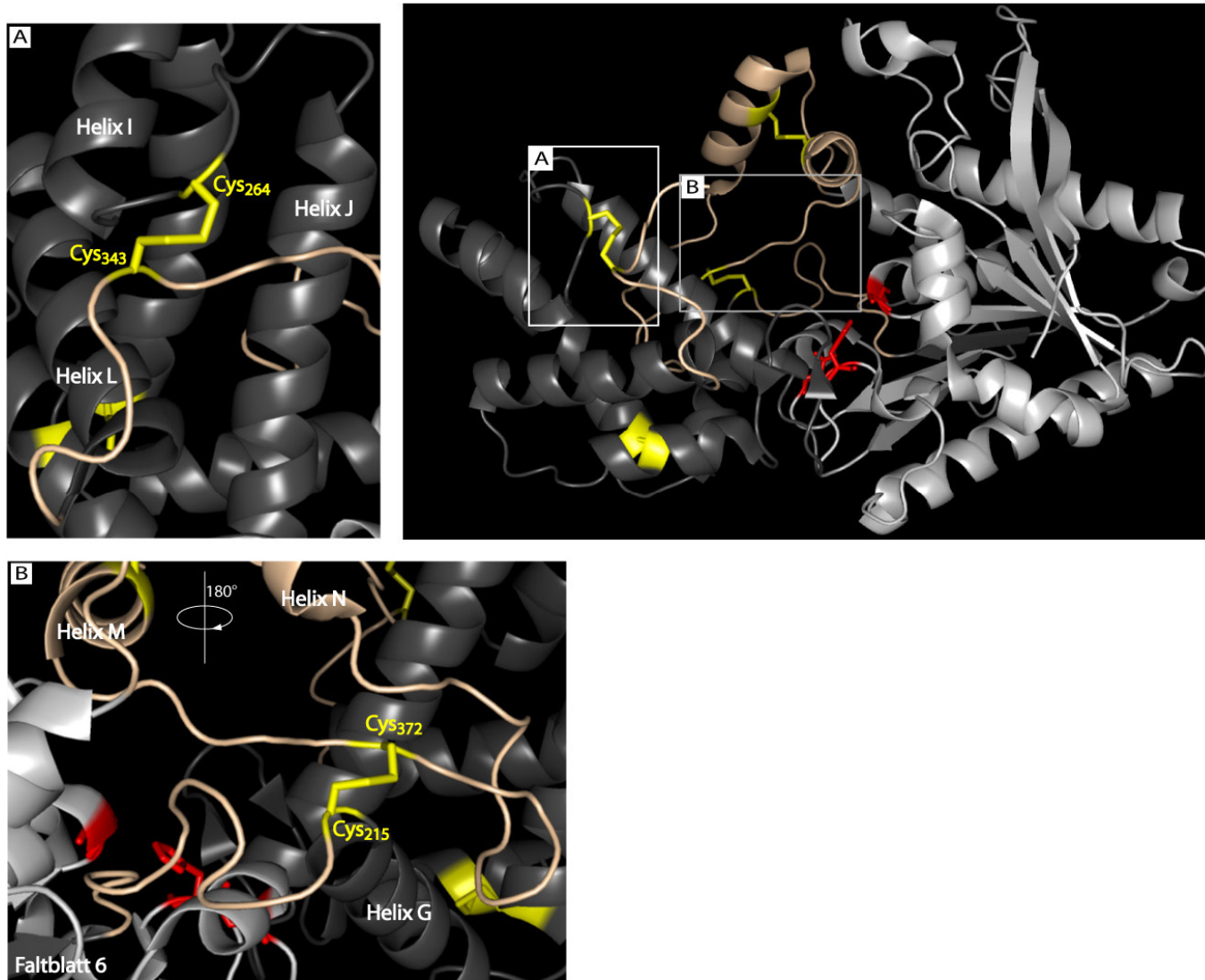


Abb. 4.3: Darstellung der Disulfidbrücken der humanen PCP. Die Disulfidbrücken zwischen den α -Helices K und H sowie M und N werden hier nicht explizit betrachtet, da sie bei allen S28-Peptidasen vorkommen und bei der PsP A aus *Wolfiporia cocos* schon angesprochen wurden. Vielmehr werden hier jene Disulfidbrücken hervorgehoben, die sich von denen in der PsP A unterscheiden oder in dieser nicht vorkommen. **A:** Cys₂₆₄ und Cys₃₄₃ verbinden die Loops zwischen den α -Helices I und J sowie L und M. **B:** Cys₂₁₅ und Cys₃₇₂ verbinden die Loops zwischen den α -Helices M und N sowie zwischen β -Faltblatt 6 und α -Helix G.



Abb. 4.4: Darstellung der Disulfidbrücken der humanen DDP2. Die Disulfidbrücken zwischen den α -Helices K und H sowie M und N werden hier nicht explizit betrachtet, da sie bei allen S28-Peptidasen vorkommen und bei der PsP A aus *Wolfiporia cocos* schon angesprochen wurden. Vielmehr werden hier jene Disulfidbrücken hervorgehoben, die sich von denen in der PsP A unterscheiden oder in dieser nicht vorkommen. **A:** Cys²⁴⁶ und Cys³²¹ verbinden die Loops zwischen den α -Helices I und J sowie L und O. **B:** Cys³³¹ und Cys³³⁶ bilden im Loop der auf die α -Helix M zuläuft eine Disulfidbrücke aus der eine loopinterne Schleife hervorgeht.

An dieser Stelle soll noch einmal auf die bei den pilzlichen S28.004-Serinpeptidasen vermutete Schleife eingegangen werden, die von der Disulfidbrücke zwischen Cys₃₄₁ und Cys₃₄₉ gebildet wird. Zu S28.004-Serinpeptidasen gibt es für diese Disulfidbrücke keinen experimentellen Beleg, der in der Literatur beschrieben wäre. Dennoch kann sie als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Dafür sprechen mehrere Gründe:

1. Bei der DPP2 und der PCP ist der hier besprochene Loop durch eine Disulfidbrücke an der SKS-Domäne fixiert (Abb. 4.5). Wie oben bereits erwähnt, ist einer der beiden Cysteinreste in allen S28-Serinpeptidasen stark konserviert. Es kann angenommen werden, dass sich seine Aufgabe, den Loop zu strukturieren bzw. zu stabilisieren, nicht geändert hat. Verändert hat sich nur der Bindungspartner. Statt eine kovalente Verbindung zu einem Cysteinrest auf der SKS-Domäne einzugehen, wird bei der PsP A eine loopinterne Verknüpfung gebildet. Man könnte vermuten, dass die gebildete Schlaufe in Richtung der SKS-Domäne zeigt, um den katalytischen Spalt nicht zu überdecken. Die Anknüpfung an diese erfolgt vermutlich durch schwache Wechselwirkungen zwischen der Schleife und der SKS-Domäne.

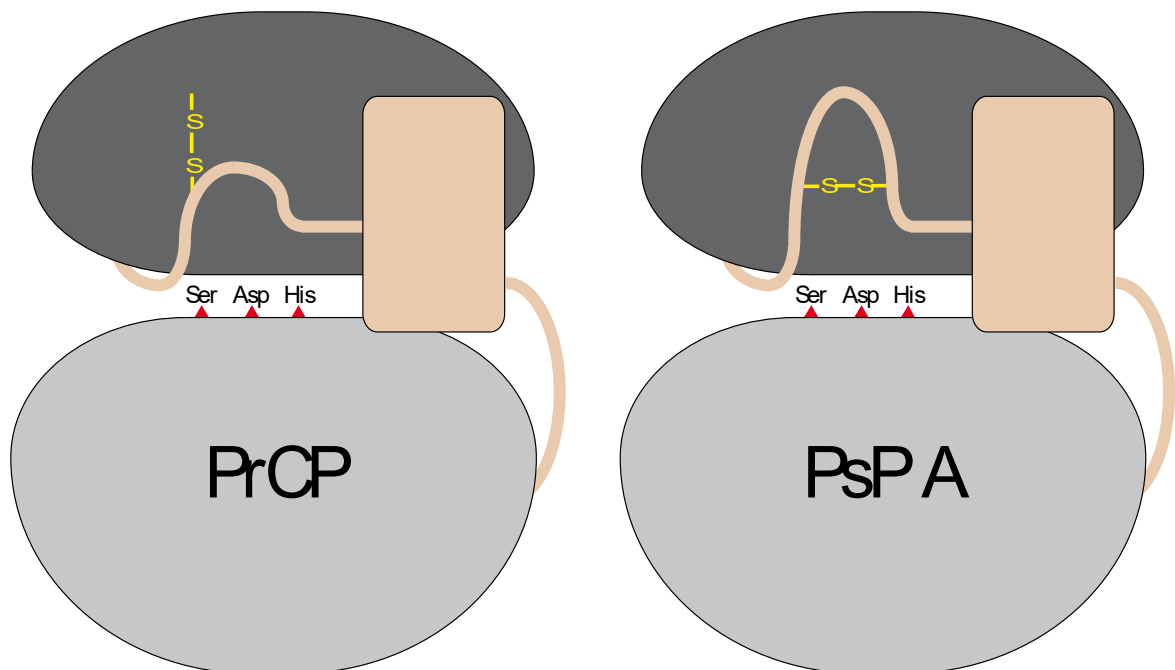


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Lage des aus einer Röntgenstrukturanalyse bekannten Loops mit der ihn und die SKS verbindenden Disulfidbrücke bei derhumanen PrCP. Dem gegenübergestellt ist die auf Basis eines Computermodells der PsP A vermutete Lage des Loops und der durch eine Disulfidbrücke gebildeten Schleife (α/β -Hydrolasedomäne in Hellgrau, SKS-Domäne in Dunkelgrau, Adapterbereich in Hellbraun, Disulfidbrücke in Gelb und katalytische Triade in Rot).

2. Das von SWISS-Model berechnete Strukturmodell zeigt gerade in diesem Bereich eine große Unsicherheit über die tatsächliche Position und Ausrichtung des Loops

(Abb. 3.20, Tafel A und B). Der Abstand zwischen den Cysteinresten beträgt in diesem Modell 18,05 Å (Abb. 3.23, Tafel B). In den mit Phyre² berechneten Modellen, die allerdings verworfen wurden, ist der Abstand deutlich kürzer. Die flexible Struktur des Loops und die starke Konservierung der zwei Cysteinreste bei vielen S28.004-Peptidasen legen nahe, dass beide Cysteinreste *in vivo* eine Disulfidbrücke ausbilden.

3. PCP und DDP2 sind beide Oligopeptidasen, wobei die PCP C-terminal und die DPP2 N-terminal schneidet. In der Arbeit von Soisson *et al.* 2010 wird beschrieben, dass eine wallartige Struktur für den Unterschied in der Substratspezifität beider Enzyme verantwortlich ist. Diese befindet sich auf dem hier besprochenen Loop, der sich zwischen der SKS-Domäne und der Helix M befindet. Da von diesem Loop bei den Unterfamilien S28.001 und S28.002 die Substratspezifität abhängt, ist anzunehmen, dass gerade wegen dieser Abhängigkeit seiner genauen Lage Grenzen aufgelegt sind. Man kann deshalb davon ausgehen, dass auch bei der PsP A eine Stabilisierung durch eine Disulfidbrücke, allein schon wegen der Länge des Loops, wahrscheinlich ist.

Cys₄₇₉, der konservierte Cysteinrest, der keiner Disulfidbrücke zugeordnet werden konnte, liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zu His₄₇₈ (Abb. 3.23 Tafel D), das zur katalytischen Triade gehört. Diese Aminosäurekonstellation ist auch bei vielen anderen S28-Peptidaseunterfamilien zu beobachten, während die Position des Cysteins bei den PrCPs und den DPP 2s durch ein stark konserviertes Histidin besetzt ist. Für die lysosomale PCP wird angenommen, dass Arg₄₆₀ den pK_s der beiden Histidine beeinflusst (Soisson *et al.* 2010, Egloff *et al.* 1995) um den katalytischen Mechanismus unter den gegebenen Milieubedingungen möglich zu machen (Yang *et al.* 1970, Ody *et al.* 1978, Maes *et al.* 2005). Dieses Arginin ist bei den PrCPs und DPP2s konserviert. Die zu Arg₄₆₀ entsprechende Position bei der PsP A (Tyr₄₈₃) befindet sich inmitten eines konservierten Bereichs. Allerdings ist sie selbst, wie bei allen pilzlichen S28.004-Serinpeptidasen und den TSSPs (S28.003), nicht konserviert (Anhang, Abb. A.1).

Es kann davon ausgegangen werden, dass, vergleichbar zur Interaktion zwischen Histidin und Arginin bei den PCPs und DPP2s, Ähnliches auch bei der PsP A vonstattengeht. Der hohe Konservierungsgrad des auf das Histidin der katalytischen Triade folgende Cystein bei vielen S28-Peptidasen weist auf eine essentielle Funktion dieser Aminosäure hin (Abb. 4.6). Zudem wären zwei Mutationen in den ersten beiden Basen des Codons notwendig um einen Austausch von Histidin in Cystein (CAY(His) → TGY(Cys)) oder umgekehrt zu bewirken. Da es, wie in der Diskussion noch gezeigt wird, im Verlauf der Differenzierung der S28-Peptidasen in den verschiedenen Organismengruppen, immer wieder zu diesem Austausch gekommen ist, kann angenommen werden, dass es sich nicht um ein Zufallsprodukt handelt, sondern hier einer Notwendigkeiten gefolgt wurde.

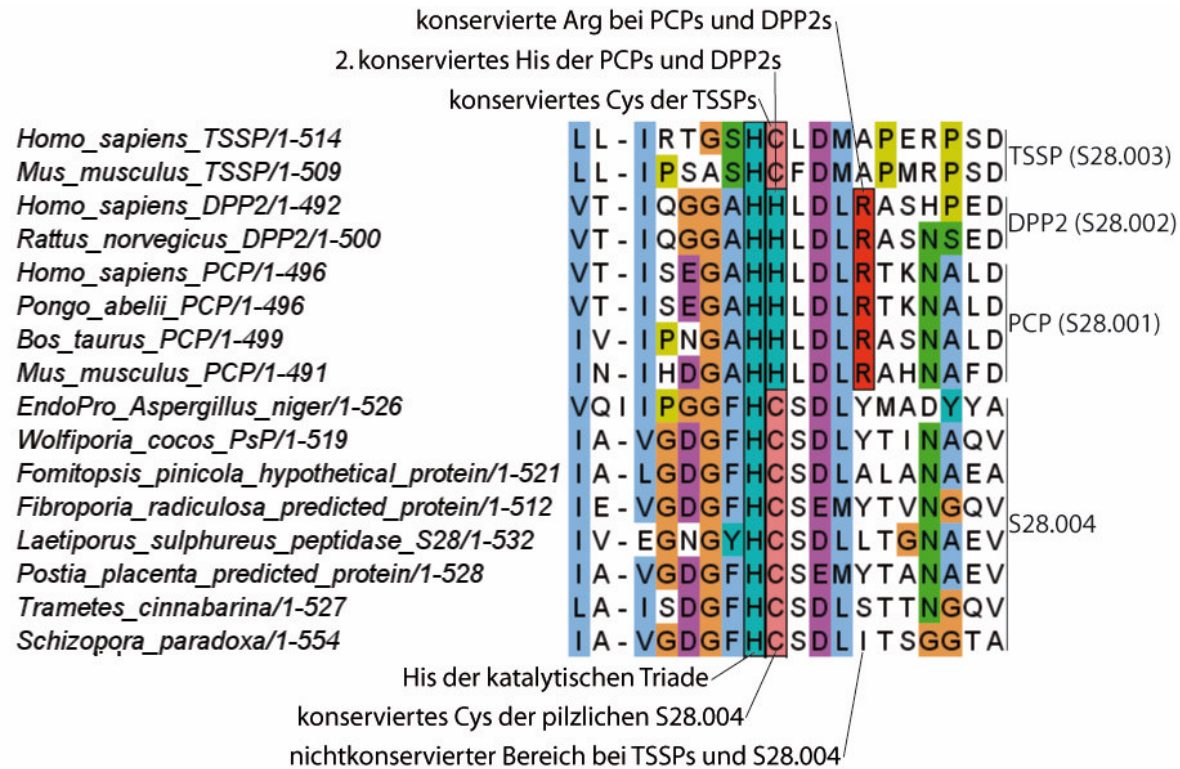


Abb. 4.6: Der Ausschnitt aus einem Multisequenzalignment mehrerer S28-Serinpeptidasen zeigt den Bereich in dem der Histidinrest der katalytischen Triade, der benachbarte, stark konservierte Cystein- bzw. Histidinrest und der bei DPP2s und PCPs auftretende Argininrest beheimatet sind. Auffällig ist, dass die Peptidasen (DPP2 und PCP), die über ein zweites konserviertes Histidin verfügen auch ein konserviertes Arginin besitzen. Soisson *et al.* 2010 zeigt in seiner Arbeit, dass bei den DPP2s und PCPs die beiden aufeinander folgenden Histidine von Arginin beeinflusst werden. Die Peptidasen (TSSP und pilzliche S28.004), die statt des zweiten Histidinrests an dieser Position einen Cysteinrest tragen, weisen an der Position des Arginins einen nichtkonservierten Bereich auf. Der hohe Konservierungsgrad des Cysteins bei den TSSPs und pilzlichen S28.004s, sowie das Fehlen des konservierten Arginins spricht dafür, dass das Cysteins eine ähnliche Rolle wie das Arginins bei den DPP2s und PCPs einnehmen könnte.

4.1.13 SKS-Domäne

Die SKS-Domäne wurde das erste Mal in der Arbeit von Soisson *et al.* (2010) beschrieben. Bezerra *et al.* stellen in ihrer Arbeit eine Hypothese über die Entstehung der SKS-Domäne auf. Es scheint, dass sie sich im Verlauf der Evolution neben dem β -Propellermotiv, das für die Substratselektivität verantwortlich ist, als zusätzliches Bündel von α -Helices entwickelte. Anfangs funktionslos, übernahm sie die Aufgabe des β -Propellermotivs und verdrängte dieses. Dieser Prozess ist mit einer zunehmenden Zahl weiterer α -Helices verbunden. Diese Entwicklung lässt sich nachzeichnen. Bei der **Dipeptidylpeptidase 4** (DPP4, UniProt-Eintrag 3EIO), dem Prolylpeptidase **Fibroblastenaktivierungsprotein α** (FAP, UniProt-Eintrag 1Z68), der **Prolylendopeptidase** (PEP, UniProt-Eintrag 3IUJ) und der **Prolyl oligopeptidase** (POP, UniProt-Eintrag 1QFM) ist neben dem β -Propeller ein Bündel aus drei Helices vorhanden. Bei der F1-Aminopeptidase (UniProt-Eintrag 1MTZ) ist der β -Propeller bereits verschwunden. Die Zahl der Helices in der SKS-Domäne steigt von der F1-Aminopeptidase ausgehend über die **Proliniminopeptidase** (PIP, UniProt-Eintrag 1AZW) und die **Prolylaminopeptidase** (PAP, UniProt-Eintrag 1QTR) zur **Dipeptidylpeptidase 2** (DPP2, UniProt-Eintrag 3JYH) und der humanen **Prolylcarboxypeptidase** (PRCP, UniProt-Eintrag 3N2Z) an. Bei allen genannten Peptidasen stellt das Bündel aus Helices, das die SKS-Domäne bildet, eine Insertion in die α/β -Hydrolase dar, die zwischen der α -Helix D und dem β -Faltblatt 7 liegt.

4.1.14 Glycosylierung

Die Glycosylierung von Proteinen ist ein zwischen den einzelnen Eukaryotengruppen stark konservierter Prozess, der mehrere Funktionen erfüllt. Neben der Adressierung der Proteine für den intrazellulären Transportprozess dient er der korrekten Faltung im endoplasmatischen Retikulum und der Vermeidung von Proteinaggregation. Im Kontext dieser Doktorarbeit sind besonders der Aspekt der mit der Glycosylierung verbundenen erhöhten Stabilität sowie die mit ihr einhergehende Resistenz gegen Peptidaseabbau interessant. Biotechnologisch ist diese Eigenschaft von hohem Interesse. Die Enzyme sind länger einsetzbar und tolerieren größere Schwankungen bei pH-Wert, Temperatur, Druck und der Ionizität des Mediums.

Der Prozess der Glycosylierung erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. Golgiapparat. Hierbei werden aktivierte Zucker auf die entsprechenden Aminosäurereste des Proteins oder auf Zucker, die Teil der wachsenden Oligosaccharidkette sind, übertragen (Lehle und Tanner 1995; Lis und Sharon 1993; Montreuil und Neuberger 1995; Strahl-Bolsinger *et al.* 1999). Die Verknüpfung mit dem jeweiligen Aminosäurerest kann sowohl an der γ -Aminogruppe von Asparagin als auch an der β -Hydroxygruppe von Serin

oder Threonin (in anderen Eukaryoten auch an Tyrosin, Hydroxylysin und Hydroxyprolin) stattfinden, was zu einer Unterscheidung in N- und O-Glycosylierung führt (Spiro 2002).

Die N-Glycosylierung erfolgt am Asparaginrest, der das Motiv Asn-Xaa-Ser/Thr (Sequon) anführt, wobei Xaa eine beliebige Aminosäure darstellt, die in diesen Zusammenhang aber kein Prolin sein darf. Allerdings werden nur rund 66% der in einem Protein vorhandenen Sequons mit einer Oligosaccharidkette verknüpft (Apweiler *et al.* 1999). Dies hängt damit zusammen, dass weitere Rahmenbedingungen erfüllt sein müssen, nämlich die Abhängigkeit von benachbarten Aminosäuren, die Position in der Peptidsequenz, sterische Aspekte und die Verfügbarkeit der Dolicholprecursorsaccharide (Kasturi *et al.* 1997; Petrescu *et al.* 2004; Senger und Karim 2005). N-Glycosylierte Proteine sind in ihrer großen Mehrheit sekretorische Enzyme, die entweder als Transmembranproteine, als Proteine der Zellwand oder in das umgebende Medium ausgeschieden werden. Die O-Glycosylierung folgt komplexeren Regeln und ist stark von Organismengruppe und Art abhängig. Hier können Serin- und Threoninreste mit Oligosacchariden modifiziert werden. Im ER erfolgt nur die Übertragung eines Mannosylrests. Dieser Teil der O-Glycosylierung ist in allen Eukaryoten konserviert. Die ersten Schritte der N- bzw. O-Glycosylierung werden mit Enzymen durchgeführt, die in den verschiedenen Organismengruppen konserviert sind, während die nachfolgenden Prozessierungen häufig von Enzymen katalysiert werden, die artspezifische Modifikationen der Oligosaccharidketten ermöglichen. Von diesen Enzymen können einige sowohl im Syntheseweg der N-Glycosylierung als auch in dem der O-Glycosylierung zum Einsatz kommen. Das Interessante an der N-Glycosylierung von Basidiomyceten ist, dass sie Oligosaccharide bilden, die denen von Säugetieren sehr ähnlich sind und damit eine Quelle für biotechnologisch erzeugte, therapeutische Proteine sein können (Berends *et al.* 2009; Rouwendal, Gerard, Johan, Adolph *et al.* 2006).

Beim Vergleich des mit ProtParam (Wilkins *et al.* 1999) errechneten Molekulargewichts (57,5 kDa) der gereiften PsP A mit dem in der SDS-PAGE ermittelten Wert (circa 72 kDa) fällt eine Differenz von 14,5 kDa auf (Abb. 3.7). Dies hängt mit der schon beschriebenen posttranslationalen Modifikation, speziell der Glycosylierung von extrazellulären Enzymen zusammen. Mit Hilfe des Programms NetNGlyc 1.0 (R. Gupta, E. Jung, S. Brunak 2004) wurden anhand der Aminosäuresequenz die Positionen von N-Glycosylierungsstellen und die Wahrscheinlichkeit ihrer Glycosylierung bestimmt (Tab. 3.2, Abb. 3.23). NetNGlyc 1.0 basiert auf einem neuronalen Netzwerk, das die Wahrscheinlichkeit für die N-Glycosylierung einer Position aufgrund eines Trainings an experimentell bestimmten Daten erhebt. Des Weiteren wurde mittels eines Multisequenzalignments nach konservierten Sequons in der PsP A und anderen S28-Serinpeptidasen gesucht (Anhang, Abb. A.2). Diese Methode ermöglicht es Sequons zu finden, die aufgrund der Rolle, die sie für die Stabilität oder Funktion des Enzyms innehaben, evolutionär stabilisiert wurden. Als

Letztes wurde eine Literaturrecherche nach experimentell bestimmten N-Glycosylierungsstellen in anderen S28-Serinpeptidasen durchgeführt. Der Gedanke dahinter war, abzuschätzen, ob die Positionen der Sequons *in vivo* bei strukturell sehr ähnlichen Enzymen von einer Glycosyltransferase erkannt werden und der Modifikation durch diese zugänglich sind (Tab. 3.3).

Alle drei Datensätze wurden zusammengeführt und die möglichen N-Glycosylierungsstellen mit diesen Ergebnissen abgeglichen (Tab. 3.4). Je mehr eine Position sich durch die verschiedenen Datensätze verifizieren ließ, desto sicherer ist ihre Glycosylierung. Diese wurden auf das Modell der PsP A übertragen und je nach Wahrscheinlichkeit farbig markiert. Es konnte dabei festgestellt werden, dass alle Positionen an der Oberfläche liegen und nicht in sterisch unzugänglichen Bereichen wie der enzymatischen Tasche lokalisiert sind (Abb. 3.25), was ein weiterer Hinweis auf die Qualität der Daten ist.

Die Position Asn₃₃₃ ist, wie die Literaturrecherche ergeben hat, bei den unterschiedlichsten Organismen glycosyliert. Es könnte sein, dass sie wie weiter oben erwähnt eine für das Enzym wichtige Aufgabe wie die korrekte Faltung des Enzyms oder die Substratbindung innehat. Für die O-Glycosylierung liegt aufgrund des wesentlich komplexeren Mechanismus kein Programm vor, so dass sich hierzu keine gesicherte Aussage treffen lässt.

Die Oligosaccharide der N-Glycosylierung haben bei Basidiomyceten ein durchschnittliches Molekulargewicht von 1,35 kDa. Das Molekulargewicht des N-deglycosylierten Enzyms liegt bei knapp über 60 kDa. Die Massedifferenz zur N-glycosylierten Form beträgt ungefähr 12 kDa. Unter Einbeziehung des oben angenommenen Wertes für ein Oligosaccharid würde dies bedeuten, dass von elf N-Glycosylierungsstellen ungefähr neun ein Oligosaccharid tragen. Es verbleibt noch ein Masseunterschied von ca. 2,5 kDa zwischen dem errechneten Wert und der N-deglycosylierten Form, der anderweitig modifiziert wurde.

Zudem legen die Ergebnisse der IEF nahe, dass von der PsP A Isoenzyme unterschiedlicher Modifikation vorliegen könnten. Weitere Klarheit können hier nur weitere Experimente bringen.

Eine Gegenüberstellung der PsP A mit der PsP B und der PsP C sowie der EndoProTM, der PCP und der DPP2 zeigten, dass bei vergleichbarem Molekulargewicht der unmodifizierten, gereiften Enzyme die PsP A mit 21,6% den bei Weitem höchsten Anteil an Proteinmodifikationen aufwies. Auch in der Zahl der durch NetNGlyc 1.0 ermittelten potentiellen N-Glycosylierungsstellen übertrifft die PsP A die anderen Enzyme deutlich (Tab. 4.2). Da es sich auch bei der EndoProTM um eine S28.004-Serinpeptidase handelt,

kann angenommen werden, dass die starke Modifikation der PsP A weniger mit dem Typus der S28-Serinpeptidase zu tun hat, sondern vielmehr mit dem Herkunftsorganismus zusammenhängt. Basidiomyceten glycosylieren ihre extrazellulären Enzyme generell stark, um sie gegen Umwelteinflüsse besser zu schützen. Dieses Ergebnis legt auch die Vermutung nahe, dass die PsP A stabiler als die EndoProTM sein könnte, was im industriellen Einsatz große Vorteile bieten könnte.

Tab. 4.2: tabellarische Aufstellung der rechnerisch mit NetNGlyc 1.0 ermittelten N-Glycosylierungen und der experimentell bestätigten für die prolylspezifischen Peptidasen aus *Wolfiporia cocos*, der EndoProTM, der humanen PrCP und der humanen DPP2. Die experimentell bestätigten N-Glycosylierungen sind durch folgende Arbeiten belegt a) Sebela *et al.* 2009, b) Chen *et al.* 2009 und c) Soisson *et al.* 2010. Des Weiteren wurde der Anteil der posttranskriptionalen Proteinmodifikationen am Gesamtgewicht bestimmt

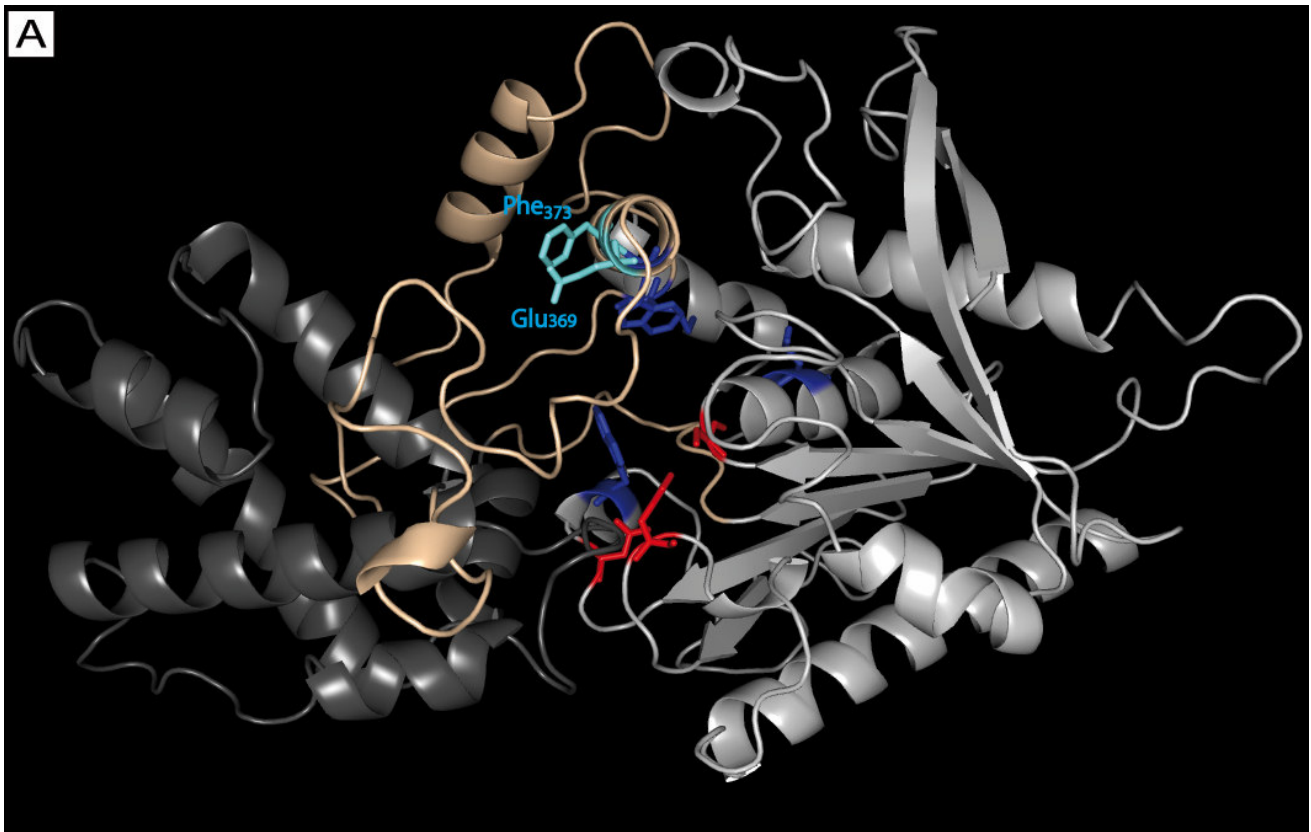
	Länge gereift [AA]	Berechnetes Molekulargewicht [kDa]	Bestimmtes Molekulargewicht gereift [kDa]	Gewicht Proteinmodifikation [kDa]	Anteil Proteinmodifikation [%]	Anzahl berechneter N-Glycosylierungen	Anzahl beschriebener N-Glycosylierungen
PsP A	475	52,8	67	14,1	21,0	11	9
PsP B	470	52,9	n.b.	n.b.	n.b.	9	n.b.
PsP C	505	56,6	n.b.	n.b.	n.b.	3	n.b.
EndoPro	481	53,8	63	9,2	14,6	7	5 ^{a)}
Humane PrCP	451	53,8	58	4,2	7,2	6	5 ^{b), c)}
humane DPP2	467	51,8	60	8,2	13,7	6	2 ^{b)}

Für die technische Anwendung ist diese Erkenntnis aus den weiter oben angeführten Gründen der höheren Stabilität und Lebensdauer von Vorteil. Damit können durch geringere Einsatzmengen oder längere Einsatzzeiten Kosten eingespart werden. Zudem ermöglicht die höhere Toleranz bei pH- und Temperaturschwankungen mehr Spielraum für die Prozessgestaltung. Denkbar wäre, dass unter Einsatz verschiedener gentechnischer Methoden oder der Expression in anderen Wirtsorganismen noch mehr potentielle Bindungsstellen auf der Oberfläche der PsP A besetzt werden könnten und die Stabilität damit weiter gesteigert werden kann.

4.1.15 Die PsP A aus *Wolfiporia cocos* im Vergleich

Vergleich der PsP A aus dem Wolfiporia cocos-Stamm MD 104 SS10 zu CBS 279.55

Sowohl die Sequenz der Nucleinsäure als auch die Aminosäuresequenz wurden mit der seit kurzem vorliegenden Sequenz (jgi|Wolco1|28272) des *Wolfiporia cocos* Stammes MD 104 SS10 verglichen, der im Rahmen eines Genomprojekts der JGI vollständig sequenziert wurde. Es stellte sich heraus, dass 18 Nucleotide des hier untersuchten Gens von denen aus *Wolfiporia cocos* MD 104 SS10 abwichen (Anhang, Abb. A.3). 14 von ihnen betreffen nur die wobbelnde Base (A₁₇₇ → G₁₇₇, G₆₀₀ → A₆₀₀, A₆₉₃ → T₆₉₃, G₆₉₆ → A₆₉₆, T₇₁₁ → C₇₁₁, A₇₂₉ → G₇₂₉, G₉₁₅ → A₉₁₅, C₁₀₉₅ → T₁₀₉₅, G₁₁₈₈ → C₁₁₈₈, G₁₂₁₈ → C₁₂₁₈, A₁₂₄₅ → G₁₂₄₅, C₁₃₄₄ → T₁₃₄₄, C₁₃₅₉ → T₁₃₅₉, T₁₅₁₅ → G₁₅₁₅) und haben keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz. Die restlichen führten zum Austausch der entsprechenden Aminosäuren (T₃₉ → C₃₉ Val₉ → Ala₉, T₁₁₀₇ → G₁₁₀₇ Asp₃₆₉ → Glu₃₆₉, A₁₁₁₇ → T₁₁₁₇ und G₁₁₁₉ → T₁₁₁₉ Met₃₇₃ → Phe₃₇₃), was bei drei Triplets zum Einbau einer anderen Aminosäure führt (zwei der Mutationen liegen in einem Triplet). Der Unterschied auf cDNA-Ebene beträgt zwischen den beiden Varianten 3,46%, auf Aminosäureebene 0,57%. Die betroffenen Aminosäuren bleiben aber in ihrer Eigenschaftsfamilie. Zwei von ihnen betreffen die Aminosäurepositionen 369 und 373, die auf der dem α/β -Hydrolasefold abgewandten Seite der α -Helix M liegen (Teil der SKS-Domäne). Obwohl Aminosäuren, die Teil der hydrophoben Tasche sind, in unmittelbarer Nähe sitzen (Trp₃₇₂, Met₃₈₀), liegen die beiden veränderten Aminosäuren in nichtkonservierten Positionen eines ansonsten konservierten Bereichs (Abb. 4.7). Zudem sitzt der erste Aminosäureaustausch im ungeriffen Enzym und liegt damit inmitten des Signalpeptids. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Enzymfunktion dadurch nicht beeinflusst wird und beide Enzyme vergleichbar arbeiten. Auch die N-Glycosylierungsstellen bleiben dadurch unverändert. Es ist davon auszugehen, dass die beiden Varianten sich in ihren Eigenschaften nicht unterscheiden.



B

<i>Homo_sapiens_TSSP/1-514</i>	GD - R	Q	W	L	Y	Q	T	C	T	E	F	G	F	Y	TSSP (S28.003)
<i>Mus_musculus_TSSP/1-509</i>	GD - R	Q	W	L	Y	Q	T	C	T	E	F	G	F	Y	
<i>Homo_sapiens_DPP2/1-492</i>	PD	A	R	A	W	Y	Q	A	C	T	E	I	N	L	T
<i>Rattus_norvegicus_DPP2/1-500</i>	SN	A	R	A	W	Y	Q	A	C	T	E	I	N	L	T
<i>Homo_sapiens_PCP/1-496</i>	- - -	L	G	W	S	Y	Q	A	C	T	E	V	V	M	P
<i>Bos_taurus_PCP/1-499</i>	- - -	L	G	W	S	Y	Q	A	C	T	E	M	V	M	P
<i>Pongo_abelii_PCP/1-496</i>	- - -	L	G	W	S	Y	Q	A	C	T	E	V	V	M	P
<i>Mus_musculus_PCP/1-491</i>	- - -	M	G	W	S	F	Q	A	C	T	E	M	V	M	P
<i>EndoPro_Aspergillus_niger/1-526</i>	VD -	R	Q	W	E	W	F	L	C	N	E	P	F	F	Y
<i>PsP_Wolfiporia_cocos/1-520</i>	- E -	R	S	W	F	W	I	V	C	N	Q	M	G	F	F
<i>Fibroporia_radiculosa_predicted_protein/1-512</i>	- D -	R	S	W	M	W	I	V	C	N	Y	M	G	F	F
<i>Postia_placenta_predicted_protein/1-528</i>	- E -	R	S	W	L	W	I	V	C	N	E	M	G	F	Y
<i>Fomitopsis_pinicola_hypothetical_protein/1-521</i>	- N -	R	S	W	T	W	I	V	C	N	E	M	G	F	Y
<i>Laetiporus_sulphureus_peptidase_S28/1-532</i>	- T -	R	S	W	E	W	I	V	C	N	Y	M	G	F	L
<i>Trametes_cinnabarina/1-527</i>	- G -	R	S	W	M	W	I	V	C	N	E	V	G	F	F
<i>Fomitiporia_mediterranea_hypothetical_protein/1-564</i>	- G -	R	S	W	T	W	I	V	C	N	Q	V	G	F	F
<i>Schizopora_paradoxa/1-554</i>	- D -	R	S	W	T	W	I	V	C	N	E	V	G	F	Y

α-Helix M

nicht konservierter Bereich mit 1. Mutation
 konservierter Bereich der hydrophoben Tasche
 nicht konservierter Bereich mit 2. Mutation

Abb. 4.7: **A:** Darstellung der PsP A mit katalytischer Triade (rot), hydrophober Tasche (blau) und den beiden Aminosäuren die bei der PsP A von *Wolfiporia cocos*-Stamm MD104SS10 abweichen (Glu₃₆₉ und Phe₃₇₃, cyan). Beide Aminosäuren liegen abseits der hydrophoben Tasche und der katalytischen Triade. **B:** Multisequenzalignment verschiedener S28-Serinpeptidasen, die unterschiedlichen Unterfamilien angehören. Die Bereiche, in denen die abweichenden Aminosäuren sitzen, sind nicht konserviert. Die sie umgebenden Bereiche, die zur Helix M gehören, zeichnen sich durch einen hohen Konservierungsgrad aus. In diesen Bereich gehört auch eine der Aminosäuren, die die hydrophobe Tasche bilden.

Weitere PsPs aus Wolfiporia cocos

Im Genom von *Wolfiporia cocos* MD 104 SS10 finden sich die Gene von zwei weiteren S28-Serinpeptidasen. Entsprechend des in dieser Arbeit bearbeiteten Enzyms PsP A, werden in diesen Zusammenhang die beiden anderen S28-Peptidasen mit PsP B (jgi|Wolco1|137065) und PsP C (jgi|Wolco1|136673) bezeichnet. Es zeigt sich, dass sich PsP A und PsP B sehr ähneln. Die Sequenzidentität liegt bei 68% und die Sequenzähnlichkeit bei 80% (Tab. 4.3). Diese Werte sowie die aller folgenden Bestimmungen dieser Art wurden mit dem Programm LALIGN berechnet (Huang und Miller 1991). Aufgrund ihrer Disulfidbrückentopologie und der konservierten Positionen der sie bildenden Cysteinreste kann geschlossen werden, dass sie mit der PsP A der gleichen S28-Unterfamilie angehört. Der hohe Grad an potentiellen N-Glycosylierungsstellen und der niedrige pI sowie das zum katalytisch aktiven Histidin benachbarte Cystein, legen einen ähnlichen Aufgabenbereich nahe. Möglicherweise ergänzen sich PsP A und PsP B in ihrem pH- bzw. Temperaturoptimum, was für den industriellen Einsatz interessant wäre.

Die PsP C ist von den beiden anderen PsPs aus *Wolfiporia cocos* genetisch weiter entfernt, was sich in einer relativ geringen Identität (31,2% zu PsP A und 27,2% zu PsP B) äußert. Man kann daraus schließen, dass sie sich an Anforderungen anpassen musste, die sich von denen der PsP A und der PsP B unterscheidet. Im Unterschied zu diesen besitzt sie nach dem katalytischen Histidin kein Cystein, sondern ein weiteres Histidin wie die schon besprochene humane PCP und die DPP2 (Anhang, Abb. A.3). Sie weist einen höheren pI (Tab 4.1) und einen mit drei N-Glycosylierungsstellen vergleichsweise geringen Glycosylierungsgrad auf. Auch fehlt ihr das Nuclear Export Signal (NES), das bei der PsP A (Val₁₃ – Leu₂₁) und der PsP B (Leu₁₀ – Leu₁₅) eindeutig durch NetNES 1.1 (la Cour, Kiemer, Mølgaard, Gupta, Skriver, Brunak 2004) identifiziert wurde. Das sind klare Hinweise auf eine intrazelluläre Funktion. Außerdem gibt es Insertionen im Bereich um die Schnittstelle der Prekursorsequenz, wobei die PsP C nicht die oben besprochene Konservierung des Arginins besitzt, so dass keine eindeutige Aussage über den N-Terminus der reifen PsP C gemacht werden konnte (Anhang, Abb. A.3). Eine weitere Insertion befindet sich inmitten des Enzyms. Die PsP C ist dadurch etwas länger als PsP A und PsP B. MEROPS stuft sie als S28.UPW (unassigned peptidase) ein, was eine Sammelgruppe für noch unbestimmte Familienmitglieder der S28-Familie ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass sie zu einer neuen, noch nicht eingeordneten Unterfamilie gehört. Die Topologie der Disulfidbrücken sowie die Konservierung der Position, der sie bildenden Cysteinreste, zeigt, dass die PsP C ein etwas entfernter, aber doch direkter Verwandter der PsP A und der PsP B sein muss.

Tab. 4.3: Gegenüberstellung von Identität und Ähnlichkeit für die einzelnen prolylspezifischen Peptidasen aus *Aspergillus niger* (EndoPro™) und den drei im *Wolfiporia cocos*-Genom gefundenen S28-Peptidasen (PsP A – PsP C)

		Identität [%]			
		PsP A <i>Wolfiporia cocos</i>	PsP B <i>Wolfiporia cocos</i>	EndoPro™ <i>Aspergillus niger</i>	PsP C <i>Wolfiporia cocos</i>
Ähnlichkeit [%]	PsP A <i>Wolfiporia cocos</i>		66	41	32
	PsP B <i>Wolfiporia cocos</i>	82	<i>Wolfiporia cocos</i>	40	28
	EndoPro™ <i>Aspergillus niger</i>	68	67	Endopeptidasen	28
	PsP C <i>Wolfiporia cocos</i>	57	57	57	

Die PsP A im Vergleich zu EndoPro™

Es wurde geprüft, wie ähnlich die PsP A aus *Wolfiporia cocos* der EndoPro™ aus *Aspergillus niger* ist. Das Alignment der Aminosäuresequenz der prolylspezifischen Peptidase aus *Wolfiporia cocos* mit der Peptidase EndoPro™ aus *Aspergillus niger* CBS 513.88 (EMBL; AX458699; Patent WO0245524-A2/1, erteilt: 13.06.2002) wurde mit Clustal O durchgeführt (Anhang, Abb. A.4). Der Sequenzvergleich zwischen der PsP A und der EndoPro™ zeigte, dass beide Enzyme bzgl. ihrer Aminosäuresequenz so weit von einander entfernt sind, dass eine Patentierung der PsP A möglich ist. EndoPro™ gehört genauso wie die PsP A aus *Wolfiporia cocos* zur S28.004 Familie.

Zudem wurde von der EndoPro™ eine schematische Darstellung der Sekundärstruktur (Abb. 4.8) sowie ein Strukturmodell mit SWISS-Model (Abb. 4.9) auf der Basis der humanen DPP2 (Uniprot: 3jyh) erstellt. Als katalytische Triade wurden Ser₁₇₉, Asp₄₅₈ und His₄₉₁ identifiziert. Tyr₁₈₀ und Ser₁₈₁ bilden das *oxyanion hole* und Ala₁₉₃, Trp₃₇₄, Phe₃₈₄ und Trp₄₆₀ sind Bestandteil der hydrophoben Tasche. Das Strukturmodell zeigte ein zur PSP A sehr ähnlich aufgebautes Enzym. Die EndoPro™ ist wie die PSP A eine Serinpeptidase vom Typ S28.004. Sie verfügt über die gleichen Domänen. Die Disulfidbrücken sind an den gleichen konservierten Stellen zu finden. Das gleiche gilt für das bei Pilzen stark konservierte Cystein (bei der PsP A Cys₄₉₂), das zum katalytisch aktiven Histidin (bei der PsP A His₄₉₁) in direkter Nachbarschaft steht. Die Verteilung der Sekundärstrukturen auf die einzelnen Domänen der EndoPro™ entspricht der der PsP A - mit Ausnahme der α -Helix E. Der Abgleich mit anderen Modellen, die von Phyre² generiert wurden, sowie die Ergebnisse von JPred4 (Abb. 4.9 Tafel D) bestätigte dieses Ergebnis. Wenn man dies alles noch vor dem Hintergrund betrachtet, dass die DPP2, auf deren Daten das Strukturmodell generiert wurde, über die α -Helix E verfügt, kann mit einiger Sicherheit gesagt werden, dass es sich nicht um ein Artefakt handelt, der sich aus dem zugrundeliegenden Modell herleitet, sondern diese α -Helix bei der EndoPro™ tatsächlich nicht existiert.

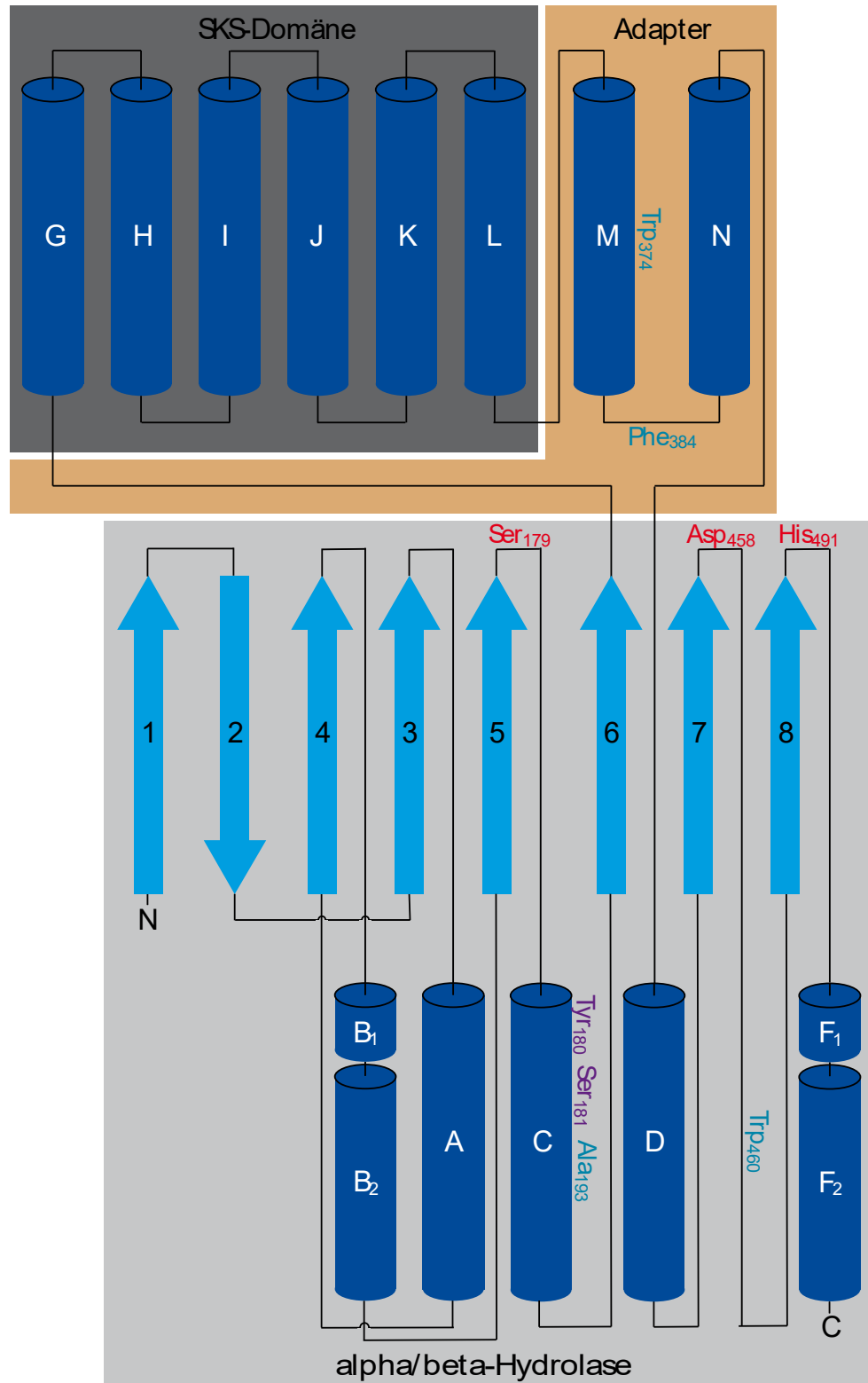


Abb. 4.8: Schematischer Aufbau der EndoPro™. Die Domänen sind als Felder dargestellt (α/β -Hydrolase hellgrau, SKS-Domäne dunkelgrau und Adapterbereich hellbraun). Die Domänen grenzen die zu ihnen gehörenden Strukturen ein (α -Helices hellblaue Pfeile, β -Faltblatt dunkelblaue Walzen und Loops als schwarze Linien). Die Aminosäuren der katalytischen Triade (rot), des *oxyanion hole* (violett) und der hydrophoben Tasche (blau) sind an den sie tragenden Strukturen dargestellt

Die bei der PsP A zweigeteilten α -Helices B₁ und B₂ bzw. F₁ und F₂ findet man auch bei der EndoProTM. Gleichzeitig wurden zwei zusätzliche antiparallele β -Faltblätter in das Modell integriert, die als Artefakte anzusehen sind. Sie liegen in einem unsicheren Bereich des Modells (Abb. 4.9 Tafel B) und konnten auch mit JPred4 nicht verifiziert werden (Abb. 4.9 Tafel D).

Die EndoProTM verfügt über eine etwas größere Gesamtlänge als die PsP A. Aus dem Alignment der Aminosäuresequenz der EndoProTM mit der PsP A ist ersichtlich, dass die EndoProTM im Verhältnis zur PsP A mehr Insertionen in Loops beinhaltet (Anhang, Abb. A.4). Die entsprechenden Bereiche wurden in Abb. 4.10 rot markiert.

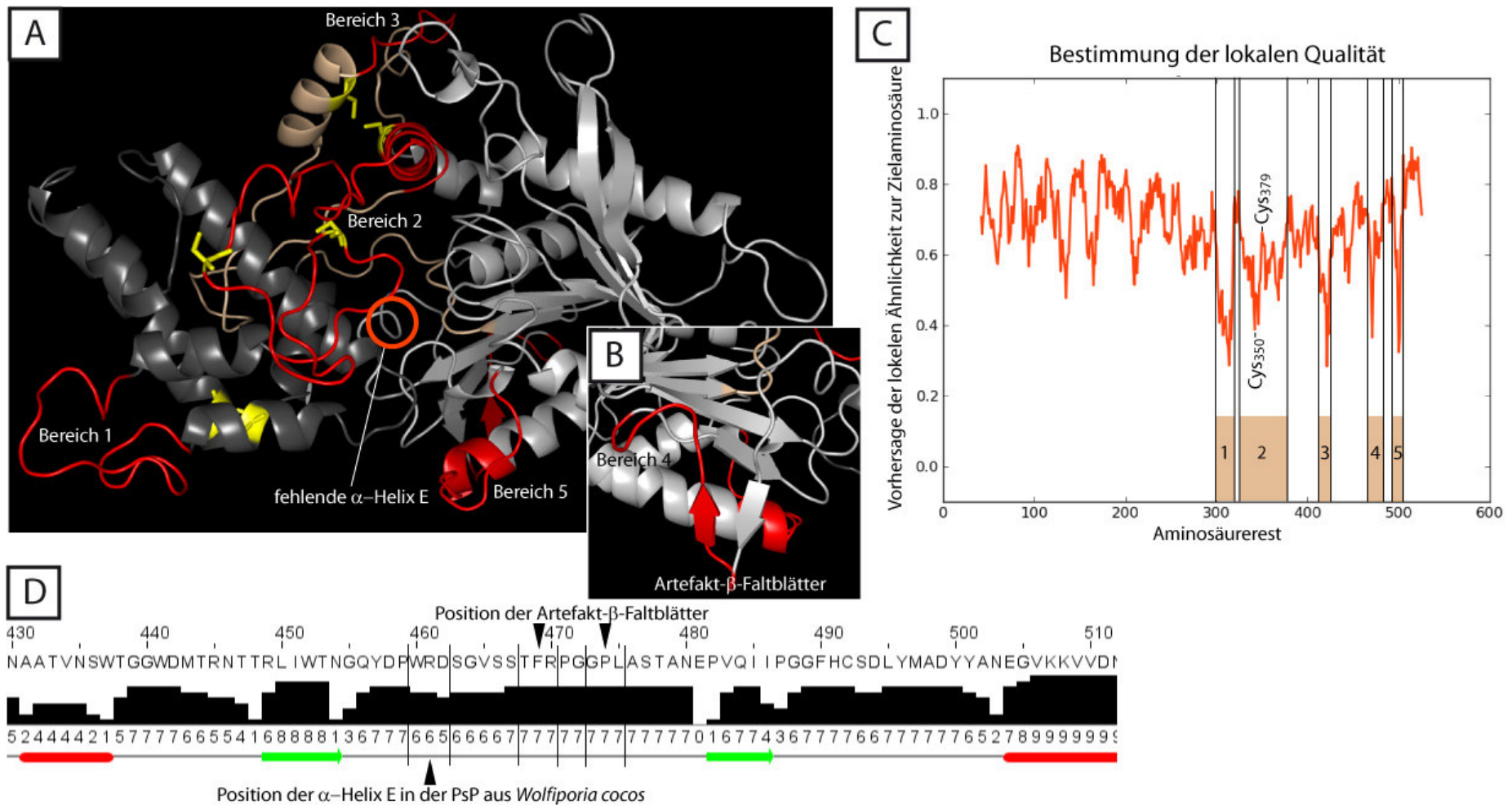


Abb.4.9: **A** und **B**: Das Homologiemodell zeigt die Bereiche 1 bis 5, die mit einer gewissen Unsicherheit behaftet sind (rot). **C**: die entsprechenden Bereiche finden sich im nebenstehenden Diagramm wieder. **D**: Die bei der PsP A vorhandene α -Helix E ist bei der EndoPro™ nicht vorhanden (grüner Kreis auf Tafel A). Das Homologiemodell beinhaltet auch zwei antiparallele β -Faltblätter, die als Artefakt der Modellbildung angesehen werden können. Berechnungen mit JPred4 zur Sekundärstruktur zeigen, dass an den entsprechenden Stellen keine β -Faltblätter sein können

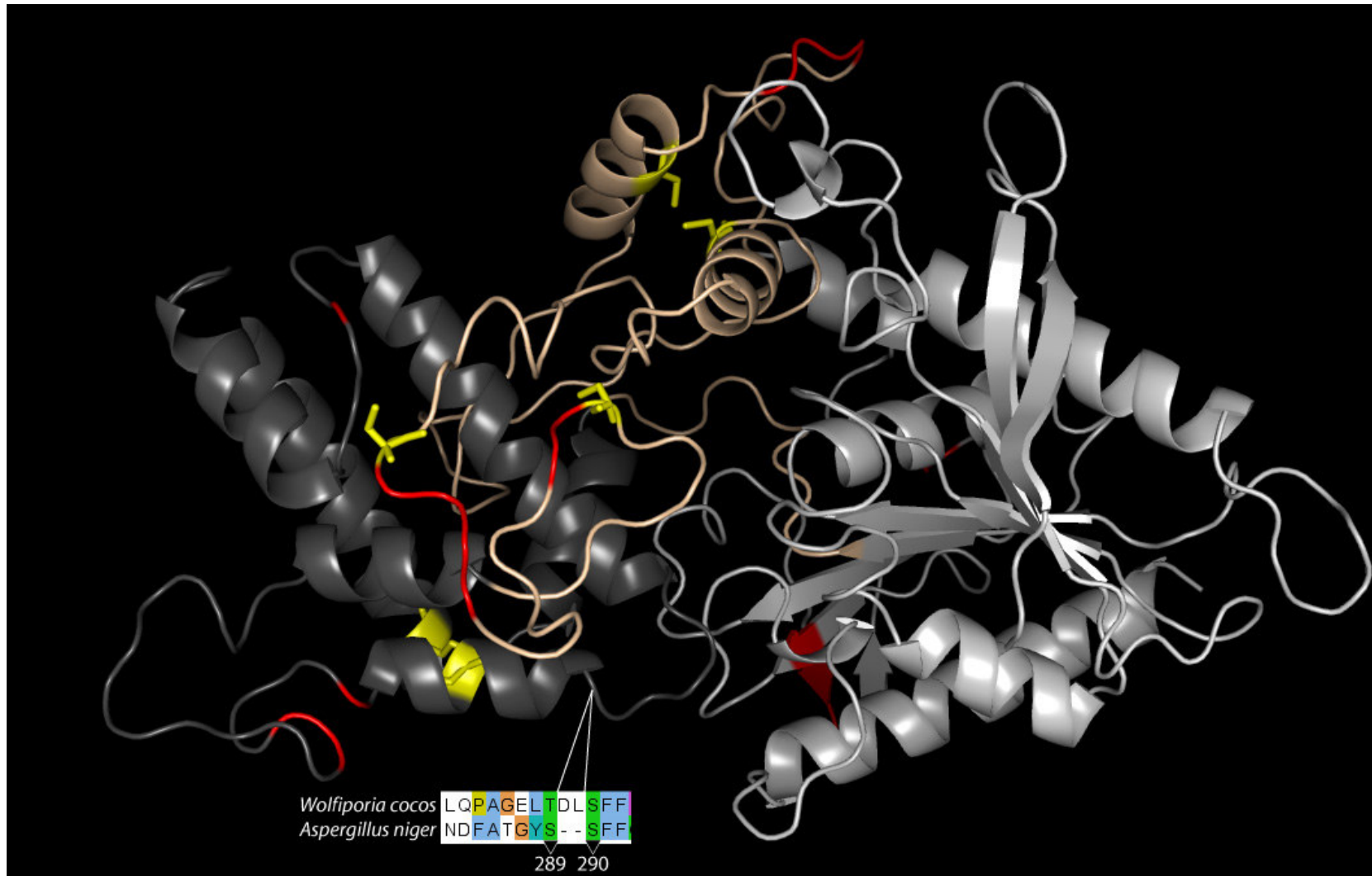


Abb. 4.10: Modell der EndoPro™ mit einer farbigen Unterlegung der Domänen (α/β -Hydrolase in hellgrau, SKS-Domäne in dunkelgrau und die Adaptersequenzen in hellbraun), der Disulfidbrücken (gelb) und der Bereiche, die länger sind als die entsprechenden Bereiche der PsP A (rot). Dargestellt ist auch der Bereich zwischen Ser₂₈₉ und Ser₂₉₀, der bei der PSP A länger ist

Weitere in der Literatur beschriebene prolylspezifische Peptidasen

An der Universität von Nagasaki wurden unter Dr. Daisuke Tsuru mehrere PsPs aus unterschiedlichen Organismen isoliert. Zwei der charakterisierten Peptidasen stammen aus den Basidiomyceten *Agaricus bisporus* (Sattar *et al.* 1990) und *Lyophyllum cinerascens* (Yoshimoto *et al.* 1988). Die restlichen sind bakteriellen Ursprungs (*Pseudomonas* sp. KU-22 (Oyama *et al.* 1997), *Xanthomonas maltophilia* (Suga *et al.* 1995), *Aeromonas hydrophila* (Kanatani *et al.* 1993), *Aeromonas sobria* (Kitazono *et al.* 1994) und *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto *et al.* 1991)). Eine Sequenzierung unterblieb, so dass ein Vergleich der Nucleotidfolge und eine Zuordnung zu einer bestimmten Peptidasefamilie bzw. einem Clan an dieser Stelle nicht vorgenommen werden konnte. Die PsP aus *Agaricus bisporus* und *Lyophyllum cinerascens* ähneln sich in vielerlei Hinsicht, sind aber von der PsP A aus *Wolfiporia cocos* in ihren Eigenschaften verschieden. Das Molekulargewicht der Peptidase aus *Agaricus bisporus* beträgt ungefähr 78 kDa, das der Peptidase aus *Lyophyllum cinerascens* ca. 76 kDa. Beide haben eine hohe Spezifität gegenüber dem Substrat, was Länge und Sequenz angeht. Ihr Temperaturoptimum von 37 bzw. 40 °C gleicht dem der *Wolfiporia cocos*-PsP A. Ihr pH-Optimum liegt mit 7,5 im basischen Bereich. Der pI wurde, je nachdem ob das Isolat aus dem Überstand oder dem Fruchtkörper stammt, zu 4,8 bzw. 5,2 bestimmt und ist damit höher als der der *Wolfiporia cocos*-PsP A. Die beiden Werte lassen sich vermutlich durch das Vorhandensein verschiedener Isoenzyme erklären. Vermutet wird, dass die sauren Aminosäuren des gleichen Enzyms in der basischeren Variante amidiert vorliegen. Die Autoren stellen sie aufgrund einer nahe dem katalytischen Zentrum gelegenen Thiolgruppe in die Nähe der Proteinase K, die zur Peptidasefamilie S08.054 und dem Clan SB gehört. Allerdings ist von diesem Clan nicht bekannt, dass er prolylspezifische Peptidasen beinhaltet. Des Weiteren ließ sich zeigen, dass das Molekulargewicht von S08-Peptidasen aus *Agaricus bisporus* (insgesamt vier Peptidasen) mit durchschnittlich 30 kDa wesentlich kleiner ist, als jenes der beschriebenen Enzyme. Auch deren N-Glycosylierung könnte nur geringfügig das Molekulargewicht nach oben beeinflussen, da diese, wie mit NetNGlyc 1.0 ermittelt, nur sehr schwach ausgeprägt ist (ungefähr drei potentielle Bindungsstellen für die N-Glycosylierung). Für *Lyophyllum cinerascens* konnten diese Werte nicht erhoben werden, weil es bis jetzt noch keine Daten aus Sequenzierungsprojekten gibt. Allerdings wurden Sequenzdaten aus Pilzen, die im Screening des DBU-Projekts 13164 verwendet wurden untersucht. Es zeigte sich, dass sich in allen Spezies mindestens eine S08-Peptidase fand, egal ob der Herkunftsorganismus die Fähigkeit das Substrat abzubauen besaß oder nicht. Zudem sind diese Enzyme bei allen Pilzen von ähnlicher Größe, so dass angenommen werden kann, dass für die Peptidasen von *Lyophyllum cinerascens* ähnliches gilt wie für die von *Agaricus bisporus*. Auch der durchschnittliche pI liegt mit einem Wert von mehr als sechs deutlich über jenen der beiden isolierten prolylspezifischen Peptidasen. Bei vielen Mitgliedern der S28-Familie

liegt, wie oben besprochen, neben dem His₄₇₉ der katalytischen Triade ein stark konserviertes Cystein. Es ist anzunehmen, dass es sich bei den gefundenen Enzymen um S28-Serinpeptidasen handelte. Auch das Molekulargewicht der aus *Agaricus bisporus* und *Lyophyllum cinerascens* isolierten Peptidasen würde eher dafür sprechen.

PSP A im Kontext anderer S28-Peptidaseunterfamilien

Um die PsP A verwandtschaftlich einzuordnen, wurden sie mit dem Programm MEGA7 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, Kumar 2013) phylogenetisch untersucht und das Resultat in Abb. 4.11 und Abb. 4.16 als Baum dargestellt. Über diese Einordnung ist es möglich, bei entsprechender Informationslage (Publikationen, Kristallstrukturen, etc.) Rückschlüsse von verwandten Enzymen auf die PsP A zu ziehen. Gleichzeitig werden aber auch generelle Eigenschaften der Enzymfamilie sichtbar, die wertvolle Hinweise für das weitere Vorgehen liefern können. Wie bereits erwähnt, können die katalytisch aktiven Aminosäuren und die Disulfidbrücken aufgrund ihres hohen Konservierungsgrades für die Zuordnung zu Enzymfamilien bzw. Unterfamilien herangezogen werden. Diese wurden ergänzend zur phylogenetischen Untersuchung in die Betrachtung einbezogen, auch um die Struktur des phylogenetischen Baums zu validieren (Abb. 4.12 bis 4.15).

Es wurden zwei phylogenetische Bäume erstellt. Der erste ordnet die pilzlichen S28-Peptidasen in die Reihe vieler der bis jetzt durch MEROPS kategorisierten S28-Peptidaseunterfamilien ein (Abb. 4.11). Zusätzlich zeichnet er die Entwicklungslinien nach, indem S28-Peptidasen von Bakterien (*Legionella cincinnatiensis*, *Fluoribacter dumoffii* und *Bdellovibrionales bacterium*) Protisten (*Monosiga brevicollis*, *Trypanosoma cruzii*, *Paramecium tetraurelia*, *Plasmodiophora brassicae*, *Dictyostelium discoideum*, *Reticulomyxa filosa*, *Guillardia theta*, *Fragilariopsis cylindrus* und *Chrysochromulina spec.*) und niederen Vertreter von Pilzen (*Chytriomycetes spec.*, *Mucor circinelloides*), Tieren (*Amphimedon queenslandica*, *Orbicella faveolata*) und Pflanzen (*Marchantia polymorpha*) in den Baum aufgenommen wurden. Der zweite phylogenetische Baum stellt die Position von PsP A, PsP B, PsP C und EndoProTM innerhalb der pilzlichen S28-Peptidasen dar (Abb. 4.16).

Die in Cluster I dargestellten drei bakteriellen S28-Peptidasen stammen aus γ - (WP 058464345.1 *Legionella cincinnatiensis* und WP 010652136 *Fluoribacter dumoffii*) und δ -Proteobakterien (OFZ80217.1 *Bdellovibrionales bacterium*). Deren Funktion wird den Einträgen von GeneBank nach mit *septum formation initiator* beschrieben (NCBI Reference Sequence: WP_058459969.1, WP_058469400.1 und WP_058511427.1). Bei diesen S28-Peptidasen handelt es sich um intrazelluläre Enzyme, die am Prozess der Zellteilung beteiligt sind. Weitere S28-Peptidasen in dieser Organismengruppe konnten bisher nicht entdeckt werden, was sich aber durch zukünftige Sequenzierungen weiterer bakterieller Genome sicher ändern wird. Die Enzyme gleichen in ihren Merkmalen den

S28-Peptidasen der Eukaryoten. Sie sind mit einer Länge von ungefähr 460 Aminosäuren etwas kompakter als viele ihrer eukaryotischen Pendanten (PsP A verfügt über 520, PsP B über 519 und PsP C 553 Aminosäuren). Die Zunahme der Proteingröße scheint mit der evolutionären Ausdifferenzierung dieser Enzyme für verschiedene Aufgabenfelder einher zu gehen. Die bakteriellen S28-Peptidasen verfügen über zwei konservierte Disulfidbrücken, die bei allen S28-Peptidasen vorhanden sind. Sie entsprechen bei der PsP A den Disulfidbrücken, die die α -Helixpaare H/K und M/N zusammenhalten. Zusätzlich verfügen sie über eine weitere Disulfidbrücke, die den Loop zwischen dem β -Faltblatt 3 und der α -Helix A verbindet.

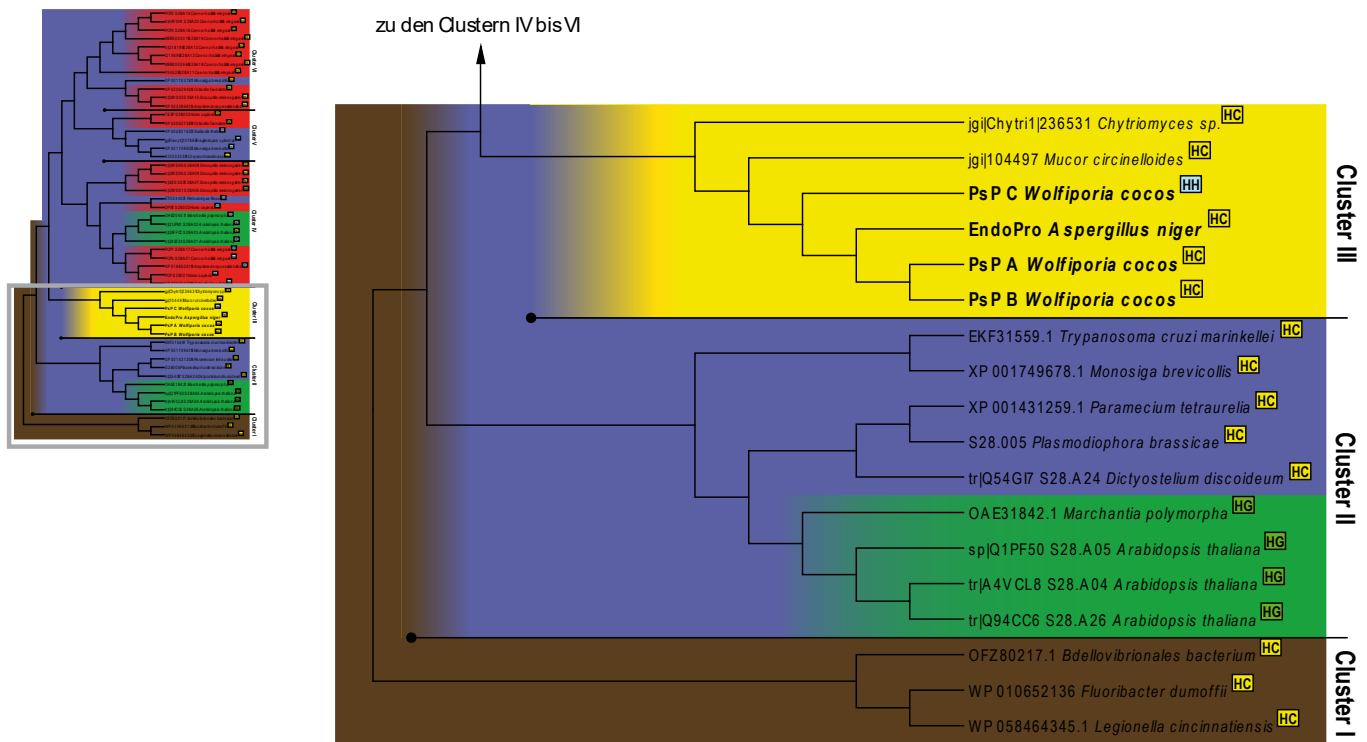
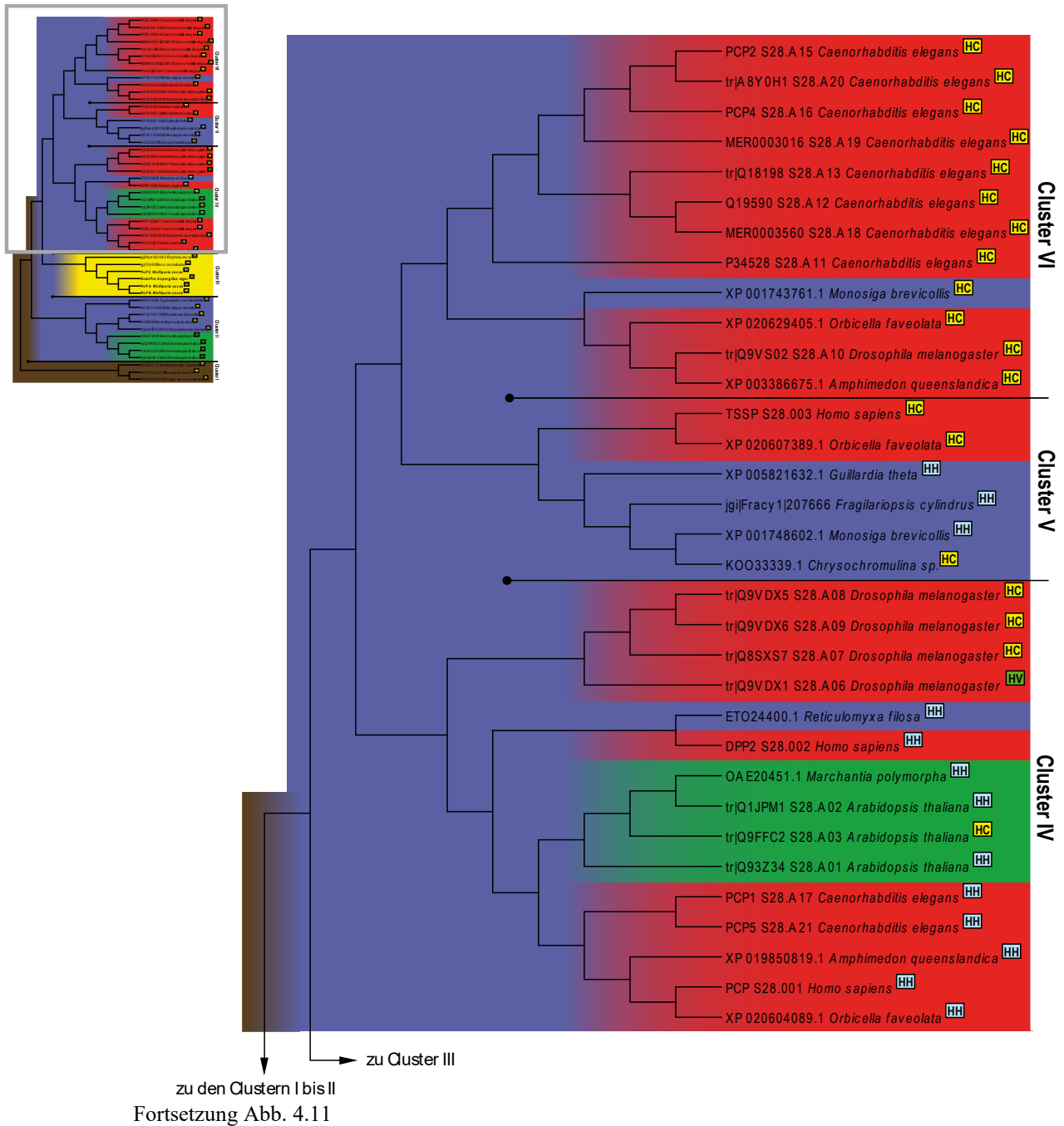


Abb. 4.11: Phylogenetische Einordnung der in dieser Arbeit betrachteten pilzlichen Peptidasen (PsP A, PsP B, PsP C und EndoPro™) mit vielen der bisher durch MEROPS charakterisierten S28-Peptidasen. Des Weiteren wurden einige Bakterien, Protisten und niedere Pilze einbezogen, um eine chronologische Entwicklungslinie nachzuzeichnen. Der Baum wurde mit MEGA unter folgenden Einstellungen erstellt: statistische Methode Maximum Likelihood, Nearest-Neighbor-Interchange (NNI); Substitutionsmodell WAG; Bootstrepfaktor 500. Neben der Einteilung in Cluster, die der Phylogenie folgt, gibt es im Baum eine farbliche Zuordnung nach den einzelnen Reichen (bakterielle S28-Peptidasen sind braun, solche aus Protisten blau, pflanzliche grün, pilzliche gelb und die tierischen Ursprungs rot gefärbt). Des Weiteren wurde hinter jeden Artname durch ein farblich unterlegtes Kästchen kenntlich gemacht, ob auf das Histidin der katalytischen Triade ein konserviertes Histidin (hellblau) oder Cystein (gelb) folgt. Der phylogenetische Baum wurde aufgrund seiner Größe geteilt. Nebstehendes Schema zeigt welcher Bereich des Baums dargestellt ist



Bei der Betrachtung der Cluster II und V fällt auf, dass sie neben Enzymen aus Vielzellern viele S28-Peptidasen aus Protisten enthalten (Abb. 4.11). Diese kommen aus abstammungsgeschichtlich sehr unterschiedlichen Gruppen. Dies legt nahe, dass es sich um sehr ursprüngliche Gruppen eukaryotischer S28-Peptidasen handelt, die vor der Aufspaltung in verschiedene Abstammungslinien schon vorhanden waren. Die Topologie ihrer Disulfidbrücken bekräftigt diesen Befund. Bei vielen S28-Peptidasen des Clusters II zeigt sich, dass die schon beschriebene, für prokaryotische S28-Peptidasen charakteristische Disulfidbrücke auch bei ihnen vorhanden ist (Abb. 4.12). Dieses Merkmal ist im Verlauf der Evolution bei vielen Eukaryoten verloren gegangen. Eine Ausnahme bilden hierbei die in Pflanzen vorkommenden Peptidasen S28.A04, S28.A05 und S28.A26.

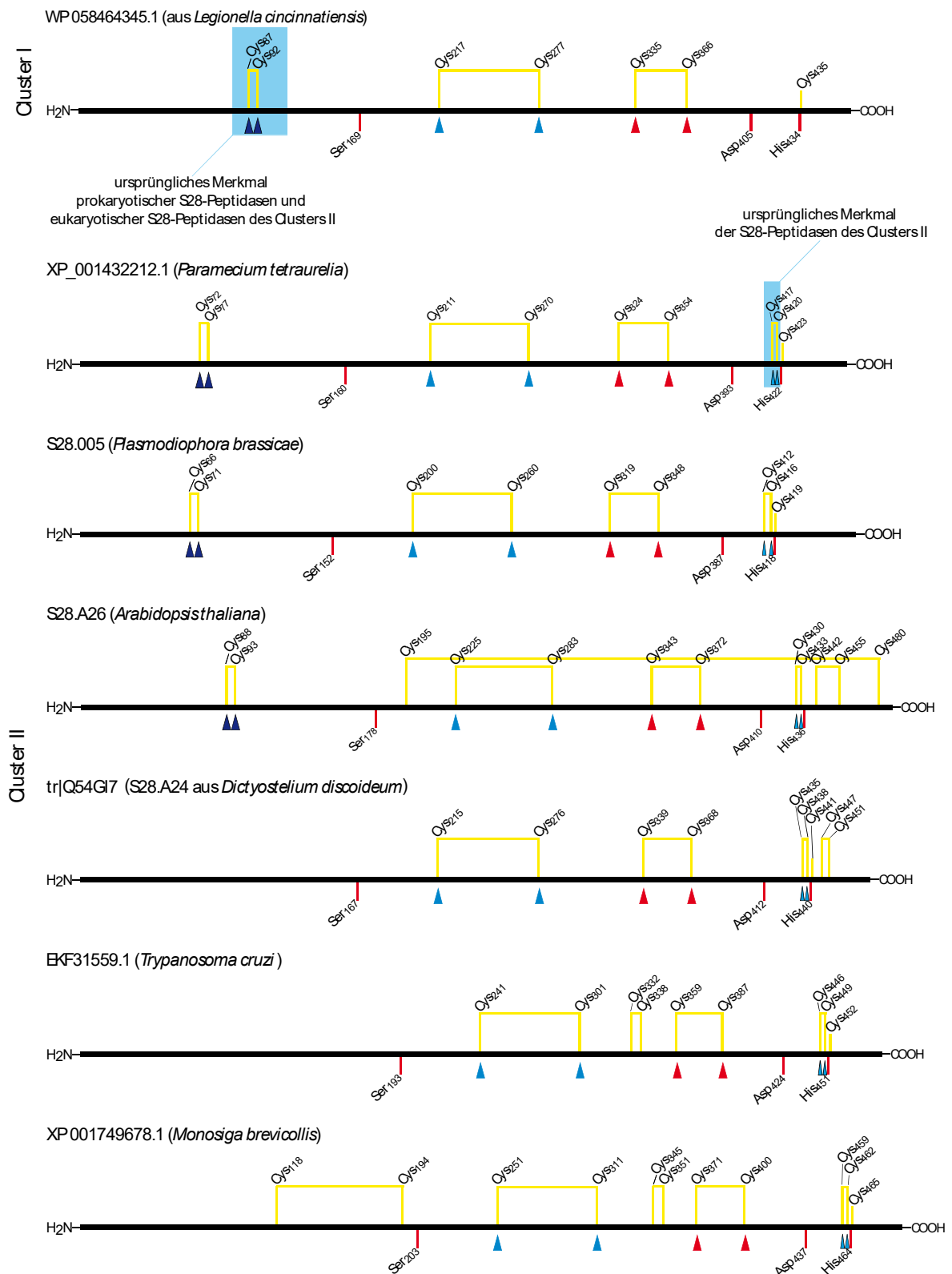


Abb. 4.12: Topologie der konservierten Cysteinreste und Disulfidbrücken der S28-Serinpeptidasen des Clusters I und II. Die Position der Disulfidbrücken, soweit nicht durch Strukturanalysen bekannt, wurde auf der Basis von SWISS-Modellen bestimmt. Die sie bildenden Cysteinreste (gelb) sowie die Aminosäuren der katalytischen Triade (rot) wurden mit ihrer Position angegeben. Die Auswahl der Darstellung der S28-Unterfamilien (stellvertretend durch einzelne Mitglieder repräsentiert), ist nicht vollständig, sondern zur Verdeutlichung bestimmter Sachverhalte angepasst, die für diese Arbeit relevant sind. Des Weiteren finden sich in der Graphik farbig markierte Pfeile unterhalb bestimmter Disulfidbrücken. Gleiche Farben kennzeichnen konservierte Disulfidbrücken.

Ein weiteres Merkmal der Peptidasen des Clusters II ist eine kurze Disulfidbrücke, die

wenige Aminosäuren vor dem Histidin der katalytischen Triade liegt. Auch hier legt die weite Verbreitung den Schluss nahe, dass es sich um ein ursprüngliches Merkmal früher eukaryotischer S28-Peptidasen handelt. Bei den Peptidasen des Clusters V gibt es ebenfalls zwei Disulfidbrücken, die bei einer Vielzahl unterschiedlicher Protisten vorkommt (Abb. 4.13). Die Peptidasen dieses Clusters sind deswegen als ursprünglich zu bezeichnen, wenn auch nicht in dem Maße wie die Peptidasen des Clusters II, da sie nicht die für Prokaryoten typische Disulfidbrücke tragen. Zu diesem Cluster gehört auch die humane TSSP. Tab. 4.4 macht die etwas größere Distanz zu den S28-Peptidasen der Cluster I und II deutlich.

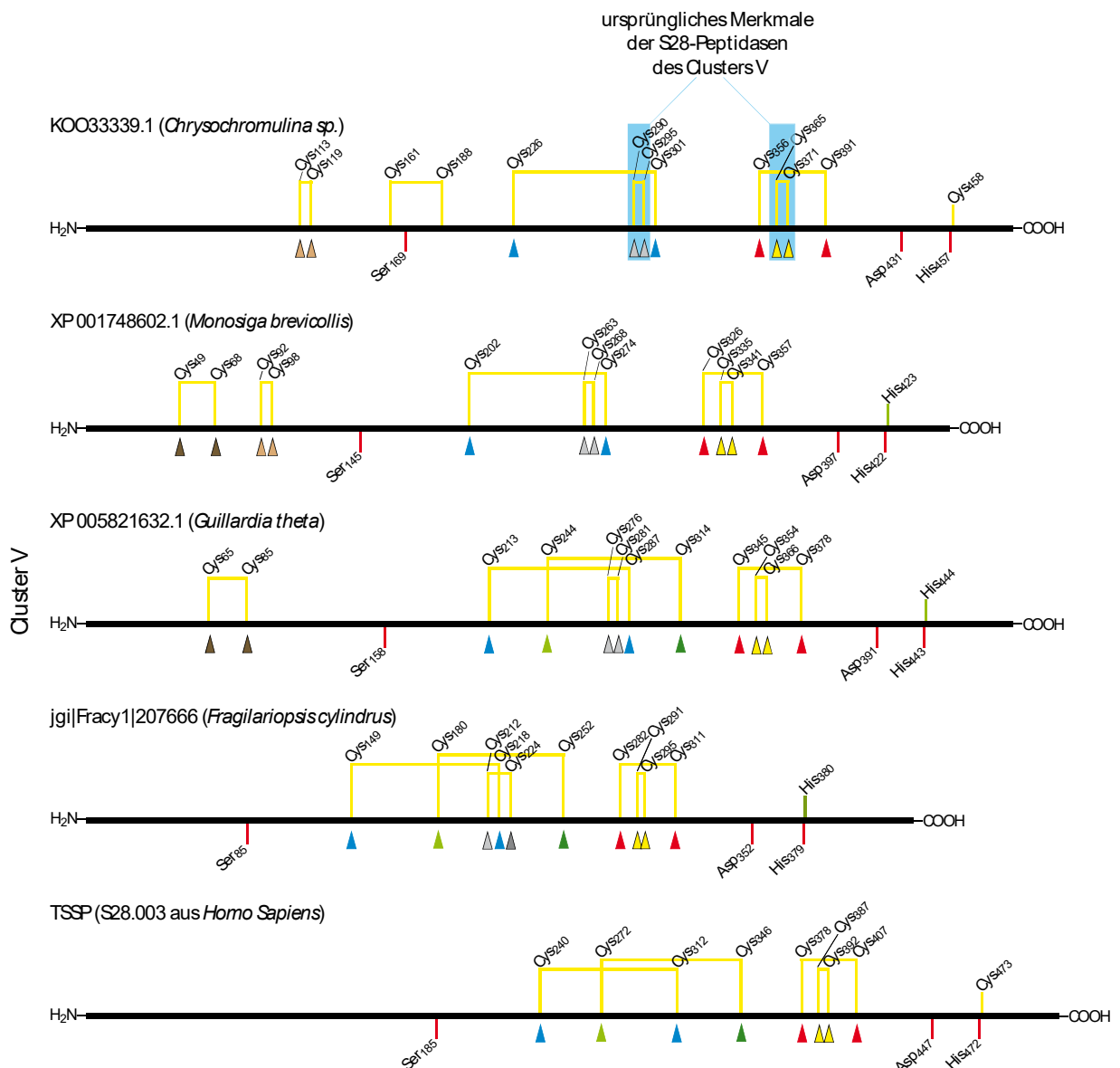


Abb. 4.13: Topologie der konservierten Cysteinreste und Disulfidbrücken der S28-Serinpeptidasen des Clusters V. Die Position der Disulfidbrücken, soweit nicht durch Strukturanalysen bekannt, wurde auf der Basis von SWISS-Modellen bestimmt. Die sie bildenden Cysteinreste (gelb) sowie die Aminosäuren der katalytischen Triade (rot) wurden mit ihrer Position angegeben. Die Auswahl der Darstellung der S28-Unterfamilien (stellvertretend durch einzelne Mitglieder repräsentiert), ist nicht vollständig, sondern zur Verdeutlichung bestimmter Sachverhalte angepasst, die für diese Arbeit relevant sind. Des Weiteren finden sich in der Graphik farbig markierte Pfeile unterhalb bestimmter Disulfidbrücken. Gleiche Farben kennzeichnen konservierte Disulfidbrücken.

Ob sich die Peptidasen der Cluster IV (Abb. 4.15) und VI aus denen des Clusters V entwickelt haben oder eigene Abstammungslinien darstellen, lässt sich aus der Topologie der Disulfidbrücken nicht mit Sicherheit ableiten. Sie tragen nur die zwei für S28-Peptidasen essentiellen Disulfidbrücken (Abb. 4.16, markiert mit blauen und roten Pfeilen) und die bei vielen Eukaryoten vorkommende Disulfidbrücke, die den Loop der oberhalb der Substrattasche liegt mit der SKS-Domäne verbindet (Abb. 4.16, markiert mit einem hell- und einem dunkelgrünen Pfeil) Weitere charakteristische Disulfidbrücken, die darüber Klarheit bringen würden, fehlen hier. Die Tatsache, dass sich in jedem dieser Cluster Vertreter aus verschiedenen Reichen finden (Cluster IV: Protisten, Pflanzen und Tiere; Cluster V: Protisten und Tiere; Cluster VI: Protisten und Tiere) lässt nur den Schluss zu, dass sich die Trennung dieser Cluster schon bei den Protisten vollzogen hat. Die Betrachtung der Sequenzähnlichkeit von Vertretern des Clusters IV mit der S28-Peptidase aus *Legionella cinцинnatiensis* (WP_058464345.1) und den auf Grund der Disulfidbrückentopologie als ursprünglich identifizierten Vertretern der Cluster II und V veranschaulicht dies noch einmal (Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Gegenüberstellung von Identität und Ähnlichkeit für die einzelnen prolylspezifischen Peptidasen aus *Legionella cinцинnatiensis* (WP_058464345.1), *Arabidopsis thaliana* (S28.A26) sowie *Homo sapiens* (PrCP bzw. S28.001, DPP2 bzw. S28.002 und TSSP bzw. S28.003). Enzyme mit hoher phylogenetischer Nähe wurden in farbigen Blöcken zusammengefasst

		Identität [%]				
		WP_058464345.1 <i>Legionella cinцинnatiensis</i>	S28.A26 <i>Arabidopsis thaliana</i>	TSSP <i>Homo sapiens</i>	DPP2 <i>Homo sapiens</i>	PrCP <i>Homo sapiens</i>
Ähnlichkeit [%]	WP_058464345.1 <i>Legionella cinцинnatiensis</i>	ursprüngliche S28 34,3		26,7	29,1	27,1
	S28.A26 <i>Arabidopsis thaliana</i>	61,0	31,5		27,9	26,3
	TSSP <i>Homo sapiens</i>	58,8	56,4		30,4	27,6
	DPP2 <i>Homo sapiens</i>	52,1	54,9	56,2		42,3
	PrCP <i>Homo sapiens</i>	54,7	54,4	53,5	68,4	S28 aus Tieren

Zwischen der Peptidase aus *Legionella cinцинnatiensis* (Cluster I) und der S28.A26 aus *Arabidopsis thaliana* (Cluster II) besteht eine deutliche verwandtschaftliche Nähe. Das gleiche gilt für die S28.A26 und die humane TSSP (Cluster V). Die TSSP ist wiederum mit der humanen DPP2 und der humanen PrCP verwandt, die beide dem Cluster IV angehören. Allerdings ist die humane TSSP unter den Peptidasen des Clusters V ein stark abgeleitetes Enzym, wie die Topologie der Disulfidbrücken zeigt. Für dieses Cluster ursprüngliche Disulfidbrücken fehlen zum Teil, dafür sind andere hinzugekommen. So kommt es, dass beim Vergleich der TSSP mit der S28-Peptidase aus *Legionella cinцинnatiensis* die

Identität (prozentueller Anteil an übereinstimmenden Aminosäuren) geringer ist als bei der DPP2 und der PrCP, aber im Gegenzug die Ähnlichkeit (prozentueller Anteil der übereinstimmenden Aminosäuren und der Aminosäuren, die der gleichen Eigenschaftsgruppe angehören) deutlich höher ausfällt als bei den beiden genannten Enzymen.

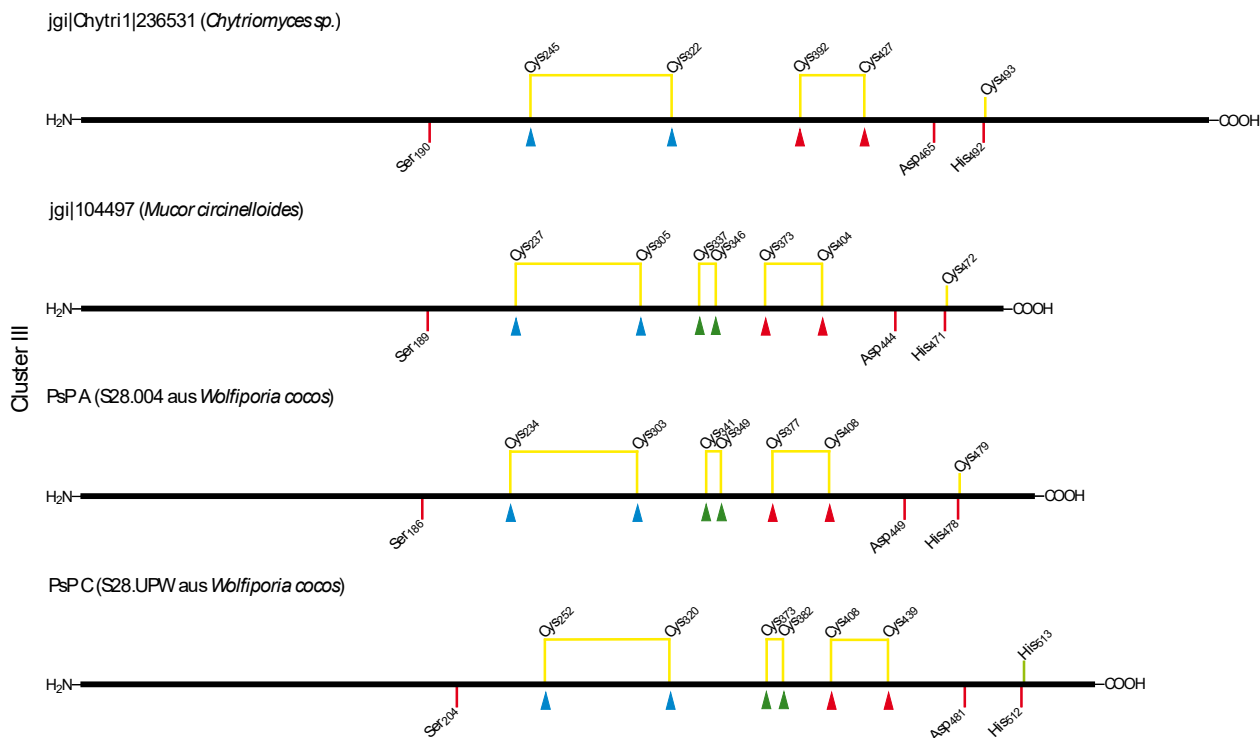


Abb. 4.14: Topologie der konservierten Cysteinreste und Disulfidbrücken der S28-Serinpeptidasen des Clusters III. Die Position der Disulfidbrücken, soweit nicht durch Strukturanalysen bekannt, wurde auf der Basis von SWISS-Modellen bestimmt. Die sie bildenden Cysteinreste (gelb) sowie die Aminosäuren der katalytischen Triade (rot) wurden mit ihrer Position angegeben. Die Auswahl der Darstellung der S28-Unterfamilien (stellvertretend durch einzelne Mitglieder repräsentiert), ist nicht vollständig, sondern zur Verdeutlichung bestimmter Sachverhalte angepasst, die für diese Arbeit relevant sind. Des Weiteren finden sich in der Graphik farbige markierte Pfeile unterhalb bestimmter Disulfidbrücken. Gleiche Farben kennzeichnen konservierte Disulfidbrücken.

Bei der Betrachtung des phylogenetischen Baums fällt auf, dass die pilzlichen Enzyme aus einem einzigen Vorläufer hervorgegangen sind. Für die verschiedenen pflanzlichen und tierischen S28-Peptidase lässt sich dagegen mehr als ein Ursprungsenzym in Einzellern finden, die in verschiedenen S28-Unterfamilien münden. Des Weiteren stehen die aus Pilzen stammenden S28-Peptidasen solchen aus Pflanzen und amöboiden Einzellern näher als tierischen. Dies verwundert, da Pilze mit Tieren enger verwandt sind als mit Pflanzen. Erklären lässt sich dies dadurch, dass sich die Familien der S28-Peptidasen, wie schon beschrieben, mit dem Aufkommen der Eukaryoten diversifiziert haben, bevor die ersten mehrzelligen Organismen auftraten. Dieser Vorgang lässt sich am Beispiel von *Monosiga brevicollis* noch genauer beschreiben. Wie Abbildung 4.11 zeigt, sind im

Protisten *Monosiga brevicollis* schon viele der auch bei vielzelligen Organismen bestehenden S28-Peptidaseunterfamilien vorhanden. Die verschiedenen Mehrzeller starteten wahrscheinlich mit mehreren S28-Peptidaseunterfamilien. Bei deren evolutionärer Entwicklung verschwanden einzelne S28-Unterfamilien zugunsten anderer. Die verbliebenen diversifizierten sich den Bedürfnissen der jeweiligen Organismengruppen entsprechend weiter aus.

Die pilzlichen S28-Peptidasen zeigen ein chronologisches Muster, das von Einzellern ausgehend über die primitiven Pilze (Chytriomyceten, Zygomyceten) zu den höher entwickelten verläuft (Ascomyceten, Basidiomyceten) (Abb. 4.11 und Abb. 4.14). EndoProTM steht in der Entwicklung vor der PsP A und der PsP B. Sie ist entwicklungsgeschichtlich älter. Sie steht den beiden Enzymen aber näher als die PsP C. Diese ist vor der EndoProTM positioniert. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die PsP C, wie später noch gezeigt werden wird, andere Aufgaben erfüllt als die extrazellulären Peptidasen PsP A, PsP B und EndoProTM. Äquivalent zur EndoProTM, die der PsP A bzw. PsP B gegenübersteht, gibt es auch S28-Peptidasen aus *Aspergillus niger* und anderen Ascomyceten, die der PsP C in ihrem Aufgabenfeld entsprechen (Abb. 4.16). Die Aufspaltung in S28-Peptidasen, die zur selben Gruppe gehören wie PsP A und B und in solche, die zur selben Gruppe wie PsP C gehören, muss spätestens in Ascomyceten stattgefunden haben. Die PsP C und verwandtschaftlich nahestehende Enzyme scheinen entwicklungsgeschichtlich vor der PsP A, PsP B und EndoProTM entstanden zu sein.

Neben den hier beschriebenen S28.004-Peptidasen und der noch nicht klassifizierten Gruppe um die PsP C existieren bei niederen Pilzen noch andere Disulfidbrückentopologien. Diese treten aber nur bei niederen Pilzen auf. Und dies auch nur auf Art-, maximal auf Gattungsebene. Sie genügen ihren Aufgaben, aber evolutionär betrachtet scheinen sie Sackgassen gewesen zu sein, die nicht die notwendige Flexibilität boten, um neue Entwicklungen zu ermöglichen.

Tab. 4.5: Gegenüberstellung von Identität und Ähnlichkeit für die einzelnen prolylspezifischen Peptidasen aus *Legionella cinclinatiensis* (WP_058464345.1), *Arabidopsis thaliana* (S28.A26), *Wolfiporia cocos* (PsP A und PsP C) sowie *Homo sapiens* (TSSP bzw. S28.003). Enzyme mit hoher phylogenetischer Nähe wurden in farbigen Blöcken zusammengefasst

	WP_058464345.1 <i>Legionella cinclinatiensis</i>	S28.A26 <i>Arabidopsis thaliana</i>	Identität [%]		
			PsP C <i>Wolfiporia cocos</i>	PsP A <i>Wolfiporia cocos</i>	TSSP <i>Homo sapiens</i>
WP_058464345.1 <i>Legionella cinclinatiensis</i>	ursprüngliche S28	34,3	24,3	24,1	26,7
Ähnlichkeit [%] S28.A26 <i>Arabidopsis thaliana</i>	61,0		30,8	25,3	31,5
PsP C <i>Wolfiporia cocos</i>	50,8	56,5		31,1	25,3
PsP A <i>Wolfiporia cocos</i>	55,4	51,9	57,4	S28 aus Pilzen	23,2
TSSP <i>Homo sapiens</i>	58,8	56,4	54,4	54,7	

Zu Cluster III findet sich keine nahstehende S28-Peptidase aus Protisten. Auch viele niedrigere Pilze verfügen über keine S28-Peptidasen, weil viele unter ihnen aufgrund der ökologischen Nische, die sie besetzen, ein reduziertes Genom besitzen (nichtfilamentöse, parasitäre Lebensweise). So kommt es, dass der Entwicklungsweg zwischen den Vorläufern der Pilze und den höheren Pilzen lückenhaft ist. Die Nähe des Clusters III zum sehr ursprünglichen Cluster II (Abb. 4.11) sowie seine Beschränkung auf Peptidasen pilzlichen Ursprungs lassen zumindest vermuten, dass sich die S28-Peptidasen der Pilze frühzeitig von den restlichen eukaryotischen S28-Peptidasen abgespalten haben. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Tab. 4.5 bestätigt. Die PsP C zeigt eine klare verwandtschaftliche Nähe zur S28.A26 aus dem Cluster II. Zur humanen TSSP, einem Vertreter des anderen ursprünglichen eukaryotischen Clusters, ist die verwandtschaftliche Nähe deutlich geringer. Das zeigt, dass der Ursprung der pilzlichen S28-Peptidasen im Cluster II liegt oder in einem gemeinsamen Vorläufer der Enzyme von Cluster II und III. Es lässt sich auch bestätigen, dass die PsP C vor der PsP A entstanden sein muss, da beide Peptidasen zueinander verwandt sind, die PsP A aber zu S28-Peptidase aus *Legionella cinclinatiensis* und zur S28.A26 nur eine geringe Verwandtschaft aufweist. Diese geringe Nähe zu den S28-Peptidasen der Cluster I und II sowie die vergleichsweise niedrige Identität bzw. Ähnlichkeit zwischen PsP A und PsP C, obwohl die eine aus der anderen hervorgegangen ist, lassen die Vermutung aufkommen, dass die PsP A größeren Veränderungen unterworfen war um den Anforderungen zu genügen, die sich aus ihren Aufgaben ergeben. Die S28.004-Peptidasen, zu denen die PsP A zählt, sind, soweit bekannt, die einzigen Enzyme der S28-Familie, die in die Umgebung sekretiert werden, also nicht durch die stabilen Verhältnisse, wie sie die Homöostase in den Zellen schafft, geschützt sind, sondern den sich wechselnden Bedingungen der Umwelt ausgesetzt sind.

Dies dürfte die S28.004-Peptidasen einem nicht zu unterschätzenden Evolutionsdruck ausgesetzt haben.

An Cluster IV soll nochmals ein Aspekt der S28-Peptidasen aufgenommen werden, der bereits angesprochen wurde (Abb. 4.11 und 4.15). Es zeigt sich an diesem, wie auch an den Clustern III und V, dass es in der Evolution dieser Enzyme immer wieder zu einem Wechsel der auf das Histidin der katalytischen Triade folgenden Aminosäure gekommen ist. Dieser Austausch von Histidin durch Cystein und umgekehrt unterstreicht die Bedeutung dieser beiden Aminosäuren für die Funktion dieser Enzymfamilie.

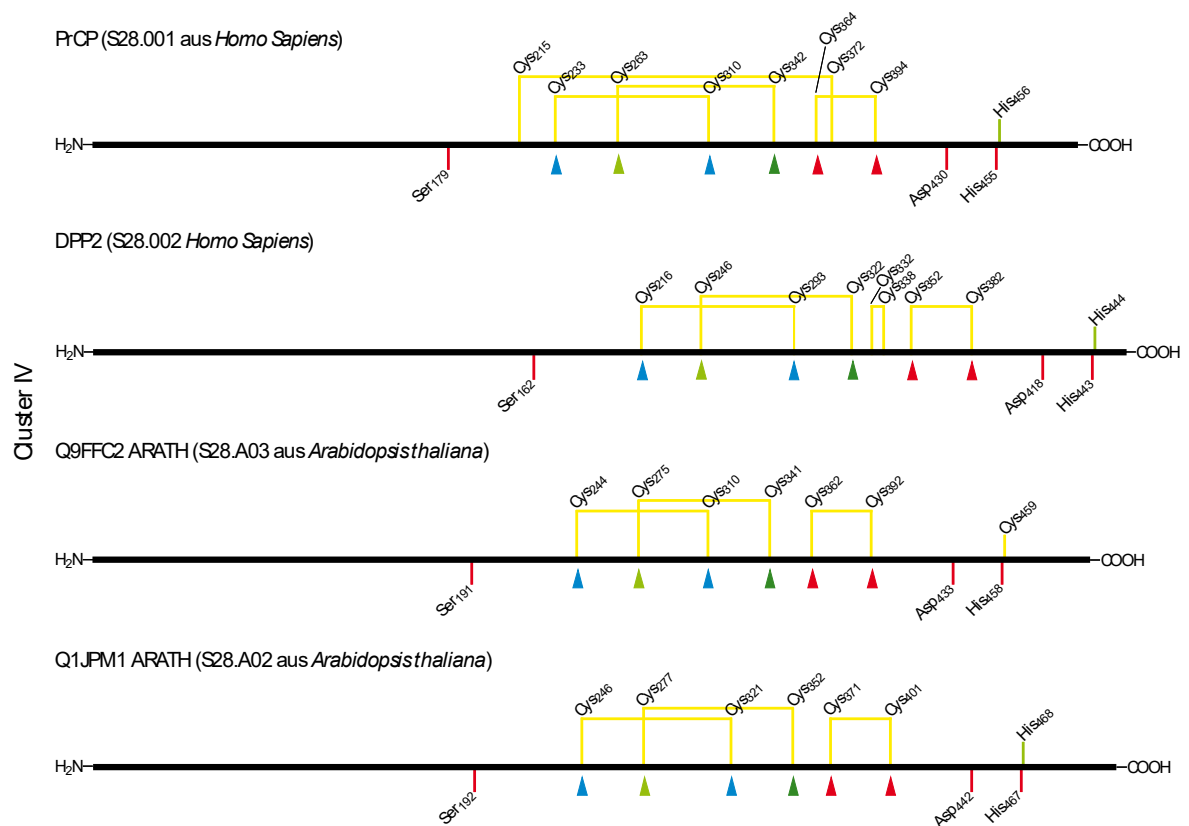


Abb. 4.15: Topologie der konservierten Cysteinreste und Disulfidbrücken der S28-Serinpeptidasen des Clusters IV. Die Position der Disulfidbrücken, soweit nicht durch Strukturanalysen bekannt, wurde auf der Basis von SWISS-Modellen bestimmt. Die sie bildenden Cysteinreste (gelb) sowie die Aminosäuren der katalytischen Triade (rot) wurden mit ihrer Position angegeben. Die Auswahl der Darstellung der S28-Unterfamilien (stellvertretend durch einzelne Mitglieder repräsentiert), ist nicht vollständig, sondern zur Verdeutlichung bestimmter Sachverhalte angepasst, die für diese Arbeit relevant sind. Des Weiteren finden sich in der Graphik farbig markierte Pfeile unterhalb bestimmter Disulfidbrücken. Gleiche Farben kennzeichnen konservierte Disulfidbrücken.

Da es sich bei phylogenetischen Bäumen um mathematische Konstrukte handelt, muss sichergestellt werden, dass die errechneten Strukturen mit der Datenlage übereinstimmen. Neben Techniken wie dem Bootstrapping kann auch, wie schon beschrieben, die Topologie der Schwefelbrücken für die Bestimmung verwandtschaftlicher Verhältnisse herangezogen werden. Die Topologie der Disulfidbrücken einiger S28-Peptidasen wurde

für mehrere Cluster dargestellt (Abb. 4.12 bis 4.15). Dabei wurde der Anfang immer mit einer aus einem Protozoen stammenden Peptidase gemacht. Die Übereinstimmung in den Topologien der Disulfidbrücken der einzelnen Cluster zeigt, dass der Baum in Abb. 4.11 mit der topologischen Analyse übereinstimmt. Für den phylogenetischen Baum in Abb. 4.16 wurde nicht so verfahren, da alle pilzlichen S28-Peptidasen auf eine einzige Topologie zurückgehen, die bei der Mehrheit der betrachteten Peptidasen auch so erhalten ist. Es gibt einige Variationen, die sich im Fehlen einer oder zweier Disulfidbrücken äußern, aber diese stellen eine Minorität dar. Augenfällig ist, dass die Topologie der pilzlichen Peptidasen im Vergleich zu denen aus anderen Organismengruppen erstaunlich einfach ist. Beschränkt auf die kritischen drei Stellen, die auch bei den meisten anderen S28-Peptidasen durch eine Disulfidbrücke verbunden sind und mit einer nicht überlappenden Topologie, scheinen die pilzlichen S28-Peptidasen schon von ihrer Struktur her ausgesprochen stabil zu sein. Diese Stabilität ist wahrscheinlich auf eine Ausgewogenheit in Abfolge und Zusammensetzung der Aminosäuresequenz zurückzuführen, denn die Sekundärstruktur ist bei allen S28-Peptidase sehr ähnlich. Bei einer nichtüberlappenden Topologie liegen die einzelnen Disulfidbrücken hintereinander wie auf einer Perlenkette. Nur die Schleifen, die von einer Disulfidbrücke zusammengehalten werden erfahren durch die zusätzliche kovalente Bindung eine Stabilisierung, die Bereiche dazwischen bleiben in ihrer Flexibilität unverändert. Bei einer überlappenden Topologie setzt die nachfolgende(n) Disulfidbrücke(n) in den Bereich zwischen den zwei Cysteinresten der vorangehenden Disulfidbrücke an. Dies führt zu kompliziert vernetzten und rigideren Proteinstrukturen, besonders, wenn die Disulfidbrücken größere Distanzen in der Sekundärstruktur überbrücken (Abb. 4.12 bis 4.15). Die intrinsische Stabilität der Struktur der pilzlichen S28-Peptidasen wird noch deutlicher, wenn man bedenkt, dass viele der pilzlichen S28-Peptidasen extrazellulär sind und wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt sind. Zudem können, wie oben schon erwähnt, bei manchen von ihnen die Disulfidbrücken, die die α -Helices und damit die Struktur des Enzyms zusammenhalten, fehlen. Umgekehrt zeigt die Vielzahl von Disulfidbrücken in anderen S28-Peptidasefamilien (z.B. Cluster II und V Abb. 4.11) und deren Rolle bei der Verhinderung von z.B. Proteinaggregation deutlich, wie unempfindlich die Struktur der pilzlichen S28-Peptidasen demgegenüber ist. Jene kommt nur mit dem Minimum an für diese Faltungsmuster notwendigen Disulfidbrücken aus, obwohl die extrazellulären Vertreter unter ihnen, wie die PsP A oder EndoProTM, wechselnden, zum Teil harschen, Umweltbedingungen ausgesetzt sind.

Für den zweiten Baum wurden die eingesetzten Aminosäuresequenzen nach folgenden Kriterien ausgewählt. Es wurden, wenn möglich, die S28-Sequenzen aus den im Screening eingesetzten Pilzen eingefügt (DBU-Bericht 13164). Für die Pilze, für die noch keine Daten aus Genomprojekten zur Verfügung standen, wurden, wenn möglich, solche aus nah verwandten Arten eingesetzt. Außerdem wurden S28-Sequenzen diverser Schimmelpilze einbezogen, von denen einige in der Lebensmittelveredlung eingesetzt werden. Hierzu gehörten *Botrytis cinerea* (Edelfäule bei Weinen), *Penicillium camemberti* und *Penicillium roqueforti* (Edelschimmel für Käseherstellung) sowie *Penicillium nalgiovense* (Salamireifung), *Aspergillus oryzae* (Miso und Sojasauce) und *Aspergillus niger* (Citronensäureproduktion) als Ursprungsorganismus der EndoProTM. Neben diesen wurden auch andere Schimmel aufgenommen (*Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus zonatus*, *Neurospora crassa* und *Rhizopus microsporus*). Es sollten zudem Sequenzen aus allen Abteilungen der Pilze einbezogen werden, um die Entwicklung nachzuzeichnen (Chytridiomyceten, Zygomyceten, Ascomyceten und Basidiomyceten). Bei den Basidiomyceten lag ein besonderes Augenmerk auf breiter Repräsentanz, um die PsP A, B und C möglichst genau einordnen zu können. Des Weiteren wurden als Quelle für die benötigten Sequenzen Pilze genommen, die in ihrem Genom eine möglichst große Zahl an S28-Peptidasen aufwiesen. Herangezogen wurden hierfür Pilze, die ein auffällig großes Genom hatten (~20.000 bis ~35.000 kbp). Hierbei muss erwähnt werden, dass Pilze mit kleinen Genomen wie zum Beispiel die Spalt- und Knosphefen, sowie viele Chytridiomyceten über gar keine S28-Peptidasen verfügen und deshalb, trotz ihrer Bedeutung für die Lebensmittelindustrie (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*), nicht im phylogenetischen Baum repräsentiert sind. S28-Peptidasen scheinen nicht essentiell notwendig für das Überleben der Pilze zu sein. Auf der anderen Seite sieht man daran, dass die Bedeutung der S28-Peptidasen mit zunehmenden Organisationsgrad der Spezies zunimmt.

Der Cluster I besteht aus Mitgliedern aller vier Pilzabteilungen und stellt damit den ursprünglichsten Cluster der pilzlichen S28-Peptidasen dar. Ein auf das katalytisch aktive Histidin folgendes Cystein kommt hier nicht vor. Das Histidin erscheint einzeln gefolgt von einer nichtkonservierten Aminosäure oder als His-His. Dies bestärkt die These, dass sich aus diesen die S28-Peptidasen des Clusters II entwickelt haben, die über ein konserviertes His-His verfügen. Zudem gibt es eine klare Tendenz bei höheren Pilzen (Asco- und Basidiomyceten), die weg von einer nichtkonservierten Aminosäure nach dem katalytisch aktiven Histidin hin zu einem konservierten (z.B. Histidin, Valin oder Cystein) an dieser Position führt. *Rhizopus microsporus* wie auch andere Zygomyceten haben im Cluster I A ihre einzige S28-Peptidase.

Es finden sich bei den aus Basidiomyceten stammenden S28-Peptidasen dieses Clusters (ID) auffällig viele Enzyme, in denen die S28-Peptidase eine Domäne eines größeren Proteins ist. Sie kann N- oder C-terminal auftreten und durch eine Transmembrandomäne verankert sein. Es handelt sich bei diesen Enzymen entweder um Fusionsproteine, wobei der Partner der S28-Peptidase immer ein intrazelluläres Enzym ist (z.B. tRNA-(Guanin-N7)-methyltransferase bei jgi|Polar1|567627, Proteinkinase bei gb|OBZ74058.1_Grifola frondosa) oder um eine Aminosäuresequenz, die eine coiled-coil-Struktur aufweist bzw. unstrukturiert ist (z.B. jgi|Polar1|569291, jgi|Polar1|656353). Wie schon beschrieben, können diese Proteinstrukturen mit anderen Proteinen bzw. Proteinkomplexen interagieren. Bei *Mycena galopus* findet sich ein Fusionsprotein aus zwei S28-Peptidasen, von denen das N-terminale eine Pseudopeptidase ist (jgi|Mycgal1|1966798). Pseudopeptidasen zeichnen sich durch das Fehlen einzelner strukturbildender Bereiche und/oder durch die Mutation einer oder mehrerer Aminosäuren der katalytischen Triade aus. Sie sind katalytisch inaktiv und übernehmen ganz neue Aufgaben, die mit der ursprünglichen Funktion nichts mehr gemein haben. Eine davon ist die Interaktion mit anderen Enzymen und die Modifikation von deren Eigenschaften (Reynolds und Fischer 2015). Viele dieser Enzyme haben kein Nuclear Export Signal (NES). Aus dem schon Besprochenen lässt sich schließen, dass alle Enzyme eines Subclusters, das ein intrazelluläres Enzym beinhaltet, intrazellulär sind.

Dies ist deshalb möglich, da Enzyme, die in einem Subcluster zusammengefasst sind, nahe miteinander verwandt sind. Die unterschiedlichen Anforderungen zwischen dem intrazellulären und dem extrazellulären Milieu sind so groß, dass es größerer Unterschiede in der Sequenz bedarf, damit ein Enzym in einem Milieu optimal funktionieren kann. Handelt es sich bei Enzymen des gleichen Subclusters um Enzyme der gleichen Spezies so sind es Isoenzyme. Sie weichen nur geringfügig voneinander ab, wie z.B. im pH- oder Temperaturoptimum. Bei Enzymen aus unterschiedlichen Arten kann davon ausgegangen werden, dass sie zueinander ortholog sind. In jedem Fall haben sie die gleiche Funktion.

Man kann davon ausgehen, dass sie bei der Proteinreifung eine Rolle spielen und damit wohl hochselektiv sind. Es ist eher unwahrscheinlich, dass sich in dieser Pilzgruppe industriell interessante Peptidasen im Sinne der in dieser Arbeit verfolgten Thematik finden lassen - zumindest was die S28-Peptidasen angeht.

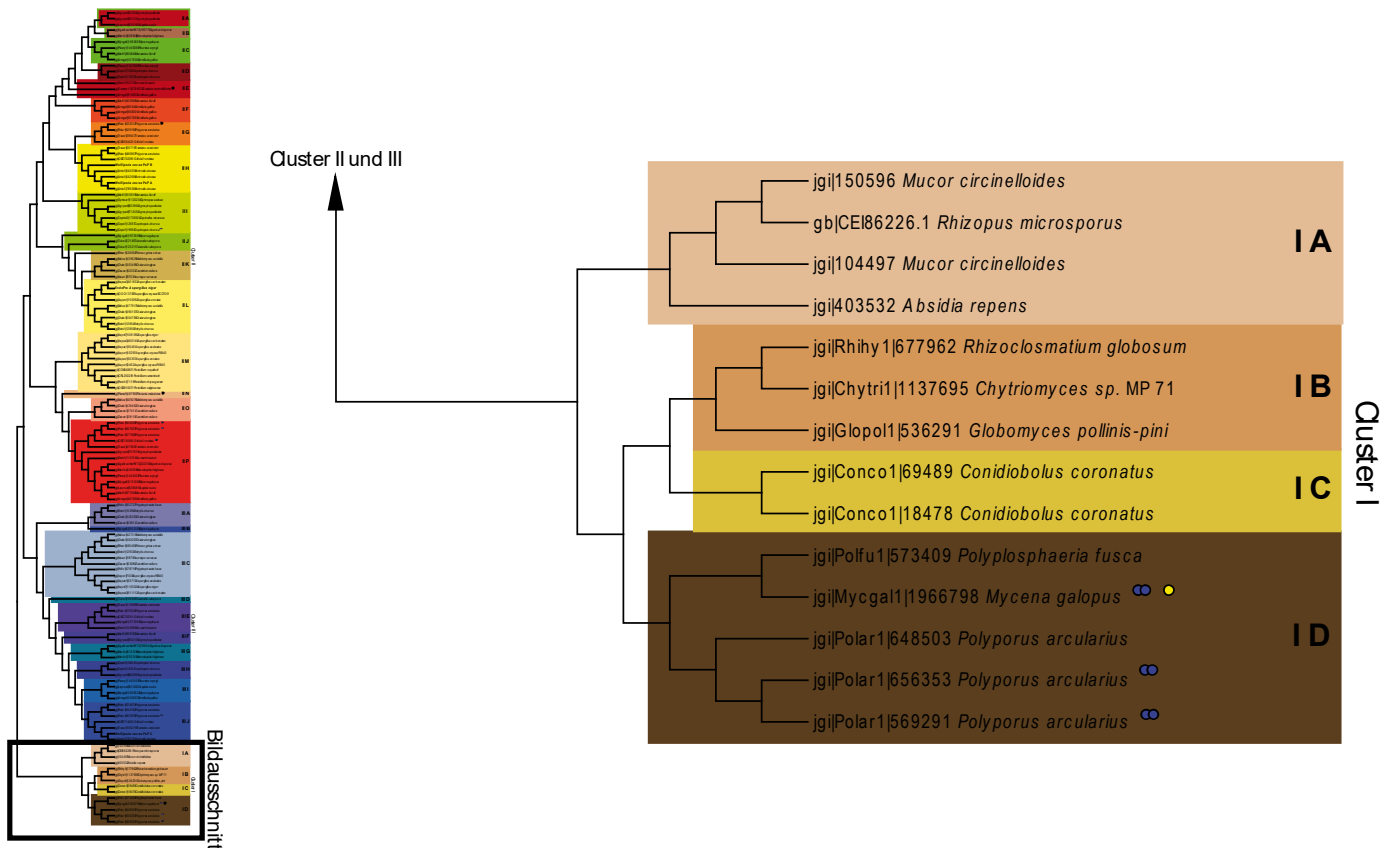
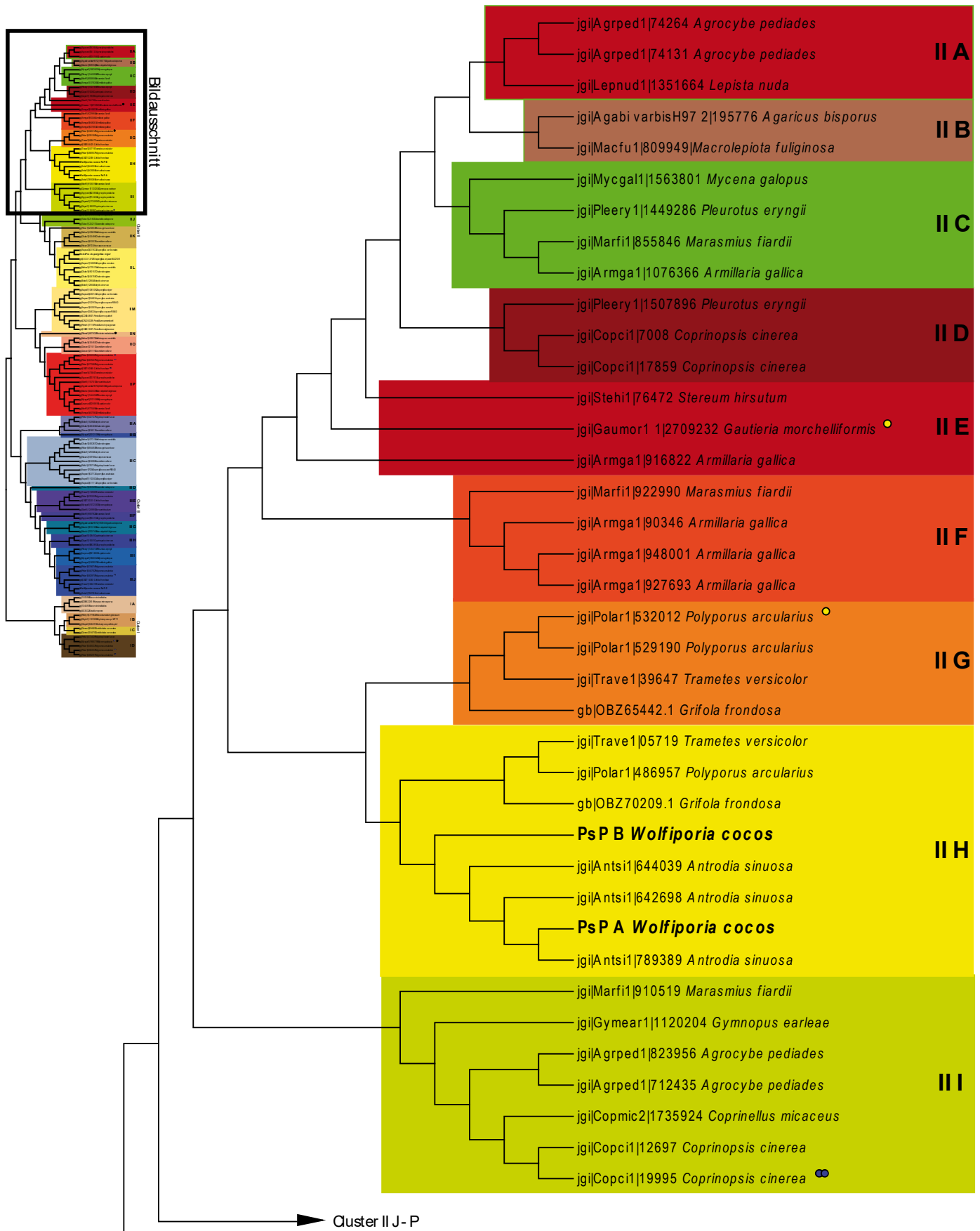


Abb. 4.16: Phylogenetische Einordnung der in dieser Arbeit betrachteten pilzlichen Peptidasen (PsP A, PsP B, PsP C und EndoPro™) im Verhältnis zu anderen Pilzen aus den Gruppen der Chytridio-, Zygo-, Asco- und Basidiomyceten. Der Baum wurde mit MEGA unter folgenden Einstellungen erstellt: statistische Methode Maximum Likelihood, Nearest-Neighbor-Interchange (NNI); Substitutionsmodell WAG; Bootstrefaktor 500. Der gelbe Punkt hinter einem Artnamen markiert ein Pseudoenzym. Zwei blaue Punkte bezeichnen eine S28-Peptidase, die kein unabhängiges Enzym, sondern eine Domäne in einem Enzym ist. Des Weiteren sind Cluster mit Basidiomyceten in dunklen bzw. satten Farben dargestellt, während Cluster mit Spezies aus allen anderen Gruppen in hellen Farben abgebildet sind

Cluster II enthält PsP A, PsP B und EndoProTM. Alle Enzyme dieses Clusters besitzen das konservierte Cystein nach dem Histidin der katalytischen Triade. Cluster II besteht ausschließlich aus S28-Peptidasen von Asco- und Basidiomyceten und bestätigt damit den Befund, dass die Ausdifferenzierung der pilzlichen S28-Peptidasen frühestens bei den Ascomyceten begann.

Bei der phylogenetischen Einordnung zeigt sich die schon besprochene große Nähe zwischen PsP A und PsP B, die beide im Subcluster II H relativ nah beieinander liegen. Dies spricht für die Vermutung, dass beide Isoenzyme sind, die sich bei sonst gleicher Funktion z.B. im pH-Optimum unterscheiden. PsP A und EndoProTM sind andererseits in getrennten Subclustern zu finden. Beide Enzyme sind nicht ortholog zueinander, sondern aus getrennten Entwicklungslinien hervorgegangen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Substratspezifität der PsP A sich in gewisser Weise von der der EndoProTM unterscheidet. Hierbei ist die Präferenz für die dem Prolin vorangehenden bzw. nachfolgenden Aminosäurereste entscheidend. Im Idealfall ist diese bei der PsP A unspezifischer als bei der EndoProTM und ermöglicht so einen vollständigeren und schnelleren Abbau des Substrats. Auch wenn dies nicht der Fall sein sollte, könnte sich die Substratspezifität der PsP A doch etwas von der der EndoProTM unterscheiden. In diesem Fall wäre die PsP A ein Alternativprodukt, das auch gemeinsam mit der EndoProTM eingesetzt und durch diese ergänzt werden könnte.

Abschließend soll noch eine Beobachtung besprochen werden, die das Screening betrifft, aus dem *Wolfiporia cocos* hervorgegangen ist. Das Screening umfasste die Spezies *Agrocybe aegerita*^g, *Clitocybe illudens*^a, *Collybia fusipes*^a, *Grifola frondosa*^{a, g}, *Hypsizygus marmoreus*, *Lentinellus cochleatus*^a, *Lentinula edodes*, *Lepista nuda*^g, *Mycetinis scorodoni*^g, *Pleurotus eryngii*^g, *Pleurotus sapidus*^{gv}, *Polyporus sp.*^{a, gv}, *Sparassis crispa*, *Trametes versicolor*^{a, g}, *Wolfiporia cocos*^{a, g} (Spezies die Abbau zeigten wurden mit ^a markiert, die, zu denen es ein sequenziertes Genom gibt, mit ^g und die, bei denen zumindest ein naher Verwandter komplett sequenziert wurde, mit ^{gv}; siehe Abschlussbericht DBU13164). Die Pilze, die im Screening erfolgreich waren, hatten, soweit Daten aus Genomprojekten zur Verfügung standen, alle mindestens ein Enzym im Subcluster II H. Jene Pilze, die aus dem Screening herausgefallen sind, haben genau in diesem Subcluster kein Enzym. Der Subcluster II H enthält, zumindest was Basidiomyceten betrifft, Peptidasen, die besonders gut für den Abbau von Gluten geeignet sind.



Fortsetzung Abb. 4.16

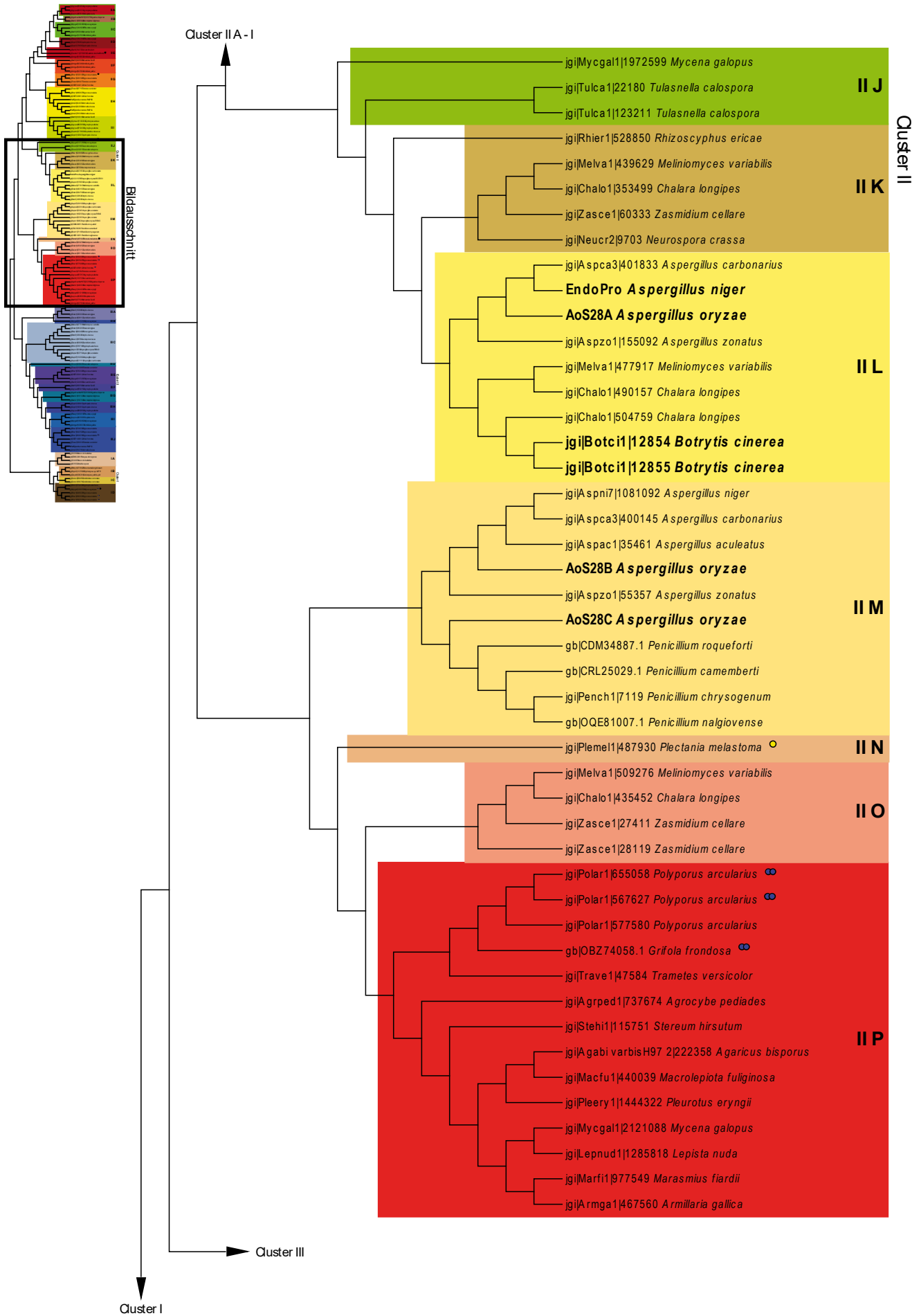
die ein hohes allergenes Potential haben, gehäuft Pro-Gly und Pro-Thr Schnittstellen vor. An dieser Stelle wäre interessant, ob eine der beiden Peptidasen fähig ist diese zu hydrolysieren.

Die Subcluster II H, II L und II M sind die einzigen Subcluster, die nachweislich Peptidasen enthalten, die prolinreiche Bereiche in Gluten hydrolysieren. Die vielen Subcluster deren peptidolytischen Eigenschaften noch unbekannt sind und die Subcluster, die Peptidasen von Pilzen enthalten, die beim Screening des DBU-Projekt 13164 mäßig oder schlecht abgeschnitten haben, zeigen, dass viele S28-Peptidasen eine Substratspezifität aufweisen, in dessen Spektrum die Prolin beinhaltenden Schnittstellen von Gluten gar nicht oder nur am Rande enthalten sind. Zumal der hier diskutierte phylogenetische Baum auf die am Anfang dieses Abschnitts erwähnten Pilze beschränkt ist. Vorversuche mit mehr Spezies und größerer Diversität auf Gattungsebene zeigten eine große Vielfalt an Subclustern, was in Anbetracht der Rolle, die S28-Peptidasen spielen, nicht verwundert. Es lässt sich daraus abschätzen, dass das Potential, S28-Peptidasen für den Abbau prolinreicher Proteine zu finden, deren Substratspezifität sich von der die PsP A aufweist unterscheidet, hoch ist. Aus dem Baum lässt sich auch erkennen, welche Subcluster noch nicht untersucht und damit welche Gattungen für Screenings mit anderen prolinreichen Substraten vielversprechend sein könnten.

Subcluster II E, II G, II I und II P beinhalten Peptidasen, die entweder Domäne eines größeren Proteins oder Pseudopeptidasen sind. Wie schon erörtert ist das ein Hinweis darauf, dass die Mitglieder dieser Subcluster im Zellinneren vorkommen. Der Cluster II enthält scheinbar ausschließlich Endopeptidasen, während der Cluster III Exopeptidasen enthält. Dies ist der markanteste Unterschied zwischen beiden Clustern. Innerhalb der beiden Cluster können einzelne Subcluster intra- oder extrazellulär sein. Der Subclusters II P weicht etwas von der Regel, das bei Peptidasen des Clusters II ein Cystein auf das katalytisch aktive Histidin folgt, ab. Als verbindendes Merkmal haben die Peptidasen dieses Subclusters ein konserviertes Valin nach dem Histidin der katalytischen Triade.

Tab. 4.6: Gegenüberstellung von Identität und Ähnlichkeit für die einzelnen prolylspezifischen Peptidasen aus *Aspergillus niger* (EndoPro™) und denen aus einigen ausgewählten Schimmelpilzen (*Aspergillus oryzae*, *Penicillium nalgiovense* und *Botrytis cinerea*). Enzyme mit hoher phylogenetischer Nähe wurden in Blöcken (hellblau) zusammengefasst

		Identität [%]					
		EndoPro™ <i>Aspergillus niger</i>	jgi Botci1 12854 <i>Botrytis cinerea</i>	jgi Botci1 12855 <i>Botrytis cinerea</i>	AoS28B <i>Aspergillus oryzae</i>	AoS28C <i>Aspergillus oryzae</i>	gb QQE81007.1 <i>Penicillium nalgiovense</i>
Ähnlichkeit [%]	EndoPro™ <i>Aspergillus niger</i>		56	59	26	30	30
	jgi Botci1 12854 <i>Botrytis cinerea</i>	73		98	28	32	33
	jgi Botci1 12855 <i>Botrytis cinerea</i>	80	99	SubclusterII L	29	34	26
	AoS28B <i>Aspergillus oryzae</i>	56	61	64	54		56
	AoS28C <i>Aspergillus oryzae</i>	55	63	63	81		60
	gb QQE81007.1 <i>Penicillium nalgiovense</i>	55	64	58	85	84	SubclusterII M



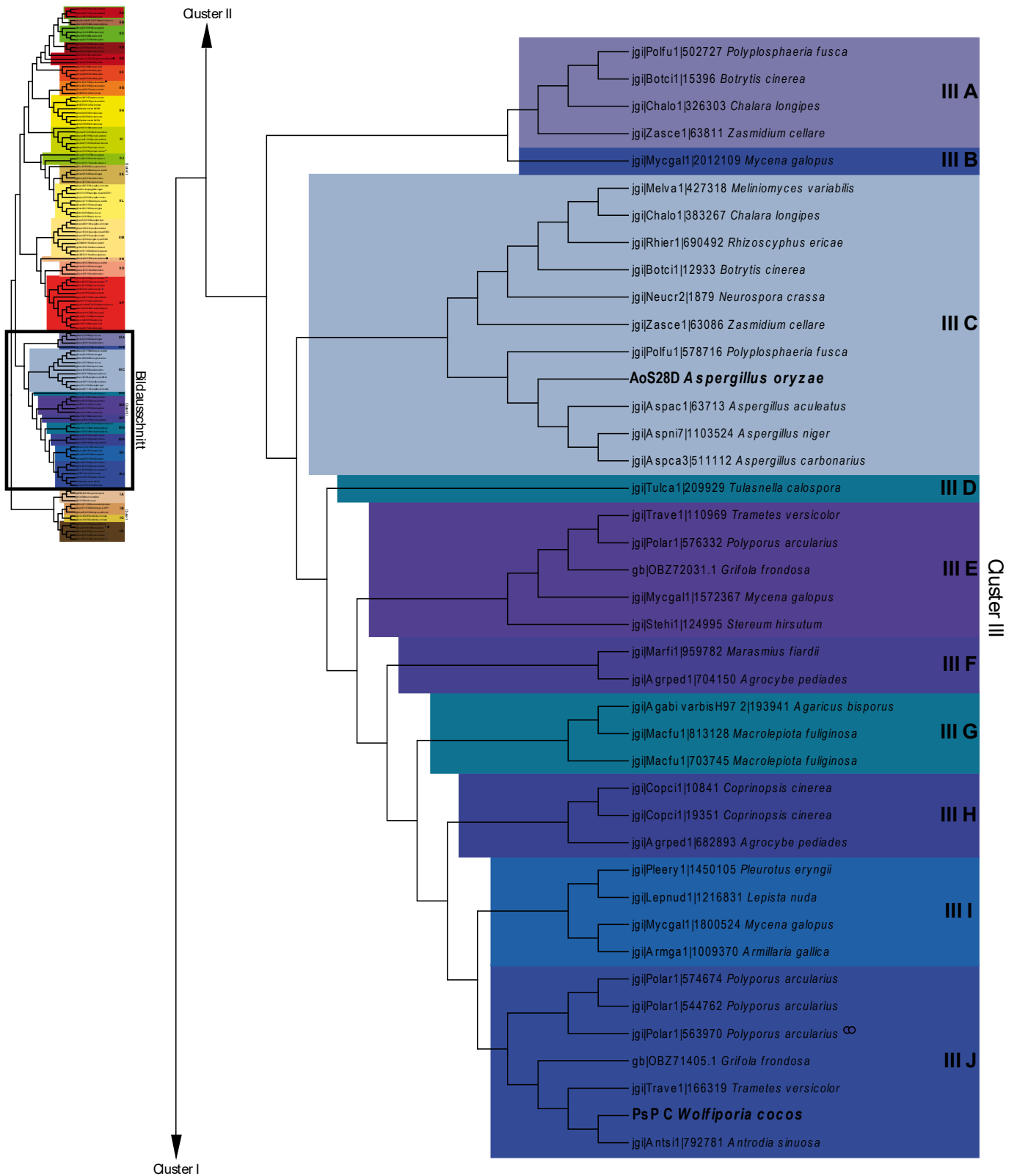
Fortsetzung Abb. 4.16

Cluster III enthält wie Cluster II nur S28-Peptidasen aus Asco- und Basidiomyceten, was zeigt, dass es bei den Chytridio- und den Zygomyceten noch nicht zu einer Ausdifferenzierung der S28-Peptidasen gekommen ist. Die auf das katalytische Histidin folgende Aminosäure ist ein weiteres Histidin. Wie schon bei den Clustern I und II, lassen sich auch beim Cluster III Fusionsproteine finden. Im Subcluster III J, in dem auch die PsP C beheimatet ist, liegt ein solches (jgi|Polar1|563970). Hierbei handelt es sich um ein intrazelluläres Enzym. Dies ist ein weiterer Hinweis für die Annahme, dass die PsP C ein intrazelluläres Enzym ist. Zudem wurde für jgi|Aspor1|7036 aus *Aspergillus oryzae* festgestellt, dass es in seiner Funktion ganz ähnlich arbeitet wie die humane lysosomale Peptidase (Salamin *et al.* 2017). Es handelt sich hierbei um eine Exopeptidase. Versuche mit 17 verschiedenen Peptiden zeigten, dass AoS28D, so die Benennung aus der Publikation, Phenylalanin-, Isoleucin-, Threonin-, Glutamin-, Glutaminsäure-, Arginin- und Lysinreste C-terminal nach Prolin abspaltet. Damit wird das Spektrum von aromatischen über hydrophobe und polare bis zu den geladenen Aminosäuren abgedeckt. Prolin-Prolinbindungen werden nicht gespalten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nur Peptide mit einem C-Terminus der Konstellation Pro-Xaa von der Peptidase hydrolysiert werden können, während auf den Prolinrest folgende Di- oder Tripeptide (Pro-Xaa-Xaa und Pro-Xaa-Xaa-Xaa) nicht mehr hydrolysiert wurden. Die Annahme von Salamin *et al.* 2017, dass die AoS28D ortholog zu der humanen lysosomalen Carboxypeptidase ist, trifft aus den beschriebenen Gründen nicht zu. Die pilzlichen S28-Peptidasen sind alle, wie schon die Topologie der Disulfidbrücken zeigt (Abb. 4.14), aus einer anderen Entwicklungslinie hervorgegangen. Es handelt sich eher um eine konvergente Entwicklung, die auf ähnlichen Rahmenbedingungen und Anforderungen beruht. In Tab. 4.7 ist dieser Sachverhalt dargestellt. Die Verwandtschaft der AoS28D (jgi|Aspor1|7036) zur PsP C geht auf die gemeinsame Funktion als Exopeptidase zurück, die zur PsP A auf den gemeinsamen Ursprung aus Basidiomyceten. Diese Überschneidung erklärt sich daraus, dass es sich bei der AoS28D und der PsP C um zueinander paraloge Enzyme handelt, die sich aus separaten Entwicklungslinien entwickelt haben. Das lässt sich auch am phylogenetischen Baum erkennen, in dem die Subcluster III C und III J, welche die AoS28D bzw. die PsP C beinhalten, ausschließlich aus Asco- bzw. Basidiomyceten bestehen und der nächstverwandte Subcluster keine Mitglieder der jeweils anderen Gruppe enthält. Dennoch lässt der Umstand, dass die beiden Exopeptidasen näher miteinander verwandt sind als PsP A und PsP C untereinander (Tab. 4.7), darauf schließen, dass sie einen gemeinsamen Vorläufer haben, der vor der Aufspaltung der Entwicklungslinien der Asco- und Basidiomyceten lag.

Tab. 4.7: Gegenüberstellung der phylogenetischen Identität und Ähnlichkeit für die prolylspezifischen Peptidasen EndoPro™ aus *Aspergillus niger*, AoS28D (jgi|Aspor1|7036) aus *Aspergillus oryzae*, *Wolfiporia cocos* (PsP A und PsP C) und der humanen PrCP und der DPP2. Verwandtschaftlich sich nahestehende Peptidasen sind farbig markiert. Es zeigte sich, dass die humanen S28-Peptidasen nur zueinander näher verwandt sind (roter Kasten) und nur eine geringe Verwandtschaft zu den S28-Peptidasen pilzlichen Ursprungs besteht (oranger Kasten). Die vier betrachteten pilzlichen S28-Peptidasen bilden einen eigenen Kasten, der von den S28-Peptidasen tierischen Ursprungs separiert ist. Dieser bildet bedingt durch nähere Verwandtschaft drei weitere Untergruppen. Sowohl zwischen den Endopeptidasen PsP A und EndoPro™ (hellblauer Kasten) als auch zwischen den Exopeptidasen PsP C und AoS28D (hellorange) besteht eine größere verwandtschaftliche Nähe. Des Weiteren bilden die zwei aus *Wolfiporia cocos* stammenden Peptidasen PsP A und PsP C (violetter Kasten) eine weitere durch Verwandtschaft verbundene Gruppe. Auffällig ist dabei, dass sowohl die Verwandtschaft zwischen den Endo- als auch zwischen den Exopeptidasen größer ist als die zwischen PsP A und PsP C aus *Wolfiporia cocos*. Dies weist darauf hin, dass sowohl die Endo- als auch die Exopeptidasen sich aus einem gemeinsamen Vorläuferenzym entwickelt haben, dessen Ursprung vor der Trennung in die Linie der Asco- und Basidiomyceten lag. Zudem kann gezeigt werden, dass die pilzlichen Exopeptidasen sich trotz ähnlicher Funktion und Aufbau unabhängig von den humanen Exopeptidasen DPP2 und PrCP entwickelt haben.

		Identität [%]						
		EndoPro™ <i>Aspergillus niger</i>	PsP A <i>Wolfiporia cocos</i>	PsP C <i>Wolfiporia cocos</i>	AoS28D <i>Aspergillus oryzae</i>	PrCP <i>Homo sapiens</i>	DPP2 <i>Homo sapiens</i>	
Ähnlichkeit [%]	EndoPro™ <i>Aspergillus niger</i>	Endopeptidasen		pilzliche S28-Peptidasen				
	PsP A <i>Wolfiporia cocos</i>	41		28	26	24	25	
	PsP C <i>Wolfiporia cocos</i>	68		31	27	24	22	
	AoS28D <i>Aspergillus oryzae</i>	57	57	<i>Wolfiporia cocos</i>	35	25	23	
	PrCP <i>Homo sapiens</i>	59	55	59	Exopeptidasen		22	23
	DPP2 <i>Homo sapiens</i>	51	51	47	51	41		
		49	49	48	52	68		
						tierische S28-Peptidasen		

Die Autoren möchten AoS28D als eine, den Endopeptidasen AoS28A und AoS28B, nachgeschaltete Exopeptidase einsetzen. Allerdings wurde bei AoS28D im Gegensatz zu AoS28A, AoS28B und AoS28C kein *nuclear export signal* gefunden. Es handelt sich also wahrscheinlich um eine intrazelluläre Peptidase. Dies würde die Frage aufwerfen, ob sie im Hinblick auf die Stabilität für den geplanten Einsatz geeignet ist. Außerdem liegt mit Enzymen wie den Prolylaminopeptidasen (PAP) schon prolylspezifische Exopeptidasen vor, die für industrielle Anwendungen geeignet sind. Diese wurden sowohl aus *Aspergillus niger* (Basten *et al.* 2005) als auch aus *Aspergillus oryzae* (Matsushita-Morita *et al.* 2009, Ding *et al.* 2014 und Wang *et al.* 2017) isoliert. Festzuhalten ist, dass es sich bei allen S28-Peptidasen des Clusters I wahrscheinlich um Exopeptidasen handelt.



4.2 Lignocelluloseprojekt

4.2.1 Holzabbau

Lignin ist neben Cellulose und Hemicellulose die dritte strukturbildende Komponente in verholzten Pflanzenteilen. Im Gegensatz zu den beiden anderen Polymeren, die durch eine Kondensationsreaktion entstehen, ist Lignin das Produkt eines radikalischen Prozesses. Die drei Alkohole p-Coumarylalkohol, p-Coniferylalkohol, und p-Sinapylalkohol (Abb. 4.17) werden durch pflanzeneigene Peroxidasen (Klasse III) oder Laccasen zu Radikalen umgewandelt, die sich in verschiedener Weise in das schon bestehende Ligningerüst einfügen.

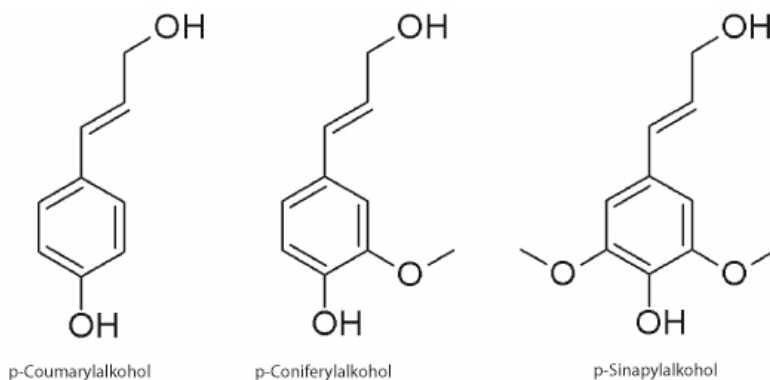


Abb. 4.17: Die drei Grundbausteine des Lignins, die durch eine radikalische Aktivierung in Lignin eingebaut werden: p-Coumarylalkohol, p-Coniferylalkohol und p-Sinapylalkohol

Der dabei entstehende polycyclische Aufbau gibt dem Lignin seine braune Farbe. Durch die zufällige Verknüpfung der einzelnen Untereinheiten wird ein in seinem Aufbau sehr komplexes Makromolekül gebildet, das mit den anderen Komponenten des Holzes kovalent verknüpft ist. Diese Komplexität und die Resonanzstabilisierung des Lignins verleihen der Pflanze einen guten Schutz gegen Schadorganismen und behindern so den Abbau. Lignin erfüllt im Verbundwerkstoff Holz die Aufgabe der druckstabilen Komponente, während Cellulose und Hemicellulose die zugstabilen Bestandteile bilden.

Bei der Zersetzung von Holz durch Pilze treten zwei Schadbilder auf. Pilze, die die Cellulosen und Hemicellulosen abbauen, erzeugen Braunfäule. Sie ist charakterisiert durch die braune Färbung und eine spröde Beschaffenheit durch die auch der typische Würfelbruch entsteht. Hierbei brechen die Überreste des Abbaus sowohl parallel als auch quer zu der Faserung des Holzes. Weißfäule hat eine weiche, faserige Beschaffenheit, da hier das Lignin zerstört wurde. Wie der Name es sagt, hat Weißfäule eine helle Färbung (Abb. 4.18).



Braunfäule



Weißfäule



Abb. 4.18: Von Braunfäule befallene Eiche (Wartha, Lausitz; Bild des Autors) zeigt die namensgebende Färbung und den charakteristischen Würfelbruch. Die Weißfäule, hier an befallenen Eschenholz (Bergwerkswald, Gießen; Bild des Autors), zeigt eine mürbe, faserige Konsistenz

Seine für die Pflanze vorteilhaften Eigenschaften erweisen sich bei seiner Nutzung bzw. Beseitigung als hinderlich. Lignin kann in Form von Organosolv als Beischlagstoff in Zement und Farben eingesetzt werden. Beim Organosolv-Verfahren wird das Lignin mithilfe einer 140 bis 210°C heißen Mischung eines organischen Lösungsmittels mit Wasser aus Holz extrahiert. Weitere Anwendungen von Organosolv wären z.B. der Einsatz in Phenolharzersatzstoffen, die Erzeugung von Synthesegas oder die Verbrennung zur Energiegewinnung. Eine direkte Spaltung in einheitliche Monomere und deren direkte Nutzung in Synthese- oder Fermentationsprozessen wie zum Beispiel bei Cellulose, ist bis jetzt nicht möglich.

Eine möglichst selektive und vollständige Abtrennung von Lignin aus den übrigen Holzbestandteilen ist also wünschenswert.

4.2.2 Laccasen

Laccasen sind Enzyme, die die direkte Oxidation von phenolischen Komponenten durch Sauerstoff bewerkstelligen (*benzenediol:oxygen oxidoreductase*, EC 1.10.3.2). Sie beinhalten in der Regel vier Kupferatome, die in Clustern organisiert sind. Bei manchen Laccasen fehlen einige oder auch alle Kupferatome, bzw. sind zum Teil durch andere Metallionen wie Mangan ersetzt (Leontievsky *et al.* 1997a; Leontievsky *et al.* 1997b; Palmieri *et al.* 1997; Zhao *et al.* 2012).

Laccasen sind in Pilzen für die unterschiedlichsten physiologischen Reaktionen von Nöten, wie zum Beispiel Entwicklungsprozesse, Entgiftung, die Bildung von Melaninen und auch beim Abbau von Lignin. Das erklärt auch, warum man sie im Gegensatz zu den Peroxidasen sowohl extrazellulär als auch intrazellulär findet. Sie haben ein Redoxpotential von ungefähr 400 bis 800 mV (Reinhammar 1972; Solomon *et al.* 1996; Xu 1996; Xu *et al.* 2000; Xu *et al.* 1996), was es ihnen ermöglicht, Substrate wie z.B. p-Dihydroxyphenole, Diphenole, Aryldiamine oder Aminophenole abzubauen. Indirekt können auch andere Substrate abgebaut werden. Hierbei wird durch Malon- oder Oxalsäure chelatisiertes Mn^{2+} zu Mn^{3+} oxidiert. Dieses dient dann als Mediator in einem sogenannten Laccase Mediator Systemen (LMS) (Bourbonnais und Paice 1990; Crestini *et al.* 2003; Eggert *et al.* 1997).

4.2.3 Peroxidasen

Peroxidasen sind eine große Gruppe von strukturell wie mechanistisch sehr unterschiedlichen Enzymen, die mit H_2O_2 bzw. organischen Peroxiden (R-OOH) organische Substrate oxidieren können. Die für den Abbau von Lignin verantwortlichen pilzlichen Enzyme Ligninperoxidase (LigP, EC 1.11.1.14), Manganperoxidase (MnP,

EC 1.11.1.13) und versatile Peroxidase (VP, EC 1.11.1.16) sind in die Superfamilie der pflanzlichen Peroxidasen, bzw. nach neuerer Bezeichnung der nichttierischen Peroxidasen eingeordnet (Welinder 1992). Sie gehören hier in die Klasse II (sekretierte pilzliche Eisenhämperoxidasen). Primär werden sie durch Helices aufgebaut. Als prosthetische Gruppe dient ein Protoporphyrin IX, das über vier Histidinreste mit dem Proteinkörper verbunden ist. Ein Histidinrest stabilisiert das Hämeisen an der proximalen Seite, während an der distalen Seite ein Wassermolekül an das Eisenatom gebunden ist. Zudem sind sowohl ein proximales als auch ein distales Histidin sowie ein distales Arginin in die katalytische Reaktion involviert. Zwei Ca^{2+} Ionen sowie mindestens vier Disulfidbrücken stabilisieren das Protein (Everse *et al.* 1991; Kunishima *et al.* 1994; Petersen *et al.* 1994; Piontek *et al.* 1993; Poulos *et al.* 1993; Sundaramoorthy *et al.* 1994).

4.2.4 Cellolytische Enzyme

Cellulose wird in einem dreistufigen Prozess zu Glucose umgewandelt. Die Spaltung des Cellulosemoleküls beginnt mit der Endo-1,4- β -glucanase (Endocellulase, EC 3.2.1.4), die kleinere Cellulosefragmente erzeugt, gefolgt von der Cellobiohydrolase (Exocellulase, EC 3.2.1.91), die diese Fragmente zu Cellobiose hydrolysiert. Der Prozess endet bei der β -Glucosidase (EC 3.2.1.21), die als letzten Schritt Cellobiose in zwei Glucosemoleküle spaltet.

Endoglucanasen (Endo-1,4- β -glucanase) sind monomere Enzyme. Ihr pH-Optimum, das zwischen pH 4,0 und 5,0 liegt, ist vergleichbar mit dem des Umgebungs-pHs von durch Pilze besiedeltem Holz (Suzuki *et al.* 2006; Valásková und Baldrian 2006). Die Glycosylierung der Enzyme ist fehlend bis schwach (maximal 12%). Die Mehrzahl aller Endoglucanasen kann nur im amorphen Bereich der Cellulose spalten. Zur Cellulose spaltenden Domäne kommt, durch einen Linker verbunden, häufig eine Bindungsdomäne (*cellulose-binding domain*, CBD), die bei kleinen Endoglucanasen fehlen kann (Henriksson *et al.* 1999). Diese kleinen Endoglucanasen sorgen für ein Aufquellen der amorphen Bereiche und schaffen so den Zugang für die Größeren, mit Bindungsdomäne ausgestatteten Endo-1,4- β -glucanasen (Henriksson *et al.* 1999). Zwischen den Endocellulasen und den nachfolgend beschriebenen Exocellulasen findet ein Zusammenspiel statt, das als endo-exo-Synergismus bezeichnet wird.

Die Exocellulasen sind den Endocellulasen, was ihren monomeren Charakter, den Aufbau der Domänen und den Glycosylierungsgrad angeht, sehr ähnlich (Eriksson und Pettersson 1975a, 1975b; Hamada *et al.* 1999; Schmidhalter und Canevascini 1993). Der Unterschied liegt hauptsächlich in der Präferenz für den Bereich der kristallinen Cellulose, dem sequenziellen Abbau der Cellulose in Cellobioseeinheiten und eine je nach Exocellulase bevorzugte Abbaurichtung. Hier werden die Cellobiohydrolase I (CBH I), die die Cellulose vom reduzierenden Ende her spaltet und die Cellobiohydrolase II (CBH II), die vom nichtreduzierenden Ende her spaltet, unterschieden (Lynd *et al.* 2002). Beide wirken in einem exo-exo-Synergismus zusammen (Lynd *et al.* 2002). Dies erklärt auch die Vielzahl an Exocellulasen, die in den Genomen der holzabbauenden Pilze vorkommen (Uzcategui *et al.* 1991). Exocellulasen werden durch Cellobiose kompetitiv inhibiert.

β -Glucosidasen sind in ihrem Aufbau sehr unterschiedlich. Ihr Molekulargewicht schwankt im Bereich von 35 und 640 kDa, wobei es monomere und multimere Typen gibt. Sie kommen extrazellulär, membrangebunden oder intrazellulär vor. Häufig verfügt ein Pilz über mehrere der genannten Typen. Der Grund dafür liegt in der weiten Verbreitung von Cellobiose. Bei Braunfäuleerregern kommen unspezifische β -Glucosidasen vor, die auch Xylose, Mannose und Galactose vom entsprechenden Oligomer abspalten können. β -Glucosidasen werden durch Glucose, Glucono-1,5-lacton und Cellobionolacton kompetitiv gehemmt.

4.2.5 Vorkulturmedien

Es zeigte sich bei den Vorkulturmedien, dass das Wachstum der Pilze auf MEA in den meisten Fällen weiter fortgeschritten war als auf SNL-Medium (Tab. 3.6). Beide Medien sind aus der Literatur bekannt. Es ist dennoch anzunehmen, dass es bei den Medien für die Anzucht von Basidiomyceten noch Optimierungspotential gibt. Zum einen werden von der DSMZ für einzelne Basidiomyceten Medien angegeben, die auf Auszügen aus Früchten, Blättern und Gemüse (z.B. Cherry Agar, DSMZ Medium 277; Tea Fungus Medium, DSMZ Medium 268; Potato Dextrose Agar, DSMZ Medium 129) basieren. Diese wären aber für den großtechnischen Einsatz zu teuer, was auch für den Malzextrakt gilt, der erst durch den Prozess der Mälzung hergestellt werden muss. Zudem ist von Schimmelkulturen bekannt, dass diese beim dauerhaften Einsatz von MEA mit der Zeit degenerieren, was mit einer veränderten Morphologie des Myzels und der Bildung von verkümmerten Konidien bzw. deren völligem Fehlen einhergeht (*Mycelia sterilia*) (mündliche Mitteilung Walter Gams). Verbunden ist dies mit den bei der Herstellung des Malzextrakt-Mediums entstehenden Nebenprodukten (z.B. aus der Maillardreaktion, Furfurale). Für den industriellen Einsatz, bei dem es auf Stammstabilität für gleichbleibende Produktqualität und -quantität ankommt, ist dies nicht tragbar. Um Stämme stabil zu halten, wird hier stattdessen Hafermehlagar (OA) empfohlen (Crous und Cock, Arthur W. A. M. de 2009).

Die Eignung dieses Substrats für Flüssigmedien ist aber aufgrund der gelierenden Eigenschaften der Stärke fraglich. Auch ist bekannt, dass viele filamentöse Pilze kein zu nährstoffreiches Medium bevorzugen (Schwantes 1996). Alle bisher genannten Medien werden im Bereich der Forschung verwendet, in welchem Gesichtspunkte wie Verfügbarkeit und Kosten der eingesetzten Mediumskomponenten eine eher untergeordnete Rolle spielen. Zu untersuchen wären das Wachstumsverhalten und die Morphologie von Basidiomyceten auf günstigen Substraten, die die Industrie für Vorkulturen einsetzt, wie beispielsweise Maisquellwasser oder Molke.

4.2.6 Hauptkulturmedien

4.2.6.1 Lignocellulosemedium I

Das Hauptkulturmedium wurde auf der Basis des Lignocelluloseaufschlusses entwickelt. Dafür wurde entsprechend eine Analytik der verschiedenen Parameter (reduzierende Zucker, Fett, Stickstoffgehalt usw.) durchgeführt. Die Parameter wurden mit denen eines am Institut benutzten Minimalmediums verglichen und Fehlendes, in diesem Fall Stickstoff, ergänzt. Das Lignocellulosemedium I eignete sich für das Wachstum der Pilze, wobei auf eine Zugabe von Aspartat verzichtet werden konnte. Da das Substrat genügend Nährstoffe enthielt, hätte eine Supplementierung mit Aspartat zu einer Verzögerung des Ligninabbaus geführt (Tab. 3.7 sowie Abb. 3.34 bis Abb. 3.36). Die Ausbreitung des Myzels erfolgte ähnlich schnell, bei einigen Pilzen sogar schneller, als auf Malzextraktmedium. Besonders Spezies, die ein langsames Wachstum auf MEA zeigten, wie z.B. *Inonotus dryadeus*, erreichten hier Wachstumsgeschwindigkeiten, die vergleichbar mit denen der meisten in diesem Screening verwendeten Pilze waren (< zwei Wochen). Wie bei den Vorkulturmedien für Basidiomyceten gibt es auch bei den Hauptkulturmedien noch Optimierungspotential. Was langfristig zu Schwierigkeiten führen könnte, sind Nebenprodukte der schwefelsauren Hydrolyse, da diese Einfluss auf die Kulturen nehmen können. Der niedrige pH-Wert des Lignocellulosesubstrats kommt den Pilzkulturen entgegen, die eher ein saures Umfeld bevorzugen.

4.2.6.2 Lignocellulosemedium II

Das von Süd-Chemie AG gelieferte Lignocellulosemedium II stellte eine auf ungefähr ein Zehntel der Ausgangskonzentration an reduzierenden Zuckern abgereicherte Variante des Lignocellulosemediums I dar. Ein neues Verfahren löste die Hemicellulosen besser aus der Lignocellulose heraus als das bisherige Verfahren. Die Wachstumseigenschaften aller Pilze waren hierauf allerdings schlecht und die lignolytische Leistung brach vom anfangs niedrigen Niveau schnell ein. Darauf aufbauend wurde getestet, ob der Zusatz von gemahlenem Stroh (10% des Gesamtanteils der zugegebenen Trockenmasse) eine Steigerung der Abbauleistung bringt (Tab. 3.10), da während der Medienoptimierung die

Erfahrung gemacht wurde, dass dieses induktiv auf die cellulolytischen Enzyme wirkt. Da diese Maßnahme aber keine Wirkung zeigte, wurden dem Lignocellulosemedium II in einem neuen Versuch, der auf mit leicht zu verwertenden Zuckern (Cellobiose, Glucose und Xylose) supplementierten Agarplatten beruhte, getestet, ob und wenn ja welche Zucker für den Abbau essentiell sind. Es zeigte sich, dass die meisten Pilze nach Zugabe von Xylose den Abbau des Substrats wieder in Gang setzen können. Cellobiose und Glucose bewirkten mit Ausnahme von *Stereum hirsutum* keinen Effekt bei der Zersetzung des Lignocellulosemediums II (Tab. 3.11). Wie oben beschrieben, wirken Cellobiose und Glucose inhibierend auf Cellobiohydrolasen bzw. β -Glucosidasen, was das Ausbleiben des Abbaus bei den meisten Pilzen erklärt. Xylose als Bestandteil der Hemicellulose hat nicht diesen hemmenden Effekt, liegt aber nach der Optimierung der Zuckerabtrennung aus dem Medium durch die Firma Süd-Chemie AG nicht mehr in ausreichenden Mengen vor. Diese Ergebnisse legen folgende Schlüsse nah:

1. Durch den Mangel an zugänglichen Nährstoffen können die für den Abbau von Lignocellulosemedium II notwendigen Enzyme nur unzureichend gebildet werden und
2. Den Hilfsenzymen, die das für die oxidative Spaltung von Lignin notwendige H_2O_2 liefern steht dafür kein Substrat (Zucker, Arylalkohol) zur Verfügung
3. Substanzen aus dem neuen Aufschlussverfahren für das Lignocellulosemedium II wirken hemmend auf die Pilze
4. Substanzen im Substrat könnten wichtige Mineralstoffe (z.B. Fe, Cu, Mn) für die Bildung der lignolytischen Enzyme binden

Durch das Weglassen des Waschschriffs beim Überimpfen der Vor- in die Hauptkultur konnte dieses Problem durch die Zuführung zusätzlicher Nährstoffe zum Teil behoben werden. Weitere Abhilfe wurde mit einer Supplementierung der Vorkultur (MEA) mit Lignocellulosemedium II geschaffen. Die Idee dahinter ist, dass die lignolytischen Enzyme des Pilzes durch die Anwesenheit des Substrats bereits in der Vorkultur induziert werden, wo genügend Nährstoffe vorhanden sind. Durch die Vorwegnahme dieses Schritts in die Vorkultur kann in der Hauptkultur die Zeit für die Bildung der lignolytischen Enzyme eingespart werden.

4.2.6.3 Medienoptimierung

Um die lignolytische Leistung der Pilze zu steigern, wurde versucht durch Supplementierung des Hauptkulturmediums die entsprechenden Enzymaktivitäten von Laccasen, Peroxidasen und Cellulose abbauenden Enzyme zu erhöhen. Des Weiteren wurde die teure Medienkomponente BME weggelassen.

Die Beimengung von gemahlenem Stroh zum Substrat brachte keine Steigerung der β -Glucosidaseaktivität (Abb. 3.41 und Abb. 3.43). Die Aktivität der lignolytischen Enzyme war verglichen mit dem Ausgangsmedium geringer (Abb. 3.4 und Abb. 3.4). Anzunehmen ist, dass durch die geringere Konzentration von Ligninfragmenten eine schnelle Entgiftung durch die Laccase für die beiden Pilze nicht notwendig und so eine geringere Aktivität zu verzeichnen war.

Die Verdopplung der Substratmenge führte zu einer starken Steigerung der Aktivität aller untersuchten Enzyme (Abb. 3.45 und Abb. 3.4). Da es die einfachste und kostengünstigste Methode war, wurde sie weitergeführt. Trotz verschiedener Versuche der Induktion wurden die Peroxidasen, außer bei der Gattung *Auricularia*, bei keinem anderen Pilz gebildet. An Medienkomponenten, die das Enzym inhibieren könnten, kann das, mit Verweis auf die eben angesprochene Ausnahme, nicht liegen. Die Gattung *Auricularia* gehört zu den primitivsten Vertretern der hutbildenden Basidiomyceten. Es wäre denkbar, dass bei ihnen für die Expression der entsprechenden Gene weniger Vorbedingungen erfüllt sein müssen. Trotzdem wurde das Substrat auch von den Spezies abgebaut, die im Verlauf der Kultivierung keine Peroxidasen bildeten. Grund dafür könnte auch das oben erwähnte Auftreten von Laccase-Mediator-Systemen bei den erfolgreich getesteten Spezies gewesen sein.

Das Weglassen der BME-Lösung führte bei keinem der getesteten Pilze zu einer Verringerung der untersuchten Enzymaktivitäten (Abb. 3.37 und Abb. 3.41). Das ursprüngliche Hauptkulturmedium, aus dem das für dieses Projekt verwendete Lignocellulosemedium abgeleitet wurde, ist für einen Pilz mit hohen Ansprüchen an den Nährstoffgehalt des Substrats optimiert worden. Das bedeutet, dass neben dem Weglassen des BMEs, eventuell auch die Konzentration anderer Nährstoffe verringert werden könnte. Wie bei der Diskussion des Vorkulturmediums erwähnt, scheint ein zu hohes Nährstoffangebot für viele Pilze nicht förderlich zu sein (s.o.). Grundsätzlich konnten die hier verwendeten Pilze alle auf dem verwendeten Substrat wachsen. Für einen großtechnischen Einsatz ist das eine Vorbedingung, da eine Supplementierung mit teuren Zusatzstoffen für die Herstellung eines günstigen Massenprodukts – hier Treibstoff – nicht wirtschaftlich ist.

4.2.7 Screening

Der erste Screeningschritt wurde auf festen Nährböden durchgeführt (Kapitel 4.2.7.1 Lignocellulosemedium I). Aus den anfangs 60 Spezies des Screenings wurden 23 ausgewählt, die sich durch schnelle Zersetzung des Mediums und geringe Ansprüche an das Substrat auszeichneten (Tab. 3.8, sowie Abb. 3.26 bis Abb. 3.28).

Der zweite Screeningschritt wurde als Flüssigkultur in Schüttelkolben vorgenommen. Aus diesem Schritt gingen zehn Spezies hervor (Tab. 3.9), mit denen die Medienoptimierung durchgeführt wurde. Diese zehn wurden auch auf Lignocellulosemedium II kultiviert, wobei *Irpex consors* und *Stereum hirsutum* bei Abschluss des Screenings als die am besten geeigneten Kandidaten für einen industriellen Einsatz Verwendung fanden.

Es war notwendig, die Artzugehörigkeit der beiden Pilze mittels ITS-Sequenzierung zu verifizieren. *Irpex consors* wurde bestätigt. Der bei Beginn des Screening noch als *Meripilus giganteus* geführte Pilz wurde hingegen als *Stereum hirsutum* identifiziert.

4.2.7.1 *Irpex consors*

Irpex consors (Berkeley 1878) wird nach molekularbiologischen Untersuchungen zu den Meruliacea gestellt (Ko und Jung 1999). Er kommt in Asien (Ranadive 2013; Murill 1909), Australien und Neuseeland (Cunningham 1949) vor und besiedelt Laubhölzer (Abb. 4.19). Daneben befällt er aber auch Substrate wie Bambus (Mohan 2002). Dieser Pilz erwies sich als im Verhältnis zu anderen im Screening eingesetzten Spezies als widerstandsfähiger gegenüber harschen Kulturbedingungen und zeigte eine hohe Enzymaktivität. Spätere Arbeiten, die auf Screenings mit Substraten wie Organosolv (Imami *et al.* 2015) und Abwässern aus der Olivenölproduktion (Mann *et al.* 2015) basierten, bestätigten das Ergebnis und weisen auf eine hohe Flexibilität dieses Pilzes in Bezug auf verschiedene Substrate hin.

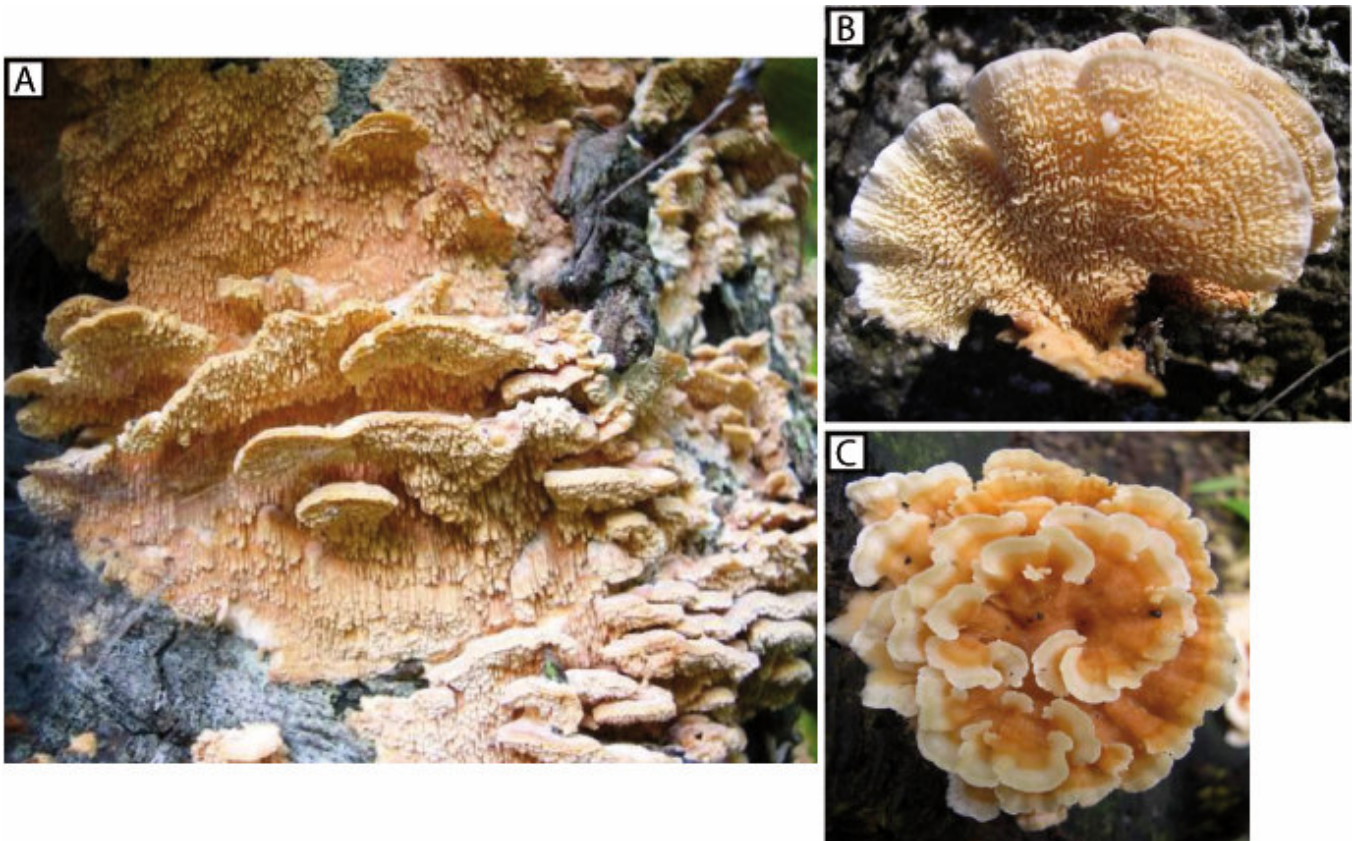


Abb. 4.19: **A:** typische Ansammlung vieler Fruchtkörper von *Irpex consors*. **B:** die Unterseite des Fruchtkörpers ist gekennzeichnet durch eine meruloide (faltige, wellige) Fruchtschicht. **C:** die Oberseite des glatten Fruchtkörpers. Die jüngste Wachstumsschicht setzt sich durch ihre hellere Farbe vom restlichen Fruchtkörper ab. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung der Manaaki Whenua – Landcare Research Databases. Die Bilder wurden von Bronwyn Dee aufgenommen.

In Imami *et al.* 2015 zeigte die Laccase aus *Irpex consors* Enzymaktivitäten, die in ähnlicher Größenordnung wie die lagen, die in dieser Arbeit gemessenen wurden. Allerdings stellte sich bei Imami *et al.* 2015 ab dem vierten Tag Peroxidaseaktivität ein. Da sich sowohl die Kultivierungsbedingungen als auch das Hauptkulturmedium bis auf das zugegebene Lignocellulosesubstrat gleichen, müsste hier nach dem Grund für den Unterschied in der Peroxidaseaktivität gesucht werden.

In der Publikation von Mann *et al.* 2015 wurden Versuche mit künstlichen (ABTS) und natürlichen aber nicht vom Pilz ausgeschiedenen Laccase-Mediator-Systemen (Bestandteil des Substrats) gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass die Abbauleistung durch diese signifikant gesteigert werden konnte. Dies legt zumindest nahe, dass die Laccasen von *Irpex consors* zumindest darauf ausgerichtet sind LMS zu nutzen.

4.2.7.2 *Stereum hirsutum*

Stereum hirsutum, zu Deutsch striegeliger Schichtpilz (Willdenow 1787), gehört zu den Stereaceae (Abb. 4.20). Es ist ein weltweit vorkommender Besiedler von totem Laubholz, seltener Nadelholz. Die Präferenz liegt auf Eichen und Buchenholz. Seine Anspruchslosigkeit gegenüber unterschiedlichen Standortbedingungen ist der Grund seiner weiten Verbreitung (Krieglsteiner 2000). In verschiedenen Arbeiten wurde bereits sein hohes Potential im Bereich der Verzuckerung von Cellulose und Hemicellulose herausgestellt (Jeya *et al.* 2012; Ramachandran *et al.* 2013), was in der erwähnten Patentierung der β -Glucosidase mündete. Aus dem oben zu den Cellulose abbauenden Enzymen gesagten geht hervor, dass die verschiedenen holzzersetzenden Pilze häufig für jeden enzymatischen Schritt des Celluloseabbaus über mehrere Enzyme verfügen. Diese entfalten ihre Wirkung erst durch ihr Zusammenspiel, was insbesondere für Endo- und Exocellulasen gilt. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da der Celluloseabbau in den ersten beiden Stufen auf ein wesentlich komplexeres Substrat trifft als bei der Hydrolyse von Cellobiose in Glucose im letzten Schritt. Hier ist das Substrat noch durch Inkrustierung durch Lignin und die enge Zusammenlagerung der Cellulosefibrillen schwer zugänglich. Diese Interaktion scheint besonders für die Exocellulasen von Bedeutung zu sein, die sowohl untereinander als auch mit den Endocellulasen interagieren. Es ist anzunehmen, dass sie den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysieren. Jede Isolierung, die die Bereitstellung einer leistungsstarken Enzymmischung für den Abbau von Cellulose für den industriellen Einsatz zum Ziel hat, sollte bei den Exocellulasen ansetzen. Diese sollten eine hohe Prozessivität aufweisen und aufeinander abgestimmt sein. Gleichfalls sollten zu ihnen passende Endocellulosen ausgewählt werden.

Die oben beschriebene Heterogenität der Eigenschaften von β -Glucosidasen wirft die Frage auf, für welche Anwendung sie benötigt wird. Wichtig wäre eine β -Glucosidase, die erst bei hohen Glucosekonzentrationen kompetitiv gehemmt wird und Cellobiose schnell abbaut um ihrerseits die kompetitive Hemmung der Cellobiohydrolase durch Cellobiose zu verhindern. Das oben beschriebene Ergebnis, dass *Stereum hirsutum* neben Xylose auch bei Anwesenheit hoher Konzentrationen an Glucose und Cellobiose fähig ist, das Substrat weiter abzubauen, macht diese Spezies zu einem interessanten Kandidaten für die Suche nach einer solchen β -Glucosidase. Ein geringes Molekulargewicht wäre für die heterologe Expression ebenfalls wünschenswert, da der „Produktionsaufwand“ der Zelle pro Enzym geringer ist. Zudem wäre es interessant, Enzyme zu haben, die eine geringe Substratspezifität zeigen, um auch andere Quellen als Cellobiose umsetzen zu können.

Stereum hirsutum weist einen weiteren Vorteil für den Einsatz im industriellen Bereich auf. Er scheidet Substanzen aus, die antibakteriell wirken und so das Wachstum von Bakterien zumindest hemmen (Dubin *et al.* 2000; Heatley *et al.* 1947; Kleinwächter *et al.* 2001; Ma *et al.* 2014; Yun *et al.* 2002a; Yun *et al.* 2002b). Bei der Freisetzung von Mono- und Oligosacchariden aus Cellulose/Hemicellulose wäre dies wünschenswert.



Abb. 4.20: **A:** für *Stereum hirsutum* arttypische Ansammlung zahlreicher Fruchtkörper auf dem Substrat; hier an *Quercus suber*. Aufgenommen an der Algavre. **B:** behaarte Oberseite des Fruchtkörpers von *Stereum hirsutum*. **C:** glatte Unterseite des Fruchtkörpers von *Stereum hirsutum*. Quelle: mit freundlicher Genehmigung von Dr. Lothar Kriegelsteiner

5 Literaturverzeichnis

Adzhubei, A.A.; Sternberg, M.J. (1994): Conservation of polyproline II helices in homologous proteins: implications for structure prediction by model building. In: *Protein science* 3 (12), S. 2395–2410. DOI: 10.1002/pro.5560031223.

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. In: *Journal of molecular biology* 215 (3), S. 403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Anderson, D.E.; Peters, R.J.; Wilk, B.; Agard, D.A. (1999): alpha-lytic protease precursor: characterization of a structured folding intermediate. In: *Biochemistry* 38 (15), S. 4728–4735. DOI: 10.1021/bi982165e.

Ang, S.; Kogulanathan, J.; Morris, G.A.; Kök, M.S.; Shewry, P.R.; Tatham, A.S. et al. (2010): Structure and heterogeneity of gliadin: a hydrodynamic evaluation. In: *European biophysics journal : EBJ* 39 (2), S. 255–261. DOI: 10.1007/s00249-009-0529-7.

Anjum, F.M.; Khan, Moazzam R.; Din, A.; Saeed, M.; Pasha, I.; Arshad, M.U. (2007): Wheat gluten: high molecular weight glutenin subunits--structure, genetics, and relation to dough elasticity. In: *Journal of food science* 72 (3), S. R56-63. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00292.x.

Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. (1999): On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. In: *Biochimica et biophysica acta* 1473 (1), S. 4–8.

Banc, A.; Desbat, B.; Renard, D.; Popineau, Y.; Mangavel, C.; Navailles, L. (2009): Exploring the interactions of gliadins with model membranes: effect of confined geometry and interfaces. In: *Biopolymers* 91 (8), S. 610–622. DOI: 10.1002/bip.21188.

Basten, D.E.J.W.; Moers, A.P.H.A.; van. Ooyen, A.J.J.; Schaap, P.J. (2005): Characterisation of *Aspergillus niger* prolyl aminopeptidase. In: *Molecular Genetics and Genomics* 272, S. 673–679 DOI: 10.1007/s00438-004-1094-5

Behnke, U.; Schalinatus, E. (1975): Zur Entstehung bitterer Peptide in Käse und aus Casein. In: *Die Nahrung* 19 (9-10), S. 839–843.

Berends, E.; Scholtmeijer, K.; Wösten, H.A.B.; Bosch, D.; Lugones, L.G. (2009): The use of mushroom-forming fungi for the production of N-glycosylated therapeutic proteins. In: *Trends in microbiology* 17 (10), S. 439–443. DOI: 10.1016/j.tim.2009.07.002.

- Berisio, R.; Vitagliano, L.; Mazzarella, L.; Zagari, A.** (2000): Crystal structure of a collagen-like polypeptide with repeating sequence Pro-Hyp-Gly at 1.4 Å resolution: implications for collagen hydration. In: *Biopolymers* 56 (1), S. 8–13. DOI: 10.1002/1097-0282(2000)56:1<8::AID-BIP1037>3.0.CO;2-W.
- Berkeley, M.J.** (1878): Enumeration of the fungi collected during the Expedition of H.M.S. 'Challenger', 1874-75. (Third notice). In: *Botanical Journal of the Linnean Society* (16), S. 38–54.
- Bezerra, G.A.; Dobrovetsky, E.; Dong, A.; Seitova, A.; Crombett, L.; Shewchuk, L.M.; Hassell, A.M.; Sweitzer, S.M.; Sweitzer, T.D.; McDevitt, P.J.; Johanson, K.O.; Kennedy-Wilson, K.M.; Cossar, D.; Bochkarev, A.; Gruber, K.; Dhe-Paganon, S.** (2012): Structures of human DPP7 reveal the molecular basis of specific inhibition and the architectural diversity of proline-specific peptidases. In: *PLoS One*. 7(8):e43019 DOI: 10.1371/journal.pone.0043019.
- Bindels J.G.** (1992): Peptiden in de Voeding. In: *Voeding* 53 (10), S. 253–257.
- Bohicchio, B.; Tamburro, A.M.** (2002): Polyproline II structure in proteins: identification by chiroptical spectroscopies, stability, and functions. In: *Chirality* 14 (10), S. 782–792. DOI: 10.1002/chir.10153.
- Bourbonnais, R.; Paice, M.G.** (1990): Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. In: *FEBS letters* 267 (1), S. 99–102.
- Breslin, P.A.; Beauchamp, G.K.** (1995): Suppression of bitterness by sodium: variation among bitter taste stimuli. In: *Chemical senses* 20 (6), S. 609–623.
- Chen, R.; Jiang, X.; Sun, D.; Han, G.; Wang, F.; Ye, M.; Wang, L.; Zou, H** (2009): Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. In: *Journal of proteom research* 8(2), S. 651-61. doi: 10.1021/pr8008012.
- Creighton, T.E.** (1983): Proteins. Structures and molecular principles. New York: W.H. Freeman.
- Crestini, C.; Jurasek, L.; Argyropoulos, D.S.** (2003): On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. In: *Chemistry* 9 (21), S. 5371–5378. DOI: 10.1002/chem.200304818.
- Crous, P.W.; de Cock, A.W.A.M.** (2009): Fungal biodiversity. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (CBS laboratory manual series, 1).
- Cubellis, M.V.; Caillez, F.; Blundell, T.L.; Lovell, S.C.** (2005): Properties of polyproline II, a secondary structure element implicated in protein-protein interactions. In: *Proteins* 58 (4), S. 880–892. DOI: 10.1002/prot.20327.

- Cunningham, E.L.; Jaswal, S.S.; Sohl, J.L.; Agard, D.A.** (1999): Kinetic stability as a mechanism for protease longevity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20), S. 11008–11014.
- Cunningham, G.H.** (1949): New Zealand Polyporaceae. 11. The genus *Irpex*. In: *New Zealand Department of Scientific and Industrial Research, Plant Diseases Division, Bulletin* 82: S. 8
- Dagleish, D.G.; Horne, D.S.; Law, A.J.R.** (1989): Size-related differences in bovine casein micelles. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 991 (3), S. 383–387. DOI: 10.1016/0304-4165(89)90061-5.
- Dagleish, D.G.** (2011): On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. In: *Soft Matter* 7 (6), S. 2265–2272. DOI: 10.1039/C0SM00806K.
- Darewicz, M.; Dziuba, J.; Minkiewicz, P.** (2008): Celiac Disease—Background, Molecular, Bioinformatics and Analytical Aspects. In: *Food Reviews International* 24 (3), S. 311–329. DOI: 10.1080/87559120802089258.
- Dave, R.I.; Joshi, N.S.; Patel, J.R.; Thakar, P.N.** (1991): Protein hydrolysates - a review. In: *Indian Journal of Dairy Science* 9 (44), S. 557–564.
- Ding, G.W.; Zhou, N.D.; Tian, Y.P.** (2014): Over-Expression of a Proline Specific Aminopeptidase from *Aspergillus oryzae* JN-412 and Its Application in Collagen Degradation. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 173: S. 1765–1777. DOI 10.1007/s12010-014-0963-6
- Drozdetskiy, A.; Cole, C.; Procter, J.; Barton, G.J.** (2015): JPred4: a protein secondary structure prediction server. In: *Nucleic Acids Research* 1;43(W1):W389-94. doi: 10.1093/nar/gkv332.
- Dubin, G.M.; Fkyerat, A.; Tabacchi, R.** (2000): Acetylenic aromatic compounds from *Stereum hirsutum*. In: *Phytochemistry* 53 (5), S. 571–574.
- Duckert, P.; Brunak, S.; Blom, N.** (2004): Prediction of proprotein convertase cleavage sites. In: *Protein Engineering, Design and Selection* 17(1): S. 107-12.
- Dunker, A.K.; Garner, E.; Guillot, S.; Romero, P.; Albrecht, K.; Hart, J.; Obradovic, Z.; Kissinger, C.; Villafranca, J.E.** (1998): Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. In: *Pacific Symposium on Biocomputing* S. 473–484.
- Dunker, A.K.; Lawson, J.D.; Brown, C.J.; Williams, R.M.; Romero, P.; Oh, J.S.; Oldfield, C.J.; Campen, A.M.; Ratliff, C.M.; Hipps, K.W.; Ausio, J.; Nissen, M.S.; Reeves, R.; Kang, C.; Kissinger, C.R.; Bailey, R.W.; Griswold, M.D.; Chiu, W.; Garner, E.C.; Obradovic, Z.** (2001): Intrinsically disordered protein. In: *Journal of Molecular Graphics and Modelling* (19) S. 26–59.

- Ecroyd, H.; Thorn, D.C.; Liu, Y.; Carver, J.A.** (2010): The dissociated form of kappa-casein is the precursor to its amyloid fibril formation. In: *The Biochemical journal* 429 (2), S. 251–260. DOI: 10.1042/BJ20091949.
- Edens, L.; Dekker, P.; van der Hoeven, R.; Deen, F.; de Roos, A.; Floris, R.** (2005): Extracellular prolyl EndoProtease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 53 (20), S. 7950–7957. DOI: 10.1021/jf050652c.
- Eder, J.; Fersht, A.R.** (1995): Pro-sequence-assisted protein folding. In: *Molecular microbiology* 16 (4), S. 609–614.
- Eggert, C.; Temp, U.; Eriksson, K.E.** (1997): Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. In: *FEBS letters* 407 (1), S. 89–92.
- Egloff, M.P.; Marguet, F.; Buono G.; Verger, R.; Cambillau, C.; Vantilbeurgh, H.** (1995): The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. In: *Biochemistry* 34, S. 2751–2762.
- Eriksson, K.E.; Pettersson, B.** (1975a): Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. 1. Separation, purification and physico-chemical characterization of five endo-1,4-beta-glucanases. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 51 (1), S. 193–206.
- Eriksson, K.E.; Pettersson, B.** (1975b): Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. 3. Purification and physico-chemical characterization of an exo-1,4-beta-glucanase. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 51 (1), S. 213–218.
- Eugster P.J.; Salamin K.; Grouzmann E.; Monod M.** (2015): Production and characterization of two major *Aspergillus oryzae* secreted prolyl endopeptidases able to efficiently digest proline-rich peptides of gliadin. In: *Microbiology* 161(12) S. 2277–88. DOI: 10.1099/mic.0.000198.
- Everse, J.; Everse, K.E.; Grisham, M.B.** (1991): Peroxidases in chemistry and biology. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Ewart, J.A.D.** (1983): Slow triple β -gliadin from Cappelle-Desprez. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* (34), S. 653–656.
- Falcão-Rodrigues, M.M.; Moldão-Martins, M.; Beirão-da-Costa, M.L.** (2005): Thermal properties of gluten proteins of two soft wheat varieties. In: *Food chemistry* 93 (3), S. 459–465. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.023.
- Fido, R.J.; Békés, F.; Gras, P.W.; Tatham, A.S.** (1997): Effects of α -, β -, γ - and ω -Gliadins on the Dough Mixing Properties of Wheat Flour. In: *Journal of Cereal Science* 26 (3), S. 271–277. DOI: 10.1006/jcrs.1997.0138.

- Frøkjær S.** (1994): Use of protein hydrolysates for protein supplementation. In: *Food Technol* 48 (10), S. 86–88.
- Fuhrmann, M.; Hausherr, A.; Ferbitz, L.; Schödl, T.; Heitzer, M.; Hegemann, P.** (2004): Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. In: *Plant Molecular Biology* 55 (6), S. 869–881. DOI: 10.1007/s11103-005-2150-1.
- Grimble G.K.** (1994): The significance of peptides in human nutrition. In: *Annual Review of Nutrition* 14, S. 419–447.
- Guex, N.; Peitsch, M.C.** (1997): SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. In: *Electrophoresis* 18 (15), S. 2714–2723. DOI: 10.1002/elps.1150181505.
- Gültekin, H.; Heermann, K.H.** (1988): The use of polyvinylidendifluorid membranes as a general blotting matrix. In: *Analytical Biochemistry* 172 , S. 320–329.
- Gupta, R.; Jung, E.; Brunak S.**: Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. 46, S. 203-206.
- Hamada, N.; Ishikawa, K.; Fuse, N.; Kodaira, R.; Shimosaka, M.; Amano, Y. et al.** (1999): Purification, characterization and gene analysis of exo-cellulase II (Ex-2) from the white rot basidiomycete *Irpex lacteus*. In: *Journal of bioscience and bioengineering* 87 (4), S. 442–451.
- Hamer, R.J.; van Vliet, T.** (2000): Understanding the structure and properties of gluten: An overview. In: P. R. Shewry und Arthur S. Tatham (Hg.): *Wheat gluten*. Cambridge: Royal Society of Chemistry (Special publication, no. 261), S. 125–131.
- Harrison, P.M.; Sternberg, M.J.E.** (1996): The disulphide -cross: From cysteine gemoetry and clustering to classification of small disulphide-rich protein folds. In: *Journal of Molecular Biology* 264, S. 603–623
- Heatley, N.G.; Jennings, M.A.; Florey, H.W.** (1947): Antibiotics from *Stereum hirsutum*. In: *British journal of experimental pathology* 28 (1), S. 35–46.
- Henriksson, G.; Nutt, A.; Henriksson, H.; Pettersson, B.; Ståhlberg, J.; Johansson, G.; Pettersson, G.** (1999): Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 259 (1-2), S. 88–95.
- Hicks, J.M.; Hsu, V.L.** (2004): The extended left-handed helix: a simple nucleic acid-binding Motiv. In: *Proteins* 55 (2), S. 330–338. DOI: 10.1002/prot.10630.
- Holt, C.; Sørensen, E.S.; Clegg, R.A.** (2009): Role of calcium phosphate nanoclusters in the control of calcification. In: *The FEBS journal* 276 (8), S. 2308–2323. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.06958.x.

Horne, D.S. (1986): Steric stabilization and casein micelle stability. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 111 (1), S. 250–260. DOI: 10.1016/0021-9797(86)90024-X.

Hsia, C.C.; Anderson, O.D. (2001): Isolation and characterization of wheat ω -gliadin genes. In: *TAG Theoretical and Applied Genetics* 103 (1), S. 37–44. DOI: 10.1007/s00122-001-0552-2.

Huang, X.; Miller, W. (1991): A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. In: *Advances in Applied Mathematics* 12 (3), S. 337–357. DOI: 10.1016/0196-8858(91)90017-D.

Imami, A.; Riemer, S.; Schulze, M.; Amelung, F.; Gorshkov, V.; Rühl, M. et al. (2015): Depolymerization of lignosulfonates by submerged cultures of the basidiomycete *Irpex consors* and cloning of a putative versatile peroxidase. In: *Enzyme and Microbial Technology* 81, S. 8–15. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.07.007.

Ishibashi N, Ono I, Kato K, Shigenaga T, Shinoda H, Okai H, et al. (1988): Role of the hydrophobic amino acid residue in the bitterness of peptides. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 52 (1), S. 91–94.

Jeya, M.; Kalyani, D.; Dhiman, S.S.; Kim, H.; Woo, S.; Kim, D.; Lee, J. (2012): Saccharification of woody biomass using glycoside hydrolases from *Stereum hirsutum*. In: *Bioresource technology* 117, S. 310–316. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.047.

Kalmar, L.; Homola, D.; Varga, G.; Tompa, P. (2012): Structural disorder in proteins brings order to crystal growth in biomineralization. In: *Bone* 51 (3), S. 528–534. DOI: 10.1016/j.bone.2012.05.009.

Kanatani, A.; Yoshimoto, T.; Kitazono, A.; Kokubo, T.; Tsuru, D. (1993): Prolyl endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene, and characterization of the expressed enzyme. In: *Journal of biochemistry* 113 (6), S. 790–796.

Kasturi, L.; Chen, H.; Shakin-Eshleman, S.H. (1997): Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. In: *The Biochemical journal* 323 (Pt 2), S. 415–419.

Kawasaki, K. (2009): The S CPP gene repertoire in bony vertebrates and graded differences in mineralized tissues. In: *Development genes and evolution* 219 (3), S. 147–157. DOI: 10.1007/s00427-009-0276-x.

Kawasaki, K.; Weiss, K.M. (2003): Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7), S. 4060–4065. DOI: 10.1073/pnas.0638023100.

- Kay, B.K.; Williamson, M.P.; Sudol, M.** (2000): The importance of being proline: the interaction of proline-rich Motifs in signaling proteins with their cognate domains. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (2), S. 231–241.
- Kazlauskas, R.J.; Bornscheuer, U.T.** (2009): Finding better protein engineering strategies. In: *Nature chemical biology* 5 (8), S. 526–529. DOI: 10.1038/nchembio0809-526.
- Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J.E.** (2015): The Swiss Model2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. In: *Nature protocols* 10 (6), S. 845–858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
- Khatkar, B.S.; Bell, A.E.; Schofield, J.D.** (1995): The dynamic rheological properties of glutes and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. In: *Journal of Cereal Science* 22 (1), S. 29–44. DOI: 10.1016/S0733-5210(05)80005-0.
- Khoshnoodi, J.; Cartailier, J.; Alvares, K.; Veis, A.; Hudson, B.G.** (2006): Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (50), S. 38117–38121. DOI: 10.1074/jbc.R600025200.
- Kiemer, L.; Bendtsen, J.D.; Blom, N.** (2005): NetAcet: prediction of N-terminal acetylation sites. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 21 (7), S. 1269–1270. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti130.
- Kitazono, A.; Kitano, A.; Tsuru, D.; Yoshimoto, T.** (1994): Isolation and characterization of the prolyl aminopeptidase gene (pap) from *Aeromonas sobria*: comparison with the *Bacillus coagulans* enzyme. In: *Journal of biochemistry* 116 (4), S. 818–825.
- Kleinwächter, P.; Dahse, H.M.; Luhmann, U.; Schlegel, B.; Dornberger, K.** (2001): Epicorazine C, an antimicrobial metabolite from *Stereum hirsutum* HKI 0195. In: *The Journal of antibiotics* 54 (6), S. 521–525.
- Ko, K.S.; Jung, H.S.** (1999): Phylogenetic re-evaluation of *Trametes consors* based on mitochondrial small subunit ribosomal DNA sequences. In: *FEMS microbiology letters* 170 (1), S. 181–186.
- Kramer, R.Z.; Vitagliano, L.; Bella, J.; Berisio, R.; Mazzarella, L.; Brodsky, B. et al.** (1998): X-ray crystallographic determination of a collagen-like peptide with the repeating sequence (Pro-Pro-Gly). In: *Journal of molecular biology* 280 (4), S. 623–638. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1881.
- Krieglsteiner, G.J.** (2000-): Die Grosspilze Baden-Württembergs. Stuttgart (Hohenheim): E. Ulmer.

- de Kruif, C.G.; Zhulina, E.B.** (1996): κ -casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 117 (1-2), S. 151–159. DOI: 10.1016/0927-7757(96)03696-5.
- Kubo, T.; Terabayashi, S.; Takeda, S.; Sasaki, H.; Aburada, M.; Miyamoto, K.** (2006): Indoor cultivation and cultural characteristics of *Wolfiporia cocos* sclerotia using mushroom culture bottles. In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 29 (6), S. 1191–1196.
- Kumetat, K.; Beeby, R.** (1954): Egg substitutes from milk proteins. In: *Dairy Industry*, S. 730–733.
- Kunishima, N.; Fukuyama, K.; Matsubara, H.; Hatanaka, H.; Shibano, Y.; Amachi, T.** (1994): Crystal structure of the fungal peroxidase from *Arthromyces ramosus* at 1.9 Å resolution. Structural comparisons with the lignin and cytochrome c peroxidases. In: *Journal of molecular biology* 235 (1), S. 331–344.
- la Cour, T.; Kiemer, L.; Mølgaard, A.; Gupta, R.; Skriver K.; Brunak, S.** (2004): Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. In: *Protein Engineering, Design and Selection* 17(6):527-36
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H. et al.** (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (21), S. 2947–2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Lehle, L.; Tanner, W.** (1995): Chapter 7 Protein Glycosylation in Yeast. In: Jean Montreuil und Albert Neuberger (Hg.): *Glycoproteins*, Bd. 29. Amsterdam [u.a.]: Elsevier (New Comprehensive Biochemistry, 29,A), S. 475–509.
- Lenderink J.**: Process for the manufacture of foam producing albuminous products and their application in food stuffs and luxuries. Anmeldenr: 2,522,050.
- Leontievsky, A.; Myasoedova, N.; Pozdnyakova, N.; Golovleva, L.** (1997a): 'Yellow' laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. In: *FEBS letters* 413 (3), S. 446–448.
- Leontievsky, A.A.; Vares, T.; Lankinen, P.; Shergill, J.K.; Pozdnyakova, N.N.; Myasoedova, N.M. et al.** (1997b): Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. In: *FEMS microbiology letters* 156 (1), S. 9–14.
- Lis, H.; Sharon, N.** (1993): Protein glycosylation. Structural and functional aspects. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 218 (1), S. 1–27.
- Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; van Zyl, W.H.; Pretorius, I.S.** (2002): Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 66 (3), S. 506-77, table of contents.

- Ma, K.; Bao, L.; Han, J.; Jin, T.; Yang, X.; Zhao, F. et al.** (2014): New benzoate derivatives and hirsutane type sesquiterpenoids with antimicrobial activity and cytotoxicity from the solid-state fermented rice by the medicinal mushroom *Stereum hirsutum*. In: *Food chemistry* 143, S. 239–245. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.07.124.
- MacArthur, M.W.; Thornton, J.M.** (1991): Influence of proline residues on protein conformation. In: *Journal of molecular biology* 218 (2), S. 397–412.
- Maes, M.; Lambeir, A.G.K.; Senten, K.; van der Veken, P.; Leiting, B.; Augustyns, K.; Scharpe, S.; de Meester, I.** (2005): Kinetic investigation of human dipeptidyl peptidase II (DPPII)-mediated hydrolysis of dipeptide derivatives and its identification as quiescent cell proline dipeptidase (QPP)/dipeptidyl peptidase 7 (DPP7). In: *Biochemical Journal*, 386, S. 315-324.
- Mann, J.; Markham, J.L.; Peiris, P.; Spooner-Hart, R.N.; Holford, P.; Nair, N.G.** (2015): Use of olive mill wastewater as a suitable substrate for the production of laccase by *Cerrena consors*. In: *International Biodeterioration & Biodegradation* 99, S. 138–145. DOI: 10.1016/j.ibiod.2015.01.010.
- Marino, S.M.; Gladyshev, V.N.** (2010): Cysteine function governs its conservation and degeneration and restricts its utilization on protein surfaces. In: *Journal of Molecular Biology* 404(5), S. 902–916
- Mas, J.M.; Aloy, P.; Martí-Renom, M.A.; Oliva, B.; de Llorens, R.; Aviles, F.X.; Querol, E.** (2001): Classification of protein disulphide-bridge topologies. In: *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 15, S. 477–487
- Matoba, T.; Hata, T.** (1972): Relationship between bitterness of peptides and their chemical structure. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 36 (8), S. 1423–1431.
- Matsushita-Morita, M.; Furukawa, I.; Suzuki, S.; Yamagata, Y.; Koide, Y.; Ishida, H.; Takeuchi, M.; Kashiwagi, Y.; Kusumoto, K.I.** (2009): Characterization of recombinant prolyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. In: *Journal of Applied Microbiology* 109 (2010), S. 156–165 doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04641.x
- Mohanan, C.** (2002): Diseases of Bamboos in Asia; Leiden: Brill
- Molberg, O.; McAdam, S.; Lundin, K.E.; Kristiansen, C.; Arentz-Hansen, H.; Kett, K.; Sollid, L.M.** (2001): T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase. In: *European journal of immunology* 31 (5), S. 1317–1323. DOI: 10.1002/1521-4141(200105)31:5<1317::AID-IMMU1317>3.0.CO;2-I.
- Montreuil, J.; Neuberger, A.** (Hg.) ((1995)): Glycoproteins. Amsterdam [u.a.]: Elsevier (New Comprehensive Biochemistry, 29,A).

- Muccilli, V.; Cunsolo, V.; Saletti, R.; Foti, S.; Margiotta, B.; Scossa, F. et al.** (2010): Characterisation of a specific class of typical low molecular weight glutenin subunits of durum wheat by a proteomic approach. In: *Journal of Cereal Science* 51 (1), S. 134–139. DOI: 10.1016/j.jcs.2009.11.003.
- Mulder, N.J.; Apweiler, R.; Attwood, T.K.; Bairoch, A.; Barrell, D.; Bateman, A. et al.** (2003): The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. In: *Nucleic acids research* 31 (1), S. 315–318.
- Murill, W.A.** (1909): Polyporaceae from Japan. In: *Mycologia* 1(4), S. 164-170
- Nakamura, Y.; Gojobori, T.; Ikemura, T.** (2000): Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. In: *Nucleic acids research* 28 (1), S. 292.
- Ney K.H.** (1971): Prediction of bitterness of peptides from their. In: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 8, S. 147–164.
- O'Cuinn, G.; FitzGerald, R.; Bouchier, P.; McDonnell, M.** (1999): Generation of non-bitter casein hydrolysates by using combinations of a proteinase and aminopeptidases. In: *Biochemical Society transactions* 27 (4), S. 730–734.
- Ody, C.E.; Marinkovic, D.V.; Hammon K.J.** (1978): Purification and properties of prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) from human kidney. In: *The Journal of Biological Chemistry*, 253, S. 5927-5931.
- Ollis, D.L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S.M. et al.** (1992): The α / β hydrolase fold. In: *Protein Engineering, Design and Selection* 5 (3), S. 197–211. DOI: 10.1093/protein/5.3.197.
- Oyama, H.; Aoki, H.; Amano, M.; Mizuki, E.; Yoshimoto, T.; Tsuru, D.; Murao, S.** (1997): Purification and characterization of a prolyl endopeptidase from *Pseudomonas sp.* KU-22. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84 (6), S. 538–542. DOI: 10.1016/S0922-338X(97)81908-3.
- Page, M.J.; di Cera, E.** (2008): Evolution of peptidase diversity. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (44), S. 30010–30014. DOI: 10.1074/jbc.M804650200.
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Scaloni, A.; Capasso, A.; Sannia, G.** (1997): A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (50), S. 31301–31307.
- Pappu, R.V.; Srinivasan, R.; Rose, G.D.** (2000): The Flory isolated-pair hypothesis is not valid for polypeptide chains: implications for protein folding. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (23), S. 12565–12570. DOI: 10.1073/pnas.97.23.12565.

- Pappu, R.V.; Rose, G.D.** (2002): A simple model for polyproline II structure in unfolded states of alanine-based peptides. In: *Protein science* 11 (10), S. 2437–2455. DOI: 10.1110/ps.0217402.
- Pawar, A.P.; Dubay, K.F.; Zurdo, J.; Chiti, F.; Vendruscolo, M.; Dobson, C.M.** (2005): Prediction of “aggregationprone” and “aggregation susceptible” regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. In: *Journal of Molecular Biology* 350, S. 379–92
- Pechmann, S.; Levy, E.D.; Tartaglia, G.G.; Vendruscolo, M.** (2009): Physicochemical principles that regulate the competition between functional and dysfunctional association of proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, S. 10159–64
- Pedersen, L.; Jørgensen, J.R.** (2007): Variation in rheological properties of gluten from three biscuit wheat cultivars in relation to nitrogen fertilisation. In: *Journal of Cereal Science* 46 (2), S. 132–138. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.01.001.
- Petersen, J.F.; Kadziola, A.; Larsen, S.** (1994): Three-dimensional structure of a recombinant peroxidase from *Coprinus cinereus* at 2.6 Å resolution. In: *FEBS letters* 339 (3), S. 291–296.
- Petersen, T.N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H.** (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. In: *Nature methods* 8 (10), S. 785–786. DOI: 10.1038/nmeth.1701.
- Petrescu, A.; Milac, A.; Petrescu, S.M.; Dwek, R.A.; Wormald, M.R.** (2004): Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. In: *Glycobiology* 14 (2), S. 103–114. DOI: 10.1093/glycob/cwh008.
- Piontek, K.; Glumoff, T.; Winterhalter, K.** (1993): Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution. In: *FEBS letters* 315 (2), S. 119–124.
- Poulos, T.L.; Edwards, S.L.; Wariishi, H.; Gold, M.H.** (1993): Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (6), S. 4429–4440.
- Ramachandran, Priyadharshini; Nguyen, N.; Choi, J.; Kang, Y.C.; Jeya, M.; Lee, J.** (2013): Optimization of β -glucosidase production by a strain of *Stereum hirsutum* and its application in enzymatic saccharification. In: *Journal of microbiology and biotechnology* 23 (3), S. 351–356.
- Ranadive, K.R.** (2013): An overview of Aphyllophorales (wood rotting fungi) from India. In: *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2(12), S. 112-139
- Rawlings, N.D.; Barrett, A.J.** (1993): Evolutionary families of peptidases. In: *The Biochemical journal* 290 (Pt 1), S. 205–218.

- Rawlings, N.D.; Barrett, A.J.; Bateman, A.** (2014a): Using the MEROPS Database for Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors and Substrates. In: *Current protocols in bioinformatics* 48, S. 1.25.1-1.25.33. DOI: 10.1002/0471250953.bi0125s48.
- Rawlings, N.D.; Waller, M.; Barrett, A.J.; Bateman, A.** (2014b): MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. In: *Nucleic acids research* 42, S. 503-509. DOI: 10.1093/nar/gkt953.
- Reinhammar, B.R.** (1972): Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin. In: *Biochimica et biophysica acta* 275 (2), S. 245–259.
- Reynolds, S.L.; Fischer, K.** (2015): Pseudoproteases: mechanisms and function. In: *Biochemical Journal* 468(1), S.17-24. DOI: 10.1042/BJ20141506.
- Rouwendal, G.J.A.; Florack, D.E.A.; Bosch, H.J.; Lugones, L.G.** (2006): Glycoengineering in mushrooms (WO/2006/096050).
- Roy, G.M.** (1990): The applications and future implications of bitterness reduction and inhibition in food products. In: *Critical reviews in food science and nutrition* 29 (2), S. 59–71. DOI: 10.1080/10408399009527516.
- Rucker, A.L.; Pagar, C.T.; Campbell, M.N.; Qualls, J.E.; Creamer, T.P.** (2003): Host-guest scale of left-handed polyproline II helix formation. In: *Proteins* 53 (1), S. 68–75. DOI: 10.1002/prot.10477.
- Salamin K.; Eugster P.J.; Jousson O.; Waridel P.; Grouzmann E.; Monod M.** (2017): AoS28D, a proline-Xaa carboxypeptidase secreted by *Aspergillus oryzae*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(10), S. 4129-4137. DOI: 10.1007/s00253-017-8186-8.
- Sattar, A.K.; Yamamoto, N.; Yoshimoto, T.; Tsuru, D.** (1990): Purification and characterization of an extracellular prolyl endopeptidase from *Agaricus bisporus*. In: *Journal of biochemistry* 107 (2), S. 256–261.
- Schmidhalter, D.R.; Canevascini, G.** (1993): Purification and characterization of two exo-cellobiohydrolases from the brown-rot fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr) Karst. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 300 (2), S. 551–558. DOI: 10.1006/abbi.1993.1076.
- Schmidl, M.K.; Taylor, S.L; Nordlee, J.A.** (1994): Use of hydrolysate based products in special medical diets. In: *Food Technology* 48 (10), S. 77–85.
- Schrödinger, L.L.C.** (2010): The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
- Schwantes, H.O.** (1996): Biologie der Pilze. Eine Einführung in die angewandte Mykologie; Stuttgart: Ulmer (Uni-Taschenbücher, 1871).

- Sebela, M.; Rehulka, P.; Kabrt, J.; Rehulkov, H.; Ozdian, T.; Raus, M.; Franc, V.; Chmelík J.** (2009): Identification of N-glycosylation in prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and evaluation of the enzyme for its possible application in proteomics. In: *Journal of Mass Spectrometry* 44(11), 1587–1595.
- Senger, R.S.; Karim, M.N.** (2005): Variable site-occupancy classification of N-linked glycosylation using artificial neural networks. In: *Biotechnology progress* 21 (6), S. 1653–1662. DOI: 10.1021/bp0502375.
- Shaw, K.L.; Grimsley, G.R.; Yakovlev, G.I.; Makarov, A.A.; Pace, C.N.** (2001): The effect of net charge on the solubility, activity, and stability of ribonuclease Sa. In: *Protein Science* 10(6), S. 1206-1215.
- Shewry, P.R.; Halford, N.G.; Tatham, A.S.** (1992): High molecular weight subunits of wheat glutenin. In: *Journal of Cereal Science* 15 (2), S. 105–120. DOI: 10.1016/S0733-5210(09)80062-3.
- Shewry, P.R.; Tatham, A.S.; Forde, J.; Kreis, M.; Mifflin, B.J.** (1986): The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. In: *Journal of Cereal Science* 4 (2), S. 97–106. DOI: 10.1016/S0733-5210(86)80012-1.
- Shi, Z.; Woody, R.W.; Kallenbach, N.R.** (2002): Is polyproline II a major backbone conformation in unfolded proteins? In: *Advances in protein chemistry* 62, S. 163–240.
- Shinde, U.; Inouye, M.** (2000): Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding. In: *Seminars in cell & developmental biology* 11 (1), S. 35–44. DOI: 10.1006/scdb.1999.0349.
- Siemensma, A.; Kunst, A.** (1999): Sports nutrition. The recovery sports drink. In: *World of Ingredients* (10), S. 53–56.
- Siemensma, A.D.; Weijer, W.J.; Bak H.J.** (1993): The importance of peptide length in hypoallergenic infant food formulae. In: *Trends in Food Science & Technology* (4), S. 16–21.
- Siligardi, G.; Drake, A.F.** (1995): The importance of extended conformations and, in particular, the PII conformation for the molecular recognition of peptides. In: *Biopolymers* 37 (4), S. 281–292. DOI: 10.1002/bip.360370406.
- Soisson, S.M.; Patel, S.B.; Abeywickrema, P.D.; Byrne, N.J.; Diehl, R.E.; Hall, D.L.; Ford, R.E.; Reid, J.C.; Rickert, K.W.; Shipman, J.M.; Sharma, S.; Lumb, K.J.** (2010): Structural definition and substrate specificity of the S28 protease family: the crystal structure of human prolylcarboxypeptidase. In: *BMC Structural Biology* 10(16). DOI: 10.1186/1472-6807-10-16.
- Sollid, L.M.** (2000): Molecular basis of celiac disease. In: *Annual review of immunology* 18, S. 53–81. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.53.

- Solomon, E.I.; Sundaram, U.M.; Machonkin, T.E.** (1996): Multicopper Oxidases and Oxygenases. In: *Chemical reviews* 96 (7), S. 2563–2606.
- Spiro, R.G.** (2002): Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. In: *Glycobiology* 12 (4), S. 43R–56R.
- Sreerama, N.; Woody, R.W.** (1999): Molecular dynamics simulations of polypeptide conformations in water: A comparison of alpha, beta, and poly(pro)II conformations. In: *Proteins* 36 (4), S. 400–406.
- Stapley, B.J.; Creamer, T.P.** (1999): A survey of left-handed polyproline II helices. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 8 (3), S. 587–595. DOI: 10.1110/ps.8.3.587.
- Sternberg, M.; Kim, C.Y.** (1977): Lysinoalanine formation in food protein ingredients. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* (86B), S. 73–84.
- Strahl-Bolsinger, S.; Gentzsch, M.; Tanner, W.** (1999): Protein O-mannosylation. In: *Biochimica et biophysica acta* 1426 (2), S. 297–307.
- Suga, K.; Ito, K.; Tsuru, D.; Yoshimoto, T.** (1995): Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C): purification and characterization of the enzyme from *Xanthomanas maltophilia*. In: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 59 (2), S. 298–301.
- Sundaramoorthy, M.; Kishi, K.; Gold, M.H.; Poulos, T.L.** (1994): The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (52), S. 32759–32767.
- Sundaramoorthy, M.; Meiyappan, M.; Todd, P.; Hudson, B.G.** (2002): Crystal structure of NC1 domains. Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (34), S. 31142–31153. DOI: 10.1074/jbc.M201740200.
- Suzuki, M.R.; Hunt, C.G.; Houtman, C.J.; Dalebroux, Z.D.; Hammel, K.E.** (2006): Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood. In: *Environmental microbiology* 8 (12), S. 2214–2223. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01160.x.
- Tamura K.; Stecher G.; Peterson D.; Filipski A.; Kumar S.** (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. In: *Molecular Biology and Evolution* 30(12), S. 2725–2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- Tamura, M.; Mori, N.; Miyoshi, T.; Koyama, S.; Kohri, H.; Okai, H.** (1990): Practical debittering using model peptides and related compounds. In: *Agricultural and biological chemistry* 54 (1), S. 41–51.

- Tartaglia, G.G.; Pawar, A.P.; Campioni, S.; Dobson, C.M.; Chiti, F.; Vendruscolo, M.** (2008): Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins. In: *Journal of Molecular Biology* 380, S. 425–36.
- Tompa, P.** (2002): Intrinsically unstructured proteins. In: *Trends in Biochemical Sciences* (27) S. 527–533.
- Treweek, T.M.; Thorn, D.C.; Price, W.E.; Carver, J.A.** (2011): The chaperone action of bovine milk α S1- and α S2-caseins and their associated form α S-casein. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 510 (1), S. 42–52. DOI: 10.1016/j.abb.2011.03.012.
- Uversky, V.N.; Gillespie, J.R.; Fink, A.L.** (2000): Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? In: *Proteins* (41) S. 415–427.
- Uzcategui, E.; Ruiz, A.; Montesino, R.; Johansson, G.; Pettersson, G.** (1991): The 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. In: *Journal of biotechnology* 19 (2-3), S. 271–285.
- Valásková, V.; Baldrian, P.** (2006): Degradation of cellulose and Hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus*--production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. In: *Microbiology (Reading, England)* 152 (Pt 12), S. 3613–3622. DOI: 10.1099/mic.0.29149-0.
- Veraverbeke, W.S.; Delcour, J.A.** (2002): Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. In: *Critical reviews in food science and nutrition* 42 (3), S. 179–208. DOI: 10.1080/10408690290825510.
- Vojdani, F.; Whitaker, J.R.**: Chemical and enzymatic modification of proteins for improved functionality.
- Wang, K.D.; Wang, K.H.; Zhou, N.D.; Tian, Y.P.** (2017): Secretory Expression, Purification, Characterization, and Application of an *Aspergillus oryzae* Prolyl Aminopeptidase in *Bacillus subtilis*. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181: S. 1611–1623. DOI 10.1007/s12010-016-2305-3.
- Weber, G.F.** (1929): The Occurrence of Tuckahoes and *Poria Cocos* in Florida. In: *Mycologia* 21 (3), S. 113. DOI: 10.2307/3753916.
- Welinder, K.G.** (1992): Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. In: *Current opinion in structural biology* 2 (3), S. 388–393. DOI: 10.1016/0959-440X(92)90230-5.
- Wellner, N.; Bianchini, D.; Mills, C.E.N.; Belton, P.S.** (2003): Effect of Selected Hofmeister Anions on the Secondary Structure and Dynamics of Wheat Prolamins in Gluten. In: *Cereal Chemistry* 80 (5), S. 596–600. DOI: 10.1094/CCHEM.2003.80.5.596.

- Wellner, N.; Mills, C.E.N.; Brownsey, G.; Wilson, R.H.; Brown, N; Freeman, J. et al.** (2005): Changes in protein secondary structure during gluten deformation studied by dynamic fourier transform infrared spectroscopy. In: *Biomacromolecules* 6 (1), S. 255–261. DOI: 10.1021/bm049584d.
- Wieser, H.** (2007): Chemistry of gluten proteins. In: *Food microbiology* 24 (2), S. 115–119. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.004.
- Wilkins, M.R.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Sanchez, J.C.; Williams, K.L.; Appel, R.D.; Hochstrasser, D. F.** (1999): Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 112, S. 531–552.
- von Willdenow, C.L.** (1787): *Thaelaephora hirsuta*. In: *Florae Berolinensis Prodromus*, S. 397.
- Williamson, M.P.** (1994): The structure and function of proline-rich regions in proteins. In: *The Biochemical journal* 297 (Pt 2), S. 249–260.
- Wolf, F.A.** (1922): The fruiting stage of the tuckahoe *Pachyma Cocos*. In: *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* (38), S. 127–137.
- Wright, P.E.; Dyson, H.J.** (1999): Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. In: *Journal of Molecular Biology* (293) S. 321–331.
- Wrigley, C.W.** (1996): Giant proteins with flour power. In: *Nature* 381 (6585), S. 738–739. DOI: 10.1038/381738a0.
- Xu, F.** (1996): Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. In: *Biochemistry* 35 (23), S. 7608–7614. DOI: 10.1021/bi952971a.
- Xu, F.; Kulys, J.J.; Duke, K.; Li, K.; Krikstopaitis, K.; Deussen, H.J. et al.** (2000): Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. In: *Applied and environmental microbiology* 66 (5), S. 2052–2056.
- Xu, F.; Shin, W.; Brown, S.H.; Wahleithner, J.A.; Sundaram, U.M.; Solomon, E.I.** (1996): A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. In: *Biochimica et biophysica acta* 1292 (2), S. 303–311.
- Xu, S.S.; Faris, J.D.; Cai, X.; Klindworth, D.L.** (2005): Molecular cytogenetic characterization and seed storage protein analysis of 1A/1D translocation lines of durum wheat. In: *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 13 (6), S. 559–568. DOI: 10.1007/s10577-005-0981-x.

- Yang, H.Y.; Erdos, E.G.; Chiang, T.S.; Jenssen, T.A.; Rodgers, J.G. (1970):** Characteristics of an enzyme that inactivates angiotensin II (angiotensinase C). In: *Biochemical Pharmacology*, 19: S. 1201-1211.
- Yoshimoto, T.; Kanatani, A.; Shimoda, T.; Inaoka, T.; Kokubo, T.; Tsuru, D. (1991):** Prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*: cloning and sequencing of the enzyme gene. In: *Journal of biochemistry* 110 (6), S. 873–878.
- Yoshimoto, T.; Sattar, A.K.; Hirose, W.; Tsuru, D. (1988):** Studies on prolyl endopeptidase from shakashimeji (*Lyophyllum cinerascens*): purification and enzymatic properties. In: *Journal of biochemistry* 104 (4), S. 622–627.
- Yun, B.; Cho, Yangrae; Lee, I.; Cho, S.; Lee, T.H.; Yoo, I. (2002a):** Sterins A and B, new antioxidative compounds from *Stereum hirsutum*. In: *The Journal of antibiotics* 55 (2), S. 208–210.
- Yun, B.; Lee, I.; Cho, Y.; Cho, S.; Yoo, I. (2002b):** New tricyclic sesquiterpenes from the fermentation broth of *Stereum hirsutum*. In: *Journal of natural products* 65 (5), S. 786–788.
- Zhao, D.; Zhang, X.; Cui, D.; Zhao, M. (2012):** Characterisation of a novel white laccase from the deuteromycete fungus *Myrothecium verrucaria* NF-05 and its decolourisation of dyes. In: *PloS one* 7 (6), S. e38817. DOI: 10.1371/journal.pone.0038817.
- Zilić, S.; Barać, M.; Pešić, M.; Dodig, D.; Ignjatović-Mičić, D. (2011):** Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes. In: *International journal of molecular sciences* 12 (9), S. 5878–5894. DOI: 10.3390/ijms12095878.

A Anhang

A.1 Darstellung konservierter Cysteinreste verschiedener S28-Peptidasen

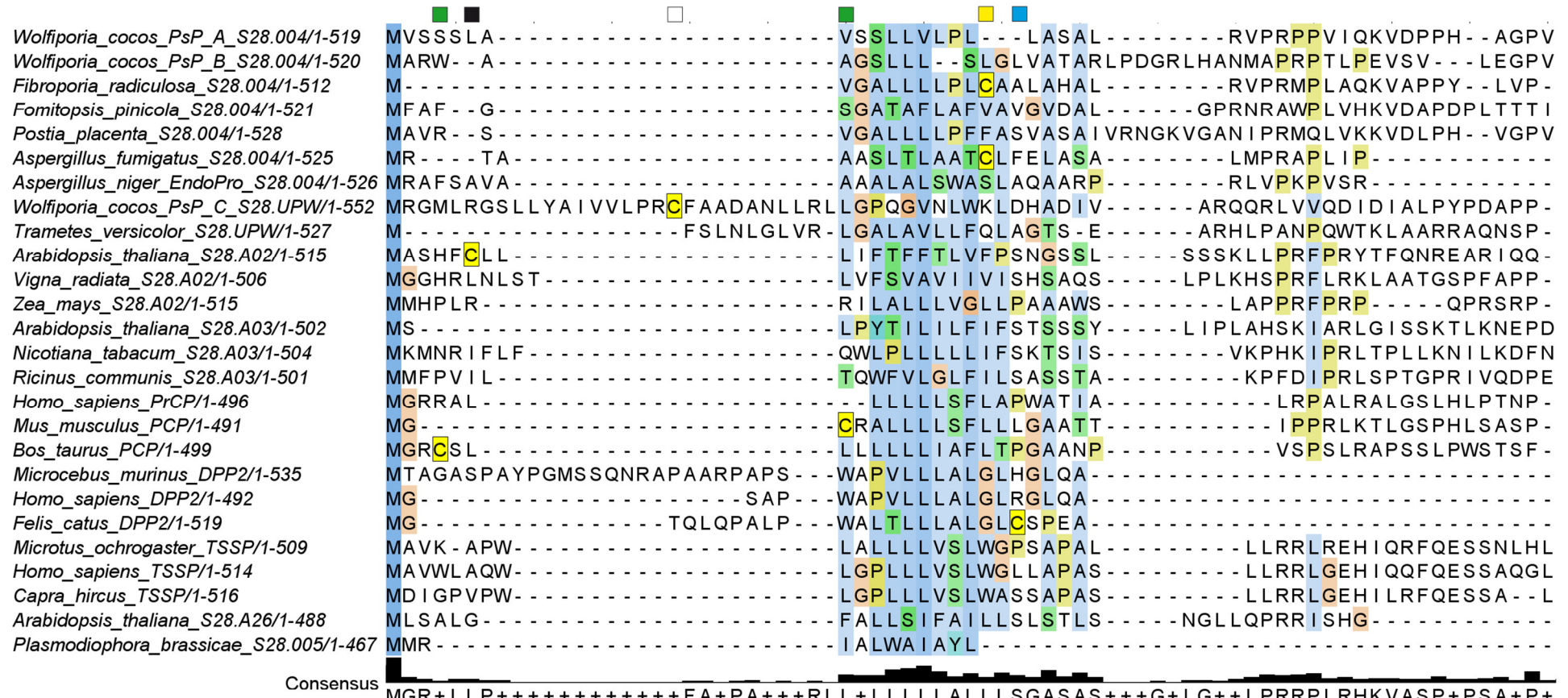
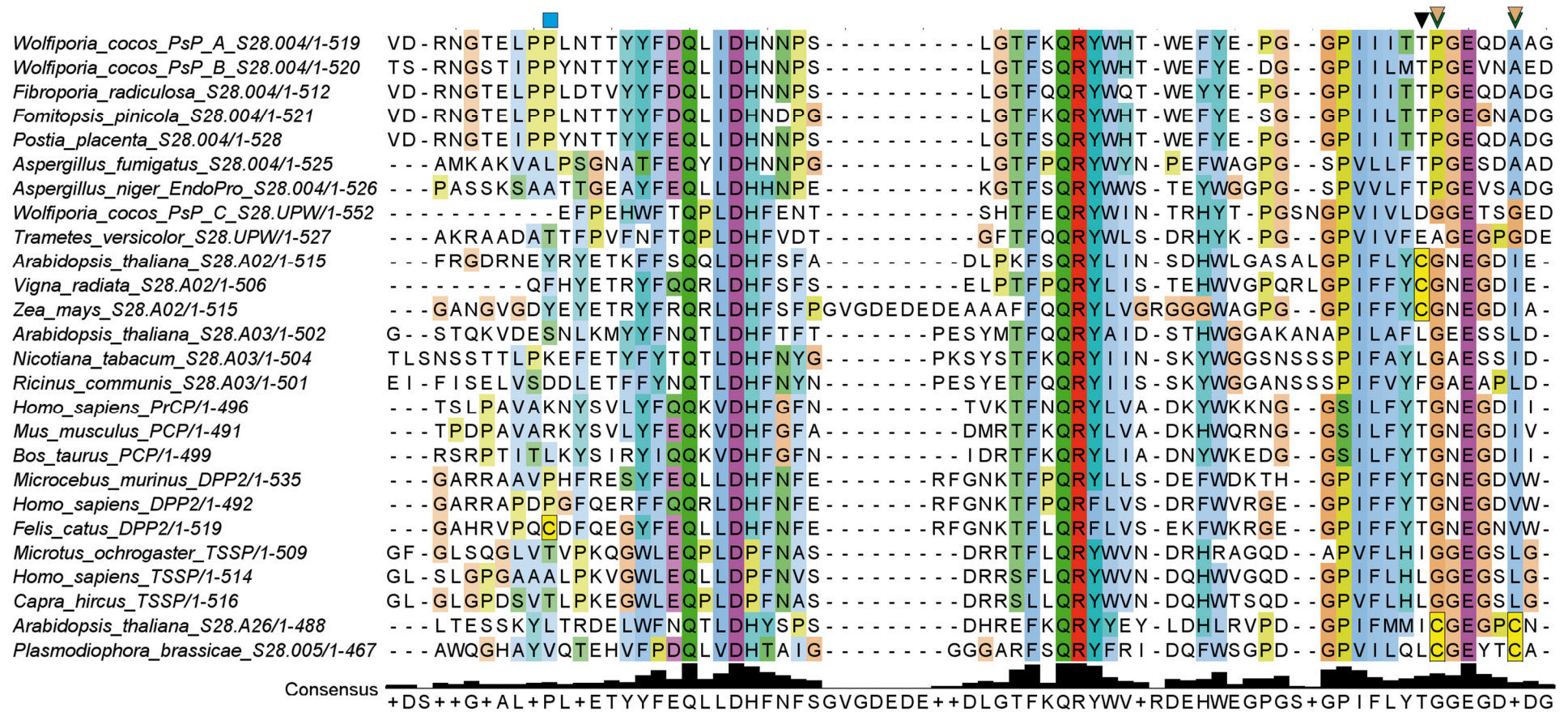
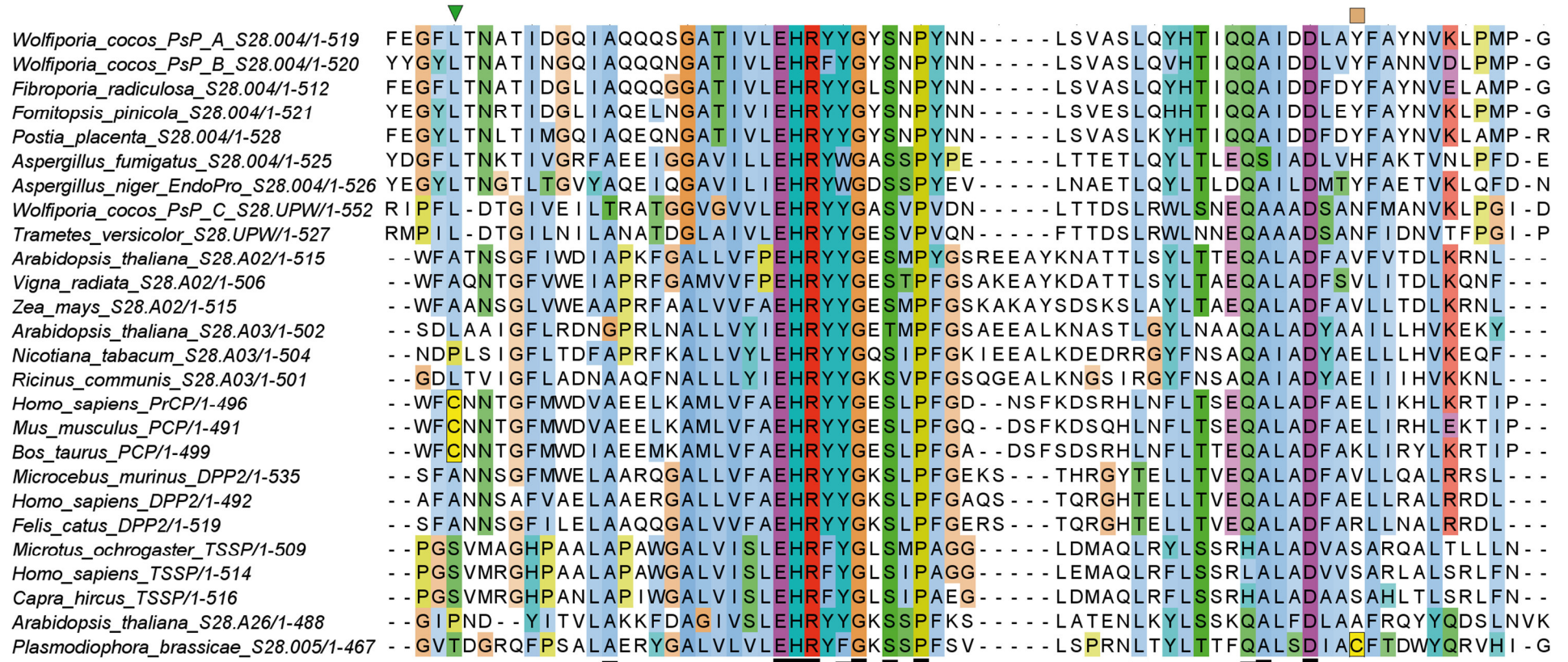


Abb. A.1: Darstellung konservierter Cysteinreste verschiedener S28-Unterfamilien. Die konservierten Cysteinreste sind umrahmt und gelb markiert. Das übrige Multisequenzalignment wurde in etwas abgeschwächter Färbung dargestellt, wobei Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften dieselbe Farbe aufweisen. Farbige Dreiecke über den einzelnen Spalten des Multisequenzalignments symbolisieren Disulfidbrücken. Quadrate stellen Cysteinreste in schwach bis nicht konservierten Bereichen dar. Die Symbole sind abhängig von der S28-Unterfamilie farbige unterlegt: S28.004 gelb, S28.UPW weiß, S28.A02 schwarz, S28.A03 rot, S28.001 (PCP) grün, S28.002 (DPP2) hellblau, S28.003 (TSSP) dunkelblau, S28.005 dunkelgrün, S28.A26 beige. Ein schwarzer Ring symbolisiert das stark konservierte Cystein nach dem katalytisch aktiven Histidin

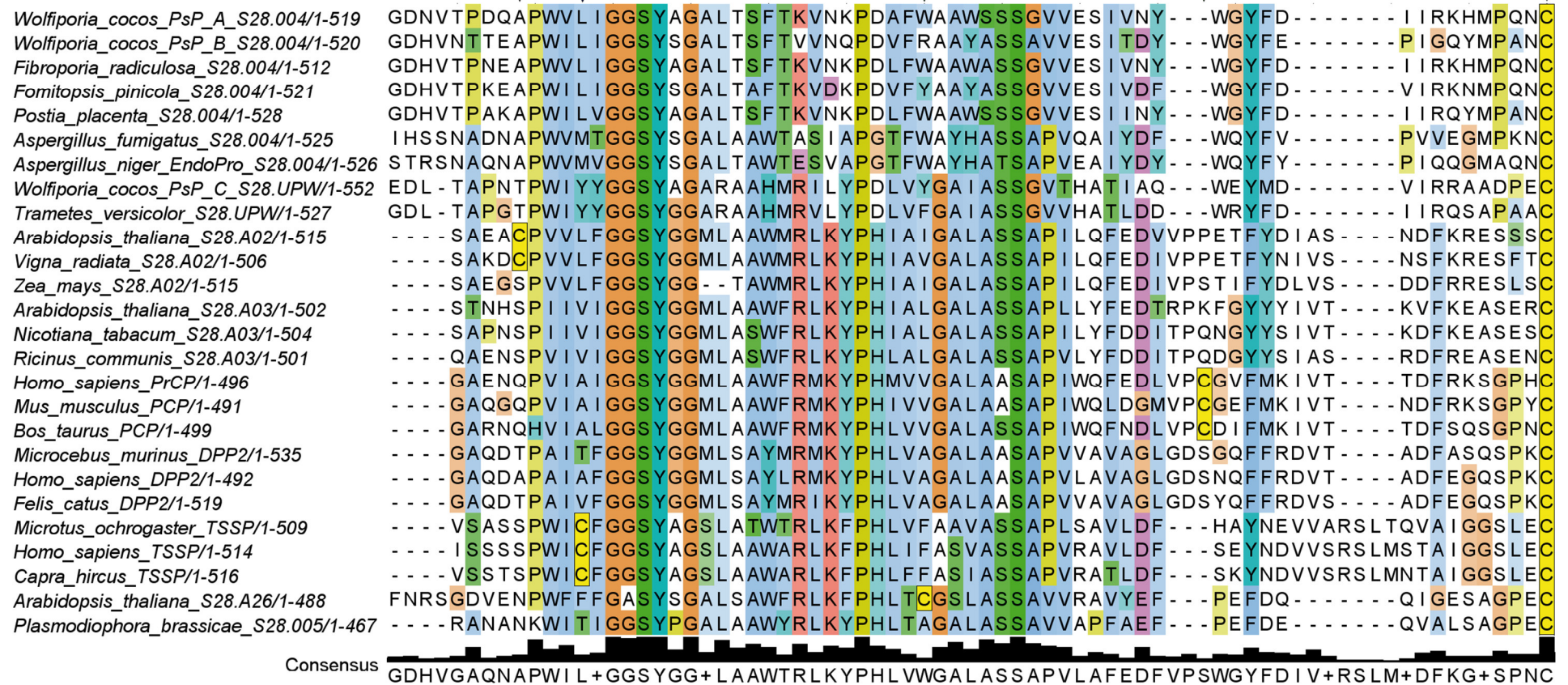


Fortsetzung Abb. A.1

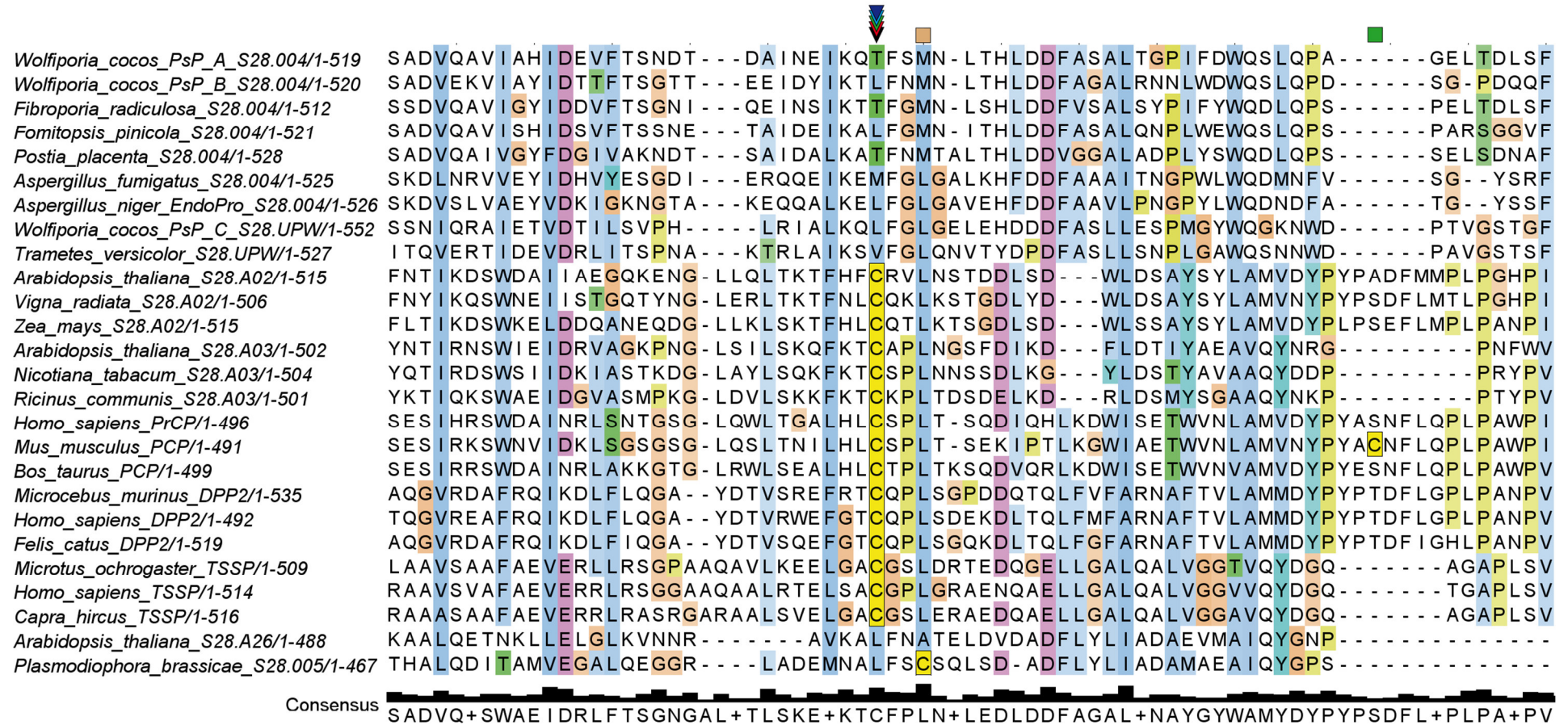


Consensus YEGFLTNTGF++DLAPE+GAL+VFLEHRY**Y**GESLPFGN++EA+LDVASLQYLTSEQALADFA**F**YFA+N+KRPL**P**V**G**

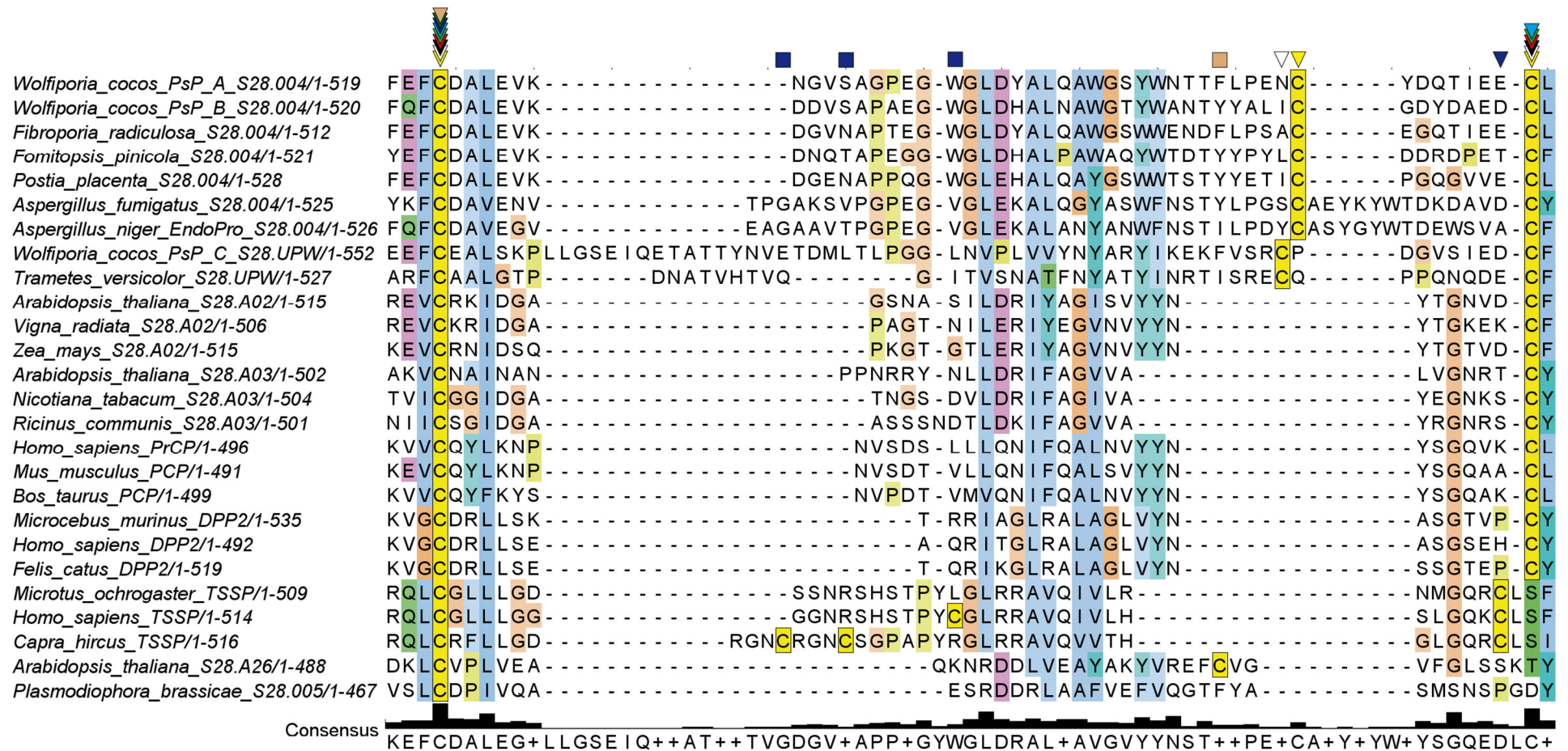
Fortsetzung Abb. A.1



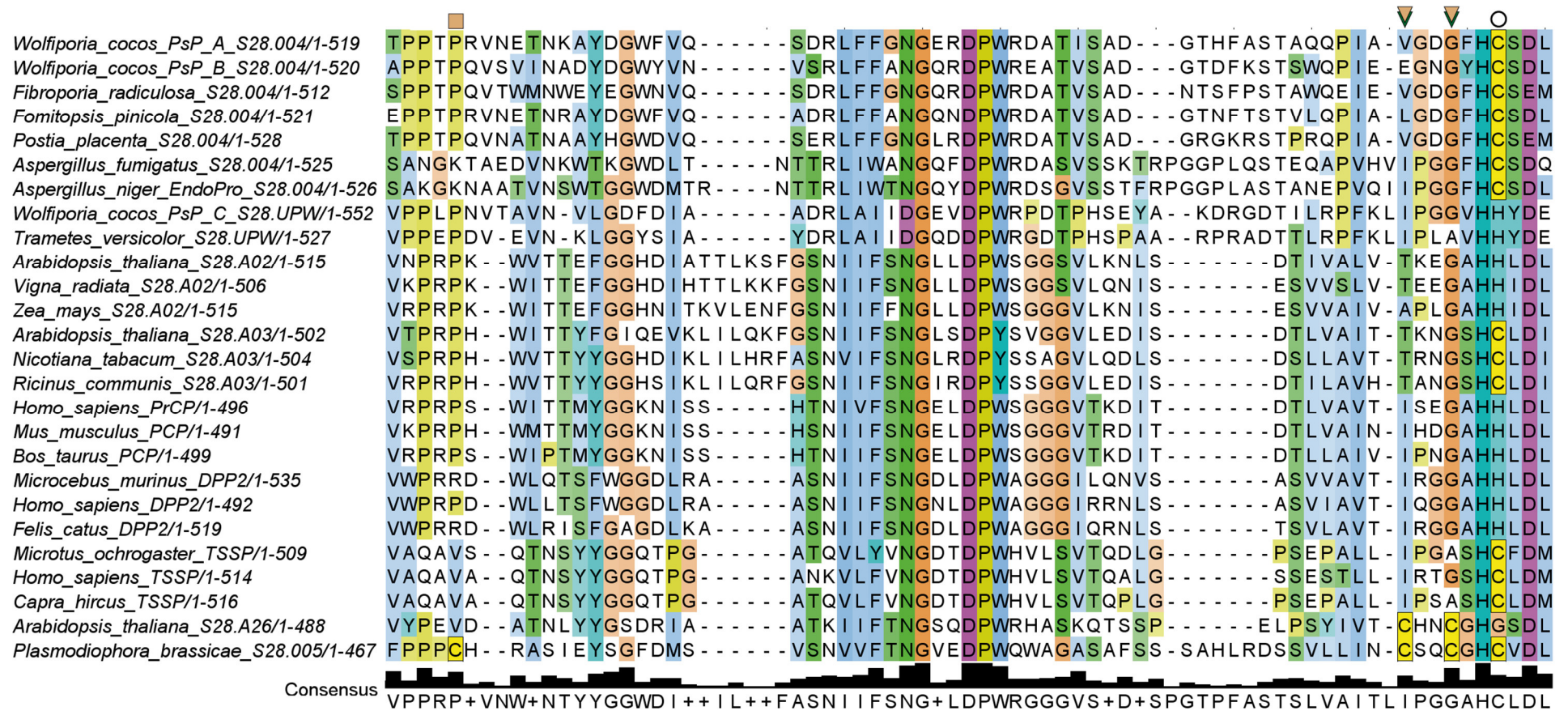
Fortsetzung Abb. A.1



Fortsetzung Abb. A.1



Fortsetzung Abb. A.1



Fortsetzung Abb. A.1

<i>Wolfiporia_cocos_PsP_A_S28.004/1-519</i>	- - - - -
<i>Wolfiporia_cocos_PsP_B_S28.004/1-520</i>	- - - - -
<i>Fibroporia_radiculosa_S28.004/1-512</i>	- - - - -
<i>Fomitopsis_pinicola_S28.004/1-521</i>	- - - - -
<i>Postia_placenta_S28.004/1-528</i>	- - - - -
<i>Aspergillus_fumigatus_S28.004/1-525</i>	- - - - -
<i>Aspergillus_niger_EndoPro_S28.004/1-526</i>	- - - - -
<i>Wolfiporia_cocos_PsP_C_S28.UPW/1-552</i>	- - - - -
<i>Trametes_versicolor_S28.UPW/1-527</i>	- - - - -
<i>Arabidopsis_thaliana_S28.A02/1-515</i>	LKRSW - - -
<i>Vigna_radiata_S28.A02/1-506</i>	- - - - -
<i>Zea_mays_S28.A02/1-515</i>	VAVKGSSSY
<i>Arabidopsis_thaliana_S28.A03/1-502</i>	V - - - - -
<i>Nicotiana_tabacum_S28.A03/1-504</i>	TMT - - - - -
<i>Ricinus_communis_S28.A03/1-501</i>	- - - - I S I T N
<i>Homo_sapiens_PrCP/1-496</i>	- - - - -
<i>Mus_musculus_PCP/1-491</i>	- - - - -
<i>Bos_taurus_PCP/1-499</i>	- - - - -
<i>Microcebus_murinus_DPP2/1-535</i>	PSPSARVVR
<i>Homo_sapiens_DPP2/1-492</i>	- - - - PRLSL
<i>Felis_catus_DPP2/1-519</i>	GRWG - - - - -
<i>Microtus_ochrogaster_TSSP/1-509</i>	- - - - -
<i>Homo_sapiens_TSSP/1-514</i>	- - - - -
<i>Capra_hircus_TSSP/1-516</i>	- - - - -
<i>Arabidopsis_thaliana_S28.A26/1-488</i>	- - - - -
<i>Plasmodiophora_brassicae_S28.005/1-467</i>	VPKAIL - - -
Consensus	<u>V++S I ++S+</u>

Fortsetzung Abb. A.1

A.2 Darstellung konservierter Sequons verschiedener S28-Peptidasen

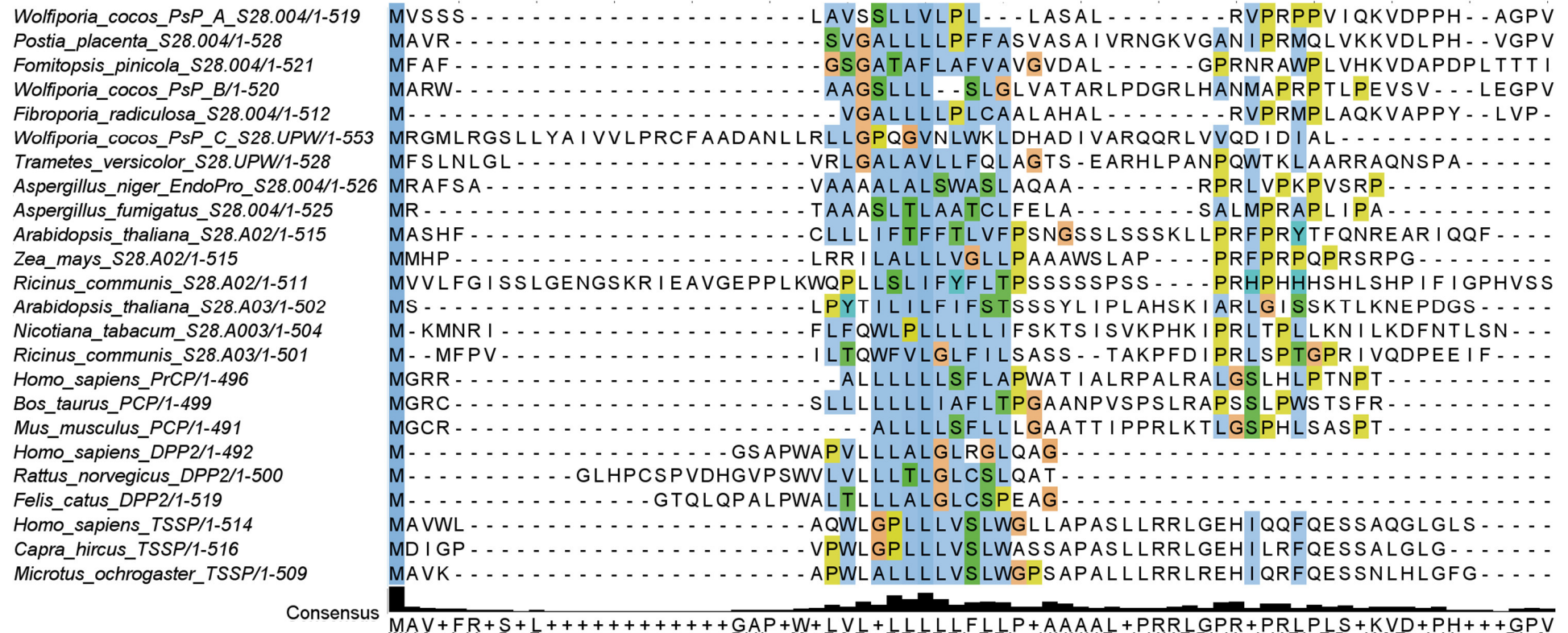
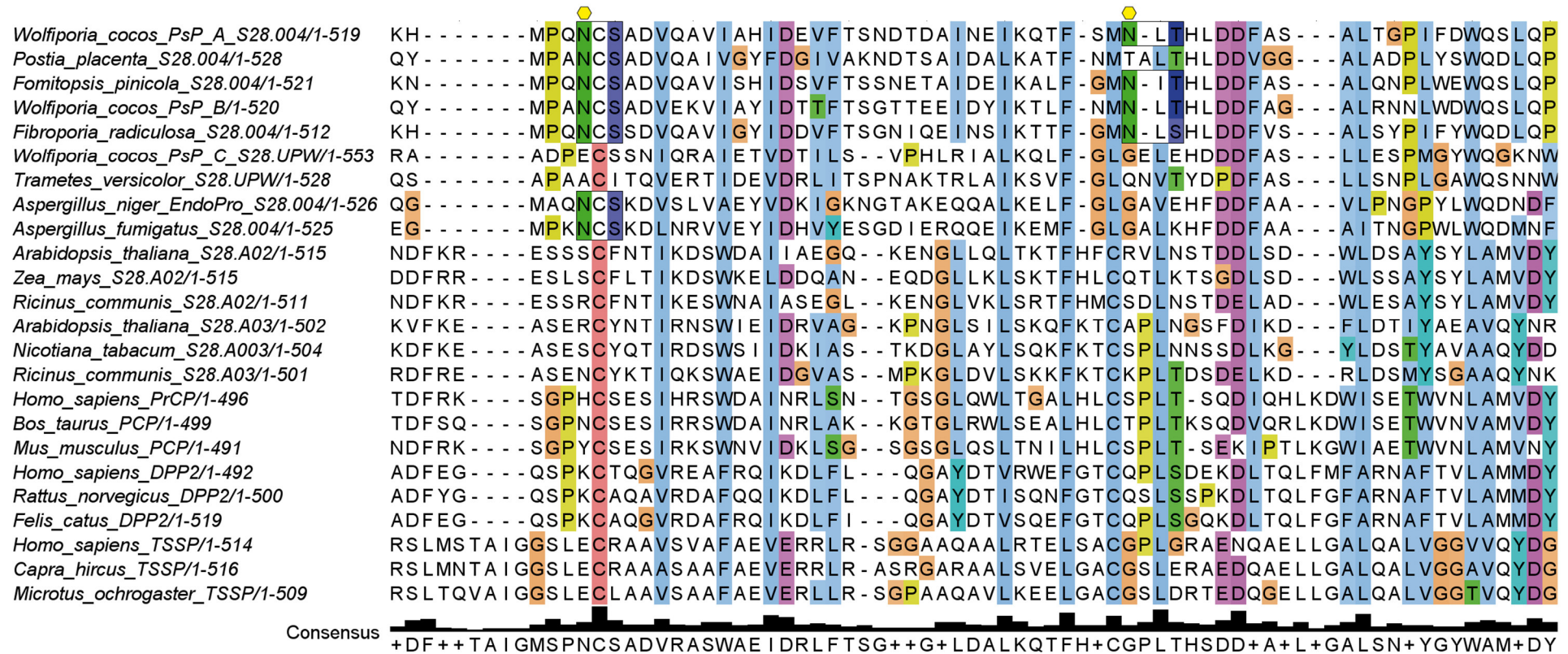


Abb. A.2: Darstellung konservierter Sequons für ausgewählte Arten verschiedener S28-Unterfamilien. Die konservierten Sequons sind umrahmt, wobei der Asperaginrest grün unterlegt ist und das zum Sequon gehörende Serin bzw. Threonin blau markiert wurde. Das übrige Multisequenzalignment wurde in etwas abgeschwächter Färbung dargestellt, wobei Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften dieselbe Farbe aufweisen. Farbige Sechsecke über den einzelnen Spalten des Multisequenzalignments symbolisieren konservierte potentielle N-Glycosylierungsstellen einzelner S28-Unterfamilien (S28.004 gelb, S28.UPW weiß, S28.A02 schwarz, S28.A03 rot, S28.001 (PCP) grün, S28.002 (DPP2) hellblau, S28.003 (TSSP) dunkelblau)

Wolfiporia cocos_PsP_A_S28.004/1-519 AYFAYNVKLPMPGGDNV - TPDQAPWVLI GGSYAGALTSFTKVNKPDFAWAAWSSSGVVESIVNY - - -WGYFDIIR
Postia placenta_S28.004/1-528 DYFAYNVK LAMPRGD HV - TPAKAPWILVGGSYAGALTSFTKVNKPD LFWAAWSSSGVVESIINY - - -WGYFDIIR
Fomitopsis pinicola_S28.004/1-521 EYFAYNVKLPMPGGD HV - TPKEAPWIL I GGSYSGALTAFTKVDKPDV FYAAYASSG VVESIVDF - - -WGYFDVIR
Wolfiporia cocos_PsP_B/1-520 VYFANNV DLPMPGGD HV - NTTEAPWIL I GGSYSGALTSFTV V NQPDV FRAAYASSAVVESITDY - - -WGYFEP I G
Fibroporia radiculosa_S28.004/1-512 DYFAYNVE LAMPGGD HV - TPNEAPWVLI GGSYAGALTSFTKVNKPD LFWAAWASSG VVESIVNY - - -WGYFDIIR
Wolfiporia cocos_PsP_C_S28.UPW/1-553 ANFMANV KLP G IDE - DL - TAPNTPW I Y Y GGSYAGARA AHMR I L Y PDLVYGA I ASSGVTHAT I AQ - - -WEYMDVIR
Trametes versicolor_S28.UPW/1-528 ANFIDNVTFPG I PG - DL - TAPGTPW I Y Y GGSYAGARA AHMR V L Y PDLVFGA I ASSGVVHAT L DD - - -WRYFDIIR
Aspergillus niger_EndoPro_S28.004/1-526 TYFAETV K L Q F D N S T R S - NAQNAPWVMVGGSYSGALTAWTESVAPGTFWAYHATSAPVEAIYDY - - -WQYFYPIQ
Aspergillus fumigatus_S28.004/1-525 VHF AKTVNLPFDE I H S S - NADNAPWVM T GGSYSGALA AWTAS I APGTFWAYHASSAPVQA I YDF - - -WQYFVPV
Arabidopsis thaliana_S28.A02/1-515 AVFVTDLKR - - - - -NL - SAEACPVVLFGGSYGGMLAAWMRLKYPH I A I GALASSAP I LQFEDVVPETFYDIAS
Zea mays_S28.A02/1-515 AVLLTDLKR - - - - -NL - SAE G S P V V L F G G S Y G G - - TAWMRLKYPH I A I GALASSAP I LQFEDIVPSTIFYDLVS
Ricinus communis_S28.A02/1-511 AVLITDLKR - - - - -NL - TAEDCPVVLFGGSYGGMLAAWMRLKYPH I A I GALAASAP I LQFENVVPHEIFYDIVS
Arabidopsis thaliana_S28.A03/1-502 AA I L L H V K E - - - - -K Y - S T N H S P I I V I G G S Y G G M L A A W F R L K Y P H I A L G A L A S S A P L L Y F E D T R P K F G Y Y I V T
Nicotiana tabacum_S28.A003/1-504 AE L L L H V K E - - - - -Q F - S A P N S P I I V I G G S Y G G M L A S W F R L K Y P H I A L G A L A S S A P I L Y F D D I T P Q N G Y Y S I V T
Ricinus communis_S28.A03/1-501 AE I I I H V K K - - - - -NL - QAENS P V I V I G G S Y G G M L A S W F R L K Y P H L A L G A L A S S A P V L Y F D D I T P Q D G Y Y S I A S
Homo sapiens_PrCP/1-496 AE L I K H L K R - - - - -T I P G A E N Q P V I A I G G S Y G G M L A A W F R M K Y P H M V V G A L A A S A P I W Q F E D L V P C G V F M K I V T
Bos taurus_PCP/1-499 AKLIRYLKR - - - - -T I P G A R N Q H V I A L G G S Y G G M L A A W F R M K Y P H L V V G A L A S S A P I W Q F N D L V P C D I F M K I V T
Mus musculus_PCP/1-491 AE L I R H L E K - - - - -T I P G A Q Q P V I A I G G S Y G G M L A A W F R M K Y P H I V V G A L A A S A P I W Q L D G M V P C G E F M K I V T
Homo sapiens_DPP2/1-492 AE L L R A L R R - - - - -DL - GAQDAPA I A F G G S Y G G M L S A Y L R M K Y P H L V A G A L A A S A P V L A V A G L G D S N Q F F R D V T
Rattus norvegicus_DPP2/1-500 AVLLQALRH - - - - -NL - G V Q D A P T I A F G G S Y G G M L S A Y M R M K Y P H L V A G A L A A S A P V I A V A G L G N P D Q F F R D V T
Felis catus_DPP2/1-519 ARLLNALRR - - - - -DL - GAQDT P A I V F G G S Y G G M L S A Y M R I K Y P H L V A G A L A A S A P V V A V A G L G D S Y Q F F R D V S
Homo sapiens_TSSP/1-514 VSARLALSR - - - - -L F N I S S S S P W I C F G G S Y A G S L A A W A R L K F P H L I F A S V A S S A P V R A V L D F - - - S E Y N D V V S
Capra hircus_TSSP/1-516 ASAHLTL SR - - - - -L F N V S S T S P W I C F G G S Y A G S L A A W A R L K F P H L F F A S I A S S A P V R A T L D F - - - S K Y N D V V S
Microtus ochrogaster_TSSP/1-509 ASARQALTL - - - - -L L N V S A S S P W I C F G G S Y A G S L A T W T R L K F P H L V F A A V A S S A P L S A V L D F - - - H A Y N E V V A

Consensus AYFA+N+K+PMPGGDNL+TA+NAPWIL+GGSYGGMLAAWTRLKYPHLVWGALASSAPVLA FED+VP+WGYFDIV+

Fortsetzung Abb. A.2

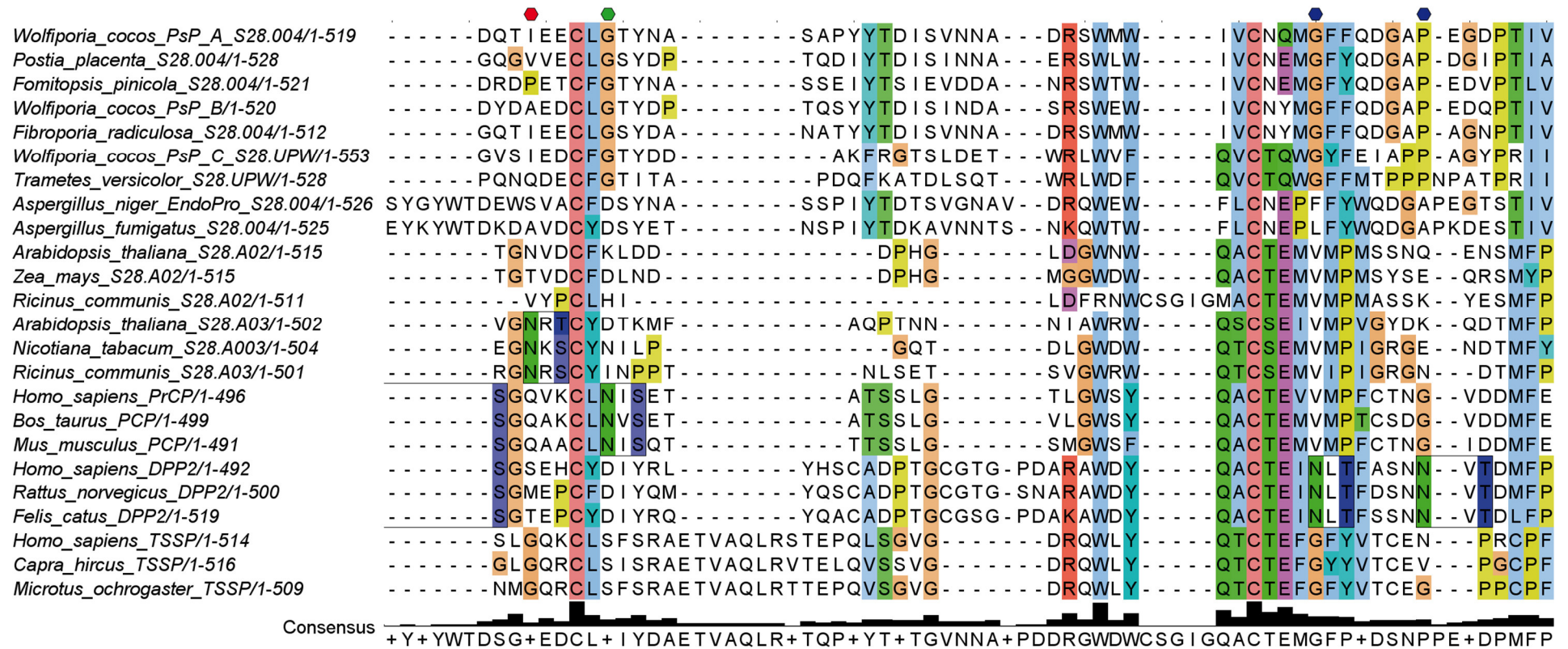


Fortsetzung Abb. A.2

Wolfiporia cocos_PsP_A_S28.004/1-519 A - - - - - GELTDLSFFEFCDALEVK - - - - - NGVSAGPE - - - - - GWGLDYALQAWGSYWNNTTFLPENY -
Postia placenta_S28.004/1-528 S - - - - - SELSDNAFFEFCDALEVK - - - - - DGENAPPPQ - - - - - GWGLEHALQAYGSWWTSTYYETICP -
Fomitopsis pinicola_S28.004/1-521 S - - - - - PARSGGVFYEFCDALEVK - - - - - DNQTAPEG - - - - - GWGLDHALPAWAQYWTDTYYPYLCD -
Wolfiporia cocos_PsP_B/1-520 D - - - - - SG-PDQQFFQFCDALEVK - - - - - DDVSAPAE - - - - - GWGLDHALNAWGTYWANTYYALICG -
Fibroporia radiculosa_S28.004/1-512 S - - - - - PELTDLSFFEFCDALEVK - - - - - DGVNAPTE - - - - - GWGLDYALQAWGSWWENDFLPSACE -
Wolfiporia cocos_PsP_C_S28.UPW/1-553 D - - - - - PTVGSTGFEEFCEALSKPLLGGSEIQETATTYNVETDMLTLPGGGLNVPLVVYNYARYIKEKFVSRCPD -
Trametes versicolor_S28.UPW/1-528 D - - - - - PAVGSTSFARFCAALGTP - - - - - DNATVHTVQ - - - - - GITVSNATFNAYTYINRTISRECQP -
Aspergillus niger_EndoPro_S28.004/1-526 A - - - - - TGYS - - SFFQFCDAVEGV - - - - - EGAAVTPGPE - - - - - GVGLEKALANYANWFNSTILPDYCAS
Aspergillus fumigatus_S28.004/1-525 V - - - - - SGYS - - RFYKFCDAVENV - - - - - TPGAHSVPGPE - - - - - GVGLEKALQGYASWFNSTYLPGSCAE
Arabidopsis thaliana_S28.A02/1-515 PYPADFMMLPLPGHPIREVCRKIDGA - - - - - GSNASILD - - - - - RIYAGISVYYNY - - - - -
Zea mays_S28.A02/1-515 PLPSEFLMPLPANPIKEVCRNIDSQ - - - - - PKGTGTLE - - - - - RIYAGVNVYYNY - - - - -
Ricinus communis_S28.A02/1-511 PYPAEFMMPLPGHPIREVTIFYF - - - - - STSKLS - - - - - HI - - - - -
Arabidopsis thaliana_S28.A03/1-502 G - - - - - PNFVWAKVCNAINAN - - - - - PPNRRYNLLD - - - - - RIFAGVVAL - - - - -
Nicotiana tabacum_S28.A003/1-504 P - - - - - PRYPVTVICGGIDGA - - - - - TNGSDVLD - - - - - RIFAGIVAY - - - - -
Ricinus communis_S28.A03/1-501 P - - - - - PTYPVNIICSGIDGA - - - - - A-SSSNDTLD - - - - - KIFAGVVAY - - - - -
Homo sapiens_PrCP/1-496 PYASNFLQPLPAWPIKVVCQYLKNP - - - - - NVSDSLLLQ - - - - - NIFQALNVYYNY - - - - -
Bos taurus_PCP/1-499 PYESNFLQPLPAWPKVVCQYFKYS - - - - - NVPDVTVMVQ - - - - - NIFQALNVYYNY - - - - -
Mus musculus_PCP/1-491 PYACNFLQPLPAWPIKEVCQYLKNP - - - - - NVSDTVLLQ - - - - - NIFQALSYYNY - - - - -
Homo sapiens_DPP2/1-492 PYPTDFLGPLPANPVKVGCDRLLSE - - - - - AQRIT - - - - - GLRALAGLVYNA - - - - -
Rattus norvegicus_DPP2/1-500 PYPTNFLGPLPANPVKVGCDRLLSE - - - - - GQRIM - - - - - GLRALAGLVYNS - - - - -
Felis catus_DPP2/1-519 PYPTDFIGHLPANPVKVGCDRLLSE - - - - - TQR IK - - - - - GLRALAGLVYNS - - - - -
Homo sapiens_TSSP/1-514 Q - - - - - TGAP - LSVRQLCGLLLGG - - - - - GGNRSHSTPYC - - - - - GLRRAVQIVLH - - - - -
Capra hircus_TSSP/1-516 Q - - - - - AGAP - LSVRQLCRFLLGDRGNC-RGNCSSGPAPYR - - - - - GLRRAVQVVTH - - - - -
Microtus ochrogaster_TSSP/1-509 Q - - - - - AGAP - LSVRQLCGLLLGD - - - - - SSNRSHSTPYL - - - - - GLRRAVQIVLR - - - - -

Consensus PYP+NFL+PLPA+PVKEFCDALEGGK++++E++NDSVTAPLETDMLTLPGGWGL+AALQAYNYWNSTYLP E+C++

Fortsetzung Abb. A.2

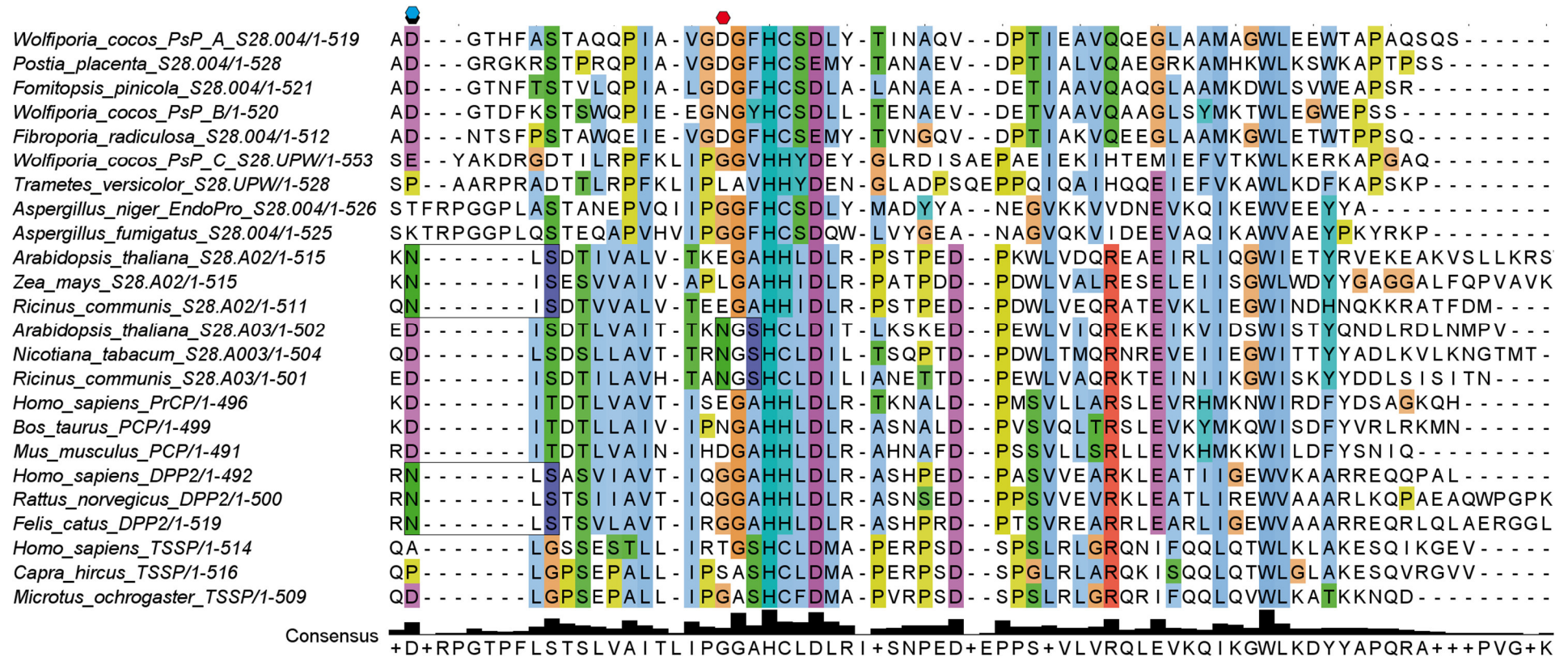


Fortsetzung Abb. A.2

Wolfiporia cocos_PsP_A_S28.004/1-519 SRLVLTALYNERQCTYYFPQ----AFSTPPTP---RVNETNKAYDGWFVQ-----SDRLFFGNGERDPWRDATIS
Postia_placenta_S28.004/1-528 SRLIQPIYEERQCTYYFPE----AFSTPPTP---QVNATNAAYHGWDVQ-----SERLFFGNGLRDPWRDATVS
Fomitopsis_pinicola_S28.004/1-521 SRLVNASYWERQCVLMFPE----AFSEPPPTP---RVNETNRAYDGWFVQ-----ADRLFFANGQNDPWRDATVS
Wolfiporia cocos_PsP_B/1-520 TRLVQPIYDERQCTYYFPE----QFSAPPTP---QVSVINADYDGWVYN-----VSRLLFFANGQRDPWREATVS
Fibroporia_radiculosa_S28.004/1-512 SRLIEPIYTERQCTYYFPE----AFSSPPTP---QVTWMNWEYEGWNVQ-----SDRLFFGNQGRDPWRDATVS
Wolfiporia cocos_PsP_C_S28.UPW/1-553 SNRLTLEYESKICRQAYPPGK--HFIVPPLP---NVTAVNV-LGDFDIA-----ADRLAII DGEVDPWRPDTPH
Trametes_versicolor_S28.004/1-528 SKLITQDYASLICKLAYDPGE--HFQVPEEP---DVEAVNK-LGGYSIA-----YDRLAII DGQDDPWRGDTPH
Aspergillus_niger_EndoPro_S28.004/1-526 PRLVSASYWQRQCPLYFPETNGYTYGSAK GK--NAA TVNSWTGGWDMT----RNTTRLIWTNGQYDPWRDSGVS
Aspergillus_fumigatus_S28.004/1-525 SRIVSAEYWQRQCCHAYFPEVNGYTFGSANGK--TAEDVNKWTKGWDLT----NTTRLI WANGQFDPWRDASVS
Arabidopsis_thaliana_S28.A02/1-515 GYGFNYSYKEECW-----N-TFRVNRPR-----KWVTTTEFGGHD IATTLKSFSGNI IFSNGLLDPWSGGSVL
Zea_mays_S28.A02/1-515 PYKFDYASYAEDCI-----K-SYGVRRPR-----KWITTEFGGHNITKVLENFSGNI IFFNGLLDPWSGGV L
Ricinus_communis_S28.A02/1-511 TYDFNYTSFEKQCW-----D-DFRVSRP-----RWIMTEFGGQDIKTSLEKFGSNI IFSNGLLDPWSGGSVL
Arabidopsis_thaliana_S28.A03/1-502 TAPFNMTSYIDGCK-----S-YHGVTRPR-----HWITTYFGIQEVKLI LQKFGSNI IFSNGLSDPYSVGGV L
Nicotiana_tabacum_S28.A003/1-504 SAPFSLDEFIEDCK-----R-DYGVSRPR-----HWVTTYGGGHD IKLILHRFASN IFSNGLRDPYSSAGV L
Ricinus_communis_S28.A03/1-501 PSPFDLNGYVQDCN-----A-IYGVRRPR-----HWVTTYGGGHS IKLILQRFSGNI IFSNGIRD PYSSGGV L
Homo_sapiens_PrCP/1-496 PHSWNLKELSDDCF-----Q-QWGVRRPR-----SWITTM YGGKNISS-----HTNIVFSNGELDPWSGGGV T
Bos_taurus_PCP/1-499 PHSWNMKEYSDDCF-----K-QWGVRRPR-----SWI PTMYGGKNISS-----HTN I IFSNGELDPWSGGGV T
Mus_musculus_PCP/1-491 PFLWDLEKYSNDCF-----N-QWGVKPRP-----HWMTTMYGGKNISS-----HSNI I IFSNGELDPWSGGGV T
Homo_sapiens_DPP2/1-492 DLPFTDELRQRYCL-----D-TWGVWPRP-----DWL L TSFWGGDLRA-----ASN I IFSNGNLDPWAGGGI R
Rattus_norvegicus_DPP2/1-500 EIPFSDELRQQYCL-----D-TWGVWPRP-----DWLQTSFWGGDLKA-----ASN I IFSNGDLDPWAGGGI Q
Felis_catus_DPP2/1-519 DLPFTEGLRQQYCL-----D-TWGVWPRR-----DWLRISFGAGDLKA-----ASN I IFSNGDLDPWAGGGI Q
Homo_sapiens_TSSP/1-514 SQLPALPSQLDLCE-----Q-VFGLSALSVAQAVAQTNSY YGGQTPG-----ANKVLFVNGDTPWHVLSVT
Capra_hircus_TSSP/1-516 SQLPALPSELELCE-----Q-VFGLSTSSVAQAVAQTNSY YGGQTPG-----ATQVLFVNGDTPWHVLSVT
Microtus_ochrogaster_TSSP/1-509 SQLPALPSQLNLCE-----Q-VFGLSAASVAQAVSQTNSY YGGQTPG-----ATQVLYVNGDTPWHVLSVT

Consensus
 SRLFNLEYERQCTYYFPEGN+YTFGVPPRPVAQ+V+WVNTYYGGWDIK+IL+RFASNI IFSNG+LDPW+GGGS

Fortsetzung Abb. A.2

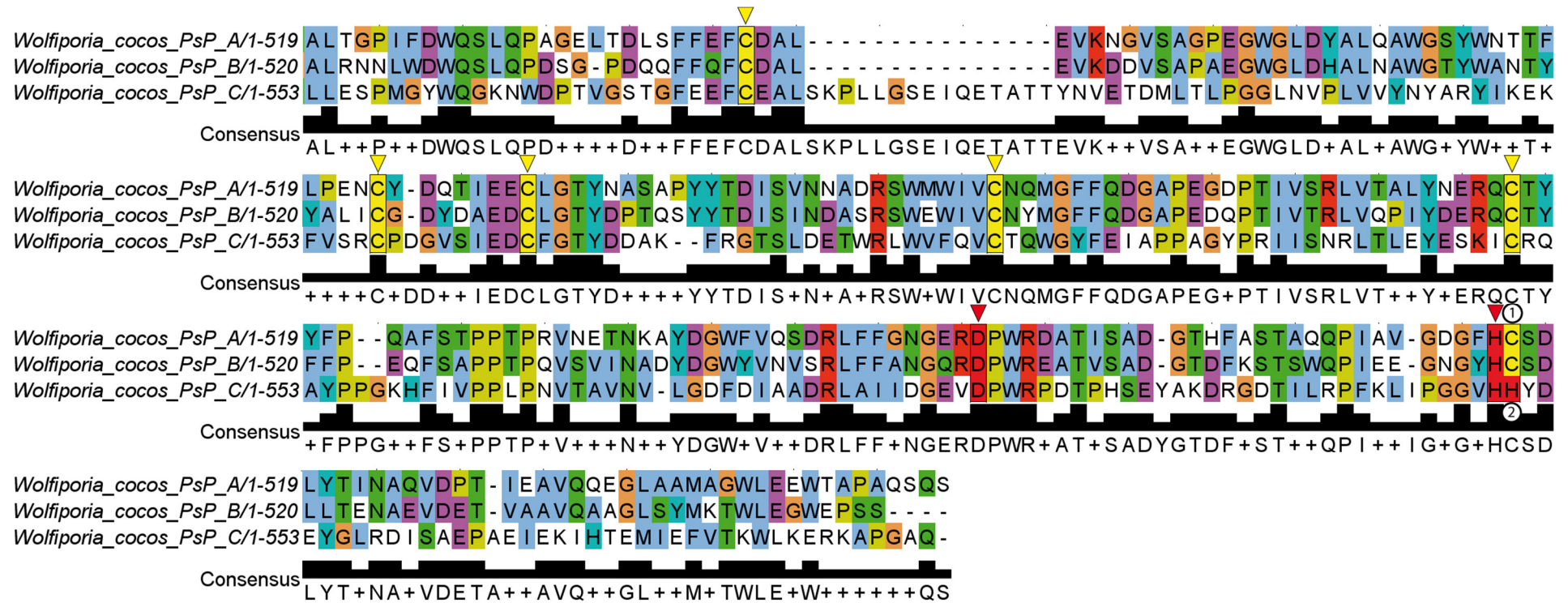


Fortsetzung Abb. A.2

A.3 Multisequenzalignment der verschiedenen PsPs aus *Wolfiporia cocos*



Abb. A.3: Multisequenzalignment der verschiedenen PsPs aus *Wolfiporia cocos* (PsP A bis PsP C). Die Aminosäuren der katalytischen Triade werden mit einem roten Dreieck markiert, die Cystenreste der Disulfidbrücken mit einem gelben. Die dem Histidin der katalytischen Triade benachbarte Cystein ist mit einer eingekreisten Eins bzw. das Histidin ist mit einer eingekreisten Zwei markiert



Fortsetzung Abb. A.3

A.4 Multisequenzalignment der PsP aus *Wolfiporia cocos* gegen EndoPro™ und Afu

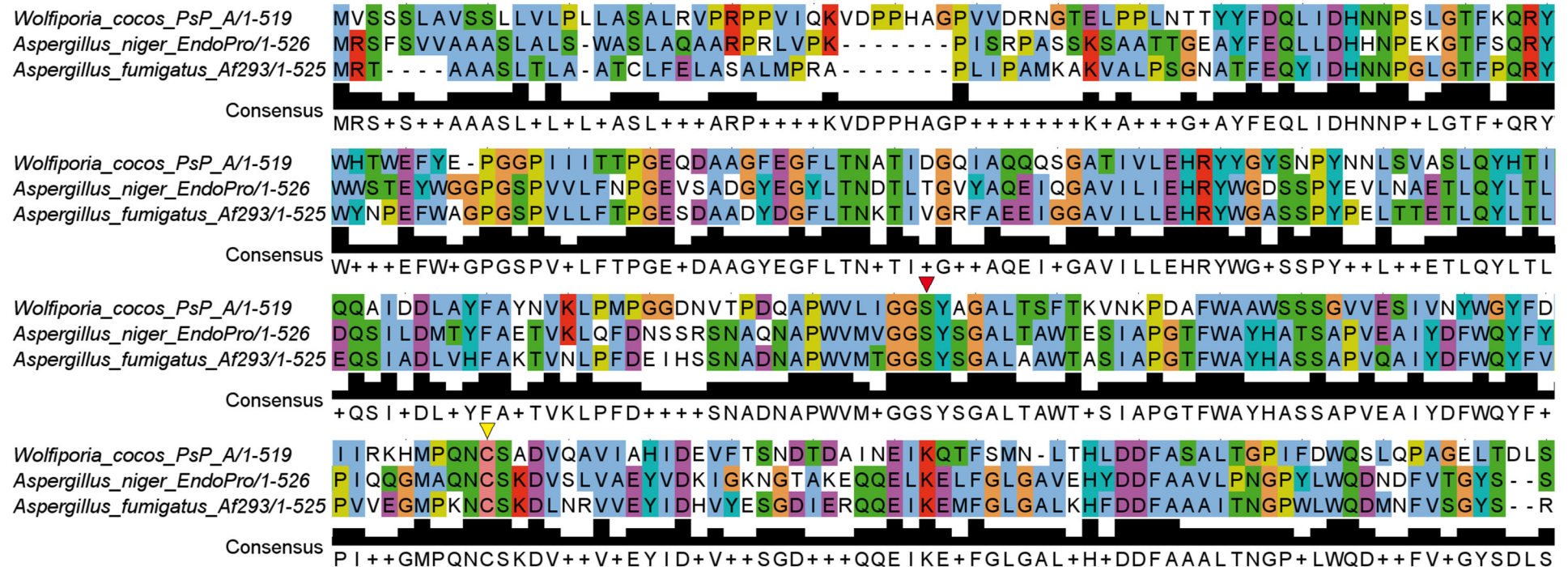
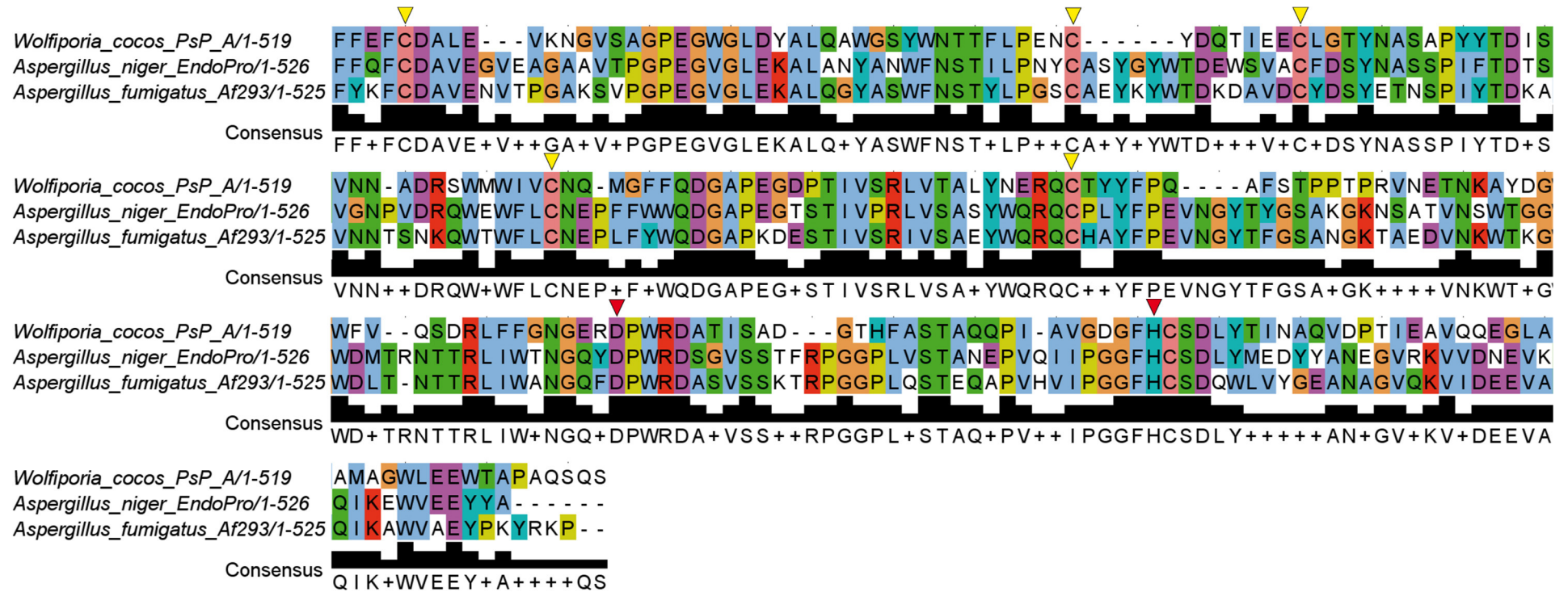


Abb. A.4: Multisequenzalignment der PsP A aus *Wolfiporia cocos*, sowie der EndoPro™ aus *Aspergillus niger* und der Afu aus *Aspergillus fumigatus*. Die Aminosäuren der katalytischen Triade werden mit einem roten Dreieck markiert, die Cystinreste der Disulfidbrücken mit einem gelben. Die dem Histidin der katalytischen Triade benachbarte Cystein ist mit einer eingekreisten Eins.



Fortsetzung Abb. A.4