

**Molekulare Charakterisierung lignocellulolytischer Enzyme  
aus dem Sekretom von *Pleurotus sapidus***

**Inauguraldissertation**

zur  
Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

— Dr. rer. nat. —

des Fachbereiches Biologie und Chemie, FB08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Dipl.-Biol. Christiane Lauber

Gießen, 2015

Dekan: Prof. Dr. H. Zorn

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

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

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

Gießen,

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## Danksagung

Professor Dr. Holger Zorn danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation an seinem Institut durchzuführen. Vielen Dank für die Bereitstellung des interessanten und vielseitigen Forschungsthemas, die wissenschaftliche Betreuung, das in mich gesetzte Vertrauen und die großzügigen Freiräume, um eigenständige wissenschaftliche Erfahrungen zu sammeln.

Professorin Dr. Sylvia Schnell danke ich für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens. Professor Dr. Siegfried Schindler und PD Dr. Gregor Meiss danke ich für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Bei allen Mitarbeitern und Ehemaligen des Institutes für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie bedanke ich mich für die gute und kollegiale Zusammenarbeit, das freundschaftliche Miteinander und die schönen gemeinsamen Fortbildungen. Ein herzlicher Dank gilt hier auch Professor Dr. Gerd Hamscher für die netten Gespräche.

Insbesondere bedanke ich mich bei den „Doktoranden der ersten Stunde“ für den engen Zusammenhalt! Der gemeinsame Aufbau des Instituts war eine abwechslungs- und lehrreiche Zeit. Dem harten Kern aus Labor und Büro – Alexander Heuger, Katharina Schmidt, Andrea Bosse, Katrin Kunkel, Stephanie Riemer und Falk Amelung – danke ich für die vielen anregenden Diskussionen, hilfreiche Tipps und den regen Austausch auch über die eigene Fachrichtung hinaus. Auch den „neuen“ Mädels – Vanessa Kleofas, Johanna Rost, Marina Rusch – danke ich für die vielen netten und motivierenden Gespräche. Vielen Dank Euch allen, dass ihr nicht nur Kollegen wart, sondern wir auch viele schöne gemeinsame Stunden außerhalb des Labors miteinander verbracht haben.

Juniorprofessor Dr. Martin Rühl danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen unseres gemeinsamen DBU-Projektes und die Lieferungen der schmackhaften Pilze.

Bei Professor Dr. Alfred Pingoud, Professor Dr. Peter Friedhoff und Dr. Wolfgang Wende bedanke ich mich für den freundlichen Empfang in meiner alten Heimat, dem Institut für Biochemie und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Ebenso bedanke ich mich bei unseren Projektpartnern Artes Biotechnology GmbH, Langenfeld für das Generieren der *Hansenula polymorpha*-Stämme und AB Enzymes, Darmstadt für die heterologe Expression in *Trichoderma reesei*. Insbesondere Herrn Dr. Manfred Suckow danke ich für die gute Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch. PD Dr. Günter Lochnit aus der Arbeitsgruppe Proteinanalytik des biochemischen Institutes der Justus-Liebig Universität danke ich für die Edman-Sequenzierung.

Meinen Eltern Dieter und Sigrid, meiner Schwester Martina, meiner Tante Annerose sowie Bernhard und Ingeborg Gerken, die sich durch das Fachchinesisch quälten, danke ich für das schnelle und sorgfältige Lesen meiner Arbeit und so manche Anregung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre tatkräftige Unterstützung. Ihr habt immer an mich geglaubt und hattet stets ein offenes Ohr für mich. Meiner Oma Theresia, danke ich für Ihre Liebe und Ihren guten Zuspruch! Ich vermisse Dich so sehr!

Christian danke ich für seine endlose Geduld, seine Unterstützung – vor allem bei meinem Kampf mit Latex. Danke, dass Du an meiner Seite bist!

## Veröffentlichungen

### Publikationen

**Zorn H, Lauber C<sup>‡</sup>, Lorenz P, Schüttmann I, Rühl M** (2012) Entwicklung eines Zwei-Enzym-Systems aus einer Peroxidase und einer Arylalkoholoxidase zum Aufschluss von Lignocellulosen. Chem-Ing-Tech 84, 8:1330

<sup>‡</sup> Erstautor

**Kieper J, Lauber C, Gimadutdinow O, Urbańska A, Cymerman I, Ghosh M, Szczesny B, Meiss G** (2010) Production and characterization of recombinant protein preparations of Endonuclease G-homologs from yeast, *C. elegans* and humans. Protein Express Purif 73:99–106

### Tagungsbeiträge

**Lauber C, Schüttmann I, Zorn H** (2011) cDNA Cloning, heterologous expression, and *in vitro* renaturation of an aryl-alcohol oxidase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. In: ECCE/ECAB, 1st European Congress of Applied Biotechnology, Berlin, 25.-29. September 2011

**Galperin I, Lauber C, Javeed A, Zorn H, Rühl M** (2014) Development of a two-enzyme system comprising of an aryl-alcohol oxidase and a dye-decolorising peroxidase. Microbiology and Infection 2014, 4. Gemeinsamer Kongreß von DGHM und VAAM, Dresden, 5.-8. Oktober 2014

**Duwe A, Tippkötter N, Wiesen S, Imami A, Lauber C, Zorn H, Ulber R** (2013) Biokatalytische Umsetzung von Lignocellulose: Einfluss von Esterasen und Peroxidasen auf die Hydrolysierbarkeit von Lignocellulose. In: Frühjahrstagung der Biotechnologen, Frankfurt a. M., 04.-05. März 2013

**Bosse AK, Köhler I, Lauber C, Fraatz MA, Honermeier B, Zorn H** (2012) Charakterisierung von geruchsaktiven Inhaltsstoffen von *Origanum vulgare*-Subspezies nach Extraktion mittels *Solvent Assisted Flavor Evaporation*. Lebensmittelchemie 66:117

Teile dieser Arbeit sind in Berichten zu den DBU-Forschungsprojekten

„Erstmaliger technischer Einsatz von Pilzsekretomen zur effizienten stofflichen Verwertung von Stroh- und Holzresten“ (Az. 13211-32)

„Entwicklung eines effizienten Zwei-Enzym-Systems aus einer Arylalkohol-Oxidase und einer Peroxidase zum umweltschonenden und sicheren Aufschluss von Lignocellulose“ (Az. 29938-32)

veröffentlicht.

## Zusammenfassung

Der Weißfäulepilz *Pleurotus sapidus* (PSA) sekretiert zahlreiche Enzyme, darunter ligninolytische Redoxenzyme und Hydrolasen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die codierenden DNA-Sequenzen einer Arylalkoholoxidase (AAO), einer Peroxidase vom DyP-Typ (DyP) und einer GDS(L)-Lipase aus dem Sekretom von PSA mit Hilfe von cDNA-Bibliotheken kloniert und sequenziert.

Die Arylalkoholoxidase wurde heterolog in *E. coli* exprimiert. Da das Enzym hauptsächlich in *inclusion bodies* abgelagert wurde, wurden mehrere Strategien angewandt, um aktives Enzym direkt in löslicher Form oder durch Rückfaltung aus den *inclusion bodies* zu gewinnen.

Die Fusion mit dem Löslichkeitsfördernden Maltose-Bindeprotein führte bei der Expression zu geringen Mengen löslichem, aber dennoch inaktivem Protein. Durch die Koexpression der Arylalkoholoxidase mit Chaperonen bei niedrigen Temperaturen wurden geringe Mengen des Proteins funktionell produziert. Mit den untersuchten Expressionssystemen wurden keine ausreichenden Mengen lösliche, aktive AAO gewonnen. Daher wurde das Enzym schließlich aus *inclusion bodies* durch Denaturierung gewonnen und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Das solubilisierte Enzym wurde *in vitro* durch blitzartige Verdünnung (*flash dilution*) in Rückfaltungspuffer renaturiert. Dabei wurden Aktivitätsausbeuten von  $\sim 190 \text{ U L}^{-1}$  erzielt. Die rückgefaltete, gereinigte AAO (AAO\*) wurde biochemisch charakterisiert sowie pH- und Temperatur-Optima bestimmt. Daneben wurden die kinetischen Parameter ( $K_m$  und  $k_{cat}$ ) sowie die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_m$ ) für verschiedene Substrate (Benzyl-, *p*-Anis-, Veratryl- und Zimtalkohol) bestimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine DyP-Typ Peroxidase aus einer *Pleurotus*-Art heterolog exprimiert. Die rekombinante Produktion erfolgte durch die Firma AB Enzymes in *Trichoderma reesei*. Für die Reinigung der DyP aus dem Kulturüberstand wurde eine FPLC-Methode etabliert. Das gereinigte Enzym wurde biochemisch charakterisiert und dessen kinetische Parameter für verschiedene Substrate bestimmt. Die rPsaDyP besitzt ein N-terminales Signalpeptid mit einer Länge von 62 Aminosäuren, das reife Enzym besteht somit aus 453 Aminosäuren. Das Enzym hat – vergleichbar zu anderen Peroxidasen dieser Familie – ein pH-Optimum im sauren Bereich und ist bei diesen Bedingungen über mehrere Stunden stabil. Der pI ist jedoch außergewöhnlich hoch und liegt im neutralen Bereich. Die rPsaDyP wird abhängig vom Substrat durch Wasserstoffperoxid bei vergleichsweise niedrigen Konzentrationen inhibiert. Die Analyse mittels *Blue Native PAGE* und Aktivitätsfärbung mit ABTS zeigte, ebenso wie die Gelfiltrationschromatographie, dass das aktive Enzym als Dimer (115 kDa) vorliegt. Die Untersuchung des Substratspektrums zeigte, dass das rekombinant produzierte Enzym neben einigen klassischen Peroxidase-Substraten auch natürliche Xanthophyllfarbstoffe abbaut.  $\beta$ -Carotin wurde durch die rPsaDyP in An- und Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  abgebaut, wobei die Enzymaktivität durch den Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gesteigert wurde. Dies deutet darauf hin, dass die rPsaDyP neben der Peroxidase auch eine Oxidasefunktion besitzt. Die rPsaDyP kann aufgrund ihrer hohen Affinität zu dem

Anthrachinonfarbstoff RB5, einem charakteristischen Substrat der DyP-Typ Peroxidasen, auch funktionell diesen Peroxidasen zugeordnet werden.

Aus den biochemischen und kinetischen Charakteristika der rekombinanten Arylalkoholoxidase und der rPsaDyP wurden Bedingungen für den Einsatz beider Enzyme in einem System abgeleitet. Die beiden Enzyme wurden kinetisch aufeinander abgestimmt und ein Zwei-Enzym-System etabliert. Dabei wurde das von der Arylalkoholoxidase bei der Oxidation von Veratrylalkohol zu Veratrumaldehyd produzierte  $H_2O_2$  von der Peroxidase verbraucht. Die untersuchten Modell-Verbindungen wurden im Zwei-Enzym-System effizient umgesetzt. Der Einsatz des Zwei-Enzym-Systems im Labormaßstab zur Oxidation von Ligninkomponenten (2,6-Dimethoxyphenol) und zur Bleichung von mit Annatto gefärbter Molke verlief erfolgreich.

Die in *Trichoderma reesei* exprimierte GDS(L)-Lipase (in Kooperation mit AB Enzymes) aus dem Sekretom von *Pleurotus sapidus* zeigt nur sehr geringe Homologien zu bereits charakterisierten Lipasen/Esterasen. Die katalytischen Eigenschaften des Enzyms wurden bestimmt und die Substratspezifität des Enzyms in Abhängigkeit von der Acyl-Kettenlänge verschiedener *p*-Nitrophenylester ermittelt. Aufgrund der höheren Aktivität gegenüber Substraten mit längeren Acyl-Ketten kann das Enzym funktionell den Lipasen zugeordnet werden. Untersuchungen der Hydrolyse von Ferulasäuremethylester und Ferulasäureestern von Polysacchariden zeigten eine geringe Umsetzung dieser Substrate. Daher ist die Art der Beteiligung dieser sekretierten Lipase am Abbau von Lignocellulosen noch unklar.

Eine Esterase aus dem Sekretom von *Pleurotus sapidus* wurde in *Hansenula polymorpha* heterolog in unlöslicher Form exprimiert. Durch denaturierende Solubilisierung und Rückfaltung wurde kein aktives Enzym gewonnen.

## Abstract

The basidiomycete *Pleurotus sapidus* (PSA) secretes numerous enzymes, comprising ligninolytic redox enzymes and various types of hydrolases. The coding DNA sequences of an aryl-alcohol oxidase (AAO), a dyp-type peroxidase (DyP) and a GDSL-like lipase from the secretome of PSA were cloned from cDNA libraries and sequenced.

Heterologous expression of the aryl-alcohol oxidase in *E. coli* led to a high level production of recombinant protein mainly in inclusion bodies. Several strategies were used to obtain the protein in a soluble, biologically active form directly or by refolding from inclusion bodies. The expression as fusion protein with maltose-binding protein (MBP), which promotes solubility, resulted in small amounts of soluble, but inactive protein. By coexpression with chaperones at low temperatures small amounts of protein were functionally expressed. Due to the low yield of active protein, the enzyme was extracted from inclusion bodies by denaturation and purified by affinity chromatography. Functional AAO (AAO<sup>\*</sup>) was prepared by refolding of the solubilized enzyme *in vitro* by flush dilution in refolding buffer. An activity yield up to 190 U L<sup>-1</sup> was obtained. The AAO<sup>\*</sup> was characterized and the kinetic constants for different substrates were determined.

For the first time, a dyp type peroxidase from a *Pleurotus* species was expressed heterologously. The enzyme was recombinantly produced in *Trichoderma reesei* by the company AB Enzymes. A method for purification of the rPsaDyP from culture supernatant of *Trichoderma reesei* was established. The enzyme was biochemically characterized and the kinetic parameters were determined. The rPsaDyP has an N-terminal signal peptide with a length of 62 amino acids. The mature enzyme is thus composed of 453 amino acids. The enzyme was comparable to other peroxidases of this family, relating to optimum pH in the acidic range and the stability at these conditions. However, the pI is exceptionally high. The enzyme is inhibited by hydrogen peroxide at relatively low concentrations, depending on the substrate used. Analysis by Blue Native PAGE and activity staining with ABTS, as well as gel filtration chromatography, showed the native dimeric state of the enzyme (115 kDa). Analysis of the substrate range revealed that the recombinant enzyme degrades, in addition to some classic peroxidase substrates, also natural xanthophylls.  $\beta$ -carotene was degraded in the presence and absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the rPsaDyP, although the enzyme activity was increased by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This indicates that the rPsaDyP has an oxidase function in addition to a peroxidase activity. Considering the high affinity to the specific substrate – the anthraquinone dye RB5 – the rPsaDyP belongs also functionally to the dyp-type peroxidase family.

Based on the biochemical and kinetic characteristics of the recombinant aryl-alcohol oxidase and the rPsaDyP, conditions for the application of both enzymes in one system were derived. The two enzymes were kinetically adjusted to each other and a two-enzyme system was established. Here, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by the AAO by oxidation of veratryl alcohol to veratraldehyde was used by the peroxidase, and the investigated model compounds were efficiently transformed in the two-enzyme system. The two-enzyme system was successfully used on laboratory scale

for the oxidation of lignocellulosic compounds (2,6-Dimethoxyphenole) and bleaching of annatto coloured whey.

The GDSL-like lipase from the secretome of *Pleurotus sapidus* expressed in *Trichoderma reesei* (in cooperation with AB Enzymes) shows only weak homologies to previously characterized lipases/esterases. The catalytic properties and the substrate specificity of the enzyme, depending on the acyl chain length of various *p*-nitrophenyl esters have been determined. Given the higher activity towards longer acyl chains, the enzyme belongs to the lipases. Studies of the hydrolysis of methyl ferulate and feruloylated carbohydrates showed a low conversion of these substrates. Consequently, the role of the secreted lipase in the degradation of lignocellulose is still unclear.

An esterase from the secretome of *Pleurotus sapidus* was expressed in *Hansenula polymorpha* heterologously in an insoluble form. Enzymatic activity was not obtained by denaturing solubilisation and refolding.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Biotechnologie . . . . .	1
1.2 Basidiomyceten . . . . .	3
1.3 Biotechnologische Nutzung von Basidiomyceten . . . . .	5
1.4 Zielsetzung . . . . .	7
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1 Material . . . . .	8
2.1.1 Geräte . . . . .	8
2.1.2 Chemikalien . . . . .	9
2.1.3 Substrate . . . . .	12
2.1.4 Größenstandards . . . . .	13
2.1.5 Kits . . . . .	13
2.1.6 Enzyme . . . . .	14
2.1.7 Oligonukleotide . . . . .	15
2.1.8 Vektoren . . . . .	16
2.1.9 Mikroorganismen . . . . .	18
2.1.10 Antikörper . . . . .	18
2.1.11 Datenbanken und Bioinformatiksoftware . . . . .	18
2.2 Mikrobiologische Methoden . . . . .	20
2.2.1 Kultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i> . . . . .	20
2.2.1.1 Nährmedien zur Anzucht von Basidiomyceten . . . . .	20
2.2.1.2 Stammhaltung . . . . .	21
2.2.1.3 Vorkultur . . . . .	21
2.2.1.4 Hauptkultur . . . . .	21
2.2.1.5 Induktion . . . . .	21
2.2.1.6 Bestimmung der Enzymaktivität während des Kulturverlaufs . . . . .	22
2.2.2 Kultivierung von <i>Hansenula polymorpha</i> . . . . .	22
2.2.2.1 Nährmedien zur Anzucht von <i>Hansenula polymorpha</i> . . . . .	22
2.2.2.2 Stammhaltung . . . . .	23

---

2.2.2.3	Kultivierung . . . . .	23
2.2.2.4	Glycerolkulturen von <i>Hansenula polymorpha</i> . . . . .	23
2.2.3	Kultivierung von Bakterienkulturen . . . . .	23
2.2.3.1	Mikroorganismen . . . . .	23
2.2.3.2	Nährmedien und Lösungen . . . . .	24
2.2.3.3	Antibiotika . . . . .	24
2.2.3.4	Induktoren . . . . .	25
2.2.3.5	TSS-Lösung . . . . .	25
2.2.3.6	Glycerolstock-Lösung . . . . .	25
2.2.3.7	Stammhaltung . . . . .	26
2.2.3.8	Übernacht-Kultur . . . . .	26
2.2.3.9	Herstellung TSS-kompetenter Zellen . . . . .	26
2.2.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit DNA . . . . .	26
2.2.4.1	Transformation TSS-kompetenter Zellen . . . . .	26
2.2.4.2	Herstellung von Zellen mit zwei Vektoren für die Koexpression . . . . .	27
2.2.5	Blau/Weiß-Screening . . . . .	27
2.2.6	Glycerolkulturen von <i>E. coli</i> . . . . .	27
2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	28
2.3.1	Isolierung genomischer DNA . . . . .	28
2.3.2	RNA-Isolierung . . . . .	28
2.3.3	Überprüfung der RNA-Stabilität . . . . .	28
2.3.4	Reverse Transkription (Erststrangsynthese) und cDNA-Synthese . . . . .	28
2.3.5	PCR . . . . .	30
2.3.5.1	Primerableitung . . . . .	30
2.3.5.2	Kolonie-PCR . . . . .	31
2.3.6	Klonierung und Modifikation von DNA . . . . .	32
2.3.6.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen . . . . .	32
2.3.6.2	TA-Klonierung . . . . .	32
2.3.6.3	Gensynthese . . . . .	34
2.3.6.4	Konstruktion von Expressionsvektoren . . . . .	34
2.3.6.5	DNA-Verdau mittels Restriktionsenzymen . . . . .	34
2.3.6.6	Sequentieller Verdau . . . . .	34
2.3.6.7	Restriktion mit FastDigest™ Enzymen . . . . .	35
2.3.6.8	Ligation . . . . .	35
2.3.7	Amplifikation und Isolierung von Plasmiden . . . . .	36
2.3.7.1	Sequenzierung . . . . .	36
2.3.8	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren . . . . .	37
2.4	Elektrophoresen . . . . .	37
2.4.1	Agarosegelelektrophorese . . . . .	37

---

---

2.4.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	38
2.4.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	38
2.4.2.2	Halbnative SDS-PAGE . . . . .	40
2.4.2.3	<i>Blue native</i> Gelelektrophorese . . . . .	40
2.4.2.4	<i>Clear native</i> Gelelektrophorese . . . . .	40
2.4.2.5	Isoelektrische Fokussierung . . . . .	41
2.4.2.6	Western Blot . . . . .	41
2.4.2.7	Immunodetektion . . . . .	42
2.4.2.8	Strippen und Rehybridisieren von Western Blots . . . . .	43
2.4.3	Färbungen . . . . .	44
2.4.3.1	Colloidal Coomassiefärbung . . . . .	44
2.4.3.2	Färbung für Häm- und Metallenzyme . . . . .	44
2.4.3.3	Aktivitätsfärbungen . . . . .	44
2.4.3.4	Aktivitätsfärbung mit ABTS . . . . .	45
2.4.3.5	Aktivitätsfärbung mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) . . . . .	45
2.4.3.6	Aktivitätsfärbung mit $\alpha$ -Naphthylacetat (Esterasefärbung) . . . . .	45
2.5	Proteinbiochemische Arbeiten . . . . .	46
2.5.1	Heterologe Expression . . . . .	46
2.5.1.1	Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i> . . . . .	46
2.5.1.2	Heterologe Expression in <i>Hansenula polymorpha</i> . . . . .	48
2.5.2	Methoden für den Zellaufschluss . . . . .	49
2.5.2.1	Mechanischer Zellaufschluss von Bakterien (Ultraschallaufschluss) . . . . .	49
2.5.2.2	Enzymatischer Zellaufschluss von Bakterien . . . . .	49
2.5.2.3	Osmotischer Zellaufschluss von Bakterien . . . . .	50
2.5.2.4	Mechanischer Zellaufschluss von Hefen (Glasperlenaufschluss) . . . . .	50
2.5.2.5	Mechanischer Aufschluss von <i>Pleurotus sapidus</i> (Mörsern) . . . . .	50
2.5.3	Konzentrierung und Umpufferung . . . . .	50
2.5.4	Proteinreinigung . . . . .	51
2.5.4.1	Native Reinigung über Ni <sup>2+</sup> -Affinitätschromatographie . . . . .	51
2.5.4.2	Denaturierende Reinigung mittels Ni <sup>2+</sup> -Affinitätschromatographie . . . . .	52
2.5.4.3	Amylose-Affinitätschromatographie . . . . .	53
2.5.4.4	Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) . . . . .	54
2.5.4.5	Hydrophobe Interaktionschromatographie . . . . .	55
2.5.4.6	Ionenaustauschchromatographie . . . . .	56
2.5.4.7	Scale up der zweistufigen Reinigung . . . . .	57
2.5.5	Gelfiltrationschromatographie (GFC) . . . . .	60
2.5.6	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	61
2.5.6.1	Proteinquantifizierung mittels Absorptionsmessung . . . . .	61
2.5.6.2	Proteinquantifizierung nach Bradford . . . . .	62

---

---

2.5.7	UV/Vis-Spektroskopie . . . . .	62
2.5.8	Bestimmung der Reinheitszahl . . . . .	62
2.5.9	Rückfaltung der Arylalkoholoxidase . . . . .	63
2.5.9.1	Bestimmung der Rückfaltungseffizienz . . . . .	63
2.5.10	Rückfaltung der Esterase . . . . .	63
2.5.11	N-terminale Sequenzierung mittels Edman-Abbau . . . . .	64
2.5.12	Deglykosylierung . . . . .	64
2.6	Photometrische Enzymassays . . . . .	65
2.6.1	Verwendete Puffer . . . . .	66
2.6.2	Bestimmung der Arylalkoholoxidase-Aktivität . . . . .	68
2.6.2.1	Optimierter AAO-Assay . . . . .	68
2.6.3	Bestimmung der Peroxidase-Aktivität . . . . .	69
2.6.3.1	Übersicht über die verwendeten Substrate . . . . .	69
2.6.3.2	Übersicht über die verwendeten Assays . . . . .	70
2.6.4	Optimierung der Assaybedingungen . . . . .	71
2.6.4.1	Bestimmung des optimalen Puffers und des pH-Optimums . . . . .	71
2.6.4.2	Bestimmung der optimalen Pufferkonzentration . . . . .	71
2.6.4.3	Temperaturoptimum . . . . .	71
2.6.4.4	Enzymaktivität in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidkonzentration . . . . .	72
2.6.4.5	Sauerstoffkonzentration im Puffer . . . . .	72
2.6.4.6	Einfluss der Pipettierreihenfolge . . . . .	72
2.6.5	Untersuchung der Enzymstabilität . . . . .	73
2.6.5.1	Salztoleranz . . . . .	73
2.6.5.2	Lagerstabilität . . . . .	73
2.6.5.3	Stabilität unter Assaybedingungen . . . . .	73
2.6.6	Bestimmung der kinetischen Parameter $K_m$ und $k_{cat}$ . . . . .	74
2.6.6.1	Enzymkinetiken der Arylalkoholoxidase . . . . .	75
2.6.6.2	Enzymkinetiken der rPsaDyP . . . . .	76
2.6.7	Bestimmung der Aktivität der rPsaDyP gegenüber weiteren Substraten . . . . .	76
2.6.7.1	Einfluss von Mangansulfat . . . . .	76
2.6.7.2	Oxidation von Mangan(II)-Ionen . . . . .	77
2.6.7.3	Umsetzung von Adlerol . . . . .	77
2.6.8	Entwicklung eines Zwei-Enzym-Systems . . . . .	78
2.6.8.1	Bleichung von Molke . . . . .	79
2.6.9	Assays für die Bestimmung der Lipaseaktivität . . . . .	79
2.6.9.1	Lipaseaktivitätstest . . . . .	80
2.6.10	Esterase-Assay . . . . .	80
2.6.10.1	Photometrischer Assay zur Bestimmung der Feruloylsterase-Aktivität . . . . .	81
2.6.11	Assay zum Nachweis der Feruloylsterase-Aktivität . . . . .	81

---

2.6.12	Assay zur Aktivitätsbestimmung der Feruloylsterase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	82
2.7	Sterilisation und Entsorgungshinweise	83
2.7.1	Sterilisation von Arbeitsmaterialien	83
2.7.2	Sterilisation von S1-Abfällen	83
2.7.3	Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien	83
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>84</b>
3.1	Molekulare Identifizierung des verwendeten Pilzes	85
3.2	cDNA-Bibliothek	86
3.2.1	Induktion	86
3.2.1.1	Arylalkoholoxidase	86
3.2.1.2	Lipase	87
3.2.1.3	DyP-Typ Peroxidase	87
3.2.2	RNA-Isolierung und Überprüfung der RNA-Qualität	88
3.2.3	Synthese der cDNA	88
3.3	Arylalkoholoxidase	89
3.3.1	Isolierung der cDNA einer Arylalkoholoxidase aus der cDNA-Bibliothek von <i>Pleurotus sapidus</i>	89
3.3.1.1	Ableiten der Primer	89
3.3.1.2	Amplifizierung und Klonierung der cDNA der Arylalkoholoxidase	90
3.3.2	Bioinformatische Analyse der AAO-Sequenz	91
3.3.2.1	Berechnung eines Strukturmodells für die Arylalkoholoxidase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	94
3.3.3	Klonierung der AAO-Sequenz in Expressionsvektoren	96
3.3.4	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	98
3.3.4.1	Heterologe Expression als His <sub>6</sub> -Arylalkoholoxidase	98
3.3.4.2	Heterologe Expression als MBP-Arylalkoholoxidase	98
3.3.4.3	Kälteschockexpression mit pColdI	101
3.3.4.4	Koexpression mit Chaperonen	102
3.3.5	Heterologe Expression in <i>Hansenula polymorpha</i>	105
3.3.6	Reinigung der rekombinanten Arylalkoholoxidase ( <i>E. coli</i> )	106
3.3.6.1	Reinigung der löslich exprimierten Arylalkoholoxidase	106
3.3.6.2	Denaturierende Reinigung aus <i>inclusion bodies</i>	106
3.3.7	Rückfaltung	107
3.3.7.1	Bestimmung der Rückfaltungseffizienz	109
3.3.8	Biochemische Charakterisierung	110
3.3.8.1	Bestimmung des pH-Optimums	110
3.3.8.2	Bestimmung des Temperaturoptimums	111
3.3.8.3	Bestimmung der kinetischen Parameter $K_m$ und $k_{cat}$	111
3.4	DyP-Typ Peroxidase	113

---

3.4.1	Isolierung und Klonierung der codierenden Sequenz der PsaDyP . . . . .	113
3.4.2	Bioinformatische Analyse der cDNA-Sequenz . . . . .	115
3.4.2.1	Berechnung eines Strukturmodells für die DyP-Typ Peroxidase . . . . .	116
3.4.2.2	Phylogenetische Einordnung . . . . .	118
3.4.3	Heterologe Expression . . . . .	119
3.4.4	Reinigung . . . . .	120
3.4.4.1	Vorversuche . . . . .	120
3.4.5	Messung der Enzymaktivität . . . . .	122
3.4.5.1	Validität der Enzymtests . . . . .	122
3.4.5.2	Einfluss von Ammoniumsulfat und Natriumchlorid . . . . .	124
3.4.5.3	Lagerstabilität . . . . .	125
3.4.5.4	UV/Vis-Spektrum . . . . .	126
3.4.6	Scale-up . . . . .	126
3.4.6.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie . . . . .	127
3.4.6.2	Ionenaustauschchromatographie . . . . .	127
3.4.6.3	Quantifizierung der gereinigten rPsaDyP . . . . .	131
3.4.7	Proteinbiochemische Charakterisierung der gereinigten DyP-Typ Peroxidase .	132
3.4.7.1	Bestimmung der nativen Konformation . . . . .	132
3.4.7.2	Bestimmung des isoelektrischen Punktes . . . . .	134
3.4.7.3	Glykosylierung . . . . .	135
3.4.7.4	N-terminale Sequenzierung mittels Edman-Abbau . . . . .	136
3.4.8	Optimierung der Reaktionsbedingungen . . . . .	137
3.4.8.1	Auswahl eines geeigneten Reaktionspuffers . . . . .	137
3.4.8.2	Bestimmung des pH-Optimums . . . . .	139
3.4.8.3	Bestimmung der optimalen Pufferkonzentration . . . . .	140
3.4.8.4	Bestimmung des Temperaturoptimums . . . . .	141
3.4.8.5	Einfluss der Wasserstoffperoxidkonzentration . . . . .	141
3.4.8.5.1	Einfluss der Pipettierreihenfolge . . . . .	142
3.4.8.6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Gehalt der $\beta$ -Carotin-Stammlösung . . . . .	143
3.4.8.7	Einfluss von O <sub>2</sub> . . . . .	144
3.4.9	Stabilität des Enzyms unter Reaktionsbedingungen . . . . .	145
3.4.9.1	Stabilität des reinen Enzyms in verdünnten Lösungen . . . . .	145
3.4.9.2	pH-Stabilität . . . . .	146
3.4.9.3	Temperaturstabilität . . . . .	148
3.4.9.4	Lösungsmitteltoleranz . . . . .	149
3.4.10	Bestimmung der kinetischen Parameter der rPsaDyP . . . . .	150
3.4.10.1	Untersuchung des Substratspektrums . . . . .	150
3.4.10.2	Enzymkinetik . . . . .	151
3.4.10.3	Einfluss von Mn <sup>2+</sup> . . . . .	154

---

3.4.10.4	Umsetzung von Adlerol	154
3.5	Entwicklung eines Zwei-Enzym-Systems	155
3.5.1	Kinetische Abstimmung der AAO* und DyP-Typ Peroxidase	155
3.5.2	Oxidation von DMP mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems	157
3.5.3	Oxidation von ABTS mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems	159
3.5.4	Abbau von Annatto mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems	160
3.5.5	Bleichung von Molke mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems	162
3.6	GDS(L)-Lipase	163
3.6.1	Amplifizierung und Isolierung der codierenden Sequenz einer GDS(L)-Lipase	163
3.6.2	Bioinformatische Analyse der cDNA-Sequenz	164
3.6.3	Heterologe Expression	166
3.6.4	Proteinbiochemische Charakterisierung der rekombinanten GDS(L)-Lipase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	167
3.6.5	Bestimmung des optimalen Puffers	168
3.6.6	Untersuchung der Substratspezifität	169
3.6.7	Untersuchung auf Feruloylsteraseaktivität	169
3.7	Feruloylsterase	171
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>173</b>
4.1	<i>Pleurotus sapidus</i>	174
4.2	Arylalkoholoxidase	175
4.2.1	Sequenz- und modellorientierte Analyse der AAO-Sequenz	176
4.2.2	Heterologe Expression der Arylalkoholoxidase in <i>E. coli</i>	179
4.2.3	Expression der Arylalkoholoxidase mit His-tag	179
4.2.4	Expression als Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP)	180
4.2.5	Expression bei niedrigen Temperaturen	181
4.2.6	Koexpression mit Chaperonen	182
4.2.7	Reinigung der <i>in vivo</i> produzierten löslichen Arylalkoholoxidase	185
4.2.8	Nutzung eines eukaryotischen Wirtes für die rekombinante Expression	185
4.2.9	Rückfaltung der Arylalkoholoxidase aus <i>inclusion bodies</i>	186
4.2.9.1	Rückfaltung durch blitzartige Verdünnung	187
4.2.10	Nachweis mittels polyklonalem Antikörper	188
4.2.11	Biochemische Charakterisierung	189
4.2.12	Substratspezifität	189
4.3	DyP-Typ Peroxidase	192
4.3.1	Sequenz- und modellorientierte Analyse der DyP-Typ Peroxidase	193
4.3.1.1	Ermittlung einer Signalsequenz	196
4.3.1.2	Katalysemechanismus	197
4.3.1.3	Berechnung eines Strukturmodells	199

---

---

4.3.2	Heterologe Expression in <i>Trichoderma reesei</i> . . . . .	199
4.3.2.1	Ermittlung des Glykosylierungsgrades und des N-Terminus der rPsaDyP . . . . .	200
4.3.3	Etablierung einer geeigneten Reinigungsmethode . . . . .	201
4.3.4	Bestimmung der nativen Konformation . . . . .	203
4.3.5	Biochemische Charakterisierung . . . . .	204
4.3.5.1	Bestimmung optimaler Reaktionsbedingungen . . . . .	206
4.3.5.2	Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Enzymaktivität . . . . .	207
4.3.5.3	Untersuchung des Substratspektrums und Bestimmung der kinetischen Parameter . . . . .	210
4.3.5.4	Abbau von $\beta$ -Carotin und Xanthophyllen . . . . .	213
4.4	Zwei-Enzym-System . . . . .	216
4.4.1	Bleichung von Molke mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems . . . . .	218
4.4.2	Abbau von Lignocellulosen aus nachwachsenden Rohstoffen mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems . . . . .	219
4.5	GDS(L)-Lipase . . . . .	220
4.5.1	Sequenz- und strukturbasierte Analyse der klonierten Lipase . . . . .	220
4.5.2	Kulturverlauf und Induktionseffekt verschiedener Kohlenstoffquellen . . . . .	225
4.5.3	Heterologe Expression . . . . .	225
4.5.4	Biochemische Charakterisierung der GDS(L)-Lipase . . . . .	226
4.5.5	Mögliche Rolle der GDS(L)-Lipase bei der Degradation von Lignocellulose . . . . .	226
4.6	Feruloyl-esterase . . . . .	228
4.6.1	Solubilisierung . . . . .	228
4.6.2	Rückfaltung . . . . .	229
<b>5</b>	<b>Ausblick</b> . . . . .	<b>231</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b> . . . . .	<b>233</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> . . . . .	<b>259</b>
7.1	Adaptierte Sequenz der Arylalkoholoxidase . . . . .	259
7.2	Vektorkarten . . . . .	260
7.2.1	Vektoren für die heterologe Expression der Arylalkoholoxidase in <i>E. coli</i> . . . . .	260
7.2.2	Vektoren für die heterologe Expression der Arylalkoholoxidase in <i>Hansenula polymorpha</i> . . . . .	261
7.2.3	Konstrukte für die heterologe Expression der rPsaDyP und der GDS(L)-Lipase in <i>Trichoderma reesei</i> . . . . .	262
7.2.4	Vektor für die heterologe Expression der Esterase aus <i>Pleurotus sapidus</i> . . . . .	263
7.3	Größenstandards . . . . .	264
	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> . . . . .	<b>265</b>

---

# Abkürzungsverzeichnis

## Symbole

$\Delta$	Differenz
$\varepsilon_{x \text{ nm}}$	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei x nm
% (w/v)	% Gewicht pro Volumen
% (v/v)	% Volumen pro Volumen
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<b>A</b>	
AAO	Arylalkoholoxidase
ABTS	Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<b>B</b>	
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
<b>C</b>	
CBD	Cellulose-Bindungsdomäne
cDNA	komplementäre DNA
<b>D</b>	
d	Tage
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DBM	Dinukleotid-Bindungsmotiv
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxribonukleinsäure

---

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
DyP	<i>dye decolorizing peroxidases</i> (Farbstoff entfärbende Peroxidasen)
<b>E</b>	
EBI	European Bioinformatics Institute
EC	EC-Nummern (engl. <i>Enzyme Commission numbers</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESI-MS	Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie
<b>F</b>	
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FE	Flächeneinheiten
FF	<i>fast flow</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
<b>G</b>	
GFC	Gelfiltrationschromatographie
GMC	Glucose-Methanol-Cholin
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
<b>H</b>	
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>I</b>	
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	<i>ion exchange chromatography</i> , Ionenaustauschchromatografie
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer Region</i>
<b>K</b>	
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

---

**L**

LB	<i>lysogeny broth</i>
LD-PCR	<i>Long-Distance-PCR</i>
LEW	Lysis-, Equilibrierungs- und Wasch-Puffer
LiP	Ligninperoxidase

**M**

MBP	Maltose-Binde-Protein
MCS	<i>multiple cloning site</i> , Polylinker
MnP	Manganperoxidase
MOPS	3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> , Ausschlussgrenze

**N**

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NI	nach Induktion
NTA	Nitrilotriessigsäure
NWE	Normalwasserstoffelektrode

**O**

OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
-------------------	--

**P**

p.a.	<i>pro analysi</i> , zur Analyse
pAB	<i>polyclonal anti body</i> , polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglykol
Pfam	Datenbank für <i>protein families</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>
PsaDyP	DyP-Typ Peroxidase aus <i>Pleurotus sapidus</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid

**R**

RB5	Reactive Blue 5
RBlack5	Reactive Black 5
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RZ	Reinheitszahl

**S**

S	Svedberg
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SNL	Standardnährlösung
SNL-H	Standardnährlösung mit Hefeextrakt
SP-Sepharose	Sulphopropyl-Sepharose

**T**

TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered Saline</i> , Tris gepufferte Salzlösung
TBST	<i>TRIS-buffered-saline-Tween</i> , TRIS gepufferte Salzlösung mit Tween
TCEP	TRIS(2-chlorethyl)phosphat
TED	TRIS(carboxymethyl)ethylendiamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	C,C,C-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglykol
TSS	<i>Transformation and Storage solution</i>
Tween <sup>®</sup> 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
Tween <sup>®</sup> 80	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat

**U**

U	<i>Units</i> , Enzymeinheit
UV	Ultraviolett

**V**

VAST	<i>Vector Alignment Search Tool</i>
VE	vollentsalzt
VI	vor Induktion
Vis	<i>visible</i>
Vol.	Volumenanteil
VP	versatile Peroxidase

**W**w/o                    *without, ohne***X**X- $\beta$ -Gal            5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid**Y**YNB-G                *Yeast Nitrogen Base mit Glycerol*YPD                    *Yeast Peptone Dextrose*

Die Bezeichnung der Aminosäuren erfolgte nach dem internationalen Ein- bzw. Dreibuchstaben-code. Eine Zahl hinter der Aminosäure kennzeichnet ihre Position innerhalb der Primärsequenz.

# 1 Einleitung

Die Bevölkerung der Erde wird bis zum Jahr 2025 um ~20% auf etwa acht Milliarden Menschen anwachsen (Di Rossetti Valdalbero 2009). Dieses Wachstum und die Entwicklung der Industrie- und Schwellenländer führen zu einem zunehmenden Energie- und Rohstoffbedarf (Keim 2010). Von zentraler Bedeutung sind dabei fossile Rohstoffe, da sie als Ausgangsstoff für viele Industrien und den Energiesektor dienen. Allerdings sind die Vorräte dieser Rohstoffe endlich und es kann nicht exakt vorhersagt werden, zu welchem Zeitpunkt sie aufgebraucht sein werden (Shafiee und Topal 2009). Außerdem forciert die Verwendung fossiler Energieträger langfristig den Klimawandel (Grubb 2001). Daher hat die Etablierung einer Wirtschaft auf Basis von Biomasse das Potential, ein nachhaltiges System mit Energie- und Rohstoffsicherheit zu bilden (Gerngross und Slater 2000).

## 1.1 Biotechnologie

Wichtige Faktoren, die die Verwendung von Biomasse in der chemischen Industrie attraktiv machen, sind neben der Verknappung von Rohstoffen vor allem bedeutende Fortschritte bei biotechnologischen Verfahren (Haas und Skerra 2008). Die moderne industrielle Biotechnologie – auch weiße Biotechnologie genannt – umfasst die Herstellung einer Vielzahl unterschiedlicher chemischer Produkte mit Hilfe von lebenden Zellen und Enzymen (Biokatalysatoren) und bietet alternative Syntheseverfahren zu petrochemischen Prozessen (Frazzetto 2003). Dabei ermöglichen Enzym basierte Prozesse neue Reaktionswege sowie Produkte und bieten enorme Chancen für die Industrie. Der Bedarf an neuen Enzymen für die Biotechnologie wächst daher schnell und stetig (Liese *et al.* 2006, Mendonça Maciel *et al.* 2010).

Obwohl die Biotechnologie sehr jung scheint, ist sie keine neue Wissenschaft. Die ersten biotechnologischen Verfahren nutzten unbewusst Mikroorganismen bzw. biologische Prozesse. Alkoholische Getränke, die aus der spontanen Vergärung zuckerhaltiger Säfte entstanden, sind wahrscheinlich die ältesten, seit 8000 Jahren bekannten biotechnischen Produkte (Ulber und Soyez 2004). Die moderne Biotechnologie hingegen nutzt gezielt Methoden der Gentechnik wie metabolisches Design oder Proteindesign (Gavrilescu und Chisti 2005) und wird heute bei der Produktion und Verarbeitung vieler Lebensmittel eingesetzt. Aber auch bei der Produktion hochwertiger Chemikalien, Enzyme, Vitamine, Wasch- und Reinigungsmittel, sowie Agrochemikalien und in der Kosmetikindustrie wird sie verwendet (Oertel 2007).

Biotechnologische Verfahren haben gegenüber chemischen Verfahren vielfältige Vorteile: Sie benötigen keine fossilen Rohstoffe, die Prozesse laufen oftmals unter milden, umweltschonenderen Bedingungen mit geringerem Energieverbrauch ab und die Menge an Schadstoffen und nicht recycelbaren Abfallstoffen wird minimiert (Festel *et al.* 2004, Gavrilesco und Chisti 2005). So hat die biobasierte industrielle Biotechnologie das Potential, erhebliche Mengen CO<sub>2</sub> einzusparen und negative Umwelteinflüsse zu reduzieren (Bang *et al.* 2009). Die biotechnologische Nutzung von Biomasse ist dabei von besonderem Interesse. Bis zum frühen 19. Jahrhundert waren erneuerbare Rohstoffe die wichtigste Quelle für Energie und Werkstoffe, wurden dann aber durch die günstigeren fossilen Rohstoffträger abgelöst. Heute wird Biomasse für die chemische Industrie wieder wirtschaftlich attraktiver (Diercks *et al.* 2008, Elliott 2004).

Biomasse stammt aus erneuerbaren Quellen und bezeichnet die biologisch abbaubaren Teile von Erzeugnissen und Abfällen der Land- und Forstwirtschaft, sowie die biologisch abbaubaren Reststoffströme der Industrie und der kommunalen Abfälle (Heinimö und Junginger 2009). Pflanzen bilden mit  $2 \times 10^{12}$  Tonnen den Hauptteil der Biomasse auf der Erde. Die nachwachsenden Rohstoffe belaufen sich auf rund  $10^{11}$  Tonnen Kohlenstoff pro Jahr (Narayan 2007). Den Hauptteil der Trockenmasse von Pflanzen bildet die Zellwand, die hauptsächlich aus Lignocellulose besteht (Kirk und Farrell 1987) und so eine nahezu unerschöpfliche Quelle nachwachsender Rohstoffe darstellt (Bouws *et al.* 2008, Sánchez 2009).

Lignocellulosen sind strukturell vielfältige Substanzen, deren Zusammensetzung je nach Herkunft der Biomasse variiert (Malherbe und Cloete 2002, McKendry 2002). Sie sind hauptsächlich aus drei polymeren Komponenten aufgebaut: Cellulose und Hemicellulose, die aus verschiedenen Zuckern zusammengesetzt sind und Lignin, einem Polymer aus aromatischen Substanzen (Higuchi 1997). Cellulose ist ein lineares, hochgeordnetes Polymer aus Cellobiose, das ungefähr 50% des Holzgewichtes ausmacht. Dagegen ist Lignin ein dreidimensionales Netzwerk aus Phenylpropaneinheiten, den Monolignolen, die von den entsprechenden *p*-Hydroxycimt-Alkoholen abgeleitet sind: *p*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapyl-Alkohole (Sarkanen und Ludwig 1971). Der Abbau von Lignocellulose ist der zentrale Schritt des Kohlenstoffkreislaufes an Land (Kirk und Farrell 1987). Die biotechnologische Integration natürlicher Abbaumechanismen ist entscheidend für die Realisierung nachhaltiger Bioraffineriekonzepte. Dabei sollen Bioraffinerien auf Basis einer nachhaltigen und umweltschonenden Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen schrittweise die petrochemischen Raffinerien ersetzen (Hasunuma *et al.* 2013). Wichtige Rohstoffquellen sind zum Beispiel Stroh, Zuckerrüben, Raps, Soja oder Mais (Roberto *et al.* 2003, Sharma *et al.* 2004). Daraus werden über verschiedene Verfahren Präkursoren wie etwa Stärke, Cellulose, Lignin, Fette oder Öle gewonnen.

In verschiedenen Bioraffineriekonzepten werden durch enzymatische Spaltung aus Cellulose vor allem Glucose und Cellobiose sowie aus Hemicellulose verschiedene Pentosen (v.a. Xylose) und Hexosen gewonnen. Diese werden entweder direkt für die Herstellung von Plattformchemikalien oder für die Produktion von Biokraftstoffen weiterverwendet (Braun *et al.* 2006, Fu *et al.* 2010). In anderen Bioraffineriekonzepten wird Lignin oxidativ abgebaut und Monolignole für die

Herstellung einer Vielzahl von Makromolekülen und Feinchemikalien gewonnen (Menon und Rao 2012). So findet Lignin Verwendung als Biowerkstoff in der Automobil- und Verpackungsindustrie sowie bei der Herstellung von Möbeln, Spielzeugen, Musikinstrumenten und Schuhen. Die Firma *Tecnaro* GmbH produziert beispielsweise einen Werkstoff auf Ligninbasis, der thermoplastisch formbar ist und mit etablierten Kunststoffverarbeitungsverfahren bearbeitet werden kann. Dieser stellt eine Alternative zu herkömmlichen Kunststoffen dar und ist vollständig biologisch abbaubar.

Viele Mikroorganismen sind in der Lage, Cellulose und Hemicellulose als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Lignin hingegen ist chemisch inert und wegen seiner komplexen Struktur vor dem Abbau durch die meisten Mikroorganismen geschützt. Zudem kann Lignin nicht hydrolytisch gespalten werden, sondern wird durch einen oxidativen Angriff abgebaut (Hofrichter 2001). Zu den wenigen Organismen, die in der Lage sind Lignocellulosen enzymatisch zu zersetzen oder zu modifizieren, gehören Asco- und Basidiomyceten. Daher sind sie in den Fokus der Forschung gerückt (Eriksson *et al.* 1990).

## 1.2 Basidiomyceten

Beliebte Speisepilze wie der Kulturchampignon (*Agaricus bisporus*), der Austernseitling (*Pleurotus ostreatus*) und der Shiitake-Pilz (*Lentinula edodes*) gehören zu den bekanntesten Vertretern der Basidiomyceten (Onken 1998). Insgesamt gehören rund 31 500 Arten zu diesem Phylum (Kirk *et al.* 2008). Als Saprophyten leben Basidiomyceten vom Um- und Abbau von Lignocellulosen und besitzen dafür eine Vielfalt extrazellulärer Enzyme. Dazu gehören u.a. zahlreiche Oxidoreduktasen sowie eine große Zahl hydrolytischer Enzyme (Bouws *et al.* 2008). Häufig sind diese extrazellulären Enzyme glykosyliert und besitzen daher eine außergewöhnliche Stabilität (Jacobs und Callewaert 2009). Dies befähigt Basidiomyceten, verschiedene Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zu nutzen. Daher können sie verschiedene ökologische Nischen, wie Holz, Erde und organische Abfallprodukte besetzen (Bouws *et al.* 2008). Basidiomyceten, die die Fähigkeit haben Holz und andere Lignocellulosen abzubauen, werden hauptsächlich nach makroskopischen Aspekten in Weiß- und Braunfäulepilze klassifiziert (Schwarze *et al.* 2000, Zabel und Morrell 1992). Braunfäulepilze bauen vorzugsweise den Polysaccharid-Anteil (Cellulose und Hemicellulose) des Holzes ab und sekretieren nur eine geringe Menge an Lignin-abbauenden Enzymen. Weißfäulepilze besitzen die Fähigkeit, Lignin, Hemicellulose und Cellulose abzubauen, wobei häufig eine Anreicherung der weißen Cellulose stattfindet. Aufgrund der Fähigkeit der Weißfäulepilze, Lignin wahlweise bevorzugt oder gleichzeitig mit der Hemicellulose und Cellulose abzubauen, werden zwei Fäulnismuster beschrieben: Die selektive Delignifizierung, auch sequenzieller Abbau genannt und die gleichzeitige Fäule (Pérez *et al.* 2002).

Als effizienter Verwerter von Lignocellulosen zeigte sich der Weißfäulepilz *Pleurotus sapidus* (Abb. 1.1), ein naher Verwandter des Austernseitlings (*P. ostreatus*).



Abbildung 1.1: Furchtkörper von *Pleurotus sapidus*

Die Gesamtheit der sekretierten und an der Sekretion beteiligten Proteine eines Organismus wird als „Sekretom“ bezeichnet (Tjalsma *et al.* 2000). Um das enorme Potential der sekretierten und am Abbau der Lignocellulose beteiligten Enzyme für biotechnologische Anwendungen nutzbar zu machen, wurde das Sekretom des Modellorganismus *Pleurotus sapidus* analysiert und das extrazelluläre Enzymsystem qualitativ, quantitativ und zeitlich aufgelöst erfasst (Bouws *et al.* 2008, Schüttmann 2011, Zorn *et al.* 2005a). Die Charakterisierung erfolgte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese als hochauflösender Trennmethode (Abb. 1.2) und anschließender massenspektrometrischer Identifizierung der beteiligten Proteine.

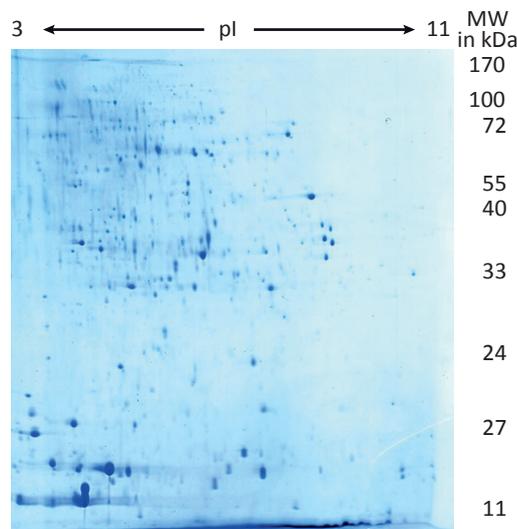


Abbildung 1.2: Analyse des Sekretoms von *Pleurotus sapidus* mittels 2D-Gelelektrophorese (verändert nach Schüttmann 2011)

Im Sekretom von *Pleurotus sapidus* wurden zahlreiche am Lignocelluloseaufschluss beteiligte Enzyme identifiziert, darunter Cellulasen, Hemicellulasen, Peptidasen, Esterasen, Laccasen, Oxidasen und insbesondere Peroxidasen (Zorn *et al.* 2005a). Die Zusammensetzung des Pilzsekretoms ist substrat- und zeitabhängig (Schüttmann 2011, Zorn *et al.* 2005a).

Bereits in den 1980er Jahren wurden Ligninperoxidasen (LiP) und Manganperoxidasen (MnP) entdeckt und als echte Ligninasen beschrieben (Glenn und Gold 1985, Guillén *et al.* 2005, Renganathan und Gold 1986). Inzwischen wurde eine dritte Art von ligninolytischen Peroxidasen beschrieben, die als versatile „vielseitige“ Peroxidasen (VP) bezeichnet werden. Diese vereinen die katalytischen Eigenschaften von LiP und MnP (Camarero *et al.* 1999, Rodríguez *et al.* 2004). Ein weiterer Peroxidase-Typ wurde erstmals bei der Kultivierung des Pilzes *Bjerkandera adusta* beschrieben, der auf Grund seiner Eigenschaften als DyP (dye decolorizing peroxidases; Farbstoff entfärbende Peroxidasen) bezeichnet wurde (Kim *et al.* 1995, Kim und Shoda 1999a). Die DyP-Typ Peroxidasen zeigen keine Sequenzhomologien zu Lignin-, Mangan- und versatilen Peroxidasen und bilden daher eine eigene Familie von Häm-Peroxidasen (Sugano *et al.* 2007). Das für den Peroxidase-katalysierten Abbau von Lignocellulosen erforderliche Wasserstoffperoxid wird typischerweise durch Glyoxaloxidasen (Vares *et al.* 1995), Superoxiddismutasen (Guillén *et al.* 1997) oder Arylalkoholoxidasen (Marzullo *et al.* 1995) produziert. Weiterhin gibt es Hinweise für eine Beteiligung spezieller Esterasen am Holzabbau. Sie katalysieren die Hydrolyse von Esterbindungen zwischen Zellwandpolymeren und aromatischen Säurederivaten der Monolignole, beispielsweise hydrolysieren Feruloylsterasen die Esterbindungen zwischen Arabinoxylan und Lignin (Mackenzie und Bilous 1988, Wong 2006).

### 1.3 Biotechnologische Nutzung von Basidiomyceten

Bei Biotransformationsreaktionen durch Basidiomyceten entstehen viele komplexe Sekundärmetabolite, an denen industrielles Interesse besteht, wie beispielsweise Aromastoffe oder pharmazeutische Wirkstoffe (Berger 2009, Erjavec *et al.* 2012). Durch ein geeignetes Kulturmedium bzw. Substrat oder die Supplementierung mit Präkursoren kann die Ausbeute dieser Metabolite erhöht werden (Gröbe *et al.* 2011, Shen 2013, Vandamme und Soetaert 2002).

Aromen werden in Lebensmitteln, Kosmetika, Waschmitteln und pharmazeutischen Produkten verwendet. Ein großer Teil der verwendeten Aromen wird durch chemische Synthese gewonnen, da der stetig wachsende Bedarf nicht aus natürlichen Quellen gedeckt werden kann (Scragg 1997, Serra *et al.* 2005). Die große Nachfrage der Verbraucher nach „bio“ oder „natürlichen“ Inhaltsstoffen ist Triebkraft für die Entwicklung neuer biotechnologischer Prozesse für die Herstellung von Aromen (Schrader 2007). Zahlreiche Neben- und Reststoffströme der Industrie enthalten Lignocellulosen, die von Pilzen als Kohlenstoffquelle genutzt werden und gleichzeitig als Substrate für die biotechnologische Produktion von Aromen dienen können. Ein Beispiel hierfür ist die Gewinnung von Vanillin aus Ferulasäure (Lesage-Meessen *et al.* 2002, Priefert *et al.* 2001). Durch die Biotransformation von carotinoidreichen Reststoffen können blumige Aromastoffe, wie beispielsweise  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Damascenon, gewonnen werden (Winterhalter und Rouseff 2002, Zorn *et al.* 2003a, 2003b). Bei den so produzierten Aromastoffen handelt es sich gemäß europäischer Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 Art. 3 Abs. 2 lit. c um „natürliche“ Aromen, die eine größere Akzeptanz bei den Verbrauchern finden. Carotinoide werden auch als

Lebensmittelzusatzstoffe und Nahrungsergänzungsmittel verwendet. Der Abbau von Carotinoiden spielt bei der Bleichung von Lebensmitteln eine wichtige Rolle.

Weiterhin ist die Produktion von pharmazeutisch wirksamen Substanzen von großem biotechnologischen Interesse. Bei Biotransformationsreaktionen durch Basidiomyceten wurden Metabolite mit antibakteriellen, antikanzerogenen, antiviralen, antifungalen, antidiabetischen, entzündungshemmenden, kardioprotektiven und anderen Wirkungen gefunden (Wasser und Weis 1999, Xu *et al.* 2011). Beispielsweise wurde bereits 1951 das Antibiotikum Pleuromutilin aus verschiedenen *Pleurotus*-Stämmen isoliert, das vorwiegend Aktivität gegen Gram-positive Bakterien zeigt (Anchel 1952, Kavanagh *et al.* 1951). Für verschiedene, von Basidiomyceten produzierte  $\beta$ -Glucane wird eine Vielzahl biologischer Effekte beschrieben (Rop *et al.* 2009). In vielen Fällen ist jedoch wenig über den Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung der bioaktiven Stoffe bekannt, und ihr pharmakologisches Potential ist noch nicht umfassend erforscht (Wasser 2011).

Daneben werden häufig Basidiomyceten als Enzymquelle verwendet (Bouws *et al.* 2008). Enzyme katalysieren chemische Reaktionen mit hoher Regio- und Stereoselektivität und können so Herstellungsprozesse vereinfachen, wirtschaftlich attraktiver machen und Ressourcen sparen (Liese *et al.* 2006). Traditionell werden Enzyme in der Lebensmittel-, Futter-, Papier-, Leder- und Textilindustrie sowie der Landwirtschaft eingesetzt (Godfrey und West 1996). Viele Enzyme sind kommerziell erhältlich, und eine große Zahl industrieller Anwendungen wurde bereits beschrieben (Kirk *et al.* 2002). In der Zellstoff- und Papierindustrie werden bereits seit langem ligninolytische Enzyme aus Weißfäulepilzen für einen nachhaltigeren Produktionsprozess verwendet (Mendonça Maciel *et al.* 2010, Scott und Akhtar 2005). Enzyme haben in der Textilindustrie eine ähnliche Rolle: So werden Laccasen zum Bleichen oder Katalasen zum Entfernen von Wasserstoffperoxid verwendet (Kirk *et al.* 2002). Verschiedene Peroxidasen werden in biotechnologischen Prozessen zum Abbau von Xenobiotika, wie beispielsweise Pestiziden (Davila-Vazquez *et al.* 2005) und polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (Pickard *et al.* 1999) im Boden sowie von Farbstoffen in Abwässern, eingesetzt (Husain 2006, Rodríguez *et al.* 1999, Sugano *et al.* 2007). Weiterhin finden sie Anwendung in der Lebensmittelindustrie. So ist die Peroxidase MsP1 aus *Mycetinis scorodonius* (Scheibner *et al.* 2008), die als „MaxiBright®“ vermarktet wird, in der Lage, gefärbte Molke aus der Käseherstellung zu bleichen. Das Enzym ermöglicht somit ein alternatives Verfahren zum chemischen Bleichen (Szweda *et al.* 2013).

Die Industrie hat zunehmend das Potential von Biokatalysatoren für die Produktion hochwertiger Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen erkannt (Thomas *et al.* 2002). Für einen effizienten enzymatischen Aufschluss von Lignocellulosen spielt die Verfügbarkeit geeigneter Enzymsysteme eine wichtige Rolle. Enzyme können dabei sowohl einzeln als auch in Mehrenzymsystemen für Biotransformationsreaktionen verwendet werden, um Prozesse des natürlichen Kohlenstoffkreislaufes nachzubilden und nachwachsende Rohstoffe gezielt zu verwerten.

Die Gesamtmenge extrazellulärer Enzyme im Kulturüberstand von Basidiomyceten ist allerdings für viele technische Applikationen zu gering. Die limitierte Verfügbarkeit führt zu hohen Preisen,

wodurch die Entwicklung von Enzym basierten Prozessen gebremst wird. Daher werden die meisten lignocellulolytischen Enzyme aus Basidiomyceten rekombinant hergestellt. Für die rekombinante Produktion im großtechnischen Maßstab werden aufgrund der guten Kultivierbarkeit und der großen Biosyntheseleistung vorzugsweise Mikroorganismen eingesetzt (Ruttloff 1994), wobei als Wirt bislang meistens Ascomyceten dienen (Ayala *et al.* 2008). So wurden bereits verschiedene Peroxidasen aus Basidiomyceten in den Ascomyceten *Aspergillus niger* und *Pichia pastoris* heterolog exprimiert (Conesa *et al.* 2002, Gu *et al.* 2003).

## 1.4 Zielsetzung

In vorangegangenen Arbeiten wurde *Pleurotus sapidus* auf Rapsstroh als Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert und die Zusammensetzung des Sekretoms analysiert. Dabei wurden verschiedene Enzyme identifiziert, die an der Umsetzung des Substrates beteiligt sind. Basierend auf den ermittelten Peptidsequenzen sollten im Rahmen dieser Arbeit die codierenden DNA-Sequenzen verschiedener neuer Enzyme aus dem Sekretom von *Pleurotus sapidus* kloniert und sequenziert werden. Nach erfolgreicher Klonierung und Expression sollten die Enzyme proteinbiochemisch charakterisiert werden.

Für diese Arbeit wurden drei Enzyme ausgewählt:

- eine Arylalkoholoxidase,
- eine DyP-Typ Peroxidase,
- sowie eine GDS(L)-Lipase.

Die Arylalkoholoxidase sollte als Fusionsprotein heterolog in *E. coli* überexprimiert werden. Dabei lag der Fokus auf der Produktion von löslichem, aktivem Enzym. Da die Expression von Pilzenzymen in Prokaryoten häufig zur Bildung inaktiver und unlöslicher Enzyme führt, sollten verschiedene Strategien verfolgt werden, um lösliches, aktives Enzym direkt bzw. durch Rückfaltung *in vitro* zu gewinnen.

Die heterologe Expression der Peroxidase vom DyP-Typ sowie der GDS(L)-Lipase erfolgte im eukaryotischen Expressionswirt *Trichoderma reesei*. Die in *Trichoderma reesei* überexprimierte rekombinante Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* sollte gereinigt und anschließend die kinetischen Konstanten bestimmt werden.

Für die rekombinante GDS(L)-Lipase sollte zunächst das Substratspektrum untersucht werden. Insbesondere sollte überprüft werden, ob das Enzym aus dem Sekretom von *Pleurotus sapidus* klassische Esterbindungen (wie Feruloyl ester) in pflanzlichen Zellwänden hydrolysieren kann und auf diese Weise am Lignocelluloseabbau beteiligt ist.

Mit der rekombinanten Peroxidase und der rekombinanten Arylalkoholoxidase sollte ein Zwei-Enzym-System entwickelt werden, bei dem die Enzyme so aufeinander abgestimmt werden, dass das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Nebenprodukt der AAO-vermittelten Reaktion als Cosubstrat für die Peroxidase dient. Dabei sollte das Potential des Zwei-Enzym-Systems in einer Applikation gezeigt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Alle Arbeiten wurden mit der allgemein üblichen Laborausstattung durchgeführt. Des Weiteren wurden folgende Geräte verwendet:

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Laboklav 160 MSL	SHP Steriltechnik, Magdeburg
Autoklav	Laboklav 25 B	SHP Steriltechnik
Blotdokumentationsanlage	VersaDoc Imaging System 4000 MP	BioRad, München
Dispergiergerät	T 25 digital Ultra-Turrax®	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Dispergierwerkzeug	S 25 N - 18 G	IKA®
Elektrophoresekammer, horizontal	PerfectBlue™ Mini S	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer, horizontal	PerfectBlue™ Mini L	Peqlab Biotechnologie GmbH
Elektrophoresekammer, vertikal	PerfectBlue™ Twin S	Peqlab Biotechnologie GmbH
Elektrophoresekammer, vertikal	Mini-Protean® Tetra System	BioRad
Elektrophoresekammer, Wet Blotting System	PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web™ S	Peqlab Biotechnologie GmbH
FPLC	BioLogic DuoFlow	BioRad
FPLC-Fraktionssammler	BioLogic BioFrac fraction collector	BioRad
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LD plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
Geldokumentation	DeVision G	Decon Science Tec, Hohengandern
HPLC	L-6200 A Intelligent Pump	Merck Hitachi, Darmstadt
HPLC-Detektor	L-4200 UV-Vis Detektor	Merck Hitachi
Inkubationsschüttler	Ecotron	Infors HT, Bottmingen CH
Inkubator	IPP 5000	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Kühl-Thermo-Mixer	MKR 13	HLC BioTech, Bovenden
Magnetrührer	RH basic 2	IKA®
Mikroplattenleser	Synergy™ 2	BioTek Germany, Friedrichshall
NanoPhotometer®	Pearl	Implen GmbH, München
PCR-Thermocycler	Alpha SC	Analytik Jena, Jena
PCR-Werkbank	PCR-Workstation	Peqlab Biotechnologie GmbH
pH-Meter	SevenEasy pH Meter S 20	Mettler Toledo GmbH, Gießen

(FORTSETZUNG)

Gerät	Modell	Hersteller
Power Supply	EV262	Peqlab Biotechnologie GmbH
Power Supply	EV231	Peqlab Biotechnologie GmbH
Reinstwassersystem	arium 611VF	Sartorius, Göttingen
Rotationsverdampfer Pumpe	VP 2 autovac/Pump MD 10	VWR International GmbH, Darmstadt
Rotationsverdampfer Vakuüm-Controller	VARIO CVC 3000	VWR
Scanner	Bio-5000 Microtek	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Spektralphotometer	Specord 50	Analytik Jena
Sterilbank	HERAsafe KS 18	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Taumelschüttler	gyro rocker SSL3	Bibby Scientific Ltd, Staffordshire UK
Tischschüttler	Orbitron	Infors HT
Tischzentrifuge	Allegra® X-15R	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Tischzentrifuge	Microfuge® 22R	Beckman Coulter GmbH
Ultraschallgerät	Sonifier B-12 Cell Disruptor	Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA
Ultraschallsonde	Sonifier Converter Modell L	Branson Ultrasonics Corporation
Ultratiefkühlschrank	Forma 906	Thermo Fisher Scientific
Umwälzthermostat	Minichiller®	Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg
Waage	BP 211 D	Sartorius, Göttingen
Waage	ALC 3100.2	Acculab sartorius group, Göttingen
Wasserbad	HB 10 basic	VWR
Zentrifuge	J2-MC	Beckman Coulter GmbH

### 2.1.2 Chemikalien

Die folgende Liste umfasst die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien; Substrate und Standards sind gesondert aufgeführt.

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Lösungsmittel

Chemikalien	Reinheit	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung, Rotiphorese® Gel 40	40% in Wasser; 37,5:1	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar Kobe I	reinst	AppliChem, Darmstadt
Agarose LE	-	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF)	>98%	Roth
Aluminiumsulfat-Hydrat		Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	> 98%, p. a.	Applichem
Ammoniumsulfat	≥ 99,5%, p.a.	Roth

(FORTSETZUNG)

Chemikalien	Reinheit	Hersteller
Ampicillin-Natriumsalz	99%, f. d. Molekularbiologie	Roth
L-(+)-Arabinose	> 99%, f. d. Biochemie	Roth
L-Asparagin Monohydrat	> 99%, reinst	Applichem
Bacto™-Pepton		Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bradford-Reagenz, Roti-Nanoquant®	5x Konzentrat	Roth
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X- $\beta$ -Gal)	> 99%, f. d. Biochemie	Roth
Bromphenolblau, Natriumsalz	f. d. Elektrophorese	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	> 99,5%, p. a.	Applichem
Citronensäure	> 99,5%, Ph.Eur.	Roth
Chloramphenicol	> 98,5%, f. d. Biochemie	Roth
Coomassie Brillantblau G 250	reinst	Applichem
Desoxycholsäure (Na-Salz)	> 98%, f. d. Biochemie	Roth
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs: dATP, dCTP,dGTP, dTTP)	> 98 %, lyophilisiert	Roth
Dichlormethan	$\geq$ 99,5%	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	$\geq$ 99,8%, p. a.	Roth
Dithiotreitol (DTT)	f. d. Molekularbiologie	Applichem
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	> 99,5%, Ph. Eur.	Roth
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	> 99%, p. a.	Applichem
Essigsäure	100%, p.a	Roth
Ethanol	> 99,8%, m. MEK vergällt	Schmidt Chemikalien, Dillenburg
Ethanol	$\geq$ 99,5%, Ph. Eur.	Roth
Ethidiumbromidlösung	1% (w/v)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA)	> 99%, p. a.	Applichem
Flavin-Adenin-Dinukleotid Dinatriumsalz (FAD)	> 95%, f. d. Biochemie	Roth
D-(+)-Glucose-Monohydrat	f. d. Mikrobiologie	Roth
L-Glutathion oxidiert	$\geq$ 98%, p. a., f. d. Biochemie	Roth
Glycerol	> 98%, Ph. Eur.	Roth
Glycin	$\geq$ 99%, p. a.	Roth
Guanidinium-Thiocyanat		Roth
Gummi Arabikum	Reagent grade	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Harnstoff	$\geq$ 99,5%, p. a.	Roth
Hefeextrakt	reinst	Fisher Scientific, Schwerte
HEPES	Pufferqualität	Applichem
Imidazol	Pufferqualität	NeoLab Migge Laborbedarf Vertrieb GmbH, Heidelberg
Isopropanol	$\geq$ 99,8%, p. a.	Roth
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	> 99%, f. d. Molekularbiologie	Roth
Kaliumchlorid	99-100,5%, Ph. Eur.	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat	$\geq$ 99,5%, p. a.	Roth
Di-Kaliumhydrogenphosphat,	p. a.	Applichem
Kaliumhydroxid	$\geq$ 85%, p. a. , in Plätzchen	Applichem

(FORTSETZUNG)

Chemikalien	Reinheit	Hersteller
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	> 99%, p. a.	Applichem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	reinst	Applichem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	mind. 99,5%	Applichem
$\beta$ -Mercaptoethanol	99%, p. a.	Roth
Methanol	99,8%, HPLC Gradient Grade	VWR
Milchpulver	Blotting Grade	Roth
3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure (MOPS)	f.d. Molekularbiologie	Applichem
Natriumacetat	wasserfrei, p. a.	Applichem
Natriumazid	> 99%, reinst	Applichem
Natriumcarbonat	$\geq$ 99%, wasserfrei	Roth
Natriumchlorid	99-100%, Ph. Eur.	Applichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Ph. Eur.	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	$\geq$ 99,5%, p. a.	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	> 99,5%, p. a.	Applichem
Natriumhydroxid	> 99%, p. a.	Roth
Ni-NTA Agarose		Qiagen, Hilden
Natriumtartrat-Dihydrat	> 99%	Roth
Natriumsulfat	$\geq$ 99%, p. a.	Fisher Scientific
Di-Natriumtartrat-Dihydrat	$\geq$ 99,5%, p.a.	Roth
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	> 99%, Ph. Eur.	Roth
Pepton	f. d. Molekularbiologie	Roth
Phosphorsäure	$\geq$ 85%, reinst	Roth
Polyethylenglykol 6000 (PEG 6000)	f. d. Molekularbiologie	Applichem
Rinderserumalbumin	> 98%, f. d. Mikrobiologie,	Roth
Albumin Fraktion V (BSA)	pulv.	
Salzsäure	> 25%, p. a.	Roth
Schwefelsäure	$\geq$ 95%, p. a.	Roth
D-Sorbitol	> 98%	Sigma
Tetracyclin-Hydrochlorid	> 99,5%	
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	> 99%	Applichem
C,C,C-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	$\geq$ 99,3%, buffer grade	Roth
TRIS-Hydrochlorid	$\geq$ 99%	Roth
Triton <sup>®</sup> X-100	reinst	Roth
Trypton	f. d. Biochemie	Applichem
Tween <sup>®</sup> 20	Ph. Eur.	Roth
Tween <sup>®</sup> 80	Ph. Eur.	Roth
L-(+)-Weinsäure	$\geq$ 99,5%	Roth
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	> 99,5%, p. a.	Applichem

### 2.1.3 Substrate

Tabelle 2.3: Substrate

Substrat	Reinheit	Hersteller
ARYLALKOHOLOXIDASE		
<i>p</i> -Anisalkohol	98%	Sigma-Aldrich
Benzylalkohol	>99%, p.a.	Sigma-Aldrich
Coniferylalkohol	98%	Sigma-Aldrich
Veratrylalkohol (3,4-Dimethoxy-benzylalkohol)	96%	Sigma-Aldrich
Zimtalkohol	98%	Sigma-Aldrich
DYP-TYP PEROXIDASE		
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz (ABTS)	f.d. Biochemie	AppliChem
1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1,3-diol (Adlerol)		ABCR Dr. Braunagel GmbH & Co KG, Karlsruhe
Annatto (wässrig-alkalischer Extrakt)	k.a.	Ruth GmbH & Co. KG, Bochum
$\beta$ -Carotin	$\geq 97,0\%$ , purum	Sigma-Aldrich
Bixin	$\geq 90\%$	Molekula, Gillingham (UK)
2,6-Dimethoxyphenol (DMP)	$\geq 97\%$	Sigma-Aldrich
Guajakol	Laboratory Reagent Grade	Fischer-Scientific, Schwerte
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	p.a.	Applichem
Reactive Black 5 (RBlack 5)	Dye content 55% (w/w)	Sigma-Aldrich
Reactive Blue 5 (RB 5) <sup>a</sup>	Dye content 100% (w/w)	
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	$\geq 99\%$	Molekula
Wasserstoffperoxid	purum, p.a., $\geq 30\%$	Sigma-Aldrich
LIPASE		
5-O-transferuloyl-L-Arabinofuranose (F-A) <sup>b</sup>		
Ferulasäureethylester	98%	Aldrich
Ferulasäuremethylester	99%	Alfa Aesar
<i>p</i> -Nitrophenylacetat	98%	Sigma-Aldrich
<i>p</i> -Nitrophenylbutyrat	98%	Sigma-Aldrich
<i>p</i> -Nitrophenyloctanoat	98%	Sigma-Aldrich
<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat	98%	Sigma-Aldrich
<i>p</i> -Nitrophenylvalerat	98%	Sigma-Aldrich

<sup>a</sup> von Prof. Dr. Christiane Liers, IHI Zittau zur Verfügung gestellt

<sup>b</sup> von Prof. Dr. Mirko Bunzel, KIT zur Verfügung gestellt

### 2.1.4 Größenstandards

Als Größenstandard bei den Elektrophoresen verwendete Marker sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Verwendete Größenstandards<sup>a</sup>

DNA-Größenstandard	Lieferant
100 bp DNA-Leiter, extended	Roth
1 kbp DNA-Leiter	Roth
Proteinstandards	Lieferant
PageRuler™ Unstained Proteinladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler™ Pstained Proteinladder	Fermentas GmbH
PageRuler™ Plus Prestained Proteinladder	Fermentas GmbH
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas GmbH
SERVA Native Marker Liquid Mix	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
IEF Marker 3–10, Liquid Mix	SERVA Electrophoresis GmbH

<sup>a</sup>Abbildungen der Standards befinden sich im Anhang (s. 7.3)

### 2.1.5 Kits

Die verwendeten Kits sind in Tabelle 2.5 aufgelistet. Die Nutzung erfolgte nach Herstellerangaben.

Tabelle 2.5: Verwendete Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Western-Blot	Merck Millipore
NucleoSpin Extract II	DNA-Extraktion aus Agarose	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Pant II	Extraktion genomischer DNA	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid DNA Purification	Plasmidisolierung	Macherey-Nagel
Opti-4CN™ Substrate Kit	Western-Blot	BioRad
PEROXsay™ Assay	Bestimmung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration	G-Biosciences, St. Louis (USA)
pMAL Protein Fusion and Purification System	herterologe Expression	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Protino® Ni-TED	Reinigung von Proteinen mit His-Tag	Macherey-Nagel
RNeasy Plant Mini Kit	RNA-Isolierung aus Myzel	Qiagen
SERVAGel™ N Native Starter Kit	native PAGE	SERVA Electrophoresis GmbH
SERVAGel™ IEF Starter Kit	IEF	SERVA Electrophoresis GmbH
SMART™ PCR cDNA Library Construction Kit	Erstellung von cDNA-Bibliotheken	Clontech Laboratories Inc., Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
TA-Cloning®	Klonierung von PCR-Fragmenten	Invitrogen, Darmstadt
Topo TA-Cloning® Kit	Klonierung von PCR-Fragmenten	Invitrogen

### 2.1.6 Enzyme

Die rekombinante Arylalkoholoxidase (AAO) aus *Pleurotus sapidus* stammte aus eigener Herstellung und wurde als Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Zusätzlich wurde die codierende Sequenz der Arylalkoholoxidase an die Firma ARTES Biotechnology GmbH (Langenfeld) weitergeleitet. Nach Anpassung der *codon usage* wurde *Hansenula polymorpha* RB11 mit dem Vektor pFPMT121-H1-M-AAO-H6 transformiert und die AAO cytosolisch exprimiert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte sowie intrazelluläre lösliche Fraktionen präpariert und für Folgeexperimente zur Verfügung gestellt. Von dieser Firma wurde daneben ein *Hansenula polymorpha* RB11-Stamm zur Verfügung gestellt, der den Vektor pFPMT-mEPS-H6 mit der codierenden Sequenz für eine Esterase aus *Pleurotus sapidus* enthält.

Die codierende Sequenz der DyP-Typ Peroxidase (PsaDyP) und einer GDS(L)-Lipase aus *Pleurotus sapidus* wurde an die Firma AB Enzymes (Darmstadt) für die heterologe Expression in *Trichoderma reesei* weitergeleitet. Die enzymhaltigen Kulturüberstände wurden von dieser Firma zur Verfügung gestellt.

Für molekularbiologische Arbeiten wurden verschiedene Enzyme von kommerziellen Quellen bezogen und nach Herstellerangaben verwendet (Tab. 2.6, Tab. 2.7).

Tabelle 2.6: Verwendete kommerziell erhältliche Enzyme

Enzym	Verwendung	Lieferant
Adventage™ 2 LD-Polymerase-Mix	cDNA-Synthese	Clontech Laboratories, Inc.
Benzonase (25 U·mL <sup>-1</sup> )	Zellaufschluss	Merck
Factor Xa	Abspaltung des MBP-Tag	New England Biolabs
Hot Star HiFidelity-Polymerase	Synthese von DNA	Qiagen
Hot Star Taq-Polymerase	Synthese von DNA	Qiagen
Katalase	AAO-Assay	Sigma Aldrich
Lysozym (1 mg·mL <sup>-1</sup> )	Zellaufschluss	Applichem
PNGaseF	Deglykosylierung	New England Biolabs
SuperScript® II Reverse Transkriptase	Einzelstrangsynthese	Invitrogen
SuperScript® III Reverse Transkriptase	Einzelstrangsynthese	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Klonierung	Invitrogen

Tabelle 2.7: Verwendete Restriktionsendonukleasen. Die jeweilige Schnittstelle der Restriktionsenzyme innerhalb der Erkennungssequenz wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet

Enzym	Hersteller	Erkennungssequenz
Sal I	Fermentas	5' ...G↓TCGAC... 3'
Xba I	Fermentas	5' ...T↓CTAGA... 3'
FastDigest™ BamH I	Thermo Scientific	5' ...G↓GATCC... 3'
FastDigest™ Nde I	Thermo Scientific	5' ...CA↓TATG... 3'
FastDigest™ Sal I	Thermo Scientific	5' ...G↓TCGAC... 3'
FastDigest™ Xho I	Thermo Scientific	5' ...C↓TCGAG... 3'

### 2.1.7 Oligonukleotide

In Tabelle 2.8 sind die verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Die Eigenschaften der Primer wurden mit PCR Primer Design und Oligo Property Scan überprüft (Tab. 2.12).

Tabelle 2.8: Verwendete Oligonukleotidprimer

Name	Sequenz
<b>KLONIERUNGSPRIMER</b>	
AAO fwd1	5'-ATGTCGTTTAGTGCACCTTCG-3'
AAO rev2	5'-ATCATATTGAATTGAAAGACTAC-3'
AAO-for-XbaI	5'-TCTTCTAGAATGTCGTTTAGTGCACCTTCGTC-3'
AAO-rev-Sall	5'-CGAAGTCGACTACTGATCAGC-3'
AAO-for-NdeI	5'-CGCTCGATCATATGATGTCGTTTAGTGCACCTTCG-3'
AAO-rev-XhoI	5'-CTCCTCGAGTCGACTACTGATCAGCC-3'
AAO_AD+for NdeI	5'-CGCTCGATCATATGTCGTTTACGCGCCTTGCGCC-3'
AAO_AD_rev-XhoI	5'-CTCCTCGAGTCGACTATTGATCC-3'
GDSL-Lip 1 for	5'-ATGCTCCGATCCTTTGTGC-3'
GDSL-Lip 1 rev	5'-TCAGCATGTTGTGACACC-3'
Lip-for-NdeI	5'-CATCATATGATGCTCCGATCCTTTGTGC-3'
Lip-rev-BamHI	5'-GGAGGATCCTCAGCATGTTGTGACACC-3'
DTP_for58	5'-ATGCGCTGGTGGACTACC-3'
DTP_rev54	5'-TTAAGCAGCGATTTTGTGC-3'
<b>SEQUNZIERUNGSPRIMER</b>	
AAO-for-MBP	5'-GTCAGACTGTCGATGAAGC-3'
AAOrev-AAO	5'-TAGATCAGCTCCTCGTTCG-3'
T7-Promotor Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3'
pCold-F Primer	5'-ACGCCATATCGCCGAAAGG-3'
pCold-R Primer	5'-GGCAGGGATCTTAGATTCTG-3'
GDSL-rev1	5'-TAGTCTGCGATCAGACCG-3'
M13 uni (-21)	5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'
M13 rev (-29)	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
T7term	5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGT-3'
<b>ITS</b>	
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
<b>cDNA</b>	
3' SMART™ CDS II A	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT <sub>(30)</sub> VN-3' (V = A/G/C)(N = A/G/C/T)
SMART II™ A Oligonucleotide	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
5' PCR Primer II A	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

### 2.1.8 Vektoren

Die für die Klonierung von DNA und die Überexpression von Proteinen verwendeten Klonierungs- bzw. Expressionsvektoren sind in folgender Tabelle beschrieben.

Tabelle 2.9: Klonierungs- und Expressionsvektoren

Vektor	Induktor	Resistenzmarker	Hersteller
<b>Klonierungsvektoren</b>			
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO		Ampicillin, Kanamycin	Invitrogen
pCR <sup>®</sup> 2.1		Ampicillin, Kanamycin	Invitrogen
<b>Expressionsvektoren</b>			
pET-15b	IPTG	Ampicillin	Novagen, Merck Millipore
pMAL-p4x	IPTG	Ampicillin	New England Biolabs
pMAL-c4x	IPTG	Ampicillin	New England Biolabs
pColdI	Kälteschock + IPTG	Ampicillin	TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)

Die Vektoren pCR2.1 bzw. pCR2.1-TOPO wurden für die Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Amplifikationsprodukte, die mit einer *Taq*-Polymerase erzeugt wurden, besitzen einen 3'-A Überhang, der mit dem komplementären 5'-T Überhang ligiert werden kann (Brownstein *et al.* 1996). Die Besonderheit des TOPO-Systems ist eine mit dem offenen Plasmid verknüpfte Topoisomerase, die einen anderen DNA-Strang mit dem Vektor verbinden kann und dabei freigesetzt wird (Shuman 1991). Die multiple Klonierungsstelle (Multiple Cloning Site, MCS) der Vektoren liegt innerhalb eines Reportergens, der  $\beta$ -Galactosidase, sodass eine Auswahl von Klonen mittels Blau/Weiß-Screening ermöglicht wird. Daneben besitzen die Vektoren Resistenzgene für Kanamycin und Ampicillin als Selektionsmarker.

Der Vektor pET-15b wurde für die Expression der Arylalkoholoxidase in *E. coli* BL21(DE3) Zellen verwendet. Der Vektor codiert einen N-terminalen *His-tag*, gefolgt von einer Proteaseschnittstelle (Thrombin, Deikus und Bechhofer 2007) und der multiplen Klonierungsstelle. Die Arylalkoholoxidase wurde mit diesem Vektor als Fusionsprotein mit einem N-terminalen *His<sub>6</sub>-tag* exprimiert. Die Kontrolle der Expression erfolgt über den *lac*-Operator und den T7-Promotor. Dafür trägt der Vektor das *lacI*-Gen, das den *lac*-Repressor codiert. Die Induktion der Expression erfolgt mittels IPTG, einem nicht hydrolysierbaren Lactose-Analogen. Weiterhin wird für die Expression die T7-RNA-Polymerase des Bakteriophagen DE3 benötigt. Der Stamm BL21(DE3) verfügt über die codierende Sequenz für diese Polymerase, die durch den  $\lambda$ -Phagen DE3 lysogen in das Bakterienchromosom eingebracht wurde. Als Selektionsmarker trägt der Vektor das Gen für die  $\beta$ -Lactamase ( $\text{Amp}^{\text{R}}$ ).

Die Vektoren der pMAL-4 Serie sind für die Expression von rekombinanten Proteinen mit einer Fusion an das Maltose-Bindeprotein (MBP) geeignet. Die multiple Klonierungsstelle ist so positioniert, dass der MBP-*tag* gefolgt von einer Proteaseschnittstelle (Faktor Xa) an das Zielprotein fusioniert wird. Die Insertion der Ziel-DNA in die Klonierungsstelle ermöglicht die Auswahl von Klonen über Blau-Weiß-Screening. Die Regulation der Expression erfolgt über den synthetischen *tac*-Promotor (konstruiert aus dem *trp*- und *lac*-Operon, Boer *et al.* 1983). Die Expression wird über den lac-Repressor kontrolliert, daher erfolgt die Induktion mit IPTG. Die Vektoren pMAL-4 Serie tragen das  $\beta$ -Lactamasegen als Selektionsmarker. Der pMAL-p4X-Vektor trägt das *malE*-Gen, welches das Maltose-Bindeprotein mit Signalsequenz codiert. Diese Signalsequenz dirigiert die Fusionsproteine in das Periplasma, wodurch die korrekte Faltung oder die Bildung von Disulfidbrücken im Fusionsprotein ermöglicht werden kann. Der Vektor pMAL-c4X ist identisch zum Vektor pMAL-p4x, jedoch wurde die Signalsequenz von *malE* entfernt. Daher wurde der Vektor für die Expression des Zielproteins im Cytoplasma verwendet. Die Protease-Spaltstelle ermöglicht die Abspaltung des MBP-*tags* vom Fusionsprotein durch den Faktor Xa.

Der Vektor pColdI ermöglicht die effiziente Expression von Proteinen bei niedrigen Temperaturen. Die Expression steht unter der Kontrolle des *cspA*-Promotors und des lac-Repressors. Die Transkription wird durch ein Transkriptions-Enhancing-Element (TEE) verstärkt. *Downstream* des Operons liegen der His-*tag*, die Faktor Xa-Spaltstelle und die multiple Klonierungsstelle. Die Expression des Zielproteins erfolgt mit einer Fusion an den His-*tag*, die durch den Faktor Xa abgespalten werden kann. Die Induktion der Transkription erfolgt physikalisch über Kälteschock und chemisch mittels IPTG. Die Transkription mittels *cspA*-Promotor ist bei 15 °C noch effizient, was eine Erhöhung der Ausbeute des Zielproteins ermöglicht. Der Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker. Der Vektor pColdI eignet sich gut, um ihn mit den Vektoren des Chaperonplasmid-Sets zu kombinieren. Für die Expression der Arylalkoholoxidase wurde der Vektor daher sowohl alleine als auch in Kombination mit Vektoren dieses Sets (pGro7, pG-Tf2 und pTf16) verwendet. In dem Zwei-Plasmid-System wurde die Arylalkoholoxidase mit Chaperonen koexprimiert, um die korrekte Faltung des Enzyms zu unterstützen.

Tabelle 2.10: Chaperonplasmide

Vektor	Resistenzmarker	Eigenschaften	Hersteller
pG-Tf2	Chloramphenicol	<i>Pzt-1</i> Promotor, Induktor: Tetracyclin Chaperone: groES 10 kDa, groEL 60 kDa, tig 56 kDa	TaKaRa
pGro7	Chloramphenicol	<i>araB</i> Promotor, Induktor: L-Arabinose Chaperone: groES 10 kDa, groEL 60 kDa	TaKaRa
pTf16	Chloramphenicol	<i>araB</i> Promotor, Induktor: L-Arabinose Chaperon: tig 56 kDa	TaKaRa

### 2.1.9 Mikroorganismen

In Tabelle 2.11 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen aufgeführt. Ihre spezifischen Eigenschaften sind unter 2.2 näher beschrieben.

Tabelle 2.11: Mikroorganismen

Mikroorganismus	Herkunft
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 star (DE3)	Invitrogen
<i>E. coli</i> K12 TB1	New England Biolabs
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen
<i>Hansenula polymorpha</i> RB11	Artes Biotechnology, Langenfeld
<i>Pleurotus sapidus</i> 8266	DSMZ, Braunschweig

### 2.1.10 Antikörper

Für die Produktion polyklonaler Antikörper gegen die Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus* wurde ein exponierter Enzymbereich ausgewählt. Auf Basis des Strukturmodells der klonierten Arylalkoholoxidase sowie Homologieuntersuchungen mit 22 mutmaßlichen Arylalkoholoxidasen aus *C. cinerea*, einer Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus ernygi* und der *Pleurotus sapidus*-Arylalkoholoxidase wurde die Aminosäuresequenz NQSFNLFRRDSSEFNA als Antigen determinante gewählt. Die Synthese des Peptids und die Produktion der Antikörper in Kaninchen wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt. Polyklonale Antikörper aus Kaninchen gegen den His-tag wurden von der Firma MicroMol GmbH (Karlsruhe) bezogen. Ein mit einer Meerrettichperoxidase konjugierter Antikörper aus Ziegen, der gegen Kaninchen-IgG gerichtet ist (*goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate*), wurde von Merck KGaA bezogen.

### 2.1.11 Datenbanken und Bioinformatiksoftware

In der Tabelle auf der folgenden Seite sind die verwendeten Datenbanken und verwendete Software aufgelistet:

Tabelle 2.12: Bioinformatiksoftware und Datenbanken

Programm	Funktion	Referenz	Internetadresse
Chimera	Molekül-Modellierungssystem	Petersen <i>et al.</i> 2004	<a href="http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/">http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/</a>
ChromasPro	DNA-Sequenzierung	Conor McCarthy, Southport, Australia	<a href="http://technelysium.com.au/">http://technelysium.com.au/</a>
CLC Sequence viewer 7	Bioinformatische Analysen	Frey <i>et al.</i> 2014	<a href="http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer/">http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer/</a>
Graphpad	Datenanalyse und graphische Darstellung	GraphPad Software, San Diego California USA	<a href="http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/">http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/</a>
OriginPro 8.6	Datenanalyse und graphische Darstellung	OriginLab, Northampton, MA	<a href="http://www.originlab.com/">http://www.originlab.com/</a>
SnapGene	Erstellung von Vektorkarten	—	<a href="http://snapgene.com">http://snapgene.com</a>
<b>Gerätesoftware</b>			
BioLogic DuoFlow Vers. 5.10	Steuerung und Datendarstellung, FPLC	—	<a href="http://www.bio-rad.com/de-de/product/biologic-duoflow-software">http://www.bio-rad.com/de-de/product/biologic-duoflow-software</a>
Clarity™ Vers. 3.0.6.589	Chromatographie Daten Station, HPLC	DataApex, Prag	<a href="http://www.dataapex.com">http://www.dataapex.com</a>
Gen5™	Datenanalyse-Software Mikroplattenleser	—	<a href="http://biotek.de">http://biotek.de</a>
WinASPECT® 2.2.1.0	Steuer- und Auswertesoftware SPECTOR®	—	<a href="http://analytik-jena.de">http://analytik-jena.de</a>
<b>Online-Tools</b>			
ATG <sup>PK</sup>	Vorhersage von Startcodon	Salamov <i>et al.</i> 1998	<a href="http://atgprdbcls.jp/">http://atgprdbcls.jp/</a>
EMBL-EBI WU-BLAST Nucleic acids	DNA-Datenbank	Altschul <i>et al.</i> 1997, McWilliam <i>et al.</i> 2013	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wublast/nucleotide.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wublast/nucleotide.html</a>
PCR Primer Design; Oligo Property Scan	Primerkonstruktion	—	<a href="http://www.eurofnsgenomics.eu/">http://www.eurofnsgenomics.eu/</a>
T-coffee	Multisequenzvergleiche	Notredame <i>et al.</i> 2000	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/</a>
Transeq	Übersetzung DNA → Protein	—	<a href="http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/transeq">http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/transeq</a>
Clustal Omega	Multisequenzvergleiche	Sievers <i>et al.</i> 2011	<a href="http://www.clustal.org/omega/">http://www.clustal.org/omega/</a>
ClustalW2	Multisequenzvergleiche	Larkin <i>et al.</i> 2007	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
JGI BLAST, PC 15 v2.0	<i>Pleurotus ostreatus</i> Genomprojekt	Grigoriev <i>et al.</i> 2012	<a href="http://genome.jgi.doe.gov/PleosPC15_2/PleosPC15_2_home.html">http://genome.jgi.doe.gov/PleosPC15_2/PleosPC15_2_home.html</a>
MEGA 6.0	Phylogenetische Analysen	Tamura <i>et al.</i> 2013	<a href="http://www.megasoftware.net/mega.php">http://www.megasoftware.net/mega.php</a>
NCBI-BLAST	Datenbank	Goujon <i>et al.</i> 2010	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
BRENDA	Enzymdatenbank	Schomburg <i>et al.</i> 2002	<a href="http://www.brenda-enzymes.org/">http://www.brenda-enzymes.org/</a>
CDD (NCBI)	Proteindomänen, Proteinfamilien	Marchler-Bauer <i>et al.</i> 2013	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml</a>
EMBL-EBI WU-BLAST Protein	Proteindatenbank	Goujon <i>et al.</i> 2010, McWilliam <i>et al.</i> 2013	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wublast/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wublast/</a>
ExpASY	Portal für Proteinanalyse	Artimo <i>et al.</i> 2012	<a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>
ExpASY Prosite	Proteindomänen, Proteinfamilien	Sigrüst <i>et al.</i> 2002, 2013	<a href="http://prosite.expasy.org/">http://prosite.expasy.org/</a>
ExpASY ProtParam	Biophysikalische Sequenzanalyse	Gasteiger <i>et al.</i> 2005	<a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a>
ExpASY ProtScale	Hydrophobizität und Sekundärstrukturen	Gasteiger <i>et al.</i> 2005	<a href="http://web.expasy.org/protscale/">http://web.expasy.org/protscale/</a>
ExpASY SWISS-MODEL	Struktur Homologie-Modelling	Biasini <i>et al.</i> 2014, Guex <i>et al.</i> 2009	<a href="http://swissmodel.expasy.org/">http://swissmodel.expasy.org/</a>
InterProScan (EMBL-EBI)	Proteindomänen, Proteinfamilien	McWilliam <i>et al.</i> 2013, Quevillon <i>et al.</i> 2005	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/ipa/iprscan5/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/ipa/iprscan5/</a>
MotifSCAN (SIB)	Proteindomänen, Proteinfamilien	Obenauer <i>et al.</i> 2003	<a href="http://scansite.mit.edu/">http://scansite.mit.edu/</a>
NetNGlyc 1.0	N-Glykosylierungsstellen	Gupta <i>et al.</i> 2004	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/</a>
NetOGlyc 4.0	O-Glykosylierungsstellen	Julenius <i>et al.</i> 2005, Steentoft <i>et al.</i> 2013	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/</a>
Pfam	Domänensuche	Finn <i>et al.</i> 2014	<a href="http://pfam.xfam.org/">http://pfam.xfam.org/</a>
PDBsum	Sekundärstrukturelemente	Laskowski 2009	<a href="http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/">http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/</a>
SignalP 4.1	potentielle Signalsequenzen	Petersen <i>et al.</i> 2011	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
VAST-Search (NCBI)	Suche Vergleichbarer Proteinstrukturen	Gibrat <i>et al.</i> 1996	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vastsearch.html">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vastsearch.html</a>
Konvertierung Gewicht - Mol	Umrechnung Gewicht - Mol	—	<a href="http://molbio.ru/ger/scripts/01_04.html">http://molbio.ru/ger/scripts/01_04.html</a>

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (HERAsafe) durchgeführt. Die verwendeten Medien, Gefäße, Pipetten und sonstigen Materialien wurden vor der Benutzung autoklaviert.

### 2.2.1 Kultivierung von *Pleurotus sapidus*

Der für die Arbeit verwendete Pilz *Pleurotus sapidus* 8266 wurde von der DSMZ (Braunschweig) bezogen.

#### 2.2.1.1 Nährmedien zur Anzucht von Basidiomyceten

##### SNL-H-Medium<sup>1</sup> und SNL-H-Agar

D-(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L <sup>-1</sup>
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L <sup>-1</sup>
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L <sup>-1</sup>
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	3,0 g L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung	1 mL L <sup>-1</sup>

Der pH-Wert wurde mit 1 M Natronlauge auf 6,0 eingestellt. Autoklavieren (121 °C, 20 min).

Für die Plattenkultivierung wurde SNL-H-Agar verwendet. Hierfür wurden dem SNL-H-Medium zusätzlich 15 g L<sup>-1</sup> Agar-Agar zugesetzt.

##### Spurenelementlösung

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

Steril filtriert

<sup>1</sup>modifiziert nach Sprecher (1959) und Sprecher und Hanssen (1982)

### 2.2.1.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *Pleurotus sapidus* erfolgte auf SNL-H-Agarplatten. Zum Erhalt des Stammes wurde in regelmäßigen Abständen ein etwa 1 cm<sup>2</sup> großes, mit Myzel bewachsenes Agarstück mit der bewachsenen Seite mittig auf eine frische Agarplatte aufgebracht, mit Parafilm™ verschlossen und im Brutschrank bei 24 °C kultiviert, bis die Platte gut bewachsen (ca. 80%) war. Die bewachsenen Platten wurden anschließend bei 4 °C gelagert und regelmäßig überimpft.

### 2.2.1.3 Vorkultur

Die Submerskultivierung des Pilzes erfolgte in SNL-H-Medium (s. 2.2.1.1). Für die Vorkulturen wurden in einem 250 mL-Erlenmeyerkolben zunächst 100 mL SNL-H-Medium vorgelegt (40% des Kolbenvolumens) und mit einem etwa 1 cm<sup>2</sup> großen, mit *Pleurotus sapidus* bewachsenem Agarstück inokuliert. Das Agarstück wurde mittels Ultra-Turrax® Dispergiergerät zerkleinert (9 800 U min<sup>-1</sup>, 15 s) und die Kultur unter Lichtausschluss bei 24 °C, 150 U min<sup>-1</sup> und 25 mm Auslenkung für 4 Tage inkubiert.

### 2.2.1.4 Hauptkultur

Für die Hauptkulturen wurden 500 mL-Erlenmeyerkolben mit 200 mL Medium verwendet. Die Vorkultur wurde mit dem Ultra-Turrax® Dispergiergerät homogenisiert (9 800 U min<sup>-1</sup>, 15 s) und die Hauptkultur mit 20 mL (10% des Hauptkulturmediums) der homogenisierten Vorkultur inokuliert. Die Kulturen wurden 10 bis 18 Tage (24 °C, 150 U min<sup>-1</sup>, 25 mm Auslenkung) unter Lichtausschluss inkubiert.

### 2.2.1.5 Induktion

Für die Hauptkultur wurde SNL-H-Medium bzw. verschiedene Varianten dieses Mediums verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Kohlenstoffquelle unterschieden, um das Expressionsmuster des Pilzes zu verändern. Für die Produktion der Arylalkoholoxidase wurde die Hauptkohlenstoffquelle (D(+)-Glucose-Monohydrat) durch Veratrylalkohol (Tab. 2.13) ersetzt. Die Produktion der Lipase wurde induziert, indem SNL-H-Medium mit Keimöl bzw. Tween 80® anstelle von Glucose verwendet wurde (Tab. 2.13).

Tabelle 2.13: Kohlenstoffquellen für die Induktion eines veränderten Expressionsmusters

Chemikalie	Konzentration
Tween 80® <sup>a</sup>	0,4 % (v/v)
Keimöl	1 % (v/v)
Veratrylalkohol <sup>b</sup>	0,1 % (w/v)

<sup>a</sup> nach Linke *et al.* (2005a) – <sup>b</sup> nach Jong *et al.* (1990), Kumar und Rapheal (2011)

### 2.2.1.6 Bestimmung der Enzymaktivität während des Kulturverlaufs

Von der Hauptkultur wurden täglich je 1 000  $\mu\text{L}$  unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert ( $14\,000\ \text{U min}^{-1}$ ,  $18\,000 \times g$ , 5 min,  $4\ ^\circ\text{C}$ ), der Überstand in ein neues steriles Eppendorfgefäß überführt und auf Lipase- bzw. AAO-Aktivität (s. 2.6.9.1 bzw. 2.6.2) untersucht. Die Myzel-Proben wurden bei  $-20\ ^\circ\text{C}$  eingefroren und anschließend für die Generierung einer cDNA-Bibliothek verwendet.

### 2.2.2 Kultivierung von *Hansenula polymorpha*

Die verwendeten *Hansenula polymorpha* RB11-Stämme wurden von Artes Biotechnology (Langenfeld) zur Verfügung gestellt. Der Stamm *H. polymorpha* RB11 ist auxotroph (relevanter Genotyp *ura3*). Die Auxotrophie kann über pFPMT-Plasmide, die das *URA3*-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* enthalten, komplementiert werden. Als Negativkontrollstamm diente *H. polymorpha* pFPMT121/RB11, bei dem der Vektor pFPMT121 (ohne Insert) genomisch integriert wurde. Für die heterologe Expression der Esterase aus *Pleurotus sapidus* wurde pFPMT-mEPS-H6/RB11 verwendet.

#### 2.2.2.1 Nährmedien zur Anzucht von *Hansenula polymorpha*

##### YPD-Vollmedium

Hefeextrakt	$10\ \text{g L}^{-1}$
Bactopepton	$20\ \text{g L}^{-1}$
D(+)-Glucose-Monohydrat	$20\ \text{g L}^{-1}$

Die Plattenkultivierung erfolgte auf YPD Agar. Hierfür wurden dem YPD Medium zusätzlich  $15\ \text{g L}^{-1}$  Agar-Agar zugesetzt.

##### YNB-2% Glycerol

YNB-w/o Ammoniumsulfat und Aminosäuren	$1,7\ \text{g L}^{-1}$
Ammoniumsulfat	$5\ \text{g L}^{-1}$
Glycerol	$20\ \text{g L}^{-1}$

Der pH-Wert wurde mit 1 M Natronlauge auf 6,0 eingestellt.

Alle Materialien wurden für 20 min bei  $121\ ^\circ\text{C}$  autoklaviert.

### 2.2.2.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf YPD-Agarplatten. Dafür wurden die Platten mit 100  $\mu$ L einer *Hansenula polymorpha* Flüssigkultur angeimpft und für maximal zwei Tage bei 37 °C inkubiert, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht war. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C gelagert. Einmal pro Monat wurde ein neuer Ausstrich gemacht, um den Stamm zu erhalten.

### 2.2.2.3 Kultivierung

Für die Vorkulturen wurden 3 mL YPD-Medium mit Kolonien von einer YPD-Platte angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 180 U min<sup>-1</sup> im Luftschüttler. Anschließend wurden 200  $\mu$ L der dicht gewachsenen Kultur in 3 mL YNB-2% Glycerol überführt und für 44 h inkubiert (37 °C, 180 U min<sup>-1</sup>).

### 2.2.2.4 Glycerolkulturen von *Hansenula polymorpha*

1 mL einer frischen dichtgewachsenen YPD-Kultur wurden mit 1 mL sterilem 34%-igem Glycerol gemischt und bei -80 °C gelagert.

## 2.2.3 Kultivierung von Bakterienkulturen

### 2.2.3.1 Mikroorganismen

Mit wenigen Ausnahmen sind alle Bakterien, die in der Molekularbiologie eingesetzt werden, Abkömmlinge des *E. coli*-Stammes K 12. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden *E. coli*-Stämme für Klonierungs- und Expressionszwecke eingesetzt.

Für Klonierungen wurde der Stamm ***Escherichia coli* TOP10** der Firma Invitrogen (Darmstadt) verwendet.

Er trägt den Genotyp: TOP10 *F* *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\varphi$ 80*lacZ*  $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 nupG*  $\lambda$ .

Die Genvariante *recA1* vermindert die Häufigkeit von Rekombinationsereignissen, daneben erhöht die funktionslose Endonuklease (*endA1*) die Qualität von Plasmidpräparationen. Daher ist dieser Stamm gut für die Generierung von Plasmid-DNA geeignet.

Der Stamm ***Escherichia coli* K12 TB1** wurde von der Firma New England Biolabs GmbH (Frankfurt) bezogen und für die heterologe Expression verwendet.

Er trägt den Genotyp: K12 TB1 (*F* *ara*  $\Delta$ (*lac-proAB*) [ $\Phi$ 80*dlac*  $\Delta$ (*lacZ*)M15] *rpsL(Str<sup>R</sup>) thi hsdR*). Dieser Stamm liefert gute Ergebnisse im Bezug auf Plasmidstabilität, Expression und Reinigung. Eine Mutation der Endonuklease R (*hsdR*) verhindert den Abbau nicht-modifizierte DNA.

Ebenfalls für die heterologe Expression wurden die Protease defizienten Stämme **BL21 (DE3)** (Genotyp:  $F^- ompT hsdSB (r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3)$ ) und **BL21star (DE3)** (Genotyp:  $F^- ompT hsdSB (r_B^- m_B^-) gal dcm rne131 (DE3)$ ) verwendet, die von Invitrogen bezogen wurden. Beide *E. coli* B-Stämme tragen den  $\lambda$ -Prophagen DE3 mit den Genen für die T7-RNA-Polymerase und  $lacI^q$ . Dadurch werden Plasmide, deren Expression mit einem T7-Promotor gesteuert wird, so lange reprimiert, bis die Bildung der T7-RNA-Polymerase durch IPTG am *lac*-Promotor induziert wird. Die Mutation der Protease (*ompT*) reduziert die Proteolyse von exprimierten Proteinen. Durch eine Mutation der RNaseE (*rne131*) im Stamm BL21star (DE3) wird die mRNA-Stabilität erhöht.

### 2.2.3.2 Nährmedien und Lösungen für die Anzucht von *E. coli*

#### *lysogeny broth*-Vollmedium (LB-Medium)<sup>2</sup>

Trypton	10 g L <sup>-1</sup>
Hefe Extrakt	5 g L <sup>-1</sup>
Natriumchlorid	10 g L <sup>-1</sup>

Autoklavieren (121 °C, 20 min)

Zur Herstellung von Flüssig-Selektivmedien wurden die entsprechenden Antibiotika kurz vor Gebrauch zugegeben. Die Endkonzentration der verwendeten Antibiotika betrug dabei für Ampicillin 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , für Tetracyclin 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , für Kanamycin 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  und für Chloramphenicol 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Für die Herstellung von Agarplatten (Festmedien in Petrischalen) wurde dem LB-Medium Agar-Agar (1,5% (w/v)) zugesetzt. Durch Zugabe von Antibiotika wurden Selektivplatten hergestellt. Die Antibiotika wurden erst unmittelbar vor dem Gießen der Platten zugegeben, da diese nicht hitzestabil sind.

### 2.2.3.3 Antibiotika

#### Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	100 mg mL <sup>-1</sup>
------------	-------------------------

In Reinstwasser gelöst, steril filtriert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### Chloramphenicol-Stammlösung

Chloramphenicol	20 mg mL <sup>-1</sup>
-----------------	------------------------

Die Stammlösung wurde mit 100%igem Ethanol hergestellt und anschließend steril in ein dunkles Falcon Tube filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

<sup>2</sup>Bertani 1951

**Kanamycin-Stammlösung**

Kanamycin	25 mg mL <sup>-1</sup>
-----------	------------------------

Die Stammlösung wurde mit Reinstwasser hergestellt, steril filtriert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**Tetracyclin-Stammlösung**

Tetracyclin	10 mg mL <sup>-1</sup>
-------------	------------------------

Gelöst in 100% Ethanol, steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**2.2.3.4 Induktoren****L-(+)-Arabinose-Stammlösung**

L-(+)-Arabinose	100 mg mL <sup>-1</sup>
-----------------	-------------------------

Hergestellt mit Reinstwasser, steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

**IPTG Stammlösung**

IPTG	0,1 M
------	-------

Die IPTG Stammlösung wurde in der angegebenen Konzentration mit Reinstwasser hergestellt und anschließend steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**Tetracyclin-Stammlösung**

Tetracyclin	500 µg mL <sup>-1</sup>
-------------	-------------------------

Gelöst in 100% Ethanol, steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**2.2.3.5 TSS-Lösung**

PEG 6000	10 % (w/v)
Magnesiumsulfat	50 mM
DMSO	5 % (v/v)

Die TSS-Lösung wurde in LB-Medium hergestellt, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt, die Lösung autoklaviert und anschließend bei 4 °C gelagert.

**2.2.3.6 Glycerolstock-Lösung**

Glycerol	65 %
Magnesiumsulfat	100 mM
Tris-HCl (pH 8)	25 mM

### 2.2.3.7 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte für Stämme ohne Resistenz auf LB-Agarplatten (s. 2.2.3.2), für Stämme mit Selektionsmarker auf LB-Selektivplatten mit Antibiotika. Dafür wurden 100  $\mu\text{L}$  einer frischen Übernachtskultur ausplattiert oder mit einer Einzelkolonie einer Stammplatte ein Verdünnungsausstrich durchgeführt. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm™ verschlossen und bei 4 °C gelagert. Zusätzlich wurden Glycerolstocks (s. 2.2.6) angelegt, um eine dauerhafte Erhaltung der Stämme zu gewährleisten.

### 2.2.3.8 Übernachtskultur

3 mL LB-Medium (s. 2.2.3.2), gegebenenfalls mit Antibiotika, wurden im 15 mL-Falcon Tube mit einer einzelnen Kolonie von einer Platte für die Stammhaltung angeimpft. Alternativ wurden einige Zellen von einem Glycerol-Stock mit einem sterilen Zahnstocher abgekratzt und das Medium damit inokuliert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 225  $\text{U min}^{-1}$ .

### 2.2.3.9 Herstellung TSS-kompetenter Zellen

Kompetente Zellen wurden mit Hilfe der TSS-Methode hergestellt, wobei sich die Abkürzung TSS auf die verwendete *Transformation and Storage solution* bezieht (Chung *et al.* 1989). Dafür wurde zunächst eine 3 mL-Vorkultur angeimpft und bei 37 °C über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden 100 mL LB-Medium mit 1 mL dieser Vorkultur angeimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 - 0,5 angezogen (frühe exponentielle Wachstumsphase). Anschließend wurde die Zellen pelletiert (10 min bei 1 000  $\times g$ , 2 100  $\text{U min}^{-1}$ , 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 mL (10% bezogen auf das ursprüngliche Kulturvolumen) eiskalter TSS-Lösung aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann à 50  $\mu\text{L}$  aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80 °C. Sämtliche Arbeitsschritte während des Herstellens der TSS-kompetenten Zellen wurden auf Eis durchgeführt, um eine ständige Kühlung der Zellen zu gewährleisten. Die so hergestellten Zellen waren sofort kompetent und konnten direkt zur Transformation eingesetzt werden. Die bei -80 °C gelagerten Zellen behielten für 2-3 Monate ihre Kompetenz.

## 2.2.4 Transformation von *E. coli*-Zellen mit DNA

### 2.2.4.1 Transformation TSS-kompetenter Zellen

50  $\mu\text{L}$  der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 100 ng Vektor-DNA bzw. 2  $\mu\text{L}$  eines Ligationsansatzes vermischt. Danach wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock. Dafür wurden die Zellen im Heizblock für

2 min auf 42 °C erwärmt (Chung *et al.* 1989). Danach wurden die Zellen sofort für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden jeweils 150 µL LB-Medium dazugegeben und für 1 h bei 37 °C und 200 U min<sup>-1</sup> inkubiert (Erholungsphase / Proteinsynthese). Nach der Erholungsphase wurden 170 µL der transformierten Zellen auf LB-Selektivagarplatten unter der Sterilbank ausplattiert und die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

#### **2.2.4.2 Herstellung von Zellen mit zwei Vektoren für die Koexpression**

Für die Expression der Arylalkoholoxidase in einem Zwei-Vektor-System wurden zunächst BL21star(DE3)-Zellen mit den Chaperonplasmiden (Tab. 2.10) transformiert und anschließend von positiven Transformanten TSS kompetente Zellen (s. 2.2.3.9) hergestellt, die danach für die Transformation mit dem Vektor pColdI-AAO verwendet wurden.

#### **2.2.5 Blau/Weiß-Screening**

Zur Identifizierung Insert-positiver Transformanten diente das sogenannte Blau/Weiß-Screening. Hierzu wurden vor dem Ausplattieren der Zellen 40 µL X-β-Gal-Lösung (40 mg mL<sup>-1</sup> in DMF) und 40 µL IPTG auf die Platten aufgebracht und verteilt. Anschließend wurden die Platten für ca. 30 min auf 37 °C temperiert. Die transformierten Zellen wurden auf den vorbereiteten Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Blau-Weiß-Selektion wird ein Bakterienstamm benötigt, der das *LacZα*-Gen im Vektor komplementiert. Entsprechende Stämme besitzen das ω-Fragment der β-Galactosidase und den Genotyp *lacZΔM15*. Die multiple Klonierungsstelle des Vektors liegt im *lacZ'*-Gen, das das N-terminale α-Fragment der β-Galaktosidase codiert und alleine keine β-Galaktosidase-Aktivität besitzt. Nehmen Zellen einen Vektor ohne Insert auf, kommt es zur α-Komplementation, und es wird aktive β-Galactosidase gebildet. Diese Bakterien können das Substrat X-β-Gal spalten und die Kolonien färben sich blau (Produkt: 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlorindigo). Wird das *lacZ'*-Gen im Vektor durch Insertion eines DNA-Fragmentes unterbrochen, bleiben die Kolonien weiß.

Die potentiell positiven, weißen Klone wurden mittels Kolonie-PCR analysiert. Weiterhin wurden mit diesen Klonen Übernachtskulturen angeimpft.

#### **2.2.6 Glycerolkulturen von *E. coli***

Für die dauerhafte Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerol-Stocks angelegt. Dazu wurden 500 µL einer frischen Übernachtskultur mit dem selben Volumen steriler Glycerolstock-Lösung (s. 2.2.3.2) vermischt. Die Mischung wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen Arbeiten richten sich größtenteils nach den Vorschriften aus dem Laborhandbuch *The condensed protocols - From Molecular Cloning: A Laboratory Manual* von Sambrook und Russell (2006).

### 2.3.1 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA von *Pleurotus sapidus* erfolgte aus Myzel vom 4. Kulturtag mittels NucleoSpin® Plant II Kit (Tab. 2.5). Dazu wurden 100 mg Myzel unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser homogenisiert und in 400 µL PL1-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 10 µL RNase A zugegeben und der Ansatz 30 min bei 65 °C inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach Herstellerangaben (Handbuch, Juli 2009, Rev. 03). Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µL nukleasefreiem Reinstwasser (70 °C). Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am Nanophotometer. Die genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert und für die molekulare Identifizierung des Pilzes verwendet.

### 2.3.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte aus Myzel von *Pleurotus sapidus*, das am Tag maximaler Enzymaktivität geerntet wurde. Dazu wurden 100 mg gefrorenes Myzel des Basidiomyceten unter flüssigem Stickstoff in einem RNase-freien Mörser (Behandlung mit trockener Hitze über Nacht bei 200 °C) aufgeschlossen und in 450 µL RLT-Puffer aufgenommen. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy™ Plant Mini Kits (Tab. 2.5, Handbuch 04/2006) nach Herstellerangaben. Die Elution der Gesamt-RNA von der Säule erfolgte mit 30 µL H<sub>2</sub>O. Das Eluat wurde bei -80 °C gelagert.

### 2.3.3 Überprüfung der RNA-Stabilität

Zur Überprüfung der Qualität der RNA-Präparation wurden 4 µL des Eluats für 2 h bei 42 °C bzw. auf Eis gelagert. Anschließend wurde die RNA mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.4.1) analysiert.

### 2.3.4 Reverse Transkription (Erststrangsynthese) und cDNA-Synthese

Für die reverse Transkription und cDNA-Synthese wurde das „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit“ (Clontech) verwendet (Chenchik *et al.* 1998, Zhu *et al.* 2001). Für die Erststrangsynthese wurde ein CDS-Primer (Tab. 2.8) verwendet, der an das Poly-A-Ende eukaryotischer mRNA bindet (Borson *et al.* 1992). Mit Hilfe der reversen Transkriptase wird die mRNA in cDNA umgeschrieben (Abb. 2.1). Anstelle der vom Hersteller angegebenen „PowerScript Reverse

Transcriptase“ wurde die SuperScript® II bzw. SuperScript® III Reverse Transkriptase (Tab. 2.6) verwendet (Gerard *et al.* 1997). Diese hat eine höhere Thermostabilität und eine längere Halbwertszeit bei 50 °C, sodass die reverse Transkription in einem Bereich zwischen 37 °C und 50 °C möglich ist. Die Inkubationstemperaturen wurden den Herstellerangaben entsprechend angepasst. Die Denaturierung erfolgte bei 65 °C (5 min), die reverse Transkription bei 50 °C für 30 bis 60 min. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min beendet. Als *Template* für die reverse Transkription wurden 3 µL RNA eingesetzt. Erreicht die Reverse Transkriptase das 5'-Ende der RNA werden einige Desoxycytidine angefügt. Der SMART-Primer (SMART II A, Tab. 2.8), der am 3'-Ende einen Oligo(dG)-Überhang besitzt, bindet an den Oligo(dC)-Schwanz des neusynthetisierten Erststrangs. Anschließend wird der Primer aufgefüllt und die cDNA in einer Long-Distance-PCR (LD-PCR, 2.3.5) mit dem Primer 5' PCR-Primer II A amplifiziert. Dafür wurde der Advantage™ 2 LD-Polymerase-Mix verwendet, der neben einer primären Polymerase eine weitere Polymerase mit *proofreading*-Funktion enthält. Dieser Mix erlaubt die Amplifikation längerer cDNA-Sequenzen mit größerer Genauigkeit und Ausbeute als bei einer Standard-PCR.

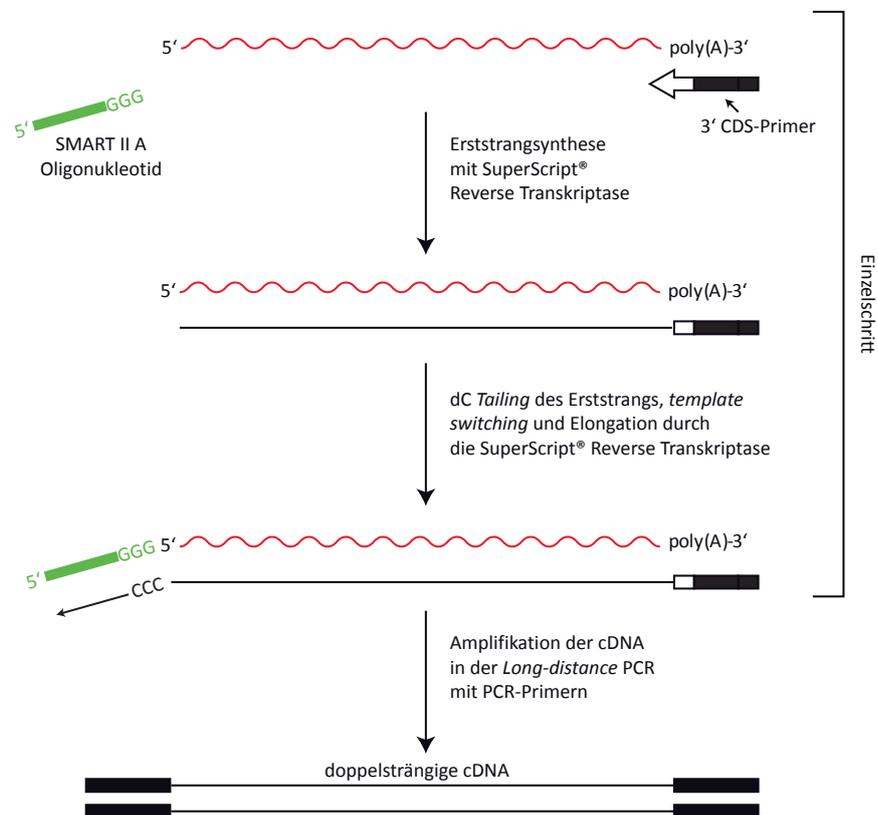


Abbildung 2.1: Reverse Transkription und cDNA-Synthese zur Erstellung einer cDNA-Bank. Verändert nach SMARTer® PCR cDNA Synthesis Kit User Manual, Januar 2012, Clontech

### Cyclerprogramm für die LD-PCR

Deckeltemperatur	105 °C	
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min
23 Zyklen	95 °C	15 s
	65 °C	30 s
	68 °C	6 min

Um die optimale Zahl an PCR-Zyklen zu bestimmen, wurde nach den Zyklen 20, 21, 22 und 23 jeweils ein Reaktionsgefäß aus dem Cycler entnommen und auf Eis gestellt. Die optimale Zahl an PCR-Zyklen stellt sicher, dass sich die Amplifikation der cDNA noch in der exponentiellen Phase befindet. Dafür wurde die cDNA mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert. Die cDNA wurde aliquotiert und bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

### 2.3.5 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Desoxyribonukleinsäuren (Saiki *et al.* 1988). In der vorliegenden Arbeit diente die PCR der Synthese von cDNA, der Generierung von Inserts für Klonierungen und der Suche nach Insert-positiven Klonen (Kolonie-PCR) im Anschluss an Ligationen. Für das Screening nach Insert-positiven Klonen wurde in der Regel die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet, während bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten im Rahmen einer Klonierung die HiFidelity DNA-Polymerase eingesetzt wurde. Beide Polymerasen fügen einen A-Überhang an das PCR-Produkt an, der eine TA-Klonierung ermöglicht. Die HiFidelity DNA-Polymerase verfügt jedoch außerdem über eine zusätzliche Eigenschaft: Sie besitzt eine 3'–5' -Exonuklease-Aktivität, die ein sogenanntes *proofreading* (Korrekturlesen) ermöglicht und dabei den A-Überhang erhält.

#### 2.3.5.1 Primerableitung

Die Primer für die Klonierung der untersuchten Enzyme wurden auf Grund der hohen Sequenzhomologie der nahen Verwandten *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii* und *P. pulmonarius* entweder von Sequenzen publizierter homologer Enzyme oder aus genomischen Sequenzen von *Pleurotus ostreatus* abgeleitet, der im Rahmen eines Genomprojektes sequenziert wird (DOE-JGI<sup>3</sup>, Tab. 2.12). Die Lage der Primer wurde so gewählt, dass das amplifizierte Fragment sowohl Start- als auch Stoppcodon enthielten. Für das Umklonieren wurden Primer verwendet, bei denen am 5' -Ende Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen angefügt wurden.

<sup>3</sup>Joint Genome Institute, United States Department of Energy

Die Berechnung der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der Primer erfolgte anhand der  $2^\circ\text{C} + 4^\circ\text{C}$ -Regel:

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

$n$ : Anzahl der Basen

Die Primerpaare wurden so entworfen, dass die Schmelztemperatur maximal um  $2^\circ\text{C}$  variierte.

Für die Generierung von Inserts für die Klonierung wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

#### PCR-Ansatz

<i>template</i>	50-100 ng	X $\mu\text{L}$
5×PCR-Puffer, incl. dNTP-Mix	1 ×	10 $\mu\text{L}$
Primer fwd (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{L}$
Primer rev (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{L}$
HotStar HiFidelity DNA-Polymerase (2,5 U $\mu\text{L}^{-1}$ )	0,05-0,1 U $\mu\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{L}$
Reinstwasser		ad 50 $\mu\text{L}$

Die PCR wurde mit einem Volumen von 30 bis 50  $\mu\text{L}$  durchgeführt. Im dargestellten PCR-Ansatz wurden die Volumina für einen 50  $\mu\text{L}$ -Ansatz angegeben.

#### Cyclerprogramm

Deckeltemperatur	105 $^\circ\text{C}$		
Initiale Denaturierung <i>Hot Start</i>	95 $^\circ\text{C}$	5	min
40 Zyklen	95 $^\circ\text{C}$	60	s
	$x - 5$ $^\circ\text{C}^a$	60	s
	72 $^\circ\text{C}$	60 bis 150 <sup>b</sup>	s
finale Elongation	72 $^\circ\text{C}$	5	min
Ende	4 $^\circ\text{C}$	$\infty$	

<sup>a</sup>  $x$  niedrigere Schmelztemperatur der verwendeten Primer

<sup>b</sup> Abhängig von der Länge des erwarteten Produktes: Geschwindigkeit der *Taq* 2000 b  $\text{min}^{-1}$ , der HiFidelity-*Taq* 1000 b  $\text{min}^{-1}$

#### 2.3.5.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur Identifizierung Insert-positiver Transformanten verwendet (Bergkessel und Guthrie 2013). Dabei wurden direkt Zellen einer einzelnen Kolonie als *template* eingesetzt. Die Zellen wurden mit einem sterilen Zahnstocher „gepickt“ und in 15,5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  suspendiert. Nach Übertragung von Zellen in das Wasser wurde mit dem Zahnstocher eine 3 mL-Übernachtskultur angeimpft. Für die PCR wurde ein vektorspezifischer Primer mit einem

Gen-spezifischen Primer kombiniert. Der vektorspezifische Primer bindet auf dem Vektor außerhalb des Inserts, während der andere Primer am gegenüberliegenden Ende im Insert bindet. So entsteht ein Fragment, welches ca. 200 bp größer ist als das Insert.

### Kolonie-PCR-Ansatz

<i>template</i>	Zellen von <i>E. coli</i>	
10×CoralLoad PCR-Puffer	1 ×	2,0 µL
dNTP-Mix <sup>a</sup> (je 10 mM)	200 µM	0,4 µL
Primer fwd (10 µM)	0,1-0,5 µM	1,0 µL
Primer rev (10 µM)	0,1-0,5 µM	1,0 µL
HotStar Taq (5 U µL <sup>-1</sup> )	0,025 U µL <sup>-1</sup>	0,1 µL
Reinstwasser		ad 20 µL

<sup>a</sup> Der dNTP-Mix wurde selbst hergestellt. Dafür wurden die lyophilisierten Desoxyribonukleosidtriphosphate so gelöst, dass eine 100 mM-Stammlösung erhalten wurde. Anschließend wurden je 10 µL der dNTPs zu 60 µL Reinstwasser gegeben und der Mix bei -20 °C gelagert.

Das Cyclerprogramm wurde entsprechend der Größe des Inserts für die Kolonie-PCR angepasst.

## 2.3.6 Klonierung und Modifikation von DNA

### 2.3.6.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der PCR (s. 2.3.5) wurden die Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese getrennt. Die relevanten PCR-Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA anschließend mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits* der Firma Macherey-Nagel (Tab. 2.5) aus dem Gel extrahiert, wobei nach Herstellerangaben (Handbuch April 2008/Rev.07) gearbeitet wurde. Für die Elution wurden 30 µL Reinstwasser verwendet.

### 2.3.6.2 TA-Klonierung

Die isolierten PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung in den Vektor pCR2.1 bzw. pCR2.1-TOPO zwischenkloniert. Die Einführung eines DNA-Fragments in einen Vektor mittels TA-Klonierung beruht auf der Entdeckung, dass die *Taq*-Polymerase bei einer PCR keine Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern meist einen unspezifischen Überhang von einer Base schafft (Clark 1988). Diese Base ist in der Mehrzahl der Fälle Adenosin (Costa und Weiner 1994). Durch die Konstruktion eines Vektors mit komplementären Thymidin-Überhang (Marchuk *et al.* 1991) lassen sich PCR-Fragmente leicht klonieren. In dieser Arbeit wurden das TA- bzw. TOPO-TA *Cloning Kit* (Tab. 2.5) verwendet. Bei der TA-Klonierung wird das frisch hergestellte und isolierte PCR-Produkt (s. 2.3.6.1) mit der T4-DNA-Ligase in den linearisierten Vektor pCR 2.1<sup>®</sup> eingebracht. Die T4-DNA-Ligase ist für die Ligation besonders geeignet, da sie als einzige Ligase in der Lage ist, neben „sticky ends“ auch „blunt ends“ zu ligieren. Der linearisierte

TOPO-Vektor (Invitrogen) besitzt an seinen 5'-Enden einzelne Desoxythymidinreste, die kovalent mit einer Vaccina Topoisomerase-I verknüpft sind und somit eine noch effizientere Ligation mit PCR-Produkten ermöglichen. Die Vaccina Topoisomerase-I besitzt eine hochspezifische Endonukleaseaktivität und schneidet DNA am Konsensus-Pentapyrimidin-Element 5' (T/C)CCTT<sup>d</sup> und bleibt anschließend mit dem 3'-Phosphat kovalent verbunden (Shuman 1994). Die Topoisomerase kann die ursprüngliche Bindung im DNA-Strang wieder herstellen (wie bei der Entspannung von DNA) oder eine heterologe Akzeptor-DNA ligieren. Bei beiden verwendeten Systemen ist die Selektion Insert-positiver Transformanten mittels Blau/Weiß-Screening (s. 2.2.5) möglich.

Für die Ligation wurden die PCR-Produkte im Verhältnis zum Vektor in einem dreifach molaren Überschuss eingesetzt.

### Ligationsansatz

<b>TA-Klonierung</b>		<b>TOPO-TA-Klonierung</b>	
frisches PCR-Produkt	X $\mu$ L	frisches PCR-Produkt	X $\mu$ L
10 $\times$ Ligationspuffer	1 $\mu$ L	Salzlösung	1 $\mu$ L
pCR <sup>TM</sup> 2.1-Vektor (25 ng $\mu$ L <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ L	pCR <sup>®</sup> II TOPO Vektor (10 ng $\mu$ L <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ L
T4-DNA-Ligase	1 $\mu$ L		
H <sub>2</sub> O (steril)	ad 10 $\mu$ L	H <sub>2</sub> O (steril)	ad 6 $\mu$ L
Ligation über Nacht bei 16 °C		Ligation 30 min bei RT	

Die verschiedenen Ligationsansätze sind in Tabelle 2.17 zusammengefasst. 2  $\mu$ L jedes Ligationsansatzes wurden in *E. coli* Top10-Zellen transformiert (2.2.4) und Insert-positive Transformanten mittels Blau/Weiß-Screening (s. 2.2.5) identifiziert. Je 10 Insert-positive Einzelklone wurden bezüglich ihrer Plasmid-DNA analysiert (s. 2.3.5.2). Von Transformanten, die einen Insert mit der erwarteten Größe hatten, wurden Übernachtskulturen angesetzt und die Plasmide isoliert (s. 2.3.7). Die Plasmide von je zwei bis sechs Insertpositiven Klonen wurde zum Sequenzieren an die Firma Eurofins MWG Operon gesendet (s. 2.3.7.1). In Tabelle 2.17 ist jeweils der Plasmidklon angegeben, der für die Konstruktion der Expressionsvektoren (s. 2.3.6.4) verwendet wurde.

Tabelle 2.17: Zusammenfassung der Ligationen für die Herstellung der verschiedenen Klonierungsvektoren

<b>Ligierte Fragmente</b>	<b>Plasmidklon mit sequenziertem Insert</b>
pCR2.1-TOPO 3931 kb + cDNA AAO 1782 kb	pCR2.1-TOPO-AAO # TOPO4K3(2)
pCR2.1-TOPO 3931 kb + cDNA GDS(L)-Lipase 954 kb	pCR2.1-TOPO-GDS(L)-Lipase # Taq 9.1.2
pCR2.1-TOPO 3931 kb + cDNA DyP-TyP Peroxidase 1551 kb	pCR2.1-TOPO-DyP # Dyp-Typ_K10

### 2.3.6.3 Gensynthese

Für die Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus* wurde ein synthetisches Gen bei der Firma MWG Operon generiert und in den Vektor pBS II SK(+) kloniert. Dabei wurde die *codon usage* für eine Expression in *E. coli* B optimiert (s. 7.1) und die Sequenz mit den flankierenden Restriktionsschnittstellen NdeI/XhoI versehen, die eine Klonierung in das pColdI-Plasmid erlauben.

### 2.3.6.4 Konstruktion von Expressionsvektoren

Für die heterologe Expression der Zielenzyme wurde die cDNA mit und ohne Signalsequenz in verschiedene Expressionsvektoren (Tab. 2.9) kloniert. Dafür wurde das Insert aus den Klonierungsvektoren (Tab. 2.17) zunächst mittels PCR amplifiziert, wobei mit Hilfe der Primer Restriktionsschnittstellen an den Enden der Fragmente angefügt wurden (Scharf *et al.* 1986). Nach der Reinigung wurden die PCR-Produkte asymmetrisch mit Restriktionsenzymen geschnitten. In gleicher Weise wurde der Zielvektor asymmetrisch linearisiert. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen verhindert eine Rezirkularisierung des Zielvektors und ermöglicht die Einführung des Inserts in Leserichtung.

### 2.3.6.5 DNA-Verdau mittels Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen sind eine Gruppe an Enzymen, die die Phosphordiesterbindung der DNA an spezifischen Stellen hydrolysieren. Für jede Restriktionsendonuklease gibt es spezifische Inkubationstemperaturen und Reaktionspuffer. Werden diese nicht optimal gewählt, kann es zu einer veränderten Aktivität kommen, die als „*star activity*“ bezeichnet wird. Diese tritt vor allem bei zu hoher Enzymaktivität (eingesetzte Units) oder falschen Salzbedingungen auf. Die Restriktionsspaltungen wurden verwendet, um DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden für die Klonierung herzustellen. Dafür wurden Ansätze mit einem Volumen von 20 µL bzw. 30 µL gewählt und 0,5 µg PCR-Produkt bzw. 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. In der Regel wurden Restriktionsspaltungen direkt mit zwei Enzymen durchgeführt. Ausnahme waren Enzyme, die auf Grund der Position der Schnittstellen nicht kompatibel waren. Der Verdau erfolgte bei 37 °C im vom Hersteller empfohlenen Puffer. Die Erkennungssequenzen und die Schnittstellen der verwendeten Enzyme sind in Tabelle 2.7 dargestellt. Die Inkubationszeit variierte zwischen 1 und 4 h. Von jedem Restriktionsenzym wurden 10 bis 20 U verwendet.

### 2.3.6.6 Sequentieller Verdau

Der sequentielle Verdau erfolgte analog zu 2.3.6.5. Zunächst wurde die Restriktion mit dem ersten Enzym für 4 h bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde dem Restriktionsverdau das zweite Restriktionsenzym (1 µL, 10 U µL<sup>-1</sup>) zugefügt und die Proben für weitere 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau erfolgte die Hitzeinaktivierung der Enzyme (80 °C, 15 min).

### 2.3.6.7 Restriktion mit FastDigest™ Enzymen

Teilweise wurden FastDigest™ Enzyme verwendet. Diese Enzyme sind in der Lage 1 µg DNA in 5 min und somit deutlich schneller als andere handelsübliche Restriktionsenzyme zu verdauen. Außerdem können alle Restriktionsenzyme in einem Reaktionspuffer verwendet werden. Die Restriktion erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (37 °C in 1× FastDigest Puffer). Die Inkubationszeit wurde abweichend von den Herstellerangaben auf 30 min erhöht. Nach dem Restriktionsverdau erfolgte die Hitzeinaktivierung der Enzyme und die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese getrennt. Die relevanten DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem PCR *clean up* Gel *Extraction* Kit von Macherey-Nagel aus dem Gel isoliert. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µL nukleasefreiem Wasser. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch (NanoPhotometer®) bestimmt.

#### Zusammensetzung des Restriktionsverdaus

	PCR-Produkt	Vektor
DNA	0,5 µg	1 µg
10×Fast Digest Puffer	3 µL	2 µL
Restriktionsenzym1 (10 U µL <sup>-1</sup> )	2 µL	1 µL
Restriktionsenzym2 (10 U µL <sup>-1</sup> )	2 µL	1 µL
H <sub>2</sub> O ad	30 µL	20 µL

### 2.3.6.8 Ligation

Für die Ligation der Inserts in die Expressionsvektoren wurden 50 bis 100 ng des restriktionsverdauten Vektors und die dreifache molare Menge an Insert zusammen mit der vom Hersteller empfohlenen Menge an T4-DNA-Ligase in Ligasepuffer inkubiert. Das Ansatzvolumen entsprach 20 µL. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für 2 h oder über Nacht bei 8 °C.

#### Ligationsansatz

PCR-Produkt, geschnitten	X µL
5×Ligationspuffer	4 µL
Vektor, linearisiert	X µL
T4-DNA-Ligase	2 µL
H <sub>2</sub> O (steril)	ad 20 µL

Die unterschiedlichen Ligationen sind in Tabelle 2.18 zusammengefasst. Verschiedene chemisch kompetente *E. coli*-Stämme wurden mit den Ligationsansätzen transformiert und ampicillinresistente Einzelklone bezüglich ihrer Plasmid-DNA mittels Kolonie-PCR analysiert. Die Insertsequenz wurde bei je zwei bis sechs positiven Plasmidklonen sequenziert (Firma Eurofins MWG Operon). Plasmidklone mit einer korrekten Insertsequenz wurden zur Stammgenerierung verwendet.

Tabelle 2.18: Zusammenfassung der Konstrukte der verschiedenen Expressionsplasmide

Fusionsprotein	Klonierungselemente	Restriktionsenzyme	Plasmidklon mit sequenziertem Insert
His <sub>6</sub> -AAO	pET 15b PCR-Produkt AAO	NdeI/XhoI	pET 15b AAO #1(3), 1(5)
His <sub>6</sub> -AAO <sup>a</sup>	pColdI PCR-Produkt AAO	NdeI/XhoI	pColdI-AAO #K1(+), K3(+) pColdI-AAO #K5(-) K3 (-)
MBP-AAO	pMal-c4x PCR-Produkt AAO	XbaI/Sall	pMAL-c4x AAO # c7, c10
MBP-AAO	pMal-p4x PCR-Produkt AAO	XbaI/Sall	pMAL-p4x AAO # p1, p3
His <sub>6</sub> -GDS(L)	pET 15b PCR-Produkt GDS(L)	NdeI/BamHI	pET 15b GDS(L) #3

<sup>a</sup>Synthetisches Gen

### 2.3.7 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden

Die Plasmid-DNA wurde *in vivo* in geeigneten *E. coli*-Stämmen amplifiziert. Dafür wurden 3 mL LB-Medium mit transformierten *E. coli*-Zellen (s. 2.2.4.1) angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (37 °C, 225 U min<sup>-1</sup>) inkubiert. Die Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA aus den Zellen erfolgte anschließend mittels Nucleo Spin<sup>®</sup> Plasmid Kit (Tab. 2.5) nach Herstellerangaben (Stand: September 2007, Rev. 04). Die Elution der DNA erfolgte mit 60 µL nukleasefreiem Reinstwasser (70 °C).

#### 2.3.7.1 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) nach der Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Für die Sequenzierung mit Standard-Sequenzierungsprimern wurden jeweils 15 µL der gereinigten Plasmid-DNA (s. 2.3.7) mit einer Konzentration von 50 bis 100 ng µL<sup>-1</sup> in einem 1,5 mL-*safe lock* Reaktionsgefäß an die Firma gesendet. Wurden für die Sequenzierung spezifische Primer verwendet, wurden 2 µL der entsprechenden Primer (10 µM) zu den 15 µL Plasmid-DNA gegeben und in einem Gesamtvolumen von 17 µL eingesendet. Die Analyse der Sequenzen wurde mit einer Testversion von ChromasPro 1.3 durchgeführt und Vektor- und Insertsequenzen identifiziert. Mit den erhaltenen Sequenzen wurden Datenbankrecherchen (EMBL-EBI, NCBI mittels nBlast und FASTA) und ein Abgleich mit dem Genom von *Pleurotus ostreatus* (DOE-JGI Genomprojekt) durchgeführt.

### 2.3.8 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde über die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration wurde aus der Absorption ( $E_{260}$ ), der Verdünnung und einem für DNA bzw. RNA spezifischen Multiplikationsfaktor<sup>4</sup> berechnet. Außerdem wurde mit Hilfe des Verhältnisses von  $E_{260}$  zu  $E_{280}$  die Reinheit der Nukleinsäure überprüft. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen  $E_{260}/E_{280}$ -Wert von 1,8 und eine reine RNA-Lösung von 2,0.

$$c = E_{260} \cdot V \cdot F \quad (2)$$

$E_{260}$  = Absorption bei 260 nm

$V$  = Verdünnungsfaktor

$F$  = Multiplikationsfaktor

## 2.4 Elektrophoresen

Die Gelelektrophorese wurde in der vorliegenden Arbeit zur Analyse von Proteinen und Nukleinsäuren verwendet.

### 2.4.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde mit zwei verschiedenen Gelsystemen der Firma Peqlab durchgeführt. Für kleine Gele (7 cm × 8 cm) wurde das PerfectBlue<sup>®</sup> Mini S-System und für große Gele (12 cm × 14 cm) das PerfectBlue<sup>®</sup> Mini L-System (Tab. 2.1) verwendet. Außerdem wurden folgende Puffer verwendet.

#### Puffer für die Agarosegelelektrophorese

##### 50× Tris-Acetat-EDTA Elektrophoresepuffer (50× TAE)

Tris	2 M
Essigsäure	1 M
0,5 M EDTA pH 8,0	50 mM

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

##### 6× Auftragspuffer

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

<sup>4</sup>1  $E_{260}$  entspricht 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  dsDNA bzw. 40 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  RNA

## Durchführung

Die Agarosegelelektrophorese wurde für die Analyse von Plasmidpräparationen und PCR-Produkten eingesetzt (McDonnell *et al.* 1977, Southern 1979). Für die Auftrennung hochmolekularer Nukleinsäuren (> 2000 bp) wurden in der vorliegenden Arbeit 0,8%ige und 1%ige (w/v) Agarosegele, für die von niedermolekularen Nukleinsäuren (< 2000 bp) 1,2%ige (w/v) Agarosegele in TAE verwendet. Die Agarose wurde in 56 mL (kleine Gele) bzw. 168 mL (große Gele) TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen (<60 °C) unter Rühren wurde dem Trägermaterial unmittelbar vor dem Gießen 0,01% (v/v) Ethidiumbromid-Lösung zugegeben. Das Agarosegel wurde in den Gelträger mit eingesetztem Kamm gegossen, nach vollständiger Polymerisation in die Elektrophoresekammer eingesetzt und vollständig mit 1× Laufpuffer überschichtet. Wurde für eine PCR 10× Coral load PCR Puffer (Qiagen) verwendet, wurden die Proben direkt aufgetragen. Andere DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6× Auftragspuffer versetzt. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurden zusätzlich 7 µL einer DNA-Leiter (Tab. 2.4) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde horizontal mit einer konstanten Spannung von maximal 10 V cm<sup>-1</sup> (80 bis 140 V) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels UV-Detektion. Die Dokumentation erfolgte mit der Geldokumentationsanlage der Firma Decon Science Tec (Tab. 2.1 mit UV-Transilluminator (312 nm)).

### 2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) wurden unter nativen, halbnativen und denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Creighton und Chasman 1997, Laemmli 1970). Für die Elektrophorese wurden die folgenden Gelkammern verwendet: Das PerfectBlue® Doppelgelsystem Twin S von Peqlab bzw. das Mini-Protean® TetraSystem von BioRad (Tab. 2.1).

#### 2.4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

##### Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

###### 10×SDS-Elektrophoresepuffer

Tris-Base	250 mM
Glycin	1,9 M
SDS	1 % (w/v)

Der Puffer wurde vor der Verwendung 1:10 mit VE-Wasser verdünnt (1× SDS-Elektrophoresepuffer).

###### 4×Lower-Tris

Tris-HCl	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

Der pH-Wert des Puffers wurde mit 1 M Natronlauge auf 8,8 eingestellt.

**4×Upper-Tris**

Tris-Base	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

pH-Wert des Puffers wurde mit 1 M Natronlauge auf 6,8 eingestellt.

**2,5×Probenauftragspuffer**

1 M Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	5 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Glycerol	25 % (v/v)

Der SDS-Gelladepuffer wurde aliquotiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**DTT-Stocklösung**

DTT	1 M
-----	-----

Das DTT wurde in Reinstwasser gelöst und die Stocklösung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**APS-Stocklösung**

APS	40 % (w/v)
-----	------------

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

**Durchführung**

Zur Analyse von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Dieses Verfahren nutzt die Tatsache, dass die meisten Proteine SDS binden und mit diesem negativ geladene SDS-Protein-Komplexe bilden (Laemmli 1970). Bei der Probenvorbereitung wurden die Proben (15  $\mu\text{L}$ ) mit einem Überschuss an SDS (12  $\mu\text{L}$  Probenauftragspuffer) versetzt und 5 min auf  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Dabei wurde die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken sowie durch Streckung der Moleküle gelöst. Die Proben wurden danach sofort auf Eis abgekühlt und mit 3  $\mu\text{L}$  Dithiothreitol (DTT) versetzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Größenstandard Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Tab. 2.4) von Fermentas verwendet. Die Gele bestanden aus einem Trenngel (pH 8,8) und einem Sammelgel (pH 6,8) mit einer Gesamtkonzentration von Acrylamid/Bisacrylamid (T) von 12% bzw. 6% (siehe Tab. 2.19). Die Konzentration des Crosslinkers (Bisacrylamid) in der Gesamtkonzentration betrug bei den Gelen 2,6% (C).

Tabelle 2.19: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	<b>Trenngel (12%)</b>	<b>Sammelgel (6%)</b>
Reinstwasser	2,7 mL	1,8 mL
Lower-Tris	1,5 mL	
Upper-Tris		750 $\mu\text{L}$
Rothiphorese Gel 40 (37,5:1) <sup>a</sup>	1,8 mL	450 $\mu\text{L}$
APS-Lösung	15 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
TEMED	7,5 $\mu\text{L}$	4,0 $\mu\text{L}$

<sup>a</sup>40% Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1

Die fertigen Gele wurden in die Gelkammer eingesetzt und mit 1×Lauffpuffer überschichtet. Von jeder Probe wurden abhängig vom Proteingehalt 5 bis 30 µL (5 µg pro Tasche) und zusätzlich auf eine Spur 5 µL des Größenstandards (Tab. 2.4) aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei konstant 10 mA pro Gel während die Proben sich im Sammelgel befanden. Sobald die Proben in das Trenngel einliefen, wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht. Der Lauf wurde beendet, wenn die Lauffront von Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreichte. Im Anschluss wurden die Gele zum Nachweis von Proteinen entweder mit colloidalen Coomassie (s. 2.4.3.1) gefärbt oder für den Western-Blot (s. 2.4.2.6) verwendet.

#### **Bestimmung des Molekulargewichts**

Die Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE erfolgte anhand eines Proteinstandards. Die Logarithmen der Molekulargewichte der Standardproteine wurden gegen den Rf-Wert ihrer Laufstrecke aufgetragen. Anhand der Regressionsgeraden wurde das Molekulargewicht der Zielproteine ermittelt.

#### **2.4.2.2 Halbnative SDS-PAGE**

Die halbnative SDS-PAGE wurde analog zur SDS-PAGE durchgeführt, wobei ein Lauf- und ein Probenauftragspuffer mit halber SDS-Konzentration verwendet wurden. Die Probe wurde nativ – Probenvorbereitung ohne Kochen und Zugabe von DTT-Lösung – auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C durchgeführt.

#### **2.4.2.3 Blue native Gelelektrophorese**

Die *blue native* Gelelektrophorese beruht auf der Bindung des Farbstoffes SERVA Blue G an die Proteine. Dieser Farbstoff ersetzt das denaturierende Detergenz SDS im Lauffpuffer und bildet negativ geladene Farbstoff-Protein-Komplexe, die mit nativer Struktur zur Anode wandern (Wittig und Schägger 2008). Die Wanderung der Komplexe erfolgt bei physiologischem pH unabhängig von ihrem pI. Der Farbstoff wurde mit einer Endkonzentration von 0,02‰ (w/v) zum 1× Kathodenpuffer gegeben. Für die Elektrophorese wurden Gradientengele von Serva® (Acrylamidkonzentration 3-12% (T), Quervernetzerkonzentration 2,6% (C), Schichtdicke 1 mm) verwendet und die Elektrophorese nach Herstellerangaben (10 min 50 V, 120 min 200 V) bei 4 °C durchgeführt. Die Proben wurden 1:2 mit *blue native* Probenauftragspuffer gemischt und pro Tasche 5 bis 30 µL Probe (5 µg bzw. 15 mU Aktivität) aufgetragen. Zusätzlich wurden 7,5 µL nativer Proteinstandard (Tab. 2.4) aufgetragen.

#### **2.4.2.4 Clear native Gelelektrophorese**

Für die *clear native* Gelelektrophorese wurden dieselben Gele wie für die *blue native* Gelelektrophorese verwendet, wobei jedoch auf die Verwendung des Farbstoffes verzichtet wurde. Die Elektrophorese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 2.4.2.5 Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung wurden Polyacrylamidgele mit immobilisierten Ampholinen (pH-Gradient pH 3-10) und einer Schichtdicke von 1 mm verwendet (Serva®). Die Vorbereitung der IEF-Gele erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die Proben wurden 1:2 mit Probenauftragspuffer gemischt und pro Tasche 10 bis 30 µL Probe (5 µg bzw. 15 mU Aktivität) aufgetragen. Zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts wurden 5 µL eines IEF-Standards (Tab. 2.4) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

60 min U = 50 V

60 min U = 200 V

30 min U = 500 V

Die isoelektrischen Punkte der Standardproteine wurden gegen ihre Laufstrecke aufgetragen. Die isoelektrischen Punkte der Zielproteine wurden anhand der Regressionsgeraden ermittelt.

#### 2.4.2.6 Western Blot

Zum Nachweis spezifischer Proteine mit Antikörpern wurden diese aus einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Dadurch liegen die Proteine exponiert an einer Oberfläche vor und können direkt und ungehindert mit anderen Stoffen (wie Antikörpern oder Farbstoffen) reagieren.

#### Lösungen für den Western Blot

##### 10× Wet-Blot Laufpuffer

Glycin	1,9 M
Tris-Base	0,25 M

##### 1× Wet-Blot Laufpuffer

10× Wet-Blot Laufpuffer	100 mL
Methanol	50 mL
VE-Wasser	ad 1 L

##### 10× TBS-Puffer

Tris-HCl	0,5 M
Natriumchlorid	1,5 M

Der pH-Wert des Puffers wurde mit 1 M Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt.

##### 1× TBST-Puffer

10× TBS-Puffer	100 mL
Tween® 20	1 mL
Reinstwasser	ad 1 L

**5%iges Milchpulver in TBST-Puffer**

Milchpulver	50 g
1× TBST-Puffer	ad 1 L

**Strip-Lösung**

Glycin	25 mM
SDS	1 %

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf pH 2,0 eingestellt.

**Durchführung**

Die SDS-PAGE wurde wie beschrieben vorbereitet und durchgeführt. Als Marker wurden 5 µL Page Ruler Prestained Protein Ladder von Fermentas (Tab. 2.4) verwendet. Nach Beendigung des Laufs wurden die aufgetrennten Proteine mittels Tank-Elektroblotter auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Roti<sup>®</sup>-PVDF-Membran, Roth) übertragen.

Für das Blotting wurden die Membran und das Blottingpapier (Whatman<sup>®</sup>, Dassel) auf Gelgröße zugeschnitten. Die Membran wurde 5 min mit Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit dem Blottingpapier und Schwämmen in 1× Wet-Blot Laufpuffer equilibriert. Das Blotting erfolgte für 1 h bei einer Spannung von 100 V. Anschließend wurde die Membran vom Gel getrennt und mit 30 mL 5%iger Milchpulver-Lösung überschichtet. Die überschichtete Membran wurde über Nacht im Kühlschrank gelagert, um freie Bindestellen auf der Membran zu blockieren und eine Hintergrundfärbung zu verhindern (Blocken).

**2.4.2.7 Immunodetektion**

Für den indirekten Nachweis von Proteinen wurden als Primärantikörper verschiedene Antikörper nach dem Blocken zur Milchpulverlösung auf die Membran gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler inkubiert.

**MBP-tag**

Für den Nachweis von Proteinen mit einem MBP-tag wurde ein Anti-MBP-Antiserum (aus Kaninchen) verwendet, das mit dem pMAL<sup>™</sup> Protein Fusion and Purification System (Tab. 2.5) bezogen wurde. Das Antiserum wurde 1:10 000 mit 5% (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer verdünnt.

**His-tag**

Für den Nachweis von Proteinen mit einem His-tag wurde ein polyklonaler Anti-His-Antikörper (pAB aus Kaninchen, AK-online; # ABIN 195461) verwendet (1:5 000 mit 5% (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer verdünnt).

**AAO**

Für den Nachweis der Arylalkoholoxidase wurde ein Antiserum aus Kaninchen verwendet, das gegen die Aminosäuresequenz NQSFNLFDRSSEFNA gerichtet ist. Das Serum wurde 1:2 500 mit 5% (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer verdünnt.

Anschließend wurde die Membran 3× je 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen (H+L) Antikörper verwendet. Der Antikörper wurde 1:15 000 mit TBST-Puffer verdünnt und die Membran für 1 h mit der Lösung auf dem Taumelschüttler inkubiert. Danach wurde die Membran 3× je 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte der Nachweis der Proteine entweder durch eine Chemolumineszenz-Reaktion oder durch eine kolorimetrisch-enzymatische Reaktion.

**Variante A:**

Eine Substrat-Lösung wurde durch Mischen von 0,7 mL Luminol und 0,7 mL Peroxidlösung (Immobilon, Tab. 2.5) hergestellt und vorsichtig über die Membran pipettiert. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Entwicklungsbox geklebt. Innerhalb von 30 min nach dem Start der Reaktion wurde ein Röntgenfilm (Kodak BioMax XAR) 5 bis 120 s belichtet und anschließend entwickelt (Entwicklermaschine von Canon Deutschland GmbH, Krefeld). Alternativ wurde die Chemolumineszenz mit dem VersaDOC™ MP 4000 Imaging System dokumentiert.

**Variante B:**

Das kolorimetrische Färbereagenz wurde durch Mischen von 9 mL destilliertem Wasser, 1 mL Opti-4CN-Diluent und 0,2 mL des Substrates 4-Chlor-1-naphthol hergestellt. Die Lösung wurde gründlich gemischt und vorsichtig über die Membran pipettiert. Die Membran wurde für maximal 30 min inkubiert und anschließend eingescannt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch die Entstehung von dunkel gefärbten Präzipitaten.

**2.4.2.8 Strippen und Rehybridisieren von Western Blots**

Zur erneuten Verwendung bereits hybridisierter Membranen wurden die gebundenen Antikörper entfernt. Dafür wurde der Blot 45 min bei RT auf dem Taumelschüttler mit der Strip-Lösung gewaschen. Anschließend wurden Reste der Strip-Lösung mit TBST entfernt und die Membran neu geblockt (5%iges Milchpulver in TBST-Puffer).

### 2.4.3 Färbungen

#### 2.4.3.1 Colloidal Coomassiefärbung

Die colloidale Coomassiefärbung (nach Kang *et al.* 2002) ist eine schnelle Färbemethode für Proteine in Polyacrylamidgelen, die eine ähnliche Sensitivität wie eine Silberfärbung erreicht (Dyballa und Metzger 2009). Für die Färbung wurde das Gel nach der Elektrophorese zunächst dreimal 5 min mit warmem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel mit colloidalem Coomassie überschichtet und auf einem Taumelschüttler gefärbt, bis eine ausreichende Färbung der Proteinbanden erreicht war. Danach wurde das Gel mit Wasser gewaschen, um eine bessere Kontrastierung zu erreichen. Zur Dokumentation wurde das Gel eingescannt.

#### Färbelösung

Coomassie <sup>®</sup> Brilliant Blue G-250	0,1% (w/v)
Ethanol	10 % (v/v)
Aluminiumsulfat	5 % (w/v)
Phosphorsäure (85%ige)	2 % (v/v)

Für die Herstellung der Färbelösung wurde zunächst das Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue G-250 in Ethanol gelöst und anschließend das Aluminiumsulfat und die Phosphorsäure zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht unter Lichtausschluss gerührt und anschließend filtriert. Die fertige Lösung wurde im Dunkeln gelagert und bis zu dreimal verwendet.

#### 2.4.3.2 Färbung für Häm- und Metallenzyme

Die Hämfärbung (modifiziert nach Thomas *et al.* 1976 und Henne *et al.* 2001) wurde für den Nachweis der Peroxidase (Prothetische Gruppe Häm) nach nativer bzw. halbnativer PAGE und IEF verwendet. Für die Färbung des Gels wurde eine TMB-Lösung ( $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$  in Methanol) frisch hergestellt. Anschließend wurden 30 mL der Lösung mit 70 mL Natriumacetat-Puffer (250 mM, pH 5,0) gemischt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese 45 bis 60 min im Dunkeln in der frisch hergestellten Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde 100  $\mu\text{L}$  30%iges  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Endkonzentration 0,9 mM) zugegeben und für 1 min inkubiert. Das gefärbte Gel wurde kurz mit Reinstwasser gewaschen und zur Dokumentation eingescannt.

#### 2.4.3.3 Aktivitätsfärbungen

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen nach nativen elektrophoretischen Trennmethode – wie native bzw. halbnative PAGE und IEF – wurden Aktivitätsfärbungen durchgeführt. Dafür wurde jede Probe zweimal auf ein Gel aufgetragen und das Gel nach der Elektrophorese geteilt. Eine Hälfte wurde mit colloidalem Coomassie gefärbt, während mit der anderen Hälfte

die Aktivitätsfärbung durchgeführt wurde. Vor der Aktivitätsfärbung wurde das Gel mit dem entsprechenden Puffer gewaschen.

#### **2.4.3.4 Aktivitätsfärbung mit ABTS**

Für den Nachweis der Peroxidase wurde nach der Elektrophorese eine Aktivitätsfärbung mit ABTS durchgeführt. Dafür wurde das Gel für 5 min in 100 mL frisch hergestellter Färbelösung (5 mM ABTS in 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0) auf dem Taumelschüttler unter leichtem Schütteln equilibriert. Anschließend wurden 150  $\mu$ L 3%iges  $H_2O_2$  (Endkonzentration 130  $\mu$ M) zugegeben und solange weiter geschüttelt, bis eine deutliche Färbung erreicht war. Nach Waschen mit Reinstwasser wurde das Gel dokumentiert.

#### **2.4.3.5 Aktivitätsfärbung mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)**

Ebenfalls für den Nachweis der Peroxidase wurde das Chromogen AEC verwendet. Dafür wurde das Gel mit Wasser gewaschen und ca. 30 min in 100 mL McIlvaine-Puffer (pH 5,0; s. 2.6.1) equilibriert (Taumelschüttler). Anschließend wurden 50 mg AEC in 1 mL Aceton gelöst und dem Puffer hinzugefügt. Die Färbung wurde durch die Zugabe von 150  $\mu$ L 3%igem  $H_2O_2$  (Endkonzentration 130  $\mu$ M) gestartet und das Gel solange weiter unter Schütteln inkubiert, bis die maximale Färbung erreicht war.

#### **2.4.3.6 Aktivitätsfärbung mit $\alpha$ -Naphthylacetat (Esterasefärbung)**

Der Nachweis von Esteraseaktivität erfolgte mit  $\alpha$ -Naphthylacetat und Echtblau. Dafür wurde das Gel 30 min in 200 mL Phosphatpuffer pH 7,4<sup>5</sup> unter Schütteln equilibriert. Danach wurden zu dem Puffer die  $\alpha$ -Naphthylacetat- und Echtblaulösung gegeben und ca. 30 min bis zur maximalen Färbung der Esterasebanden inkubiert.

Für die Herstellung der  $\alpha$ -Naphthylacetatlösung wurden 40 mg des Substrates in 1 bis 2 mL Aceton gelöst und solange mit VE-Wasser versetzt, bis eine Trübung einsetzte. Für die Echtblau-Lösung wurden 100 mg Fast Blue RR-Salz in 5 mL Methanol gelöst.

---

<sup>5</sup>A – 66 mM  $KH_2PO_4$ , B – 66 mM  $Na_2HPO_4$ ; A und B wurden gemischt, um pH 7,4 einzustellen

## 2.5 Proteinbiochemische Arbeiten

### 2.5.1 Heterologe Expression

#### 2.5.1.1 Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Vor der rekombinanten Produktion von Proteinen im 100 mL-Maßstab wurde die Expression in einem Miniexpressionstest (3 mL-Expressionskultur) überprüft.

Für die Proteinexpression wurden zunächst 3 mL-Übernachtskulturen (s. 2.2.3.8) vorbereitet. Nach dem Animpfen des Mediums wurde zusätzlich eine Agarplatte angeimpft, um von demselben Klon erneut Proteine gewinnen zu können. Mit 30  $\mu\text{L}$  (1% (v/v)) der Übernachtskultur wurden 3 mL LB-Medium (mit Antibiotika) in einem 15 mL-Falcon Tube inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 225  $\text{U min}^{-1}$  im Luftschüttler inkubiert, bis eine Zelldichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0,5–0,8 erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression und die Kulturen wurden wie unter A–C beschrieben weitergeführt. Vor der Induktion (VI) und am Ende der Kultivierung (NI) wurde jeweils ein 500  $\mu\text{L}$ -Aliquot entnommen, bei 14 000  $\text{U min}^{-1}$  (18 000  $\times g$ ) für eine 1 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 50  $\mu\text{L}$  Auftragspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt und nach dem Abkühlen 5  $\mu\text{L}$  DTT zugefügt. Zur Kontrolle der Expression wurden 10  $\mu\text{L}$  der Proben mittels SDS-PAGE analysiert. Als Negativkontrolle wurde jeweils der entsprechende Vektor ohne Insert im verwendeten Expressionsstamm mitgeführt.

Die Produktion im 100 mL-Maßstab erfolgte analog zur Miniexpression. Dafür wurden 100 mL LB Medium (mit Antibiotika) in einem 250 mL-Erlenmeyerkolben mit 1 mL (1% (v/v)) der Übernachtskultur inokuliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Steuerung der Expression verschiedene Operons und Induktionsmechanismen verwendet (siehe A–C).

#### A — Expression mit pMAL

Für die Expressionsversuche wurden die Klone pMAL-c4x AAO # c7 und pMAL-c4x AAO # c10 sowie die Klone pMAL-p4x AAO # p1 und pMAL-p4x AAO # p3 verwendet. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG (final 0,3 mM) induziert. Dem Expressionsmedium wurde zusätzlich 0,2% (w/v) Glucose zugefügt, um das *E. coli* eigene Maltose-System zu reprimieren. Dadurch wird die Expression von Amylasen unterdrückt, die zu Problemen bei der Reinigung des Fusionsproteins über die Amylosesäule führen können. Diese Enzyme können die Maltose aus dem Säulenmaterial freisetzen und so die Bindung des Fusionsproteins an die Säule verhindern bzw. das Protein von der Säule eluieren (Handbuch pMAL Proteinfusions- und Reinigungssystem). Die Expression erfolgte für 3 h bei 37 °C bzw. für 16 h bei 20 °C.

## **B — Expression mit pET 15b**

Für die Expression wurden die Klone pET 15b AAO # 1(3) und pET 15b AAO # 1(5) verwendet. Die Induktion der Expression des Fusionsproteins erfolgte durch Zugabe von IPTG (final 0,3 mM). Anschließend wurden die Kulturen 3 h bei 37 °C inkubiert.

## **C — Expression pCold-System und Chaperon-Koexpression**

Die Koexpression der Arylalkoholoxidase mit Chaperonen erfolgte unter Verwendung des pCold-Systems und des Chaperon Plasmid Sets der Firma TaKaRa Bio Inc.. pCold I wurde als Expressionsplasmid aus der pCold-Serie ausgewählt. Für die effiziente Expression bei niedrigen Temperaturen nutzen die Plasmide dieser Serie den durch einen Kälteschock induzierbaren *cspA*-Promotor (Qing *et al.* 2004). Weiterhin unterstützen sie die Koexpression von Chaperonen. Für die Expression wurde Vektor der pColdI-AAO (Tab. 2.18) konstruiert. Das Chaperon Plasmid Set stellt eine Auswahl an Plasmiden mit verschiedenen Chaperongenenen zur Verfügung (Tab. 2.10).

Die optimalen Chaperone und die optimalen Bedingungen für die Koexpression sind laut Hersteller für jedes Protein sehr unterschiedlich und müssen daher experimentell bestimmt werden. Daher wurden für die Koexpression der Arylalkoholoxidase drei verschiedene Chaperonkombinationen ausgewählt, um mögliche Effekte auf das Produktionslevel und die Löslichkeit der Arylalkoholoxidase zu untersuchen. Die Koexpression erfolgte mit den cytoplasmatischen Chaperonen GroEL/GroES (pGro7) oder dem Triggerfaktor (pTf16). Weiterhin wurden diese Chaperone gemeinsam (pG-Tf2) mit der Arylalkoholoxidase koexprimiert. Daneben wurden der Zeitpunkt der Induktion, die Konzentration der Induktoren, die Kultivierungstemperatur und -dauer optimiert. Als Negativkontrollen dienten entweder Zellen mit einem leeren Expressionsvektor bzw. Zellen, die nicht mit IPTG induziert wurden. Die Effekte der unterschiedlichen Kombinationen und Variationen wurden zunächst in 3 mL-Kulturen untersucht.

### **I. Optimierung der Induktion**

Die Induktion der Expression der Arylalkoholoxidase wurde zu verschiedenen Zeitpunkten von der frühen ( $OD_{600}$  0,3–0,4) bis zur späten exponentiellen Phase ( $OD_{600} \geq 0,6$ ) durchgeführt. Dafür wurde die Kultur für 15 bis 30 min auf Eis abgekühlt (Kälteschock-Induktion, pColdI) und anschließend 15 bis 30 min bei 15 °C ohne Schütteln inkubiert. Außerdem wurde der Induktor IPTG (pColdI) über einen Konzentrationsbereich von 0,25 bis 1 mM eingesetzt. Der Zeitpunkt der Induktion der Chaperonexpression wurde ebenfalls variiert und zum Beginn der Kultivierung, jedoch spätestens parallel zum Kälteschock, durchgeführt. Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss das Konzentrationsverhältnis der verwendeten Induktoren auf die Produktmengen von Zielprotein und Chaperonen hat. Dafür wurde zunächst bei konstanter IPTG-Konzentration (0,5 mM) die Konzentration der Chaperoninduktoren variiert. Die Konzentration des Induktors L-Arabinose (pTf16 und pGro7) wurde in einem Bereich von 0,25 bis 1 mg mL<sup>-1</sup> und die Konzentration von Tetracyclin (pG-Tf2) im Bereich von 1 ng mL<sup>-1</sup> bis 10 ng mL<sup>-1</sup> variiert. Die Kultivierungstemperatur von 37 °C wurde erniedrigt und in einem Temperaturbereich von 8 bis 15 °C über einen Zeitraum von 24 bis 48 h untersucht.

## II. Expressionsprotokoll für die Arylalkoholoxidase

Für die Expression wurde eine 3 mL-Übernachtskultur vorbereitet (s. 2.2.3.8). Die Proteinexpression erfolgte im 10 mL- bzw. 100 mL-Maßstab. Dafür wurden 10 mL LB-Medium (mit Antibiotika) in einem 50 mL-Falcon Tube bzw. 100 mL LB-Medium (mit Antibiotika) in einem 250 mL-Erlenmeyerkolben mit 1% (v/v) der Vorkultur inokuliert. Die Kultur wurde im Luftschüttler bei 37 °C und 225 U min<sup>-1</sup> inkubiert. Nach 1 h wurden die Induktoren für die Chaperonexpression hinzugefügt. Abhängig vom verwendeten Plasmid wurde die Expression der Chaperone mit 0,25 mg mL<sup>-1</sup> L-Arabinose bzw. 5 ng mL<sup>-1</sup> Tetracyclin induziert. Nach Erreichen einer Zelldichte (OD<sub>600</sub>) von 0,3 wurde die Expression der Arylalkoholoxidase durch einen Kälteschock und IPTG induziert. Die Kultur wurde dazu in einem Eiswasserbad für 15 min abgekühlt und anschließend für 30 min bei 15 °C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 mM IPTG. Nach der Induktion wurden die Kulturen bei 10 °C für 36 h bei 225 U min<sup>-1</sup> unter Schütteln inkubiert.

Für eine regelmäßige Inokulation von Flüssigkulturen wurden Stammpplatten mit transformierten Zellen bei 4 °C gelagert. Da unter diesen Lagerbedingungen der *cspA*-Promotor des pCold-Vektors aktiv ist, wurde überprüft, ob die Zellen den Vektor ausschleusen. Dafür wurde das Expressionslevel von Bakterienkulturen, deren Vorkultur mit Zellen einer Stammpplatte angeimpft wurde, mit Kulturen verglichen, deren Vorkultur mit Zellen eines Glycerolstocks angeimpft wurde.

### Kulturernte

Im Anschluss an die Expression wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Kulturen bei 4 200 U min<sup>-1</sup> (4 100 ×g), 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für den Zellaufschluss weiter verwendet.

### 2.5.1.2 Heterologe Expression in *Hansenula polymorpha*

Für die Expression der Esterase wurde die Hefe *Hansenula polymorpha* RB11 mit den Vektoren pFPMT-mEPS-H6 #15-3 bzw. pFPMT-mEPS-H6 #15-4 transformiert. Als Negativkontrollstamm diente der Stamm pFPMT/RB11, bei dem Vektor pFPMT121 ohne Insert genomisch integriert wurde (Artes Biotechnology).

Die Kultivierung der Stämme zwecks Produktbildung erfolgte im 12 mL-Maßstab bei 37 °C und 180 U min<sup>-1</sup>. Zunächst wurden die Stämme für 16 h als YPD-Kulturen inkubiert. Unter dieser Bedingung liegt der die Fremdgene steuernde FMD-Promotor Glucose-reprimiert vor. 800 µL der dichtgewachsenen YPD-Kultur wurden in 12 mL YNB mit 2% Glycerol überführt. Die Inkubation erfolgte für 68 h, bis eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> ≥ 2,5 erreicht wurde. Während dieser sogenannten Derepressionsphase ist der FMD-Promotor aktiv, da die Glucoserepression aufgehoben ist. Für Folgeexperimente wurden Gesamtzellextrakte aus solchen Kultivierungen eingesetzt.

## 2.5.2 Methoden für den Zellaufschluss

Nach der heterologen Expression wurden die Zellen aufgeschlossen. Hierfür wurden enzymatische und verschiedene physikalische Aufschlussverfahren eingesetzt.

### 2.5.2.1 Mechanischer Zellaufschluss von Bakterien (Ultraschallaufschluss)

Für den Ultraschallaufschluss wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut. Danach wurden 4 mL Aufschlusspuffer bzw. LEW-Puffer (s. 2.5.4.1) zugegeben und die Zellen resuspendiert. Die Probe wurde anschließend in ein 15 mL-Falcon Tube überführt und mit Ultraschall aufgeschlossen. Während der Beschallung (10×15 s, Output Control 3) wurde die Probe durch eine Eis-Ethanol-Mischung gekühlt. Durch eine 60 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 14 000 U min<sup>-1</sup> (18 000 ×g) wurden die löslichen Bestandteile von dem Zelldebris getrennt. Vom Überstand wurden 20 µL entnommen und mit 5 µL Auftragspuffer versetzt. Vom Pellet wurde eine Probe genommen und in 50 µL Auftragspuffer aufgenommen. Mittels SDS-PAGE wurde überprüft, ob das Zielprotein in der löslichen oder unlöslichen Fraktion vorlag. Überstände mit Zielprotein wurden bei 4 °C und Zellpellets bei -20 °C gelagert.

#### Aufschlusspuffer

Tris-HCl pH 8	50 mM
Natriumchlorid	100 mM
DTT	1 mM
EDTA	1 mM

### 2.5.2.2 Enzymatischer Zellaufschluss von Bakterien

Der enzymatische Zellaufschluss wurde mit Benzonase und Lysozym durchgeführt. Dafür wurde das Zellpellet in der Lösung für den enzymatischen Aufschluss resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

#### Lösung für den enzymatischen Aufschluss

Tris-HCl pH 7,5	20 mM
Benzonase	10 U mL <sup>-1</sup>
Magnesiumchlorid	2 mM
Lysozym	1 mg mL <sup>-1</sup>
PMSF	1 mM

Optional wurden die Zellen zusätzlich 10× für 10 s mittels Ultraschall aufgeschlossen und anschließend die Zellfragmente pelletiert (15 min, 11 200 U min<sup>-1</sup>, 11 400 ×g, 4°C). Der Überstand wurde für die Aktivitätsbestimmung eingesetzt, um lösliches, aktives Enzym nachzuweisen. Außerdem wurde der Aufschluss mittels SDS-PAGE kontrolliert.

### 2.5.2.3 Osmotischer Zellaufschluss von Bakterien

Die rekombinanten Proteine aus dem Periplasma wurden durch einen osmotischen Aufschluss gewonnen. Dafür wurde das Zellpellet in 30 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 20% Saccharose (80 mL Puffer pro g Zellen) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mM EDTA wurde die Suspension für 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (8 500 U min<sup>-1</sup>, 8 000 ×g, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in eiskalter 5 mM Magnesiumsulfatlösung (80 mL Puffer pro g Zellen) aufgenommen und 10 min in einem Eiswasserbad geschüttelt. Die Zellen wurden erneut pelletiert (8 500 U min<sup>-1</sup>, 8 000 ×g, 4 °C, 20 min) und dabei die periplasmatische Fraktion als Überstand erhalten.

### 2.5.2.4 Mechanischer Zellaufschluss von Hefen (Glasperlenaufschluss)

*Hansenula polymorpha* wurde mit Hilfe von Glasperlen aufgeschlossen. Dafür wurden 10 mL einer Flüssigexpressionskultur mit einer OD<sub>600</sub> von 3 pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µL Hefe-Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und auf das gleiche Volumen (500 µL) Glasperlen (ø 0,5 mm, Roth) gegeben und 15×30 s mittels Vortexer aufgeschlossen. Nach Zugabe von weiteren 500 µL Aufschlusspuffer wurde 15×15 s gevortext. Der Überstand wurde nach Absinken der Glasperlen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als Gesamtzellextrakt bezeichnet. Während des Zellaufschlusses erfolgte eine ständige Kühlung auf Eis.

#### Hefe-Aufschlusspuffer

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Natriumchlorid	150 mM
Tween <sup>®</sup> 20	0,1 %

### 2.5.2.5 Mechanischer Aufschluss von *Pleurotus sapidus* (Mörsern)

Das Myzel von *Pleurotus sapidus* wurde für die Isolierung der Gesamt-RNA aufgeschlossen. Dafür wurde das Myzel mit flüssigem Stickstoff gefroren und nach der Zugabe von Aufschlusspuffer (RNeasy Plant Mini Kit, 450 µL pro 100 mg) mit Mörser und Pistill aufgeschlossen.

## 2.5.3 Konzentrierung und Umpufferung

Abhängig vom Probenvolumen wurden Macrosep<sup>®</sup>-, Microsep<sup>®</sup>- oder Nanosep<sup>®</sup>-Zentrifugationseinheiten (Pall GmbH, Dreieich) mit einer Ausschussgröße (MWCO<sup>6</sup>) von 10 kDa verwendet. Vor der ersten Verwendung wurden die Zentrifugationseinheiten 3× mit Reinstwasser gewaschen (4 500 U min<sup>-1</sup>, 4 700 ×g, 4 °C).

<sup>6</sup>molecular weight cut off

## 2.5.4 Proteinreinigung

Zur Reinigung der rekombinanten Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene chromatographische Methoden eingesetzt. Durch die Klonierung der codierenden DNA-Sequenzen in geeignete Vektoren wurden Konstrukte mit verschiedenen *tags* für die spätere Reinigung hergestellt (MBP, His<sub>6</sub>). Zur Reinigung von Fusionsproteinen wurde die Affinitätschromatographie verwendet, Proteine ohne einen *tag* wurden mittels FPLC gereinigt.

### 2.5.4.1 Native Reinigung über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie

#### Reinigung über Protino<sup>®</sup> Ni-TED 1000 Säulen

Die Reinigung der heterolog exprimierten Arylalkoholoxidase erfolgte bei konstant 4 °C mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung des His-*tags* über Protino<sup>®</sup> Ni-TED 1000 Säulen (Macherey–Nagel). Dafür wurde zunächst die Protino<sup>®</sup> Säule mit 2×2 mL LEW-Puffer<sup>7</sup> equilibriert, der Überstand mit dem Zielprotein nach Zellaufschluss auf die Säule gegeben und der Durchbruch (D) aufgefangen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 2 mL LEW-Puffer gewaschen (W1 und W2). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in zwei Schritten mit je 1,5 mL Elutionpuffer (E1 und E2). Die Kontrolle der Reinigung erfolgte mittels SDS-PAGE.

#### LEW-Puffer<sup>8</sup>

Natriumdihydrogenphosphat	50 mM
Natriumchlorid	300 mM

Der pH-Wert des Puffers wurde mit Natronlauge auf 8,0 eingestellt.

#### Elutionspuffer

Natriumdihydrogenphosphat	50 mM
Natriumchlorid	300 mM
Imidazol	250 mM

Der pH-Wert des Puffers wurde mit Natronlauge auf 8,0 eingestellt.

#### Reinigung über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose beads

Neben der Reinigung mit kommerziell erhältlichen Säulen wurde die Reinigung mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose im *batch*-Verfahren durchgeführt. Für die Proteinreinigung aus einer 100 mL-Kultur wurden 100 µL Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose eingesetzt. Die Reinigung erfolgte bei 4 °C. Die Proteine wurden über Nacht auf dem Rollmischer an die *beads* gebunden. Anschließend wurden die *beads* bei 800 U min<sup>-1</sup> (60 ×g) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde die Matrix dreimal mit 2 mL Waschpuffer gewaschen. Dafür wurden die *beads* in 2 mL Waschpuffer aufgenommen und für 5 min gemischt (Rollmischer). Anschließend wurden die *beads* erneut

<sup>7</sup>Lysis-, Equilibrierungs- und Wasch-Puffer

<sup>8</sup>Protino<sup>®</sup> Purification System

pelletiert und der Überstand verworfen. Die Elution erfolgte analog zum Waschen. Hierbei wurde Elutionspuffer (1× 250 µL und 2× 500 µL) mit Imidazol verwendet, um die Proteine von der Matrix zu lösen. Die Überstände wurden aufgehoben. Um das Imidazol zu entfernen, wurden die Eluate mittels Zentrifugationröhrchen (s. 2.5.3) umgepuffert.

#### Waschpuffer

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
Natriumchlorid	100 mM
DTT	1 mM
EDTA	1 mM
Imidazol	10 mM

#### Elutionspuffer

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
Natriumchlorid	100 mM
DTT	1 mM
EDTA	1 mM
Imidazol	250 mM

#### 2.5.4.2 Denaturierende Reinigung mittels Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie

Die Arylalkoholoxidase wurde zum Teil unlöslich in *inclusion bodies* exprimiert. Die heterolog exprimierten Proteine liegen hier meist nur partiell gefaltet vor. Zur Isolierung müssen die *inclusion bodies* solubilisiert und das enthaltene Protein vollständig denaturiert werden. Dafür wurde das Pellet in 5 mL Solubilisierungspuffer aufgenommen und die Zellen mittels Ultraschall (5×15 s) resuspendiert. Der im Solubilisierungspuffer enthaltene Harnstoff zählt zu den chaotropen Reagenzien und verhindert eventuelle Fehlfaltung durch die Ausbildung nicht-kovalenter Bindungen der Aminosäureseitengruppen. Das enthaltene Reduktionsmittel ( $\beta$ -Mercaptoethanol) verhindert die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken. Im Solubilisierungsansatz liegt das Protein damit vollständig denaturiert vor. Für die Solubilisierung der Proteine aus *inclusion bodies* wurde die Suspension über Nacht bei 4 °C auf dem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurde der Zelldebris durch Zentrifugation entfernt (30 min, 20 °C, 9 500 U min<sup>-1</sup>, 10 000 ×g).

#### Solubilisierungs-, Equilibrierungs- und Waschpuffer für die Arylalkoholoxidase

Natriumphosphat-Puffer pH 8,0	50 mM
Natriumchlorid	300 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	30 mM
EDTA	1 mM
Harnstoff	8 M
Imidazol	10 mM

**Solubilisierungs-, Equilibrierungs- und Waschpuffer für die Esterase**

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
EDTA	2 mM
DTT	10 mM
Harnstoff	8 M
Imidazol	10 mM

Die denaturierende Reinigung erfolgte äquivalent zur nativen Reinigung. Für die Elution wurde ein denaturierender Elutionspuffer verwendet.

**Denaturierender Elutionspuffer für die Arylalkoholoxidase**

Natriumphosphatpuffer-Puffer pH 8,0	50 mM
Natriumchlorid	300 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	30 mM
EDTA	1 mM
Harnstoff	4 M
Imidazol	250 mM

**Denaturierender Elutionspuffer für die Esterase**

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
EDTA	2 mM
DTT	10 mM
Harnstoff	4 M
Imidazol	250 mM

**2.5.4.3 Amylose-Affinitätschromatographie**

Die Reinigung des Fusionsproteins (rekombinante MBP-AAO) aus der löslichen Fraktion erfolgte über Affinitätschromatographie (Amylosebeads). Die Beladung der *beads* mit dem Zielprotein erfolgte im *batch*-Verfahren. Hierzu wurde der Überstand mit dem Zielprotein nach dem Ultraschallaufschluss (s. 2.5.2.1) einer 100 mL-Kultur 1:5 mit Säulenpuffer verdünnt und zu 13,5 mL Amylosebeads gegeben. Die Beladung der *beads* erfolgte über Nacht unter Rollen bei 8 °C. Zum Waschen und Eluieren wurden die *beads* in eine Säule überführt (Bettvolumen ~8 mL). Die *beads* wurden mit 12 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 30 mL Elutionspuffer, der 10 mM Maltose enthielt. Das Eluat wurde in 1,5 mL-Fractionen aufgefangen und die proteinhaltigen Fractionen vereinigt und konzentriert.

**Säulen- und Waschpuffer**

Tris-HCl pH 7,4	20 mM
Natriumchlorid	200 mM
EDTA	1 mM

**Elutionspuffer**

Tris-HCl pH 7,4	20 mM
Natriumchlorid	200 mM
Maltose	10 mM
EDTA	1 mM

**2.5.4.4 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)**

Die Reinigung von Proteinen ohne *tag* und die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte mit Hilfe der FPLC. Für die Reinigung der Peroxidase aus dem Kulturüberstand wurden verschiedene Trennprinzipien der Flüssigchromatographie untersucht und geeignete Trennverfahren ausgewählt.

Die Auswahl geeigneter Trennprinzipien und die Optimierung der Reinigung der heterolog exprimierten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* erfolgte mit Säulen (Säulenvolumen 1 mL) aus dem HiTrap HIC Selection Kit und dem HiTrap IEX Selection Kit. Die Beladung der Säulen erfolgte mit Hilfe einer 1 mL-Probenschleife. Die Flussrate betrug 1 mL min<sup>-1</sup>. Während des gesamten FPLC-Laufes wurden Fraktionen mit einem Volumen von 0,5 bzw. 1,0 mL aufgefangen. Der Nachweis von Proteinen in den gesammelten Fraktionen erfolgte mittels Bradford-Assay (s. 2.5.6) bzw. SDS-PAGE (s. 2.4.2.1). Das Zielenzym wurde mit dem ABTS-Assay nachgewiesen (s. 2.6.3.2).

Tabelle 2.20: Säulen für die Auswahl geeigneter Trennprinzipien

Säule	Eigenschaft
<b>HiTrap HIC Selection Kit</b>	
Phenyl Sepharose High Performance	zunehmende Hydrophobizität ↓
Butyl-S Sepharose High Performance	
Butyl Sepharose High Performance	
Octyl Sepharose 4 Fast Flow	
<b>HiTrap IEX Selection Kit</b>	
SP Sepharose Fast Flow	starker Kationentauscher
SP Sepharose XL	starker Kationentauscher
CM Sepharose Fast Flow	schwacher Kationentauscher

### 2.5.4.5 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Elution des Zielproteins von den Säulen des HiTrap HIC Selection Kits erfolgte zunächst mit einem linearen Gradienten über 15 mL von 0% nach 100% Elutionspuffer. Anschließend wurde die Reinigung optimiert. Dabei wurde die Reinigungsleistung jeder Säule bei der Verwendung von 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 bzw. 6,0 und verschiedener Gradienten beurteilt. Die beste Reinigung wurde mit folgenden Parametern erzielt:

Tabelle 2.21: Parameter der hydrophoben Interaktionschromatographie

Säule	HiTrap Phenyl FF
Säulenvolumen	1 mL
Probenschleife	1 mL
Flussrate	1 mL min <sup>-1</sup>
Fraktionsgröße	1 mL
Startpuffer	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 + 1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Pumpe B)
Elutionspuffer	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 (Pumpe A)
Probe	Kulturüberstand von <i>Trichoderma reesei</i> mit rPsaDyP, konzentriert und umgepuffert auf den Startpuffer

#### Methode:

- 1) UV-Lampe an
- 2) Autozero
- 3) Startpuffer (1 mL)
- 4) Injektion der Probe (1 mL) und Spülen der Schleife mit Startpuffer (1 mL)
- 5) Startpuffer (10 mL)
- 6) Linearer Gradient über 2 mL von 0% nach 58% Elutionspuffer
- 7) 58% Elutionspuffer (5 mL)
- 8) Linearer Gradient über 5 mL von 58% nach 100% Elutionspuffer
- 9) 100% Elutionspuffer (10 mL)
- 10) Linearer Gradient über 2 mL von 100% nach 0% Elutionspuffer
- 11) Startpuffer (10 mL)

Die Fraktionen der Peaks, in denen Peroxidase-Aktivität nachgewiesen wurde, wurden vereinigt und in den Startpuffer der zweiten Reinigungsstufe (50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0) umgepuffert. Anschließend erfolgte die Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie.

### 2.5.4.6 Ionenaustauschchromatographie

Die Säulen des HiTrap IEX Selection Kits wurden analog zu den Säulen des HIC-Kits getestet. Dabei wurde zunächst ein linearer Gradient über 10 mL von 0% nach 100% Elutionspuffer verwendet. Als Elutionspuffer wurde 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 mit 1 M NaCl verwendet. Nach der Optimierung wurde die beste Reinigung mit folgenden Parametern erzielt:

Tabelle 2.22: Parameter der Kationenaustauschchromatographie

Säule	HiTrap SP FF
Säulenvolumen	1 mL
Probenschleife	1 mL
Flussrate	1 mL min <sup>-1</sup>
Fraktionsgröße	500 µL
Startpuffer	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 (Pumpe A)
Elutionspuffer	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 + 1 M NaCl (Pumpe B)
Probe	aktive Fraktionen aus der HIC-Chromatographie, konzentriert und umgepuffert in den Startpuffer

#### Methoden:

- 1) UV-Lampe an
- 2) Autozero
- 3) Startpuffer (1 mL)
- 4) Injektion der Probe (1 mL) und Spülen der Schleife mit Startpuffer (1 mL)
- 5) Startpuffer (7,5 mL)
- 6) Linearer Gradient über 1 mL von 0% nach 10% Elutionspuffer
- 7) 10% Elutionspuffer (16 mL)
- 8) Linearer Gradient über 1 mL von 10% nach 100% Elutionspuffer
- 9) 100% Elutionspuffer (10 mL)
- 10) Startpuffer (10 mL)

Die aktiven Fraktionen der zweiten Reinigungsstufe wurden vereinigt und in 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 umgepuffert.

### 2.5.4.7 Scale up der zweistufigen Reinigung

Für die präparative Reinigung der rPsaDyP wurde der Maßstab des Reinigungsprotokolls, das durch die Vorversuche etabliert wurde, vergrößert. Dabei erfolgte die Beladung der Säulen über das Umschaltventil an Pumpe A (Position 4). Für die zweite Reinigungsstufe wurde eine selbstgepackte Säule (XK 16/20) mit SP Sepharose FF als Säulenmaterial verwendet. Während der Reinigung wurden die proteinhaltigen Fraktionen mit Hilfe des Fraktionssammlers aufgefangen. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay (s. 2.5.6) und der Nachweis der DyP-Typ Peroxidase mittels ABTS-Assay (s. 2.6.3.2).

Tabelle 2.23: Verwendete FPLC-Säulen und Zubehör nach dem Scale Up

Säule/Zubehör	Funktion
HiTrap Phenyl FF (high sub) 16/10	Hydrophobe Interaktionschromatographie
XK 26/200 Column	Leersäule
SP Sepharose Fast Flow	Säulenmaterial (starker Kationentauscher)
Packingreservoir RK 16/26	Säulenpackhilfe

### Packen der Säule

Als Matrix für die selbstgepackte Säule XK 20/26 wurde SP Sepharose FF verwendet. Das Chromatographiematerial wurde als eine 50%ige Suspension in 20% Ethanol bezogen. Für eine Säule mit einem Bettvolumen von ca. 25 mL wurde das 2,5-Fache Volumen der Vorratssuspension verwendet. Mit Hilfe des Packingreservoirs RK 16/26 wurde die Leersäule XK 16/26 mit dem Packungsmaterial gefüllt und das Säulenmaterial mit einer Flussrate von  $2 \text{ mL min}^{-1}$  ( $23 \text{ cm h}^{-1}$ ) sedimentiert (2 Säulenvolumen). Anschließend wurde der Adapter mit Stempel an die Säule angebaut und der Stempel so platziert, dass er exakt das Bett berührt. Dann wurde das Säulenbett mit einer steigenden Flussrate komprimiert, wobei der Druck unter 43 psi gehalten wurde, bis das Säulenmaterial eine stabile Packung aufwies. Anschließend wurde der Stempel erneut direkt über dem Säulenbett positioniert.

Die Qualität der gepackten Säule wurde über die Pulsantwort („Acetontest“) getestet. Dafür wurde Wasser als Laufmittel und eine 1%ige Acetonlösung als Probe verwendet und die Zahl der theoretischen Trennböden sowie die Peaksymmetrie bestimmt.

Tabelle 2.24: Parameter der hydrophoben Interaktionschromatographie nach Scale up

Säule	HiTrap Phenyl FF (High Sub) 16/10
Säulenvolumen	20 mL
Probenauftrag	über Pumpe A (Position 4)
Flussrate	3 mL min <sup>-1</sup>
Fraktionsgröße	4 mL
Startpuffer	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 + 1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Pumpe B)
Elutionspuffer	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 (Pumpe A)
Reinigung	Reinstwasser (Pumpe A)
Probe	Kulturüberstand von <i>Trichoderma reesei</i> mit rPsaDyP, konzentriert und umgepuffert auf den Startpuffer

**Methode:**

- 1) UV-Lampe an
- 2) Autozero
- 3) Startpuffer (5 mL)
- 4) Injektion der Probe (12 mL)
- 5) Startpuffer (40 mL)
- 6) Linearer Gradient über 40 mL von 0% nach 58% Elutionspuffer
- 7) 58% Elutionspuffer (25 mL)
- 8) Linearer Gradient über 30 mL von 58% nach 100% Elutionspuffer
- 9) 100% Elutionspuffer (75 mL)
- 10) Reinigung (40 mL)
- 11) 100% Startpuffer (60 mL)

Die Fraktionen der Peaks, in denen Peroxidase-Aktivität nachgewiesen wurde, wurden vereinigt und in den Startpuffer der zweiten Reinigungsstufe umgepuffert. Anschließend erfolgte die Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie.

Tabelle 2.25: Parameter der Ionenaustauschchromatographie nach Scale up

Säule	XK 16/20
Säulenmaterial	SP Sepharose Fast Flow (starker Kationentauscher)
Säulenvolumen	25 mL
Probenauftrag	über Pumpe A (Position 4)
Flussrate	3 mL min <sup>-1</sup>
Fraktionsgröße	2 mL
Startpuffer	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 (Pumpe A)
Elutionspuffer	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 + 1 M NaCl (Pumpe B)
Reinigungspuffer	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 + 2 M NaCl (Pumpe A, Position 3)
Probe	aktive Fraktionen aus der HIC-Chromatographie, konzentriert und umgepuffert in den Startpuffer

**Methode:**

- 1) UV-Lampe an
- 2) Autozero
- 3) Startpuffer (5 mL)
- 4) Injektion der Probe (15 mL)
- 5) Startpuffer (40 mL)
- 6) Linearer Gradient über 30 mL von 0% nach 10% Elutionspuffer
- 7) 10% Elutionspuffer (100 mL)
- 8) Linearer Gradient über 30 mL von 10% nach 100% Elutionspuffer
- 9) 100% Elutionspuffer (80 mL)
- 10) 100% Reinigungspuffer (40 mL)
- 11) 100% Startpuffer (60 mL)

Die aktiven Fraktionen der zweiten Reinigungsstufe wurden vereinigt und in 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 umgepuffert und konzentriert. Die gereinigte rPsaDyP wurde aliquotiert (50 µL in PCR-Reaktionsgefäßen), mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Ein Teil des gereinigten Enzyms wurde lyophilisiert und für die Proteinquantifizierung verwendet. Die Charakterisierung erfolgte mit dem gereinigten Enzym.

### 2.5.5 Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Für die Bestimmung des Molekulargewichts und der nativen Konformation der gereinigten DyP-Typ Peroxidase wurde die GFC verwendet (Tab. 2.26).

Tabelle 2.26: Bestimmung des Molekulargewichts mittels GFC

Säule	Superdex 200 10/300 GL
Säulenmaterial	Superdex 200 (Trennbereich 10 bis 600 kDa)
Säulenvolumen	24 mL
Probenschleife	500 $\mu$ L
Flussrate	0,5 mL min <sup>-1</sup>
Elutionspuffer	50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 + 250 mM NaCl + 0,005% Triton X-100
Probe	gereinigte rPsaDyP 1:50 verdünnt mit Elutionspuffer

#### Methode:

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

Für die Bestimmung des Molekulargewichts wurden nachfolgend genannte Proteine als Standard verwendet. Die Proteine wurden im Elutionspuffer gelöst und jeweils 50  $\mu$ L injiziert.

Tabelle 2.27: Liste der als Größenstandard verwendeten Proteine

<b>Standard</b>	<b>Konzentration</b> mg mL <sup>-1</sup>	<b>Molekulargewicht</b> kDa
Thyroglobulin	4	669,0 / 1338,0
Apoferritin	1,7	443,0
Rinderserumalbumin (BSA)	3,6	66,5 / 133,0
Ovalbumin	1,7	42,8 / 85,6
Cytochrom C	2,0	12,4

Thyroglobulin wurde zur Bestimmung des Ausschlussvolumens der Säule verwendet, da das Molekulargewicht des Dimers außerhalb des Trennbereichs der Säule lag. Anschließend wurden die Retentionskoeffizienten  $K_{av}$  der Standardproteine mittels folgender Gleichung berechnet:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (3)$$

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

Die ermittelten Retentionskoeffizienten wurden gegen die Logarithmen der Molekulargewichte aufgetragen und die Kalibriergerade mittels linearer Regression erstellt. Das Molekulargewicht der rPsaDyP wurde anhand dieser Geraden ermittelt.

## 2.5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

### 2.5.6.1 Proteinquantifizierung mittels Absorptionsmessung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Extinktion bei 280 nm verwendet. Die Methode beruht auf der Absorption aromatischer Aminosäuren. Für die Berechnung der Konzentration wurde der molare dekadische Extinktionskoeffizient auf Basis der Aminosäuresequenz berechnet (Gasteiger *et al.* 2005). Dabei wurde der Algorithmus (Gl. 4) nach Pace *et al.* (1995) verwendet. Die Berechnung erfolgte mit ProtParam (ExPASy).

$$\varepsilon_{Protein} = n \times \text{Trp} \times 5500 + n \times \text{Tyr} \times 1490 + n \times \text{Cys-S-S-Cys} \times 125 \quad (4)$$

$$\varepsilon: \text{ in } \text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Für die DyP-Typ Peroxidase (Dimer) wurde ein molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von  $\varepsilon = 134\,760 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und für die Arylalkoholoxidase ein Extinktionskoeffizient von  $\varepsilon = 71\,515 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 280 nm berechnet. Die Proteinkonzentration wurde nach der Messung der Extinktion mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet.

$$E_{280} = \varepsilon \times c \times d \quad (5)$$

- $E_{280}$ : Extinktion bei 280 nm
- $\varepsilon$ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient in  $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- $c$ : Konzentration in  $\text{mol L}^{-1}$
- $d$ : Schichtdicke in cm

### 2.5.6.2 Proteinquantifizierung nach Bradford

Daneben wurde die Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Diese beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassieblau G-250 an Proteine, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verschiebt. Für die Bestimmung der Konzentration wurde die kommerziell erhältliche Farbstofflösung Roti<sup>®</sup> Nanoquant verwendet und diese Methode modifiziert. Bei der Konzentrationsbestimmung von Proteingemischen wurde Rinderserumalbumin (BSA) als Standard verwendet. Die Quantifizierung von gereinigten Enzymen erfolgte gegen eine Standardreihe mit dem lyophilisierten Protein. Die Herstellung der Standardreihen (0 bis 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) erfolgte abhängig von der Probe in Wasser bzw. Puffer. Jeweils 50  $\mu\text{L}$  Standard bzw. Probe wurden mit 200  $\mu\text{L}$  der Farbstofflösung (1:5 verdünnt mit Reinstwasser) versetzt und nach 5 min die Absorption bei 590 nm und 450 nm gegen Wasser bzw. Puffer als Referenz am Mikroplattenleser gemessen. Die Kalibriergerade wurde durch Auftragung des Quotienten der Extinktionen (590 nm/450 nm) gegen die Proteinkonzentration erstellt. Aus dem Quotienten der Extinktionen (590 nm/450 nm) der Probe wurde die Proteinmenge anhand der Kalibriergerade bestimmt.

### 2.5.7 UV/Vis-Spektroskopie

Für die UV/Vis-Spektroskopie wurden das Photometer bzw. NanoPhotometer<sup>™</sup> Pearl (s. 2.1.1) verwendet. Abhängig von der jeweiligen Analyse wurden die Proteinlösungen in Puffer bzw. Wasser verdünnt und Spektren in verschiedenen Wellenlängenbereichen aufgenommen. Die verwendeten Parameter sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

### 2.5.8 Bestimmung der Reinheitszahl

Die Reinheitszahl für die rPsaDyP wurde nach Shannon *et al.* (1966) bestimmt und stellt das Verhältnis des Hämgehalts zu den absorbierenden Aminosäureresten des Enzyms dar. Dafür wurde bei 25 °C die Extinktion bei 280 nm und bei 409 nm (Absorptionsmaxima der rPsaDyP, siehe Abb. 3.40) gegen Puffer als Nullwert ermittelt. Die Reinheitszahl ergibt sich aus dem Quotient der Extinktionen:

$$RZ = \frac{E_{409}}{E_{280}} \quad (6)$$

### 2.5.9 Rückfaltung der Arylalkoholoxidase

Für die Rückfaltung der rekombinanten Arylalkoholoxidase nach der Reinigung wurde das erste Eluat verwendet. Die Rückfaltung erfolgte durch *flash dilution* in den Rückfaltungspuffer. Das Eluat wurde direkt und vollständig zum einen 1:20 ( $\sim 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und zum anderen 1:50 ( $\sim 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) in Rückfaltungspuffer verdünnt, bei 16 °C für 96 h abgedunkelt gelagert und die AAO-Aktivität täglich bestimmt. Anschließend wurde das Rückfaltungsgemisch mittels Pall-Zentrifugenröhrchen um den Faktor 3 konzentriert. Das Enzym wurde über 30 Tage im Kühlschrank gelagert und regelmäßig die Aktivität mittels AAO-Assay bestimmt.

#### Rückfaltungspuffer nach Ruiz-Dueñas *et al.* (2006)

Tris pH 9,0	20 mM
GSSG	2,5 mM
DTT	1 mM
FAD	0,08 mM
Glycerol (98%)	35 % (v/v)
Harnstoff	600 mM

#### 2.5.9.1 Bestimmung der Rückfaltungseffizienz

Für die Bestimmung der Rückfaltungseffizienz wurde die rückgefaltete Arylalkoholoxidase (AAO\*) in Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 6,0) umgepuffert. Anschließend wurde mit dem Photometer ein Spektrum von 300 nm bis 550 nm aufgenommen. Aus der Extinktion bei 280 nm wurde die Proteinkonzentration und die Konzentration des freien FAD aus der Extinktion bei 450 nm bestimmt. Anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 75 °C denaturiert, bei 14 000 U min<sup>-1</sup> (18 000  $\times g$ ) zentrifugiert und erneut ein Spektrum mit dem Photometer aufgenommen. Die Konzentration des freien FAD wurde erneut bei 450 nm bestimmt. Die zusätzlich frei gewordene Menge FAD entspricht der Menge, die durch die Denaturierung des Enzyms freigesetzt wurde und damit der Menge an Enzym, die FAD gebunden hatte. Die Bestimmung der Konzentration des freien FAD erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gl. 5) mit  $\epsilon = 11\,300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006).

### 2.5.10 Rückfaltung der Esterase

Für die Rückfaltung der Esterase wurden verschiedene Puffersysteme untersucht, die in den Ergebnissen näher beschrieben werden.

### 2.5.11 N-terminale Sequenzierung mittels Edman-Abbau

Für die Sequenzierung des N-Terminus mittels Edman-Abbau wurde das gereinigte Enzym verwendet. Die Sequenzierung wurde durch die Arbeitsgruppe Proteinanalytik der Justus-Liebig-Universität (Prof. Dr. G. Lochnit) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde das Enzym elektrophoretisch auf eine Membran transferiert und anschließend der Edman-Abbau über 12 Zyklen durchgeführt.

### 2.5.12 Deglykosylierung

Die rPsaDyP wurde heterolog in dem eukaryotischen Wirtsorganismus *Trichoderma reesi* exprimiert. Eukaryotische Organismen können Enzyme posttranslational modifizieren, daher wurde der Glykosylierungsgrad der rPsaDyP überprüft. Dafür wurde die rPsaDyP zunächst denaturiert und anschließend mit der Endoglykosidase PNGase F inkubiert, um Kohlenhydratketten von N-Glykosylierungsstellen abzuspalten. Mittels SDS-PAGE wurde überprüft, ob die Inkubation zu einer Veränderung des Molekulargewichtes des Enzyms führte.

#### Denaturierung

rPsaDyP (2,9 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ )	4 $\mu\text{L}$
Denaturierungspuffer	1 $\mu\text{L}$
Reinstwasser	ad 10 $\mu\text{L}$

Die Probe wurde bei 95 °C für 4 min denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und die Substanzen für die Deglykosylierung hinzugefügt.

#### Deglykosylierung

Denaturierungsansatz	10 $\mu\text{L}$
10×G7-Reaktionspuffer	2 $\mu\text{L}$
10% NP-40	2 $\mu\text{L}$
PNGase F	2 $\mu\text{L}$
Reinstwasser	ad 20 $\mu\text{L}$

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C.

## 2.6 Photometrische Enzymassays

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurden verschiedene Assays verwendet, deren Zusammensetzung im Laufe der Arbeit optimiert wurden. Die Reaktion wurde entweder durch die Zugabe des Substrates (bzw. Cosubstrates) oder des Enzyms gestartet. Die Messung der Substratabnahme bzw. Produktzunahme erfolgte bei den entsprechenden Wellenlängen über einen Zeitraum von mindestens 10 min. Als Proben wurden sowohl die enzymhaltigen Kulturüberstände sowie Überstände nach dem Zellaufschluss und die gereinigten Enzyme verwendet. Die Probe wurde stets so verdünnt, dass die Extinktionsänderung pro Minute zwischen 0,01 und 0,15 lag. Bei jeder Messung wurden Blindwerte mit Puffer bzw. Negativkontrollen mit hitzeinaktiviertem Enzym (95 °C, mindestens 10 min) anstelle von enzymhaltigen Proben mitgeführt.

Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte, wenn nicht anders angegeben am Mikroplattenleser in einem Gesamtvolumen von 200 µL. Die Bestimmung erfolgte in mindestens drei Parallelen, in Mikrotiterplatten (96 Well) unter Verwendung der Software Gen 5. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 und OriginPro 8.6.

Die spezifische Enzymaktivität  $A$  wurde mit Hilfe von Gleichung 7 berechnet, wobei eine Unit (1 U) als die Menge Enzym definiert ist, die pro Minute ein µmol Substrat umsetzt:

$$A = \frac{\Delta E_T \cdot V_g \cdot F}{V_p \cdot d \cdot \varepsilon} \cdot 10^6 \quad (7)$$

- $A$ : Enzymaktivität in  $\text{U L}^{-1}$
- $\Delta E_T$ : Extinktionsänderung in  $\text{min}^{-1}$
- $V_g$ : Gesamtvolumen in mL
- $V_p$ : Probenvolumen in mL
- $F$ : Verdünnungsfaktor
- $\varepsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient in  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
- $d$ : Schichtdicke der Küvette bzw. im Well in cm:
  - 0,8 cm bei 250 µL Gesamtvolumen bzw.
  - 0,64 cm bei 200 µL Gesamtvolumen in der 96 Well-Mikrotiterplatte
  - 1 cm bei Messung in Küvetten

### 2.6.1 Verwendete Puffer<sup>9</sup>

#### Citronensäure/Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer nach McIlvaine (1921)<sup>(A,B)</sup>

Der Citrat-Phosphat-Puffer (im weiteren Verlauf als McIlvaine-Puffer bezeichnet) wurde aus einer 0,1 M Citronensäure- und einer 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung hergestellt. Abhängig vom gewünschten pH-Wert wurden die beiden Lösungen in unterschiedlichen Anteilen gemischt. Aus dem Mischungsverhältnis resultieren die verschiedenen Konzentrationen an Citronensäure und Dinatriumhydrogenphosphat in den Pufferlösungen (Tab. 2.28). Die Endkonzentration der Pufferlösung wurde durch Verdünnung mit Wasser eingestellt.

Tabelle 2.28: Citronensäure/Phosphat-Puffer nach McIlvaine (1921)

pH	Citronensäure (0,1 M)		Dinatriumhydrogenphosphat (0,2 M)	
	Volumen in mL	Konzentration in mM	Volumen in mL	Konzentration in mM
2,2	98,80	99	1,20	2
2,5	92,25	92	7,75	16
3,0	80,30	80	19,70	39
3,5	70,20	70	29,80	60
4,0	62,00	62	38,00	76
4,5	55,05	55	44,95	90
5,0	49,00	49	51,00	102
5,5	43,45	43	56,55	113
6,0	35,80	36	64,20	128
6,5	30,55	31	69,45	139
7,0	12,80	13	87,20	174
7,5	7,90	8	92,1	184

#### Citronensäure/Dikaliumhydrogenphosphat-Puffer (K-McIlvaine-Puffer) <sup>(B)</sup>

Dieser Puffer wurde analog zum McIlvaine-Puffer hergestellt. Anstelle der 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung wurde jedoch 0,2 M Dikaliumhydrogenphosphatlösung verwendet.

#### Natriumacetat-Puffer <sup>(A, B)</sup>

Für die Herstellung des Puffers wurden 0,5 M Natriumacetat-Lösung und 0,5 M Essigsäure-Lösung verwendet. Beide Lösungen wurden abhängig vom gewünschten pH-Wert des Puffers in unterschiedlichen Volumenanteilen gemischt. Die Konzentration der Pufferlösung wurde anschließend durch Verdünnen mit Wasser eingestellt.

#### Kaliumacetat-Puffer <sup>(B)</sup>

Die Herstellung dieses Puffers erfolgte analog zum Natriumacetat-Puffer, jedoch wurde anstelle der Natriumacetatlösung eine 0,5 M Kaliumacetatlösung verwendet.

<sup>9</sup>Hinter den Namen der Puffer wurde mit Buchstaben die Verwendung indiziert:

A – für Arylalkoholoxidase, B – für DyP-Typ Peroxidase, C – für Lipase, D – für Esterase

**Natriumphosphat-Puffer (A)**

Für die Herstellung eines 100 mM Natriumphosphat-Puffers wurden eine 200 mM Natriumdihydrogenphosphat-Lösung mit einer 200 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung in unterschiedlichen Anteilen gemischt, um den gewünschten pH-Wert einzustellen. Durch Verdünnen mit Wasser wurde die Konzentration des Puffers eingestellt.

**Kaliumphosphat-Puffer (C, D)**

Dieser Puffer wurde analog zum Natriumphosphat-Puffer mit Kaliumdihydrogenphosphat- und Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung hergestellt.

**Sørensen-Phosphat-Puffer nach Gomori *et al.* (1955) (C)**

Der Sørensen-Phosphat-Puffer (50 mM, pH 8,0) wurde durch Mischen von  
250 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung    94,7 mL    und  
250 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung    5,3 mL  
hergestellt. Durch dieses Mischungsverhältnis wurde ein pH von 8,0 eingestellt (Kontrolle mittels pH-Meter) und die Lösung mit Reinstwasser auf 500 mL aufgefüllt, um die gewünschte Konzentration einzustellen.

**Natriumtartrat-Puffer (B)**

Für einen 100 mM Puffer wurden je nach gewünschtem pH-Wert des Puffers unterschiedliche Anteile 100 mM Weinsäure- und 100 mM Natriumtartrat-Lösung gemischt.

**Bernsteinsäure-Tartrat-Puffer (C)**

Dieser Puffer wurde analog zum Weinsäure-Tartrat-Puffer mit 100 mM Bernsteinsäure hergestellt.

**HCl/Glycin-Puffer (B)**

Abhängig vom gewünschten pH-Wert des 100 mM HCl/Glycin-Puffers wurden unterschiedliche Volumenanteile der Lösung I (100 mM Glycin, 100 mM Natriumchlorid) mit Lösung II (100 mM Salzsäurelösung) gemischt.

## 2.6.2 Bestimmung der Arylalkoholoxidase-Aktivität

Verschiedene enzymhaltige Lösungen wurden mit Veratrylalkohol als Substrat auf AAO-Aktivität untersucht. Verwendet wurden:

- enzymhaltiger Kulturüberstand von *Pleurotus sapidus*
- Gesamtzellextrakt nach Zellaufschluss (s. 2.5.2) von *E. coli*
- lösliche Fraktion nach Zellaufschluss und Pelletierung des Zelldebris von *E. coli*
- Gesamtzellextrakt von *H. polymorpha* nach Zellaufschluss (s. 2.5.2)
- gereinigte, rückgefaltete Arylalkoholoxidase (AAO<sup>\*</sup>)

Für das Screening nach Arylalkoholoxidase-Aktivität wurde folgender Assay verwendet:

Tabelle 2.29: Screening-Assay für Arylalkoholoxidase-Aktivität

Probe	50 µL
50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5	110 µL
40 mM Veratrylalkohol in Puffer (final 2 mM)	10 µL
Katalase in H <sub>2</sub> O (final 9 U)	30 µL
Gesamtvolumen	200 µL

### 2.6.2.1 Optimierter AAO-Assay

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der AAO-Assay optimiert (s. 2.6.4) und für die Bestimmung der Aktivität der rückgefalteten Arylalkoholoxidase (AAO<sup>\*</sup>) sowie der Kontrolle der Aktivität in den löslichen Fraktionen in folgender Weise angepasst:

Tabelle 2.30: Optimierter Assay für die Kontrolle der Aktivität der AAO<sup>\*</sup>

Probe	25 µL
100 mM Natriumacetat-Puffer pH 6,0	125 µL
50 mM Veratrylalkohol in Puffer (final 5 mM)	20 µL
Katalase in H <sub>2</sub> O (final 36 U)	30 µL
Gesamtvolumen	200 µL

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und erfolgte bei einer Temperatur von 30 °C über einen Zeitraum von mindestens 10 min. Die Extinktion wurde bei 310 nm gemessen und anschließend die Enzymaktivität nach Gleichung 7 berechnet. Für Veratrumaldehyd wurde  $\epsilon_{310}$ : 9 300 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> als molarer dekadischer Extinktionskoeffizient verwendet (Guillén *et al.* 1992, Tien und Kirk 1984).

## 2.6.3 Bestimmung der Peroxidase-Aktivität

### 2.6.3.1 Übersicht über die verwendeten Substrate

#### Wässrige $\beta$ -Carotin-Stammlösung nach Pühse *et al.* (2009)

5 mg  $\beta$ -Carotin und 0,5 g Tween<sup>®</sup> 80 wurden in einem 250 mL-Rundkolben in ~20 mL Dichlormethan gelöst. Anschließend wurde das Lösungsmittel weitgehend mittels Rotationsverdampfer entfernt (20 min, 40 °C, 250 U min<sup>-1</sup>, 800 mbar). Der Rückstand wurde in 30 mL Reinstwasser aufgenommen. Anschließend wurde das restliche Lösungsmittel in 200 mbar Schritten am Rotationsverdampfer (40 °C, 250 U min<sup>-1</sup>, von 800 mbar auf 200 mbar, 15 min pro Schritt) und im N<sub>2</sub>-Strom entfernt. Abschließend wurde die Lösung in einen 50 mL-Messkolben filtriert und mit Reinstwasser aufgefüllt. Die Lösung wurde im Dunkeln bei 4 °C gelagert und maximal 1 Woche verwendet.

#### Wässrige Bixin-Stammlösung

Diese Stammlösung wurde analog zu  $\beta$ -Carotinlösung hergestellt, wobei 15 mg Bixin verwendet wurden.

#### Weitere Substratstammlösungen

In folgender Tabelle sind sonstige verwendete Substrate mit den genutzten Stockkonzentrationen und den verwendeten Lösungsmitteln aufgeführt:

Tabelle 2.31: Peroxidasesubstrate

Substrat	Konzentration	Lösungsmittel
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz (ABTS)	2 mM	Reinstwasser
1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-propan-1,3-diol (Adlerol)	15 mM	Ethanol
Annatto (wässrig-alkalischer Extrakt)	64 $\mu$ M	Reinstwasser
2,6-Dimethoxyphenol (DMP)	50 mM	Ethanol
Guajakol	50 mM	Ethanol
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	20 mM	Reinstwasser
Reactive Black 5 (RBlack 5)	200 $\mu$ M	Reinstwasser
Reactive Blue 5 (RB 5)	1 mM	Reinstwasser
Veratrylalkohol (VA)	20 mM	Ethanol
Wasserstoffperoxid <sup>a</sup>	1,4 mM	Reinstwasser

<sup>a</sup>Die Wasserstoffperoxid-Konzentration wurde im Verlauf der Arbeit abhängig von den eingesetzten Substraten optimiert und angepasst.

### 2.6.3.2 Übersicht über die verwendeten Assays

Die Peroxidase-Aktivität wurde von enzymhaltigem Kulturüberstand von *Trichoderma reesei* und der gereinigten rPsaDyP bestimmt. Für die Assays – die im weiteren Verlauf dieser Arbeit nach den verwendeten Substraten benannt wurden – wurde zunächst 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 verwendet. Für weitere Messungen bzw. nach Optimierung wurde der Puffer abhängig von den eingesetzten Substraten angepasst. Für die Bestimmung der Enzymaktivität gegenüber Veratrylalkohol wurde nach Tien und Kirk (1984) zunächst ein 100 mM Natriumtartrat-Puffer pH 3,0 verwendet.

Im Allgemeinen wurden folgende Zusammensetzungen der Assays verwendet:

Tabelle 2.32: Allgemeine Zusammensetzung der Assays für die Bestimmung der Peroxidaseaktivität

	ABTS-, $\beta$ -Carotin-, Bixin-, RBlack/RB5-Assay		VA-, DMP-, Guajakol-Assay	
	mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Probe	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Puffer	80 $\mu$ L	80 $\mu$ L	110 $\mu$ L	110 $\mu$ L
Substrat	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 $\mu$ L	—	50 $\mu$ L	—
H <sub>2</sub> O	—	50 $\mu$ L	—	50 $\mu$ L
Gesamtvolumen	200 $\mu$ L			

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung oder des Cosubstrates (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gestartet und die Extinktion über einen Zeitraum von 10 min bei 30 °C gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach Gleichung 7.

In Tabelle 2.33 sind die untersuchten Substrate aufgeführt.

Tabelle 2.33: Liste der für die kinetischen Untersuchung verwendeten Substrate, finale Konzentration der Substrate im Assay sowie Messgröße mit Extinktionskoeffizient und verwendeter Wellenlänge

Substrat	Endkonz. in $\mu$ M	Messgröße	$\epsilon$ in L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Wellenlänge in nm	Referenz verändert nach
ABTS	500,0	ABTS-Radikalkation	36 000	420	Eggert <i>et al.</i> (1996)
$\beta$ -Carotin	24,5	$\beta$ -Carotin	95 000	450	Ben Aziz <i>et al.</i> (1971)
Bixin	16,5	Bixin	136 100	465	Hülsdau (2007)
Annatto <sup>a</sup>	16,0	Norbixin	108 400	452	Scotter <i>et al.</i> (1998)
VA	2 000,0	Veratrumaldehyd	9 300	310	Tien und Kirk (1984)
DMP	5 000,0	2,2',6,6'-Tetramethoxy- dibenzo-1,1'-dichinon	27 500 <sup>b</sup>	469	Saparrat <i>et al.</i> (2002)
Guajakol <sup>c</sup>	5 000,0	Tetraguajakol	26 600	470	Koduri und Tien (1995)
RBlack 5	50,0	Reactive Black 5	37 200	598	Sugano <i>et al.</i> (2006)
RB 5	250,0	Reactive Blue 5	8 000	600	Sugano <i>et al.</i> (2006)

<sup>a</sup>Hauptbestandteil des wässrig-alkalischen Extraktes war das Natriumsalz des Norbixins

<sup>b</sup>Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bezogen auf 2,6-Dimethoxyphenol

<sup>c</sup>Für die Berechnung der Enzymaktivität wurde aufgrund des stöchiometrischen Verhältnisses von Edukt zu Produkt (Messgröße) von 4:1 der Faktor 4 berücksichtigt

## 2.6.4 Optimierung der Assaybedingungen

### 2.6.4.1 Bestimmung des optimalen Puffers und des pH-Optimums

Das pH-Optimum der AAO\* wurde mit Veratrylalkohol als Substrat und verschiedenen Puffern bestimmt. Mit McIlvaine-Puffer (Tab. 2.28) wurde ein Bereich von pH 2,0-8,0 und mit Natriumacetat-Puffer (50 mM) ein Bereich von pH 3,0-6,0 untersucht. Zusätzlich wurde die Aktivität der rekombinanten AAO\* in Natriumphosphat-Puffer (100 mM) pH 6,0 bestimmt, der in der Literatur häufig verwendet wird.

Zur Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers für die DyP-Typ Peroxidase wurde die Aktivität bei 30 °C in einer Auswahl verschiedener Pufferlösungen (s. 2.6.1) untersucht. Dabei wurde der Umsatz in Abhängigkeit des verwendeten Puffers in einem pH-Bereich von 2,0 bis 6,0 untersucht. Für den Umsatz von ABTS wurde beispielsweise ein pH-Bereich von 3,0 bis 5,5 und für den Umsatz von  $\beta$ -Carotin ein Bereich von 3,0 bis 6,0 untersucht.

### 2.6.4.2 Bestimmung der optimalen Pufferkonzentration

Die Bestimmung der optimalen Pufferkonzentration erfolgte über einen Konzentrationsbereich von 20 bis 350 mM, mit dem pH-Wert, bei dem für das Enzym in dem jeweiligen Puffer die höchste Aktivität ermittelt wurde. Die Enzymaktivität wurde photometrisch bestimmt.

### 2.6.4.3 Temperaturoptimum

Die Umsetzung des Substrates wurde am Photometer (Tab. 2.1) mit temperierbarem Küvetten-schlitten bestimmt. Das Volumen des Assays wurde an die verwendeten Küvetten angepasst. Für jede Messung wurde die Enzymlösung 5 min vortemperiert und anschließend eine 10 minütige Messung durchgeführt. Die Umsatzgeschwindigkeit war bei allen Messungen über mindestens 5 min stabil.

Die Bestimmung der optimalen Temperatur für die rekombinante AAO\* wurde unter Verwendung des AAO-Assays in einem Temperaturbereich von 20 bis 80 °C in 10 °C-Schritten durchgeführt.

Tabelle 2.34: Pipettierschema für den AAO-Assay zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Arylalkoholoxidase

AAO-Assay	
Probe	50 $\mu$ L
Puffer	750 $\mu$ L
50 mM Veratrylalkohol in Puffer (final 5 mM)	100 $\mu$ L
Katalase in H <sub>2</sub> O (final 36 U)	100 $\mu$ L
Gesamtvolumen	1 000 $\mu$ L

Das Temperaturoptimum für die rPsaDyP wurde für die Umsetzung der Substrate ABTS und  $\beta$ -Carotin in einem Temperaturbereich von 15 bis 75 °C in 5 °C Schritten untersucht.

Tabelle 2.35: Pipettierschema für die Reaktionsansätze zur Bestimmung des Temperaturoptimums der DyP-Typ Peroxidase

	ABTS-Assay	$\beta$ -Carotin-Assay
Probe	25 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Puffer	100 $\mu$ L	720 $\mu$ L
Substrat	75 $\mu$ L	100 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 $\mu$ L	80 $\mu$ L
Gesamtvolumen	250 $\mu$ L	1 000 $\mu$ L

Der vortemperierte Puffer bzw. Reaktionsansatz wurde in eine Küvette in den entsprechend temperierten Schlitten gegeben und die Umsetzung durch Zugabe des Substrates gestartet.

#### 2.6.4.4 Enzymaktivität in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidkonzentration

Die Aktivität der rPsaDyP für die Umsetzung der untersuchten Substrate wurde in Abhängigkeit der verwendeten Cosubstratkonzentration (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Endkonzentration: 0 bis 1,25 mM) untersucht. Dazu wurden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stocklösungen mit Konzentrationen von 0 bis 5 mM angesetzt. Die Umsetzung wurde durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet und die Enzymaktivität am Mikroplattenleser verfolgt.

#### 2.6.4.5 Sauerstoffkonzentration im Puffer

Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration im Puffer auf die Reaktionsgeschwindigkeit der gereinigten rPsaDyP wurde mit 100 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,8 untersucht. Dafür wurde der Puffer mit Sauerstoff an- bzw. abgereichert. Für die Anreicherung des Puffers mit Sauerstoff wurde das Gas mit einer Kerzenfritte (Porengröße 3,  $\varnothing$  16 bis 40  $\mu$ m) durch den Puffer geleitet (2  $\times$  15 min). Die Abreicherung des Puffers erfolgte durch Entgasung von 100 mL Puffer im Ultraschallbad für 1 h. Anschließend wurde der Kopfraum mit Stickstoff gesättigt. Die an- bzw. abgereicherten Puffer wurden sofort für die Umsetzung von ABTS bzw.  $\beta$ -Carotin ohne Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet. Als Kontrolle wurde Puffer verwendet, bei dem die gelösten Gase nicht künstlich variiert wurden.

#### 2.6.4.6 Einfluss der Pipettierreihenfolge

Wie bereits beschrieben, wurde die Reaktion in der Regel durch Zugabe des Substrates bzw. des Cosubstrates gestartet. Da es vor allem bei der Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu lokalen Inhibierungseffekten

kommen kann, wurde untersucht, welchen Einfluss die Pipettierreihenfolge auf die Enzymaktivität hat. Dabei wurde die Reaktion gestartet durch:

- Enzym
- Substrat
- Cosubstrat
- Cosubstrat vorgelegt im Reaktionspuffer

## **2.6.5 Untersuchung der Enzymstabilität**

Die Stabilität der gereinigten rPsaDyP wurde für verschiedene Faktoren untersucht. Dafür wurde die Ausgangsaktivität (100%) nach 1 min unter diesen Bedingungen ermittelt und die Restaktivität zu den unterschiedlichen Messzeiten in Relation dazu gesetzt. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte bei den Untersuchungen mittels ABTS-Assay.

### **2.6.5.1 Salztoleranz**

Für die Bestimmung der Salztoleranz wurde Natriumacetat-Puffer pH 4,0 verwendet, der 0 bis 1 M NaCl bzw.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  enthielt. Der Puffer mit dem entsprechenden Salzgehalt wurde direkt für den Assay verwendet. Außerdem wurde die Aktivität der rPsaDyP nach Umpuffern und Lagerung (1 h, 4 °C) in Puffer mit 1 M Salz und nach erneutem Umpuffern in Puffer ohne Salz getestet.

### **2.6.5.2 Lagerstabilität**

Die Stabilität des Enzyms wurde für die Lagerung bei -80 °C, -20 °C und 4 °C über einen Zeitraum von 6 Tagen untersucht. Für die Lagerung bei -20 °C und -80 °C wurde das Enzym mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kontrolle der Aktivität erfolgte an den Tagen 1, 2, und 6. Hierbei wurde untersucht, ob die Aktivität des Enzyms durch mehrfaches Auftauen bzw. Einfrieren beeinflusst wird, indem eine Probe aufgetaut, die Aktivität bestimmt und die Probe erneut eingefroren wurde. Im Vergleich dazu wurde jeweils die Aktivität einer Probe bestimmt, die zuvor nicht aufgetaut wurde.

### **2.6.5.3 Stabilität unter Assaybedingungen**

#### **Stabilität des reinen Enzyms nach Verdünnen in Lösungen**

Das Enzym wurde für den Einsatz im Assay abhängig vom verwendeten Substrat aus der Stocklösung bis 1:100 000 verdünnt. Dafür wurde das Enzym zunächst in Wasser oder Puffer vorverdünnt und anschließend in den Assay weiter verdünnt. Daher wurde die Stabilität des Enzyms nach Verdünnen untersucht, indem das verdünnte Enzym 24 h bei 4 °C gelagert und die Aktivität nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 24 h gegenüber ABTS bestimmt wurde.

### pH-Stabilität und Lösungsmitteltoleranz

Zur Untersuchung der pH-Stabilität wurde die DyP-Typ Peroxidase in Natriumacetat-Puffer im pH-Bereich von 3,0 bis 6,0 (0,5er Schritte) bzw. in McIlvaine-Puffer im pH-Bereich von 3,0 bis 5,5 (0,5 er Schritte) verdünnt. Direkt vor der Messung wurde die Probe nochmals 1:10 mit 100 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,8 (Messpuffer) verdünnt, um den pH-Wert für die Messung nicht zu stark zu verändern. Nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 24 h wurde die Aktivität bestimmt und mit der Ausgangsaktivität verglichen.

Für die Bestimmung der Lösungsmitteltoleranz wurde die Dyp-Typ Peroxidase in einer 30%igen Ethanol-Lösung in 100 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,8 bzw. in Wasser bei 4 °C gelagert. Die Aktivität der Probe wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 24 h bestimmt.

### Temperaturstabilität

Die Bestimmung der Temperaturstabilität erfolgte mit Vorverdünnungen in 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5 über einen Zeitraum von 24 h bei 0 °C, 25 °C und 35 °C. Im Anschluss an die Lagerung wurde die Aktivität des Enzyms mit der Ausgangsaktivität verglichen.

### 2.6.6 Bestimmung der kinetischen Parameter $K_m$ und $k_{cat}$

Für die Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit wurden photometrische Assays verwendet und die Anfangsgeschwindigkeit bei konstanter Enzymkonzentration in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration bestimmt. Damit sich die Reaktion während der Messung im *steady state* befindet und somit die Bedingungen der Michaelis-Menten-Kinetik erfüllt, wurde stets mit einem Substratüberschuss gearbeitet. Die Anfangsgeschwindigkeiten ( $v_0$ ) wurden direkt linear gegen die Substratkonzentration in einem Graphen (Cornish-Bowden-Diagramm) aufgetragen. Mit Hilfe der Software Origin (OriginPro 8.6G) wurde, entsprechend den Vorgaben für eine Michaelis-Menten-Kinetik, durch eine nichtlineare Regression eine Sättigungshyperbel an die Messdaten angepasst.

$$\nu = \frac{\nu_{\max} \times S}{K_m + S} \quad (8)$$

- $\nu$ : Umsatzgeschwindigkeit
- $\nu_{\max}$ : maximale Umsatzgeschwindigkeit
- $K_m$ : Michaelis-Menten-Konstante
- S: Substratkonzentration

Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und die maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $\nu_{\max}$ ) wurden direkt durch die Software aus der Kurvenfunktion erhalten.

Die katalytische Konstante (Wechselzahl,  $k_{\text{cat}}$ ) wurde mit Hilfe folgender Gleichung ermittelt:

$$k_{\text{cat}} = \frac{\nu_{\text{max}}}{E} \quad (9)$$

$k_{\text{cat}}$ : katalytische Konstante

$\nu_{\text{max}}$ : Maximale Umsatzgeschwindigkeit

E: Enzymkonzentration

### 2.6.6.1 Enzymkinetiken der Arylalkoholoxidase

Die Bestimmung der kinetischen Parameter der Arylalkoholoxidase wurde mit den in Tabelle 2.36 angegebenen Substraten unter den optimierten Assay-Bedingungen (30 °C, 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0) in den angegebenen Substratbereichen (Tab. 2.37) durchgeführt. Für das Substrat Coniferylalkohol wurden die kinetischen Konstanten nicht ermittelt.

Tabelle 2.36: Liste der für die Kinetiken verwendeten Substrate sowie Messgröße mit Extinktionskoeffizient und verwendeter Wellenlänge

Substrat	Messgröße	$\epsilon$ L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Wellenlänge nm	Referenz modifiziert nach
Benzylalkohol	Benzaldehyd	13 800	250	Guillén <i>et al.</i> (1992)
Veratrylalkohol	Veratrumaldehyd	9 300	310	Guillén <i>et al.</i> (1992)
<i>p</i> -Anisalkohol	<i>p</i> -Anisaldehyd	16 980	285	Guillén <i>et al.</i> (1992)
Zimtalkohol	Zimtaldehyd	15 600	310	Ferreira <i>et al.</i> (2005)
Coniferylalkohol	Coniferylaldehyd	56 800	343	Guillén <i>et al.</i> (1990)

Tabelle 2.37: Für die Kinetiken verwendete Parameter. Angegeben sind der Konzentrationsbereich für die untersuchten Substrate sowie die Endkonzentration des Enzyms im Reaktionsansatz

Substrat	Stockkonz. in mM	Lösungsmittel	Konzentrationsbereich in $\mu\text{M}$	Enzymkonz. in nM
Benzylalkohol	300	Ethanol	200–30 000	4,12
Veratrylalkohol	200	Puffer	50–20 000	1,96
<i>p</i> -Anisalkohol	20	Ethanol	10–2 000	1,12
Zimtalkohol	300	Ethanol	50–30 000	2,24
Coniferylalkohol	100	Ethanol	500–10 000	4,48

### 2.6.6.2 Enzymkinetiken der rPsaDyP

Mit der rPsaDyP wurde die Umsetzung der Substrate (Tab. 2.33) unter Michaelis-Menten-Bedingungen in den angegebenen Substratbereichen (Tab. 2.38) durchgeführt. Vor Beginn der Kinetik wurde die Extinktion der RB5- und  $\beta$ -Carotin-Substratlösung gemessen und so die exakte Konzentration der Substrate bestimmt. Die Substratlösungen wurden so verdünnt, dass die Startextinktion im Assay 1,5 nicht überschritt. Für jedes Substrat wurde die optimale Enzym- und Cosubstratkonzentration ermittelt. Für die Ermittlung der  $H_2O_2$ -Konzentration, die keinen limitierenden Effekt auf die Aktivität hat, wurden die Messungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter parallel mit verschiedenen  $H_2O_2$ -Konzentrationen durchgeführt. Die kinetischen Parameter wurden für die Substrate ABTS, DMP, Guajakol und RB5 bestimmt. Die Umsetzung der Substrate erfolgte bei 30 °C.

Tabelle 2.38: Für die Kinetiken verwendete Parameter. Angegeben sind der Konzentrationsbereich für die untersuchten Substrate, die Endkonzentration des Enzyms und Cosubstrates im Reaktionsansatz sowie der verwendete Puffer

Substrat	Konzentrationsbereich	Enzymkonz.	$H_2O_2$ -Konz.	Puffer
	in $\mu M$	in nM	in $\mu M$	
ABTS	15 – 1 500	0,27	125	100 mM Natriumacetat pH 3,8
DMP	250 – 15 000	1,8	62,5	50 mM Natriumacetat pH 4,5
Guajakol	500 – 15 000	4,5	62,5	50 mM Natriumacetat pH 4,5
RB5	11 – 302	5,4	31,2	100 mM Natriumtartrat pH 4,0
Annatto <sup>a</sup>	8 – 25	54	125	50 mM Natriumacetat pH 6,0
Bixin <sup>a</sup>	5 – 28	67,5	125	50 mM Natriumacetat pH 3,5
$\beta$ -Carotin <sup>a</sup>	5 – 26	54	125	50 mM Natriumacetat pH 3,5
RBlack 5 <sup>a</sup>	1 – 48	54	62,5	50 mM Natriumacetat pH 4,0
Veratrylalkohol <sup>b</sup>	2 500 – 20 000	9	125	50 mM Natriumacetat pH 3,5

<sup>a</sup>Aufgrund der hohen Eigenabsorption dieser Substrate konnten sie bei photometrischen Assays nur in geringen Konzentrationen eingesetzt werden und die Substratsättigung wurde nicht erreicht

<sup>b</sup>Die Substratsättigung wurde mit diesem Substrat nicht erreicht

### 2.6.7 Bestimmung der Aktivität der rPsaDyP gegenüber weiteren Substraten

#### 2.6.7.1 Einfluss von Mangansulfat

Der Einfluss von Mangan-(II)-sulfat auf die Enzymaktivität der gereinigten rPsaDyP wurde für das Substrat 2,6-Dimethoxyphenol untersucht, wobei der Messlösung unterschiedliche Mengen an  $MnSO_4$  zugesetzt wurden (Wariishi *et al.* 1992). Für die Messung der Enzymaktivität wurde der DMP-Assay (Tab. 2.32) modifiziert. Abweichend wurde die Wasserstoffperoxidkonzentration im Assay auf konstant 0,1 mM eingestellt und  $MnSO_4$  in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 1 mM eingesetzt. Dafür wurden 0,4 mM Wasserstoffperoxidstocklösungen mit 0 bis 4 mM  $MnSO_4$  in Wasser verwendet, von denen jeweils 50  $\mu L$  in den Assay eingesetzt wurden.

### 2.6.7.2 Oxidation von Mangan(II)-Ionen

Die Oxidation von Mangan(II)-Ionen ( $Mn^{2+}$ ) wurde nach Wariishi *et al.* (1992) anhand der Bildung von Mangan(III)-tartrat bestimmt. Die Messung erfolgte am Photometer über einen Zeitraum von 10 min bei einer Wellenlänge von 290 nm und 30 °C gemessen. Der Enzymassay war wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 2.39: Pipettierschema zur Oxidation von Mangan(II)-Ionen

	Volumen	Endkonzentration
rPsaDyP	50 $\mu$ L	270 nM
100 mM Natriumtartrat-Puffer pH 4,5	250 $\mu$ L	50 mM
20 mM Mangansulfat	25 $\mu$ L	1 mM
0,4 mM $H_2O_2$	125 $\mu$ L	100 $\mu$ M
$H_2O$	50 $\mu$ L	
Gesamtvolumen	500 $\mu$ L	

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach Gleichung 7 mit einem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten für Mangan(III)-tartrat von 2 860  $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.6.7.3 Umsetzung von Adlerol

Die Umsetzung von Adlerol durch die rPsaDyP wurde mittels Photometer vermessen. Die Umsetzung erfolgte über einen Zeitraum von 24 h bei 30 °C. Vor und nach der Umsetzung wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes entnommen, 1:50 verdünnt und anschließend ein Spektrum über einen Wellenlängenbereich von 300 bis 500 nm aufgezeichnet (Liers *et al.* 2010). Zur Kontrolle wurde der Assay mit hitzeinaktiviertem Enzym (95 °C, 10 min) durchgeführt.

Tabelle 2.40: Pipettierschema zur Umsetzung von Adlerol

	Volumen	Endkonzentration
rPsaDyP	100 $\mu$ L	270 nM
100 mM Natriumtartrat-Puffer pH 3,0	500 $\mu$ L	50 mM
15 mM Adlerollösung	100 $\mu$ L	1,5 mM
0,5 mM $H_2O_2$	250 $\mu$ L	125 $\mu$ M
$H_2O$	50 $\mu$ L	
Gesamtvolumen	1 000 $\mu$ L	

### 2.6.8 Entwicklung eines Zwei-Enzym-Systems

Bei der Entwicklung des Zwei-Enzym-Systems wurden die rekombinante DyP-Typ Peroxidase mit der rekombinanten rückgefalteten Arylalkoholoxidase (AAO<sup>\*</sup>) aus *Pleurotus sapidus* kombiniert. Die Arylalkoholoxidase setzt, wie bereits beschrieben, Veratrylalkohol (VA) in den korrespondierenden Aldehyd um, wobei Wasserstoffperoxid produziert wird. Das gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird von der Peroxidase als Cosubstrat zur Oxidation der untersuchten Substrate benötigt. Für die Abstimmung des Systems wurden zunächst bei konstanter rPsaDyP- und Peroxidasesubstratkonzentration steigende AAO<sup>\*</sup>-Konzentrationen in den Assay eingesetzt. Anschließend wurde die Umsatzgeschwindigkeit der rPsaDyP sowie die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch die Arylalkoholoxidase bestimmt. Die Umsatzgeschwindigkeit der Peroxidase wurde sowohl in Abhängigkeit der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion als auch der AAO<sup>\*</sup>-Konzentration analysiert, um einen Einfluss der Enzyme aufeinander zu bestimmen.

Die Konzentrationen der beiden Enzyme wurden dann so gewählt, dass die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die AAO<sup>\*</sup> die DyP-Typ Peroxidase nicht inhibierte. Dafür wurden vor der Zusammensetzung des Assays die Umsatzgeschwindigkeiten der beiden Enzyme für ihre jeweiligen Substrate unter den Bedingungen des Zwei-Enzym-Systems getestet. Für das Zwei-Enzym-System wurden die verwendeten Enzymkonzentrationen stets so gewählt, dass die Extinktionsänderung pro Minute zwischen 0,01 und 0,1 lag. Dies entsprach einer Produktion von 1,7 bis 17 µM min<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die AAO<sup>\*</sup>.

Die DyP-Typ Peroxidase wurde verwendet, um die Substrate DMP, ABTS bzw. Annatto umzusetzen. Die Umsetzung der Substrate wurde über die Extinktion bei 469 nm (DMP), 420 nm (ABTS) bzw. 452 nm (Annatto) verfolgt. Um beide Teilreaktionen zu quantifizieren, wurde parallel zum Umsatz des DyP-Substrates auch die Bildung von Veratrumaldehyd bei 310 nm kontrolliert. Wurde ABTS als Substrat verwendet, wurde die Umsetzung von Veratrylalkohol nicht bestimmt, da die Absorption von ABTS die des Veratrumaldehyds überlagerte.

Im AAO-Assay wird eine Erniedrigung der Umsatzgeschwindigkeit der Arylalkoholoxidase durch das entstehende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Hilfe von Katalase verhindert. Im Zwei-Enzym-System wurde dies durch die Umsetzung des Coproduktes durch die DyP-Typ Peroxidase erreicht.

Tabelle 2.41: Zusammensetzung des Assays, auf dessen Basis das Zwei-Enzym-System entwickelt wurde

	Zwei-Enzym-System	Positivkontrolle	Negativkontrolle
AAO <sup>*</sup> (10 U mg <sup>-1</sup> )	25 µL	–	–
rPsaDyP (20 U mg <sup>-1</sup> )	20 µL	20 µL	20 µL
Puffer	75 µL	75 µL	75 µL
Substrat	20 µL	20 µL	20 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	–	50 µL	–
H <sub>2</sub> O	50 µL	–	50 µL
Veratrylalkohol	10 µL	10 µL	10 µL
Rückfaltungspuffer (s. 2.5.9)	–	25 µL	25 µL
Gesamtvolumen		200 µL	

Das Zwei-Enzym-System wurde bei 30 °C in einem Reaktionsvolumen von 200 µL (Mikroplattenleser-Maßstab) etabliert. Als Reaktionspuffer wurde ein Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4,5) verwendet. Das Substrat der Arylalkoholoxidase (Veratrylalkohol) wurde mit einer Konzentration von 5 mM (gelöst in Puffer) eingesetzt. Die Substrate der DyP-Typ Peroxidase wurden in folgenden Konzentrationen verwendet:

- 5 mM DMP in 30%igem Ethanol gelöst
- 400 µM ABTS in Wasser
- 0,3% (v/v) Annatto in Puffer

Eine Positivkontrolle mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anstelle der Arylalkoholoxidase und eine Negativkontrolle wurden stets mitgeführt. Daneben wurde kontrolliert, welchen Einfluss die Verwendung der rPsaDyP anstelle von Katalase bzw. das Fehlen eines H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-umsetzenden Enzyms auf die Aktivität der Arylalkoholoxidase hat.

### 2.6.8.1 Bleichung von Molke

Die verwendete Molke (Strothmann reine Molke, pH 4,5) wurde pur bzw. mit Annatto gefärbt (0,3% (v/v)) verwendet. Für die Umsetzung wurde der für Annatto optimierte Assay auf 1 mL hochskaliert (Tab. 2.42) und Molke bzw. als Kontrolle 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5 als Reaktionspuffer verwendet.

Tabelle 2.42: Zweienzymassay für den Umsatz von Annatto in Molke

	Zwei-Enzym-System	Positivkontrolle	Negativkontrolle
AAO (6,2 U mg <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	50 µL	–	–
DyP (0,04 U mg <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	100 µL	100 µL	100 µL
Puffer <sup>3</sup> bzw. Molke	550 µL	550 µL	550 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>4</sup>	–	250 µL	–
H <sub>2</sub> O	250 µL	–	250 µL
Veratrylalkohol <sup>5</sup>	50 µL	50 µL	50 µL
Rückfaltungspuffer (s. 2.5.9)	–	50 µL	50 µL
Gesamtvolumen		1 000 µL	

<sup>1</sup> final 3 mU • <sup>2</sup> final 1 mU • <sup>3</sup> Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4,5) mit Annatto (0,3% (v/v)) • <sup>4</sup> 0,25 mM •

<sup>5</sup> 100 mM in Puffer

### 2.6.9 Assays für die Bestimmung der Lipaseaktivität

Die Bestimmung der Lipaseaktivität erfolgte mit Kulturüberständen von *Pleurotus sapidus* und Kulturüberständen von *Trichoderma reesei* mit der heterolog exprimierte GDS(L)-Lipase nach Winkler und Stuckmann (1979). Weiterhin wurde für die heterolog exprimierte GDS(L)-Lipase aus *Pleurotus sapidus* untersucht, ob diese neben der Lipaseaktivität auch eine Esterase-Aktivität (s. 2.6.10) oder Feruloylsterase-Aktivität (s. 2.6.10.1, 2.6.11) besitzt. Die untersuchten Substrate sind in den jeweiligen Assays näher beschrieben.

### 2.6.9.1 Lipaseaktivitätstest nach Winkler und Stuckmann (1979)

Zur Bestimmung der Lipaseaktivität wurde *p*-Nitrophenylpalmitat (pNPP) als Substrat verwendet. Zur Herstellung der Substratlösung (0,8 mM) wurden 30 mg *p*-Nitrophenylpalmitat in 10 mL Isopropanol im Ultraschallbad gelöst. 207 mg Natriumdesoxycholat und 100 mg Gummiarabikum wurden in 90 mL Sørensen-Phosphat-Puffer (50 mM, pH 8,0) gelöst und das gelöste Substrat unter Rühren zugefügt. Die Suspension wurde für 10 min im Ultraschallbad behandelt.

Der Nachweis der Umsetzung beruht auf der enzymatischen Freisetzung von *p*-Nitrophenol, welches photometrisch detektiert werden kann. Das Absorptionsmaximum des Spaltproduktes liegt bei 405 nm. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte an einem Mikroplattenleser bei 37 °C für mindestens 10 min. Pro Reaktionsansatz wurden 200 µL der vorgewärmten Substratemulsion mit 50 µL Kulturüberstand versetzt und direkt vermessen. Der verwendete Kulturüberstand wurde für die Messung so verdünnt, dass die Extinktionsänderung ( $\Delta E_{405}$ ) 0,015 bis 0,15 min<sup>-1</sup> betrug. Als Negativkontrolle wurde die Messung mit hitzeinaktivierter Probe (10 min, 95 °C) durchgeführt.

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach Gleichung 7 mit  $\epsilon_{405\text{nm}}$ : 16 800 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> als molarer dekadischer Extinktionskoeffizient (Ferri und Meighen 1994).

### 2.6.10 Esterase-Assay nach Purdy und Kolattukudy (1973)

Zur Bestimmung der Substratspezifität wurde die Umsetzung verschiedener *p*-Nitrophenylester untersucht. Neben kurzkettigen *p*-Nitrophenylestern wie *p*-Nitrophenylacetat (C2), *p*-Nitrophenylbutyrat (C4) und *p*-Nitrophenylvalerat (C5) wurden auch *p*-Nitrophenyloktanoat (C8) und *p*-Nitrophenylpalmitat (C16) (Tab. 2.3) verwendet. Die Bestimmung beruht auf der enzymatischen Freisetzung von *p*-Nitrophenol, welches photometrisch bei 405 nm detektiert werden kann. Die Messung erfolgte mit folgendem Assay:

Esterase-Assay	
Probe	20 µL
80 mM Kaliumphosphat-Puffer (0,5% (v/v) Triton X-100) pH 7,0	130 µL
3,5 mM <i>p</i> -Nitrophenylester (0,5% (v/v) Triton X-100) pH 7,0	50 µL
Gesamtvolumen	200 µL

Die Stocklösungen (17,5 mM) der *p*-Nitrophenylester wurden nach Levisson *et al.* (2007) in Isopropanol hergestellt und anschließend 1:5 in 80 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 verdünnt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet und die Extinktion über einen Zeitraum von 10 min bei 405 nm und 30 °C gemessen.

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach Gleichung 7 mit  $\epsilon_{405\text{nm}}$ : 12 000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> als molarer dekadischer Extinktionskoeffizient (Stäudinger *et al.* 1973).

### 2.6.10.1 Photometrischer Assay zur Bestimmung der Feruloyl-esterase-Aktivität<sup>10</sup>

Die Messung der Esterase-Aktivität erfolgte mittels Ferulasäuremethylester, welcher zu Ferulasäure und Methanol hydrolysiert wird (Ralet *et al.* 1994). Die Differenz der Absorptionsmaxima von freier Ferulasäure und Ferulasäuremethylester bei pH 6,0 ermöglichen es, die Hydrolyse des Esters spektrometrisch zu messen. Der Inkubationsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

MOPS-Puffer (pH 6,0)	100 mM
Ferulasäure-Methylester	1,3 mM
Enzymlösung	50 µL
Natriumazid	1 mM
Ethanol	2 % (v/v)

Jeweils 50 µL Probe bzw. Kontrolle (hitzeinaktiviertes Enzym, 10 min, 95 °C) wurden mit 940 µL Substrat-Puffer-Gemisch für 72 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Inhibierung störender Laccasen wurden dem Gemisch 100 mM (10 µL) Natriumazid zugesetzt. Anschließend wurde ein UV/Vis-Spektrum von 280 bis 340 nm aufgezeichnet.

### 2.6.11 Assay zum Nachweis der Feruloyl-esterase-Aktivität nach Linke *et al.* (2013)

Das Substrat (5-O-Transferuloyl-L-Arabino-furanose) wurde zunächst in DMSO gelöst und anschließend mit Puffer vermischt. Jeweils 125 µL Probe wurden mit 375 µL Substrat/Puffer-Gemisch (100 mM Bernsteinsäure-Tartrat-Puffer pH 6,0, 3% (v/v) DMSO, 2 mM 5-O-Transferuloyl-L-Arabino-furanose) für 17 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und dann auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurden 500 µL Acetonitril zugegeben. Als Kontrolle diente eine hitzeinaktivierte Probe (30 min 95 °C im Wasserbad). Zur Inhibierung von Laccasen wurde 1 mM Natriumazid verwendet. Die Produktbildung bzw. die Abnahme der Substratkonzentration wurde mittels HPLC-DAD (Detektion bei 325 nm) verfolgt.

#### HPLC-Analytik der Umsetzungen

Vor der Analyse der Umsetzung der Substrate wurden die Proben durch 10 kDa-MWCO-Zentrifugeneinheiten filtriert, um die Enzyme aus den Ansätzen abzutrennen. Das Filtrat wurde für die Messung verwendet. Die Trennung der Produkte erfolgte an einer 250/4 Nucleosil 100-5-Säule (Macherey-Nagel). Als Fließmittel dienten Wasser + 0,05% Ameisensäure (A) und Acetonitril + 0,05% Ameisensäure (B).

<sup>10</sup>verändert nach Ralet *et al.* 1994

Die Elution erfolgte mit folgender Methode:

- 1) 90% A (1 min)
- 2) Linearer Gradient von 90% A nach 0% A (über 10 min)
- 3) 0% A (5 min)
- 4) Linearer Gradient über 1 min von 0% A nach 90% A (über 1 min)
- 5) 90% A (2 min)

Die Flußrate betrug  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ . 10  $\mu\text{L}$  Probe wurden initiiert und die Substratumsetzung bei 325 nm vermessen.

### **2.6.12 Assay zur Aktivitätsbestimmung der Feruloylsterase aus *Pleurotus sapidus***

#### **Lipase-Assay (Screening-Assay) nach Linke *et al.* (2005a)**

Linke *et al.* (2005a) suchten mit Hilfe dieses Assays nach einer Lipase in Kulturüberständen von *Pleurotus sapidus*. Inzwischen wurde das dabei nachgewiesene Enzym als Feruloylsterase identifiziert (Linke *et al.* 2013). Daher wurde für das Screening auf Aktivität des rekombinanten Enzyms (Expression in *H. polymorpha*) derselbe Assay verwendet.

Für die Bestimmung der Aktivität wurde eine Substratlösung aus 5 mL Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) und 2,16 g Tween<sup>®</sup> 80 verwendet. Die Bestimmung erfolgte in einem 250  $\mu\text{L}$  Reaktionsansatz:

Tween <sup>®</sup> 80-Lösung	200 $\mu\text{L}$
Enzymlösung	50 $\mu\text{L}$

Als Kontrolle wurde der Assay mit inaktiviertem Enzym (10 min, 95 °C) durchgeführt.

Die Inkubation erfolgte für 30 bis 60 min bei 37 °C und  $160 \text{ U min}^{-1}$ . Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Ethanol gestoppt. Die Aktivität wurde durch Titration (Zugabe in 25  $\mu\text{L}$ -Schritten) der bei der Hydrolyse von Tween<sup>®</sup> 80 freigesetzten freien Fettsäuren mit 50 mM NaOH mit 2% ethanolischem Phenolphthalein als Indikator quantifiziert. Die Nachweisgrenze lag bei 1,25  $\mu\text{mol}$ . Die Lipaseaktivität wurde aus der Differenz zwischen Kontrolle und Probe ermittelt.

Weiterhin wurde die Aktivität mit dem Esteraseassay nach Purdy und Kolattukudy (1973) untersucht.

## **2.7 Sterilisation und Entsorgungshinweise**

### **2.7.1 Sterilisation von Arbeitsmaterialien**

Alle Medien, Lösungen und Geräte wurden für die Sterilisation für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Lösungen, die nicht autoklavierbar waren, wurden durch Sterilfilter (Porendurchmesser 0,22 µm) filtriert. Nicht-autoklavierbare Geräte wurden über Nacht in 70%igem Ethanol eingelegt und anschließend unter der Sterilwerkbank (Laminar) getrocknet.

### **2.7.2 Sterilisation von S1-Abfällen**

Flüssige und feste S1-Abfälle wurden für 40 min bei 121 °C autoklaviert. Autoklavierte Flüssigkulturen wurden anschließend filtriert und der Durchfluss in das Laborabwasser gegeben; feste Bestandteile wurden mit dem Laborabfall entsorgt.

### **2.7.3 Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien**

Zu entsorgende Lösungsmittel wurden durch Mikroextraktion sowie durch die weitgehende Wiederverwendung nach destillativer Aufbereitung auf ein Minimum reduziert. Nicht wieder verwendbare Lösungsmittel wurden getrennt und nach folgenden Gruppen getrennt gesammelt:

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

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

### 3 Ergebnisse

In vorangegangenen Arbeiten wurden Proteine des Sekretoms von *Pleurotus sapidus* mittels hochauflösender 2D-Gelelektrophorese analysiert. Die isoelektrischen Punkte der Proteine an den verschiedenen Kulturtagen lagen in einem Bereich von 4,0 bis 8,0 und einem Molekulargewichtsbereich von 10 bis 170 kDa. Insgesamt wurden über 200 Proteinspots vermessen und massenspektrometrisch analysiert (Schüttmann 2011). Die dabei ermittelten Peptidsequenzen wurden mit Hilfe des Genoms des Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* (*JGI Genome Portal*), sowie der Datenbank NCBI (blastp-Analyse) und der Datenbank PFAM verschiedenen Enzymen bzw. Enzymklassen zugeordnet. Hierbei wurden unter anderem eine Arylalkoholoxidase und eine GDS(L)-Lipase identifiziert, die in der vorliegenden Arbeit kloniert und heterolog exprimiert wurden. Die zugehörigen Peptidsequenzen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Massenspektrometrisch ermittelte Peptide

Spot-ID	Sequenz	Spot-ID	Sequenz
	<b>Arylalkoholoxidase</b>		<b>GDS(L)-Lipase</b>
126-02	LVNSGTTNGLPAFR	284-397/420	EGIYAGLNTLHTR
126-02	DSSEFNADLDQWTNTR	284-397/420	NIIVVDNYGR
126-02	YAAVTGDDGWNWDNIQQFVR		
126-02	TKGPLYLGMPR		
126-02	LSDPTNDAALPAGGPLR		
126-02	KGLVSAGGKGVPA(CamC)NGGPGPR		
126-02	(OxH)GTWFDYLVVGAGNAGNVVAAR		
126-41	CAMHKK		
126-41	DPSVCTGPPK		
126-41	CCTST(OxH)MVSKR		
126-41	(OxH)KCA(CamC)VEEAGPGR		
126-41	LYPTGAGNAHMTAAR		
126-41	M(OxM)GPMENDNHCCGPGCGTPYEFGCSK		
284-525	AGDFAALDIDDDDALHAFLR		
284-525	FFSSTPWNGYVLGR		
284-525	FTAVEFVESVNR		
284-548	DSSEFNADLDQWTNTR		
284-548	TQGPIYLVGER		
284-549	DNANTIFHPVGTASMSPR		
284-549	IVDGSILPFAPNAHTQGPIYLVGER		
284-549	LPTADFDYIVVGAGNAGNVVAAR		

### 3.1 Molekulare Identifizierung des verwendeten Pilzes

Für diese Arbeit wurde der Basidiomycet *Pleurotus sapidus* Stamm 8266 verwendet, der von der institutseigenen Stammsammlung bereitgestellt wurde. Molekularbiologisch wurde der Stamm nach White *et al.* (1990) identifiziert. Dafür wurde aus genomischer DNA mit den Primern ITS5 und ITS4 (Tab. 3.2) die ITS1- und ITS2-Region (Internal Transcribed Spacer Region), einschließlich der 5,8S rDNA, amplifiziert (Bellemain *et al.* 2010). Das 712 bp große Fragment wurde sequenziert (Abb. 3.1) und durch einen Datenbankvergleich (EMBL-EBI, WU-BLAST2, Altschul *et al.* 1997) eine hohe Homologie zu 2 verschiedenen *Pleurotus sapidus* Stämmen ermittelt (Tab. 3.3).

Tabelle 3.2: ITS-Primer zur Amplifizierung der rRNA der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit ITS-Bereich

Nummer	Name	Sequenz	T <sub>M</sub>
1473	ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	58 °C
1474	ITS5	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG-3'	58 °C

TCTTGAAAG	TAAAAAGTCG	TAACAAGGTT	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	60
ATGAATCAC	TATGGAGTTG	TTGCTGGCCT	CTAGGGGCAT	GTGCACGCTT	CACTAGTCTT	120
TCAACCACCT	GTGAACTTTT	GATAGATCTG	TGAAGTCGTC	CTTCAAGTCG	TCAGACTTGG	180
TTTGCTGGGA	TTTAAACGTC	TCGGTGTGAC	AACGCAGTCT	ATTACTTAA	CACACCCCAA	240
ATGTATGTCT	ACGAATGTCA	TTAATGGGC	CTTGTGCCTA	TAAACCATAA	TACAACCTTC	300
AACAACGGAT	CTCTGGCTC	TCGCATCGAT	GAAGAACGCA	GCGAAATGCG	ATAAGTAATG	360
TGAATTGCAG	AATTCAGTGA	ATCATCGAAT	CTTTGAACGC	ACCTTGCGCC	CCTTGGTATT	420
CCGAGGGGCA	TGCCTGTTT	AGTGTCATTA	AATTCTCAAA	CTCACATTTG	GTTTTTCCAT	480
CTGTGATGTT	TGGATTGTTG	GGGGTTGCTG	GCTGTAACAA	GTCGGCTCCT	CTTAAATGCA	540
TTAGCAGGAC	TTCTCATTGC	CTCTGCGCAT	GATGTGATAA	TTATCACTCA	TCAATAGCAC	600
GCATGAATAG	AGTCCAGCTC	TCTAATCGTC	CGCAAGGACA	ATTGACAAT	TTGACCTCAA	660
ATCAGGTAGG	ACTACCCGCT	GAACCTAAGC	ATATCAAAAC	GGGAAGAAA	CG	712

Abbildung 3.1: Sequenz der 5,8S rDNA inklusive der flankierenden ITS-Bereiche des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* Stamm 8266

Tabelle 3.3: *Pleurotus sapidus*-Stämme mit großen Homologien zur ermittelten ITS- und 5,8S rDNA-Sequenz

Zugriffsnummer	Organismus/Stamm	Homologie	E-Wert
AY540327	<i>Pleurotus sapidus</i> /S047	98%	$4,5 \cdot 10^{-193}$
FJ810181	<i>Pleurotus sapidus</i> /dd08093	98%	$5,6 \cdot 10^{-192}$

Dies bestätigt, dass es sich bei dem verwendeten Basidiomyceten um *Pleurotus sapidus* handelt.

## 3.2 Erstellung von cDNA-Bibliotheken von *Pleurotus sapidus*

### 3.2.1 Induktion

*Pleurotus sapidus* wurde submers kultiviert (s. 2.2.1), wobei dem Medium verschiedene enzym-spezifische Substrate (s. 2.2.1.5) zugesetzt wurden, um das Expressionsmuster von *Pleurotus sapidus* zu beeinflussen und die Expression der Zielenzyme zu steigern. Das Wachstum der Hauptkulturen wurde täglich überprüft und die sekretierte Enzymaktivität im Kulturüberstand mit Hilfe photometrischer Assays (Tab. 2.13) quantitativ erfasst.

#### 3.2.1.1 Arylalkoholoxidase

Die Arylalkoholoxidaseaktivität stieg über den Kulturverlauf an und erreichte ab dem 10. Kultur-tag ein Plateau bei ca.  $220 \text{ U L}^{-1}$  (Abb. 3.2). Durch die Zugabe von Veratrylalkohol zum Medium wurde die Aktivität nicht erhöht.

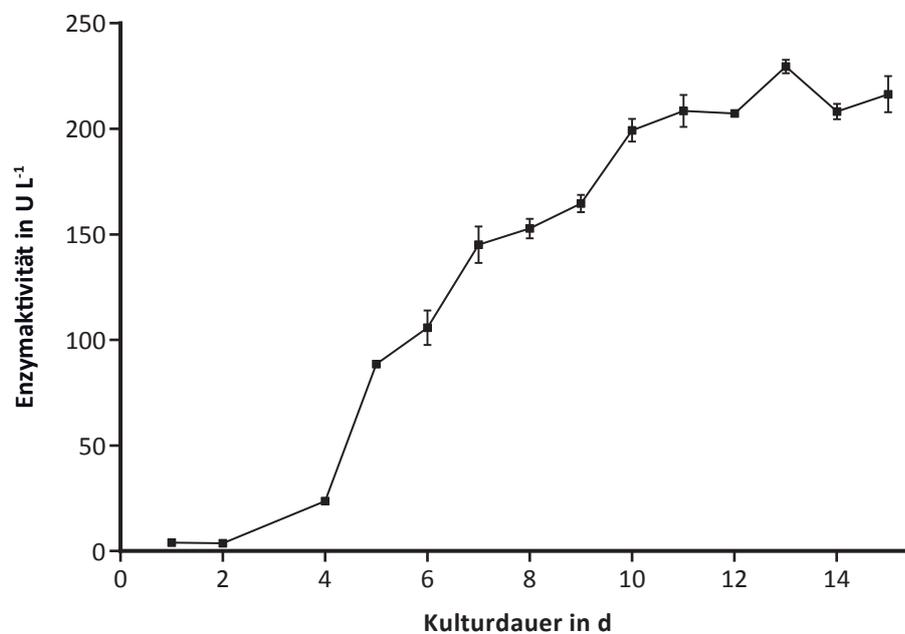


Abbildung 3.2: Sekretierte Arylalkoholoxidaseaktivität während der Kultivierung von *Pleurotus sapidus*

### 3.2.1.2 Lipase

Das Wachstum des Myzels und die Aktivität von Lipasen im Sekretom wurde durch die verwendete Kohlenstoffquelle (C-Quelle) signifikant beeinflusst. Die Hauptkulturen, denen Keimöl bzw. Glucose als Kohlenstoffquelle diente, wuchsen deutlich schneller als die Hauptkulturen mit Tween® 80 als Kohlenstoffquelle. Die Aktivität von Lipasen im Sekretom wurde täglich mit Hilfe des Lipaseassays (s. 2.6.9.1) photometrisch bestimmt. Ein deutlicher Induktionseffekt wurde bei der Kultivierung des Pilzes mit Tween® 80 als einziger C-Quelle beobachtet, die Verwendung von Keimöl als C-Quelle zeigte jedoch im Vergleich zum SNL-Medium keinen Effekt (Abb. 3.3). Die höchste Lipaseaktivität ( $26 \text{ U L}^{-1}$ ) wurde am 5. Kulturtag gemessen. Die Lipaseaktivitäten in den Kulturüberständen mit Keimöl bzw. Glucose als Kohlenstoffquelle stieg über die gesamte Kulturdauer an, blieb aber deutlich hinter denen von Kulturüberständen mit Tween® 80 zurück.

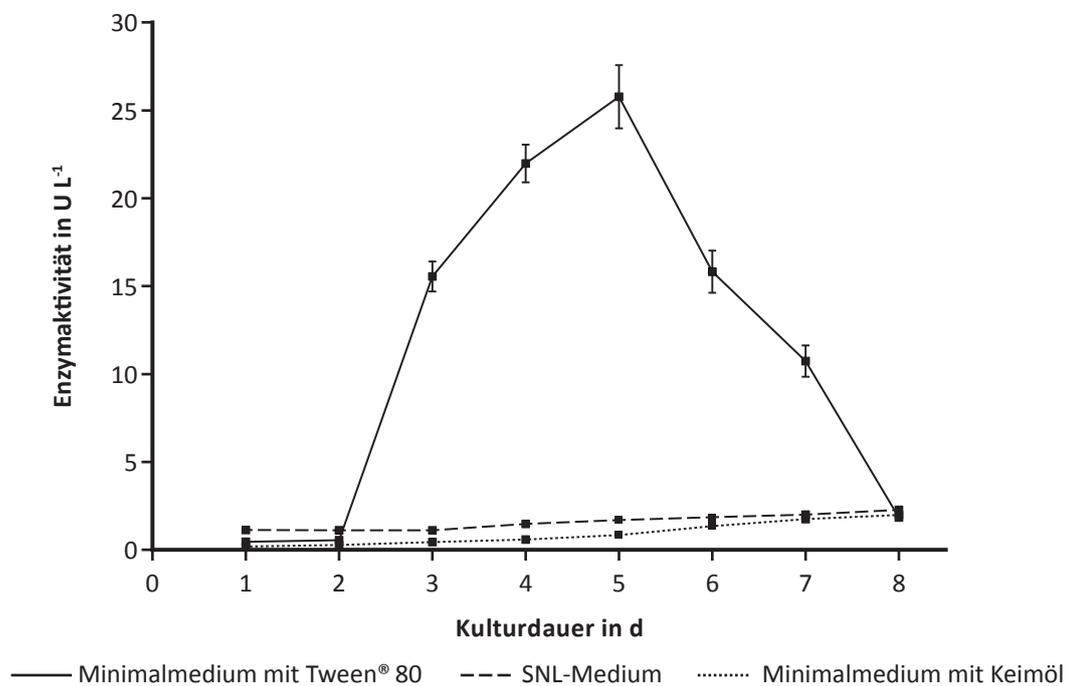


Abbildung 3.3: Lipaseaktivität in Kulturüberständen von *Pleurotus sapidus*, kultiviert in Medien mit verschiedenen C-Quellen

### 3.2.1.3 DyP-Typ Peroxidase

Die Peroxidaseaktivität im Kulturverlauf von *Pleurotus sapidus* wurde bereits im Rahmen der Sekretomanalyse untersucht und die höchsten Aktivitäten im Kulturüberstand zu Beginn der Submerskultivierung gefunden (Schüttmann 2011).

### 3.2.2 RNA-Isolierung und Überprüfung der RNA-Qualität

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Plant Mini Kits aus Myzel des Basidiomyceten, das zum Zeitpunkt der höchsten Enzymaktivität geerntet wurde (s. 2.3.2). Für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek für die Klonierung der Arylalkoholoxidase wurde Myzel vom 10. Kulturtag verwendet, für die Klonierung der DyP-Typ Peroxidase und der Lipase wurde Myzel vom 5. Kulturtag verwendet. Die isolierte Gesamt-RNA und ihre Stabilität wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (s. 2.3.3).

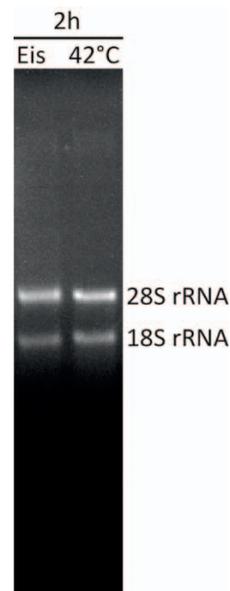


Abbildung 3.4: Analyse der isolierten Gesamt-RNA des 5. Kulturtages; 1,1%iges, ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel. Aufgetragen wurden 4  $\mu$ L der isolierten Gesamt-RNA nach 2 h Lagerung unter den angegebenen Bedingungen

Das Gel zeigt ausgeprägte Banden, die dem charakteristischen Bandenmuster der 28S rRNA und 18S rRNA von Pilzen entsprechen (Abb. 3.4). Die 28S rRNA und 18S rRNA liegen etwa in dem erwarteten Verhältnis von 2:1 vor. Dies zeigt, dass die isolierte RNA nicht degradiert ist (Accerbi *et al.* 2010).

### 3.2.3 Synthese der cDNA

Die RNA diente als Matritze für die Synthese des Erststrangs. In einer Long-Distance-PCR (LD-PCR) wurde der Gegenstrang synthetisiert und die cDNA amplifiziert (s. 2.3.4). Die cDNA-Bibliothek aus *Pleurotus sapidus* wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 3.5). Für die nachfolgende PCR wurde die cDNA-Bank nach Zyklus 23 verwendet.

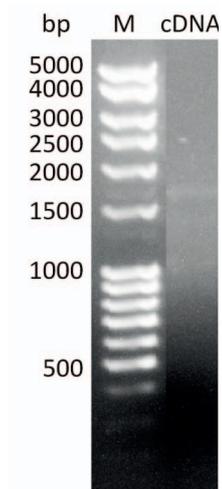


Abbildung 3.5: cDNA aus *Pleurotus sapidus*. Als Template diente die Gesamt-RNA des 5. Kulturtages; 1,1%iges, mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel  
M – 100 bp DNA-Leiter, extended, aufgetragen wurden 4  $\mu$ L cDNA

### 3.3 Arylalkoholoxidase

#### 3.3.1 Isolierung der cDNA einer Arylalkoholoxidase aus der cDNA-Bibliothek von *Pleurotus sapidus*

##### 3.3.1.1 Ableiten der Primer

Aufgrund der großen Homologie von *Pleurotus sapidus* zu den nahen Verwandten *P. eryngii*, *P. pulmonarius* und *P. ostreatus* wurden die massenspektrometrisch erhaltenen Peptidsequenzen (Tab. 3.1) mit deren AAO-Sequenzen verglichen. Von den Genen der homologen Arylalkoholoxidasen wurden anschließend Primer für die Amplifizierung der cDNA der Arylalkoholoxidase von *Pleurotus sapidus* abgeleitet. Die Lage der Primer wurde so gewählt, dass das amplifizierte Fragment sowohl das Start- als auch das Stoppcodon des Enzyms enthielt (s. 2.3.5.1).

### 3.3.1.2 Amplifizierung und Klonierung der cDNA der Arylalkoholoxidase

Die cDNA der Arylalkoholoxidase wurde aus der cDNA-Bibliothek von *Pleurotus sapidus* mittels PCR mit den abgeleiteten Primern amplifiziert (s. 2.3.5). Die PCR-Produkte im erwarteten Größenbereich von ca. 1800 bp wurden aus dem Agarosegel isoliert, unter Nutzung des TOPO/TA Cloning Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR2.1-TOPO zwischenkloniert und der Vektor pCR2.1-TOPO-AAO (Abb. 3.6) erzeugt.

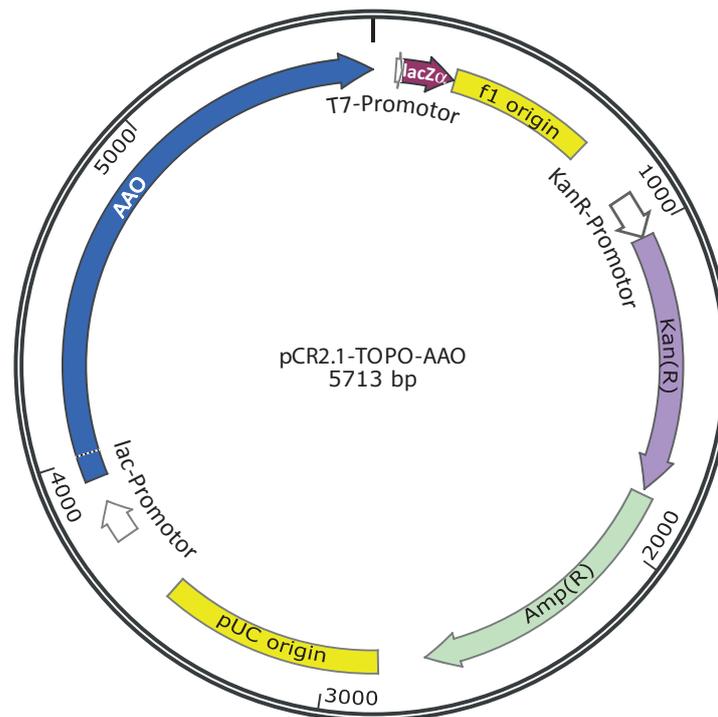


Abbildung 3.6: Vektorkarte des Klonierungsvektors pCR2.1-TOPO-AAO, mit inserierter cDNA-Sequenz der Arylalkoholoxidase, durch die das lacZ $\alpha$ -Gen inaktiviert wurde  
**pUC origin** – high copy Replikationsursprung, **Amp(R)** – Ampicillinresistenzgen, **Kan(R)** – Kanamycinresistenzgen, **f1 ori** – f1 Bakteriophage-Replikationsursprung

Der Vektor wurde in *E. coli* TOP 10-Zellen transformiert und vermehrt (s. 2.3.7). Insert-positive Transformanten wurden mittels Blau/Weiß-Screening identifiziert (s. 2.2.5) und das Insert mit Hilfe der Kolonie-PCR und Agarosegelelektrophorese analysiert (s. 2.3.5.2, Abb. 3.7). Als Primer wurden ein vektorspezifischer Primer und ein Gen-spezifischer Primer kombiniert, sodass das erwartete PCR-Produkt ca. 200 bp größer ist als das inserierte Gen.

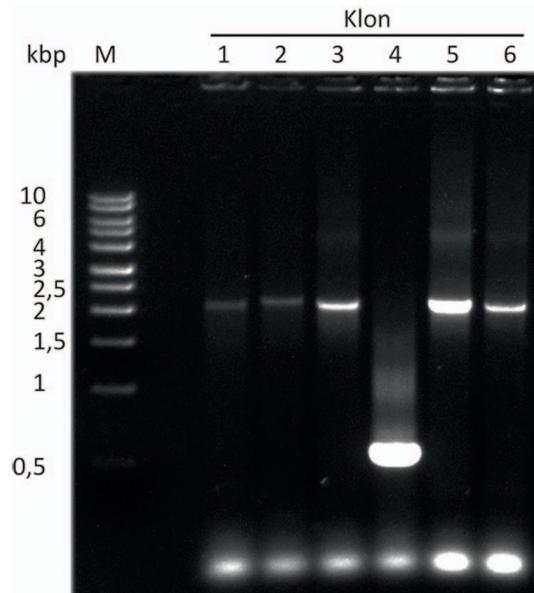


Abbildung 3.7: Analyse der PCR-Produkte zur Kontrolle der Insert-Größe; 1,2%iges, ethidimbromidgefärbtes Agarosegel  
**M** – DNA-Leiter (1 kbp), **1-6** – untersuchte Klone

Mittels Kolonie-PCR wurden 6 Insert-positive Transformanten überprüft, von denen fünf ein Insert mit der erwarteten Größe (ca. 2000 bp) besaßen (Abb. 3.7). Die Plasmide mit einem Insert der erwarteten Größe wurden isoliert und sequenziert (MWG Operon).

### 3.3.2 Bioinformatische Analyse der AAO-Sequenz

Die ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe von ChromasPro<sup>®</sup> analysiert. Die klonierte Sequenz umfasst 1782 Basenpaare und wurde unter der Zugriffsnummer LN830265 bei EBI-EMBL veröffentlicht. Sie codiert ein Protein mit 593 Aminosäuren (Abb. 3.8). Das berechnete Molekulargewicht des Proteins beträgt 63,6 kDa mit einem pI von 4,85 (ExpASy ProtParam, Tab. 2.12).

ATGTCGTTTA	GTGCACTTCG	TCAACTTCTC	TTCATCGCTT	GCTTGGCTCT	GCCATCACTG	60
M S F S	A L R	Q L L	F I A C	L A L	P S L	
GCGGCCGCTA	ACCTCCAAC	CGCCGATTTT	GACTACATCG	TCGTCGGGGC	GGGGAACGCG	120
A A A N	L P T	A D F	D Y I V	V G A	G N A	
GGGAATGTTG	TCGCTGCACG	ACTCACGGAG	GATCCCAACG	TGTCTGTCTT	GGTCTCTGAA	180
G N V V	A A R	L T E	D P N V	S V L	V L E	
GCGGGTGTAT	CAGATGAGAA	TGTAGTAGGG	GCAGAGGCTC	CACTTCTTGC	GCCCGGACTT	240
A G V S	D E N	V V G	A E A P	L L A	P G L	
GTCCTAACT	CTATCTTCGA	CTGGAATTAC	ACGACAACAG	CTCAAGCTGG	GTACAATGGG	300
V P N S	I F D	W N Y	T T T A	Q A G	Y N G	
CGGTTCGATTG	CGTACCCTCG	TGGCCGTATG	CTAGGAGGGT	CTAGCTCTGT	TCATTACATG	360
R S I A	Y P R	G R M	L G G S	S S V	H Y M	
GTTATGATGC	GCGGTTTCGAT	AGAGGACTTC	GATCGCTATG	CGGCCGTCAC	TGGCGATGAT	420
V M M R	G S I	E D F	D R Y A	A V T	G D D	
GGATGGAAT	GGGACAACAT	CCAGCAGTTC	GTCAGGAAGA	ACGAAATGGT	CGTGCCCCCT	480
G W N W	D N I	Q Q F	V R K N	E M V	V P P	
GCTGACAACC	ATAATACTTC	CGGCGAATTT	ATCCAGCGG	TACATGGGAC	TAACGGCTCT	540
A D N H	N T S	G E F	I P A V	H G T	N G S	
GTCTCTATTA	GCTTGCCAGG	CTTCCCTACC	CCACTTGATG	ATCGCGTCTT	AGCCACAAC	600
V S I S	L P G	F P T	P L D D	R V L	A T T	
CAGGAGCAAA	GCGAAGAGTT	CTTTTTCAAT	CCTGACATGG	GAACAGGTCA	TCCTCTCGGA	660
Q E Q S	E E F	F F N	P D M G	T G H	P L G	
ATCAGTTGGT	CAATCGCATC	AGTCGGCAAC	GGTCAACGTA	GCAGTTCTTC	TACTGCCTAC	720
I S W S	I A S	V G N	G Q R S	S S S	T A Y	
TTACGGCCTG	CCCAGTCACG	GCCCAATCTC	AGCGTGTGA	TAAATGCTCA	AGTGACTAAA	780
L R P A	Q S R	P N L	S V L I	N A Q	V T K	
CTCGTTAACA	GCGGAACGAC	GAACGGCCTA	CCTGCGTTCC	GGTGTGTAGA	GTACGCAGAG	840
L V N S	G T T	N G L	P A F R	C V E	Y A E	
CGTGAAGGAG	CACCAACGAC	GACTGTTTTGT	GCTAAAAAAG	AAGTCGTTCT	TTCCGCGGGA	900
R E G A	P T T	T V C	A K K E	V V L	S A G	
TCGGTTGGTA	CCCCATCCT	TCTGCAATTG	TCAGGCATCG	GTGATCAGAG	TGATCTGTCA	960
S V G T	P I L	L Q L	S G I G	D Q S	D L S	
GCGGTTGGTA	TCGATACCAT	CGTCAACAA	CCTAGCGTAG	GCCGAAACCT	GTCCGACCAC	1020
A V G I	D T I	V N N	P S V G	R N L	S D H	
TTGCTCCTTC	CTGCTACGTT	CTTCGTCAAC	AACAATCAAT	CATTGATAA	CCTCTTCAGA	1080
L L L P	A T F	F V N	N N Q S	F D N	L F R	
GACTCGTCCG	AGTTCAACGC	TGATTTAGAT	CAGTGGACAA	ACACTAGAAC	GGGCCCTCTC	1140
D S S E	F N A	D L D	Q W T N	T R T	G P L	
ACCGCGCTGA	TTGCTAACCA	CCTGGCCTGG	CTGCGGTTGC	CATCGAATTC	AAGCATCTTC	1200
T A L I	A N H	L A W	L R L P	S N S	S I F	
CAGTCCGTCC	CGGACCCAGC	TGCGGGCCCC	AACTCGGCTC	ATTGGGAGAC	CATCTTCTCG	1260
Q S V P	D P A	A G P	N S A H	W E T	I F S	
AACCAATGGT	TCCATCCAGC	TCTCCCTCGT	CCTGATACTG	GTAACCTTAT	GAGCGTTACA	1320
N Q W F	H P A	L P R	P D T G	N F M	S V T	
AACGCATTAA	TTGCTCCCGT	GGCCCGTGGG	GACATCAAGC	TTGCTACGTC	CAACCCATTC	1380
N A L I	A P V	A R G	D I K L	A T S	N P F	
GACAAGCCAC	TCATCAACCC	GCAGTATCTC	TCAACGGAAT	TCGACATCTT	CGCCATGATC	1440
D K P L	I N P	Q Y L	S T E F	D I F	A M I	
CAAGCAGTCA	AATCCAACCT	CCGTTTCCTT	TCTGGCCAAG	CATGGGCAGA	TTTCGTTATA	1500
Q A V K	S N L	R F L	S G Q A	W A D	F V I	
CGCCCATTCG	ATGCCCGTTT	GAGCGACCCG	ACGAACGACG	CTGCTATCGA	GTCATACATC	1560
R P F D	A R L	S D P	T N D A	A I E	S Y I	
CGAGACAACG	CCAACACAAT	TTTCCACCCA	GTAGGAACGG	CCAGCATGTC	CCCAGCGGGA	1620
R D N A	N T I	F H P	V G T A	S M S	P R G	
GCTTCTTGGG	GCGTCGTAGA	TCCCGATCTC	AAGGTCAAAG	GTGTGGACGG	CCTCAGAATC	1680
A S W G	V V D	P D L	K V K G	V D G	L R I	
GTCGATGGGT	CTATTTTGCC	CTTCGCGCCA	AACGCGCACA	CCCAAGGACC	GATATACCTT	1740
V D G S	I L P	F A P	N A H T	Q G P	I Y L	
GTAGGCGAAC	GAGGAGCTGA	TCTAATTAAG	GCTGATCAGT	AG		1782
V G E R	G A D	L I K	A D Q *			

Abbildung 3.8: Nukleotid- und übersetzte Aminosäuresequenz der Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus*

Die Domänensuche mittels Pfam (Sanger Institut, Finn *et al.* 2014) zeigte, dass das Enzym zu der Familie der GMC-Oxidoreduktasen gehört. Bei Datenbankrecherchen (blastp, NCBI) wurden hohe Homologien der klonierten Sequenz zu Arylalkoholoxidasen aus *Pleurotus pulmonarius* (NCBI: AAF31169.1) und *Pleurotus eryngii* (NCBI: AAC72747.1) festgestellt. Die hochkonservierte Dinukleotid-Bindungsmotiv (DBM)-Sequenz G9xG11xxG14(x)<sub>18</sub>E33 (Fernández *et al.* 2009) und die Signatur-2-Konsensussequenz (PROSITE PS00624) der GMC-Oxidoreduktasen wurden identifiziert (Abb. 3.9).

Mittels PSORT Prediction (Horton und Nakai 1997, Horton *et al.* 2007) und SinganIP 4.1 (Petersen *et al.* 2011) wurde für die Arylalkoholoxidase ein Signalpeptid mit einer Länge von 21 Aminosäuren vorhergesagt. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Arylalkoholoxidase mit den N-Termini der reifen Proteine aus *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus pulmonarius* (Sannia *et al.* 1991, Varela *et al.* 2000a) sowie den ermittelten Peptidsequenzen (Tab. 3.1) machen ein längeres Signalpeptid (AS 1-24) plausibel. Ohne Signalpeptid umfasst die Sequenz 569 Aminosäuren. Das reife Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 61,1 kDa und einen theoretischen pI von 4,8. In Abbildung 3.9 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenz des klonierten Enzyms mit Peptidsequenzen von potentiellen Arylalkoholoxidasen aus dem Sekretom von *Pleurotus sapidus* dargestellt. Das klonierte Enzym kann dem Sekretom des Pilzes zugeordnet werden.

AAO 284-549	MSFSALRQLLFIACLALPSLAAANLPTADFDYIVV <b>GAGNAGNVVAAR</b> L <b>TEDPNVSVLVLE</b> 60 LPTADFDYLVV <b>GAGNAGNVVAAR</b> *****
AAO	AGVSDENVVGAEP LLAPGLVPNSIFDWNYYTTTAQAGYNGRSIAYPRGRMLGGSSSVHYM 120
AAO 126-02	VMMRGSIEDFDRYAAVTGDDGWNWDNIQQFVRKNEVPPADNHNTSGEFIPAVHGTNGS 180 YAAVTGDDGWNWDNIQQFVR *****
AAO	VSISLPGFPTPLDDRVLATTQESEQSEFFFPDMPGTGHPLGISWSIASVGNQRRSSSTAY 240
AAO 126-02	LRPAQSRPNLSVLINAQVTKLVNSGTTNGLPAFRCEVEYAEREGAPTTTVCAKKEVLSAG 300 LVNSGTTNGLPAFR *****
AAO	<b>SVGTPILLQLSGIGD</b> QSDLSAVGIDTIVNPNVSVGRNLSDHLLLPATFFVNNNQSFNDLFR 360
AAO 126-02	DSSEFNADLDQWTNTRTGPLTALIANHLAWLRLPSNSSIFQVDPDPAAGPNSAHWETIFS 420 DSSEFNADLDQWTNTR *****
AAO	NQWFHPALPRPDTGNFMSVTNALIAPVARGDIKLATSNPFDKPLINPQYLSTEFDIFAMI 480
AAO 126-02 284-549	QAVKSNLRFSLGQAWADFVIRPFARLSDPTNDAAIESYIRDNANTIFHPVGTASMSPRG 540 LSDPTNDAAALPAGGPLR ***** DNANTIFHPVGTASMSPR *****
AAO 284-549	ASWGVVDPDLKVKGV DGLRIVDGSILPFAPNAHTQGPIYLVGERGADLIKADQ 593 IVDGSILPFAPNAHTQGPIYLVGER *****

Abbildung 3.9: Vergleich der Aminosäuresequenz der Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus* mit den massenspektrometrisch generierten Peptidsequenzen (grau). Identische Aminosäuren (\*), Signalpeptid (rot), GMC Oxidoreduktasen Signatur 2, DBM-Sequenz G9xG11xxG14(x)<sub>18</sub>E33

### 3.3.2.1 Berechnung eines Strukturmodells für die Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus*

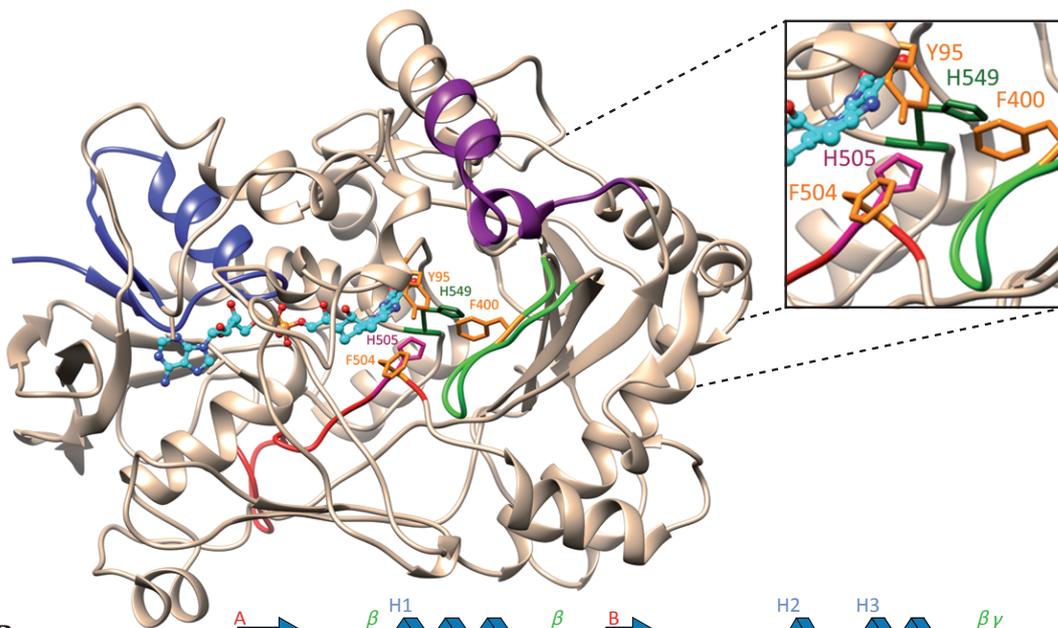
Mit dem Programm SWISS-MODEL wurde ein Strukturmodell der Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus* in Homologie zur dreidimensionalen Struktur einer Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus eryngii* (PDB-ID 3FIMB) berechnet (Abb. 3.11). Die beiden Arylalkoholoxidasen weisen eine Sequenzidentität von ca. 95% auf (Abb. 3.10).

	---	$\beta$	---	$\alpha$	---	--	$\beta$	---			
Psa	LPTADFDYIV	VGAGNAGNVV	AARLTEDPNV	SVLVLEAGVS	DENVVGAEEAP	LLAPGLVPNS	60				
Per	ADFDYVV	VGAGNAGNVV	AARLTEDPDV	SVLVLEAGVS	DENVLGAEEAP	LLAPGLVPNS	57				
	*****	*	*****	*****	*****	*****					
Psa	IFDWN <sup>Y</sup> TTTA	QAGYNGRSIA	YPRGRMLGGS	SSVHYMVMMR	GSIEDFDRYA	AVTGDDGWNW	120				
Per	IFDWN <sup>Y</sup> TTTA	QAGYNGRSIA	YPRGRMLGGS	SSVHYMVMMR	GSTEDFDRYA	AVTGDEGWNW	117				
	*****	*****	*****	*****	**	*****					
Psa	DNIQQFVRKN	EMVVPADNH	NTSGEFIPAV	HGTNGSVSIS	LPGFPTPLDD	RVLATTQEQS	180				
Per	DNIQQFVRKN	EMVVPADNH	NTSGEFIPAV	HGTNGSVSIS	LPGFPTPLDD	RVLATTQEQS	177				
	*****	*****	*****	*****	*****	*****					
Psa	EEFFNPDMG	TGHPLGISWS	IASVGNQGRS	SSSTAYLRPA	QSRPNLSVLI	NAQVTKLVNS	240				
Per	EEFFNPDMG	TGHPLGISWS	IASVGNQGRS	SSSTAYLRPA	QSRPNLSVLI	NAQVTKLVNS	237				
	*****	*****	*****	*****	*****	*****					
Psa	GTTNGLPAFR	CVEYAEREGA	PTTVCAPKE	VVLSAGSVGT	PILLQLSGIG	DQSDLSAVGI	300				
Per	GTTNGLPAFR	CVEYAEQEGA	PTTVCAPKE	VVLSAGSVGT	PILLQLSGIG	DENDLSSVGI	297				
	*****	*****	***	*****	*****	*					
Psa	DTIVN <sup>N</sup> PSVG	RNLSDHLLLP	ATFFVNNQNS	FDNLF <sup>R</sup> DSSE	FNADLDQWTN	TRTGPLTALI	360				
Per	DTIVN <sup>N</sup> PSVG	RNLSDHLLLP	AFFVNSNQT	FDNIF <sup>R</sup> DSSE	FNVLDLQWTN	TRTGPLTALI	357				
	*****	*****	*	*****	**	*****					
Psa	ANHLAWLRLP	S <sup>N</sup> SSIFQSV	DPAAGPNSAH	WETIFSNQWF	HPALPRPDTG	NFMSVTNALI	420				
Per	ANHLAWLRLP	S <sup>N</sup> SSIFQTFP	DPAAGPNSAH	WETIFSNQWF	HPALPRPDTG	SFMSVTNALI	417				
	*****	*****	*	*****	***	*****					
Psa	APVARGDIKL	ATSNPFDKPL	INPQYLSTEF	DIFAMIQAVK	SNLRF <sup>L</sup> SGQA	WADFVIRPFD	480				
Per	SPVARGDIKL	ATSNPFDKPL	INPQYLSTEF	DIFTMIQAVK	SNLRF <sup>L</sup> SGQA	WADFVIRPFD	477				
	*****	*****	*****	***	*****	*****					
Psa	ARLSDPTNDA	AIESYIRDNA	NT <sup>I</sup> F <sup>H</sup> PVGTA	SMSPRGASWG	VVDPDLKVKG	VDGLRIVDGS	540				
Per	PRLRDPDDA	AIESYIRDNA	NT <sup>I</sup> F <sup>H</sup> PVGTA	SMSPRGASWG	VVDPDLKVKG	VDGLRIVDGS	537				
	**	***	*****	*****	*****	*****					
Psa	ILPFAPNAHT	QGPIYLVGER	GADLIKADQ				569				
Per	ILPFAPNAHT	QGPIYLVGKQ	GADLIKADQ				566				
	*****	*****	*****								

Abbildung 3.10: Vergleich der Arylalkoholoxidasesequenzen von *Pleurotus sapidus* (ohne postulierte Signalsequenz) und *Pleurotus eryngii* (PDB-ID 3FIMB). Hervorgehoben sind die **FAD-Bindungsdomäne**, das **aktive Zentrum** sowie die katalytische Base H505 (●), das an der Alkoholbindung beteiligte H549 (◆), die Aminosäuren Y95, F400, F504, die Bestandteil des Flaschenhalses sind (■) und sieben potentielle Glykosylierungsstellen (hellgrün), vorhergesagt mit NetNGlyc 1.0)

Aufgrund der großen Ähnlichkeit wurde die Struktur der Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus eryngii* für die Modellierung gewählt. Anschließend wurde über den Onlineservice von NCBI mit der erstellten PDB-Datei ein VAST-Search (Vector Alignment Search Tool) durchgeführt und die 3D-Struktur mit Chimera analysiert.

A



B

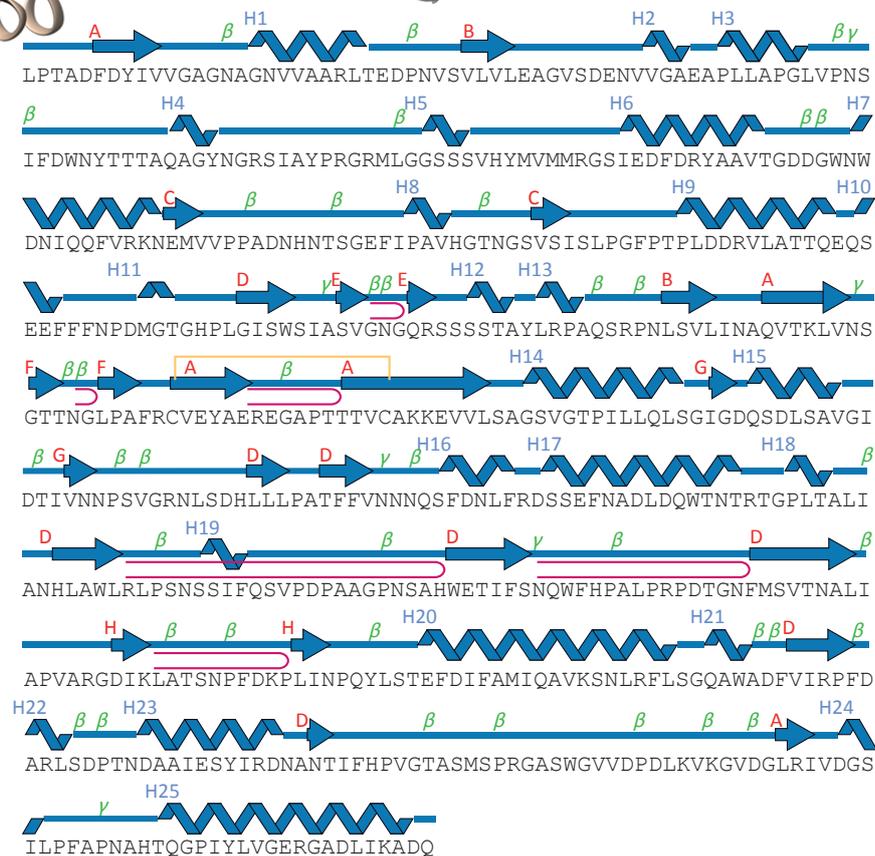


Abbildung 3.11: A – Modell der Arylalkoholoxidase mit FAD

Hervorgehoben sind die konservierte FAD-Bindestelle, das aktive Zentrum, der Substratzugangsloop, die katalytische Base H505, das an der Alkoholbindung beteiligte H549, sowie die aromatischen Reste Y95, F400 und F504, die den Zugang zum aktiven Zentrum limitieren. Das als Antigen determinante ausgewählte Peptid ist lila hervorgehoben

B – Primärsequenz mit korrespondierenden Sekundärstrukturelementen (PDBsum) gezeigt sind die  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Stränge,  $\beta$ -turns und  $\gamma$ -turns.  $\beta$ -Haarnadelschleifen sind als Schleifen und die Disulfidbrücke gelb dargestellt

Die berechnete Struktur der Arylalkoholoxidase zeigt zwei Domänen und ähnelt der räumlichen Struktur anderer Flavoenzyme. Beide Domänen besitzen charakteristische  $\beta$ -Faltblattstrukturen und homologe Motive zu anderen Oxidoreduktasen. Der N-Terminus zeigt ein  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ -Motiv, das an der Bindung des AMP-Teils des FAD-Cofaktors beteiligt ist. Die zweite homologe Region, die Arylalkoholoxidasen und andere Oxidoreduktasen besitzen, ist das aktive Zentrum im Bereich des C-Terminus. Drei aromatische Reste (Y95, F400 und F504) bilden einen Flaschenhals am Substrat-Zugangloop und beschränken den Zugang von Substraten zum aktiven Zentrum. Das Substrat gelangt durch den Flaschenhals zum aktiven Zentrum mit dem C1-Atom in der Nähe des FAD-Rings und den Seitenketten der katalytischen Reste H505 und H549 (nach Fernández *et al.* 2009).

Die Auswahl eines exponierten Proteinbereichs für die Produktion eines polyklonalen Antikörpers wurde auf Basis des Strukturmodells der Arylalkoholoxidase (Abb. 3.11) und Homologieuntersuchungen getroffen und die Aminosäuresequenz NQSFNLFDRSSEFNNA als Antigen determinante ausgewählt (s. 2.1.10).

### 3.3.3 Klonierung der AAO-Sequenz in Expressionsvektoren

Für die heterologe Expression der Arylalkoholoxidase wurde die cDNA aus dem Klonierungsvektor mit Hilfe von Restriktionsenzymen in Expressionsvektoren umkloniert (s. 2.3.6.4). Dafür wurden die Schnittstellen für die verwendeten Restriktionsendonukleasen mit Hilfe spezifischer Primer in einer PCR an die Enden der cDNA angefügt. Die PCR-Produkte und die Expressionsvektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Anschließend wurden die Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 3.12).

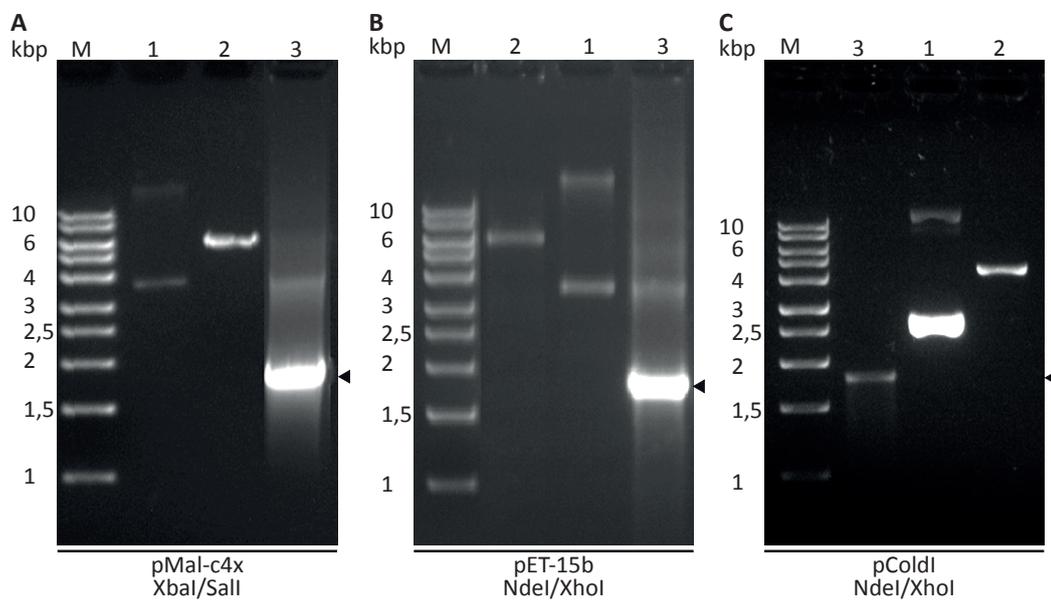


Abbildung 3.12: Kontrolle des Restriktionsverdaus; 1,2%ige ethidiumbromidgefärbte Agarosegele

Unter den Gelen sind der verwendete Vektor und die verwendeten Restriktionsendonukleasen aufgeführt  
**M** – DNA-Leiter (1 kbp DNA-Leiter), **1** – Vektor (Kontrolle), **2** – Vektor, linearisiert, **3** – für die Klonierung verwendetes PCR-Fragment (◄)

Die Klonierungselemente wurden aus dem Gel eluiert, gereinigt und das Insert in den linearisierten Expressionsvektor ligiert.

Im Folgenden ist als Beispiel die Vektorkarte des Expressionsplasmids pET 15b-AAO dargestellt (Abb. 3.13). Die codierende Sequenz der Arylalkoholoxidase wurde nach Restriktion mit NdeI und XhoI in den Vektor inseriert.

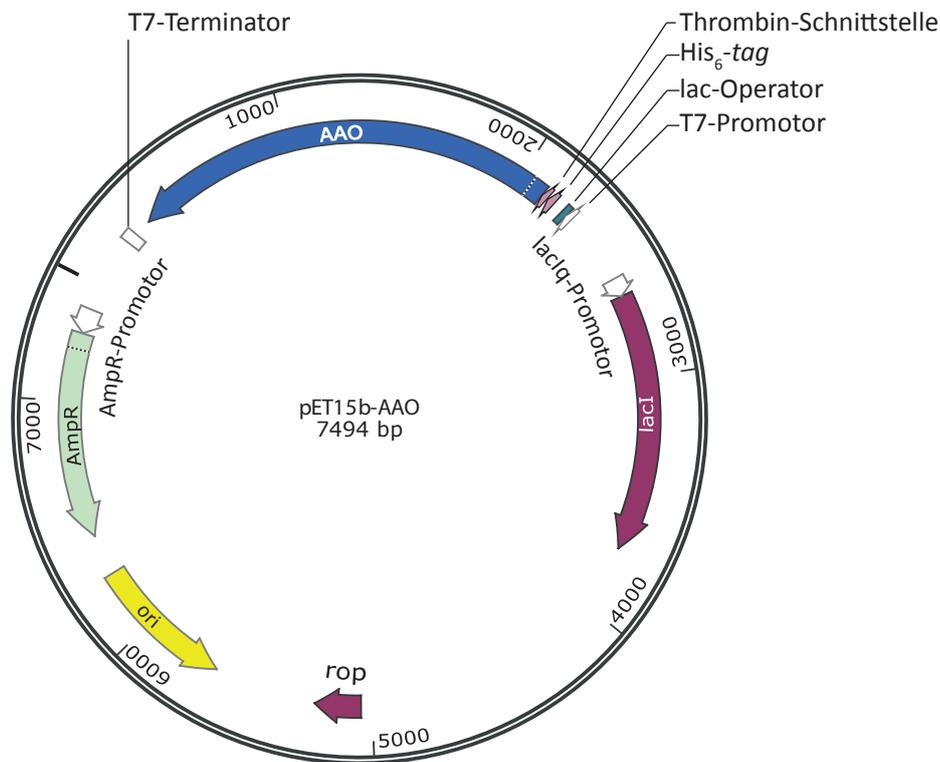


Abbildung 3.13: Karte des Expressionsvektors pET 15b-HisAAO

**ori** – pUC origin: *high copy* Replikationsursprung, **rop** – Regulatorprotein Rop (*repressor of primer*) für die Replikation des Plasmids, **AmpR** – Ampicillinresistenzgen, **lacI** – lac-Repressor, **His<sub>6</sub>** – His-tag

### 3.3.4 Heterologe Expression in *E. coli*

#### 3.3.4.1 Heterologe Expression als His<sub>6</sub>-Arylalkoholoxidase

Für die heterologe Expression der Arylalkoholoxidase in *E. coli* wurde die codierende DNA-Sequenz in den Vektor pET 15b kloniert (s. 2.1.8, 2.3.6.8). Dabei wurde das Protein für die Reinigung mit einem N-terminalen His-*tag* und einer darauf folgenden Thrombin-Spaltstelle fusioniert. Die Expression der His<sub>6</sub>-AAO erfolgte im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) (s. 2.2.3.1) und wurde mittels SDS-PAGE analysiert (s. 2.4.2.1).

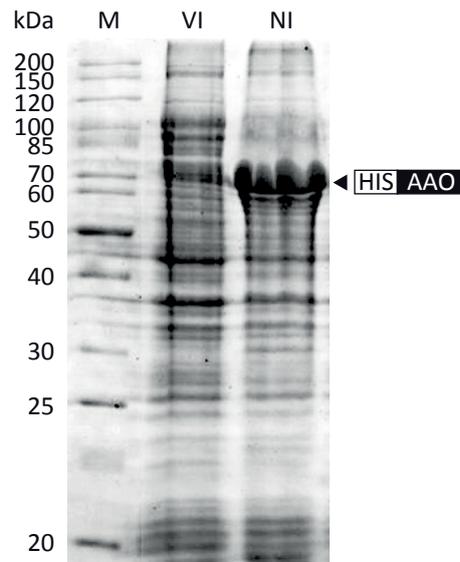


Abbildung 3.14: Heterologe Expression der His<sub>6</sub>-Arylalkoholoxidase  
Colloidal Coomassie gefärbte SDS-PAGE; **M** – Proteinstandard, **VI** – vor Induktion, **NI** – nach Induktion

Die Überexpression mit diesem System führte zur Bildung großer Mengen des Proteins (Abb. 3.14), allerdings unlöslich in Form von *inclusion bodies*.

#### 3.3.4.2 Heterologe Expression als MBP-Arylalkoholoxidase

Eine Möglichkeit, lösliche und biologisch aktive Proteine in *E. coli* zu produzieren, ist die Fusion des Proteins mit einem MBP-*tag* (Maltose-Bindeprotein), welches die Löslichkeit und darüber hinaus die korrekte Faltung des „Passagierproteins“ fördert. In diesem Fall wurde die Arylalkoholoxidase in zwei Varianten des Expressionsvektors pMAL (Tab. 2.9) mit dem MBP zur MBP-Arylalkoholoxidase fusioniert. Der pMAL-c4x Variante fehlt die malE-Signalsequenz, sodass das Fusionsprotein im Cytoplasma verbleibt. Bei der pMAL-p4x Variante besitzt das MBP seine natürliche N-terminale Lokalisationssequenz, die das Fusionsprotein in den periplasmatischen Raum dirigiert. Hierdurch wird eine verbesserte Faltung von Proteinen mit Disulfidbrücken

ermöglicht. Die beiden Fusionsproteine wurden in *E. coli* K12 TB1 bzw. BL21 (DE3) exprimiert (s. 2.5.1.1) und auf Löslichkeit untersucht.

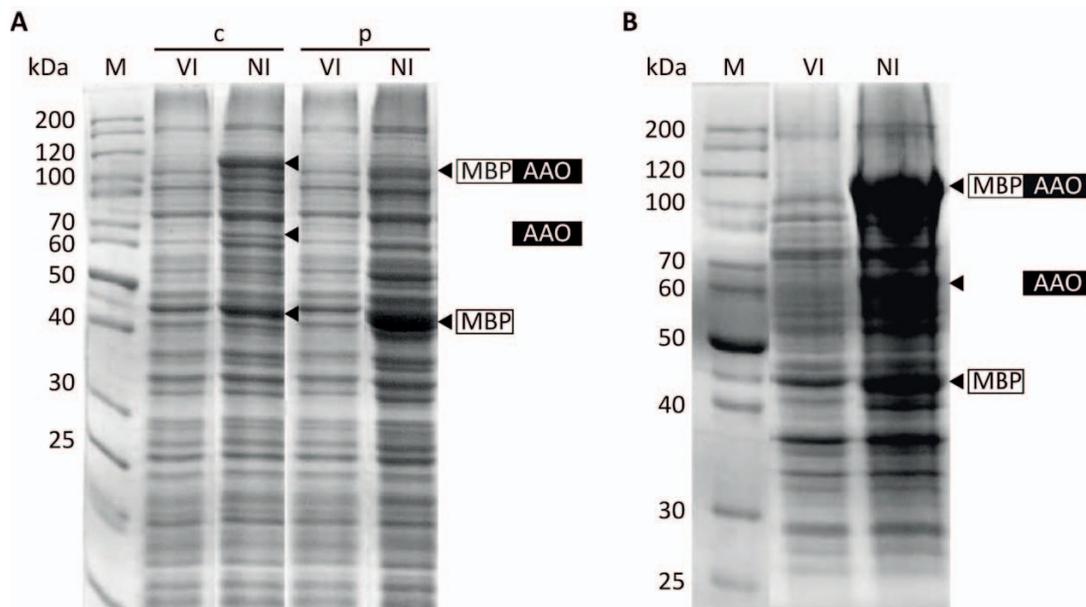


Abbildung 3.15: Heterologe Expression der MBP-AAO in *E. coli*

**A** - K12 TB1, cytoplasmatische (c) bzw. periplasmatische (p) Expression

**B** - BL21 (DE3), cytoplasmatische Expression

Colloidal Coomassie gefärbte SDS-PAGE; **M** – Proteinstandard, **VI** – vor Induktion, **NI** – nach Induktion

Die Expression ohne die Lokalisationssequenz in *E. coli* K12 TB1 führte zur Bildung des Fusionsproteins mit einer apparenten Größe von ca. 113 kDa (Abb. 3.15 A). Das Fusionsprotein wurde allerdings teilweise gespalten. Neben dem erwarteten Produkt wurden zusätzliche Proteinbanden mit ca. 43 kDa und 63 kDa nachgewiesen, die dem MBP-tag sowie der Arylalkoholoxidase entsprechen. Die Menge der nachgewiesenen Arylalkoholoxidase war jedoch deutlich niedriger als die Menge des MBP. Dies zeigte, dass das Fusionsprotein teilweise auch bis zum stabilen MBP abgebaut wurde. Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde das Fusionsprotein in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen.

Auch die Expression mit der malE-Signalsequenz führte zur Bildung des Fusionsproteins mit einer apparenten Größe von ca. 107 kDa, allerdings wurde hauptsächlich die Bande für das unfusionierte MBP nachgewiesen (Abb. 3.15 A). Offensichtlich wurde das Fusionsprotein bis zum stabilen MBP abgebaut, da nur geringe Mengen des Fusionsproteins und große Mengen des MBP nachgewiesen wurden. Für die Isolierung der periplasmatischen Fraktion wurde ein osmotischer Zellaufschluss (s. 2.5.2.3) durchgeführt. Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte, dass das gebildete Fusionsprotein in der unlöslichen und das MBP in der löslichen Fraktion vorlag.

Daher wurde für die Expression der Protease-defiziente Stamm BL21 (DE3) verwendet, um einen proteolytischen Abbau des Fusionsproteins zu verhindern (s. 2.2.3.1). Mit Hilfe dieses Stammes

wurde eine Steigerung der Expression ohne die Lokalisationssequenz gegenüber dem Stamm K12 TB1 erreicht. Die Verwendung dieser Zellen führte zu einer deutlich geringeren Spaltung des Fusionsproteins (Abb. 3.15 B). Die Expression mit der Lokalisationssequenz kam hingegen fast vollständig zum Erliegen. Der Aufschluss der BL21(DE3)-Zellen mit den überexprimierten Proteinen wurde wie in Abschnitt 2.5.2 durchgeführt. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation getrennt und Proben von Pellet und Überstand mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.16).

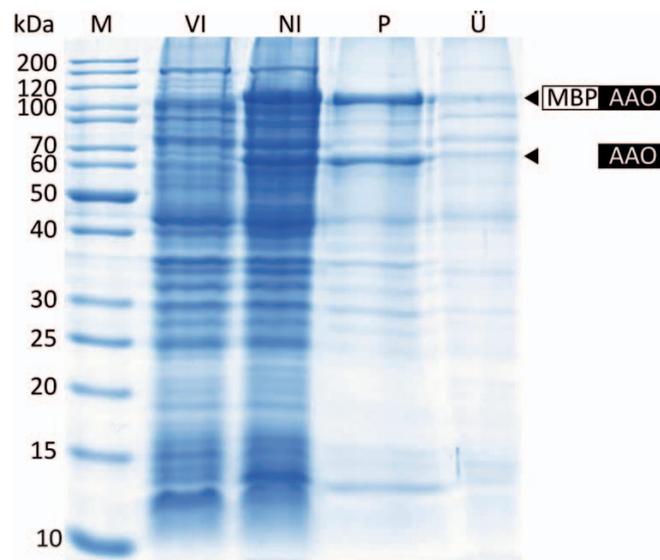


Abbildung 3.16: Analyse der Löslichkeit nach Expression der MBP-AAO in *E. coli* BL12 (DE3)  
Colloidal Coomassie gefärbte SDS-PAGE; **M** – Proteinstandard, **VI** – vor Induktion, **NI** – nach Induktion, **P** – Pellet, **Ü** – lösliche Fraktion

Das Fusionsprotein und die hydrolysierten Fusionspartner lagen hauptsächlich in der unlöslichen Fraktion vor. Geringe Mengen wurden auch in der löslichen Fraktion nachgewiesen (Abb. 3.16). Daher wurde versucht, das lösliche Fusionsprotein mittels Chromatographiesäulen mit Amylosematrix zu reinigen (s. 2.5.4.3). Allerdings band fast ausschließlich der freie MBP-tag an die Matrix. Eine Reinigung und Anreicherung der MBP-AAO war somit nicht möglich. Daher wurde die Peptidase Faktor Xa ohne vorherige Reinigung zum Überstand gegeben (5% bezogen auf den Gesamtproteingehalt ermittelt nach Bradford). Nach der Abspaltung des tags durch die Peptidase wurde der Überstand auf AAO-Aktivität überprüft. Dabei wurden pH-Wert, Inkubationstemperaturen und -zeiten variiert, jedoch keine Aktivität nachgewiesen.

### 3.3.4.3 Kälteschockexpression mit pColdI

Mit den bisher verwendeten Expressionssystemen wurde keine ausreichende Löslichkeit und Aktivität der Arylalkoholoxidase erreicht. Daher wurde die *codon usage* an den Wirtsorganismus *E. coli* B angepasst und die synthetische Sequenz mit bzw. ohne Signalsequenz in den Vektor pCold I kloniert. Die Expression wurde mit *E. coli* BL21(DE3)-Star-Zellen durchgeführt und optimiert.

Der *cspA*-Promotor ist bei 4 °C aktiv. Die Lagerung von Stammpplatten mit transformierten Zellen im Kühlschrank kann daher dazu führen, dass der Vektor ausgeschleust wird. Deshalb wurde der Einfluss der zur Inokulation verwendeten Zellen (Stammpatte oder Glycerolkultur) auf das Expressionslevel von Bakterienkulturen untersucht (s. 2.5.1.1). Die Verwendung einer Vorkultur, die mit Zellen einer zwei Tage alten Stammpatte angeimpft wurde, führte im Vergleich zur Verwendung einer Vorkultur, die mit Zellen eines Glycerolstocks angeimpft wurde, zu einem deutlich niedrigeren Expressionslevel. Daher wurde für alle weiteren Untersuchungen die Vorkultur immer mit Zellen des Glycerolstocks inokuliert.

Ein weiterer kritischer Faktor bei der Verwendung des pCold-Systems ist die Induktion. Diese findet durch einen Kälteschock und die Zugabe von IPTG statt. Unter den verschiedenen getesteten Mechanismen für den Kälteschock führte eine Abkühlung der Kultur in einem Eiswasserbad für 15 min und eine anschließende Inkubation für 30 min bei 15 °C zur stärksten Induktion. Daneben wurde die Regulation der Expression durch die beiden Promotoren kontrolliert. Dazu wurden die Induktionsmechanismen kombiniert bzw. alleine durchgeführt und es wurde gezeigt, dass nur die Kombination beider Induktionsmechanismen (Kälteschock und IPTG) zur Bildung des Zielproteins führte. Weiterhin wurde überprüft, welchen Einfluss der Induktionszeitpunkt auf die Expressionsrate des Zielproteins hat. Dabei wurde ein deutlicher Effekt auf die Proteinausbeute gezeigt: So führte eine Induktion bei  $OD_{600} = 0,3$  zu einer deutlich höheren Proteinmenge als die Induktion zu einem späteren Zeitpunkt.

Die Expression bei niedrigen Temperaturen führt in der Regel zu einer niedrigeren Produktausbeute, wobei diese häufig durch eine längere Inkubation ausgeglichen wird. Daher wurde das Expressionslevel für die Arylalkoholoxidase bei der Inkubation in einem Temperaturbereich von 8 °C bis 15 °C über einen Zeitraum von 24 h bis 48 h untersucht. Dabei wurde eine optimale Expressionsdauer von 36 h bei 10 °C ermittelt.

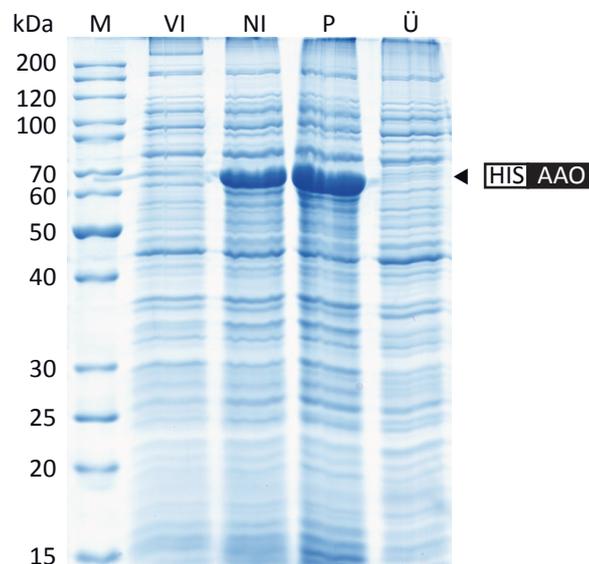


Abbildung 3.17: Heterologe Expression der His-AAO mit dem pCold-System in BL21star (DE3)-Zellen und Analyse der Löslichkeit  
Colloidal Coomassie gefärbte SDS-PAGE; **M** – Proteinstandard, **VI** – vor Induktion, **NI** – nach Induktion, **P** – Pellet, **Ü** – lösliche Fraktion

Die Expression bei niedrigen Temperaturen mit dem pCold-Vektor erhöhte die Löslichkeit der Arylalkoholoxidase nicht, und das Enzym lag weiterhin in *inclusion bodies* vor (Abb. 3.17). Durch die Anpassung der Nukleotidsequenz an die *codon usage* von *E. coli* B wurde das Expressionslevel jedoch deutlich gesteigert.

#### 3.3.4.4 Koexpression mit Chaperonen

Mit dem pCold-System alleine wurde die Löslichkeit des Zielproteins nicht gesteigert. Durch eine Koexpression der Arylalkoholoxidase mit Chaperonen (s. 2.10) sollte die Ausbeute an löslichem und aktivem Enzym verbessert werden.

Die Koexpression unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen führte zunächst zur Bildung großer Mengen Chaperone, jedoch wurde keine Arylalkoholoxidase gebildet. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss das Konzentrationsverhältnis der verwendeten Induktoren sowie der Zeitpunkt der Induktion auf die Mengen und das Verhältnis der gebildeten Produkte haben. Das Konzentrationsverhältnis beeinflusste das Expressionsniveau des Zielproteins und der Chaperone entscheidend. Mit zunehmender Konzentration des Induktors für die Chaperone

stieg die Menge des produzierten Chaperons, wobei die Bildung des Zielproteins erheblich abnahm oder sogar zum Erliegen kam. Daher wurde für alle verwendeten Plasmide das optimale Verhältnis der beiden Induktoren sowie der optimale Zeitpunkt für die Induktion bestimmt. Das Expressionslevel von Chaperon zu Zielprotein wurde mittels SDS-PAGE überprüft und die Konzentrationsverhältnisse der Induktoren ausgewählt, bei denen diese Proteine ein vergleichbares Expressionsniveau hatten.

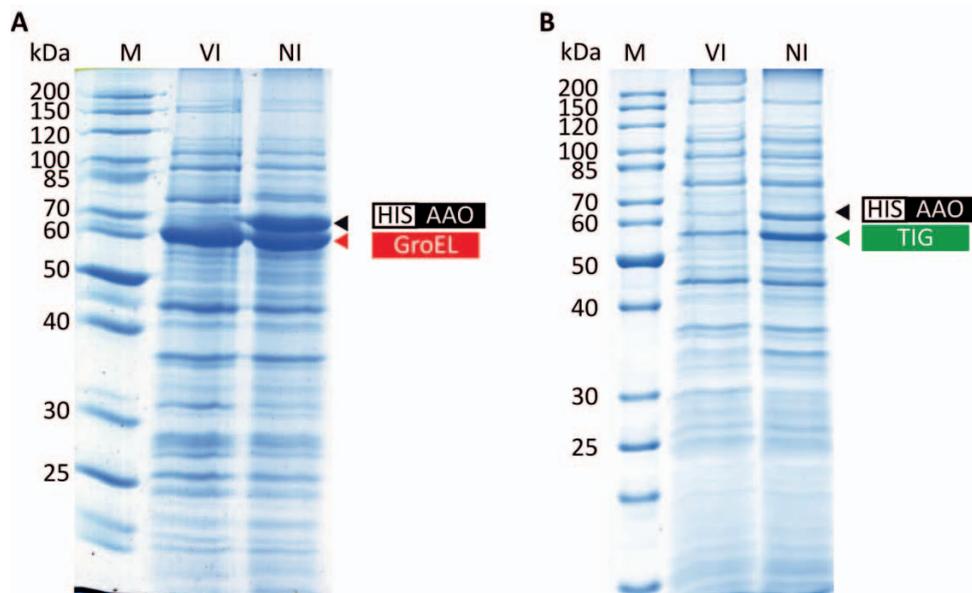


Abbildung 3.18: Koexpression der His-AAO mit Chaperonen (GroEL/ES **(A)** bzw. Triggerfaktor **(B)**, Tab. 2.10) in BL21star (DE3) nach Optimierung der Induktorkonzentrationen ( $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  L-Arabinose zu  $0,5 \text{ mM}$  IPTG).  
SDS-PAGE, colloidal Coomassie gefärbt; **M** – Proteinstandard, **VI** – vor Induktion, **NI** – nach Induktion

Die optimale Konzentration des Induktors L-Arabinose betrug für die Chaperonplasmide pTF16 und pGro7  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ , wobei ein vergleichbares Expressionslevel für die Arylalkoholoxidase erreicht wurde, wenn deren Expression mit  $0,5 \text{ mM}$  IPTG induziert wurde (Abb. 3.18). Für das Chaperonplasmid pG-Tf2 wurde ein optimales Konzentrationsverhältnis von  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  Tetracyclin zu  $0,5 \text{ mM}$  IPTG (AAO) ermittelt. Anders als vom Hersteller angegeben war der optimale Zeitpunkt für die Induktion der Chaperone nicht zu Beginn der Kultivierung sondern 1 h danach.

Die Koexpression wurde unter optimierten Bedingungen durchgeführt, anschließend wurden die Zellen geerntet und – wie in Abschnitt 2.5.2.2 beschrieben – aufgeschlossen. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation getrennt und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 3.19). Die lösliche Fraktion von einem Kulturvolumen von 200 mL wurde dafür mit Hilfe von Pall-Zentrifugenröhrchen (MWC0 10 kDa) um den Faktor 5 konzentriert.

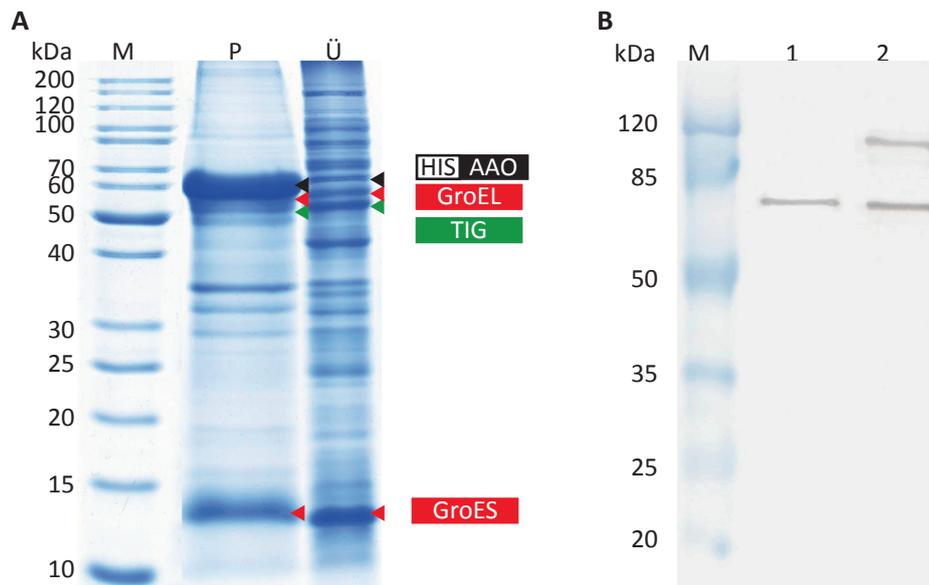


Abbildung 3.19: Nachweis löslicher Arylalkoholoxidase (AAO) mittels SDS-PAGE und Western-Blot nach Koexpression mit den Chaperonen GroES, GroEL und TIG  
**A** - SDS-PAGE, colloidal Coomassie gefärbt; **M** – Proteinstandard, **P** – Pellet, **Ü** – lösliche Fraktion  
**B** - Western-Blot mit AAO-spezifischem Antikörper  
**1** Kontrolle (rückgefaltete AAO\*)  
**2** unter Koexpression mit Chaperonen exprimierte Arylalkoholoxidase nach Zellaufschluss in der löslichen Fraktion  
**M** Proteinstandard (Prestained Protein Molecular Weight Marker)

Die Koexpression mit Triggerfaktor alleine (pTf16) führte nicht zu einer Erhöhung der Löslichkeit. Mit Hilfe der Chaperone GroEL und GroES (pGro7), auch in Kombination mit dem Triggerfaktor (pG-Tf2), wurde die Löslichkeit der Arylalkoholoxidase erhöht, allerdings war weiterhin ein großer Teil des Proteins in *inclusion bodies* eingeschlossen. Mit Hilfe des Western-Blots wurde in der löslichen Fraktion Arylalkoholoxidase mit einem apparenten Molekulargewicht von 62,6 kDa spezifisch mittels Antikörper detektiert. Zusätzlich wurde eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 126 kDa nachgewiesen. Die AAO-Aktivität in der löslichen Fraktionen wurde mittels AAO-Assay überprüft und eine Aktivität von maximal  $29 \text{ U L}^{-1}$  ermittelt. Anschließend wurde eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen durchgeführt, um das Enzym aus der löslichen Fraktion zu reinigen (s. 3.3.6).

### 3.3.5 Heterologe Expression in *Hansenula polymorpha*

Die Versuche zur heterologen Expression der Arylalkoholoxidase in *Hansenula polymorpha* wurden von der Firma Artes Biotechnology durchgeführt. Als Expressionsstamm diente *Hansenula polymorpha* RB11. Für die cytosolische Expression wurde die *codon usage* an den Wirtsorganismus angepasst und das Plasmid pFPMT121-H1-M-AAO-H6 konstruiert. Für die Expression der rekombinanten Arylalkoholoxidase wurde die Hefe unter dereprimierenden Bedingungen kultiviert und der Gesamtzellextrakt, sowie die lösliche und unlösliche Fraktion mit Hilfe der denaturierenden SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert (Abb. 3.20). Als Kontrolle wurde der Expressionsstamm mit dem entsprechenden Vektor ohne AAO-Gen transformiert. Der Nachweis des heterolog exprimierten Enzyms erfolgte über den His-tag mittels spezifischem Antikörper.

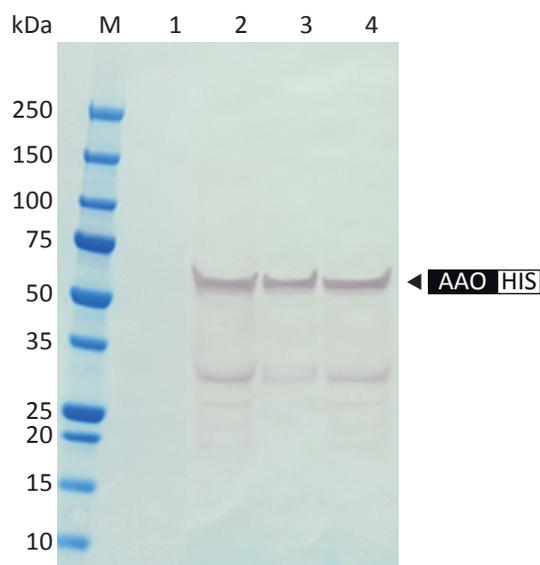


Abbildung 3.20: Western Blot der cytosolischen Expression der Arylalkoholoxidase in *Hansenula polymorpha* (Artes Biotechnology). Analysiert wurde der AAO-Gehalt des Gesamtzellextraktes sowie der cytosolisch löslichen und unlöslichen Fraktion.

**M** – Proteinstandard, **1** – Kontrolle, **2** – Gesamtzellextrakt, **3** – unlösliche Fraktion, **4** – lösliche Fraktion

Im Western Blot wurde eine dominante Bande für ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 60 kDa nachgewiesen, die vermutlich der Arylalkoholoxidase entspricht. Mehr als 50% der cytosolisch exprimierten Arylalkoholoxidase waren in der löslichen Fraktion lokalisiert (Abb. 3.20 Spur 4). In der löslichen Fraktion wurde mit Hilfe des AAO-Assays (s. 2.6.2.1) die Aktivität bei pH 3,5 und pH 6,0 bestimmt. Bei pH 3,5 wurde eine Trübung der Reaktionslösung festgestellt, was eine Messung unmöglich machte. Diese Trübung war, wenn auch vermindert, ebenfalls bei pH 6,0 zu sehen. Daraufhin wurde die Probe mit Hilfe von Zentrifugationsröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa von kleineren Molekülen und Salzen getrennt. Anschließend wurde bei pH 6,0 eine AAO-Aktivität von ca.  $5 \text{ U L}^{-1}$  ermittelt.

### 3.3.6 Reinigung der rekombinanten Arylalkoholoxidase (*E. coli*)

#### 3.3.6.1 Reinigung der löslich exprimierten Arylalkoholoxidase

Die Reinigung der heterolog in *E. coli* exprimierten Arylalkoholoxidase erfolgte mit Hilfe des His-tags (s. 2.5.4.1).

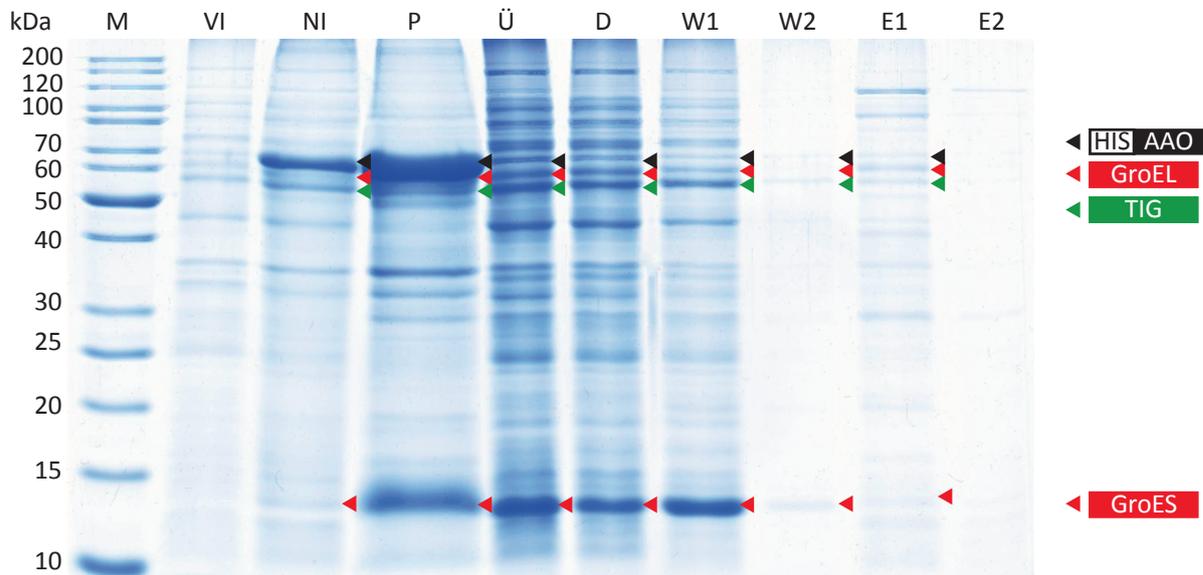


Abbildung 3.21: Reinigung der löslichen Arylalkoholoxidase über  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen. Die Arylalkoholoxidase wurde unter Koexpression der Chaperone GroEL/GroES und Trigger-Faktor (pG-Tf2) exprimiert. Colloidal Coomassie gefärbte SDS-PAGE; **M** – Proteinstandard, **VI** – vor Induktion, **NI** – nach Induktion, **P** – Pellet, **Ü** – lösliche Fraktion, **D** – Durchbruch, **W1**, **W2** – Waschschrte 1 und 2, **E1**, **E2** – Eluate 1 und 2

Bei der Reinigung des löslichen Enzyms unter nativen Bedingungen band nur wenig Zielprotein an die Säule, sodass über diese Methode keine Anreicherung des Enzyms erreicht wurde (Abb. 3.21). Daher wurde die unlösliche Fraktion für die denaturierende Reinigung und anschließende Rückfaltung verwendet.

#### 3.3.6.2 Denaturierende Reinigung aus *inclusion bodies*

Bei der heterologen Expression in *E. coli* wurde die Arylalkoholoxidase hauptsächlich in *inclusion bodies* eingeschlossen. Daher wurde versucht, durch Solubilisierung des Proteins und anschließende Rückfaltung lösliche und aktive Arylalkoholoxidase in ausreichenden Mengen für eine Charakterisierung zu gewinnen (s. 2.5.9). Dafür wurde das Enzym durch Harnstoff in Lösung gebracht (Solubilisierung), was eine Denaturierung des Proteins zur Folge hatte. Anschließend wurde das Protein mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen (s. 2.5.4.2) gereinigt.

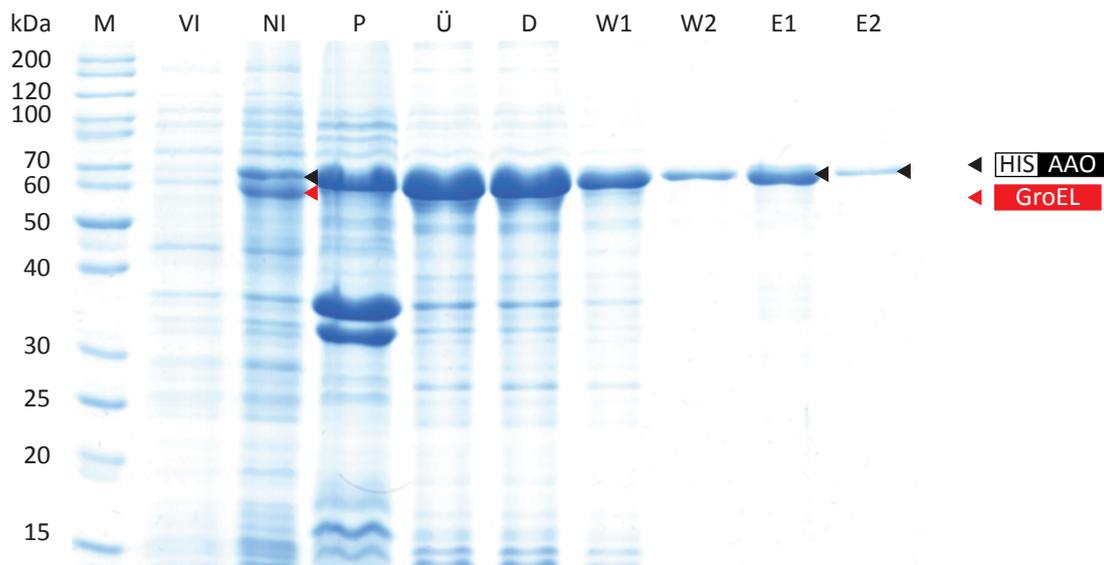


Abbildung 3.22: Reinigung der His-AAO unter denaturierenden Bedingungen  
Colloidal Coomassie gefärbte SDS-PAGE; **M** – Proteinstandard, **VI** - vor Induktion, **NI** – nach Induktion, **P** – Pellet, **Ü** – lösliche Fraktion, **D** – Durchbruch **W1**, **W2** - Waschschrte 1 und 2, **E1**, **E2** – Eluate 1 und 2

Abbildung 3.22 zeigt den Verlauf der denaturierenden Reinigung. Zusätzlich wurden Proben vor und nach der Induktion (VI, NI) aufgetragen. Durch die Inkubation im LEW-Puffer über Nacht wurde ein großer Teil der Arylalkoholoxidase in Lösung gebracht (Ü). Im Pellet (P) wurde noch unlösliche Arylalkoholoxidase nachgewiesen. Mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie ist es gelungen, Fremdproteine abzutrennen und die Arylalkoholoxidase zu reinigen. Das Eluat wurde für die Rückfaltung eingesetzt. Für die gereinigte Arylalkoholoxidase wurde ein apparentes Molekulargewicht von 62,5 kDa ermittelt.

### 3.3.7 Rückfaltung

Bei der Rückfaltung wurde das chaotrope Agens durch blitzartige Verdünnung (*flash dilution*) in einen Renaturierungspuffer entfernt (s. 2.5.9).

Die Lagerung der Arylalkoholoxidase im Elutionspuffer führte zu einer starken Verminderung der Enzymaktivität nach Rückfaltung, daher wurde das Eluat stets direkt und vollständig in Rückfaltungspuffer verdünnt. Für die Rückfaltung der His<sub>6</sub>-AAO wurden verschiedene Verdünnungen getestet. Dabei zeigte sich, dass höhere Verdünnungen zu einer höheren Enzymaktivität führten.

Für die Rückfaltung der His<sub>6</sub>-AAO wurde das Enzym 1:50 (final 4,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in Rückfaltungspuffer verdünnt und für 96 h bei 16 °C gelagert. Zu definierten Zeiten wurde die Aktivität des rückgefalteten Enzyms überprüft. Anschließend wurde das Enzym mittels Pall-Zentrifugenröhrchen um den Faktor 3 konzentriert und im Rückfaltungspuffer bei 4 °C gelagert. Die Aktivität der

Arylalkoholoxidase ohne Signalsequenz stieg über einen Zeitraum von 10 Tagen deutlich weiter an. Für die rückgefaltete AAO\* wurde nach 10 Tagen eine Aktivität von  $188 \text{ U L}^{-1}$  bestimmt. Bei der Rückfaltung der Arylalkoholoxidase ohne Signalsequenz wurde eine höhere AAO-Aktivität ermittelt als für die Arylalkoholoxidase mit Signalsequenz ( $6 \text{ U L}^{-1}$ ). Die so gewonnene aktive AAO\* ohne Signalsequenz wurde für die nachfolgende Charakterisierung verwendet.

Nach der Rückfaltung wurde die *Pleurotus sapidus*-Arylalkoholoxidase mittels Antikörper nach nativer und denaturierender PAGE nachgewiesen. Die gereinigte AAO\* wurde im Western-Blot nach SDS-PAGE (Abb. 3.23) selektiv mit einem Molekulargewicht von ca. 63 kDa nachgewiesen.

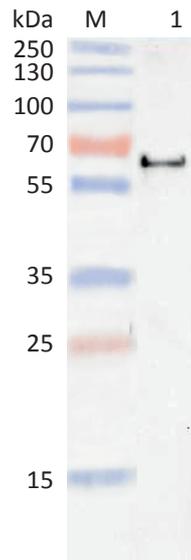


Abbildung 3.23: Nachweis der rückgefalteten Arylalkoholoxidase mit spezifischen Antikörper nach denaturierender SDS-PAGE und Western-Blot.

**M** – Marker, **1** – rückgefaltete Arylalkoholoxidase

### 3.3.7.1 Bestimmung der Rückfaltungseffizienz

Für die Bestimmung der Rückfaltungseffizienz wurde die rückgefaltete Arylalkoholoxidase (AAO\*) in Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 6,0) umgepuffert (s. 2.5.9.1) und ein Spektrum von 300 bis 600 nm aufgenommen. Die rückgefaltete Arylalkoholoxidase (AAO\*) zeigt das typische Absorptionsspektrum FAD-enthaltender Enzyme.

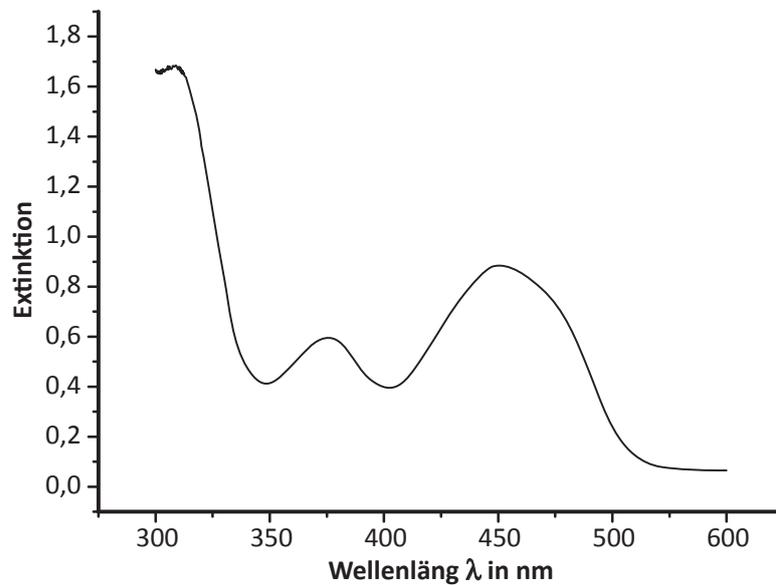


Abbildung 3.24: UV-VIS Spektrum der gereinigten und rückgefalteten Arylalkoholoxidase aus *E. coli*

Für die Bestimmung der Rückfaltungseffizienz wurde die Proteinkonzentration bei 280 nm und die Konzentration des freien FAD bei 450 nm vor und nach Denaturierung bestimmt. Nach der Denaturierung wurden zusätzlich  $1,15 \pm 0,02 \mu\text{M}$  freies FAD nachgewiesen. Auf den Gesamtproteingehalt bezogen bedeutet dies, dass  $54 \pm 2\%$  des FAD gebunden war, was den Anteil korrekt gefalteter Arylalkoholoxidase widerspiegelte.

### 3.3.8 Biochemische Charakterisierung

#### 3.3.8.1 Bestimmung des pH-Optimums

Das pH-Optimum für die AAO\* wurde mit Veratrylalkohol als Substrat und verschiedenen Puffern bestimmt:

- McIlvaine-Puffer (Tab. 2.28)
- Natriumacetat-Puffer (50 mM)
- Natriumphosphat-Puffer (100 mM)

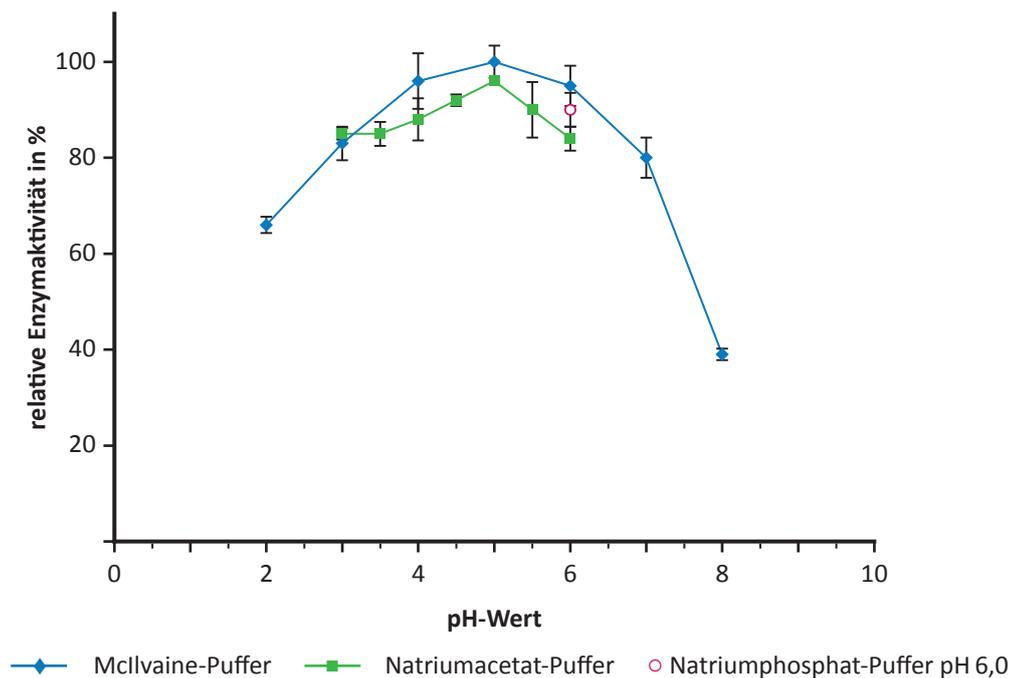


Abbildung 3.25: Relative Aktivität der AAO\* in Abhängigkeit von pH-Wert und Puffer

Die AAO\* zeigte ein breites pH-Optimum mit einer Aktivität von mehr als 80% der maximalen Aktivität im Bereich von pH 3-7 und eine signifikante Abnahme der Aktivität bei pH 8 (Abb. 3.25). Die höchste AAO-Aktivität wurde in beiden Puffern bei pH 5 bestimmt. Die Aktivität der rekombinanten AAO\* in Natriumphosphat-Puffer pH 6,0 betrug 90%.

### 3.3.8.2 Bestimmung des Temperaturoptimums

Mit Hilfe des AAO-Assays (s. 2.6.2) wurde die Abhängigkeit der AAO<sup>\*</sup>-Aktivität von der Temperatur untersucht. Der Assay wurde in einem Temperaturbereich von 20 bis 80 °C in 10 °C-Schritten durchgeführt.

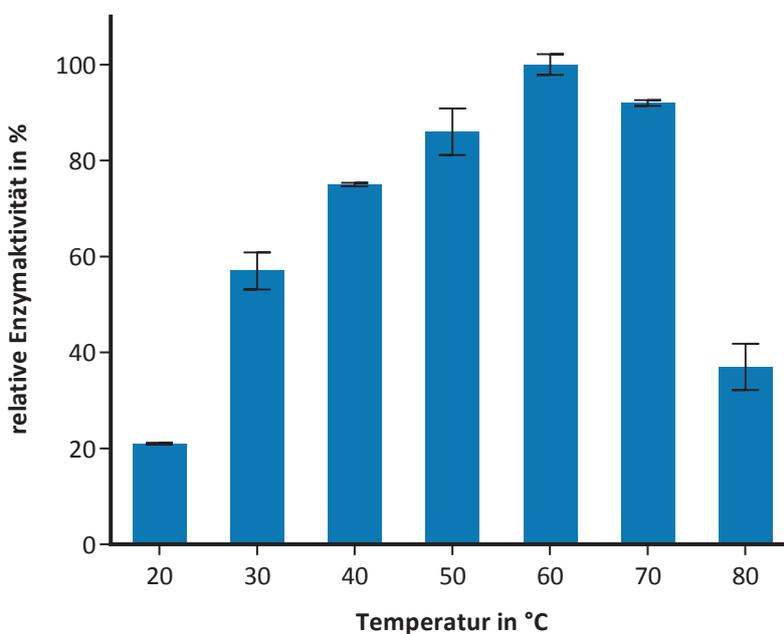


Abbildung 3.26: Relative AAO<sup>\*</sup>-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur

Für die rückgefaltete Arylalkoholoxidase wurde ein Temperaturoptimum von 60 °C ermittelt (Abb. 3.26).

### 3.3.8.3 Bestimmung der kinetischen Parameter $K_m$ und $k_{cat}$

Die kinetischen Parameter – Michelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und katalytische Konstante ( $k_{cat}$ ) – der rückgefalteten Arylalkoholoxidase wurden mit dem optimierten AAO-Assay (s. 2.6.2.1) für verschiedene Substrate bestimmt. Als Substrate wurden die primären, aromatischen Alkohole Benzylalkohol, *p*-Anisalkohol, Veratrylalkohol und Zimtalkohol verwendet.

Dafür wurde zunächst – wie unter 2.6 beschrieben – für jedes Substrat die optimale Enzymkonzentration bestimmt. Anschließend wurde die Reaktionsgeschwindigkeit unter Michelis-Menten-Bedingungen bei konstanter Enzymkonzentration und steigender Substratkonzentration bestimmt. Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten ( $v$ ) wurden direkt linear gegen die Substratkonzentration aufgetragen und mit Hilfe der Software OriginPro 8.6 eine Sättigungshyperbel an die Messdaten angepasst (Abb. 3.27). Die enzymkinetischen Parameter ( $K_m$  und  $v_{max}$ ) ließen sich direkt aus der Hyperbel ablesen und sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

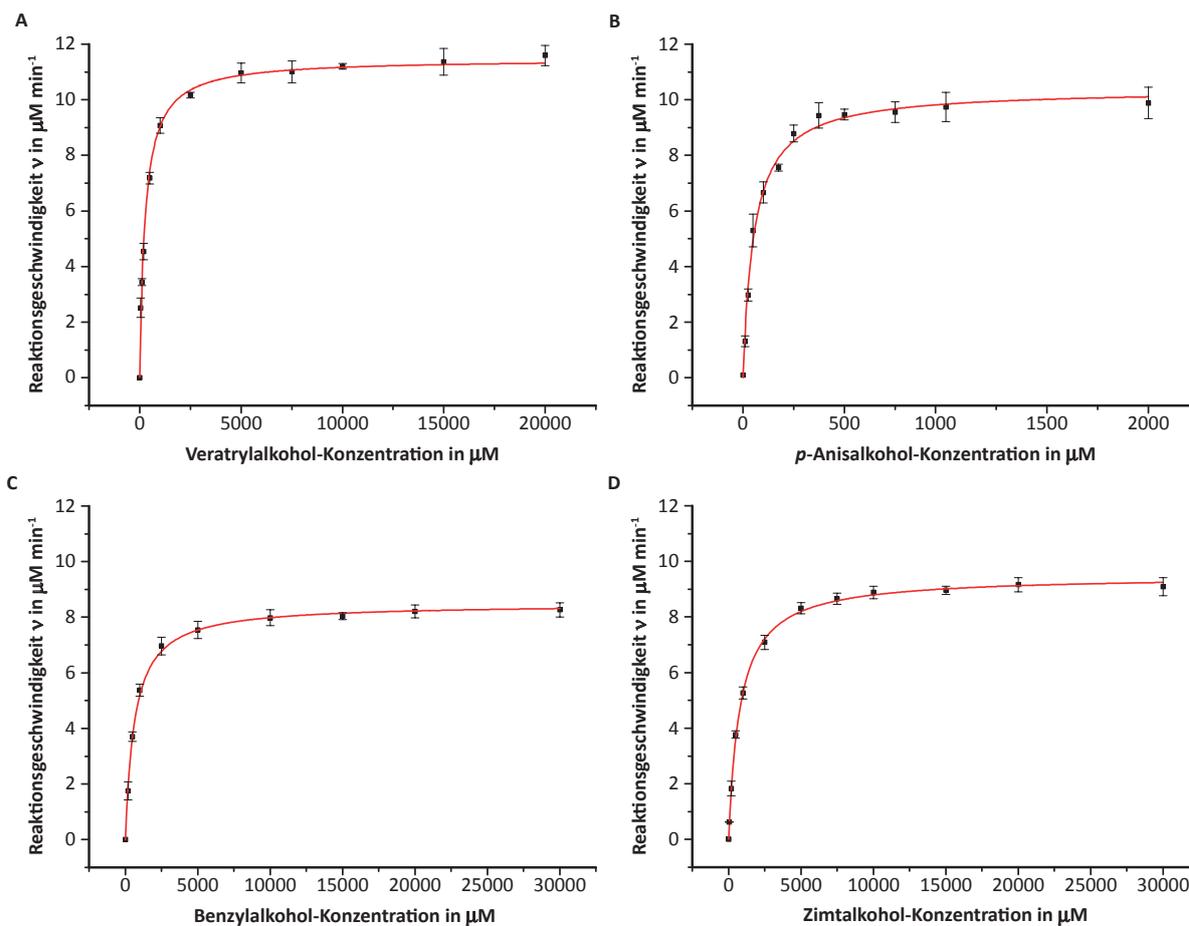


Abbildung 3.27: Cornish Bowden Diagramme zur Herleitung der enzymkinetischen Parameter der AAO\*.

**A** – Veratrylalkohol, **B** – *p*-Anisalkohol, **C** – Benzylalkohol, **D** – Zimtalkohol. Aufgetragen ist die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Die Diagramme wurden mit OriginPro 8.6 erstellt und die Sättigungshyperbel (—) mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung  $v = (\nu_{\max} \times S) / (K_m + S)$  an die Messdaten (■) angepasst

Tabelle 3.4: Kinetische Parameter für die rekombinante (*E. coli*) rückgefaltete Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus* gegenüber verschiedenen Substraten

Substrate	$K_m$ in $\mu\text{M}$	$k_{\text{cat}}$ in $\text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ in $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$	$\nu_{\max}$ in $\mu\text{M s}^{-1}$
Benzylalkohol	629	34	$5,5 \cdot 10^4$	0,14
Veratrylalkohol	270	98	$3,6 \cdot 10^5$	0,16
<i>p</i> -Anisalkohol	55	154	$2,8 \cdot 10^6$	0,17
Zimtalkohol	789	67	$8,5 \cdot 10^4$	0,19

Weiterhin wurde Coniferylalkohol als Substrat verwendet. Coniferylalkohol wird durch die AAO\* umgesetzt. Die AAO\* wies gegenüber Coniferylalkohol eine Aktivität von  $13,0 \pm 0,9 \text{ UL}^{-1}$  bzw. eine spezifische Aktivität von  $2,4 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$  auf.

### 3.4 DyP-Typ Peroxidase

#### 3.4.1 Isolierung und Klonierung der codierenden Sequenz der DyP-Typ Peroxidase

Für die Isolierung der codierenden Sequenz einer DyP-Typ Peroxidase von *Pleurotus sapidus* wurde die RNA aus dem Myzel des 5. Kulturtages einer Submerskultur verwendet. Die Amplifizierung der Sequenz erfolgte mittels PCR, wobei Primer von einer homologen DyP-Typ Peroxidase-Sequenz aus dem Genom (DOE-JGI) von *Pleurotus ostreatus* abgeleitet wurden.

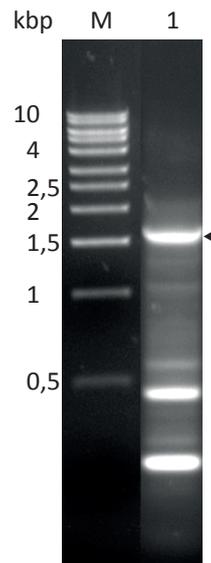


Abbildung 3.28: Analyse der PCR-Produkte für die Klonierung der DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*; 1,2%iges, ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel. Die mit der Pfeilspitze markierte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert  
**M** – DNA-Leiter (1 kbp DNA-Leiter), **1** – PCR-Produkte, erwartete Fragmentgröße für das DyP-Typ Peroxidase-cDNA: 1600 bp

PCR-Produkte mit der erwarteten Fragmentgröße von ~1600 bp wurden aus dem Agarosegel isoliert (Abb. 3.28) und in den Vektor pCR2.1-TOPO<sup>®</sup> zwischenkloniert. Anschließend wurden *E. coli* TOP 10-Zellen mit diesem Vektor transformiert, um ihn zu vervielfältigen (s. 2.2.4.1, 2.3.7). Danach wurden die Plasmide aus den Zellen isoliert und gereinigt. Für die Kontrolle der klonierten cDNA wurden die Plasmide zur Sequenzierung an die Firma MWG Eurofins gesandt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit ChromasPro<sup>®</sup> analysiert. Die klonierte cDNA-Sequenz umfasst 1551 Basenpaare und wurde bei EBI-EMBL unter der Zugriffsnummer LN830264 veröffentlicht. Sie codiert ein Protein mit einer Größe von 516 Aminosäuren (Abb. 3.29).

ATGCGCTGGT	GGA	TACCTG	CGT	CGCTCTC	ACTTCGTTAA	TACCTTACGC	CCTCTTGCCC	60
M R W W	T T C	V A L	T S L I	P Y A	L L P			
AGTTATGGGT	TCAATCTGCC	TCAGCAACTC	GAGGCGAGGC	AGAACGACTA	TCCGAGTGGA		120	
S Y G F	N L P	Q Q L	E A R Q	N D Y	P S G			
TCCCTACTAC	ACGACTATCC	TGGG	CAGCAT	ACATTGCCAA	CGCTTGAGTT	GATCCAGAAG	180	
S L L H	D Y P	G Q H	T L P T	L E L	I Q K			
TTGAATGCCA	CTAATGGCAC	ATTCTG	CCG	CTGGAAGAGA	TTCAAGGAGA	TATTATGATT	240	
L N A T	N G T	F L P	L E E I	Q G D	I M I			
GGCATGAGGA	AGCCCAAAGA	AATCTTCTTT	TTCTACTCGC	TTCAGAATCC	AAGGAAGTTC		300	
G M R K	P K E	I F F	F Y S L	Q N P	R K F			
AAGAGTGTC	TCGCGAAATT	GATATACCCT	CACATAACTA	CGACTGCTCA	AATGGTCTGC		360	
K S V L	A K L	I Y P	H I T T	T A Q	M V C			
ACCACCTGCG	CGCAACCCTC	AGCTATGCTG	AACGTCGCTT	GGACTTCCCA	AGGGTTGCGT		420	
T T C A	Q P S	A M L	N V A W	T S Q	G L R			
AAGCTCGGCG	TCTTAGATAA	CCTCGGTGAT	CCCTACTTCG	CTATGGGGCA	ATTAAGCGAC		480	
K L G V	L D N	L G D	P Y F A	M G Q	L S D			
GCTGCCGCGC	TTGGTGATAC	CGACCCAAGC	ACA	ACTGGG	CCCCAGGTCT	CTACGCCAAC	540	
A A A L	G D T	D P S	T T W A	P G L	Y A N			
AAGACGGACG	GCGCATTCTT	CATCGCGGCT	AAAGACTGGG	AACCCATCGA	CACCTTACTT		600	
K T D G	A F L	I A A	K D W E	P I D	T L L			
AATCAAATGA	AGGCCTGGTT	GGGTGATGCG	ATCGTAGAGA	CACACAGCAA	CAGGGGCGCA		660	
N Q M K	A W L	G D A	I V E T	H S N	R G A			
GTACGACCTG	GCGATGCAGC	TGGTAAAGAG	CACTTTGGCT	GGCTTGATGG	CTTTATTCAA		720	
V R P G	D A A	G K E	H F G W	L D G	F I Q			
CCTGCTGTAG	CTGGCTTTGC	TACAAGCACA	TATCCCGGAC	AGCAGTCCT	CCTACCCGGT		780	
P A V A	G F A	T S T	Y P G Q	Q L L	L P G			
ACGCTTTTGA	CGAAGGAAAT	CGGCGACCTT	CGCAGAGCTG	CCCGACCAGC	ATGGACGAAA		840	
T L L T	K E I	G D P	R R A A	R P A	W T K			
TGGGGTTCTT	TCATGGCTTA	CCGACA	ACTT	CAGGAGCTCG	TTCCCGAGTT	TGATGACTAT	900	
W G S F	M A Y	R Q L	Q E L V	P E F	D D Y			
CTTATGCAAG	AAGCGGCCCT	CATT	CAGGAC	TCGTCAAGGA	GCGTCCGCGA	GCGCGCCGAC	960	
L M Q E	A A L	I Q D	S S R S	V R E	R A D			
CTTCTTGAG	CCCGTATGTT	CGGTCGCTGG	AAGAGCGGTA	CTCCTCTTGA	CCTTGCTCCA		1020	
L L G A	R M F	G R W	K S G T	P L D	L A P			
GAGAAAGACG	ACCCATCCAT	CGGCCCAAAT	CTTATGTTGA	ACAATAACTT	CGACTTCAAC		1080	
E K D D	P S I	G P N	L M L N	N N F	D F N			
CACCCAGCGC	CATTCAACAT	CAATACCAAC	CAATCCTACT	GTCCATTCTC	GGCCACATC		1140	
H P A P	F N I	N T N	Q S Y C	P F S	A H I			
CGCAAGATTC	GCCCTCGTGC	TGATCAAGGA	AATCAGAATC	TCAAGAACCA	AATGATCAGG		1200	
R K I R	P R A	D Q G	N Q N L	K N Q	M I R			
GCCAGTATAC	CTTATGGCGA	AGAACTCAGC	GACGACGAGA	TAAACAACAA	GAAGACAGGG		1260	
A S I P	Y G E	E L S	D D E I	N N K	K T G			
ACTGAACGTG	GTGTCGCATT	TGTGACCTAT	CAAAGTGATC	TCGGTTCAGG	ATTTCACTTC		1320	
T E R G	V A F	V T Y	Q S D L	G S G	F H F			
CAGCAGGCTG	AATGGGCCAA	CAACGTCAAC	ATCCCCACTG	GAAAAAGCGA	TCCAACACCT		1380	
Q Q A E	W A N	N V N	I P T G	K S D	P T P			
GGATTTGACC	CGATTGTCGG	CCAGAACAGC	GGTAAACCGC	TTGTTGTCTC	TGGGATTGAT		1440	
G F D P	I V G	Q N S	G K P L	V V S	G I D			
TACACAGATC	TTAACACAG	CTTGACCTTC	ATGAGTTTCG	TTGTTTCAAA	GGGAGGGGAC		1500	
Y T D L	N H D	L T F	M S F V	V S K	G G D			
TACTTCTTCA	GCCCCCTCCAT	GTCCGCCATC	TTGCACAAAA	TCGCTGCTTA	A		1551	
Y F F S	P S M	S A I	L H K I	A A *				

Abbildung 3.29: Nukleotid- und übersetzte Aminosäuresequenz der DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*

### 3.4.2 Bioinformatische Analyse der cDNA-Sequenz

Ein Vergleich mit der Datenbank NCBI (blastn) ergab, dass die Sequenz eine große Ähnlichkeit zu dem Gen einer potentiellen DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus* (GenBank: AM283034.1; Identität: 91%) zeigt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz hat ein theoretisches Molekulargewicht von 57,1 kDa und einen berechneten pI zu 5,73 (ExpASy ProtParam, Tab. 2.12). Durch bioinformatische Untersuchungen (Prosite, Pfam und InterProScan 4) wurde das Enzym eindeutig als Mitglied der DyP-Typ Peroxidase-Familie identifiziert (Abb. 3.30).

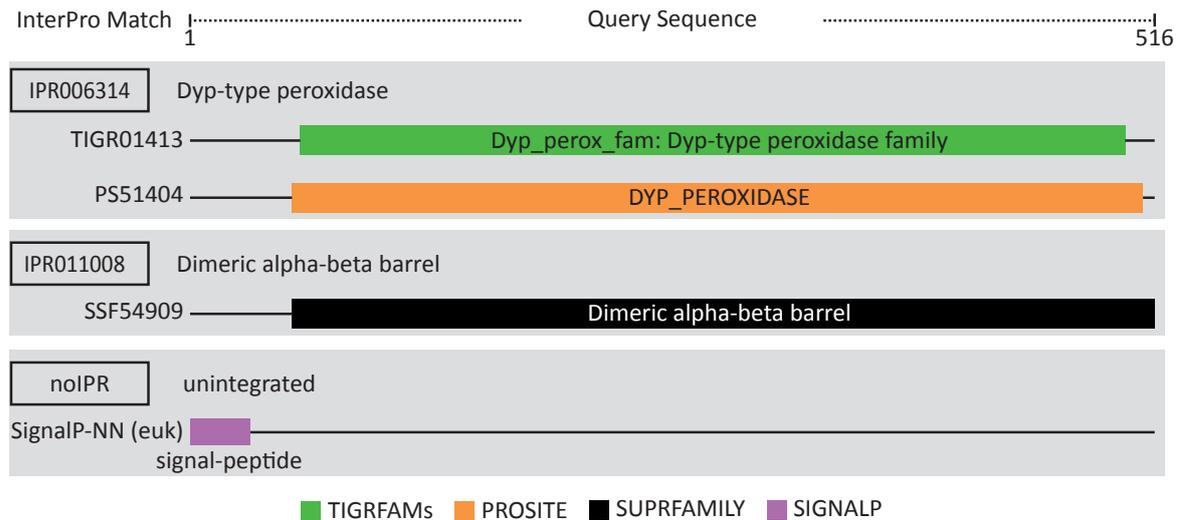


Abbildung 3.30: Funktionelle Analyse der übersetzten Aminosäuresequenz mittels InterProScan

Datenbankrecherchen (NCBI - blastp) ergaben, dass die Aminosäuresequenzen aus *Pleurotus sapidus* und *Pleurotus ostreatus* (ID EMBL CAK55151.1) eine Übereinstimmung von 95% aufweisen. Weiterhin weist die Aminosäuresequenz aus *Pleurotus sapidus* eine Identität von 43% zu der Sequenz einer DyP-Typ Peroxidase von *Bjerkandera adusta* (der Stamm wurde in der Vergangenheit fälschlicherweise als *Thanatephorus cucumeris* identifiziert; NCBI Zugriffsnummer: BAA77283.1) sowie 42% zu den Sequenzen von DyP-Typ Peroxidasen aus *Mycetinis scorodoni* (bislang als *Marasmius scorodoni* bezeichnet; NCBI Zugriffsnummer B0BK71.1) und *Auricularia auricula-judae* (NCBI Zugriffsnummer: AFJ79723) auf.

In der Sequenz wurde das unter allen Mitgliedern der DyP-Typ Peroxidase-Familie konservierte Strukturmotiv GxxDG identifiziert (Sugano 2009). Konservierte Reste, die an der Katalyse beteiligt sind, wurden ebenfalls in der Sequenz identifiziert. Außerdem wurden mit Hilfe der Programme NetNGly1.0 (Gupta *et al.* 2004) und NetOGly 3.1 (Julenius *et al.* 2005) potentielle Glykosylierungsstellen identifiziert. Die DyP-Typ Peroxidase weist vier potentielle N-Glykosylierungsstellen und eine potentielle O-Glykosylierungsstelle auf.

### 3.4.2.1 Berechnung eines Strukturmodells für die DyP-Typ Peroxidase

Über den Onlineservice von SWISS-MODEL wurde die hypothetische Tertiärstruktur der DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* in Homologie zur Röntgenkristallstruktur der DyP-Typ Peroxidase aus *Auricularia auricula-judae* (PDB-ID 4AU9B) berechnet (Abb. 3.31). Die Strukturen wiesen eine Homologie von 44% auf.

rPsaDyP	MRWWTTCVAL	TSLIPYALLP	SYGFNLPQQL	EARQNDYPSG	SLLDHYPGQH	TLPTLELIQK	60
AauDyP	-----ATSLN	TDDIQGDILV	GMHKKQLFY	FFAINDPATF	KTFFLASDIAP	VVASVTQLSN	55
	* *	*****	** * * *	* * * *	* * * *	* *	
rPsaDyP	TTCAQPSAML	NVAWTSQGLR	KLGVLDNLGD	PYFAMGQLSD	AAALGDTDPS	TTWAPGLYAN	180
AauDyP	-VATQPLVAL	NIAFSNTGLL	ALGVTDNLGD	SLFANGQAKD	ATSFKES--T	SSWVPQFAGT	112
	** * *	* * *	*****	** * *	* *	* *	
rPsaDyP	KTDGAFLIAA	KDWEPIDTLL	NQMKAWLGDA	IVETHSNRGA	VRPGDAAGKE	HFGWLDGFIQ	240
AauDyP	GIHGVIIILAS	DTTDLIDQVQ	ASIESTFGSS	ISKLYLSLAS	IRPGNEAGHE	MFGFLDGLIAQ	172
	* *	**	*	* *	*** ** *	** *** *	
rPsaDyP	PAVAGFATST	YPGQQLLLPG	TLLTKEIGDP	RRAARPAWTK	WGSFMAYRQL	QELVPEFDDY	300
AauDyP	PAINGFNTP-	LPGQNIVDAG	VIITGATNDP	--ITRPSWAV	GGSFALFRQL	EQLVPEFNKY	229
	** * *	*** *	* **	** *	*** * ***	***** *	
rPsaDyP	LMQEAAAIQD	SSRSVRERAD	LLGARMFGRW	KSGTPLDLAP	EKDDPSIGPN	LMLNNNFDFN	360
AauDyP	LLDNAP---A	GSGSLQARAD	LLGARMVGRW	KSGAPIDLTP	TADDPALGAD	AQRNNNFYTS	286
	* *	* * **	***** **	*** * ** *	*** *	****	
rPsaDyP	HPAPFNINTN	QSYCPFSAHI	RKIRPRADQG	N---QNLKN	---QMIRASI	PYGEELSDDE	413
AauDyP	HAG-FDLGSD	QSHCPFSAHI	RKTRPRADLG	GSLTPPNLSA	GANSIMRSGI	PYGPEVTSAE	345
	* *	** *****	** ***** *	**	* *	*** * *	
rPsaDyP	INNKKTGTER	GVAFVTYQSD	LGSGFHFQQA	EWANNVNIPT	GKSDPTPGFD	PIVGQNSGKP	473
AauDyP	SASNTTQER	GLAFVAYQAQ	LSQGFHFLQQ	TWADNANFPP	GKTPATVGLD	PIIQNNGQP	405
	* **	* *** **	* **** *	** * * *	** * * *	** *** * *	
rPsaDyP	LVVSGIDYTD	LNHDLTFMSF	VVSKGGDYFF	SPSMSAILHK	IAA		516
AauDyP	RVVNGLLPSN	SSASLSIPQF	VVSHGGEYFF	SPPISAIGGR	LSA		448
	** *	* *	*** ** **	** ***	*		

Abbildung 3.31: Vergleich der Aminosäuresequenzen der rPsaDyP und einer DyP-Typ Peroxidase aus *Auricularia auricula-judae* (PDB-ID 4AU9B). Hervorgehoben sind Reste mit bekannten Funktionen nach Strittmatter *et al.* (2013a) sowie potentielle Glykosylierungsstellen. Konservierte Aminosäuren (\*)

- blau:** konserviertes GxxDG-Motiv,
- rot:** potentiell an der Katalyse beteiligte Aminosäuren,
- hellgrün:** potentielle N-Glykosylierungsstellen,
- lila:** potentielle O-Glykosylierungsstelle,
- gelb:** an der Häm-Bindung beteiligt,
- grün:** potentielle Substrat-Oxidationsstellen
- pink:** Reste der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bindetasche

Aufgrund der Homologie kann von einer ähnlichen Faltung der beiden Proteine ausgegangen werden, da funktions- und strukturbestimmende Sequenz- und damit auch Strukturbereiche konserviert sind. Anschließend wurde über den Onlineservice von NCBI mit der erstellten PDB-Datei ein VAST-Search durchgeführt. Die 3D-Struktur wurde mit Chimera analysiert (Abb. 3.32).

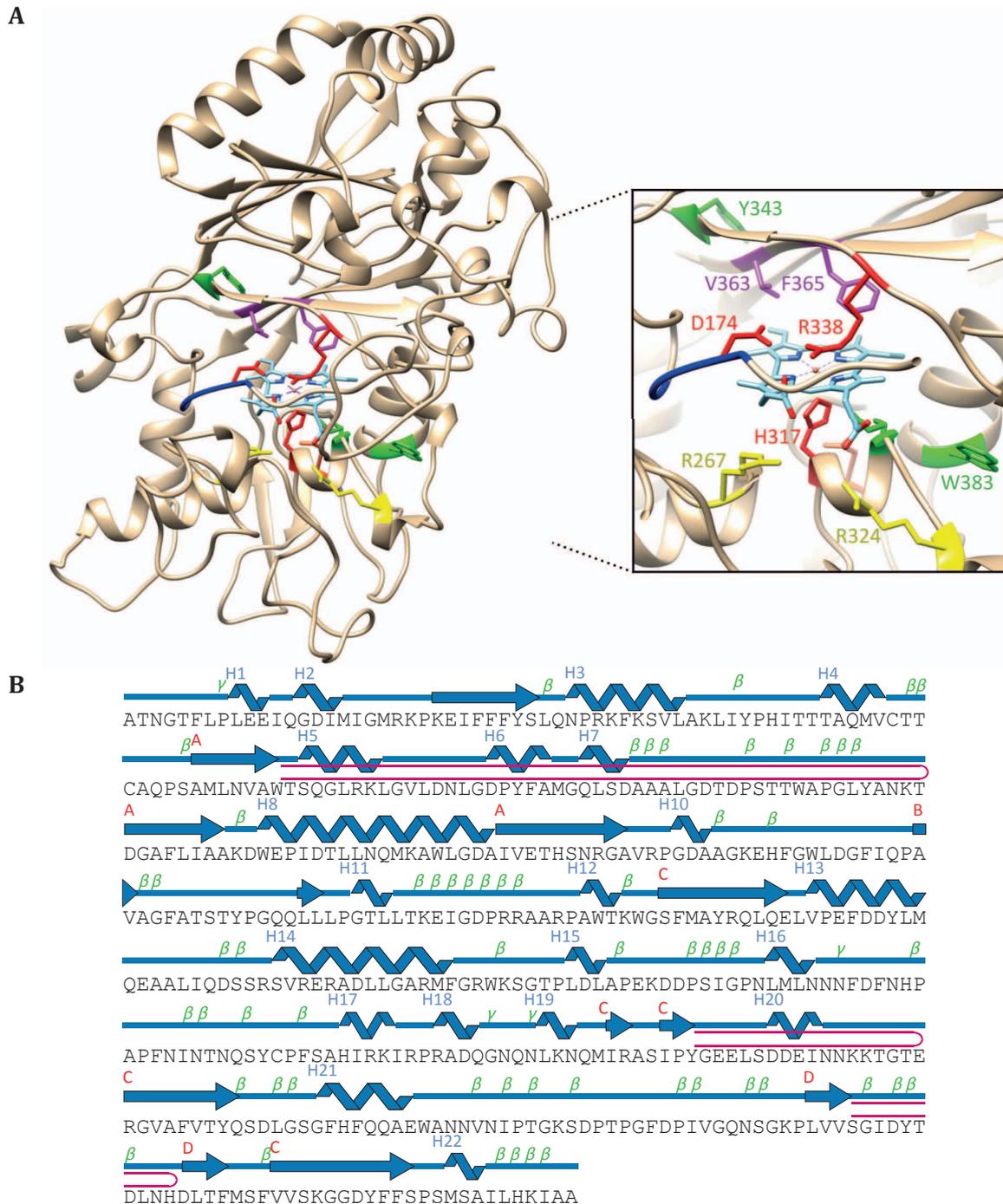


Abbildung 3.32: **A** – 3D-Proteinstrukturmodell der DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* - basierend auf der Struktur der DyP-Typ Peroxidase (AauDyP; *A. auricula-judae*; PDB-file: 4AU9B), modelliert mit SWISS-MODEL. Die Position der hervorgehobenen Reste bezieht sich auf das reife Protein (s. 3.4.7.4)

rot: potentiell an der Katalyse beteiligte Aminosäuren    hellblau: Häm

blau: GxxDG-Motiv

gelb: an der Häm-Bindung beteiligt

grün: Aminosäuren des potentiellen LRET

pink: Reste der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bindetasche

**B** – Primärsequenz mit korrespondierenden Sekundärstrukturelementen (PDBsum)

gezeigt sind die  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Stränge,  $\beta$ -turns und  $\gamma$ -turns.  $\beta$ -Haarnadelschleifen sind als Schleifen dargestellt

Das berechnete Strukturmodell besitzt eine helikale Grundstruktur mit zwei Domänen (proximal N-terminale, distal C-terminale Domäne), die den zentralen Cofaktor Häm einschließen. Auf der distalen Seite des Häms ist ein prominentes Motiv aus anti-parallelen  $\beta$ -Faltblättern, das zusammen mit den  $\alpha$ -Helices eine Ferredoxin-ähnliche Faltung zeigt. Den Zugangskanal zum Häm des katalytischen Zentrums bildet ein überwiegend hydrophober Kanal, durch den das Cosubstrat in die  $H_2O_2$ -Bindetasche (D174, R338, V363 und F365) gelangt. An der Katalyse sind die Aminosäuren D174 und R338 auf der distalen Seite des Häms sowie das proximale Histidin (H317) als fünfter Ligand des Häms beteiligt. Als weitere Liganden des Häms bilden die Arginine 267 und 324 Wasserstoffbrückenbindungen mit den Propionatresten des Häms aus. Auf der Oberfläche liegen exponiert die Aminosäurereste Y343 und W383 vor, die als Oxidationsstellen für große Substrate dienen und Bestandteil eines LRET (*long range electron transfer*) sein können (Liers *et al.* 2013a, Strittmatter *et al.* 2013a).

### 3.4.2.2 Phylogenetische Einordnung

Die Aminosäuresequenz der rPsaDyP wurde mit Hilfe der Software MEGA mit dem *maximum likelihood* Algorithmus (Tamura *et al.* 2013) unter verschiedenen DyP-Typ Peroxidasen aus Pilzen phylogenetisch eingeordnet (Abb. 3.33).

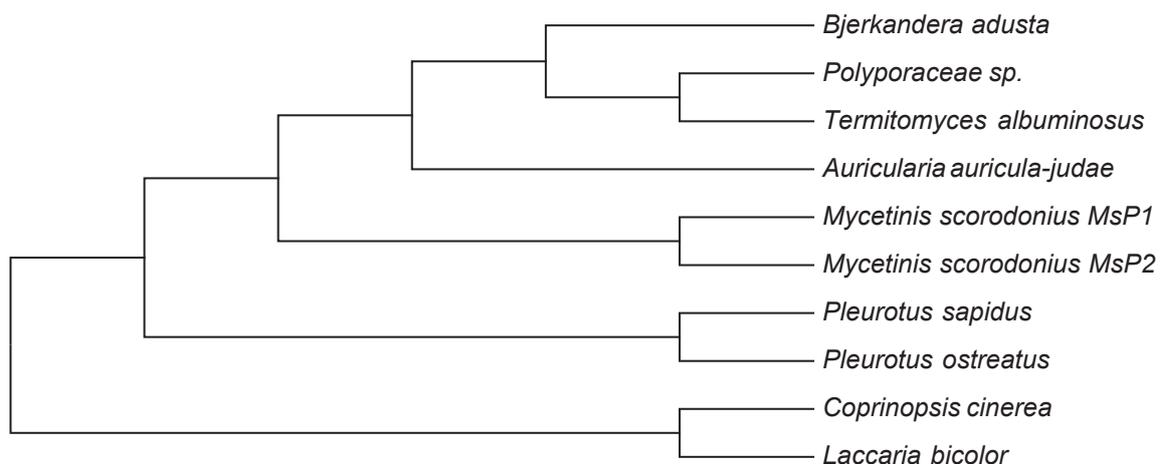


Abbildung 3.33: Phylogramm von Vertretern verschiedener DyP-Typ Peroxidasen aus Basidiomyceten

Die verwandtschaftliche Beziehung auf Basis der Aminosäuresequenz wurde durch das Phylogramm verdeutlicht.

### 3.4.3 Heterologe Expression

Die Versuche zur heterologen Expression der DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* in *Trichoderma reesei* RF6651 wurden von der Firma AB Enzymes (Darmstadt) durchgeführt. Dafür wurde der Firma die cDNA-Sequenz der Peroxidase zur Verfügung gestellt. Die *codon usage* wurde an den Wirtsorganismus angepasst und die adaptierte Sequenz in die Plasmide pAB510 bzw. pAB600 kloniert (Abb. 7.5). Die Expression der Peroxidase erfolgte bei beiden Konstrukten unter der Kontrolle des *cbhI*-Promotors und -Terminators. Im Plasmid pAB600 wurde das Gen mit dem *cbhII*-Carrier fusioniert. Als Selektionsmarker diente das Gen *amdS*. Insgesamt vier Peroxidase-positive Transformanten, zwei von jedem Konstrukt (pAB510: RH32908, RH32911 und pAB600: RH32902, RH32903), wurden im 0,5 L-Fermentern im *feed-batch*- bzw. *batch*-Verfahren kultiviert. Die Enzymaktivität wurde nach 91 h, 112 h, 136 h und 160 h mittels ABTS-Assay untersucht (Abb. 3.34). Die höchste Peroxidase-Produktion erfolgte bei der *fed-batch* Fermentation des Stammes RH32908 nach 160 h mit einer Aktivität von 21 000 U L<sup>-1</sup>. Der zweite Stamm (RH32911) erreichte eine Aktivität von 18 000 U L<sup>-1</sup> nach 136 h. Die Transformanten mit dem zweiten Konstrukt (pAB600) produzierten insgesamt weniger Peroxidase. Dabei wurden bei der *batch*-Fermentation höhere Aktivitäten gemessen als bei der *fed-batch*-Kultivierung. Die höchsten Peroxidaseaktivitäten wurden für beide Stämme nach 91 h ermittelt (6 500 U L<sup>-1</sup> RH32902 bzw. 5 000 U L<sup>-1</sup> RH32903).

Der Stamm RH32908 mit der höchsten Peroxidaseaktivität wurde von der Firma AB Enzymes in einem größeren Maßstab kultiviert und der Kulturüberstand für die Charakterisierung der Peroxidase zur Verfügung gestellt. Für diesen Kulturüberstand wurde eine Peroxidaseaktivität von 55 000 U L<sup>-1</sup> nachgewiesen.

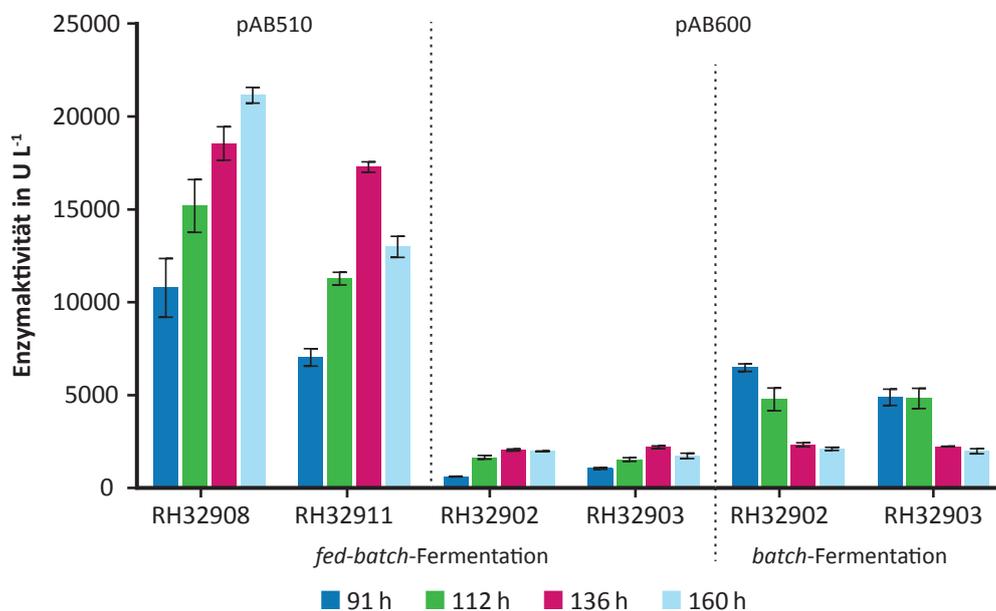


Abbildung 3.34: Aktivität der rekombinant produzierten DyP-Typ Peroxidase

### 3.4.4 Reinigung

Zur Bestimmung der Charakteristika der Peroxidase wurde diese zunächst gereinigt, um andere Bestandteile des Kulturüberstandes wie weitere sekretierte Proteine, Medienkomponenten und Glycerol<sup>1</sup> abzutrennen.

#### 3.4.4.1 Vorversuche

Der Kulturüberstand wurde für die Reinigung um den Faktor 5 konzentriert (s. 2.5.3). Dies führte zu keinem Aktivitätsverlust. Für die Etablierung einer geeigneten Reinigungsmethode wurden als Reinigungsprinzipien die Gelfiltrations- (GFC), die Ionenaustausch- (IEX) und die hydrophobe Interaktionchromatographie (HIC) getestet. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels ABTS-Assay (s. 2.6.3.2) auf DyP-Aktivität untersucht und der Proteingehalt mittels Bradford-Assay (s. 2.5.6) bestimmt.

Die Gelfiltrationschromatographie erwies sich für die Reinigung großer Enzymmengen als ungeeignet. Daher wurden für die Reinigung die HIC und die IEX ausgewählt. Die Auswahl geeigneter Säulen erfolgte für die IEX und HIC zunächst im kleinen Maßstab mit 1 mL-Säulen aus dem HiTrap IEX selection kit und dem HiTrap HIC selection kit (Tab. 2.20).

Bei der HIC (s. 2.5.4.5) wurde mit allen getesteten Säulen eine erste Abtrennung von Fremdproteinen erreicht, wobei die beste Reinigungsleistung bei der Verwendung der HiTrap Phenyl FF Säule erzielt wurde. Dabei wurde eine beinahe vollständige Abtrennung eines Proteins mit ähnlicher Größe erreicht, allerdings war die Reinheit der Peroxidase für eine Charakterisierung zu gering. Eine Änderung der Pufferkonzentrationen bzw. des pH-Wertes verbesserte die Reinigungsleistung nicht.

Daher wurde untersucht, ob mit Hilfe der IEX eine bessere Reinigung der Peroxidase aus dem Kulturüberstand erreicht wird. Im Vorfeld wurde dafür eine IEF mit dem Kulturüberstand durchgeführt und gezeigt, dass der pI der Peroxidase im neutralen Bereich liegt. Deshalb wurde die Reinigung mittels Kationentauscher untersucht (s. 2.5.4.6). Die Proteinlösung wurde mit einem 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 auf die Säule aufgetragen, sodass das Enzym positiv geladen war und mit dem Säulenmaterial interagieren konnte. Mit den verwendeten Kationenaustauschsäulen wurde eine gute Reinigung des Zielproteins erreicht, wobei der starke Kationentauscher (HiTrap SP FF) eine deutlich bessere Trennleistung zeigte als ein schwacher Kationentauscher (HiTrap CM FF). Zur Verbesserung der Proteinreinigung wurde der lineare Gradient durch einen optimierten Stufengradienten ersetzt, sodass der Peak mit dem Zielprotein deutlich von anderen Proteinpeaks getrennt wurde und das Zielprotein lediglich in wenigen Fraktionen eluierte.

---

<sup>1</sup>Der Kulturüberstand wurde für den Versand und zur Lagerung mit Glycerol (35% (v/v)) versetzt.

Durch eine Kombination der beschriebenen Reinigungsschritte wurde die beste Reinigung erreicht. Dazu wurden die Fraktionen mit der höchsten Peroxidaseaktivität aus der hydrophoben Interaktionschromatographie vereinigt, konzentriert und in den Startpuffer für die Ionenaustauschchromatographie umgepuffert. Anschließend erfolgte die Reinigung mittels Kationentauscher. Der Erfolg der zweistufigen sequenziellen Proteinreinigung wurde mittels halbnativer PAGE (Abb. 3.35) gezeigt.

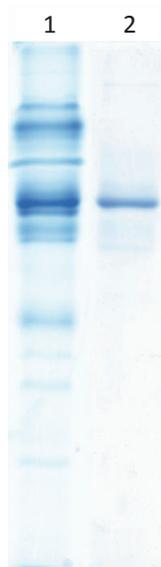


Abbildung 3.35: Kontrolle der Reinigung mittels halbnativer PAGE

1 – Kulturüberstand, 2 – Konzentrierte aktive Fraktionen nach HIC und IEX

### 3.4.5 Messung der Enzymaktivität

Für den Nachweis von Enzymaktivität sowie für die kinetische Charakterisierung wurden die Assays für die Durchführung am Mikrotiterplattenleser adaptiert (s. 2.6.3.2).

#### 3.4.5.1 Validität der Enzymtests

Für eine quantitative Bestimmung der Enzymaktivität muss die Änderung der Messgröße über einen definierten Zeitraum linear sein. Dafür wurde die Enzymlösung so verdünnt, dass die Extinktion über einen Zeitraum von mindestens 10 min konstant ab- bzw. zunahm (Abb. 3.36).

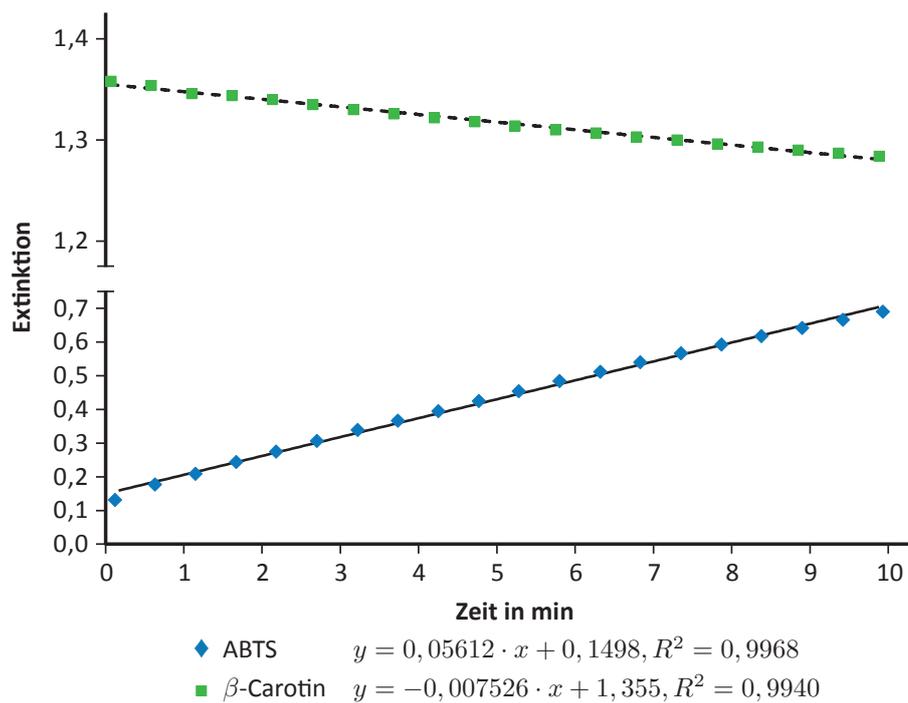


Abbildung 3.36: Nachweise der Linearität über den Messzeitraum. Gezeigt ist die Umsetzung von ABTS beispielhaft für eine Messung der Zunahme der Produktkonzentration sowie die Umsetzung von  $\beta$ -Carotin als Beispiel für eine Messung des Substratabbaus

Als Parameter für eine valide Kinetik wurde nach Suelter (1990) darüber hinaus ein Konzentrationsbereich ermittelt, in dem die Reaktionsgeschwindigkeit proportional mit der Enzymkonzentration steigt (Abb. 3.37). Diese Kriterien wurden für jedes untersuchte Substrat experimentell überprüft und festgelegt.

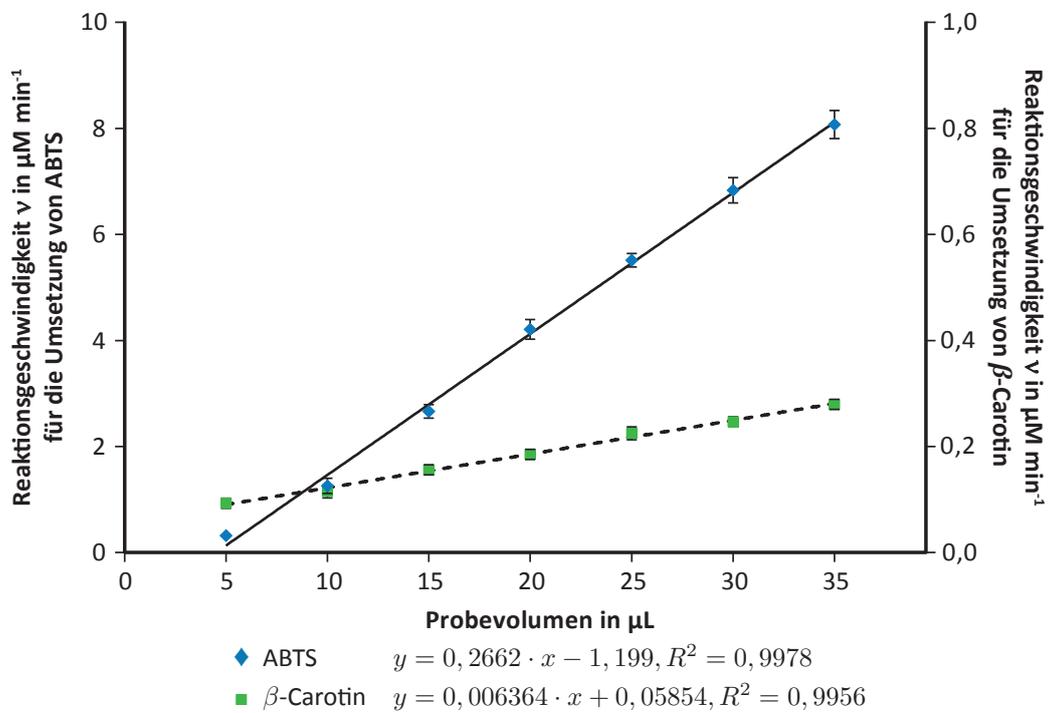


Abbildung 3.37: Kontrolle der Validität der Enzymkinetik am Beispiel von ABTS und  $\beta$ -Carotin. Die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  in  $\mu\text{M min}^{-1}$  nimmt proportional zum eingesetzten Enzymvolumen zu

### 3.4.5.2 Einfluss von Ammoniumsulfat und Natriumchlorid

Der Einfluss der im Verlauf der Proteinreinigung eingesetzten Salze auf die Enzymaktivität – sowohl des gereinigten Enzyms als auch des Enzyms im Kulturüberstand – wurde überprüft, indem für den Aktivitätstest Pufferlösungen mit 0 bis 1 M Salz verwendet wurden (Abb. 3.38). Dabei wurde gezeigt, dass die Aktivität durch den Salzzusatz deutlich abnahm. Der Zusatz von 0,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  führte bereits zu einem Aktivitätsverlust von 60%. Bei zunehmenden Salzkonzentrationen blieb die Aktivität konstant. Der Zusatz von 0,2 M NaCl führte zu einem Aktivitätsverlust von 40%, die Erhöhung der Salzkonzentration auf 0,4 M zu einem Aktivitätsverlust von 60%. Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration führte zu keinem weiteren Aktivitätsverlust. Durch Dialyse gegen 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4 war die Enzymaktivität regenerierbar.

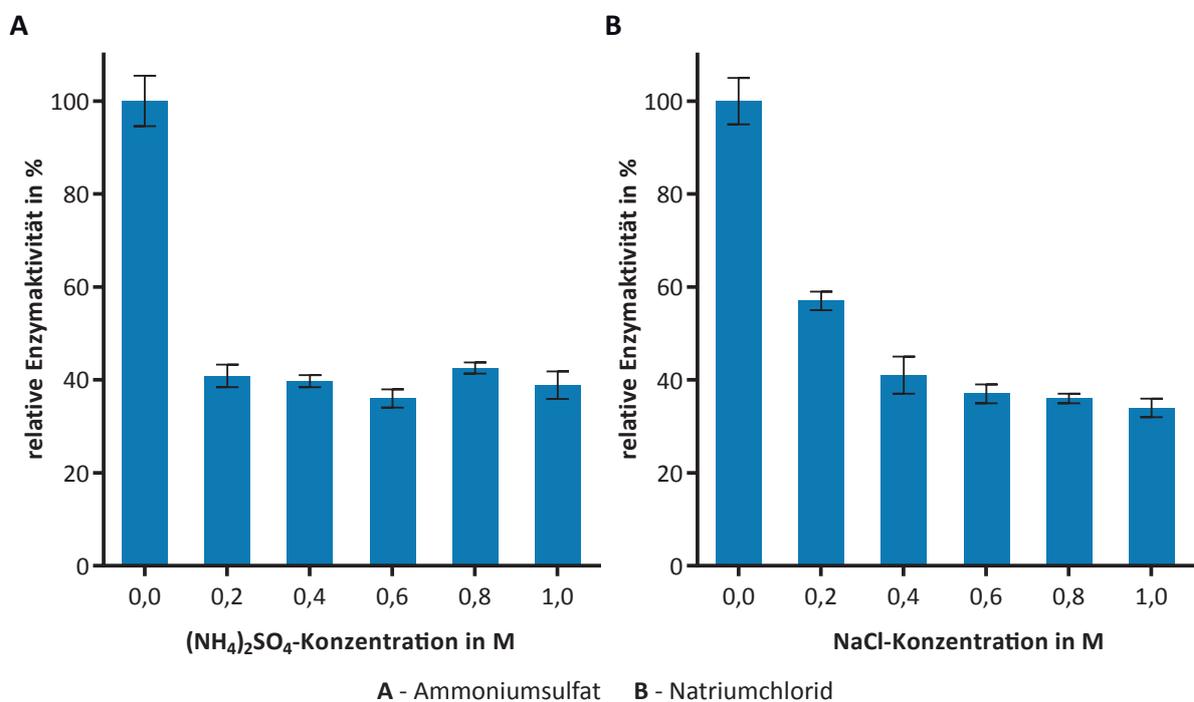


Abbildung 3.38: Relative Enzymaktivität in Abhängigkeit der Konzentration der zugesetzten Salze im verwendeten Puffer

### 3.4.5.3 Lagerstabilität

Das Enzym zeigte bei der Lagerung im Kulturüberstand (mit 35% Glycerol) bei 4 °C über einen längeren Zeitraum keinen Aktivitätsverlust. Für das gereinigte und konzentrierte Enzym wurde überprüft, unter welchen Bedingungen das Protein ohne Aktivitätsverlust gelagert werden kann. Dafür wurde die Enzymlösung aliquotiert und wie unter 2.6.5.2 beschrieben bei 4 °C, -20 °C und -80 °C gelagert und die Aktivität zu definierten Zeiten ermittelt (Abb. 3.39).

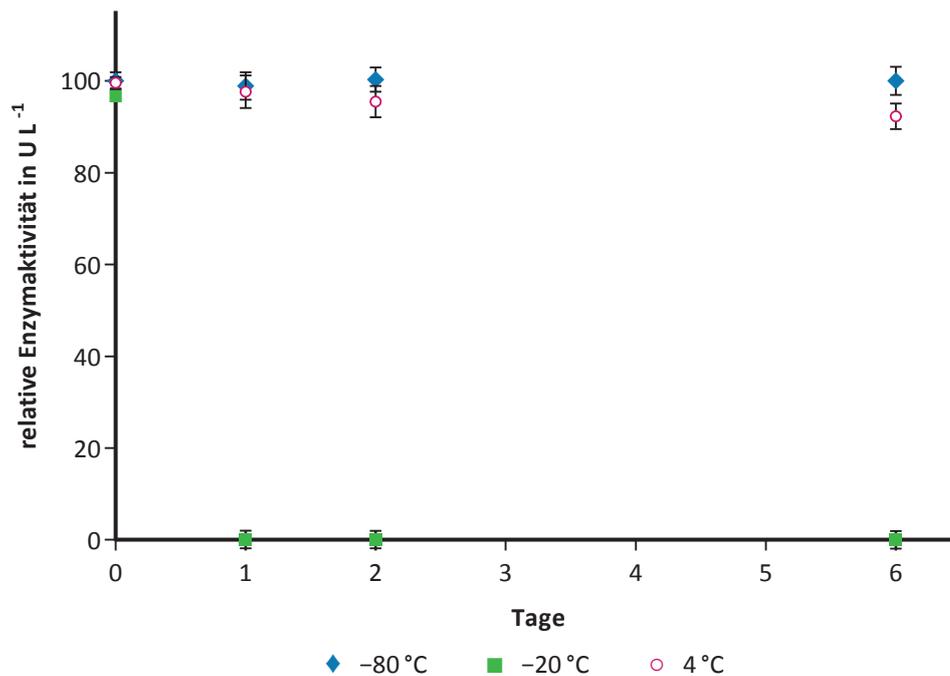


Abbildung 3.39: Relative Aktivität der gereinigten rPsaDyP in Abhängigkeit der Lagerdauer und -temperatur

Das gereinigte Enzym verlor bei 4 °C im Verlauf von 6 Tagen ca. 10% seiner Aktivität. Die Zugabe von Glycerol verbesserte die Stabilität des Enzyms bei 4 °C nicht (nicht gezeigt). Das Enzym, das bei -20 °C gelagert wurde, präzipitierte und zeigte nach dem Auftauen keine Aktivität mehr. Bei Lagerung des Enzyms bei -80 °C war nach 6 Tagen kein Aktivitätsverlust nachzuweisen, unabhängig davon, ob das Enzym erstmalig oder bereits mehrfach (nicht dargestellt) aufgetaut wurde. Daher wurde das gereinigte Enzym bei -80 °C (50 µL in PCR-Reaktionsgefäßen) gelagert.

#### 3.4.5.4 UV/Vis-Spektrum

Für das gereinigte Enzym wurde ein UV/Vis-Spektrum im Bereich von 250 bis 800 nm aufgenommen. Das Absorptionsspektrum des Enzyms zeigt neben dem Maximum bei 280 nm ein Absorptionsmaximum bei 409 nm (Soret-Bande) und zwei kleinere Maxima im Bereich von 510 nm und 640 nm (Abb. 3.40).

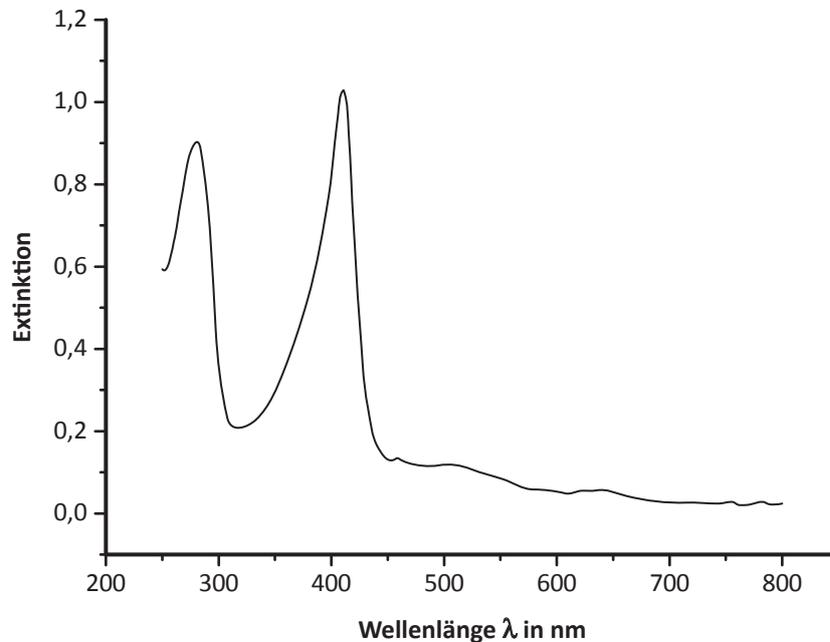


Abbildung 3.40: UV/Vis-Spektrum der gereinigten rPsaDyP

#### 3.4.6 Scale-up

Zur Reinigung größerer Enzymmengen wurden Säulen mit einem Volumen von 20 mL eingesetzt (s. 2.5.4.7). Die etablierte Gradienten wurde bei der Maßstabsvergrößerung an das Säulenvolumen angepasst. Für die IEX wurde die Säule mit dem Säulenmaterial SP Sepharose FastFlow nach Herstellerangaben selbst gepackt. Die Qualität der selbst hergestellten Säule wurde überprüft, indem die Anzahl der Trennböden („plates“) mit Hilfe von Aceton bestimmt wurde.

### 3.4.6.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Der Kulturüberstand wurde konzentriert und auf 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 mit 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  umgepuffert. Anschließend wurde der konzentrierte Kulturüberstand über eine Säule mit Phenyl-Sepharose-Matrix (HiPrep Phenyl FF(high sub)) als erste Stufe gereinigt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden untersucht und in drei Peaks Peroxidaseaktivität nachgewiesen. Der Peak mit der höchsten Aktivität (Fraktionen 28 bis 35, Abb. 3.41 grün hinterlegt) wurde für den nächsten Reinigungsschritt weiterverwendet. Das auf die Säule gegebene Volumen an Kulturüberstand wurde von 100  $\mu\text{L}$  im Vorversuch auf 12 mL in der präparativen Reinigung erhöht. Die Trennleistung wurde dadurch nicht beeinflusst.

### 3.4.6.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Fraktionen mehrerer FPLC-Läufe mit der höchsten Aktivität aus der ersten Reinigungsstufe wurden vereint, konzentriert und umgepuffert (50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0, Macrosep<sup>®</sup>, 10 kDa MWCO, Pall). Anschließend wurde erneut in die FPLC injiziert und mit Hilfe des starken Kationenaustauschers SP Sepharose FF getrennt (Reinigungsstufe 2, Abb. 3.42). Im zweiten Reinigungsschritt wurde Peroxidaseaktivität nur noch in einem Peak (Abb. 3.42 grün hinterlegt) nachgewiesen. Der Anteil des gereinigten Enzyms am Gesamtproteingehalt des Kulturüberstandes betrug 4%. Bei einer Wiederfindung der Anfangsaktivität von 18% wurde ein Reinigungsfaktor von 5, bezogen auf die spezifische Aktivität, erzielt (Tab. 3.5). Die aktiven Fraktionen mehrerer FPLC-Läufe wurden vereint und konzentriert und auf 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 umgepuffert (Macrosep<sup>®</sup>, 10 kDa MWCO, Pall). Die Enzymlösung wurde aliquotiert, bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert und für weitere Untersuchungen verwendet.

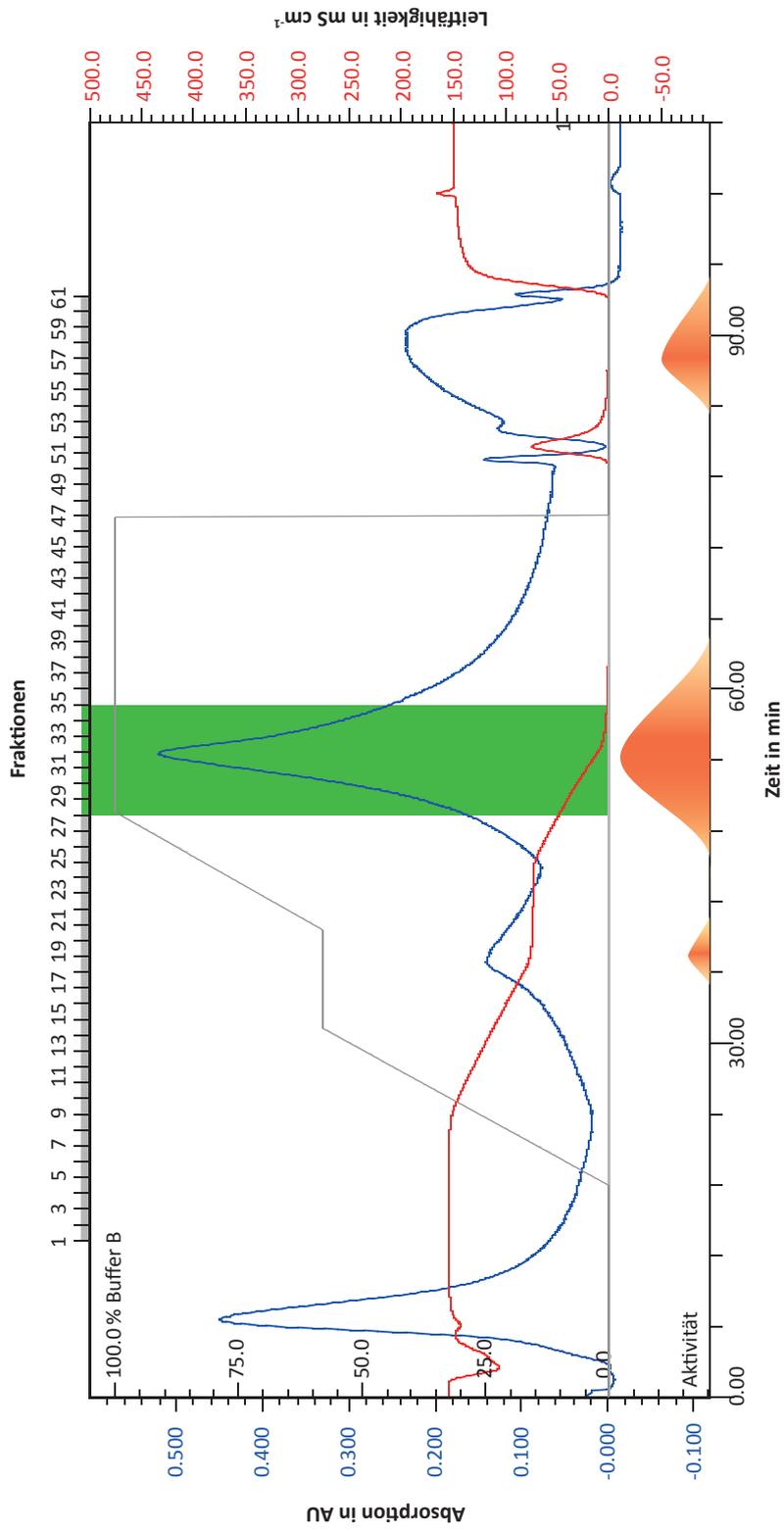


Abbildung 3.41: FPLC-Chromatogramm der Reinigung der DyP-Typ Peroxidase mittels HighPrep Phenyl FF-Säule.  
 —: UV-Absorption in AU bei 280 nm; —: Leitfähigkeit in  $\text{mS cm}^{-1}$ ; —: Konzentration des Puffers B in %; ■: Fraktionen, die für die weiter  
 Reinigung verwendet wurden; ■: Verteilung der Peroxidaseaktivität

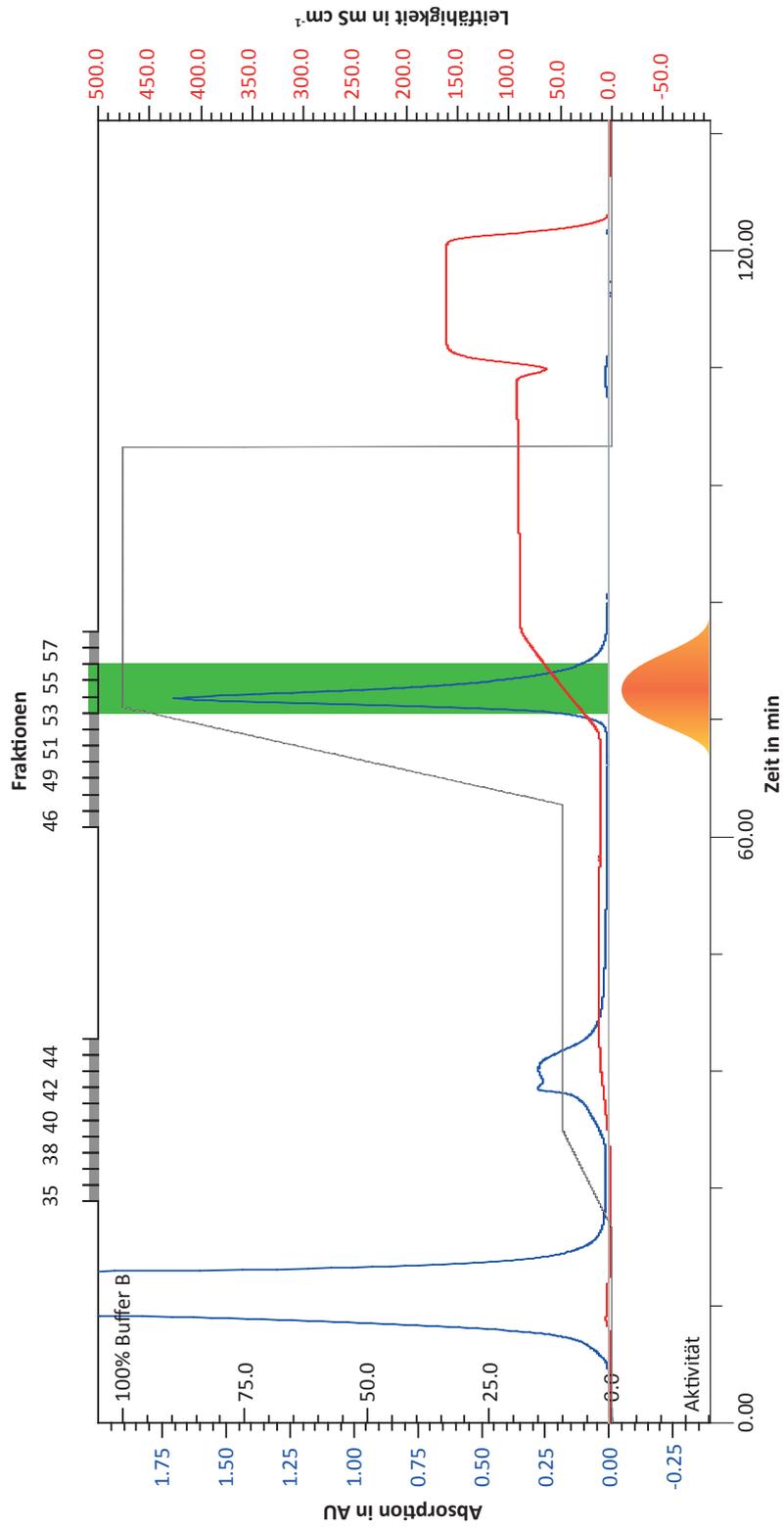


Abbildung 3.42: FPLC-Chromatogramm der Reinigung der DyP-Typ Peroxidase mittels SP Sepharose FF-Säule.  
 —: UV-Absorption in AU bei 280 nm; —: Leitfähigkeit in mS cm<sup>-1</sup>; —: Konzentration des Puffers B in %; ■: Fraktionen, die als gereinigte DyP-Typ Peroxidase gepoolt wurden; ■: Verteilung der Peroxidaseaktivität

Der Erfolg der Reinigung wurde mittels denaturierender und halbnativer PAGE visualisiert (Abb. 3.43).

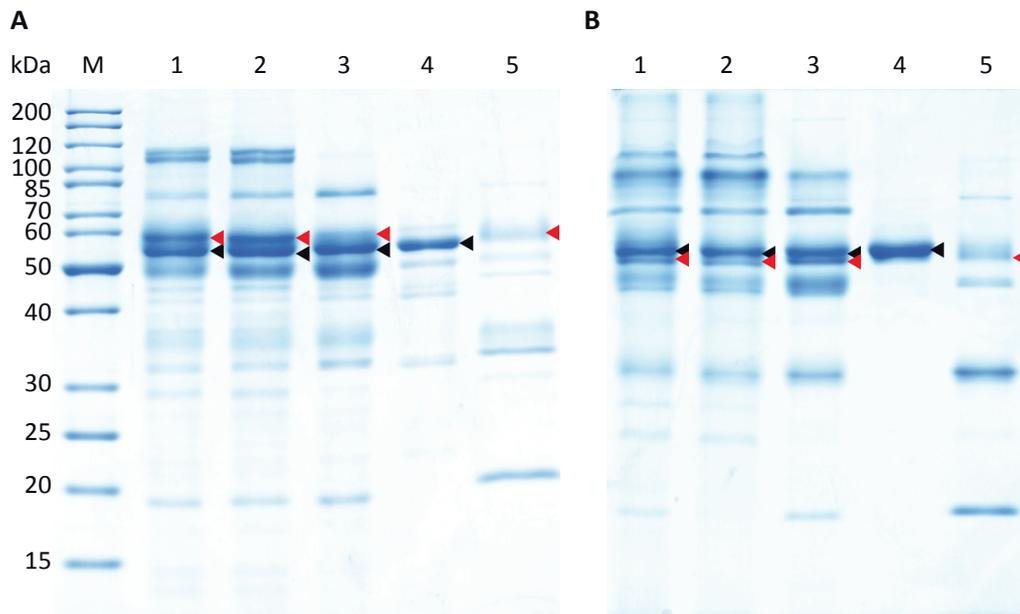


Abbildung 3.43: Kontrolle der einzelnen Reinigungsstufen für die rPsaDyP aus dem Kulturüberstand von *Trichoderma reesei*

**A** – SDS-PAGE, **B** – halbnative PAGE; gefärbt mit colloidalem Coomassie

**M** – Proteinstandard, **1** – Kulturüberstand, **2** – Kulturüberstand umgepuffert, **3** – aktive Fraktionen nach Phenyl-FF, **4** – Fraktionen des Peak 2 mit aktivem Protein nach SP-FF, **5** – Fraktionen (40–45) des Peak 1 mit abgetrenntem Fremdprotein nach SP-FF. Eine schwarze Pfeilspitze kennzeichnet das Zielprotein, eine rote Pfeilspitze kennzeichnet ein Fremdprotein

Nach der Analyse mittels denaturierender SDS-PAGE (Abb. 3.43 A) wurden für die aktiven Fraktionen der IEX (Peak2) eine Hauptbande mit einem Molekulargewicht von 57,4 kDa und mehrere Banden in niedrigeren Molekulargewichtsbereichen gefunden. Ein Protein, das mit dem Zielprotein eine Doppelbande bildete, wurde durch die zweistufige Reinigung vollständig abgetrennt (Abb. 3.43 Spur 5). In der halbnativen PAGE wurde im Vergleich zur SDS-PAGE nur eine Bande nachgewiesen (s. 3.43 B). Die Banden in niedrigeren Molekulargewichtsbereichen sind daher vermutlich auf Degradation des Zielproteins durch die Probenvorbereitung für die SDS-PAGE zurückzuführen.

Mit einem Teil des halbnativen SDS-Polyacrylamidgels wurde eine Aktivitätsfärbung mit ABTS durchgeführt, allerdings wurde hierbei keine Peroxidaseaktivität nachgewiesen. Die Bedingungen der halbnativen SDS-PAGE führten zu einem Aktivitätsverlust des Enzyms.

Durch die Reinigung wurde die spezifische Aktivität der DyP-Typ Peroxidase von  $1,8 \text{ U mg}^{-1}$  vor der Reinigung auf  $9,1 \text{ U mg}^{-1}$  gesteigert (Tab. 3.5). Dies entspricht einer Anreicherung um den Faktor 5. Gleichzeitig wurde die Reinheitszahl (s. 2.5.8) von 0,2 auf 1,1 gesteigert.

Tabelle 3.5: Bilanzierung der zweistufigen Reinigung der rekombinanten DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*

Probe	Protein			Aktivität			spez. Aktivität in U mg <sup>-1</sup>	Anreicherung	RZ
	in mg mL <sup>-1</sup>	in mg	in %	in UL <sup>-1</sup>	in U	in %			
Kulturüberstand	13,2	825,5	100	24 354	1 522	100	1,8	1	0,2
Kulturüberstand (umgepuffert)	10,5	716,9	86,8	20 496	1 394	91,6	1,9	1,1	0,2
HIC	3,8	96	10,7	11 755	295	19,3	3,1	1,7	0,6
IEX	2,9	30,4	3,7	26 283	276	18,1	9,1	4,9	1,1

### 3.4.6.3 Quantifizierung der gereinigten rPsaDyP

Für die gereinigte rPsaDyP wurde mittels Bradford-Assay und UV-Absorptionsmessung (s. 2.5.6) eine Konzentration von  $27,25 \pm 0,12 \mu\text{M}$  für das Dimer ermittelt. Dies entspricht einem Proteingehalt von  $2,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ .

### 3.4.7 Proteinbiochemische Charakterisierung der gereinigten DyP-Typ Peroxidase

#### 3.4.7.1 Bestimmung der nativen Konformation

Da die Peroxidase keine Aktivität nach der halbnativen PAGE zeigte, wurde die DyP-Typ Peroxidase mittels *Clear Native* PAGE untersucht (s. 2.4.2.4). Diese Methode eignet sich zur Trennung von Proteinen mit einem  $pI < 7$ . Hierbei wurde gezeigt, dass die Peroxidase im Gel nicht wie erwartet wanderte bzw. aggregierte und als Oligomer (Tetramer bzw. Hexamer) vorkam. Mittels Aktivitätsfärbung (s. 2.4.3.4) wurde jedoch Peroxidaseaktivität nachgewiesen. Eine Bestimmung der nativen Proteingröße war unter diesen Bedingungen allerdings nicht möglich.

Die Bestimmung der aktiven Konformation der gereinigten Peroxidase erfolgte daher mittels *Blue Native* PAGE, wobei SERVA Blue G als negativ geladener Farbstoff dem Laufpuffer bzw. Probenauftragspuffer zugegeben wurde (s. 2.4.2.3). Der Farbstoff bindet an Proteine, wobei deren native Struktur erhalten bleibt und der Farbstoff-Protein-Komplex wandert unabhängig vom  $pI$  zur Anode. Anschließend wurde ein Teil des Gels mit colloidalem Coomassie gefärbt und mit dem anderen Teil eine Aktivitätsfärbung mit ABTS durchgeführt (Abb. 3.44).

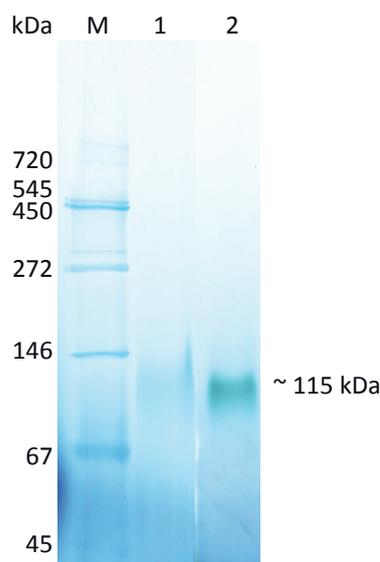


Abbildung 3.44: Untersuchung der nativen Konformation der gereinigten rPsaDyP  
*Blue Native* Gel; **M** – Proteinstandard **1** – gereinigte rPsaDyP (gefärbt mit colloidalem Coomassie), **2** – Aktivitätsfärbung mit ABTS

Auf Basis der Aminosäuresequenz wurde für die DyP-Typ Peroxidase ein Molekulargewicht von 57,1 kDa berechnet, das auch durch die SDS-PAGE (Abb. 3.43) bestätigt wurde. Mit Hilfe der *Blue Native* PAGE wurde für die aktive rPsaDyP ein apparentes Molekulargewicht von ~115 kDa ermittelt (Abb. 3.44). Das entspricht in etwa dem doppelten Molekulargewicht, das mittels denaturierender SDS-PAGE ermittelt wurde. Dies legt nahe, dass die Peroxidase nativ als Dimer vorliegt und auch in dieser Form aktiv ist.

Zusätzlich wurde die native Größe der gereinigten rPsaDyP mittels GFC bestimmt (s. 2.5.5). Dafür wurde das gereinigte Enzym auf eine Superdex-200-Säule aufgetragen und chromatographisch analysiert.

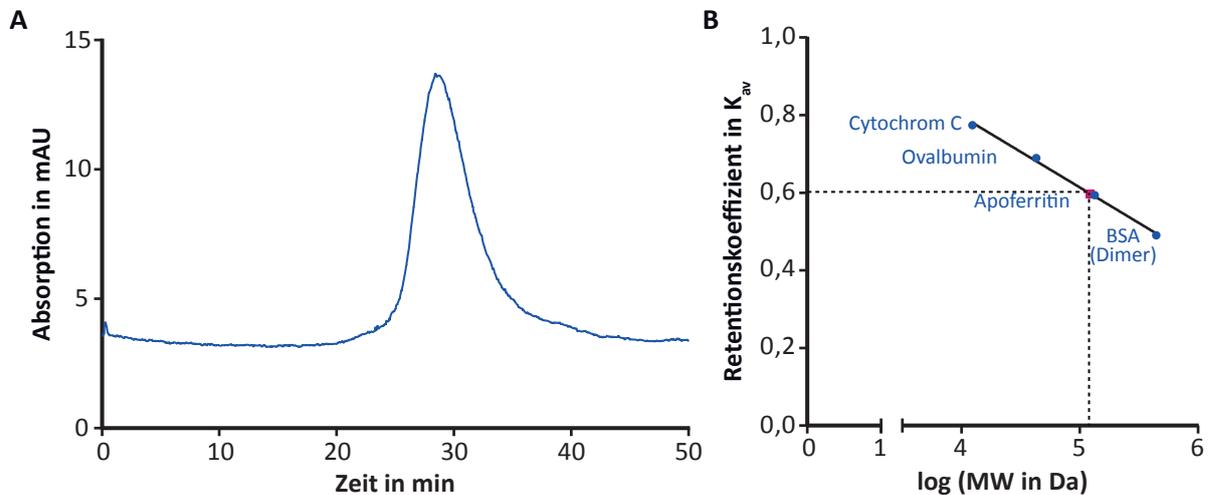


Abbildung 3.45: Bestimmung der Proteingröße mittels Gelfiltrationschromatographie

A FPLC-Chromatogramm der Bestimmung des Molekulargewichtes der gereinigten rPsaDyP mittels Superdex-200-Säule

Laufpuffer: 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5, 250 mM NaCl, Triton X-100 0,005% (v/v) , Flussrate:  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , Probenvolumen:  $200 \mu\text{L}$ , Fraktionsgröße:  $2,0 \text{ mL}$   
 — UV-Absorption ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ )

B Kalibriergerade  $y = -0,1835 \cdot x + 1,531$ ,  $R^2 = 0,9969$

■ rPsaDyP

Das Chromatogramm für die gereinigte rPsaDyP zeigte nur einen diskreten Peak. Dies bestätigt die bisher durch die PAGE (Abb. 3.43) gezeigte Reinheit der rPsaDyP. Nach Kalibrierung der Gelfiltrationssäule (Abb. 3.45 B) und Mittelung der Retentionszeiten der Peakmaxima von drei verschiedenen GFC-Läufen wurde für die rPsaDyP ein apparentes Molekulargewicht von 122 kDa bestimmt (Abb. 3.45). Das mittels *Blue Native* PAGE ermittelte Molekulargewicht für die aktive DyP-Typ Peroxidase von 115 kDa wurde durch die GFC bestätigt.

### 3.4.7.2 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Mit der gereinigten DyP-Typ Peroxidase wurde eine isoelektrische Fokussierung (s. 2.4.2.5) mit anschließenden Aktivitätsfärbungen durchgeführt (Abb. 3.46). Neben der Aktivitätsfärbung mit ABTS (s. 2.4.3.4) wurde eine spezifische Färbung für Häm- beziehungsweise Metallenzyme mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) durchgeführt (s. 2.4.3.2). Weiterhin wurde eine Färbung mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) durchgeführt (s. 2.4.3.5).

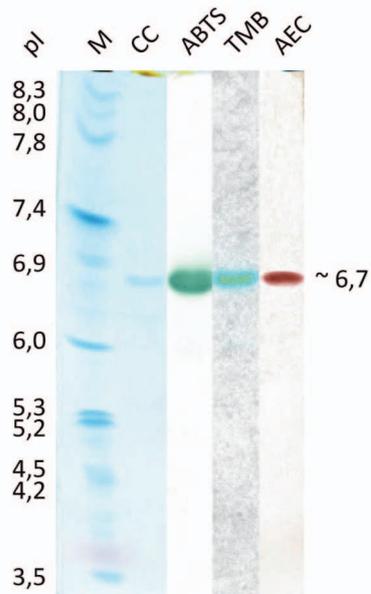


Abbildung 3.46: Isoelektrische Fokussierung der gereinigten rPsaDyP, gefärbt mit colloidalem Coomassie, Aktivitätsfärbungen mit ABTS, spezifische Färbung mit TMB für Häm-/Metallenzyme und Färbung mit AEC

Die Färbung mit colloidalem Coomassie zeigte, ebenso wie die Aktivitätsfärbungen mit ABTS und AEC, für die gereinigte aktive rPsaDyP einen apparenten isoelektrischen Punkt von 6,7. Zusätzlich wurde durch die Färbung mit TMB die über zwei Stufen gereinigte DyP-Typ Peroxidase als Metallenzym identifiziert.

### 3.4.7.3 Glykosylierung

In der Aminosäuresequenz wurden mit bioinformatischen Methoden potentielle Glykosylierungsstellen nachgewiesen (Abb. 3.31). Daher wurde das Protein mit PNGase F behandelt, um gegebenenfalls vorhandene Oligosaccharide von N-Glykosylierungsstellen zu entfernen (s. 2.5.12). Die Kontrolle der Deglykosylierung erfolgte anschließend mittels SDS-PAGE (Abb. 3.47).

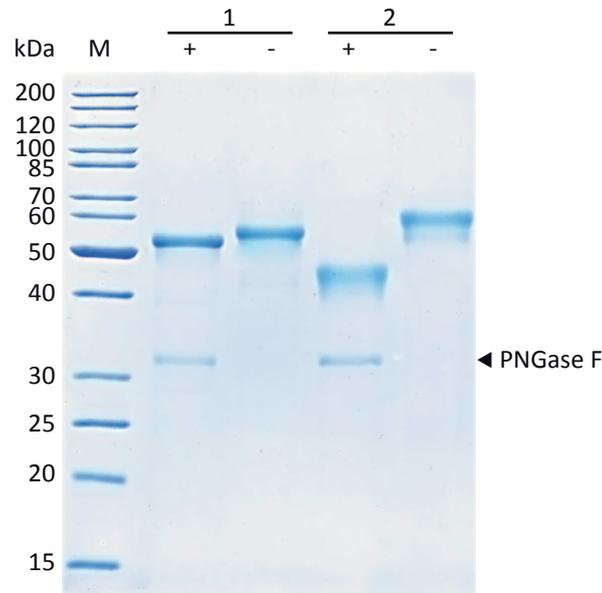


Abbildung 3.47: Bestimmung des Glykosylierungsgrades der heterolog exprimierten DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*  
**1** – rPsaDyP; **2** – Fetuin (Kontrolle); + – Behandlung mit PNGase F; - – ohne PNGase F-Behandlung

Nach der Behandlung mit PNGase F zeigte die rPsaDyP ein niedrigeres apparentes Molekulargewicht als die unbehandelte Vergleichsprobe (Abb. 3.47). In der nicht-deglykosylierten Probe zeigte die rPsaDyP ein apparentes Molekulargewicht von 57,6 kDa. Dieses stimmt gut mit dem berechneten Molekulargewicht der rPsaDyP (57,4 kDa) überein. Nach Behandlung mit PNGase F zeigte das Protein ein apparentes Molekulargewicht von 52,8 kDa. Zusätzlich wurde in den deglykosylierten Proben ein Protein mit einer apparenten Größe von 32 kDa nachgewiesen, das der eingesetzten PNGase F entspricht (Abb. 3.47). Die rPsaDyP wird bei der heterologen Expression glykosyliert. Aus der Differenz der Molekulargewichte wurde ein Glykosylierungsgrad von ~9% errechnet. Die ermittelte apparente Größe der deglykosylierten rPsaDyP weicht von dem Molekulargewicht ab, das aus der Primärsequenz berechnet wurde. Dies spricht dafür, dass das Protein im Wirtsorganismus prozessiert wird und der N-Terminus nicht aus der cDNA abgeleitet werden kann.

### 3.4.7.4 N-terminale Sequenzierung mittels Edman-Abbau

Für die Bestimmung des N-Terminus des rekombinant produzierten Enzyms wurde eine Sequenzierung nach Edman durchgeführt (s. 2.5.11). Dabei wurde nach 12 Zyklen die Sequenz AT?GTFLPLEEI für den N-Terminus ermittelt. Mit Hilfe des Edman-Abbaus konnte die dritte Aminosäure nicht eindeutig identifiziert werden. Die ermittelte Sequenz wurde in der abgeleiteten Aminosäuresequenz der rPsaDyP identifiziert (Abb. 3.48).

```
MRWWTTCVALTSLIPYALLPSYGFNLPQQLEARQNDYPSGSLLDYPGQHTLPTLELIQK
LNATNGTFLPLEEIQGDIMIGMRKPKEIFFFYSLQNPRKFKSVLAKLIYPHITTTAQMVC
TTCAQPSAMLNVAWTSQGLRKLGVLDNLGDPYFAMGQLSDAAALGDTDPSTTWAPGLYAN
KTDGAFLIAAKDWEPIDTLLNQMKAWLGDAIVETHSNRGAVRPGDAAGKEHFGWLDGFIQ
PAVAGFATSTYPGQQLLLPGTLLTKEIGDPRRAARPAWTKWGSF MAYRQLQELVPEFDDY
LMQEAALI QDSSRSVRERADLLGARMFGRWKS GTPLDLAPEKDDPSIGPNLMLNNFDFN
HPAPFNINTNQSYCPFSAHIRKIRPRADQGNQNLKKNQDMIRASIPYGEELSDDEINNKKTG
TERGVAFVITYQSDLGSGFHFQAEWANNVNIPTGKSDPTPGFDP IVGQNSGKPLVVSGID
YTDLNHDLTFMSFVVS KGGDYFFSPSMSAILHKIAA*
```

Abbildung 3.48: Abgeleitete Primärsequenz der DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*. Hervorgehoben ist die Edman-Sequenz (rot)

Die Aminosäuresequenz der rPsaDyP wurde mit Sequenzen verschiedener homologer Enzyme verglichen. In Abbildung 3.49 sind die N-terminalen Bereiche des Sequenzvergleichs dargestellt.

rPsaDyP	MRWWTTCVALTSLIPYALLPSYGFNLPQQLEARQ-----NDYPSGSLLDH-----DY	46
PosDyP	MRWWTTCVALTSLIPYLLPSYGFSLPQQLEARQ-----NDYPSGSLLDHCVLTRL PVDY	55
TAP	-MQLKNFLAATAAFVALSQPIAAYHV-----KRARSSPLIV-----PF	37
POP	-MQLKHFLAATAAFSAVTQSAFAYHV-----KRARSSPLIG-----SF	37
BadDyP	-MRLSLFVVSVAVLVGSSSHVNAAKLG-----ARQTRTTPLLT-----NF	39
AauDyP	-MRLS--PVFVALLSGLLAADLGLARSVAPRVADSPA AVTGTTRKTSLLK-----NV	48
MscDyP	-MKLFSASVFAAIIASHYASATAHIR--APNVKPR-----RTNSLLT-----AP	41
	. . . : . . . *	
rPsaDyP	PGQHTLPTLELIQKLNATNGTFLPLEEIQGDIMIGMRKPKEIFFFYSLQNPRKFKSVLAK	106
PosDyP	PGQHTLPTLELIQKLNATNGTFLPLEEIQGDIMIGMRKPKEIFFFYSLQNPRKFKSVLAK	115
TAP	PGQALPTAAQVQSTASAGDDS-IPFENIQADILVGMKKQNEKFVFFHINNAATFKSVLKT	96
POP	PGQPPLPTIAEVQSSSAGNDS-LPFENIQGDILVGMKKQNEKFVFFHINNAATFKSFLKT	96
BadDyP	PGQAPLPTLTQHTTESGANDTILPLNNIQGDILVGMKKQKERFVFFQVNDATSFKTALKT	99
AauDyP	AGLPPVPSAAQVAATS-----LNTDDIQGDILVGMHKQKQLFYFFAINDPATFKTHLAS	102
MscDyP	PQQPPLPSAQAASASS--SAGLNLDIQGDILVGMKKNEKELFFFSITDAATFKAKLGS	99
	. . . : . . . : ** . ** : ** : * : * * : : . . . ** : * .	

Abbildung 3.49: Sequenzvergleich der N-Termini der rPsaDyP, einer DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus* (PosDyP), einer peroxidabhängigen Phenoloxidase (TAP) aus *Termitomyces albuminosus*, einer Peroxidase aus *Polyporaceae sp.* (POP), einer DyP aus *B. adusta* (BadDyP), einer DyP aus *A. auricula-judae* (AauDyP) und einer DyP aus *M. scorodoni* (MscDyP, MsP1)  
rot: N-Terminus des prozessierten Proteins, konservierte Aminosäuren (\*)

Bei allen untersuchten Sequenzen wurde der N-Terminus in einem ähnlichen Bereich gefunden. Für die rekombinant produzierte Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* wurde ein 62 Aminosäuren langes Signalpeptid ermittelt. Das reife Enzym besteht aus 453 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 50,0 kDa. Über den N-Terminus des reifen nativen Proteins aus *Pleurotus sapidus* oder den eines nahen Verwandten ist noch nichts bekannt.

### 3.4.8 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die optimalen Reaktionsbedingungen für die DyP-Typ Peroxidase wurden anhand der Enzymassays (s. 2.6.3.2) bestimmt und sind im Folgenden mit den Substraten ABTS und  $\beta$ -Carotin gezeigt. Dabei wurde ABTS als typisches Substrat für Laccasen und Peroxidasen und  $\beta$ -Carotin exemplarisch für die natürlichen Farbstoffe gewählt.

#### 3.4.8.1 Auswahl eines geeigneten Reaktionspuffers

Zur Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers für die DyP-Typ Peroxidase wurde die Aktivität in unterschiedlichen Puffern (s. 2.6.1) über einen pH-Bereich von 2,0 bis 5,5 für den Umsatz von ABTS und  $\beta$ -Carotin bestimmt (s. 2.6.4.1). Auf Grund der Pufferkonzentration (50 mM) wurden bei den Acetat-Puffern nur pH-Werte ab 3,0 erreicht.

Folgende Puffer wurden eingesetzt:

- McIlvaine-Puffer (Tab. 2.28)
- K-McIlvaine-Puffer
- Natriumacetat-Puffer (50 mM)
- Kaliumacetat-Puffer (50 mM)
- Natriumtartrat-Puffer (100 mM)
- HCl/Glycin-Puffer (100 mM)

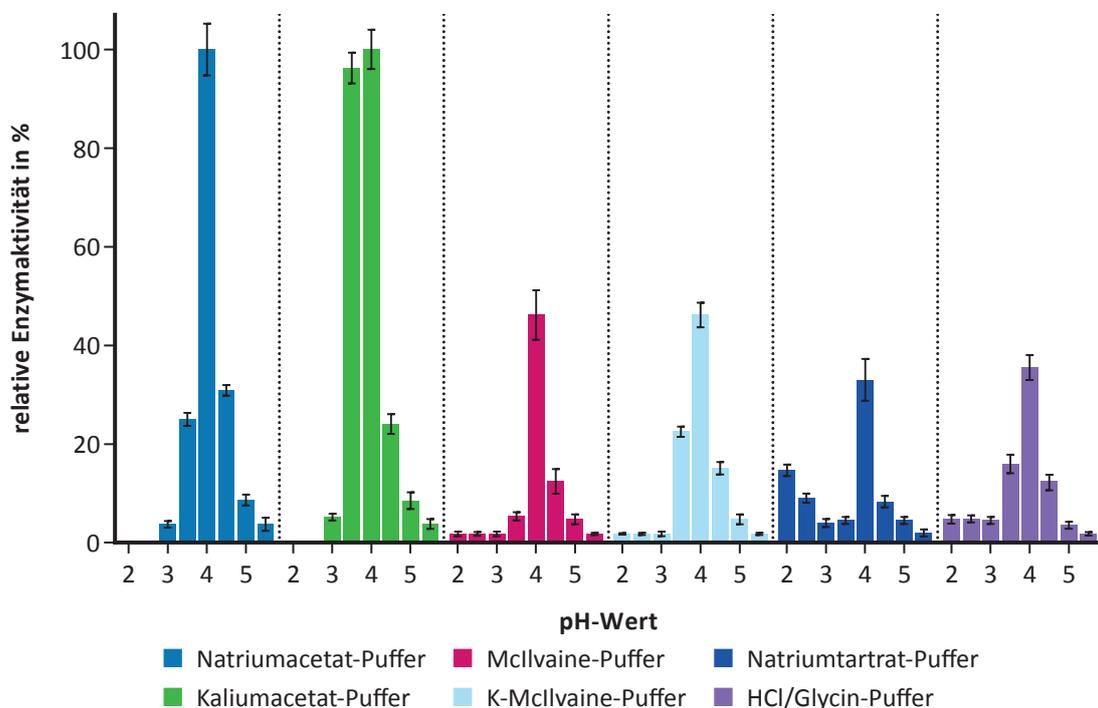


Abbildung 3.50: Relative Enzymaktivität der DyP-Typ Peroxidase gegenüber ABTS in Abhängigkeit vom verwendeten Puffer und pH-Wert

Die Enzymaktivität zeigt für den Umsatz von ABTS bei allen verwendeten Puffern ein signifikantes Maximum bei pH 4,0. Oberhalb bzw. unterhalb dieses pH-Wertes sank die Enzymaktivität stark ab. Das Enzym ist somit nur in einem engen pH-Bereich, abhängig vom verwendeten Puffer, zwischen pH 3,5 und pH 4,5 aktiv. Die größte Aktivität der DyP-Typ Peroxidase wurde im Natrium- bzw. Kaliumacetat-Puffer bestimmt (Abb. 3.50). Bei Verwendung des McIlvaine-Puffers pH 4,0 wurden lediglich 50% der im Natrium- bzw. Kaliumacetat-Puffer bestimmten Aktivität nachgewiesen.

Als Reaktionspuffer für den Umsatz von ABTS wurde für die weiteren Aktivitätsbestimmungen ein Natriumacetat-Puffer pH 4,0 verwendet.

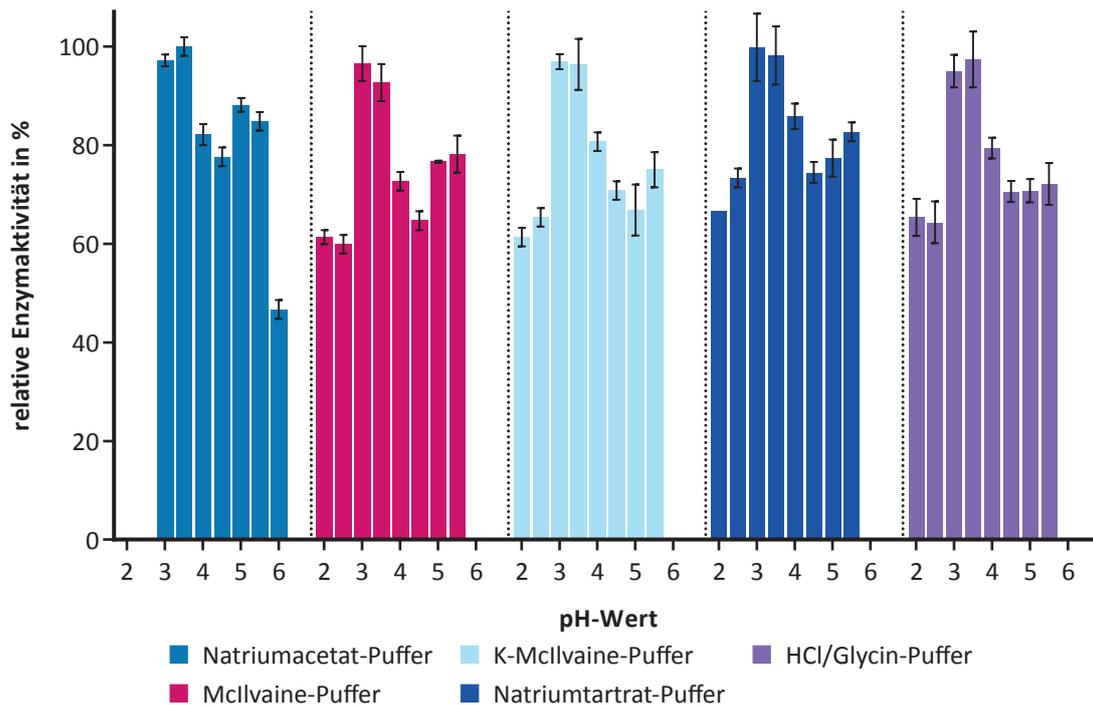


Abbildung 3.51: Relative Enzymaktivität der DyP-Typ Peroxidase gegenüber  $\beta$ -Carotin in Abhängigkeit vom verwendeten Puffer und pH-Wert

Die höchste Enzymaktivität für den Abbau von  $\beta$ -Carotin wurde bei den verwendeten Puffern zwischen pH 3,0 und 3,5 gezeigt. Bei pH-Werten zwischen 2,0–2,5 und 4,0–6,0 betrug die Enzymaktivität noch zwischen 60% und 80%. Die Enzymaktivität blieb somit über einen breiten pH-Bereich relativ konstant. Die höchste Aktivität der DyP-Typ Peroxidase wurde im Natriumacetat-Puffer pH 3,5 beobachtet (Abb. 3.51). Daher wurden alle weiteren Umsetzungen von  $\beta$ -Carotin mit Natriumacetat-Puffer bei diesem pH-Wert durchgeführt.

### 3.4.8.2 Bestimmung des pH-Optimums

Die Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers hat gezeigt, dass für den Umsatz von ABTS die Aktivität bei pH 4,0 am höchsten war. Für die Bestimmung des exakten pH-Optimums wurde die Enzymaktivität in einem pH-Bereich von 3,5 bis 4,2 in 0,1er-Schritten im Natriumacetat-Puffer (50 mM) überprüft (s. 2.6.4.1). Die Enzymaktivität war bei pH 3,8 maximal (Abb. 3.52). Für die weitere Charakterisierung der DyP-Typ Peroxidase wurde daher ein Natriumacetat-Puffer pH 3,8 verwendet.

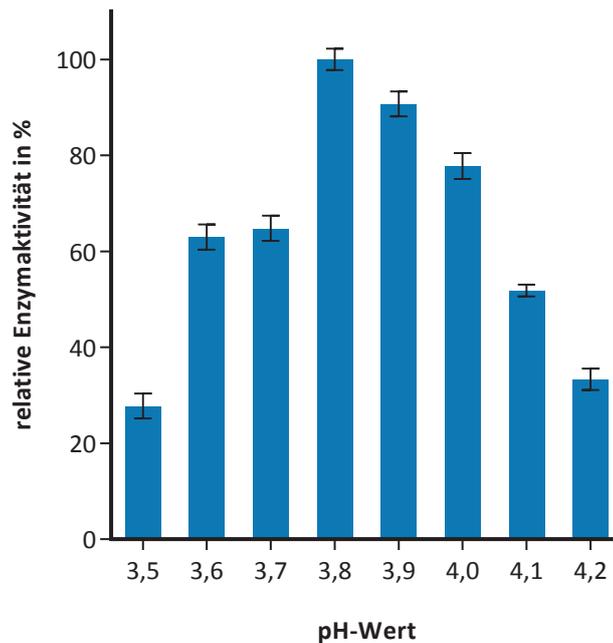


Abbildung 3.52: Relative Enzymaktivität der DyP-Typ Peroxidase für den Umsatz von ABTS in Abhängigkeit vom pH-Wert

Für  $\beta$ -Carotin wurde das pH-Optimum nicht genauer bestimmt, da die Aktivität bei allen verwendeten Puffersystemen gegenüber diesem Substrat über einen breiten pH-Bereich relativ konstant blieb.

### 3.4.8.3 Bestimmung der optimalen Pufferkonzentration

Die Ermittlung der optimalen Konzentration des Natriumacetat-Puffers erfolgte bei einem pH-Wert von 3,8 für den Umsatz von ABTS und 3,5 für den Abbau von  $\beta$ -Carotin (s. 2.6.4.2).

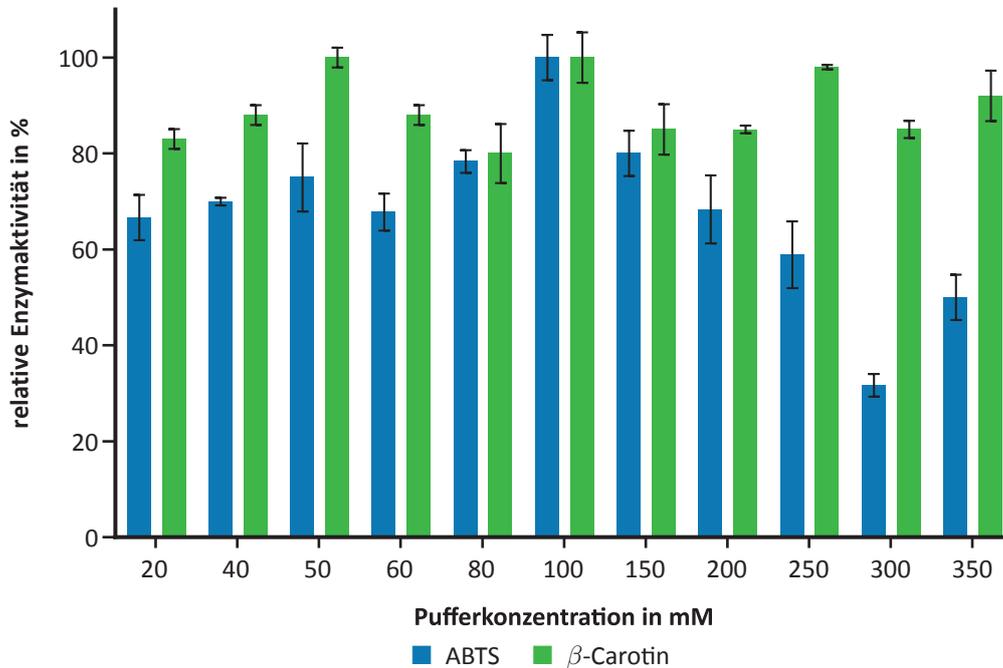


Abbildung 3.53: Relative Enzymaktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten Natriumacetat-Puffers

Die Enzymaktivität für den Abbau von ABTS war in einem 100 mM Natriumacetat-Puffer am höchsten (Abb. 3.53). Bei einer Konzentration von 50 mM lag die relative Enzymaktivität noch bei ca. 75%. Für alle weiteren Messungen mit ABTS wurde daher ein 100 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,8 verwendet.

Für den Abbau von  $\beta$ -Carotin lag die Enzymaktivität über den gesamten Konzentrationsbereich zwischen 80% und 100% (Abb. 3.53). Für die folgenden Untersuchungen wurde ein 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 verwendet.

### 3.4.8.4 Bestimmung des Temperaturoptimums

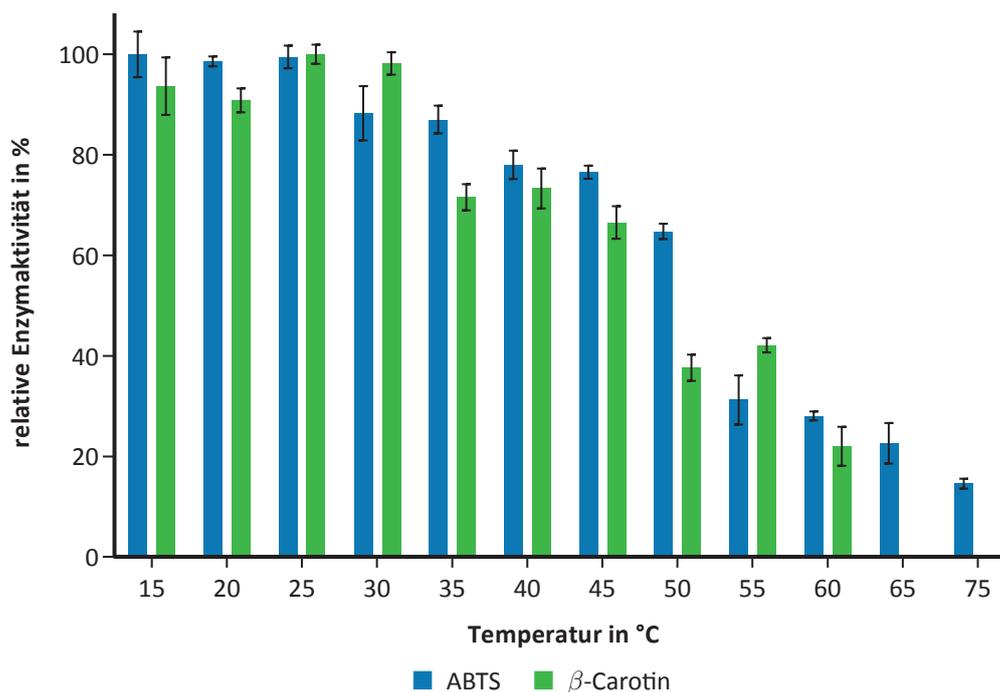


Abbildung 3.54: Relative Enzymaktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit der Temperatur

Das Temperaturoptimum wurde mit 100 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,8 (ABTS) bzw. 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5 ( $\beta$ -Carotin) bestimmt (s. 3.4.8.2, 3.4.8.3). Das Temperaturoptimum wurde in einem Bereich von 15 bis 75 °C untersucht (s. 2.6.4.3). Die Aktivität der DyP-Typ Peroxidase war bei beiden Substraten bei Temperaturen von 15 bis 30 °C maximal (Abb. 3.54). Das Enzym behält bis 45 °C eine hohe Aktivität. Deshalb wurden alle weiteren Messungen mit ABTS bei 25 °C und mit  $\beta$ -Carotin bei 30 °C durchgeführt.

### 3.4.8.5 Einfluss der Wasserstoffperoxidkonzentration

Die Enzymaktivität wurde sowohl ohne  $H_2O_2$ - als auch mit  $H_2O_2$ -Zusatz bestimmt. Hierbei wurden Wasserstoffperoxidkonzentrationen in einem Bereich von 12,5 bis 1 250  $\mu$ M (im Assay) verwendet (s. 2.6.4.4). Die Enzymaktivität wurde durch die Erhöhung der  $H_2O_2$ -Konzentration signifikant gesteigert (Abb. 3.55). Die Aktivität der DyP-Typ Peroxidase war bei der Wasserstoffperoxidkonzentration von 125  $\mu$ M für beide Substrate maximal. Für den Umsatz von ABTS wurde eine Steigerung der Aktivität um 96% und für den Umsatz von  $\beta$ -Carotin um 40% erreicht. Eine weitere Erhöhung der  $H_2O_2$ -Konzentration führte schließlich zu einer Hemmung der Enzymaktivität. Bei 1 250  $\mu$ M betrug die Aktivität gegenüber  $\beta$ -Carotin noch 66% der maximalen Aktivität, während die Aktivität gegenüber ABTS nur noch 5% der maximalen Aktivität betrug. Daher wurden die weiteren Messungen unter gleichen Bedingungen mit 125  $\mu$ M  $H_2O_2$  durchgeführt.

Die Umsetzung des Substrates  $\beta$ -Carotin erfolgte auch ohne die Zugabe von  $H_2O_2$ . Die Aktivität des Enzyms gegenüber  $\beta$ -Carotin betrug ohne  $H_2O_2$  bereits 60% der maximalen Aktivität.

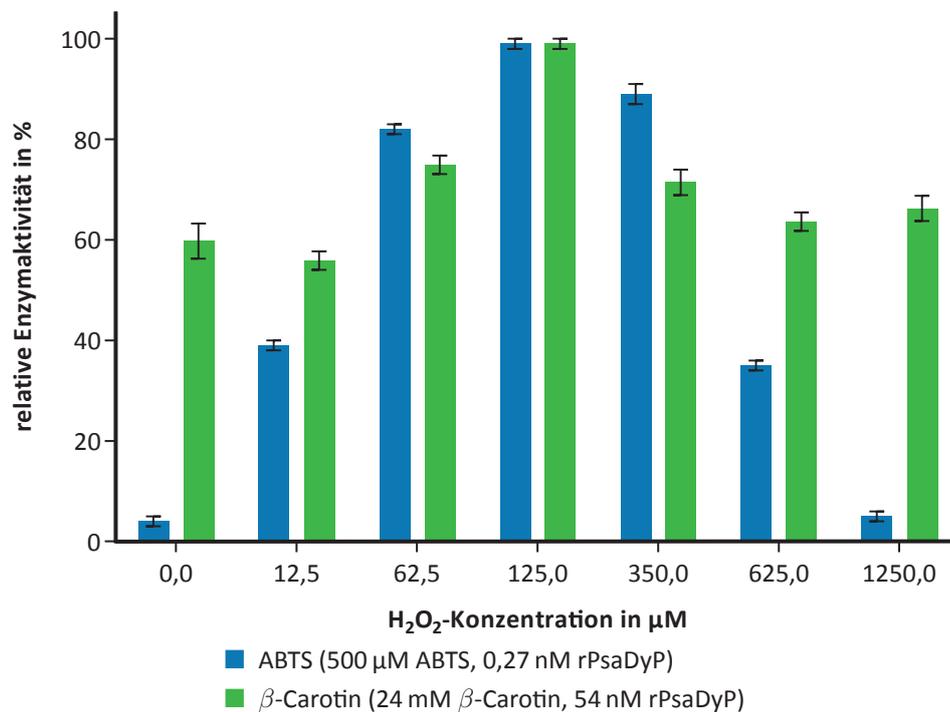


Abbildung 3.55: Relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der  $H_2O_2$ -Konzentration

Die optimale Konzentration an  $H_2O_2$  ist sowohl von der Substrat- als auch von der Enzymkonzentration abhängig. Daher wurde bei Änderung eines Parameters stets die optimale  $H_2O_2$ -Konzentration ermittelt. Bei der Messung der kinetischen Parameter wurden die Aktivitäten stets bei unterschiedlichen  $H_2O_2$ -Konzentrationen gemessen und die Konzentration gewählt, die keinen limitierenden Effekt auf die Aktivität hatte (s. 2.6.6.2, 3.4.10.2).

#### 3.4.8.5.1 Einfluss der Pipettierreihenfolge

Prinzipiell kann eine Reaktion durch die Zugabe des Substrates (auch des Cosubstrates) oder des Enzyms gestartet werden. Daher wurde der Einfluss der Startkomponente (rPsaDyP bzw.  $H_2O_2$ ) auf die Aktivität des Enzyms untersucht (s. 2.6.4.6).

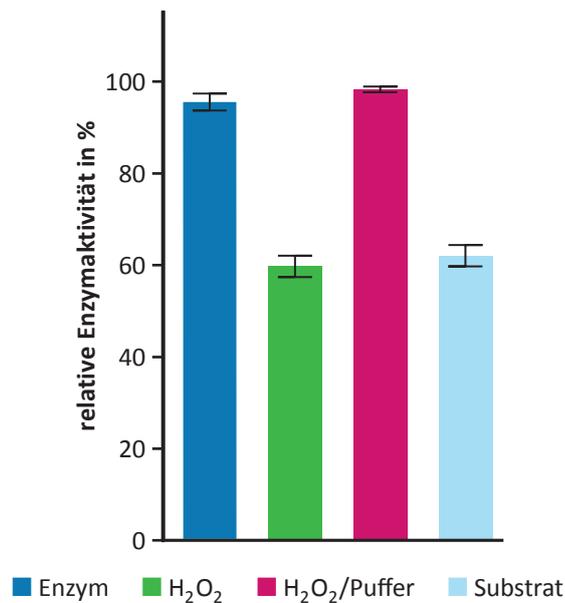


Abbildung 3.56: Bestimmung Enzymaktivität in Abhängigkeit der Komponente, mit der der ABTS-Assay gestartet wurde unter Sättigungsbedingungen (2,5 mM ABTS)

Durch Starten der Reaktion mit Enzym im Vergleich zum Start mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war die ermittelte Aktivität um den Faktor 1,7 höher (Abb. 3.56). Wurde die Reaktion mit einem Gemisch aus Puffer und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet, wurde eine vergleichbare Aktivität zum Start mit Enzym ermittelt, und die Messungen erbrachten stabilere Werte.

Das Starten der Reaktion mit dem Substrat führte bei der Umsetzung von ABTS ebenso wie das Starten der Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer Erniedrigung der Enzymaktivität (62% im Vergleich zu Start mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Puffer). Bei der Oxidation von Guajakol betrug die Aktivität beim Start der Reaktion mit Substrat im Vergleich zu der mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Puffer gestarteten Reaktion nur noch etwa 10%. Daneben wurde bei der Umsetzung von Guajakol zu Beginn eine kurze *lag*-Phase nachgewiesen, die bei der Umsetzung von ABTS nicht beobachtet wurde. Daher wurden die folgenden Messungen durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Puffer gestartet.

#### 3.4.8.6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt der $\beta$ -Carotin-Stammlösung

Für die Herstellung der  $\beta$ -Carotin-Stammlösung (s. 2.6.3.1) wurde kommerziell erhältliches Tween<sup>®</sup> 80 als Emulgator verwendet, das geringe Mengen Peroxide enthalten kann. Daher kann die Substrat-Stammlösung ebenfalls Spuren von Peroxiden enthalten. Da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das Cosubstrat der Peroxidasen ist, wurde untersucht, welche Menge an Peroxiden durch die Substratlösung in den Assay eingebracht wurde.

Der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt der  $\beta$ -Carotin-Stammlösung wurde mit Hilfe des PEROXsay™-Assays (s. 2.1.5) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben. Die ermittelte Konzentration in der Stammlösung betrug  $143 \pm 18 \mu\text{M}$ . Bei den Untersuchungen für den Umsatz

von  $\beta$ -Carotin nach dem unter 2.6.3.2 beschriebenen Assay wird durch die Substratlösung eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von  $8,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$  pro Ansatz erreicht. Diese Konzentration entspricht 7% der unter 3.4.8.5 ermittelten optimalen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration.

Wurde Kulturüberstand als Probe in den Assay eingesetzt, wurde eine Umsetzung von  $\beta$ -Carotin nur durch die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erreicht. Die durch die Substratlösung eingebrachte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge musste durch Zugabe von mindestens  $12,5 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  erhöht werden, um eine Umsetzung des Substrats zu erreichen.

### 3.4.8.7 Einfluss von $\text{O}_2$

Die Umsetzung des Substrates  $\beta$ -Carotin ohne die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wies darauf hin, dass die Peroxidase noch eine andere katalytische Funktion hat. Daher wurde überprüft, ob die im Puffer gelösten Gase die Umsetzung von  $\beta$ -Carotin durch das Enzym beeinflussen. Dafür wurde der Reaktionspuffer frisch hergestellt und für den Assay unterschiedlich vorbereitet (s. 2.6.4.5). Die Anreicherung des Reaktionspuffers mit Sauerstoff führte zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 2,3 im Vergleich zur Umsetzung unter Standardbedingungen (Abb. 3.57). Die Entgasung des Puffers führte hingegen dazu, dass die Umsetzung von  $\beta$ -Carotin durch das Enzym fast vollständig zum Erliegen kam.

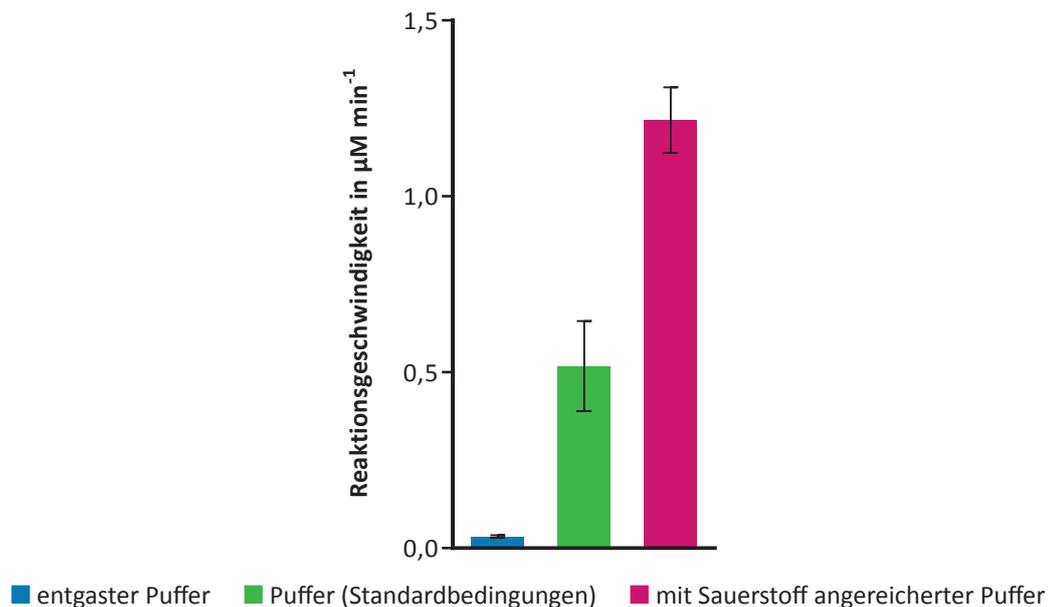


Abbildung 3.57: Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von  $\beta$ -Carotin in Abhängigkeit des Sauerstoffgehalts des Puffers

### 3.4.9 Stabilität des Enzyms unter Reaktionsbedingungen

Die Stabilität des Enzyms unter den jeweiligen Reaktionsbedingungen (Enzymkonzentration, pH-Wert, Temperatur und Lösungsmittelgehalt) wurde untersucht (s. 2.6.5.3), um das Potential für technische Anwendungen abzuschätzen. Die Enzymaktivität wurde mittels ABTS-Assay bestimmt.

#### 3.4.9.1 Stabilität des reinen Enzyms in verdünnten Lösungen

Zur Bestimmung der Stabilität in verdünnten Lösungen wurde das Enzym mit Puffer (100 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,8) bzw. Wasser 1:10 000 verdünnt (final: 2,7 nM) und bei 4 °C gelagert. Nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 24 h wurde die Aktivität bestimmt (Abb. 3.58).

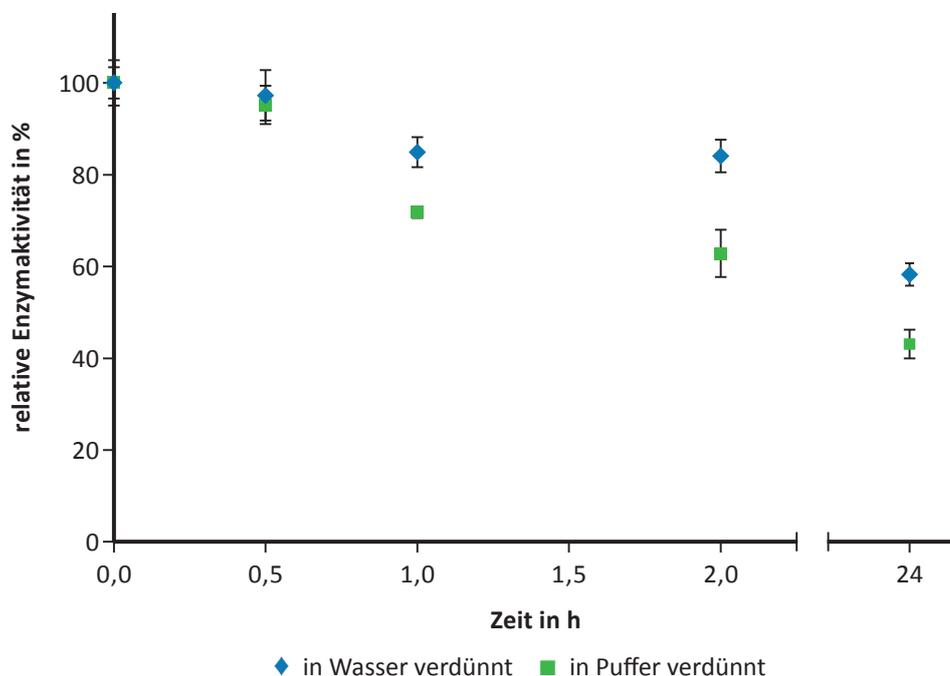


Abbildung 3.58: Relative Aktivität der DyP-Typ Peroxidase nach Verdünnung des Enzyms

Nach 0,5 h war die Enzymaktivität – unabhängig davon, ob das Enzym in Wasser oder Puffer verdünnt wurde – noch bei durchschnittlich 96%. Die Enzymaktivität nach 2 h Lagerung bei 4 °C betrug nach Verdünnen in Wasser noch 84%, während die Aktivität des in Puffer verdünnten Enzyms nur noch 63% betrug. Daher erfolgte bei allen weiteren Messungen die Vorverdünnung des Enzyms in Wasser.

### 3.4.9.2 pH-Stabilität

Zur Untersuchung der pH-Stabilität wurde die DyP-Typ Peroxidase in Natriumacetat-Puffer im pH-Bereich von 3,0 bis 5,5 bzw. in McIlvaine-Puffer im pH-Bereich von 3,0 bis 6,0 verdünnt und bei 4 °C gelagert. Nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 24 h wurde die Aktivität bestimmt und auf die Anfangsaktivität bezogen (Abb. 3.59, 3.60).

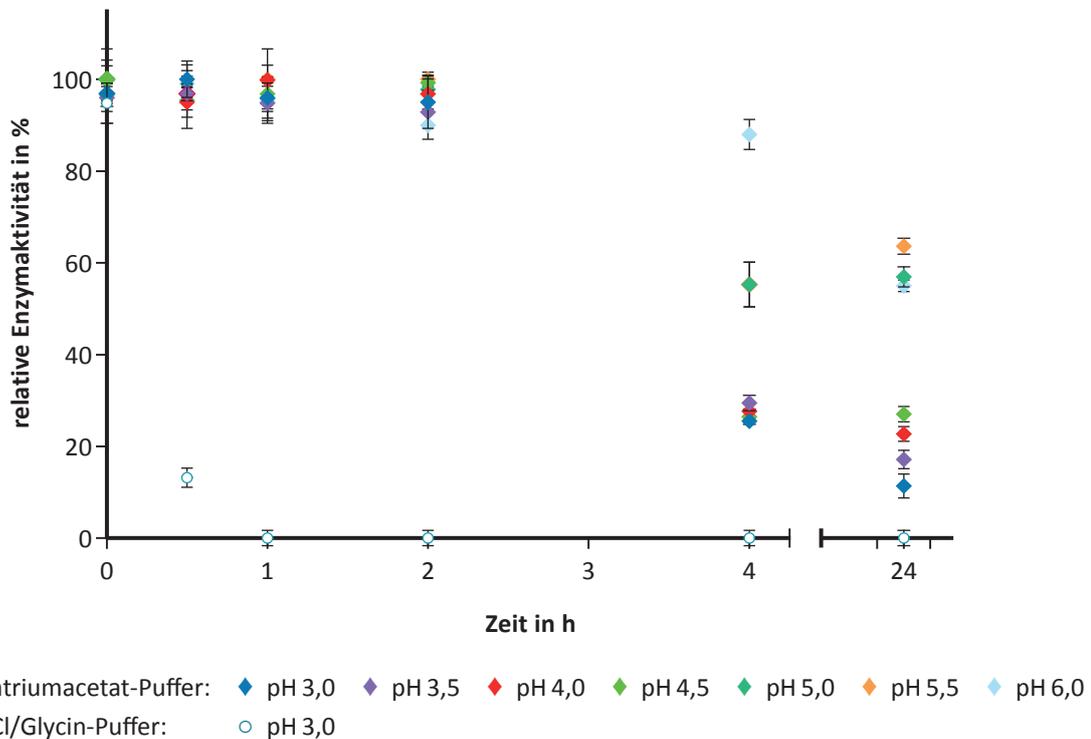


Abbildung 3.59: Relative Aktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit von der Lagerdauer bei verschiedenen pH-Werten

Die Aktivität der DyP-Typ Peroxidase blieb in Natriumacetat-Puffer im pH-Bereich von 3,0 bis 6,0 über 2 h weitgehend stabil. Nach 4 h lagen die Aktivitäten bei allen Proben noch über 20%. Die Aktivitäten für höhere pH-Werte waren deutlich höher und lagen bei pH 5,0 und 5,5 bei ~60% bzw. bei pH 6,0 bei ~90%. Nach 24 h Lagerung bei pH 5,0 bis pH 6,0 waren noch Aktivitäten bis ca. 55% der Ausgangsaktivität nachweisbar. Für die Lagerung in Natriumacetat-Puffer mit niedrigeren pH-Werten wurden nach dieser Lagerzeit maximal 30% der Ausgangsaktivität gemessen. In HCl/Glycin-Puffer pH 3,0 hatte das Enzym bereits nach 30 min fast vollständig die Aktivität verloren und nach 1 h war keine Aktivität mehr nachweisbar.

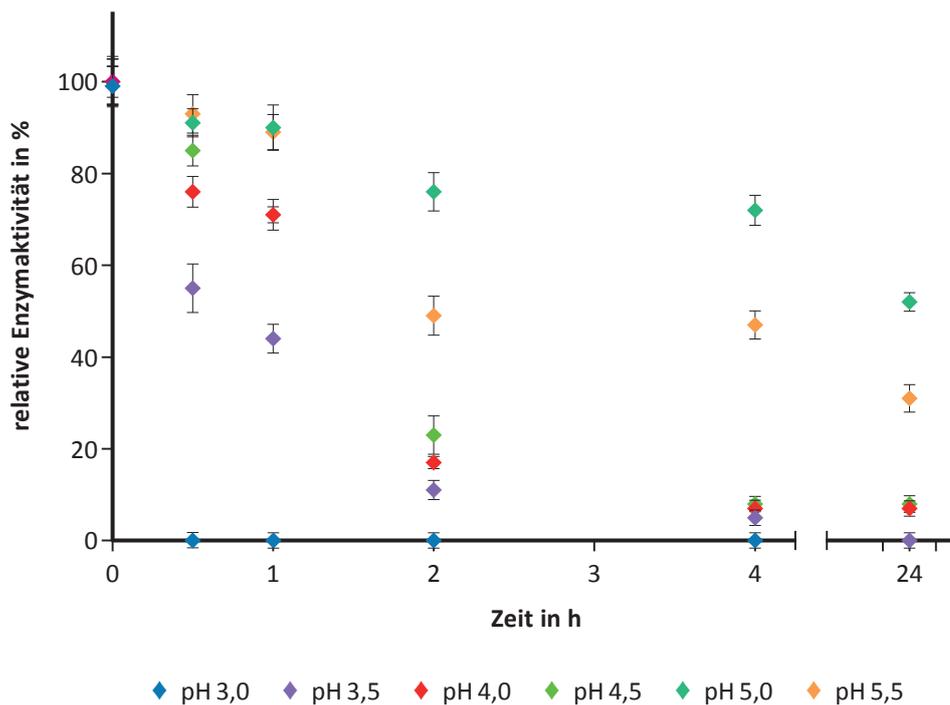


Abbildung 3.60: Relative Aktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit von der Lagerdauer in McIlvaine-Puffer mit verschiedenen pH-Werten

Die Aktivität der DyP-Typ Peroxidase nahm in McIlvaine-Puffer im pH-Bereich von 3,5 bis 4,5 rasch ab, die Aktivitäten betragen nach 2 h nur noch zwischen 10% und 20% während die Aktivität bei den pH-Werten 5,0 und 5,5 nach 4 h noch zwischen 50% und 70% lag. Nach 24 h Lagerung wurden maximal noch 55% der Ausgangsaktivität nachgewiesen.

### 3.4.9.3 Temperaturstabilität

Zur Ermittlung der Temperaturstabilität wurde die Peroxidase bei 0 °C, 25 °C und 35 °C in 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5 gelagert und anschließend die Aktivität bestimmt. Die Stabilität war bei einer Lagerung bei 0 °C am höchsten (Abb. 3.61). Nach 24 h zeigte das Enzym noch eine relative Aktivität von 60%. Das bei 25 °C gelagerte Enzym hingegen verlor nach 1 h ca. 20% der Aktivität und wies nach 24 h noch über 40% der Anfangsaktivität auf. Wurde das Enzym bei 35 °C gelagert, verlor es nach 2 h ca. 40% der Aktivität und nach 24 h war fast keine Aktivität mehr nachweisbar.

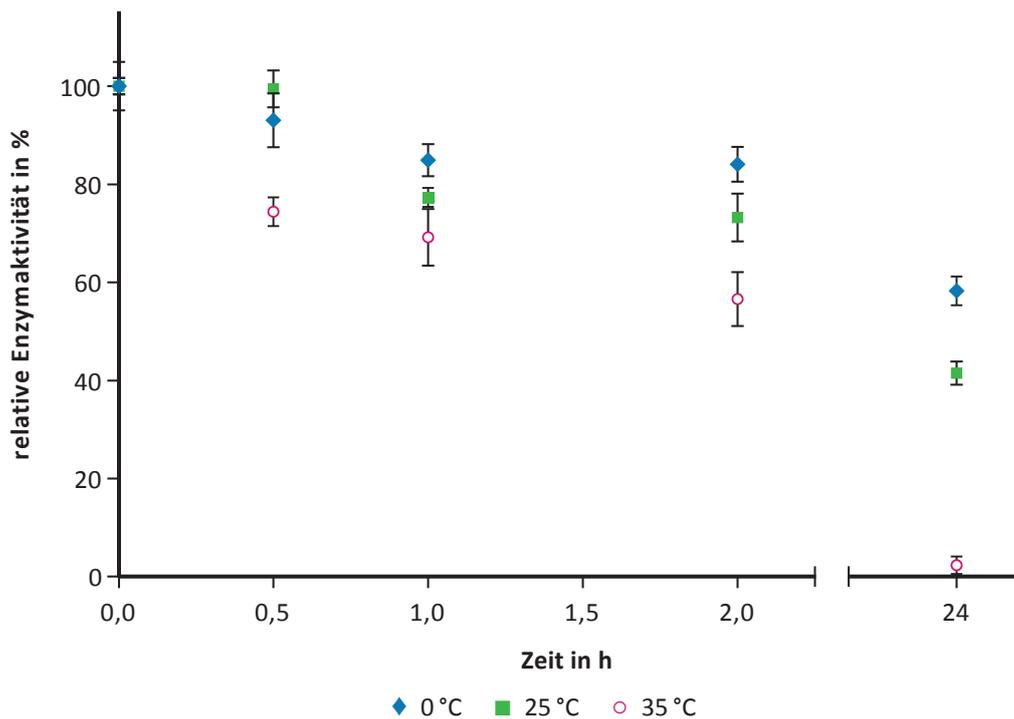


Abbildung 3.61: Relative Aktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit von der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

### 3.4.9.4 Lösungsmitteltoleranz

Die DyP-Typ Peroxidase wurde in einer 30%igen Ethanol-Lösung in 100 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,8 bzw. in Wasser bei 4 °C gelagert. Die Aktivität des Enzyms wurde über einen Zeitraum von 24 h zu definierten Zeiten (0,5 h, 1 h, 2 h und 24 h) untersucht (Abb. 3.62). Nach 1 h verlor das Enzym bereits über die Hälfte der Aktivität und nach 24 h ca. 90% der Aktivität.

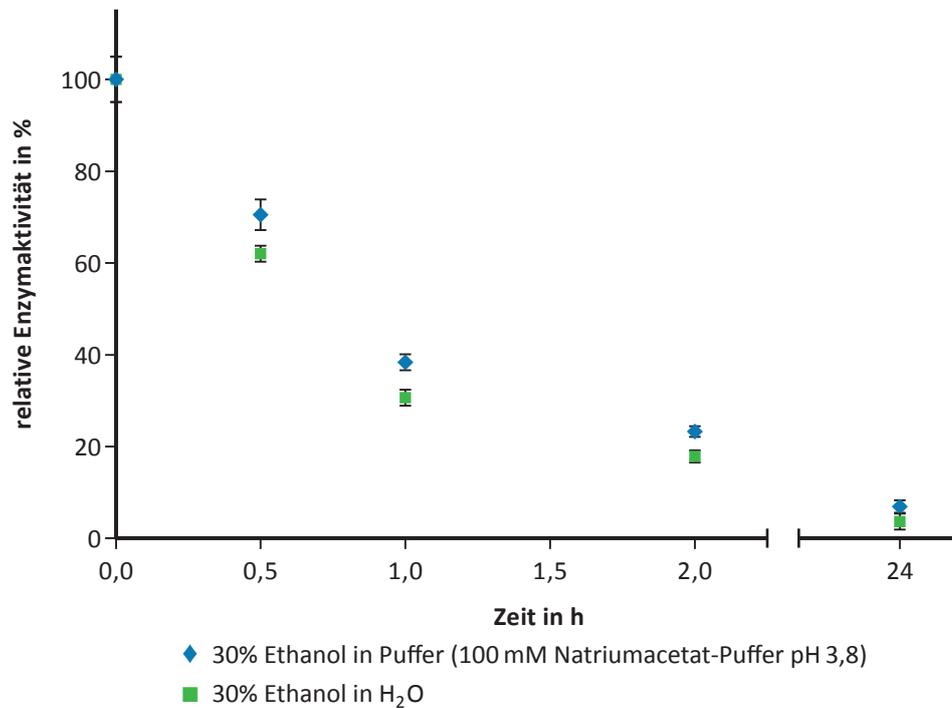


Abbildung 3.62: Relative Aktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit von der Lagerung in 30% Ethanol

### 3.4.10 Bestimmung der kinetischen Parameter der rPsaDyP

#### 3.4.10.1 Untersuchung des Substratspektrums

Für die Untersuchung des Substratspektrums und eine Einordnung der Peroxidase wurden neben ABTS und  $\beta$ -Carotin eine Auswahl charakteristischer Substrate (Tab. 3.6) untersucht (s. 2.6.3.2). Das Substratspektrum umfasste typische Substrate für Laccasen und DyP-Typ Peroxidasen sowie für Lignin-modifizierende Peroxidasen (LiP, MnP, VP).

Tabelle 3.6: Untersuchte Substrate

Substrate		Beschreibung
Annatto	Xanthophyll	natürlicher Farbstoff
Bixin	Xanthophyll	natürlicher Farbstoff
2,6-Dimethoxyphenol	Phenolderivat	typisches Substrat für MnP <sup>1</sup> bzw. LiP <sup>2</sup>
Guajakol	Phenolderivat	typisches Substrat für MnP <sup>1</sup> bzw. LiP <sup>2</sup>
Mn <sup>2+</sup>		charakteristisches Substrat für MnP <sup>1</sup>
Reactive Black 5	Azofarbstoff	charakteristisches Substrat VP <sup>3</sup>
Reactive Blue 5	Anthrachinonfarbstoff	charakteristisches DyP-Typ Substrat
Veratrylalkohol	nicht-phenolischer Aromat	typisches Substrat für MnP <sup>1</sup> bzw. LiP <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Manganperoxidasen • <sup>2</sup> Ligninperoxidasen • <sup>3</sup> versatile Peroxidasen

Für das Screening wurden die Substrate zunächst in 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,0 mit 62,5  $\mu$ M bzw. 125  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde für alle getesteten Substrate außer Mn(II) eine Umsetzung beobachtet. Anschließend wurde für alle Substrate der Puffer sowie pH-Wert ermittelt, bei dem die maximale Umsetzung erreicht wurde (Tab. 3.7). Außerdem wurden für einige Substrate die kinetischen Parameter ermittelt.

Tabelle 3.7: Optimale Puffer und pH-Werte für die Oxidation der getesteten Substrate

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

Für die Substrate  $\beta$ -Carotin, Bixin, Annatto und RBlack 5 wurden die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $k_{cat}$  nicht ermittelt. Gemessen wurde die Abnahme der Substratkonzentration, die mit der Entfärbung der Lösung einhergeht. Aufgrund der hohen Eigenabsorption dieser Substrate war es nicht möglich ausreichende Konzentrationen in den photometrischen Assays einzusetzen, um

die Substratsättigung zu erreichen und so die Bedingungen für eine Michaelis-Menten-Kinetik zu erfüllen. Für die Umsetzung von Veratrylalkohol konnten die kinetischen Parameter ebenfalls nicht bestimmt werden, da keine Substratsättigung erreicht wurde. In folgender Tabelle (s. 3.8) sind die ermittelten Aktivitäten gegenüber diesen Substraten aufgeführt.

Tabelle 3.8: Ermittelte Aktivität der rPsaDyP gegenüber verschiedenen Substraten bei der Umsetzung in 50 mM Natriumacetat-Puffer bei 30 °C

Substrat	pH	Substratkonzentration in $\mu\text{M}$	Aktivität in $\text{U L}^{-1}$	spezifische Aktivität in $\text{U mg}^{-1}$
$\beta$ -Carotin <sup>a</sup>	3,5	19	90	0,03
Bixin <sup>a</sup>	3,5	19	90	0,03
Annatto <sup>b</sup>	6,0	15	114	0,04
Veratrylalkohol	3,5	20000	2772	1,0
Reactive Black 5	4,0	48	231	0,08

<sup>a</sup> ein signifikanter Umsatz dieser Substrate wurde auch ohne Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nachgewiesen

<sup>b</sup> für dieses Substrat wurde ohne Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein schwacher Umsatz beobachtet

Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten wurden nicht im Bereich der Substratsättigung gemessen und waren somit von der eingesetzten Substratkonzentration abhängig. Daher war es nicht möglich eine Aussage über die Affinität des Enzyms zu den verschiedenen Substraten zu treffen.

### 3.4.10.2 Enzymkinetik

Die kinetischen Parameter – die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und die katalytische Konstante ( $k_{\text{cat}}$ ) – der heterolog exprimierten DyP-Typ Peroxidase wurden unter optimierten Bedingungen bestimmt (s. 2.6.6). Als Substrate wurden ABTS, DMP, Guajakol und RB 5 verwendet.

Dafür wurde zunächst für jedes Substrat die optimale Enzymkonzentration bestimmt. Anschließend wurde die Reaktionsgeschwindigkeit unter Michaelis-Menten-Bedingungen bei konstanter Enzymkonzentration und steigender Substratkonzentration bestimmt. Die Messungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurden parallel mit verschiedenen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen durchgeführt, um eine Unabhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Konzentration des Cosubstrates zu gewährleisten (s. 2.6.6.2).

Wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  in großen Mengen zugesetzt, führte dies zu einer Hemmung der Enzymaktivität. Dadurch wurden stets zu niedrige Anfangsgeschwindigkeiten ermittelt. Zudem wurde kein hyperbelförmiger Kurvenverlauf erreicht. Bei niedrigen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen wurde für niedrige Substratkonzentrationen die maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht, bei hohen Substratkonzentrationen ist die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration allerdings limitierend für das Erreichen der maximalen Umsatzgeschwindigkeit. Daher wird bei der Bestimmung der kinetischen Parameter ein zu geringes  $v_{\text{max}}$  ermittelt. In Abbildung 3.63 ist dieser Effekt exemplarisch für ABTS dargestellt. Für dieses Substrat wurden maximale Anfangsgeschwindigkeiten ( $v$ ) bei einer Wasserstoffperoxidkonzentration von  $125 \mu\text{M}$  im Assay erhalten.

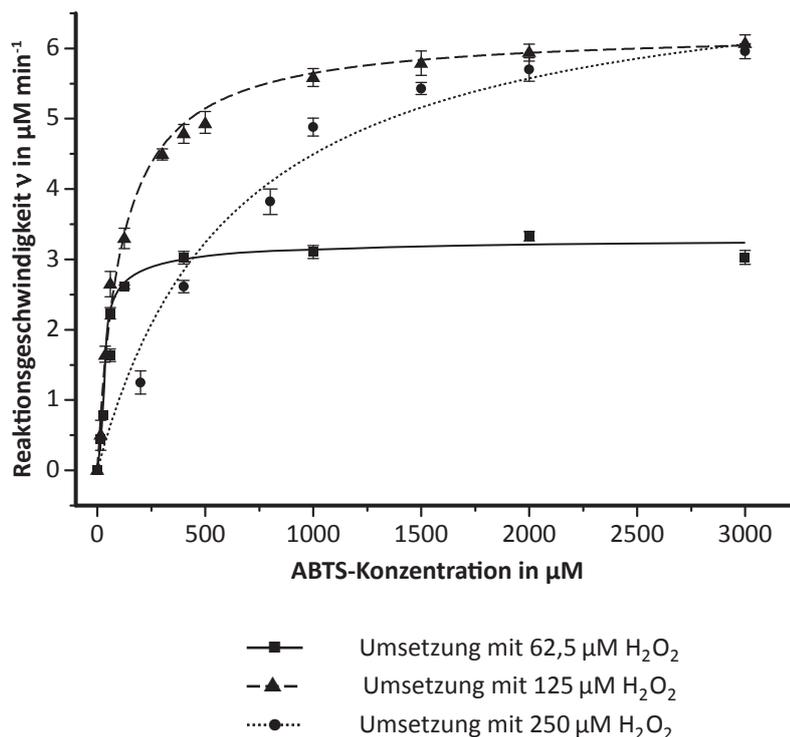


Abbildung 3.63: Einfluss der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration auf die Umsatzgeschwindigkeit. Die Sättigungshyperbeln wurden mittels nichtlinearer Regression an die Messdaten angepasst. Für alle Messreihen wurden  $0,27 \text{ nM rPsaDyP}$  eingesetzt

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ausgewählt, bei der die maximalen Anfangsgeschwindigkeiten nicht limitiert bzw. inhibiert wurden. Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten ( $v$ ) wurden direkt linear gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Abb. 3.64). Mit Hilfe der Software OriginPro 8.6 wurde, entsprechend den Vorgaben für eine Michaelis-Menten-Kinetik, durch eine nichtlineare Regression eine Sättigungshyperbel an die Messdaten angepasst. Die enzymkinetischen Parameter ( $K_m$  und  $v_{\text{max}}$ ) wurden direkt aus der Hyperbel ermittelt (Tab. 3.9).

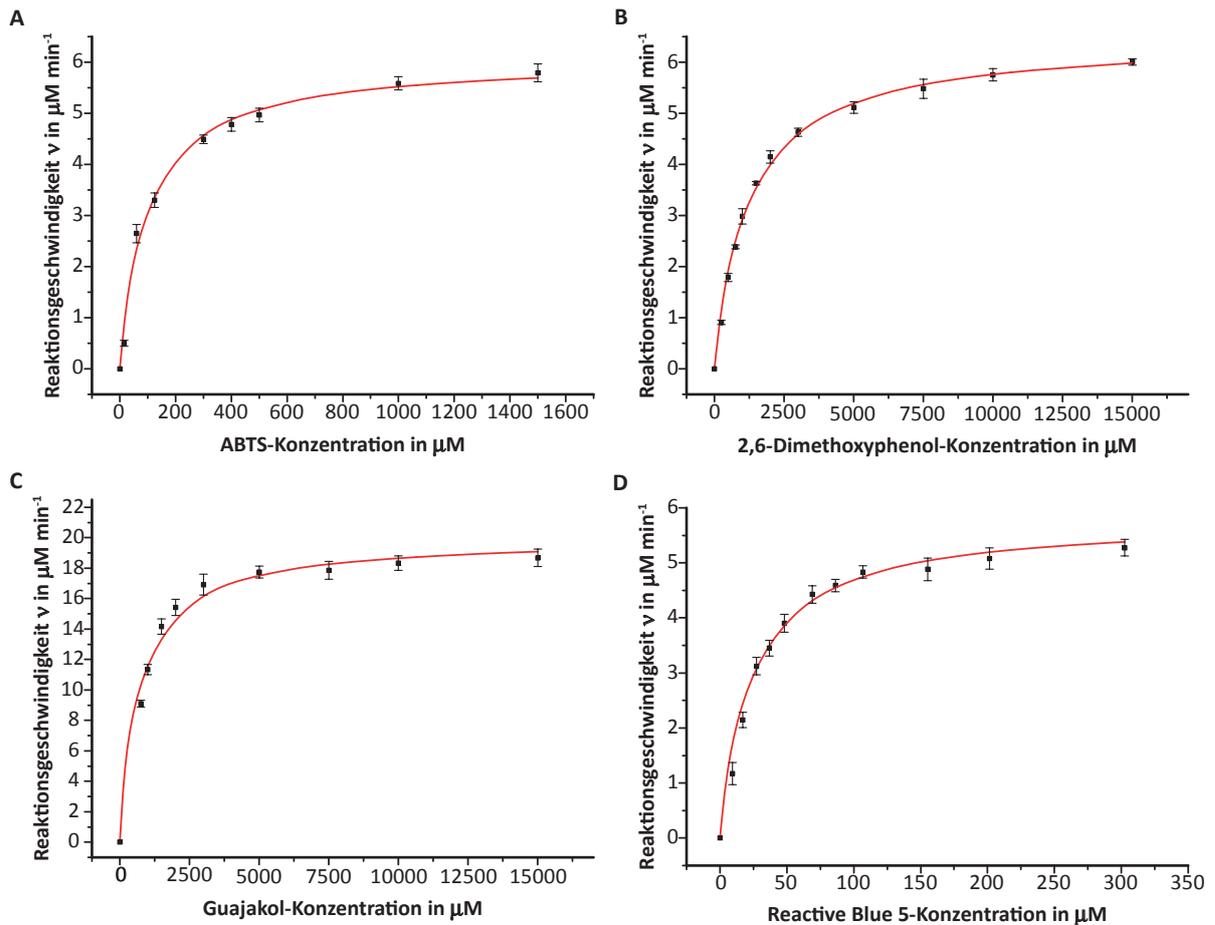


Abbildung 3.64: Cornish Bowden Diagramme zur Herleitung der enzymkinetischen Parameter der rPsaDyP. Aufgetragen ist die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Die Diagramme wurden mit OriginPro 8.6 erstellt und die Sättigungshyperbel (—) mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung  $v = (\nu_{\max} \times S) / (K_m + S)$  an die Messdaten (■) angepasst

Tabelle 3.9: Kinetische Parameter für die rekombinante DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*

Substrate	pH	Enzymkonzentration in nM	$K_m$ in $\mu\text{M}$	$k_{\text{cat}}$ in $\text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ in $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$	$\nu_{\max}$ in $\mu\text{M s}^{-1}$
ABTS	3,8	0,27	99	375	$3,8 \cdot 10^6$	0,10
DMP	4,5	1,8	1227	60	$4,9 \cdot 10^4$	0,11
Guajakol	4,5	4,50	713	74	$1,0 \cdot 10^5$	0,35
Reactive Blue 5	4,0	5,4	24	18	$7,5 \cdot 10^5$	0,10

Die rPsaDyP weist eine hohe Affinität gegenüber ABTS auf und die Wechselzahl ist am höchsten, damit wird dieses Substrat mit der höchsten Effizienz umgesetzt. Die höchste Affinität zeigt das Enzym zu RB 5, allerdings ist die Wechselzahl geringer als für ABTS, daher wird RB 5 mit einer geringeren Effizienz umgesetzt. Die niedrigste Affinität hat das Enzym zu DMP und Guajakol. Diese Substrate werden von der rPsaDyP mit der niedrigsten katalytischen Effizienz umgesetzt.

### 3.4.10.3 Einfluss von $Mn^{2+}$

Die Oxidation von DMP durch die untersuchte DyP-Typ Peroxidase wurde auch mit Zusatz von  $MnSO_4$  untersucht (s. 2.6.7.1). Die Aktivität des Enzyms gegenüber DMP wurde durch die Zugabe von unterschiedlichen Mangansulfatkonzentrationen bei einer niedrigen  $H_2O_2$ -Konzentration nicht beeinflusst. Daneben wurde  $Mn^{2+}$  direkt als Substrat der Peroxidase eingesetzt, um eine Manganperoxidasefunktion nachzuweisen (s. 2.6.7.2). Dabei wurde keine Oxidation von Mn(II) durch die rPsaDyP nachgewiesen.

### 3.4.10.4 Umsetzung von Adlerol

Nachdem Modellsubstrate für die Monolignol-Bausteine von der rPsaDyP umgesetzt wurden, wurde auch die Umsetzung komplexer Ligninmodell-Substrate untersucht. Hierfür wurde die Umsetzung von Adlerol durch Messung von UV/Vis-Spektren (250 bis 500 nm) verfolgt (s. 2.6.7.3). Das Hauptprodukt der Oxidation von Adlerol durch Peroxidasen ist Veratrumaldehyd, das ein Absorptionsmaximum bei 310 nm besitzt (Liers *et al.* 2010). Eine Zunahme der Extinktion bei dieser Wellenlänge nach 24 h Inkubation mit aktivem im Vergleich zu hitzeinaktiviertem Enzym zeigt, dass Adlerol in geringen Mengen umgesetzt wurde (Abb. 3.65).

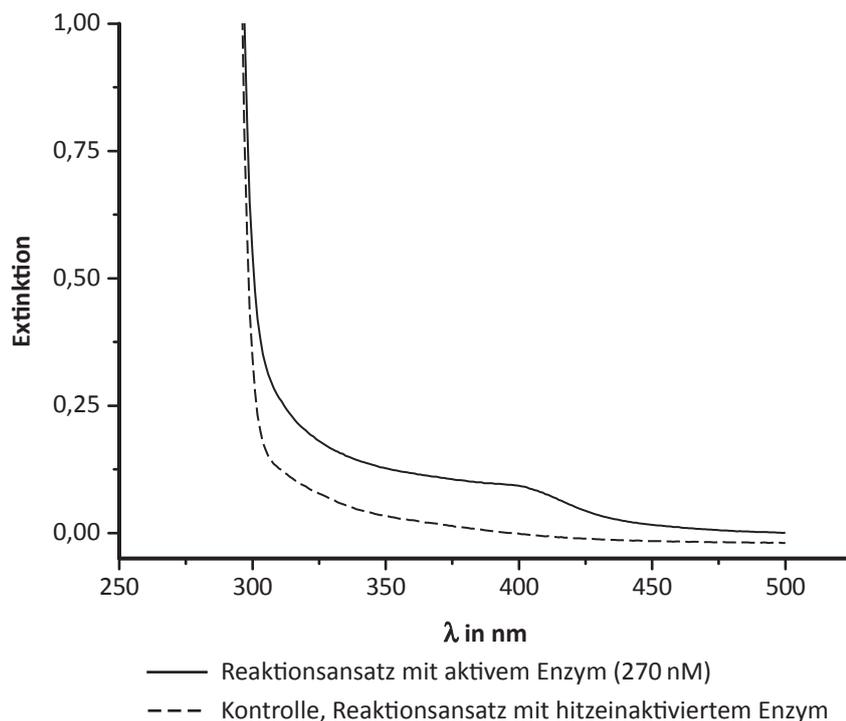


Abbildung 3.65: UV/Vis-Spektrum der Umsetzung von Adlerol durch die rPsaDyP

### 3.5 Entwicklung eines Zwei-Enzym-Systems

Mit der heterolog exprimierten Arylalkoholoxidase und der rekombinanten DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* sollte ein Zwei-Enzym-System etabliert werden. Dabei wurde die DyP-Typ Peroxidase verwendet, um verschiedene Substrate wie DMP (aromatisches Ligninmodell), ABTS oder Annatto umzusetzen. Dafür wurde als Cosubstrat  $H_2O_2$  benötigt, welches kontinuierlich durch die Oxidation von primären aromatischen Alkoholen durch die AAO\* bereitgestellt werden sollte.

#### 3.5.1 Kinetische Abstimmung der AAO\* und DyP-Typ Peroxidase

Zunächst wurde untersucht, ob die beiden Enzyme in Gegenwart der Peroxidase-Substrate bzw. von Veratrylalkohol ihr „eigenes“ Substrat umsetzen: Die Umsetzung von Veratrylalkohol durch die Arylalkoholoxidase fand auch in Gegenwart von DMP, ABTS und Annatto statt. Die Umsetzung von Veratrylalkohol in Gegenwart von ABTS konnte nicht direkt überprüft werden, da die Extinktion von ABTS die des Veratrumaldehyds überlagerte. Durch die Bestimmung des entstehenden  $H_2O_2$  konnte indirekt nachgewiesen werden, dass die AAO\* den Alkohol oxidiert. Alle Peroxidase-Substrate wurden durch die rPsaDyP in Gegenwart von Veratrylalkohol umgesetzt. Die Peroxidase setzt ebenfalls Veratrylalkohol um, allerdings zeigte die Peroxidase eine so niedrige Affinität zu dem Alkohol, dass die beiden Enzyme in einem Zwei-Enzym-System nicht um dieses Substrat konkurrierten. Beide Enzyme werden durch das Substrat des jeweils anderen nicht negativ beeinflusst.

Im AAO-Assay wird eine Erniedrigung der Umsatzgeschwindigkeit der AAO\* durch das entstehende  $H_2O_2$  mit Hilfe von Katalase verhindert. Im Zwei-Enzym-System wird das Coprodukt durch die rPsaDyP umgesetzt und so eine Inhibierung der AAO\* verhindert. Dabei wurden für die Umsetzung von Veratrylalkohol vergleichbare Umsatzgeschwindigkeiten ermittelt ( $12,9 \mu M \text{ min}^{-1}$  mit Katalase bzw.  $12,8 \mu M \text{ min}^{-1}$  mit rPsaDyP). Wurde kein Wasserstoffperoxid-umsetzendes Enzym im Assay verwendet, führte dies zu einer Inhibierung der Arylalkoholoxidase durch das Coprodukt. Unmittelbar vor dem Einsatz der beiden Enzyme im Zwei-Enzym-System wurde ihre Aktivität überprüft, um geeignete Konzentrationen in Abhängigkeit der Substrate für den Assay einzusetzen.

Bei der Charakterisierung der DyP-Typ Peroxidase wurde gezeigt, dass diese – abhängig vom Substrat – bestimmte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen benötigt bzw. toleriert und das Substrat umsetzt. Im Zwei-Enzym-System wurde der Einfluss der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration auf die Peroxidase-Aktivität ebenfalls untersucht. Hierzu wurden verschiedene AAO-Konzentrationen in den Assay eingesetzt und die Aktivität der Peroxidase in Abhängigkeit der AAO-Konzentration bzw. des gebildeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  bestimmt (Abb. 3.66 A). Eine Steigerung der AAO-Konzentration führte zunächst zu einer Steigerung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung und parallel dazu zu einer Erhöhung der DyP-Aktivität. Wurde so viel AAO\* in den Assay eingesetzt, dass  $18 \mu\text{M min}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildet wurde, führte dies zu einer Verminderung der Umsatzgeschwindigkeit der rPsaDyP. Wurde die AAO-Konzentration weiter gesteigert, sank die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und die Aktivität der rPsaDyP stieg wieder. In Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität der verwendeten AAO\* trat dieser Effekt in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen auf. Die Aktivität der rPsaDyP wurde früher inhibiert, als anhand der Positivkontrolle mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu erwarten war (Abb. 3.66 B).

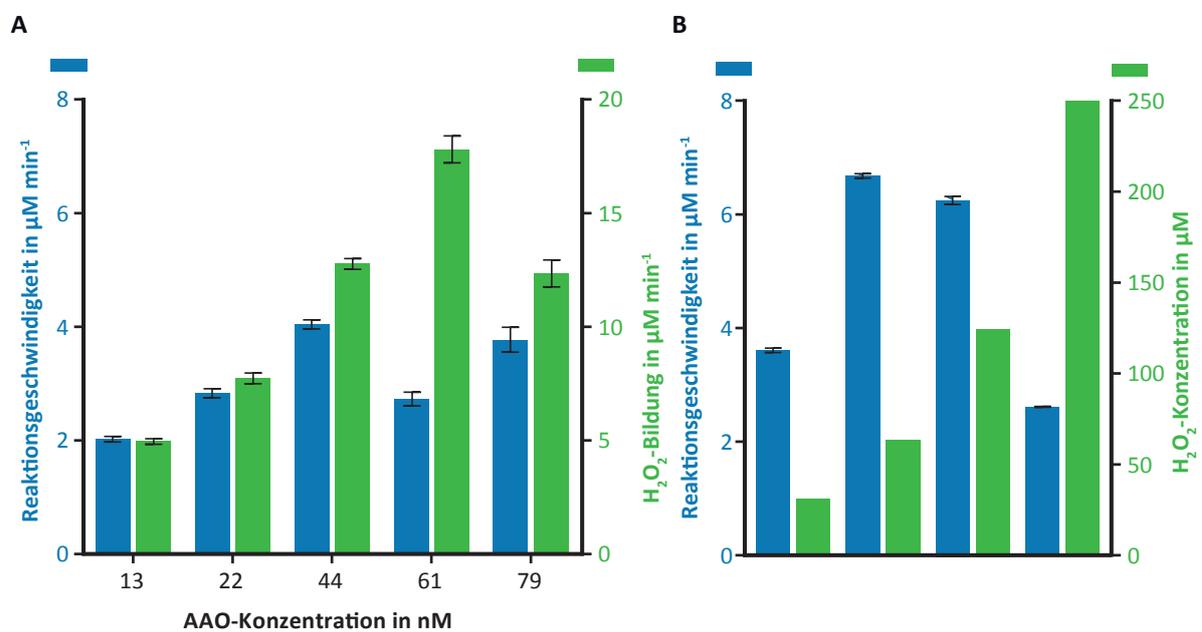


Abbildung 3.66: DyP-Aktivität für den Umsatz von DMP (■) in Abhängigkeit von  
 A – der Arylalkoholoxidase-Konzentration bzw. der durch die Arylalkoholoxidase produzierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge<sup>2</sup>(■) und  
 B – der hinzugefügten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge (■)

<sup>2</sup>Die Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  pro Minute wurde aus dem Umsatz von Veratrylalkohol errechnet

### 3.5.2 Oxidation von DMP mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems

Die höchste Aktivität der rPsaDyP für den Umsatz von DMP liegt bei pH 4,5 (Tab. 3.7). Die Arylalkoholoxidase hat bei diesem pH-Wert eine Aktivität von 90%. Eine Umsetzung von DMP durch die rPsaDyP bei pH 6,0 wurde nicht nachgewiesen. Daher wurde das Zwei-Enzym-System bei pH 4,5 etabliert. Die höchste Enzymaktivität zeigt die rPsaDyP bei einer Temperatur zwischen 20 °C und 30 °C (s. 3.4.8.4). Außerhalb dieses Temperaturbereiches sinkt die Aktivität deutlich ab. Da die Aktivität der Arylalkoholoxidase bei 30 °C noch größer als 55% ist, wurde das Zwei-Enzym-System bei 30 °C etabliert (Tab. 3.10). Abbildung 3.67 zeigt den Umsatz des Ligninmodellsubstrates 2,6-Dimethoxyphenol im Zwei-Enzym-System sowie im Vergleich Positiv- und Negativkontrolle. Parallel zum Umsatz des DyP-Substrates wurde der Umsatz von Veratrylalkohol kontrolliert (Abb. 3.68). Nur im Zwei-Enzym-System wurde Veratrylalkohol oxidiert und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Assay produziert. In der Positivkontrolle – bestehend aus der Peroxidase und dem benötigtem Cofaktor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – erfolgte der Umsatz von DMP nicht kontinuierlich und wurde bereits nach 6 min deutlich verringert. Bei der Negativkontrolle (mit rPsaDyP, ohne Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und ohne AAO) erfolgte kein Umsatz des Modells substrates. Im Zwei-Enzym-System wurde im Vergleich zur Positivkontrolle DMP kontinuierlich über einen Zeitraum von 15 min oxidiert (Abb. 3.67). Dabei wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontinuierlich von der Arylalkoholoxidase zur Verfügung gestellt, welches von der rPsaDyP verbraucht wurde.

Tabelle 3.10: Zweienzymassay für den Umsatz von DMP

	Zwei-Enzym-System	Positivkontrolle	Negativkontrolle
AAO* (16,2 U mg <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	25 µL	–	–
rPsaDyP (33,5 U mg <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	20 µL	20 µL	20 µL
Puffer <sup>3</sup>	85 µL	85 µL	85 µL
DMP <sup>4</sup>	10 µL	10 µL	10 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>5</sup>	–	50 µL	–
H <sub>2</sub> O	50 µL	–	50 µL
Veratrylalkohol <sup>6</sup>	10 µL	10 µL	10 µL
Rückfaltungspuffer	–	25 µL	25 µL
Gesamtvolumen		200 µL	

<sup>1</sup> final 5 mU • <sup>2</sup> final 3 mU • <sup>3</sup> Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4,5) • <sup>4</sup> 100 mM gelöst in 30% Ethanol • <sup>5</sup> 0,125 mM •

<sup>6</sup> 100 mM in Puffer

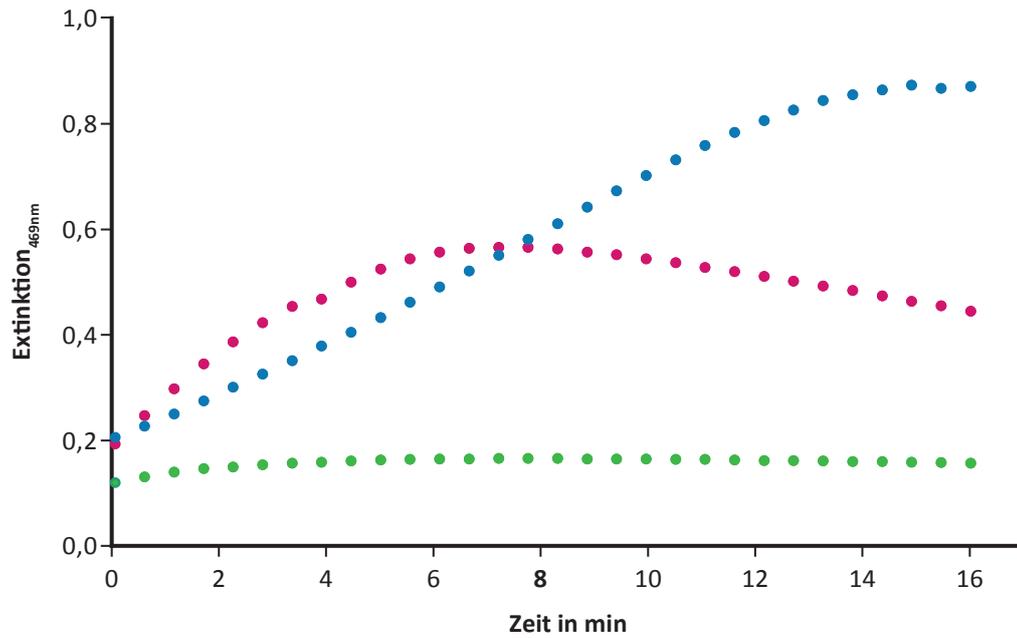


Abbildung 3.67: Umsatz von DMP durch das AAO-DyP-Zwei-Enzym-System (•) im Vergleich zur Umsetzung des Substrates in einem einfachen Enzym-System aus DyP mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (•) bzw. ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (•) (50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5 bei 30 °C)

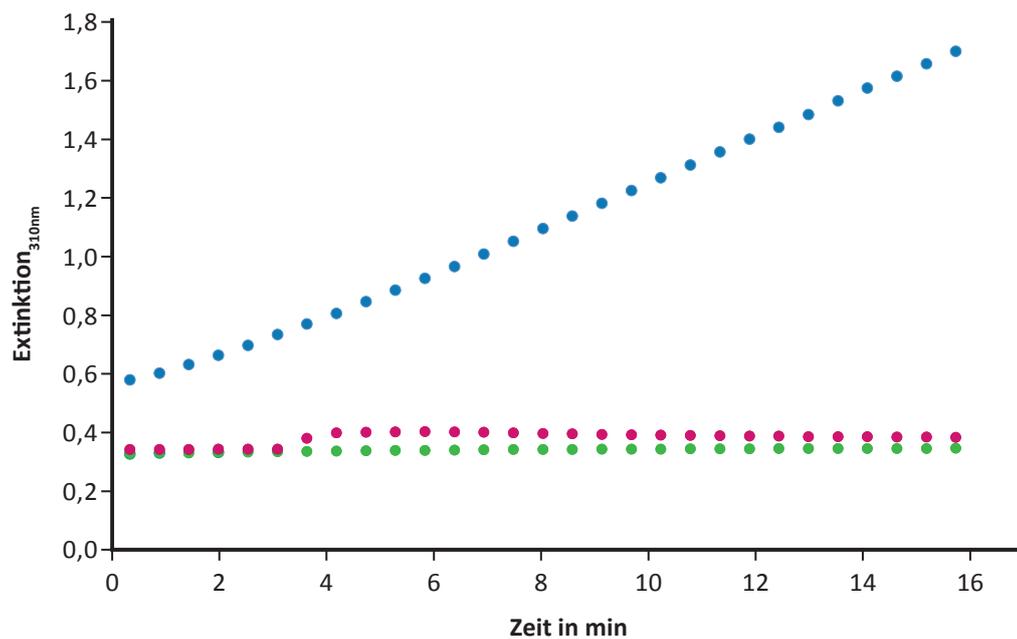


Abbildung 3.68: Parallel zum DMP-Umsatz gemessene Oxidation von Veratrylalkohol im AAO-DyP-Zwei-Enzym-System (•) bzw. rPsaDyP mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (•) bzw. ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (•) im Vergleich (50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5 bei 30 °C)

### 3.5.3 Oxidation von ABTS mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems

Für die Umsetzung von ABTS wurde ebenfalls Natriumacetat-Puffer pH 4,5 und 30 °C verwendet. ABTS wird von der rPsaDyP optimal bei pH 3,8 umgesetzt (s. 3.4.8.2). Zur Optimierung des Assays wurde ein pH in der Mitte der pH-Optima beider Enzyme gewählt. Der Assay wurde hinsichtlich des ABTS-Umsatzes optimiert (Tab. 3.11). Die Substratkonzentration wurde so gewählt, dass sie im Sättigungsbereich für die DyP-Typ Peroxidase lag. Für den Umsatz von ABTS wurde im Vergleich zu DMP als Substrat nur eine niedrige Konzentration H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> benötigt, daher wurde eine AAO\* mit niedrigerer spezifischer Aktivität eingesetzt. Im Zwei-Enzym-System konnte die Oxidation von Veratrylalkohol aufgrund der Absorption von ABTS nicht nachvollzogen werden.

Tabelle 3.11: Zweienzymassay für den Umsatz von ABTS

	Zwei-Enzym-System	Positivkontrolle	Negativkontrolle
AAO* (4,2 U mg <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	35 µL	-	-
rPsaDyP (209,5 U mg <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	40 µL	40 µL	40 µL
Puffer <sup>3</sup>	70 µL	70 µL	70 µL
ABTS <sup>4</sup>	20 µL	20 µL	20 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>5</sup>	-	25 µL	-
H <sub>2</sub> O	25 µL	-	25 µL
Veratrylalkohol <sup>6</sup>	10 µL	10 µL	10 µL
Rückfaltungspuffer	-	35 µL	35 µL
Gesamtvolumen		200 µL	

<sup>1</sup> final 1,3 mU • <sup>2</sup> final 24 mU • <sup>3</sup> Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4,5) • <sup>4</sup> 4 mM gelöst in Wasser • <sup>5</sup> 0,25 mM •

<sup>6</sup> 100 mM in Puffer

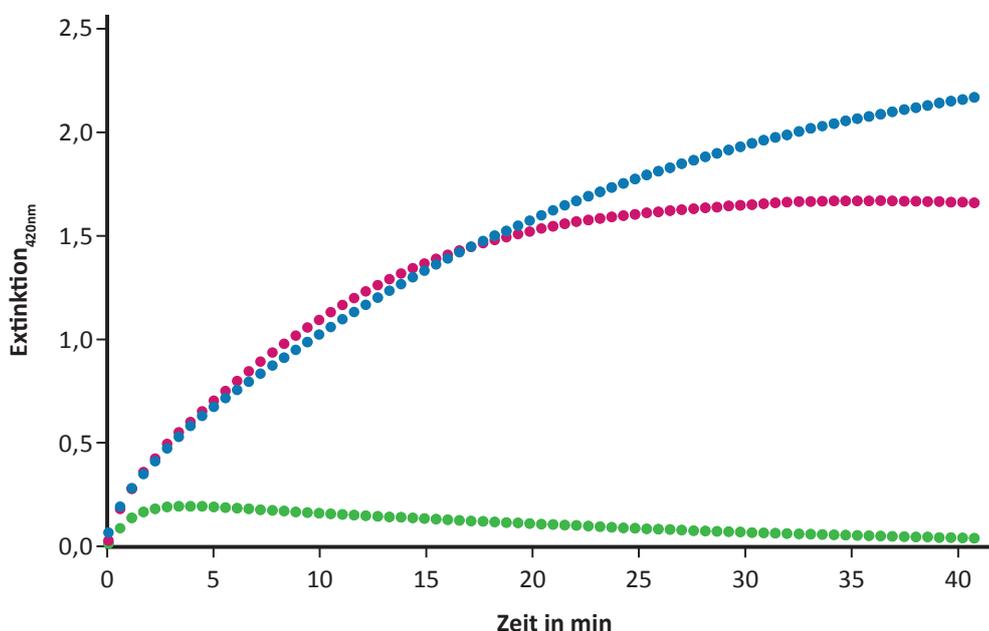


Abbildung 3.69: Umsatz von ABTS in 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5 bei 30 °C durch das AAO-DyP-Zwei-Enzym-System (•) und die rPsaDyP mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (•) bzw. ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (•) im Vergleich

Im optimierten Zwei-Enzym-System war zunächst eine vergleichbare Umsatzgeschwindigkeit zur Positivkontrolle zu beobachten (Abb. 3.69). Nach etwa 15 min jedoch wurde der Umsatz von ABTS bei der Positivkontrolle verlangsamt und stagnierte nach ca. 20 min annähernd, während der Umsatz im Zwei-Enzym-System über einen Zeitraum von 40 min kontinuierlich erfolgte. Im Vergleich zur Positivkontrolle wurde das Substrat beim Zwei-Enzym-System trotz einer nahezu gleichen Anfangsgeschwindigkeit länger andauernd umgesetzt und somit mehr Produkt gebildet. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde kontinuierlich über den Zeitraum von 40 min bereitgestellt. Bei der Negativkontrolle war ein minimaler Umsatz zu beobachten, der jedoch nach ca. 2 min bereits stagnierte.

### 3.5.4 Abbau von Annatto mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems

Anschließend wurde die Oxidation des industrierelevanten Farbstoffs Annatto durchgeführt (Tab. 3.12). Der Abbau von Annatto erfolgte ebenfalls bei pH 4,5. Der pH-Wert wurde gewählt, da dieser dem pH-Wert der Molke entspricht. Die für den Abbau von Annatto benötigte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge ist vergleichbar mit der Menge für den Abbau von ABTS. Daher musste auch für den Umsatz dieses Substrates die AAO-Konzentration niedrig gehalten werden, um eine Hemmung der rPsaDyP durch eine zu rasche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion zu verhindern.

Tabelle 3.12: Zweienzymassay für den Umsatz von Annatto

	Zwei-Enzym-System	Positivkontrolle	Negativkontrolle
AAO* (6,2 U mg <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	10 µL	–	–
rPsaDyP (0,04 U mg <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	20 µL	20 µL	20 µL
Puffer <sup>3</sup> bzw. Molke	110 µL	110 µL	110 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>4</sup>	–	50 µL	–
H <sub>2</sub> O	50 µL	–	50 µL
Veratrylalkohol <sup>5</sup>	10 µL	10 µL	10 µL
Rückfaltungspuffer	–	10 µL	10 µL
Gesamtvolumen		200 µL	

<sup>1</sup> final 0,5 mU • <sup>2</sup> final 0,2 mU • <sup>3</sup> Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4,5) mit Annatto (0,3% (v/v)) • <sup>4</sup> 0,25 mM •

<sup>5</sup> 100 mM in Puffer

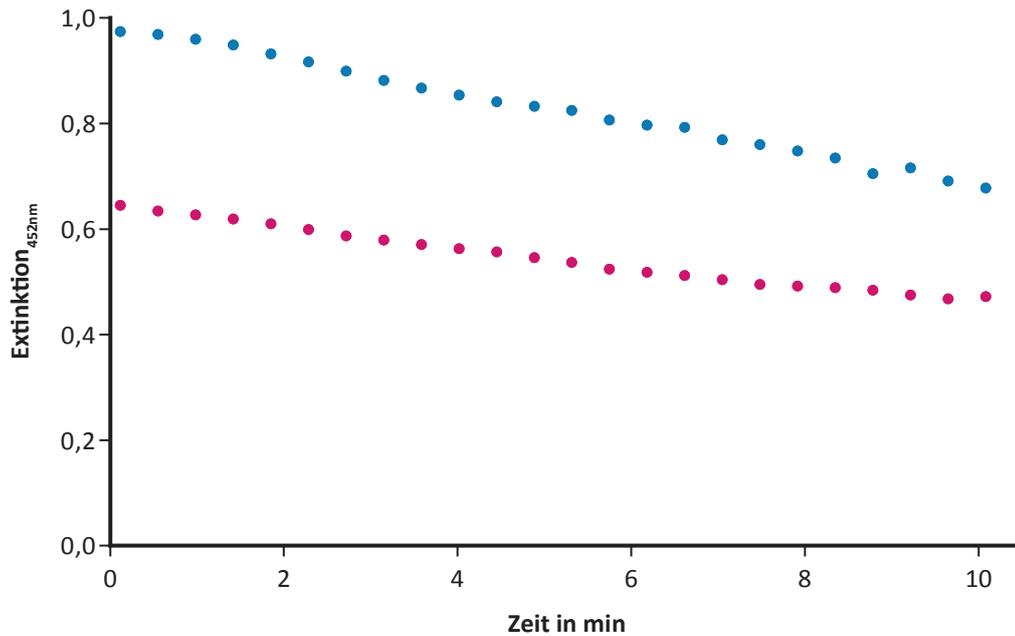


Abbildung 3.70: Abbau des Farbstoffs Annatto bei pH 4,5 durch das AAO-DyP-Zwei-Enzym-System (•) im Vergleich zum Abbau durch die rPsaDyP mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (•)

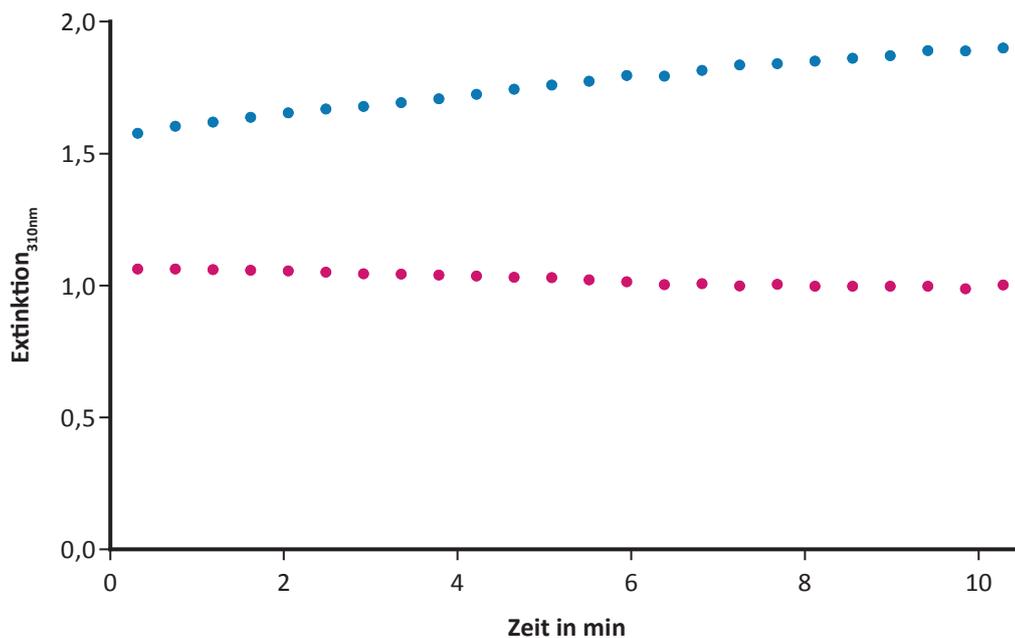


Abbildung 3.71: Parallel zum Annatto-Abbau gemessene Oxidation von Veratrylalkohol im AAO-DyP-Zwei-Enzym-System (•) bzw. rPsaDyP mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (•) im Vergleich

Im Vergleich zur Positivkontrolle wurde Annatto im optimierten Zwei-Enzym-System effizienter und schneller abgebaut (Abb. 3.70). Bei der kontinuierlichen Zuführung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die Arylalkoholoxidase wurde die Umsatzgeschwindigkeit der rPsaDyP gegenüber einer einmaligen Gabe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gesteigert. Die Negativkontrolle zeigte keinen Substratumsatz. Parallel zum

Abbau von Annatto wurde der Umsatz von Veratrylalkohol kontrolliert (Abb. 3.71). Nur im Zwei-Enzym-System wurde Veratrylalkohol oxidiert und  $H_2O_2$  im Assay produziert.

### 3.5.5 Bleichung von Molke mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems

Das hinsichtlich der Umsetzung von Annatto optimierte Zwei-Enzym-System wurde zur Bleichung von Annatto-gefärbter Molke eingesetzt. Die verwendete Molke (Strothmann reine Molke; pH 4,5) wurde pur bzw. mit Annatto versetzt eingesetzt. Die Assayzusammensetzung wurde auf 1 mL hochskaliert (s. 2.6.8.1). Anstelle des Puffers wurde Molke eingesetzt. Eine Bleichung der gefärbten Molke war mit dem Zwei-Enzym-System aus Arylalkoholoxidase und rPsaDyP möglich (Abb. 3.72). Beide Enzyme waren auch unter den in der Molke gegebenen Bedingungen aktiv. Gegenüber der Positivkontrolle wurde der Umsatz durch das optimierte Zwei-Enzym-System gesteigert. Bei der ungefärbten Molke war innerhalb von 12 h keine Bleichung erkennbar. Bei der Molkebleichung wurde der Vorteil des Zwei-Enzym-Systems besonders deutlich. Im Vergleich zur Positivkontrolle mit  $H_2O_2$  ist die Bleichung mit dem Zwei-Enzym-System deutlich effektiver (Abb. 3.72). Eine Negativkontrolle wurde stets mitgeführt, aber weder der Einsatz der Arylalkoholoxidase alleine noch der Einsatz der DyP-Typ Peroxidase alleine führte zu einer Farbveränderung der Probe.

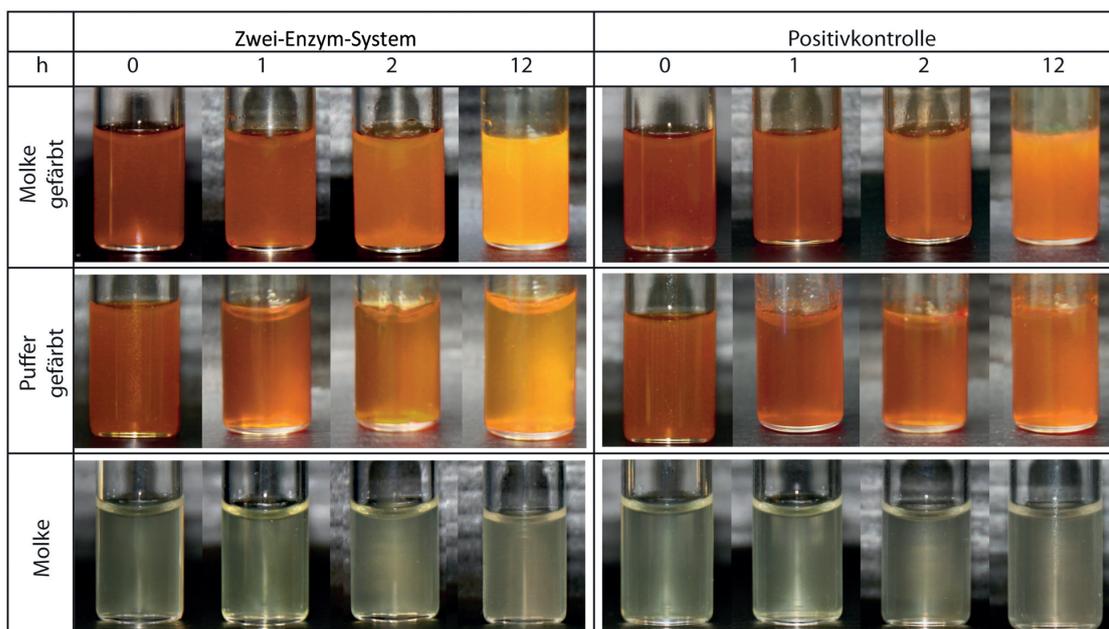


Abbildung 3.72: Bleichung der mit Annatto gefärbten Molke bzw. des gefärbten Puffers (50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5) über 12 h mittels Zwei-Enzym-System und Vergleich mit der Positivkontrolle (Zugabe von  $H_2O_2$ ) sowie der ungefärbten Molke

### 3.6 GDS(L)-Lipase

#### 3.6.1 Amplifizierung und Isolierung der codierenden Sequenz einer GDS(L)-Lipase

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde Myzel (ca. 100 mg) vom Tag der höchsten Lipaseaktivität (Tag 5) der Kultivierung mit Tween® 80 als Kohlenstoffquelle verwendet (s. 2.2.1.5). Mit der isolierten Gesamt-RNA wurde eine cDNA-Bibliothek erstellt und diese zur weiteren Klonierung verwendet. Die Amplifizierung der Gesamtsequenz (cDNA) der GDS(L)-Lipase erfolgte mittels PCR. Die benötigten Primer wurden von der genomischen DNA-Sequenz einer potentiellen Lipase von *P. ostreatus* abgeleitet. Die Lage wurde so gewählt, dass das amplifizierte Fragment sowohl das Start- als auch das Stoppcodon der GDS(L)-Lipase enthielt (s. 2.3.5.1).

ATGCTCCGAT	CCTTTGTCGT	ACTGACATCC	GTCTGCGCTG	CCTACGCTGC	AGTACTTCCC	60
M L R S	F V V	L T S	V C A A	Y A A	V L P	
CGCGACGCAC	CCAACGGCGT	TCACTTGGCC	GTTGATCCAA	AGTGCGGTGT	TGCGGGGGGA	120
R D A P	N G V	H L A	V D P K	C G V	A G G	
CGATTTGGCG	ATGTCAACAT	CGTCTCAAA	CCGTTGACAT	CCTACGAACA	TATCGTCGCA	180
R F G D	V N I	G L K	P L T S	Y E H	I V A	
TTTGAGACT	CATGGACTGA	CGGAGGAGCA	CATAACGGAG	AGCCGTTACC	GCCACCAGTT	240
F <b>G D S</b>	<b>W</b> T D	G G A	H N G E	P L P	P P V	
CTTACACCAC	CAAACCCAAG	GGCTGGAGGA	CGGGCGAGTA	ATGGTCCTGT	ATGGGTGGAG	300
L T P P	N P R	A G G	R A S N	G P V	W V E	
AAATTGGCTT	CGGCTGCTGG	TGCAACCTTG	CTCGACTTTG	CAGAAATTGG	CGCTGTTACA	360
K L A S	A A G	A T L	L D F A	E I G	A V T	
GATAAAAATA	TCTGGCCATC	TAGTCTGCTT	CCTACCACCG	CATCGAGCGC	AAACGACTTT	420
D K N I	W P S	S L L	P T T A	S S A	N D F	
GTCGGTCAAG	CGCACAACTA	CATTAATCAA	CGAAACGGAT	TTGATCCAGA	GACGACACTA	480
V G Q A	H N Y	I N Q	R N G F	D P E	T T L	
TATACCATAT	TCCTCGGAGT	CGGGGACTTT	GACTTGTCCC	AACAAACGGG	CACTGATAAC	540
Y T I F	L G V	G D F	D L S Q	Q T G	T D N	
CTCTACACGG	TGGCTGGCGC	CATCGTATAC	ACGATCCTTG	AACTCACTTC	CTACCCACA	600
L Y T V	A G A	I V Y	T I L E	L T S	Y P T	
TACGCCAAGA	ACATAATCGT	CGTTGACAAC	TATGGTCGTG	GAATCTACGA	AACACCGTCA	660
Y A K <u>N</u>	<u>I I V</u>	<u>V D N</u>	<u>Y G R</u>	<u>G</u>	<u>I Y E</u>	<u>T P S</u>
GGAGACGCGT	TCAAGGAAGG	CATCTACGCT	GGATTGAACA	CCCTCCACAC	GAGATACGGC	720
G D A F	K E G	I Y A	G L N T	L H T	R Y G	
ACGAGCGTCG	GGTTTGTCGA	TCTCAAGACC	CTATGGGATG	GCGTCTTGGG	CAGCAGCCCC	780
T S V G	F V D	L K T	L W D G	V L <b>G</b>	<b>S S P</b>	
GGATACGAAG	CATTTGGATA	TACCAGTAAG	GCAGCATGCT	TGCCCTCTTC	AACGTGACG	840
<b>G</b> Y E A	F G Y	T S K	A A C L	P S S	T S T	
TCTGGAGCCT	GTGCCAATCC	CGAATCAACG	TTCTACTGGC	TACCAGGGAT	ACCGTCGGCG	900
S G A C	A N P	E S T	F Y W L	P G I	P S A	
GCTACGCACG	GTCTGATCGC	AGACTACGTG	GAGAAGGTGC	TGACAACATG	CTGA	954
A T H G	L I A	D Y V	E K V L	T T C	*	

Abbildung 3.73: Nukleotidsequenz der klonierten GDS(L)-Lipase aus *Pleurotus sapidus* (oben) und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz (unten)

Hervorgehoben sind das **GDS(L)**-Motiv und das **GxSxG**-Motiv. Die in der Sekretomanalyse erhaltenen Peptidsequenzen sind schwarz unterstrichen

### 3.6.2 Bioinformatische Analyse der cDNA-Sequenz

Die klonierte cDNA-Sequenz umfasst 954 Basenpaare (Abb. 3.73) und codiert ein Protein mit einer Länge von 317 Aminosäuren. Die Sequenz wurde unter der Zugriffsnummer LN830263 bei EBI-EMBL veröffentlicht. Das Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 33,3 kDa (ExpASy ProtParam, Tab. 2.12). Der pI wurde zu 4,86 berechnet. In der Sequenz wurden die konservierten Struktur motive GDSL (Leucin ist durch Tryptophan ersetzt) und G<sub>x</sub>S<sub>x</sub>G identifiziert. Die bei Sekretomuntersuchungen des Pilzes *Pleurotus sapidus* ermittelten Peptidsequenzen (Tab. 3.1) sind in der abgeleiteten Aminosäuresequenz enthalten (Abb. 3.73).

Anhand von Datenbankrecherchen (BlastN, NCBI, InterProScan 4) wurde eine Homologie der Aminosäuresequenz zu Enzymen der SGNH-Hydrolase Superfamilie festgestellt (Abb. 3.74). Durch bioinformatische Untersuchungen (Pfam HMM, NCBI CDD) wurde das Enzym eindeutig als Mitglied der GDS(L)-Lipase/Acylhydrolase-Familie (PF00657; CD01846) identifiziert, die zu dieser Superfamilie gehören.

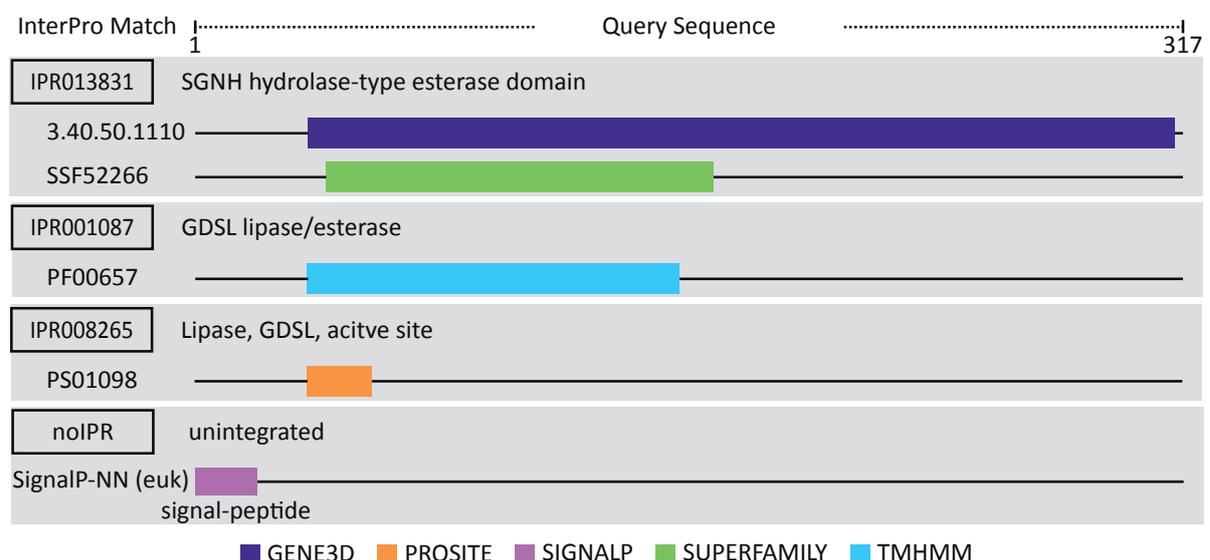


Abbildung 3.74: Funktionelle Analyse der übersetzten Aminosäuresequenz mittels InterProScan

Bei den weiteren bioinformatischen Untersuchungen wurde in der aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz mittels SignalP 4.1 (Petersen *et al.* 2011) eine potentielle Schnittstelle für eine Signalpeptidase zwischen den Aminosäuren 16 und 17 ermittelt. Demnach besteht das reife Protein aus 438 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 31,6 kDa. Mit Hilfe der Programme NetNGly1.0 (Gupta *et al.* 2004) und NetOGly 3.1 (Julenius *et al.* 2005) wurde die Sequenz auf potentielle Glykosylierungsstellen untersucht und keine potentielle N-Glykosylierungsstelle, jedoch fünf potentielle O-Glykosylierungsstellen ermittelt.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Cellulose-Bindungsdomäne (CBD), die ein Indiz für eine Beteiligung am Abbau von Lignocellulosen ist, vorhanden ist. Mittels Datenbankrecherche wurde keine bekannte CBD in der Aminosäuresequenz gefunden.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit Datenbanken (NCBI, BlastP; EMBL-EBI Blast+) zeigte, dass das Enzym nur sehr geringe Homologien zu bereits charakterisierten Lipasen/Esterasen aufweist. Die Identität zur Feruloylsterase (NCBI: CBE71381) bzw. zur Xanthophyllesterase (NCBI: CAH17527) aus *Pleurotus sapidus* war jeweils kleiner als 10%. Die Sequenz zeigte die höchste Homologie zu einem lipolytischen Protein aus der GDS(L)-Familie aus *Moniliophthora roreri*<sup>3</sup> (EMBL: ESK93427; Identität 51%).

Ein Vergleich der Nukleotidsequenz der isolierten Lipase mit dem Genom von *Pleurotus ostreatus* (Joint Genome Institute JGI, PC 15 v.2, BlastN) ergab eine Übereinstimmung von 92% zu einer Nukleotidsequenz (estExt\_fgenes1\_pg.C\_030854), die eine Identität von 81% zu einem als Phospholipase/Lecithinase/Hämolyisin annotiertem Protein aus *Burkholderia dolosa* zeigt. Die übersetzten Aminosäuresequenzen zeigen eine Übereinstimmung von 96% (Abb. 3.75).

Psa	MLRSFVVLTS	VCAAYA AVL P	RDAPNGVHLA	VDPKCGVAGG	RFGD VNIGLK	PLTSYEHIVA	60
Pos	MLRSFVVLTS	VCAAYA AVL P	RDALNGVHLA	VDPKCGVAGG	RFGD VNIGLK	SLTSYEHIVA	60
	*****	*****	*** *****	*****	*****	*****	
Psa	<b>FGDSW</b> TDGGA	HNGEPLPPP	LTPPNPRAGG	RASNGPVWVE	KLASAAGATL	LDFAEIGAVT	120
Pos	<b>FGDSW</b> TDGGA	HDGEPLPPP	LTPPNPRAGG	RASDGPVWVE	RLASAAGATL	LDFAEIGAVT	120
	*****	* *****	*****	*** *****	*****	*****	
Psa	DKNIWPSSLL	PTTASSANDF	VGQAHNYINQ	RNGFDPETTL	YTIFLGVGDF	DLSQQTGTDN	180
Pos	DKNIWPKTLL	PTTSSGANDF	VGQAHNYINQ	RNGFDPETTL	YTIFLGVGDF	DLSQQTGTDN	180
	*****	** * * * *	*****	*****	*****	*****	
Psa	LYTVAGAIIVY	TILELTSYPT	YAKNIIVVDN	YGRGIYETPS	GDAFKEGIYA	GLNTLHTRYG	240
Pos	LYTVAGAIIVY	TILELTSYPT	YAKNIIVVDN	YGRGIYETPS	GDAFKEGIYA	GLNTLHTRYG	240
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Psa	TSVGFVDLKT	LWDGVL <b>GSSP</b>	<b>G</b> YEAFGYTSK	AACLPSSTST	SGACANPEST	FYWLPGIPSA	300
Pos	TNMGFVDLKT	LWDGVL <b>GSSP</b>	<b>G</b> YEAFGYTSK	GACLPSSTST	SGACANPEST	FYWLPGIPSA	300
	*	*****	*****	*****	*****	*****	
Psa	ATHGLIADYV	EKVLTTTC					317
Pos	ATHGLIADYV	EKVLTTTC					317
	*****	*****					

Abbildung 3.75: Vergleich der Aminosäuresequenz der GDS(L)-Lipase aus *Pleurotus sapidus* (Psa) mit einer potentiellen GDS(L)-Lipase von *Pleurotus ostreatus* (Pos), deren Sequenz aus dem Genom abgeleitet wurde (JGI).

Hervorgehoben sind das **GDS(L)**-Motiv und das **GxSxG**-Motiv. Konservierte Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet

Das aktive Zentrum lipolytischer Enzyme bildet die sogenannte katalytische Triade aus den konservierten Aminosäuren Ser, Asp oder Glu und His. Mit Ausnahme des Serins, das im namensgebenden GDSL-Motiv lokalisiert ist, wurden die anderen Reste der katalytischen Triade bei beiden Sequenzen nicht zugeordnet.

Mittels SWISS-MODEL wurde versucht, eine 3D-Struktur für die GDS(L)-Lipase zu erstellen. Als Template wurden die Esterase estA aus *Pseudomonas aeruginosa* (PDB-ID: 3KVN) sowie Xylanesterasen (PDB-ID: 4JJ6 und 2WAA) bzw. eine Lipase (PDB-ID: 1YZF) verwendet. Die Sequenzen zeigten allerdings lediglich eine Übereinstimmung von 18% bis 21%. Die Homologie der Strukturen war zu gering, um ein aussagekräftiges Modell erstellen zu können.

<sup>3</sup>Erreger der Monilia-Furchtfäule des Kakaos

### 3.6.3 Heterologe Expression

Die codierende Sequenz der GDS(L)-Lipase aus *Pleurotus sapidus* wurde zur heterologen Expression in *Trichoderma reesei* an die Firma AB Enzymes weitergeleitet. Für die Expression der Lipase-DNA wurden drei Expressionsvektoren konstruiert (s. 7.2.3). In allen Konstrukten stand das Lipase-Gen unter der Kontrolle des *cbhI*-Promotors (Cellobiohydrolase I) und *cbhI*-Terminators von *T. reesei*:

- pAB500-LipPS: Lipase-Gen mit seiner Signalsequenz;
- pAB510-LipPS: Lipase-Gen ohne mittels SignalP vorhergesagte Signalsequenz; die Sekretion wird durch die *cbhI*-Signalsequenz vermittelt;
- pAB600-LipPS: Lipase-Gen ohne berechnete Signalsequenz mit einem *cbhII* (Cellobiohydrolase II) Carrier fusioniert. Die *cbhII*-Signalsequenz dient der Sekretion des *cbhII*-KexII-Lipase Fusionsproteins. Die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins durch die Erkennungsstelle für die KexII Protease (Lys-Arg) innerhalb des Konstrukts führt zur Bildung von aktiver Lipase.

Sechs Transformanten, die die Lipase exprimierten, wurden von der Firma AB Enzymes in 0,5 L Fermentern im *fed-batch*- und *batch*-Verfahren kultiviert und der Kulturüberstand für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Enzymaktivität wurde nach 88 h, 116 h, 137 h und 161 h anhand des *p*-Nitrophenylpalmitat-Assays (pNPP-Assays; 2.6.9.1) untersucht (Abb. 3.76). Die Aktivitäten nach *batch*-Kultivierung (Medium D5) waren stets deutlich höher als nach *fed-batch*-Kultivierung. Der Stamm RH32919, dessen Expressionskassette das Konstrukt mit der Lipasesignalsequenz (pAB500) enthält, erreichte die höchste Aktivität mit  $370 \text{ U L}^{-1}$  nach 161 h. Der Stamm RH32929 mit dem Konstrukt pAB600 erreichte das Aktivitätsmaximum mit  $350 \text{ U L}^{-1}$  nach 137 h. Das Aktivitätsmaximum des Stammes RH32924 (pAB510) lag bei  $280 \text{ U L}^{-1}$  nach 137 h. Die drei weiteren Stämme zeigten geringere Aktivitäten.

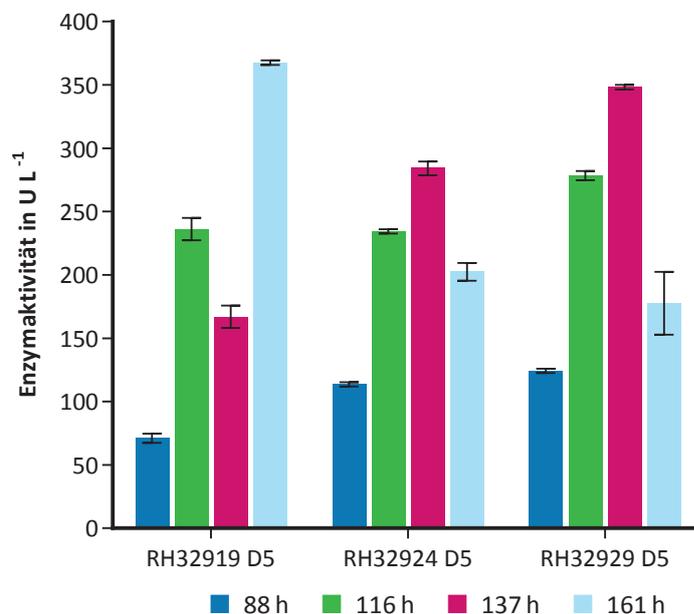


Abbildung 3.76: Aktivität der GDS(L)-Lipase in Kulturüberständen der Stämme RH32919, RH32924, RH32929 (*batch*-Kultivierung)

### 3.6.4 Proteinbiochemische Charakterisierung der rekombinanten GDS(L)-Lipase aus *Pleurotus sapidus*

Der Kulturüberstand wurde mittels SDS-PAGE sowie mittels halbnativer PAGE analysiert. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das SDS-Gel mit colloidalem Coomassie gefärbt (Abb. 3.77 A). Das halbnative Gel wurde geteilt, eine Hälfte wurde mit colloidalem Coomassie gefärbt, mit der anderen Hälfte wurde eine Aktivitätsfärbung mit  $\alpha$ -Naphthylacetat durchgeführt (s. 2.4.3.6, Abb. 3.77 B). Der Nachweis der heterologen Expression sowie die Identifizierung der Lipase im Gel erfolgte über die Aktivitätsfärbung.

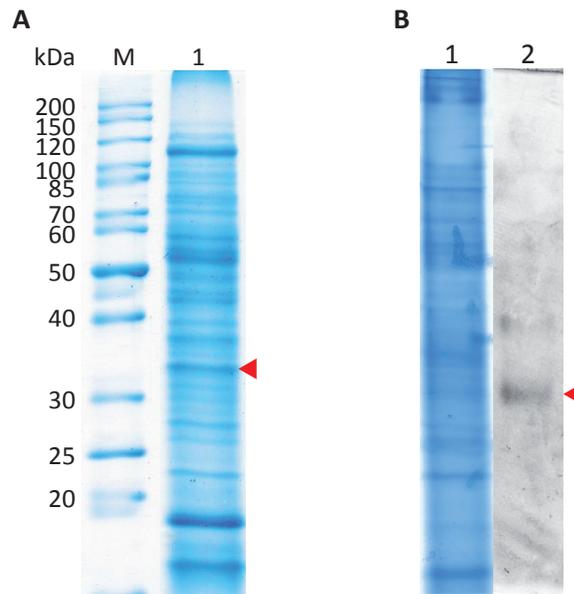


Abbildung 3.77: Elektrophoretische Analyse des Kulturüberstandes mit exprimierter GDS(L)-Lipase und Aktivitätsfärbung mit  $\alpha$ -Naphthylacetat  
**A** – SDS-PAGE, **B** – halbnative SDS-PAGE, 12%ig **M** – Proteinstandard  
**1** – colloidal Coomassiefärbung  
**2** – Aktivitätsfärbung mit  $\alpha$ -Naphthylacetat

Mittels SDS-PAGE wurde für die GDS(L)-Lipase ein apparentes Molekulargewicht von 34 kDa bestimmt (Abb. 3.77 A), das mit dem anhand der cDNA kalkulierten Molekulargewicht der GDS(L)-Lipase mit Signalsequenz von 33,3 kDa gut übereinstimmt.

Für die Bestimmung des pI wurde mit dem Kulturüberstand eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt (s. 2.4.2.5). Das IEF-Gel wurde nach der Fokussierung geteilt und eine Hälfte mit colloidalem Coomassie gefärbt, mit der anderen wurde eine Aktivitätsfärbung durchgeführt (s. 2.4.3.6). Anhand der Aktivitätsfärbung wurde ein apparenter isoelektrischer Punkt zu 5,0 ermittelt (Abb. 3.78), der mit dem berechneten pI von 4,9 gut übereinstimmt.

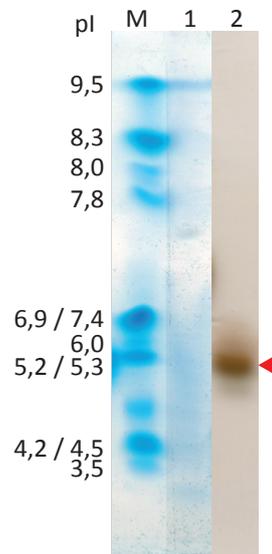


Abbildung 3.78: Isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung des pI der rekombinanten GDS(L)-Lipase  
**M** – Proteinstandard, **1** – colloidal Coomassiefärbung, **2** – Aktivitätsfärbung mit  $\alpha$ -Naphthylacetat

### 3.6.5 Bestimmung des optimalen Puffers

Zunächst wurde die Aktivität des Enzyms mit dem Esterase-Assay (s. 2.6.10) nach Purdy und Kolattukudy (1973) in folgenden Puffern (s. 2.6.1) untersucht:

Sørensen-Phosphat-Puffer pH 8,0

Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0

Natriumacetat-Puffer pH 6,0

MOPS-Puffer pH 6,0

Bernsteinsäuretartrat-Puffer pH 6,0

Eine hohe Aktivität wurde bei der Verwendung von Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 bzw. Sørensen-Phosphat-Puffer pH 8,0 ermittelt. Im Vergleich dazu lag die Aktivität bei der Verwendung von Puffern mit pH 6,0 zwischen 20% und 30% der in Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 ermittelten Aktivität. Um einige Substrate in Lösung zu bringen, wurde DMSO verwendet. Daher wurde die Aktivität des Enzyms untersucht, nachdem den Puffern 3% (v/v) DMSO zugesetzt wurde. Durch diesen Zusatz wurde die Aktivität der Lipase nicht beeinflusst.

### 3.6.6 Untersuchung der Substratspezifität

Das Protein wurde hinsichtlich seiner biokatalytischen Eigenschaften gegenüber *p*-Nitrophenylestern untersucht (s. 2.6.10).

Tabelle 3.13: Aktivität der GDS(L)-Lipase gegenüber *p*-Nitrophenylestern

<i>p</i> -Nitrophenylester	Aktivität in U L <sup>-1</sup>
<i>p</i> -Nitrophenyloctanoat	825
<i>p</i> -Nitrophenylvalerat	264
<i>p</i> -Nitrophenylbutyrat	516
<i>p</i> -Nitrophenylacetat	455

Die Aktivität der GDS(L)-Lipase steigt mit zunehmender Kettenlänge der Ester und einer geraden Anzahl an C-Atomen (s. 3.13). Die Aktivität gegenüber *p*-Nitrophenylpalmitat wurde mittels NPP-Assay nach Winkler und Stuckmann (1979) bestimmt, da diese mit dem verwendeten Assay nicht valide bestimmt werden konnte. Dabei zeigte das untersuchte Enzym eine hohe Aktivität (368 U L<sup>-1</sup>), was auf eine Lipaseaktivität hindeutet.

### 3.6.7 Untersuchung auf Feruloylsteraseaktivität

Die Aktivität des Enzyms gegenüber dem Substrat Ferulasäuremethylester wurde untersucht, um zu überprüfen, ob das Enzym Feruloylsteraseaktivität aufweist (s. 2.6.10.1). Die Differenz der Absorptionsmaxima von freier Ferulasäure und Ferulasäuremethylester unter den gegebenen Bedingungen ermöglichen es, die Hydrolyse des Esters spektroskopisch zu messen (Ralet *et al.* 1994). Der Ferulasäuremethylester wurde für 72 h bei 37 °C mit dem Enzym bzw. als Kontrolle mit hitzeinaktiviertem Enzym inkubiert. Anschließend wurde ein Spektrum von 280 bis 340 nm aufgenommen (Abb. 3.79).

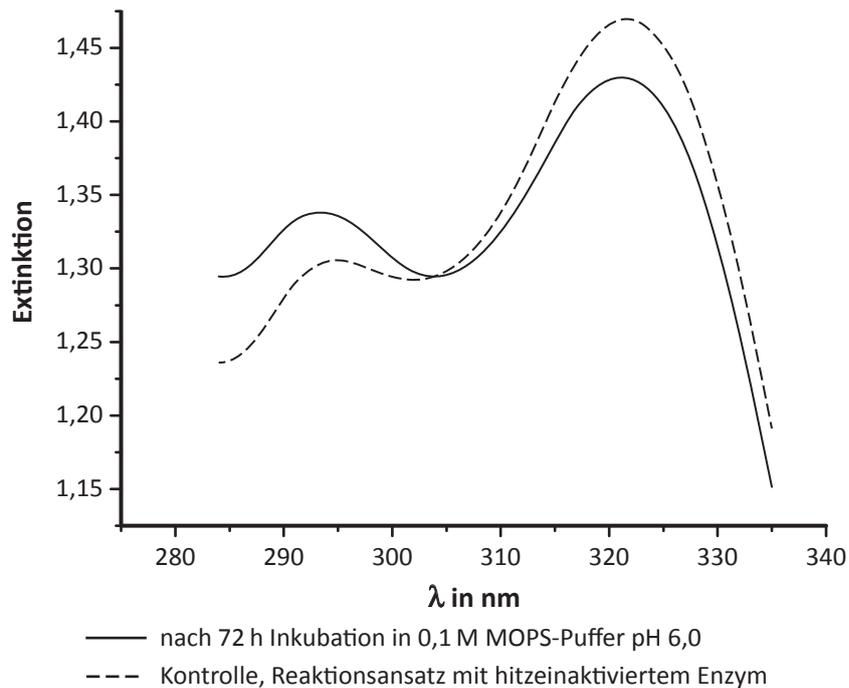


Abbildung 3.79: Veränderung des Absorptionsspektrums vor und nach der Hydrolyse des Ferulasäuremethyl-esters

Das Spektrum verschob sich nach 72 h in Richtung des Spektrums der freien Ferulasäure. Zu Beginn der Messung war eine Bande bei 322 nm sichtbar, welche auf die veresterte Ferulasäure zurückzuführen ist. Die Absorption bei 322 nm nahm mit der Reaktionszeit ab, während die Absorption bei 293 nm zunahm.

Weiterhin wurde die Aktivität des Enzyms gegenüber dem Modells substrat 5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (F-A) nach Linke *et al.* (2013) untersucht und die Hydrolyse mittels HPLC analysiert (s. 2.6.11). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.14 zusammengefasst.

Tabelle 3.14: Umsetzung von 5-O-transferuloyl-L-Arabinofuranose durch die GDS(L)-Lipase

	F-A in FE <sup>a</sup>	freie Ferulasäure in FE
5-O-transferuloyl-L-Arabinofuranose (F-A)	4483005	33309
Negativkontrolle (hitzeinaktiviertes Enzym)	4880842	33215
Umsetzung mit GDS(L)-Lipase	5306896	73608

<sup>a</sup> FE - Flächeneinheiten

Mittels HPLC war im Vergleich zur Negativkontrolle eine nicht signifikante Umsetzung des Substrates nachzuweisen.

### 3.7 Feruloyl-esterase

Die cDNA der Esterase aus *Pleurotus sapidus* wurde von Linke *et al.* (2013) kloniert und ist unter der Zugriffsnummer CBE71381 bei NCBI als Feruloyl-esterase veröffentlicht. Das Esterasegen umfasst 1662 Basenpaare und codiert ein Protein mit 554 Aminosäuren. Die abgeleitete Aminosäuresequenz hat ein theoretisches Molekulargewicht von 59,4 kDa. Die Sequenzanalyse mit PSORT II ergab ein mögliches Signalpeptid von 19 Aminosäuren. Für die heterologe Expression dieser Esterase aus *Pleurotus sapidus* (EPS1) in *H. polymorpha* wurden von der Firma Artes Biotechnology rekombinante RB11-Stämme generiert und für Expressionsversuche in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Für die intrazelluläre Expression wurde die cDNA-Sequenz dieser Esterase in die Plasmide pFPMT-mEPS-H6 #15-3 bzw. pFPMT-mEPS-H6 #15-4 eingebracht (s. 7.2.4) und die Hefe *H. polymorpha* RB11 mit diesen Vektoren transformiert. Als Negativkontrollstamm diente *H. polymorpha* pFPMT121/RB11, bei dem der Vektor pFPMT121 (ohne Insert) genomisch integriert wurde.

Nach der heterologen Expression wurden die Zellen aufgeschlossen (s. 2.5.2.4) und ein Western-Blot nach denaturierender SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 3.80 A). Der Nachweis der rekombinanten Esterase erfolgte mittels polyklonalen Antikörpern gegen den His-tag (s. 2.4.2.7).

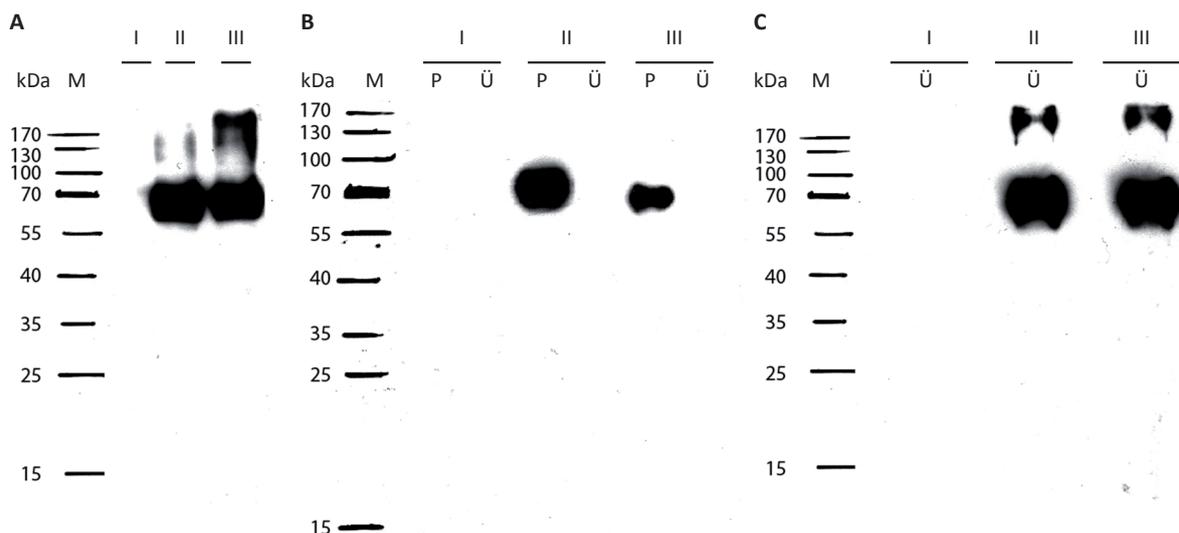


Abbildung 3.80: Nachweis der rekombinanten Esterase mittels anti-*His-tag*-Antikörpern  
 I – Kontrolle (121/RB11), II – Expressionstamm #15-3, III – Expressionstamm #15-4  
 P – Pellet, Ü – Überstand  
 A: Kontrolle der Expression    B: Kontrolle der Löslichkeit    C: Solubilisierung der Esterase

Die heterologe Expression der Esterase aus *Pleurotus sapidus* in *Hansenula polymorpha* führte zu großen Mengen an rekombinantem Enzym, allerdings lag das Produkt nach dem Zellaufschluss ausschließlich in der unlöslichen Fraktion (Pellet) vor (Abb. 3.80 B). Im Western-Blot wurde jeweils eine dominante Proteinbande mit einer apparenten Größe von 60 kDa nachgewiesen, die gut mit dem anhand der cDNA kalkulierten Molekulargewicht von 59,4 kDa übereinstimmt.

Das Enzym wurde unter denaturierenden Bedingungen aus dem Pellet solubilisiert und nach erneuter Zentrifugation in der löslichen Fraktion (Überstand) nachgewiesen (Abb. 3.80 C). Die Esterase wurde mit Hilfe des Affinitäts-*tags* aus dem Überstand gereinigt und anschließend renaturiert, um aktives, lösliches Enzym zu erhalten (s. 2.5.4.2). Für die Rückfaltung der Esterase wurden unterschiedliche Rückfaltungsbedingungen untersucht. Die Auswahl der Bedingungen erfolgte auf Basis publizierter Methoden für die erfolgreiche Renaturierung einer Lipase und weiterer hydrolytischer Enzyme. Dabei wurden der Puffer, die Ionenstärke des Puffers, das Redoxagens und die Rückfaltungsadditive variiert. Insgesamt wurden vier verschiedene Systeme für die Rückfaltung untersucht (Tab. 3.15).

Tabelle 3.15: Übersicht über die getesteten Rückfaltungspuffer

<b>Puffer A<sup>a</sup></b>	<b>Puffer B<sup>b</sup></b>	<b>Puffer C<sup>c</sup></b>	<b>Puffer D<sup>d</sup></b>
20 mM Tris-HCl pH 9	20 mM Tris-HCl pH 8	20 mM Tris-HCl pH 8	50 mM HEPES pH 7,5
35 % Glycerol	10 mM CaCl <sub>2</sub>	10 mM CaCl <sub>2</sub>	1 500 mM Sorbitol
600 mM Harnstoff	1 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM TCEP
2,5 mM 2:1 GSSG/GSH		600 mM Harnstoff	24 mM NaCl
80 mM FAD		35 % Glycerol	1 mM KCl
1 mM DTT			

<sup>a</sup>Rückfaltungspuffer für eine Arylalkoholoxidase nach Ruiz-Dueñas *et al.* 2006

<sup>b</sup>Rückfaltungspuffer für eine Lipase aus *Pleurotus sapidus* nach Krügener *et al.* 2009

<sup>c</sup>verändert nach Krügener *et al.* 2009, mit chaotropen Reagenzien

<sup>d</sup>Kieper *et al.* 2010

Die solubilisierten Enzyme wurden für die Rückfaltung blitzartig 1:10 bzw. 1:50 in die verwendeten Puffer verdünnt. Die Rückfaltung erfolgte unter den in Tabelle 3.16 dargestellten Bedingungen.

Tabelle 3.16: Rückfaltungsbedingungen für die heterolog exprimierte Esterase

<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>	<b>Puffer C</b>	<b>Puffer D</b>
16 °C	4 °C	4 °C	10 °C/RT
10 Tage	10 Tage	10 Tage	2 Tage

Über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen wurde täglich die Enzymaktivität mittels Esterase- bzw. Titrationsassay überprüft (s. 2.6.10, 2.6.12). Über den gesamten Zeitraum wurde keine Enzymaktivität nachgewiesen. Mit allen untersuchten Systemen konnte die Aggregationskinetik nicht in Richtung der Faltungskinetik verschoben werden.

## 4 Diskussion

Enzyme werden von der Industrie bereits in vielen Bereichen genutzt. Allerdings wird in der Natur eine große Zahl nicht charakterisierter Enzyme vermutet, die in technischen Applikationen verwendet werden könnten. Im Fokus der Forschung stehen insbesondere höhere Pilze wie die Basidiomyceten. Das Phylum der Basidiomyceten umfasst rund 31.500 Arten (Kirk *et al.* 2008). Zu ihnen gehören die Weiß- und Braunfäulepilze, die als Destruenten die polymeren Strukturen der Lignocellulosen abbauen, um Nährstoffe zu erschließen (Müller und Löffler 1992). Hierfür besitzen sie ein breites Repertoire extrazellulärer Enzyme. Daher sind insbesondere Weiß- und Braunfäulepilze als neuartige Quelle für extrazelluläre hydrolytische und oxidative Enzyme zum Aufschluss lignifizierter Biomaterialien von besonderem Interesse (Rajarithnam *et al.* 1998).

Der Einsatz von Enzymen reduziert aufgrund der Substrat- und Regiospezifität der verwendeten Enzyme unerwünschte Nebenreaktionen (Longo und Sanromán 2006). Biotechnologischer Anwendungen können emissionsreiche, umweltschädliche chemische Verfahren ersetzen. Applikationsfelder für neuartige Enzyme finden sich vor allem in Naturstoff orientierten Industrien, wie bei der Lebensmittel-, Waschmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie. So sollen beispielsweise mit Hilfe von lignocellulolytischen Enzymen die chemisch inerten Lignine sowie Gemische aus Cellulose und Hemicellulose für die Gewinnung von Aromastoffen, Pigmenten, Biokraftstoffen sowie pharmazeutischen Wirkstoffen genutzt werden (Himmel *et al.* 2007, Mendonça Maciel *et al.* 2010). Ein kontrollierter Aufschluss von Lignocellulosen im Rahmen von Bioraffineriekonzepten kann dazu beitragen, den Verbrauch an fossilen Energieträgern wesentlich zu reduzieren und damit zugleich die Emission von Treibhausgasen zu vermindern (Herrera 2004). Die Verfügbarkeit geeigneter Enzymsysteme ist dabei die Voraussetzung für einen effizienten enzymatischen Aufschluss von Lignocellulosen. Daher wurden in dieser Arbeit mehrere lignocellulolytische Enzyme aus *Pleurotus sapidus* kloniert und heterolog exprimiert. Die Auswahl geeigneter Enzyme erfolgte auf Grundlage von Untersuchungen des Sekretoms (Schüttmann 2011).

#### 4.1 *Pleurotus sapidus*

*Pleurotus sapidus* ist ein holzbesiedelnder Basidiomycet (Ständerpilz) aus der Familie der *Pleurotaceae* (Seitlinge). Er ist ein naher Verwandter des Austernseitlings *Pleurotus ostreatus*, der als Speisepilz geschätzt wird. Diese Pilze gehören zu den Weißfäulepilzen und sind in der Lage, mit ihrer Ausstattung sekretierter Enzyme alle Bestandteile von Zellwänden abzubauen. Verholzte Zellwände bestehen vorwiegend aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Weißfäulepilze bauen insbesondere den bräunlichen Ligninanteil ab, wobei die weißlichen Polysaccharide Cellulose und Hemicellulose zurückbleiben, die dieser Fäulnis den Namen „Weißfäule“ geben (Blanchette 1991). Weißfäulepilze sind die effizientesten Lignindestruenten und sind in der Lage das komplexe Polymer vollständig abzubauen (Rajaratnam *et al.* 1998).

Im Sekretom von *Pleurotus sapidus* wurden zahlreiche am Lignocelluloseaufschluss beteiligte Enzyme identifiziert. Unter anderem wurden Cellulasen, Hemicellulasen, Peptidasen, Esterasen, Laccasen und insbesondere Peroxidasen vom Pilz in das Kulturmedium sekretiert (Zorn *et al.* 2005a). Ein umfassendes Verständnis der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung des Pilzsekretoms sowie des synergistischen Zusammenwirkens der Enzyme ermöglicht die Entwicklung optimierter „Enzym-Cocktails“ für die Weiße Biotechnologie (Bouws *et al.* 2008).

*Pleurotus sapidus* wächst natürlicherweise auf festen, unbeweglichen Substraten, lässt sich aber auch gut submers kultivieren (Peters 2004). *Pleurotus*-Spezies sind in der Lage, eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen – wie Weizenstroh (Mata und Savoie 1998), Erdnussschalen (Zorn *et al.* 2005a), Kaffeepulpe (Rolz *et al.* 1988) oder Bananen-Pseudostämme (Ghosh *et al.* 1998) – zu verwerten. Sie sekretieren je nach Substrat unterschiedliche Enzymaktivitäten (Bouws *et al.* 2008, Linke *et al.* 2005b, Peters 2004, Zorn *et al.* 2005a) und besitzen daher ein großes Potential, Enzyme mit neuartigen biosynthetischen bzw. biodegradativen Funktionen zu bilden.

Da verschiedene Oxidoreduktasen die Grundlage für einen effektiven Aufschluss von Lignocellulosen bilden, wurde die cDNA einer Arylalkoholoxidase kloniert, die im Sekretom nachgewiesen wurde.

## 4.2 Arylalkoholoxidase

Die klonierte cDNA der Arylalkoholoxidase hat eine Größe von 1782 Basenpaaren, die ein Protein aus 593 Aminosäuren codiert. Das berechnete Molekulargewicht des Proteins beträgt 63,6 kDa und entspricht damit dem über SDS-PAGE bestimmten apparenten Molekulargewicht von 63 kDa (Abb. 3.22). Auf Ebene der Aminosäuresequenz zeigt das Enzym eine Identität von 95% zu dem homologen Protein aus *Pleurotus eryngii*. Nicht alle massenspektrometrisch generierten Peptidsequenzen (Tab. 3.1), die Arylalkoholoxidasen zugeordnet wurden, sind in der Aminosäuresequenz der Arylalkoholoxidase enthalten (Abb. 3.9). Daher könnten noch weitere Enzyme dieser Klasse zum Sekretom des Pilzes gehören.

Arylalkoholoxidasen (AAO, EC 1.1.3.7) sind sekretierte monomere Enzyme und gehören zur Familie der GMC-Oxidasen (Glucose/Methanol/Cholin-Oxidasen) mit nicht kovalent gebundenem FAD als Cofaktor (Hefti *et al.* 2003, Sannia *et al.* 1991). Die Enzyme besitzen zwei Domänen: die N-terminale FAD-Bindungsdomäne und die C-terminale Substrat-Bindungsdomäne (Varela *et al.* 1999). Arylalkoholoxidasen aus Weißfäulepilzen sind am Abbau von Lignin beteiligt. Sie katalysieren die Zwei-Elektronen-Oxidation von aromatischen und aliphatischen, mehrfach ungesättigten primären Alkoholen, wie z.B. 2,4-Hexadien-1-ol zu ihren korrespondierenden Aldehyden und reduzieren gleichzeitig  $O_2$  zu  $H_2O_2$  (Ferreira *et al.* 2005, Guillén *et al.* 1992). Das extrazellulär produzierte  $H_2O_2$  ist als oxidierendes Cosubstrat für den Peroxidase-katalysierten Abbau von Lignocellulosen zwingend erforderlich (Ruiz-Dueñas und Martínez 2009). Daneben ist  $H_2O_2$  ein Vorläufer des hochreaktiven Hydroxylradikals, das in der Lage ist, Lignin und Polysaccharide direkt oxidativ zu spalten (Guillén *et al.* 2000). In der Natur wird die kontinuierliche Bereitstellung von  $H_2O_2$  durch einen Redoxzyklus unter Beteiligung von intrazellulären Dehydrogenasen gewährleistet, die die entstandenen Aldehyde zu Alkoholen reduzieren (Guillén und Evans 1994).

Die ersten Sequenzen von Arylalkoholoxidasen, die publiziert wurden, stammten aus den Pleuroten *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus pulmonarius* (Varela *et al.* 1999, 2000a). Die Gene sind in beiden Organismen sehr ähnlich und zeigen auf der Aminosäureebene eine Identität von 95%. Ein Vergleich mit anderen Oxidoreduktasen zeigte gemeinsame Motive sowohl im Bereich des N-Terminus als auch im C-Terminus, die mit der FAD-Bindungsregion bzw. mit dem aktiven Zentrum korrespondieren. Inzwischen wurden Arylalkoholoxidasen in verschiedenen anderen Weißfäulepilzen – darunter weitere Pleurotusarten, *Bjerkandera adusta* und *Phanerochaete chrysosporium* – sowie in einigen Braunfäulepilzen und Ascomyceten gefunden (Ferreira *et al.* 2005, Hernández-Ortega *et al.* 2012a, Varela *et al.* 2001). Die Zahl steigt stetig an, seit mit zunehmendem Interesse an der Bioraffinerietechnologie verschiedene Basidiomycetengenome im DOE (Joint Genome Institute) (<http://www.jgi.doe.gov>) sequenziert wurden.

Die Kristallstruktur der in *E. coli* exprimierten Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus eryngii* (Fernández *et al.* 2009) zeigt 33% Identität zu der Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* (Varela *et al.* 2000b), der ersten GMC-Oxidoreduktase, deren Struktur aufgeklärt wurde.

#### 4.2.1 Sequenz- und modellorientierte Analyse der AAO-Sequenz

Für die heterologe Expression der Arylalkoholoxidase wurde die aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz zunächst bioinformatisch analysiert. Dabei wurde mittels SignalP 4.1 für die Arylalkoholoxidase aus *P. sapidus* ein Signalpeptid mit einer Länge von 21 Aminosäuren vorhergesagt. Für die reifen Arylalkoholoxidasen der eng verwandten Pilze *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus pulmonarius* wiesen Varela *et al.* (1999, 2000a) durch N-terminale Sequenzierung der reifen Enzyme ein Signalpeptid mit einer Länge von 27 Aminosäuren nach. Sannia *et al.* (1991) identifizierten mittels Edman-Abbau für eine Veratrylalkoholoxidase aus *Pleurotus ostreatus* zwei überlappende Sequenzen als N-Termini (LPTADFDYIVV... bzw. ADFDYIVV...) und somit ein Signalpeptid mit einer Länge von 24 bzw. 27 Aminosäuren. Mit der Version 4.1 von SignalP wird gegenüber den Vorgängerversionen eine höhere Sensitivität bei der Vorhersage von Signalsequenzen erreicht (Bendtsen *et al.* 2004, Nielsen *et al.* 1997), dennoch scheint sie für die Vorhersage der Spaltstellen bei Basidiomyceten nur bedingt geeignet. So wurde für eine polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* (Scheibner 2006) und auch bei einer Xanthophyllesterase aus *Pleurotus sapidus* (Bouws 2007) mittels Edman-Abbau ein anderer N-Terminus der reifen Enzyme ermittelt als mit SignalP berechnet. Bei Sekretomanalysen von *Pleurotus sapidus* wurde u.a. ein Peptid mit der Sequenz LPTADFDYLVVGAGNAGNVVAAR ermittelt, das der Arylalkoholoxidase zugeordnet wurde (Abb. 3.9). Aufgrund dieser Daten und der Literatur wurde postuliert, dass die Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus* vor dem Leucin prozessiert wird und das Enzym ein Signalpeptid mit einer Länge von 24 Aminosäuren besitzt.

Ruiz-Dueñas *et al.* (2006) und Varela *et al.* (2001) zeigten, dass die heterologe Expression der AAO-Sequenz aus *P. eryngii* mit und ohne Signalsequenz im Ascomyceten *Aspergillus nidulans* zu einem extrazellulären, aktiven Enzym führte. Die Bedeutung einer Signalsequenz für die Expressionsrate und die Enzymaktivität kann noch nicht vorhergesagt werden. Daher wurde sowohl die vollständige Sequenz als auch die Sequenz des gereiften Enzyms ohne die potentielle Signalsequenz (AS 1-24) in *E. coli* exprimiert.

Zur Berechnung des Strukturmodells (Abb. 3.11) diente die von Fernández *et al.* (2009) bestimmte Röntgenkristallstruktur der rekombinanten Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus eryngii* (PDB-ID 3FIM). Die katalytischen Reste wurden auch in der Sequenz der Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus* identifiziert (Abb. 3.10).

Die N-terminalen Strukturen beider Enzyme entsprechen auf Ebene der Primärsequenz einem konservierten GMC-Motiv, dem  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ -ADP-Bindemotiv, das an der FAD-Bindung beteiligt ist (Varela *et al.* 1999, Wierenga *et al.* 1986). Das FAD interagiert nicht-kovalent über Wasserstoffbrückenbindungen vorwiegend zu den NH- und CO-Gruppen der Hauptkette des Enzyms (Fernández *et al.* 2009). Die Kristallstruktur der Arylalkoholoxidase zeigt einen trichterförmigen Kanal, über den das Lösungsmittel mit dem Flavin Cofaktor in Verbindung steht (Abb. 3.11). Im Gegensatz dazu liegt das aktive Zentrum bei der Glucoseoxidase lösungsmittlexponiert vor. Die Substratbindungsdomäne und das aktive Zentrum liegen im Bereich des C-Terminus. Die

Substratdiffusion wird bei der Arylalkoholoxidase von *Pleurotus eryngii* durch drei aromatische Aminosäurereste – Y92, F397 und F501 – eingeschränkt, die einen „Flaschenhals“ bilden und den freien Zugang zum aktiven Zentrum limitieren (Fernández *et al.* 2009). Die Substratspezifität wird so durch einen Größenausschlussmechanismus kontrolliert. *Docking*-Studien anhand der Kristallstruktur zeigten, dass sekundäre Alkohole aufgrund des F501 nicht effizient gebunden werden können (Hernández-Ortega *et al.* 2012b). Ein schmaler Spalt am Boden der Substratbindetasche des aktiven Zentrums beschränkt große Substrate auf die C1-Position (Hernández-Ortega *et al.* 2012a).

Die Kristallstrukturen verschiedener Arylalkoholoxidasen zeigen, dass diese ein hochkonserviertes aktives Zentrum besitzen. Dies legt einen ähnlichen Katalysemechanismus nahe, der für die Arylalkoholoxidase während der letzten Jahre intensiv diskutiert wurde (Ferreira *et al.* 2005, 2009, Guillén *et al.* 1992, Hernández-Ortega *et al.* 2012a, Varela *et al.* 2000b). Der Reaktionsmechanismus der Arylalkoholoxidasen umfasst zwei Halbreaktionen, die bezogen auf das FAD als reduzierend bzw. oxidierend bezeichnet werden (Abb. 4.1).

In der reduzierenden Halbreaktion wird der Substratalkohol zum Aldehyd oxidiert (Abb. 4.1 oben). Dabei wird das Proton der Hydroxyl-Gruppe des Substratalkohols auf ein Histidin übertragen, das als katalytische Base wirkt. Die Abstraktion des Protons ist eng gekoppelt mit der Übertragung eines Hydridions vom C1-Atom des Substratalkohols auf das N5 des Flavins und geht diesem voraus (Hernández-Ortega *et al.* 2011a). Die Übertragung des Hydridions durch die Arylalkoholoxidase erfolgt stereoselektiv (Hernández-Ortega *et al.* 2012b). Bei Arylalkoholoxidasen und Glucoseoxidasen sind im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der GMC-Oxidoreduktase Superfamilie zwei Histidinreste hoch konserviert, die in der Nähe des Isoalloxazinringes lokalisiert sind (bei anderen Mitgliedern His/Asn). Beide Histidine sind für die Bindung und Oxidation des Substrates wichtig (Wongnate und Chaiyen 2013). Dies wurde bereits 2006 von Ferreira *et al.* durch zielgerichtete Mutagenese gezeigt. Welches Histidin (H502 bzw. H546) die Rolle der katalytischen Base einnimmt, wurde lange diskutiert. Hernández-Ortega *et al.* (2012c) identifizierten H502 als katalytische Base. H546, das sich ein Proton mit dem benachbarten E389 teilt, ist an der Alkoholbindung im aktiven Zentrum beteiligt. Das katalytische H502 ist unter den Mitgliedern der GMC-Superfamilie hoch konserviert.

Die oxidierende Halbreaktion regeneriert den FAD-Cofaktor und schließt den katalytischen Zyklus der Arylalkoholoxidase ab (Abb. 4.1 unten). In dieser Halbreaktion wird  $O_2$  zu  $H_2O_2$  reduziert. Dies geschieht ebenfalls im aktiven Zentrum – im Bereich der Seitenketten der Histidine 502 und 546 – wobei H502 signifikant an der Reduktion von  $O_2$  beteiligt ist. Dabei wird  $O_2$  mit Hilfe von F501 im Bereich des N5-C4a des Flavins positioniert (Hernández-Ortega *et al.* 2011b). Dann erfolgt die Übertragung des Protons von H502 auf  $O_2$ . Dies fördert den Transfer eines Elektrons vom Flavin, wodurch ein protoniertes Superoxidradikal entsteht. Durch die Übertragung eines zweiten Elektrons vom Flavin und des Protons von N5 wird  $H_2O_2$  gebildet. Nach Abschluss der Reaktion liegt das Flavin wieder reoxidiert und H502 unprotoniert vor (Hernández-Ortega *et al.* 2012c).

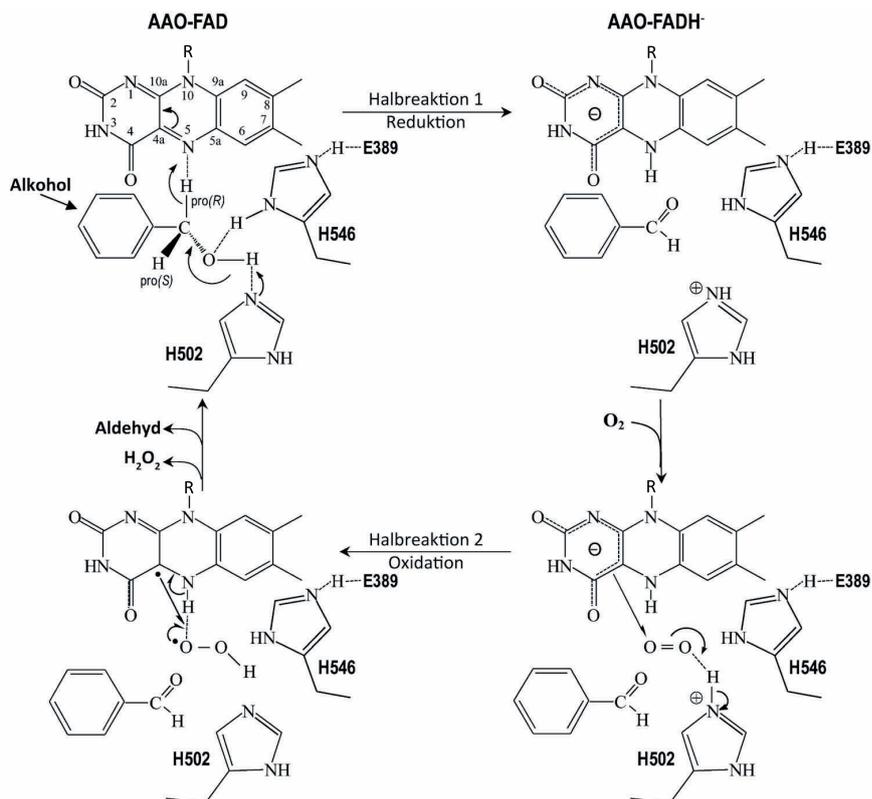


Abbildung 4.1: Postulierter Reaktionsmechanismus der Arylalkoholoxidase mit den potentiell katalytischen Aminosäuren, nach Hernández-Ortega *et al.* (2012c)

Arylalkoholoxidasen zeigen daneben Aktivität gegenüber dem aromatischen Aldehyd. Diese Aktivität liegt jedoch deutlich unter der Aktivität gegenüber dem entsprechenden Alkohol (Ferreira *et al.* 2010, Guillén *et al.* 1992). Das Reaktionsschema für die Umsetzung von aromatischen Substraten ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

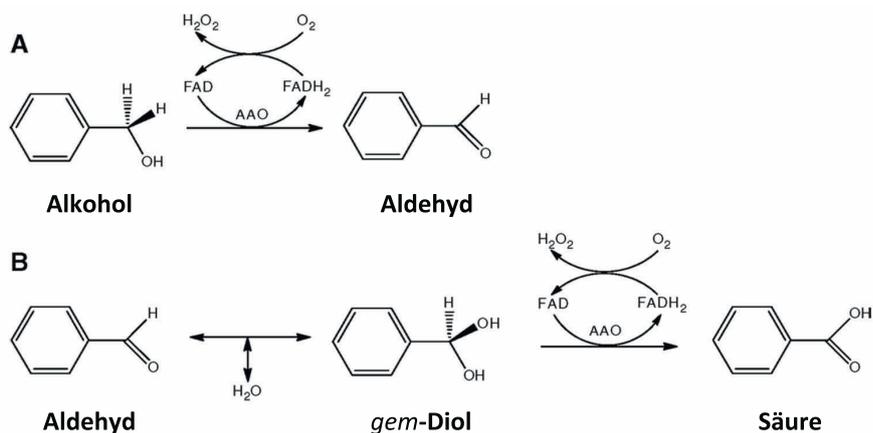


Abbildung 4.2: **A** – Umsetzung primärer, aromatischer Alkohole zu den korrespondierenden Aldehyden und **B** – Umsetzung aromatischer Aldehyde zu ihren korrespondierenden Säuren durch die Arylalkoholoxidase, nach Hernández-Ortega *et al.* (2012a)

#### 4.2.2 Heterologe Expression der Arylalkoholoxidase in *E. coli*

Die Arylalkoholoxidase sollte im Bakterium *E. coli* heterolog exprimiert werden. *Escherichia coli* ist aufgrund seiner einfachen Handhabung, kostengünstiger Wachstumsbedingungen und einer hohen Proteinausbeute einer der bedeutendsten Expressionswirte (Jhamb und Sahoo 2012). Jedoch werden rekombinante Proteine, insbesondere wenn sie einen eukaryotischen Ursprung haben, in prokaryotischen Wirten häufig inaktiv und unlöslich produziert, was vor allem auf die fehlende Kompartimentierung der prokaryotischen Zellen zurückzuführen ist. Posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Glykosylierungen sind in Bakterien nicht möglich. Darüber hinaus wirkt das bakterielle Cytoplasma reduzierend, wodurch eine Bildung von nativen Disulfidbrücken durch vorhandene Cysteinreste nicht möglich ist (Fink 1998, Jhamb und Sahoo 2012, Kapust und Waugh 1999). In *E. coli* exprimierte Proteine liegen daher oft intrazellulär in Einschlusskörpern, den sogenannten *inclusion bodies*, vor. Dabei handelt es sich um große Aggregate falsch gefalteter Proteine bzw. Faltungsintermediate, die sich im Cytoplasma, teilweise auch im Periplasma ablagern (Bowden *et al.* 1991). Bei der Ausbildung der unlöslichen Aggregate spielen die Ladungsverteilung, Anzahl der Cysteine und Proline sowie die Hydrophobizität der Proteine eine große Rolle (Wilkinson und Harrison 1991).

#### 4.2.3 Expression der Arylalkoholoxidase mit His-tag

Oxidoreduktasen aus Pilzen wurden bereits mit ihrer nativen cDNA-Sequenz erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert (Ichinose *et al.* 2002, Kotik *et al.* 2004, Ruiz-Dueñas *et al.* 2006). Daher wurde die Arylalkoholoxidase zunächst ohne Anpassung der *codon usage* mit N-terminalem His<sub>6</sub>-tag exprimiert. Dabei wurde eine Überexpression des Enzyms erreicht, allerdings akkumulierte die Arylalkoholoxidase in der unlöslichen Fraktion in Form von *inclusion bodies*. Dies wurde auch für andere rekombinant in *E. coli* produzierte Flavoenzyme beschrieben (Connaris *et al.* 1999, Witt *et al.* 1998). Die cDNA-Sequenz wurde an die *codon usage* des Expressionsorganismus *E. coli* B angepasst, um eine korrekte Translation in *E. coli* zu gewährleisten. Die Adaptation der Sequenz an den Expressionsorganismus führte zu einer Steigerung des Expressionslevels und einer deutlich höheren Proteinausbeute. Dabei sammelte sich das Enzym weiterhin in *inclusion bodies* in den Zellen an.

Da die Produktion des Proteins zu *inclusion bodies* führte, wurden verschiedene Strategien verfolgt, um aktives Enzym zu erhalten. Zum einen wurde versucht das Protein durch Rückfaltung in seine native 3D-Struktur zu überführen, zum anderen wurde versucht der Bildung von *inclusion bodies* entgegenzuwirken und direkt *in vivo* lösliches, aktives Protein zu produzieren. Die Produktion von Einschlusskörpern kann auch Vorteile haben. Für die Produktion großer Proteinmengen im industriellen Maßstab ist die Rückfaltung allerdings weniger geeignet, da diese zeit- und kostenintensiv ist (Jungbauer und Kaar 2007, Singh und Panda 2005). Daher wurden zunächst Methoden für die Produktion löslicher Arylalkoholoxidase *in vivo* überprüft (Abb. 4.3).

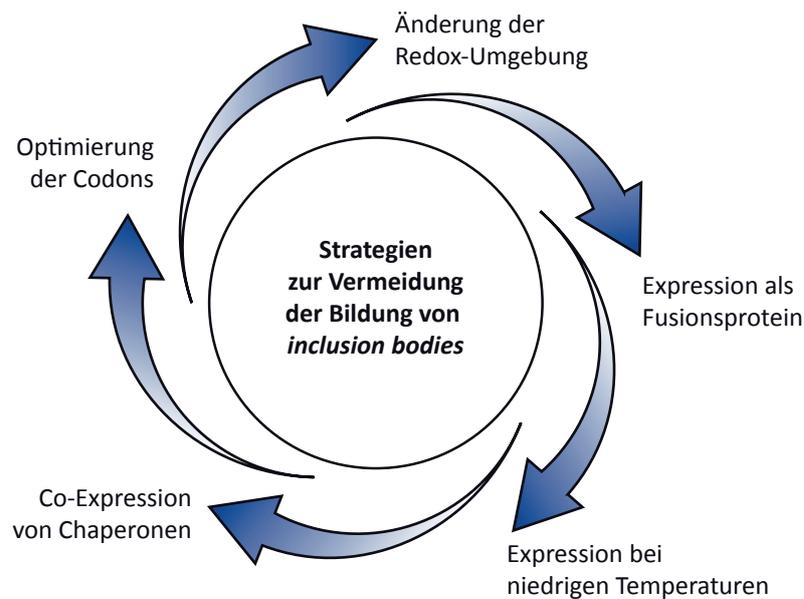


Abbildung 4.3: Bekannte Strategien zur Vermeidung der Bildung von *inclusion bodies* bei der heterologen Expression von Proteinen in *E. coli* (verändert nach Basu *et al.* 2011)

Eine gebräuchliche Methode zur Erhöhung der Löslichkeit rekombinanter Proteine in *E. coli* ist die Fusion mit einem Protein, das die Löslichkeit des Fusionspartners erhöhen kann (Basu *et al.* 2011, Schein 1991). Im Idealfall wird das „Passagierprotein“ bei der Expression korrekt gefaltet und ist auch nach Abspaltung durch eine geeignete Protease löslich und aktiv. Eine weitere Möglichkeit, die Löslichkeit rekombinanter Proteine zu erhöhen, ist die Verringerung der Proteinsyntheserate durch die Expression bei niedrigen Temperaturen. Außerdem könnte die Produktion von aktivem Enzym durch eine Koexpression mit Chaperonen („Faltungshelfer“) erfolgen, die eine korrekte Faltung des Enzyms unterstützen (Buchner *et al.* 1991, Rudolph und Lilie 1996). Da Bakterien keine Möglichkeit zur posttranslationalen Modifikation von Enzymen besitzen, wäre die Verwendung eines eukaryotischen Expressionsorganismus eine Alternative.

#### 4.2.4 Expression als Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP)

Von verschiedenen Protein-*tags* ist bekannt, dass sie die Löslichkeit des Fusionspartners bei der Expression in *E. coli* erhöhen und die korrekte Faltung in seine biologisch aktive Konformation fördern (Waugh 2005). Zu diesen gehören beispielsweise MBP (*maltose binding protein*), NusA (*N utilization substance A*), GST (Glutathion-S-Transferase) und Thioredoxin. In Bezug auf seine löslichkeitsfördernden Eigenschaften ist MBP vergleichbar mit Thioredoxin und deutlich effektiver als GST und NusA (Terpe 2007). Das Maltose-Bindeprotein (40 kDa) scheint in Bezug auf seinen Fusionspartner als allgemeines molekulares Chaperon zu fungieren (Kapust und Waugh 1999). Zahlreiche Beispiele für die löslichkeitsfördernde Wirkung von MBP finden sich in der Literatur (Eliseev *et al.* 2004, Goh *et al.* 2003, Smyth *et al.* 2003). Die Arylalkoholoxidase wurde N-terminal mit MBP fusioniert und in *E. coli* K12 TB1 Zellen exprimiert.

Während das Fusionsprotein bei der Expression mit dem Vektor pMAL-p4X über ein Signalpeptid in den periplasmatischen Raum transportiert wurde, verblieb es bei der Expression mit dem Vektor pMAL-c4X im Cytoplasma. Bei beiden Expressionssystemen wurde mittels SDS-PAGE eine Überexpression des Zielproteins nachgewiesen (Abb. 3.15). Ohne die Lokalisationssequenz wurde das Fusionsprotein allerdings teilweise gespalten, da daneben sowohl die Arylalkoholoxidase als auch das MBP unfusioniert vorlagen. Die Überproduktion des Zielproteins im Cytoplasma führte zu einer geringeren Kulturdichte. Dies deutet auf eine cytotoxische Wirkung des Enzyms hin. Bei der Expression mit der malE-Sequenz dominierte die Bande für das unfusionierte MBP. Dies kann auf einen vorzeitigen Abbruch der Translation oder auf *E. coli* eigene Proteasen zurückzuführen sein, die das Fusionsprotein spalten bzw. abbauen können. Im Periplasma scheint hauptsächlich ein Abbau des Fusionsproteins stattzufinden, wohingegen im Cytoplasma die Spaltung des Proteins dominiert. Dies lässt sich durch die unterschiedlichen Bedingungen und Proteinzusammensetzung des Cytoplasmas und des periplasmatischen Raumes erklären. Bei beiden Systemen wurde das Fusionsprotein nach dem Zellaufschluss ausschließlich in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen.

Bei der Expression mit Hilfe des proteasedefizienten Stammes BL21(DE3) wurde das Protein cytoplasmatisch als stabiles Fusionsprotein exprimiert. Dennoch wurde eine geringe Menge des Proteins in die beiden Fusionspartner gespalten. Durch die Fusion mit dem MBP wurde die Löslichkeit des Enzyms geringfügig erhöht (Abb. 3.16). Bei der Fusion mit MBP muss das *tag* zum Erhalt der Aktivität zwingend abgespalten werden (Terpe 2007). Nach einer Abspaltung des MBP vom Fusionsprotein durch Faktor Xa wies die so gewonnene Arylalkoholoxidase keine Aktivität auf. Das Enzym wurde vermutlich nicht in eine aktive Form gefaltet.

Die periplasmatische Expression in diesen Zellen führte nicht zur Bildung des Fusionsproteins. Im Cytosol und im Periplasma wurden weder das Protein noch seine Abbauprodukte nachgewiesen. Die beiden Expressionskonstrukte unterscheiden sich nur hinsichtlich des Signalpeptides, daher ist davon auszugehen, dass die Expression in diesem Stamm reprimiert wird, da bei der Sekretion Probleme auftreten.

#### 4.2.5 Expression bei niedrigen Temperaturen

Eine andere Methode zur Erhöhung der Löslichkeit rekombinanter Proteine ist die Erniedrigung der Temperatur, bei der das Zielprotein gebildet wird, auch wenn dies nicht immer effektiv ist (Schein 1989). Dabei führt eine niedrigere Wachstumstemperatur aufgrund einer langsameren Proteinsyntheserate häufig dazu, dass die Bildung von *inclusion bodies* vermindert wird. Eine verringerte Proteinsyntheserate bedeutet einen geringeren Zellstress und die Aggregationen und hydrophobe Interaktionen zwischen neu gebildeten Polypeptidketten werden verringert (Fink 1998, Shirano und Shibata 1990, Weickert *et al.* 1996). Die korrekte Faltung wird von der Proteinsynthese-, der Faltungs- und der Aggregationsrate bestimmt. Die Beeinflussung jedes dieser Prozesse kann die korrekte Faltung fördern (Kiefhaber *et al.* 1991).

Daher wurde die Arylalkoholoxidase als MBP-Fusionsprotein zusätzlich bei 20 °C exprimiert (Southworth *et al.* 1996), wodurch jedoch keine Verbesserung der Löslichkeit erreicht wurde. Daneben wurde für die Proteinexpression bei niedrigen Temperaturen in dieser Arbeit der Vektor pCold I verwendet. Dabei handelt es sich um einen Vektor aus der Reihe der pCold-Vektoren, bei denen die Proteinexpression unter der Kontrolle des Kälteschock-Promotors *cspA* steht (Mujacic *et al.* 1999, Qing *et al.* 2004). Auf diese Weise wurden bereits verschiedene Oxidoreduktasen aus Basidiomyceten funktionell exprimiert, wie die Pyranoseoxidase aus *Trametes multicolor* (Spadiut *et al.* 2010) oder die DyP-TyP Peroxidase MsP2 aus *Mycetinis scorodonius* (Zelena *et al.* 2011). Der *cspA*-Promotor ermöglicht eine effiziente Produktion rekombinanter Proteine bei niedrigeren Temperaturen, wobei die Menge des gebildeten rekombinanten Proteins gegenüber den Wirtsproteinen erhöht wird. Das Kälteschockregulatorprotein CspA selbst hat eine Schutzfunktion, bei der die Aggregation durch die Bindung entfalteter Proteine verhindert wird. Kälteschockproteine fungieren bei tieferen Temperaturen als Chaperon und erfüllen die gleiche Funktion wie die Hitzeschockproteine. Sie dienen zur besseren Faltung und können somit die Löslichkeit des Proteins erhöhen (Antson *et al.* 1996, Cole 1996, Weissman *et al.* 1996).

Mit Hilfe des verwendeten Systems wurde eine Überexpression der Arylalkoholoxidase erreicht, dennoch wurde durch Kultivierung bei niedrigen Temperaturen alleine die Löslichkeit des Enzyms nicht erhöht (Abb. 3.17).

#### 4.2.6 Koexpression mit Chaperonen

Eine andere Möglichkeit direkt *in vivo* lösliche und aktive Arylalkoholoxidase zu produzieren und die Bildung von *inclusion bodies* zu verhindern, ist eine Koexpression mit Chaperonen. Dafür vertreibt TaKaRa Bio *inc.* ein Set mit Plasmiden (s. 2.1.5), die eine Koexpression von Chaperonen in *E. coli* ermöglichen.

Chaperone sind in der Lage, Proteine bei ihrer Faltung zu unterstützen. Die meisten Proteine kommen nur in zwei Zuständen vor, sie sind entweder gefaltet ( $N^1$ ) oder ungefaltet ( $U^2$ ), das heißt aber nicht, dass es keine partiell gefalteten Übergangszustände gibt. Diese sind jedoch deutlich weniger stabil und damit sehr kurzlebig. Eine Ausnahme ist die sogenannte *molten globule*-Konformation, die einige Proteine einnehmen können. Dieser Zustand kann entweder als ein dritter Zustand oder eine Variante des ungefalteten Zustands betrachtet werden. In der lebenden Zelle wird die rasche und genaue Faltung durch faltungsakzessorische Proteine (sogenannte Chaperone) unterstützt. Die Chaperone binden vorübergehend spezifisch an Faltungsintermediate und konkurrieren somit direkt mit den Aggregationsreaktionen (Fink 1998). Damit sind sie in der Lage, Proteine bei ihrer Faltung zu unterstützen. Sie können Faltungsintermediate stabilisieren oder auch aggregierte Proteine und kinetisch gefangene Faltungsintermediate wieder entfalten und so einen neuen Faltungsvorgang ermöglichen.

---

<sup>1</sup>*native*

<sup>2</sup>*unfolded*

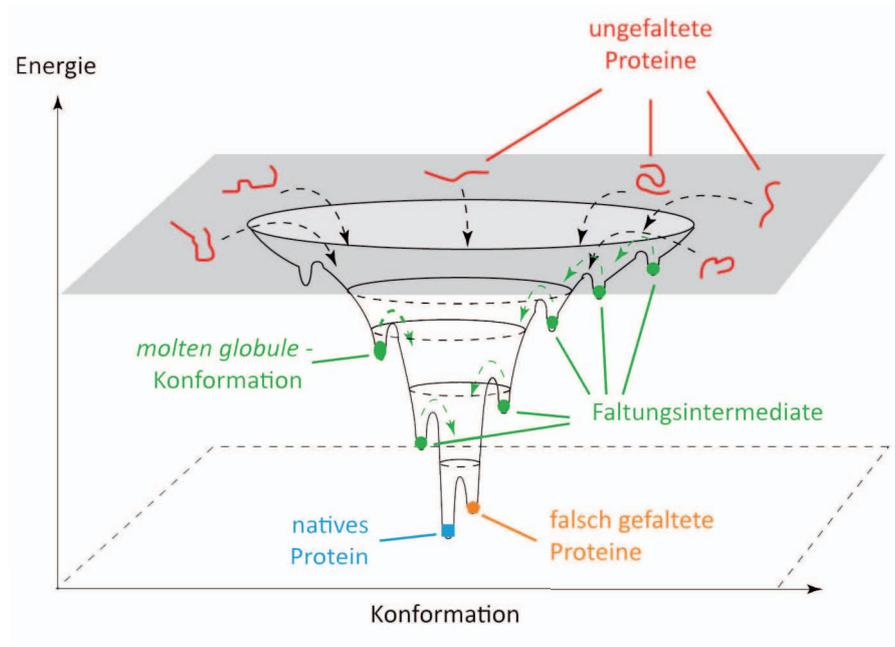


Abbildung 4.4: Schematisches Diagramm für die Faltungsenergie eines Proteins. Die ungefalteten Moleküle an der Oberseite des Trichters können die energieärmste, native Konformation über verschiedene Wege erreichen. Der Faltungstrichter besitzt viele lokale Minima, in die das Protein hineinfallen kann. Einige dieser Minima stellen Übergangszustände (Faltungsintermediate) dar, andere repräsentieren bereits relativ stabile, kompakte Strukturen „molten globule“. Andere nehmen falsche Konformationen ein, da das lokale Minimum eine „kinetische Falle“ darstellt. Für Proteine, die im Wesentlichen nur die zwei Konformationen (N bzw. U) einnehmen ist die Oberfläche des Tunnels glatt (verändert nach Schultz 2000)

Der Erfolg der Chaperon-Koexpression hängt von der relativen Affinität des Chaperonsystems zu dem zu faltenden Intermediat und der Faltungs- und Aggregationskinetik des Proteins ab. Eine Vorhersage der Affinität bestimmter Chaperone zu einem Protein ist nicht möglich (Schlieker *et al.* 2002), daher muss experimentell bestimmt werden, welche der Chaperonkombinationen für ein bestimmtes Protein wirksam sind (Marco und Marco 2004). Außerdem ist eine Feinabstimmung der Expression von Chaperon und Zielprotein notwendig, um die Löslichkeit von aggregationsanfälligen Proteinen zu verbessern (Jhamb und Sahoo 2012).

Eine Erhöhung der Löslichkeit wurde durch die Koexpression von Chaperonen bereits mehrfach dokumentiert (Nishihara *et al.* 2000, Sonoda *et al.* 2010, Wang *et al.* 2012). Auch Enzyme aus Basidiomyceten wurden bereits auf diese Weise funktionell exprimiert, darunter auch verschiedene Oxidoreduktasen, wie Lipoxygenasen aus verschiedenen *Pleurotus*-Arten (Leonhardt *et al.* 2013) oder die Valencendioxygenase aus *Pleurotus sapidus* (Zelena *et al.* 2012). Daher wurde versucht, durch die Koexpression von Chaperonen lösliche und aktive Arylalkoholoxidase zu produzieren. Für die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Enzyms wurden im Rahmen dieser Arbeit drei unterschiedliche Chaperonkombinationen getestet. Dabei fand die Expression der Arylalkoholoxidase gemeinsam mit den Chaperonen GroEL/GroES oder dem Triggerfaktor statt. Zusätzlich wurde die gleichzeitige Expression der zwei Chaperonsysteme (GroEL/GroES

und Triggerfaktor) zusammen mit der Arylalkoholoxidase untersucht. Der Triggerfaktor (TF) ist das am besten charakterisierte *E. coli* Chaperon. Dieses Chaperon ist an der Außenseite der Ribosomen lokalisiert, jedoch zeigen neuere Untersuchungen, dass der Triggerfaktor auch agieren kann, wenn er nicht mit dem Ribosom assoziiert ist (Hoffmann *et al.* 2010). TF bindet kotranslational an die neu synthetisierten Polypeptidketten, verhindert dadurch unerwünschte Interaktionen zwischen diesen und fördert die korrekte Faltung von Proteinen (Bukau *et al.* 2000). Im Gegensatz dazu ist das Hitzeschock Chaperon GroEL/GroES-System hauptsächlich posttranslational an diesem Prozess beteiligt (Hoffmann *et al.* 2010). GroEL formt einen Zylinder, der eine Polypeptidkette aufnehmen kann. GroES bindet als Deckel an GroEL und ermöglicht die Neufaltung eines Proteins. Dieser Vorgang findet unter ATP-Verbrauch statt (Fenton *et al.* 1996). Der GroEL/GroES-Komplex unterstützt die korrekte Faltung neu gebildeter Polypeptidketten, minimiert durch die erneute Faltung von falsch gefalteten Proteinen die Aggregation und erhöht dadurch die Löslichkeit des rekombinant gebildeten Proteins (Gasser *et al.* 2008). Daher kann es in manchen Fällen sinnvoll sein, beide Chaperonsysteme gleichzeitig zu exprimieren (Nishihara *et al.* 2000).

Unter den vom Hersteller vorgegebenen Anfangsbedingungen war eine Koexpression der Arylalkoholoxidase mit den Chaperonen nicht möglich. Abhängig von den eingesetzten Induktormengen wurde entweder nur das Chaperon oder nur die Arylalkoholoxidase exprimiert. Daher wurden die Expressionsbedingungen optimiert, wobei die Konzentrationen und der Zeitpunkt der Zugabe der induzierenden Substanzen variiert wurden. Weiterhin wurde durch die Reduzierung der Expressionstemperatur auf 10 °C die Produktbildungsrate stark verlangsamt. Eine Induktorkonzentration von 0,25 mg mL<sup>-1</sup> L-Arabinose (pTF16 und pGro7) bzw. 5 ng mL<sup>-1</sup> Tetracyclin (pG-Tf2) zu 0,5 mM IPTG erzielte das beste Verhältnis zwischen der Produktion der Chaperone und des Zielenzym.

Durch die Koexpression der Arylalkoholoxidase mit der Chaperonkombination GroEL-GroES-tig bzw. mit GroEL-GroES alleine gelang es, die Menge an löslicher, aktiver Arylalkoholoxidase in den Zellen zu erhöhen. Daraus wurde geschlossen, dass das Vorhandensein des GroEL/GroES-Systems für die Faltung der rekombinanten Arylalkoholoxidase in die lösliche Form entscheidend ist. Allerdings lag immer noch ein großer Teil des Proteins in *inclusion bodies* vor. Daher bedarf diese Methode weiterer Entwicklung, um die Menge aktiven Enzyms zu erhöhen.

Häufig werden *inclusion bodies* gebildet, wenn ein Protein zu stark exprimiert wird. Die Verringerung der Expressionstemperatur auf 10 °C und somit eine starke Erniedrigung der Proteinsyntheserate, führte zur Bildung der größten Menge löslicher Arylalkoholoxidase. Daneben führen auch oxidativer Stress oder zellschädigende Substanzen zu einer Anhäufung von Proteinaggregaten. Die Bildung von Wasserstoffperoxid durch die lösliche aktive Arylalkoholoxidase, das für die Zelle toxisch ist, kann folglich auch zur Eliminierung der Arylalkoholoxidase in *inclusion bodies* führen. Ein weiteres Problem bei der Faltung der Arylalkoholoxidase könnte sein, dass die Affinität der exprimierten Chaperone zu gering war, um die Proteinaggregation effektiv verhindern zu können. Da die Wahl eines geeigneten Chaperons von der Affinität des Chaperons zum

Enzym abhängt, könnte weiterhin untersucht werden, ob die Löslichkeit der Arylalkoholoxidase durch die Chaperone DnaK/DnaJ/GrpE alleine oder zusammen mit dem GroES/GroEL-System verbessert wird.

In dieser Arbeit ist es durch mehrere Methoden gelungen, rekombinante Arylalkoholoxidase aus *E. coli* in eine lösliche Form zu bringen. Allerdings war die Aktivität der produzierten Arylalkoholoxidase niedrig, sodass eine weitere biochemische Charakterisierung nicht möglich war.

#### 4.2.7 Reinigung der *in vivo* produzierten löslichen Arylalkoholoxidase

Die lösliche Arylalkoholoxidase wurde mit einem His-tag produziert. Der Versuch, das Protein anschließend über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie zu reinigen zeigte, dass eine Reinigung der heterolog exprimierten Arylalkoholoxidase über den tag nur begrenzt möglich war, da nur sehr wenig Protein an das Säulenmaterial band. Die Reinigung von Proteinen über die IMAC ist dann problematisch, wenn das Zielprotein lediglich in geringen Mengen produziert wird und/oder reaktive Sauerstoffspezies generiert, da die Bildung von Ni<sup>2+</sup>-bindenden Proteinen bei den meisten *E. coli*-Stämme durch oxidativen Stress induziert wird (Bolanos-Garcia und Davies 2006). Für die Arylalkoholoxidase trifft beides zu. Nur ein geringer Teil liegt in löslicher, aktiver Form vor. Zudem ist die AAO ein Wasserstoffperoxid produzierendes Flavoprotein. Die aktive Arylalkoholoxidase verursacht höchstwahrscheinlich in der Zelle oxidativen Stress. *E. coli* reagiert darauf mit der Bildung von Schutzproteinen, die häufig eine große Zahl Histidine enthalten und so ebenfalls an das Ni<sup>2+</sup>-Harz binden können. Dadurch kann es zu einer starken Konkurrenz um die Bindungsstellen kommen. Daher band nur sehr wenig Enzym an das Säulenmaterial. Somit war eine Anreicherung des Zielproteins einhergehend mit der Abtrennung von Fremdprotein mittels Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie nicht möglich. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Arylalkoholoxidase zwar in einer löslichen Form vorliegt, aber der His-tag aufgrund der Faltung maskiert ist und somit nicht mit den Nickelionen an der Matrix interagieren kann.

#### 4.2.8 Nutzung eines eukaryotischen Wirtes für die rekombinante Expression

Die Wahl eines geeigneten Wirtes für die heterologe Expression ist direkt von den Eigenschaften des Zielproteins abhängig (Spadiut *et al.* 2010). Als Expressionswirt wurde daher neben *Escherichia coli* auch die Hefe *Hansenula polymorpha* ausgewählt. *Hansenula polymorpha* gehört zur Familie der Saccharomycetaceae und ist obligat aerob und thermotolerant. Für die heterologe Proteinexpression ist *Hansenula polymorpha* wegen der strikten Regulation der starken Promotoren (FMD, MOX, DHAS) und der Kultivierbarkeit zu hohen Zelldichten ein attraktiver Organismus (Gellissen *et al.* 2005). *Hansenula polymorpha* ist ebenso wie der Quellorganismus ein Eukaryont und besitzt im Gegensatz zu Bakterien die Möglichkeit der posttranslationalen

Modifikation. Ein wichtiger Aspekt der posttranslationalen Modifikation ist die Glykosylierung. *Hansenula polymorpha* besitzt die Fähigkeit Proteine sowohl durch N- als auch O-Glykosylierung zu modifizieren (Gellissen 2000, Irzykowska und Waśkiewicz 2014). Daher erhöht die Expression in diesem Wirt das Potential für die Produktion von löslichen, korrekt gefalteten Proteinen (Daly und Hearn 2005).

Die codierende Sequenz der reifen Arylalkoholoxidase wurde mit der hefespezifischen MF $\alpha$ -Präprosequenz fusioniert und in *Hansenula polymorpha* exprimiert (Artes Biotechnology), wobei das Enzym in den Kulturüberstand sezerniert werden sollte. Obwohl mit Hilfe des Konstruktes die Arylalkoholoxidase mit einer Translokationssequenz verknüpft wurde, wurde im Kulturüberstand keine lösliche Arylalkoholoxidase nachgewiesen. Das Enzym wurde jedoch cytosolisch exprimiert, wobei mehr als 50% der Arylalkoholoxidase in der löslichen Fraktion vorlagen. Dennoch wurde in der löslichen Fraktion lediglich eine Aktivität von ca. 5 U L<sup>-1</sup> nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass durch den Expressionswirt eine nicht native Faltung begünstigt bzw. eine nicht gewünschte posttranslationale Modifikation durchgeführt wurde.

#### 4.2.9 Rückfaltung der Arylalkoholoxidase aus *inclusion bodies*

Mit den untersuchten Expressionsstrategien wurden keine ausreichenden Mengen löslicher, aktiver Arylalkoholoxidase produziert, und das Enzym sammelte sich hauptsächlich in *inclusion bodies*. Daher wurde überprüft, ob es eine Methode gibt, um das Protein aus *inclusion bodies* in lösliches und aktives Protein zu überführen. Hierfür ist es meistens notwendig, denaturierende und chaotrope Agenzien wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid zu verwenden, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu lösen. Dies führt zu löslichem, jedoch denaturiertem Protein. Um katalytisch aktives Protein zu erhalten, ist es erforderlich, das Protein durch einen Rückfaltungsprozess *in vitro* in die korrekt gefaltete, native Form zu überführen. Für die Renaturierung muss das chaotrope Agens wieder entfernt werden. Dies erfolgt abhängig vom Protein entweder durch Dialyse oder Verdünnung des gelösten Proteins in einen Rückfaltungspuffer (Jhamb und Sahoo 2012, Tsumoto *et al.* 2003). Bei der Dialyse verändern sich Pufferzusammensetzung und Konzentrationen langsam und die Proteinkonzentration bleibt hierbei nahezu gleich. Die Rückfaltung des Enzyms erfolgt langsam mit der allmählichen Änderung der Bedingungen. Bei der blitzartigen Verdünnung sinkt zum einen die Proteinkonzentration stark, zum anderen ändern sich Pufferzusammensetzung und Konzentrationen schlagartig. Die Rückfaltung des Enzyms erfolgt schnell durch die plötzliche Änderung der Bedingungen. Das chaotrope Agens mit einem großen Überschuss an Agens-freiem Puffer blitzartig zu verdünnen, ist meist deutlich effektiver, da eine zu geringe Pufferaustauschrate vermehrt zu Fehlfaltungen und Aggregationen der Faltungsintermediate führt (Basu *et al.* 2011). Ein Anhaltspunkt für eine erfolgreiche Renaturierungsstrategie bietet die REFOLD *database*, in der publizierte Methoden für die Rückfaltung von Proteinen gesammelt werden (Chow *et al.* 2006). Bislang liegen in der Datenbank 1165 Einträge vor (Stand Dezember 2014). Die Rückfaltungsprozedur bedeutet

meist jedoch einen hohen Zeitaufwand und es ist stets unsicher, ob das Protein tatsächlich seine biologische Aktivität zurück erhält. Oft sind auch die Ausbeuten sehr niedrig (Sørensen und Mortensen 2005).

Die Produktion von *inclusion bodies* kann allerdings auch Vorteile haben, da das Protein so vor Proteasen und der Wirtsorganismus vor toxischen Proteinen geschützt wird. Außerdem liegt das Protein in einer hohen Konzentration mit einer hohen Reinheit innerhalb der *inclusion bodies* vor und kann einfach mittels Zentrifugation isoliert werden (Idicula-Thomas und Balaji 2007). Ein Beispiel für die erfolgreiche Rückfaltung eines in *E. coli* produzierten Enzyms aus *Pleurotus sapidus* ist eine extrazelluläre Lipase. Die Produktion führte ebenfalls zur Bildung von *inclusion bodies*. Durch Denaturierung und Rückfaltung wurde ein katalytisch aktives Protein gewonnen, welches Xanthophyllester mit hoher Effizienz hydrolysierte (Krügener *et al.* 2009). Daher wurde überprüft, ob die Arylalkoholoxidase ebenfalls solubilisiert, renaturiert und so in eine aktive Form überführt werden kann.

Die *in vitro*-Renaturierung wird durch viele verschiedene Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und die Eigenschaften des verwendeten Lösungsmittels beeinflusst und muss an jedes zu renaturierende Protein angepasst werden. Der Rückfaltungsprozess konkurriert mit parallel ablaufenden Nebenreaktionen wie Aggregation und Fehlfaltung (Kiefhaber *et al.* 1991). Der Faltungsprozess kennzeichnet den Übergang von einer thermodynamisch ungünstigen Konformation – über eine Vielzahl von unterschiedlichen Intermediatzuständen – hin zu einer thermodynamisch stabilen Konformation (Dill *et al.* 2008).

#### 4.2.9.1 Rückfaltung durch blitzartige Verdünnung

Die Rückfaltung erfolgte nach Ruiz-Dueñas *et al.* (2006), die eine Rückfaltungsstrategie für eine Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus eryngii* veröffentlichten. Bei diesem Protokoll wurden die *inclusion bodies* mit 8 M Harnstoff gelöst. Das schnelle Entfernen des chaotropen Agens durch die blitzartige Verdünnung in ein großes Volumen an Rückfaltungspuffer führte zu einem katalytisch aktiven Enzym. Der Zusatz von FAD und Glycerol zum Rückfaltungspuffer war notwendig, um aktives Enzym zu erhalten. Glycerol hat eine Chaperon-ähnliche Wirkung und verhindert die Proteinaggregation (Gekko und Timasheff 1981). Bei dem schwach alkalischen pH (pH 9) werden die Cysteinreste in den deprotonierten Zustand überführt und ein Überschuss von GSSG erzeugt oxidierende Bedingungen. Beides fördert die Bildung von Disulfidbrücken und scheint an der Bildung der in der Arylalkoholoxidase erwarteten Disulfidbrücke mitzuwirken. Bei hohen Proteinkonzentrationen können intermolekulare Interaktionen zur Aggregation und Präzipitation des Proteins führen. Für einige Proteine wurde bereits gezeigt, dass durch niedrigere Proteinkonzentrationen höhere Aktivitäten erreicht wurden (Lilie *et al.* 1998). Bei der *flash dilution* wird üblicherweise eine finale Proteinkonzentration im Bereich von 10 bis 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  eingestellt (Jungbauer und Kaar 2007).

Ruiz-Dueñas *et al.* (2006) zeigten, dass die höchste Aktivität nach der Rückfaltung erreicht wird (Rückfaltungseffizienz 75%), wenn bei der *flash dilution* eine finale Proteinkonzentration von  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  im Rückfaltungspuffer eingestellt wird. Anders als bei Ruiz-Dueñas *et al.* (2006) wurde in dieser Arbeit für eine Steigerung der Reinigungseffizienz zuvor die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Das Eluat wurde zum einen 1:20 ( $11 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und zum anderen 1:50 ( $4,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) verdünnt, bei  $16^\circ\text{C}$  abgedunkelt gelagert und die AAO-Aktivität zu definierten Zeiten bestimmt. Bei beiden Verdünnungen wurde nach 96 h die höchste AAO-Aktivität gemessen, die bei weiteren Messungen konstant blieb. Die Aktivität war bei einer Verdünnung um den Faktor 50 allerdings deutlich höher. Die Arylalkoholoxidase wurde im Anschluss mittels Pall-Zentrifugenröhrchen um den Faktor 3 konzentriert und im Rückfaltungspuffer bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Eine fortlaufende Kontrolle der Aktivität zeigte, dass die Aktivität der rückgefalteten Arylalkoholoxidase (AAO\*) bei einer Lagerung unter diesen Bedingungen wieder deutlich stieg und nach 10 Tagen die höchste Aktivität vorhanden war. Dies deutet darauf hin, dass neben der Verdünnung von Pufferkomponenten, wie Harnstoff und  $\beta$ -Mercaptoethanol, auch die Proteinkonzentration eine entscheidende Rolle für die Rückfaltungseffizienz spielt. Die Signalsequenz beeinflusste nicht die Löslichkeit in den untersuchten Expressionssystemen. Nach Denaturieren und Rückfalten wurde für das Enzym mit Signalsequenz jedoch eine geringere Aktivität nachgewiesen als für das Enzym ohne Signalsequenz. Daher wurde für die weitere Charakterisierung das Enzym ohne Signalsequenz verwendet.

#### 4.2.10 Nachweis mittels polyklonalem Antikörper

Die in *E. coli* exprimierte AAO\* aus *Pleurotus sapidus* wurde mittels Western Blot und AAO-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3.23). Die gereinigte AAO\* wurde im Western Blot selektiv mit einem Molekulargewicht von ca. 63 kDa nachgewiesen. Das rekombinante Enzym wurde nativ, wie auch denaturiert mittels Western Blot detektiert. Die nach dem Strukturmodell ausgewählte Antigen determinante befindet sich demnach an der Oberfläche des Enzyms, sodass eine Antikörperbindung auch am nativen Enzym möglich ist. Auch die unter Koexpression der Chaperone (GroEL/GroES, Triggerfaktor) produzierte Arylalkoholoxidase wurde spezifisch mittels Antikörper in der löslichen Fraktion detektiert. Allerdings wurde hier auch eine weitere Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 126 kDa nachgewiesen (Abb. 3.19). Dabei könnte es sich um dimere Aggregate der Arylalkoholoxidase handeln. In gereinigter Form lag die Arylalkoholoxidase dauerhaft als Monomer vor. Im Gegensatz dazu neigte das Enzym, wenn es nach dem Zellaufschluss ungereinigt gelagert wurde, dazu zu aggregieren. Sowohl die lösliche, als auch die rückgefaltete Arylalkoholoxidase wurden mit Hilfe des spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass beide Enzyme in der nativen Konformation vorliegen.

#### 4.2.11 Biochemische Charakterisierung

Arylalkoholoxidasen aus Basidiomyceten sind monomere Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 70 bis 88 kDa. Die isoelektrischen Punkte liegen in einem Bereich zwischen 3,5 und 5,5. Sie zeigen in einem Bereich von pH 5-6 die höchste Aktivität (Asada *et al.* 1995, Varela *et al.* 2001). Die heterolog in *E. coli* exprimierte Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus eryngii* zeigte mit einem breiten optimalen pH-Bereich (pH 4-8) und pH 6,0 als Optimum sowie einem optimalen Temperaturbereich von 50 bis 55 °C (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006) vergleichbare Charakteristika wie die rekombinante Arylalkoholoxidase dieser Arbeit. Bei hoher Aktivität über einen breiten pH-Bereich (pH 3-7) wurde pH 5,0 als Optimum (s. 3.3.8.1) und ein Temperatur-Optimum von 60 °C (s. 3.3.8.2) ermittelt. Auch für die nativen Arylalkoholoxidasen aus *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus pulmonarius* sind mit einem optimalen pH von 5,0 (Guillén *et al.* 1992) bzw. 6,0 (Varela *et al.* 2000a) und einer optimalen Temperatur von 55 °C ähnliche Charakteristika in der Literatur beschrieben. Das Molekulargewicht der gereinigten, rückgefalteten AAO\* aus *Pleurotus sapidus* betrug 62,5 kDa (Abb. 3.22). Das Molekulargewicht der löslichen Arylalkoholoxidase betrug 62,6 kDa (Abb. 3.19). Die für das Molekulargewicht ermittelten Werte stimmen mit dem theoretischen Wert für die His<sub>6</sub>-Arylalkoholoxidase ohne Signalsequenz von 62,9 kDa (Abweichung 0,6%) überein. Diese Molekulargewichte sind vergleichbar mit denen für die rekombinante, nicht glykosylierte Arylalkoholoxidase<sup>3</sup> aus *Pleurotus eryngii* (61,8 kDa Ruiz-Dueñas *et al.* 2006) sowie dem Molekulargewicht der deglykosylierten Arylalkoholoxidase aus *P. pulmonarius* (60,9 kDa; Varela *et al.* 2000a). Die für die nativen Enzyme ermittelten Molekulargewichte von 69,1 kDa für die Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus eryngii* (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006) und 70,5 kDa (Varela *et al.* 2000a) für Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus pulmonarius* liegen höher. Dieser Unterschied hängt mit der Glykosylierung der Wildtypenzyme zusammen, für die ein Kohlehydratgehalt von 10,5% bzw. 15% nachgewiesen wurde. Aufgrund der Homologie und der bioinformatisch ermittelten potentiellen N-Glykosylierungsstellen (s. 3.10) kann für das Wildtypenzym von *Pleurotus sapidus* ebenfalls eine Glykosylierung postuliert werden. Die Glykosylierung hat keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms, beeinflusst jedoch die Stabilität und Löslichkeit (Nie *et al.* 1999). Das Fehlen einer Glykosylierung bei der rekombinanten Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus* könnte der Grund dafür sein, dass diese hauptsächlich unlöslich in Form von *inclusion bodies* produziert wurde.

#### 4.2.12 Substratspezifität

Untersuchungen zur Substratspezifität zeigten, dass die Arylalkoholoxidase aus *P. eryngii* den Umsatz von primären Alkoholen mit sehr unterschiedlichen chemischen Strukturen katalysiert. Die Arylalkoholoxidase ist in der Lage, neben primären aromatischen Alkoholen auch deren Aldehyde sowie nicht aromatische mehrfach ungesättigte primäre Alkohole umzusetzen (Guillén

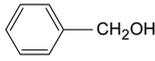
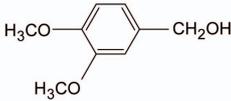
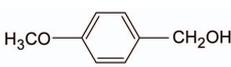
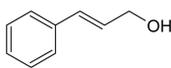
---

<sup>3</sup>exprimiert in *E. coli*

et al. 1990, 1992). Daneben setzen Arylalkoholoxidasen mit niedriger Effizienz auch sekundäre Alkohole um (Hernández-Ortega et al. 2012b). Für eine effiziente Umsetzung durch die Arylalkoholoxidase muss das Substrat mindestens zwei konjugierte Doppelbindungen und eine primäre Alkoholgruppe besitzen, wie beispielsweise das Substrat 2,4-Hexadien-1-ol. Diese nicht-aromatische Verbindung stellt eines der besten AAO-Substrate dar (Ferreira et al. 2005). Arylalkoholoxidasen zeigen gegenüber aromatischen Aldehyden nur eine geringe Aktivität. Die höchste Aldehydoxidase-Aktivität wurde gegenüber aromatischen Aldehyden mit elektronenziehenden Substituenten nachgewiesen. Für die Umsetzung von beispielsweise *p*-Nitrobenzaldehyd wurden Aktivitäten von unter 5% bezogen auf die Aktivität für die Umsetzung von Benzylalkohol ermittelt (Guillén et al. 1992).

Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die rekombinante (*E. coli*) rückgefaltete Arylalkoholoxidase (AAO\*) aus *Pleurotus sapidus* erfolgte mit den aromatischen primären Alkoholen Benzylalkohol, *p*-Anisalkohol, Veratrylalkohol und Zimtalkohol (s. 3.3.8.3). Diese vier Substrate werden auch von der rekombinanten Arylalkoholoxidase und der Wildtyp Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus eryngii* umgesetzt. Guillén et al. (1990) zeigten, dass Coniferylalkohol von der Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus eryngii* umgesetzt wird. In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Umsetzung von Coniferylalkohol durch die AAO\* aus *Pleurotus sapidus* nachgewiesen, wobei jedoch nur eine niedrige Umsatzrate detektiert und daher keine kinetischen Parameter bestimmt wurden.

Tabelle 4.1: Kinetische Parameter für die rekombinante (*E. coli*) rückgefaltete Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus* sowie im Vergleich die Konstanten für die rekombinante (*E. coli*) rückgefaltete Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus eryngii* und die Wildtyp-Arylalkoholoxidase aus *P. eryngii*

		rückgefaltete AAO <i>P. sapidus</i>	rückgefaltete AAO <i>P. eryngii</i> <sup>a</sup>	AAO <i>P. eryngii</i> <sup>b</sup>
<b>Benzylalkohol</b>				
	$K_m$	629	873	840
	$k_{cat}$	34	30	59
	$k_{cat} K_m^{-1}$	55	35	70
<b>Veratrylalkohol</b>				
	$K_m$	270	541	349
	$k_{cat}$	98	99	143
	$k_{cat} K_m^{-1}$	361	172	410
<b><i>p</i>-Anisalkohol</b>				
	$K_m$	55	37	40
	$k_{cat}$	154	134	239
	$k_{cat} K_m^{-1}$	2808	3870	5970
<b>Zimtalkohol</b>				
	$K_m$	789		
	$k_{cat}$	67	n.b.	n.b.
	$k_{cat} K_m^{-1}$	85		

$K_m$  in  $\mu\text{M}$ ,  $k_{cat}$  in  $\text{s}^{-1}$ ,  $k_{cat} K_m^{-1}$  in  $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ , n.b. – nicht bestimmt. Alle Fehlergrenzen lagen unter 20% der Mittelwerte

<sup>a</sup>Ruiz-Dueñas et al. 2006, <sup>b</sup>Guillén et al. 1992

Die Aktivität der Arylalkoholoxidase gegenüber den getesteten Substraten stieg vom Benzylalkohol über Veratrylalkohol zum *p*-Anisalkohol an. Die Anzahl konjugierter Doppelbindungen und das Vorhandensein von Elektronendonorguppen sind dafür entscheidend (Guillén *et al.* 1992). Die höhere AAO-Aktivität gegenüber Zimtalkohol im Vergleich zum Benzylalkohol ist durch die steigende Anzahl konjugierter Doppelbindungen zu erklären. Bei den substituierten Benzylalkoholen führt eine Methoxygruppe in *para* Stellung als Elektronendonor zu einer signifikanten Steigerung der Arylalkoholoxidaseaktivität und so zu einer höheren Aktivität gegenüber Veratrylalkohol und Benzylalkohol. Die bestimmten Werte sind vergleichbar mit den für die rückgefaltete AAO\* wie auch für die Wildtyp Arylalkoholoxidase aus *P. eryngii* ermittelten Werten (Tab. 4.1). Allerdings waren die bestimmten  $k_{cat}$ -Werte für die rekombinanten Enzyme stets geringfügig niedriger als für das Wildtypenzym. Die fehlende Glykosylierung von heterolog in *E. coli* exprimierten Enzymen im Vergleich zu den glykosylierten Wildtypenzymen kann für unterschiedliche physikochemischen Eigenschaften verantwortlich sein (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006, Solá *et al.* 2007). Für eine heterolog in *Emericella nidulans* exprimierte Arylalkoholoxidase aus *P. eryngii* wurden die kinetischen Parameter für Zimtalkohol ( $K_m$ : 708  $\mu\text{M}$ ;  $k_{cat}$ : 65  $\text{s}^{-1}$ ;  $k_{cat} K_m^{-1}$ : 78  $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ ) bestimmt (Ferreira *et al.* 2005). Diese Werte sind ebenfalls mit den für die rekombinante Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus sapidus* bestimmten Werten vergleichbar.

Einige durch Arylalkoholoxidasen produzierte phenolische wie auch nicht-phenolische aromatische Aldehyde stellen industriell bedeutsame Aromaverbindungen dar, beispielsweise Vanillin, Benzaldehyd oder *p*-Anisaldehyd (Romero *et al.* 2009). Daneben setzen Arylalkoholoxidasen mit niedriger Effizienz auch sekundäre Alkohole um, deren Umsetzung durch eine gentechnische Vergrößerung der Substratbindetasche verbessert werden könnte. Da die Umsetzung der Substrate stereoselektiv erfolgt, könnte eine so veränderte Arylalkoholoxidase dazu verwendet werden, aus einem Razematengemisch bestimmte Enantiomere anzureichern. Diese Gewinnung von verschiedenen sekundären Alkoholen, die beispielsweise als synthetische Intermediate oder analytische Reagenzien dienen, ist für die chemische Industrie von Interesse (Hernández-Ortega *et al.* 2012a, 2012b).

### 4.3 DyP-Typ Peroxidase

Bereits 2003 stellten Zorn *et al.* in einem Screening von mehr als 50 Pilzen fest, dass *Mycetinis scorodonius* (Echter Knoblauchschwinding) die Fähigkeit besitzt  $\beta$ -Carotin zu spalten. 2008 identifizierten Scheibner *et al.* in diesem Basidiomycet neuartige Peroxidasen (MsP1 und MsP2), die den sogenannten „*dye decolorizing peroxidases*“ (Farbstoff entfärbende Peroxidasen) zugeordnet wurden. MsP1 weist z.T. außergewöhnliche Charakteristika auf (Pühse *et al.* 2009). Da Peroxidasen eine zentrale Rolle bei der Degradation von Lignocellulosen spielen, sollte aus *Pleurotus sapidus* ebenfalls eine Peroxidase vom DyP-Typ identifiziert und charakterisiert werden.

Für die Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* wurde eine cDNA-Sequenz mit einer Größe von 1 551 bp kloniert. Dies entspricht einer Aminosäuresequenz mit einer Länge von 516 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 57,1 kDa für das Protein (Abb. 3.29). Die klonierte cDNA-Sequenz wurde bioinformatisch (Tab. 2.12: Prosite, Pfam) untersucht und das codierte Enzym aufgrund seiner Homologie der Klasse der Häm-Peroxidasen und der Familie der DyP-Typ Peroxidasen zugeordnet. Häm-Peroxidasen werden anhand von Sequenzhomologien sowie funktioneller und struktureller Eigenschaften in verschiedenen Superfamilien zusammengefasst (Morgenstern *et al.* 2008). Häm-Peroxidasen aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen werden in der Superfamilie der Pflanzen-Peroxidasen zusammengefasst (Morgenstern *et al.* 2008). Die zweite Superfamilie wird von den tierischen Peroxidasen gebildet. Die Superfamilie der Pflanzen-Peroxidasen wird wiederum in drei verschiedene Klassen unterteilt (Caruso *et al.* 2001, Welinder 1992). Die Klasse II beinhaltet die sekretorischen Pilz-Peroxidasen, welche sich durch eine große Heterogenität auszeichnen (Welinder 1992). Zu dieser Klasse gehören u.a. die Familien der Mangan-Peroxidasen (MnP), Lignin-Peroxidasen (LiP) und versatile Peroxidasen (VP) (Lundell *et al.* 2010, Martínez 2002). Die DyP-Typ Peroxidasen wurden entsprechend der Klassifikation von Welinder ursprünglich auch der Klasse II der Superfamilie der pflanzlichen Peroxidasen zugeordnet. Alle Peroxidasen der Klasse II sind extrazellulär und besitzen ein Häm als prosthetische Gruppe (Dunford 1991, Petersen *et al.* 1994, Piontek *et al.* 1993, Poulos *et al.* 1978, 1993). Allerdings zeigen die DyP-Typ Peroxidasen keine Homologie zu anderen bisher beschriebenen Peroxidase-Familien. Sie besitzen einzigartige Merkmale, die sie von anderen Häm-Peroxidasen unterscheiden und bilden inzwischen eine eigene Superfamilie (EC 1.11.1.19) unter den Häm-Peroxidasen. Ein erstes Anzeichen für die Existenz dieses neuen Peroxidase-Typs fanden Kim *et al.* (1995). Das erste Enzym dieser Familie (BadDyP) wurde 1999 aus dem Pilz *Bjerkandera adusta* (ursprünglich bezeichnet als *Geotrichum candidum* Dec 1, später fälschlicherweise als *Thanatephorus cucumeris* bezeichnet) gereinigt und charakterisiert (Kim und Shoda 1999b). Inzwischen wurden DyP-Typ Peroxidasen nicht nur in Basidiomyceten sondern auch in Ascomyceten und Bakterien gefunden (Hofrichter *et al.* 2010). Dies bedeutet auch, dass diese Peroxidasen einen gemeinsamen Ursprung vor der Trennung der Domänen haben (Sugano 2009). Die klassische DyP aus *Bjerkandera adusta* ist das am besten charakterisierte Mitglied der Familie





Das charakteristische G<sub>xx</sub>DG-Motiv der DyP-Typ Peroxidasen mit den konservierten Resten im Bereich der Häm-Bindestelle wurde auch in der rPsaDyP-Sequenz gefunden. DyP-Typ Peroxidasen besitzen eine einzigartige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bindestelle, die sich von anderen Peroxidasen unterscheidet (Faraco *et al.* 2007). Während bei anderen Peroxidasen die Neuordnung des Protons von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> typischerweise durch das distale Histidin vermittelt wird, findet diese bei DyP-Typ Peroxidasen durch ein Aspartat statt. Für die Katalyse spielen bei der klassischen DyP aus *Bjerkandera adusta* die Reste D171, H308 und R329 (s. 4.3.1.2, Zählung ausgehend vom reifem Protein) eine wichtige Rolle (Sugano *et al.* 2007). Das Alignment (Abb. 4.5) zeigt, dass die Aminosäuren, die an der Häm-Bindung sowie an der Katalyse beteiligt sind, hochkonserviert sind. Das proximale Histidin (H308, fünfter Ligand des Häms) wurde bei der rPsaDyP an der Position 317 (Zählung ausgehend vom reifen Protein) identifiziert. Die konservierten Reste D171 und R329 an der distalen Seite des Häms sind an der Aktivierung des Enzyms durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beteiligt. Die Positionen dieser Reste wurden anhand des Alignments in der rPsaDyP-Sequenz ebenfalls identifiziert (D174 und R338). Interessanterweise ist der distale Aspartatrest in der Häm-Höhle ein strukturelles Merkmal, das DyP-Typ Peroxidasen mit bakteriellen Katalase-Peroxidasen gemeinsam haben (Liers *et al.* 2013b, Zámocký *et al.* 2009).

Die Histidine 164 bzw. 166 (BadDyP) sind in vielen DyP-Sequenzen konserviert. Lange Zeit wurde daher diskutiert, ob einer dieser Reste als proximales Histidin bzw. als Häm-Ligand fungiert. Sugano *et al.* (2004) zeigten, dass H166 für die Peroxidaseaktivität nicht essentiell ist. Andererseits zeigten diese Autoren, dass die Substitution H164A zum Verlust der Aktivität führte. Die Ergebnisse zeigten keine direkte Beteiligung von H164 an der Häm-Bindung, sondern deuten nur auf eine Erniedrigung der Proteinstabilität und eine Abnahme der Häm-Binde-Affinität hin (Faraco *et al.* 2007). Das H164 ist bei der rPsaDyP ebenso wie bei der PosDyP nicht konserviert und gegen ein Lysin ausgetauscht (K167). Dieser Austausch wird auch bei verschiedenen anderen Vertretern der DyP-Typ Peroxidase-Familie gefunden, beispielsweise bei den Proteinen aus *Aspergillus oryzae* (Q2UPE9, Q2U113), *Neurospora crassa* (Q7S3A4) und verschiedenen anderen Mitgliedern der DyP-Familie (Faraco *et al.* 2007). Dies deutet darauf hin, dass H164 nicht direkt an der Häm-Bindung beteiligt ist und ein anderer Rest an der Koordination des Häms in DyP-Typ Peroxidasen beteiligt ist. Dennoch spielt das H164 nach Sugano (2009) eine wichtige Rolle für die Faltung von DyP-Typ Peroxidasen und die Bindung des Häms, auch wenn es nicht bei allen Mitgliedern dieser Proteinfamilie konserviert ist. Anders als die Autoren beschreiben, scheint jedoch nicht Histidin für die Faltung entscheidend zu sein, sondern eine basische Aminosäure an dieser Position. Johjima *et al.* (2003) identifizierten 10 potentielle Liganden (His, Tyr und Cys) des Häms. Strittmatter *et al.* (2013a) zeigten für die AauDyP, dass auf der proximalen Seite Arginin 255 und 311 Wasserstoffbrückenbindungen zu den Propionatresten des Häms eingehen und an der Koordination des Häms beteiligt sind. Die homologen Reste wurden bei der rPsaDyP identifiziert (Positionen 267 und 324) und haben im Modell eine Distanz von 3,2 Å bzw. 3,5 Å zu den Propionaten (Abb. 3.32).

DyP-Typ Peroxidasen besitzen eine einzigartige Sekundärstruktur, die sich von den Strukturen klassischer Häm-Peroxidasen unterscheidet. Im Gegensatz zu klassischen Peroxidasen, die hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices aufgebaut sind, haben DyP-Typ Peroxidasen ein prominentes Motiv antiparalleler  $\beta$ -Faltblätter auf der distalen Seite des Häms, die eine Ferredoxin-ähnliche Faltung annehmen. Dieses Motiv wurde bisher für keine andere Peroxidase beschrieben (Sugano *et al.* 2007, Zubieta *et al.* 2007).

Faraco *et al.* (2007) isolierten und sequenzierten die cDNA einer potentiellen DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus*. Die untersuchte rPsaDyP besitzt eine Identität auf Ebene der Primärsequenz von 95% zu der veröffentlichten Sequenz der PosDyP. Obwohl die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Enzyms unter der Zugriffsnummer CAK55151.1 (NCBI, GenBank) registriert sind, wurde das Enzym bisher nicht weiter charakterisiert.

Homologievergleiche zwischen der rPsaDyP und verschiedenen Vertretern der Pilz-Peroxidasen wie Lignin-Peroxidasen (LiP) und Mangan-Peroxidasen (nach Collins *et al.* 1999) zeigten nur geringe Homologien. Die klassischen Reste der Lignin- und Manganperoxidase für die Bindung von aromatischen Substraten und Mangan wurden in der rPsaDyP nicht gefunden.

#### 4.3.1.1 Ermittlung einer Signalsequenz

In der aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz wurde mittels InterProScan (EBI) bzw. SignalP 4.1 (Petersen *et al.* 2011) eine potentielle Schnittstelle für eine Signalpeptidase zwischen den Aminosäuren 19/20 ermittelt. Bei verschiedenen anderen DyP-Typ Peroxidasen – wie der BadDyP sowie bei MsP1 und MsP2 – wurden ebenfalls potentielle Signalpeptidschnittstellen an ähnlicher Position identifiziert (Scheibner *et al.* 2008, Sugano *et al.* 1999, 2000). Die Prozessierung von anderen DyP-ähnlichen Enzymen aus Basidiomyceten zeigt allerdings, dass deren Prozessierung zwischen Position 56/57 (BadDyP), 55/56 (MsP1), 57/58 (MsP2), 61/62 (AauDyP) und 55/56 (TAP) erfolgt (Johjima *et al.* 2003, Liers *et al.* 2010, Scheibner *et al.* 2008, Sugano *et al.* 2000). Bei allen diesen Enzymen wurden jedoch am N-Terminus des reifen Proteins keine typischen Schnittstellen gefunden. Allerdings wurde in allen Sequenzen im Bereich des N-Terminus ein Cluster konservierter Aminosäuren gefunden (Abb. 4.5, Liers *et al.* 2010). Die rPsaDyP wird vergleichbar zu anderen DyP-Typ Peroxidasen aus Basidiomyceten vor diesem Bereich zwischen den Positionen 62/63 prozessiert. Das reife Protein hat wie die verglichenen DyP-Typ Peroxidasen als Startaminosäure ein Alanin (Abb. 3.49). Hier zeigt sich erneut, dass die Berechnung möglicher Signalpeptidschnittstellen mittels SignalP 4.1 für Enzyme aus Basidiomyceten nur bedingt geeignet ist.

#### 4.3.1.2 Katalysemechanismus

Peroxidasen katalysieren die Oxidation eines breiten Spektrums von Substraten unter Verwendung von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) als Cofaktor. Peroxidasen werden bspw. durch Arylkohloxidasen mit dem Cofaktor versorgt, die simultan mit diesem Enzym produziert werden (Shimokawa *et al.* 2008). Sugano *et al.* (2007) haben ein Schema für den Katalysemechanismus von DyP-Typ Peroxidasen aufgestellt. Dabei gelangt Wasserstoffperoxid über den überwiegend hydrophoben Häm-Kanal (*heme access channel*) in die Wasserstoffperoxidbindetasche (Yoshida *et al.* 2011, D171, R329, L354, F356 bei der BadDyP). Drei der Reste der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bindetasche sind bei der rPsaDyP ebenfalls konserviert (D174, R338, F365). Leucin ist bei den DyP-Typ Peroxidasen von *P. sapidus* und *P. ostreatus* gegen Valin (rPsaDyP V363) ausgetauscht, das ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften hat. Wasserstoffperoxid fungiert als Elektronenakzeptor und wird zu Wasser reduziert. Dabei nimmt das Aspartat ein Proton vom proximalen Sauerstoffatom des  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf, wobei Arginin (BadDyP, R329) als Ladungsstabilisator dient. Dieses Proton wird auf das distale Sauerstoffatom übertragen und die O-O-Bindung wird heterolytisch gespalten, wobei Wasser freigesetzt wird. Anschließend wird ein Elektron vom  $\text{Fe}^{3+}$ , das zu  $\text{Fe}^{4+}$  oxidiert wird und vermutlich ein Elektron aus dem Porphyrin, ähnlich wie bei den klassischen Peroxidasen, auf den verbleibenden Sauerstoff übertragen. Dadurch entsteht ein Porphyrin-Kation-Radikal, das einen Fe(IV)-Oxo-Komplex enthält (Verbindung I der klassischen Peroxidasen).  $\text{Fe}^{3+}$  bzw.  $\text{Fe}^{4+}$  werden stabilisiert, indem E391 eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem fünften Liganden des Häms (H308) ausbildet. Anhand des Alignments (Abb. 4.5) wurde gezeigt, dass das E391 der BadDyP bei anderen DyP-Typ Peroxidasen gegen ein Aspartat (rPsaDyP D401) ausgetauscht ist. Durch die sukzessive Aufnahme von zwei Elektronen von Substratmolekülen wird der Ausgangsoxidationszustand des  $\text{Fe}^{3+}$  wieder hergestellt. Die für den Reaktionsweg der klassischen Peroxidasen beschriebene Verbindung II wurde für die DyP-Typ Peroxidasen bisher nicht nachgewiesen (Hofrichter *et al.* 2010, Sugano *et al.* 2007). Erste Daten über einen reaktiven Enzymzustand als letztes substratoxidierendes DyP-Intermediat, der möglicherweise Verbindung II ähnelt, wurden erst kürzlich veröffentlicht (Liers *et al.* 2013a). Auch wenn die DyP-Typ Peroxidasen nicht die typische Verbindung II der Peroxidasen bilden, genügen sie dennoch der Definition von Peroxidasen (Sugano 2009). Dieser Unterschied deutet darauf hin, dass sich der Reaktionsmechanismus von dem klassischer Peroxidasen unterscheidet und so auch die Einzigartigkeit von DyP-Typ Peroxidasen begründet.

Während die Rolle von Histidin und Aspartat als Schlüsselreste der Säure-Base-Katalyse in der Häm-Bindetasche belegt ist, ist die Funktion von Arginin 329 noch nicht vollständig geklärt. Dieser Rest ist für Mitglieder der Superfamilie der pflanzlichen Peroxidasen essentiell, wohingegen bei DyP-Typ Peroxidasen bspw. die Mutante R329K teilweise ihre Aktivität behält und dieser Rest daher nicht immer für die Katalyse notwendig scheint (Sugano 2009). Wie Guallar und Olsen (2006) zeigten, spielen die Propionatreste des Häms ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Katalyse. So wird bei den Dyp-Typ Peroxidasen im Vergleich zu anderen Peroxidasen

das Propionat am Pyrrolring C durch starke Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein in eine ungewöhnliche Konformation gekippt. Yoshida *et al.* (2011) erweiterten den Mechanismus für die Bildung von Verbindung I, in dem sie zeigten, dass eine Änderung der Konformation des katalytischen Aspartats (D171) für die Umsetzung von  $H_2O_2$  entscheidend ist. Im Ruhezustand ist das Aspartat vom Häm abgewandt und bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Proteinrückgrat und Wasser in der Bindetasche aus. In Gegenwart von  $H_2O_2$  schwingt dieser Rest in Richtung des Häms und bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Arginin (R329) aus. Diese Konformationsänderung ist die Voraussetzung dafür, dass Verbindung I gebildet werden kann (Strittmatter *et al.* 2013a). Sobald Verbindung I gebildet wurde, schwingt das Aspartat in seine Ausgangsposition zurück und zeigt erneut in Richtung des Proteinrückgrats (Yoshida *et al.* 2011). Die Öffnung des Häm-Zugangskanals ist in dieser Konformation deutlich größer. Folglich könnte D171 als „Pfortner“ den Zugang zum Häm-Kanal regulieren und die Passage von Substratmolekülen ermöglichen, die größer als  $H_2O_2$  sind. Dadurch könnte es den Enzymen möglich sein, Substrate direkt in der distalen Substratbindetasche zu oxidieren (Strittmatter *et al.* 2013a). Allerdings zeigten die Autoren ebenfalls, dass Substrate mit maximal der Größe von Guajakol in die Bindetasche passen, daher ist der Schwingmechanismus vor allem für die Bildung der Verbindung I erforderlich. Yoshida *et al.* (2012) identifizierten die Substratbindetasche der BadDyP für DMP, das eine ähnliche Größe hat wie Guajakol. Die Autoren zeigten, dass zwei DMP-Moleküle an das Enzym banden. Ein Substratmolekül band – vermutlich unspezifisch – weit entfernt vom Häm und es wurde kein Wasserstoffbrückennetzwerk zur prosthetischen Gruppe ausgebildet. Das andere band in einer kleinen Tasche an der Enzymoberfläche nahe des Häms und bildete Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren N313 und H326. Allerdings zeigt das Alignment (Abb. 4.5), dass diese Aminosäuren unter den verglichenen DyP-Typ Peroxidasen nicht konserviert sind, daher bleibt hier zu klären, ob ein vergleichbares Wasserstoffbrückennetzwerk bei anderen DyP-Typ Peroxidasen aufgebaut wird.

DyP-Typ Peroxidasen sind daneben in der Lage große Substrate zu oxidieren, die nicht in die unmittelbare Nähe des Häms im aktiven Zentrum gelangen können. Daher wird diskutiert, ob diese Enzyme ausschließlich lösungsmittel-exponierte Substratbindestellen besitzen (Liers *et al.* 2013a). Dabei interagieren die Substrate mit oberflächenexponierten Bindestellen und Elektronen werden durch einen Langstreckentransfer von der Oberfläche des Proteins bis hin zum Häm übertragen. Der wahrscheinliche *long range electron transfer* (LRET-Übertragungsweg) ähnelt dem von Lignin-Peroxidasen, ist aber nicht mit diesem identisch (Colpa *et al.* 2014). Strittmatter *et al.* (2013a) identifizierten potentielle LRET-Übertragungswege bei der DyP-Typ Peroxidase aus *Auricularia auricula-judae*. Dabei dienen verschiedene an der Proteinoberfläche exponierte Reste (Trp bzw. Tyr) als Oxidationsstelle für große Substrate. Daneben stabilisieren saure Seitenketten (rPsaDyP E360, AauDyP E354) in der Umgebung der exponierten Reste die Bildung von Radikalkationen. Die Elektronen werden dabei von der Oberfläche des Enzyms zum Häm übertragen. Die wahrscheinlichste Elektronenübertragung bei der AauDyP findet vom exponierten Y337 über L357 (Zählung ausgehend vom reifen Protein) zum Häm statt. Dieser

Tyrosinrest ist bei DyP-Typ Peroxidasen aus Bakterien und Pilzen hoch konserviert und ist auch bei der rPsaDyP an Position 343 vorhanden. Das Leucin (L357) ist wie bereits beschrieben bei der rPsaDyP gegen Valin (V363) ausgetauscht. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Aminosäuren ist ein Elektronentransfer über Valin ebenfalls denkbar. Ein alternativer kurzer LRET verläuft bei der AauDyP von dem an der Oberfläche exponierten Rest W377 über T308 zum Eisen (Liers *et al.* 2013a, Strittmatter *et al.* 2013b). Bei VP und LiP wurde ebenfalls ein auf der Oberfläche der Enzyme exponiertes Tryptophan als Oxidationsstelle identifiziert (Pogni *et al.* 2006, Ruiz-Dueñas *et al.* 2009a). Das oberflächenexponierte Tryptophan des kurzen LRET ist bei der rPsaDyP ebenfalls konserviert (W383). Das Threonin ist gegen ein Isoleucin (I321) ausgetauscht. Dieser Austausch wird von Liers *et al.* (2013a) für andere DyP-Typ Peroxidasen ebenfalls beschrieben. In jüngsten Untersuchungen von Linde *et al.* (2015a,b) wurde durch Aminosäureaustausche (Y337S bzw. W377S) gezeigt, dass der LRET der AauDyP im Wesentlichen am W377 beginnt.

#### 4.3.1.3 Berechnung eines Strukturmodells

Bisher wurden lediglich Strukturen von zwei DyP-Typ Peroxidasen aus Pilzen mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Die erste DyP-Typ Peroxidasestruktur war die der DyP-Peroxidase aus *Bjerkandera adusta* (BadDyP; PDB-Code 2D3Q). Inzwischen wurde auch die Struktur einer DyP aus *Auricularia auricula-judae* (AauDyP; PDB-Code 4AU9) aufgeklärt. Das 3D-Modell der rPsaDyP wurde in Homologie zur Struktur der AauDyP berechnet. Das Modell besitzt die charakteristische  $\beta$ -barrel Struktur und Häm-Umgebung. Diese beinhaltet das proximale Histidin und den konservierten Arginin- und Aspartatrest auf der distalen Seite des Häms. Dieses Modell zeigt ebenfalls hohe Homologie zu den theoretischen Modellen für vier potentielle DyP-Typ Peroxidasen aus *P. ostreatus* (Ruiz-Dueñas *et al.* 2011). Obwohl die rPsaDyP zur AauDyP eine Identität von 43% hat, kann SWISS-MODEL das Häm nicht in die Struktur integrieren. Folglich unterscheidet sich die rPsaDyP in diesem Punkt von dem Modell, da sie ein Häm besitzt. Sie ist aktiv und zeigt auch die für Hämenzyme typische Soret-Bande (Abb. 3.40). Auch eine spezifische Färbung für Häm- und Metallenzyme wurde erfolgreich mit dem Enzym durchgeführt (Abb. 3.46).

#### 4.3.2 Heterologe Expression in *Trichoderma reesei*

Die DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* wurde erfolgreich in dem Ascomyceten *Trichoderma reesei* heterolog exprimiert, dabei wurde Aktives Enzym erhalten und in den Kulturüberstand sekretiert. Die im Verlauf dieser Arbeit produzierte und hier beschriebene rPsaDyP ist somit bislang die erste heterolog exprimierte DyP-Typ Peroxidase aus der Gattung der Pleuroten. Für die rekombinante DyP-Typ Peroxidase im Kulturüberstand wurde gegenüber dem Substrat ABTS eine Aktivität von  $55\,000\text{ U L}^{-1}$  ermittelt. Die klassische DyP aus *Bjerkandera adusta* wurde in *Aspergillus oryzae* heterolog exprimiert. Durch die heterologe Expression wurde im Vergleich

zum Kulturüberstand von *Bjerkandera adusta* eine 42-fach höhere Aktivität gegenüber dem Substrat *Reactive blue 5* ( $8 \cdot 10^2 \text{ U L}^{-1}$  Kultur) erhalten. Bei der heterologen Expression der PsaDyP in *Trichoderma reesei* wurde gegenüber RB5 eine um eine Potenz höhere Aktivität ( $5 \cdot 10^3 \text{ U L}^{-1}$  Kultur) erhalten. Aufgrund der hohen Aktivitätsausbeute eignet sich der Wirtsorganismus gut für die Produktion ausreichender Mengen Enzym für biotechnologische Applikationen.

Das rekombinante Enzym zeigt ein Absorptionsmaximum bei 409 nm und zwei weitere Maxima im Bereich von 510 und 640 nm (Abb. 3.40). Sowohl Lignin- als auch Manganperoxidasen enthalten Häm als prosthetische Gruppe. Die nativen Enzyme zeigen eine starke Absorptionsbande bei ca. 407 nm (Soret-Bande) sowie zwei schwächere Banden ( $\alpha$  und  $\beta$ ) bei ca. 500 und 630 nm, die auf der Absorption der Porphyrinstrukturen des Häms beruhen (Glenn und Gold 1985, Renganathan und Gold 1986). Das Vorhandensein dieser sogenannten Soret-Bande in der rPsaDyP zeigt, dass das rekombinante Enzym eine Hämgruppe enthält. Für die Produktion der aktiven rPsaDyP in dem Wirtstamm *Trichoderma reesei* war kein exogenes Häm erforderlich. Für andere, in heterologen Wirtsorganismen produzierte DyP-Typ Peroxidasen, wie die in *A. oryzae* produzierte rBadDyP wurde vergleichbares beschrieben (Sugano *et al.* 2000).

#### 4.3.2.1 Ermittlung des Glykosylierungsgrades und des N-Terminus der rPsaDyP

Davon ausgehend, dass es sich bei der PsaDyP um ein extrazelluläres Enzym handelt, wurde das Protein auf Glykosylierung untersucht. Für die in *Trichoderma reesei* heterolog exprimierte DyP-Typ Peroxidase wurde mittels SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von 57,4 kDa bestimmt (Abb. 3.43). Das ermittelte apparente Molekulargewicht stimmt mit dem aus der Primärsequenz berechneten Molekulargewicht überein. Dies deutete zunächst darauf hin, dass das rekombinante Enzym nicht glykosyliert ist. Mittels NetNGly 1.0 (Gupta *et al.* 2004) und NetOGly 4.0 (Steentoft *et al.* 2013) wurden allerdings für das Enzym vier potentielle N- und eine potentielle O-Glykosylierungsstelle ermittelt (Abb. 3.31). Für die AauDyP wurden ebenfalls vier potentielle Glykosylierungsstellen ermittelt, von denen tatsächlich drei glykosyliert vorliegen (Strittmatter *et al.* 2013a). Daher wurde versucht, das Enzym mit PNGase F zu deglykosylieren. Anschließend wurde mittels SDS-PAGE ein niedrigeres apparentes Molekulargewicht der DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* von 52,8 kDa nachgewiesen (Abb. 3.47). Diese Differenz in den Molekulargewichten entspricht einem Glykosylierungsgrad des rekombinanten Enzyms von ca. 9%, der mit dem Kohlenhydratgehalt der DyP-Typ Peroxidase Msp2 (Scheibner *et al.* 2008) vergleichbar ist. Da der Grad der Glykosylierung vom Expressionsorganismus abhängt, kann hieraus nicht direkt auf den Glykosylierungsgrad des nativen Enzyms geschlossen werden. Im Vergleich zu anderen DyP-Typ Peroxidasen weisen beide Enzyme einen niedrigen Glykosylierungsgrad auf. Der Kohlenhydratgehalt der DyP-Typ Peroxidasen liegt typischerweise zwischen 9% und 31% (Hofrichter *et al.* 2010). Die Glykosylierung ist typisch für sekretierte Proteine und schützt diese vor Proteolyse, erhöht ihre Stabilität und Löslichkeit (Lis und Sharon 1993, Sugano *et al.* 2000, Varki *et al.* 2009). Weiterhin kann die Glykosylierung die anschließende

Faltung von Proteinen und somit auch deren Funktion beeinflussen (Varki *et al.* 2009). Für die BadDyP wurde gezeigt, dass die Enzymaktivität unabhängig vom Glykosylierungsgrad des Proteins ist, eine geringere Glykosylierung jedoch zu einer Abnahme der Thermostabilität führt (Sugano *et al.* 2000, Sugano *et al.* 2004). Dies geht mit der relativ niedrigen Thermostabilität der rPsaDyP einher (s. 3.4.9.3).

Für die in *Trichoderma reesei* heterolog exprimierte rPsaDyP wurde nach der Deglykosylierung mittels SDS-PAGE ein niedrigeres apparentes Molekulargewicht ermittelt. Dies deutet darauf hin, dass das Enzym in *T. reesei* weiter prozessiert wurde. Daher wurde die N-terminale Sequenz der rPsaDyP mittels Edman-Sequenzierung bestimmt. Dabei wurde die Sequenz AT?GTFLPLEEI als N-terminale Aminosäuresequenz identifiziert, wobei durch den Edman-Abbau die dritte Aminosäure nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Die ermittelte Sequenz wurde in der aus der cDNA abgeleiteten Sequenz identifiziert (Abb. 3.29). Der Vergleich legt nahe, dass es sich bei der nicht identifizierten Aminosäure um einen Asparaginrest handelt. Besondere Schwierigkeiten bei der Bestimmung von Aminosäuresequenzen mittels Edman-Abbau bilden glykosylierte Abschnitte. Der ermittelte N-Terminus enthält eine potentielle N-Glykosylierungsstelle mit der Konsensussequenz N-X-S/T, durch die die nicht eindeutig identifizierte Aminosäure erklärt werden kann. Die reife rPsaDyP besteht aus 453 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 50,0 kDa. Sie besitzt ein 62 Aminosäuren langes Signalpeptid (Abb. 3.48). Der Vergleich der Sequenz mit anderen DyP-ähnlichen Enzymen aus Basidiomyceten legt nahe, dass auch das native Enzym diesen N-Terminus besitzt. Sugano *et al.* (2000) verglichen die rekombinant in *Aspergillus oryzae* produzierte DyP-Typ Peroxidase aus *Bjerkandera adusta* mit der nativen BadDyP und zeigten, dass die Enzyme den selben N-Terminus haben. Überraschenderweise erfolgt die Prozessierung beider Peroxidasen in verschiedenen heterologen Wirtsorganismen wie *A. oryzae* und *T. reesei*. Der identische N-Terminus der rekombinanten und nativen BadDyP macht eine autokatalytische Spaltstelle in der Aminosäuresequenz wahrscheinlich (Sugano *et al.* 2000). Ist dies tatsächlich der Fall, erfolgt die Prozessierung des nativen Enzyms möglicherweise in zwei Schritten: In einem ersten Prozessierungsschritt durch eine Signalpeptidase und in einem zweiten, autokatalytischen Prozess durch das Enzym selbst. Andererseits sind bereits viele unterschiedliche Signalpeptide mit variablen Längen und Strukturen bekannt (Kreil 1981), daher könnten einige Enzyme aus Pilzen eine bislang unbekannte Peptidaseschnittstelle besitzen.

#### 4.3.3 Etablierung einer geeigneten Reinigungsmethode

Der Kulturüberstand wurde zunächst mit dem Macrosep™ Zentrifugalsystem (Pall, 10 kDa MWCO) konzentriert, um niedermolekulare Substanzen und Proteine mit einer Größe kleiner 10 kDa abzutrennen und das Zielprotein zu konzentrieren. Die anschließende Reinigung sollte mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) und Ionenaustauschchromatographie (IEX) erfolgen. Dabei zeigte sich, dass die größte Herausforderung der Reinigung die Abtrennung eines Proteins mit ähnlicher Größe war. Dieses Protein zeigte sich in der SDS-PAGE als Bande oberhalb

des Zielproteins und bildete mit diesem eine Doppelbande (Abb. 3.43). Beide Banden zeigten eine ähnliche Intensität. Daher könnte es sich bei diesem Protein um den Selektionsmarker Acetamidase handeln, der mit dem Zielenzym koexprimiert wird und daher in vergleichbaren Mengen im Kulturüberstand vorkommt. Die Acetamidase hat eine ähnliche Größe (60 kDa) und einen ähnlichen pI (6,2) wie das Zielprotein (57 kDa; pI 6,7). Die HIC beruht auf dem Prinzip der hydrophoben Wechselwirkung in Kombination mit dem Aussalzeffekt von Proteinen und ermöglicht es daher auch, Proteine mit einem ähnlichen pI zu trennen. Als erster Reinigungsschritt wurde daher eine Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose durchgeführt. Hierdurch wurde eine beinahe vollständige Abtrennung des Proteins, das mit dem Zielenzym eine Doppelbande bildete, sowie eine erste Abtrennung anderer Fremdproteine erreicht. Allerdings wurde dadurch keine ausreichende Reinheit der Peroxidase für eine Charakterisierung erreicht. Daher wurde eine zweite Reinigungsstufe angeschlossen. Die rPsaDyP weist einen berechneten pI zu 5,7 auf. Eine isoelektrische Fokussierung mit konzentriertem Kulturüberstand und anschließender Aktivitätsfärbung hatte ergeben, dass der pI der rPsaDyP eher im neutralen Bereich (pH 6-7) liegt. Typischerweise liegt der pI der in der Literatur beschriebenen DyP-Typ Peroxidasen im sauren Bereich (< pH 4). Aufgrund der Abweichung des Isoelektrischen Punktes wurde die rPsaDyP nicht, wie für andere DyP-Typ Peroxidasen beschrieben, mittels Anionentauscher gereinigt, sondern der Fokus bei der Auswahl eines geeigneten Trennprinzips auf Kationentauscher gelegt. Bei der Verwendung von Kationentauschern sollte der pH-Wert des Startpuffers mindestens eine pH-Einheit unter dem pI des Zielenzyms liegen. Da für die rPsaDyP im Kulturüberstand ein Aktivitätsoptimum bei pH 4 ermittelt wurde, wurde für die Ionenaustauschchromatographie ein Puffer mit diesem pH-Wert gewählt. Unter diesen Bedingungen ist das Enzym positiv geladen und kann so mit dem Säulenmaterial interagieren. Das Enzym wurde mit einem NaCl-Gradienten eluiert. Die Zugabe von Natriumchlorid führte zu einer Reduzierung der Enzymaktivität, die jedoch nach Dialyse regeneriert werden konnte. Unter Verwendung von Säulen aus dem HiTrap IEX selection Kit wurde ein geeigneter Kationentauscher ermittelt. Mit den untersuchten Kationenaustauschsäulen wurde eine weitere Reinigung des Zielproteins erreicht, wobei ein starker Kationentauscher (HiTrap SP FF) eine deutlich bessere Trennleistung ermöglichte als ein schwacher Kationentauscher (HiTrap CM FF). Durch die Kombination von HIC und IEX wurde die rPsaDyP erfolgreich gereinigt. Im SDS-Gel war nur noch eine Hauptbande erkennbar (Abb. 3.35). Durch die Reinigung wurde eine Anreicherung um den Faktor 5 erzielt und eine spezifische Aktivität von  $9,1 \text{ U mg}^{-1}$  erhalten (Tab. 3.5).

Für die DyP-Typ Peroxidase wurde eine Reinheitszahl (RZ; s. 2.5.8) von 1,1 ermittelt. Diese ist vergleichbar mit der für die DyP-Typ Peroxidase aus *Auricularia auricula-judae* beschriebene RZ nach einer dreistufigen Reinigung des Enzyms mittels FPLC (Liers *et al.* 2010, 2013a). In der Literatur werden für gereinigte DyP-ähnliche Enzyme Werte von 0,8 für die DyP aus *Mycena epipterygia* (Liers *et al.* 2013a) bis 3,2 für die rekombinante DyP-Typ Peroxidase (MsP1) aus *Mycetinis scorodonius* (Szweda *et al.* 2013) beschrieben. Für die Meerrettichperoxidase, die häufig als Markerenzym mit anderen Proteinen konjugiert wird, wurde eine Reinheitszahl von 3,1

beschrieben (Nakane und Kawaoi 1974). Die Reinheitszahl ist der Quotient aus der Absorption des Enzyms bei 409 nm und 280 nm. Die Absorption bei 409 nm spiegelt den Gehalt von Häm in der Enzymlösung wider, wohingegen die Absorption bei 280 nm die Proteinkonzentration widerspiegelt. Daher wird die Reinheitszahl wesentlich durch die Anzahl der absorbierenden Gruppen des Proteins beeinflusst. Die rPsaDyP weist deutlich mehr absorbierende Gruppen auf als die Meerrettichperoxidase (45:26). Demnach zeigt die rPsaDyP eine relativ hohe Absorption bei 280 nm. Dies bedeutet, dass sich bei gleicher Reinheit eine wesentlich kleinere Reinheitszahl ergibt.

#### 4.3.4 Bestimmung der nativen Konformation

Da die rPsaDyP einen relativ hohen pI besitzt und daher nur schlecht in *Clear Native* Gele einwandert, wurde die Größe des nativen Proteins mittels *Blue Native* PAGE und anschließender Aktivitätsfärbung untersucht. Dabei wurde für die rPsaDyP ein apparentes Molekulargewicht von 115 kDa bestimmt (Abb. 3.44). Bei der *Blue Native* Gelelektrophorese wird das denaturierende Detergenz SDS durch SERVA Blue G ersetzt. Dieser Farbstoff ist ebenfalls negativ geladen. Durch Bindung an hydrophobe Oberflächenbereiche und basische Aminosäuren der Proteine bilden sich negativ geladene Farbstoff-Protein-Komplexe. Die native Struktur der Proteine bleibt erhalten, da der Farbstoff nicht als Detergenz wirkt. Die Farbstoff-Protein-Komplexe wandern bei physiologischem pH durch den Ladungsshift zur Anode. Allerdings führt die Bindung großer Mengen Farbstoff von sehr hydrophoben Proteinen zu einer Instabilität von Komplexen und kann zu deren Dissoziation führen (Wittig und Schägger 2008). Daher wurde die Größe des nativen Proteins zusätzlich mittels Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200) überprüft. Mittels dieser Methode wurde eine apparente Größe von 122 kDa (Abb. 3.45) für die Peroxidase ermittelt. Mit Hilfe der beiden Methoden wurde für das native Enzym ein vergleichbares Molekulargewicht bestimmt, das ungefähr doppelt so groß ist wie das apparente Gewicht der rPsaDyP unter denaturierenden Bedingungen (57,5 kDa). Die *Blue Native* Elektrophorese zeigt dabei vermutlich aufgrund der artifiziellen negativen Ladung des Proteins, die die Bindung von SDS bei der denaturierenden PAGE nachahmt, ein Ergebnis, das exakt das Dimer widerspiegelt. Das etwas größere apparente Molekulargewicht, das mittels GFC ermittelt wurde, ist vermutlich auf die Glykosylierung und die Form des Dimers zurückzuführen. Wahrscheinlich hat das Dimer keine globuläre Form und besitzt daher einen größeren Stokesradius, als sich aus den Molekulargewichten der Monomere ableiten lässt. Der Nachweis der rekombinanten PsaDyP im Gel erfolgte mittels Aktivitätsfärbung. Dies deutet darauf hin, dass die Quartärstruktur des nativen Enzyms ein Dimer ist und das Enzym auch in dieser Form aktiv ist. Die Behandlung mit SDS führt dazu, dass die rekombinante Peroxidase ihre Aktivität vollständig verliert. Dabei ist unklar, ob dieser Aktivitätsverlust auf die Trennung des Dimers in die Monomere oder auf eine Denaturierung des Enzyms zurückzuführen ist. Die klassische DyP (BadDyP) ist ein Monomer, allerdings bilden verschiedene andere DyP-Typ Peroxidasen, vor allem aus Prokaryonten, eine

Vielfalt höherer Quartärstrukturen, die von Monomeren bis Hexameren reicht. Die Gründe für die Oligomerisierung wurden bereits mehrfach diskutiert, sind allerdings bislang noch nicht geklärt. Zubieta *et al.* (2007) verglichen die Struktur der prokaryotischen DyP-Typ Peroxidase TyrA, die ein Dimer bildet, mit der Struktur der BadDyP, die als Monomer vorliegt und zeigten, dass bei der BadDyP Sequenzinsertionen vorhanden sind. Sequenzanalysen zeigen, dass einige der Reste, die bei TyrA die Dimerisierung vermitteln, benachbart zu Insertionen in der BadDyP liegen. Bei TyrA ist eine Schleife zwischen den  $\beta$ -Strängen 8 und 9 an der Bildung des Dimers beteiligt. Anhand eines Vergleichs der dreidimensionalen Strukturen von TyrA und BadDyP wurde gezeigt, dass die BadDyP eine zusätzliche Schleife im Bereich des Dimerisierungsinterface besitzt. Die Autoren vermuteten, dass dadurch eine Dimer-Bildung der BadDyP verhindert wird. Sugano (2009) vermutete ebenfalls, dass die Quartärstruktur der Enzyme durch Sequenzinsertionen beeinflusst wird, die die Bildung der monomeren Form begünstigen. Die Autoren zeigten, dass die klassische DyP im Vergleich zu DyP-Typ Peroxidasen, die Oligomere bilden, Insertionen in der Primärsequenz aufweist, die den anderen fehlen. Allerdings zeigen die Primärsequenzen von MsP1 und MsP2 hohe Homologien zur BadDyP und weisen diese Insertionen ebenso auf. Dennoch liegen sie nativ als Dimere vor (Scheibner *et al.* 2008). Daher wird die Bildung der Quartärstruktur der Enzyme nicht zwangsläufig durch Sequenzinsertionen beeinflusst. Ein Sequenzvergleich der rPsaDyP mit TyrA und der BadDyP zeigt, dass die rPsaDyP ebenfalls diese Insertionen besitzt. Dennoch liegt das Enzym nativ als Dimer vor.

#### 4.3.5 Biochemische Charakterisierung

DyP-Typ Peroxidasen sind typischerweise sekretierte Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 40 - 67 kDa (bezogen auf ein Monomer) und einem isoelektrischem Punkt im sauren Bereich (3,5-4,3) (Hofrichter *et al.* 2010). Das Monomer der rPsaDyP hat ein Molekulargewicht von 57,4 kDa und somit eine durchschnittliche Größe für ein Enzym der Familie der DyP-ähnlichen Enzyme. Das Molekulargewicht der rPsaDyP ist mit dem der klassischen DyP (60 kDa) vergleichbar. Im Gegensatz zu anderen Enzymen dieser Familie besitzt die rPsaDyP einen apparenten pI im neutralen Bereich (6,7, Abb. 3.46). Der experimentell ermittelte pI weicht stark von dem aus der Sequenz berechneten pI (5,7) ab. Dieser Unterschied ist vermutlich auf die Glykosylierung des Enzyms zurückzuführen. Zum einen werden Oligosaccharide an geladene Aminosäuren an der Proteinoberfläche gebunden, zum anderen können die Zuckerreste aufgrund ihrer Größe Ladungen abschirmen und so den apparenten pI beeinflussen. Die Nettoladung eines Enzyms beeinflusst dessen Löslichkeit, Aktivität und Stabilität (Shaw *et al.* 2001).

Ligninolytische Peroxidasen aus Pilzen (LiP, VP, DyP) zeigen, ebenso wie pflanzliche Peroxidasen, die höchste Aktivität in einem sauren Milieu (pH 1,5 – 5,0, Camarero *et al.* 1999, Gazarian *et al.* 1996, Liers *et al.* 2010, McEldoon *et al.* 1995). Das pH-Profil der rPsaDyP zeigt in Abhängigkeit vom Substrat ein Aktivitätsmaximum zwischen pH 3,5 bis 4,5. Damit ist das Profil gegenüber anderen DyP-Typ Peroxidasen leicht zu höheren pH-Werten verschoben. Eine Ausnahme bilden

die Substrate Annatto und  $\beta$ -Carotin. Obwohl für  $\beta$ -Carotin ebenfalls ein pH-Optimum von 3,5 bestimmt wurde, zeigt das pH-Profil eine hohe Enzymaktivität über den gesamten untersuchten pH-Bereich (pH 2-6, Abb. 3.51). Für den Abbau von Annatto hingegen wurde ein pH-Optimum von pH 6,0 bestimmt, das höher liegt als bei den anderen Substraten, aber mit dem pH-Optimum von MsP1 für dieses Substrat übereinstimmt (Schmidt, unveröffentlicht). Für die Umsetzung verschiedener Substrate wie Veratrylalkohol und Adlerol beschreiben Liers *et al.* (2010) für die AauDyP zusätzlich pH-Optima, die deutlich in den sauren Bereich verschoben sind (pH 1,4 – 2,5). Das pH-Optimum für die Oxidation phenolischer Substrate liegt hingegen – vergleichbar mit der rPsaDyP – etwas höher (pH 3,5-4,5, Liers *et al.* 2013b). Der pH von Holz liegt gewöhnlich zwischen 3 und 6. In der Mikroumgebung von Weißfäulepilzen kann der pH-Wert deutlich niedrigere Werte bis zu einem pH von 2,5 aufweisen (Gamauf *et al.* 2007). Als Bestandteile des Sekretoms zeigen DyP-Typ Peroxidasen daher häufig pH-Optima im stark sauren Bereich und im Zusammenhang damit auch eine große Stabilität unter sauren Bedingungen. Die hohe pH-Stabilität könnte eine Grundvoraussetzung für die Oxidation nicht-phenolischer Ligninstrukturen unter natürlichen Bedingungen sein (Liers *et al.* 2010).

Für die rPsaDyP wurde die höchste Aktivität zwischen 15 °C und 30 °C ermittelt. Dies ist vergleichbar mit den in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmten Aktivitäten für die BadDyP (Kim und Shoda 1999b). Für kurze Inkubationszeiten wurden für die MscDyP Temperaturoptima von bis zu 60 °C ermittelt (Pühse *et al.* 2009). Die Aktivität der rPsaDyP nahm bei Temperaturen oberhalb von 35 °C kontinuierlich ab und lag bei 50 °C noch bei bis zu ~65% (Abb. 3.54). Die Temperaturstabilität der rPsaDyP ist im Vergleich zur MscDyP wesentlich niedriger. Dies ist wahrscheinlich auf einen niedrigen Glykosylierungsgrad der rPsaDyP zurückzuführen.

Wie bereits beschrieben weist die rPsaDyP auf der Ebene der Primärsequenz eine Identität von 95% zu einer potentiellen DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus* (PosDyP) auf. Diese wird in der Literatur (Faraco *et al.* 2007) mit einer Remazol Brilliant Blue R (RBBR) entfärbenden Peroxidase (Shin *et al.* 1997) aus dem Sekretom des Pilzes gleichgesetzt. Die rPsaDyP und die RBBR entfärbende Peroxidase besitzen einige Ähnlichkeiten aber auch Unterschiede. So weisen beide Enzyme die höchste Aktivität im sauren Bereich auf und besitzen ein Temperaturoptimum zwischen 20 °C und 30 °C. Allerdings weicht der Isoelektrische Punkt der beiden Enzyme stark voneinander ab. So besitzt die RBBR einen pI von 3,0 während der pI der rPsaDyP 6,7 beträgt. Auch die ermittelten apparenten Größen der beiden Enzyme sind unterschiedlich. Die rPsaDyP hat ein Molekulargewicht von 57 kDa bzw. 53 kDa (deglykosyliert), wohingegen die von Shin *et al.* (1997) isolierte Peroxidase ein Molekulargewicht von 73 kDa bzw. 45 kDa (deglykosyliert) aufweist. Die Größe des deglykosylierten Enzyms weicht damit auch stark von der postulierten Größe der potentiellen reifen PosDyP ab (50 kDa; Faraco *et al.* 2007). Obwohl die Glykosylierung eines Enzyms von dem Organismus abhängt, in dem es gebildet wird, deutet ein Glykosylierungsgrad von 38% bzw. 9% darauf hin, dass die DyP-Typ Peroxidase und die RBBR entfärbenden Peroxidase aus *P. ostreatus* nicht gleichzusetzen sind. Außerdem scheinen die N-Termini beider Enzyme verschieden zu sein, da die N-terminale Aminosäure des von Shin

*et al.* (1997) beschriebenen Enzyms mittels Edman-Abbau nicht bestimmt werden konnte, was darauf hindeutet, dass der N-Terminus dieses Enzyms blockiert sein könnte. Der N-Terminus der rPsaDyP wurde hingegen identifiziert.

#### 4.3.5.1 Bestimmung optimaler Reaktionsbedingungen

Die Aktivität des rekombinanten Enzyms wurde in verschiedenen Puffersystemen untersucht. In Analogie zu den Untersuchungen der DyP-Typ Peroxidasen MsP1 und MsP2 von Scheibner *et al.* (2008) wurde die Aktivität des Enzyms in einem Natriumacetat-Puffer bestimmt. Zusätzlich wurde nach Zorn *et al.* (2003b) die Enzymaktivität in McIlvaine-Puffer – einem Citronensäure/Natriumhydrogenphosphat-Puffer – bestimmt. Daneben wurde der Einfluss der verwendeten Salze untersucht, indem ein Kaliumacetat- bzw. ein K-McIlvaine-Puffer verwendet wurde. Außerdem wurde ein Natriumtartrat-Puffer (Liers *et al.* 2010, AauDyP) und ein HCl/Glycin-Puffer verwendet, um den sauren pH-Bereich bis pH 1,2 abzudecken. Die Verwendung von Kalium- statt Natriumsalzen für die Puffer führte zu keiner signifikanten Veränderung der Enzymaktivität. Für die Umsetzung der Substrate ABTS und  $\beta$ -Carotin wurden die höchsten Aktivitäten in den untersuchten Acetatpuffern detektiert. Dabei wurde für die Umsetzung von ABTS ein optimaler pH-Wert von 3,8 (Abb. 3.52) und für die Umsetzung von  $\beta$ -Carotin pH 3,5 als optimaler pH-Wert ermittelt. Alle weiteren Versuche wurden deshalb im Natriumacetat-Puffer durchgeführt.

Die rPsaDyP ist in einem breiten Temperatur- und pH-Bereich aktiv. Substrate werden von dem Enzym bis zu 75 °C umgesetzt, wobei sie bei 50 °C noch eine Aktivität von bis zu 65% hat. Bei 4 °C bzw. 25 °C bleibt sie unter Reaktionsbedingungen im Natriumacetat-Puffer zwischen pH 3 und pH 6 über mehrere Stunden aktiv und besitzt nach 24 h noch bis zu 60% ihrer Ausgangsaktivität. Tendenziell bleibt die Aktivität des Enzyms bei höheren pH-Werten länger stabil. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Lagerung in McIlvaine-Puffer gezeigt, allerdings nahm die Aktivität des Enzyms früher ab. Im HCl/Glycin-Puffer pH 3,0 ist die rPsaDyP ebenso wie im McIlvaine-Puffer pH 3,0 nur kurze Zeit aktiv und hat nach 0,5 h fast vollständig die Aktivität verloren. Dieser Aktivitätsverlust ist nicht auf den pH-Wert zurückzuführen, da das Enzym bei diesem pH-Wert im Natriumacetat-Puffer aktiv ist. Daher wäre es möglich, dass das Enzym bei diesem pH-Wert mit einer der Pufferkomponenten interagiert und inaktiviert wird.

Die höchste Aktivität zeigt die rPsaDyP bei der Verwendung von 50 mM ( $\beta$ -Carotin) bzw. 100 mM (ABTS) Natriumacetat-Puffer. Wird die Molarität des Puffers bei der Umsetzung von ABTS weiter erhöht, sinkt die Enzymaktivität. Vergleichbare Effekte wurden bei Zugabe von Salzen (Natriumchlorid bzw. Ammoniumsulfat) beobachtet. Wurde das Enzym für den Assay in Wasser vorverdünnt, blieb die Aktivität über einen längeren Zeitraum stabil, als bei einer Vorverdünnung in Puffer. Für den technischen Aufschluss von Lignocellulosen werden häufig Lösungsmittel eingesetzt. Daher wurde für einen potentiellen Einsatz des Enzyms bei der Verwertung von Reststoffströmen bzw. für die Umsetzung von Ligninmodellsubstraten, die in organischen Lösungsmitteln gelöst werden, die Stabilität des Enzyms gegenüber Ethanol

untersucht. Bei der Verwendung von 30% Ethanol im Assay verlor das Enzym nach 1 h über 50% seiner Ausgangsaktivität. Dies ist vermutlich auf den niedrigen Glykosylierungsgrad der rPsaDyP im Vergleich zu anderen DyP-Typ Peroxidasen (MsP1 23% bzw. BadDyP 17%; Scheibner *et al.* 2008, Sugano *et al.* 1999) zurückzuführen.

DyP-Typ Peroxidasen sind katalytisch außerordentlich vielseitig und stabil (Pühse *et al.* 2009). Sie besitzen ein hohes Redoxpotential (1,1 bis 1,2 V), weshalb zahlreiche Substrate als Elektrodendonoren dienen können (Liers *et al.* 2013a). Daher sind DyP-Typ Peroxidasen in der Lage, ein breites Spektrum komplexer Farbstoffe, insbesondere xenobiotische Anthrachinonderivate wie auch typische Peroxidasesubstrate wie ABTS und Phenole zu oxidieren (Sugano 2009). Einige DyP-Typ Peroxidasen spalten auch  $\beta$ -Carotin (Scheibner *et al.* 2008) und andere Carotinoide, nicht-phenolische Verbindungen wie Veratrylalkohol sowie das  $\beta$ -O-4 Ligninmodell dimer Adlerol (Liers *et al.* 2010).

#### 4.3.5.2 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Enzymaktivität

Mit ABTS als Substrat nahm die Peroxidaseaktivität signifikant ab, wenn im Assay die  $H_2O_2$ -Konzentration 0,125 mM überstieg. Bei  $H_2O_2$ -Konzentrationen unterhalb von 0,125 mM war die Enzymaktivität abhängig von der Substratkonzentration ebenfalls verringert, da für die maximale Aktivität die  $H_2O_2$ -Konzentration limitierend war. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die anderen untersuchten Substrate ermittelt. Die Hemmung der Peroxidaseaktivität durch einen Überschuss an Wasserstoffperoxid in Abwesenheit reduzierender Substrate über eine Selbstmord-Inaktivierung ist bereits lange bekannt (Arnao *et al.* 1990b), aber für DyP-Typ Peroxidasen noch nicht abschließend geklärt. Arnao *et al.* (1990a) untersuchten die Kinetik des Inhibierungsweges der Meerrettichperoxidase in Konkurrenz zu der Oxidation von ABTS. Baynton *et al.* (1994) kombinierten die von Nakajima und Yamazaki (1987) und Arnao *et al.* (1990a,b) beschriebenen Inaktivierungsmechanismen und untersuchten die Inhibierung in Abwesenheit und Gegenwart von Phenolen.

Bei den bisher beschriebenen Inhibierungswegen spielt auch die Bildung der Verbindung II eine wichtige Rolle, deren Existenz für den Reaktionsweg der DyP-Typ Peroxidasen bisher nicht nachgewiesen wurde (Hofrichter *et al.* 2010, Sugano *et al.* 2007). In dem für die klassischen Peroxidasen beschriebenen katalytischen Kreislauf wird das native Enzym in Gegenwart von reduzierenden Substraten, zunächst durch Übertragung von zwei Elektronen auf  $H_2O_2$  zu Verbindung I oxidiert. Durch die Übertragung eines Elektrons vom reduzierenden Substrat wird Verbindung II gebildet, die durch die Reaktion mit einem weiteren Substratmolekül zum nativen Enzym reduziert wird. In Anwesenheit von reduzierenden Substraten konkurrieren  $H_2O_2$  und die Substrate um die Reaktion mit Verbindung I bzw. II. Die Reaktion mit  $H_2O_2$  führt zur inaktiven Form des Enzyms (Arnao *et al.* 1990a), die bei einem Überschuss an  $H_2O_2$  vermehrt gebildet wird. Zusätzlich können alle am katalytischen Kreislauf beteiligten Verbindungen (I und II) sowie das

native Enzym durch freie Substratradikal-Intermediate in die inaktive Form überführt werden (Baynton *et al.* 1994).

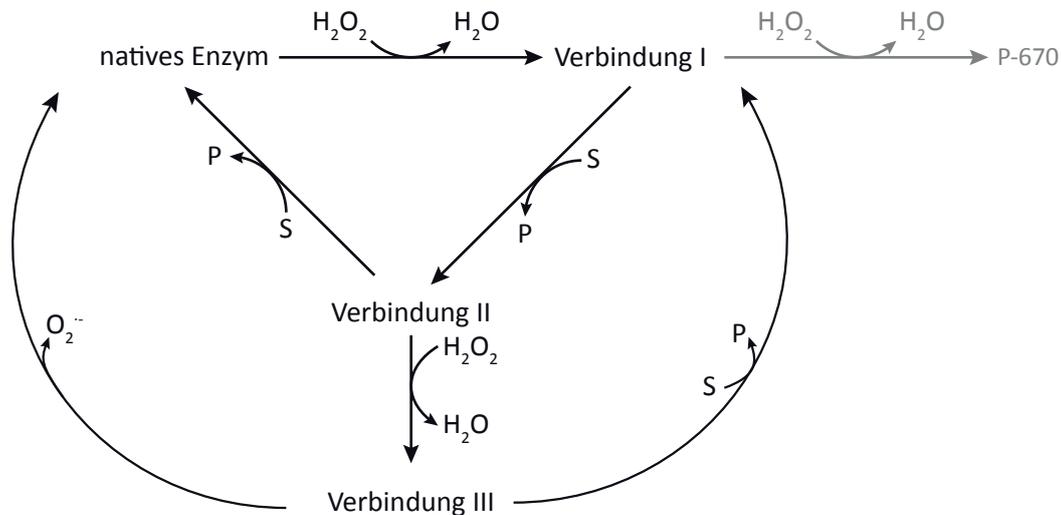


Abbildung 4.6: Möglicher Katalyse- und Inhibierungsweg der Meerrettichperoxidase verändert nach Dequaire *et al.* (2002)

Für die Art der Inaktivierung der Meerrettichperoxidase bei einem Überschuss von Wasserstoffperoxid wurden zwei verschiedene Wege beschrieben. Die Art der Inaktivierung hängt dabei von der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ab. Die Hemmung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen unter 1,0 mM ist vorwiegend reversibel, während mit steigenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen die Hemmung überwiegend irreversibel ist (Baynton *et al.* 1994). Bei der irreversiblen Inaktivierung des Enzyms reagiert Verbindung I vermehrt mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und die inaktive Verdo-Häm-Form (P-670) des Proteins wird akkumuliert (Abb. 4.6). Der reversible Weg bezieht die Bildung einer sogenannten Oxyperoxidase-Form des Enzyms (Verbindung III) durch die Reaktion von Verbindung II mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit ein, deren Struktur eine Ähnlichkeit zum Oxyhämoglobin aufweist. Dies bedeutet nicht notwendigerweise ein endgültiges Ausscheiden des Enzyms aus dem katalytischen Zyklus. Für die Meerrettichperoxidase gibt es Hinweise darauf, dass das Enzym langsam durch spontanen Zerfall der Verbindung III in den Grundzustand zurückkehren kann, wobei ein Superoxidion entsteht. Weiterhin kann Verbindung III durch verschiedene Elektronendonoren (auch durch die reduzierte Form des Cosubstrats) zu Verbindung I reduziert werden und so wieder in den katalytischen Zyklus eintreten (Dequaire *et al.* 2002). Einige Peroxidasen, wie beispielsweise die Mikroperoxidasen, zeigen eine geringe Wasserstoffperoxidtoleranz, während andere Peroxidasen eine Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid zeigen (Gil-Rodríguez *et al.* 2008, Khosraneh *et al.* 2007). Der Grad der Hemmung durch Wasserstoffperoxid variiert abhängig vom verwendeten Substrat stark (Kim und Shoda 1999b). Die Inhibierung ist somit sowohl vom Enzym als auch vom verwendeten Substrat sowie deren Konzentrationen abhängig. Kim und Shoda (1999b) zeigten, dass die Aktivität der klassischen DyP aus *Bjerkandera adusta* für RB5 inhibiert wurde, sobald eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von 0,2 mM bei einer konstanten Enzymkon-

zentration von 0,6 nM überschritten wurde. Die Aktivität für AQ-2' (RB5 Derivat) wurde bei einer konstanten Enzymkonzentration von 2,8 nM bereits inhibiert, sobald die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,1 mM überschritten wurde. Dieser Effekt für die Inhibierung durch Wasserstoffperoxid wurde ebenfalls für die rPsaDyP beobachtet. Die Aktivität des Enzyms wurde in Abhängigkeit vom Substrat und dessen Konzentration unterschiedlich stark inhibiert, wobei unter den verwendeten Reaktionsbedingungen die irreversible Hemmung und Bildung von P-670 vernachlässigt werden kann. Die Aktivität für den Umsatz von ABTS wurde bei einer konstanten Enzymkonzentration von 0,27 nM bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen über 0,125 mM inhibiert. Ein stärkerer Effekt wurde für die Substrate DMP und Guajakol beobachtet. Bei einer konstanten Enzymkonzentration von 1,8 nM bzw. 4,5 nM (DMP bzw. Guajakol) wurde die Aktivität bereits stark gehemmt, sobald eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,062 mM überschritten wurde. Der stärkste Effekt wurde für RB5 beobachtet. Bei einer konstanten Enzymkonzentration von 5,4 nM wurde die Enzymaktivität bereits bei einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,031 mM gehemmt. Eine Hemmung der Enzymaktivität trat bei den Substraten RB5, DMP und Guajakol somit bei niedrigeren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen als beim Substrat ABTS auf.

Weiterhin wurde ein Einfluss der Pipettierreihenfolge der Bestandteile des Assays (s. 3.4.8.5.1) auf den Inhibierungseffekt durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die rPsaDyP untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die höchste Peroxidaseaktivität erreicht wird, wenn der Reaktionspuffer unmittelbar vor Gebrauch mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorgemischt wurde und die Reaktion mit dieser Mischung gestartet wurde. Vergleichbare Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Reaktion mit dem Enzym gestartet wird. Der Start mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Puffer gewährleistete eine gute Durchmischung des Reaktionsansatzes und führte zu den stabilsten Aktivitätsmessungen. Beim Starten der Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann es zu lokalen Inhibierungseffekten kommen, die dann zu einer verringerten Enzymaktivität führen. Das Starten der Reaktion mit dem Substrat kommt einer Vorinkubation des Enzyms mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gleich. Dies führte im Vergleich zum Start der Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Puffer zu einer niedrigeren Enzymaktivität. Bei der Umsetzung von ABTS wurde die Umsatzgeschwindigkeit weniger stark erniedrigt als bei der Oxidation von Guajakol. Die Aktivität im Vergleich zur mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Puffer gestarteten Reaktion betrug etwa 60% bzw. 10%. Chung und Aust (1995) verfolgten spektrometrisch die Bildung von Verbindung II und Verbindung III einer LiP während der Oxidation von Phenolen bzw. von Veratrylalkohol. Dabei wiesen sie eine Akkumulation von Verbindung III bei der Oxidation von Phenolen nach. Für den Schutz vor Inaktivierung der LiP durch Veratrylalkohol werden zwei Modelle vorgeschlagen. Bei dem ersten Modell wird Verbindung III durch Veratrylalkohol-Kationenradikale effizient in den Grundzustand überführt. Im anderen Modell wird die Bildung von Verbindung III durch eine bevorzugte Reaktion von Verbindung II mit dem Substrat gegenüber einer alternativen Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verhindert. Koduri und Tien (1995) zeigten, dass das Substrat Guajakol bzw. Phenoxyradikale dieses Intermediat (Verbindung III) nur teilweise in den Grundzustand überführen können und bei diesem Prozess deutlich weniger effizient als Veratrylalkohol sind. Dequaire *et al.* (2002) zeigten vergleichbare Ergebnisse für die Meerrettichperoxidase. Verbindung III wurde durch verschiedene Elektronendonoren zu

Verbindung I reduziert. Dies lässt auf eine Schutzfunktion des Substrates schließen. Für die rPsaDyP kann ein ähnlicher Mechanismus für die Regenerierung des inaktivierten Enzyms durch die untersuchten Substrate angenommen werden. Dabei könnten ähnlich wie bei der Ligninperoxidase durch Guajakol nur geringe Mengen des inaktivierten Enzyms in den Grundzustand oder zu Verbindung I überführt werden. ABTS hingegen führt vermutlich ähnlich wie Veratrylalkohol zu einer effizienteren Reaktivierung der rPsaDyP. Damit könnte auch erklärt werden, dass bei der Umsetzung von ABTS im Gegensatz zu Guajakol nach Vorninkubation mit  $H_2O_2$  keine *lag*-Phase zu Beginn der Umsetzung beobachtet wurde.

Möglicherweise schützen verschiedene Substrate das Enzym unterschiedlich effektiv, da sie das inhibierte Enzym unterschiedlich effektiv reduzieren und so in den katalytischen Kreislauf zurückführen können. Zusätzlich könnte der Grad der Inhibierung auch durch den  $K_m$ -Wert des Enzyms bzw. der Intermediate zu den Substraten beeinflusst werden.  $H_2O_2$  konkurriert mit dem Substrat um die Bindung am Enzym, sodass bei Substraten mit einem höheren  $K_m$  eher  $H_2O_2$  gebunden und vermehrt inaktiviertes Enzym gebildet wird. Dadurch könnten abhängig vom Substrat unterschiedliche Konzentrationen an  $H_2O_2$  toleriert werden.

Generell lässt sich die Stabilität von Peroxidasen gegenüber  $H_2O_2$  nur schwer vergleichen, da viele verschiedene Faktoren wie pH-Wert, Zeit und Temperatur während der Inkubation einen großen Einfluss haben (Böckle *et al.* 1999).

#### 4.3.5.3 Untersuchung des Substratspektrums und Bestimmung der kinetischen Parameter

Für eine funktionelle Einordnung der rPsaDyP sowie zur Bestimmung des Substratspektrums wurde die Umsetzung verschiedener Substrate untersucht. Ein charakteristisches Substrat der DyP-Typ Peroxidasen ist der Anthrachinonfarbstoff Reactive Blue 5 (Kim *et al.* 1995, Liers *et al.* 2013b), den diese im Gegensatz zu anderen Peroxidasen – wie beispielsweise LiP, VP und MnP – effizient oxidieren. Daher können DyP-Typ Peroxidasen analog zu den versatilen Peroxidasen, die als Reactive Black 5: $H_2O_2$  Oxidoreduktasen (EC 1.11.1.16) beschrieben werden, als Reactive Blue 5: $H_2O_2$  Oxidoreduktasen bezeichnet werden und unter einer eigenen EC-Nummer klassifiziert werden (EC 1.11.1.19) (Hofrichter *et al.* 2010, Sugano 2009). Neben der Peroxidaseaktivität zeigte Sugano (2009) auch eine  $H_2O_2$ -abhängige Hydrolasefunktion von DyP-Typ Peroxidasen, durch die Analyse der Abbauprodukte von RB5 mittels ESI-MS. Die Entstehung des Produktes Phtalsäure wird durch den Autor mit einer Hydrolasefunktion erklärt. Linde *et al.* (2015b) hingegen schlagen einen Peroxidasemechanismus vor, wobei Phtalsäure durch spontanem Zerfall eines Zwischenproduktes entsteht.

Die rPsaDyP bindet mit hoher Affinität den Farbstoff RB5 ( $K_m=24 \mu M$ ) und setzt diesen effizient um. Die Affinität zu diesem Substrat ist vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen Affinitäten von DyP-Typ Peroxidasen aus *Bjerkandera adusta* ( $54 \mu M$ ) und *Auricularia auricula-judae* ( $23 \mu M$ ) (Kim und Shoda 1999b, Liers *et al.* 2010). Obwohl der Farbstoff RB5 von der rPsaDyP mit vergleichbarer Affinität gebunden wird, wurde für die Entfärbung mit  $7,5 \cdot 10^5 s^{-1} M^{-1}$  jedoch

eine geringere katalytische Effizienz als für die BadDyP und AauDyP ermittelt ( $4,8 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  bzw.  $5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ).

Die Affinitäten der rPsaDyP für ABTS und substituierte Phenole sind niedriger. Dennoch wurde von den untersuchten Substraten für ABTS die höchste Aktivität und katalytische Effizienz ermittelt. Bei ABTS handelt es sich um einen der effizientesten Elektronendonoren (Childs und Bardsley 1975). Die katalytische Effizienz der rPsaDyP ist mit  $3,8 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  vergleichbar mit der katalytischen Effizienz einer DyP-Typ Peroxidase aus *Irpex lacteus* (IlaDyP) ( $8,0 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ; Salvachúa *et al.* 2013) und geringer als die der AauDyP ( $1,8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ; Liers *et al.* 2010) und der MscDyP ( $6,3 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ; Szweda *et al.* 2013). Allerdings ist auch die Affinität der rPsaDyP zu ABTS etwas geringer als die Affinitäten der AauDyP und MscDyP zu ABTS.

2,6-Dimethoxyphenol (DMP) und Guajakol sind substituierte Phenole mit zwei bzw. einer Methoxygruppe als Substituenten. Sie ähneln den Lignin-Bausteinen und werden als klassische Standardsubstrate für MnP verwendet. Während die BadDyP diese Phenole nur langsam umsetzt (Sugano *et al.* 2000), setzten einige andere DyP-Typ Peroxidasen diese effizient um (spezifische Aktivität 31 bis  $278 \text{ U mg}^{-1}$ ; Liers *et al.* 2013b). Die spezifischen Aktivitäten der rPsaDyP für diese Substrate liegen in diesem Bereich ( $33 \text{ U mg}^{-1}$  und  $41 \text{ U mg}^{-1}$  für DMP bzw. Guajakol) und sind ebenfalls vergleichbar mit den Aktivitäten anderer Phenol-oxidierender Peroxidasen aus *Coprinopsis cinerea* und *Glycine max.* Die Wechselzahlen  $k_{\text{cat}}$  für die Umsetzung von DMP ( $k_{\text{cat}} = 60 \text{ s}^{-1}$ ) bzw. Guajakol ( $k_{\text{cat}} = 74 \text{ s}^{-1}$ ) sind vergleichbar mit anderen DyP-Typ Peroxidasen (AauDyP:  $k_{\text{cat}} = 90 \text{ s}^{-1}$  bzw. IlaDyP:  $k_{\text{cat}} = 70 \text{ s}^{-1}$ ; Liers *et al.* 2010, Salvachúa *et al.* 2013) bzw. Manganperoxidasen (Bad MnP für DMP:  $k_{\text{cat}} = 70 \text{ s}^{-1}$ ; Wang *et al.* 2002) und höher als bei Ligninperoxidasen (DMP:  $k_{\text{cat}} = 27 \text{ s}^{-1}$ , Guajakol:  $k_{\text{cat}} = 38 \text{ s}^{-1}$ ; Ward *et al.* 2003) und den versatilen Peroxidasen (für die Umsetzung von DMP ohne Mn(II): VP aus *Pleurotus eryngii*:  $k_{\text{cat}} = 3 \text{ s}^{-1}$  oder BadVP:  $k_{\text{cat}} = 2,3 \text{ s}^{-1}$ ; Camarero *et al.* 1999, Mester und Field 1998). Die für die rPsaDyP ermittelten  $K_{\text{m}}$ -Werte liegen im Vergleich zu anderen Peroxidasen relativ hoch. Dennoch ist die katalytische Effizienz für die Oxidation von DMP vergleichbar mit einer MnP aus *Bjerkandera adusta* ( $5,6 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ; Mester und Field 1998). Im Vergleich zu anderen DyP-Typ Peroxidasen liegt die katalytische Effizienz jedoch aufgrund der höheren  $K_{\text{m}}$ -Werte der rPsaDyP um eine Potenz niedriger. Wie bereits beschrieben ist die Größe des Häm-Kanals bzw. der distalen Substratbindetasche ein limitierender Faktor. Guajakol ist ein einfach substituiertes Phenol, wohingegen DMP ein zweifach substituiertes Phenol ist. Daher könnte die niedrigere Affinität für DMP gegenüber Guajakol auf die Größe und den schlechteren Zugang zum aktiven Zentrum zurückzuführen sein, falls diese dort umgesetzt werden.

Manganperoxidasen oxidieren bevorzugt  $\text{Mn}^{2+}$  zu dem hochreaktiven  $\text{Mn}^{3+}$ , das für die Oxidation vieler phenolischer Verbindungen verantwortlich ist. Neben der Mangan-abhängigen Oxidation von Phenolen wurde für Manganperoxidasen aus *Pleurotus* Arten und *Bjerkandera adusta* eine Mangan-unabhängige Reaktion beschrieben (Heinfling *et al.* 1998a, Palma *et al.* 2000). Giardina *et al.* (2000) zeigten für verschiedene Isoformen einer MnP aus *Pleurotus ostreatus*, dass die Aktivität gegenüber DMP und Guajakol durch den Zusatz von  $\text{Mn}^{2+}$  gesteigert wird. Die rPsaDyP

oxidiert DMP ohne den Zusatz von  $Mn^{2+}$  und es wurde ebenso wie bei der BadDyP (Sugano *et al.* 2000) nach Zugabe von Mangansulfat keine Steigerung der Aktivität gezeigt. Daneben wurde  $Mn^{2+}$  direkt als Substrat der Peroxidase eingesetzt. Dabei wurde für die rPsaDyP ebenfalls – wie für die von Liers *et al.* (2013b) untersuchten DyP-Typ Peroxidasen – keine Oxidation von  $Mn^{2+}$  und somit keine Manganperoxidasefunktion nachgewiesen. Ein Strukturvergleich der rPsaDyP mit verschiedenen Mangan- und Ligninperoxidasen zeigte, dass die für MnP klassischen Aminosäurereste (Glu, Glu, Asp), die für die Bindung von Mn(II) verantwortlich sind (nach Collins *et al.* 1999, Ruiz-Dueñas *et al.* 2009b), bei der rPsaDyP nicht vorhanden sind.

Reactive Black 5 ist ein Bisazofarbstoff und ein spezifisches Substrat für VP (Camarero *et al.* 1999, Heinfling *et al.* 1998b). Das Substratspektrum der versatilen Peroxidasen reicht von  $Mn^{2+}$ , dem typischen Manganperoxidase-Substrat, über Veratrylalkohol, dem typischen Ligninperoxidase-Substrat bis zu Phenolen. Liers *et al.* (2013b) zeigten, dass auch einige Dyp-Typ Peroxidasen RBlack 5 oxidieren. Die rPsaDyP setzt RBlack 5 ebenfalls mit geringer Effizienz ( $0,1 \text{ U mg}^{-1}$ ) um. Die spezifische Aktivität ist somit geringer als die Aktivität der BadVP und ähnlich der Aktivität der PchLiP ( $3 \text{ U mg}^{-1}$  bzw.  $0,2 \text{ U mg}^{-1}$  Liers *et al.* 2013b). Funktionell ist die rPsaDyp nicht den versatilen Peroxidasen zuzuordnen, da sie das spezifische Substrat nur mit geringer Effizienz umsetzt und  $Mn^{2+}$  nicht oxidiert.

Die rPsaDyP zeigte gegenüber Veratrylalkohol lediglich eine geringe Aktivität. Veratrylalkohol ist ein nicht-phenolisches Modellsubstrat und ein charakteristisches Substrat der LiP, das nicht von allen DyP-Typ Peroxidasen umgesetzt wird (Sugano *et al.* 2007). Veratrylalkohol ist ein Benzylalkohol mit zwei Methoxygruppen als Substituenten. Die Umsetzung von Veratrylalkohol erfolgt optimal im stark sauren Bereich (pH 1,4 – 3,0; Liers *et al.* 2010), bei dem die rPsaDyP nicht stabil ist. Veratrylalkohol wird durch die rPsaDyP bei pH 3,5 umgesetzt. Die Oxidation verläuft sehr langsam, was vermutlich auf den pH-Wert zurückzuführen ist, der deutlich oberhalb des Optimums für die Oxidation von Veratrylalkohol durch andere DyP-Typ Peroxidasen liegt und bei dem die Aktivität der Peroxidasen gegenüber diesem Substrat sehr gering ist. Die niedrige katalytische Effizienz gegenüber diesem Substrat zeigt, dass die rPsaDyP nicht den Ligninperoxidasen zuzuordnen ist.

Als komplexeres Modellsubstrat diente das  $\beta$ -O-4 Ligninmodell dimer Adlerol, das von der rPsaDyP mit sehr niedriger Effizienz umgesetzt wurde. Die Struktur von Adlerol weist weder eine phenolische OH-Gruppe noch eine zum Aromaten  $\alpha$ -ständige Doppelbindung auf. Die enzymatische Umsetzung von Adlerol wird in der Literatur bei einem pH von 1,4 beschrieben (Liers *et al.* 2010). Die Spaltung von Adlerol durch die rPsaDyP kann nur bei einem höheren pH (pH 3,0) erfolgen, da die rPsaDyP bei niedrigeren pH-Werten nicht stabil ist. Bei diesem pH erfolgte die Umsetzung von Adlerol nur sehr langsam. Dies könnte auf den vergleichsweise hohen pH-Wert zurückzuführen sein, bei dem auch die von Liers *et al.* (2010) beschriebene AauDyP nur noch eine Aktivität von ca. 30% gegenüber der Aktivität bei pH 1,4 besitzt.

Die Spaltung der  $\beta$ -O-4 Etherbindung in Adlerol ist eine Voraussetzung für den Abbau des Lignins. Die Fähigkeit der DyP-Typ Peroxidasen, nicht-phenolische niedermolekulare Modellverbindun-

gen für Lignin, wie Veratrylalkohol und Adlerol zu spalten, deutet auf eine ligninolytische Aktivität hin und gibt einen Hinweis auf eine mögliche biologische Funktion dieser Enzyme (Liers *et al.* 2010). Sie könnten Bestandteil eines alternativen synergistischen Systems für die Oxidation von Substraten mit einem hohen Redoxpotential sein, bei dem sie mit Manganperoxidasen kooperieren und Ligninperoxidasen ersetzen, die beispielsweise im Sekretom von *Pleurotus ostreatus* nicht vorkommen (Alfaro *et al.* 2014, Liers *et al.* 2013b). Allerdings ist die Aktivität der DyP-Typ Peroxidasen gegenüber diesen Substraten zu gering, als dass sie bei dem initialen Angriff auf das Ligninpolymer eine entscheidende Rolle spielen könnten (Linde *et al.* 2015b). Aufgrund des breiten Substratspektrums und struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten zu Katalase-Peroxidasen, wird diskutiert, dass DyP-Typ Peroxidasen – neben dem Abbau von Lignocellulosen und anderen Polymeren – auch an einer unspezifischen Pathogenabwehr und Entgiftungsprozessen beteiligt sind (Liers *et al.* 2013b, Zámocký *et al.* 2009).

Sugano *et al.* (2000) zeigten, dass die Substratspezifität der rBadDyP und der nativen BadDyP gegenüber Farbstoffen annähernd gleich sind. Auch die Aktivitäten der rBadDyP gegenüber Veratrylalkohol, Guajakol und DMP waren mit der nativen DyP-Typ Peroxidase vergleichbar. Demnach kann auch für die rPsaDyP angenommen werden, dass sie eine ähnliche Aktivität zeigt wie das native Enzym.

#### 4.3.5.4 Abbau von $\beta$ -Carotin und Xanthophyllen

In verschiedenen Arbeiten (Langhoff 2002, Veddeler 2004) wurde gezeigt, dass versatile Peroxidasen aus Pilzen zum Abbau von Carotinoiden unter Bildung norisoprenoider Verbindungen fähig sind. Scheibner *et al.* zeigten 2008, dass zwei DyP-Typ Peroxidasen aus *Mycetinus scorodoni* (MsP1 und MsP2) ebenfalls in der Lage sind, Carotinoide abzubauen. Die Farbstoffe  $\beta$ -Carotin (E 160a) und Annatto (E 160b) werden häufig zur Färbung von Lebensmitteln wie Käse, Margarine oder Dessertspeisen (Anlage 1 Teil B und C zu § 3, Abs. 1 ZZulV) sowie Kosmetika eingesetzt. Die DyP-Typ Peroxidase MsP1 wird bereits industriell als Maxibright™ vermarktet und findet Anwendung bei der Bleichung von gefärbter Molke aus der Käseproduktion, die Annatto oder  $\beta$ -Carotin enthält. Daher wurde das Potential der rPsaDyP untersucht, die natürlichen Farbstoffe  $\beta$ -Carotin sowie das Farbstoffgemisch Annatto bzw. die beiden Komponenten Bixin und Norbixin umzusetzen.

Mit dem gereinigten Enzym wurde ein Abbau von  $\beta$ -Carotin nachgewiesen.  $\beta$ -Carotin ist ein Terpenoid, bei dem zwei Ionon-Ringe durch eine Kohlenstoffkette mit neun konjugierten Doppelbindungen verbunden sind.

Auch Annatto wurde von der rPsaDyP abgebaut. Annatto ist ein Farbstoffgemisch aus den Xanthophyllen Bixin und Norbixin und kommt natürlicherweise in den Samen des Orleanstrauches (*Bixa orellana*) vor, aus denen es extrahiert wird (Ebermann und Elmadfa 2001). Bixin ist ein offenkettiges Xanthophyll mit zwei endständigen Carboxylgruppen von denen eine als Methyl-ester vorliegt. Abhängig vom Extraktionsverfahren überwiegt eines der beiden Xanthophylle,

wobei Norbixin ein Verseifungsprodukt von Bixin ist. Für die Umsetzung von Annatto wurde ein wässrig-alkalischer Extrakt verwendet, dessen Hauptbestandteil das Natriumsalz des Norbixins war (Scotter 2009). Um zu überprüfen, ob die rPsaDyP beide Xanthophylle des Farbstoffgemisches umsetzt, wurde ebenfalls der Abbau von Bixin untersucht. Das Enzym setzte Bixin ebenfalls um. Allerdings wurde für Norbixin (als wässrig-alkalischer Annattoextrakt) bei einer niedrigeren Substratkonzentration (15  $\mu\text{M}$  zu 19  $\mu\text{M}$ ) eine höhere Aktivität ermittelt. Für die Umsetzung der hydrophoben Substrate Bixin und  $\beta$ -Carotin wurde bei gleicher Substratkonzentration (19  $\mu\text{M}$ ) eine vergleichbare Aktivität ermittelt (Tab. 3.8).

In den photometrischen Assays konnten die untersuchten Substrate nur in niedrigen Konzentrationen eingesetzt und somit nicht in der Sättigung gearbeitet werden. Daher ist ein exakter Vergleich der Aktivitäten nicht möglich. Für diese Farbstoffe waren die kinetischen Parameter nicht bestimmbar, da die Voraussetzungen für eine Michaelis-Menten-Kinetik nicht erfüllt waren.

Zorn *et al.* (2003b) zeigten, dass  $\beta$ -Carotin durch den zellfreien Überstand einer *Mycetinis scorodonius*-Kultur in einer Sauerstoff-abhängigen Reaktion abgebaut wird. In weiteren Arbeiten zeigten Scheibner (2006) und HülSDau (2007), dass die Oxidation von  $\beta$ -Carotin durch die aus dem Kulturüberstand gereinigte DyP-Typ Peroxidase MsP1 ohne Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgen kann, wobei die Enzymaktivität durch den Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gesteigert wurde. Solche  $\text{H}_2\text{O}_2$ -unabhängigen Oxidationen wurden bereits für Pflanzenperoxidasen (Gazarian und Lagrimini 1998, Savitsky *et al.* 1999) und Manganperoxidasen beschrieben (Hofrichter *et al.* 1998). Auch die rPsaDyP kann  $\beta$ -Carotin ohne den Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidieren, wobei die Enzymaktivität durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ebenfalls gesteigert wurde (Abb. 3.55). In der Substratlösung können – durch das bei der Herstellung verwendete Tween – geringe Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  vorhanden sein (s. 3.4.8.6). Allerdings erfolgte der Umsatz von  $\beta$ -Carotin über einen Zeitraum von mehr als 50 min. Würde die Reaktion nur durch das in der Substratlösung enthaltene  $\text{H}_2\text{O}_2$  ermöglicht, wäre die Reaktion durch den Verbrauch des Cosubstrates bereits nach kurzer Zeit zum Erliegen gekommen. Eine Anreicherung des Reaktionspuffers mit Sauerstoff steigerte zudem die Transformation von  $\beta$ -Carotin, wohingegen eine Entgasung des Puffers die Umsetzung verlangsamte. Dies zeigt, dass der Abbau von  $\beta$ -Carotin direkt vom Gehalt an molekularem Sauerstoff im Puffer abhängt. Dies lässt zusätzlich zur Peroxidase-Funktion auf eine Oxidase- oder Oxygenase-Funktion schließen (Sugano 2009). Für die Meerrettichperoxidase wurde beschrieben, dass sie Epinephrin auch ohne den Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und endogenem  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert (Adak *et al.* 1998). Die Autoren entwarfen einen Mechanismus, der die Kombination einer Peroxidase- und Oxidasefunktion enthält, der in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder bei niedrigen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen unter physiologischen Bedingungen abläuft. Dabei wurde vermutet, dass in einer Oxidasereaktion zunächst das  $\text{Fe}^{3+}$  des Häms zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wird, wobei ein Substratradikal entsteht. Das  $\text{Fe}^{2+}$ -Enzym reagiert dann mit molekularem Sauerstoff, was zur Bildung von Verbindung III führt. Verbindung III wird unter Bildung von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  wieder zum nativen Enzym ( $\text{Fe}^{3+}$ ) oxidiert. Das Superoxidradikal ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) reagiert mit dem Substratradikal

und erzeugt Wasserstoffperoxid, das anschließend für die Peroxidasereaktion genutzt werden kann. Der Peroxidasezyklus setzt die Umsetzung unter Bildung der Zwischenprodukte  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^{\bullet-}$  mit hoher Geschwindigkeit fort.

Die rPsaDyP baut auch ohne den Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit einer  $\text{O}_2$ -abhängigen Aktivität das Substrat  $\beta$ -Carotin ab, daher ist es möglich, dass der Abbau in ähnlicher Weise erfolgt, wie er für die Oxidation von Epinephrin durch die Meerrettichperoxidase beschrieben wurde. Dieser Mechanismus muss für die DyP-Typ Peroxidasen noch untersucht werden.

Adak *et al.* (1998) führten die Umsetzung von Epinephrin durch die Meerrettichperoxidase in dem Oxidase-Peroxidase-Mechanismus auf das zu Phenolen vergleichsweise niedrige Standardpotential des Substrates (150-300 mV (gegen NWE)) zurück. Das Standardpotential von Phenolen (z.B. Guajakol) hingegen liegt bei etwa 900 mV (gegen NWE).

Das Standardpotential für eine Ein-Elektronen-Oxidation von  $\beta$ -Carotin beträgt 650-780 mV (gegen NWE) (Martin *et al.* 1999) und liegt damit deutlich höher als das von Epinephrin und nur knapp unter dem für Phenole, für deren Umsatz  $\text{H}_2\text{O}_2$  notwendig ist (Adak *et al.* 1998). Daher kann die Oxidasereaktion vermutlich nicht alleine durch das Standardpotential des Substrates begründet werden. Die Strukturen der ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgesetzten Substrate unterscheiden sich deutlich von denen der umgesetzten Phenole. Wahrscheinlich binden die Substrate an unterschiedlichen Bindestellen an der Proteinoberfläche. Dabei wäre es möglich, dass der initiale Schritt dieses Reaktionszyklus, wie von Gazarian und Lagrimini (1998) für die Umsetzung von Indol-3-essigsäure beschrieben, die Bildung eines ternären Komplexes (Substrat-Enzym- $\text{O}_2$ ) ist. Bei der Auflösung des Komplexes nach enzymatischer Umsetzung werden ein Substratkationenradikal sowie ein Superoxidanionenradikal gebildet und das Enzym im Grundzustand freigesetzt. Die rPsaDyP kann aufgrund ihrer Substratspezifität und katalytischen Eigenschaften der Familie der DyP-Typ Peroxidasen zugeordnet werden.

#### 4.4 Zwei-Enzym-System

Peroxidasen sind die wichtigsten Vertreter ligninolytischer Enzyme und werden bereits in einer Vielzahl technischer Prozesse eingesetzt. Einige neuere Anwendungen, bei den Peroxidasen verwendet werden, sind (Hamid und Khalil-ur-Rehman 2009):

- Entfernung phenolischer Substanzen aus Abwässern
- Synthese verschiedener aromatischer Chemikalien
- Entfernung von Peroxiden aus Lebensmitteln und Industrieabwässern

Für die Oxidation ihrer Substrate benötigen Peroxidasen Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) als Cofaktor. In der Natur wird dieses durch andere Enzyme, wie z.B. Arylalkoholoxidasen durch die Oxidation von aromatischen und mehrfach ungesättigten aliphatischen primären Alkoholen zur Verfügung gestellt.

Guillén *et al.* (2000) beobachteten einen synergetischen Effekt bei der Produktion von Hydroxylradikalen durch eine Laccase und eine Arylalkoholoxidase aus *Pleurotus eryngii*.  $Mn^{2+}$ -abhängige Peroxidasen wurden zusammen mit Arylalkoholoxidasen, die bei Pleuroten für die Produktion von  $H_2O_2$  verantwortlich sind, in Flüssigkulturen von *Pleurotus eryngii* beschrieben (Martínez *et al.* 1994, Muñoz *et al.* 1997). In einem System aus einer DyP und einer Arylalkoholoxidase, die aus Kulturüberstand von *Bjerkandera adusta* isoliert wurden, entfärbte die DyP in Gegenwart einer Arylalkoholoxidase den Farbstoff RB5 auch *in vitro* (Kim *et al.* 2001).

Bei technischen Applikationen, in denen Peroxidasen eingesetzt werden, muss dem System  $H_2O_2$  zugeführt werden. Dabei kann es aufgrund von lokalen Überdosierungen zur Inhibierung der Peroxidasen kommen (Kim und Shoda 1999b). Daneben sind Transport und Lagerung von  $H_2O_2$  gefährlich und machen besondere Vorsichtsmaßnahmen notwendig (Mai *et al.* 2004). Daher sollte in dieser Arbeit ein Zwei-Enzym-System bestehend aus einer DyP-Typ Peroxidase und einer Arylalkoholoxidase entwickelt werden, das die artifizielle Zugabe von Wasserstoffperoxid überflüssig macht. Durch die Verwendung eines  $H_2O_2$  produzierenden Enzyms, wie der Arylalkoholoxidase, wird der Cofaktor  $H_2O_2$  *in situ* zur Verfügung gestellt.

In dieser Arbeit wurden eine Arylalkoholoxidase und eine DyP-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* kloniert, heterolog exprimiert und charakterisiert. Auf Basis dieser Untersuchungen wurde das neuartige Zwei-Enzym-System mit den rekombinant produzierten Enzymen etabliert und verschiedene Substrate umgesetzt. Bei der Charakterisierung der Peroxidase wurde gezeigt, dass die Aktivität der Peroxidase in Abhängigkeit des Substrates bei verschiedenen  $H_2O_2$ -Konzentrationen gehemmt wird. Dieser Effekt trat beispielsweise bei der Umsetzung von ABTS ab einer Konzentration des Cosubstrates von 0,125 mM auf. Die beiden Enzyme müssen in diesem System daher so aufeinander abgestimmt werden, dass einerseits eine ausreichende Verfügbarkeit des Cofaktors  $H_2O_2$  gewährleistet und andererseits eine Inhibierung der Peroxidase durch einen Überschuss an  $H_2O_2$  vermieden wird. Für die Entwicklung des Zwei-Enzym-Systems wurden zunächst aus den pH- und Temperaturoptima, sowie den Puffern,

in denen die beiden Enzyme die höchste Aktivität zeigten, Reaktionsbedingungen abgeleitet, unter denen die Enzyme kombiniert wurden. Das Zwei-Enzym-System wurde bei pH 4,5 und 30 °C etabliert (3.5.1) und auf die Eignung hinsichtlich der Oxidation von Substraten wie DMP (aromatisches Ligninmodell), ABTS oder Annatto untersucht, die ebenfalls für die Charakterisierung der rPsaDyP verwendet wurden. Das für die Umsetzung benötigte Cosubstrat  $H_2O_2$  wurde dabei kontinuierlich durch die Oxidation von Veratryalkohol durch die AAO\* bereitgestellt. Bei der kinetischen Abstimmung der beiden Enzyme wurde die  $H_2O_2$ -Produktion reguliert, indem verschiedene AAO\*-Konzentrationen in den Reaktionseinsatz eingebracht wurden. Dabei wurde die Konzentration der AAO\* im Reaktionsansatz so gewählt, dass die produzierte  $H_2O_2$ -Menge die maximale Umsatzgeschwindigkeit der Peroxidase ermöglichte, ohne diese zu hemmen. Wurde die Konzentration der AAO\* im Zwei-Enzym-System erhöht, führte dies – früher als durch die produzierte  $H_2O_2$ -Menge zu erwarten – zu einer Inhibierung der rPsaDyP (Abb. 3.66). Möglicherweise wird die Umsatzgeschwindigkeit nicht nur durch die bereitgestellte Menge an  $H_2O_2$  beeinflusst, sondern auch durch die Konzentration der eingesetzten Enzyme und ist so auf eine Interaktion der beiden Enzyme untereinander zurückzuführen (Hill 1977). Andererseits könnte die rPsaDyP durch ein *Substrate-Channeling* (Zhang 2011) des  $H_2O_2$  mit einem Überschuss des Cosubstrates versorgt und so inaktiviert werden.

Alle untersuchten Substrate für die rPsaDyP wurden durch das Zwei-Enzym-System umgesetzt. Nach der kinetischen Abstimmung der beiden verwendeten Enzyme wurde im Vergleich zu einer einmaligen  $H_2O_2$ -Zugabe in der Positivkontrolle eine verbesserte Umsetzung des phenolischen Ligninmodellsubstrates 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) gezeigt (Abb. 3.67). Dieses Substrat wurde ebenso wie ABTS bei einer ähnlichen Umsatzgeschwindigkeit länger andauernd umgesetzt als in der Positivkontrolle mit  $H_2O_2$  (Abb. 3.69). Der Umsatz von DMP in der Positivkontrolle mit  $H_2O_2$  erfolgte nicht kontinuierlich und stagnierte relativ schnell. Möglicherweise ist das entstehende Produkt bei hohen  $H_2O_2$ -Konzentrationen nicht stabil und wird abgebaut, wie es für Guajakol beschrieben wurde (Koduri und Tien 1995). Im optimierten Zwei-Enzym-System wird von der AAO\* kontinuierlich  $H_2O_2$  zur Verfügung gestellt, welches von der DyP-Typ Peroxidase umgehend verbraucht wird. Dies ermöglicht einen länger andauernden Substratumsatz sowie eine höhere Produktausbeute und verdeutlicht den Vorteil des Zwei-Enzym-Systems. Das Substrat Annatto wurde nach der Abstimmung der verwendeten Enzyme im Vergleich zur Positivkontrolle (mit  $H_2O_2$ ) effizienter und schneller abgebaut (Abb. 3.70). Die kontinuierliche systeminterne Produktion von  $H_2O_2$  durch die AAO\* führte zu einer Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit der rPsaDyP gegenüber einer einmaligen Gabe von  $H_2O_2$ .

#### 4.4.1 Bleichung von Molke mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems

Bei der Käseherstellung werden gelb-orange Farbstoffe wie Annatto verwendet, um die Farbe von Cheddar oder Gouda zu intensivieren. Die dabei als Nebenprodukt entstehende Molke ist ebenfalls gefärbt, wodurch deren kommerzielle Nutzung aufgrund einer geringeren Verbraucherakzeptanz erschwert wird (Kang *et al.* 2010). Die Bleichung von gefärbter Molke erfolgt in der Industrie durch Zusatz von Peroxiden ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Benzoylperoxid) und unter Hitzeeinwirkung (McDonough *et al.* 1968). Die Bleichung der Molke durch einen enzymatischen Prozess bietet verschiedene Vorteile. Durch den Einsatz eines Zwei-Enzym-Systems oder Drei-Enzym-Systems bei dem *in situ* das benötigte  $\text{H}_2\text{O}_2$  produziert wird, kann eine Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  weitgehend überflüssig werden. Dadurch kann eine Hitze- und Peroxid-vermittelte Denaturierung von Proteinen und die Entstehung von Fehlparfums vermieden werden (Croissant *et al.* 2009, Listiyani *et al.* 2012).

Szweda *et al.* (2013) entwickelten ein Drei-Enzym-System aus einer sauren Lactase, einer Glucoseoxidase und einer DyP-Typ Peroxidase (MsP1) zur Bleichung von Molke. MsP1 baut Carotinoide und Xanthophylle zu ungefärbten norisoprenoiden Verbindungen ab (Zorn *et al.* 2003a). Die im Rahmen dieser Arbeit klonierte und charakterisierte rPsaDyP ist dazu ebenfalls in der Lage. Ein Zwei-Enzym-System aus einer Arylalkoholoxidase, die  $\text{H}_2\text{O}_2$  produziert und der rPsaDyP, die in der Lage ist, Annatto (E 160b) und  $\beta$ -Carotin (E 160a) abzubauen, ist ebenfalls für die Bleichung von Molke geeignet. Die Bleichung von gefärbter Molke mit diesem Zwei-Enzym-System ist gegenüber einer einmaligen Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Positivkontrolle deutlich effektiver (Abb. 3.72). Mit dem Zwei-Enzym-System war es möglich, die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen während der Bleichung zu regulieren und somit eine Inhibierung der Peroxidase zu vermeiden. Durch die kontinuierliche Bereitstellung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch die AAO\* wurde gewährleistet, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  über einen längeren Zeitraum ausreichend zur Verfügung stand und die Molke fortwährend gebleicht wurde. Bei der einmaligen Zugabe der höchstmöglichen Menge  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die final im homogen gemischten Reaktionsansatz noch nicht zu einer Hemmung der Peroxidase führte, kann es bei der Zugabe zu lokalen Inhibierungseffekten kommen. Solche Effekte und die begrenzte Menge des zur Verfügung stehenden Cosubstrates führten zu einer deutlich geringeren Bleichung der Molke. Zusätzlich kann die Arylalkoholoxidase auch spezifische Aldehyde als Substrate nutzen, für die die  $K_m$ -Werte jedoch deutlich höher liegen als für die entsprechenden Alkohole (Ferreira *et al.* 2010). Dadurch könnte die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion länger aufrechterhalten werden, wodurch auch die Bleichung fortgesetzt werden könnte. Das Zwei-Enzym-System zeigte in diesem Anwendungsbeispiel zur umweltverträglichen Bleichung von Annatto-gefärbter Molke klare Vorteile gegenüber dem einfachen Enzymsystem bestehend aus einer DyP-Typ Peroxidase und  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

---

#### 4.4.2 Abbau von Lignocellulosen aus nachwachsenden Rohstoffen mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems

Lignocellulosen wie Holz und Stroh stellen die größte Quelle nachwachsender Rohstoffe dar. Sie bestehen aus den beiden am häufigsten in der Natur vorkommenden Polymeren: Cellulose/Hemicellulose und Lignin. Während Cellulosen in vielen Industriezweigen Verwendung finden, kann Lignin noch nicht effizient veredelt werden und wird zumeist thermisch verwertet. Der Aufschluss dieser Polymere durch höhere Pilze erfolgt durch sekretierte ligninolytische Enzyme. Extrazelluläre Pilzenzyme ermöglichen den Aufschluss des Lignocellulose-Komplexes unter energetisch günstigen Bedingungen ohne den Einsatz umweltgefährdender Chemikalien. In einer Bioraffinerie könnten mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems Lignocellulosen aufgeschlossen werden, wobei das von Peroxidasen benötigte  $H_2O_2$  durch die Arylalkoholoxidase bereitgestellt wird.

Das Zwei-Enzym-System wurde erfolgreich für die Oxidation des phenolischen Ligninmodellsubstrates DMP eingesetzt. Dabei zeigte das Zwei-Enzym-System deutliche Vorteile gegenüber dem einfachen Enzymsystem. Das Modellsubstrat Adlerol wurde von der verwendeten Peroxidase allerdings nur in sehr geringem Maße umgesetzt. Daher gilt es, die Fähigkeiten des Zwei-Enzym-Systems hinsichtlich des umweltschonenden und sicheren Aufschlusses von Lignocellulosematerialien aus nachwachsenden Rohstoffen noch weiter zu untersuchen. Allerdings sind in der Literatur DyP-Typ Peroxidasen beschrieben (Liers *et al.* 2010), die Adlerol effektiv umsetzen. Durch den Einsatz dieser Peroxidasen in das Zwei-Enzym-System könnte ein effizienter Aufschluss von Lignocellulosen aus nachwachsenden Rohstoffen möglich werden. Die entstehenden Abbauprodukte könnten dann als Ausgangsstoffe für chemische Synthesen oder Fermentationsprozesse dienen und so für die Produktion neuer Werkstoffe bis hin zu Biokraftstoffen eingesetzt werden.

## 4.5 GDS(L)-Lipase

Bei der Kultivierung von Pilzen wurden ebenfalls Lipasen identifiziert, bei denen sich neuartige proteinbiochemische und katalytische Eigenschaften abzeichneten. So wurde von Zorn *et al.* (2005b) eine neuartige extrazelluläre Carboxylesterase aus *Pleurotus sapidus* identifiziert, die Xanthophyllester mit hoher Effizienz hydrolysiert. Ebenfalls aus *Pleurotus sapidus* identifizierten Linke *et al.* (2013) eine neuartige Esterase, die die Hydrolyse von Esterbindungen feruloylierter Saccharide katalysiert. Bei der Untersuchung des Sekretoms von *Pleurotus sapidus* wurden Peptidsequenzen identifiziert, die einer GDS(L)-Lipase zugeordnet wurden, deren cDNA in dieser Arbeit kloniert wurde.

### 4.5.1 Sequenz- und strukturbasierte Analyse der klonierten Lipase

Für die GDS(L)-Lipase wurde eine cDNA-Sequenz mit 954 Basenpaaren kloniert (Abb. 3.73). Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz umfasst 317 Aminosäuren. Durch bioinformatische Untersuchungen wurde eine Homologie zu Enzymen der SGNH-Hydrolase Superfamilie festgestellt (Abb. 3.74) und das Enzym als Mitglied der GDS(L)-Lipase/Acylhydrolase-Familie identifiziert. Die Mitglieder der SGNH-Hydrolase Superfamilie, die vielfältige hydrolytische Enzymaktivitäten zeigen, werden in drei Familien eingeteilt (Muralidharan *et al.* 2013). Dazu gehört unter anderem die Familie der GDS(L)-Lipasen (EC 3.1.1.3), die Enzyme aus allen Reichen umfasst und die größte Familie stellt. Daher wird der Begriff GDS(L)-Lipase häufig sowohl als Bezeichnung der Familie als auch der Superfamilie genutzt (Akoh *et al.* 2004).

Über ihre Funktion und die physiologische Rolle ist wenig bekannt, allerdings geben die wenigen Studien über GDS(L)-Lipasen erste Hinweise auf die Beteiligung an bestimmten Prozessen. So scheinen einige dieser Proteine eine Rolle bei der Abwehr von Pathogenen zu spielen oder sind Teil der Stressreaktion von Pflanzen (Kim *et al.* 2008, Kwon *et al.* 2009). Auch im Nektar verschiedener Pflanzen wurden GDS(L)-Lipasen nachgewiesen, denen direkte antimikrobielle Aktivitäten durch die Zerstörung von Membranen zugeschrieben werden (Kram *et al.* 2008). Eine wichtige Bedeutung scheinen GDS(L)-Lipasen auch bei Entwicklungsprozessen zu haben, speziell bei der sexuellen Reproduktion, Embryogenese und Keimentwicklung (Clauss *et al.* 2008, Kondou *et al.* 2008, Takahashi *et al.* 2010). Auch wenn erst wenige Erkenntnisse über GDS(L)-Lipasen publiziert wurden, so sind dennoch bereits verschiedene Leitmotive bekannt.

Lipasen zeigen eine Präferenz für wasserunlösliche Substrate. Die Hydrolyse der Esterbindungen erfolgt an einer Öl-Wasser-Grenzfläche, wobei die Anlagerung des Enzyms an die Grenzfläche zu einer Konformationsänderung des Enzyms führt. Dadurch kommt es zu einem drastischen Anstieg der katalytischen Aktivität, die als Grenzflächenaktivierung bezeichnet wird (Jaeger *et al.* 1999, Wong und Schotz 2002). Auf molekularer Ebene lässt sich dies durch das Vorhandensein eines „Deckels“ (*lid*) erklären, der häufig aus ein bis zwei  $\alpha$ -Helices besteht und erst in Anwesenheit der Grenzfläche dem Substrat den Zugang zum aktiven Zentrum freigibt (Arpigny und Jaeger 1999, Grochulski *et al.* 1993). Dadurch kann die katalytische Aktivität von Esterasen durch einfache Michaelis-Menten-Kinetiken beschrieben werden, während Lipasen zunächst eine

bestimmte Substratkonzentration benötigen, bevor es zu einem starken Anstieg der Aktivität kommt (Nini *et al.* 2001, Verger 1997). Die Grenzflächenaktivierung tritt ausschließlich bei Lipasen auf und dient somit als Merkmal zur Unterscheidung von Lipasen und Esterasen.

Hydrolasen mit einer  $\alpha/\beta$ -Faltung, wie die Serinhydrolasen und Cholinesterasen besitzen drei konservierte, katalytisch essentielle Aminosäuren: Ser, Asp oder Glu und His, die als katalytische Triade das aktive Zentrum bilden (Muralidharan *et al.* 2013, Schrag *et al.* 1991). Das katalytische Serin ist im hoch konservierten Pentapeptid (GxSxG-Motiv) lokalisiert, wohingegen die beiden anderen Reste der katalytischen Triade in der Primärsequenz weit entfernt und in der Struktur jeweils in einem eigenen Loop liegen (Brumlik und Buckley 1996, Muralidharan *et al.* 2013). Bei den GDS(L)-Lipasen, die zu der SGNH-Hydrolase-Superfamilie gehören, liegt das katalytische Serin in dem namensgebenden GDSL-Motiv, das katalytische Aspartat und Histidin liegen nah zusammen in der Konsensussequenz DxxHP (Dalrymple *et al.* 1997, Ding *et al.* 2014). Das GDSL-Motiv (Gly-Asp-Ser-Leu) liegt näher am N-Terminus wohingegen das GxSxG-Motiv im Zentrum der Sequenzen lokalisiert ist (Arpigny und Jaeger 1999, Upton und Buckley 1995).

Obwohl GDS(L)-Lipasen sehr variabel in ihrer Größe sind und verschiedene Funktionen erfüllen, besitzen sie fünf diskrete Blöcke mit einer relativ großen Sequenzhomologie. Diese Blöcke haben in jedem Protein dieselbe relative Position. Die namensgebenden Reste der SGNH-Hydrolase Superfamilie Serin, Glycin, Asparagin und Histidin liegen in den Blöcken I, II, III und V (Upton und Buckley 1995). Serin und Glycin sind auch in der GDS(L)-Lipase aus *Pleurotus sapidus* konserviert und liegen in Block I bzw. II (Abb. 4.7). Diese Reste bilden zusammen mit dem Asparagin in Block III die Oxyanionenhöhle. Das katalytische Serin ist ein Nukleophil, das den Carbonylkohlenstoff der Esterbindung angreift und als Protonendonator für die Oxyanionenhöhle dient. Glycin und Asparagin dienen ebenfalls als Protonendonoren für die Oxyanionenhöhle (Chepyshko *et al.* 2012). Die Position des katalytisch aktiven Aspartats ist noch nicht exakt bestimmt. Upton und Buckley (1995) sowie Brumlik und Buckley (1996) haben beschrieben, dass diese Aminosäure bei GDS(L)-Lipasen im Block III lokalisiert ist. Nach Akoh *et al.* (2004) enthält Block V das katalytische Aspartat bzw. Glutamat und Histidin. Das Histidin bewirkt als katalytische Base die Deprotonierung der Hydroxylgruppe des Serins im aktiven Zentrum, wodurch das Serin nukleophiler wird (Akoh *et al.* 2004, Mølgaard *et al.* 2000).

Ein Vergleich der Primärsequenzen verschiedener Lipasen aus unterschiedlichen Organismen<sup>4</sup> (Abb. 4.7) zeigt, dass alle das Strukturmotiv GDS(L) besitzen. Anhand des Aminosäuresequenzvergleichs wurde in Block V die Konsensussequenz DxxHP der katalytischen Triade in den Aminosäuresequenzen der SGNH-Hydrolasen identifiziert. In der Aminosäuresequenz aus *Pleurotus sapidus* und *Agaricus bisporus var. bisporus* wurde diese Sequenz nicht identifiziert, jedoch ein konserviertes Aspartat in Block III. Die GDS(L)-Lipase aus *Pleurotus sapidus* zeigt zu den GDS(L)-Lipasen aus den verschiedenen Organismen eine Identität zwischen 6% (*P. sapidus* – *A. thaliana*) und 50% (*P. sapidus* – *A. bisporus*).

---

<sup>4</sup> *Agaricus* und *Pleurotus* – Basidiomyceten, *Colletotrichum* – Ascomycet, *Nostoc* – filamentöses Cyanobakterium, *Pseudomonas* – Bakterium und *Arabidopsis* – Pflanzen





Der Vergleich verschiedener GDS(L)-Lipasen von Basidiomyceten zeigte, dass die klassische katalytische Triade der SGNH-Hydrolasen nicht über das gesamte Phylum konserviert ist. Ausschließlich das katalytisch aktive Serin ist in allen untersuchten Sequenzen vorhanden. Die Untersuchungen von Vujaklija *et al.* (2002) bei *Streptomyces* zeigten, dass ein „nicht-klassisches“ Aspartat katalytisch aktiv ist. In den Aminosäuresequenzen der Basidiomyceten wurde hier ein konserviertes Aspartat in Block III identifiziert (Abb. 4.8), das zu diesem homolog sein könnte und somit ebenfalls Bestandteil einer alternativen katalytischen Triade sein kann. Bei GDS(L)-Lipasen aus Basidiomyceten wurde das Histidin der klassischen katalytischen Triade bzw. ein katalytisch aktives Histidin bisher noch nicht identifiziert. Daher ist es möglich, dass das konservierte Histidin in Block V bei Basidiomyceten der katalytische Rest ist.

Die klassischen katalytischen Reste sind offensichtlich nicht unter allen Vertretern der GDS(L)-Lipasen konserviert und nur wenige Alternativen identifiziert. Bender *et al.* (2009) beschrieben eine neue Lipase-Familie, die Phospholipasen (PlaB)-Lipasen, deren Mitglieder katalytische Reste an anderen Stellen aufweisen. Allerdings weist die isolierte Lipase zu diesen ebenfalls nur eine sehr geringe Homologie auf.

Die Berechnung einer 3D-Struktur für die GDS(L)-Lipase erfolgte mittels SWISS-MODEL. Als Template wurde die Esterase estA aus *Pseudomonas aeruginosa* (PDB-ID: 3KVN) verwendet, da bisher keine Struktur einer GDS(L)-Lipase aus Pilzen publiziert wurde. Beide Sequenzen zeigten lediglich eine Übereinstimmung von 21% und das Template besitzt die klassische katalytische Triade. Die Homologie der Strukturen war zu gering, um ein aussagekräftiges Modell erstellen zu können. Daneben wurden Modelle mit Xylanesterasen (PDB-ID: 4JJ6 und 2WAA) bzw. einer Lipase (PDB-ID: 1YZF) als Template erstellt. Den Templates fehlen ebenso wie der klonierten GDS(L)-Lipase die klassischen katalytischen Reste. Die Homologien dieser Sequenzen zu dem klonierten Enzym lagen bei etwa 18%, somit konnte hier ebenfalls kein aussagekräftiges Modell erstellt werden. Der Vergleich von Sequenzen verschiedener GDS(L)-Lipasen zeigt, dass andere His- oder Asp/Glu-Reste konserviert sind und als katalytisch aktive Reste der GDS(L)-Lipasen fungieren könnten. Ohne ein geeignetes Modell lässt sich ihre Lage in der dreidimensionalen Struktur jedoch nicht eindeutig bestimmen. Daher kann nicht bestimmt werden, ob diese Reste tatsächlich an der Katalyse beteiligt sein könnten. Die GDS(L)-Lipasen aus Basidiomyceten könnten jedoch einen ganz eigenen Reaktionsmechanismus aufweisen. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass sich die Tertiärstruktur der GDS(L)-Lipasen deutlich von der klassischen  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung unterscheidet und einzigartig unter den bisher bekannten Hydrolasen ist (Muralidharan *et al.* 2013). Genauere Auskunft über an der Katalyse beteiligte Aminosäurereste kann durch Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse der Lipase gewonnen werden.

#### 4.5.2 Kulturverlauf und Induktionseffekt verschiedener Kohlenstoffquellen

Der Pilz *Pleurotus sapidus* kann verschiedene Substrate besiedeln, wobei sich die Zusammensetzung des Sekretoms in Abhängigkeit des besiedelten Substrates verändert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch die Verwendung bestimmter C-Quellen im Kulturmedium die Aktivität von Lipasen im Sekretom gesteigert wird. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine gesteigerte Aktivität vor allem auf die vermehrte Bildung von Lipasen zurückzuführen ist (Substratinduktion). Mit Keimöl als Induktor wurde die Lipaseaktivität gegenüber der Kontrolle nicht gesteigert. Tween<sup>®</sup> 80 führte als Induktor nach einer anfänglichen lag-Phase (bis Tag 2), zu einem raschen Anstieg der Lipaseaktivität. Am Tag 5 überstieg die Enzymaktivität die Aktivität ohne Induktion um den Faktor 15 (Abb. 3.3). Der anschließende rasche Abfall der Lipaseaktivität ist vermutlich auf die abnehmende Substratkonzentration zurückzuführen, bei der die Bildung weiterer Lipasen nicht mehr induziert wird. Tween<sup>®</sup> 80 ist ein Polyoxyethylensorbitanmonooleat, welches als Emulgator und Stabilisator Anwendung in der Lebensmittelindustrie findet. Als nicht-ionischer grenzflächenaktiver Stoff sorgt es für eine feine Verteilung hydrophober Substrate und gewährleistet eine stabile Substratemulsion. Dadurch wird eine ausgedehnte Grenzfläche bereitgestellt (Liu *et al.* 2000). Verschiedene Stoffe wie Tenside sind dafür bekannt, dass sie die Permeabilität von Membranen erhöhen und den Export von verschiedenen Komponenten erleichtern. Daher ist anzunehmen, dass Tween<sup>®</sup> 80 neben der Erhöhung der Biosynthese von Lipasen auch deren Sekretion verstärkt (Dalmau *et al.* 2000).

#### 4.5.3 Heterologe Expression

Die GDS(L)-Lipase wurde heterolog im filamentösen Ascomycet *Trichoderma reesei* exprimiert (AB Enzymes), wobei eine Sekretion der Lipase in den Kulturüberstand vermittelt wurde. Filamentöse Pilze sind in der Lage, große Proteilmengen zu sekretieren (Gouka *et al.* 1997), eukaryotische mRNA zu prozessieren, ermöglichen posttranslationale Modifikationen (u.a. Glykosylierung) und die Bildung von Disulfidbrücken (Lin *et al.* 1993). Für die Expression wurden drei verschiedene Expressionsvektoren erzeugt (Abb. 7.6), die sich hinsichtlich des Sekretionssignals unterscheiden. Mit Hilfe des verwendeten Expressionssystems wurde eine effiziente Sekretion des rekombinanten Proteins in den Kulturüberstand erreicht und ausreichende Enzymmengen für technische Applikationen produziert. Unabhängig vom verwendeten Expressionskonstrukt wurde die höchste Lipaseaktivität im Kulturüberstand bei der *batch*-Fermentation nachgewiesen. Für die Vermittlung der Sekretion wurde zum einen das native Signalpeptid der Lipase verwendet (pAB500-LipPS), zum anderen wurde das Lipasegen ohne die mittels SiganLP vorhergesagte Signalsequenz mit der *cbhI*-Signalsequenz (pAB510-LipPS) bzw. mit dem *cbhII*-Carrier (pAB600-LipPS) fusioniert. Der *cbhII*-Carrier wird durch die KexII-Protease abgespalten, wodurch das aktive Enzym entsteht. Bei der Verwendung der nativen Signalsequenz und des *cbhII*-Carriers wurden vergleichbar hohe Lipaseaktivitäten im Kulturüberstand nachgewiesen (Abb. 3.76). Offensichtlich führt auch die natürliche Signalsequenz zur Sekretion der Lipase

im heterologen Organismus. Außerdem spricht dies dafür, dass das natürliche Signalpeptid der Lipase ebenfalls abgespalten wird. Allerdings ist es auch möglich, dass die native Signalsequenz die Aktivität der Lipase nicht negativ beeinflusst. Mit der cbhI-Signalsequenz wurde im Vergleich eine niedrigere Lipaseaktivität in den Kulturüberstand sekretiert. Hier bleibt zu überprüfen, ob die Signalsequenz ein schlechteres Sekretionssignal für die Lipase ist, oder ob die niedrigere Aktivität auf eine schlechtere Abspaltung der Signalsequenz zurückzuführen ist.

#### 4.5.4 Biochemische Charakterisierung der GDS(L)-Lipase

Für die GDS(L)-Lipase wurde experimentell ein pI zu 5,0 (Abb. 3.78) und ein Molekulargewicht von 33,3 kDa (Abb. 3.77) bestimmt. Der anhand der IEF ermittelte pI stimmt mit dem aus der Sequenz berechneten pI überein. In der Literatur sind für GDS(L)-Lipasen aus Pilzen pI-Werte im Bereich zwischen 4,2 und 5,6 (BRENDA) beschrieben. Der pI der in dieser Arbeit untersuchten Lipase liegt ebenfalls in diesem Bereich.

Kikuta *et al.* (2012) beschrieben für eine GDS(L)-Lipase ein pH-Profil mit einem Aktivitätsmaximum von pH 7,5, deren Aktivität unterhalb und oberhalb dieses Wertes stark abnahm. Für dieses Enzym wurde bei pH 6,0 keine Aktivität ermittelt. Die GDS(L)-Lipase aus *Pleurotus sapidus* zeigte ein vergleichbares pH-Profil, wobei die Aktivität bei pH 6,0 noch zwischen 20% und 30% lag.

Das Molekulargewicht von GDS(L)-Lipasen variiert stark zwischen 22 kDa und 60 kDa, wobei das Molekulargewicht von glykosylierten Enzymen höher sein kann (Akoh *et al.* 2004). Für die GDS(L)-Lipase aus *Pleurotus sapidus* wurden fünf potentielle O- und keine potentielle N-Glykosylierungsstelle ermittelt (s. 3.6.2). Das ermittelte apparente Molekulargewicht stimmt mit dem aus der Primärsequenz berechneten Molekulargewicht überein, was darauf hindeutet, dass die rekombinante Lipase nicht glykosyliert wird. In dieser Arbeit wurde allerdings bereits gezeigt, dass in *Trichoderma reesei* heterolog exprimierte Enzyme aus *Pleurotus sapidus* prozessiert und modifiziert werden. Daher ist es möglich, dass die rekombinante Lipase ebenso durch den Wirtsorganismus prozessiert wird. Deshalb muss der Glykosylierungsgrad des rekombinanten Enzyms ebenso wie der des nativen Enzyms noch untersucht werden.

#### 4.5.5 Mögliche Rolle der GDS(L)-Lipase bei der Degradation von Lignocellulose

Ihre biochemischen Eigenschaften machen Lipasen und Esterasen zu attraktiven Enzymen für die biotechnologische Anwendung. Die GDS(L)-Lipasen sind aufgrund ihrer Fähigkeit, ein breites Substratspektrum umsetzen zu können, besonders interessant. Sie haben ein flexibles aktives Zentrum, das in Gegenwart und bei der Bindung verschiedener Substrate seine Konformation ändert (*induced fit*) und so die Umsetzung unterschiedlicher Substrate ermöglicht. Daher besitzen sie das Potential, interessante Esterverbindungen, beispielsweise für die Pharmaindustrie oder Lebensmittelindustrie, zu hydrolysieren und zu synthetisieren (Akoh *et al.* 2004).

Extrazelluläre hydrolytische Pilzenzyme haben als wesentliche Bestandteile des Sekretoms die Aufgabe, den Zucker aus pflanzlichen Polymeren (Hemicellulosen, Cellulosen) als Kohlenstoff- und Energiequelle für den Pilz verfügbar zu machen. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass bei einer Kultivierung des Pilzes *Pleurotus sapidus* auf Rapsstroh als Substrat relevante enzymatische Aktivitäten detektiert wurden, die mit dem Lignocelluloseabbau in Verbindung stehen. Peroxidase-, Laccase-, Lipase-, Esterase-, Peptidase-, Xylanase- und Glucanase-Aktivitäten wurden dabei zeitabhängig nachgewiesen (Schüttmann 2011). Die Lipaseaktivität wurde hierbei über die gesamte Kulturdauer nachgewiesen. Die klonierte GDS(L)-Lipase könnte als Bestandteil des Sekretoms am Abbau von Lignocellulose bzw. dem Umbau von Zwischenprodukten beteiligt sein. Cellulasen und Xylanasen besitzen für die Bindung an Cellulose sogenannte Cellulosebindedomänen (CBD). Das Vorhandensein einer CBD ist somit ein Indiz für die Beteiligung dieser Enzyme am Abbau von Cellulosen. Für die katalytische Aktivität der Enzyme ist die CBD jedoch nicht essentiell (Gilkes *et al.* 1991). Kroon *et al.* (2000) zeigten, dass die von ihnen untersuchte Zimtsäureesterase aus dem Pilz *Penicillium funiculosum* ebenfalls eine Cellulosebindedomäne besitzt. Die Aktivität der Esterase wurde durch die Eliminierung der CBD nicht beeinflusst. In der Literatur wurde eine GDS(L)-Lipase aus dem Rotfäulepilz *Heterobasidion parviporum* beschrieben, die eine Cellulosebindedomäne besitzt (Yakovlev *et al.* 2008) und für die eine Beteiligung am Abbau der Cellulose postuliert wird. Allerdings wurde bei der klonierten GDS(L)-Lipase anhand von Datenbankrecherchen keine bekannte Cellulosebindedomäne nachgewiesen. Dies deutet, ebenso wie der Nachweis der Aktivität des Enzyms über die gesamte Kulturdauer, darauf hin, dass die Lipase indirekt am Abbau von Lignocellulosen beteiligt sein könnte. Eventuell baut die Lipase Zwischenprodukte weiter ab oder ist an „Entgiftungsprozessen“ beteiligt.

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Hydrolasen auch aktiv am Abbau der Lignocellulose beteiligt sind. Unter den Hydrolasen sind spezielle Esterasen (EC 3.1.1.x) von besonderer Bedeutung, die in der Lage sind, Esterbindungen zwischen den pflanzlichen Zellwandpolysacchariden und den Hydroxyzimtsäure-Bausteinen des Lignins (beispielsweise Ferulasäure oder *p*-Coumarsäure) zu hydrolysieren (Wong 2006). Zu diesen Esterasen gehören die Feruloyl-esterasen (EC 3.1.1.73), die an der Spaltung der Esterbindungen von „Crosslinkern“ (bspw. Diferulate) zwischen Arabinoxylanketten und zwischen Arabinoxylan und Lignin beteiligt sind (Fazary und Ju 2007). Sie spielen somit in der initialen Phase des Abbaus von Lignocellulose eine wichtige Rolle (Kroon *et al.* 2000, Mackenzie und Bilous 1988, Rumbold *et al.* 2003). Bisher wurden jedoch nur wenige Enzyme charakterisiert, die diese Esterbindungen hydrolysieren können, von denen die meisten aus Bakterien, Hefen und Ascomyceten stammen (Fazary und Ju 2007, Wong 2006). Das Interesse an Feruloyl-esterasen für Biotransformationen von industriellen Nebenströmen steigt stetig. Beispiele hierfür sind die enzymatische Freisetzung von Ferulasäure und anderen Zimtsäurederivaten aus Zellwandpolymeren, die als Rohstoff für die biotechnologische Produktion von Vanillin, Vanillinsäure oder Vinylguajakol dienen (Rosazza *et al.* 1995).

Die Substratspezifität des Enzyms wurde in Abhängigkeit von der Acyl-Kettenlänge verschiedener *p*-Nitrophenylester ermittelt (s. 3.6.6). Die Aktivität des Enzyms stieg mit der zunehmenden

Acyl-Kettenlänge des Substrates und einer geraden Anzahl C-Atome an. Das Enzym zeigte somit typische katalytische Eigenschaften einer Lipase. Zusätzlich katalysierte die Lipase die Hydrolyse des von der Zimtsäure abgeleiteten Ferulasäuremethylesters in geringem Maße. Zimtsäurederivate sind Vorstufen der im Lignocellulose-Komplex vorkommenden Monolignole, deren Ester klassische Bindungstypen in pflanzlichen Zellwänden repräsentieren (Iiyama *et al.* 1994, Li und Helm 1995). Die Umsetzung des feruloylierten Polysaccharids 5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (F-A) durch die untersuchte GDS(L)-Lipase war nicht signifikant. Im Rahmen der Charakterisierung waren katalytische Eigenschaften einer Feruloyl-esterase somit nicht eindeutig nachzuweisen. Daher kann über die genaue Funktion der Lipase im Sekretom keine Aussage getroffen werden. Durch Variation der Substrat- bzw. der Enzymkonzentration müsste weiter untersucht werden, ob die GDS(L)-Lipase Eigenschaften einer Feruloyl-esterase zeigt.

## 4.6 Feruloyl-esterase

Die Feruloyl-esterasen gehören zu den Schlüsselenzymen für den Abbau von Lignocellulosen (Williamson *et al.* 1998b). Die Ferulasäure spielt eine wichtige Rolle bei der Ligninsynthese und kann das Lignin mit Polysacchariden des Zellwandmaterials über Esterbindungen verknüpfen. Diese Bindung kann durch die Feruloyl-esterasen hydrolysiert werden (Williamson *et al.* 1998a). Durch verschiedene Genomprojekte wurden inzwischen über 350 Sequenzen für potentielle Feruloyl-esterasen identifiziert, allerdings wurde bisher nur eine Feruloyl-esterase von *Pleurotus sapidus* charakterisiert (Linke *et al.* 2013). Für die Charakterisierung wurde das Enzym aus dem Kulturüberstand gereinigt. Die Effizienz der Isolierung von Enzymen aus Kulturüberständen ist für biotechnologische Anwendungen zu gering, daher wurde die cDNA für dieses Enzym kloniert und sequenziert (Linke *et al.* 2013). Für Expressionsstudien zur heterologen Expression dieser Esterase aus *Pleurotus sapidus* (EPS1) in *Hansenula polymorpha* wurden von der Firma Artes Biotechnology rekombinante Stämme generiert, die für die Expressionsversuche in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Allerdings wurde dabei nur unlösliches, inaktives Enzym gebildet. Daher wurde das Enzym solubilisiert und versucht, dieses auf der Grundlage bekannter Protokolle für die Rückfaltung von Esterasen sowie der bei der Rückfaltung der Arylalkoholoxidase gewonnenen Erfahrungen zu renaturieren.

### 4.6.1 Solubilisierung

Für die Solubilisierung werden häufig hohe Konzentrationen (6 bis 8 M) chaotroper Agenzien, wie Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff verwendet (Middelberg 2002, Villaverde und Carrió 2003). Die Verwendung dieser Agenzien erhöht die Löslichkeit, führt jedoch auch zur vollständigen Entfaltung des Proteins. In dieser Arbeit wurde die Esterase erfolgreich mit 8 M Harnstoff solubilisiert. Die Verwendung eines Puffers, dessen pH-Wert sich deutlich vom pI des Proteins unterscheidet, ermöglicht es das Protein unter milderer Bedingungen in Lösung

zu halten. Weiterhin können reduzierende Agenzien, wie z.B. DTT, zugesetzt werden, die dazu beitragen, dass die Cysteinreste in reduziertem Zustand vorliegen. Dadurch werden nicht-native intra- und intermolekulare Disulfidbrückenbildungen verhindert. Daneben wird häufig EDTA als Chelatbildner zugesetzt, um die Metall-katalysierte Lufoxidation der Cysteinreste zu verhindern (Singh und Panda 2005).

#### 4.6.2 Rückfaltung

Die Rückfaltung der Esterase erfolgte in vier verschiedenen Rückfaltungspuffern. In einem Rückfaltungsgemisch sollte die Rückfaltung nach einer bekannten Rückfaltungsstrategie für eine Lipase aus *Pleurotus sapidus* nach Krügener *et al.* (2009) erfolgen. Diese Rückfaltungsstrategie wurde variiert, indem diesem Puffer Faltungsadditive zugefügt wurden. Zusätzlich wurde ein Rückfaltungsprotokoll für andere hydrolytische Enzyme getestet. In einem weiteren Rückfaltungsgemisch wurde der Puffer verwendet, der für die Rückfaltung der Arylalkoholoxidase (s. 2.5.9) erfolgreich angewendet wurde.

Für die Renaturierung eignen sich, ebenso wie für die Solubilisierung, typische Proteinpuffer. Bei der Rückfaltung der Esterase wurden ein Tris-HCl-Puffer und ein HEPES-Puffer verwendet.

Zusätzlich können Faltungsadditive verwendet werden, die stabilisierend auf die renaturierten Proteine wirken. Diese Additive können prinzipiell zwei Funktionen haben: Sie verbessern die Faltung oder vermindern Aggregationen. Dabei verstärken sie entweder die Protein-Protein-Interaktionen oder vermindern die Interaktionen zwischen Seitenketten der Faltungsintermediate, die zu Aggregationen führen können (Tsumoto *et al.* 2003). Die Additive wirken im Rückfaltungspuffer als Detergenz, Chelatbildner, Stabilisator, Salz, Osmolyt oder chaotropes Agens (Alibolandi und Mirzahoseini 2011). Das eingesetzte Faltungsadditiv Glycerol ist bereits lange als Faltungsstabilisator bekannt und der Stabilisierungsmechanismus wurde durch Timasheff (2002) beschrieben. Glycerol führt zu einer Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen, da es sich um die Proteine anordnet. Sorbitol wirkt ebenfalls stabilisierend bei der Rückfaltung. Dieser Zuckeralkohol vermindert die Aggregation, indem er die Struktur und Eigenschaften von Wassermolekülen verändert, die das zu faltende Protein umgeben (Alibolandi und Mirzahoseini 2011). Durch den Zusatz von Salzen kann die Renaturierungsausbeute verbessert werden. In den verschiedenen Rückfaltungsansätzen wurden die eingesetzten Salze (Calcium-, Natrium- und Kaliumchlorid) variiert. Abhängig von Art und Konzentration können Salze stabilisierend auf Proteine wirken und somit deren Löslichkeit erhöhen (Tanford und Huggins 1961). EDTA wird ebenfalls als Faltungsadditiv eingesetzt und fördert als Chelatbildner die Proteinrückfaltung, wobei der Mechanismus bisher noch ungeklärt ist. In der Literatur wird ebenfalls der Einsatz der Aminosäuren L-Arginin und Prolin für die Renaturierung von Proteinen beschrieben. L-Arginin wirkt dabei vermutlich denaturierend und limitiert so die Anzahl möglicher falscher Faltungsintermediate (Xia *et al.* 2007, Yancey *et al.* 1982). Prolin bindet Intermediate und reduziert die hydrophobe Oberfläche von Proteinen und vermindert so die Aggregation (Rudolph und

---

Crowe 1985). Auch Detergenzien, wie SDS, Triton X-100 und Tween® 80, werden in geringen Konzentrationen (0,01% bis 1%) für die Rückfaltung eingesetzt (Alibolandi und Mirzahoseini 2011).

Die Verwendung eines Redoxsystems im Renaturierungspuffer ermöglicht zum einen durch Oxidation von Cysteinresten im Protein die Bildung von Disulfidbrücken, zum anderen können falsch gebildete Disulfidbindungen aufgebrochen und native gebildet werden (Wang *et al.* 2010). Die Sequenz der Esterase enthält fünf Cysteinreste, die an einer Bildung von Disulfidbrücken beteiligt sein könnten. Für die Rückfaltung der Esterase wurde u.a. eine Kombination aus oxidiertem (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH) im Verhältnis 2:1 im schwach alkalischen Milieu (pH 9) verwendet. Daneben wurde in Rückfaltungsansätzen ebenfalls DTT bzw. TCEP als reduzierendes Agens eingesetzt, um Disulfidbrücken in und zwischen Proteinen aufzubrechen. Der Einsatz von Reduktionsmitteln ist nicht kritisch, allerdings wird dadurch die Rückfaltungsdauer beeinflusst.

Bei der Rückfaltung durch blitzartige Verdünnung verbleibt ein Teil der niedermolekularen Additive des Solubilisierungspuffers (z.B. Harnstoff) im Rückfaltungspuffer. Diese niedermolekulare Substanzen werden ansonsten auch in geringen Konzentrationen Rückfaltungspuffern zugesetzt um Aggregationen zu vermindern. Analog zur Rückfaltung der Arylalkoholoxidase wurde die Rückfaltungsdauer, die -temperatur sowie die Proteinkonzentration variiert. Allerdings gibt es keine Rückfaltungstechnik bzw. -methode, die auf alle Proteinerückfaltungsprozesse übertragbar ist. Trotz der Variation der verschiedenen Parameter wurde mit den verwendeten Rückfaltungssystemen kein aktives Protein erhalten.

Für die Optimierung der Rückfaltungsbedingungen gibt es kommerziell erwerbliche Renaturierungs-Kits, wie z.B. das iFOLD™ Protein Refolding System der Firma Novagen. Mit diesem Kit können parallel eine große Zahl unterschiedlicher Puffer für die Renaturierung von Proteinen getestet werden. Die Renaturierung des Proteins soll dabei durch eine rasche Verdünnung in einem Renaturierungspuffer erfolgen. Dafür stellt das System eine 96-Well Mikrotiterplatte mit verschiedenen, empirisch ermittelten Renaturierungspuffern zur Verfügung. Möglicherweise könnten mit Hilfe des iFOLD™-Systems geeignete Renaturierungsbedingungen für die Esterase aus *Pleurotus sapidus* gefunden werden.

## 5 Ausblick

In weiteren Arbeiten sollten andere Expressionssysteme für die rekombinante Produktion der Arylalkoholoxidase im großen Maßstab untersucht werden. Wie in dieser Arbeit für die rPsaDyP und die GDS(L)-Lipase gezeigt wurde, ist der Ascomycet *Trichoderma reesei* als Expressionsstamm für die heterologe Expression von Enzymen aus Basidiomyceten geeignet. Daneben wurde die funktionelle Expression verschiedener Pilzenzyme in Ascomyceten der Gattung *Aspergillus* beschrieben (Hülsdau 2007, Ruiz-Dueñas *et al.* 2006, Sugano *et al.* 2000). Der Einschluss von Proteinen in *inclusion bodies* ist häufig Teil eines Entgiftungsprozesses. Eine optimierte sekretorische Expression – auch in Koexpression mit einer Katalase – könnte die Toxizität, des durch eine aktive Arylalkoholoxidase produzierten  $H_2O_2$  erniedrigen und so diese Form des Zellschutzes verhindern. Neben der heterologen Expression in Ascomyceten könnte die Expression in einem anderen Basidiomyceten – wie *Coprinopsis cinerea* – oder eine homologe Expression einen Ansatz für eine rekombinante Produktion bieten. Wird dadurch die Bildung einer löslichen, aktiven Arylalkoholoxidase erreicht, könnte das getestete Zwei-Enzym-System weiterentwickelt werden und weitere Versuche zur Oxidation von technischem Lignin erfolgen.

Die codierende Sequenz der DyP-Typ Peroxidase wurde erfolgreich in *Trichoderma reesei* exprimiert, wobei das Zielenzym in den Kulturüberstand sekretiert wurde. Das Enzym wurde erfolgreich gereinigt und charakterisiert. Im Folgenden sollte das Enzym bzw. das Enzym mit gebundenem Substrat (Co-Kristallstruktur) kristallisiert werden. Dabei könnten die Substratbindetaschen, das Dimerisierungsinterface und der Mechanismus der Enzymkatalyse und -inhibition näher geklärt werden.  $\beta$ -Carotin wird durch die rPsaDyP auch ohne Zusatz von  $H_2O_2$  umgesetzt. Die Produkte dieser Umsetzung sowie der Mechanismus sollten weiter untersucht werden.

Im Verlauf der Arbeit wurde aus der rPsaDyP und der rückgefalteten Arylalkoholoxidase (AAO<sup>\*</sup>) ein Zwei-Enzym-System entwickelt. Bisher wurden die beiden Enzyme getrennt exprimiert und anschließend zusammen in einem System eingesetzt. Wird für die Arylalkoholoxidase ein geeignetes Expressionssystem gefunden, könnten beide Enzyme koexprimiert werden und durch die Verwendung entsprechender Promotoren in geeigneten Konzentrationsverhältnissen produziert werden. Bei einer solchen Koexpression beider Enzyme in einer Zelle könnte das Wasserstoffperoxid, welches als Nebenprodukt der AAO-vermittelten Reaktion entsteht, als Cosubstrat für die DyP-Typ Peroxidase zur Verfügung stehen. Weiterhin könnten beide Enzyme gemeinsam in entsprechenden Verhältnissen beispielsweise an Latexmatrizen immobilisiert werden und so die Einsatzmöglichkeiten für biotechnologische Anwendungen verbessert werden. Außerdem könnte das Zwei-Enzym-System hinsichtlich des Aufschlusses von Lignocellulosen

optimiert werden, beispielsweise durch die Koexpression mit einer Peroxidase, die eine höhere katalytische Effizienz gegenüber Adlerol zeigt.

Die klonierte Lipase wurde aufgrund bioinformatischer Untersuchungen der Familie der GDS(L)-Lipasen zugeordnet. Mittels Peptiddaten – die bei Sekretomanalysen gewonnen wurden – wurde gezeigt, dass dieses Enzym sekretiert wird. Mit der Lipase im Kulturüberstand wurden bereits erste Untersuchungen hinsichtlich der Substratspezifität durchgeführt, die in weitergehenden Arbeiten mit dem reinen Enzym fortgesetzt werden sollten. Mit Hilfe dieser Untersuchungen kann die Rolle des Enzyms im Sekretom genauer beschrieben werden. Mutagenese-Experimente sowie eine Kristallisierung des rekombinanten Enzyms bzw. des Enzyms mit gebundenem Substrat und anschließender Röntgenstrukturanalyse könnte dazu beitragen, die katalytischen Aminosäurereste zu identifizieren und weitere Informationen über den Reaktionsmechanismus zu gewinnen. Nach der Charakterisierung kann die GDS(L)-Lipase ein weiterer Baustein für die Entwicklung einer biotechnologischen Toolbox für den Aufschluss von Lignocellulosen werden. Verschiedene Lipasen werden bereits bei der Herstellung von Käse verwendet, daher sollte überprüft werden, ob diese Lipase – aus einem Speisepilz – als Alternative für beispielsweise tierische Lipasen in diesem biotechnologischen Prozess verwendet werden kann.

Die Feruloylsterase wurde, ebenso wie die Arylalkoholoxidase, in *Hansenula polymorpha* heterolog exprimiert. Die Produktion der rekombinanten Esterase führte zu unlöslichem Protein, das durch denaturierende Reinigung und Rückfaltung nicht in die native Konformation überführt werden konnte. Mit Hilfe des iFold-Systems™ könnten in weiteren Arbeiten geeignete Rückfaltungsbedingungen für dieses Enzym gefunden werden. Andererseits könnten sich für die heterologe Expression der Esterase aus *Pleurotus sapidus* ebenfalls Ascomyceten als Expressionsorganismen als sinnvoll erweisen.

## 6 Literatur

- Accerbi M, Schmidt SA, De Paoli E, Park S, Jeong DH, Green PJ** (2010) Methods for isolation of total RNA to recover miRNAs and other small RNAs from diverse species. In: *Plant MicroRNAs*. Springer, Berlin, S. 31–50
- Adak S, Bandyopadhyay U, Bandyopadhyay D, Banerjee RK** (1998) Mechanism of horseradish peroxidase catalyzed epinephrine oxidation: obligatory role of endogenous  $O_2^-$  and  $H_2O_2$ . *Biochemistry* 37:16922–16933
- Ahmad M, Roberts JN, Hardiman EM, Singh R, Eltis LD, Bugg TDH** (2011) Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. *Biochemistry* 50:5096–5107
- Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, Shaw JF** (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res* 43:534–552
- Alfaro M, Oguiza JA, Ramírez L, Pisabarro AG** (2014) Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *J Proteomics* 102:28–43
- Alibolandi M, Mirzahoseini H** (2011) Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochem Res Int* 2011:631607–631612
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Anchel M** (1952) Chemical studies with pleuromutilin. *J Biol Chem* 199:133–139
- Antson AA, Dodson EJ, Dodson GG** (1996) Circular assemblies. *Curr Opin Struct Biol* 6:142–150
- Arnao MB, Acosta M, del Río JA, García-Cánovas F** (1990a) Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochim Biophys Acta* 1038:85–89
- Arnao MB, Acosta M, del Río JA, Varón R, García-Cánovas F** (1990b) A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1041:43–47
- Arpigny JL, Jaeger KE** (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343:177–183
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, Stockinger H** (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* 40:597–603

- Asada Y, Watanabe A, Ohtsu Y, Kuwahara M** (1995) Purification and characterization of an aryl-alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biosci Biotech Biochem* 59:1339–1341
- Ayala M, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R** (2008) Fungal enzymes for environmental purposes, a molecular biology challenge. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15:172–180
- Bang JK, Follér A, Buttazzoni M** (2009) Industrial biotechnology: more than green fuel in a dirty economy? Exploring the transformational potential of industrial biotechnology on the way to a green economy. WWF, Denmark
- Basu A, Li X, Leong SSJ** (2011) Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:241–251
- Baynton KJ, Bewtra JK, Biswas N, Taylor KE** (1994) Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Biochim Biophys Acta* 1206:272–278
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H** (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 10:189
- Ben Aziz A, Grossman S, Ascarelli I, Budowski P** (1971) Carotene-bleaching activities of lip-oxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method. *Phytochemistry* 10:1445–1452
- Bender J, Rydzewski K, Broich M, Schunder E, Heuner K, Flieger A** (2009) Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* represents a novel lipase family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis. *J Biol Chem* 284:27185–27194
- Bendtsen JD, Nielsen H, Heijne G von, Brunak S** (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783–795
- Berger RG** (2009) Biotechnology of flavours—the next generation. *Biotechnol Lett* 31:1651–1659
- Bergkessel M, Guthrie C** (2013) Colony PCR. *Methods Enzymol* 529:299–309
- Bertani G** (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62:293–300
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T** (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*. Online verfügbar unter DOI: 10.1093/nar/gku340
- Blanchette RA** (1991) Delignification by wood-decay fungi. *Annu Rev Phytopathol* 29:381–403
- Böckle B, Martínez MJ, Guillén F, Martínez ÁT** (1999) Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Appl Environ Microbiol* 65:923–928
- Boer HA de, Comstock LJ, Vasser M** (1983) The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:21–25

- Bolanos-Garcia VM, Davies OR** (2006) Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1760:1304–1313
- Borson ND, Salo WL, Drewes LR** (1992) A lock-docking oligo(dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *PCR Methods Appl* 2:144–148
- Bouws H** (2007) Molekularbiologische Charakterisierung neuartiger Enzyme aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus*. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Bouws H, Wattenberg A, Zorn H** (2008) Fungal secretomes – nature's toolbox for white biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:381–388
- Bowden GA, Paredes AM, Georgiou G** (1991) Structure and Morphology of Protein Inclusion Bodies in *Escherichia Coli*. *Nat Biotechnol* 9:725–730
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Braun M, Teichert O, Zweck A** (2006) Biokatalyse in der industriellen Produktion. VDI e.V., Technik und Wissenschaft
- Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR** (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* 20:1004–6, 1008–10
- Brumlik MJ, Buckley JT** (1996) Identification of the catalytic triad of the lipase/acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol* 178:2060–2064
- Buchner J, Schmidt M, Fuchs M, Jaenicke R, Rudolph R, Schmid FX, Kiefhaber T** (1991) GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation. *Biochemistry* 30:1586–1591
- Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA** (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101:119–122
- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez ÁT** (1999) Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J Biol Chem* 274:10324–10330
- Caruso C, Chilosi G, Leonardi L, Bertini L, Magro P, Buonocore V, Caporale C** (2001) A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochemistry* 58:743–750
- Chenchik A, Zhu YY, Diatchenko L, Li R, Hill J, Siebert PD** (1998) Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In: **Siebert PD, Larrick JW** (Hrsg.) *Gene cloning and analysis by RT-PCR*. Bio Techniques Books, Natick, MA, S. 305–319
- Chepyshko H, Lai CP, Huang LM, Liu JH, Shaw JF** (2012) Multifunctionality and diversity of GDSL esterase/lipase gene family in rice (*Oryza sativa* L. *japonica*) genome: new insights from bioinformatics analysis. *BMC Genomics* 13:309–327
- Childs RE, Bardsley WG** (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J* 145:93–103

- Chow MK, Amin AA, Fulton KF, Fernando T, Kamau L, Batty C, Louca M, Ho S, Whisstock JC, Bottomley SP et al.** (2006) The REFOLD database: a tool for the optimization of protein expression and refolding. *Nucleic Acids Res* 34:D207–D212
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH** (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2172–2175
- Chung N, Aust SD** (1995) Inactivation of lignin peroxidase by hydrogen peroxide during the oxidation of phenols. *Arch Biochem Biophys* 316:851–855
- Clark JM** (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 16:9677–9686
- Clauss K, Baumert A, Nitz M, Milkowski C, Strack D** (2008) Role of a GDSL lipase-like protein as sinapine esterase in *Brassicaceae*. *Plant J* 53:802–813
- Cole PA** (1996) Chaperone-assisted protein expression. *Structure* 4:239–242
- Collins PJ, O'Brien MM, Dobson AD** (1999) Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel extracellular peroxidase from *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 65:1343–1347
- Colpa DI, Fraaije MW, van Bloois E** (2014) DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:1–7
- Conesa A, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ** (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J Biotechnol* 93:143–158
- Connaris H, Chaudhuri JB, Danson MJ, Hough DW** (1999) Expression, reactivation, and purification of enzymes from *Haloferax volcanii* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 64:38–45
- Costa GL, Weiner MP** (1994) Polishing with T4 or *Pfu* polymerase increases the efficiency of cloning of PCR fragments. *Nucleic Acids Res* 22:2423
- Creighton TE, Chasman DI** (1997) Protein structure: a practical approach. **Creighton TE** (Hrsg.) IRL press Oxford
- Croissant A, Kang E, Campbell R, Bastian E, Drake M** (2009) The effect of bleaching agent on the flavor of liquid whey and whey protein concentrate. *J Dairy Sci* 92:5917–5927
- Dalmau E, Montesinos JL, Lotti M, Casas C** (2000) Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb Technol* 26:657–663
- Dalrymple BP, Cybinski DH, Layton I, McSweeney CS, Xue GP, Swadling YJ, Lowry JB** (1997) Three *Neocallimastix patriciarum* esterases associated with the degradation of complex polysaccharides are members of a new family of hydrolases. *Microbiology* 143 ( Pt 8):2605–2614
- Daly R, Hearn MT** (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* 18:119–138
- Davila-Vazquez G, Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R** (2005) Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microb Technol* 36:223–231
- Deikus G, Bechhofer DH** (2007) Initiation of decay of *Bacillus subtilis* trp leader RNA. *J Biol Chem* 282:20238–20244

- Dequaire M, Limoges B, Moiroux J, Savéant JM** (2002) Mediated electrochemistry of horseradish peroxidase. Catalysis and inhibition. *J Am Chem Soc* 124:240–253
- Di Rossetti Valdabero D** (2009) The world in 2025: rising Asia and socio-ecological transition. EUR. Office for official publications of the european communities, Luxembourg
- Diercks R, Arndt JD, Freyer S, Geier R, Machhammer O, Schwartz J, Volland M** (2008) Raw material changes in the chemical industry. *Chemical engineering & technology* 31:631–637
- Dill KA, Ozkan SB, Shell MS, Weikl TR** (2008) The protein folding problem. *Annu Rev Biophys* 37:289–316
- Ding J, Yu T, Liang L, Xie Z, Yang Y, Zhou J, Xu B, Li J, Huang Z** (2014) Biochemical characterization of a GDSL-motif esterase from *Bacillus* sp. K91 with a new putative catalytic mechanism. *J Microbiol Biotechnol* 24:1551–1558
- Dunford H** (1991) Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. In: **Everse J, Grisham MB, Everse KE** (Hrsg.) *Peroxidases in Chemistry and Biology*, Bd. 2. CRC Press, Boca Raton, FL, S. 1–24
- Dyballa N, Metzger S** (2009) Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J Vis Exp* 30:1431
- Ebermann R, Elmadfa I** (2001) *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*. 2., korr. und erw. Aufl. Springer, Wien
- Eggert C, Temp U, Eriksson KE** (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62:1151–1158
- Eliseev R, Alexandrov A, Gunter T** (2004) High-yield expression and purification of p18 form of Bax as an MBP-fusion protein. *Protein Expr Purif* 35:206–209
- Elliott DC** (2004) Biomass, chemicals from. In: **Cleveland CJ** (Hrsg.) *Encyclopedia of energy*, Bd. 1. Elsevier Acad. Press, Oxford, S. 163–174
- Eriksson KEL, Blanchette RA, Ander P** (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer, Berlin u.a.
- Erjavec J, Kos J, Ravnikar M, Dreo T, Sabotič J** (2012) Proteins of higher fungi—from forest to application. *Trends Biotechnol* 30:259–273
- Faraco V, Piscitelli A, Sannia G, Giardina P** (2007) Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus*. *World J Microbiol Biotechnol* 23:889–893
- Fazary AE, Ju YH** (2007) Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. *Acta Biochim Biophys Sin* 39:811–828
- Fenton WA, Weissman JS, Horwich AL** (1996) Putting a lid on protein folding: structure and function of the co-chaperonin, GroES. *Chem Biol* 3:157–161
- Fernández IS, Ruíz-Dueñas FJ, Santillana E, Ferreira P, Martínez MJ, Martínez ÁT, Romero, A** (2009) Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65:1196–1205

- Ferreira P, Medina M, Guillén F, Martínez M, Van Berkel W, Martínez ÁT** (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem J* 389:731–738
- Ferreira P, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, van Berkel WJH, Martínez ÁT** (2006) Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing ligninolytic enzyme. *FEBS J* 273:4878–4888
- Ferreira P, Hernández-Ortega A, Herguedas B, Martínez ÁT, Medina M** (2009) Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: a mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and solvent isotope effects with two alcohol substrates. *J Biol Chem* 284:24840–24847
- Ferreira P, Hernández-Ortega A, Herguedas B, Rencoret J, Gutiérrez A, Martínez M, Jiménez-Barbero J, Medina M** (2010) Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem J* 425:585–593
- Ferri SR, Meighen EA** (1994) An essential histidine residue required for fatty acylation and acyl transfer by myristoyltransferase from luminescent bacteria. *J Biol Chem* 269:6683–6688
- Festel G, Knöll J, Götz H, Zinke H** (2004) Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie. *Chem Ing Tech* 76:307–312
- Fink AL** (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des* 3:R9–R23
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer ELL, Tate J, Punta M** (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42:D222–D230
- Frazzetto G** (2003) White biotechnology. *EMBO Rep* 4:835–837
- Frey KG, Herrera-Galeano JE, Redden CL, Luu TV, Servetas SL, Mateczun AJ, Mokashi VP, Bishop-Lilly KA** (2014) Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. *BMC Genomics* 15:96–109
- Fu D, Mazza G, Tamaki Y** (2010) Lignin extraction from straw by ionic liquids and enzymatic hydrolysis of the cellulosic residues. *J Agric Food Chem* 58:2915–2922
- Gamauf C, Metz B, Seiboth B** (2007) Degradation of plant cell wall polymers by fungi. In: **Kubicek C, Druzhinina I** (Hrsg.) *The Mycota*. Bd. 4: Environmental and microbial relationships, 2. edn. Springer, Berlin, S. 325–339
- Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodriguez-Carmona E, Baumann K, Giuliani M, Parrilli E, Branduardi P, Lang C, Porro D, Ferrer P, Tutino M, Mattanovich D, Villaverde A** (2008) Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb Cell Fact* 7:11
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins M, Appel R, Bairoch A** (2005) Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: **Walker J** (Hrsg.) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, S. 571–607
- Gavrilescu M, Chisti Y** (2005) Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv* 23:471–499

- Gazarian IG, Lagrimini LM, George SJ, Thorneley RN** (1996) Anionic tobacco peroxidase is active at extremely low pH: veratryl alcohol oxidation with a pH optimum of 1.8. *Biochem J* 320:369–372
- Gazarian IG, Lagrimini LM** (1998) Anaerobic stopped-flow studies of indole-3-acetic acid oxidation by dioxygen catalysed by horseradish C and anionic tobacco peroxidase at neutral pH: catalase effect. *Biophys Chem* 72:231–237
- Gekko K, Timasheff SN** (1981) Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* 20:4667–4676
- Gellissen G** (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:741–750
- Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, Cregg JM, Berardi E, Veenhuis M, Klei I van der** (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* —a comparison. *FEMS Yeast Res* 5:1079–1096. DOI: 10.1016/j.femsyr.2005.06.004
- Gerard GF, Fox DK, Nathan M, D'Alessio JM** (1997) Reverse transcriptase. *Mol Biotechnol* 8:61–77
- Gerngross TU, Slater SC** (2000) How green are green plastics? *Sci Am* 283:36–41
- Ghosh M, Mukherjee R, Nandi B** (1998) Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass. *Acta Biotechnol* 18:243–254
- Giardina P, Palmieri G, Fontanella B, Riviaccio V, Sannia G** (2000) Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch Biochem Biophys* 376:171–179
- Gibrat JF, Madej T, Bryant SH** (1996) Surprising similarities in structure comparison. *Curr Opin Struct Biol* 6:377–385
- Gilkes NR, Henrissat B, Kilburn DG, Miller Jr R, Warren RA** (1991) Domains in microbial  $\beta$ -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol Rev* 55:303–315
- Gil-Rodríguez P, Ferreira-Batista C, Vázquez-Duhalt R, Valderrama B** (2008) A novel heme peroxidase from *Raphanus sativus* intrinsically resistant to hydrogen peroxide. *Eng Life Sci* 8:286–296
- Glenn JK, Gold MH** (1985) Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 242:329–341
- Godfrey T, West S** (1996) *Industrial enzymology*. Stockton Press, New York
- Goh LL, Loke P, Singh M, Sim TS** (2003) Soluble expression of a functionally active *Plasmodium falciparum* falcipain-2 fused to maltose-binding protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 32:194–201
- Gomori G, Colowick S, Kaplan N** (1955) Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods Enzymol* 1:138–148

- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R** (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 38:W695–W699
- Gouka RJ, Punt PJ, van den Hondel CA** (1997) Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:1–11
- Grigoriev IV, Nordberg H, Shabalov I, Aerts A, Cantor M, Goodstein D, Kuo A, Minovitsky S, Nikitin R, Ohm RA, Otilar R, Poliakov A, Ratnere I, Riley R, Smirnova T, Rokhsar D, Dubchak I** (2012) The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Res* 40:D26–D32
- Gröbe G, Ullrich R, Pecyna MJ, Kapturska D, Friedrich S, Hofrichter M, Scheibner K** (2011) High-yield production of aromatic peroxygenase by the agaric fungus *Marasmius rotula*. *AMB Express* 1:31
- Grochulski P, Li Y, Schrag JD, Bouthillier F, Smith P, Harrison D, Rubin B, Cygler M** (1993) Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem* 268:12843–12847
- Grubb M** (2001) Who's afraid of atmospheric stabilisation? Making the link between energy resources and climate change. *Energy Policy* 29:837–845
- Gu L, Lajoie C, Kelly C** (2003) Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog* 19:1403–1409
- Guallar V, Olsen B** (2006) The role of the heme propionates in heme biochemistry. *J Inorg Biochem* 100:755–760
- Guex N, Peitsch MC, Schwede T** (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis* 30:S162–S173
- Guillén F, Martínez MJ, Martínez ÁT** (1990) Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:465–469
- Guillén F, Martínez ÁT, Martínez MJ** (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 209:603–611
- Guillén F, Evans CS** (1994) Anisaldehyde and Veratraldehyde Acting as Redox Cycling Agents for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production by *Pleurotus eryngii*. *Appl Environ Microbiol* 60:2811–2817
- Guillén F, Martínez MJ, Muñoz C, Martínez ÁT** (1997) Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch Biochem Biophys* 339:190–199
- Guillén F, Gómez-Toribio V, Martínez MJ, Martínez ÁT** (2000) Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl-alcohol oxidase. *Arch Biochem Biophys* 383:142–147
- Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A** (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8:195–204
- Gupta R, Jung E, Brunak S** (2004) Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *In preparation*

- Haas T, Skerra A** (2008) Weiße Biotechnologie - Innovation für die Chemieindustrie. *Nachr Chem* 56:1028–1031
- Hamid M, Khalil-ur-Rehman** (2009) Potential applications of peroxidases. *Food Chem* 115:1177–1186
- Hasunuma T, Okazaki F, Okai N, Hara KY, Ishii J, Kondo A** (2013) A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresour Technol* 135:513–522
- Hefti MH, Vervoort J, van Berkel WJ** (2003) Deflavination and reconstitution of flavoproteins. *Eur J Biochem* 270:4227–4242
- Heinfling A, Martínez MJ, Martínez ÁT, Bergbauer M, Szewzyk U** (1998a) Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl Environ Microbiol* 64:2788–2793
- Heinfling A, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Bergbauer M, Szewzyk U, Martínez ÁT** (1998b) A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett* 428:141–146
- Heinimö J, Junginger M** (2009) Production and trading of biomass for energy – an overview of the global status. *Biomass Bioenergy* 33:1310–1320
- Henne KR, Kunze KL, Zheng YM, Christmas P, Soberman RJ, Rettie AE** (2001) Covalent linkage of prosthetic heme to CYP4 family P450 enzymes. *Biochemistry* 40:12925–12931
- Hernández-Ortega A, Borrelli K, Ferreira P, Medina M, Martínez ÁT, Guallar V** (2011a) Substrate diffusion and oxidation in GMC oxidoreductases: an experimental and computational study on fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem J* 436:341–350
- Hernández-Ortega A, Lucas F, Ferreira P, Medina M, Guallar V, Martínez ÁT** (2011b) Modulating O<sub>2</sub> reactivity in a fungal flavoenzyme: Involvement of aryl-alcohol oxidase PHE-501 contiguous to catalytic histidine. *J Biol Chem* 286:41105–41114
- Hernández-Ortega A, Ferreira P, Martínez ÁT** (2012a) Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1395–1410
- Hernández-Ortega A, Ferreira P, Merino P, Medina M, Guallar V, Martínez ÁT** (2012b) Stereoselective hydride transfer by aryl-alcohol oxidase, a member of the GMC superfamily. *ChemBioChem* 13:427–435
- Hernández-Ortega A, Lucas F, Ferreira P, Medina M, Guallar V, Martínez ÁT** (2012c) Role of active site histidines in the two half-reactions of the aryl-alcohol oxidase catalytic cycle. *Biochemistry* 51:6595–6608
- Herrera S** (2004) Industrial biotechnology — a chance at redemption. *Nat Biotechnol* 22:671–675
- Higuchi T** (1997) *Biochemistry and molecular biology of wood*. Springer Verlag, Berlin
- Hill TL** (1977) Theoretical study of the effect of enzyme-enzyme interactions on steady-state enzyme kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3632–3636

- Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD** (2007) Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315:804–807
- Hoffmann A, Bukau B, Kramer G** (2010) Structure and function of the molecular chaperone trigger factor. *Biochim Biophys Acta* 1803:650–661
- Hofrichter M, Ziegenhagen D, Vares T, Friedrich M, Jäger MG, Fritsche W, Hatakka A** (1998) Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 434:362–366
- Hofrichter M** (2001) Lignin, humic substances and coal. In: **Steinbüchel A** (Hrsg.) *Biopolymere*. Wiley-Blackwell, Weinheim, New York, online verfügbar unter DOI: 10.1002/3527600035
- Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T** (2010) New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:871–897
- Horton P, Nakai K** (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 5:147–152
- Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K** (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 35:W585–W587
- Hülsdau B** (2007) Oxidativer Abbau von Carotinoiden durch Pilzenzyme. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Husain Q** (2006) Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. *Crit Rev Biotechnol* 26:201–221
- Ichinose H, Wariishi H, Tanaka H** (2002) Identification and heterologous expression of the cytochrome P450 oxidoreductase from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:658–664
- Idicula-Thomas S, Balaji PV** (2007) Protein aggregation: A perspective from amyloid and inclusion-body formation. *Curr Sci* 92:758–67
- Iiyama K, Lam TBT, Stone BA** (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol* 104:315–320
- Irzykowska L, Waśkiewicz A** (2014) Hansenula: Biology and Application. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2nd edn. Elsevier BV, S. 121–124
- Jacobs PP, Callewaert N** (2009) N-glycosylation engineering of biopharmaceutical expression systems. *Curr Mol Med* 9:774–800
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT** (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53:315–351
- Jhamb K, Sahoo DK** (2012) Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. *Bioresour Technol* 123:135–143

- Johjima T, Ohkuma M, Kudo T** (2003) Isolation and cDNA cloning of novel hydrogen peroxide-dependent phenol oxidase from the basidiomycete *Termitomyces albuminosus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:220–225
- Jong E de, Beuling EE, Zwan RP van der, Bont JA de** (1990) Degradation of veratryl alcohol by *Penicillium simplicissimum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 34:420–425
- Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S** (2005) Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15:153–164
- Jungbauer A, Kaar W** (2007) Current status of technical protein refolding. *J Biotechnol* 128:587–596
- Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C** (2002) Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc* 23:1511–1512
- Kang EJ, Campbell RE, Bastian E, Drake MA** (2010) Invited review: Annatto usage and bleaching in dairy foods. *J Dairy Sci* 93:3891–3901
- Kapust RB, Waugh DS** (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 8:1668–1674
- Kavanagh F, Hervey A, Robbins WJ** (1951) Antibiotic Substances From Basidiomycetes: VIII. *Pleurotus Multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus Passeckerianus* Pilat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 37:570–574
- Keim W** (2010) Petrochemicals: Raw material change from fossil to biomass? *Petrol Chem* 50:298–304
- Khosraneh M, Mahmoudi A, Rahimi H, Nazari K, Moosavi-Movahedi AA** (2007) Suicide-peroxide inactivation of microperoxidase-11: a kinetic study. *J Enzyme Inhib Med Chem* 22:677–684
- Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler HH, Buchner J** (1991) Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Nat Biotechnol* 9:825–829
- Kieper J, Lauber C, Gimadutdinow O, Urbańska A, Cymerman I, Ghosh M, Szczesny B, Meiss G** (2010) Production and characterization of recombinant protein preparations of Endonuclease G-homologs from yeast, *C. elegans* and humans. *Protein Expr Purif* 73:99–106
- Kikuta Y, Ueda H, Takahashi M, Mitsumori T, Yamada G, Sakamori K, Takeda K, Furutani S, Nakayama K, Katsuda Y, Hatanaka A, Matsuda K** (2012) Identification and characterization of a GDSL lipase-like protein that catalyzes the ester-forming reaction for pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifolium* - a new target for plant protection. *Plant J* 71:183–193
- Kim KJ, Lim JH, Kim MJ, Kim T, Chung HM, Paek KH** (2008) GDSL-lipase1 (CaGL1) contributes to wound stress resistance by modulation of CaPR-4 expression in hot pepper. *Biochem Biophys Res Commun* 374:693–698
- Kim SJ, Ishikawa K, Hirai M, Shoda M** (1995) Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. *J Ferment Bioeng* 79:601–607

- Kim SJ, Shoda M** (1999a) Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. *Biotechnol Bioeng* 62:114–119
- (1999b) Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Appl Environ Microbiol* 65:1029–1035
- Kim SJ, Suzuki N, Uematsu Y, Shoda M** (2001) Characterization of aryl-alcohol oxidase produced by dye-decolorizing fungus, *Geotrichum candidum* Dec1. *J Biosci Bioeng* 91:166–172
- Kirk TK, Farrell RL** (1987) Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 41:465–501
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC** (2002) Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* 13:345–351
- Kirk P, Ainsworth GC, Bisby GR** (2008) *Ainsworth & Bisby’s dictionary of the fungi*. 10. Aufl. CABI, Wallingford
- Koduri RS, Tien M** (1995) Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase. Role of veratryl alcohol. *J Biol Chem* 270:22254–22258
- Kondou Y, Nakazawa M, Kawashima M, Ichikawa T, Yoshizumi T, Suzuki K, Ishikawa A, Koshi T, Matsui R, Muto S, Matsui M** (2008) Retarded growth of embryo 1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth. *Plant Physiol* 147:1924–1935
- Kotik M, Kočanová M, Marešová H, Kyslík P** (2004) High-level expression of a fungal pyranose oxidase in high cell-density fed-batch cultivations of *Escherichia coli* using lactose as inducer. *Protein Expr Purif* 36:61–69
- Kram BW, Bainbridge EA, Perera MADN, Carter C** (2008) Identification, cloning and characterization of a GDSL lipase secreted into the nectar of *Jacaranda mimosifolia*. *Plant Mol Biol* 68:173–183
- Kreil G** (1981) Transfer of proteins across membranes. *Annu Rev Biochem* 50:317–348
- Kroon PA, Williamson G, Fish NM, Archer DB, Belshaw NJ** (2000) A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *Eur J Biochem* 267:6740–6752
- Krügner S, Zelena K, Zorn H, Nimtz M, Berger RG** (2009) Heterologous expression of an extracellular lipase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *J Mol Catal B: Enzym* 57:16–21
- Kumar VV, Rapheal VS** (2011) Induction and purification by three-phase partitioning of aryl alcohol oxidase (AAO) from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Biochem Biotechnol* 163:423–432
- Kwon SJ, Jin HC, Lee S, Nam MH, Chung JH, Kwon SI, Ryu CM, Park OK** (2009) GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* 58:235–245
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Langhoff S** (2002) Carotinoid abbauende Enzymaktivitäten aus Mikroorganismen. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007)** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948
- Laskowski RA (2009)** PDBsum new things. *Nucleic Acids Res* 37:D355–D359
- Leonhardt RH, Plagemann I, Linke D, Zelena K, Berger RG (2013)** Orthologous lipoxygenases of *Pleurotus* spp. – A comparison of substrate specificity and sequence homology. *J Mol Catal B: Enzym* 97:189–195
- Lesage-Meessen L, Lomascolo A, Bonnin E, Thibault JF, Buleon A, Roller M, Asther M, Record E, Ceccaldi BC, Asther M (2002)** A biotechnological process involving filamentous fungi to produce natural crystalline vanillin from maize bran. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:141–153
- Levisson M, van der Oost J, Kengen SWM (2007)** Characterization and structural modeling of a new type of thermostable esterase from *Thermotoga maritima*. *FEBS J* 274:2832–2842
- Li K, Helm RF (1995)** Synthesis and rearrangement reactions of ester-linked lignin-carbohydrate model compounds. *J Agric Food Chem* 43:2098–2103
- Liers C, Bobeth C, Pecyna M, Ullrich R, Hofrichter M (2010)** DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1869–1879
- Liers C, Aranda E, Strittmatter E, Piontek K, Plattner DA, Zorn H, Ullrich R, Hofrichter M (2013a)** Phenol oxidation by DyP-type peroxidases in comparison to fungal and plant peroxidases. *J Mol Catal B: Enzym. In press* DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.09.025
- Liers C, Pecyna MJ, Kellner H, Worrich A, Zorn H, Steffen KT, Hofrichter M, Ullrich R (2013b)** Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5839–5849
- Liese A, Seelbach K, Wandrey C, Hrsg. (2006)** Industrial biotransformations. John Wiley & Sons
- Lilie H, Schwarz E, Rudolph R (1998)** Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* 9:497–501
- Lin WL, Felberg RS, De Bernardez Clark E (1993)** Kinetics of cell growth and heterologous glucoamylase production in recombinant *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol Bioeng* 41:273–279
- Linde D, Pogni R, Cañellas M, Lucas F, Guallar V, Baratto MC, Sinicropi A, Sáez-Jiménez V, Coscolín C, Romero A, Medrano FJ, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez ÁT (2015a)** Catalytic surface radical in dye-decolorizing peroxidase: a computational, spectroscopic and site-directed mutagenesis study. *Biochem J* 466:253–262
- Linde D, Ruiz-Dueñas FJ, Fernández-Fueyo E, Guallar V, Hammel KE, Pogni R, Martínez AT (2015b)** Basidiomycete DyPs: Genomic diversity, structural-functional aspects, reaction mechanism and environmental significance. *Arch Biochem Biophys.* online verfügbar unter DOI: 10.1016/j.abb.2015.01.018
- Linke D, Zorn H, Gerken B, Parlar H, Berger RG (2005a)** Foam fractionation of exo-lipases from a growing fungus (*Pleurotus sapidus*). *Lipids* 40:323–327

- Linke D, Bouws H, Peters T, Nimitz M, Berger RG, Zorn H** (2005b) Laccases of *Pleurotus sapidus*: characterization and cloning. *J Agric Food Chem* 53:9498–9505
- Linke D, Matthes R, Nimitz M, Zorn H, Bunzel M, Berger RG** (2013) An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:7241–7251
- Lis H, Sharon N** (1993) Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 218:1–27
- Listiyani M, Campbell R, Miracle R, Barbano D, Gerard P, Drake M** (2012) Effect of temperature and bleaching agent on bleaching of liquid Cheddar whey. *J Dairy Sci* 95:36–49
- Liu YY, Xu JH, Hu Y** (2000) Enhancing effect of Tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *J Mol Catal B: Enzym* 10:523–529
- Longo MA, Sanromán MA** (2006) Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol Biotechnol* 44:335–353
- Lundell TK, Mäkelä MR, Hildeén K** (2010) Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - ecological, functional and phylogenetic review. *J Basic Microbiol* 50:5–20
- Mackenzie CR, Bilous D** (1988) Ferulic acid esterase activity from *Schizophyllum commune*. *Appl Environ Microbiol* 54:1170–1173
- Mai C, Kües U, Militz H** (2004) Biotechnology in the wood industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:477–494
- Malherbe S, Cloete TE** (2002) Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Rev Environ Sci Biotechnol* 1:105–114
- Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Lu S, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Bryant SH** (2013) CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res* 41:D348–D352
- Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS** (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* 19:1154
- Marco A de, Marco V de** (2004) Bacteria co-transformed with recombinant proteins and chaperones cloned in independent plasmids are suitable for expression tuning. *J Biotechnol* 109:45–52
- Martin H, Ruck C, Schmidt M, Sell S, Beutner S, Mayer B, Walsh R** (1999) Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. *Pure Appl Chem* 71:2253–2262
- Martínez ÁT, Camarero S, Guillén F, Gutiérrez A, Muñoz C, Varela E, Martínez MJ, Barrasa J, Ruel K, Pelayo J** (1994) Progress in biopulping of non-woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol Rev* 13:265–273
- Martínez ÁT** (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb Technol* 30:425–444

- Marzullo L, Cannio R, Giardina P, Santini MT, Sannia G** (1995) Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J Biol Chem* 270:3823–3827
- Mata G, Savoie JM** (1998) Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World J Microbiol Biotechnol* 14:513–519
- McDonnell MW, Simon MN, Studier FW** (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* 110:119–146
- McDonough F, Hargrove R, Tittler R** (1968) Decolorization of annatto in Cheddar cheese whey. *J Dairy Sci* 51:471–472
- McEldoon JP, Pokora AR, Dordick JS** (1995) Lignin peroxidase-type activity of soybean peroxidase. *Enzyme Microb Technol* 17:359–365
- McIlvaine T** (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem* 49:183–186
- McKendry P** (2002) Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour Technol* 83:37–46
- McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP, Lopez R** (2013) Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 41:W597–W600
- Mendonça Maciel MJ, Castro e Silva A, Telles Ribeiro HC** (2010) Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. *Electron J Biotechnol* 13:1–13
- Menon V, Rao M** (2012) Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog Energ Combust* 38:522–550
- Mester T, Field JA** (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera species* strain BOS55 in the absence of manganese. *J Biol Chem* 273:15412–15417
- Middelberg APJ** (2002) Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 20:437–443
- Mølgaard A, Kauppinen S, Larsen S** (2000) Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure* 8:373–383
- Morgenstern I, Klopman S, Hibbett DS** (2008) Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the Agaricomycetes. *J Mol Evol* 66:243–257
- Mujacic M, Cooper KW, Baneyx F** (1999) Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene* 238:325–332
- Müller E, Löffler W** (1992) Mykologie : Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner. 5., durchges. Aufl. Thieme, Stuttgart u.a.
- Muñoz C, Guillén F, Martínez ÁT, Martínez MJ** (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Appl Environ Microbiol* 63:2166–2174

- Muralidharan M, Buss K, Larrimore KE, Segerson NA, Kannan L, Mor TS** (2013) The *Arabidopsis thaliana* ortholog of a purported maize cholinesterase gene encodes a GDSL-lipase. *Plant Mol Biol* 81:565–576
- Nakajima R, Yamazaki I** (1987) The mechanism of oxyperoxidase formation from ferryl peroxidase and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 262:2576–2581
- Nakane PK, Kawaoi A** (1974) Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* 22:1084–1091
- Narayan R** (2007) Rationale, drivers, standards, and technology for biobased materials. CRC Press-Taylor und Francis Group, Boca Raton, FL
- Nie G, Reading NS, Aust SD** (1999) Relative stability of recombinant versus native peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 365:328–334
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, Heijne G von** (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10:1–6
- Nini L, Sarda L, Comeau LC, Boitard E, Dubès JP, Chahinian H** (2001) Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. *Biochim Biophys Acta* 1534:34–44
- Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T** (2000) Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66:884–889
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J** (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302:205–217
- Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB** (2003) Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 31:3635–3641
- Oertel D** (2007) TAB-Arbeitsbericht Nr. 114: Industrielle stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe: Sachstandsbericht zum Monitoring „Nachwachsende Rohstoffe“. Büro für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag (TAB), Berlin
- Onken J** (1998) Biotechnologie lipophiler Substrate in wässrigen Systemen: Terpententransformationen durch Basidiomyceten als Modell. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T** (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4:2411–2423
- Palma C, Martínez ÁT, Lema JM, Martínez MJ** (2000) Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biotechnol* 77:235–245
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, La Rubia Td, Martínez J** (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int J Microbiol* 5:53–63
- Peters T** (2004) Extrazelluläre Enzyme aus Basidiomyceten. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Petersen JF, Kadziola A, Larsen S** (1994) Three-dimensional structure of a recombinant peroxidase from *Coprinus cinereus* at 2.6 Å resolution. *FEBS Lett* 339:291–296

- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H** (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–786
- Petterson EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE** (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612
- Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R** (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white-rot fungi and oxidation by *Corioloropsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl Environ Microbiol* 65:3805–3809
- Piontek K, Glumoff T, Winterhalter K** (1993) Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett* 315:119–124
- Pogni R, Baratto MC, Teutloff C, Giansanti S, Ruiz-Dueñas FJ, Choinowski T, Piontek K, Martínez ÁT, Lendzian F, Basosi R** (2006) A tryptophan neutral radical in the oxidized state of versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii*: a combined multifrequency EPR and density functional theory study. *J Biol Chem* 281:9517–9526
- Poulos TL, Freer ST, Alden RA, Xuong NH, Edwards SL, Hamlin RC, Kraut J** (1978) Crystallographic determination of the heme orientation and location of the cyanide binding site in yeast cytochrome c peroxidase. *J Biol Chem* 253:3730–3735
- Poulos TL, Edwards SL, Wariishi H, Gold MH** (1993) Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *J Biol Chem* 268:4429–4440
- Priefert H, Rabenhorst J, Steinbüchel A** (2001) Biotechnological production of vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:296–314
- Pühse M, Szweda RT, Ma Y, Jeworrek C, Winter R, Zorn H** (2009) *Marasmius scorodoni* extracellular dimeric peroxidase – exploring its temperature and pressure stability. *Biochim Biophys Acta* 1794:1091–1098
- Purdy RE, Kolattukudy PE** (1973) Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani f. pisi*: isolation and some properties of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* 159:61–69
- Qing G, Ma LC, Khorchid A, Swapna G, Mal TK, Takayama MM, Xia B, Phadtare S, Ke H, Acton, T** (2004) Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22:877–882
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R** (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 33:W116–W120
- Rajarithnam S, Shashirekha MN, Bano Z** (1998) Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: present and future strategies. *Crit Rev Biotechnol* 18:91–236
- Ralet MC, Faulds CB, Williamson G, Thibault JF** (1994) Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydr Res* 263:257–269

- Renganathan V, Gold MH** (1986) Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 25:1626–1631
- Roberto IC, Mussatto SI, Rodrigues RCLB** (2003) Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Ind Crops Prod* 17:171–176
- Rodríguez E, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R** (1999) Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr Microbiol* 38:27–32
- Rodríguez E, Nuero O, Guillén F, Martínez ÁT, Martínez MJ** (2004) Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol Biochem* 36:909–916
- Rolz C, De Leon R, De Arriola M** (1988) Solid substrate growth of white-rot fungi on coffee pulp. *Acta Biotechnol* 8:211–223
- Romero E, Ferreira P, Martínez ÁT, Martínez MJ** (2009) New oxidase from *Bjerkandera arthroconidial* anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochim Biophys Acta* 1794:689–697
- Rop O, Mlcek J, Jurikova T** (2009) Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr Rev* 67:624–631
- Rosazza JP, Huang Z, Dostal L, Volm T, Rousseau B** (1995) Review: biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *J Ind Microbiol* 15:457–471
- Rudolph AS, Crowe JH** (1985) Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 22:367–377
- Rudolph R, Lilie H** (1996) *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J* 10:49–56
- Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Martínez MJ, Martínez ÁT** (2006) *In vitro* activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme. *Protein Expr Purif* 45:191–199
- Ruiz-Dueñas FJ, Martínez ÁT** (2009) Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microb Biotechnol* 2:164–177
- Ruiz-Dueñas FJ, Pogni R, Morales M, Giansanti S, Mate MJ, Romero A, Martínez MJ, Basosi R, Martínez ÁT** (2009a) Protein radicals in fungal versatile peroxidase: catalytic tryptophan radical in both compound I and compound II and studies on W164Y, W164H, and W164S variants. *J Biol Chem* 284:7986–7994
- Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, García E, Miki Y, Martínez MJ, Martínez ÁT** (2009b) Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J Exp Bot* 60:441–452
- Ruiz-Dueñas FJ, Fernández E, Martínez MJ, Martínez ÁT** (2011) *Pleurotus ostreatus* heme peroxidases: an in silico analysis from the genome sequence to the enzyme molecular structure. *C R Biol* 334:795–805

- Rumbold K, Biely P, Mastihubová M, Gudelj M, Gübitz G, Robra KH, Prior BA** (2003) Purification and properties of a feruloyl esterase involved in lignocellulose degradation by *Aureobasidium pullulans*. *Appl Environ Microbiol* 69:5622–5626
- Ruttloff H**, Hrsg. (1994) Industrielle Enzyme. 2. neubearb. und aktualisierte Auflage. Behr, Hamburg
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487–491
- Salamov AA, Nishikawa T, Swindells MB** (1998) Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. *Bioinformatics* 14:384–390
- Salvachúa D, Prieto A, Martínez ÁT, Martínez MJ** (2013) Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Appl Environ Microbiol* 79:4316–4324
- Sambrook J, Russell D** (2006) The condensed protocols - from molecular cloning: a laboratory manual. **Inglis J** (Hrsg.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sánchez C** (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* 27:185–194
- Sannia G, Limongi P, Cocca E, Buonocore F, Nitti G, Giardina P** (1991) Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochim Biophys Acta* 1073:114–119
- Saparrat MCN, Guillén F, Arambarri AM, Martínez ÁT, Martínez MJ** (2002) Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl Environ Microbiol* 68:1534–1540
- Sarkanen KV, Ludwig CH**, Hrsg. (1971) Lignins: occurrence, formation, structure and reactions. Wiley-Interscience, New York
- Savitsky PA, Gazaryan IG, Tishkov VI, Lagrimini LM, Ruzgas T, Gorton L** (1999) Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochem J* 340 (Pt 3):579–583
- Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA** (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 233:1076–1078
- Scheibner M** (2006) Identifizierung und Charakterisierung carotinoidabbauender Enzyme aus Basidiomyceten. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Scheibner M, Hülsdau B, Zelena K, Nimtze M, Boer L, Berger R, Zorn H** (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodoni* degrade  $\beta$ -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1241–1250
- Schein CH** (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Nat Biotechnol* 7:1141–1149
- Schein CH** (1991) Optimizing protein folding to the native state in bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 2:746–750

- Schlieker C, Bukau B, Mogk A** (2002) Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol* 96:13–21
- Schomburg I, Chang A, Hofmann O, Ebeling C, Ehrentreich F, Schomburg D** (2002) BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information. *Trends Biochem Sci* 27:54–56
- Schrader J** (2007) Microbial Flavour Production. In: **Berger RG** (Hrsg.) *Flavours and Fragrances*. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 507–574
- Schrag JD, Li YG, Wu S, Cygler M** (1991) Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* 351:761–764
- Schultz CP** (2000) Illuminating folding intermediates. *Nat Struct Biol* 7:7–10
- Schüttmann I** (2011) Sekretomanalyse von *Pleurotus sapidus* zum effizienten Aufschluss von Lignocellulosen. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Schwarze FW, Engels J, Mattheck C** (2000) Fungal strategies of wood decay in trees. Springer, Berlin
- Scott GM, Akhtar M** (2005) Biotechnological applications of lignin-degrading fungi (white-rot fungi). In: *Biopolymers Online*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, online verfügbar unter DOI: 10.1002/3527600035.bpo11006
- Scotter M** (2009) The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Addit Contam Part A* 26:1123–1145
- Scotter MJ, Wilson LA, Appleton GP, Castle L** (1998) Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J Agric Food Chem* 46:1031–1038
- Scragg AH** (1997) The production of aromas by plant cell cultures. In: **Berger RG** (Hrsg.) *Biotechnology of aroma compounds. Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 239–263
- Serra S, Fuganti C, Brenna E** (2005) Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol* 23:193–198
- Shafiee S, Topal E** (2009) When will fossil fuel reserves be diminished? *Energy Policy* 37:181–189
- Shannon LM, Kay E, Lew JY** (1966) Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *J Biol Chem* 241:2166–2172
- Sharma SK, Kalra KL, Kocher GS** (2004) Fermentation of enzymatic hydrolysate of sunflower hulls for ethanol production and its scale-up. *Biomass Bioenergy* 27:399–402
- Shaw KL, Grimsley GR, Yakovlev GI, Makarov AA, Pace CN** (2001) The effect of net charge on the solubility, activity, and stability of ribonuclease Sa. *Protein Sci* 10:1206–1215
- Shen T** (2013) Biotechnologische Gewinnung von Cyathan-Diterpenoiden. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

- Shimokawa T, Hirai M, Shoda M, Sugano Y** (2008) Efficient dye decolorization and production of dye decolorizing enzymes by the basidiomycete *Thanatephorus cucumeris* Dec 1 in a liquid and solid hybrid culture. *J Biosci Bioeng* 106:481–487
- Shin K, Oh I, Kim C** (1997) Production and purification of Remazol brilliant blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 63:1744–1748
- Shirano Y, Shibata D** (1990) Low temperature cultivation of *Escherichia coli* carrying a rice lipoxygenase L-2 cDNA produces a soluble and active enzyme at a high level. *FEBS Lett* 271:128–130
- Shuman S** (1991) Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10104–10108  
— (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269:32678–32684
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG** (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539–545
- Sigrist CJA, Cerutti L, Hulo N, Gattiker A, Falquet L, Pagni M, Bairoch A, Bucher P** (2002) PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform* 3:265–274
- Sigrist CJA, de Castro E, Cerutti L, Cuče BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I** (2013) New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res* 41:D344–D347
- Singh SM, Panda AK** (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 99:303–310
- Smyth DR, Mrozkiewicz MK, McGrath WJ, Listwan P, Kobe B** (2003) Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Sci* 12:1313–1322
- Solá RJ, Rodríguez-Martínez JA, Griebenow K** (2007) Modulation of protein biophysical properties by chemical glycosylation: biochemical insights and biomedical implications. *Cell Mol Life Sci* 64:2133–2152
- Sonoda H, Kumada Y, Katsuda T, Yamaji H** (2010) Functional expression of single-chain Fv antibody in the cytoplasm of *Escherichia coli* by thioredoxin fusion and co-expression of molecular chaperones. *Protein Expr Purif* 70:248–253
- Sørensen HP, Mortensen KK** (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4:1
- Southern E** (1979) Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol* 68:152–176
- Southworth MW, Fuhrman JA, Robbins PW, Beauregard K, Perler FB** (1996) Gene cloning and production of active recombinant *Brugia malayi* microfilarial chitinase. *Gene* 177:55–58
- Spadiut O, Posch G, Ludwig R, Haltrich D, Peterbauer CK** (2010) Evaluation of different expression systems for the heterologous expression of pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor* in *E. coli*. *Microb Cell Fact* 9:14

- Sprecher E** (1959) Über die Guttation bei Pilzen. *Planta* 53:565–574
- Sprecher E, Hanssen HP** (1982) Influence of strain specificity and culture conditions on terpene production by fungi. *Planta Med* 44:41–43
- Stäudinger M, Deimling Ov, Grossarth C, Wienker T** (1973) Esterase. VIII. Histochemische, elektrophoretische und quantitative Untersuchungen zum Einfluß von Phenobarbital auf die Leberesterase der Maus. *Histochem Cell Biol* 34:107–116
- Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KTBG, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Lavery SB, Clausen H** (2013) Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J* 32:1478–1488
- Strittmatter E, Liers C, Ullrich R, Wachter S, Hofrichter M, Plattner DA, Piontek K** (2013a) First crystal structure of a fungal high-redox potential dye-decolorizing peroxidase: substrate interaction sites and long-range electron transfer. *J Biol Chem* 288:4095–4102
- Strittmatter E, Wachter S, Liers C, Ullrich R, Hofrichter M, Plattner DA, Piontek K** (2013b) Radical formation on a conserved tyrosine residue is crucial for DyP activity. *Arch Biochem Biophys* 537:161–167
- Suelter CH** (1990) *Experimentelle Enzymologie: Grundlagen für die Laborpraxis*. Fischer, Stuttgart
- Sugano Y, Sasaki K, Shoda M** (1999) cDNA cloning and genetic analysis of a novel decolorizing enzyme, peroxidase gene *dyp* from *Geotrichum candidum* Dec 1. *J Biosci Bioeng* 87:411–417
- Sugano Y, Nakano R, Sasaki K, Shoda M** (2000) Efficient heterologous expression in *Aspergillus oryzae* of a unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, of *Geotrichum candidum* Dec 1. *Appl Environ Microbiol* 66:1754–1758
- Sugano Y, Ishii Y, Shoda M** (2004) Role of H164 in a unique dye-decolorizing heme peroxidase DyP. *Biochem Biophys Res Commun* 322:126–132
- Sugano Y, Matsushima Y, Shoda M** (2006) Complete decolorization of the anthraquinone dye Reactive blue 5 by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:862–871
- Sugano Y, Muramatsu R, Ichiyanagi A, Sato T, Shoda M** (2007) DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family. Asp<sup>171</sup> replaces the distal histidine of classical peroxidases. *J Biol Chem* 282:36652–36658
- Sugano Y** (2009) DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell Mol Life Sci* 66:1387–1403
- Szweda RT, Schmidt K, Zorn H** (2013) Bleaching of colored whey and milk by a multiple-enzyme system. *Eur Food Res Technol* 237:377–384
- Takahashi K, Shimada T, Kondo M, Tamai A, Mori M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2010) Ectopic expression of an esterase, which is a candidate for the unidentified plant cutinase, causes cuticular defects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 51:123–131

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S** (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Tanford C, Huggins ML** (1961) Physical chemistry of macromolecules. *J Electrochem Soc* 109:98C–98C
- Terpe K** (2007) Protein-Affinität-Tags. *Biospektrum* 13:389–391
- Thomas PE, Ryan D, Levin W** (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 75:168–176
- Thomas SM, DiCosimo R, Nagarajan V** (2002) Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends Biotechnol* 20:238–242
- Tien M, Kirk TK** (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2280–2284
- Timasheff SN** (2002) Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. *Biochemistry* 41:13473–13482
- Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, Bron S, Dijk JM van** (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:515–547
- Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T** (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 28:1–8
- Ulber R, Soyez K** (2004) 5000 Jahre Biotechnologie: Vom Wein zum Penicillin. *Chem unserer Zeit* 38:172–180
- Upton C, Buckley JT** (1995) A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem Sci* 20:178–179
- Vandamme EJ, Soetaert W** (2002) Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *J Chem Technol Biotechnol* 77:1323–1332
- Varela E, Martínez ÁT, Martínez MJ** (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from the fungus *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem J* 341:113–117
- Varela E, Böckle B, Romero A, Martínez ÁT, Martínez MJ** (2000a) Biochemical characterization, cDNA cloning and protein crystallization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus pulmonarius*. *Biochim Biophys Acta* 1476:129–138
- Varela E, Martínez MJ, Martínez ÁT** (2000b) Aryl-alcohol oxidase protein sequence: a comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* 1481:202–208
- Varela E, Guillén F, Martínez ÁT, Martínez MJ** (2001) Expression of *Pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1546:107–113
- Vares T, Kalsi M, Hatakka A** (1995) Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. *Appl Environ Microbiol* 61:3515–3520

- Varki A, Cummings RD, Eski JD**, Hrsg. (2009) Essentials of glycobiology. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Veddeler B** (2004) Biotransformation terpenoider Substrate mit Mikroorganismen. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Verger R** (1997) 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. Trends Biotechnol 15:32–38
- Villaverde A, Carrió MM** (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. Biotechnol Lett 25:1385–1395
- Vujaklija D, Schröder W, Abramić M, Zou P, Lescić I, Franke P, Pigac J** (2002) A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. Arch Microbiol 178:124–130
- Wang S, Tan A, Lv J, Wang P, Yin X, Chen Y** (2012) Soluble expression of recombinant human CD137 ligand in *Escherichia coli* by co-expression of chaperones. J Ind Microbiol Biotechnol 39:471–476
- Wang SSS, Hung YT, Lin YC** (2010) Kinetic studies of the oxidation of glutathione in protein refolding buffer. Bioprocess Biosyst Eng 33:277–286
- Wang Y, Vazquez-Duhalt R, Pickard MA** (2002) Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. Curr Microbiol 45:77–87
- Ward G, Hadar Y, Bilkis I, Dosoretz CG** (2003) Mechanistic features of lignin peroxidase-catalyzed oxidation of substituted phenols and 1,2-dimethoxyarenes. J Biol Chem 278:39726–39734
- Wariishi H, Valli K, Gold MH** (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. J Biol Chem 267:23688–23695
- Wasser SP, Weis AL** (1999) Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. Crit Rev Immunol 19:65–96
- Wasser SP** (2011) Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. Appl Microbiol Biotechnol 89:1323–1332
- Waugh DS** (2005) Making the most of affinity tags. Trends Biotechnol 23:316–320
- Weickert MJ, Doherty DH, Best EA, Olins PO** (1996) Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol 7:494–499
- Weissman JS, Rye HS, Fenton WA, Beechem JM, Horwich AL** (1996) Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. Cell 84:481–490
- Welinder KG** (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. Curr Opin Struct Biol 2:388–393
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, J. WT** (Hrsg.) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, S. 315–322

- Wierenga RK, Terpstra P, Hol WG** (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding  $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* 187:101–107
- Wilkinson DL, Harrison RG** (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 9:443–448
- Williamson G, Faulds CB, Kroon PA** (1998a) Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases. *Biochem Soc Trans* 26:205–209
- Williamson G, Kroon PA, Faulds CB** (1998b) Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *Microbiology* 144 (Pt 8):2011–2023
- Winkler UK, Stuckmann M** (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 138:663–670
- Winterhalter P, Rouseff RL** (2002) Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. In: Carotenoid-derived aroma compounds. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, D.C, S. 1–17
- Witt S, Singh M, Kalisz HM** (1998) Structural and kinetic properties of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 64:1405–1411
- Wittig I, Schägger H** (2008) Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics* 8:3974–3990
- Wong DWS** (2006) Feruloyl esterase. *Appl Biochem Biotechnol* 133:87–112
- Wong H, Schotz MC** (2002) The lipase gene family. *J Lipid Res* 43:993–999
- Wongnate T, Chaiyen P** (2013) The substrate oxidation mechanism of pyranose 2-oxidase and other related enzymes in the glucose-methanol-choline superfamily. *FEBS J* 280:3009–3027
- Xia Y, Park YD, Mu H, Zhou HM, Wang XY, Meng FG** (2007) The protective effects of osmolytes on arginine kinase unfolding and aggregation. *Int J Biol Macromol* 40:437–443
- Xu X, Yan H, Chen J, Zhang X** (2011) Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnol Adv* 29:667–674
- Yakovlev IA, Hietala AM, Steffenrem A, Solheim H, Fossdal CG** (2008) Identification and analysis of differentially expressed *Heterobasidion parviporum* genes during natural colonization of Norway spruce stems. *Fungal Genet Biol* 45:498–513
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN** (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217:1214–1222
- Yoshida T, Tsuge H, Konno H, Hisabori T, Sugano Y** (2011) The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue. *FEBS J* 278:2387–2394
- Yoshida T, Tsuge H, Hisabori T, Sugano Y** (2012) Crystal structures of dye-decolorizing peroxidase with ascorbic acid and 2,6-dimethoxyphenol. *FEBS Lett* 586:4351–4356
- Zabel RA, Morrell JJ** (1992) Wood microbiology: decay and its prevention. Elsevier Science, Oxford

- Zámocký M, Furtmüller PG, Bellei M, Battistuzzi G, Stadlmann J, Vlasits J, Obinger C** (2009) Intracellular catalase/oxidase from the phytopathogenic rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*: expression analysis and biochemical characterization of the recombinant protein. *Biochem J* 418:443–451
- Zelena K, Lehnert N, Krings U, Horváth G, Molnár P, Turcsi E, Deli J, Berger RG** (2011) Degrading of carotenoids by the DyP oxidase MsP2 from *Marasmius scorodoni*. *Acta Biol Crac* 53:60
- Zelena K, Krings U, Berger RG** (2012) Functional expression of a valencene dioxygenase from *Pleurotus sapidus* in *E. coli*. *Bioresour Technol* 108:231–239
- Zhang YHP** (2011) Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 29:715–725
- Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PD** (2001) Reverse transcriptase template switching: a SMART™ approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* 30:892–897
- Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Nimtz M, Berger RG** (2003a) A oxidase from *Lepista irina* cleaves  $\beta$ ,  $\beta$ -carotene to flavor compounds. *Biol Chem* 384:1049–1056
- Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Berger RG** (2003b) Cleavage of  $\beta$ ,  $\beta$ -carotene to flavor compounds by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:331–336
- Zorn H, Peters T, Nimtz M, Berger RG** (2005a) The secretome of *Pleurotus sapidus*. *Proteomics* 5:4832–4838
- Zorn H, Bouws H, Takenberg M, Nimtz M, Getzlaff R, Breithaupt DE, Berger RG** (2005b) An extracellular carboxylesterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyses xanthophyll esters. *Biol Chem* 386:435–440
- Zubieta C, Joseph R, Krishna SS, McMullan D, Kapoor M, Axelrod HL, Miller MD, Abdubek P, Acosta C, Astakhova T, Carlton D, Chiu HJ, Clayton T, Deller MC, Duan L, Elias Y, Elsliger MA, Feuerhelm J, Grzechnik SK, Hale J, Han GW, Jaroszewski L, Jin KK, Klock HE, Knuth MW, Kozbial P, Kumar A, Marciano D, Morse AT, Murphy KD, Nigoghossian E, Okach L, Oommachen S, Reyes R, Rife CL, Schimmel P, Trout CV, van den Bedem H, Weekes D, White A, Xu Q, Hodgson KO, Wooley J, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Wilson IA** (2007) Identification and structural characterization of heme binding in a novel dye-decolorizing oxidase, TyrA. *Proteins* 69:234–243

## 7 Anhang

### 7.1 Adaptierte Sequenz der Arylalkoholoxidase

ATGTCGTTCA	GCGCCTTGCG	CCAGTFACTG	TTTATCGCCT	GTTTAGCGCT	TCCAAGCCTT	60
GCGGCGGCGA	ATCTGCCGAC	TGCAGACTTT	GACTATATCG	TGGTAGGGGC	TGGTAATGCG	120
GGTAATGTGG	TGGCTGCCCG	CCTGACGGAA	GATCCGAACG	TTAGCGTGTT	AGTTCTGGAA	180
GCAGGCGTGA	GTGACGAGAA	TGTCGTAGGC	GCCGAAGCGC	CGCTGCTGGC	ACCTGGCTTA	240
GTTCCGAATT	CCATCTTTGA	CTGGAATTAC	ACCACGACCG	CTCAAGCAGG	GTATAACGGC	300
CGTTCCATTG	CCTATCCGCG	CGGTGCGATG	TTGGGAGGTT	CAAGCTCTGT	ACACTACATG	360
GTGATGATGC	GTGGTTCGAT	TGAGGACTTT	GATCGCTATG	CGGCGGTGAC	TGGGGACGAT	420
GGGTGGAATT	GGGATAATAT	TCAGCAGTTT	GTCGGAAGA	ACGAGATGGT	TGTGCCACCA	480
GCAGACAACC	ACAATACGTC	GGGTGAGTTT	ATCCCGGCAG	TCCATGGTAC	AAATGGCTCG	540
GTGTCTATCA	GTCTGCCGGG	CTTCCGACT	CCTCTGGATG	ATCGTGTGCT	GGCAACCACC	600
CAGGAACAAA	GCGAAGAGTT	CTTCTCAAT	CCGGACATGG	GGACAGGACA	TCCGCTCGGG	660
ATCAGTTGGT	CAATCGCATC	TGTTGGCAAT	GGGCAACGGA	GCAGTTCATC	AACCGCATAT	720
CTGCGCCCTG	CACAGAGTCG	TCCGAATCTG	TCCGTCTCA	TTAATGCGCA	AGTGACGAAA	780
TTGGTGAATT	CTGGAACTAC	GAACGGACTT	CCGGCGTTTC	GCTGCGTTGA	GTATGCGGAA	840
CGCGAAGGTG	CACCGACAAC	GACCGTATGC	GCCAAGAAAG	AAGTGGTGCT	CAGTGCGGGA	900
TCGGTGGGCA	CCCCAATCTT	ACTGCAGCTC	TCTGGCATTG	GCGATCAGAG	CGATCTGTCT	960
GCCGTGGGCA	TTGACACCAT	CGTCAACAAC	CCGTCTGTAG	GCCGCAATCT	GTCGGATCAT	1020
TTGCTGCTGC	CTGCTACTTT	CTTTGTGAAC	AACAACCAGT	CGTTTGATAA	CCTGTTTCGC	1080
GATTCTAGCG	AGTTCAATGC	AGACTTAGAT	CAATGGACGA	ATACGCGCAC	CGGTCCGTTG	1140
ACCGCGCTGA	TTGCGAATCA	TCTCGCTTGG	TTACGGTTAC	CGTCCAACTC	AAGCATCTTT	1200
CAGTCAGTGC	CAGATCCAGC	TGCGGGTCCG	AATTCGGCCC	ATTGGGAAAC	CATCTTTTCC	1260
AACCAGTGGT	TTCACCCGGC	ATTGCCTCGC	CCGGATACCG	GCAACTTTAT	GAGCGTTACC	1320
AATGCTCTGA	TTGCGCCGGT	TGCCCGTGGC	GACATCAAAC	TTGCCACCAG	TAATCCGTTT	1380
GATAAACCGC	TTATTAATCC	GCAGTATCTC	TCGACGGAAT	TCGATATTTT	CGCGATGATT	1440
CAGGCCGTCA	AAAGCAACTT	GCGTTTTCTG	AGTGGCCAGG	CTTGGGCGGA	TTTCGTTATT	1500
CGCCCGTTCG	ATGCGCGTCT	GTCGGACCCA	ACCAATGATG	CCGCTATTGA	ATCGTATATT	1560
CGCGATAACG	CCAACACGAT	CTTTCATCCA	GTTGGTACAG	CGAGCATGAG	CCCGCGTGGC	1620
GCCTCCTGGG	GTGTCGTCGA	TCCTGATCTG	AAAGTGAAAG	GCGTTGACGG	TTTGCGCATT	1680
GTGGATGGGT	CCATTCTGCC	GTTTGCCCCG	AACGCCACA	CCCAAGGCC	GATTTACCTG	1740
GTAGGTGAAC	GTGGCGCCGA	TCTGATCAAA	GCGGATCAAT	AG		1782

Abbildung 7.1: Arylalkoholoxidasesequenz angepasst an die *codon usage* von *E. coli* B

## 7.2 Vektorkarten

### 7.2.1 Vektoren für die heterologe Expression der Arylalkoholoxidase in *E. coli*

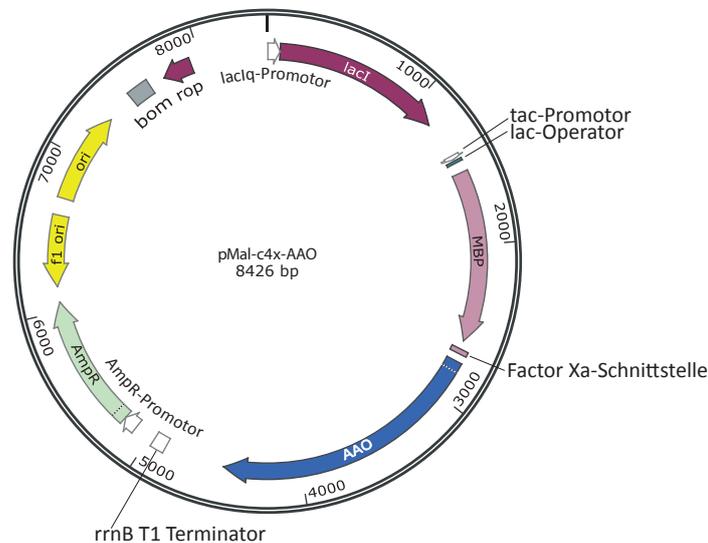


Abbildung 7.2: Karte des Expressionsvektors pMal-c4x-AAO

**ori** – pUC origin: *high copy* Replikationsursprung, **AmpR** – Ampicillinresistenzgen, **lacI** – lac-Repressor, **MBP** – Maltose-Bindeprotein, **AAO** – Arylalkoholoxidase, **rop** – Regulatorprotein Rop (*repressor of primer*) für die Replikation des Plasmids, **bom** – basis of mobility

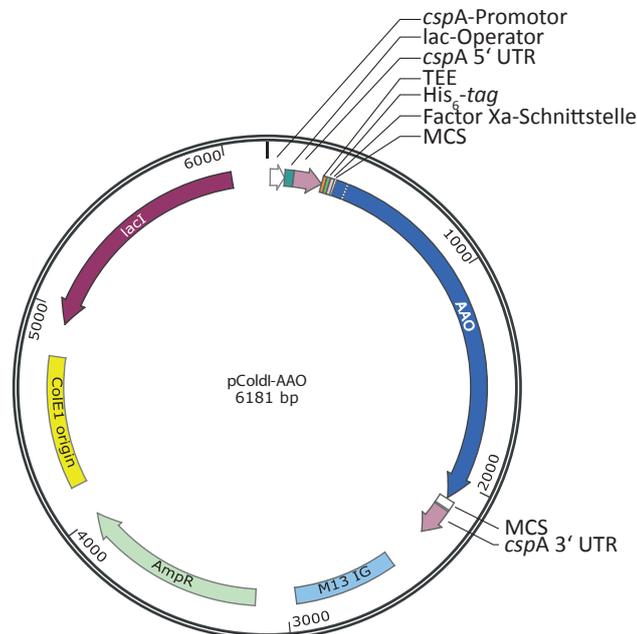


Abbildung 7.3: Karte des Expressionsvektors pCold-AAO

**ori** – ColE1 ori: *low copy* Replikationsursprung, **AmpR** – Ampicillinresistenzgen, **lacI** – lac-Repressor, **M13 IG** – M13-Phage intergenetische Region, **AAO** – Arylalkoholoxidase, **MCS** – Polylinker, **UTR** – untranslated region, **TEE** – translation enhancing element

## 7.2.2 Vektoren für die heterologe Expression der Arylalkoholoxidase in *Hansenula polymorpha*

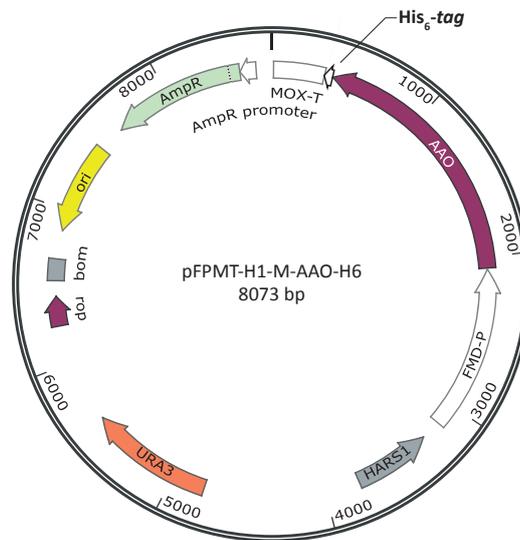


Abbildung 7.4: Karte des Expressionsvektors pFPMT-H1-M-AAO-H6 (verändert nach ARTES Biotechnology)  
**ori** – Origin of replication aus pBR322, **AmpR** – Ampicillinresistenzgen, **HARS1** – autonom replizierende Sequenz 1 aus *H. polymorpha*, **URA3** – URA3-Gen aus *S. cerevisiae*, **FMD-P** – Promotor des Formiatdehydrogenase-Gens aus *H. polymorpha*

### 7.2.3 Konstrukte für die heterologe Expression der rPsaDyP und der GDS(L)-Lipase in *Trichoderma reesei*

Die Peroxidase- und Lipase-cDNA-Sequenz aus *Pleurotus sapidus* wurden unter Anwendung der *Trichoderma reesei* Codon-Nutzung synthetisiert.

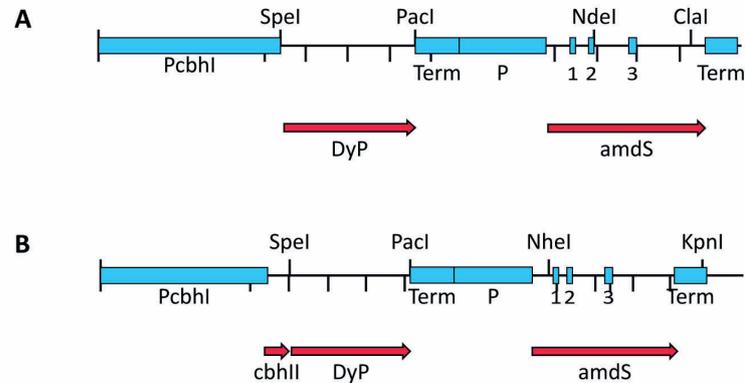


Abbildung 7.5: Schematische Darstellung der Peroxidase Expressionskassetten (verändert nach AB Enzymes). In beiden Konstrukten steht die Peroxidase-Sequenz unter der Kontrolle des cbhII-Promotors und -Terminators

**A** – AB510-DyPK10    **B** – AB600-DyPK10M mit Fusion cbhII-Carrier-DyP  
**amdS** – Selektionsmarker Acetamidase

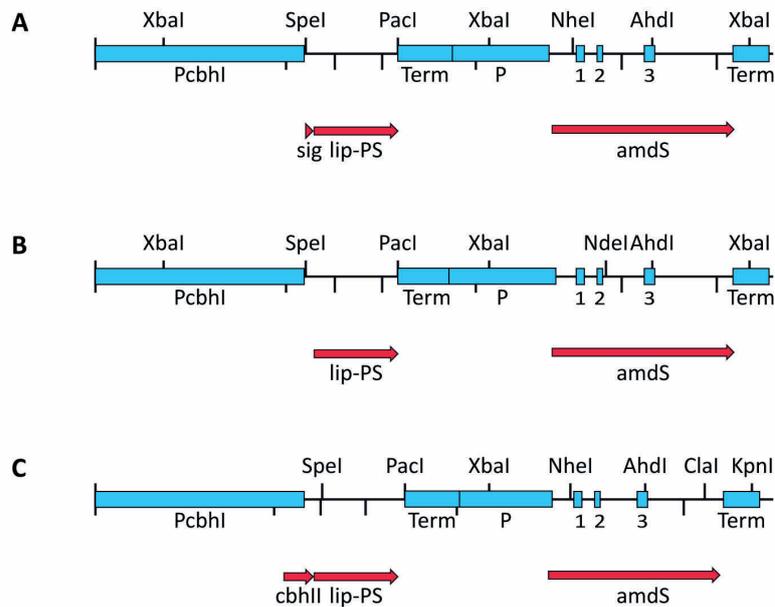


Abbildung 7.6: Schematische Darstellung der Lipase-Expressionskassetten (verändert nach AB Enzymes). In allen Konstrukten steht die Lipase-Sequenz unter der Kontrolle des cbhII-Promotors und -Terminators

**A** – AB500-LipPS enthält die Lipase mit nativer Signalsequenz  
**B** – In AB510-LipPS dient die cbhII-Signalsequenz der Sekretion der Lipase  
**C** – In AB600-LipPS dient der cbhII-Carrier der Sekretion eines cbhII-KexII-Lipase Fusionsproteins  
**amdS** – Selektionsmarker

### 7.2.4 Vektor für die heterologe Expression der Esterase aus *Pleurotus sapidus*

Für die cytosolische Expression der Esterase in *Hansenula polymorpha* wurde ein Leseraster synthetisiert, wobei die Esterase-cDNA-Sequenz aus *Pleurotus sapidus* mit einem Startmethionin und einem C-terminalen His-tag versehen wurden. Die Sequenz wird von Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI flankiert.

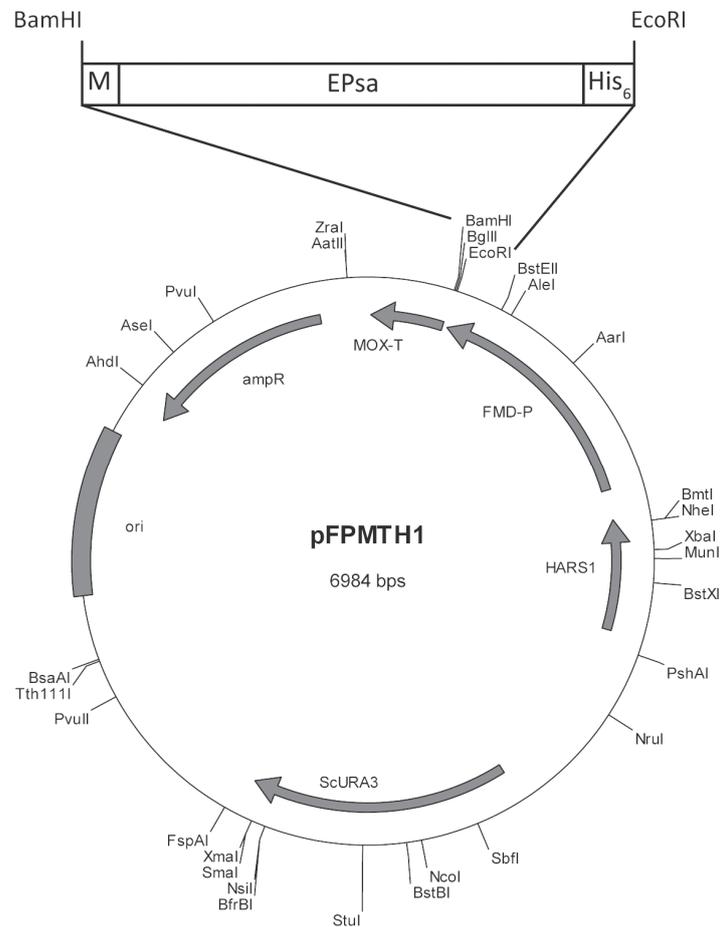


Abbildung 7.7: Schematische Darstellung des Expressionsvektors und des Expressionskonstruktes für die Esterase aus *P. sapidus* (verändert nach ARTES Biotechnology).

**M** – Startmethionin    **EPsa** – cDNA Sequenz der Esterase aus *P. sapidus* ohne Signalsequenz  
**His<sub>6</sub>** – His-tag    **FMD-P** – FMD-Promotor aus *H. polymorpha*    **MOX-T** – MOX-Terminator aus *H. polymorpha*  
**ampR** – Ampicillin-Resistenzgen aus pBR322    **ScURA3** – URA3 aus *Saccharomyces cerevisiae*

### 7.3 Größenstandards

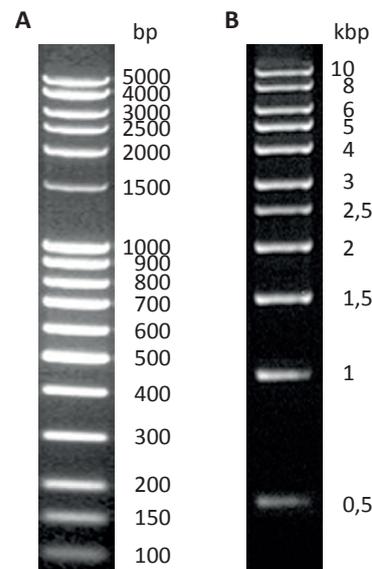


Abbildung 7.8: DNA-Größenstandards für die Agarosegelelektrophorese (Tab. 2.4)

**A** – 100 bp DNA-Leiter, extended

**B** – 1 kbp DNA-Leiter

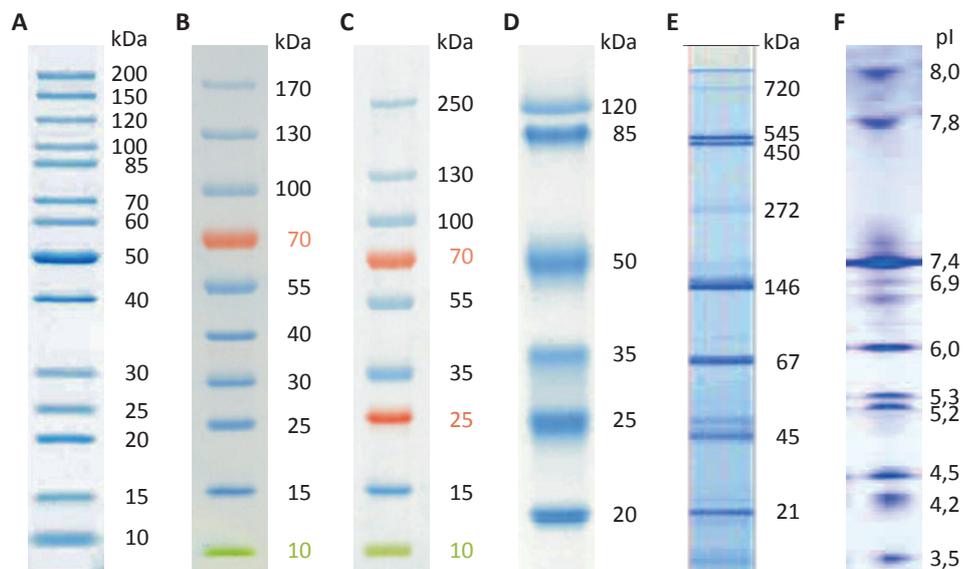


Abbildung 7.9: Standards für die Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen (Tab. 2.4)

**A** – PageRuler™ Unstained Proteinladder

SDS-PAGE

**B** – PageRuler™ Pestained Proteinladder

Western Blot

**C** – PageRuler™ Plus Prestained Proteinladder

Western Blot

**D** – Prestained Protein Molecular Weight Marker

Western-Blot

**E** – SERVA Native Marker Liquid Mix

*clear native* und *blue native* PAGE

**F** – IEF Marker 3–10, Liquid Mix

IEF

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungen

1.1	Furchtkörper von <i>Pleurotus sapidus</i> . . . . .	4
1.2	Analyse des Sekretoms von <i>Pleurotus sapidus</i> mittels 2D-Gelelektrophorese . . . . .	4
2.1	Reverse Transkription . . . . .	29
3.1	Sequenz der 5,8S rDNA inklusive der flankierenden ITS-Bereiche . . . . .	85
3.2	Sekretierte Arylalkoholoxidaseaktivität während der Kultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i> . . . . .	86
3.3	Lipaseaktivität in Kulturüberständen von <i>Pleurotus sapidus</i> . . . . .	87
3.4	RNA-Qualität . . . . .	88
3.5	cDNA aus <i>Pleurotus sapidus</i> . . . . .	89
3.6	Vektorkarte des Klonierungsvektors pCR2.1-TOPO-AAO . . . . .	90
3.7	Kolonie-PCR zur Kontrolle der Insert-Größe . . . . .	91
3.8	Nukleotid- und übersetzte Aminosäuresequenz der Arylalkoholoxidase . . . . .	92
3.9	Vergleich der Aminosäuresequenz der Arylalkoholoxidase aus <i>Pleurotus sapidus</i> mit Peptidsequenzen aus einer Sekretomanalyse . . . . .	93
3.10	Vergleich der Arylalkoholoxidasesequenzen von <i>P. sapidus</i> und <i>P. ostreatus</i> mit den für die Katalyse wichtigen Resten . . . . .	94
3.11	Modell der Arylalkoholoxidase mit FAD . . . . .	95
3.12	Kontrolle des Restriktionsverbaus der Klonierungselemente. . . . .	96
3.13	Karte des Expressionsvektors pET 15b-HisAAO . . . . .	97
3.14	Heterologe Expression der His <sub>6</sub> -Arylalkoholoxidase . . . . .	98
3.15	Heterologe Expression der MBP-AAO in <i>E. coli</i> . . . . .	99
3.16	Analyse der Löslichkeit nach Expression der MBP-AAO in <i>E. coli</i> BL12 (DE3) . . . . .	100
3.17	Heterologe Expression der His-AAO mit dem pCold-System . . . . .	102
3.18	Koexpression der His-AAO mit Chaperonen . . . . .	103
3.19	Nachweis löslicher Arylalkoholoxidase mittels SDS-APGE und Western-Blot . . . . .	104
3.20	Heterologe Expression in <i>Hansenula polymorpha</i> . . . . .	105
3.21	Reinigung der löslichen His-AAO nach Koexpression mit GroEL, GroES und TIG . . . . .	106
3.22	Reinigung der His-AAO unter denaturierenden Bedingungen . . . . .	107
3.23	Nachweis der rückgefalteten Arylalkoholoxidase mittels Western-Blot . . . . .	108

---

3.24	UV-VIS-Spektrum der AAO*	109
3.25	Relative Aktivität der AAO* in Abhängigkeit von pH-Wert und Puffer	110
3.26	Relative AAO*-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur	111
3.27	Cornish Bowden Diagramme zur Herleitung der enzymkinetischen Parameter der AAO*	112
3.28	Analyse der mittels PCR generierten Insert für die Klonierung einer DyP-Typ Peroxidase	113
3.29	Nukleotid- und übersetzte Aminosäuresequenz der DyP-Typ Peroxidase	114
3.30	Funktionelle Analyse der übersetzten Aminosäuresequenz mittels InterProScan	115
3.31	Vergleich der AS-Sequenz der rPsaDyP und AauDyP	116
3.32	Modell der rPsaDyP	117
3.33	Phylogeneitsche Einordnung der rPsaDyP	118
3.34	Aktivität der rekombinant produzierten DyP-Typ Peroxidase im Kulturüberstand nach verschiedenen Kultivierungsmethoden	119
3.35	Kontrolle der Reinigung mittels halbnativer PAGE	121
3.36	Nachweise der Linearität über den Messzeitraum	122
3.37	Kontrolle der Validität der Enzymkinetik	123
3.38	Relative Enzymaktivität in Abhängigkeit der Salzkonzentration	124
3.39	Lagerstabilität der gereinigten rPsaDyP	125
3.40	UV/Vis-Spektrum der gereinigten rPsaDyP	126
3.41	FPLC-Chromatogramm der Reinigung der DyP-Typ Peroxidase mittels HighPrep Phenyl FF-Säule	128
3.42	FPLC-Chromatogramm der Reinigung der DyP-Typ Peroxidase mittels SP Sepharose FF-Säule	129
3.43	Kontrolle der Reinigung der rPsaDyP	130
3.44	Untersuchung der nativen Konformation der gereinigten rPsaDyP mittels <i>Blue Native</i> PAGE	132
3.45	Bestimmung der Proteingröße mittels Gelfiltrationschromatographie	133
3.46	Isoelektrische Fokussierung der gereinigten rPsaDyP	134
3.47	Bestimmung des Glykosylierungsgrades der rPsaDyP	135
3.48	Abgeleitete Primärsequenz der DyP-Typ Peroxidase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	136
3.49	Sequenzvergleich der N-Termini verschiedener DyP-Typ Peroxidasen	136
3.50	Relative Enzymaktivität der DyP-Typ Peroxidase gegenüber ABTS in Abhängigkeit vom verwendeten Puffer und pH-Wert	137
3.51	Relative Enzymaktivität der DyP-Typ Peroxidase gegenüber $\beta$ -Carotin in Abhängigkeit vom verwendeten Puffer und pH-Wert	138
3.52	Relative Enzymaktivität der DyP-Typ Peroxidase für den Umsatz von ABTS in Abhängigkeit vom pH-Wert	139

---

3.53	Relative Enzymaktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten Natriumacetat-Puffers . . . . .	140
3.54	Relative Enzymaktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit der Temperatur . . . . .	141
3.55	Relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration . . . . .	142
3.56	Enzymaktivität in Abhängigkeit der Komponente, mit der der ABTS-Assay gestartet wurde . . . . .	143
3.57	Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von $\beta$ -Carotin in Abhängigkeit des Sauerstoffgehalts des Puffers . . . . .	144
3.58	Relative Aktivität der DyP-Typ Peroxidase nach Verdünnung des Enzyms in Wasser bzw. Puffer . . . . .	145
3.59	Relative Aktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit von der Lagerdauer bei verschiedenen pH-Werten . . . . .	146
3.60	Relative Aktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit von der Lagerdauer in McIlvaine-Puffer mit verschiedenen pH-Werten . . . . .	147
3.61	Relative Aktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit von der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	148
3.62	Relative Aktivität der DyP-Typ Peroxidase in Abhängigkeit von der Lagerung in Ethanol . . . . .	149
3.63	Einfluss der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration auf die Umsatzgeschwindigkeit . . . . .	152
3.64	Cornish Bowden Diagramme zur Herleitung der enzymkinetischen Parameter der rPsaDyP . . . . .	153
3.65	Umsetzung von Adlerol . . . . .	154
3.66	DyP-Aktivität in Abhängigkeit der AAO- bzw. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration . . . . .	156
3.67	Umsatz von DMP durch das AAO-DyP-Zwei-Enzym-System . . . . .	158
3.68	Umsetzung von Veratrylalkohol parallel zum Umsatz von DMP im Zwei-Enzym-System . . . . .	158
3.69	Umsatz von ABTS mit dem Zwei-Enzym-System . . . . .	159
3.70	Abbau von Annatto mit dem Zwei-Enzym-System . . . . .	161
3.71	Oxidation von Veratrylalkohol im Zwei-Enzym-System . . . . .	161
3.72	Bleichung von gefärbter Molke . . . . .	162
3.73	Nukleotid- und Aminosäuresequenz der klonierten GDS(L)-Lipase . . . . .	163
3.74	Funktionelle Analyse der übersetzten Aminosäuresequenz mittels InterProScan . . . . .	164
3.75	Sequenzvergleich einer GDS(L)-Lipase aus <i>P. sapidus</i> mit <i>P. ostreatus</i> . . . . .	165
3.76	Aktivität der GDS(L)-Lipase in Kulturüberständen von <i>Trichoderma reesi</i> . . . . .	166
3.77	Elektrophoretische Analyse des Kulturüberstandes mit exprimierter GDS(L)-Lipase . . . . .	167
3.78	Isoelektrische Fokussierung der rekombinanten GDS(L)-Lipase . . . . .	168
3.79	Veränderung des Absorptionsspektrums vor und nach der Hydrolyse des Ferulasäuremethylesters . . . . .	170

3.80	Nachweis der rekombinanten Esterase . . . . .	171
4.1	Postulierter Reaktionsmechanismus der Arylalkoholoxidase mit den potentiell katalytischen Aminosäuren . . . . .	178
4.2	Umsetzung von Alkoholen bzw. Aldehyden durch die Arylalkoholoxidase . . . . .	178
4.3	Strategien zur Vermeidung von <i>inclusion bodies</i> . . . . .	180
4.4	Schematisches Diagramm für die Faltungsenergie eines Proteins . . . . .	183
4.5	Sequenzalignment verschiedener DyP-Typ Peroxidasen . . . . .	194
4.6	Möglicher Katalyse- und Inhibierungsweg der Meerrettichperoxidase . . . . .	208
4.7	Alignment von GDS(L)-Lipasen aus verschiedenen Organismengruppen . . . . .	222
4.8	Aminosäuresequenzvergleich der GDS(L)-Lipase aus <i>Pleurotus sapidus</i> mit GDS(L)-Lipasen aus anderen Basidiomyceten . . . . .	223
7.1	Arylalkoholoxidasesequenz angepasst an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i> B . . . . .	259
7.2	Vektorkarte des Expressionsplasmids pMal-c4X-AAO . . . . .	260
7.3	Karte des Expressionsvektors pColdI-AAO . . . . .	260
7.4	Karte des Expressionsvektors pFPMT-H1-M-AAO-H6 . . . . .	261
7.5	Schematische Darstellung der Peroxidase Expressionskassetten . . . . .	262
7.6	Schematische Darstellung der Lipase-Expressionskassetten . . . . .	262
7.7	Schematische Darstellung des Expressionsvektors für die Esterase . . . . .	263
7.8	DNA-Größenstandards für die Agarosegelelektrophorese . . . . .	264
7.9	Proteinstandards . . . . .	264

## Tabellen

2.1	Verwendete Geräte . . . . .	8
2.2	Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Lösungsmittel . . . . .	9
2.3	Substrate . . . . .	12
2.4	Verwendete Größenstandards . . . . .	13
2.5	Verwendete Kits . . . . .	13
2.6	Verwendete kommerziell erhältliche Enzyme . . . . .	14
2.7	Verwendete Restriktionsendonukleasen . . . . .	14
2.8	Verwendete Oligonukleotidprimer . . . . .	15
2.9	Klonierungs- und Expressionsvektoren . . . . .	16
2.10	Chaperonplasmide . . . . .	17
2.11	Mikroorganismen . . . . .	18
2.12	Bioinformatiksoftware und Datenbanken . . . . .	19
2.13	Kohlenstoffquellen für die Induktion eines veränderten Expressionsmusters . . . . .	21
2.17	Zusammenfassung der ligierten DNA-Fragmente . . . . .	33
2.18	Zusammenfassung der Konstrukte der verschiedenen Expressionsplasmide . . . . .	36

---

2.19	Zusammensetzung der SDS-Gele . . . . .	39
2.20	Säulen für die Auswahl geeigneter Trennprinzipien . . . . .	54
2.21	Parameter der hydrophoben Interaktionschromatographie . . . . .	55
2.22	Parameter der Kationenaustauschchromatographie . . . . .	56
2.23	Verwendete FPLC-Säulen und Zubehör nach dem Scale Up . . . . .	57
2.24	Parameter der hydrophoben Interaktionschromatographie nach Scale up . . . . .	58
2.25	Parameter der Ionenaustauschchromatographie nach Scale up . . . . .	59
2.26	Bestimmung des Molekulargewichts mittels GFC . . . . .	60
2.27	Liste der als Größenstandard verwendeten Proteine . . . . .	60
2.28	Citronensäure/Phosphat-Puffer . . . . .	66
2.29	Screening-Assay für Arylalkoholoxidase-Aktivität . . . . .	68
2.30	Optimierter Assay für die Kontrolle der Aktivität der AAO* . . . . .	68
2.31	Peroxidasesubstrate . . . . .	69
2.32	Allgemeine Zusammensetzung der Peroxidase-Assays . . . . .	70
2.33	Übersicht über die verwendeten Assayparameter . . . . .	70
2.34	Pipettierschema für den AAO-Assay zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Arylalkoholoxidase . . . . .	71
2.35	Pipettierschema für die Reaktionsansätze zur Bestimmung des Temperaturoptimums der DyP-Typ Peroxidase . . . . .	72
2.36	Messparameter für die AAO-Substrate . . . . .	75
2.37	Für die AAO-Kinetiken verwendete Parameter . . . . .	75
2.38	Für die DyP-Kinetiken verwendete Parameter . . . . .	76
2.41	Zusammensetzung des Assays, auf dessen Basis das Zwei-Enzym-System entwickelt wurde . . . . .	78
2.42	Zweienzymassay für den Umsatz von Annatto in Molke . . . . .	79
3.1	Peptidsequenzen . . . . .	84
3.2	ITS-Primer . . . . .	85
3.3	<i>Pleurotus sapidus</i> -Stämme mit großen Homologien zur ermittelten ITS- und 5,8S rDNA-Sequenz . . . . .	85
3.4	Ermittelte kinetische Parameter der AAO* . . . . .	112
3.5	Bilanzierung der Reinigung (rPsaDyP) . . . . .	131
3.6	Untersuchte Peroxidasesubstrate zur Bestimmung des Substratspektrums . . . . .	150
3.7	Optimale Puffer und pH-Werte für die Oxidation der getesteten Substrate . . . . .	150
3.8	Ermittelte Aktivität der rPsaDyP gegenüber verschiedenen Substraten . . . . .	151
3.9	Ermittelte kinetische Parameter der rPsaDyP . . . . .	153
3.10	Zweienzymassay für den Umsatz von DMP . . . . .	157
3.11	Zweienzymassay für den Umsatz von ABTS . . . . .	159
3.12	Zweienzymassay für den Umsatz von Annatto . . . . .	160
3.13	Aktivität der GDS(L)-Lipase gegenüber <i>p</i> -Nitrophenylestern . . . . .	169

---

3.14	Umsetzung von 5-O-transferuloyl-L-Arabinofuranose durch die GDS(L)-Lipase . .	170
3.15	Übersicht über die getesteten Rückfaltungspuffer . . . . .	172
3.16	Rückfaltungsbedingungen für die heterolog exprimierte Esterase . . . . .	172
4.1	Vergleich der kinetischen Parameter der rekombinanten Arylalkoholoxidase mit homologen Enzymen . . . . .	190