

Entwicklung eines Expressionssystems für Enzyme in der Lebensmittelindustrie

(Development of an expression system for enzymes in the food
industry)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Lebensmittelchemie und

Lebensmittelbiotechnologie

vorgelegt von:

Mikro- und Molekularbiologe

Karl Marcus Schulze

Dekan: Prof. Dr. Thomas Wilke

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Rühl

Institut für Lebensmittelchemie und -biotechnologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Czermak

Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie

Technische Hochschule Mittelhessen

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, 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 Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Villingen, Juni 2022

Marcus Schulze

Danksagung:

Ich möchte mich an dieser Stelle bei denen bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht haben. Ich bedanke mich bei dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der europäischen Förderinitiative EuroTransBio (Grant 031A506B). Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Niedersächsische Ministerium für Wissenschaft und Kultur (MWK Hannover) für die finanzielle Unterstützung. Weiterhin bedanke ich mich bei Herr Sugawara von Huvepharma.

Vor allem möchte ich mich aber bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Rühl bedanken, der mir stets mit Rat und Tat bei jeglichen Fragen oder Problemen zur Seite stand, der mir viel Geduld und Verständnis entgegenbrachte und es schaffte, trotz Rückschläge mich immer wieder zu motivieren. Hierbei habe ich seinen sehr kollegialen Umgang mit seiner gesamten Arbeitsgruppe stets bewundert und auch genossen. Vielen lieben Dank dafür, Martin.

Ich bedanke mich natürlich auch beim gesamten Institut für Lebensmittelchemie und Biotechnologie für die gute Zusammenarbeit, das wissenschaftliche Fachsimpeln und das freundschaftliche Verhältnis. Ich habe meine Doktorandenzeit bei euch sehr genossen und, dass nicht nur freitags ab 16:00.

Ich danke Dr. Andrzej Majcherczyk für seine Hilfe bei der Identifizierung der Lcc8. Ebenso danke ich unseren russischen Kooperationspartnern Dr. Alexandra Rajkova und Dr. Ivan Zorov.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie für den Rückhalt und die Motivation, für das Schaffen von Gelegenheiten um diese Arbeit zu vollenden. Ganz besonders danke ich dabei meiner Frau Sabrina. Ohne sie hätte ich es nicht geschafft.

Veröffentlichungen

Publikationen

Schulze, M., Geisler, L., Majcherczyk, A., and Rühl, M. (2019). Signal peptide replacement resulted in recombinant homologous expression of laccase Lcc8 in *Coprinopsis cinerea*. *AMB Express* 9, 36

Tagungsbeiträge

Schulze, M., Rühl, M. (2018). Improvement of recombinant production of industrial relevant enzymes in *Coprinopsis cinerea*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Wolfsburg, 15.04.2018 bis 18.04.2018

Zusammenfassung

Mit Hilfe des pYSK7 basierten Expressionssystem wurde versucht drei Serinpeptidasen aus *Wolfiporia cocos* (*W. cocos*) und *Rhizopertha dominica* (*R. dominica*) heterolog und aus *Coprinopsis cinerea* (*C. cinerea*) homolog durch den Expressionsorganismus *C. cinerea* zu exprimieren. Hierzu wurde der Expressionsvektor pYSK7 modifiziert, bei dem das Gen von Interesse unter der Kontrolle des *gpdII*-Promotors und des *lcc1*-Terminators steht. Die Klonierung der Expressionsvektoren erfolgte mittels homologer Rekombination in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Zur Expression einer Prolyl-spezifischen Serinpeptidase aus dem Braunfäulepilz *W. cocos* (WcOPsP) wurden insgesamt vier Expressionsvektoren (pYMS1, 2, 3 und 11c) kloniert und *C. cinerea* damit transformiert. Hierbei verwendete pYMS1 das native WcOPsP Signalpeptid und die Prosequenz. Bei pYMS2 wurde das native WcOPsP Signalpeptid durch das Lcc1 Signalpeptid aus pYSK7 ausgetauscht und bei pYMS3 wurde ebenfalls das Lcc1 Signalpeptid, aber ohne WcOPsP Prosequenz verwendet. Der Kulturüberstand der pYMS1, 2, und 3 Transformanden zeigte an unterschiedlichen Tagen weder Peptidaseaktivität in einem Z-Gly-Pro-4-Nitroanilid-Peptidase spezifischen Assay, noch einen eindeutigen Nachweis des rekombinanten Proteins mittels polyklonalem Anti-WcOPsP-Antikörper in einer Western Blot Analyse. Erst durch die Transformation von *C. cinerea* durch den Expressionsvektor pYMS11c, bei dem das homologe Signalpeptid der Serinpeptidase EAU91794, die native WcOPsP Prosequenz und eine C-terminale rekombinante Histidin-Markierung verwendet wurde, konnte die rekombinante WcOPsP spezifisch mittels Western Blot Analyse im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Es konnte allerdings keine Peptidaseaktivität im Kulturüberstand mittels Z-Gly-Pro-4-Nitroanilid-Peptidase spezifischen Assay festgestellt werden. Eine ausreichende Menge rekombinantes Protein für eine Charakterisierung oder andere Untersuchungen konnte nicht gereinigt werden.

Für die Expression der Serinpeptidase aus *R. dominica* wurden ebenfalls vier Expressionsvektoren kloniert (pYSM5, 6, 7 und 13c) und *C. cinerea* damit transformiert. Hierbei verwendete pYMS5 das synthetische *rdot3* Gen. Da dieses keinerlei Introns aufweist, wurde in pYMS6 ein Intron aus *Agaricus bisporus* (*A. bisporus*) zwischen *gpdII*-Promotor und Start des *rdot3* Gens hinzugefügt. In pYMS7 wurde das synthetische Gen N-terminal mit dem Lcc1 Signalpeptid aus pYSK7 verknüpft. Der Kulturüberstand der pYMS5, 6 und 7

Transformanden zeigten keine höhere Peptidaseaktivität im Vergleich zu den Negativkontrollen im Azocasein Assay. Die potentielle Hydrolyse der Prosequenz mittels Faktor Xa führte zu keiner gesteigerten Peptidaseaktivität im Kulturüberstand. Es wurde daher ein weiterer Expressionsvektor pYMS13c kloniert, bei dem ebenfalls das homologe Signalpeptid der Serinpeptidase EAU91794 und eine rekombinante C-terminale Histidin-Markierung verwendet wurde. Weiterhin wurde ein Intron aus *A. bisporus* zwischen *gpdII*-Promotor und Start des EAU91794 Signapeptids eingefügt. Im Kulturüberstand der pYMS13c Transformanden konnte kein rekombinantes Protein mittels Histidin-Markierung in der Western Blot Analyse detektiert werden.

Da die Expression von heterologen Peptidasen keine Peptidaseaktivität im Kulturüberstand von *C. cinerea* zeigte, wurde daher versucht eine endogene Serinpeptidase (EAU91794) homolog in *C. cinerea* mittels des pYSK7 basierten Expressionssystem zu exprimieren. Zur Expression der Serinpeptidase aus *C. cinerea* wurden insgesamt drei Expressionsvektoren (pYMS15, 15c und 25) kloniert und *C. cinerea* damit transformiert. Hierbei verwendet pYMS15 das native Gen der EAU91794 unter der Kontrolle des *gpdII*-Promotors und des *lcc1*-Terminators. Bei pYMS15c wurde eine rekombinante C-terminale Histidin-Markierung hinzugefügt und bei pYMS25 wurde das native Signalpeptid der EAU91794 durch das Lcc1 Signalpeptid mit einer zusätzlichen Kozaksequenz ersetzt und eine rekombinante C-terminale Histidin-Markierung hinzugefügt. Der Kulturüberstand der pYMS15 Transformanden zeigte eine erhöhte Peptidaseaktivität im Azocasein Assay im Vergleich zu den Negativkontrollen. Da sich die native Peptidaseaktivität nicht von der potentiellen rekombinanten Peptidaseaktivität differenzieren ließ, wurde pYMS15c kloniert und *C. cinerea* damit transformiert. Im Kulturüberstand der pYMS15c Transformanden konnte mittels Western Blot Analyse gezeigt werden, dass das rekombinante Enzym erfolgreich exprimiert und sekretiert wurde. Das rekombinante Protein wurde mittels FPLC gereinigt, wobei sich zeigte, dass die Peptidaseaktivität nicht mit der Anwesenheit des rekombinanten Proteins korreliert. Zusätzlich wurde der Expressionsvektor pYMS25 mit einer zusätzlichen Kozaksequenz versehen, um die Translationsrate der mRNA zu steigern. Der Kulturüberstand der pYMS25 Transformanden zeigte ebenfalls Banden des rekombinanten Proteins in der Western Blot Analyse, was zeigte, dass die EAU91794 auch mittels Lcc1-Signalpeptids sekretiert wurde. Allerdings zeigten die pYMS25 Transformanden im Vergleich zu den pYMS15c Transformanden keine stärkeren

Banden des rekombinanten Proteins, was zeigte, dass die zusätzliche Kozaksequenz nicht zu einer gesteigerten Menge an rekombinanten Protein geführt hat.

Als ein weiteres Enzym wurde versucht homolog eine Laccase mittels *C. cinerea* zu exprimieren. Da bereits in *C. cinerea* einige Laccasen homolog exprimiert werden konnten, wurde in dieser Arbeit sich auf eine Laccase konzentriert, die noch nicht zuvor rekombinant exprimiert wurde. Hierzu wurde der Expressionsvektor pYMS33 kloniert, bei dem die *lcc8* unter Kontrolle des *gpdII*-Promotors, des *lcc1*-Signalpeptids und dem *lcc1*-Terminators steht. Ein pYMS33 Transformant zeigte Laccaseaktivität auf ABTS Platten und in Flüssigkultur, obwohl unter Bedingungen kultiviert wurde, bei denen keine nativen Laccasen exprimiert werden. Zusätzlich wurde die Integration der *lcc8* Expressionskassette mittels PCR bestätigt. Daher wurde der Kulturüberstand für eine Gelelektrophorese verwendet und die Laccaseaktivität spezifisch gefärbt. Die Proteinbanden wurden sequenziert und als Laccase8 identifiziert. Die Lcc8 wurde mittels FPLC gereinigt und anschließend biochemisch charakterisiert. Es konnte eine spezifische Aktivität von 46,3 U mg⁻¹ erreicht werden. Das Molekulargewicht der Lcc8 betrug 64 und 77 kDa, wobei eine Deglykosylierung zeigte, dass bis zu 10% des Molekulargewichts von der Glykosylierung stammen. Der optimale pH Bereich für katalytische Aktivität lag zwischen 4 bis 5. Die Lcc8 wies eine hohe Thermostabilität von bis zu 300 min bei 50°C auf. Die optimale Temperatur lag bei 54-63°C, während der pI bei 3,3 und 3,4 lag. Es wurden weiterhin K_m und K_{cat} für ABTS und DMP bestimmt.

Darüber hinaus wurde ein alternativer Expressionsorganismus für die rekombinante Expression von Peptidasen verwendet. Die Serinpeptidase Rdo_c6991 aus *R. dominica* sollte heterolog mittels *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) exprimiert werden. Hierzu wurde der Expressionsstamm GS115 und der Expressionsvektor pPIC9K kommerziell erworben um die Peptidase Rdo_c6991 zu exprimieren. Die Expressionsvektoren pPIC9K-KPep und pPIC9K-PlaPep wurden dafür entworfen. Bei pPIC9K-KPep steht das *rdo_c6991* Gen unter der Kontrolle des AOX1 Promotors, dem α -Faktor Sekretionssignal, einer zusätzlichen Kozak-Sequenz und dem AOX1 Terminator, wobei noch eine rekombinante C-terminale Histidin-Markierung hinzugefügt wurde. Bei pPIC9K-PlaPep wurde derselbe Aufbau der Expressionkassette wie bei pPIC9K-KPep verwendet, wobei zwischen dem α -Faktor Sekretionssignal mit der zusätzlichen Kozak-Sequenz und dem *rdo_c6991* Gen noch eine Phospholipase A₂ (PLA₂) Domäne hinzugefügt wurde, um die Sekretion und damit die

Ausbeute der rekombinanten Expression zu optimieren. Der Kulturüberstand positiver pPIC9K-KPep und pPIC9K-PlaPep Transformanden zeigten in einer Western Blot Analyse, dass das rekombinante Enzym mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa bei pPIC9K-KPep und mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa bei pPIC9K-PlaPep exprimiert und sekretiert wurde. Allerdings zeigten die pPIC9K-PlaPep Transformanden keine stärkeren Proteinbanden des rekombinanten Proteins in einer Western Blot Analyse im Vergleich zu den pPIC9K-KPep Transformanden. Die zusätzliche PLA₂ Domäne hat nicht zu einer besseren Expression des rekombinanten Proteins geführt. Daher wurde der Kulturüberstand der pPIC9K-KPep Transformanden für eine Reinigung des rekombinanten Enzyms mittels FPLC verwendet. Das gereinigte Enzym wies nur eine schwache spezifische Peptidaseaktivität von 159 mU L⁻¹ im Gly-Pro p-Nitroanilid Assay auf.

Abstract

Using the pYSK7-based expression system, attempts were made to express three serine peptidases from *Wolfiporia cocos* and *Rhizopertha dominica* heterologously and homologously from *Coprinopsis cinerea* by the expression organism *C. cinerea*. For this purpose, the expression vector pYSK7 was modified, in which the gene of interest is under the control of the *gpdII* promoter and the *lcc1* terminator. The expression vectors were cloned by means of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. To express the serine peptidase from the brown rot fungus *W. cocos*, a total of four expression vectors (pYMS1, 2, 3 and 11c) were cloned and *C. cinerea* was transformed with them. pYMS1 used the native WcOPsP signal peptide and the prosequence. In pYMS2 the native WcOPsP signal peptide was replaced by the Lcc1 signal peptide and in pYMS3 the Lcc1 signal peptide was also used, but without the WcOPsP prosequence. The culture supernatant of the pYMS1, 2 and 3 transformants showed neither peptidase activity in a Z-Gly-Pro-4-nitroanilide-peptidase-specific assay on different days, nor a clear detection of the recombinant protein by using polyclonal anti-WcOPsP antibodies in a Western blot Analysis. Only through the transformation of *C. cinerea* by the expression vector pYMS11c, in which the homologous signal peptide of the serine peptidase EAU91794, the native WcOPsP prosequence and a C-terminal recombinant histidine tag was used, the recombinant WcOPsP could be specifically detected in the culture supernatant by using of Western blot analysis. However, no peptidase activity could be determined in the culture supernatant by means of the Z-Gly-Pro-4-nitroanilide-peptidase-specific assay. A sufficient amount of recombinant protein for characterization or other studies could not be purified.

For the expression of the serine peptidase from *R. dominica*, four expression vectors were also cloned (pYMS5, 6, 7 and 13c) and *C. cinerea* was transformed with them. Here pYMS5 used the synthetic *rdot3* gene. Because this does not have any introns, an intron from *Agaricus bisporus* was added to pYMS6 between the *gpdII* promoter and the start of the *rdot3* gene. In pYMS 7, the synthetic gene was linked N-terminally with the Lcc1 signal peptide from pYSK7. The culture supernatant of the pYMS5, 6 and 7 transformants showed no higher peptidase activity compared to the negative controls in the azocasein assay. The potential hydrolysis of the prosequence by means of factor Xa did not lead to any increased peptidase activity in the culture supernatant. A further expression vector pYMS13c was therefore cloned

in which the homologous signal peptide of the serine peptidase EAU91794 and a recombinant C-terminal histidine tag were also used. Furthermore, an intron from *A. bisporus* was inserted between the *gpdII* promoter and the start of the EAU91794 signal peptide. In the culture supernatant of the pYMS13c transformants, no recombinant protein could be detected by using the histidine tag in the Western blot analysis.

Since the expression of heterologous peptidases showed no peptidase activity in supernatant of *C. cinerea*, an attempt was therefore made to express an endogenous serine peptidase (EAU91794) homologously in *C. cinerea* using the pYSK7-based expression system. To express the serine peptidase from *C. cinerea*, a total of three expression vectors (pYMS15, 15c and 25) were cloned and *C. cinerea* was transformed with them. Here pYMS15 uses the native gene of EAU91794 under the control of the *gpdII* promoter and the *lcc1* terminator. A recombinant C-terminal histidine tag was added to pYMS15c and the native signal peptide of EAU91794 was replaced by the Lcc1 signal peptide with an additional Kozak sequence and a recombinant C-terminal histidine tag was added to pYMS25. The culture supernatant of the pYMS15 transformants showed an increased peptidase activity in the azocasein assay compared to the negative controls. Since the native peptidase activity could not be differentiated from the potential recombinant peptidase activity, pYMS15c was cloned and *C. cinerea* was transformed with it. In the culture supernatant of the pYMS15c transformants, it was possible to show by means of Western blot analysis that the recombinant enzyme was successfully expressed and secreted. The recombinant protein was purified by FPLC, which showed that the peptidase activity does not correlate with the presence of the recombinant protein. In addition, the expression vector pYMS25 was provided with an additional Kozak sequence in order to increase the translation rate of the mRNA. The culture supernatant of the pYMS25 transformants also showed bands of the recombinant protein in the Western blot analysis, which showed that the EAU91794 was also secreted when using the Lcc1 signal peptide. However, the pYMS25 transformants did not show any stronger bands of the recombinant protein compared to the pYMS15c transformants, which showed that the additional Kozak sequence did not lead to an increased amount of recombinant protein.

Using another enzyme was a further attempt to homologously express a laccase using *C. cinerea*. Since some laccases could already be homologously expressed in *C. cinerea*, this work concentrated on a laccase that had not previously been recombinantly expressed. For

this purpose, the expression vector pYMS33, in which the *lcc8* gene is under the control of the *gpdII* promoter, the *lcc1* signal peptide and the *lcc1* terminator, was cloned. A pYMS33 transformant showed laccase activity on ABTS plates and in liquid culture, although cultivation was carried out under conditions in which no native laccases are expressed. In addition, the integration of the *lcc8* expression cassette was confirmed by means of PCR. Therefore, the culture supernatant was used for gel electrophoresis and the laccase activity was specifically stained. The protein bands were sequenced and identified as Laccase8. The Lcc8 was purified by FPLC and then characterized biochemically. A specific activity of 46.3 U mg⁻¹ could be reached. The molecular weight of the Lcc8 was 64 and 77 kDa, with deglycosylation showing that up to 10% of the molecular weight originated from glycosylation. The optimal pH range for catalytic activity was between 4 and 5. The Lcc8 had a high thermal stability of up to 300 min at 50°C. The optimal temperature was 54-63°C, while the pI was 3.3 and 3.4. K_m and K_{cat} were also determined for ABTS and DMP.

In addition, an alternative expression organism was used for the recombinant expression of peptidases. The serine peptidase Rdo_c6991 from *R. dominica* should be expressed heterologously by *Pichia pastoris*. For this purpose, the expression strain GS115 and the expression vector pPIC9K were purchased commercially in order to express the peptidase Rdo_c6991. The expression vectors pPIC9K-KPep and pPIC9K-PlaPep were designed for this. In pPIC9K-KPep, the *rdo_c6991* gene is under the control of the AOX1 promoter, the α -factor secretion signal, an additional Kozak sequence and the AOX1 terminator, with a recombinant C-terminal histidine tag being added. In pPIC9K-PlaPep, the same structure of the expression cassette was used as in pPIC9K-KPep, with a phospholipase A₂ (PLA₂) domain being added between the α -factor secretion signal with the additional Kozak sequence and the *rdo_c6991* gene to facilitate secretion and thus to optimize the yield of recombinant expression. The culture supernatant of positive pPIC9K-KPep and pPIC9K-PlaPep transformants showed in a Western blot analysis that the recombinant enzyme is expressed and secreted with a molecular weight of approx. 70 kDa for pPIC9K-KPep and a molecular weight of approx. 100 kDa for pPIC9K-PlaPep. However, the pPIC9K-PlaPep transformants did not show any stronger protein bands of the recombinant protein in a Western blot analysis compared to the pPIC9K-KPep transformants. The additional PLA₂ domain did not lead to a better expression of the recombinant protein. The culture supernatant of the pPIC9K-KPep transformants was

therefore used for purification of the recombinant enzyme by FPLC. The purified enzyme had only a weak specific peptidase activity of 159 mU L^{-1} in the Gly-Pro p-nitroanilide assay.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | Einleitung | 19 |
| 1.1 | Mikroorganismen als Expressionsplattform..... | 19 |
| 1.2 | Prokaryoten als Expressionsplattform | 19 |
| 1.3 | Eukaryoten als Expressionsplattform | 20 |
| 1.4 | <i>Coprinopsis cinerea</i> als Expressionsplattform | 21 |
| 1.5 | Struktur eukaryotischer Gene | 23 |
| 1.6 | Expression eines Gens | 25 |
| 1.6.1 | Laccasen | 27 |
| 1.6.2 | Peptidasen | 28 |
| 1.6.2.1 | Serinpeptidasen..... | 28 |
| 1.6.2.2 | Prolyl-spezifische Peptidasen | 28 |
| 1.7 | Anwendungsbereiche für Peptidasen | 29 |
| 1.8 | Auswirkung nativer Peptidasen auf rekombinante Expression | 30 |
| 1.9 | Zielsetzung dieser Arbeit..... | 30 |
| 2 | Material und Methoden: | 31 |
| 2.1 | Material | 31 |
| 2.1.1 | Mikroorganismen | 31 |
| 2.1.2 | Oligonukleotide | 32 |
| 2.1.3 | Vektoren..... | 37 |
| 2.1.4 | Antibiotika und Selektionszusätze..... | 38 |
| 2.1.5 | Größenstandards Gelelektrophorese..... | 38 |
| 2.1.6 | Molekularbiologische Kits | 39 |
| 2.1.7 | Enzyme/Proteine | 39 |
| 2.1.8 | Chemikalien | 40 |
| 2.1.9 | Geräte und Materialien | 45 |
| 2.1.10 | Software und Webseiten..... | 47 |
| 2.2 | Methoden..... | 48 |
| 2.2.1 | Kultivierungsarbeiten | 48 |
| 2.2.1.1 | Kultivierung von <i>E. coli</i> JM109..... | 49 |
| 2.2.1.2 | Kultivierung <i>S. cerevisia</i> RH1385 und <i>P. pastoris</i> GS115 | 49 |
| 2.2.1.3 | Kultivierung <i>C. cinerea</i> FA2222..... | 50 |
| 2.2.1.4 | Messung OD ₆₀₀ als Wachstumsnachweis | 52 |
| 2.2.2 | Molekularbiologische Methoden | 52 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.2.2.1 | Isolation von Vektor DNA aus <i>E. coli</i> | 52 |
| 2.2.2.2 | Isolation Vektor DNA aus Hefen | 53 |
| 2.2.2.3 | Isolation genomischer Pilz-DNA | 54 |
| 2.2.2.4 | Isolation von DNA für Kolonie-PCR..... | 55 |
| 2.2.2.5 | Polymerase Kettenreaktion (PCR) | 56 |
| 2.2.2.6 | Restriktionsverdau..... | 57 |
| 2.2.2.7 | Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> JM109 Zellen | 58 |
| 2.2.2.8 | Transformation <i>E. coli</i> | 58 |
| 2.2.2.9 | Transformation Hefe RH1385 (homologe Rekombination) | 59 |
| 2.2.2.10 | Transformation <i>C. cinerea</i> FA2222 | 59 |
| 2.2.2.11 | Herstellung elektrokompenter <i>P. pastoris</i> GS115..... | 60 |
| 2.2.2.12 | Elektroporationstransformation <i>P. pastoris</i> GS115 | 60 |
| 2.2.2.13 | Kryokulturen | 61 |
| 2.2.2.14 | Proteinextraktion aus Pilzmyzel | 61 |
| 2.2.2.15 | Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford..... | 61 |
| 2.2.2.16 | Unspezifischer Peptidase Assay mit Azocasein | 61 |
| 2.2.2.17 | Spezifischer Serinpeptidase-Assay | 62 |
| 2.2.2.18 | Laccase Assay..... | 63 |
| 2.2.2.19 | Nukleotid-Sequenzierung..... | 64 |
| 2.2.3 | Gelelektrophoretische Methoden..... | 64 |
| 2.2.3.1 | Agarose-Gelelektrophorese | 64 |
| 2.2.3.2 | SDS-PAGE..... | 64 |
| 2.2.3.3 | Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen..... | 65 |
| 2.2.3.4 | Western Blot Analyse | 66 |
| 2.2.3.5 | Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 67 |
| 2.2.3.6 | Laccase-Zymogram | 67 |
| 2.2.3.7 | Deglykosylierung | 68 |
| 2.2.4 | Proteinreinigung..... | 68 |
| 2.2.4.1 | FPLC Reinigung mittels HisTrap™ HP Säule | 68 |
| 2.2.4.2 | Reinigung der Laccase Lcc8 mittels FPLC..... | 68 |
| 2.2.4.3 | Protein-Sequenzierung mittels nano-LC-MS/MS | 69 |
| 2.2.5 | Biochemische Methoden..... | 69 |
| 2.2.5.1 | Biochemische Charakterisierung Lcc8..... | 69 |
| 2.2.5.2 | Berechnung K_{cat} für Lcc8..... | 70 |

| | | |
|----------|---|---|
| 3 | Durchführung und Ergebnisse | 70 |
| 3.1 | Expression der Laccase Lcc1 in <i>C. cinerea</i> mittels pYSK7: | 70 |
| 3.2 | Expression zweier Peptidasen mit Hilfe des pYSK7 basierten Expressionssystem in <i>C. cinerea</i> 71 | |
| 3.2.1 | Expression <i>Wolfiporia cocos</i> Prolyl-spezifische Peptidase (WcOPsP) | 71 |
| 3.2.2 | Expression der WcOPsP mit homologem Signalpeptid einer Serinpeptidase..... | 78 |
| 3.2.3 | Expression der <i>Rhizopertha dominica</i> Serinpeptidase (RdoT3) | 82 |
| 3.2.4 | Expression der RdoT3 mit homologem Signalpeptid einer Serinpeptidase | 86 |
| 3.3 | Homologe Expression einer Serinpeptidase..... | 88 |
| 3.3.1 | Expression der Serinpeptidase EAU91794 | 88 |
| 3.3.2 | Auswirkungen einer zusätzlichen Kozak-Sequenz und der Verwendung des <i>lcc1</i> - Signalpeptids auf die Expression der EAU91794 | 97 |
| 3.4 | Expression der Laccase Lcc8 in <i>C. cinerea</i> mittels pYSK7: | 100 |
| 3.5 | Expression einer Insektenpeptidase mittels <i>Pichia pastoris</i> GS115..... | 110 |
| 4 | Diskussion | 117 |
| 4.1 | Expression von Peptidasen mit <i>C. cinerea</i> | 117 |
| 4.2 | Expression der Lcc8 | 124 |
| 4.3 | Beurteilung pYSK7 basiertes Expressionssystem in <i>C. cinerea</i> | 129 |
| 4.4 | <i>Gene engineering</i> in filamentösen Pilzen | 130 |
| 4.5 | Expression einer Insektenpeptidase in <i>Pichia pastoris</i> GS115 | 135 |
| 4.6 | Fazit | 137 |
| 5 | Anhang: | 139 |
| 6 | Referenzen | Fehler! Textmarke nicht definiert. |

Abkürzungsverzeichnis

ABTS = 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin-6-sulfonsäure)

APS = Ammoniumperoxodisulfat

AU = Arbitrary Unit

BSA = bovine serum albumin

DHPPA = 3,4-dihydroxyhydrocinnamin Säure

DMP = 2,6-Dimethoxyphenol

cDNA = kodierende DNA

gDNA = genomische DNA

ssDNA = einzelsträngige DNA

EDTA = Ethylen-diamintetraessigsäure (Dinatriumsalz, Dihydrat)

FDA = Food and Drug Administration

GFP = Grün fluoreszierendes Protein

GRAS = *generally recognized as safe*

Guajakol = 2-Methoxyphenol

HIC = Hydrophobeinteraktionschromatography

HRP = Meerrettich-Peroxidase

IEF = Isoelektrische Fokussierung

KOAc = Kalium Acetat

LiOAc = Lithium Acetat

MBTH = 3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon Hydrochlorid

PAA = Polyacrylamid

PAGE = Polyacrylamid Gelelektrophorese

PLA₂ = Phospholipase A₂ Domäne

PsP = Prolyl spezifische Peptidase

PVDF = Polyvinylidenfluorid

PEG = Polyethylenglykol

mRNA = messenger RNA

SDS = Natriumdodecylsulfat

SGZ = 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehydazin

SV = Säulenvolumen

TEMED = Tetramethylenethyldiamin

TRIS = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid

TSS = Transkriptionsstartstelle

UPR = *“unfolded proteine response“*

UTR = untranslatierte Region

WcOPsP = Prolyl spezifische Peptidase mit Ursprung aus *Wolfiporia cocos*

1 Einleitung

1.1 Mikroorganismen als Expressionsplattform

Mikroorganismen spielen eine sehr wichtige Rolle in unserem Leben. Sie können zur Produktion von Lebensmitteln wie zum Beispiel Brot, Käse oder Brauereierzeugnissen verwendet werden (Fox et al., 2004; Ivey and Phister, 2011; Ray and Montet, 2015). Hierbei sind es vor allem Enzyme, die durch Mikroorganismen produziert werden und diese zu außergewöhnlichen StoffwechsellLeistungen befähigen, welche sich der Mensch zu Nutze gemacht hat. Die Biotechnologie förderte hierbei die Entwicklung von Methoden zur gentechnischen Veränderung von Mikroorganismen, sodass rekombinante Mikroorganismen gezielt spezifische Enzyme exprimieren können. So wird heute Rinder-Chymosin zur Käseherstellung vorwiegend durch einen rekombinanten *Escherichia coli* (*E. coli*) K-12 Stamm hergestellt. Das so produzierte Chymosin war das erste rekombinante Enzym, das durch die *Food and Drug Administration* (FDA) der Vereinigten Staaten für den Einsatz in Lebensmitteln zugelassen wurde (Flamm, 1991). Mittlerweile werden weitaus mehr Mikroorganismen zur Produktion rekombinanter Proteine genutzt. So wird zum Beispiel *Aspergillus niger* (*A. niger*) zur Expression von Phytasen, Chymosin und Lipasen sowie *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) zur Expression von Decarboxylasen, α -Amylasen und Pullulanasen genutzt wie Übersichtsartikel darlegen (Olempska-Beer et al., 2006).

1.2 Prokaryoten als Expressionsplattform

Seit den 1970er Jahren wurde intensiv an der Verwendung von *E. coli* zur Expression rekombinanter Enzyme und den Kultivierungsbedingungen geforscht, um eine maximale Produktionseffizienz zu erreichen (Shiloach and Fass, 2005). Hierbei wurden viele Aspekte der Proteinexpression, wie Promotorsequenzen, mRNA Stabilität, Proteinfaltung oder Proteinsekretion, untersucht (Baneyx, 1999). Dennoch hat die rekombinante Expression mittels *E. coli* auch Nachteile. Zum Beispiel können bei der rekombinanten Expression mittels *E. coli* Endotoxine co-produziert werden (Wakelin et al., 2006). Wird *E. coli* dann zur Produktion von Medikamenten genutzt, können Patienten, denen die Medikamente verabreicht werden, mit einer Immunantwort reagieren (Mamat et al., 2015). Es ist in solchen Fällen daher nötig das rekombinante Produkt von Endotoxinen zu reinigen bevor es verwendet werden kann (Petsch, 2000). Ebenso wird das heterologe Produkt häufig nicht

sekretiert, sondern mittels „*inclusion bodies*“ ausgeschleust (Chen et al., 1989). *B. subtilis* ist wie *E. coli* ein Prokaryot und wird ebenfalls bei der Herstellung von industriellen Enzymen, Insektiziden, pharmazeutischen Proteinen, Antibiotika als auch Purinnukleotiden, die als Geschmacksverstärker verwendet werden, eingesetzt (Harwood, 1992; Schallmey et al., 2004; Westers et al., 2004; Olempska-Beer et al., 2006). *B. subtilis* besitzt gegenüber *E. coli* den Vorteil, dass es rekombinante Produkte an das Kultivierungsmedium abgeben kann, aber auch Nachteile wie eine geringere Vektorstabilität und geringere Produktausbeuten (Li et al., 2004). Bei beiden prokaryotischen Wirten muss allerdings auch mit Beeinträchtigungen gerechnet werden. So treten bei der Expression von eukaryotischen Proteinen in einem Prokaryoten immer wieder Probleme auf. Daher wurden auch höhere Mikroorganismen auf ihr Potential rekombinante Proteine zu exprimieren hin untersucht.

1.3 Eukaryoten als Expressionsplattform

Hefen sind durch ihren langjährigen Einsatz im Back- und Brauereihandwerk schon sehr lange bekannt. Ebenso wie bei *E. coli* begann die Entwicklung von Methoden zur genetischen Modifikation in den 1970er Jahren. Seither wurden zahlreiche Proteine in verschiedenen Hefestämmen exprimiert (Cereghino and Cregg, 2000). Es gibt hierbei verschiedene Hefestämme, die alle ihre eigenen Vor- und Nachteile besitzen (Gellissen and Hollenberg, 1997). Die Hefe *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) entwickelte sich hierbei zu einem sehr erfolgreichen Expressionssystem für zahlreiche heterologe Proteine. Die zunehmende Popularität von *P. pastoris* ist zurückzuführen auf: (a) die Einfachheit, mit der es möglich ist *P. pastoris* in großem Maßstab zu kultivieren und es genetisch zu manipulieren; (b) seine Fähigkeit, fremde Proteine entweder intrazellulär oder extrazellulär in hohen Konzentrationen zu produzieren; (c) seine Fähigkeit wichtige posttranslationale Modifikationen, wie proteolytische Prozessierung, Faltung, Bildung von Disulfidbindungen und Glykosylierung, an eukaryotischen Proteinen durchzuführen; und (d) seine Verfügbarkeit innerhalb von kommerziellen Baukastensystemen (engl. *Kits*) zur Proteinexpression (Cereghino et al., 2001). Aufgrund dieser vielen Vorteile konnten seit 1985 zahlreiche rekombinante Proteine erfolgreich mit der Hefe *P. pastoris* produziert werden (Cereghino and Cregg, 2000; Karbalaei et al., 2020), darunter auch einige Proteine die von Interesse für die Lebensmittelindustrie sind, wie zum Beispiel *carrot antifreeze protein* zu besseren Gefrierbarkeit von Teig (Liu et al.,

2018) oder Transglutaminasen um Fleischqualität zu verbessern (Liu et al., 2018; Yang and Zhang, 2019), indem sie kovalente Modifikationen von Proteinen in industriellen Lebensmitteln katalysieren, was die Form, Wasserlöslichkeit und Wasserspeicherkapazität beeinflussen kann.

Unter den filamentösen Pilzen der Abteilung Asco- und Basidiomycota, die als höhere Pilze gelten, befinden sich auch diverse *Aspergillus* Spezies/Arten. *A. oryzae* wird bereits seit Jahrtausenden für das Brauereihandwerk der Sake Herstellung verwendet (Yoshizawa, 1999). *A. oryzae* sekretiert Amylasen, die die Stärke im Reis hydrolysieren und Glukose freisetzen, welche dann wiederum von Hefen zu Alkohol fermentiert wird. Die multizellulare Morphologie der filamentösen Pilze, die dicken Chitin-haltigen Zellwände und das Fehlen von Vektoren führten zu Schwierigkeiten bei der Entwicklung von Methoden zur genetischen Modifikation der *Aspergillus* Stämme und anderer filamentöser Pilze und damit zur industriellen Nutzung um rekombinante Enzyme zu produzieren. 1982/83 konnte *Aspergillus* erstmals erfolgreich transformiert werden (Ballance et al., 1983; Tilburn et al., 1983). Seither wurden verschiedene *Aspergillus* Arten für die rekombinante Expression von Enzymen verfügbar gemacht und mehr als 300 Gene kloniert und exprimiert (Punt et al., 2002; Lubertozi and Keasling, 2009). Obwohl die Stämme *A. niger* und *A. oryzae* von der FDA als „*generally recognized as safe*“ (GRAS) angesehen werden, weist zum Beispiel *A. oryzae* Gene auf, die für die Expression von Aflatoxin benötigt werden (Tominaga et al., 2006). Die Gencluster zur Synthese von Aflatoxin sind allerdings unvollständig oder inaktiv aufgrund von zahlreichen Mutationen (Matsushima et al., 2001).

1.4 *Coprinopsis cinerea* als Expressionsplattform

Coprinopsis cinerea (*C. cinerea*) gehört zur Abteilung der Basidiomycota und dient in Thailand auch als Speisepilz. Er besitzt daher den GRAS Status. Er gehört zur Gattung der Tintlinge und lässt sich schnell und relativ günstig im Labormaßstab kultivieren (Abbildung 1).



Abbildung 1: Bild von *C. cinerea*. Links = Plattenkultivierung, rechts = Flüssigkultivierung.

Das Genom von *C. cinerea* ist sequenziert (Stajich et al., 2010; Nordberg et al., 2014) und es gibt Methoden ihn gentechnisch zu verändern (Binnering et al., 1987; Granado et al., 1997; Dörnte and Kües, 2012). Die Transformation von *C. cinerea* erfolgt meistens über eine Ko-Transformation, bei der der Vektor pCc1001 (Binnering et al., 1987) eingesetzt wird. pCc1001 komplementiert die Tryptophan Auxotrophie mancher *C. cinerea* Stämme, wie zum Beispiel die des Stammes FA2222. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Transformation von *C. cinerea* mit pCc1001 allein oder in einer Ko-Transformation mit anderen Plasmiden paradoxe Phänomene auftreten, die die Anzahl von Transformanten betreffen (Dörnte and Kües, 2016). Bei einer Ko-Transformation konkurriert das *trp* Gen, das für eine Tryptophan-Synthase codiert, aus pCc1001 mit dem Gen von Interesse aus dem Expressionsvektor um Integrationsstellen im Genom. Dies führt dazu, dass im Verhältnis weniger *trp* Gene integriert werden, als bei einer Transformation nur mit pCc1001. Werden viele *trp* Gene integriert, führt dies zu einer Überproduktion von Tryptophan, was wiederum die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren reduziert, was fatale Folgen für einen Transformanten haben kann. Nichts desto trotz konnten bereits mit Hilfe des Expressionsvektors pYSK7 in einer Ko-Transformation mit pCc1001 mehrere Laccasen homolog (Kilaru et al., 2006a; Kilaru et al., 2006b) und eine Aryl-Alkohol Oxidase heterolog exprimiert werden (Galperin et al., 2016). Weiterhin konnten mit Hilfe der pCc1001 Ko-Transformation eine heterologe Cellulase (Cheng et al., 2009), heterologe immunmodulatorische Proteine (Han et al., 2010) und eine heterologe Xylanase (Kikuchi et al., 1999) in *C. cinerea* rekombinant exprimiert werden. Während es für die Expressionsorganismen *E. coli*, *B. subtilis*, *P. pastoris* oder *A. niger* zahlreiche Veröffentlichungen über rekombinante Expression gibt und wie dessen Effizienz gesteigert werden kann, gibt es im Vergleich dazu nur wenige Veröffentlichungen zur rekombinanten Expression in *C. cinerea*. Daher bedarf es weiterer Grundlagenforschung, um

C. cinerea zu einem zuverlässigen Expressionsorganismus zu etablieren. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Introns für die erfolgreiche Expression von GFP notwendig sind (Burns et al., 2005). Mittels *GFP Reporter Assay* konnte ein neuer Promotor *CcDED1_{pro}* identifiziert werden, der eine siebenmal höhere Aktivität als der *GPD2* Promotor aufwies. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems gezieltes Genom Editierung in *C. cinerea* möglich ist, was zur Entwicklung verbesserter Expressionsstämme verwendet werden kann (Sugano et al., 2017). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine Änderung der Signalpeptid Sequenz von Serin-Arginin zu Lysin-Arginin zu einer effizienteren Sekretion einer Xylanase in *C. cinerea* führte (Kikuchi et al., 2004), was die Anwesenheit einer KEX2 ähnlichen Peptidase vermuten lässt.

Im Vergleich zu anderen Expressionsplattformen wie Bakterien, einzelligen Pilzen (Hefe), Insektenzellen oder Säugetierzelllinien, zeigen die filamentösen Pilze Eigenschaften, die sie als gute Expressionsplattform auszeichnen. Sie wachsen zwar langsamer als Bakterien und einzellige Pilze, aber schneller als Insektenzellen oder Säugetierzelllinien und das bei geringeren Kosten für das Kultivierungsmedium. Die rekombinante Expression lässt sich durch induzierbare, aber auch konstitutive Promotoren steuern und nur manche Stämme sind proteolytisch aktiv, was sich negativ auf die Effizienz der rekombinanten Expression auswirken kann. Proteine aus höheren Eukaryoten, lassen sich am ehesten in höheren Eukaryoten exprimieren, da sie dann eher korrekt posttranslational modifiziert werden (Kraševac and Benčina, 2016). Das *C. cinerea* pYSK7 basierte Expressionssystem stellt daher eine vielversprechende Möglichkeit zur rekombinanten Expression dar.

1.5 Struktur eukaryotischer Gene

Ein Gen ist eine codierende Einheit für ein spezifisches Protein. Es besitzt eine typische Abfolge von Genabschnitten, die unterschiedliche Funktionen haben (Abbildung 2).

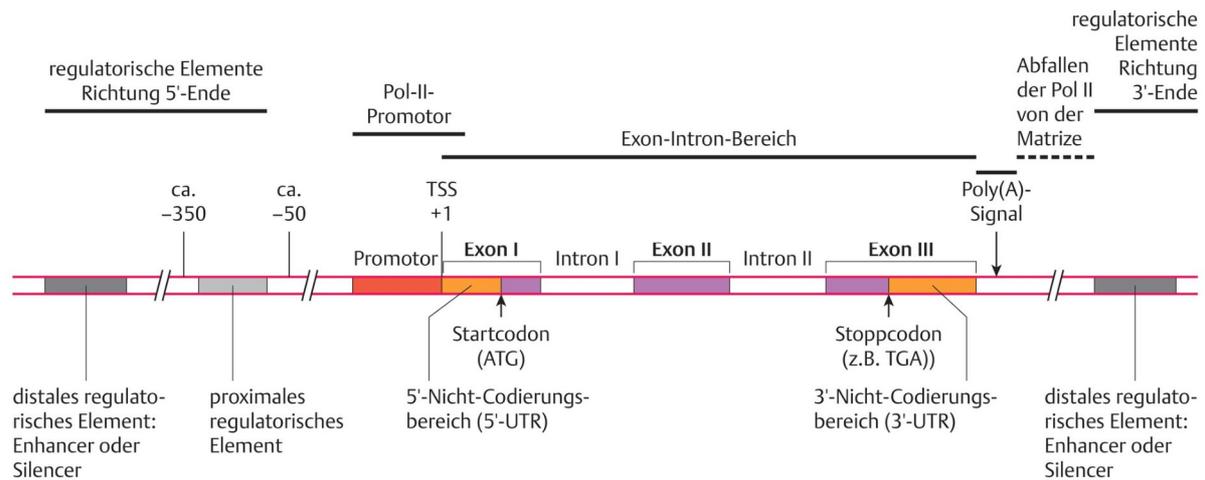


Abbildung 2: Generelle Struktur eines Gens. +1 ist das erste Nukleotid an der Transkriptionsstartstelle (TSS), das transkribiert wird. Mit ihm beginnt die entstehende mRNA. -50 und -350 bezeichnen Nukleotidpositionen oberhalb des Transkriptionsstarts. Der Nicht-Codierungsbereich (UTR, *untranslated region*) ist jeweils ein Abschnitt auf der RNA, der nicht translatiert wird (vor dem Start- bzw. nach dem Stoppcodon). Als distale regulatorische Elemente werden Enhancer oder Silencer bezeichnet, die entweder in 5'- oder 3'-Richtung mit variabler Entfernung zum Promotor positioniert sind (Dröge et al., 2018)(Erlaubnis zur Darstellung wurde eingeholt).

Für eine erfolgreiche Expression rekombinanter Gene können die Genabschnitte Promotor, Gen von Interesse und Terminator eine sehr wichtige Rolle spielen. Der Promotor besteht aus *Downstream Promotor Element* (DPE), TATA-Box und *Transcription Start Site* (TSS) (Solovyev et al., 2010) und dient der Rekrutierung der RNA-Polymerase. Das Gen von Interesse, das bei Eukaryoten aus Exons (codierender Genabschnitt) und Introns (nicht-codierender Genabschnitte) besteht, codiert die Aminosäuresequenz für das rekombinant zu exprimierende Protein und der Terminator dient der Ablösung der RNA-Polymerase von der DNA-Matrize. Darüber hinaus spielt das Signalpeptid ebenfalls eine wichtige Rolle für die Sekretion und Faltung des Proteins. Es wird in n-, h- und c- Regionen unterteilt (Heijne, 1990). Das Signalpeptid wird in der Regel durch die ersten 27-36 Nukleotide der cDNA codiert. Es besteht meistens aus einer Pre-Sequenz, welche für den Transport des Proteins verantwortlich ist, und eine Pro-Sequenz, welche für die Faltung des Proteins benötigt wird. Ebenso spielt das Start Codon eine wichtige Rolle, da es den Start der Translation markiert. Es gibt Beispiele für die rekombinante Proteinexpression in *C. cinerea*, bei denen diese Elemente (Promotor, Signalpeptid, Start-Codon (Kozak-Sequenz) und das Intron gezielt ausgetauscht oder dupliziert wurden oder deren Anwesenheit für die erfolgreiche Expression nötig war (Kikuchi et al., 2004; Burns et al., 2005; Leonhardt et al., 2016; Sugano et al., 2017).

1.6 Expression eines Gens

Die Expression eines Gens startet mit der Transkription. Diese teilt sich in drei Phasen, die Initiation, Elongation und Termination (Abbildung 3). Während der Initiation rekrutiert der Promotor eine RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktoren. Diese bilden einen Komplex (Initiation), der die RNA-Polymerase aktiviert, sodass diese damit beginnen kann komplementär zur Sequenz des Matrizenstrangs einen RNA-Strang zu synthetisieren (Elongation). Dieser Prozess schreitet fort bis die RNA-Polymerase den Terminator Bereich erreicht, der durch seine Nukleotidabfolge dazu führt, dass die Polymerase den Transkriptionsprozess abbricht und die RNA frei gibt (Termination).

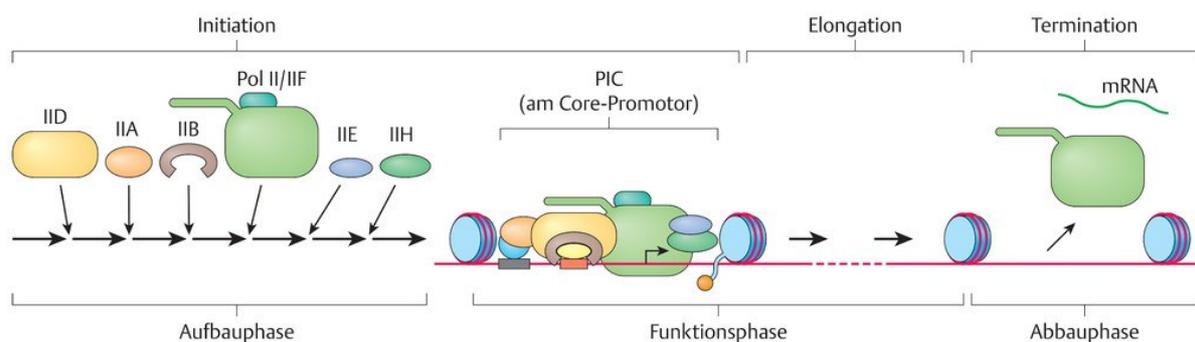


Abbildung 3: Drei Phasen der Transkription. Am Beispiel eines Pol-II-Gens ist der Transkriptionsprozess in drei Phasen unterteilt: Initiation, Elongation und Termination. In der Initiationsphase wird der Präinitiationskomplex (PIC) am Core-Promotor aufgebaut. Dazu interagieren die generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFII E, TFII F und TFII H mit der Pol II und binden gemeinsam am Core-Promotor. Mit der dort stattfindenden Ausbildung des offenen Komplexes, in dem lokale Aufschmelzung der DNA-Doppelhelix erfolgt (nicht gezeigt), wird die transkriptionelle Aktivität der Pol II gestartet und geht in die Elongationsphase über. Am Ende eines Gens wird die synthetisierte RNA freigesetzt und die Pol-II-Maschinerie löst sich von der DNA. (nach Coulon A, Chow CC, Singer RH et al (2013) Eucaryotic transcriptional dynamics: from single molecules to cell populations. Nat Rev Genet 14: 572–584)(Dröge et al., 2018)(Erlaubnis zur Darstellung wurde eingeholt).

Die RNA, sofern sie proteinkodierend ist, wird als prä-mRNA bezeichnet. Die prä-mRNA wird als nächstes prozessiert (Abbildung 4). Hierzu zählt das *Capping* des 5'-Endes und die Polyadenylierung des 3'-Endes des mRNA-Strangs. Zudem werden die Introns durch das Spleißen entfernt.

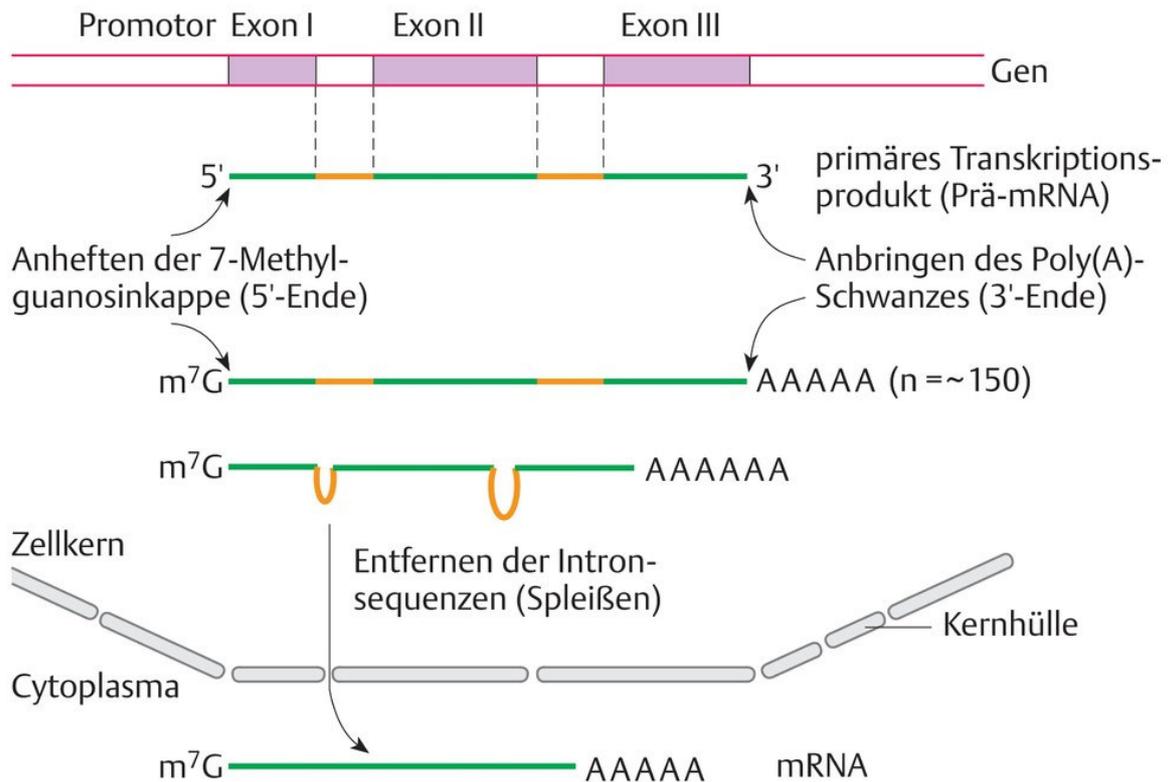


Abbildung 4: Schritte der Prozessierung, die eine prä-mRNA zur reifen mRNA entwickeln. Diese Abbildung soll nur einen Einblick in das Geschehen zwischen Transkription im Kern und dem Auftauchen der reifen mRNA im Cytoplasma geben. Am wichtigsten ist hier: Das gesamte proteincodierende Gen, Exons und Introns, wird transkribiert, sodass ein langes primäres Transkriptionsprodukt entsteht, auch prä-mRNA genannt. Bereits während der Transkription, wie auch nach deren Abschluss, finden Prozessierungsschritte statt: Veränderungen am 5'-Ende (Capping) und am 3'-Ende (Polyadenylierung) sowie das Herausschneiden der Intronsequenzen (Spleißen). Diese Reaktionen finden im Zellkern statt. Erst die derart prozessierte mRNA erscheint im Cytoplasma (Dröge et al., 2018)(Erlaubnis zur Darstellung wurde eingeholt).

Die prozessierte prä-mRNA wird dann als mRNA bezeichnet und steht für die Translation bereit. Während der Translation wird die mRNA in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Hierbei erkennen verschiedene Initiationsfaktoren unterschiedliche Bereiche der mRNA wie zum Beispiel die Ribosomenbindestelle, die in Eukaryoten auch Kozak-Sequenz genannt wird. An dieser Stelle beginnt das Ribosom die Translation der mRNA und baut der Codon-Anticodon-Erkennung gemäß tRNA ein und verknüpft die durch die tRNA bereitgestellten Aminosäuren mittels Peptidbindung miteinander, sodass ein Polypeptid entsteht. Diese Polypeptidkette wird anschließend noch posttranslational modifiziert. Hierzu zählen die Faltung von Proteinen mittels Chaperone, um die korrekte tertiäre Struktur der Proteine zu gewährleisten, die Markierungen der Proteine mit Ubiquitin, um die Halbwertszeit zu regulieren, die Hydrolyse des Signalpeptids bei der Sekretion, die Hydrolyse der Prosequenz sobald das Enzym den

Bestimmungsort erreicht hat, um eine frühzeitige Aktivierung des Enzyms zu verhindern, sowie die Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und das Anheften von Zuckerresten (Glykosylierung) (Nordheim and Knippers, 2018). Die korrekt gefaltete und modifizierte Polypeptidkette wird als Protein bezeichnet.

1.6.1 Laccasen

Laccasen gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen (EC 1.x) und zur Superfamilie der kupferhaltigen Oxidasen, welche in zahlreichen Bakterien, Pilzen, Insekten und Pflanzen gefunden wurden (Forootanfar and Faramarzi, 2015). Sie können ein breites Spektrum an Verbindungen oxidieren wie mono-, di-, poly- und Methoxyphenole, aromatische und aliphatische Amine, Hydroxyindole, Benzolthiole, Kohlenhydrate und anorganische/organische Metallverbindungen (Giardina et al., 2010; Jeon et al., 2012; Karaki et al., 2016). Die Laccasen zeigen damit ein großes katalytisches Potential, welches auch in der Industrie Verwendung findet. Sie werden unter anderem in der Industrie für das Bleichen von Textilien (Camarero et al., 2004), zum Zellstoffbleichen (Palonen and Viikari, 2004), zur Lebensmittelverbesserung (Minussi et al., 2002), zur biologische Entgiftung von Böden und Wasser (Wesenberg, 2003), zur Polymersynthese (Marzorati et al., 2005) und zur Entwicklung von Biosensoren und Biokraftstoffzellen (Trudeau et al., 1997; Palmore and Kim, 1999) eingesetzt. Um die Produktion der Laccasen zu steigern, wurden zahlreiche Mikroorganismen als Expressionsplattform verwendet, um Laccasen rekombinant und damit effizienter zu produzieren (Kunamneni et al., 2008; Yang et al., 2017). Laccasen aus Pilzen sind von besonderem Interesse, da sie sowohl in intra- als auch extrazelluläre physiologische Prozesse einschließlich Delignifizierung, Morphogenese, Pigmentierung und Pathogenese involviert sind (Singh Arora and Kumar Sharma, 2010; Kües and Rühl, 2011; Forootanfar and Faramarzi, 2015). Hierbei sind vor allem die Weißfäulepilze zu nennen, die als effizienteste Ligninabbauer und Laccase-Produzenten bekannt sind (Couto and Toca-Herrera, 2007; Singh Arora and Kumar Sharma, 2010).

1.6.2 Peptidasen

Peptidasen gehören zur Klasse der Hydrolasen (EC 3.x) und sind Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren. Bei der Klassifizierung von Peptidasen werden unter anderen die Aminosäuren, welche im katalytischen Zentrum gelegen sind und maßgeblich an der Hydrolyse beteiligt sind, verwendet. Daraus ergeben sich sechs spezifische katalytische Typen, welche Serin, Threonin, Cystein, Asparagin-, Glutamin- und Metallopeptidasen genannt werden (Rawlings et al., 2007). Kommerziell verwendete Peptidasen werden von Rawling et al. (2007) mit Verweis auf die Datenbank MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) genannt.

1.6.2.1 Serinpeptidasen

Über ein Drittel aller bekannten Peptidasen gehören zu den Serinpeptidasen und machen so den größten Anteil an charakterisierten Peptidasen aus (Page and Di Cera, 2008). Hierbei sind die drei wichtigen katalytisch aktiven Aminosäuren Asparagin-Histidin-Serin, wobei das stark konservierte Serin namensgebend ist. Die Katalyse der Peptidhydrolyse beinhaltet die Aktivierung des Carbonyls über eine allgemeine Säure, die Aktivierung von Wasser mit einer allgemeinen Base und die Protonierung der Aminabgangsgruppe (Hedstrom, 2002). Serinpeptidasen kommen in allen lebenden Organismen vor und erfüllen eine Vielzahl von Funktionen, von *housekeeping*: z.B. Proteinreifung, Signalpeptidspaltung, Signaltransduktion, intrazellulärer Proteinumsatz, Immunantwort, Apoptose, Fortpflanzung (Hedstrom, 2002) und Cytochrom-Prozessierung in Mitochondrien bis hin zum Nährstoffabbau und Erwerb (Muszewska et al., 2017). Von den in MEROPS beschriebenen 54 Familien der Serinpeptidasen sind 21 in den Pilzen present (Muszewska et al., 2017), sodass Pilze eine interessante Quelle für Serinpeptidasen darstellen.

1.6.2.2 Prolyl-spezifische Peptidasen

Prolin ist eine Aminosäure, die einen Pyrrolidinring besitzt. Prolin-reiche Proteine sind aufgrund der sterischen Hinderung durch die Einbindung des Stickstoffatoms in den relativ starren Pyrrolidinrings und eine eingeschränkte Drehbarkeit der N-C Bindung sehr gut vor enzymatischem Verdau geschützt (Gass and Khosla, 2007). Prolyl-spezifische Peptidasen können dennoch die Peptidbindung zwischen Prolin und anderen Aminosäuren hydrolysieren.

Dies befähigt die Prolyl-spezifischen Peptidasen Polypeptide wie zum Beispiel Gluten zu hydrolysieren, was sie sehr interessant für die Herstellung von Gluten-freien Produkten und damit für die Lebensmittelindustrie macht (Mika et al., 2015). Gluten verursacht bei Patienten mit Zöliakie, eine unkontrollierte Immunantwort im Gastrointestinaltrakt (Stepniak et al., 2006). Pilze und Insekten sind hierbei vielversprechende Quellen von Prolyl-spezifischen Peptidasen (Mika et al., 2015).

1.7 Anwendungsbereiche für Peptidasen

Peptidasen sind eine wichtige Klasse der Enzyme. Sie finden große Anwendung in der Biologie, medizinischen Forschung und Biotechnologie (Rawlings et al., 2007). So werden sie zum Beispiel in der Lederindustrie zum Ablösen der Haare oder in Waschmitteln zur Entfernung von Flecken verwendet (Rawlings et al., 2007). Sie haben aber noch weitere Anwendungsmöglichkeiten, vor allem in der Lebensmittelindustrie. Hier können sie eingesetzt werden, um gezielt spezifische Peptide zu hydrolysieren. Bei der Produktion von Maggi Würze werden Peptidasen zur Hydrolyse von Weizenproteinen eingesetzt. Rekombinantes Chymosin hydrolysiert κ -Kasein und wird in der Käseherstellung (Vallejo et al., 2012) verwendet. Es stellt damit eine vegane Alternative zu den tierischen Lab Produkten dar (Kumar et al., 2010). Prolyl-spezifische Peptidasen können genutzt werden um glutenfreies Bier herzustellen (Kerpes et al., 2017), was von Interesse für Zöliakie Patienten ist. Molke, die in der Milch- und Käseindustrie anfallen, werden heutzutage als Proteinquelle angesehen. Durch die Behandlung von Molke mit proteolytischem Extrakt des Milchorangenbaums entstehen bioaktive Peptide, die unter anderem eine antioxidative Wirkung haben (Bertucci et al., 2015). Manche Lebensmittel besitzen von Natur aus bitter schmeckende Peptide oder erhalten diese durch den Herstellungsprozess. Solche Bitterstoffe können durch Peptidasen hydrolysiert werden, was zum besseren Geschmack der Lebensmittel beiträgt (Raksakulthai and Haard, 2003). Ebenso können Peptidasen dazu verwendet werden um Polypeptide aus Wein zu entfernen, um dadurch zur Klärung des Weins beizutragen (Ferreira et al., 2001). Allerdings gestaltet sich der Einsatz von Peptidasen hierbei als schwierig, da unter den Herstellungsbedingungen die meisten Peptidasen nicht aktiv sind.

1.8 Auswirkung nativer Peptidasen auf rekombinante Expression

Ein Problem bei der rekombinanten Expression von Proteinen können native Peptidasen spielen, die vom Expressionsorganismus synthetisiert werden. Die nativen Peptidasen können die rekombinanten Proteine degradieren, sodass nur eine geringe Ausbeute der rekombinanten Proteine erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute bei einer homologen Expression höher ist als bei einer heterologen Expression, da die nativen Peptidasen heterologe Proteine vermehrt degradieren (Archer and Peberdy, 1997; Gouka et al., 1997; van den Hombergh et al., 1997). Deletionsmutanten von endogenen Peptidasen im Wirt stellen eine Möglichkeit dar den Abbau heterologer Proteine zu minimieren. So führte in *A. oryzae* eine zehnfach Deletion nativer Peptidasen im Vergleich zu einer fünffach Deletion zu einer 30-35% höheren Ausbeute an rekombinanten Protein (Yoon et al., 2011). Hierbei wurde humanes Lysozom und Rinderchymosin rekombinant exprimiert.

Dorothea Güttel hat in ihrer Doktorarbeit zeigen können, dass *C. cinerea* unter anderem Serin-, Aspartat- und Metallopeptidasen exprimiert und sekretiert (Güttel, 2010). Es ist daher zu erwarten, dass vor allem bei heterologen Expressionversuchen in *C. cinerea* Degradation des rekombinanten Produkts auftreten kann.

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

In einzelnen Fällen konnten bereits mittels der gängigen Expressionsorganismen *E. coli* (Diefenthal et al., 1993), *B. subtilis* (Degering et al., 2010), *P. pastoris* (Jiang et al., 2016) und *A. nidulans* (Morita et al., 2009) einige Peptidasen produziert werden. Allerdings konnten noch keine Peptidasen mittels *C. cinerea* exprimiert werden. Die Grundsteine zur Verwendung von *C. cinerea* als Expressionsorganismus wurden bereits gelegt. In der vorliegenden Arbeit soll *C. cinerea* als Expressionssystem für Enzyme, die in der Lebensmittelindustrie Anwendung finden, etabliert werden. Hierzu sollen verschiedene Enzyme, darunter Peptidasen und Laccasen, durch *C. cinerea* exprimiert werden. Die Etablierung eines Expressionssystems beinhaltet die Entwicklung des Expressionsstammes, Entwicklung eines Expressionsvektors, Transformation des Expressionsstammes, Identifizierung des besten rekombinanten Stammes, weitere Optimierungen und die Charakterisierung des Produktionsstammes (Olempska-Beer et al., 2006). Diese Prozesse sollen in dieser Arbeit durchgeführt und diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mikroorganismen

| Organismus | Stamm | Beschreibung |
|---------------------------------|------------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> | JM109 | <i>endA1, glnV44, thi⁻¹, relA1, gyrA96, recA1, mcrB⁺, Δ(lac-proAB), e14⁻, *F', traD36, proAB⁺, lacIq, lacZΔM15], hsdR17, (r_K⁻m_K⁺)</i> (Yanisch-Perron et al., 1985) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | RH1385 | MATaΔura3 (Mösch et al., 1990) |
| <i>Pichia pastoris</i> | GS115 | <i>hls4</i> , (ThermoFisher Scientific) |
| <i>Pichia pastoris</i> | GS115 pPIC9K_KPep | <i>hls4</i> , (ThermoFisher Scientific), transformiert mit pPIC9K (Expressionsvektor von ThermoFisher Scientific), zur Expression der Rdo_c6991 |
| <i>Pichia pastoris</i> | GS115 pPIC9K_PlaPep | <i>hls4</i> , (ThermoFisher Scientific), transformiert mit pPIC9K (Expressionsvektor von ThermoFisher Scientific), zur Expression der Rdo_c6991 |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 | <i>A5, B6, acu1, trp1-1,1-6</i> L. A. Casselton (<i>Mutasa et al., 1990</i>) GÖFA2222 Stammnummer 28333, DSMZ, Braunschweig |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pCc1001 | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+ |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYSK7 | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYSK7 (Laccase1 Überexpressionsvektor) |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYMS1 | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYMS1 (Peptidase Überexpressionsvektor) |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYMS2 | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYMS2 (Peptidase Überexpressionsvektor) |

| | | |
|-----------------------------------|-----------------------|---|
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYMS3 | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYMS3 (Peptidase Überexpressionsvektor) |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYMS5 | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYMS5 (Peptidase Überexpressionsvektor) |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYMS6 | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYMS6 (Peptidase Überexpressionsvektor) |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYMS7 | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYMS7 (Peptidase Überexpressionsvektor) |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYMS11c | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYMS11c (Peptidase Überexpressionsvektor) |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYMS13c | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYMS13c (Peptidase Überexpressionsvektor) |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYMS15 | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYMS15 (Peptidase Überexpressionsvektor) |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYMS15c | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYMS15c (Peptidase Überexpressionsvektor) |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | FA2222 pYMS25 | <i>C. cinerea</i> Stamm FA2222 transformiert mit pCC1001, Trp+, transformiert mit pYMS25 (Peptidase Überexpressionsvektor) |

2.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden für Klonierungen und Sequenzierungsaufgaben verwendet (18-24bp Oligonukleotide wurden bei BIOMERS, Ulm, DE (<https://www.biomers.net>), längere bei EUROFINS, Ebersberg, DE (<https://www.eurofinsgenomics.eu/de>) erworben).

| Nr. | Oligonukleotide | Sequenz 5' - 3' Verwendung |
|-------|--------------------|---|
| 29 | gpdII_for | CCATCTCCGTTTTCTCCCATC Amplifizierung der Expressionskassette für Kolonie-PCR |
| 29.2 | gpdII_for | TCTGTGTCAGGCTAGCAGTT Sequenzierung der Expressionskassette |
| 109 | gpdII_PSP | CATCTACACACAACAAGCTTATCGCCATGGTGTCTCCAGCCTG GCGGTGAGC Amplifizierung der <i>wcopsp</i> zur Klonierung von pYMS1 |
| 110 | lcc1term_PSP | CTGGCCCTCTGGTCAACTATAATATTATTCATGACTGCGACTGC GCGGGGGC Amplifizierung der <i>wcopsp</i> zur Klonierung von pYMS1, 2, 3 |
| 111 | SPlcc1_PSP | CTTCTGGCGATCAGCGTTGCCAACGCTCTGCGCGTCCCTCGCCC GCCTGTGATC Amplifizierung der <i>wcopsp</i> zur Klonierung von pYMS2 |
| 113 | SPlcc1_PSPwoPro | CTTCTGGCGATCAGCGTTGCCAACGCTGGACCCGTCGTGGATC GGAACGGGAC Amplifizierung der <i>wcopsp</i> zur Klonierung von pYMS3 |
| 130 | lcc1term_rev | CTGGCCCTCTGGTCAACTATAAT Amplifizierung der Expressionskassette für Kolonie-PCR |
| 130.2 | lcc1term_rev | CTCAAGCACACATAACGATAG Sequenzierung der Expressionskassette |
| 145 | pYMS_for2 | CTGGAAGAAGCCCATCTGGT Sequenzierung der Expressionskassette |
| 146 | pYMS_rev2 | CTGGAAGAAGCCCATCTGGT Sequenzierung der Expressionskassette |
| 156 | gpdII_RdoT3_for | CATCTACACACAACAAGCTTATCGCCATGTTCAAATTAGTCGCT ATACTATGCCTGG Amplifizierung der <i>rdo-sp</i> zur Klonierung von pYMS5 |
| 157 | RdoT3_lcc1Term_rev | CTGGCCCTCTGGTCAACTATAATATTATTCACAAGCCCGTGATA TTATAGACATAGTCCC |

| | | |
|-----|----------------------|--|
| | | Amplifizierung der <i>rdo-sp</i> zur Klonierung von pYMS5, 6, 7 |
| 158 | gpdII_Intron_for | CATCTACACACAACAAGCTTATCGCCATGGTTTGTCTCTCGCTT GCATACC Amplifizierung des <i>gpdII</i> -Introns zur Klonierung von pYMS6 |
| 159 | Intron_RdoT3_rev | CCAGGCATAGTATAGCGACTAATTTGAATTTAACCTACAAGTC GACATCAGTG Amplifizierung des <i>gpdII</i> -Introns zur Klonierung von pYMS6 |
| 160 | Intron_RdoT3_for | CACTGATGTCGACTTGTAGGTTAAATTCAAATTAGTCGCTATAC TATGCCTGG Amplifizierung der <i>rdo-sp</i> zur Klonierung von pYMS6 |
| 162 | gpdII_Intron_for | CATCTACACACAACAAGCTTATCGCCATGGTTTGTCTCTCGCTT GCATACC Amplifizierung des <i>gpdII</i> -Introns zur Klonierung von pYMS7 und pYMS13c |
| 163 | Intron_lcc1SP_rev | CGAACGAGAGGAGGTTCTTGAATTTAACCTACAAGTCGACATC AGTG Amplifizierung des <i>gpdII</i> -Introns zur Klonierung von pYMS7 |
| 164 | Intron_lcc1SP_for | CACTGATGTCGACTTGTAGGTTAAATTCAAGAACCTCCTCTCGT TCGCCC Amplifizierung des <i>lcc1</i> -Signalpeptids zur Klonierung von pYMS7 |
| 165 | lcc1SP_RdoT3_rev | GGCATAGTATAGCGACTAATTTGAAAGCGTTGGCAACGCTGAT CGCCAGA Amplifizierung des <i>lcc1</i> -Signalpeptids zur Klonierung von pYMS7 |
| 166 | lcc1SP_RdoT3_for | TCTGGCGATCAGCGTTGCCAACGCTTTCAAATTAGTCGCTATAC TATGCCTGG Amplifizierung der <i>rdo-sp</i> zur Klonierung von pYMS7 |
| 220 | gpdII_CcEAU91794_for | CATCTACACACAACAAGCTTATCGCCATGCGTTTCTTCGCTGCC TTCGCGGC Amplifizierung der <i>cci-sp</i> zur Klonierung von pYMS15 |
| 222 | EAU91794_for | ATGCGTTTCTTCGCTGCCTTCG |

| | | |
|------------|--------------------------------|---|
| | | Amplifizierung der EAU91794 signalpeptidhaltigen Expressionskassetten für Kolonie-PCR (pYMS11c, 13c, 15c) |
| 223 | EAU91794_rev | TTACAGAGGGCCGATCTGCG Sequenzierung der <i>cci-sp</i> , Kolonie PCR pYMS15c |
| 224 | gpdII_SP_C.c.EAU91794_for | CATCTACACACAACAAGCTTATCGCCATGCGTTTCTTCGCTGCC TTCGCGG Amplifizierung des Signalpeptids der <i>cci-sp</i> (EAU91794) zur Klonierung von pYMS11c und 13c |
| 225 | SP_C.c.EAU91794_RdoT3(+P+)_rev | CCAGGCATAGTATAGCGACTAATTTGAACATTGAAAGCACAGG TTCCGCCAATAAG Amplifizierung des Signalpeptids der <i>cci-sp</i> (EAU91794) zur Klonierung von pYMS13c |
| 226 | SP_C.c.EAU91794_RdoT3(+P+)_for | CTTATTGGCGGAACCTGTGCTTTCATGTTCAAATTAGTCGCTA TACTATGCCTGG Amplifizierung der <i>rdo-sp</i> zur Klonierung von pYMS13c |
| 229 | SP_C.c.EAU91794_WcP(+P+)_rev | TCACAGGCGGGCGAGGGACGCGCAGTGAAAGCACAGGTTCCG CCAATAAG Amplifizierung des Signalpeptids der <i>cci-sp</i> (EAU91794) zur Klonierung von pYMS11c |
| 230 | SP_C.c.EAU91794_WcP(+P+)_for | CTTATTGGCGGAACCTGTGCTTTCACTGCGCGTCCCTCGCCCCG CTGTGA Amplifizierung der <i>wcopsp</i> zur Klonierung von pYMS11c |
| 233 | CcEAU91794_lcc1T_erm_rev | CTGGCCCTCTGGTCAACTATAATATTATTACAGAGGGCCGATC TGCGCAAGGTTGTTGGCAG Amplifizierung der <i>cci-sp</i> zur Klonierung von pYMS15 |
| 250 | In_SP_CcP_rev | CACTGATGTCGACTTGTAGGTTAAACGTTTCTTCGCTGCCTTCG CGGCTG Amplifizierung des <i>gpdII</i> -Introns zur Klonierung von pYMS13c |
| 251 | In_SP_CcP_for | CACTGATGTCGACTTGTAGGTTAAACGTTTCTTCGCTGCCTTCG CGGCTG Amplifizierung des Signalpeptids der <i>cci-sp</i> (EAU91794) zur Klonierung von pYMS13c |

| | | |
|---------------------------|------------------|--|
| 309 | pYMS15c_for | CAACAAGCTTATCGCCATGTTCTTTCCAAGTGACCTCT Amplifizierung der <i>cci-sp</i> zur Klonierung von pYMS15c |
| 310 | pYMS15c_rev | GGTCAACTATAATATTATTTAgtggtggtggtggtgCAGAGGGCC GATCTGCGC Amplifizierung der <i>cci-sp</i> zur Klonierung von pYMS15c |
| 322 | WcOPsP_6xhis_rev | CTGGCCCTCTGGTCAACTATAATATTATTCAGTGGTGGTGGT GTGGTGTGACTGCGACTGCGCGGGGGCCGT Amplifizierung der <i>wcopsp</i> zur Klonierung von pYMS11c |
| MCS 5 | pYMS25_for1 | CGCTCAGATCGTCAATTCTgccATGGCACCAGGGCCGTCCTTGA AGTCGG Amplifizierung der <i>cci-sp</i> zur Klonierung von pYMS25 |
| MCS 8 | RdPsp_6xhis_rev | CTGGCCCTCTGGTCAACTATAATATTATTCAGTGGTGGTGGT GTGGTGCAAGCCCGTGATATTATAGACATAGTCCC Amplifizierung der <i>rdo-sp</i> zur Klonierung von pYMS13c |
| MCS 31 | pYMS33_for | TTCTGTCGATACCATGACCCTACCAACGCAAACCTGTCGCCGG ATGGCT Amplifizierung des <i>lcc8</i> -Gens mit nativem Signalpeptid zur Klonierung von pYMS33 |
| MCS 32 | pYMS32_rev | GCCCTCTGGTCAACTATAATATTATTCACGACGAATCAGTAGCC GCAGCA Amplifizierung des <i>lcc8</i> -Gens mit nativem Signalpeptid zur Klonierung von pYMS32 und pYMS33 |
| MAG _019 | Pichia_AOX_1_fw | GACTGGTTCCAATTGACAAGC Amplifizierung der pPIC9K-Expressionskassette für Integrationskontrolle |
| MAG _020 | Pichia_AOX_1_rx | GCAAATGGCATTCTGACATCC Amplifizierung der pPIC9K-Expressionskassette für Integrationskontrolle |

2.1.3 Vektoren

| Vektor | Beschreibung / Herkunft |
|---------|--|
| pCC1001 | <i>trp1</i> in pUC9 (Binniger et al., 1987) |
| pYSK7 | <i>gpdII-lcc1-lcc1t-ura3-ampR</i> (Kilaru et al., 2006b) (Anhang 1) |
| pYMS1 | pYSK7 Derivat mit Deletion der <i>lcc1</i> und Insertion <i>wcopsp</i> unter Kontrolle <i>gpdII</i> -Promotor und <i>lcc1</i> -Terminator |
| pYMS2 | pYSK7 Derivat mit Deletion der <i>lcc1</i> und Insertion <i>wcopsp</i> ohne natives Signalpeptid unter Kontrolle <i>gpdII</i> -Promotor, <i>lcc1</i> -Signalpeptid und <i>lcc1</i> -Terminator |
| pYMS3 | pYSK7 Derivat mit Deletion der <i>lcc1</i> und Insertion <i>wcopsp</i> ohne natives Signalpeptid und ohne native Prosequenz unter Kontrolle <i>gpdII</i> -Promotor, <i>lcc1</i> -Signalpeptid und <i>lcc1</i> -Terminator |
| pYMS5 | pYSK7 Derivat mit Deletion der <i>lcc1</i> und Insertion <i>rdo-sp</i> unter Kontrolle <i>gpdII</i> -Promotor und <i>lcc1</i> -Terminator |
| pYMS6 | pYSK7 Derivat mit Deletion der <i>lcc1</i> und Insertion <i>rdo-sp</i> mit zusätzlichem <i>gpdII</i> -Intron unter Kontrolle <i>gpdII</i> -Promotor und <i>lcc1</i> -Terminator |
| pYMS7 | pYSK7 Derivat mit Deletion der <i>lcc1</i> und Insertion <i>rdo-sp</i> unter Kontrolle <i>gpdII</i> -Promotor, <i>lcc1</i> -Signalpeptid und <i>lcc1</i> -Terminator |
| pYMS11c | pYSK7 Derivat mit Deletion der <i>lcc1</i> und Insertion <i>wcopsp</i> ohne natives Signalpeptid unter Kontrolle <i>gpdII</i> -Promotor, <i>cci-sp</i> -Signalpeptid und <i>lcc1</i> -Terminator mit zusätzlichem n-terminalen sechsfach Histidin-Markierung |
| pYMS13c | pYSK7 Derivat mit Deletion der <i>lcc1</i> und Insertion <i>rdo-sp</i> ohne natives Signalpeptid unter Kontrolle <i>gpdII</i> -Promotor, <i>cci-sp</i> -Signalpeptid und <i>lcc1</i> -Terminator mit zusätzlichem n-terminalen sechsfach Histidin-Markierung |
| pYMS15c | pYSK7 Derivat mit Deletion der <i>lcc1</i> und Insertion der <i>cci-sp</i> unter Kontrolle <i>gpdII</i> -Promotor und <i>lcc1</i> -Terminator mit zusätzlichem n-terminalen sechsfach Histidin-Markierung |

| | |
|---------------|--|
| pYMS25 | pYSK7 Derivat mit Deletion der <i>lcc1</i> und Insertion der <i>cci-sp</i> unter Kontrolle <i>gpdII</i> -Promotor, <i>lcc1</i> -Signalpeptid und <i>lcc1</i> -Terminator mit zusätzlichem n-terminalen sechsfach Histidin-Markierung |
| pPIC9K | pPIC9K (Expressionsvektor ThermoFisher Scientific) (Anhang 2) |
| pPIC9K-KPep | pPIC9K (Expressionsvektor ThermoFisher Scientific) zur Expression der Rdo_c6991 |
| pPIC9K-PlaPep | pPIC9K (Expressionsvektor ThermoFisher Scientific) zur Expression der Rdo_c6991 mit zusätzlicher PLA ₂ Domäne |

2.1.4 Antibiotika und Selektionszusätze

| Antibiotikum | Abk. | Stammlösung [mg/mL] | Endkonzentration <i>E coli</i> [µg/mL] |
|------------------|------|------------------------|---|
| Ampicilin | Amp | 50 | 50 |

2.1.5 Größenstandards Gelelektrophorese

| DNA Standard | Bezugsquelle |
|--|-------------------|
| 1 kb-DNA-Leiter | Carl Roth |
| 100 bp-DNA-Leiter | Carl Roth |
| 1 kb-DNA-Leiter | Nippon Genetics |
| Midori Green Direct | Nippon Genetics |
| | |
| Protein Standard | Bezugsquelle |
| Unstained Protein MW Marker | Fisher Scientific |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa | Fisher Scientific |
| PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 bis 250 kDa | Fisher Scientific |

2.1.6 Molekularbiologische Kits

| Name | Hersteller | Artikelnummer | Verwendungszweck |
|---|--------------------|----------------------|---|
| SERVAGel™ IEF 3-10 | SERVA | 43240.01 | Bestimmung des pI der <i>C. cinerea</i> Lcc8 |
| NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up | Macherey- Nagel | 740609.250 | Reinigung von PCR-Produkten, DNA-Fragmenten oder Fragmente aus einem Restriktionsverdau aus Agarose-Gel |
| Roti®- Nanoquant | Carl Roth | K880.3 | Photometrische Bestimmung Proteinkonzentration |
| Opti-4CN Substrat | BioRad | #1708235 | Kolorimetrische Detektion von Antikörper-Protein Komplexen bei Western Blot Analysen |
| Ni-NTA Spin Columns | Qiagen | Cat No./ID: 31014 | Reinigung Histidin-markierter Proteine |
| Nanosep® m. Omega™ Membran | PALL | 516-8491 | Konzentrierung und Umpufferung von proteinhaltigen Lösungen |
| HisTrap™ HP | GE Healthcare | 17524801 | Reinigung rekombinanter und Histidin-markierter Proteine |

2.1.7 Enzyme/Proteine

| Enzym | Hersteller | Verwendung |
|--|---------------------------------|---|
| Anti His-HRP 3894.1 | Carl Roth | Detektion Histidin-markierter Proteine mittels Western Blot Analyse |
| Anti WcOPsP Polyklonaler Antikörper | Eurogentec, Seraing, Belgien | Detektion der WcOPsP mittels Western Blot Analyse |
| BamHI | Thermo Scientific | Endonuklease zur Linearisierung von pYSK7 |
| Cellulase | Sigma Aldrich | Herstellung der Protoplasten |
| Chitinase | Sigma Aldrich | Herstellung der Protoplasten |

| | | |
|---------------------------|---------------------------------------|--|
| CTLA4 | ThermoFisher Scientific (11159H08H50) | Rekombinantes Histidin-markiertes Protein als Positivkontrolle für Western Blot Analysen (ca. 25 kDa), nicht länger erhältlich |
| Faktor Xa | NEB | Hydrolyse des Signalpeptids der rekombinanten RdoT3 |
| HpaI (KspAI) | Thermo Scientific | Endonuklease zur Linearisierung von pYSK7 |
| Phusion-Polymerase | NEB | Amplifizierung von DNA-Fragmenten |
| RNase A | amresco | Abbau von RNA |
| Sall | Thermo Scientific | Endonuklease zur Linearisierung von pPIC9K |

2.1.8 Chemikalien

| Substanz | Reinheit | Hersteller | Ort, Land |
|--|----------------------------------|-------------------------|---------------|
| Acetonitril | ≥99,9% | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 40) | 40% in H ₂ O (37,5:1) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Adeninsulfat | ≥98% | Alfa Aesar GmbH & Co KG | Karlsruhe, DE |
| Agar-Agar | reinst | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Agarose | DNas, RNase nicht nachweisbar | Biozyme | Oldendorf, DE |
| Ammoniumbicarbonat | ≥98% | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Ammoniumsulfat | ≥99,5% p.a. ACS, ISO | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| di-Ammoniumtartrat | ≥99,5% | Fluka Analytical- | Steinheim, DE |

| | | | |
|--|-----------------------------------|-------------------|------------------|
| | | Sigma- Aldrich | |
| Ammonium Acetat | ≥99,0% | Sigma- Aldrich | Steinheim, DE |
| Ampicillin Natriumsalz | 93% f. d. Molekularbiologie | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | 100% für die Molekularbiologie | AppliChem GmbH | Darmstadt, DE |
| L-Asparagin-1-Hydrat | reinst | AppliChem GmbH | Darmstadt, DE |
| 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin- 6-sulfonsäure) – Diammoniumsalz (ABTS) | 100% | AppliChem GmbH | Darmstadt, DE |
| Azocasein | 41E1% bei 440 nm | Sigma- Aldrich | Steinheim, DE |
| Biotin | ≥98,5% | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | >98% | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Bradford-Reagenz, Roti-Nanoquant | 5-fach Konzentrat | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Bromphenolblau Natriumsalz | - | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Calciumchlorid Dihydrat | ≥99%, p.a. ACS | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Caseinhydrolysat (Casaminoacids) | Standard | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| 3,4-dihydroxyhydrocinnamin Säure (DHPPA) | ≥98,0% | Sigma- Aldrich | Steinheim, DE |
| 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) | ≥99,0% | Sigma- Aldrich | Steinheim, DE |

| | | | |
|--|----------------------------|----------------------|------------------|
| Ethanol | ≥99,5% Ph. Eur. Reinst. | Carl Roth | Karlsruhe, DE |
| Ethylen-diamintetraessigsäure (Dinatriumsalz, Dihydrat) | ≥99% USP | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Essigsäure | 100%, p.a. | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Formaldehyd | ≥37% | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| D-Glucose | wasserfrei, p.a. ACS | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| D-Glucose Monohydrat | für die Mikrobiologie | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Glycerol | 99% | Carl Roth GmbH | Karlsruhe DE |
| Hefeextrakt | - | Fisher Scientific | Schwerte, DE |
| Imidazol | 99% | Carl Roth GmbH | Karlsruhe DE |
| Kaliumacetat | reinst Ph. Eur. | AppliChem GmbH | Darmstadt, DE |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat | ≥98%, wasserfrei | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Kaliumdihydrogenphosphat | ≥99%, p.a. | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Kupfersulfat | ≥99% | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Lachssperma (A2160,0001) | - | AppliChem GmbH | Darmstadt, DE |
| LB-Medium (Lennox) | für die Mikrobiologie | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| LB-Agar (Lennox) | für die Mikrobiologie | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |

| | | | |
|---|----------------------------|----------------|---------------|
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | reinst. | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Maleinsäure Dinatriumsalz | ≥98% | Sigma-Aldrich | Steinheim, DE |
| Malzextrakt | für die Mikrobiologie | Sigma-Aldrich | Steinheim, DE |
| β-Mercaptoethanol | ≥99% | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| 2-Methoxyphenol (Guajakol) | - | Merck kGaA | Darmstadt, DE |
| 3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrason Hydrochlorid (MBTH) | ≥97% | Sigma-Aldrich | Steinheim, DE |
| Methanol HPLC Grade | ≥99% | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| D-Mannitol | ≥98% | Sigma-Aldrich | Steinheim, DE |
| Milchpulver | Blotting grade | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Natriumacetat | ≥98,5%, reinst, wasserfrei | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Natriumcarbonat-Decahydrat | p. a. | Merck KGaA | Darmstadt, DE |
| Natriumchlorid | ≥99,5%, p.a. ACS, ISO | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Ph. Eur. | Merck kGaA | Darmstadt, DE |
| Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat | ≥98%, Ph.Eur., USP | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat | - | AppliChem GmbH | Darmstadt, DE |
| Natriumsulfat | ≥99%, p. a. | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |

| | | | |
|---|--|-------------------|------------------|
| Natriumhydroxid | 100% | Merck kGaA | Darmstadt, DE |
| Natriumthiosulfat-Pentahydrat | ≥99%, krist. | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Pepton aus Casein | tryptisch verdaut, für die Mikrobiologie | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) | - | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Polyethylenglykol 3350 | - | Sigma- Aldrich | Steinheim, DE |
| Saccharose | ≥ 99,0% | Sigma- Aldrich | Steinheim, DE |
| Sorbit | 98% | Merck kGaA | Darmstadt, DE |
| Stärke aus Kartoffeln | reinst. | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Silbernitrat | ≥99,9%, p. a. | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilid | - | Sigma- Aldrich | Steinheim, DE |
| Syringaldazin (SGZ, 4-Hydroxy-3,5- dimethoxybenzaldehydazin) | - | Merck kGaA | Darmstadt, DE |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | ≥99% | AppliChem GmbH | Darmstadt, DE |
| Thiaminhydrochlorid | 98,5% | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| TRIS (Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan) | ≥99, Buffer Grade | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| TRIS-HCl (Tris-(hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid) | ≥99, Buffer Grade | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Triton X-100 | | | |

| | | | |
|--|--------------------|----------------|---------------|
| Tryptophan | für die Zellkultur | AppliChem GmbH | Darmstadt, DE |
| Tween20 | Ph.Eur. | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Yeast Nitrogen Base (mit Histidin) | - | Merck kGaA | Darmstadt, DE |
| Yeast Nitrogen Base (ohne Histidin) | - | Merck kGaA | Darmstadt, DE |
| Z-Gly-Pro-4-Nitroanilid | - | Sigma-Aldrich | Steinheim, DE |

2.1.9 Geräte und Materialien

| Gerät | Modell | Hersteller | Ort, Land |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------|
| Autoklav | Sterilisator Laboklav 25 B | SHP Steriltechnik | Magdeburg, DE |
| Autoklav | Sterilisator Laboklav 160 MSL | SHP Steriltechnik | Magdeburg; DE |
| Eismaschine | AF80 | Scotsman Ice Systems | Vernon Hills, USA |
| Elektrophoresekammer | PerfectBlue™ Mini S und Mini M | PeQLqab | Erlangen, DE |
| Elektrophoresekammer | Mini-Protean® TetraSystem | BioRad | München, DE |
| Elektrophoresekammer | PerfectBlue™ Twin S | PeQLqab | Erlangen, DE |
| Elektroporationsküvetten | <i>my-Budget</i> | PeQLab | Erlangen, DE |
| Eporator | Eppendorf Eporator® | Eppendorf | Hamburg, DE |
| Feinwaage | Adventurer™ | OHAUS | Parsippany, NJ, USA |
| Feinwaage | SI-234 A | Denver Instrument | Göttingen, DE |
| FPLC Gerät | BioLogic DuoFlow™ | BioRad | München, DE |

| | | | |
|-----------------------------|--|-------------------------------|------------------------------|
| FPLC Säule | HisTrap™ HP | GE Healthcare | Solingen, DE |
| FPLC Säule | DEAE-FF (XK26) | GE Healthcare | Solingen, DE |
| FPLC Säule | HiPrep16/10 highsub Phenyl FF | GE Healthcare | Solingen, DE |
| Gasbrenner | Gasprofi 1 micro | WLD-TEC GmbH | Göttingen, DE |
| Inkubationsschrank | Incu-line | VWR | Darmstadt, DE |
| Inkubationsschüttler | Ecotron | infors HT | Einsbach, DE |
| Kühltermomixer | MKR13 V118A4 | DITABIS | Pforzheim, DE |
| Mikrowelle | MWG1227CB | BOMANN® | Kempen, DE |
| Mikrozentrifuge | Mikrofuge® 22R Centrifuge | Beckman Coulter | Krefeld, DE |
| Mini-Heizblock | AccublockTMMini | LabNet Systems GmbH | Oberwil-Lieli, CH |
| Mini-Zentrifuge | NG00212 | NipponGenetics Europe | Düren, DE |
| Nanophotometer | Pearl | Implen | München, DE |
| Nanophotometer | P-Class | IMPLEN GmbH | München, DE |
| Parafilm | Paramfilm® M, Verschlussfolie Länge 38 M, Breite 100 MM | Th. Geyer GmbH | Lohmar, DE |
| Petrischalen | Produktnr. 632 180 | Greiner Bio-One | Frickenhausen, DE |
| Photometer | Specord 50 | Analytik Jena AG | Jena |
| Pipetten | 0,1 bis 1 µL 0,5 bis 10 µL 0,2 bis 20 µL 0,20 bis 200 µL 0,100 bis 1000 µL | Brand | Wertheim, DE |
| Plattenreader | Synergy 2 | BioTek Instruments GmbH | Bad Friedrichshall, DE |

| | | | |
|-------------------------------|---|-----------------------|----------------|
| Real Time System | CFX Connect™ Real Time System | BioRad | München, DE |
| Reinigungsmembran | VivaFlow200 | Satorius | Göttingen, DE |
| Rollinkubator | RS-TR05 | Phoenix Instrument | Garbsen, DE |
| Spannungsquelle | Electrohoresis Power Supply EV262 EV231 | PeQLab | Erlangen, DE |
| Sterilbank | HeraSafe | Thermo Scientific | Darmstadt, DE |
| Tank Blotting System | PerfectBlue™ Tank- Elektroblotter Web™ S | PeQLab | Erlangen, DE |
| Thermocycler | T100™ Thermal | BioRad | München, DE |
| Turrax-Stab | T25 digital Ultra-Turrax | IKA® | Staufen, DE |
| Vortex-Mixer | VTX-3000L Mixer Uzusio | LMS | Brigachtal, DE |
| Western Blot Membran | ROTI® FluoroPVDF | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, DE |
| Zentrifuge | Allegra® X_15R Centrifuge | Beckman Coulter | Krefeld, DE |
| Zentrifugationsmembran | Makrosep® 300 kDa | PALL | Dreieich, DE |

2.1.10 Software und Webseiten

| Name | Verwendung | Webadresse |
|--|--|---|
| Conversion: weight - moles (for proteins) | Umrechnung Molekulargewicht in Stoffmenge | http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_04.html |
| Expasy Bioinformatics Resource Portal | Kalkulierung des Isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht anhand der Aminosäuresequenz | https://web.expasy.org/compute_pi/ |
| SignalP - 4.1 | Signalpeptid und Hydrolysestellen in | https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1 |

| | | |
|---|---|---|
| | gram+, gram- und eukaryotischen Aminosäuresequenzen | |
| ProP - 1.0 | Arginin und Lysin „propeptide cleavage sites“ in eukaryotischen Protein Sequenzen | https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?ProP-1.0 |
| GraphPadPrism 5 für Windows Version 5.03 | Programm zur Erstellung von Grafiken und statistischen Analysen | Eigene Lizenz |
| JGI MycoCOsm | Genomdatenbank | https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf |
| MEROPS the Peptidase Database | Identifizierung und Charakterisierung von Peptidasen | https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml |
| MultAlin | Multiple sequence alignment with hierarchical clustering" F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890 | http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/ |
| SWISS-MODEL | 3D-Modellierung von Proteinen | https://swissmodel.expasy.org/interactive |
| NEBcutter | Identifizierung von Restriktionsschnittstellen in DNA-Sequenzen | https://nc3.neb.com/NEBcutter/prj/ |

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierungsarbeiten

Alle Arbeiten zur Erstellung einer Emers- oder Submerskultur wurden unter sterilen Bedingungen an der Flamme oder unter einer Sterilbank durchgeführt. Hierzu wurde Hilfsmaterial wie Impföse und Spatel mit 96% Ethanol abgeflammt und verwendet.

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli* JM109

Für die Kultivierung von *E. coli* auf Agarplatten oder in Flüssigmedium wurde ausschließlich LB-Medium (Carl Roth) verwendet. Hierzu wurde *E. coli* bei 37 °C und, im Falle einer submersen Kultivierung, bei 180 U_{min} auf einem Horizontalschüttler kultiviert.

2.2.1.2 Kultivierung *S. cerevisia* RH1385 und *P. pastoris* GS115

Für die Kultivierung von *S. cerevisia* auf Agarplatten oder in Flüssigmedium wurden, wenn nicht anders angegeben, die Medien YPD und YSDO (siehe Tabelle 1) verwendet. Hierzu wurde *S. cerevisia* bei 30 °C und im Falle einer submersen Kultivierung, bei 230 U_{min} auf einem Horizontalschüttler kultiviert.

Tabelle 1: Zusammensetzung Nährmedien RH1385

| Flüssigmedien und Agarplatten | und | Bestandteile pro L |
|-------------------------------------|-----|---|
| YPD | | 10 g Hefeextrakt 20 g Pepton 30 mg Adeninsulfat 20 g Glukose (separat autoklavieren) |
| YPD-Agarplatten | | wie YPD + 20 g Agar |
| | | |
| YSDO | | 1,7 g Yeast nitrogen base 5 g Ammoniumsulfat 5 g CAS-Aminosäuren 20 mg Adeninsulfat 20 mg Tryptophan pH 5,6 einstellen |

| | |
|--|--|
| | 20 g Glukose (separat autoklavieren) |
| YSDO-Agarplatten | wie YSDO + 20 g Agar (zuerst pH Einstellen, dann Agar hinzugeben) |
| | |
| Die Medien MD und BMMY wurden nach Herstellerangaben anhand „Invitrogen Easy Select™ <i>Pichia</i> Expression Kit, S.57, 58 – <i>Pichia</i> Media Recipes“ gefertigt | |
| Minimal Dextrose (MD) | 1,34% Yeast Nitrogen Base (ohne Histidin) 4x10 ⁻⁵ % Biotin 2% Dextrose (Glukose) Für Agarplatten 15 g Agar L ⁻¹ zugeben |
| Buffered Methanol-complex Medium (BMMY) | 1% Hefeextrakt 2% Pepton 100 mM Kaliumphosphat pH 6 1,34% Yeast Nitrogen Base (ohne Histidin) 4x10 ⁻⁵ % Biotin 0,5% Methanol |

2.2.1.3 Kultivierung *C. cinerea* FA2222

C. cinerea wurde auf Agarplatten oder in Flüssigmedium bei 37 °C kultiviert. Für die Kultivierung des Tryptophan auxotrophen *C. cinerea* Stamms FA2222 wurde dem Minimal und dem YMG-Medium Tryptophan (Tabelle 2) hinzugefügt. Transformanten von FA2222, die mit pCc1001 transformiert wurden, wurden in YMG oder Minimal Medium ohne Tryptophan (Tabelle 2) kultiviert. Hierzu wurde *C. cinerea* bei 37 °C und, falls submers kultiviert, bei 150 U_{min} auf einem Horizontalschüttler für ca. 7 d kultiviert. *C. cinerea* Transformanten, die eine rekombinante Laccase exprimierten, wurden zur Analyse der Laccaseaktivität auf

Minimal Medium Agarplatten mit ABTS (Tabelle 2) überführt. Wenn diese Transformanden submers kultiviert wurden, wurde dem mKjalke Medium CuSO_4 (Tabelle 2) zugesetzt, da dies zu einer besseren Aktivität der Laccasen führt.

Tabelle 2: Zusammensetzung Nährmedien *C. cinerea*.

| Flüssigmedien und Agarplatten | Bestandteile pro L |
|--|--|
| YMG | 4 g Hefeextrakt 10 g Malzextrakt 4 g Glukose (separat autoklavieren) |
| YMGT | wie YMG + 100 mg Tryptophan |
| YMG/YMGT-Agarplatten | wie YMG/YMGT + 10 g Agar |
| | |
| Minimal Medium (MM) nach (Dörnte and Kues, 2012) | 25 mL Stock A [40 g KH_2PO_4 , 90 g Na_2HPO_4 , 11,6 g NaSO_4 und 20 g di-Ammoniumtartrat] 1 mL Stock B [40 mg Thiamin] 10 mL Stock C [25 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$] 2 g Asparagin 10 g Glukose (separat autoklavieren) |
| Minimal Medium Tryptophan (MMT) | wie MM + 50 mg Tryptophan |
| MM/MMT-Agarplatten | wie MM/MMT + 10 g Agar |
| MM-Agarplatten + ABTS | wie MM Agarplatten mit final 0,5 mM ABTS |

| | |
|---|---|
| Regenerationsmedium Agarplatten (RegMedAgar) | wie MM +172 g Saccharose +5 g lösliche Stärke anstatt 10 g Glukose werden 5 g verwendet (separat autoklavieren) |
| | |
| mKjalke Medium nach (Rühl et al., 2018) | 10 g Hefe Extrakt 0,5 g CaCl ₂ × 2 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ 50 mg MgSO ₄ × 7H ₂ O 20 g Glukose (separat autoklavieren) 0,1 mM CuSO ₄ |

2.2.1.4 Messung OD₆₀₀ als Wachstumsnachweis

Es wurden ausschließlich OD₆₀₀ Messungen für die Bewertung des Wachstums von *P. pastoris* durchgeführt. Hierzu wurde das NanoPhotometer® P-Class von Implen verwendet. Es wurde das vorgegebene Programm zum Messen der OD₆₀₀ genutzt. Als Blank wurde ddH₂O oder BMMY verwendet und die Probe direkt verwendet oder 1:100 mit ddH₂O verdünnt und anschließend gemessen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolation von Vektor DNA aus *E. coli*

Zur Isolation von Vektor-DNA aus *E. coli* Kulturen wurden 1,5 mL einer frischen Übernachtskultur für 5 min bei 3000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µL Lösung 1 resuspendiert. Es wurden anschließend 200 µL der Lösung 2 hinzugegeben, 5- bis 10-mal invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µL Lösung 3 hinzugegeben, die zuvor mit RNaseA (final 0,1 mg mL⁻¹)

versetzt wurde. Der Ansatz wurde 5- bis 10-mal invertiert, danach für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 15.000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt und erneut zentrifugiert. 400 μ L Überstand wurden in ein weiteres neues Eppendorfggefäß überführt und mit 40 μ L 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 mL 96% Ethanol versetzt und invertiert. Die Suspension wurde dann über Nacht bei -20 °C oder für 1 h bei -80 °C gelagert, um die DNA zu fällen. Nach der Fällung wurde der Ansatz für 10 – 20 min bei 15.000 *g* zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 500 μ L 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 15.000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet wurde bei 70 °C getrocknet (ca. 5 min) und anschließend mit 100 μ L ddH₂O versetzt, um die DNA während einer erneuten Inkubation für 5 min bei 70 °C zu lösen. Die Ausbeute wurde mit Hilfe des Nanophotometers bestimmt.

Lösung 1 50 mM Glukose, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8, bei 4 °C lagern

Lösung 2 200 mM NaOH, 1% SDS, bei Raumtemperatur lagern

Lösung 3 3M KOAc, 2 M Essigsäure, bei 4 °C lagern

2.2.2.2 Isolation Vektor DNA aus Hefen

Ein einzelner Hefe Transformand wurde über Nacht bis zur Sättigung in YSDO Medium bei 30 °C und 230 U_{\min} kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen für 5 min bei ca. 1.000 *g* zentrifugiert, der Kulturüberstand verworfen und das Zellpellet in 500 μ L sterilem ddH₂O aufgenommen. Die Zellen wurden in ein 1,5 mL Eppendorfggefäß überführt und für ca. 5 s bei 16.000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im restlichen Überstand wieder resuspendiert. Zu den Zellen wurden 200 μ L Lysepuffer (4 mL Triton x-100, 20 mL 10% SDS, 4 mL 5 M NaCl, 400 μ L 0,5 M EDTA, 2 mL 1M Tris, auffüllen auf 200 mL mit ddH₂O), 200 μ L Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3 g Säure gewaschene Glasperlen (Durchmesser: 425-600 μ m) hinzugegeben. Der Isolationsansatz wurde für 10 min mittels Vortex homogenisiert und anschließend 200 μ L TE-Puffer (pH 8,0) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 15.000 *g* zentrifugiert und 400 μ L des wässrigen Überstands wurden in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Der Überstand wurde mit 40 μ L 3 M Natrium Acetat (pH 5,5) und 1 mL 96% Ethanol versetzt, invertiert und für 15 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei 4 °C und 15.000 *g* zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen und das gefällte DNA-Pellet wurde in 400 µL TE Puffer und 4 µL RNase A (10mg mL⁻¹) aufgenommen und bei 37 °C inkubiert, bis das DNA-Pellet gelöst war. Anschließend wurde dem Ansatz 10 µL 4 M Ammonium Acetat und 1 mL 96% Ethanol hinzugegeben und invertiert. Der Ansatz wurde 2 min bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µL 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet wurde bei 70 °C getrocknet (ca. 5 min) und anschließend mit 100 µL ddH₂O versetzt, um die DNA während einer erneuten Inkubation für 5 min bei 70 °C zu lösen. Die Ausbeute wurde mit Hilfe des Nanophotometers bestimmt.

2.2.2.3 Isolation genomischer Pilz-DNA

Für die Isolation von genomischer DNA aus Pilzen wurde entweder ein Fruchtkörper oder die Biomasse einer Flüssigkultur verwendet. Das Probenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert, um die Probe zu homogenisieren und grobe Zellwandbestandteile zu zerkleinern. Von der homogenisierten Probe wurden vier Mikrospatel in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µL Lysepuffer [400 mM TrisHCl pH 8, 60 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl, 1% SDS] versetzt. Der Isolationsansatz wurde daraufhin 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 150 µL einer 3 M Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) versetzt und invertiert. Hierauf folgte eine 10-minütige Sedimentierung ausgefallener Bestandteile bei maximaler Drehzahl (ca. 18.000 g) und Raumtemperatur. Der erhaltene Überstand (ca. 600 µL) wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Dasselbe Volumen (ca. 600 µL) wurde an Isopropanol zur Fällung der DNA zum Überstand hinzugegeben und invertiert. Nach der Sedimentierung der ausgefallenen DNA für 10 min bei maximaler Drehzahl (ca. 18.000 g) und Raumtemperatur, wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet in 500 µL 70% Ethanol gewaschen. Hierzu wurde der 70% Ethanol auf das DNA-Pellet pipettiert, nicht resuspendiert oder invertiert, sondern für 5 min bei Raumtemperatur und maximaler Drehzahl (ca. 18.000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wobei darauf geachtet wurde, das DNA-Pellet nicht zu verlieren. Das DNA-Pellet wurde bei 70 °C getrocknet (ca. 5 min) und anschließend mit 100 µL ddH₂O versetzt, um die DNA während einer erneuten Inkubation für 5 min bei 70 °C zu lösen. Die Ausbeute wurde mit Hilfe des Nanophotometers bestimmt.

2.2.2.4 Isolation von DNA für Kolonie-PCR

Um Transformanten mittels PCR auf korrekte Aufnahme oder Klonierung eines Vektors zu kontrollieren, wurde die DNA auf anderem Wege isoliert.

Einzelne *E. coli* Transformanten wurden mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 2-3 mL LB-Medium mit der entsprechenden Menge Ampicillin über Nacht kultiviert. 100 µL der frischen Übernachtskultur wurden in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 15.000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 40 µL ddH₂O aufgenommen. Die *E. coli* Zellen wurden für 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Nach der Lyse der *E. coli* Zellen wurden Zellfragmente sedimentiert indem 5 min bei 6.000 *g* zentrifugiert wurde. 1-2 µL des wässrigen Überstands wurden für eine PCR eingesetzt.

Einzelne *P. pastoris* und *S. cerevisiae* Transformanten wurden mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 10 µL 20 mM NaOH überführt. Durch die Inkubation für 10 min bei 99 °C wurden die Zellen lysiert und die DNA dadurch freigegeben. Zellfragmente wurden für 5 min bei 6.000 *g* sedimentiert. 1-2 µL des wässrigen Überstands wurden für eine PCR eingesetzt.

Die Isolation von DNA aus *C. cinerea* wurde nach (Dörnte and Kues, 2013) durchgeführt. Hierzu wurden einzelne Transformanten auf Minimal Medium Agar-Platten überführt (meistens vier Transformanten pro Platte) und kultiviert bis ca. ein Viertel der Agar-Platte mit Myzel bewachsen war. Die bewachsene Fläche wurde mit Hilfe einer sterilen Impföse eine ca. Stecknadelkopf große Menge an Myzel abgeschabt. Das Myzel wurde in 100 µL sterilem ddH₂O überführt. Das Myzel-Wasser Gemisch im Eppendorfgefäß wurde mittels Vortex homogenisiert und anschließend für 1 min bei 600 W in einer Mikrowelle erhitzt. Nach erneuter Homogenisierung mit dem Vortex und einer Inkubation für 30 s bei Raumtemperatur, wurde das Gefäß erneut für 1 min bei 600 W erhitzt. Daraufhin wurde das Gefäß für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend Zellfragmente für 5 min bei 9.000 *g* sedimentiert. 1-2 µL des wässrigen Überstands wurden für eine PCR verwendet.

2.2.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Es wurde in der PCR die Phusion® Polymerase von New England Biolabs verwendet und die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Nachfolgend werden im Allgemeinen die Zusammensetzung des Mastermix und die Abfolge des Temperaturprogramms dargestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung PCR Mastermix und Abfolge Temperaturprogramm.

| Mastermix | | | Temperaturprogramm | | |
|--|-----------------------------|--|------------------------|----------------|--------------------------------|
| Komponenten | 20 μ L Reaktion | finale Konz. | Schritt | Temperatur | Zeit |
| 5x GC Puffer | 4 μ L | 1x | Initiale Denaturierung | | 98 °C 300 s |
| 10 mM dNTPs | 0,4 μ L | 200 μ M | 25-35 Zyklen | Denaturierung | 98 °C 30 s |
| 10 μ M Vorwärts- oligonukleotid | 1 μ L | 0,5 μ M | | Hybridisierung | 45-72 °C 30 s |
| 10 μ M Rückwärts- oligonukleotid | 1 μ L | 0,5 μ M | | Elongation | 72 °C 15- 30 s pro kb |
| DNA Matrize | variabel | 1-200 ng | Finale Elongation | | 72 °C 300 s |
| Phusion DNA Polymerase 2 U μ L ⁻¹ | 0,2 μ L | 1,0 U pro 50 μ L Reaktion | Lagerung | | 4-8 °C für immer |
| 100% DMSO | 1 μ L | 5% | | | |
| 50 mM MgCl ₂ | 0,4 μ L | 1 mM | | | |
| ddH ₂ O | auffüllen auf 20 μ L | | | | |

2.2.2.6 Restriktionsverdau

Die benötigten Enzyme wurden von Thermo Scientific bezogen und nach Herstellerangabe mit den dazugehörigen Puffersystemen eingesetzt. Es wurden hierbei ausschließlich die Fast Digest Systeme verwendet. Für die Linearisierung von pYSK7 wurden bis zu 20 μ g Vektor DNA

mit jeweils 1 μL *Bam*HI und *Hpa*I, 10 μL Puffer und der entsprechenden Menge ddH₂O auf 100 μL Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Reaktion bei 80 °C für 5 min gestoppt und die Restriktionsprodukte gelelektrophoretisch analysiert.

2.2.2.7 Herstellung elektrokompenter *E. coli* JM109 Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen, die für eine Elektroporationstransformation geeignet sind, wurden 20 mL einer frischen Übernachtskultur von JM109 *E. coli* Zellen aus einer Einzelkolonie angesetzt. Mit der frischen Übernachtskultur wurde am Folgetag 1 L LB-Medium angeimpft, so dass eine OD_{600nm} von 0,05 – 0,07 erreicht wurde. Die Kultur wurde für ca. 2 h bei 37 °C kultiviert, bis diese eine OD_{600nm} zwischen 0,5 und 1,0 erreicht hatte. Der Kultur-Kolben wurde anschließend für 30 min auf Eis gestellt. Die Kultur wurde steril auf vier Zentrifugenbecher aufgeteilt und für 8 min bei 3000 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes Zellsediment in je 5 mL sterilem ddH₂O resuspendiert und vereinigt. Die vereinigten Zellsedimente wurden in 175 mL sterilem ddH₂O erneut resuspendiert und für 5 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellsediment in 100 mL sterilem ddH₂O resuspendiert und erneut für 5 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und mit Hilfe einer sterilen Glaspipette wurden Wasserreste entfernt. Das Zellsediment wurde in 10 mL Glycerin (10%, autoklaviert, gekühlt) resuspendiert und für 10 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 3 mL Glycerin (10%, autoklaviert, gekühlt) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte 1,5 mL Eppendorf-Gefäße zu je 100 μL aliquotiert, direkt in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.2.8 Transformation *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurde der Eporator von Eppendorf nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurden 100 μL elektrokompenter JM109 Zellen aufgetaut und mit 10-2.000 ng Vektor-DNA versetzt. Anschließend wurde der Transformationsansatz in eine Elektroporationsküvette gegeben und eine Spannung von 2 kV angelegt. Die Zellen wurden

anschließend mit 500 µL LB Medium aus der Küvette ausgewaschen und in ein 1,5 mL Eppendorfgesäß überführt. Die Zellen wurden 1 h bei 37 °C regeneriert und anschließend auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

2.2.2.9 Transformation Hefe RH1385 (homologe Rekombination)

Eine Kolonie der Hefe RH1385 wurde über Nacht in 3 mL YPDA Medium bei 30 °C und 230 U_{min} kultiviert. Am Folgetag wurden 2 mL dieser Kultur verwendet um 50 mL YPDA Medium zu beimpfen und für 5 h zu denselben Bedingungen zu kultivieren. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei Raumtemperatur und 1.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 mL sterilem ddH₂O resuspendiert. Die Zellen wurden erneut für 5 min bei Raumtemperatur und 1.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 µL sterilem ddH₂O resuspendiert. Anschließend wurden 50 µL der Hefezellen für den Transformationsansatz eingesetzt und mit 50 µL ssDNA, 100-1.000 ng mittels Restriktionsverdau linearisiertem pYSK7 und 200-2.000 ng PCR Produkt, welches in der Regel ein Gen von Interesse oder Genabschnitt darstellte, versetzt. Die ssDNA stammte hierbei von Lachssperma DNA mit einer Konzentration von 2 µg µL⁻¹, welche von Zeit zu Zeit durch Hitzedenaturierung (5 min 95 °C) denaturiert wurde und das Gesamtvolumen des Transformationsansatzes überstieg hierbei 110 µL nicht. 240 µL 50% PEG 3350 (50 g in 100 mL H₂O) wurden mit 32 µL 1 M Lithium Acetat (LiOAc) gemischt und anschließend zu dem Transformationsansatz hinzugegeben. Der mit PEG/LiOAc versetzte Transformationsansatz wurde resuspendiert und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei 45 °C einem Hitzeschock unterzogen. Der Ansatz wurde wenige Sekunden bei 15.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µL H₂O resuspendiert um ihn anschließend auf YSDO Agarplatten auszustreichen. Die Platten wurden für zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2.2.10 Transformation *C. cinerea* FA2222

C. cinerea wurde nach der Methode von (Dörnte and Kues, 2012) transformiert. Hierzu wurden die Sporen gesammelt, die Zellwand mit ≥ 4 U Chitinase und 800 U Cellulase pro 20 mL MM Puffer verdaut und die Zellmembran mittels PEG/CaCl₂ permeabilisiert. Es wurden in der

Regel zwischen 1-3 µg Vektor-DNA, bei der kein RNA-Verdau durchgeführt wurde, für die Transformation eingesetzt und die Transformationsansätze wurden final auf Regenerationsmedium-Agarplatten ausplattiert. Es wurden nur Ko-Transformationen von pCc1001 mit dem entsprechenden Expressionsvektor durchgeführt.

2.2.2.11 Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris* GS115

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen von GS115 erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen Easy Select™ *Pichia* Expression Kit, S.27 – Electroporation of *Pichia*). Hierzu wurde 5 mL des *P. pastoris*-Stammes GS115 in YPD in einem 50 mL-Kolben bei 30 °C über Nacht kultiviert. Anschließend wurden 500 mL frisches Medium in einen 2 L Kolben mit 0,1–0,5 mL Kultur über Nacht inokuliert. Die Kultur wuchs über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3–1,5. Die Zellen wurden für 5 min bei 1.500 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 mL eiskaltem, sterilem ddH₂O resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Pellet mit 250 mL eiskaltem, sterilem ddH₂O resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Pellet mit 20 mL eiskaltem, sterilem 1 M Sorbit resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Pellet mit 1 mL eiskaltem, sterilem 1 M Sorbit resuspendiert. Die Zellen wurden am selben Tag verwendet.

2.2.2.12 Elektroporationstransformation *P. pastoris* GS115

Die Transformation von GS115 erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen Easy Select™ *Pichia* Expression Kit, S.28 – Electroporation of *Pichia*). Hierzu wurden 80 µL frischer elektrokompetenter GS115 Zellen mit 5–10 µg linearisiertem (Sall-Restriktionsverdau) Expressionsvektor pPIC9K-KPep und Pla-Pep (in 5–10 µL sterilem ddH₂O) in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 0,2 cm überführt. Die Küvette wurde 5 min mit den Zellen auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationansatz mit einer Spannung von 2,5 kV geschockt. Es wurde sofort danach 1 mL eiskaltes steriles 1 M Sorbit in die Küvette geben. Der Küvetteninhalt wurde in ein steriles 15 mL-Röhrchen geben und bei 30 °C ohne Schütteln für 1 bis 2 h inkubiert. Anschließend wurden 10, 25, 50, 100 und 200 µL auf separaten, beschrifteten Minimal Dextrose (MD) Platten ausplattiert. Die Platten wurden 3–10 d lang bei 30 °C kultiviert, bis sich Kolonien bildeten.

2.2.2.13 Kryokulturen

Um Kryokulturen von *E. coli* herzustellen, wurden 2 x 2 mL einer frischen Übernachtskultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand (OD_{600nm} : 0,5 - 0,9), für 5 min bei 1.500 g und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 mL LB-Medium gewaschen und erneut für 5 min bei 1.500 g und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 mL LB-Medium aufgenommen und die aufgenommene Zellkultur in ein Kryogefäß überführt, in welchem 500 µL 80%igem sterilem Glycerin vorgelegt wurden. Die Kultur wurde dann für 30 bis 60 min in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Alle Schritte wurden an der Flamme und mit gestopften Spitzen durchgeführt.

Zur Herstellung von Kryokulturen von *C. cinerea* wurden unter sterilen Bedingungen kleine, mit Pilzmyzel bewachsene Stücke Agar aus einer MM Agarplatte ausgeschnitten und in 10%igem sterilem Glycerin eingelegt. Das Kryogefäß wurde ebenfalls für 30 bis 60 min in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.2.14 Proteinextraktion aus Pilzmyzel

Pilzmyzel wurde gesammelt und lyophilisiert. Das getrocknete Myzel wurde unter Stickstoff gemörsert und über Nacht bei 4 °C in 0,1 M Tris HCl pH 7 inkubiert.

2.2.2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte nach (Bradford, 1976), der einen photometrischen Assay entwickelte, der auf der Färbung der Proteine mittels Coomassie Brilliant Blue-G250 beruht. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Bestimmungskit Roti®-Nanoquant von Carl Roth durchgeführt und erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.16 Unspezifischer Peptidase Assay mit Azocasein

Die Bestimmung der Peptidaseaktivität erfolgte mittels eines Azocasein-Assays nach (Kilcawley et al., 2002). Es wurden 80 µL Kulturüberstand mit 320 µL Azocasein-Reagenzlösung (vorgewärmt auf 37 °C) gemischt. Die Azocasein-Reagenzlösung setzte sich aus 240 µL 0,1 M

Tris-HCl-Puffer, pH 6,0 und 80 µL einer 0,5% wässrigen Azocasein-Lösung zusammen. Die Reaktionsansätze wurden 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte die Fällung des nicht umgesetzten Azocasein durch Zugabe von 600 µL 3% Trichloressigsäure. Die Reaktionsgefäße wurden nachfolgend 10 min bei 4 °C gekühlt. Daraufhin wurden die Reaktionsansätze 10 min bei 4 °C und bei 15.000 g zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden photometrisch bei 366 nm vermessen. Für die Erstellung eines Blindwertes wurde der Kulturüberstand zuvor 15 min in einem Wasserbad gekocht und dadurch inaktiviert. Dann erfolgte eine analoge Durchführung.

Die Peptidaseaktivität wurde wie folgt berechnet:

$$\text{AU mL}^{-1} = \frac{\Delta E_{366\text{nm}} * 60 \text{ min}}{V_{\text{Kulturüberstand}} * 15 \text{ min} * 0,01}$$

AU = Arbitrary Unit; $\Delta E_{366 \text{ nm}}$ = Extinktion Probe – Extinktion Blindwert; $V_{\text{Kulturüberstand}} = 0,08 \text{ mL}$; 1 U = Enzymmenge, welche eine Extinktionsdifferenz von 0,01 innerhalb einer Stunde hervorruft

2.2.2.17 Spezifischer Serinpeptidase-Assay

Die Bestimmung der Serinpeptidaseaktivität erfolgte gemäß (Szwajcer-Dey et al., 1992) mit Hilfe des Substrats Z-Gly-Pro-*p*-Nitroanilid oder Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-Nitroanilid. Das Prinzip der Messung beruht auf der Zunahme der Absorption bei 410 nm bei 37 °C durch die Bildung von *p*-Nitroanilin ($\epsilon_{410 \text{ nm}}: 10.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, (Lottenberg and Jackson, 1983)). Die Messung erfolgt am Plattenreader in einer 96-Well Platte mit 200 µL Ansätzen. Es wurde wie folgt pipettiert:

130 µL 100 mM TrisHCl Puffer pH 7,0

20 µL Kulturüberstand

50 µL 48 µL TrisHCl Puffer + 2 µL Substrat (8 mM in Methanol gelöst)

Die Extinktion wird bei 410 nm gemessen. Die Messungen erfolgen bei 37 °C über einen Zeitraum von 15 bis 60 min alle 31 s. Es wird die Steigung (ΔE oder V_{max}) bestimmt. Die Peptidaseaktivität kann über folgende Formel berechnet werden. Hierbei bezeichnet die

Aktivität die Enzymmenge die 1 μmol des Substrats pro Minute umsetzt. Für die Erstellung eines Blindwertes wurde anstatt Kulturüberstands weitere 20 μL Puffer eingesetzt.

$$U L^{-1} = \frac{V * F * \Delta E}{v * \epsilon * d}$$

V = Gesamtvolumen Reaktionsansatz; F = Verdünnungsfaktor; ΔE = Zunahme der Extinktion; v = Volumen der Probe; ϵ = Extinktionskoeffizient von *p*-Nitroanilin bei 410 nm ($10.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); d = Schichtdicke des Volumens in Kavität (0,64 cm für 200 μL Ansätze in 96-Well Platte); 1 U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$

2.2.2.18 Laccase Assay

Die Bestimmung der Laccaseaktivität erfolgte nach (Rühl et al., 2013) mit Hilfe des Substrats 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS). Das Prinzip der Messung beruht auf der Zunahme der Absorption bei 420 nm und bei Raumtemperatur durch die Oxidation von ABTS zu seinem Kation Radikal (ABTS \bullet +) ($\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) innerhalb von 10 min (Matsumura et al., 1986; Johannes and Majcherczyk, 2000). Die Messung erfolgt am Plattenreader in einer 96-Well Platte mit 200 μL Ansätzen. Es wurde wie folgt pipettiert:

160 μL 150 mM Natrium Acetat Puffer pH 5,0

20 μL Kulturüberstand

20 μL 10 mM ABTS

Die Extinktion wird bei 420 nm gemessen. Die Messungen erfolgen bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 10 min alle 31 s. Es wird die Steigung (ΔE oder V_{max}) bestimmt. Die Laccase-Aktivität kann über folgende Formel berechnet werden. Hierbei bezeichnet die Aktivität die Enzymmenge die 1 μmol des Substrats pro Minute umsetzt. Für die Erstellung eines Blindwertes wurde anstatt Kulturüberstands weitere 20 μL Puffer eingesetzt.

$$U L^{-1} = \frac{V * F * \Delta E}{v * \epsilon * d}$$

V = Gesamtvolumen Reaktionsansatz; F = Verdünnungsfaktor; ΔE = Zunahme der Extinktion; v = Volumen der Probe; ϵ = Extinktionskoeffizient von ABTS bei 420 nm ($36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); d =

Schichtdicke des Volumens in Kavität (0,64 cm für 200 µL Ansätze in 96-Well Platte); 1 U = 1 µmol min⁻¹

2.2.2.19 Nukleotid-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA Proben wurden diese an die Firma Microsynth SeqLab (Göttingen, DE) gesendet. Dort wurde eine Sanger Sequenzierung durchgeführt. Die Menge an DNA richtete sich dabei nach den Dienstleistervorgaben. Die Proben wurden zuvor mit den entsprechenden Oligonukleotiden versetzt.

2.2.3 Gelelektrophoretische Methoden

2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA Fragmenten oder Produkten wurde in der Regel ein 1,5%iges Agarosegel verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde das PerfectBlue™ Mini S und Mini M Gelelektrophorese System von PeqLab genutzt. Hierzu wurde die entsprechende Menge an Agarose in 60 mL oder 180 mL TAE Puffer (50xTAE-Puffer Stock: 242 g Tris, 57,1 mL Eisessig, 100 mL 0,5 M EDTA pH 8, auffüllen auf 1 L mit ddH₂O) eingesetzt und mittels Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose geschmolzen war und das Gel gegossen werden konnte. Die Proben wurden mit Midori Green Direct nach Herstellerangaben versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Die TAE-Agarosegele wurden bei einer Spannung von 80-120 V für die Trennung von DNA-Fragmenten verwendet bis die untere Farbfront des Midori Green Ladepuffers kurz davor war aus dem Gel auszutreten. Anschließend wurden die DNA mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.3.2 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulphat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Methode wurde nach (Laemmli, 1970) durchgeführt. Hierzu wurden denaturierende 6% Sammelgele und 12% Trenngele verwendet. Die Gele wurden wie folgt hergestellt:

| Bestandteile | 6%iges PAA Gel | 12%iges PAA Gel |
|--|----------------|-----------------|
| ddH ₂ O | 1,8 mL | 2,7 mL |
| Upper Tris Puffer (pH 6,8) [0,5 M Tris; 0,4% SDS] | 0,75 mL | - |
| Lower Tris Puffer (pH 8,8) [1,5 M Tris; 0,4% SDS] | - | 1,5 mL |
| Rotiphorese® Gel 40 (Carl Roth) | 0,45 mL | 1,8 mL |
| APS 40% | 10 µL | 15 µL |
| TEMED | 4 µL | 7,5 µL |

Die Gele wurden mit Hilfe der Mini-Protean® TetraSystem von BioRad gegossen und für die Trennung der Proben verwendet. Die Proben wurden mit denaturierendem Probenauftragungspuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele) wurden mit den denaturierten Proben beladen und anfangs mit 20 mA pro Gel getrennt, bis die Proben aus dem Sammelgel in das Trenngel migriert waren. Ab dann wurde der Stromfluss auf 40 mA pro Gel erhöht bis die Bromphenolblau Farbbande des Ladepuffers aus dem Gel migriert war. Die Zusammensetzung des Probenauftragungspuffers und Laufpuffers war wie folgt:

| | |
|--|--|
| Denaturierender Probenauftragungspuffer (5x Laemli) | 300 mM Tris HCl pH 6,8; 50% Glycerin; 10% SDS; 0,25% Bromphenolblau; 7,5% β-Mercaptoethanol |
| Denaturierender SDS- PAGE Laufpuffer (10x Konzentrat) | 1,92 M Glycin; 0,25 M Tris; 1% SDS |

2.2.3.3 Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen

Die Silberfärbung wurde nach (Blum et al., 1987) durchgeführt. Die einzelnen Schritte und die Zusammensetzungen der Lösungen für die Silberfärbung werden nachfolgend zusammengefasst.

| | Zusammensetzung der Lösungen | Dauer |
|------------------------|--|------------|
| 1 Fixierung | 50% MeOH; 12% AcOH; 0,5 mL 37% HCOH L ⁻¹ | ≥ 1h |
| 2 Waschen | 50% EtOH | 3 x 20min |
| 3 Vorbehandlung | Na ₂ S ₂ O ₃ 5H ₂ O (0,2 g L ⁻¹) | 1 min |
| 4 Spülen | H ₂ O | 3 x 30 sec |
| 5 Imprägnierung | AgNO ₃ (2 g L ⁻¹); 0,75 mL 37% HCOH L ⁻¹ | 20 min |
| 6 Spülen | H ₂ O | 2 x 20 sec |
| 7 Entwickeln | Na ₂ CO ₃ (60 g L ⁻¹); 0,3 mL 37% HCOH L ⁻¹ | 10 min |
| 8 Waschen | H ₂ O | 2 x 2 min |
| 9 Stoppen | 50% MeOH, 12% AcOH | 10 min |
| 10 Waschen | 50% MeOH | ≥ 20 min |

2.2.3.4 Western Blot Analyse

Um spezifisch mittels Antikörper Proteine nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine aus dem PAA-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membran übertragen. Dafür wurde die Membran zuvor in Methanol vorkonditioniert und anschließend mit Reinstwasser und Western Blot Laufpuffer gewaschen. Für den Transfer wurde das PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web™ S System von PeqLab genutzt. Hierzu wurden 3 Whatman Papiere, das PAA-Gel, die PVDF-Membran und erneut 3 Whatman Papiere geschichtet und in der Transferkammer positioniert und mit Western Blot Laufpuffer gefüllt. Der Proteintransfer erfolgte in der Blottingkammer für eine Stunde bei 100 V. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen und über Nacht in 5% Milchpulver TBS-T-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen und diese anschließend für zwei Stunden auf dem Rollinkubator mit dem Primärantikörper inkubiert. Für die Detektion der WcOPsP wurde als Primärantikörper ein Anti-WcOPsP-Antikörper aus Kaninchenserum und ein Anti-Kaninchen-HRP Antikörper als Sekundärantikörper verwendet (Merck KGaA, Darmstadt). Für die Detektion Histidin-markierter Proteine wurde nur der Anti His-HRP 3894 Antikörper (1:10.000 in TBS-T) von der Firma Carl Roth bei Raumtemperatur verwendet. Dieser Antikörper stellt einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper dar, welcher mit einer

Meerrettich-Peroxidase fusioniert ist. Nach der Antikörperinkubation wurde erneut dreimal mit TBS-T-Puffer für 5 min gewaschen. Die Membran wurde anschließend mit dem Opti-4CN™ Substrate Kit von BioRad gefärbt. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Membran dreimal mit Reinstwasser gewaschen und eingescannt. In einem Fall wurde eine klassische Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper durchgeführt. Zwischen den Inkubationen der Antikörper wurden jeweils 3mal mit TBS-T für 5 min gewaschen.

| | |
|---|--|
| Blotting Puffer (10x Konzentrat) | 1,92 M Glycin; 0,25 M Tris; auf 1x verdünnen und mit 5% Methanol versetzen |
| TBS (10x Konzentrat) | 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl; mit NaOH auf pH 7,5 einstellen |
| TBS-T | TBS Puffer (10x) auf 1x verdünnen und 0,1% Tween20 hinzugeben |

2.2.3.5 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die IEF wurden das SERVAGel™ IEF 3-10 Kit (Kathodenpuffer, Anodenpuffer, IEF Marker 3-10, ServaGel™IEF3-10) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Elektrophorese wurde das PerfectBlue™ Twin S System von PeqLab verwendet. Die Laufstrecke der Markerproteine wurde gegen ihren isoelektrischen Punkt aufgetragen und mit einer daraus abgeleiteten Regressionsgeraden der isoelektrische Punkt des Zielproteins bestimmt. Die Elektrophorese wurde für 1 h bei 60 V, 1 h bei 200 V und anschließend 30 min bei 500 V permanent bei 4 °C durchgeführt.

2.2.3.6 Laccase-Zymogram

Zum Nachweis der Laccaseaktivität in einem PAA-Gel wurde ein Laccase Zymogram nach (Rühl et al., 2013) durchgeführt. Hierzu wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, bei der die Laccase haltigen Proben mit Probenauftragspuffer ohne β -Mercaptoethanol versetzt und nicht thermisch denaturiert wurden. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel mit 10 mM 3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon Hydrochlorid (MBTH) und 10 mM 3,4-dihydroxyhydrocinnamin Säure (DHPPA) in 100 mM Natriumacetat Puffer pH 5 ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3.7 Deglykosylierung

Die Desglykosylierung von Lcc8 wurde gemäß dem Herstellerhandbuch von PNGase F (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) durchgeführt.

2.2.4 Proteinreinigung

2.2.4.1 FPLC Reinigung mittels HisTrap™ HP Säule

Für die Reinigung rekombinanter Histidin-markierter Proteine wurde eine HisTrap™ HP Säule 5 mL von GE Healthcare und das BioLogic DuoFlow™ System von BioRad verwendet. Das Reinigungsprotokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde die Probe mit Natriumphosphat, Natriumchlorid und Imidazol (20 mM Na₂PO₄, 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,4) versetzt und damit vorkonditioniert. Die Probe wurde anschließend filtriert (0,45 µm). Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen (SV) filtriertem ddH₂O gewaschen und anschließend mit 5 SV Bindepuffer (20 mM Na₂PO₄, 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,4) vorkonditioniert. Das Probenvolumen wurde über die Säule gegeben und anschließend so lange mit Bindepuffer gespült, bis die UV-Absorption wieder abflachte und in eine Plateauphase überging. Daraufhin wurde die Elutionsphase eingeleitet. Hierzu wurde ein Gradient mit dem Elutionspuffer (20 mM Na₂PO₄, 0,5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4) eingestellt, bei dem nach 5 SV die finale Konzentration von 500 mM Imidazol erreicht wurde. Alle Schritte wurden mit einem Fluss von 5 mL min⁻¹ durchgeführt. Während der Elution wurden alle Fraktionen gesammelt und anschließend für weitere Analysen verwendet.

2.2.4.2 Reinigung der Laccase Lcc8 mittels FPLC

Die Reinigung der Laccase Lcc8 wurde analog zu der Reinigung von (Rühl, 2009) durchgeführt. Hierzu wurde der pH-Wert des Kulturüberstands auf pH 6,4 eingestellt und der Überstand durch Zentrifugation und Filtration (Makrosep® PALL Zentrifugationsmembran 300 kDa) von groben Bestandteilen und Ausfällungen befreit. Alle FPLC Reinigungsschritte wurden mit Chromatographie Säulen der Firma GE Healthcare unter der Verwendung des BioLogic DuoFlow™ Systems von BioRad durchgeführt. Der ultrafiltrierte Überstand wurde für die Reinigung mittels einer DEAE-FF Anionenaustauscher (AEX) Säule (XK26) verwendet. Hierbei wurde als Ladepuffer 20 mM KH₂PO₄ Puffer pH 6,4 und als Elutionspuffer 20 mM KH₂PO₄ 1 M

NaCl Puffer pH 6,4 eingesetzt. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels ABTS-Assay (2.2.2.18) auf Laccaseaktivität hin untersucht und aktive Fraktionen wurden vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden mittels VivaFlow 200 mit einer 10 kDa Membran (Sartorius, Göttingen, DE) auf 20 mM KH_2PO_4 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ umgepuffert und für eine Hydrophobeinteraktionschromatography (HIC) eingesetzt. Hierbei wurde eine HiPrep16/10 highsub Säule mit Phenyl FF als Festphase verwendet. Als Elutionspuffer für die HIC wurde 20 mM KH_2PO_4 verwendet. Gesammelte Fraktionen wurden erneut auf Laccaseaktivität getestet, dementsprechend vereinigt und entsalzt.

2.2.4.3 Protein-Sequenzierung mittels nano-LC-MS/MS

Zur Reinigung aus einer SDS-PAGE geschnittener Proteinbanden wurden die Gelstücke nach (Gundry et al., 2009) gereinigt. Hierzu wurden die Gelstücke in 50% Methanol (0,1% Ameisensäure) gewaschen, mit 50 mM Ammoniumbicarbonat in 50% Acetonitril entfärbt, erneut mit ddH₂O gewaschen und mit Acetonitril dehydriert. Die Proben wurden für das Peptidmassenfingerprinting an Dr. Andrzej Majcherczyk (Molekulare Holzbiotechnologie und technische Mykologie, Bünsen-Institut, Universität von Göttingen, Bünsenweg 2, 37077 Göttingen, DE) gegeben.

2.2.5 Biochemische Methoden

2.2.5.1 Biochemische Charakterisierung Lcc8

Neben ABTS wurden zur Bestimmung der Laccaseaktivität 2,6-Dimethoxyphenol (DMP), 2-Methoxyphenol (Guajakol) und Syringaldazin (SGZ, 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehydazin) verwendet. Die Zunahme der Extinktion wurde spektroskopisch bei 420 nm ($\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 468 nm ($\epsilon = 49.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 436 nm ($\epsilon = 6.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und 526 nm ($\epsilon = 65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) für ABTS, DMP, Guajakol bzw. SGZ gemessen (Matsumura et al., 1986; Wariishi et al., 1992; Slomczynski et al., 1995; Eggert et al., 1996). Eine Einheit der Enzymaktivität wurde als die Menge an Enzym definiert, die 1 μmol Substrat pro Minute oxidiert. Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurde der Britton-Robinson-Universalpuffer pH 2–12 (Rauen, 1964) verwendet. Die pH-Stabilität wurde durch Inkubation von 150 mU Laccase in 1 mL Universalpuffer (pH 2–12) für bis zu 24 h bestimmt. In definierten

Abständen wurden Proben entnommen und die Laccase-Aktivität mit ABTS in 150 mM Natriumacetatpuffer (pH 5) gemessen. Zur Bestimmung der optimalen Temperatur wurde die Laccase-Aktivität bei Temperaturen im Bereich von 11 bis 71 °C mit ABTS in 150 mM Natriumacetatpuffer (pH 5) unter Verwendung von Küvetten gemessen. Die Reaktionstemperatur wurde direkt in den Küvetten gemessen, was zu unterschiedlichen Werten von 11 °C, 20 °C, 28 °C, 36 °C, 45 °C, 54 °C, 63 °C und 71 °C führte. Die thermische Stabilität wurde durch Inkubation der Laccase in Universalpuffer pH 8 für mindestens 5 h bei 10 °C, 30 °C, 50 °C und 70 °C bestimmt. Die Aktivität wurde mit ABTS in 150 mM Natriumacetatpuffer (pH 5) gemessen.

2.2.5.2 Berechnung K_m für Lcc8

Anhand des Verhältnisses von V_{max} zur Substratkonzentration konnte mit Hilfe des Programms GraphPad® Prism Version 5.03 der K_m -Wert mittels nicht linearer Regression für die beiden Substrate ABTS und DMP bestimmt werden.

Die Berechnung von K_{cat} erfolgte nachfolgender Formel:

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{E}$$

3 Durchführung und Ergebnisse

3.1 Expression der Laccase Lcc1 in *C. cinerea* mittels pYSK7:

Zu Beginn dieser Arbeit wurde demonstriert, dass das bereits beschriebene pYSK7 basierte Expressionssystem (Kilaru et al., 2006b) zur Expression von Laccasen in *C. cinerea* funktioniert. Hierzu wurde *C. cinerea* mit dem Markervektor pCc1001 und dem Expressionsvektor pYSK7 transformiert (2.2.2.10). Die Transformation zeigte *C. cinerea* Transformanden, die in der Lage waren auf Tryptophan freien Agar-Platten zu wachsen. Weiterhin zeigten acht der 13 Transformanden eine starke Grün-Färbung bei der Kultivierung auf ABTS Agarplatten (2.2.1.3) (Abbildung 5).

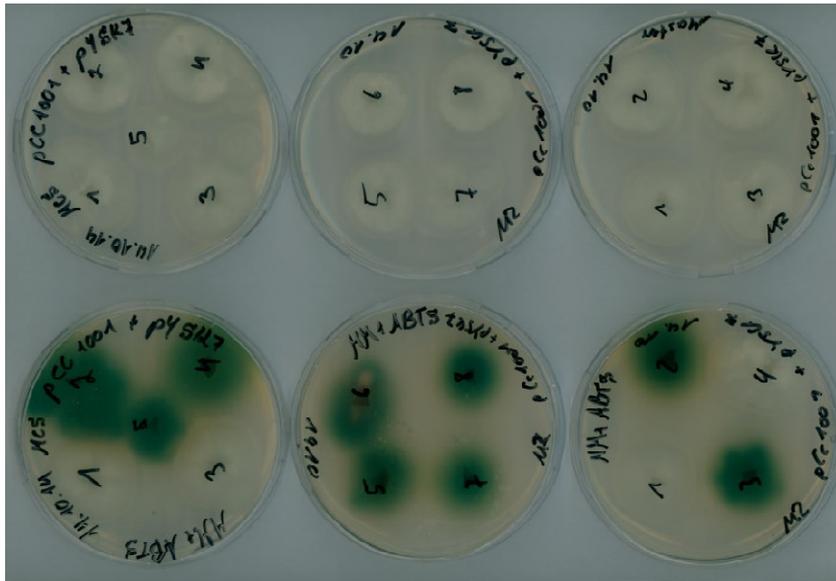


Abbildung 5: ABTS-Agarplatten Assay zum Nachweis der Laccaseproduktion. Obere Reihe zeigt Transformanten auf Minimal Medium Agarplatten. Untere Reihe zeigt dieselben Transformanten auf ABTS-Minimal Medium Agarplatten.

Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass durch die Transformation von *C. cinerea* mit pYSK7 eine aktive Laccase exprimiert und durch die Transformation von *C. cinerea* mit pCc1001 die Tryptophan Auxotrophie kompensiert werden kann. Weiterhin konnte Galperin et al. (2016) zeigen, dass das pYSK7 basierte Expressionssystem auch für andere Oxidasen (Arylalkohol Oxidase) verwendet werden kann. Aufgrund dieser Ausgangssituation sollte versucht werden zwei Peptidase Gene, welche nicht rekombinant in *P. pastoris* und *E. coli* exprimiert werden konnten, mit Hilfe des pYSK7 basierten Expressionssystems in *C. cinerea* zu exprimieren.

3.2 Expression zweier Peptidasen mit Hilfe des pYSK7 basierten Expressionssystem in *C. cinerea*

3.2.1 Expression *Wolfiporia cocos* Prolyl-spezifische Peptidase (WcOPsP)

Das zu exprimierende Peptidasegen aus *W. cocos* codiert für eine putative Serinpeptidase mit einer Prolyl spezifischen Aktivität (Prolyl-spezifische Peptidase (PsP)). Diese Peptidase wurde von Falk Amelung im Rahmen seiner Doktorarbeit am Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen identifiziert und zum Teil charakterisiert. Hierbei wurde auch die Nukleotidsequenz der cDNA bestimmt (Anhang 3). Für die Amplifikation der *W. cocos* PsP (WcOPsP) wurde hingegen gDNA verwendet, wodurch sich die Größe des zu erwartenden PCR Produkts im Vergleich zur cDNA erhöht. Ein Abgleich der

cDNA Sequenz mit ähnlichen Sequenzen aus der Datenbank des Joint Genome Institutes (JGI, <https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) führte zum Protein mit der ID28272 aus dem Stamm *W. cocos* MD-104 SS10. Anhand dieser Genomdaten (Anhang 4) konnten die Introns annotiert und die Größe der gDNA der WcOPsP aus dem *W. cocos* Stamm CBS 279.55 mit 2.133 bp bestimmt werden. Für die Expression der WcOPsP wurden drei auf pYSK7 basierte Expressionsvektoren generiert (Abbildung 6).

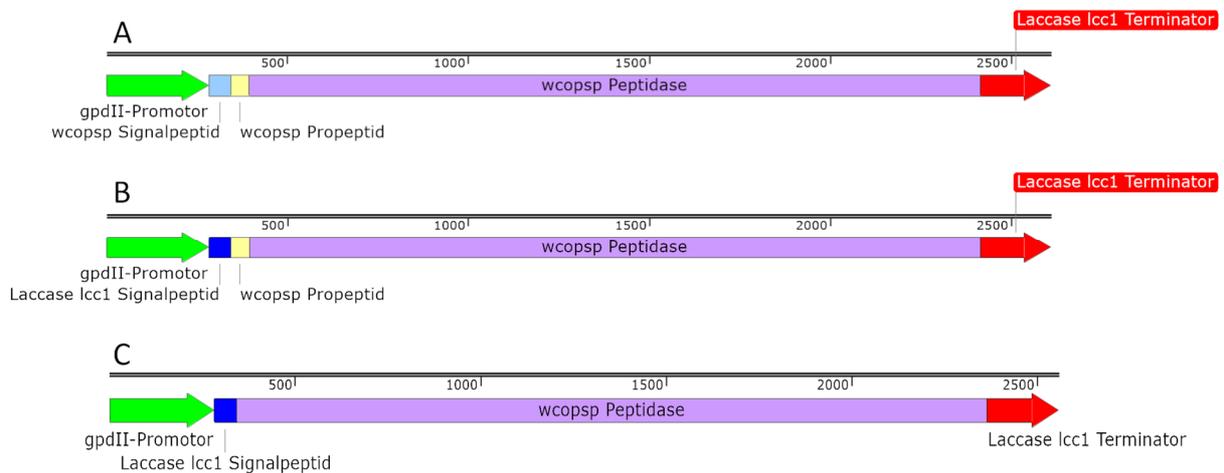


Abbildung 6: Expressionskassetten der pYMS Expressionsvektoren. A = pYMS1, grün: *gpdII*-Promotor, hellblau: *wcopsp*-Signalpeptid, hellgelb: *wcopsp*-Prosequenz, lila: *wcopsp*-Peptidase, rot: *lcc1*-Terminator; B = pYMS2, grün: *gpdII*-Promotor, dunkelblau: *lcc1*-Signalpeptid, hellgelb: *wcopsp*-Prosequenz, lila: *wcopsp*-Peptidase, rot: *lcc1*-Terminator; C = pYMS3, grün: *gpdII*-Promotor, dunkelblau: *lcc1*-Signalpeptid, lila: *wcopsp*-Peptidase, rot: *lcc1*-Terminator.

Das jeweilige PCR-Fragment der WcOPsP DNA zur Klonierung der Expressionsvektoren wurde mit Hilfe der Oligonukleotidpaare 109/110 (pYMS1), 111/110 (pYMS2) und 113/110 (pYMS3) amplifiziert (2.2.2.5) (Abbildung 7). Die Analyse der optimalen Hybridisierungstemperatur zeigte bei allen drei Amplifikationen, dass eine hohe Hybridisierungstemperatur von ca. 75 °C zu sauberen Produkten mit einer Größe von ca. 2 kbp führte. Diese Produkte entsprachen der

zu erwartenden Größe, weshalb die PCR wiederholt und die Produkte direkt nach der PCR mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt wurden.

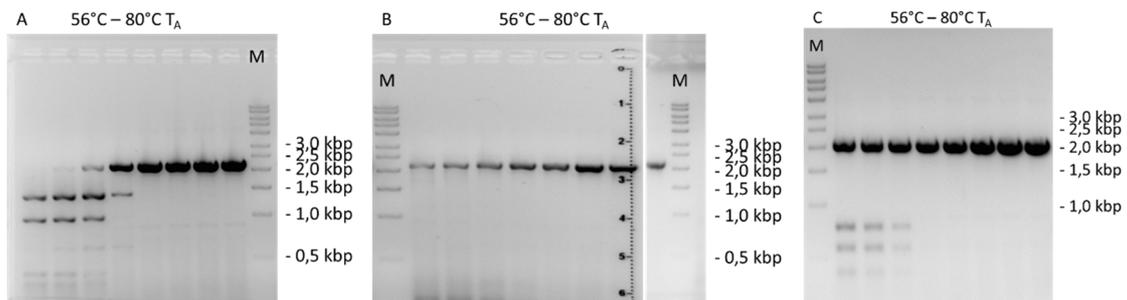


Abbildung 7: Amplifikation der WcOPsP Fragmente. Für die Amplifikation wurde für die Oligonukleotid-Hybridisierungstemperatur ein Temperaturgradient von 56 °C bis 80 °C verwendet. **A** = PCR mit den Oligonukleotiden 109 und 110 für pYMS1; **B** = PCR mit den Oligonukleotiden 111 und 110 für pYMS2; **C** = PCR mit dem Oligonukleotiden 113 und 110 für pYMS3. Es wurde jeweils 1 kb-DNA-Leiter von Carl Roth (M) verwendet.

pYSK7 wurde mittels Restriktionsverdau (2.2.2.6) mit den Enzymen *Bam*HI und *Hsp*AI verdaut. Dabei sollte ein ca. 800 bp großes Fragment von *lcc1* entfernt werden. Der Restriktionsverdau zeigte sowohl das ca. 11 kbp große Vektorrückgrat, als auch das ca. 800 bp große entfernte Fragment des *lcc1* Gens (Abbildung 8). Das Vektorrückgrat wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt.

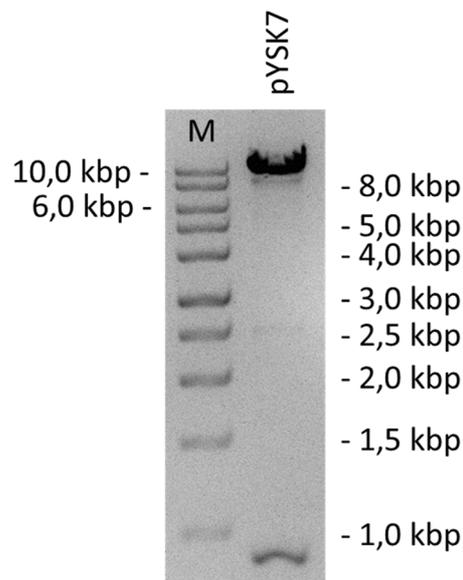


Abbildung 8: Restriktionsverdau von pYSK7. Die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hsp*AI wurden verwendet. Es wurde 1 kb-DNA-Leiter von Carl Roth (M) verwendet.

Sowohl die amplifizierten WcOPsP Fragmente für pYMS1, pYMS2 und pYMS3 als auch das linearisierte Vektorrückgrat von pYSK7 wurden jeweils für eine homologe Rekombination in der Hefe RH1385 eingesetzt (2.2.2.9). Die Transformationsansätze wurden auf YSDO-Agar (2.2.1.2) ausplattiert. Nach entsprechender Kultivierung wurden sichtbare Transformanden mittels PCR (2.2.2.5) mit dem Oligonukleotidpaaren, welche für die Amplifikation der WcOPsP Fragmente verwendet wurden, analysiert (Abbildung 9). Die Ergebnisse der PCR zeigten, dass von jeweils 10 Transformanden pro Transformationsansatz zwei (Abbildung 9A und B) bis sieben (Abbildung 9C) Transformanden das Gen von Interesse, die *wcopsp*, in den Expressionsvektor pYSK7 integriert hatten.

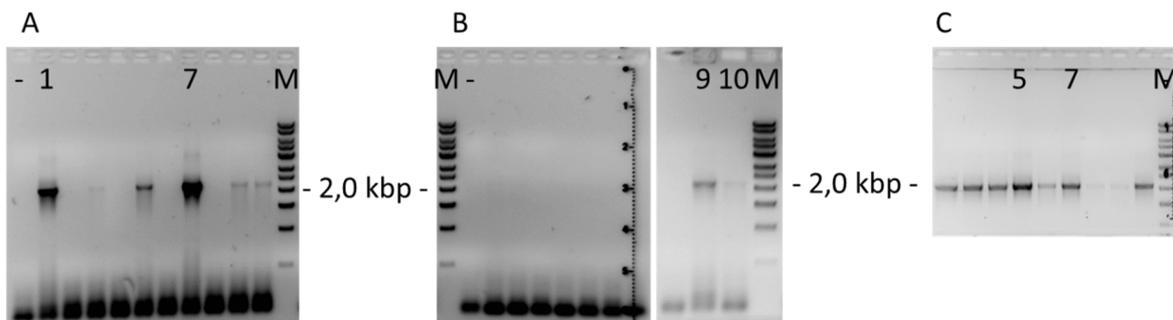


Abbildung 9: PCR zur Überprüfung der Hefe RH1385 Transformanden. A = PCR der Hefe RH1385 pYMS1 Transformanden 1-10; - Negativkontrolle. Die Transformanden 1 und 7 sind numerisch gekennzeichnet. B = PCR der Hefe RH1385 pYMS2 Transformanden 1-10; - Negativkontrolle. Die Transformanden 9 und 10 sind numerisch gekennzeichnet. C = PCR der Hefe RH1385 pYMS3 Transformanden 2-10; - Negativkontrolle. Die Transformanden 5 und 7 sind gekennzeichnet. Es wurde jeweils 1 kb-DNA-Leiter von Carl Roth (M) verwendet.

Die Vektor-DNA der Hefe Transformanden 1 und 7 für pYMS1, 9 und 10 für pYMS2 sowie 5 und 7 für pYMS3 wurde isoliert (2.2.2.2) und in elektrokompente *E. coli* JM109 (2.2.2.7) Zellen transformiert (2.2.2.8). Nach entsprechender Kultivierung (2.2.1.1) wurden JM109 Transformanden mittels PCR (2.2.2.5) und den Oligonukleotiden 29 und 130 auf die Aufnahme des Vektors hin analysiert. Die PCR zeigt eindeutige Banden auf der erwarteten Höhe von ca. 2 kbp für alle drei Expressionsvektoren (Abbildung 10).

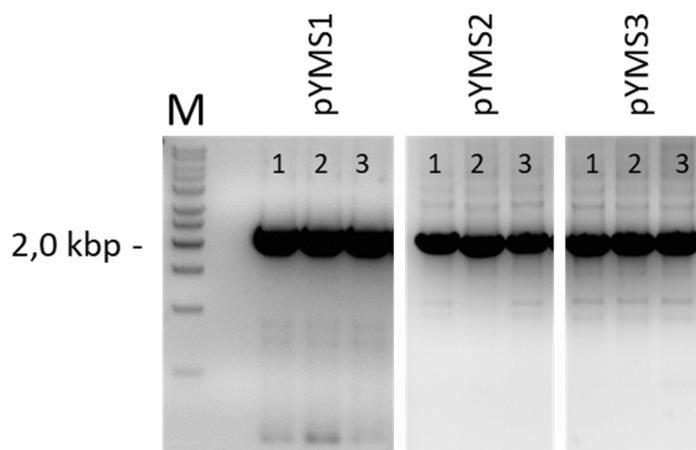


Abbildung 10: PCR zur Überprüfung der *E. coli* JM109 Transformanden. Es wurden von pYMS1, pYMS2 und pYMS3 jeweils 3 JM109 Transformanden (1-3) mittels Kolonie-PCR analysiert und dargestellt. Es wurde 1 kb-DNA-Leiter von Carl Roth (M) verwendet.

Die Vektor-DNA der JM109 Transformanden wurde isoliert (2.2.2.1) und für eine Sequenzierung (2.2.2.19) der Expressionskassette verwendet. Hierzu wurden die Oligonukleotide 29.2 und 130.2 verwendet. Da die Sequenzierungs-Reichweite nicht ausreichte um die Expressionskassette vollständig zu sequenzieren, wurde mit den Oligonukleotiden 145 (pYMS_for2) und 146 (pYMS_rev2) eine weitere Sequenzierung durchgeführt. Für den Abgleich der Sequenzierungsergebnisse mit der Nukleotid-Sequenz der WcOPsP wurde für die korrekte Annotation der Introns die Nukleotid-Sequenz der PsP aus *W. cocos* aus JGI (ID 28272) verwendet. Der Abgleich wurde mit dem Online-Werkzeug „Multalin“ (<http://multalin.toulouse.inra.fr>) durchgeführt. Die Referenz-Sequenzen und Sequenzierungsergebnisse, welche für den Abgleich verwendet wurden, befinden sich im Anhang (Anhang 3; Anhang 4; Anhang 5; Anhang 6; Anhang 7). Die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass die Expressionsvektoren pYMS1, 2 und 3 erfolgreich kloniert wurden.

C. cinerea wurde mit pCc1001 und jeweils mit den Expressionsvektoren pYMS1, 2 oder 3 transformiert (2.2.2.10). Es konnten 15 Transformanden für pYMS1, acht Transformanden für pYMS2 und drei Transformanden für pYMS3 generiert werden, die auf Minimal Medium ohne Tryptophan wuchsen. Die genomische DNA der *C. cinerea* Transformanden wurde isoliert (2.2.2.4). Eine Kolonie-PCR unter Verwendung der Oligonukleotide 145 und 146 zeigte jedoch, dass jeweils nur ein Transformand der pYMS1 und 3 Konstrukte und drei Transformanden des pYMS3 Konstrukts erfolgreich die Expressionskassette integriert hatten (Abbildung 11).

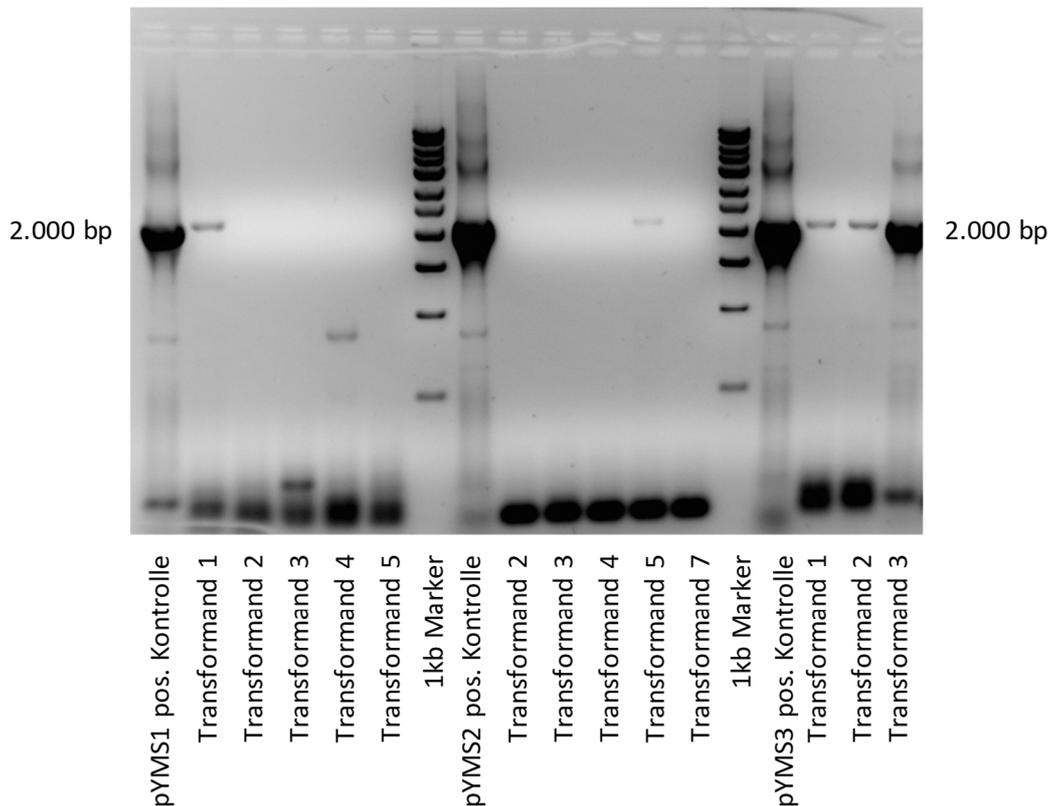


Abbildung 11: Kolonie-PCR der pYSM1-3 Transformanden. Dargestellt sind die pYMS1 Transformanden 1-5 (links), die pYMS2 Transformanden 2-5,7 (Mitte) und die pYMS3 Transformanden 1-3 (rechts). Es wurde 1 kb-DNA-Leiter von Carl Roth verwendet.

Lediglich pYMS1 Transformand 1, pYMS2 Transformand 5 und pYMS3 Transformanden 1-3 zeigten eine Integration der WcOPsP Expressionskassette. Diese positiven pYMS Transformanden und ein pCc1001 Transformand wurden für 7 d in Vorkultur und anschließend 10 d in Hauptkultur in YMG kultiviert (2.2.1.3). Von der Hauptkultur wurde an den Tagen 1, 3, 6, 8 und 10 Überstand entnommen und für den Z-Gly-Pro-4-Nitroanilid-Peptidase spezifischen Assay (2.2.2.17) verwendet. Keine der verwendeten Kulturüberstände (pCc1001, pYMS1 Transformand 1, pYMS2 Transformand 5 und pYMS3 Transformanden 1-3) wiesen eine nennenswerte PsP-Aktivität ($<2 \text{ U L}^{-1}$) auf. Als Positivkontrolle wurde *W. cocos* Kulturüberstand verwendet, welcher eine Aktivität von ca. $30 - 35 \text{ U L}^{-1}$ zeigte. Daneben wurde an Tag 6 der jeweiligen Hauptkulturen Zellpellets entnommen, gefriergetrocknet, gemörsert und die intrazellulären Proteine isoliert (2.2.2.14). Auch hier konnte in keiner der pYMS Transformanden PsP-Aktivität nachgewiesen werden.

Da keine Enzymaktivität der rekombinanten WcOPsP messbar war, wurde geprüft, ob die Translation funktionell war und möglicherweise ein inaktives Enzym vorlag. Hierzu wurde eine Western Blot Analyse (2.2.3.4) durchgeführt. Hierfür wurden Kulturüberstände und Zelllysate aller pYMS Transformanden von Tag 6 verwendet. Als Positivkontrolle diente erneut Kulturüberstand von *W. cocos* (Abbildung 12). Der verwendete Primärantikörper „Anti WcOPsP“ war ein polyklonaler Antikörper von Eurogentec (Seraing, Belgien), der durch die Immunisierung eines Kaninchens mit WcOPsP Antigen gewonnen wurde.

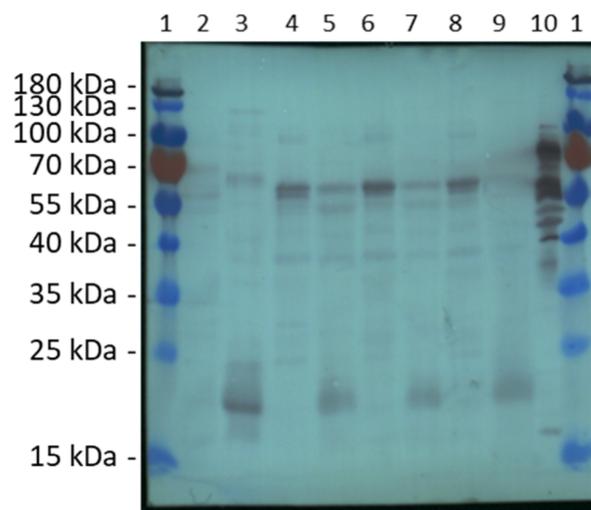


Abbildung 12: Western Blot Analyse von Kulturüberstand und Zelllysate der pYMS1, 2 und 3 Transformanden. Für die Detektion der WcOPsP wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigte Antikörper 1:100 verdünnt in TBS-T als Primärantikörper und anti-Kaninchen-HRP Antikörper als Sekundärantikörper eingesetzt. 1 = PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 2 = Kulturüberstand pCc1001; 3 = Zellpellet pCc1001; 4 = Kulturüberstand pYMS1 Transformand 1; 5 = Zellpellet pYMS1 Transformand 1; 6 = Kulturüberstand pYMS2 Transformand 5; 7 = Zellpellet pYMS2 Transformand 5; 8 = Kulturüberstand pYMS3 Transformand 3; 9 = Zellpellet pYMS3 Transformand 3; 10 = *W. cocos* Kulturüberstand als Positivkontrolle.

Die mittels dem Online-Werkzeug Expasy MW Calculator (https://web.expasy.org/compute_pi/) berechnete Größe der WcOPsP liegt bei 57 kDa. Die Proteinbanden der Western Blot Analyse zeigen, dass vor allem die Kulturüberstände der pYMS Transformanden eine Bande mit der entsprechenden Größe von ca. 57 kDa aufwiesen. Die detektierten Proteinbanden der pCc1001 Proben, welche keine WcOPsP enthält, deuten darauf hin, dass die polyklonalen Antikörper unspezifische Bindungen mit anderen Proteinen eingehen und daher Proteinbanden in allen Proben zu erkennen sind. Der Kulturüberstand von *W. cocos* zeigt mehrere kräftige Banden und deutet damit ebenfalls nicht auf eine spezifische Detektion oder Degradationsprodukte der rekombinanten WcOPsP hin.

Die bisherigen Expressionskonstrukte der WcOPsP (pYMS1-3) deuten zwar in der Western Blot Analyse die Anwesenheit der rekombinanten WcOPsP an, zeigen allerdings keinerlei Aktivität im Z-Gly-Pro-4-Nitroanilid-Peptidase spezifischen Assay auf. Die Inaktivität könnte auf fehlerhafte post-translationale Modifikationen hindeuten. Es wurde daher ein weiterer Expressionsvektor konstruiert, bei dem das native Signalpeptid der WcOPsP durch ein Signalpeptid einer *C. cinerea* Serinpeptidase ersetzt wurde. Weiterhin sollten die Detektion und Reinigung eines potentiellen Produkts durch die Verwendung einer C-terminalen sechsfachen Histidin-Markierung verbessert werden.

3.2.2 Expression der WcOPsP mit homologem Signalpeptid einer Serinpeptidase

Bei der Expressionskassette der zweiten Generation an Expressionsvektoren für die WcOPsP sollte das native Signalpeptid der WcOPsP mit einem Signalpeptid einer *C. cinerea* Serinpeptidase ausgetauscht werden. Dorothea Güttel zeigte 2010 in ihrer Doktorarbeit (Güttel, 2010), dass die Serinpeptidase EAU91794 (Anhang 8) von *C. cinerea* sekretiert wird. Damit stellte das Signalpeptid dieser Peptidase einen geeigneten Kandidaten für die Expression der WcOPsP in der zweiten Generation an Expressionsvektoren dar. Zusätzlich wurde eine C-terminale sechsfach Histidin-Markierung an das rekombinante *wcopsp* Gen angefügt (Abbildung 13). Der vollständige Expressionsvektor wurde pYMS11c genannt.

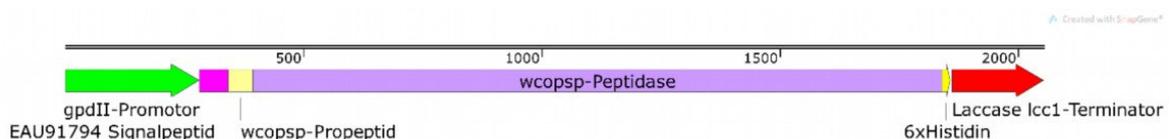


Abbildung 13: Expressionskassette des pYMS11c Expressionsvektor. Das *wcopsp* (violett) Gen steht unter der Kontrolle des *gpdII*-Promotors (grün) und des *lcc1*-Terminators (rot). Es wird das Signalpeptid der EAU91794 (pink) mit dem nativen Propeptid (gelb) der *wcopsp* verwendet. Zusätzlich ist eine sechsfach Histidin-Markierung vor dem *lcc1*-Terminator eingefügt.

Für die Amplifizierung (2.2.2.5) des Signalpeptids von EAU91794 wurden die Oligonukleotide 224 und 229 verwendet. Für die Amplifizierung (2.2.2.5) der WcOPsP wurden die Oligonukleotide 230 und 322 verwendet. Der Expressionsvektor pYMS11c wurde analog zu den Expressionsvektoren pYMS1-3 kloniert. Der Expressionsvektor pYMS11c wurde sequenziert (2.2.2.19) um sicher zu stellen, dass das Signalpeptid ausgetauscht wurde und die

Histidin-Markierung hinzugefügt wurde. Die Sequenzierung wurde mit den Oligonukleotiden 29.2 und 130.2 durchgeführt (Anhang 10).

Die Sequenzierungsdaten decken die Sequenz der Expressionskassette zu ca. 88% ab, da die Sequenzierreichweite nicht ausreichte. Sie zeigen aber, dass das Signalpeptid ausgetauscht und die C-terminale Histidin-Markierung hinzugefügt wurde. Die Sequenzbereiche, die durch die Sequenzierungsergebnisse abgedeckt werden, sind homolog zur erwarteten pYMS11c Sequenz. Somit wurde davon ausgegangen, dass der Expressionsvektor wie erwartet kloniert wurde. *C. cinerea* wurde daraufhin mit dem Expressionsvektor pYMS11c transformiert (2.2.2.10). Dies geschah analog zur Durchführung mit pYMS1-3. Es wurden analog Transformanten auf Tryptophan freiem Minimal Medium Agar-Platten kultiviert (2.2.1.3) und mittels Kolonie PCR (2.2.2.4; 2.2.2.5) analysiert, welche Transformanten die Expressionskassette integriert hatten (Abbildung 14). Für die Kolonie PCR wurden die Oligonukleotide 222 und 130 eingesetzt.

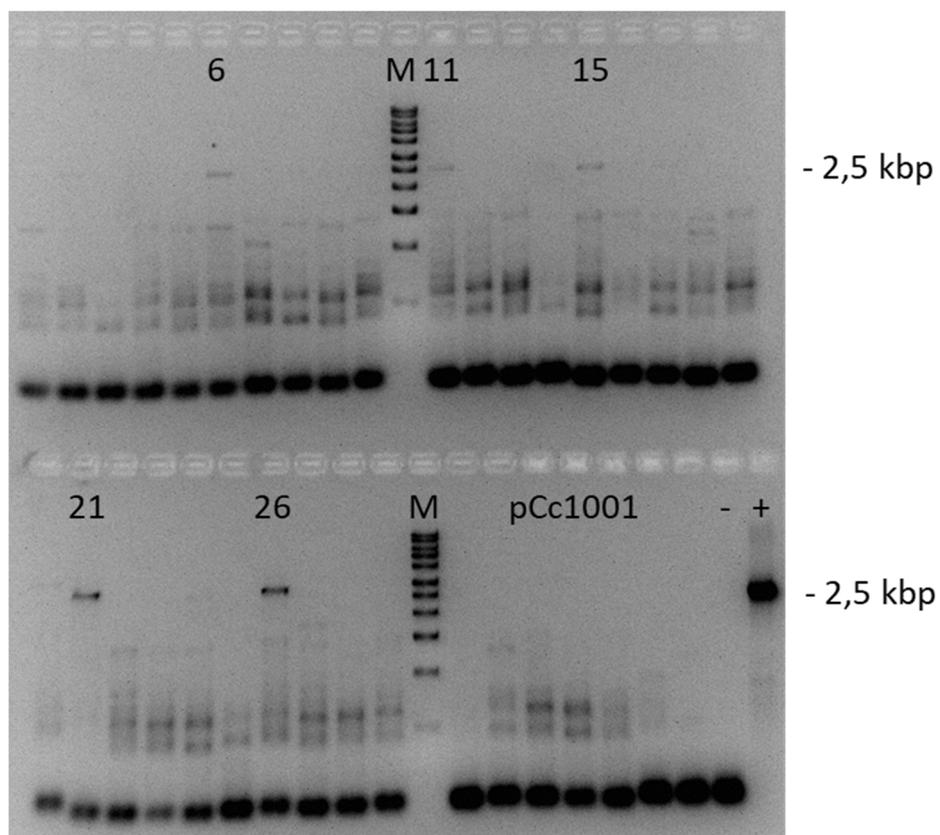


Abbildung 14: Kolonie PCR der pYMS11c Transformanten. Dargestellt sind die Transformanten 1-29, wobei nur positive Transformanten numerisch in der Abbildung aufgeführt wurden. Die pCc1001 Transformanten (1-7) stellen eine Negativkontrolle dar, + stellt die Positivkontrolle dar, welche mit

welche als Negativkontrolle dienen, keine solche Banden zeigten. Die Kulturüberstände aller pYMS11c Transformanden wurden vereinigt und für eine Reinigung mittels Ni-NTA Säule (Ni-NTA Spin Column (50), Qiagen) verwendet. Die vereinigten Kulturüberstände wurden zuvor mittels Nanosep® PALL Zentrifugationsmembran (10 kDa) eingeeengt und anschließend mittels Ni-NTA Säulen gereinigt. Um den Reinigungserfolg nachzuweisen, wurde mittels Western Blot (2.2.3.4) analysiert, in welchen Fraktionen sich das rekombinante Produkt befand (Abbildung 16).

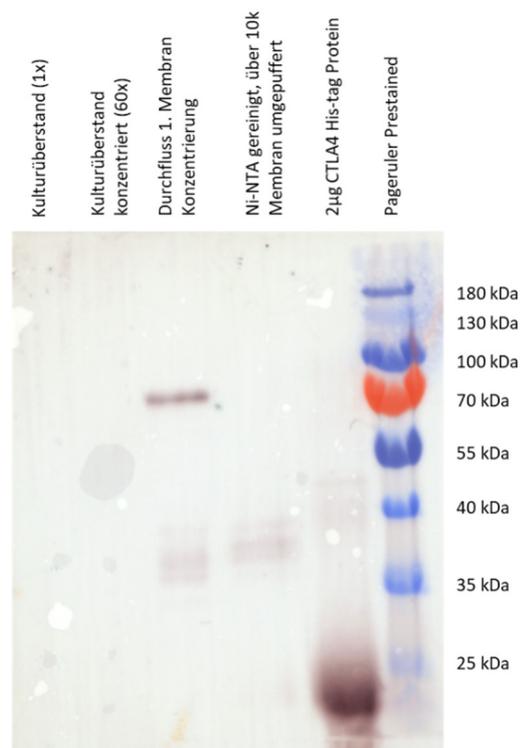


Abbildung 16: Kontrolle der Reinigung des Kulturüberstandes der pYMS11c Transformanden mittels Western Blot Analyse. Marker ist der PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

Die Reinigungsanalyse zeigte, dass bereits während des Einengens des Kulturüberstands das rekombinante Produkt durch die Membran migrierte und im Durchfluss detektiert wurde. Eine Aktivitätsbestimmung konnte an dieser Stelle nicht erfolgen. Der pYMS11c Transformand 11 wurde mehrmals wiederholt kultiviert, jedoch konnte in allen Kulturüberständen kein rekombinantes Produkt mehr nachgewiesen werden. Es wurde eine erneute PCR zur Überprüfung der Anwesenheit der Expressionskassette durchgeführt, allerdings zeigte die Gelelektrophorese keine Bande mehr auf der erwarteten Höhe.

3.2.3 Expression der *Rhizopertha dominica* Serinpeptidase (RdoT3)

Neben der PsP aus *W. cocos*, sollte eine weitere Serinpeptidase aus dem Getreidekapuziner *Rhizopertha dominica* rekombinant dargestellt und charakterisiert werden. Diese Peptidase wurde von Nicole Mika während ihrer Doktorarbeit am Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie in Gießen detektiert und die Aminosäuresequenz mittels Quadrupol Orbitrap Hybrid-Massenspektrometers bestimmt. Mit Hilfe der Aminosäuresequenz wurde die cDNA synthetisch und Codon optimiert für die Expression in *E. coli* hergestellt (Anhang 12). Das synthetische Gen wurde als Matrize für die Amplifizierung (2.2.2.5) der RdoT3 und Klonierung der Expressionsvektoren pYMS5, 6 und 7 (Abbildung 17) genutzt.

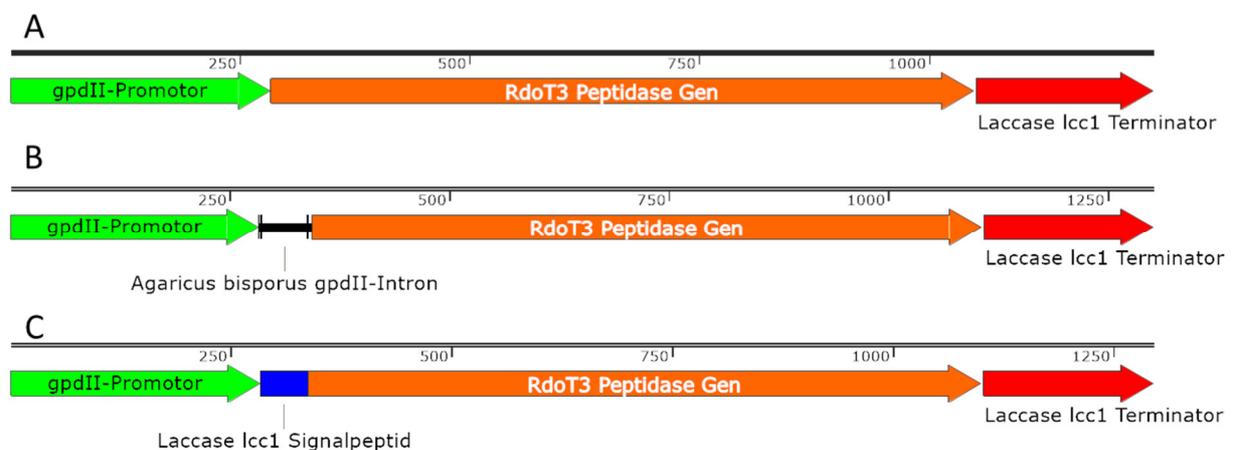


Abbildung 17: Expressionskassetten des A = pYMS5 Expressionsvektor. Das *rdoT3*-Gen (orange) steht unter der Kontrolle des *gpdII*-Promotors (grün) und des *lcc1*-Terminators (rot). **B = pYMS6 Expressionsvektor.** Das *rdoT3*-Gen (orange) steht unter der Kontrolle des *gpdII*-Promotors (grün) und des *lcc1*-Terminators (rot). Es wurde ein Intron des *A. bisporus gpdII*-Gens direkt nach dem Start Codon eingefügt (schwarz). **C = pYMS7 Expressionsvektor.** Das *rdoT3*-Gen (orange) steht unter der Kontrolle des *gpdII*-Promotors (grün) und des *lcc1*-Terminators (rot). Das *lcc1*-Signalpeptid (blau) wurde direkt vor dem 5'-Ende des *rdoT3*-Gens eingefügt.

Für die Amplifizierung (2.2.2.5) des *rdoT3* Gens für die Klonierung von pYMS5 wurden die Oligonukleotide 156 und 157 verwendet. Bei pYMS5 steht das *rdoT3* Gen unter der Kontrolle des *gpdII*-Promotors und des *lcc1*-Terminators. Da das synthetische *rdoT3* Gen keine Introns besitzt und Burns et al. (2005) demonstrierten, dass für die erfolgreiche Expression von Grün fluoreszierendem Protein (GFP) in *C. cinerea* ein Intron nötig sein kann, wurde deshalb pYMS6 mit einem zusätzlichen *gpdII*-Intron (Anhang 9) aus *A. bisporus* konstruiert. Das *gpdII*-Intron wurde mit den Oligonukleotiden 158 und 159 amplifiziert, wobei gDNA aus *A. bisporus* als Matrize verwendet wurde. Das *rdoT3*-Gen wurde mit den Oligonukleotiden 160 und 157

amplifiziert. pYMS7 war ursprünglich so geplant, dass dieser Vektor ebenfalls ein zusätzliches *gpdII*-Intron zwischen dem *gpdII*-Promotor und dem *lcc1*-Signalpeptid besitzt. Die Oligonukleotide 162 und 163 dienten der Amplifizierung des *gpdII*-Introns, die Oligonukleotide 164 und 165 der Amplifizierung des *lcc1*-Signalpeptids und die Oligonukleotide 166 und 157 der Amplifizierung des *rdot3* Gens. Die Vektoren wurden analog zu den Vektoren pYMS1-3 kloniert und sequenziert (2.2.2.19). Bei der Sequenzierung stellte sich heraus, dass das *gpdII*-Intron in pYMS7 nicht eingebaut wurde, weshalb mit dem Aufbau der Expressionskassette (Abbildung 17C) fortgefahren wurde. Die Sequenzierungsergebnisse zu pYMS5, 6 und 7 befinden sich im Anhang 13, Anhang 14 und Anhang 15. Die korrekt klonierten Expressionsvektoren pYMS5, 6, 7 sowie pCc1001 wurden für die Transformation (2.2.2.10) von *C. cinerea* verwendet. Hierbei wurden jeweils 2 µg Plasmid DNA pCc1001 und Expressionsvektor pro Transformationsansatz eingesetzt. Es konnten insgesamt 75 Transformanden für pCc1001, 71 Transformanden für pYMS5, 230 Transformanden für pYMS6 und 356 Transformanden für pYMS7 generiert werden. Die genomische DNA von jeweils ca. 40 Transformanden wurde isoliert (2.2.2.4) und für eine Kolonie PCR (2.2.2.5) eingesetzt, um zu überprüfen, welche Transformanden die Expressionskassette integriert hatten (Abbildung 18).

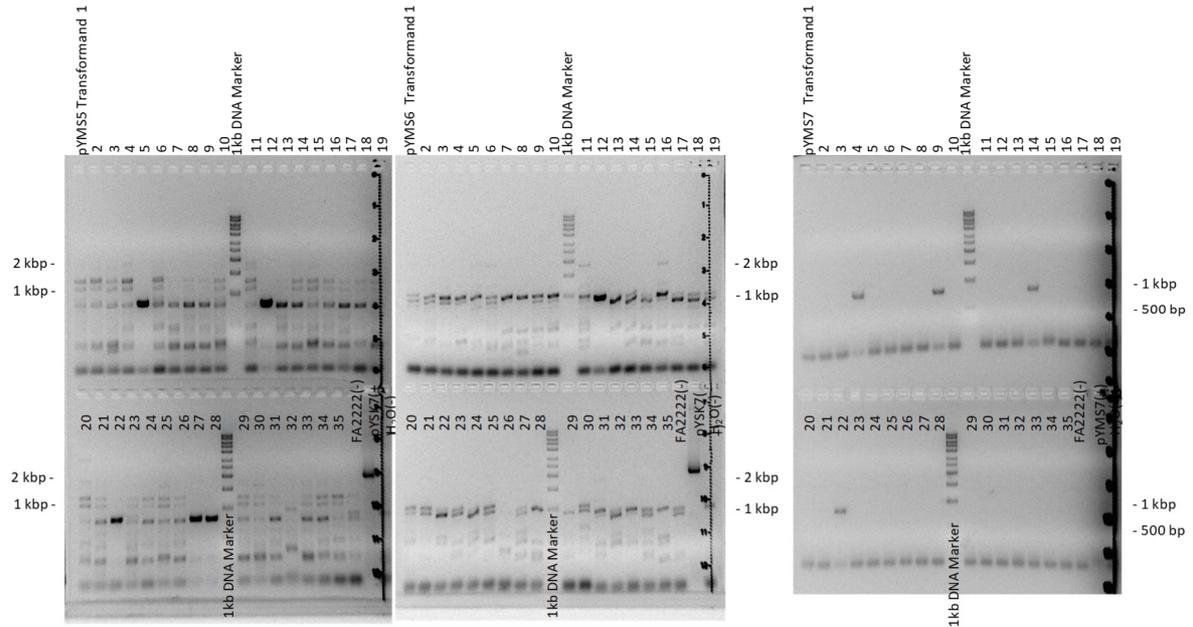


Abbildung 18: Kolonie PCR pYMS5 (links), 6 (mitte) und 7 (rechts) Transformanden. Dargestellt sind jeweils die Transformanden 1-35 der Transformation mit pYMS5, 6 und 7. Als Negativkontrolle wurde genomische DNA aus *C. cinerea* verwendet. + stellt die Positivkontrolle mit Vektor-DNA von pYSK5,6 und 7 dar, – stellt die H₂O Negativkontrolle dar. Es wurde jeweils 1 kb-DNA-Leiter von Carl Roth verwendet.

Die Kolonie PCR der pYMS5, 6 und 7 Transformanden zeigte, dass fünf, 19 bzw. vier Transformanden die erwartete Bande mit der Größe von ca. 900 bp aufwiesen und somit die Expressionskassetten stabil ins Genom integriert wurden. Jeweils vier Transformanden je Konstrukt und drei pCc1001 Kontrolltransformanden wurden auf 0,5% und 2% Magermilch Minimal Medium Agarplatten kultiviert (2.2.1.3). Es konnte während der Kultivierung kein Abbau von Milcheiweiß und eine damit verbundene Klärung der Agarplatten beobachtet werden. Darüber hinaus wurden die Transformanden in 100 mL Komplexmedium YMG kultiviert (2.2.1.3) und nach 6 d Überstand geerntet. Die Peptidaseaktivität des Überstands wurde mittels Azocasein Assay (2.2.2.16) ermittelt (Abbildung 19).

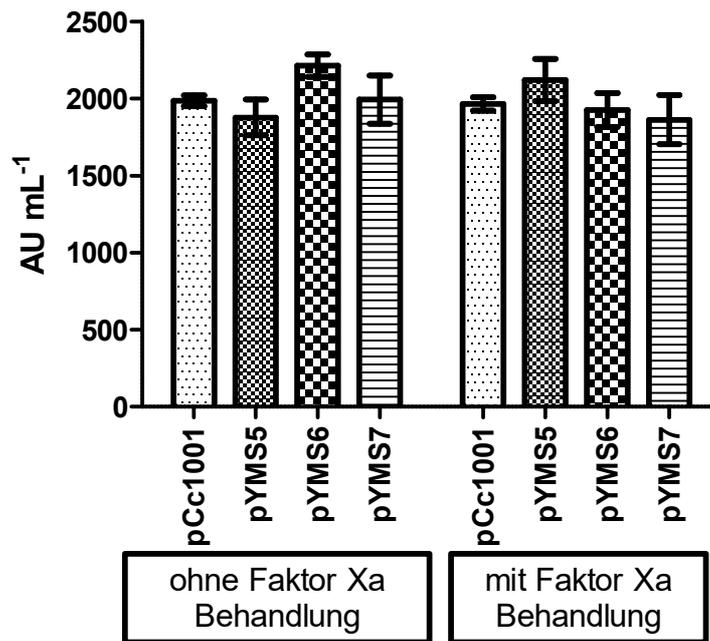


Abbildung 19: Bestimmung der Peptidaseaktivität der pYMS5, 6, 7 Transformanten mittels Azocasein Assay. Die rekombinante RdoT3 wurde einmal ohne und einmal mit dem Gerinnungsfaktor Xa behandelt um das Propeptid zu hydrolysieren.

Mika (Mika, 2015) postulierte aufgrund von Sequenzhomologien der RdoT3 zu Chymotrypsin, dass die ersten 29 Aminosäuren des N-Terminus der RdoT3 ein Propeptid darstellen. Sie konnte zeigen, dass durch die Hydrolyse der RdoT3 mit der Serinpeptidase Faktor Xa (ein humaner Gerinnungsfaktor), welcher die C-terminalen Aminosäuren Asparaginsäure, Glycin und Arginin des Propeptids der RdoT3 erkennt und hydrolysiert (He et al., 1993), das Propeptid entfernt werden konnte, was zur Aktivierung der RdoT3 führte. Deshalb wurde bei der Durchführung des Azocasein Assays zur Aktivitätsbestimmung der pYMS5, 6, 7 Transformanten auch Faktor Xa verwendet. Die Ergebnisse des Azocasein Assays zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Peptidaseaktivität der Negativkontrollen (pCc1001) im Vergleich zu den pYMS5, 6, 7 Transformanten unabhängig von der Behandlung mit Faktor Xa.

Die pYMS5 Transformanten 12 und 27, pYMS6 Transformand 12 und 14 und pYMS7 Transformand 4 und 14 wurden nochmals in einem auf pH 7 gepufferten mKjalke Medium, kultiviert (2.2.1.3). Hierbei sollte der veränderte pH das rekombinante Enzym stabilisieren. Nach sechs Tagen wurde der Kulturüberstand geerntet und für einen Azocasein Assay (2.2.2.16) eingesetzt (Abbildung 20).

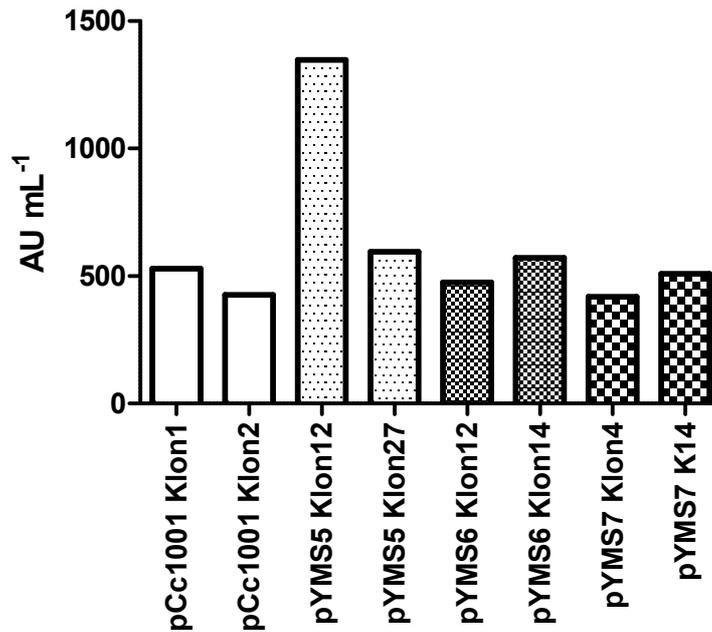


Abbildung 20: Bestimmung der Peptidaseaktivität der pYMS5, 6, 7 Transformanden mittels Azocasein Assay. Die Kultivierung der Transformanden wurde 6 d in mKjalke Medium durchgeführt.

Nur der pYMS5 Transformand 12 zeigte eine signifikant höhere Peptidaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle (pCc1001). Allerdings konnte an dieser Stelle nicht mit Gewissheit gezeigt werden, dass diese Peptidaseaktivität auch von der rekombinanten Peptidase stammte. Es sollte daher wie bei pYMS11c eine Histidin-Markierung verwendet werden um eine eindeutige Detektion und einfachere Reinigung gewährleisten zu können.

3.2.4 Expression der RdoT3 mit homologem Signalpeptid einer Serinpeptidase

Analog zu pYMS11c sollte die RdoT3 unter die Kontrolle des EAU91794 Signalpeptids gebracht, mit einer sechsfachen Histidin-Markierung versehen und das *A. bisporus* Intron eingefügt werden (Abbildung 21).

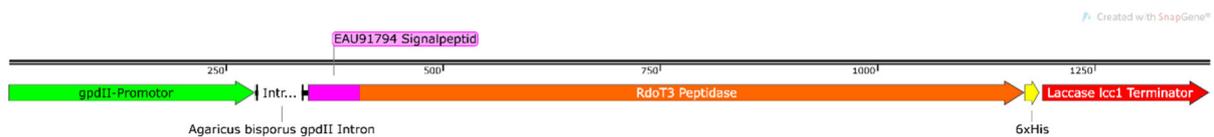


Abbildung 21: Expressionskassette des pYMS13c Expressionsvektors. Das *rdoT3*-Gen steht unter der Kontrolle des *gpdII*-Promotors (grün) und des *lcc1*-Terminators (rot). Es wurde ein Intron des *A. bisporus gpdII*-Gens direkt nach dem Start Codon eingefügt. Es wurde das EAU91794 Signalpeptid (pink) zwischen dem Intron und der RdoT3 Sequenz (orange) eingefügt und eine sechsfache Histidin-Markierung (gelb) am 3'-Ende vor dem Terminator angefügt.

Für die Amplifizierung (2.2.2.5) des *A. bisporus* Introns wurden die Oligonukleotide 162 und 250 verwendet. Die Amplifizierung (2.2.2.5) des Signalpeptids von EAU91794 erfolgte durch die Oligonukleotide 251 und 225. Das Gen *rdoT3* wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 226 und MCS8 amplifiziert (2.2.2.5). Der Expressionsvektor pYMS13c wurde analog zu den Expressionsvektoren pYMS1-3 kloniert und die Sequenz unter Verwendung des Oligonukleotid 130.2 mittels Sequenzierung bestätigt (Anhang 16). Der korrekt klonierte Expressionsvektor pYMS13c wurde mit pCc1001 für die Transformation (2.2.2.10) von *C. cinerea* verwendet. Es wurden erneut ca. 40 Transformanten überführt, kultiviert und für eine Kolonie PCR (2.2.2.4; 2.2.2.5) verwendet (Abbildung 22).

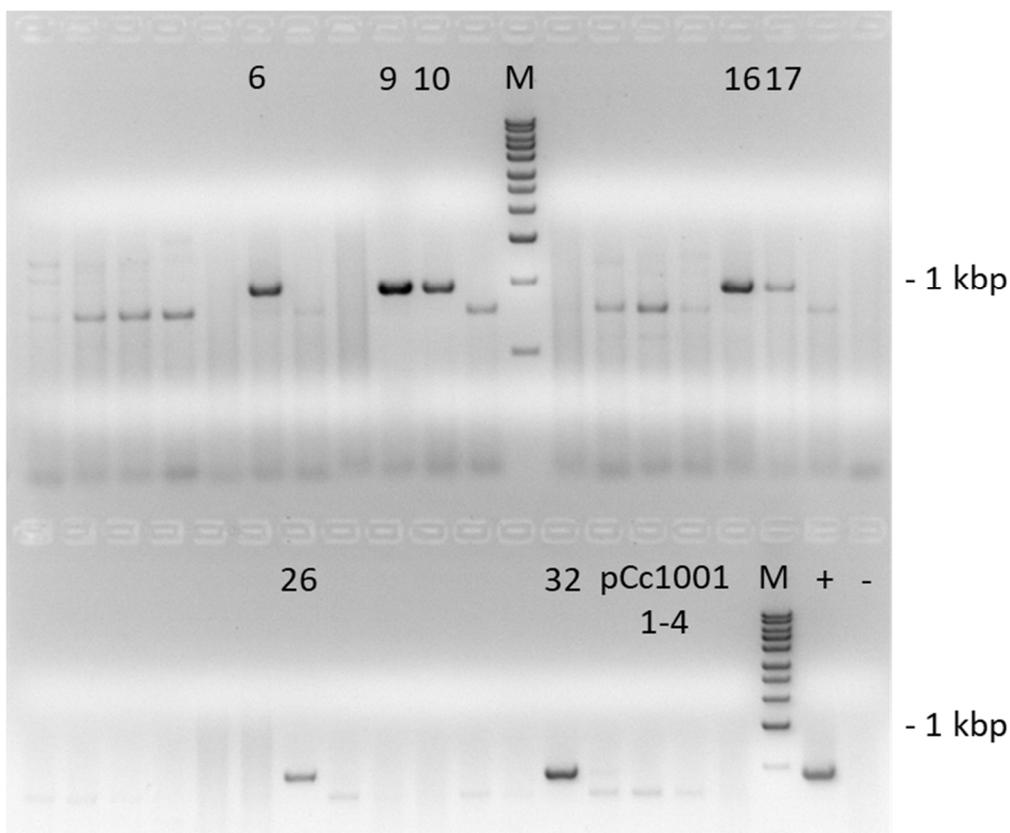


Abbildung 22: Kolonie PCR der pYMS13c Transformanten. Dargestellt sind die Transformanten 1-32, wobei nur positive Transformanten numerisch in der Abbildung aufgeführt wurden. Die pCc1001 Transformanten 1-4 stellen eine Negativkontrolle dar, + stellt die Positivkontrolle dar, welche mit pYMS13c Vektor DNA als Matrize durchgeführt wurde, – stellt die H₂O Negativkontrolle dar. Es wurde 1 kb-DNA-Leiter von Carl Roth (M) verwendet.

Die Kolonie PCR der pYMS13c Transformanten ergab, dass die Transformanten 6, 9, 10, 16, 17, 26 und 31 die pYMS13c Expressionskassette aufgenommen hatten. Daher wurden diese Transformanten in YMG Medium kultiviert (2.2.1.3) und an Tag 6 die Peptidaseaktivität im Kulturüberstand mittels Azocasein Assay (2.2.2.16) bestimmt. Allerdings zeigte keiner der

Transformanden eine höhere Peptidaseaktivität als die pCc1001 Transformanden. Es wurde daher mittels Western Blot Analyse überprüft, ob ein rekombinantes Protein vorhanden war. Hierzu wurde die Western Blot Analyse (2.2.3.4) analog zu der von pYMS11c durchgeführt. Zusätzlich wurden die eingesetzten Kulturüberstände zuvor mittels Gefriertrockner um den Faktor 10 konzentriert und dann für die Western Blot Analyse eingesetzt. Allerdings konnte auch bei dieser Methode kein Nachweis für die Anwesenheit von rekombinantem Protein mittels Histidin-Markierung erbracht werden. Weder das zusätzliche Intron, noch die Verwendung eines nativen Signalpeptids einer Serinpeptidase führte zu einer erfolgreichen Expression der Insektenpeptidase RdoT3.

3.3 Homologe Expression einer Serinpeptidase

3.3.1 Expression der Serinpeptidase EAU91794

Als *proof of concept* sollte versucht werden, eine Serinpeptidase mit dem pYSK7 basierten Expressionssystem zu exprimieren, die absolut kompatibel mit dem Expressionsorganismus *C. cinerea* ist. Dorothea Güttel analysierte in ihrer Doktorarbeit das Sekretom von *C. cinerea*. Hierbei zeigte sie, dass *C. cinerea* eine Vielzahl an Peptidasen exprimierte und sekretierte, unter anderem die Serinpeptidase EAU91794. Die homologe Expression dieser Peptidase sollte jegliche Kompatibilitätsprobleme mit dem Expressionsorganismus ausschließen. Die Aminosäure Sequenz der Serinpeptidase EAU91794 konnte der MEROPS Datenbank (<https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml>) entnommen werden und wurde für einen Abgleich mit der Genomdatenbank von JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) genutzt. Dadurch wurde die Nukleotidsequenz der Serinpeptidase CC1G_04562T0 (Anhang 8) aus dem *C. cinerea* Stamm Okayama7#130 erhalten, von der die Oligonukleotide zur Amplifizierung der Serinpeptidase aus *C. cinerea* Stamm FA2222 abgeleitet wurden. Diese Oligonukleotide 220 und 233 wurden für die Amplifizierung (2.2.2.5) der EAU91794 aus *C. cinerea* FA2222 verwendet. Die Klonierung des Expressionsvektors pYMS15 (Abbildung 23) erfolgte analog zu den anderen pYMS Vektoren. Die Sequenzierungsergebnisse (2.2.2.19) des vollständig klonierten Vektors pYMS15 befinden sich im Anhang 16.

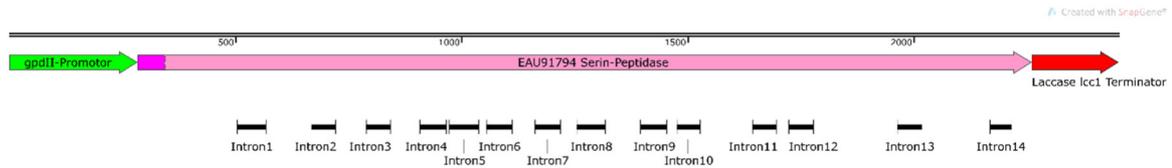


Abbildung 23: Expressionskassette des pYMS15 Expressionsvektors. Das Gen der EAU91794 befindet sich unter der Kontrolle des *gpdII*-Promotors (grün) und des *lcc1*-Terminators (rot). Zwischen dem *gpdII*-Promotor und dem Gen der Serinpeptidase EAU91794 (rosa) ist in Pink das Signalpeptid dargestellt.

C. cinerea wurde mit dem Expressionsvektor pYMS15 zusammen mit pCc1001 co-transformiert. Es wurden erneut ca. 40 Transformanten mittels Kolonie PCR (2.2.2.4; 2.2.2.5) mit den Oligonukleotiden 29 und 130 analysiert (Abbildung 24).

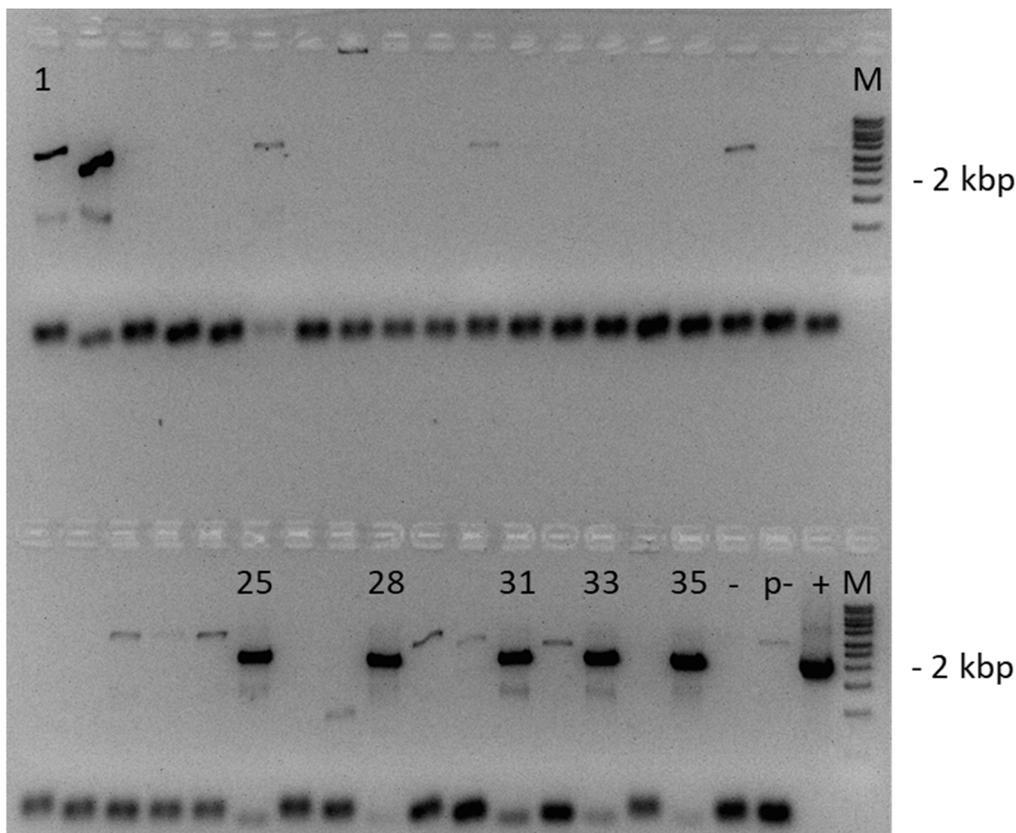


Abbildung 24: Kolonie PCR der pYMS15 Transformanten. Dargestellt sind die Transformanten 1-35, wobei nur positive Transformanten numerisch in der Abbildung aufgeführt wurden. – stellt die H₂O Negativkontrolle dar, p- stellt einen pCc1001 Transformand als Negativkontrolle dar, + stellt die Positivkontrolle dar, welche mit pYMS15 Vektor DNA durchgeführt wurde. Es wurde 1 kb-DNA-Leiter von Carl Roth (M) verwendet.

Die Kolonie PCR der pYMS15 Transformanten zeigt, dass die Transformanten 1, 25, 28, 31, 33 und 35 die Expressionskassette von pYMS15 integriert hatten. Daher wurden die pYMS15 Transformanten 1, 25, 28, 31 und 35 zusammen mit vier pCc1001 Transformanten in Minimal

Medium mit 0,5% Magermilchpulver kultiviert (2.2.1.3) und die Peptidaseaktivität über die Zeit mittels Azocasein-Assay (2.2.2.16) detektiert (Abbildung 25).

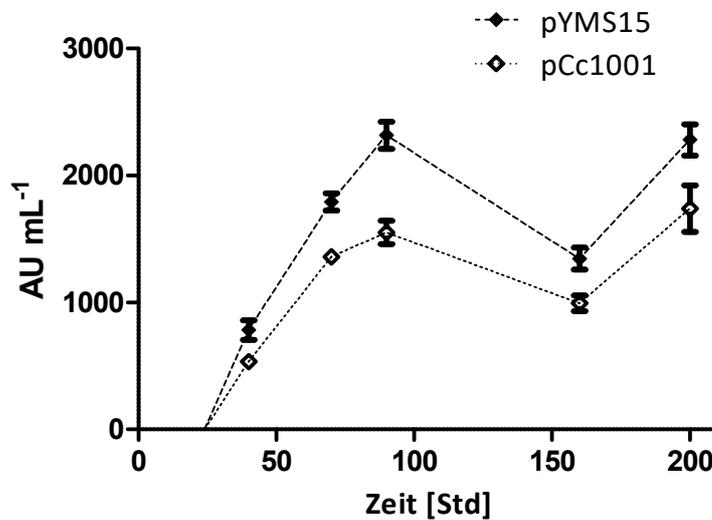


Abbildung 25: Peptidaseaktivitätsbestimmung der pYMS15 Transformanden mittels Azocasein-Assay. Die Messung der pYMS15 Transformanden ist auf 5 biologische Replikate zurück zu führen, während die Messung der pCc1001 Transformanden auf 4 biologische Replikate zurück zu führen ist. Die Transformanden wurden in Minimal Medium mit 0,5% Magermilchpulver kultiviert.

Die Bestimmung der Peptidaseaktivität der pYMS15 Transformanden zeigte, dass diese im Vergleich zu den pCc1001 Transformanden eine leicht höhere Aktivität über den gesamten Zeitraum aufwiesen. Allerdings konnte an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, wie groß der Anteil der rekombinanten Peptidase an der Gesamtaktivität war. Da native und rekombinante Peptidase wahrscheinlich identisch sind, ist eine Trennung beider Peptidasen durch eine Reinigung nicht möglich. Daher wurde der pYMS15 Vektor mit den Oligonukleotiden 309 und 310 umkloniert und eine sechsfach Histidin-Markierung hinzugefügt. Hierzu wurde pYMS15 zur Amplifizierung (2.2.2.5) der EAU91794 als Matrize verwendet. Das Produkt wurde analog zu den anderen pYMS-Konstrukten für die homologe Rekombination in der Hefe RH1385 (2.2.2.9) verwendet (Abbildung 26).

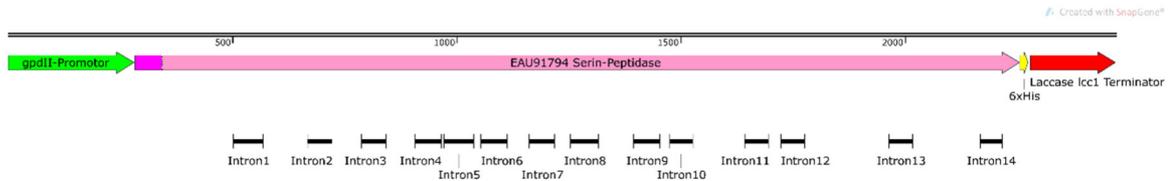


Abbildung 26: Expressionskassette des pYMS15c Expressionsvektors. Das Gen der EAU91794 befindet sich unter der Kontrolle des *gpdII*-Promotors (grün) und des *lcc1*-Terminators (rot). Zwischen dem *gpdII*-Promotor und dem Gen der Serinpeptidase EAU91794 (rosa) Gen ist in Pink das Signalpeptid dargestellt. Weiterhin wurde zwischen dem 3'-Ende der EAU91794 und dem *lcc1*-Terminator eine sechsfach Histidin-Markierung (gelb) hinzugefügt.

Für die Sequenzierung (2.2.2.19) des pYMS15c Vektors wurde das Oligonukleotid 130 verwendet (Anhang 18). Der korrekt klonierte pYMS15c Vektor wurde zusammen mit pCc1001 für die Transformation (2.2.2.10) von *C. cinerea* verwendet. Es wurden ca. 100 pYMS15c Transformanten überführt und kultiviert, wobei nicht alle Transformanten auf den neuen Minimal Medium Agarplatten (2.2.1.3) wuchsen. Von den auf Minimal Medium gewachsenen pYMS15c Transformanten wurden 18 für eine Kolonie PCR (2.2.2.4; 2.2.2.5) eingesetzt, wobei die zwei Oligonukleotidpaare 29 mit 223 und 222 mit 130 verwendet wurden (Abbildung 27).

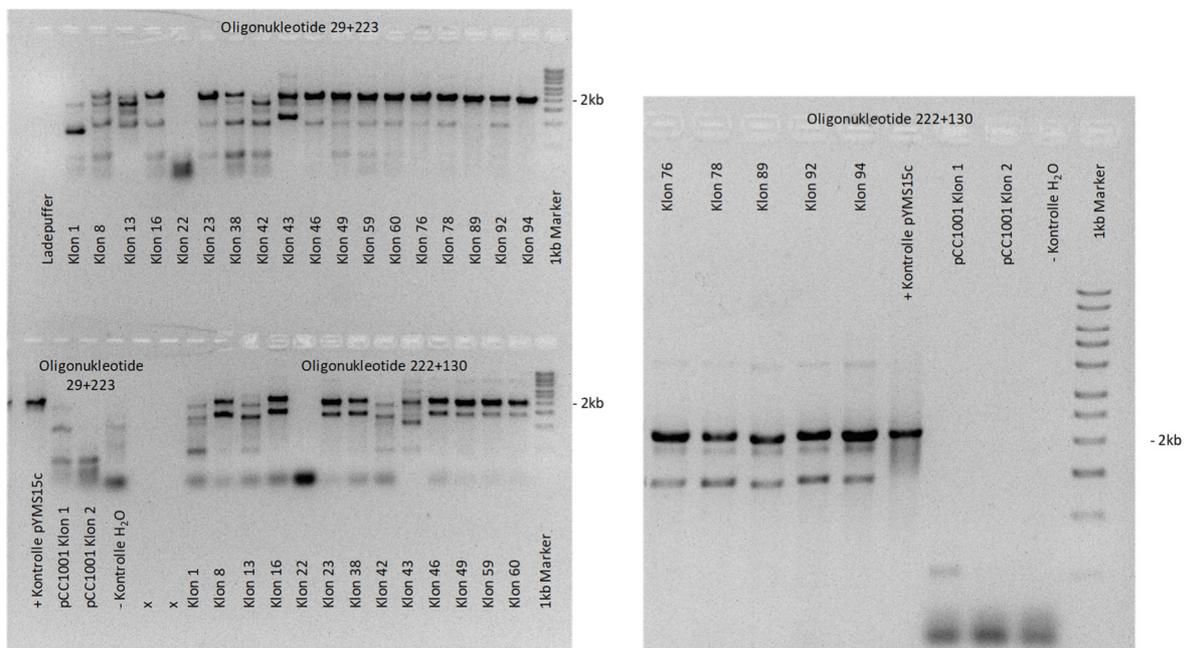


Abbildung 27: Kolonie PCR der pYMS15c Transformanten mit den Oligonukleotiden 29+223 und 222+130. Es wurde jeweils 1 kb-DNA-Leiter von Carl Roth verwendet.

Die Ergebnisse der beiden Kolonie PCRs zeigen, dass die Oligonukleotide zwar kein sauberes Produkt ergeben haben, es aber bei einigen Transformanten eine klare Bande mit der erwarteten Größe von ca. 2 kbp gab. Hierbei zeigten die Transformanten 23, 46, 49, 59, 60,

76, 78, 89, 92 und 94 in beiden Kolonie PCR positive Signale, sodass diese weiterverwendet wurden. Diese pYMS15c Transformanden und fünf pCc1001 Kontrolltransformanden wurden für sieben Tage in Minimal Medium vorkultiviert (2.2.1.3). Anschließend wurde jeder Transformand in Minimal Medium und in Minimal Medium mit 0,5% Magermilchpulver für 12 Tage in Hauptkultur gehalten (2.2.1.3). An den Tagen 2, 4, 6, 8 und 12 wurde Kulturüberstand entnommen und die Proben bei -20 °C gelagert. Der Kulturüberstand von Tag 4 wurde mittels Azocasein-Assay (2.2.2.16) analysiert. Hierbei zeigte sich, dass bei der Kultivierung in Minimal Medium ohne Magermilchpulver keiner der Transformanden eine detektierbare Enzymaktivität im Azocasein Assay aufwies. Die Kultivierung in Minimal Medium mit Magermilchpulver zeigte hingegen Enzymaktivität im Azocasein Assay (Abbildung 28).

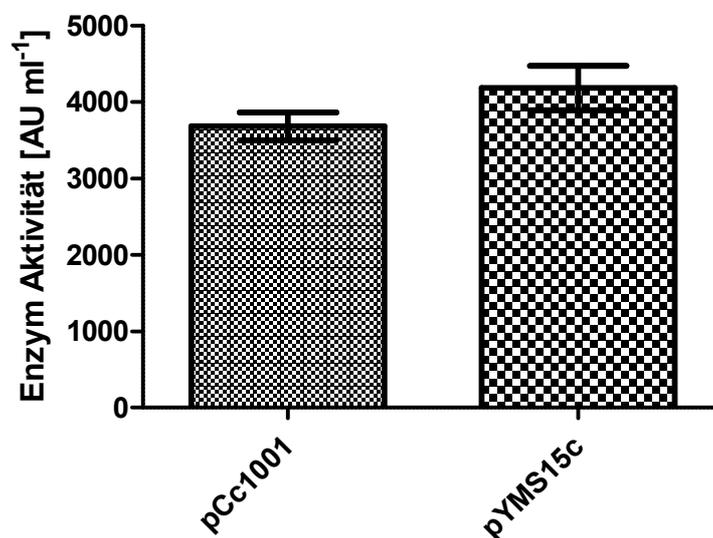


Abbildung 28: Bestimmung der Peptidaseaktivität der pYMS15c Transformanden mittels Azocasein Assay. Die pCc1001 und pYMS15c Transformanden wurden in Minimal Medium mit 0,5% Milchpulveranteil kultiviert. Der Überstand wurde an Tag 4 geerntet. Die Messung für pCc1001 besteht aus 5 biologischen Replikaten. Die Messung für pYMS15c besteht aus 9 biologischen Replikaten.

Die Untersuchung der Peptidaseaktivität mittels Azocasein Assay zeigte, dass die pYMS15c Transformanden eine nur leicht erhöhte Peptidaseaktivität im Vergleich zu den pCc1001 Kontrolltransformanden aufwiesen. Um nachzuweisen, ob die leicht höhere Aktivität auf rekombinante Peptidase zurück zu führen war, wurde eine Western Blot Analyse (2.2.3.4) (Abbildung 29) durchgeführt. Die pYMS15c Transformanden 23, 49, 59, 76, 89 und 92 wurden hierzu verwendet. Der Kulturüberstand der pCc1001 Kontrolltransformanden 3 und 11, sowie die Überstände der pYMS15c Transformanden 23, 49, 59, 76, 89 und 92 aus der Kultivierung

mit und ohne Magermilchpulver wurde mittels Lyophilisation um den Faktor 10 konzentriert. Die konzentrierten Überstände wurden für die Analyse eingesetzt.

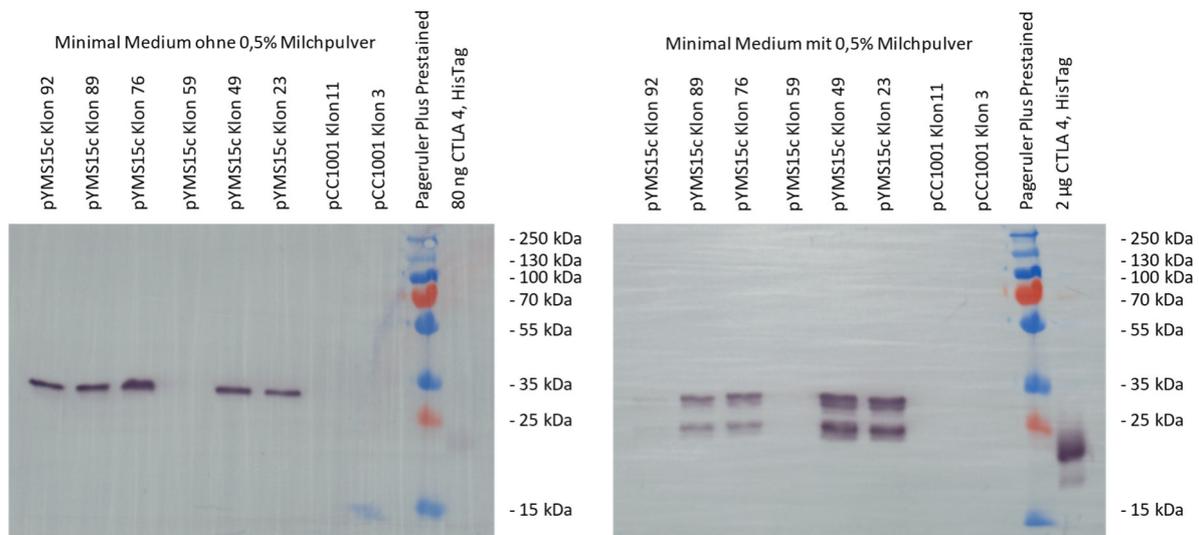


Abbildung 29. Western Blot Analyse der Kulturüberstände der pYMS15c Transformanten. Die pCc1001 und pYMS15c Transformanten wurden in Minimal Medium ohne und mit 0,5% Milchpulveranteil kultiviert. Der Überstand wurde an Tag 4 der Hauptkultur geerntet und mittels Lyophilisation um den Faktor 10 eingengt. Das mit Histidin markierte CTLA4 Protein stellt die Positivkontrolle dar. Marker ist der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

Die Western Blot Analyse zeigt, dass der Nachweis von Histidin-markierten Proteinen erfolgreich war. Das Histidin-markierte Protein CTLA4 (bezogen von ThermoFisher Scientific) ist auf der linken Membran in Abbildung 29 nur sehr leicht zu sehen, da hier nur 80 ng des Proteins eingesetzt wurden. Auf der rechten Membran hingegen ist eine deutliche Bande des CTLA4 Proteins zu sehen, da hier ca. 2 µg eingesetzt wurden. Die beiden Negativkontrollen pCc1001 Transformand 3 und 11 zeigten weder bei der Kultivierung ohne Milchpulver noch mit Milchpulver eine Bande. Die pYMS15c Transformanten 23, 49, 76, 89 zeigten bei beiden Kultivierungen Banden auf der Höhe von ca. 34 kDa. pYMS15c Transformand 92 zeigt nur in der Kultivierung ohne Milchpulver eine solche Bande. Bei der Kultivierung mit Milchpulver zeigen die pYMS15c Transformanten 23, 49, 76 und 89 darüber hinaus eine zweite Bande mit der Größe von ca. 24 kDa. Somit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass rekombinantes Protein exprimiert wurde.

Da die Kultivierung in Minimal Medium mit Milchpulver vermeintliche Abbauprodukte des rekombinanten Produkts zeigte, sollte durch eine erneute Kultivierung mit und ohne Milchpulver und einem engeren Dokumentationsraster gezeigt werden, wann und unter

welchen Kultivierungsbedingungen diese vermeintlichen Abbauprodukte auftreten. Hierzu wurden die pYMS15c Transformanden 49 und 76 und einem pCc1001 Transformanden erneut in Minimal Medium ohne und mit Milchpulver über 10 Tage kultiviert (2.2.1.3), wobei jeden zweiten Tage Kulturüberstände gezogen wurden. Die Western Blot Analyse (2.2.3.4) zeigte, dass der pCc1001 Transformand über die gesamte Kultivierungsdauer und unter beiden Kultivierungsbedingungen keine Banden aufwies (Abbildung 30), wohingegen in Kulturüberständen der pYMS15c Transformanden 49 und 76 sowohl in Kulturen mit als auch ohne Zusatz von Milchpulver entsprechende Banden detektiert wurden (exemplarisch für pYMS15c Transformand 76 in Abbildung 30).

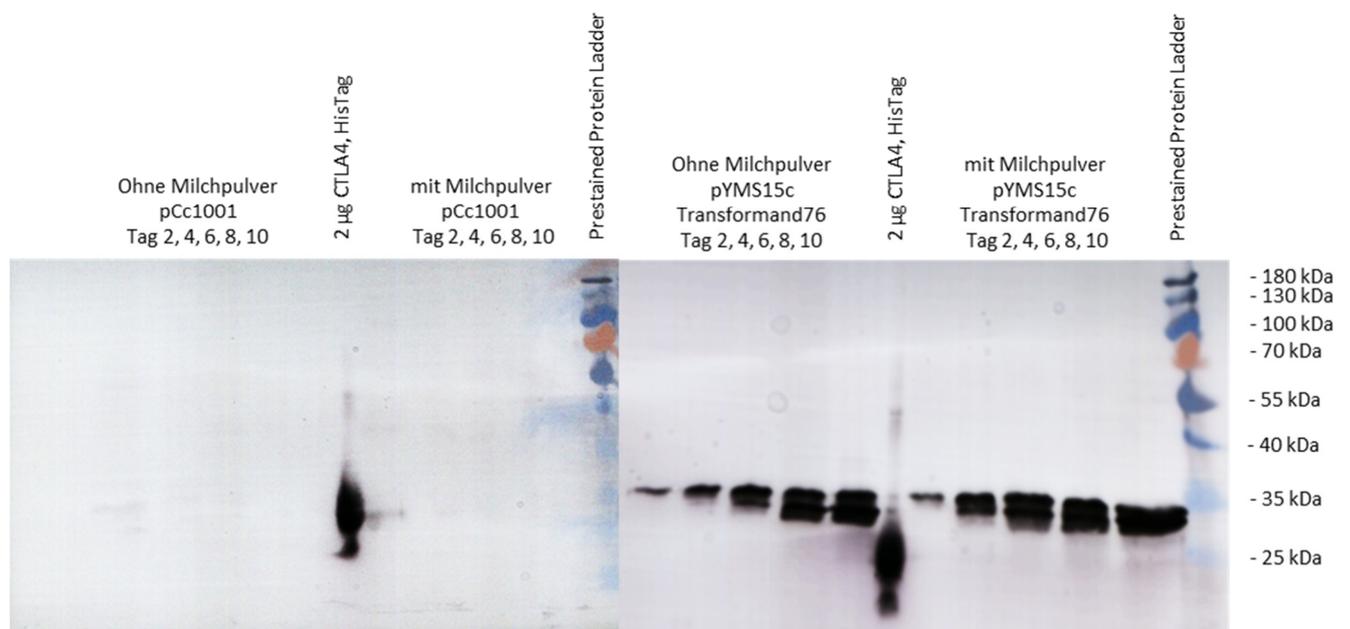


Abbildung 30: Western Blot Analyse des pCc1001 (links) und pYMS15c Transformand 76 (rechts). Der Transformand wurde über 10 d in Minimal Medium mit und ohne 0,5% Milchpulveranteil kultiviert. Der Kulturüberstand wurde mittels Lyophilisation um den Faktor 10 konzentriert. Marker ist der PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

Die Western Blot Analyse zeigt, dass unabhängig von der Kultivierung ohne oder mit Milchpulver spätestens ab Tag 6 eine zweite Bande sichtbar wird. Beide Banden haben ein Molekulargewicht von ca. 34 bzw. 33 kDa. In der zuvor durchgeführten Kultivierung der pYMS15c Transformanden 23, 49, 76 und 89 mit Milchpulver (Abbildung 29) ist ebenfalls eine leichte Doppelbande mit diesen Molekulargewichten zu erkennen. Allerdings konnte die Proteinbande aus Abbildung 29 mit einem Molekulargewicht von ca. 24 kDa nicht reproduziert werden. Die Kulturüberstände der pYMS15c Transformanden 49 und 76 von Tag 4 bis 10 wurden vereinigt und für eine Affinitätschromatographie (2.2.4.1) verwendet (Abbildung 31).

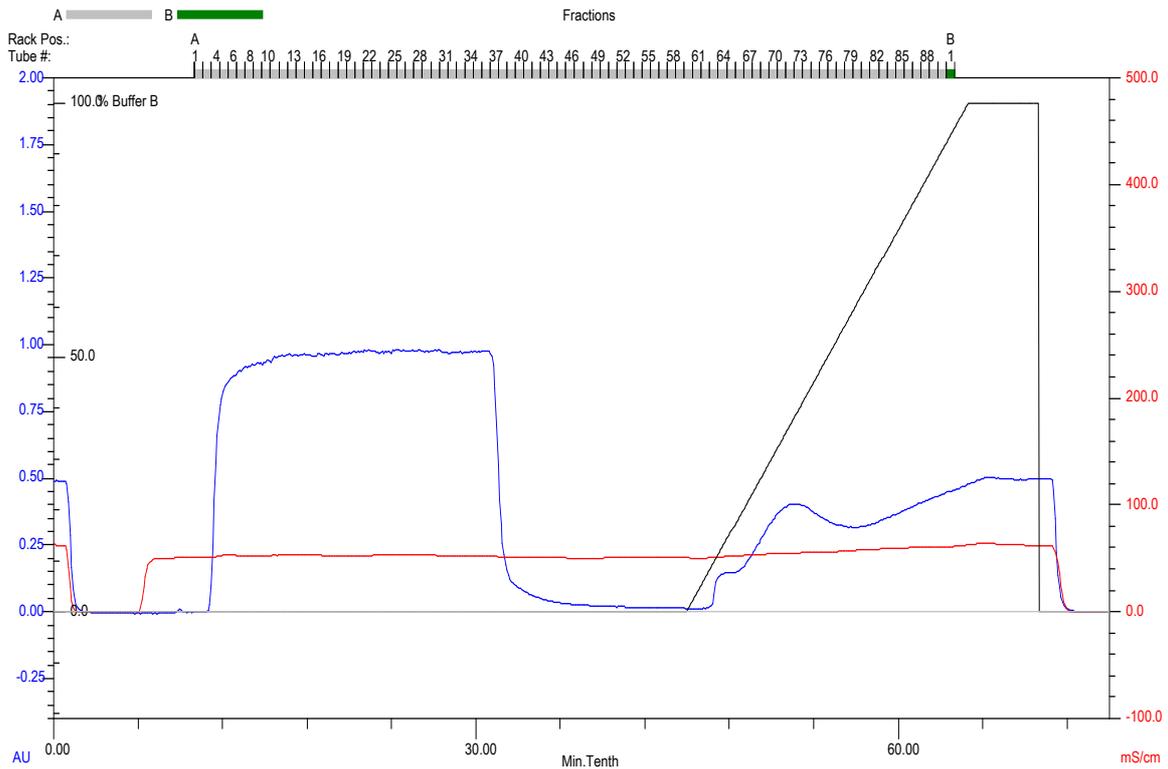


Abbildung 31: Chromatogramm der HisTrap™ Reinigung des Kulturüberstands der pYMS15c Transformanten 49 und 76. In blau ist das UV-Signal dargestellt, in Rot die Leitfähigkeit und in schwarz der Imidazol Gehalt der in Puffer B (Elutionspuffer) enthalten ist.

Das Chromatogramm zeigte, dass durch den langsamen Anstieg von Imidazol im Elutionspuffer sich zwei UV-Spitzen bei der Elution ergaben. Es wurden daher die Fraktionen 4 bis 38 (2), 60 bis 62 (3), 63 bis 65 (4), 66 bis 68 (5), 69 bis 77 (6) und 78 bis 90 (7) jeweils vereinigt und mit einer neuen Probennummer versehen (2-7). Der Kulturüberstand wurde als Probe 1 bezeichnet. Die Proben 1-7 wurden für eine denaturierte SDS-PAGE (2.2.3.2), Western Blot (2.2.3.4) und Serinpeptidase spezifischen Assay (2.2.2.17) mit dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA verwendet (Abbildung 32) um zu prüfen, ob die Reinigung erfolgreich war und die rekombinante Peptidase aktiv war. Die SDS-PAGE Analyse wurde anschließend mit Silber gefärbt (2.2.3.3).

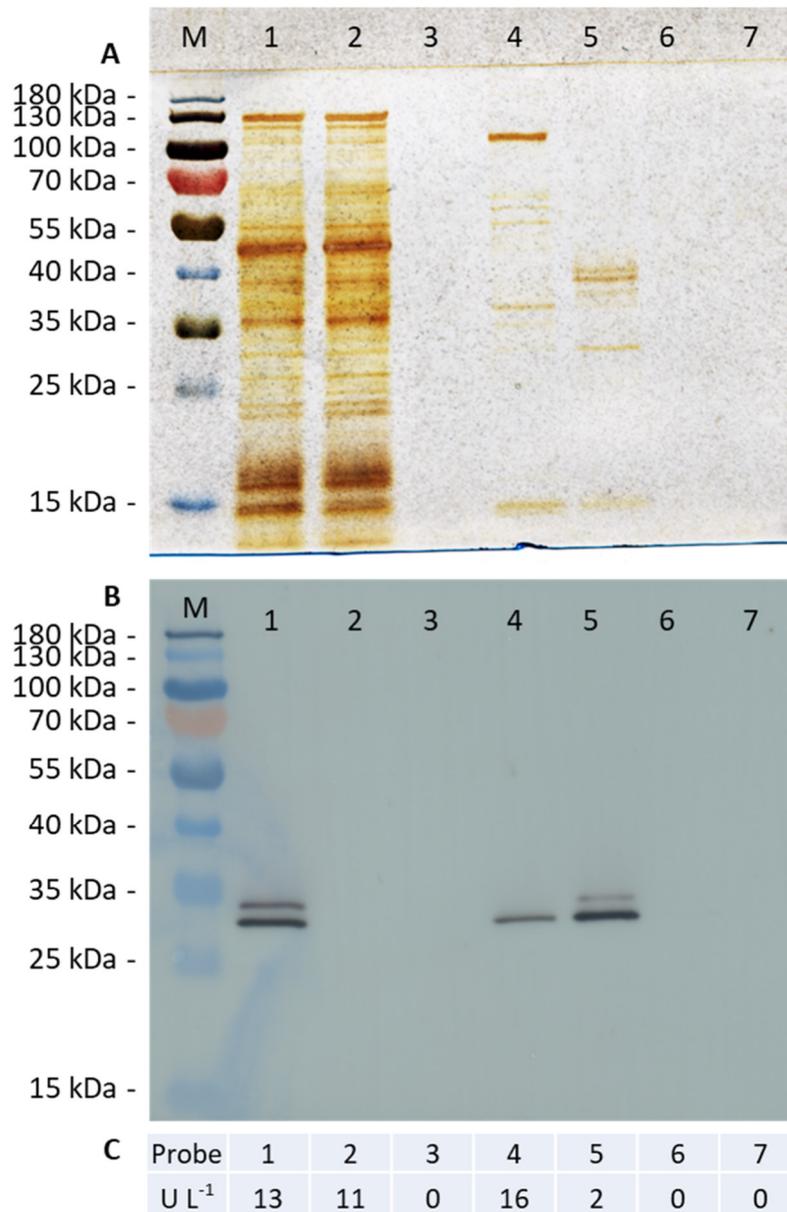


Abbildung 32: A = SDS-PAGE Analyse mit Silberfärbung, B = Western Blot Analyse mittels Anti Histidin Antikörper, C = Serinpeptidase spezifischer Assay mittels Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA Assay. M ist der Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Die Proben 1 bis 7 entsprechen dem Kulturüberstand (1), dem Säulendurchfluss (2), den ersten beiden Fraktionen direkt nach Beginn des Imidazolgradienten (3), der ersten UV-Spitze (4), dem Bereiche zwischen der ersten und zweiten UV-Spitze (5), der zweiten UV-Spitze (6) und dem Bereich nach der zweiten UV-Spitze (7) im Chromatogramm (Abbildung 31).

Mit Hilfe dieser drei Analysen konnte deutlich gezeigt werden, dass der Kulturüberstand (1) neben vielen anderen Proteinen in der SDS-PAGE Analyse (Abbildung 32A) wie erwartet rekombinantes Protein in der Western Blot Analyse (Abbildung 32B) aufweist, welches sich in zwei Banden mit dem Molekulargewicht von ca. 34 und 33 kDa äußert und eine Serinpeptidaseaktivität (Abbildung 32C) von 13 U L⁻¹ aufwies. Der Durchfluss (2) zeigte in der

SDS-PAGE Analyse das gleiche Proteinbandenmuster wie in Probe 1, was dafürspricht, dass ein Großteil der Proteine nicht an die Säule gebunden hat. Die Western Blot Analyse bestätigte, dass kein rekombinantes Protein im Durchfluss (2) enthalten war. Dennoch zeigt der Durchfluss eine Aktivität von ca. 11 U L^{-1} was auf eine native Serinpeptidaseaktivität schließen lässt. In den Proben 3, 6 und 7 wurden keine Proteine detektiert und auch keine Peptidaseaktivität gemessen. Die Probe 4 zeigte in der Western Blot Analyse, dass nur die 33 kDa Bande des rekombinanten Proteins vorhanden war. Dafür zeigte die SDS-PAGE Analyse, dass eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa deutlich vorhanden war, welches kein rekombinantes Protein darstellte, da es nicht in der Western Blot Analyse detektiert wurde. Die Peptidaseaktivität betrug 16 U L^{-1} . Probe 5 zeigte in der Western Blot Analyse hingegen beide rekombinante Proteinbanden. Hierbei war die 33 kDa Bande intensiver im Vergleich zu der aus Probe 4. Die SDS-PAGE Analyse von Probe 5 hingegen zeigte, dass kaum noch Protein enthalten war. Vor allem die Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa war nicht mehr vorhanden. Die Peptidaseaktivität lag bei nur noch 2 U L^{-1} . Die Reinigung des rekombinanten Proteins war zwar erfolgreich, allerdings korreliert die Anwesenheit des rekombinanten Proteins nicht mit der spezifischen Serinpeptidaseaktivität.

3.3.2 Auswirkungen einer zusätzlichen Kozak-Sequenz und der Verwendung des *lcc1*-Signalpeptids auf die Expression der EAU91794

Leonhardt et al. (2016) zeigte, dass bei der heterologen Expression einer Speisepilz-Peptidase in *P. pastoris* eine zusätzliche Kozak-Sequenz notwendig war, um eine aktive Peptidase exprimieren zu können. Deshalb sollte überprüft werden, ob eine zusätzliche Kozak-Sequenz einen ähnlich positiven Effekt auf die Expression der EAU91794 hat. Weiterhin sollte geprüft werden, ob das *lcc1*-Signalpeptid funktionell für die Sekretion einer Peptidase ist. Für dieses Vorhaben wurde die Expressionskassette von pYMS25 geplant (Abbildung 33) und kloniert. Für die Amplifizierung (2.2.2.5) der EAU91794 mit den für die homologe Rekombination (2.2.2.9) nötigen homologen Überhängen wurden die Oligonukleotide MCS5 und 310 verwendet.

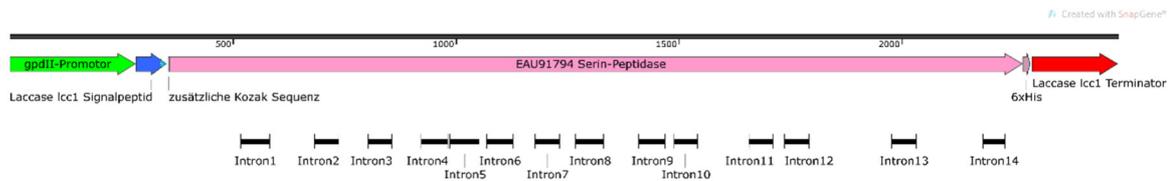


Abbildung 33: Expressionskassette des pYMS25 Expressionsvektors. Die Expressionskassette verwendet den *gpdII*-Promotor (grün), das *lcc1*-Signalpeptid (blau) mit 9 weiteren Nukleotiden als Linker (hellblau) zwischen Signalpeptid und Peptidase-Gensequenz (rosa). Zwischen Signalpeptid und Peptidase Gensequenz wurde eine zusätzliche Kozak-Sequenz (gccATG) hinzugefügt. Die sechsfache Histidin-Markierung (dunkel-rosa) erleichtert eine Detektion und Reinigung des rekombinanten Proteins. Der *lcc1*-Terminator stoppt den Transkriptionsprozess.

Der vollständig klonierte Vektor wurde mit dem Oligonukleotid 29.2 (Anhang 19) sequenziert und für die Transformation (2.2.2.10) von *C. cinerea* verwendet. Für die Kolonie PCR (2.2.2.4; 2.2.2.5) wurden die Oligonukleotide 29 und 130 eingesetzt (Abbildung 34).

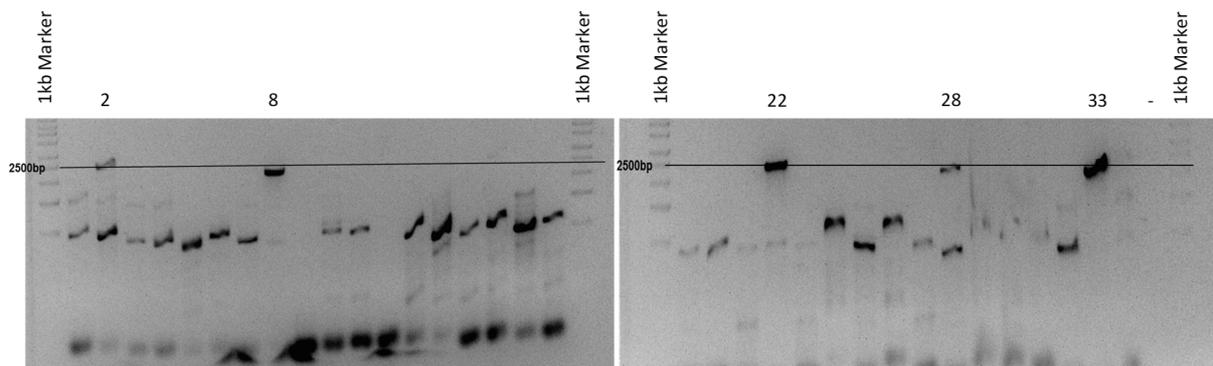


Abbildung 34: Kolonie PCR der pYMS25 Transformanden mit den Oligonukleotiden 29 und 130. Dargestellt sind die Transformanden 1-34, wobei nur positive Transformanden numerisch in der Abbildung aufgeführt wurden. – stellt die H₂O Negativkontrolle dar. Es wurde 1 kb-DNA-Leiter von Carl Roth verwendet.

Die Kolonie PCR zeigte, dass die pYMS25 Transformanden 2, 8, 22, 28 und 33 Banden mit der erwarteten Größe von ca. 2.500 bp aufwiesen. Es wurden daher vier pCc1001 Transformanden, fünf pYMS15c Transformanden und die fünf pYMS25 Transformanden für eine Kultivierung in Minimal Medium verwendet (2.2.1.3). An Tag 10 wurde der Kulturüberstand für eine Western Blot Analyse (2.2.3.4) verwendet (Abbildung 35).

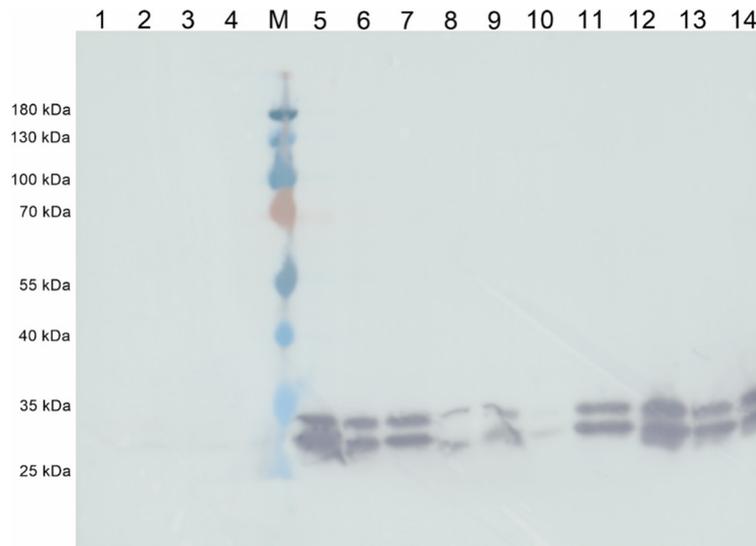


Abbildung 35: Western Blot Analyse von pCc1001, pYMS15c und pYMS25 Transformanden nach Tag 10. M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder, In den Positionen 1 bis 4 wurden die pCc1001 Transformanden 3, 4, 5 und 6 aufgetragen, in den Positionen 5 bis 9 die pYMS15c Transformanden 23, 49, 76, 89 und 92 und in den Positionen 10 bis 14 die pYMS25 Transformanden 2, 8, 22, 28, 33. Alle Transformanden wurden für 10 Tage in Minimal Medium kultiviert. Der Überstand wurde mittels Lyophilisation um den Faktor 10 konzentriert und 1,5 mg Protein pro Probe eingesetzt.

Die pYMS15c Transformanden 23, 49, 76, 89 und 92 zeigten erneut die Expression einer Protein-Doppelbande mit einem Molekulargewicht von ca. 34 und 33 kDa. Die pYMS25 Transformanden 2, 8, 22, 28, 33 zeigten alle dieselbe Protein-Doppelbande mit den gleichen Molekulargewichten wie die pYMS15c Transformanden.

Die Kulturüberstände der pCc1001, pYMS15c und pYMS25 Transformanden wurden jeweils vereinigt mittels Ni-NTA Säulen der Firma Qiagen isoliert und gereinigt. Anschließend erfolgte eine Umpufferung über eine Nanosep® PALL Membran (10 kDa), wodurch die Probe gleichzeitig zehnfach konzentriert wurde. Die daraus gewonnenen Proben wurden zur photometrischen Enzymaktivitätsmessung mittels Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (2.2.2.17) eingesetzt. Allerdings zeigte keine der Proben eine spezifische Peptidaseaktivität. Eine Western Blot Analyse (2.2.3.4) der gereinigten und umpufferten Proben (Abbildung 36) zeigte, dass pCc1001 nach der Reinigung kein rekombinantes Protein aufwies. Die pYMS15c Probe und die pYMS25 Probe hingegen wiesen Proteinbanden auf, die aufgrund der spezifischen Färbung der Histidin-Markierung auf rekombinantes Protein zurück zu führen sind.

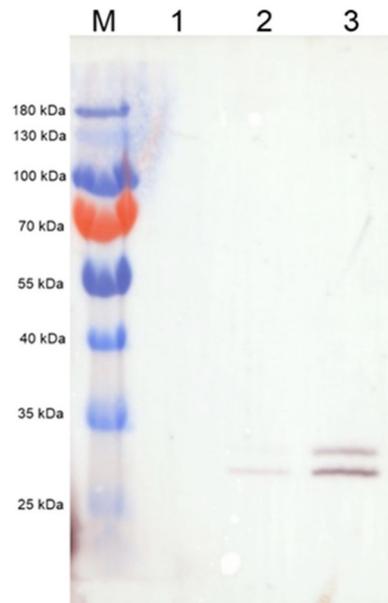


Abbildung 36: Western Blot-Analyse der Ni-NTA-gereinigten Kulturüberstände der pCc1001, pYMS15c und pYMS25 Transformanden. M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 1 = pCc1001, 2 = pYMS15c, 3 = pYMS25.

Trotz der erfolgreichen Reinigung des rekombinanten Enzyms, konnte in den pYMS15c und pYMS25 Proben keine Peptidaseaktivität mittels photometrischer Enzymaktivitätsmessung mit Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (2.2.2.17) detektiert werden.

3.4 Expression der Laccase Lcc8 in *C. cinerea* mittels pYSK7:

(Kilaru et al., 2006a) versuchte 17 verschiedene Laccasegene von *C. cinerea* mit Hilfe des pYSK7 basierten Systems homolog zu exprimieren. Hierzu wurde unter anderen das *lcc8*-Gen (Anhang 20) mit seinem nativen Signalpeptid verwendet. Allerdings konnte die Lcc8 nicht aktiv exprimiert werden. Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit versucht werden die Lcc8 mit dem Lcc1-Signalpeptid zu exprimieren.

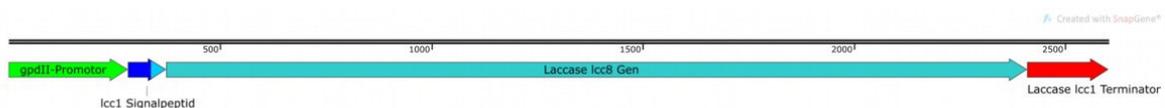


Abbildung 37: Expressionskassette des pYMS33 Expressionsvektors. Die Expressionskassette verwendet den *gpdII*-Promotor (grün) und den *lcc1*-Terminator (rot). Zwischen dem Promotor und dem *lcc8*-Gen (türkis) befindet sich in blau das *lcc1*-Signalpeptid, welches um 36 bp (hellblau) verlängert wurde und als Verbindung zwischen Signalpeptid und *lcc8*-Sequenz dient.

Zur Amplifizierung der *lcc8* wurden die Oligonukleotide MCS31 und MCS32 verwendet. Der Expressionsvektor pYMS33 wurde wie zuvor mittels homologer Rekombination (2.2.2.9) kloniert und sequenziert (2.2.2.19) (Anhang 21). Die Co-Transformation von *C. cinerea* mit pYMS33 und pCc1001 ergab mehr als 80 Transformanden. Allerdings zeigte nur ein Transformand eine starke Färbung bei der Kultivierung auf einer das Laccase Substrat ABTS enthaltenden Minimal Medium Agarplatte (2.2.1.3). Mittels Kolonie-PCR wurde die Integration der Expressionskassette von pYMS33 in den Transformanden pYMS33-12 bestätigt (Abbildung 38).

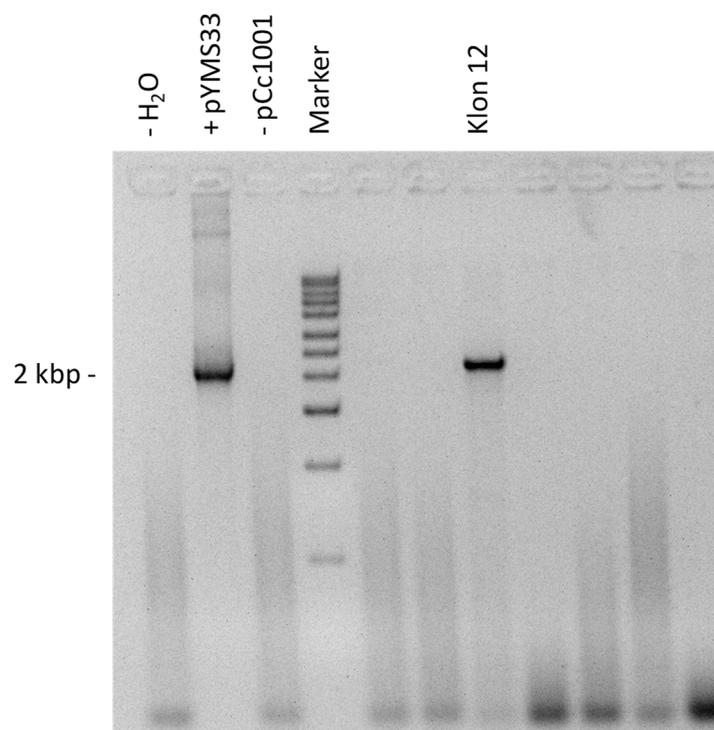


Abbildung 38: Kolonie PCR der pYMS33 Transformanden mit den Oligonukleotiden 29 und 130. Dargestellt sind die H₂O Negativkontrolle (-H₂O), die pYMS33 Positivkontrolle (+pYMS33) bei der Vektor DNA von pYMS33 eingesetzt wurde, die pCc1001 Negativkontrolle (-pCc1001) bei der genomische DNA eines pCc1001 Transformanden eingesetzt wurde, es wurde 1 kb-DNA-Leiter von Carl Roth als Marker verwendet und der pYMS33 Transformand 12 (Klon 12).

Der pCc1001 und pYMS33 Transformand 12 wurden für 8 Tage in 0,1 mM CuSO₄ mKjalke Medium kultiviert (2.2.1.3) und die Laccaseaktivität mittels ABTS Assay (2.2.2.18) dokumentiert (Abbildung 39).

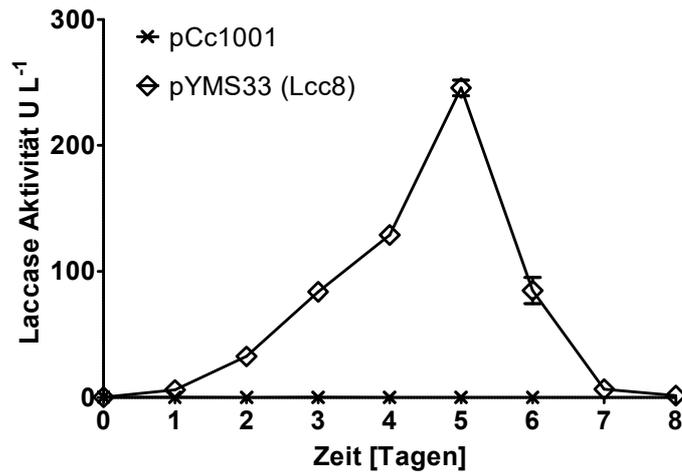


Abbildung 39: Laccaseaktivität des pYMS33 Transformand 12 und eines pCc1001 Transformanden. Die Laccaseaktivität wurde mittels ABTS Assay bestimmt (Schulze et al., 2019) (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Der pYMS33 Transformand zeigte deutlich einen Anstieg der Laccaseaktivität, die ihr Maximum an Tag 5 hatte und danach wieder abfiel, während der pCc1001 Kontrolltransformand keine Laccaseaktivität über 8 Tage zeigte. Der Kulturüberstand von Tag 5 wurde für ein Laccase Zymogramm (2.2.3.6) verwendet (Abbildung 40).

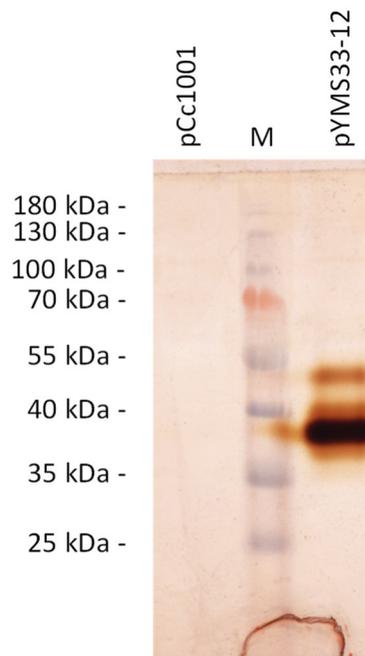


Abbildung 40: Laccase Zymogramm des pYMS33 Transformanden von Tag 5. Für die Färbung der Laccaseaktivität wurden die Laccase spezifischen Substrate MBTH (10 mM) und DHPPA (10 mM) verwendet. M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

Das Laccase Zymogramm zeigte, dass der pYMS33 Transformand zwei Aktivitätsbanden aufwies, während der pCc1001 Transformand keinerlei Aktivitätsbande zeigte.

Der Kulturüberstand einer wiederholten Kultivierung von pYMS33-12 wurde für eine Ultrafiltration mittels Anionenaustauschchromatographie (AEX) und Hydrophobeinteraktionschromatographie (HIC) (2.2.4.2) verwendet. Hierbei konnte ein finaler Reinigungsfaktor von 10 und eine spezifische Laccaseaktivität von $46,3 \text{ U L}^{-1}$ erzielt werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Reinigung der Laccase8 aus Kulturüberstand (Schulze et al., 2019)(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

| Reinigungsschritt | Totale Laccase Aktivität [U] | Totale Protein Menge [mg] | Spezifische Aktivität [U mg^{-1}] | Ausbeute [%] | Reinigungsfaktor |
|-------------------|------------------------------|---------------------------|--|--------------|------------------|
| Überstand | 133 | 28,6 | 4,7 | 100 | 1,0 |
| Ultrafiltration | 127 | 22,7 | 5,6 | 95 | 1,2 |
| AEX | 85 | 5,4 | 15,7 | 64 | 3,3 |
| HIC | 25 | 0,5 | 46,3 | 19 | 9,9 |

Die in Tabelle 4 gezeigten Reinigungsschritte wurden ebenfalls für eine SDS-PAGE Analyse mit Silberfärbung (2.2.3.2; 2.2.3.3) verwendet (Abbildung 41).

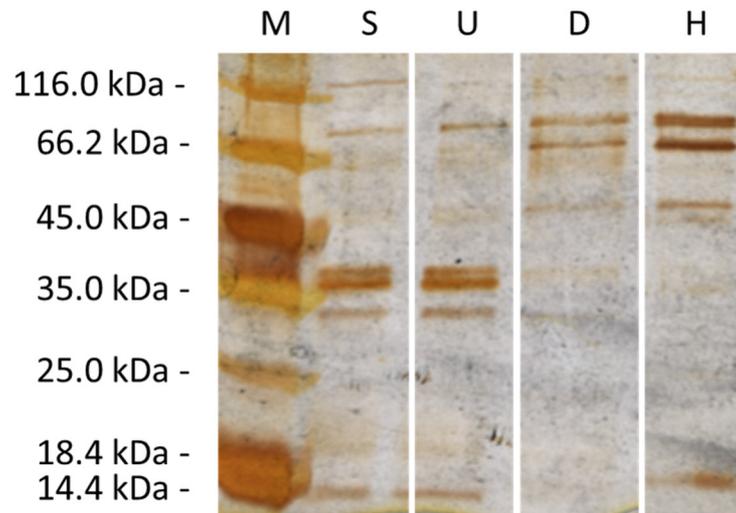


Abbildung 41: SDS-PAGE Analyse der Lcc8 Reinigungsschritte. Das PAA-Gel wurde mit Silber gefärbt und unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. M = Pierce™ unstained protein MW Marker, S = Überstand, U = Ultrafiltration, D = AEX (DEAE-Sepharose) und H = HIC (Schulze et al., 2019)(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Die SDS-PAGE Analyse zeigte, dass mit zunehmendem Reinigungsgrad die Intensität einer 64 kDa und einer 77 kDa Bande zunahm. Zusätzlich ist in der HIC Reinigungsfraction eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa zu sehen. Die HIC Fraktion wurde für ein Laccase Zymogramm (2.2.3.6) eingesetzt (Abbildung 42).

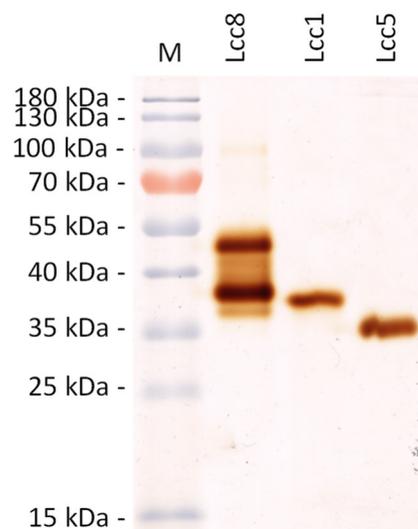


Abbildung 42: Zymogramm der gereinigten Lcc8 mit Lcc1 und Lcc5 (alle Proben entsprechen einer Aktivität von 20 mU) und wurden mit den Laccase Substraten MBTH (10 mM) und DHPPA (10 mM) gefärbt, M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Schulze et al., 2019)(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Das Laccase Zymogramm zeigte, dass die vermeintlich gereinigte Lcc8 Probe zwei Aktivitätsbanden aufwies, während die gereinigte Lcc1 und Lcc5 jeweils nur eine Bande aufwies. Die beiden Aktivitätsbanden der Lcc8 wurden aus dem Gel ausgeschnitten, vorbereitet und mittels nano-LC-MS/MS (2.2.4.3) auf die Peptidsequenz hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 zusammengefasst.

MFKNLLSFALLAISVANA*QIVNSVDTMTLTNANLS
 PDGFERPSSVNGVFPAPLIKANKGDHFSLNVVND
 MTDDTQFRATSIHWHGIIYQKHTNWADGVAGVNQC
 PIGPGDSFLYQFDVFNQAGTFWYHSHFRTQYCDGL
 RGPLVIYDPEDPYRDLYDVDDENTVITIGDWYHLQS
 PSITGVASNDATVINGKGRYVGGPLVDLAIINVPGK
 RYRLRIMAISCDPNYIFSIDGHQLTVIEADAQSTQPL
 VVDSIQIFAGQRYSAILTADQPIGNYWIRALPNSGN
 NNLFTGFIDGTNSAILRYAGAPIADPTTSAPDAPVLL
 DETLLVPLDTPVPGQPFPGGADVNLNLLNLDNFVDA
 WRFYVNNETFNPTVPVLLQVMGAVAAQDLLPAG
 SVYTLPPNASVEISIPGGVISSPHPFHLHGHSFSVVK
 AGIDTPYNYVNPVKRDVVSTGDVGSNTTIRFFTDNS
 GPWILHCHIDWHLDLGLAIVLAEDPVGTPALNPTPQ
 DWDDLCPAYDALDPSMTEIAVVATPSPLDPQVVSVP
 ESYLATSTEAEDEVTVTVTVTEGDDAAATDSS

Abbildung 43: Zusammenfassung der nano-LC-MS/MS Analyse der Lcc8 Aktivitätsbanden. Der unterstrichene Teil stellt das Lcc1-Signalpeptid dar. Der Stern markiert die Signalpeptid Schnittstelle. In Rot sind die Sequenzbereiche der Lcc8 dargestellt, welche durch Sequenzierungsergebnisse abgedeckt wurden. Die in den blauen Boxen markierten Histidine sind in die Kupferbindung involviert. Die in den grünen Boxen markierten Asparagine stellen potentielle N-Glykosylierungsstellen dar.

Die Sequenzierungsergebnisse der beiden Lcc8 Aktivitätsbanden deuteten darauf hin, dass beide Banden zur Lcc8 gehören. Hierbei deckten die Sequenzierungsergebnisse der oberen Bande 38,46% der Lcc8 Sequenz ab, während die Sequenzierungsergebnisse der unteren Bande 62,94% abdeckten (Anhang 22). Die HIC Fraktion wurde fortan als gereinigte Lcc8 bezeichnet und für die biochemische Charakterisierung der Lcc8 verwendet.

Zur Bestimmung des Glykosylierungsgrades wurde Lcc8 mit PNGase F von NEB (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) deglykosyliert (Abbildung 44).

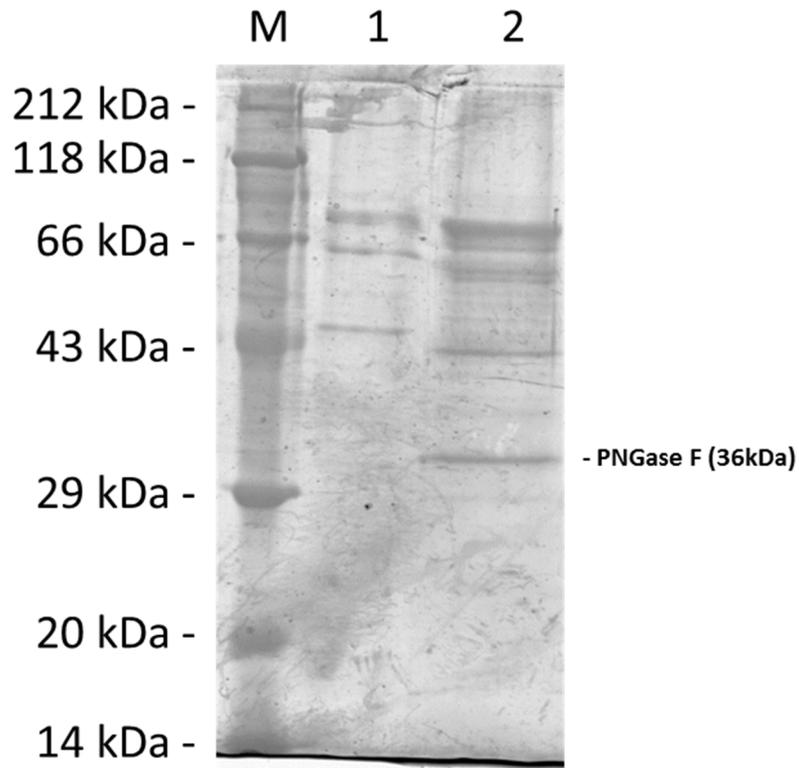


Abbildung 44: Bestimmung des Glykosylierungsgrades. M zeigt den „unstained“ Marker von Carl Roth, 1 ist unbehandelte Lcc8, 2 stellt die mit PNGaseF behandelte Lcc8. Das PAA-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

Die Markerbanden wurden zur Berechnung des Molekulargewichts der glykosylierten und deglykosylierten Lcc8-Banden verwendet. Es wurde berechnet, dass die Banden von glykosyliertem Lcc8 ein Molekulargewicht von 75 kDa, 63 kDa und 45 kDa hatten. Die Banden von deglykosyliertem Lcc8 bildeten Doppelbanden, was eine genaue Berechnung behindert. Trotzdem wurde berechnet, dass die Banden ein Molekulargewicht von 67 kDa und 57 kDa

und 42 kDa haben. Die berechneten Glykosylierungsgrade für diese drei Banden betragen 10%, 9,4% und 6,7%.

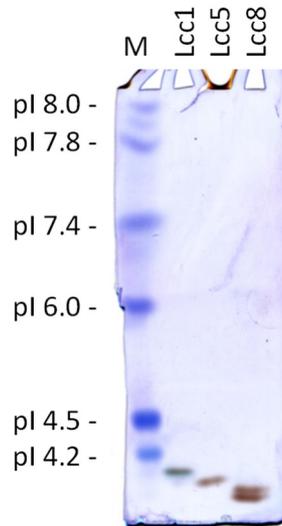


Abbildung 45: Isoelektrische Fokussierung gefärbt mit den Laccase Substraten MBTH/ DHPPA. M = SERVA IEF Marker 3–10 Liquid Mix, gereinigte Lcc1, Lcc5 and Lcc8.

Die isoelektrische Fokussierung (Abbildung 45) der gereinigten Lcc8 zeigte, dass die Lcc8 auch hierbei zwei Aktivitätsbanden aufwies. Die beiden Lcc8 Banden zeigten einen niedrigeren pI als die Vergleichs-Laccasen Lcc1 und Lcc5. Der pI der beiden Lcc8 Banden wurde durch Extrapolation der Markerbanden berechnet und lag bei ca. 3,3 und 3,4.

Die gereinigte Lcc8 wurde für die Bestimmung des optimalen pH-Wertes unter Verwendung vier verschiedener Substrate verwendet. Weiterhin wurde die optimale Temperatur, die pH-Stabilität und die Temperatur-Stabilität bestimmt (2.2.5.1) (Abbildung 46).

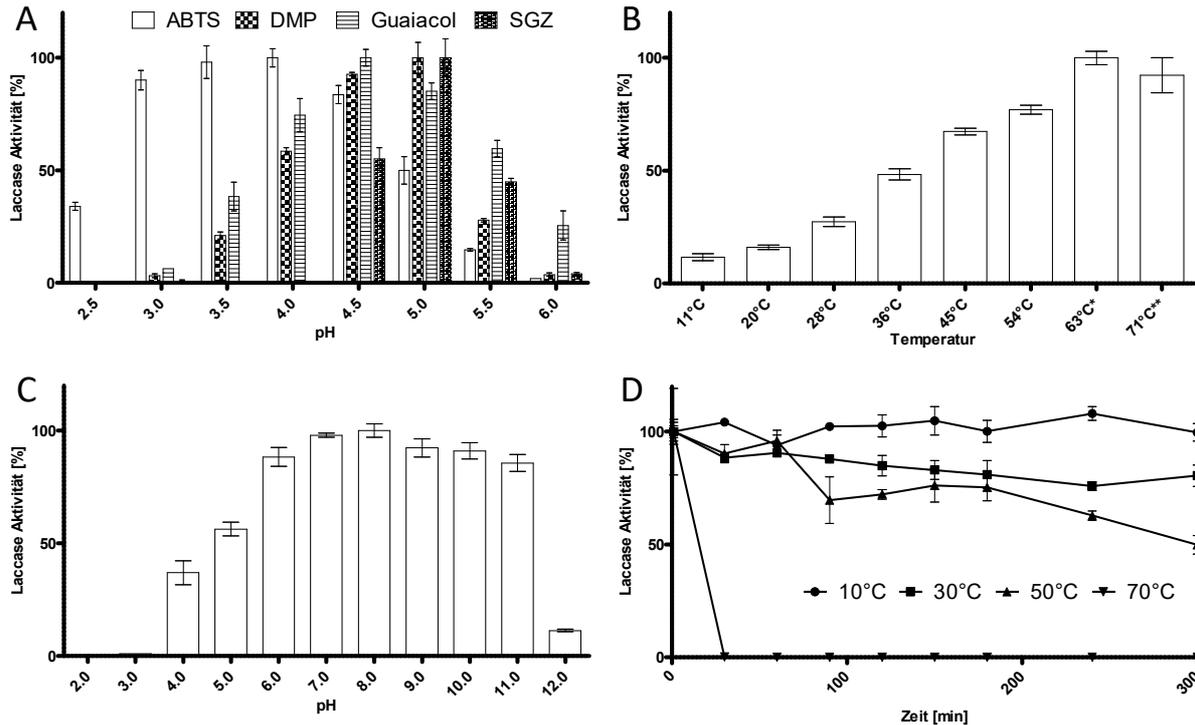


Abbildung 46: Charakterisierung der Lcc8. A = Detektion des substratspezifischen pH Optimum. B = Detektion der optimalen Reaktionstemperatur mit ABTS. *Die Aktivität war für 5 min stabil und begann dann langsam zu sinken. ** Die Aktivität war für 3 min stabil und begann dann rapide zu sinken. C = Analyse des optimalen Lagerungs-pH. D = Enzymstabilität bei verschiedenen Temperaturen (Schulze et al., 2019)(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Die Detektion des substratspezifischen pH-Optimums zeigte, dass die Lcc8 das Substrat ABTS optimal bei einem pH-Wert zwischen 3,5 bis pH 4,0 oxidieren konnte. Das Substrat DMP bei einem pH 5,0. Das Substrat Guajakol bei einem pH 4,5 und das Substrat SGZ bei einem pH 5,0 (Abbildung 46A). Die optimale Temperatur für die Oxidation von ABTS durch die Lcc8 lag bei 63 °C, wobei die Aktivität nur für 5 min stabil war (Abbildung 46B). Die Bestimmung des optimalen pH-Bereichs zur Lagerung der Lcc8 wurde in Universalpuffer durchgeführt und zeigte, dass im pH-Bereich 6-11 die höchsten Aktivitäten nach 48 h beobachtet wurden. Die Lagerung bei pH 8 zeigte die höchste Stabilität und damit besten Lagerbedingungen (Abbildung 46C). Demzufolge wurde für die Bestimmung der Temperaturstabilität Universalpuffer mit einem pH-Wert von 8 verwendet. Die Bestimmung zeigte, dass bei einer Temperatur von 70 °C die Aktivität schnell verloren ging. Bei einer Temperatur von 50 °C zeigte die Lcc8 nach 300 min eine Restaktivität von mindestens 50%. Bei niedrigeren Temperaturen zeigte die Lcc8 kaum (30 °C) oder keinen (10 °C) Verlust der Aktivität (Abbildung 46D).

Die gereinigte Lcc8 wurde weiterhin für eine Bestimmung des K_m und K_{cat} Werts verwendet. Hierzu wurden steigende Substratkonzentrationen bei dem Aktivitätsassay (2.2.2.18) verwendet um die V_{max} Werte zu bestimmen. Dies wurde für die Substrate ABTS unter Verwendung eines Universal-Puffer pH 4,0 und für das Substrat DMP unter Verwendung eines Universal-Puffer pH 5,0 durchgeführt (Abbildung 47).

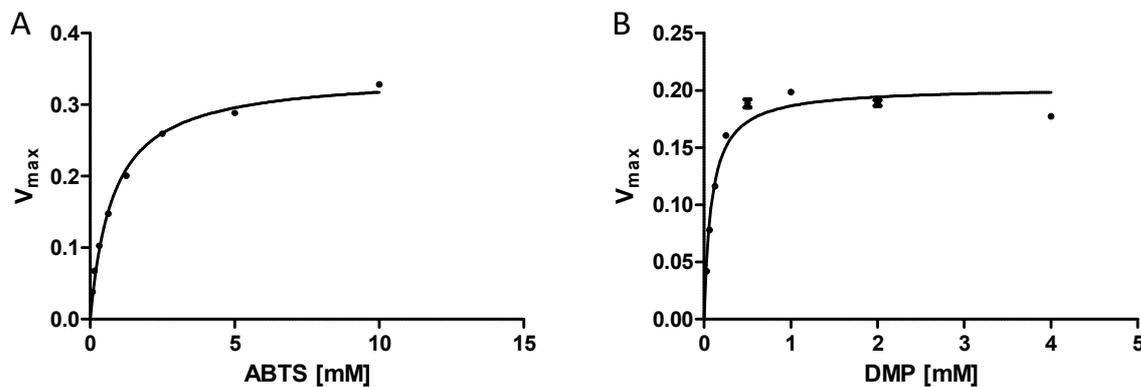


Abbildung 47: Darstellung des Lcc8 Verhältnis von V_{max} zu Substratkonzentration ABTS(A) und DMP(B).

Anhand des Verhältnisses von V_{max} zur Substratkonzentration konnte mit Hilfe des Programms GraphPad® Prism Version 5.03 der K_m -Wert mittels nicht linearer Regression für die beiden Substrate ABTS und DMP bestimmt werden. Der K_m -Wert für ABTS war 792 μM und für DMP 88 μM .

Die Berechnung von K_{cat} erfolgte anschließend nachfolgender Formel:

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{E}$$

Hierbei stellt V_{max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und E die Enzymkonzentration dar. V_{max} betrug für ABTS 0,3426 OD min^{-1} und für DMP 0,2028 OD min^{-1} . Diese Werte wurden mittels des Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{\text{ABTS}} = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{\text{DMP}} = 49.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und der Spaltbreite von 0,64 cm umgerechnet. Daraus ergaben sich die V_{max} Werte 14,87 $\mu\text{M min}^{-1}$ für ABTS und 6,39 $\mu\text{M min}^{-1}$ für DMP. Für die Berechnung der eingesetzten Enzymkonzentration in mol musste die Proteinkonzentration umgerechnet werden. Die Proteinkonzentration der gereinigten Lcc8 betrug 21,6 ng μL^{-1} . Die Enzymlösung wurde für die ABTS Messungen 1:40 verdünnt und für die DMP Messungen 1:10 verdünnt und jeweils 20 μL in einem Ansatz verwendet. Daraus ergab sich eine Menge von 10,8 ng Lcc8 in einem ABTS

Ansatz und 43,2 ng in einem DMP Ansatz. Das theoretische Molekulargewicht der Lcc8 ohne Signalpeptid betrug 58 kDa. Mit Hilfe eines Online Kalkulators (http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_04.html) wurde die Stoffmenge der Lcc8 berechnet. Diese betrug für den ABTS Ansatz $1,7241 \times 10^{-13}$ mol und für den DMP Ansatz $7,4138 \times 10^{-13}$ mol. Umgerechnet auf das eingesetzte Reaktionsvolumen von 200 μL ergibt sich daraus eine Proteinkonzentration [E] an Lcc8 im ABTS Ansatz von 0,00086 μM und im DMP Ansatz von 0,00371 μM . Anschließend wurde der Quotient aus V_{max} und E gebildet. Der K_{cat} ergab für ABTS 17.290 min^{-1} und für DMP 1.722 min^{-1} .

3.5 Expression einer Insektenpeptidase mittels *Pichia pastoris* GS115

Die Literatur weist darauf hin, dass bei der Expression von Peptidasen höherer Eukaryoten mit der Verwendung der Hefe *P. pastoris* Stamm GS115 unter der Nutzung des Expressionsvektors pPIC9K einige Erfolge erzielt werden konnten (Li et al., 2011; Yin et al., 2014; Leonhardt et al., 2016; Yang et al., 2016). Daher sollte versucht werden dieses alternative Expressionssystem zur Expression von Insektenpeptidasen zu verwenden. Das Zielprotein war die Rdo_c6991 (Anhang 24). Hierzu wurde folgende Expressionskassette geplant (Abbildung 48).

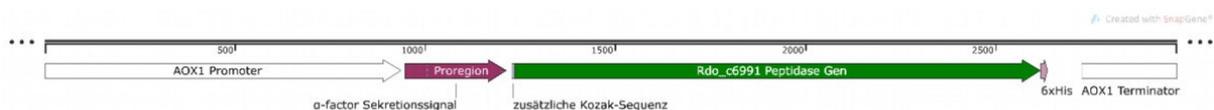


Abbildung 48: Expressionskassette des Expressionsvektor pPIC9K-KPep. Das Zielgen *Rdo_c6991* steht hierbei unter der Kontrolle des *AOX1*-Promotors und Terminators. Für die Sekretion des Zielgens wird das α -factor Sekretionssignal verwendet. Das Zielgen *Rdo_c6991* besitzt am 5'-Terminus eine zusätzliche Kozak-Sequenz und am 3'-Terminus eine sechsfach Histidin-Markierung.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung zusätzlicher Sekretionsdomänen die Expressioneffizienz gesteigert werden kann (Jiang et al., 2016). Hierbei zeigte die Verwendung einer zusätzlichen Phospholipase A₂ (PLA₂) Domäne die größte Steigerung der Expressioneffizienz. Daher wurde ein zweiter Expressionsvektor für die Expression der *Rdo_c6991* konstruiert (Abbildung 49). Die Sequenz für die PLA₂ Domäne wurde der Literatur von (Liu et al., 2015) entnommen und ist im Anhang 25 zu finden. Anhand der von (Liu et al., 2015) verwendeten Oligonukleotide, konnte der Bereich der PLA₂-Domäne,

welche für die Expression einer Peptidase verwendet wurde, identifiziert und für die Planung von pPIC9K-PlaPep verwendet werden.

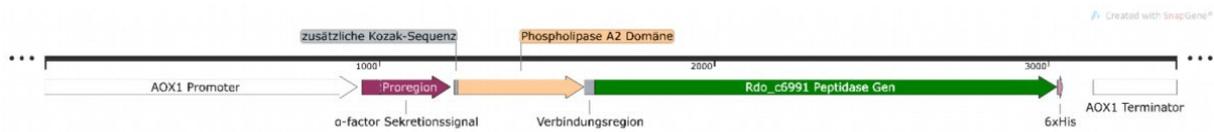


Abbildung 49: Expressionskassette des Expressionsvektor pPIC9K-PlaPep. Das Zielgen *Rdo_c6991* steht hierbei unter der Kontrolle des *AOX1*-Promotors und Terminators. Für die Sekretion des Zielgens wird das α -factor Sekretionssignal verwendet. Das Zielgen *Rdo_c6991* ist am 5'-Terminus mit der Phospholipase A₂ Domäne fusioniert, welche als zusätzliche Sekretionsdomäne fungieren soll und eine zusätzliche Kozak-Sequenz besitzt. Am 3'-Terminus besitzt das Zielgen *Rdo_c6991* eine sechsfach Histidin-Markierung.

Der Auftrag der Synthese der beiden synthetischen Gene wurde an die Firma BioCat GmbH gegeben. Ebenfalls übernahm BioCat GmbH die Codon-Optimierung und Klonierung der synthetischen Gene in den Expressionsvektor pPIC9K. Der *P. pastoris* Stamm GS115 wurde von ThermoScientific bezogen. Die erhaltenen Expressionsvektoren wurden nach Herstellerangaben für die Transformation von *P. pastoris* GS115 verwendet. Hierzu wurden die Expressionsvektoren zuvor mittels Restriktionsverdau durch *SalI* linearisiert und anschließend für die Elektroporationstransformation (2.2.2.11; 2.2.2.12) eingesetzt. Für die Kolonie PCR (2.2.2.4; 2.2.2.5) der Transformanden wurden die Oligonukleotide MAG_019 (hybridisiert am Ende des *AOX1*-Promotors) und MAG_020 (Hybridisiert am Anfang des *AOX1*-Terminators) eingesetzt (Abbildung 50). Die Kolonie PCR ergab 14 positive Transformanden für die pPIC9K-KPep Transformation und 17 positive Transformanden für die pPIC9K-PlaPep Transformation.

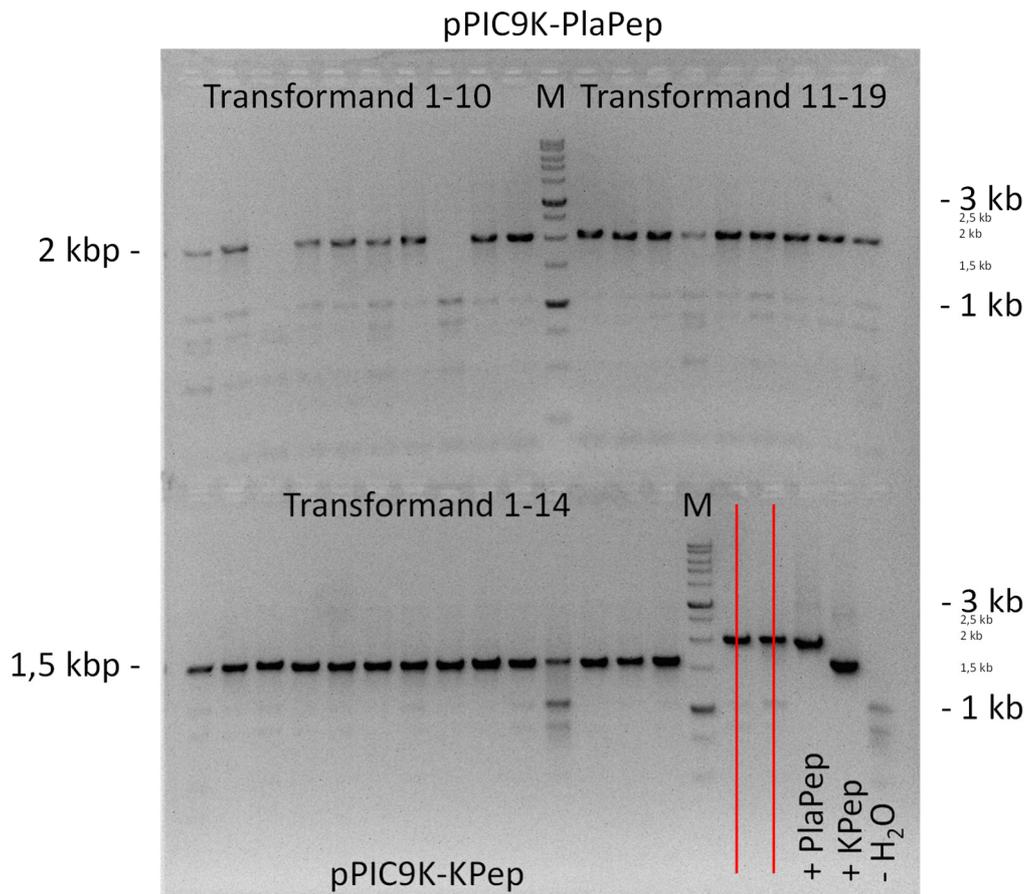


Abbildung 50: Kolonie PCR der pPIC9K-KPep und -PlaPep *P. pastoris* GS115 Transformanden. In der oberen Hälfte sind die pPIC9K-PlaPep und in der unteren Hälfte die pPIC9K-KPep Transformanden dargestellt. Proben mit roter Linie sind irrelevante Proben. + PlaPep und +KPep stellen die jeweiligen Positivkontrollen dar, bei der pPIC9K-PlaPep und pPIC9K-KPep Vektor DNA eingesetzt wurde. -H₂O stellt die Negativkontrolle dar. M = 1kb Marker (Nippon Genetics).

Die Transformanden pPIC9K-KPep 1, 2, 3, 4, 5 und pPIC9K-PlaPep 1, 2, 4, 5, 6 wurden nach Herstellerangaben in BMMY Medium (2.2.1.2) für 5 Tage bei 18 °C kultiviert. Hierbei wurde alle 24 h 2% Methanol hinzugegeben. Die OD_{600nm} wurde zur Bewertung des Kultivierungserfolg dokumentiert (2.2.1.4) (Abbildung 51).

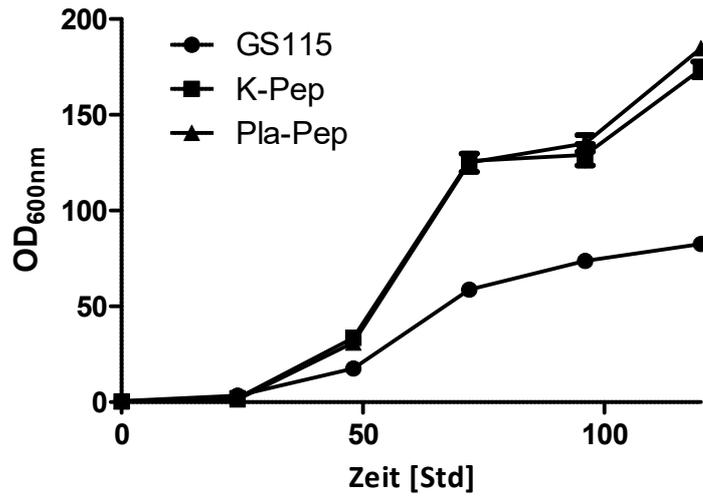


Abbildung 51: Kultivierung von GS115 und pPIC9K-KPep und -PlaPep Transformanden in BMMY über 5 Tage.

Die Messung der OD_{600nm} zeigte, dass alle Transformanden kontinuierlich wuchsen. Während die pPIC9K Transformanden eine OD_{600nm} von ca. 175 erreichten, konnte der untransformierte Stamm GS115 nur eine OD_{600nm} von ca. 80 erreichen. An Tag 5 wurde Kulturüberstand entnommen und für eine Western Blot Analyse (2.2.3.4) mit gegen die Histidin-Markierung gerichtete Antikörper verwendet (Abbildung 52). Der Kulturüberstand wurde hierzu mittels Lyophilisator um den Faktor 10 konzentriert.

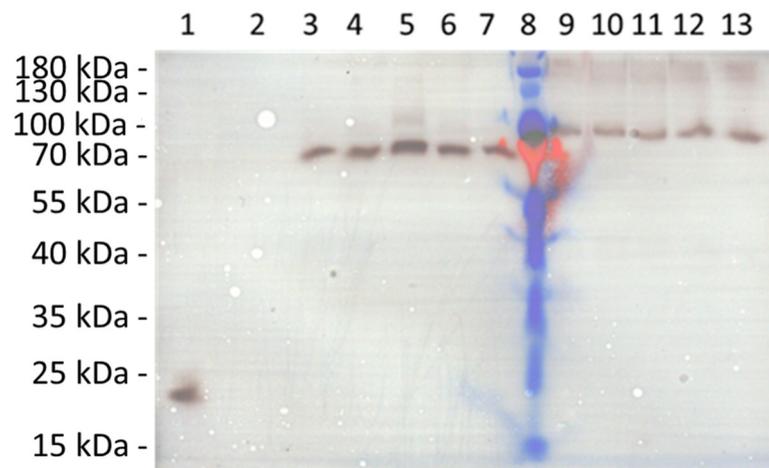


Abbildung 52: Western Blot Analyse der pPIC9K-KPep und-PlaPep Transformanden. 1 = Positivkontrolle Kulturüberstand von pYMS15c; 2 = Überstand GS115, 3-7 = Überstand der pPIC9K-KPep Transformanden 1-5; 8 = Marker Page Ruler Prestained, 9-13 = Überstand der pPIC9K-PlaPep Transformanden 1-5.

Die Western Blot Analyse zeigte, dass alle pPIC9K Transformanten ein rekombinantes Protein exprimierten. Die pPIC9K-KPep Transformanten exprimierten ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa, während die pPIC9K-PlaPep Transformanten ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa exprimierten. Das größere Molekulargewicht des Proteins, welches durch die pPIC9K-PlaPep Transformanten exprimiert wurde, lässt darauf schließen, dass die zusätzliche PLA₂ Domäne nicht während der Prozessierung und Sekretion hydrolysiert wurde, was das katalytische Verhalten des rekombinanten Enzyms beeinflussen könnte. Daher wurden nur die Kulturüberstände der pPIC9K-KPep Transformanten von Tag 5 vereinigt und für eine Histidin-Markierung spezifische Reinigung (2.2.4.1) verwendet. Hierzu wurde eine HisTrap™ Säule von GE Healthcare mit dem BioLogic DuoFlow™ System von BioRad verwendet (Abbildung 53).

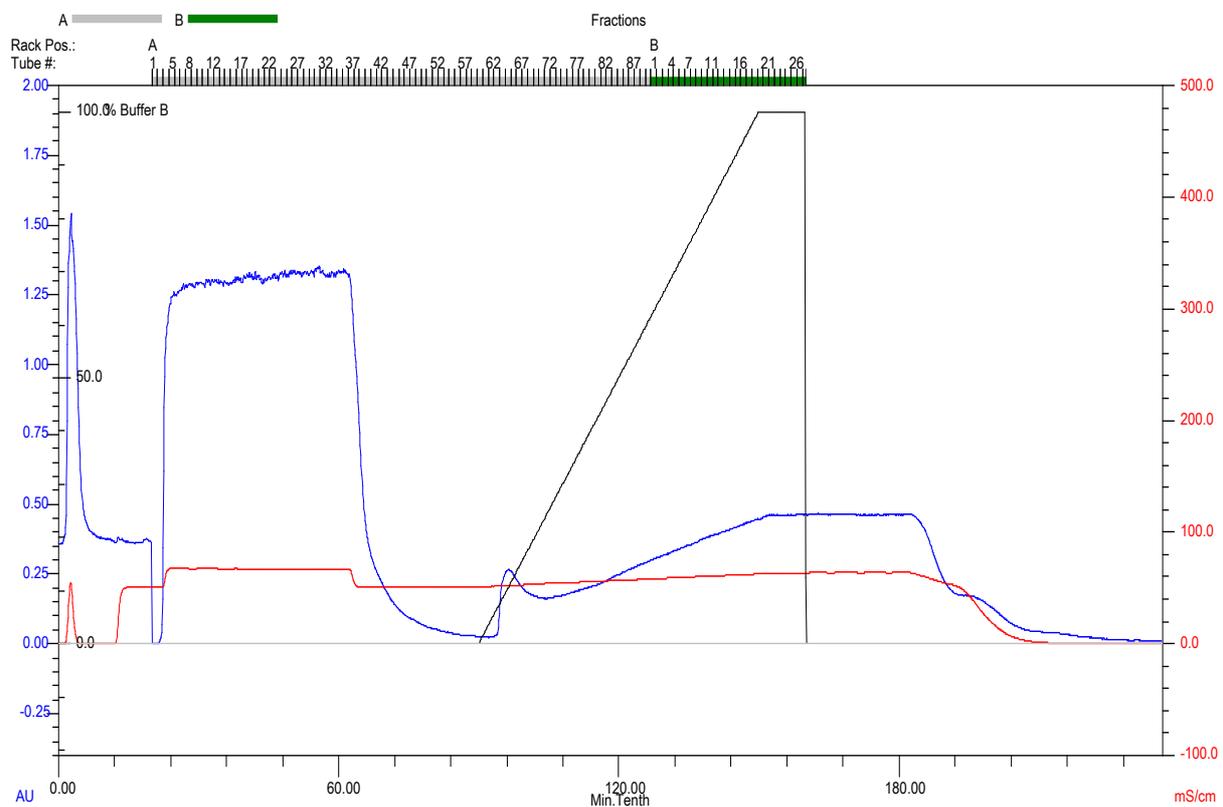


Abbildung 53: Chromatogramm der HisTrap™ Reinigung des Kulturüberstands der pPIC9K-KPep Transformanten. In Blau ist das UV-Signal dargestellt, in Rot die Leitfähigkeit und in Schwarz der Imidazol Gehalt.

Das Chromatogramm der HisTrap™ Reinigung zeigte einen UV-Peak bei den Fraktionen 62-69. Diese Fraktionen wurden vereinigt und mittels Nanosep® PALL Zentrifugationsmembran (10 kDa) umgepuffert und eingengt. Die vereinigten Kulturüberstände der pPIC9K-KPep Transformanten, der Durchfluss der HisTrap™ Reinigung und die vereinigten, umgepufferten

und konzentrierten Fraktionen 62-69 wurden für eine weitere PAA-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse (2.2.3.4) mittels Histidin-spezifischem Antikörper eingesetzt (Abbildung 54).

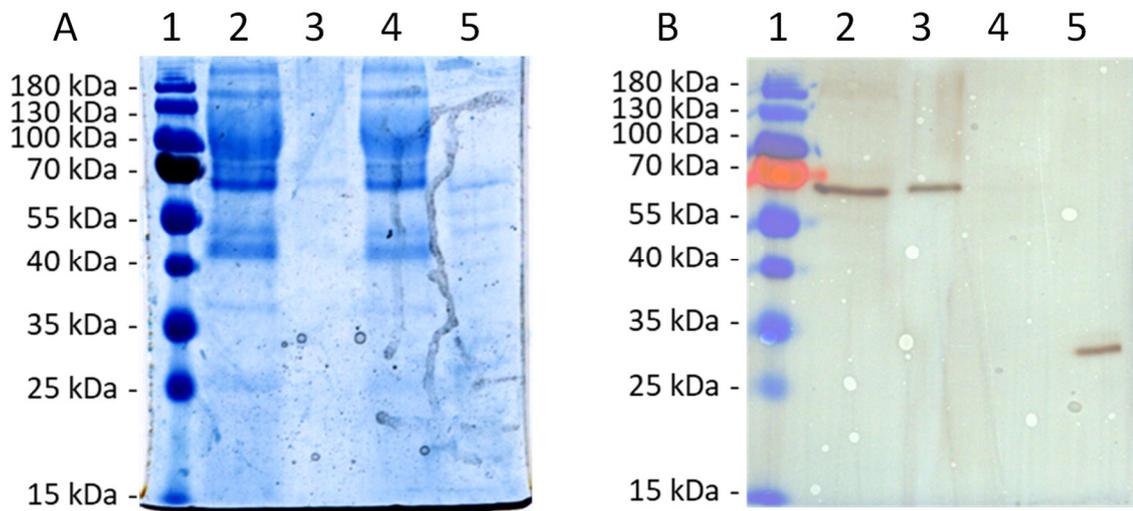


Abbildung 54: PAA Gelelektrophorese Analyse (A) und Western Blot Analyse (B) der HisTrap™ Reinigung des Kulturüberstands der pPIC9K-KPep Transformanden. 1 = PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 2 = konditionierter Kulturüberstand; 3 = vereinigte Fraktionen 62-69; 4 = Durchfluss der HisTrap™ Reinigung; 5 = Positivkontrolle Kulturüberstand pYMS15c.

Die PAA-Gelelektrophorese zeigt im Kulturüberstand mehrere Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa bis ca. 180 kDa. In den vereinigten Fraktionen 62-69 ist nur eine ganz leichte Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa zu erkennen. Der Durchfluss der HisTrap™ Reinigung zeigt ein ähnliches Proteinprofil wie der Kulturüberstand. Die Western Blot Analyse der HisTrap™ Reinigung zeigte, dass im Kulturüberstand der pPIC9K-KPep Transformanden und in den vereinigten, umgepufferten und konzentrierten Fraktionen 62-69 rekombinantes Protein enthalten war. Der Durchfluss der HisTrap™ Reinigung enthielt kein rekombinantes Protein. Das gereinigte rekombinante Protein aus den Fraktionen 62-69 wurde daher als gereinigte Rdo_c6991 angesehen und für einen Serinpeptidase spezifischen Assay (2.2.2.17) mit dem Substrat Gly-Pro p-Nitroanilid eingesetzt. Hierbei wurde 0,1 M Tris HCl pH 8 eingesetzt. Es ergab sich eine Serinpeptidase spezifische Aktivität von 159 mU L⁻¹. Darüber hinaus besagte die Analyse der Daten durch GraphPad Prism, dass die Abweichung von Null signifikant war (Anhang 26). Nach 18 h wurde die Extinktion erneut gemessen und es

konnte beobachtet werden, dass die Extinktion sich in dieser Zeit nahezu verdoppelt hatte, was für eine andauernde, aber sehr schwache Peptidaseaktivität der Rdo_c6991 sprach.

4 Diskussion

4.1 Expression von Peptidasen mit *C. cinerea*

Peptidasen sind in allen Lebewesen vertreten und spielen eine wichtige Rolle in physiologischen Zuständen und katalysieren eine Vielzahl metabolischer Reaktionen (Hedstrom, 2002). Neben der Klassifizierung von Peptidasen über die katalytisch aktiven Aminosäuren im aktiven Zentrum (Hartley, 1960), können Peptidasen auch anhand des Hydrolyseorts klassifiziert werden. Es werden hierbei die Endopeptidasen von den Exopeptidasen unterschieden (Walter et al., 1980). Die Endopeptidasen, zu denen auch die Oligopeptidasen zählen, hydrolysieren interne, alpha-Peptidbindungen von Polypeptidketten. Exopeptidasen benötigen zur Hydrolyse einen freien N- oder C- Terminus und sie hydrolysieren nicht weiter als drei Aminosäuren entfernt vom Terminus. Die Exopeptidasen unterteilen sich weiterhin in die Amino-, Di-, Dipeptidyl-, Tripeptidyl-, Peptidyl- und Carboxypeptidasen (Rao et al., 1998). Sie können ebenso anhand ihres pH-Optimums in saure-, neutrale- oder alkaline Peptidasen, anhand ihrer Substratspezifität wie zum Beispiel Collagenase, Keratinase, Elastase oder anhand ihrer Ähnlichkeit zu bereits bekannten Peptidasen wie Trypsin, Pepsin (*trypsin-like*, *pepsin-like*) eingeteilt werden (Sumantha A. et al., 2006). Ein weiterer Klassifizierungsansatz beruht auf der molekularen Struktur und Homologie der Aminosäuresequenz und dreidimensionaler Struktur der Peptidasen. Hierbei werden die Peptidasen in Familien und Clans eingeteilt (Rawlings et al., 2007). Peptidasen finden unter anderem Anwendung in der Lebensmittel-, Getränke- und Waschmittelindustrie sowie in der Medizintechnik, Behandlung, Diagnose sowie Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten und auch in Leder Branchen machen sie zum größten Segment in der gesamten Enzymindustrie (Rao et al., 1998; Sumantha A. et al., 2006; Fraatz et al., 2014). Peptidasen wie Papain (Jon, 2012), Bromelain (Orsini, 2006) und Keratinasen (Kothari et al., 2017) sind pflanzlichen Ursprungs und stellen Cysteine Peptidasen dar. Sie können unter anderem Anwendung beim Brauen, Backen oder Lebensmittelbehandlung finden (Rao et al., 1998; Feijoo-Siota and Villa, 2011). Trypsin (Rick, 1974), Chymotrypsin (Blow, 1976), Pepsin (Fruton, 1970) und Rennin (Fish, 1957) sind tierischen Ursprungs und finden ihre Anwendung unter anderem in der Käseherstellung. Aufgrund des weltweiten Bedarfs an Peptidasen, den pflanzliche oder tierische Quellen nicht decken konnten, entstand gesteigertes Interesse an Peptidasen aus Mikroorganismen. Während Bakterien hauptsächlich neutrale und alkaline Peptidasen wie Subtilisin (Smith et al., 1968) exprimieren, können Pilze wie *A. oryzae* ebenfalls saure

Peptidasen exprimieren (Rao et al., 1998). Es gibt zahlreiche Beispiele für die oben genannten Peptidasen und deren rekombinante Expression (Rao et al., 1998; Feijoo-Siota and Villa, 2011; Fraatz et al., 2014).

Werden die Aminosäure Sequenzen der Peptidasen WcOPsP, RdoT3 und EAU91794 bei MEROPS für einen Abgleich verwendet, ordnet MEROPS (Rawlings et al., 2016) alle den Serinpeptidasen zu. Die WcOPsP ist eine lysosomale Pro-Xaa Carboxypeptidase und gehört zum Clan SC und der S28 Familie. Die katalytische Triade besteht aus Serin, Asparagin und Histidin. Die S28 Familie ist bekannt dafür Prolyl-Verbindungen zu hydrolysieren, weshalb sich Prolin-haltige Substrate zum Nachweis der Aktivität anbieten. Daher wurde Gly-Pro-pNA als Substrat verwendet, sowie es bereits von (Amelung, 2019) während der Charakterisierung der Peptidase verwendet wurde. Bisher konnte gezeigt werden, dass eine Prolyl Aminopeptidase aus *A. oryzae* (Yang et al., 2016) und eine Prolyl Endopeptidase aus *A. oryzae* (Jiang et al., 2016) in *P. pastoris* rekombinant exprimiert werden konnten.

Die RdoT3 gehört zum Clan PA und der Unterfamilie S1A. Die S1 Familie ist die größte Familie zu der auch Chymotrypsin gehört. Die katalytische Triade dieser Familie besteht aus Histidin, Asparagin und Serin. Sie wird weiterhin als Endopeptidase klassifiziert. Für die Bestimmung der Peptidaseaktivität wurde wie bei (Mika, 2015) sowohl Azocasein als auch Gly-Pro-pNA verwendet. Chymotrypsin C, ursprünglich extrahiert aus dem Schweinepankreas, kann rekombinant in *E. coli* exprimiert werden (Wang et al., 2011).

Die EAU91794 gehört zum Clan SB und der Familie S8A. Die katalytische Triade besteht aus Asparagin, Histidin und Serin und wird weiter als Endopeptidase klassifiziert. Zu dieser Familie gehört auch Subtilisin, was die Familie zur Zweitgrößten der Serinpeptidasen macht. Ein typisch verwendetes Substrat für den Nachweis einer S8A Peptidase ist Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. Obwohl Subtilisin bereits seit 1985 durch *Bacillus licheniformis* rekombinant hergestellt werden kann (Jacobs et al., 1985), gibt es Bestrebungen dieses Enzym durch moderne Expressionsstämme höherer Eukaryoten wie *P. pastoris* zu exprimieren (Zhou et al., 2017). Eine Subtilisin ähnliche Peptidase aus *Pleurotus pulmonaris* konnte ebenfalls rekombinant in *P. pastoris* exprimiert werden (Leonhardt et al., 2016).

Bei den verschiedenen Transformationen von *C. cinerea* wurden immer mindestens 1 µg Vektor-DNA sowohl von pCc1001 als auch von dem Expressionsvektor eingesetzt. Es wurde

bereits berichtet, dass eine höhere Menge an Vektor-DNA nicht zwingend zu einer erhöhten Anzahl an Transformanden führt (Dörnte and Kües, 2016). In dieser Arbeit wurden in der Regel zwischen 5 und 100 Transformanden pro μg eingesetzter Vektor-DNA erzeugt, was geringer ist als die von (Dörnte and Kües, 2012) mögliche Transformationseffizienz von bis zu 700 Transformanden pro μg Vektor-DNA. Dies kann mit der DNA-Qualität zusammenhängen (Dörnte and Kües, 2012), aber auch mit der unterschiedlichen Menge an asexuellen Sporen, die in dieser Arbeit nicht eingestellt wurde, oder dem Erntezeitpunkt der asexuellen Sporen. Daneben wurden sie unterschiedlich lange verdaut, was in Abhängigkeit der eingesetzten Chitinase Menge und Aktivität zu Protoplasten unterschiedlicher Qualität führt, weshalb auch bei gleicher Menge eingesetzter Vektor DNA unterschiedlich viele Transformanden produziert werden können. (Dörnte and Kües, 2012) haben hierzu anhand von Bildern gezeigt wie die Protoplastierung von *C. cinerea* Stamm FA2222 Oidia verläuft. Da es sich bei der Transformationsmethode von *C. cinerea* um eine Co-Transformation handelt, werden in erster Linie Transformanden erhalten, die erfolgreich mit pCc1001 transformiert und die Tryptophan Auxotrophie kompensiert wurde (Transformationrate). Es muss daher weiter mittels Kolonie PCR getestet werden, bei welchem der Transformanden auch die Expressionskassette des Expressionsvektors erfolgreich integriert wurde (Integrationsrate). Dies kann laut (Dörnte and Kües, 2016) zwischen 5 bis 60% liegen. Die Integrationsrate in dieser Arbeit betrug in der Regel zwischen 5 und 20% und liegt damit im unteren Bereich der für *C. cinerea* bekannten Effizienz. Dennoch konnten für alle Konstrukte mindestens ein positiver Transformand generiert werden, bei dem die Integration der Kasette mittels PCR nachgewiesen wurde.

Bei den Expressionsversuchen der WcOPsP mittels pYMS1, 2 und 3 wurden mittels Western Blot Analyse mehrere Banden detektiert (Abbildung 12). Dies können Abbauprodukte des rekombinanten Proteins aufgrund der heterologen Expression sein. Aber auch in dem Kulturüberstand von *W. cocos*, der Positivkontrolle, wurden mehrere Banden detektiert, was für eine unspezifische Bindung des Nachweisantikörpers spricht. Die WcOPsP konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Bei der Expression der WcOPsP mittels pYMS11c (Abbildung 15) konnte bei 2-3 Transformanden das rekombinante Produkt spezifisch per Western Blot mit nur einer Bande detektiert werden. Allerdings zeigte die rekombinante WcOPsP ein größeres Molekulargewicht von ca. 90 kDa, während die theoretisch berechnete Größe nur bei 57 kDa lag. Dies ist vermutlich auf Hyperglykosylierung aufgrund der heterologen Expression

zurückzuführen (Conde et al., 2004; Aza et al., 2021). Zudem konnte die Expression der WcOPsP nicht reproduziert werden, sodass eine Reinigung und Aktivitätsbestimmung nicht möglich waren. Hierbei ist es möglich, dass die Transformanden die Expressionskassette entfernten oder die rekombinante Expression regulierten, sodass die Transkriptionsrate verändert wurde. Wiebe (1999) fasst zusammen, dass filamentöse Pilze in der Lage sind rekombinante DNA aus dem Genom zu entfernen (Mainwaring et al., 1999; Wiebe et al., 2001), dass bei der Aufnahme mehrerer Kopien eines Gens, obgleich homolog oder heterolog, es zu *gene silencing* Ereignissen kommen kann, welche auf eine Vielzahl von Mechanismen zurückzuführen sind, die unter dem Begriff *homology-dependent gene silencing* bekannt sind (Faugeron, 2000). Weiterhin können bei der Unterdrückung rekombinanter Expression DNA Methylierung in vegetativen Hyphen zum Einsatz kommen (Selker, 1997). Methylierte rekombinante DNA konnte zum Beispiel in *A. niger* beobachtet werden (Swift et al., 2000). Es ist daher möglich, dass der pYSM11c Transformand die Expressionskassette der WcOPsP entfernt oder modifiziert hat, was die Expression beeinflusst hat und deshalb durch die Reproduktion der Western Blot Analyse kein rekombinantes Protein detektiert werden konnte.

Für die verschiedenen Expressionsversuche der RdoT3 wurden die Expressionskassetten unterschiedlich aufgebaut. Insgesamt wurde versucht die RdoT3 mit der nativen Pro-Sequenz, mit einem zusätzlichen Intron oder mit dem Lcc1 Signal-Peptid zu exprimieren, doch die rekombinante Expression der RdoT3 zeigte in keinem der Expressionsversuche ein rekombinantes Protein, dass sich per Western Blot und damit spezifisch im Kulturüberstand detektieren ließ. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die rekombinante Expression nicht wie im Falle der WcOPsP verlief. Die Kolonie-PCR zeigte, dass das *rdoT3*-Gen erfolgreich integriert wurde. Es ist möglich, dass das rekombinante Gen aber nicht transkribiert wurde, sondern aufgrund von *gene silencing* Mechanismen inaktiviert wurde (Selker, 1997; Faugeron, 2000). Ebenfalls ist es möglich, dass das rekombinante Protein zwar transkribiert und translatiert wurde, aber nicht sekretiert wurde und daher intrazellulär akkumulierte, sodass es nicht per Western Blot im Kulturüberstand detektierbar war. Die Western Blot Ergebnisse von pYMS11c zeigen aber, dass die Verwendung des nativen Signalpeptids der EAU91794 erfolgreich zur Sekretion der WcOPsP führte. Daher wurde zumindest bei der Verwendung des pYMS13c Expressionsvektors, der ebenfalls das native Signalpeptid der EAU91794 codiert, eine Sekretion der rekombinanten RdoT3 erwartet.

Weiterhin ist die Nukleotid-Sequenz der RdoT3 zur Expression in *E. coli* optimiert. Eine nicht optimale Nutzung von Codons kann zu zahlreichen Problemen bei der Expression führen durch Einfluss auf die Geschwindigkeit, Effizienz und Präzision der Translationelongation, auf die mRNA Halbwertszeit, aber auch auf die Transkription (Liu et al., 2021). Es ist daher möglich, dass die nicht für die Expression in *C. cinerea* optimierte Nukleotid-Sequenz der RdoT3 Ursache für die Expressionsprobleme ist und daher kein rekombinantes Protein in den Western Blot Analysen detektiert werden konnte.

Die homologe Expression einer nativen Serinpeptidase mittels pYMS15c und pYMS25 zeigte die stärksten Signale in der Western Blot Analyse und die größte Anzahl an positiven Transformanten (Abbildung 35). Dies deckt sich mit der Aussage von (Gouka et al., 1997), dass heterologe Expressionen in filamentösen Pilzen meistens eine geringere Effizienz im Vergleich zur homologen Expression aufweisen. Bei der Kultivierung von pYMS15c ohne und mit Milchpulver (Abbildung 30) ist erkennbar, dass zwei Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 33 und 34 kDa exprimiert wurden. Die rekombinante EAU91794 besitzt laut ExPasy Bioinformatics Resource Portal (https://web.expasy.org/compute_pi/) ein Molekulargewicht von ca. 40,9 kDa bei voller Aminosäuresequenz. Das Signalpeptid sitzt laut SignalP 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>) zwischen Position 20 und 21, sodass die rekombinante EAU91794 ohne Signalpeptid ein Molekulargewicht von 38,8 kDa besitzt. Die Prosequenz konnte nicht eindeutig mittels ProP-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?ProP-1.0>) bestimmt werden, da keine Arginin Lysin Schnittstelle vorhanden war. Die Sequenz mit dem höchsten Score (0,289) und damit dem wahrscheinlichsten Hydrolyseort war an Position 58 (QWIRKLR|LA), woraus sich ein Molekulargewicht von ca. 34,4 kDa für die rekombinante EAU91794 ergibt. Weiterhin gab es eine Sequenz (RPGVSRK|QW) an Position 51 (Score von 0.146), die bei Hydrolyse zu einem Molekulargewicht von ca. 35,5 kDa für die rekombinante EAU91794 führen würde. Sollten beide Positionen wirklich als Propetid Hydrolysestelle fungieren, ließen sich dadurch die beiden in Abbildung 30 beobachteten Proteinbanden der rekombinanten EAU91794 erklären. Eine Sequenzanalyse der beiden Banden könnte hierbei helfen. Der Vergleich der Proteinbanden von pYMS15c und pYMS25 (Abbildung 35) zeigte, dass durch die Verwendung des Lcc1-Signalpeptids in pYMS25 ebenfalls ein rekombinantes Protein exprimiert und sekretiert werden konnte. Weiterhin zeigte die Analyse der pYMS15c und pYMS25 Transformanten, dass die zusätzliche Kozak-Sequenz bei der Western Blot Analyse nicht zu

einer gesteigerten Translation der mRNA führte, da die Bandenintensität der Western Blot Analyse bei Einsatz der gleichen Menge an Protein bei beiden Transformationen augenscheinlich gleich groß war.

Es konnte zwar in manchen Expressionsversuchen eine rekombinante Peptidase mittels Western Blot nachgewiesen werden, allerdings konnte in keinem der Expressionsversuche eine eindeutige enzymatische Aktivität der rekombinanten Peptidasen zugeordnet werden. Die WcOPsP konnte lediglich bei Transformanden der pYMS11c Transformation spezifisch detektiert werden, die Kulturüberstände zeigten aber keine Peptidase Aktivität. Es wird vermutet, dass die Hydrolyse des Propeptids aufgrund der relativ nahen Verwandtschaft von *W. cocos* zu *C. cinerea* kein Problem darstellen sollte, sodass das rekombinante Enzym hätte aktiv sein sollen und nicht wie im Falle der RdoT3 eine vorherige Behandlung mit Faktor Xa oder einer anderen Peptidase nötig ist um das Enzym zu aktivieren. Da die RdoT3 nicht mittels Western Blot detektiert werden konnte, ist es auch nicht verwunderlich, dass keine Enzymaktivität nachgewiesen wurde. Auch wenn die homologe *C. cinerea* Serinpeptidase EAU91794 per Western Blot detektiert werden konnte, war diese nicht aktiv. Die fehlende Aktivität kann auf eine inkorrekte posttranslationale Modifikation der Serinpeptidase zurückzuführen sein oder auf den Einsatz von Substraten, die durch die Peptidase nicht hydrolysiert werden können. Auch die zusätzliche Kozak-Sequenz in pYMS25 führte anders als bei (Leonhardt et al., 2016) nicht zur Expression einer aktiven Peptidase. Bei der Kultivierung der pYMS15c Transformanden mit dem pCc1001 Transformand, hat allein der pCc1001 Transformand gezeigt, dass die Supplementierung des Minimal Mediums mit Magermilchpulver zu einer gesteigerten Enzymaktivität im Azocasein Assay führt, was dafürspricht, dass die Supplementierung zur gesteigerten Expression nativer Peptidasen und ihrer Ko-Faktoren führt. Die noch höhere Enzymaktivität der pYMS15c Transformanden im Vergleich zum pCc1001 Transformand im Azocasein Assay ist entweder auf die Enzymaktivität der rekombinanten Peptidase zurückzuführen oder stellt eine Art Reaktion auf den Versuch der Expression einer rekombinanten Peptidase dar. Da die Peptidaseaktivität der gereinigten rekombinanten EAU91794 im Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA Assay (Abbildung 32) nicht mit der Anwesenheit des Histidin-markierten Proteins in der Western Blot Analyse korrelierte, muss davon ausgegangen werden, dass die rekombinante EAU91794 nicht aktiv war bzw. ein unpassendes Substrat verwendet wurde. Weiterhin mussten in allen Fällen die Kulturüberstände erst 10x konzentriert werden, damit starke Signale des rekombinanten

Proteins in der Western Blot Analyse sichtbar wurden. Dies spricht für eine sehr niedrige Konzentration des rekombinanten Proteins im Kulturüberstand. Es ist daher möglich, dass native Peptidasen die rekombinanten Produkte abbauen, sowie dies in anderen filamentösen Pilzen wie *A. nidulans* ebenfalls der Fall ist (Yoon et al., 2009). Weiterhin konnte (Güttel, 2010) zeigen, dass *C. cinerea* einige Peptidasen exprimiert, die womöglich ebenfalls rekombinante Proteine abbauen. Obwohl das verwendete Minimal Medium im Falle der Kultivierung des pYMS15c Transformant 76 keine Peptide als Nahrungsquelle beinhaltet und einen relativ hohen Zuckergehalt besitzt, welcher die native Peptidase Expression inhibieren kann (Wang et al., 2005), zeigte die homologe Expression der EAU91794 in Minimal Medium potentielle Abbauprodukte.

Die Western Blot Analyse der WcOPsP mit einem gegen WcOPsP gerichteten polyklonalen Antikörper zeigte (Abbildung 12) eine sehr starke Hintergrundfärbung, die vermutlich auf die Unspezifität des polyklonalen Antikörpers zurückzuführen ist. Daher hat sich die Verwendung der sechsfachen Histidin-Markierung in den folgenden Versuchen bewährt, da durch diese Verwendung vor allem im Falle der EAU91794 saubere Signale in der Western Blot Analyse produziert werden konnten. Bei der Verwendung einer sechsfach Histidin-Markierung sollte zuvor allerdings geprüft werden, ob die Histidin-Markierung besser C- oder N-terminal angebracht werden sollte, um nicht das aktive Zentrum des Enzyms sterisch zu behindern. Dies wurde im Falle der Peptidasen WcOPsP, RdoT3, EAU91794 und Rdo_c6991 mit Hilfe von SWISS-Model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) überprüft und die Histidin-Markierung C-terminal angefügt, da diese Termini in allen Fällen peripher gelegen und damit zugänglich waren und damit ein Verlust der Markierung durch die Hydrolyse des Propeptids bei N-terminaler Anfügung ausgeschlossen werden konnte. Histidin Markierungen sind allgemein klein und es wurde angenommen, dass sie Struktur und Funktion des Proteins kaum beeinflussen (Gräslund et al., 2008). Es gibt aber Hinweise in der Literatur, dass sie Einfluss auf verschiedene Funktionen und Eigenschaften eines Proteins haben können. Bei der rekombinanten Expression einer L-Laktatdehydrogenase von *Bacillus stearothermophilus* zeigte das C-terminal markierte Enzym sowohl im Vergleich zum Wildtyp, als auch zur N-terminal markierten Variante eine geringere Aktivität (Halliwell et al., 2001). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Histidin-Markierung die Thermostabilität von zum Beispiel Cytochrom Oxygenase beeinflussen kann (Aslantas and Surmeli, 2019). Es gibt sogar Fälle, in denen eine C-terminale Histidin Markierung den N-Terminus und damit die Schnittstelle des

Signalpeptids beeinflussen (Ledent et al., 1997). Es zeigt sich also, dass die verwendete Histidin-Markierung durchaus einen negativen Einfluss auf die Expression eines rekombinanten Proteins haben kann, aber auch einen enormen Vorteil beim Nachweis und Reinigen des rekombinanten Proteins bietet, was sich in den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt. Ohne Histidin-Markierung wäre ein spezifischer Nachweis der rekombinanten Proteine nicht möglich gewesen. Ohne weitere Experimente kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Markierung Einfluss auf die Enzymaktivität genommen hat. Demzufolge ist es wichtig die richtige Markierung zu wählen, da alternative Markierungen Optimierungspotenzial besitzen (Terpe, 2003). Weiterhin gibt es die Möglichkeit mit speziellen Peptidasen Histidin-Markierungen zu hydrolysieren, was die Markierung entfernt und die nativen Eigenschaften des rekombinanten Proteins wiederherstellen kann (Pedersen et al., 1999).

4.2 Expression der Lcc8

In dieser Arbeit konnte unter Verwendung des Lcc1-Signalpeptids die Laccase Lcc8 erfolgreich exprimiert werden. Dass die Verwendung unterschiedlicher Signalpeptide die Expression stark beeinflussen kann, konnte unter anderem bereits für *B. subtilis* (Brockmeier et al., 2006), aber auch für nicht-lytische Insektenzellen, also höhere Eukaryoten, gezeigt werden (Olczak and Olczak, 2006). In diesem Falle scheint es sich bei der Lcc8 aber um eine intrazelluläre Laccase zu handeln, da keinerlei Peptide der Lcc8 in Kulturüberständen des Wildtyps *C. cinerea* gefunden wurden (Rühl et al., 2013; Hu et al., 2019). Damit kann auch erklärt werden, warum (Kilaru et al., 2006a) bei der Verwendung des nativen Signalpeptids keine sekretierte Laccase detektieren konnte, in dieser Arbeit aber mit dem Lcc1 Signalpeptid die rekombinanten Lcc8 exprimiert und sekretiert wurde.

Bei der Transformation von *C. cinerea* mit pYMS33 zeigte nur ein Transformand von ca. 80 (ca. 1,25%), eine Färbung bei der Kultivierung auf ABTS Minimalmedium Agar Platten und wurde positiv auf die Integration der Lcc8 Expressionskassette per PCR getestet. Im Gegensatz dazu zeigten die Transformationen von (Kilaru et al., 2006a) 10-50% positive Transformanden, die eine Färbung bei der Kultivierung auf ABTS Regenerationsmedium zeigten. Da die Konzentration der eingesetzten Vektoren eine wichtige Rolle spielt, ist es möglich, dass eine unzureichende Vektormenge eingesetzt wurde, welche sich negativ auf die Transformationseffizienz auswirkte (Dörnte and Kües, 2016). Weiterhin können positive

Transformanden beim ABTS Platten Assay übersehen worden sein, aufgrund ihrer schwachen Laccaseaktivität. Eine Aussage über die Expressionseffizienz des gesamten Systems ist schwerlich möglich, da bei nur einem positiven Transformanden nicht bekannt ist, ob dieser ein guter oder schlechter Performer ist. Es kann lediglich vermutet werden, dass es sich bei pYMS33-12 um einen schlechten Performer handelt. Er zeigte eine maximale Laccaseaktivität von ca. $0,25 \text{ U mL}^{-1}$. Als (Rühl, 2009) während seiner Dissertation mit demselben Expressionssystem Laccasen aus *C. cinerea* homolog exprimierte, reinigte und charakterisierte, zeigten seine Transformanden bei der Expression der Lcc6, Lcc7 und Lcc5 während der Kultivierung unter denselben Bedingungen wie in dieser Arbeit (mKjalke mit $0,1 \text{ mM CuSO}_4$) eine Laccaseaktivität von $5,1 \text{ U mL}^{-1}$, $2,0 \text{ U mL}^{-1}$ und $25,0 \text{ U mL}^{-1}$. Damit wiesen seine Transformanden eine 8 bis 100x höhere Laccaseaktivität im Kulturüberstand auf als der pYMS33 Transformand 12. Auch (Kilaru et al., 2006b; Rühl et al., 2013) konnte bei der Expression der Lcc1 mittels pYSK7 in *C. cinerea* Laccaseaktivitäten von bis zu ca. $2,8 \text{ U mL}^{-1}$ erreichen. Hier wurde YMG Medium mit $0,1 \text{ mM CuSO}_4$ verwendet. Er zeigte aber auch, dass es Transformanden gab, die nur eine Laccaseaktivität von $0,25 \text{ U mL}^{-1}$ im Kulturüberstand zeigten, was sich mit der Laccaseaktivität des pYMS33 Transformanden deckt. Da *C. cinerea* unter diesen Kultivierungsbedingungen keine nativen Laccasen exprimiert (Kilaru et al., 2006b; Rühl et al., 2013), konnte darüber sichergestellt werden, dass es sich bei der detektierten Laccaseaktivität bei der Kultivierung in dieser Arbeit um die rekombinante Laccase handeln musste. Dies wird durch die Abwesenheit von Laccaseaktivität bei der Kultivierung des pCc1001 Transformanden ebenfalls bestätigt. Während der Kultivierung kam CuSO_4 zum Einsatz, da dadurch die Laccaseaktivität gesteigert werden konnte (Kilaru et al., 2006b). Dies ist darauf zurück zu führen, dass Laccasen Multi-Kupfer Enzyme sind, welche vier Kupferatome pro aktivem Laccasemolekül benötigen (Messerschmidt, 1997). Die Kupfer Ionen stabilisieren hierbei das kupferhaltige katalytische Zentrum des Enzyms und tragen somit zur Laccaseaktivität bei (Solé et al., 2012). Die Kupfer Ionen können aber auch als Induktor für die Laccase Expression wirken. So konnte gezeigt werden, dass Kupfer Ionen mit dem Transkriptionsfaktor ACE1 in *Polyporus brumalis* (Nakade et al., 2013) oder CUF1 in *Cryptococcus neoformans* (Jiang et al., 2009) interagieren und dadurch die Laccase Expression steigern.

Die Proteinausbeute auf Basis der spezifischen Aktivität von $46,3 \text{ U mg}^{-1}$ und der Aktivität im Kulturüberstand von ca. 250 U L^{-1} beträgt ca. 5 mg L^{-1} . Bei der Expression der POXC und

POXA1b Laccase aus *Pleurotus ostreatus* durch die Hefe *Kluyveromyces lactis* konnte eine ähnliche Laccase Ausbeute von 2 mg L⁻¹ erzielt werden (Piscitelli et al., 2005), sowie bei der Expression einer *Ganoderma lucidum* Laccase in *P. pastoris* eine ähnliche Ausbeute von 6 mg L⁻¹ erzielt werden konnte (You et al., 2014). Bei der rekombinanten Expression der Lcc2 aus *C. cinerea* in *P. pastoris* konnte eine spezifische Aktivität von 27,2 U mg⁻¹ und eine Aktivität im Kulturüberstand von 43,2 U L⁻¹ erzielt werden (Tian et al., 2014). Weiterhin kann auch eine Ko-Kultivierung von *C. cinerea* mit *Gongronella sp. w5* genutzt werden um die native Expression der Lcc9 zu steigern und um so eine Ausbeute von 15,8 U L⁻¹ und 92,9 U mg⁻¹ zu erzielen (Pan et al., 2014). Allerdings liegt die Ausbeute der Lcc8 weit unter dem was in industriell genutzten filamentösen Pilzen als Expressionsorganismen möglich ist (bis zu 1 g L⁻¹) (Mate and Alcalde, 2015). Obwohl die Ausbeute vergleichsweise gering war, reichte die Menge an Lcc8 für eine biochemische Charakterisierung (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammenfassung der Lcc8 Charakteristika und Vergleich mit anderen nativen und rekombinanten *C. cinerea* Laccasen.

| Enzym Eigenschaften | Substrate | Lcc1 (Schneider et al., 1999) | Lcc2 (Tian et al., 2014) | Lcc6 (Wang et al., 2014) | Lcc9 (Pan et al., 2014) | Lcc8 diese Arbeit |
|---|------------------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Molekular Gewicht [kDa] | | 66,0 | 54,0 | 57,4 | n. d. | 64 und 77 |
| Optimaler pH | ABTS | 4,0 | 2,6 | 3,0 | 2,5 | 4,0 |
| | DMP | n. d. | n. d. | n. d. | 6,5 | 5,0 |
| | Guajacol | n. d. | n. d. | n. d. | 6,5 | 4,5 |
| | SGZ | 6,5 | n. d. | n. d. | 6,5 | 5,0 |
| Thermisch e Stabilität (50 °C) | | >200 min | ca.50 min | >60 min | n. d. | 300 min |
| Optimale Temperatur | | 60 – 70 °C | 45 °C | 40 °C | 60 °C | 54 – 63 °C |

| | | | | | | |
|--------------------------------------|------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------|
| pH Stabilität (≥ 50%) | | 7,0 – 10,0 | 2,0 – 11,0 | 2,5 – 6,0 | 4,5 – 6,5 | 5,0 – 11,0 |
| | | 4 °C, 14 d | 4 °C, 24 h | 4 °C, 24 h | 37 °C, 8 h | 24 °C, 24 h |
| pI Wert | | 3,5 | n. d. | n. d. | n. d. | 3,3/3,4 |
| Für Kinetik verwendete Puffer | | 100 mM Natriumphosphat pH 8 | Mcllvaine Puffer pH 2,6 | Mcllvaine Puffer pH 3,0 | 100 mM Citrat Puffer pH 4,0 | Universal Puffer pH 4,0 |
| <i>K_m</i> | ABTS | 280 µM | 930 µM | 149 µM | 10,9 µM | 792 µM |
| <i>K_{cat}</i> | ABTS | 60 min ⁻¹ | 50.807 min ⁻¹ | 1.922 min ⁻¹ | 12.919 min ⁻¹ | 17.290 min ⁻¹ |
| | | n. d. | Mcllvaine Puffer pH 2,6 | Mcllvaine Puffer pH 3,0 | 100 mM Citrate Puffer pH 4,0 | Universal Puffer pH 5,0 |
| <i>K_m</i> | DMP | n. d. | 1.020 µM | 1.520 µM | 218 µM | 88 µM |
| <i>K_{cat}</i> | DMP | n. d. | 4.380 min ⁻¹ | 138 min ⁻¹ | 2.426 min ⁻¹ | 1.722 min ⁻¹ |

Die SDS-PAGE Analyse der Lcc8 zeigte zwei Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 64 und 77 kDa, was größer ist als das anhand der Aminosäuresequenz theoretisch berechnete Molekulargewicht von ca. 59,7 kDa. Andere Laccasen aus *C. cinerea* zeigten ein nur leicht kleineres Molekulargewicht von ca. 54-66 kDa (Schneider et al., 1999; Tian et al., 2014; Wang et al., 2014). Die beiden Banden sind in der SDS-PAGE Analyse nach der Reinigung gut zu erkennen. Auch im Laccase-Zymogram sind nach der Reinigung zwei Banden zu erkennen. Aber auch vor der Reinigung zeigt der Kulturüberstand im Laccase-Zymogram zwei Banden, sodass ausgeschlossen werden kann, dass durch die Reinigung der Laccase es zu einer Denaturierung oder Hydrolyse der rekombinanten Lcc8 gekommen ist. Beide Banden wurden

als Lcc8 mittels LC-MS identifiziert. Eine Hyperglykosylierung einer einzigen Lcc8 Variante kann als Begründung der zwei Laccase Banden ausgeschlossen werden, da die Deglykosylierung der beiden Banden nicht in einer einzelnen Bande resultierte, sondern in ca. 8 Banden, welche vermutlich von einer nicht vollständigen Deglykosylierung oder Degradation der Lcc8 durch die Behandlung oder Verunreinigung des Ansatzes durch Peptidasen stammen. In anderen Arbeiten, in denen ebenfalls rekombinante Laccasen exprimiert wurden, konnte aber ein solcher Effekt der Hyperglykosylierung beobachtet werden (Otterbein et al., 2000; Sigoillot et al., 2004; Madzak et al., 2005). Es ist daher möglich, dass durch eine alternative Prozessierung der mRNA zwei Lcc8 Varianten translatiert werden und durch Glykosylierung die beiden Banden mit einem Molekulargewicht von 64 und 77 kDa entstehen. Die Sequenzierungsergebnisse im Anhang 22 sprechen für eine alternative Prozessierung, da die obere Bande die Lcc8 Sequenz nur zu 38% abdeckt, während die untere Bande die Lcc8 Sequenz zu 63% abdeckt. Der Glykosylierungsanteil pilzlicher Laccasen liegt zwischen 10-50% in Abhängigkeit des Expressionsorganismus (Kunamneni et al., 2008), was sich mit dem in dieser Arbeit ermittelten Glykosylierungsgrad für die rekombinante Lcc8 deckt.

Wie die Tabelle 5 zeigt, weist die Lcc8 viele Charakteristika auf, die vergleichbar sind mit denen anderer Laccasen aus *C. cinerea* (Schneider et al., 1999; Pan et al., 2014; Tian et al., 2014; Wang et al., 2014). Der optimale pH-Wert zur Oxidation von ABTS der Lcc8 entspricht mit pH 4 dem Optimum der Lcc1 (Schneider et al., 1999). Die anderen Laccasen Lcc2, Lcc6 und Lcc9 zeigen ein noch niedrigeres pH-Optimum. Für die Oxidation der phenolischen Substrate DMP, Guajacol und SGZ zeigt die Lcc8 einen niedrigeres pH-Optimum als die Lcc1 und Lcc9 (Schneider et al., 1999; Pan et al., 2014). Der optimale pH-Bereich der Lcc8 (pH 5-11) ist ein wenig kleiner als der der Lcc2 (pH 2-11) (Tian et al., 2014), aber größer als der der Lcc6 (pH 3-6) (Wang et al., 2014). Die Stabilität der Lcc8 wurde nach 24 h bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C getestet, während sie bei der Lcc2 nach 24 h bei 4 °C getestet wurde. Es lässt sich daher vermuten, dass die Lcc8 stabiler ist als die Lcc2. Sogar nach 48 h bei 24 °C zeigte die Lcc8 noch immer mehr als 50% Aktivität im pH Bereich von pH 6-11. Die optimale Temperatur der Lcc8 ist vergleichbar mit der von Lcc1 und Lcc9 (Schneider et al., 1999; Pan et al., 2014), welche bei der Oxidation von ABTS zwischen 60-70 °C liegt. Die Lcc2 ist in einem großen Temperaturbereich aktiv mit einem Optimum bei 45 °C (Tian et al., 2014), während die Lcc6 ein Optimum bei 40 °C zeigte (Wang et al., 2014). Die thermische Stabilität der Lcc8 war hierbei die bemerkenswerteste Eigenschaft und unterschied sich von den meisten anderen

128

Laccasen. Während die Aktivität der Lcc2 nach 60 min bei 50 °C weniger als 50% betrug (Tian et al., 2014), zeigte die Lcc8 erst nach 300 min eine Restaktivität von 50%. Die Lcc6 (Wang et al., 2014) wurde zwar nur für 60 min bei 50 °C inkubiert, zeigte in dieser Zeit aber einen ähnlich starken Abfall der Laccaseaktivität wie die Lcc8 nach 300 min bei 50 °C.

4.3 Beurteilung pYSK7 basiertes Expressionssystem in *C. cinerea*

Bisher konnten mit Hilfe des pYSK7 basierten Systems mehrere homologe Laccasen und eine heterologe Aryl Alkohol Oxidase exprimiert werden (Kües et al., 2001; Kilaru et al., 2006a; Kilaru et al., 2006b; Galperin et al., 2016). Es konnte keine Literatur zur Expression von Peptidasen mittels des pYSK7 basierten Expressionssystems oder generell zur rekombinanten Expression von Peptidasen in *C. cinerea* gefunden werden. Es wurden aber noch andere Enzyme wie eine Mangan-Peroxidase aus *Irpex consors* und eine „dye decolorizing peroxidase“ (DyP) aus *Pleurotus sapidus* erfolglos versucht mit dem pYSK7 basierten System zu exprimieren (Daten nicht gezeigt/veröffentlicht). Dies und die Tatsache, dass (Kilaru et al., 2006a) mit demselben Expressionssystem nicht alle Laccase (1-17) Gene homolog exprimieren konnte deutet darauf hin, dass das pYSK7 basierte Expressionssystem nicht in der Lage ist alle, sondern nur bestimmte Gene von Interesse rekombinant zu exprimieren.

Darüber hinaus konnte (Kilaru et al., 2006a) zeigen, dass eine Vielzahl an Transformanden analysiert werden müssen, um einen guten Performer zu erhalten, da pYSK7 zufällig in das Genom integriert. In *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass bei einer chromosomalen Integration die Expressionsrate nicht immer gut mit der Anzahl aufgenommener Kopien korreliert (Cullen et al., 1987). Das hängt vermutlich damit zusammen, dass die Expressionsrate eines Gens in Abhängigkeit zu dessen Integrationsposition steht (Verdoes et al., 1995; Chiou et al., 2002; Dörnte and Kües, 2016). Hierbei können sich nahegelegene regulatorisch aktive Bereiche im Genom auf die Expression der integrierten Expressionskassette negativ auswirken. Die Verwendung eines Crisp/CAS9 System zur Zielgerichteten Integration der Expressionskassette an einem bestimmten Lokus könnte hierbei zu beständigen Expressionsraten führen (Sugano et al., 2017). Weiterhin wäre dadurch eine bessere Vergleichbarkeit von Modifikationen am Expressionssystem gegeben.

Um weitere Gründe für die Ineffektivität des pYSK7 basierten Expressionssystem in *C. cinerea* bei der Expression von Peptidasen ausmachen zu können, müssen erst die Regulationsmechanismen zur Expression von rekombinanten Enzymen in *C. cinerea* weiter untersucht werden. Das *gene engineering* bietet darüber hinaus zahlreiche Ansätze zur Steigerung einer rekombinanten Expression.

4.4 *Gene engineering* in filamentösen Pilzen

C. cinerea ist als Expressionsorganismus noch nicht so gut etabliert wie es manch ein anderer Mikroorganismus ist. Demzufolge lässt sich relativ wenig Literatur zu diesem Expressionsorganismus und den verwendeten Expressionsvektoren finden (Kikuchi et al., 1999; Kilaru et al., 2006b; Cheng et al., 2009; Han et al., 2010; Galperin et al., 2016). Allerdings wurden diverse *Aspergillus* Stämme schon sehr lange als Expressionsorganismen verwendet. Sie sind als filamentöse Pilze relativ nah mit *C. cinerea* verwandt, sodass sich die genetischen Modifikationen der *Aspergillus* Stämme zur Steigerung der rekombinanten Expression auf *C. cinerea* übertragen lassen könnten. Hierzu wurden in der Regel gezielte Modifikation bestimmter Regulationsmechanismen oder genetischer Elemente zur Verbesserung des Expressionssystems vorgenommen.

Die Regulation der Proteinexpression in *Aspergillus* scheint hauptsächlich auf der Ebene der Transkription statt zu finden (Verdoes et al., 1993) und kann hierbei sehr komplexe Regulationsmechanismen annehmen (S. and T., 2001). Zum Beispiel beinhalten eukaryotische Promotoren häufig eine CCAAT-Box, zur Bindung eines Multi-Protein-Komplexes, welcher wiederum die Aktivierung der Expression eines Gens beeinflussen kann. Dies wurde für *A. nidulans* gezeigt (Brakhage et al., 1999). Hier wird die Expression unter anderem einer Glutamat Dehydrogenase, einer Formamidase oder einer Acetamidase durch die Bindung des Multi-Protein-Komplexes, bestehend aus HAP-B, -C und -E positiv reguliert. Die Proteine HAP-B, -C und -E stellen hierbei Proteinuntereinheiten eines DNA bindenden Komplexes dar, der an das regulatorisch aktive CCAAT Motiv bindet und die Genexpression aktiviert. Der in dieser Arbeit verwendete *gpdII*-Promotor in pYSK7 weist diese CCAAT-Box ebenfalls auf. Durch die Überexpression des Multi-Protein-Komplexes, könnte so versucht werden, die Expression des rekombinanten Gens zu erhöhen.

Gemäß dem Aufbau eines eukaryotischen Gens (Abbildung 2), kann die 5'-UTR eines Gens einen regulatorischen Effekt haben. Hierbei können „*open reading frames*“ (ORF) in der 5'-UTR kleine Proteine kodieren, die eine regulatorische Wirkung auf die Rekrutierung des Ribosoms zur Translation haben (Vilela and McCarthy, 2003). (Kubodera et al., 2003) deutete darauf hin, dass *A. oryzae* einen solchen Genregulationsmechanismus verwendet, welcher sich „*riboswitch*“ nennt. Weiterhin wurden verschiedene 5'-UTR verwendet und die Expression einer β -Glucuronidase in *A. oryzae* (Koda et al., 2004; Koda et al., 2006) analysiert. Es zeigte sich, dass die unterschiedlichen 5'UTR einen unterschiedlich starken Einfluss auf die β -Glucuronidase Expression hatten. Hierbei konnte eine 5'UTR die Expression der β -Glucuronidase um den Faktor 7 steigern. Es kann daher hilfreich sein unterschiedliche 5'UTR auch in *C. cinerea* zu nutzen um die Expression eines rekombinanten Proteins zu steigern.

Eine andere Möglichkeit zur Verbesserung eines Expressionssystems ist die Verwendung neuer Promotoren. So konnten durch den Einsatz des *exlA*-Promotors anstatt des *glaA*-Promotors in *A. awamori* drei Mal höhere β -Glucuronidase Aktivität erzielt werden (Gouka et al., 1996). Das *lcc1*-Gen wurde bereits in *C. cinerea* unter der Kontrolle des *gpdII*-, *priA*-, *tub1*- und *lcc1*-Promotors exprimiert (Kilaru et al., 2006b), wobei sich zeigte, dass die Nutzung des *gpdII*-Promotors am effektivsten war. Ebenfalls in *C. cinerea* konnte gezeigt werden, dass der *CcDED1*-Promotor siebenmal höhere Aktivität in einem Enzymassay zeigte, als der konventionell eingesetzte *gpdII*-Promotor (Sugano et al., 2017). Dies zeigt, dass das Potential bei der Wahl des Promotors zur rekombinanten Expression in *C. cinerea* noch nicht ausgeschöpft ist. Weiterhin können Promotoren so konstruiert werden, dass diese mit weiteren Aktivator-Bindedomänen ausgestattet sind und damit die Expressionsrate verbessert wird (Minetoki et al., 1998; Liu et al., 2003). Ebenso können Repressor-Bindedomänen im Promotor identifiziert (Kulmburg et al., 1993) werden und diese Domänen so verändert werden, dass das Gen nicht mehr reprimiert wird (Hintz and Lagosky, 1993). Der *gpdII*-Promotor aus pYSK7 weist zwar keine CREA Repressor-Binde-Domäne (5'-GCGGGGC-3') auf, es konnte allerdings eine 5'-GGGG-3' Sequenz im *gpdII*-Promotor identifiziert werden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass der Promotor eine Repressor-Binde-Domäne enthält und dass durch dessen Mutation, um die Bindung des Repressors zu verhindern, sich die rekombinante Expression steigern lässt. Weiterhin konnte in *C. cinerea* gezeigt werden, dass der Einsatz von Homologen Haarnadel RNAs zur gezielten Inhibierung der Expression bestimmter Gene eingesetzt werden kann (Wälti et al., 2006; Costa et al., 2008). Mit Hilfe

moderner Methoden können *in silico* eigene „*riboswitches*“ erstellt werden (Avihoo et al., 2007). Hiermit könnten sich induzierbaren Promotoren etablieren lassen, welche auf kostengünstige Signale reagieren, wie zum Beispiel Temperatur. Da *A. oryzae* als filamentöser Pilz diesen Regulationsmechanismus zu nutzen scheint, liegt die Vermutung nahe, dass auch *C. cinerea* diesen Mechanismus nutzen kann und daher die Verwendung von „*riboswitches*“ ein weiteres Werkzeug für die rekombinante Genexpression darstellt.

Um ungewünschte Peptidaseaktivität am falschen Ort zu vermeiden, sind die meisten Peptidasen mit einer Prosequenz ausgestattet, die die Bindung von Substrat am aktiven Zentrum durch eine sterische Blockade verhindert. Darüber hinaus kann die Prosequenz eine wichtige Rolle bei der Faltung, Stabilität und Sortierung des Vorläuferenzym spielen (Khan and James, 1998). Sowie bereits erwähnt wurde, dass der Austausch des Signalpeptids zu besseren Expressionsraten führen kann, so kann auch die Modifikation der Pro-Sequenz speziell bei Serinpeptidasen eine positive Auswirkung haben. Es wird angenommen, dass durch gezielte Mutationen der Pro-Sequenz von Subtilisin Eigenschaften wie Substratspezifität, katalytische Aktivität und Stabilität der Peptidase beeinflusst werden können (Takagi and Takahashi, 2003), was eine neue Art des Pro-Sequenz Engineering darstellt. Die Annahme beruht hierbei auf Ergebnisse, die zeigen, dass eine Punktmutation der Aminosäure Ile (-48) zu Val in der Pro-Sequenz von Subtilisin E das Faltungsverhalten der Pro-Sequenz verändert hat. Dadurch wurde die Sekundärstruktur von Subtilisin E verändert, was die Thermostabilität und Substratspezifität beeinflusst hat (Shinde et al., 1997).

Es ist ebenfalls möglich zusätzliche genetische Elemente zum rekombinanten Gen hinzuzufügen um die Sekretion und damit die Effizienz zu erhöhen. Durch die Fusion mit Trägerproteinen konnte die Expression einer Chymosin Peptidase in *A. nidulans* gesteigert werden (Cullen et al., 1987; Ward et al., 1990). Ebenso konnte für *P. pastoris* gezeigt werden, dass die Fusion mit unterschiedlichen Trägerproteinen wie einer Zellulose Bindedomäne, einer Maltose Bindedomäne, einer *small ubiquitin-related modifier* Domäne und einer Phospholipase A₂ Domäne zu einer gesteigerten Aktivität einer Prolylendopeptidase führte (Jiang et al., 2016), was damit einen weitere Ansatz zur Expressionsoptimierung bei *C. cinerea* darstellt.

Obwohl Gencluster eher aus Prokaryoten bekannt sind, gibt es solche Cluster auch in filamentösen Pilzen (Keller and Hohn, 1997). Diese Gencluster und die damit verbundene

simultane Expression mehrerer Gene, die zu einem aktiven Produkt führen, können bei einer rekombinanten Expression eines einzelnen Gens aus dem Cluster zu Problemen führen, da nicht alle notwendigen Gene gleichzeitig exprimiert werden. Im Falle der Serinpeptidase EAU91794 (Name:CC1G_04562T0, Protein ID:3959, Location:Chr_3:1156204-1158236) befindet sich in 3'-Richtung ein Gen, was ein mitochondriales FAD Trägerprotein (Name:CC1G_04563T0, Protein ID:3960, Location:Chr_3:1160783-1162048) codiert und am Metabolismus beteiligt ist. Das nächste Gen in dieser Richtung codiert eine SNF2 Familie angehörige DNA-abhängige ATPase (Name:CC1G_04564T0, Protein ID:3961, Location:Chr_3:1163496-1167420). Dieses Protein besitzt eine DNA Binde-Domäne und eine Domäne mit Helikase Aktivität. Helikasen lösen die Basenpaarung zweier DNA oder RNA Stränge unter zumeist ATP-Verbrauch, sodass ihre Anwesenheit die Transkriptionsaktivität beeinflussen kann. In 5'Richtung der EAU91794 befindet sich ein U2 snRNP Splicing Faktor (Name:CC1G_04561T0, Protein ID:3958, Location:Chr_3:1154751-1155747), der an der RNA Prozessierung und Modifikation beteiligt ist. Weiter befindet sich dort eine Glykosyltransferase (Name:CC1G_04560T0, Protein ID:3957, Location:Chr_3:1153835-1154657). Die DNA abhängige ATPase, U2 snRNP Splicing Faktor und die Glykosyltransferase könnten eine wichtige Rolle bei der Expression der EAU91794 spielen, sodass eine Koexpression die rekombinante Expression unterstützen kann. Für die Expression aktiver Enzyme ist es bei den meisten Enzymen wichtig, dass das Signalpeptid durch eine Signal- oder „leader“ Peptidase hydrolysiert wird, sowie es auch bei der Expression der RdoT3 der Fall war (Mika, 2015). Diese Autoaktivierung kann aber auch durch eine extrazelluläre RNA als Cofaktor eingeleitet werden (Nakazawa et al., 2005). Signal- oder „leader“ Peptidasen hydrolysieren ihre Signal- oder „leader“ Peptide meistens autokatalytisch (Tuteja, 2005). Auch Faltungshelfer spielen hierbei eine wichtige Rolle um aktive Enzyme zu exprimieren. Bei der heterologen Expression einer Manganperoxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* in *A. niger* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des Chaperons Calnexin zu einem 4 bis 5 mal höheren Level an Manganperoxidase im Kulturüberstand führte (Conesa et al., 2002). Die Analyse von Genclustern kann also bei der Identifizierung neuer interessanter Gene und Kofaktoren helfen (Lubertozzi and Keasling, 2009), die wiederum die rekombinante Expression eines Gens aus einem Cluster unterstützen können. Aufgrund von Problemen wie Sauerstoffstress können bei der Faltung und Sekretion von Proteinen Fehler auftreten. Dadurch kann es zur Ansammlung von nicht korrekt gefalteten Proteinen im

Endoplasmatischen Retikulum (ER) kommen. Diese Ansammlung führt zur Expression von Faltungshelfern (Chaperone), welche im ER die Ansammlung von falsch gefalteten Proteinen beheben sollten. Dieser Mechanismus wird als „*unfolded proteine response*“ (UPR) bezeichnet. Durch eine konstitutive Induktion der UPR konnten in *A. niger* höhere Expressionsraten für eine Laccase und eine Chymosin-Peptidase erzielt werden (Valkonen et al., 2003).

Wie bereits erwähnt sind Peptidasen an biologischen Prozessen sowohl intrazellulär als auch extrazellulär beteiligt. So kann es bei der rekombinanten Expression von Proteinen dazu kommen, dass native Peptidasen exprimiert werden, welche das rekombinante Produkt hydrolysieren. Durch die richtige Wahl der Kultivierungsbedingungen, wie z.B. das verwendete Medium, der pH Bereich und die Temperatur, kann die Expression nativer Peptidasen reduziert werden. Es konnten weiterhin aber auch rekombinante Expressionsstämme hergestellt werden, in denen eine oder mehrere native Peptidasen deletiert wurden (Gouka et al., 1997). Bei der Hydrolyse rekombinanter und sekretierter Proteine sind vor allem extrazelluläre Peptidasen beteiligt. Daher ist die Identifizierung von Regulationsmechanismen zur Expression von extrazelluläre Peptidasen besonders vielversprechend (Katz et al., 2000). Da es noch keine Peptidasen defizienten Stämme von *C. cinerea* gibt, stellt dies einen weiteren Ansatz zur Verbesserung der rekombinanten Expression in *C. cinerea* dar. Alternativ kann auch versucht werden, die Expression nativer Peptidasen durch die rekombinante Expression von *antisense* RNA zu regulieren (Zheng et al., 1998).

Die Glykosylierung ist eine Art der Post-translationalen Modifikation. Hierbei wird die N-Glykosylierung, bei der Kohlenhydrate an ein Asparagin Rest angefügt wird (Bause, 1983), von der O-Glykosylierung, bei der Glykan an ein Hydroxylysin, Hydroxyprolin, Serin, oder Threonin angefügt wird (Carraway and Hull, 1989) unterschieden. Die Glykosylierung kann eine entscheidende Rolle bei der Sekretion, Stabilität, aber auch Aktivität eines Enzyms spielen (Deshpande et al., 2008). Bei der rekombinanten Expression heterologer Enzyme kann es zu Problemen bei der Glykosylierung kommen, was zu einer Inaktivität oder fehlenden Sekretion des Enzyms führt. Durch *protein engineering* wurde einer Chymosin Peptidase eine zusätzliche N-Glykosylierungsstelle hinzugefügt (van den Brink et al., 2006). Dies führte zu einer effizienteren Expression der Peptidase und besseren Aktivität in *A. niger*. Diese Art des

proteine engineering kann sicherlich auf andere filamentöse Pilze wie *C. cinerea* übertragen werden.

Neben der gezielten Modifizierung spezifischer genetischer Elemente kann auch eine zufällige Modifikation durch Mutagenese zu einer gesteigerten Expressionsrate eines rekombinanten Proteins führen. Zur Verbesserung industrieller Expressionsstämme werden schon lange Mutagenese und Selektion eingesetzt, um so die Expressionseffizienz zu steigern (Rowlands, 1984). Durch die Mutagenese mit Nitrosoguanidin und einem von einem Roboter unterstützten Screening System konnten bereits einige Mutationen etabliert und identifiziert werden, welche sich positiv auf die Expression von Rinder Chymosin in *A. niger* auswirkten (Dunn-Coleman et al., 1991). Hierbei handelte es sich hauptsächlich um Mutationen, die die Sekretion von fremden Proteinen betreffen. Es kann versucht werden diese Mutationen gezielt in *C. cinerea* zu induzieren oder mittels zufälliger Mutagenese weitere Mutationen in *C. cinerea* zu induzieren.

4.5 Expression einer Insektenpeptidase in *Pichia pastoris* GS115

In *P. pastoris* wurden bereits einige Peptidasen unterschiedlicher Herkunft erfolgreich exprimiert (Despreaux and Manning, 1993; Beauvais et al., 1997; Reverter et al., 1998; Ventura et al., 1999). Hierbei zeigte sich die Verwendung des Expressionsvektors pPIC9K als sehr zuverlässig (Yang et al., 2016; Zhao et al., 2017). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Fusion der Peptidase von Interesse mit zusätzlichen Sekretionsdomänen die Expressionseffizienz steigerten (Jiang et al., 2016), aber auch das in bestimmten Fällen eine zusätzliche Kozak-Sequenz essentiell für die Expression einer Peptidase ist (Leonhardt et al., 2016). Trotz der Nutzung des GS115 Stammes, des pPIC9K Expressionsvektors und einer zusätzlichen Kozak-Sequenz konnte in dieser Arbeit nur sehr wenig aktive Peptidase exprimiert und gereinigt werden. Die Aktivität betrug hierbei lediglich $0,15 \text{ U L}^{-1}$ nach der Histidin-spezifischen Reinigung. Andere Peptidasen, die mittels *P. pastoris* exprimiert wurden, erreichten Aktivitäten von 300 U L^{-1} (Jiang et al., 2016), 132 U mL^{-1} (Zhao et al., 2017) oder 228 U mL^{-1} (Zhang et al., 2018) im Kulturüberstand. In einem anderen Beispiel wurde eine Cysteinpeptidase aus *Sphenophorus levis*, die zum Clan CA und der Familie C1A, zu der auch Papain gehört, erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert (Fonseca et al., 2012). Die Ausbeute betrug 260 mg L^{-1} Kultur. Hierbei wurden aber der *P. pastoris* Stamm KM71H und der

Expressionsvektor pPICZ α -C verwendet, sodass dieser Stamm und dieser Expressionsvektor eine Alternative zum verwendeten Stamm GS115 und Vektor pPIC9K darstellt. Weiterhin lässt sich zeigen, dass bereits Peptidasen derselben Familie in *P. pastoris* exprimiert werden konnten. Anhand der Aminosäuresequenz der Rdo_c6991 kategorisiert MEROPS diese Peptidase als Mitglied der S28 Familie. Die von (Jiang et al., 2016) verwendete Peptidase ist ebenfalls ein Mitglied der S28 Familie. Allerdings stammt die von (Jiang et al., 2016) verwendete Peptidase aus *A. oryzae*. Die geringe Ausbeute bei der Expression der Rdo_c6991 kann verschiedenen Ursachen haben.

Wie bereits bei diversen *Aspergillus* Stämmen angesprochen, können nativ exprimierte Peptidasen das rekombinante Produkt sowohl intra- als auch extrazellulär hydrolysieren. Durch die Veröffentlichung von Genomdaten und Genannotierungen wird es möglich Protease-defiziente Expressionsstämme zu entwickeln (Schutter et al., 2009), die eine bessere Produktion eines rekombinanten Produkts erlauben können. Da das Genom von *C. cinerea* bekannt ist, könnte auch hier versucht werden Protease defiziente Expressionsstämme zu entwickeln. Ebenso ist es denkbar, dass eine unzureichende UPR zur intrazellulären Akkumulation des rekombinanten Produkts führte. Da keine Western Blot Analyse der intrazellulären Proteine durchgeführt wurde, kann nicht gesagt werden, ob es zu einer Akkumulation rekombinanten Proteins in der Zelle gekommen ist.

Da es sich bei der Integration der Expressionskassette von pPIC9K um eine homologe Rekombination handelt, wird die Expressionskassette an einem bestimmten Locus im Genom von *P. pastoris* integriert. Daher sind Expressionsunterschiede aufgrund unterschiedlicher Integrationsloki auszuschließen. Allerdings kann es zu mehrfach Integration an diesem Locus kommen. Der Hersteller Invitrogen verweist darauf, dass es nötig sein kann 100 bis 1000 Transformanten mit Genitocin zu screenen um Transformanten zu erhalten, welche 7-12 Kopien der Expressionskassette aufgenommen haben und damit potentiell am meisten rekombinantes Produkt herstellen sollten. Bei der Durchführung der Transformation von GS115 mit dem Expressionsvektor pPIC9K-KPep in dieser Arbeit wurden aber nur 14 Transformanten produziert, von denen nur 5 Transformanten kultiviert und analysiert wurden. Es ist also auch nicht auszuschließen, dass eine Intensivierung der Transformationsbemühungen und Screening nach positiven Transformanten zu einem Transformanten führen, welcher größere Mengen der Peptidase exprimiert. Nur durch eine

erneute Produktion einer ausreichenden Menge der rekombinanten Peptidase kann durch Sequenzierung der gereinigten Peptidase analysiert werden, ob es sich dabei wirklich um die rekombinante Insektenpeptidase handelt und eine biochemische Charakterisierung durchgeführt werden. Die erwartete Größe für das K-Pep Produkt beträgt 55 kDa und für das Pla-Pep Produkt 69 kDa. Der spezifische Nachweis der rekombinanten Histidin-Markierung bei der Western Blot Analyse spricht dafür, dass es sich um das rekombinante Protein handelt, aber das Molekulargewicht der Proteinbanden ist mit 70 und 100 kDa größer als erwartet. Eine Deglykosylierung kann zeigen, ob der Unterschied im Molekulargewicht von der Glykosylierung herrührt.

4.6 Fazit

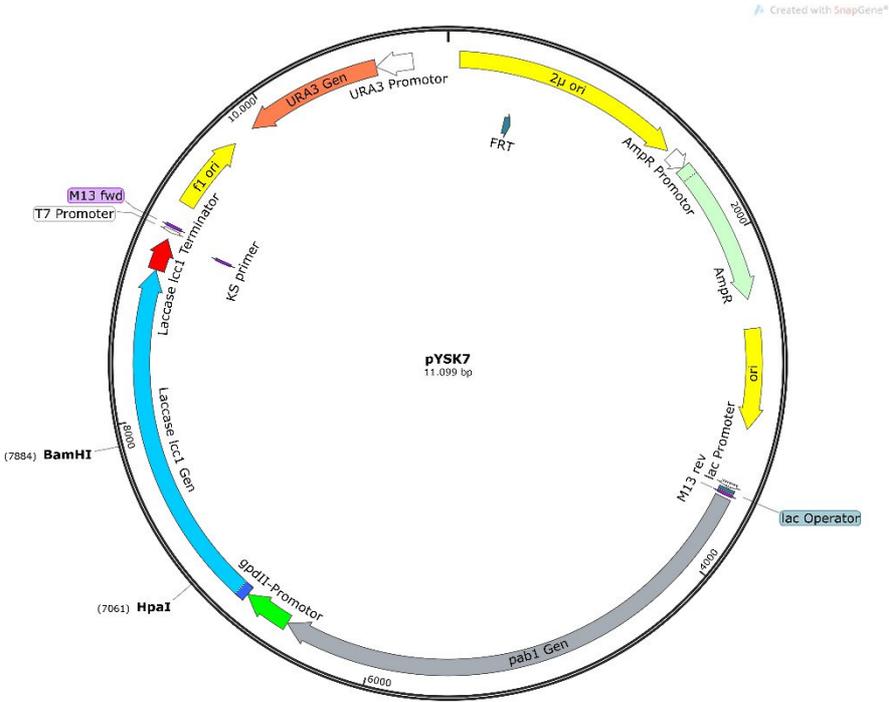
In dieser Arbeit wurde versucht hauptsächlich Peptidasen mit Hilfe des pYSK7 basierten Expressionssystem in *C. cinerea* FA2222 zu exprimieren. Durch die erfolgreiche Etablierung einer Histidin-Markierung in *C. cinerea* konnten einige rekombinante Produkte mittels Western Blot Analyse detektiert werden. Dies ist vor allem hinsichtlich des spezifischen Nachweises der rekombinanten Produkte und der Möglichkeit mittels Affinitätschromatographie die rekombinanten Proteine zu reinigen überaus hilfreich. Weiterhin gelang es erstmals durch Signalpeptidaustausch erfolgreich eine homologe Laccase zu exprimieren und dadurch zu charakterisieren. Weitere Laccasen aus *C. cinerea*, die derzeit noch nicht charakterisiert sind, können nun mit dieser Vorgehensweise produziert werden. Die Produktion einer aktiven Peptidase zeigte sich aber über die gesamte Zeit der Dissertation als überaus schwierig. Dies wurde auch dadurch deutlich, dass die Projektpartner ebenfalls die angedachten Peptidasen nicht rekombinant darstellen konnten. Lediglich eine Insektenpeptidase konnte mittels *P. pastoris* GS115 exprimiert werden. Diese zeigte eine geringe Aktivität gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA.

Abschließend bleibt zu sagen, dass *C. cinerea* weiterhin für die Expression von Enzymen optimiert werden muss. Es wurden diverse Ansätze zur Verbesserung von Expressionsraten in *Aspergillus* Stämmen aufgezeigt, die sich wahrscheinlich auf *C. cinerea* übertragen lassen. Allerdings stellt die zufällige Integration der Expressionskassette im pYSK7 basierten Expressionssystem eine Variable dar, die Optimierungsversuche erschwert. Wenn eine konstante Expressionsrate mit einem Markergen wie der *Icc1* über alle Transformanden

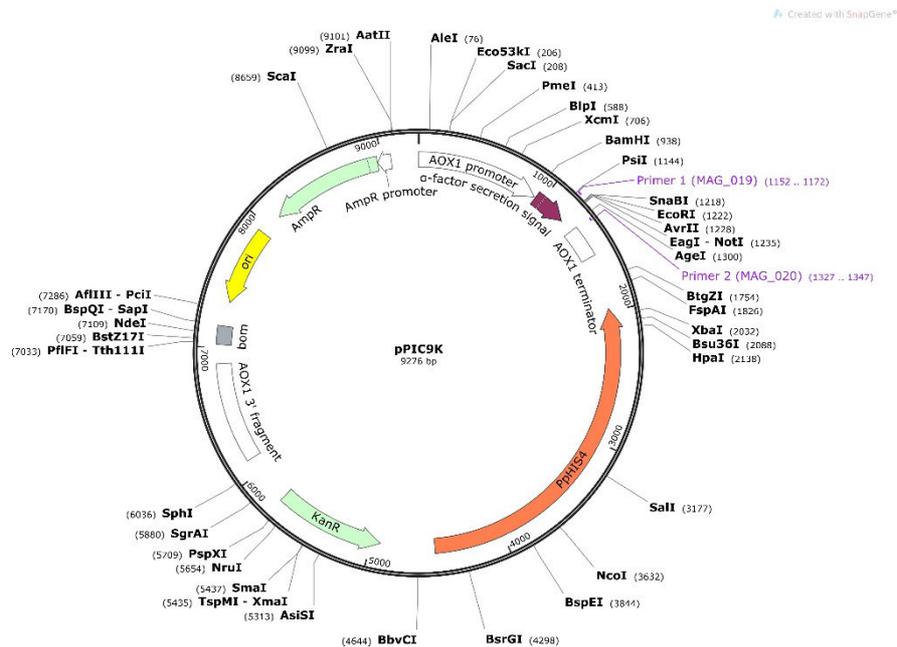
hinweg etabliert werden kann, sollte es möglich sein, weitere Modifikationen am Expressionssystem vorzunehmen und diese zu validieren um das Expressionssystem zu optimieren.

5 Anhang

Anhang 1: Vektorkarte pYSK7. Enthält die Expressionskassette mit dem *gpdII*-Promotor, das Laccase1 Gen *lcc1* und den *lcc1*-Terminator. Das *URA3*-Gen wird für die Komplementierung der Uracil Auxotrophie in RH1385 verwendet. Die Ampicillin-Resistenz-Kassette (AmpR) wird als Selektionsmarker in *E. coli* verwendet.



Anhang 2: Vektorkarte pPIC9K. Enthält die Expressionskassette mit dem AOX1 Promotor, dem α -factor Sekretionssignal, der *multiple cloning site* (MCS) und dem AOX1 Terminator. Die KanR Resistenzkassette wird für das Genitcin Screening verwendet.



Anhang 3: Nukleotidsequenz der PsP aus *W. cocos* CBS 279.55 (Falk Amelung) cDNA 1.560 bp
(kursiv = Signalpeptid, Fett = Propeptid, rot = cDNA)

ATGGTGTCTCCAGCCTGGCGGTGAGCTCCTTGCTCGCATTACCTCTGCTCGCCTCGGCCCTGCGCGT
CCCTCGCCCGCCTGTGATCCAGAAGTTCGATCCCCGCATGCGGGACCCGTCGTGGATCGGAACGG
 GACCGAGCTCCCGCCGCTGAACACCACATACTACTTTGACCAGCTCATTGATCACAACAACCCAGCC
 TTGGGACGTTCAAGCAGCGTACTGGCACACCTGGGAGTTCTACGAGCCTGGCGGACCCATCATCAT
 CACGACCCCGGGCGAACAAGATGCTGCTGGTTTTGAAGCTTCCTCACCAATGCGACAATCGACGGA
 CAGATCGCGCAGCAGAGCGGCGCGACGATTGTGCTCGAGCACCGCTACTACGGCTACTCGAAC
 CCGTACAACAACCTCTCGGTCGCGAGTCTCCAGTACCACACGATTCAGCAGGCGATCGATGACCTCG
 CCTACTTCGCGTACAATGTCAAGCTGCCTATGCCTGGCGGCGACAATGTCACGCCCGACCAGGCGCC
 GTGGGTCTGATTGGCGGTAGCTACGCGGGCGCGCTGACGAGCTTCACGAAAGTCAACAAACCAGA
 CGCGTTCTGGGCTGCGTGGTCTTCTGGCGTCTGGAGAGCATTGTCAATTATTGGGGATACTTT
 GACATTATTCGAAGCACATGCCTCAAACCTGCTCCGCGGACGTGCAAGCCGTGATCGCGCATATCG
 ACGAGGTCTTCAGTCCAATGACACCGACGCGATCAACGAGATCAAGCAGACGTTTCAGCATGAACCT
 CACCCATCTCGACGACTTCGCCAGCGCCTTGACAGGCCGATTTTCGACTGGCAGTCGCTGCAGCCG
 GCGGGCGAGCTGACCGACCTGTCGTTCTTCGAGTTCTGCGATGCACTCGAGGTGAAGAACGGCGTG

AGCGCGGGACCGGAAGGGTGGGGCCTCGACTATGCCCTGCAGGCCTGGGGCTCGTACTGGAACAC
GACGTTCTGCCGGAGAACTGTTATGACCAGACTATCGAGGAATGCCTCGGTACCTATAACGCGAGC
GCGCCCTACTACACGGACATTTTCGGTTAAACAATGCCGAGCGGTCGTGGTTTTGGATTGTCTGCAACC
AGATGGGCTTCTCCAGGATGGCGCGCCAGAAGGTGACCCTACTATCGTCTCCCGCCTCGTGACTGC
TCTCTACAACGAGCGCCAGTGCACATACTACTTCCCACAGGCGTTCAGCACCCCGCCCACGCCCCGCG
TCAACGAGACCAACAAGGCCTACGACGGCTGGTTCGTGCAGTCCGACCGGCTTCTTTCGGCAACGG
AGAGCGTGACCCGTGGCGCGATGCGACGATCTCCGACAGCGGCACGCACTTTGCGAGCACGGCGCA
GCAGCCGATCGCGGTGCGCGACGGGTTCCACTGCTCGGACTTGACACGATCAACGCGCAGGTCTGA
CCCGACGATCGAGGCGGTGCAGCAGGAGGGCCTTGCTGCGATGGCGGGCTGGCTGGAGGAGTGGA
CGGCCCCGCGCAGTCGCAGTCATGA

Anhang 4: Nukleotidsequenz der WCO_PSP Prot ID:28272 Expressionskassette (tiefgestellt = *gpdlI*-Promotor, kursiv = Signalpeptid, Fett = Propeptid, Standard rot = Exon, Standard schwarz = Intron, hochgestellt = *lcc1*-Terminator)

GAAGAAGAAGAAGAAATTCAGAGGTCCGCAAGTAGATTGAAAGTTCAGTACGTTTTTAAACAATAGAGCATTTTCGAGGCTTGCCTATTCTGTGTCAGGCTA
GCAGTTTATAAGCGTTGAGGATCTAGAGCTGCTGTTCCCGCTCTCGAATGTTCTCGGTGTTTAGGGGTTAGCAATCTGATATGATAATAATTTGTGATGAC
ATCGATAGTACAAAAACCCCAATTCGGTCCACATCCACCATCTCCGTTTTCTCCCATCTACACACAACAAGCTTATCGCC*ATGGTGTCTCTCCAGC*
CTGGCGGTGAGCTCCTTGCTCGTATTACCTCTGCTCGCCTCGGCCCTGCGCGTCCCTCGCCCCGCTGT
GATCCAGAAGGTCGATCCCCGCATGCG*GGACCCGTCGTGGATCGGAACGGGACCGAGCTCCCGCC*
GCTGAACACCACATACTACTTTGACCAACTCATTGATCACAACAACCCAGCCTTGGGACGTTCAAGC
*AGCGGTACTGGCACACCTGGGAGTTCTACGAGCCTG**GTACGGCTTCTTTGCATGCGCTGCTCGCGCT*
*CGCACTAACGCCGCACTTGCGAATTAG**GCGGACCCATCATCATCACGACCCCGGGCGAACAAGATGC*
*TGCT**GTGAGTACAGAACCTCGCGAGTTTCAAGGAGAATCGACGCTAATCCGCGCGCACAG**GTTTTG*
AAGGCTTCTACCAATGCGACAATCGACGGACAGATCGCGCAGCAGCAGAGCGGCGCGACGATTG
TGCTCGAGCACCGCTACTACGGCTACTCGAACCCGTACAACAACCTCTCGGTGCGAGTCTCCAGTAC
CACAGATTCAGCAGGCGATCGATGACCTCGCCTACTTCGCGTACAATGTCAAGCTGCCTATGCCTG
GCGGCGACAATGTCACGCCGACCAGGCGCCGTGGTCTCTGATTGGCGGTAGCTACGCGGGCGCGC
*TGACGAGCTTACGAAAGTCAAG**GTAAGTCGGGCGCTCGCGTGACATGTTCAAGTGTGACAGGAGTT*
*GTAG**CAAACCGGACGCGTTCTGGGCTGCGTGGTCGTCTTCTGGCGTCGTGGAGAGCATTGTGTACG*
*ACTTTAGAGTTCACCTGCGTCAGGGTGTACTGACTCTTGGGGCATCCTCTAG**CAATTATTGGGGATAC*
TTTGACATTATTCGCAAGCACATGCCACAGAAGTCTCCGCGGATGTGCAAGCCGTGATCGCACATA

TCGACGAGGTCTTCACGTCCAATGACACCGACGCGATCAACGAGATCAAGCAGACGTTTCAGCATGAA
CCTCACCCATCTCGACGACTTCGCCAGCGCCTGTGAGTACTGTCACTTGCAGTTCCATGCATCAGTGT
TCACGATAGCGCCACCCAGTGACAGGCCCGATTTTCGACTGGCAGTCGCTGCAGCCGGCGGGCGAG
CTGACCGACCTGTCGTTCTTCGAGTTCTGCGATGCGCTCGAGGTGAAGAACGGCGTGAGCGCGGGA
CCGGAAGGGTGGGGCCTCGACTATGCCCTGCAGGCCTGGGGCTCGTACTGGAACACGACGTTCTTG
CCGGAGAGTGAGTCCATCCTCATCCCTCCGGCATGCAGCACGAATAATCGATCGTGCTTAGACTGTT
ATGACCAGACTATCGAGTGAGTCTCGAGCGCGCTCCGCTGCCTGCCATCAGATTGGCTCACTAGTGG
ATCTCGTCTGCAGGGAATGCCTCGGTACCTATAACGCGAGCGCGCCCTACTACACGGACATTTCCGGT
CAACAATGCCGATCGGTCTGGATGTGGATTGTGTAAGCTCTTGGAAGTGCCTGTGTAGATAGCTAT
AGCTCATCCATACATCAGCTGCAACCAGATGGGCTTCTTCAGGATGGCGCGCCAGAAGGTGACCCT
ACTATCGTCTCGCGCCTCGTGAAGTCTCTCTACAACGAGGTCGGTGGCCCTCCCTTGACGATAGCCGT
CCCGCTGACTAAGACCGGCCCTTGCTTGGAAGTGCAGCGGCAGTGCACATACTACTTCCCACAGGCA
TTCAGCACCCCGCCACGCCCCGCGTCAACGAGACCAACAAGGCCTACGACGGCTGGTTCGTGCAGT
CCGACCGGCTCTTCTTCGGCAACGGAGAGCGTGAGCACCTCGCTTATTCTGTCTACCTGCATGCCACT
GACGCTTCCGCACCGGATGCACAGGCGACCCGTGGCGCGACGCGACGATCTCCGCAGACGGCACGC
ACTTTGCGAGCACGGCGCAGCCGATCGCGGTGGCGACGGGTTCCACTGCTCGGACTTGTACA
CGATCAACGCGCAGGTCGACCCGACGATCGAGGCGGTGCAGCAGGAGGGCCTTGCTGCGATGGCT
GGCTGGCTGGAGGAGTGACGGCCCCCGCGCAGTCGAGTCATGA^{ATAATATTATAGTTGACCAGAGGGCCAGTGG}
TAGGAGGCTGCTATAGTCAAAGTTGGTCACAGAGGGAAGAGTTAGTCGAGAGGAGTCGTTTGAGTACTACTAGTTATTCATCGTGTGTTATTTATCGTG
GTTGTTACATACTTATTAACATATCGTTATGTGTGCTTGAGTTTGAATCAAGCTTATCG

Anhang 5: Sequenzierungsergebnisse zu pYMS1

>pYMS1: 29_gpdlI_for

TACACACAACAAGCTTATCGCCATGGTGTCTCCAGCCTGGCGGTGAGCTCCTTGCTCGCATTACCTC
TGCTCGCCTCGGCCCTGCGCGTCCCTCGCCCGCCTGTGATCCAGAAGGTTCGATCCCCCGCATGCGGG
ACCCGTCGTGGATCGGAACGGGACCGAGCTCCCGCCGCTGAACACCACATACTACTTTGACCAGCTC
ATTGATCACAACAACCCAGCCTTGGGACGTTCAAGCAGCGGTAAGTGGCACACCTGGGAGTTCTACG
AGCCTGGTACGACTTCCTGCTATGCGCTGCTCGCGCTCGCACTAACGCCGCACTTGCGAATTAGGCG
GACCCATCATCATCACGACCCCGGGCGAACAAGATGCTGCTGGTGTGAGTACAGAACCTCGCGAGTTTC
AAGGAGAATCGACGCTGATCCGCGCGCACAGTTTTGAAGGCTTCTCACCAATGCGACAATCGACG

GACAGATCGCGCAGCAGCAGAGCGGCGCGACGATTGTGCTCGAGCACCGCTACTACGGCTACTCGA
ACCCGTACAACAACCTCTCGGTCGCGAGTCTCCAGTACCACACGATTCAGCAGGCGATCGATGACCT
CGCCTACTTCGCGTACATGTCAAGCTGCCTATGCCTGGCGGCGACATGTCACGCCCCGACAGCGCCGT
GGTCTGATTGCGGTACTACGCGGCGCGCTGACAG

>pYMS1: 145_pYMS_for2

CTGATCGATGACCTCGCCTACTTCGCGTACAATGTCAAGCTGCCTATGCCTGGCGGCGACAATGTCAC
GCCCCAGCAGGCGCCGTGGGTCTGATTGGCGGTAGCTACGCGGGCGCGCTGACGAGCTTACGAA
AGTCAAGTAAGTCGGGCGTTCGCGTAGGCATGCTCAGTGCTGACAGGCGAGTTGTAGCAAACCAGA
CGCGTTCTGGGCTGCGTGGTCTTCTGGCGTCGTGGAGAGCATTGTGTACGACTTAGAATTCACC
TACGTCAGGGTGTACTGACTCTTGGGCCATCTCTAGCAATTATTGGGGATACTTTGACATTATTCGC
AAGCACATGCCTCAAACCTGCTCCGCGGACGTGCAAGCCGTGATCGCGCATATCGACGAGGTCTTCA
CGTCCAATGACACCGACGCGATCAACGAGATCAAGCAGACGTTTACGCATGAACCTCACCCATCTCGA
CGACTTCGCCAGCGCCTGTGAGTACTGTCACCTGCAGTTCCATGCATCAGTGTTACGATAGCGCCAC
CCAGTGACAGGCCCCGATTTTCGACTGGCAGTCGCTGCAGCCCCGCGGGCGAAGCTGACCGAACCTG
TCGTTCTTCGAGTTCTGCGATGCACTCAGGTGAANAACGCTTGAGCNCGGACCGAAGGTGGGCCTC
ANTATGCCCTGCAGGCCTGG

>pYMS1: 146_pYMS_rev2 (revers komplementiert)

TTGCAAGCACATGCCTCAAACCTGNTCCGCGGACGTGCAAGCCGTGATCGGCGCAANATCGACGAG
GTCTTACGTCCAATGACACCGACGCGATCAACGAGATCAAGCAGACGTTTACGCATGAACCTCACCCA
TCTCGACGACTTCGCCAGCGCCTGTGAGTACTGTCACCTGCAGTTCCATGCATCAGTGTTACGATAG
CGCCACCCAGTGACAGGCCCCGATTTTCGACTGGCAGTCGCTGCAGCCGGCGGGCGAGCTGACCGAC
CTGTCGTTCTTCGAGTTCTGCGATGCACTCGAGGTGAAGAACGGCGTGAGCGCGGGACCGGAAGGG
TGGGGCCTCGACTATGCCCTGCAGGCCTGGGGCTCGTACTGGAACACGACGTTTCTGCCGGAGAGT
GAGTCTATCCTCATCTCTCCGGCGTGACGACGAACTAATCGATCGTGCTCAGACTGTTATGACCAGA
CTATCGAGTGAGTCTCGAGCGCGCTCCGCTGCCCCGCCATCAGATTGGCTCACTAGTGGATCTCGTCTG
CAGGGAATGCCTCGGTACCTATAACGCGAGCGGCCCTACTACACGGACATTTTCGGTTAACAATGCC
GAGCGGTCTGGTTTTGGATTGTGTAAGCTCTTGGAAAGTGCCTGTGTGGATAGCTATAGCTCATCCA
TACATCAGCT

>pYMS1: 130_lcc1-Terminator_rev (revers komplementiert)

TGGATNTGCTGCAGGAAGCCTCGGTACCTATAACGCGAGCGCGCCCTACTCACGGACATTTCCGGNTT
ACAATGCCGAAGCGGTCTGGTTTTGGATGGTGTAAAGCTTCTTGAAAGTGCCCTGTGTGGATAGCT
ATAGCTCATCCATACATCAGCTGCAACCAGATGGGCTTCTTCAGGATGGCGCGCCAGAAGGTGACCC
TACTATCGTCTCCCGCCTCGTGACTGCTCTCTACAACGAGGTCTGGTGCACCTCCCTTGACGATGGCAC
ACTACGCCGACTGATACCGGCCCTTGCTTGAACTGCAGCGCCAGTGCACATACTACTTCCCACAGG
CGTTCAGCACCCCGCCACGCCCGCGTCAACGAGACCAACAAGGCCTACGACGGCTGGTTCGTGCA
GTCCGACCGGCTCTTCTTCGGCAACGGAGAGCGTGAGCACCTCGCTCCTTCCGTCTACCCGCATGCC
ACTGACGCGTCCGCCTTGATTCACAGGTGACCCGTGGCGCGATGCGACGATCTCCGCAGACGGCAC
GCACTTTGCGAGCACGGCGCAGCAGCCGATCGCGGTCGGCGACGGGTTCCACTGCTCGGACTTGTA
CACGATCAACGCGCAGGTGACCCGACGATCGAGGCGGTGCAGCAGGAGGGCCTTGCTGCGATGG
CGGGCTGGCTGGAGGAGTGACGGCCCCCGCGCAGTCGCAGTCATAATANT

Anhang 6: Sequenzierungsergebnisse zu pYMS2

>pYMS2: 29_gpdlI_for

TACACACAACAAGCTTATCGCCATGTTCAAGAACCTCCTCTCGTTCGCCCTTCTGGCGATCAGCGTTG
CCAACGCTCTGCGCGTCCCTCGCCCGCCTGTGATCCAGAAGGTGATCCCCCGCATGCGGGACCCGT
CGTGGATCGGAACGGGACCGAGCTCCCGCCGCTGAACACCACATACTACTTTGACCAGCTCATTGAT
CACAACAACCCAGCCTTGGGACGTTCAAGCAGCGGTACTGGCACACCTGGGAGTTCTACGAGCCTG
GTACGACTTCTGCTATGCGCTGCTCGCGCTCGCACTAACGCCGCACTTGCGAATTAGGCGGACCCAT
CATCATCACGACCCCGGGCGAACAAGATGCTGCTGGTGTAGTACAGAACCTCGCGAGTTTCAAGGAG
AATCGACGCTGATCCGCGCGCACAGTTTTGAAGGCTTCTCACCAATGCGACAATCGACGGACAGA
TCGCGCAGCAGCAGAGCGGCGCGACGATTGTGCTCGAGCACCGCTACTACGGCTACTCGAACCCGT
ACAACAACCTCTCGGTCGCGAGTCTCCAGTACCACACGATTCAGCAGGCGATCGATGACCTCGCCTA
CTTCGCGTACATGTCAAGCTGCCTATGCCTGGCGGGCAGATGTCACGCCCGACCAGGCGCCGTGGGT
CCTGATTGGCGGTAGCTACNCGGCGCGCTGACAGCTTACCGAAGTCAAGTAAGTCGGCGTTC

>pYMS2: 145_pYMS_for2

TCGATCGATGACCTCGCCTACTTTCGCGTACAATGTCAAGCTGCCTATGCCTGGCGGCGACAATGTCAC
GCCCCACCAGGCGCCGTGGGTCTGATTGGCGGTAGCTACGCGGGCGCGCTGACGAGCTTACGAA
AGTCAAGTAAGTCGGGCGTTTCGCGTAGGCATGCTCAGTGCTGACAGGCGAGTTGTAGCAAACCAGA

CGCGTTCTGGGCTGCGTGGTCGTCTTCTGGCGTCGTGGAGAGCATTGTGTACGACTTAGAATTCACC
TACGTCAGGGTGTACTGACTCTTGGGCCATCCTCTAGCAATTATTGGGGATACTTTGACATTATTCGC
AAGCACATGCCTCAAACTGCTCCGCGGACGTGCAAGCCGTGATCGCGCATATCGACGAGGTCTTCA
CGTCCAATGACACCGACGCGATCAACGAGATCAAGCAGACGTTTCAGCATGAACCTCACCCATCTCGA
CGACTTCGCCAGCGCCTGTGAGTACTGTCACTTGCAGTTCCATGCATCAGTGTTACGATAGCGCCAC
CCAGTGACAGGCCCGATTTTCGACTGGCAGTCGCTGCAGCCCGGCGGGCGAGCTGACCGACCTGTC
GTTCTTCGAGTTCTGCGATGCACTCAGGTGAAGAACGGCGTGAGCGCGGACCGAAGGTGGGCCTCA
CTATGCCCTGCAGCCTGGGCTCGTACTGGAACACGACGTTCTGCCGAAA

>pYMS2:146_pYMS_rev2 (revers komplementiert)

GATCTGGCCATCTCTAGCAATATGGATACTTGACATATTCGCAAGCACATGCCTCAAACTGCTCGCG
GACGTGCAAGCCGTGATCGCGCATATCGACGAGGTCTTCACGTCCAATGACACGACGCGATCAACGA
GATCAAGCAGACGTTTCAGCATGAACCTCACCCATCTCGACGACTTCGCCAGCGCCTGTGAGTACTGT
CACTTGCAGTTCCATGCATCAGTGTTACGATAGCGCCACCCAGTGACAGGCCCGATTTTCGACTGGC
AGTCGCTGCAGCCGGCGGGCGAGCTGACCGACCTGTCGTTCTTCGAGTTCTGCGATGCACTCGAGGT
GAAGAACGGCGTGAGCGCGGGACCGGAAGGGTGGGGCCTCGACTATGCCCTGCAGGCCTGGGGCT
CGTACTGGAACACGACGTTCTGCGGAGAGTGAGTCTATCCTCATCTCTCCGGCGTGACGACGAA
CTAATCGATCGTGCTCAGACTGTTATGACCAGACTATCGAGTGAGTCTCGAGCGCGCTCCGCTGCCC
GCCATCAGATTGGCTCACTAGTGGATCTCGTCTGCAGGGAATGCCTCGGTACCTATAACGCGAGCGC
GCCCTACTACACGGACATTTTCGGTTAACAATGCCGAGCGGTGCGTGGTTTTGGATTGTGTAAGCTCTTG
GAAGTGCCTGTGTGGATAGCTATAGCTCATCCATACATCAGCT

>pYMS2: 130_lcc1-Terminator_rev (revers komplementiert)

ANGATNTGTCNCAGGAATGCCTCGGTACCTATAACGCGAGCGCGCCCTACTACACGGACATTTTCGGT
TAACAATGCCGAGCGGTCGTGGTTTTGGATTGTGTAAGCTCTTGAAAGTGCCTGTGTGGATAGCTAT
AGCTCATCCATACATCAGCTGAACCAGATGGGCTTCTTCCAGGATGGCGCGCCAGAAGGTGACCCTA
CTATCGTCTCCCGCCTCGTGACTGCTCTCTACAACGAGGTCGGTGCACCTCCCTTGACGATGGCACAC
TACGCCGACTGATACCGGCCCTTGCTTGGAACTGCAGCGCCAGTGACATACTACTTCCACAGGCG
TTCAGCACCCCGCCACGCCCCGCGTCAACGAGACCAACAAGGCCTACGACGGCTGGTTTCGTGCAGT
CCGACCGGCTCTTCTTCGGCAACGGAGAGCGTGAGCACCCCTCGTCTTCCGTCTACCCGCATGCCAC
TGACGCGTCCGCCTTGATTCACAGGTGACCCGTGGCGCGATGCGACGATCTCCGCAGACGGCACGC
ACTTTGCGAGCACGGCGCAGCAGCCGATCGCGGTGCGGACGGGTTCCACTGCTCGGACTTGTACA

CGATCAACGCGCAGGTGACCCGACGATCGAGGCGGTGCAGCAGGAGGGCCTTGCTGCGATGGCG
GGCTGGCTGGAGGAGTGGACGGCCCCCGCGCAGTCGCATCATGAATCNT

Anhang 7: Sequenzierungsergebnisse zu pYMS3

>pYMS3: 29_gpdlI_for

TACACACAACAAGCTTATCGCCATGTTCAAGAACCTCCTCTCGTTCGCCCTTCTGGCGATCAGCGTTG
CCAACGCTGGACCCGTCGTGGATCGGAACGGGACCGAGCTCCCGCCGCTGAACACCACATACTACTT
TGACCAGCTCATTGATCACAACAACCCAGCCTTGGGACGTTCAAGCAGCGGTACTGGCACACCTGG
GAGTTCTACGAGCCTGGTACGACTTCTGCTATGCGCTGCTCGCGCTCGCACTAACGCCGCACTTGCG
AATTAGGCGGACCCATCATCATCACGACCCCGGGCGAACAAGATGCTGCTGGTGAGTACAGAACCTC
GCGAGTTTCAAGGAGAATCGACGCTGATCCGCGCGCACAGGTTTTGAAGGCTTCCTCACCAATGCGA
CAATCGACGGACAGATCGCGCAGCAGCAGAGCGGCGCGACGATTGTGCTCGAGCACCGCTACTACG
GCTACTCGAACCCGTACAACAACCTCTCGGTCGCGAGTCTCCAGTACCACACGATTACAGCAGGCGAT
CGATGACCCTCGCCCTACTTTCGCGTACAATGGTCAAGCTGCCTATGCCTGGCGGGCACAATGTCACC
GCCCCACCAGGCGCCGTGGGTCTGATTGGCGGTAGCTACCGCCGGCGCGCCTGACAGCTTACGAA
AGTCAAGTAAGTCGGCGTTCGGTAGCATGCTCATGCT

>pYMS3: 145_pYMS_for2

CTGATCGATGACCTCGCCTACTTCGCGTACAATGTCAAGCTGCCTATGCCTGGCGGGCACAATGTCAC
GCCCCACCAGGCGCCGTGGGTCTGATTGGCGGTAGCTACGCGGGCGCGCTGACGAGCTTACGAA
AGTCAAGTAAGTCGGGCGTTCGCGTAGGCATGCTCAGTGCTGACAGGCGAGTTGTAGCAAACCAGA
CGCGTTCTGGGCTGCGTGGTCTTCTGGCGTCGTGGAGAGCATTGTGTACGACTTAGAATTACCC
TACGTCAGGGTGTACTGACTCTTGGGCCATCCTCTAGCAATTATTGGGGATACTTTGACATTATTCGC
AAGCACATGCCTCAAACTGCTCCGCGGACGTGCAAGCCGTGATCGCGCATATCGACGAGGTCTTCA
CGTCCAATGACACCGACGCGATCAACGAGATCAAGCAGACGTTTCCAGCATGAACCTCACCCATCTCGA
CGACTTCGCCAGCGCCTGTGAGTACTGTCACTTGCAGTTCCATGCATCAGTGTTACGATAGCGCCAC
CCAGTGACAGGCCCGATTTTCGACTGGCAGTCGCTGCAGCCGGCGGGCGAGCTGACCGACCTGTGCG
TTCTTCGAGTTCTGCGATGCACTCAGGTGAAGAACGCGTGAGCGCGGACCGAAGGTGGGGCCTCGA
CTATGCCCTGCAGCCTGGGCTGTACTGACACGACGTTCTGCGAAGTGATCTATCTATTTCCG

>pYMS3: 146_pYMS_rev2: (revers komplementiert)

ACTGACTCTGGCCATCCTCTAGCAATATGGGATACTTGACATATTCGCAAGCACATGCCTCAAACCTG
CTCGCGGACGTGCAAGCCGTGATCGCGCATATCGAACGAGGTCTTCACGTCCAATGACACGACGCG
ATCAACGAGATCAAGCAGACGTTTACGATGAACCTCACCCATCTCGACGACTTCGCCAGCGCCTGTG
AGTACTGTCACTTGCAGTTCCATGCATCAGTGTTACGATAGCGCCACCCAGTGACAGGCCCGATTTT
CGACTGGCAGTCGCTGCAGCCGGCGGGGAGCTGACCGACCTGTCGTTCTTCGAGTTCTGCGATGCA
CTCGAGGTGAAGAACGGCGTGAGCGCGGGACCGGAAGGGTGGGGCCTCGACTATGCCCTGCAGGC
CTGGGGCTCGTACTGGAACACGACGTTCTGCCGGAGAGTGAGTCTATCCTCATCTCTCCGGCGTGC
AGCACGAACTAATCGATCGTGCTCAGACTGTTATGACCAGACTATCGAGTGAGTCTCGAGCGCGCTC
CGCTGCCCCGCCATCAGATTGGCTCACTAGTGGATCTCGTCTGCAGGGAATGCCTCGGTACCTATAAC
GCGAGCGCGCCCTACTACACGGACATTTGCGTTAACAATGCCGAGCGGTCGTGGTTTTGGATTGTGT
AAGCTCTTGGAAAGTGCCTGTGTGGATAGCTATAGCTCATCCATACATCAGCTNA

>pYMS3: 130_1cc1-Terminator (revers komplementiert)

TAGTGGANTGTCTGCAGGAATGCCTCGGTACCTATAACGCGAGCGCGCCCTACTACACGGACATTTT
GGGTTAACAAATGCCGAAGCGGTCTGGTTTTGGATTGTGTAAGCTCTTGAAGTGCCTGTGTGGATA
GCTATAGCTCATCCATACATCAGCTGCAACCAGATGGGCTTCTTCAGGATGGCGCGCCAGAAGGTGA
CCCTACTATCGTCTCCCGCTCGTGAAGTCTCTTACAACGAGGTCGGTGCACCTCCCTTGACGATGG
CACACTACGCCGACTGATACCGGCCCTTGCTTGGAACTGCAGCGCCAGTGCACATACTACTTCCCACA
GGCGTTCAGCACCCCGCCACGCCCGCGTCAACGAGACCAACAAGGCCTACGACGGCTGGTTCGT
GCAGTCCGACCGCTCTTCTTCGGCAACGGAGAGCGTGAGCACCTCGCTCCTTCCGTCTACCCGCAT
GCCACTGACCGTCCGCCTTGATTCACAGGTGACCCGTGGCGCGATGCGACGATCTCCGCAGACGGC
ACGCACTTTGCGAGCACGGCGCAGCAGCCGATCGCGGTGCGCGACGGTTCCACTGCTCGGACTTG
TACACGATCAACGCGCAGGTGACCCGACGATCGAGGCGGTGCAGCAGGAGGGCCTTGCTGCGATG
GCGGGCTGGCTGGAGGAGTGGACGGCCCCCGCGCAGTCGCAGTCATGAATNNT

Anhang 8: Nukleotidsequenz der Serinpeptidase EAU91794 aus *Coprinopsis cinerea* Okayama 7 (#130) (Entnommen aus der Datenbank JGI Mycosm, Name CC1G_04562T0; Protein ID 3959). Die untranslatierten Regionen sind in blau dargestellt, die Exons in rot und die Introns in schwarz.

TTTCCAAGTGACCTCTCTCCTCCTGACCTGCCCGTCGCTTCCCTGTCTCTGCCATGCGTTTCTTCG
TGCCCTTCGCGGCTGCCACTGTCTTATTGGCGGAACCTGTGCTTTCAGCACCCAGGGCCGTCCTTGAAGT

CGGTGAAAGATTCCCCGGACAGACCACCGGAAATACATTGTCAAGCTCAGACCCGGTGTGTCGC
GCAAGCAATGGATTCGCAAGCTCAGGCTCGCCGCCAACACCGTTAACTGGGGCCTCATCAACGGTT
TGCTGGTTAGCGTTCCTACTATCATGGTGTCAATGTTTCGGTCGCGACTGACTTCCAATCTCACCTAG
GCATTCTGAACGACCAGGCTCTCAACACCTTGAGAGAATCTGAGGATGTAGAGTACATCACTGAGGA
CGGTATCATGTACACCATGTCCCCTGTACCCAGTAGGACATCCTTTCACGTTCCGGTGTGGTTGGGTG
TACTTACTCCCCTGGATCAGGTCCGATGCTCCTGGGGTCTTCAAAGGGTCAGCCAGGCCGCGAGGC
TCAGCAACACGGATGTGCGGTACGATTAGCCTCCATTACGCCTCGTCTGCGCATTCTAATCCATTCC
GAAAGTGCACTCGACTATCAGTACACCTACGATTCTTCGGCCGGTAGCGGTGTGACATCTATATTGC
CGGTGCGCGTTCAATCTCCTTACTGCCTTCGGAAGATCGTGGCTGACATTTTCGGATAGATACCGG
TGGGTAATCGTTCTAATTTTATGACTTGTACAAAGAACCATCTCACCATTCAATTTGATTGGCAGGTAT
ACTGGTCTCTCATGTGTGTCTTGCCCTCGTGGAGCATGAGTTGGCATGTGCTGATCGACGACTGTAC
AGTCCCAATTTGGTGGACGAGCTCGATGGGGAGGTACCTTCGGTGTACAGGGTAAGCCCCTAGCC
CCTGAACACCGCACACTGACCGTTAATGGTCTGCTTCATCAGCACCACTGATGGTCACGGTCATGGA
ACCCATTGCGCGTAAGTTATCTCGTCAACCTCTCGCCAAATCTCTAAAGCTCATTGGGCTCCTATATC
TTTAGCGGCACCGCTGCTGGCGCCAGTTCGGTGTGCAAAGAACGCCTCTCTCATCGCCGTCAAGG
TTTTGACTGATGGAGGGTATGTCTCCCTTCAGTTCGCATCCCACTTGAAGGCACCACTGACACGCCTA
TCTGCAGATCTGGAAGCATTGCTGGAATGTGAAGCTCCTGATCCCTTTGAGAAAATCAACGGTCTAA
ATATCATTCCAGTGTCTCTGGCTTGATTGGATTAGAACCAAGTTGCCGCTTCTGGAAGACCCTCG
GTTGTTCCATGTCCCTTGCGGCAGTGCCTCGACTGCTCTTGACAATGCTGTGCGCCAGTGTGAGCTC
AACCCCGTCCCTCATGATCTGGGTTTGCCTGACTTTCCTCGTCTAGTTAACGGCCGCTGGAATCCACG
TTACCGTAAGTCGCATCTGAAGAAATCTGCCGTCACCTACTGAACACCTATTGGTATAGGTTGCTGCT
GGGAACGACAACAGGGATGCTGCCAACACTTCTCCCGCAAGGACACCCTCTGCCATCACCGTTGGTG
CGACCGACATTCAGGATGGCAAAGCCTCATTCTCCAATTCGGCGCGGCCGTCGACGTATTTGCACCT
GGACAGAATGTCATCAGCGCATGGATCGGTGCCAGCAACTCGGTGTGTTCCCTCCCATGGATGTTTCT
CCGGGAGTCTCCTGACCGAGTCATGTTAGGCAACCAACAGCATCTCTGGAACCTTCGATGGCCACGCC
CCATGTCGCTGGCTTGCTCGCTACTTGATCTCAAAGGACGGAAATATCTCTCTGCTGCTATGGAG
GCCAAGATCAAGGACCTTTCTGTCAAGGGAGCTGTCACTGGCCTTCGTACGTGTCCAGACTACCG
CATACCTCGTCTAATCCATCATTGTAGCTTCTACAACCTGCAACCAACCTTGCAGATCGGCCCTCTGT
AA

Anhang 9: *A. bisporus* Intron Sequenz. (Burns et al., 2005) verwendete die Sequenz mit der Genbank Accession No. M81728. Ein Abgleich dieser CDS Sequenz mit JGI Mycosm führte

zum Gen [fgenesh2_kg.11_#_7_#_2_2183_CFAF_CFAG_CFAH_EXT](#) mit der Protein ID 138631. Anhand dieser Sequenz konnte die Intron Sequenz eingesehen werden. Nachfolgend ist die Sequenz des ersten Introns dargestellt (rot = codierende Sequenz, schwarz = nicht codierende Sequenz (Intron)).

ATGGTTTGTCTCTCGCTTGCATACCACCCAGCAGCTCACTGATGTCGACTTGTAG**GTTAAA**

Anhang 10: Sequenzierungsergebnisse pYMS11c mit den Oligonukleotiden 29.2 und 130.2

>pYMS11c_29.2

ATGTTCTCGGTGTTTAGGGGTTAGCAATCTGATATGATAATAATTTGTGATGACATCGATAGTACAAA
AACCCCAATTCCGGTCACATCCACCATCTCCGTTTTCTCCCATCTACACACAACAAGCTTATCGCCATG
CGTTTCTTCGCTGCCTTCGCGGCTGCTACTGTCTTATTGGCGGAACCTGTGCTTTCACTGCGCGTCCCT
CGCCCGCCTGTGATCCAGAAGGTCGATCCCCGCATGCGGGACCCGTCGTGGATCGGAACGGGACC
GAGCTCCCGCCGCTGAACACCACATACTACTTTGACCAGCTCATTGATCACAACAACCCAGCCTTGG
GACGTTCAAGCAGCGGTAAGTGGCACACCTGGGAGTTCTACGAGCCTGGTACGACTTCTGCTATGCG
CTGCTCGCGCTCACACTAACGCCGCACTTGCGAATTAGGCGGACCCATCATCATCACGACCCCGGGC
GAACAAGATGCTGCTGGTGAGTACAGAACCTCGCGAGTTTCAAGGAGAATCGACGCTGATCCGCGC
GCACAGGTTTTAAAGGCTTCCTACCAATGCGACAATCGACGGACAGATCGCGCAGCAGCAGAGCG
GCGCGACGATTGTGCTCGAGCACCGCTACTACGGCTACTCGAACCCGTACAACAACCTCTCGGTCGC
GAGTCTCCAGTACCACACGATTCAGCAGGCGATCGATGACCTCGCCTACTTCGCGTACAATGTCAAG
CTGCCTATGCCTGGCGGCGACAATGTCACGCCGACCAGGCGCCGTGGGTCCTGATTGGCGGTAGCT
ACGCGGGCGCGCTGACGAGCTTCACGAAAGTCAAGTAAGTCGGGCGTTTCGCGTAGGCATGCTCAGT
GCTGACAGGCGAGTTGTAGCAAACCAGACGCGTTCTGGGCTGCGTGGTCTTCTGGCGTCGTGG
AGAGCATTGTGTACGACTTAGAATTCACCTACGTCAGGGTGTACTGACTCTTGGGCCATCTCTAGCA
ATTATTGGGGGATACTTTGACATTATTCGCAAGCACATGCCTCAAACCTGCTCCGCGGACGTGCAAG
CCGTGATCGCGCATATCGACGAGGTCTTCACGTCCAATGACCCCGACG

>pYMS11c_130.2 (revers komplementiert)

CCSCGGGACCGGAAAGGGTGGGGCCTTSGACTATGCCCTGCAGGCCTGGGGGYTCGTAAGTGGAAAC
CAGGACGTTTCTCCCGGAGAGTGAGTTCTATCCTCATCTTTYCGGGCGTGCAGCACGAACCTAATTCG
ATCGTGCTCAGACTGTTATGACCAGACTATCGAGTGAGTCTCGAGCGCGCTCCGCTGCCCGCCATCA
GATTGGCTCACTAGTGGATCTCGTCTGCAGGGAATGCCTCGGTACCTATAACGCGAGCGCGCCCTAC
TACACGGACATTTGGTTAAACAATGCCGAGCGGTCGTGGTTTTGGATTGTGTAAGCTCTTGGAAAGTG
CCTGTGTGGATAGCTATAGCTCATCCATACATCAGCTGCAACCAGATGGGCTTCTTCCAGGATGGCG

CGCCAGAAGGTGACCCTACTATCGTCTCCCGCCTCGTGACTGCTCTCTACAACGAGGTCGGTGCACCT
 CCCTTGACGATGGCACACTACGCCGACTGATACCGGCCCTTGCTTGAACTGCAGCGCCAGTGCACA
 TACTACTTCCCACAGGCGTTCAGCACCCCGCCACGCCCGCGTCAACGAGACCAACAAGGCCTACG
 ACGGCTGGTTCGTGCAGTCCGACCGGCTCTTCTTCGGCAACGGAGAGCGTGAGCACCTCGCTCCTT
 CCGTCTACCCGCATGCCACTGACGCGTCCGCCTTGATTCACAGGTGACCCGTGGCGCGATGCGACGA
 TCTCCGCAGACGGCACGCACTTTGCGAGCACGGCGCAGCAGCCGATCGCGGTTCGGCGACGGGTTC
 ACTGCTCGGACTTGTACACGATCAACGCGCAGGTCGACCCGACGATCGAGGCGGTGCAGCAGGAGG
 GCCTTGCTGCGATGGCGGGCTGGCTGGAGGAGTGGACGGCCCCCGCGCAGTCGCAGTCACACCACC
 ACCACCACCACTGAATAATATTATAGTTGACCAGAGGGCCAGTGGTAGGAGGCTGCTATAGTCAAAG
 TTGGTCACAGAGGGAAGAGTTAGTCGCAGAGGAGTCGTTTGAGTACTACTAGTTATTCATCGTGN

Anhang 11: Rohdaten zum Z-Gly-Pro-4-Nitroanilid-Peptidase spezifischen Assay der pYMS11c Transformanden d6 YMG. Alle Angaben entsprechen U L⁻¹.

| pCc1001 Transformand 3 | pCc1001 Transformand 4 | pCc1001 Transformand 5 | pYMS11 c Transformand 6 | pYMS11 c Transformand 11 | pYMS11 c Transformand 15 | pYMS11 c Transformand 21 | pYMS11 c Transformand 26 | Blank |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|
| 4,7 | 3,1 | 6,3 | 4,7 | 3,1 | 4,7 | 3,1 | 3,1 | 0,0 |
| 4,7 | 3,1 | 6,3 | 4,7 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 0,0 |
| 4,7 | 3,1 | 6,3 | 4,7 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 0,0 |

Anhang 12: Nukleotidsequenz der Serinpeptidase *Rhizopertha dominica* (Nicole Mika) 768 bp cDNA

ATGTTCAAATTAGTCGCTATACTATGCCTGGTAGCCTCTGCAATTGCGCTCCCCGTAAGACAAAGGT
 GCCAAGACTCGATGGTCGCATCGTTGGCGGTGAAGATGCCGAGATTGAGGATTATAATTATACTGTG
 CAACTTCTATATTTTGAAGCCACATCTGTGGGGGCTCCATAATCTCGCCCAAGTACGTTGTCACCGC
 CGCACACTGCACAGATGGTTCGTCGACAACGCTTCTGAGCATTGAGCCGGATCCACCCTCCGGAAC
 CAGGGAGGTACCGTTGTAAACGTCGCCGCGATACATCAGAATCCCGACTTCGATTGGTCATACATTG

ATTACGACATTAGCATTCTGGAAGCTCGCGGAGGAGCTTGAGTTCTCCTCCAGTATTGGTCCGATCTCC
CTCCAGAGGTGAACCAAATCGTGGAAGCAGGAACTAACTCAACAGTCACCGGTTGGGGGACTACG
ACGGAAGGGGGCTCACTCCCGTCTATCTTGCAAGTGGTGCAAGTTCCTATCGTAAGTCTCGAAGAGT
GCCGAGCTGCATACGGTCAGGCTGACGTTACCGACAGGATGGTTTGTGCGGGGTACACTGAAGGGG
GGAAAGACGCTTGTGAGGGAGACTCGGGCGGACCATTGGTCGTTGGAGACGAATTGATCGGCATCG
TCTCTGGGGATACGGCTGCGCGCGCCCTAACTACCCTGGAGTCTATGGCTCTGTCCTGCTATGAGG
GACTATGTCTATAATATCACGGGCTTGTGA

Anhang 13: Sequenzierungsergebnisse pYMS5 mit den Oligonukleotiden 29 und 130

>pYMS5_29

TACACACAACAAGCTTATCGCCATGTTCAAATTAGTCGCTATACTATGCCTGGTAGCCTCTGCAATTG
CGCTCCCCGTAAGACAAAGGTGCCAAGACTCGATGGTCGCATCGTTGGCGGTGAAGATGCCGAGA
TTGAGGATTATAATTATACTGTGCAACTTCTATATTTTGAAGCCACATCTGTGGGGGCTCCATAATC
TCGCCCAAGTACGTTGTCACCGCCGCACACTGCACAGATGGTTCGTCGACAACGCTTCTGAGCATTCCG
AGCCGGATCCACCCTCCGGAACCAGGGAGGTACCGTTGTAAACGTCGCCGCGATACATCAGAATCCC
GACTTCGATTGGTCATACATTGATTACGACATTAGCATTCTGGAAGCTCGCGGAGGAGCTTGAGTTCTC
CTCCAGTATTGGTCCGATCTCCCTTCCAGAGGTGAACCAAATCGTGGAAGCAGGAACTAACTCAACA
GTCACCGGTTGGGGGACTACGACGGAAGGGGGCTCACTCCCGTCTATCTTGCAAGTGGTGCAAGTT
CCTATCGTAAGTCTCGAAGAGTGCCGAGCTGCATACGGTCAGGCTGACGTTACCGACAGGATGGTTT
GTGCGGGTACACTGAAGGGGGAAAGACGCTTGTGAGGAGACTCGGGCGGACCATTGGTCGTTGGAG
AACAATTGATCGGCATCGTCTNTTGGGATACGGCTGNCCNCCTAACTAC

>pYMS5_130 (revers komplementiert)

GCGGNAAGATGCCGAGATTGAGGATTATAATTATACTGTGCAACTTCTATTATTTGAAGCCACATCTG
TGGGGCTCCATAATCTTCGCCCAAGTACGTTGTCACCGCCGCACACTGCACAGATGGTTTCGTCGACA
ACGCTTCTGAGCATTGAGCCGGATCCACCCTCCGGAACCAGGGAGGTACCGTTGTAAACGTCGCCG
CGATACATCAGAATCCCGACTTCGATTGGTCATACATTGATTACGACATTAGCATTCTGGAAGCTCGCG
GAGGAGCTTGAGTTCTCCTCCAGTATTGGTCCGATCTCCCTTCCAGAGGTGAACCAAATCGTGGAAG
CAGGAACTAACTCAACAGTCACCGGTTGGGGGACTACGACGGAAGGGGGCTCACTCCCGTCTATCTT
GCAAGTGGTGCAAGTTCCTATCGTAAGTCTCGAAGAGTGCCGAGCTGCATACGGTCAGGCTGACGTT
ACCGACAGGATGGTTTGTGCGGGGTACACTGAAGGGGGGAAAGACGCTTGTGAGGGAGACTCGGG

CGGACCATTGGTCGTTGGAGACGAATTGATCGGCATCGTCTCTTGGGGATACGGCTGCGCGCGCCCT
AACTACCCTGGAGTCTATGGCTCTGTCCCTGCTATGAGGGACTATGTCTATAATATCACGGGCTTGTG
AATAAT

Anhang 14: Sequenzierungsergebnisse pYMS6 mit den Oligonukleotiden 29 und 130

>pYMS6_29

TACACACAACAAGCTTATCGCCATGGTTTGTCTCTCGCTTGCATACCACCCAGCAGCTCACTGATGTC
GACTTGTAGGTTAAATTCAAATTAGTCGCTATACTATGCCTGGTAGCCTCTGCAATTGCGCTCCCCCG
TAAGACAAAGGTGCCAAGACTCGATGGTCGCATCGTTGGCGGTGAAGATGCCGAGATTGAGGATTA
TAATTATACTGTGCAACTTCTATATTTTGGAAAGCCACATCTGTGGGGGCTCCATAATCTCGCCCAAGT
ACGTTGTCACCGCCGCACACTGCACAGATGGTTCGTGACAACGCTTCTGAGCATTGAGCCGGATC
CACCTCCGGAACCAGGGAGGTACCGTTGTAAACGTGCCGCGATACATCAGAATCCCGACTTCGAT
TGGTCATACATTGATTACGACATTAGCATTCTGGAACTCGCGGAGGAGCTTGAGTTCTCCTCCAGTAT
TGGTCCGATCTCCCTCCAGAGGTGAACCAAATCGTGGAAAGCAGGAACTCAACAGTCACCGGT
TGGGGGACTACGACGGAAGGGGGCTCACTCCCGTCTATCTTGCAAGTGGTGCAAGTTCCTATCGTAA
GTCTCGAAGAAGTGCCGACTGCATACGGTCAGGCTGACGTTACCGACAGGATGGTTTGTGCGGGTA
CACTGAAAGGGG

>pYMS6_130 (revers komplementiert)

CGTTGCGGNAAGATGCCGAGATTGAGGATTATAATTATACTGTGCAACTTCTATATTTGGAAGCCAC
ATCTGTGGGGCTCCATAATCTCGCCCAAGTACGTGGTCACCGCCGCACACTGCACAGATGGTTTCGTC
GACAACGCTTTCTGAGCATTGAGCCGGATCCACCCTCCGGAACCAGGGAGGTACCGTNGTAAACGT
CGCCGCGATACATCAGAATCCCGACTTCGATTGGTCATACATTGATTACGACATTAGCATTCTGGAAC
TCGCGGAGGAGCTTGAGTTCTCCTCCAGTATTGGTCCGATCTCCCTCCAGAGGTGAACCAAATCGTG
GAAGCAGGAACTAACTCAACAGTCACCGGTTGGGGGACTACGACGGAAGGGGGCTCACTCCCGTCT
ATCTTGCAAGTGGTGCAAGTTCCTATCGTAAGTCTCGAAGAGTGCCGAGCTGCATACGGTCAGGCTG
ACGTTACCGACAGGATGGTTTGTGCGGGGTACTGAAGGGGGGAAAGACGCTTGTGAGGGAGAC
TCGGGCGGACCATTGGTCGTTGGAGACGAATTGATCGGCATCGTCTCTTGGGGATACGGCTGCGCG
CGCCCTAACTACCCTGGAGTCTATGGCTCTGTCCCTGCTATGAGGGACTATGTCTATAATATCACGGG
CTTGTGAATAAT

Anhang 15: Sequenzierungsergebnisse pYMS7 mit den Oligonukleotiden 29 und 130

>pYMS7_29

TACACACAACAAGCTTATCGCCATGTTCAAGAACCTCCTCTCGTTCGCCCTTCTGGCGATCAGCGTTG
CCAACGCTTTCAAATTAGTCGCTATACTATGCCTGGTAGCCTCTGCAATTGCGCTCCCCGTAAGACA
AAGGTGCCAAGACTCGATGGTCGCATCGTTGGCGGTGAAGATGCCGAGATTGAGGATTATAATTAT
ACTGTGCAACTTCTATATTTTGAAGCCACATCTGTGGGGGCTCCATAATCTCGCCAAGTACGTTGT
CACCGCCGCACACTGCACAGATGGTTCGTGACAACGCTTCTGAGCATTGAGCCGGATCCACCCTC
CGGAACCAGGGAGGTACCGTTGTAAACGTCGCCGCGATACATCAGAATCCCGACTTCGATTGGTCAT
ACATTGATTACGACATTAGCATTCTGGAACCTCGCGGAGGAGCTTGAGTTCTCCTCCAGTATTGGTCCG
ATCTCCCTTCCAGAGGTGAACCAAATCGTGGAAGCAGGAACTAACTCAACAGTCACCGGTTGGGGG
ACTACGACGGAAGGGGGCTCACTCCCGTCTATCTTGCAAGTGGTGCAAGTTCCTATCGTAAGTCTCG
AAGATGCCGAACTGCATACGGTCAGGCTGACTTTACCCGACAGGATGGTTTGTGCGGGTACACTGAA
GGGGGAAAGACNCTTG

>pYMS7_130 (revers komplementiert)

CGTANCAAGGNCCAGACTNATGTCGCATCGTTGCGGNAAGATGCCGAGATTNAGATTATAATTATA
CTGTGCAACTTCTATATTTTGAAGCCACATCTGTGGGGGCTCCATAATCTTCGCCCAAGTACGTTGTAC
CGCCGCACACTGCACAGATGGTTTCGTGACAACGCTTCTGAGCATTGAGCCGGATCCACCCTCCGG
AACCAGGGAGGTACCGTTGTAAACGTCGCCGCGATACATCAGAATCCCGACTTCGATTGGTCATACA
TTGATTACGACATTAGCATTCTGGAACCTCGCGGAGGAGCTTGAGTTCTCCTCCAGTATTGGTCCGATC
TCCCTTCCAGAGGTGAACCAAATCGTGGAAGCAGGAACTAACTCAACAGTCACCGGTTGGGGGACT
ACGACGGAAGGGGGCTCACTCCCGTCTATCTTGCAAGTGGTGCAAGTTCCTATCGTAAGTCTCGAAG
AGTGCCGAGCTGCATACGGTCAGGCTGACGTTACCGACAGGATGGTTTGTGCGGGGTACACTGAAG
GGGGGAAAGACGCTTGTGAGGAGACTCGGGCGGACCATTGGTCGTTGGAGACGAATTGATCGGC
ATCGTCTCTGGGGATACGGCTGCGCGCGCCCTAACTACCCTGGAGTCTATGGCTCTGTCCCTGCTAT
GAGGGACTATGTCTATAATATCACGGGCTTGTGAATAAT

Anhang 16: Sequenzierungsergebnisse pYMS13c mit dem Oligonukleotid 130.2

>pYMS13c_130.2 (revers komplementiert)

GGATGACATCGATAGTACAAAACCCCAATTCCGGTCACATCCACCATTTCCGTTTTNNTCCCATCTA
CACACAACAAGCTTATCGCCATGGTTTGTCTCTCGCTTGCATACCACCCAGCAGCTCACTGATGTCGA
CTTGTAGGTTAAACGTTTCTTCGCTGCCTTCGCGGCTGCTACTGTCTTATTGGCGGAACCTGTGCTTTC
AATGTTCAAATTAGTCGCTATACTATGCCTGGTAGCCTCTGCAATTGCGCTCCCCGTAAGACAAAGG
TGCCAAGACTCGATGGTCGCATCGTTGGCGGTGAAGATGCCGAGATTGAGGATTATAATTATACTGT
GCAACTTCTATATTTTGAAGCCACATCTGTGGGGGCTCCATAATCTCGCCCAAGTACGTTGTCACCG
CCGCACACTGCACAGATGGTTCGTGACAACGCTTCTGAGCATTGAGCCGGATCCACCCTCCGGAA
CCAGGGAGGTACCGTTGTAAACGTCGCCGCGATACATCAGAATCCCGACTTCGATTGGTCATACATT
GATTACGACATTAGCATTCTGGAACTCGCGGAGGAGCTTGAGTTCTCCTCCAGTATTGGTCCGATCTC
CCTTCCAGAGGTGAACCAATCGTGGAAGCAGGAACTAACTCAACAGTCACCGGTTGGGGGACTAC
GACGGAAGGGGGCTCACTCCCGTCTATCTTGCAAGTGGTGCAAGTTCCTATCGTAAGTCTCGAAGAG
TGCCGAGCTGCATACGGTCAGGCTGACGTTACCGACAGGATGGTTTGTGCGGGGTACACTGAAGGG
GGGAAAGACGCTTGTGAGGGAGACTCGGGCGGACCATTGGTCGTTGGAGACGAATTGATCGGCATC
GTCTCTTGGGGATACGGCTGCGCGCGCCCTAACTACCCTGGAGTCTATGGCTCTGTCCCTGCTATGAG
GGACTATGTCTATAATATCACGGGCTTGCACCACCACCACCACCCTGAATAATATTATAGTTGACCA
GAGGGCCAGTGGTAGGAGGCTGCTATAGTCAAAGTTGGTCACAGAGGGAAGAGTTAGTCGCAGAG
GAGTCGTTTGAGTAYTR

Anhang 17: Sequenzierungsergebnisse pYMS15 mit den Oligonukleotiden 29, 254, 255, 130

>pYMS15_29

TACACACAACAAGCTTATCGCCATGCGTTTCTTCGCTGCCTTCGCGGCTGCTACTGTCTTATTGGCGG
AACCTGTGCTTTCAGCACCAGGGCCGTCCTTGAAGTCGGTGGAAAGATTCCCCGGACAGACCACCGG
GAAATACATTGTCAAGCTCAGACCCGGTGTGTGCGCAAGCAATGGATTGCAAGCTCAGGCTCGCC
GCCAACACCGTTAACTGGGGCCTCATCAACGGGTTTGTGGTTAGCGTTCCTACTATCATGGTGTCA
ATGTTTCGGTCGCGACTGACTTCCAATCTCACCTAGGCATTCTGAACGACCAGGCTCTCAACACCTTG
AGAGAATCTGAGGATGTAGAGTACATCACTGAGGACGGTATCATGCACACCATGTCCCCTGTCACCC
AGTAGGACATCCTTTCACGTTTCGGTGTGGTTGGGTGTACTIONTCCCCTGGATCAGGTCCGATGCTCC

TTGGGGTCTTCAAAGGGTCAGCCAGGCCGCGAGGCTCAGCAACACGGATGTCGCGTACGATTAGCC
TCCATTACGCCTCGTCTGCGCATTTCTAATCCATTCCGAAAGTGCACTCGACTATCAGTACACCTACGA
TTCTTCGGCCGGTAGCGGTGTCGACATCTATATTGCCGGTGCGCGTTCAATCTCCTCTTACTGCCTTCG
AGATCGTGGCTGAGATTTTCGGATAGATACCGGTGGGTAATCGTTCATTTA

>pYMS15_254

GCCGGTGCGCGTTCAATCTCCTCTTACTGCCTTCGGAAGATCGTGGCTGACATTTTCGGATAGATAACC
GGTGGGTAATCGTTCATAATTTTATGACTTGTACAAAGAACCATCTCACCATTCAATTTGATTGGCAGG
TATACTGGTCTCTCATGTATGTGTCTTGCCCCTCGTGGAGCATGAGTTGGCATGTGCTGATCGACGAC
TGTACAGTCCCAATTTGGTGGACGAGCTCGATGGGGAGGTACCTTCGGTGTACAGGGTAAGCCCCT
AGCCCCTGAACACCGCACACTGACCGTTAATGGTCTGCTTCATCAGCACCCTGATGGTCACGGTCAT
GGAACCCATTGCGCGTAAGTTATCTCGTCAACCTCTCGCCCAAATCTCTAAAGCTCATTGGGCTCCTA
TATCTTTAGCGGCACCGCTGCTGGCGCCCAGTTCGGTGTGCAAAGAACGCCTCTCTCATCGCCGTCA
AGGTTTTGACTGATGGAGGGTATGTCTCCCTTCAGTTCGCATCCCCTTGAAGGCACCACTGACACGC
CTATCTGCAGATCTGGAAGCATTGCTGGATGTGAAGCTCCTGATCCCTTTGAGAAAATCAACGGTCTA
AATAT

>pYMS15_255 (revers komplementiert)

ATACCGGTGGGTAATCGTCTAATTTATGACTTGTACAAAGAACCATCTCACCATTCAATTTGATTGGC
AGGGATACTGGTCTCTCATGTATGTGTCTTGCCCCTCGTGGAGCATGAGTTGGCATGTGCTGATCGA
CGACTGTACAGTCCCAATTTGGTGGACGAGCTCGATGGGGAGGTACCTTCGGTGTACAGGGTAAG
CCCCTAGCCCCTGAACACCGCACACTGACCGTTAATGGTCTGCTTCATCAGCACCCTGATGGTCACG
GTCATGGAACCCATTGCGCGTAAGTTATCTCGTCAACCTCTCGCCCAAATCTCTAAAGCTCATTGGGC
TCCTATATCTTTAGCGGCACCGCTGCTGGCGCCCAGTTCGGTGTGCAAAGAACGCCTCTCTCATCGC
CGTCAAGGTTTTGACTGATGGAGGGTATGTCTCCCTTCAGTTCGCATCCCCTTGAAGGCACCACTGA
CACGCCTATCTGCAGATCTGGAAGCATTGCTGGAATGTGAAGCTCCTGATCCCTTTGAGAAAATCAA
CGGTCTAAATATCATTTCCAGTGTCTCTGGCTTGGATTGGATTAGAACCCAAGTTGCCGCTTCTGGAA
GGCCCTCGGTTGTTTCATGTCCCTTGCGGCAGTGCCTCGACTGCTCTTGAC

>pYMS15_130 (revers komplementiert)

TGAAGCCTCGGTGTTCCATGTCCCTGGCGGCAGTGCCTTGACTGCTTCTTGACAATGCTGTCGCCAGT
GTGAGCTCAACCCCGTCCCTCATGATCTGGGTTTGCCTGACTTTCCTCGTCTAGTTAACGGCCGCTGG

AATCCACGTTACCGTAAGTCGCATCTGAAGAAATCTGCCGTCACCTTACTGAACACCTATTGGTATAGG
TTGCTGCTGGGAACGACAACAGGGATGCTGCCAACACTTCTCCCGCAAGGACACCCTCTGCCATCAC
CGTTGGTGCACCGACATTCAGGATGGCAAAGCCTCATTCTCCAACCTTCGGCGCGGCCGTCGACGTA
TTTGACCTGGACAGAATGTCATCAGCGCATGGATCGGTGCCAGCAACTCGGTGTGTTCCCTCCCATG
GATGTTTCTCCGGGAGTCTCCTGACCGAGTCATGTTAGGCAACCAACAGCATCTCTGGAACCTTCGATG
GCCACGCCCCATGTCGCTGGCTTGGTCGCGTACTTGATCTCAAAGGACGGAAATATCTCTCCTGCTGC
TATGGAGGCCAAGATCAAGGACCTTTCTGTCAAGGGAGCTGTCACTGGCCTTCGTACGTGTCCCAGA
CTACACGCATACCTCGTCTAATCCATCATTGTAGCTTCTACAACCTGCCAACAACTTGCGCAGATCGG
CCCTCTGTAA

Anhang 18: Sequenzierungsergebnisse pYMS15c mit dem Oligonukleotid 130

>pYMS15c_130 (revers komplementiert)

TGAAGCCTCGGTGTTCCATGTCCCTGGCGGCAGTGCCTTGACTGCTTCTTGACAATGCTGTGCGCCAGT
GTGAGCTCAACCCCGTCCCTCATGATCTGGGTTTGCCTGACTTTCCTCGTCTAGTTAACGGCCGCTGG
AATCCACGTTACCGTAAGTCGCATCTGAAGAAATCTGCCGTCACCTTACTGAACACCTATTGGTATAGG
TTGCTGCTGGGAACGACAACAGGGATGCTGCCAACACTTCTCCCGCAAGGACACCCTCTGCCATCAC
CGTTGGTGCACCGACATTCAGGATGGCAAAGCCTCATTCTCCAACCTTCGGCGCGGCCGTCGACGTA
TTTGACCTGGACAGAATGTCATCAGCGCATGGATCGGTGCCAGCAACTCGGTGTGTTCCCTCCCATG
GATGTTTCTCCGGGAGTCTCCTGACCGAGTCATGTTAGGCAACCAACAGCATCTCTGGAACCTTCGATG
GCCACGCCCCATGTCGCTGGCTTGGTCGCGTACTTGATCTCAAAGGACGGAAATATCTCTCCTGCTGC
TATGGAGGCCAAGATCAAGGACCTTTCTGTCAAGGGAGCTGTCACTGGCCTTCGTACGTGTCCCAGA
CTACACGCATACCTCGTCTAATCCATCATTGTAGCTTCTACAACCTGCCAACAACTTGCGCAGATCGG
CCCTCTGCACCACCACCACCACCTAAATAATATT

Anhang 19: Sequenzierungsergebnisse pYMS25 mit dem Oligonukleotid 29.2

>pYMS25_29.2

ATGTTCTCGGTGTTTtaggggTTAGCAATCTGATATGATAATAATTTGTGATGACATCGATAGTACAAA
AACCCCAATTCCGGTCACATCCACCATCTCCGTTTTCTCCCATCTACACACAACAAGCTTATCGCCATG
TTCAAGAACCTCCTCTCGTTCGCCCTTCTGGCGATCAGCGTTGCCAACGCTCAGATCGTCAATTCTGCC
156

ATGGCACCAGGGCCGTCCTTGAAGTCGGTGGAAAGATTCCCCGGACAGACCACGGGAAATACATT
GTCAAGCTCAGACCCGGTGTGTGCGCAAGCAATGGATTGCAAGCTCAGGCTCGCCGCCAACACC
GTTAACTGGGGCCTCATCAACGGGTTTGTGGTTAGCGTTCCTACTATCATGGTGTCAATGTTTCGG
TCGCGACTGACTTCCAATCTCACCTAGGCATTCTGAACGACCAGGCTCTCAACACCTTGAGAGAATCT
GAGGATGTAGAGTACATCACTGAGGACGGTATCATGCACACCATGTCCCCTGTACCCAGTAGGACA
TCCTTTCACGTTCCGGTGTGGTTGGGTGTACTTACTCCCCTGGATCAGGTCCGATGCTCCTTGGGGTCT
TCAAAGGGTCAGCCAGGCCGCGAGGCTCAGCAACACGGATGTCGCGTACGATTAGCCTCCATTACG
CCTCGTCTGCGCATTTCTAATCCATTCCGAAAGTGCCTCGACTATCAGTACACCTACGATTCTTCGGC
CGGTAGCGGTGTCGACATCTATATTGCCGGTGCAGTTCAATCTCCTTACTGCCTTCGGAAGATCG
TGGCTGACATTTTCGGATAGATACCGGTGGGTAATCGTTCTAATTTTATGACTTGTACAAAGAACCAT
CTCACCATTCAATTTGATTGGCAGGTATACTGGTCTCTCATGTATGTGTCTTGCCCCCTCGTGGAGCATG
AGTTGGCATGTGCTGATCGACACTGTACAGTCCCAATTTGGTGGACGAGCTCGATGGGGGAGGTA
CCTTCGGTGTACAGGGTAAGCCCCTAGCCCCTGAACACCGCMACTGACCGTTAATGGTCTGGCTT
CATCA

Anhang 20: Nukleotidsequenz der Laccase Lcc8 aus *Coprinopsis cinerea* Okayama 7 (#130)
(Entnommen aus der Datenbank ENA (<https://www.ebi.ac.uk/ena>), Accession Nummer
DAA04513.1). Unterstrichen dargestellt ist das vermeintliche Signalpeptid.

>ENA|DAA04513|DAA04513.1 *Coprinopsis cinerea* okayama7#130 laccase 8

ATGTCGCCTGCTGTCATCGCCGCTGGGTCAACTTCTTTCCCGTTCGTCGGCTCCGTGGCAACGCTCAA
CATCGGTAACGCAAACTTGTGCGCCGGATGGCTTTGAAAGACCATCTTCCGTCGTCAACGGTGTTCCTC
CTGCTCCTCTCATCAAGGCCAACAAAGGGAGACCACTTCAGTCTCAACGTTGTCAATGATATGACGGAC
GATACCCAATTCCGCGCCACCTCCATCCACTGGCATGGTATCTATCAGAAGCATACAAACCTGGGCTGA
CGGTGTTGCTGGTGTCAACCAATGTCCTATCGGTCCAGGCGACTCCTCCTCTACCAATTCGATGTTCC
GAACCAAGCTGGAACGTTCTGGTACCATTTCGATTTCCGCACCCAATACTGCGATGGACTGCGCGGC
CCGCTTGTTATCTACGACCCTGAGGATCCTTACAGAGACTTGTACGATGTTGACGACGAAAACACTGT
CATCACCATCGGAGACTGGTACCACCTCCAGTCACCTTCATCACTGGCGTGGCTTCCAACGATGCAA
CAGTCATCAACGAAAGGGCCGCTACGTCGGTGGTCCGCTAGTTGACCTAGCCATCATCAACGTCGT
TCCCGGAAAGCGCTATCGGCTTCAATCATGGCCATATCATGCGATCCTAACTATATCTTCTCGATTG
ACGGTCACCAATTGACGGTCATCGAAGCGGATGCGCAATCGACGCAGCCTTTGGTAGTGGATAGTAT
TCAGATTTTCGCTGGTCAACGGTACTCTGCCATCCTCACCGCCGACCAGCCCATTGGCAA

TTCGTGCTCTGCCAACTCTGGCAACAACAACCTATTCACGGGCTTCATCGACGGAACCAACTCCGCC
ATCCTGCGGTACGCCGGCGCACCCATCGCAGACCCGACCACCTCCGCGCCCGACGCCCCGTCTCCT
CGACGAGACGCTCCTCGTTCCCCTCGACACCACGCCCGTCCCAGGACAGCCCTTCCCCGGCGGCGCC
GACGTCAACCTCTTGTTGAATTTGGACTTTAATGTGGACGCGTGGAGGTTTTATGTTAACAACGAGAC
GTTCAACCCCCGACTGTGCCCGTGCTGTTGCAGGTTATGAGTGGGGCTGTTGCGGCGCAGGATTTG
TTACCCGCGGGTTCGGTGTATACCCTTCTCCCAACGCGAGCGTTGAGATTCGATTCCGGGAGGTGT
GATTCGAGTCCTCATCCTTTCCATTTGCACGGGCATTCTTCAGCGTCGTCAAATCAGCCGGCATCG
ACACGCCCTACAACCTACGTCAACCCTGTCAAGCGCGACGTGGTGAGCACGGGCGACGTAGGGTCCA
ACACCACGATCCGGTCTTACCGACAACAGCGGGCCGTGGATCCTCCACTGCCACATCGACTGGCA
CCTCGACCTCGGGCTCGCCATCGTGCTCGCTGAGGACCCCGTCGGCACCCCCGCGCTCAACCCACG
CCGCAGGATTGGGACGACCTCTGCCCGGCGTATGATGCGCTTGATCCTAGTATGACGGAGATTGCG
GTGGTCGCGACCCCGAGCCCGTTGGACCCGCGAGGTGGTGAGTGTGCCGGAGAGTTATTTGGCGACG
AGTACGGAGGCGGAGGATGTGACTGTTACGGTTACGGTTACTGTTACGGAGGGTGATGATGCTGCG
GCTACTGATTCGTCGTGA

Anhang 21: Sequenzierungsergebnisse pYMS33 mit den Oligonukleotiden 29, 130.2 und 29.2

>pYMS33_29

CCTTAATACCTCGAGAACCTAGATCTCCGTCGTCAACGGTGTTTTCCCTGCTCCTCTCATCAAGGCCA
ACAAGGTAAAGAACATCCTTGGAACGTATGCACTGTAACGATTACAGGGAGACCACTTCAGT
CTCAACGTTGTCAATGGTATGACGGACGATACCCAGTTCGCGCCACCTCCATCGTACGCCGTCTCT
TCTCCCCTCCCATATTGACTTAACCCTTCCCTAGCATTGGCATGGTATCTACCAGAAGCACACTAAC
TGGGCTGACGGTGTGCTGGCGTCAACCAATGTCCTATTGGCCCAGGCGACTCCTTCTCTACCAATT
CGATGTTCTAACCAAGCCGGAACGTTCTGGTACCACTCGCATTTCGTTGAGTTCACTTACCTTCTTCG
GTGAATAGACGGATCTGACTACATTCCGTAGGCACCCAATACTGCGATGGACTCCGCGGCCCGCTTG
TTATCTACGACCCTGAGGATCCTTACAGAGACCTGTACGATGGTAAGCTGTCCCCTCTCCCTTCTCTC
TCCCCGCACACGATCTGACTTTGTCCTCAGTTGACGACGAAAACACTGTCATCACCATCGGAGACTGG
TACCACCTCCAGTCACCTTCCATCACTGGCGTTGCTTCCAACGATGCAACAGTCATCAACGGAAAGGG
CCGCTACGTCGGTGGTCCGCTAGTTGACCTAGCCATCATCAACGTCGTTCCCGGAAAGCGCTATCGG
CTTCGAATCATGGCCATATCATGCGATCCTAACTATATCTTCTCGATTGACGGTCACCAATTGACGGTC
ATCGAAGCGGATGCGCAATCGACGCAGCCTTTGGTAGTGGATAGTATTCAGATTTTCGCTGGTGAGC
ACCCCTTCGTTGTTCCGGGATTTGAACGGGCAGTGACACAAAGTGGGATGCACTCTAGGTCAACGGTA

CTCTGCCATCCTCACCGCCGACCAGCCCATTGGCAACTACTGGATTTCGTGCTCTGCCAACTCTGGCA
ACAACAACCTATTCACGGGCTTCATCGACGGAACCAACTCCGCCATCCTGCGGTACGCCGGSGCACC
CMT

>pYMS 33_130.2 (revers komplementiert)

GAARCGGAWGCGCAATSGASGCAGCCNTTGGTAGTGGATAGTATTCAGATTTTCGMTGGTGAGCAC
CCCTTMGTTGTTTCGGGANTTGAACGGGCAGTGACACAAAGTNGGATGCACTCTAGGTCAACGGTAC
TCTGCCATCCTCACSCCGACCAGCCCATTGGCAACTACTGGATTTCGTGCTCTGCCAACTCTGGCAAC
AACAACCTATTCACGGGCTTCATCGACGGAACCAACTCCGCCATCCTGCGGTACGCCGGCGCACCCA
TCGCAGACCCAACCACCTCCGCGCCCGACGCCCCGTCCTCCTCGACGAGACGCTCCTCGTTCCCCTC
GACACCACGCCCCTCCAGGACAGCCCTTCCCCGGCGGCGCCGACGTCAACCTCCTGTTGAATTTGG
ACTTTAATGTGGACGCGTGGAGGTTTTATGTTAACAACGAGACGTTCAACCCCCGACTGTGCCTGT
GCTGTTGCAGGTTATGAGTGGGGCTGTTGCGGCGCAGGATTTGTTACCCGCGGGTTCGGTGTATACC
CTTCTCCAACGCGAGCGTTGAGATTTTCGATTCCGGGAGGTGTGATTTTCGAGTCCTCATCCTTTCCA
TTTGACGGGGTGCCTTCAGCCTCGTCTTTTTCTCCGTCCTGTCGTACTIONTCTCATTAC
GCTTACGACTATAGCATTCTTCAGCGTCGTCAAATCAGCCGGCATCGACACGCCCTACAACACTACGTC
AACCCGGTCAAGCGCGACGTGGTCAGCACGGGCGACGTAGGGTCCAACACCACGATCCGGTTCTTC
ACCGACAACAGCGGGCCGTGGATCCTCCACTGCCACATCGACTGGCACCTCGACCTCGGGCTCGCCA
TCGTGCTCGCTGAGGACCCCGTCGGCACCCCGCGCTCAACCCGACGCCGAGGACTGGGACGACCT
CTGCCCGCGTATGATGCGCTTGATCCTAGTATGACGGAGATTGCGGTGGTCGCGACCCCGAGCCCG
TTGGACCCGAGGTGGTGAGTGTGCCGGAGAGTTATTTGGCGN

>pYMS 33_15_1_P29.2

CGTCTCGATGTTCTCGGTGTTTAGGGGTTAGCAATCTGATATGATAATAATTTGTGATGACATCGATA
GTACAAAACCCCAATTCCGGTCACATCCACCATCTCCGTTTTCTCCCATCTACACACAACAAGCTTAT
CGCCATGTTCAAGAACCTCCTCTCGTTCGCCCTTCTGGCGATCAGCGTTGCCAACGCTCAGATCGTCA
ATTCTGTCGATACCATGACCCTACCAACGCAAACCTTGTCGCCGGATGGCTTTGAAAGACCGTGAGTT
CTCTCGATGTCTGCTGGTCCTATTCGTCCCTAATACCTCGAGAACCTAGATCTTCCGTCGTCAACGGT
GTTTTCCCTGCTCCTCTCATCAAGGCCAACAAGGTAAAGAACATCCTTGGTAACGTATGCACTGTACT

AAACGATTACAGGGAGACCACTTCAGTCTCAACGTTGTCAATGGTATGACGGACGATACCCAGTTCC
 GCGCCACCTCCATCGTACGCCGTCCTCTTCTCCCCTCCCATATTCGACTTAACCCTTCCCTAGCATTGG
 CATGGTATCTACCAGAAGCACACTAACTGGGCTGACGGTGTGCTGGCGTCAACCAATGTCCTATTG
 GCCCAGGCGACTCCTTCTCTACCAATTCGATGTTCTAACCAAGCCGGAACGTTCTGGTACCACTCG
 CATTTCCGTGAGTTCACTTACCTTCTTCGGTGAATAGACGGATCTGACTACATTCCGTAGGCACCCAA
 TACTGCGATGGACTCCGCGGCCCGCTTGTATCTACGACCCTGAGGATCCTTACAGAGACCTGTACG
 ATGGTAAGCTGTCCCCTCTCCCTTCTCTCTCCCCGCACACGATCTGACTTTGTCCTCAGTTGACGACG
 AAAACACTGTCATCACCATCGGAGACTGGTACCACCTCCAGTCACCTTCCATCACTGGCGTTGCTTCC
 AACGATGCAACAGTCATCAACGGAAAGGGCCGCTACGTCGGTGGTCCGCTAGTTGACCTAGCCATCA
 TCAACGTCGTTCCCGGAAAGCGCTATCGGCTTCGAATCATGGCCATATCATGCGATCCTAACTATATC
 TTCTCGATTGACGGTCACCAATTGACGGTCATCGAAGCGGATGCGCAATC

Anhang 22: Sequenzierungsergebnisse Lcc8: Laccase Peptide detektiert mittels LC-MS/MS und Mascot Suche. Die mittels SDS-PAGE und Laccase-Zymogram detektierten Banden der Lcc8 wurden als Bande 1 (die obere Bande) und Bande 2 (die untere Bande) bezeichnet.

| Enzym (Accession Nummer) und Peptide ^a | Bande 1 (obere) | Bande 2 (untere) |
|---|-----------------|------------------|
| Lcc8 (okayama 7: Q08AB9, AmutBmut: 440433) | | |
| AIVLAEDPVGTPA | 18 | 19 |
| ALPNSGNLFTGFIDGTNSAILR | 21 | 30 |
| ANKGDHFSLN | | 14 |
| ANLSPDGFERPSSVNVGVFPAPLIK | | 24 |
| AQSTQPLVVDSIQIFAGQR | | 24 |
| ATSIHWHGIYQK | | 12 |
| DTPVPGQPFPGGADV N | | 12 |
| DVVSTGDVGSNTTIR | | 17 |
| FFDNSGPWILH | | 14 |
| GDHFSLVVNDMTDDTQFR | | 12 |
| GPLVIYDPEDPYR | 20 | 23 |

| Enzym (Accession Nummer) und Peptide ^a | | |
|---|---------------|--------------|
| HLQSPSITGVASNDATVINGK | | 26 |
| HTNWADGVAGVNQ | | 15 |
| IMAIscDPNYIFSIDGH | | 21 |
| ITGVASNDATVINGK | 21 | (24) |
| LDFNVDAWR | | 14 |
| NANLSPDGFER | 10 | (11) |
| PSSVVNGVFPAPLIK | 22 | (22) |
| QCPIGPGDSF | | 12 |
| QLTVIEADAQSTQPL | 14 | 11 |
| SAGIDTPYNYVNPVKR | 27 | 25 |
| SGAVAAQDLLPAGSVY | 23 | 24 |
| TQYCDGLR | 13 | 11 |
| VNDMTDDTQFR | 13 | (9) |
| VPVLLQVM | | 11 |
| VVDSIQIFAGQR | 15 | (20) |
| YAGAPIADPTTSAPDAPVLL | 17 | (25) |
| YAGAPIADPTTSAPDAPVLLDETLLVPL | | 16 |
| YSAILTADQPIGN | 21 | (21) |
| YSAILTADQPIGN ^b YWIR | | 25 |
| YVGGPLVDLAIINVVPGK | 22 | (25) |
| YVGGPLVDLAIINVVPGKR | | 26 |
| Totaler Protein score | 277 | 438 |
| Protein Abdeckung (%) | 38 | 63 |
| | | |
| | | |
| Lcc5 (DAA04510) | 218:10 | 306:2 |
| R.INVVNNLDDDTMLR.Q | 55 | |
| R.RPGNTEGDIAVVNVEK.D | | |
| R.YSVVVNADQAIGNYWIR.A | 73 | |

| | | |
|---|----------------|--------------|
| Enzym (Accession Nummer) und Peptide^a | | |
| R.AEPNIGDTGLVGTSGGGVNSAILR.Y | 62 | |
| R.YATADEVDPDTPR.L | 71 | |
| R SAGGSPNFVDPVR.R | | |
| R.DVVAVGTEAGQGDTIIR.F | 101 | 45 |
| Totaler Protein score | 427 | 45 |
| Protein Abdeckung (%) | 24 | 3 |
| | | |
| | | |
| Lcc2 (DAA04507) | 306:6 | JV6:6 |
| R.SAVLAGATQPTVQFPGPVIQGNK.N | 55 | |
| K.NSFFAINVIDALDPTMLR.T | 78 | |
| R.ANPNIGTTGFVGGVNSAILR.Y | 46 | |
| R.SAGSSTYNFANPVR.R | | 49 |
| Totaler Protein score | 284 | 65 |
| Protein Abdeckung (%) | 22 | 5 |
| | | |
| | | |
| Lcc9 (DAA04514) | 306:6/7 | AT8:5 |
| R.INVVNDLNDPTMLR.Q | | 67 |
| R.RPGGPETDIAIVNVQR.N | 51 | 51 |
| R.AIPNVGSNNLPNFSSGGINSAILR.Y | 54 | 76 |
| Totaler Protein score | 220 | 319 |
| Protein Abdeckung (%) | 15 | 30 |
| | | |
| | | |
| Lcc10 (DAA04515) | 306:6+7 | 306:7 |
| R.GPLVIYDDNDPYK.N | 49 | 66 |
| R.YSFILEANQPVGNYWIR.A | 45 | |
| R.NLPDFSSGGINSAILR.Y | | 70 |

| | | |
|---|------------|------------|
| Enzym (Accession Nummer) und Peptide^a | | |
| R.SAGSDTYNYVNPVR.R | 57 | 68 |
| Totaler Protein score | 188 | 247 |
| Protein Abdeckung (%) | 11 | 11 |

^a Peptide stellt die Peptidsequenz dar, welche durch Mascot gefunden wurden; Totaler Protein score ist ein Wert, der die Qualität des Treffers darstellt; Protein Abdeckung stellt den prozentualen Anteil aller gefundenen Peptide zur Proteinsequenz dar

^b Die Banden 1 (obere) und 2 (untere) entsprechen den Banden, wie sie in Abbildung 42 dargestellt sind.

Anhang 23: Rohdaten der GraphPad Prism Analyse zur Berechnung Km der Lcc8 zu ABTS und DMP

| | ABTS | DMP |
|-----------------------------------|------------------|-------------------------|
| Michaelis-Menten | | |
| Best-fit values | | |
| Vmax [OD min⁻¹] | 0,3426 | 0,2028 |
| Km [mM] | 0,7919 | 0,08774 |
| Std. Error | | |
| Vmax | 0,004665 | 0,004721 |
| Km | 0,03758 | 0,009413 |
| 95% Confidence Intervals | | |
| Vmax | 0,3330 to 0,3523 | 0,1930 to 0,2126 |
| Km | 0,7140 to 0,8699 | 0,06821 to 0,1073 |
| Goodness of Fit | | |
| Degrees of Freedom | 22 | 22 |
| R square | 0,9934 | 0,9491 |
| Absolute Sum of Squares | 0,001580 | 0,003659 |
| Sy.x | 0,008475 | 0,01290 |
| Constraints | | |
| Km | Km > 0,0 | Km > 0,0 |
| Number of points | | |
| Analyzed | 24 | 24 |

Anhang 24: Aminosäuresequenz der Rdo_c6991, welche durch pPIC9K-KPep codiert wurde.

Der unterstrichene Teil stellt das mittels SignalP4.1 vorhergesagte Signalpeptid dar. Das berechnete Molekulargewicht beträgt ca.55 kDa.

MIGLLLVLCLFGSWITVSAETIYIEEKYVEVPVDHFSFANNATFRMRYLYNDTYWAYKGIPIFFYPGNEGAIE
MFAQNTGFMWAAAREFGALVIFAEHRYYGKSMPIFGNMSLTEPKYSGYLTSSQAMADYVYLLDLLQKTT
MYMVSAKRQRPVIAFGGSYGGMLAAWMRMKYPSTILGAIASSAPIFQFSDLTPCDSFNRIVTTDFKSSTD

GDCTILIQRSWETIKEIAVTSAGKGWISNTFKLCEPLQSNEQVERFLDWISQIYGNVAMINYPYPTDFLNPV
 PGYPVREVCERLLDTSLRDKALVDAVFNAISVYTYNYTGQTKCNALNSTSGKMDENAWDFQACTELIMPF
 CSTDNDMFENEAWDFEEFSEACYKRWGVKMLRPDVAVLEYGGKDLAYSNIIFSNGLLDPWAPGGVLH
 DISDSVRAFIPEAAHHLDLREDNPNDPESVRQARNFHRQTIRGWLKNYYESKKRSTLLVD

Anhang 25: Phospholipase A2 Sequenz: >ENA|AY359866|AY359866.1
Streptomyces violaceoruber strain 2917 phospholipase A2 gene, complete cds. :
 Location:1..453; Unterstrichen ist der Teil der als Sekretionsdomäne verwendet wurde. Das
 berechnete Molekulargewicht beträgt ca.14 kDa.

GTGCGCACCACCACCAGGACCCGGACCACGCTCGCCGCCGTCGGTGCGGCGCTCGCCCTCGGCGTC
GCCGCCGCGCCCCCAGGCGGCCCGCGGACAAGCCCCAGGTACTCGCTCCTTACCCAGACCA
GCGCGTCCAGCCAGAACGCCTGGCTCGCGGCGAACCGGAACCAGTCCGCCTGGGCCGCTACGAGT
TCGACTGGTCCACGGACCTGTGCAGCCAGGCGCCCGACAACCCCTTCGGCTTCCCGTTCAACACGGC
CTGCGCGCGCCACGACTTCGGTTACCGCAACTACAAGGCGGCGGGCAGCTTCGACGCCAACAAAGAG
CCGCATCGACAGCGCCTTCTACGAGGACATGAAGCGCGTCTGCACCGGCTACACCGGCGAGAAGAA
CACGGCCTGCAACAGCACCGCCTGGACCTACTACCAGGCCGTCAAGATCCTCTAG

Anhang 26: Ergebnisse der linearen Regression durch GraphPad Prism für die Berechnung von V_{max} der gereinigten Rdo_c6991.

| | Blank | Rdo_c6991 |
|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| Best-fit values | | |
| Slope | 1,247e-005 ± 3,156e-005 | 0,0001139 ± 2,163e-005 |
| Y-intercept when X=0.0 | 0,05017 ± 0,0006240 | 0,05301 ± 0,0004277 |
| X-intercept when Y=0.0 | -4025 | -465,5 |
| 1/slope | 80225 | 8782 |
| 95% Confidence Intervals | | |

| | | |
|----------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Slope | -5,056e-005 to 7,549e-005 | 7,066e-005 to 0,0001571 |
| Y-intercept when X=0.0 | 0,04893 to 0,05142 | 0,05215 to 0,05386 |
| X-intercept when Y=0.0 | -infinity to -650,4 | -760,6 to -332,8 |
| Goodness of Fit | | |
| R square | 0,002289 | 0,2895 |
| Sy.x | 0,002666 | 0,001828 |
| Is slope significantly non-zero? | | |
| F | 0,1560 | 27,71 |
| DFn, DFd | 1,000, 68,00 | 1,000, 68,00 |
| P value | 0,6941 | < 0,0001 |
| Deviation from zero? | Not Significant | Significant |
| Data | | |
| Number of X values | 35 | 35 |
| Maximum number of Y replicates | 2 | 2 |
| Total number of values | 70 | 70 |
| Number of missing values | 0 | 0 |

6 References

- Amelung, F.C.H. (2019). Neuartige Enzyme aus Basidiomyceten für technische Anwendungen. Dissertation (Gießen).
- Archer, D.B. and Peberdy, J.F. (1997). The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Critical reviews in biotechnology* 17, 273–306.
- Aslantas, Y. and Surmeli, N.B. (2019). Effects of N-Terminal and C-Terminal Polyhistidine Tag on the Stability and Function of the Thermophilic P450 CYP119. *Bioinorganic chemistry and applications* 2019, 8080697.
- Avihoo, A., Gabdank, I., Shapira, M., and Barash, D. (2007). In Silico Design of Small RNA Switches. *IEEE Trans.on Nanobioscience* 6, 4–11.
- Aza, P., Salas, F. de, Molpeceres, G., Rodríguez-Escribano, D., La Fuente, I. de, and Camarero, S. (2021). Protein Engineering Approaches to Enhance Fungal Laccase Production in *S. cerevisiae*. *International journal of molecular sciences* 22.
- Ballance, D.J., Buxton, F.P., and Turner, G. (1983). Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 112, 284–289.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 411–421.
- Bause, E. (1983). Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *The Biochemical journal* 209, 331–336.
- Beauvais, A., Monod, M., Debeauvais, J.P., Diaquin, M., Kobayashi, H., and Latgé, J.P. (1997). Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of biological chemistry* 272, 6238–6244.
- Bertucci, J.I., Liggieri, C.S., Colombo, M.L., Vairo Cavalli, S.E., and Bruno, M.A. (2015). Application of peptidases from *Maclura pomifera* fruit for the production of active biopeptides from whey protein. *LWT - Food Science and Technology* 64, 157–163.
- Binninger, D.M., Skrzynia, C., Pukkila, P.J., and Casselton, L.A. (1987). DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *The EMBO Journal* 6, 835–840.
- Blow, D.M. (1976). Structure and mechanism of chymotrypsin. *Accounts of Chemical Research* 9, 145–152.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93–99.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–254.

- Brakhage, A.A., Andrianopoulos, A., Kato, M., Steidl, S., Davis, M.A., Tsukagoshi, N., and Hynes, M.J. (1999). HAP-Like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: implications for biotechnology. *Fungal genetics and biology : FG & B* 27, 243–252.
- Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T., and Eggert, T. (2006). Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *Journal of molecular biology* 362, 393–402.
- Burns, C., Gregory, K.E., Kirby, M., Cheung, M.K., Riquelme, M., Elliott, T.J., Challen, M.P., Bailey, A., and Foster, G.D. (2005). Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns. *Fungal genetics and biology : FG & B* 42, 191–199.
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Río, J.C., Gutiérrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martínez, M.J., and Martínez, Á.T. (2004). Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 113–120.
- Carraway, K.L. and Hull, S.R. (1989). O-glycosylation pathway for mucin-type glycoproteins. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 10, 117–121.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews* 24, 45–66.
- Chen, Q.M., Geng, Y.Q., Ni, J., Wang, G.F., and Hjiang, R.Z. (1989). Study on *Bacillus pumilus* as a recipient strain for genetic engineering of *Bacillus*. *Acta Gen. Sinica*, 206–212.
- Cheng, S., Yang, P., Guo, L., Lin, J., and Lou, N. (2009). Expression of multi-functional cellulase gene *mfc* in *Coprinus cinereus* under control of different basidiomycete promoters. *Bioresource technology* 100, 4475–4480.
- Chiou, C.-H., Miller, M., Wilson, D.L., Trail, F., and Linz, J.E. (2002). Chromosomal location plays a role in regulation of aflatoxin gene expression in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and environmental microbiology* 68, 306–315.
- Conde, R., Cueva, R., Pablo, G., Polaina, J., and Larriba, G. (2004). A search for hyperglycosylation signals in yeast glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 279, 43789–43798.
- Conesa, A., Jeenes, D., Archer, D.B., van den Hondel, C.A.M.J.J., and Punt, P.J. (2002). Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology* 68, 846–851.
- Costa, A.M.S.B., Mills, P.R., Bailey, A.M., Foster, G.D., and Challen, M.P. (2008). Oligonucleotide sequences forming short self-complementary hairpins can expedite the down-regulation of *Coprinopsis cinerea* genes. *Journal of microbiological methods* 75, 205–208.
- Couto, S.R. and Toca-Herrera, J.L. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology advances* 25, 558–569.

- Cullen, D., Gray, G.L., Wilson, L.J., Hayenga, K.J., Lamsa, M.H., Rey, M.W., Norton, S., and Berka, R.M. (1987). Controlled Expression and Secretion of Bovine Chymosin in *Aspergillus Nidulans*. *Nat Biotechnol* 5, 369–376.
- Degering, C., Eggert, T., Puls, M., Bongaerts, J., Evers, S., Maurer, K.-H., and Jaeger, K.-E. (2010). Optimization of protease secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by screening of homologous and heterologous signal peptides. *Applied and environmental microbiology* 76, 6370–6376.
- Deshpande, N., Wilkins, M.R., Packer, N., and Nevalainen, H. (2008). Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. *Glycobiology* 18, 626–637.
- Despreaux, C.W. and Manning, R.F. (1993). The *dacA* gene of *Bacillus stearothermophilus* coding for d-alanine carboxypeptidase: cloning, structure and expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Gene* 131, 35–41.
- Diefenthal, T., Dargatz, H., Witte, V., Reipen, G., and Svendsen, I. (1993). Cloning of proline-specific endopeptidase gene from *Flavobacterium meningosepticum*: expression in *Escherichia coli* and purification of the heterologous protein. *Applied microbiology and biotechnology* 40.
- Dörnte, B. and Kües, U. (2012). Reliability in Transformation of the Reliability in Transformation of the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 340–355.
- Dörnte, B. and Kües, U. (2013). Fast Microwave-based DNA Extraction from Vegetative Mycelium and Fruiting Body Tissues of Agaricomycetes for PCR Amplification. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 825–836.
- Dörnte, B. and Kües, U. (2016). Paradoxical performance of tryptophan synthase gene *trp1* (+) in transformations of the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Applied microbiology and biotechnology* 100, 8789–8807.
- Dröge, P., Meister, G., and Schiebel, E. (2018). *Molekulare Genetik* (Thieme: Stuttgart).
- Dunn-Coleman, N.S., Bloebaum, P., Berka, R.M., Bodie, E., Robinson, N., Armstrong, G., Ward, M., Przetak, M., Carter, G.L., LaCost, R., Wilson, L.J., Kodama, K.H., Baliu, E.F., Bower, B., Lamsa, M., and Heinsohn, H. (1991). Commercial Levels of Chymosin Production by *Aspergillus*. *Nat Biotechnol* 9, 976–981.
- Eggert, C., Temp, U., and Eriksson, K.E. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and environmental microbiology* 62, 1151–1158.
- Faugeron, G. (2000). Diversity of homology-dependent gene silencing strategies in fungi. *Current Opinion in Microbiology* 3, 144–148.
- Feijoo-Siota, L. and Villa, T.G. (2011). Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food Bioprocess Technol* 4, 1066–1088.
- Ferreira, R.B., Piçarra-Pereira, M.A., Monteiro, S., Loureiro, V.B., and Teixeira, A.R. (2001). The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology* 12, 230–239.

- FISH, J.C. (1957). Activity and specificity of rennin. *Nature* 180, 345.
- Flamm, E.L. (1991). How FDA Approved Chymosin: A Case History. *Nat Biotechnol* 9, 349–351.
- Fonseca, F.P.P., Soares-Costa, A., Ribeiro, A.F., Rosa, J.C., Terra, W.R., and Henrique-Silva, F. (2012). Recombinant expression, localization and in vitro inhibition of midgut cysteine peptidase (Sl-CathL) from sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. *Insect biochemistry and molecular biology* 42, 58–69.
- Forootanfar, H. and Faramarzi, M.A. (2015). Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications. *Biotechnology progress* 31, 1443–1463.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., and Guinee, T.P. (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. General Aspects* (Elsevier professional: s.l.).
- Fraatz, M.A., Rühl, M., and Zorn, H. (2014). Food and feed enzymes. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 143, 229–256.
- FRUTON, J.S. (1970). Specificity and Mechanism of Pepsin Action. In *Structure–Function Relationships of Proteolytic Enzymes* (Elsevier), pp. 222–236.
- Galperin, I., Javeed, A., Luig, H., Lochnit, G., and Rühl, M. (2016). An aryl-alcohol oxidase of *Pleurotus sapidus*: heterologous expression, characterization, and application in a 2-enzyme system. *Applied microbiology and biotechnology* 100, 8021–8030.
- Gass, J. and Khosla, C. (2007). Prolyl endopeptidases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64, 345–355.
- Gellissen, G. and Hollenberg, C.P. (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*- a review. *Gene* 190, 87–97.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., and Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67, 369–385.
- Gouka, R.J., Hessing, J.G.M., Punt, P.J., Stam, H., Musters, W., and van den Hondel, C.A.M.J.J. (1996). An expression system based on the promoter region of the *Aspergillus awamori* 1,4- β -endoxylanase A gene. *Applied microbiology and biotechnology* 46, 28–35.
- Gouka, R.J., Punt, P.J., and van den Hondel, C.A. (1997a). Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied microbiology and biotechnology* 47, 1–11.
- Gouka, R.J., Punt, P.J., and van den Hondel, C.A.M.J.J. (1997b). Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus* : progress, limitations and prospects. *Applied microbiology and biotechnology* 47, 1–11.
- Granado, J.D., Kertesz-Chaloupková, K., Aebi, M., and Kües, U. (1997). Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. *Molecular and General Genetics* MGG 256, 28–36.

- Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B.M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H.-w., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., Kim, S.-H., Rao, Z., Shi, Y., Terwilliger, T.C., Kim, C.-Y., Hung, L.-W., Waldo, G.S., Peleg, Y., Albeck, S., Unger, T., Dym, O., Prilusky, J., Sussman, J.L., Stevens, R.C., Lesley, S.A., Wilson, I.A., Joachimiak, A., Collart, F., Dementieva, I., Donnelly, M.I., Eschenfeldt, W.H., Kim, Y., Stols, L., Wu, R., Zhou, M., Burley, S.K., Emtage, J.S., Sauder, J.M., Thompson, D., Bain, K., Luz, J., Gheyi, T., Zhang, F., Atwell, S., Almo, S.C., Bonanno, J.B., Fiser, A., Swaminathan, S., Studier, F.W., Chance, M.R., Sali, A., Acton, T.B., Xiao, R., Zhao, L., Ma, L.C., Hunt, J.F., Tong, L., Cunningham, K., Inouye, M., Anderson, S., Janjua, H., Shastry, R., Ho, C.K., Wang, D., Wang, H., Jiang, M., Montelione, G.T., Stuart, D.I., Owens, R.J., Daenke, S., Schütz, A., Heinemann, U., Yokoyama, S., Büssov, K., and Gunsalus, K.C. (2008). Protein production and purification. *Nature methods* 5, 135–146.
- Gundry, R.L., White, M.Y., Murray, C.I., Kane, L.A., Fu, Q., Stanley, B.A., and van Eyk, J.E. (2009). Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Current protocols in molecular biology Chapter 10*, Unit10.25.
- Güttel, D. (2010). Secretome Analysis in Higher Basidiomycetes - Freely Secreted and Cell Wall Proteins from *Coprinopsis cinerea*. Dissertation.
- Halliwell, C.M., Morgan, G., Ou, C.P., and Cass, A.E. (2001). Introduction of a (poly)histidine tag in L-lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules. *Analytical biochemistry* 295, 257–261.
- Han, F., Liu, Y., Guo, L.Q., Zeng, X.L., Liu, Z.M., and Lin, J.F. (2010). Heterologous expression of the immunomodulatory protein gene from *Ganoderma sinense* in the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Journal of applied microbiology* 109, 1838–1844.
- HARTLEY, B.S. (1960). Proteolytic enzymes. *Annual review of biochemistry* 29, 45–72.
- Harwood, C.R. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends in biotechnology* 10, 247–256.
- He, M., Jin, L., and Austen, B. (1993). Specificity of factor Xa in the cleavage of fusion proteins. *Journal of protein chemistry* 12, 1–5.
- Hedstrom, L. (2002a). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews* 102, 4501–4524.
- Hedstrom, L. (2002b). Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* 102, 4501–4524.
- Heijne, G. von (1990). The signal peptide. *J. Membrin Biol.* 115, 195–201.
- Hintz, W.E. and Lagosky, P.A. (1993). A Glucose-Derepressed Promoter for Expression of Heterologous Products in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Nat Biotechnol* 11, 815–818.
- Hu, J., Zhang, Y., Xu, Y., Sun, Q., Liu, J., Fang, W., Xiao, Y., Kües, U., and Fang, Z. (2019). *Gongronella* sp. w5 elevates *Coprinopsis cinerea* laccase production by carbon source syntrophism and secondary metabolite induction. *Applied microbiology and biotechnology* 103, 411–425.

- Ivey, M.L. and Phister, T.G. (2011). Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 38, 1619–1634.
- Jacobs, M., Eliasson, M., Uhlén, M., and Flock, J.I. (1985). Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic acids research* 13, 8913–8926.
- Jeon, J.-R., Baldrian, P., Murugesan, K., and Chang, Y.-S. (2012). Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. *Microbial biotechnology* 5, 318–332.
- Jiang, N., Sun, N., Xiao, D., Pan, J., Wang, Y., and Zhu, X. (2009). A copper-responsive factor gene CUF1 is required for copper induction of laccase in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS microbiology letters* 296, 84–90.
- Jiang, T., Kang, C., Yu, X.-W., and Xu, Y. (2016). High-level expression of prolyl endopeptidase in *Pichia pastoris* using PLA 2 as a fusion partner. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 125, 81–87.
- Johannes, C. and Majcherczyk, A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* 78, 193–199.
- Jon (2012). PAPAINE, A PLANT ENZYME OF BIOLOGICAL IMPORTANCE: A REVIEW. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 8, 99–104.
- Karaki, N., Aljawish, A., Humeau, C., Muniglia, L., and Jasniewski, J. (2016). Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, properties, and potential applications: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 90, 1–18.
- Karbalaei, M., Rezaee, S.A., and Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of cellular physiology*.
- Katz, M.E., Masoumi, A., Burrows, S.R., Shirtliff, C.G., and Cheetham, B.F. (2000). The *Aspergillus nidulans* xprF gene encodes a hexokinase-like protein involved in the regulation of extracellular proteases. *Genetics* 156, 1559–1571.
- Keller, N.P. and Hohn, T.M. (1997). Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Fungal Genetics and Biology* 21, 17–29.
- Kerpes, R., Fischer, S., and Becker, T. (2017). The production of gluten-free beer: Degradation of hordeins during malting and brewing and the application of modern process technology focusing on endogenous malt peptidases. *Trends in Food Science & Technology* 67, 129–138.
- Khan, A.R. and James, M.N. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein science : a publication of the Protein Society* 7, 815–836.
- Kikuchi, M., Kitamoto, N., and Shishido, K. (2004). Secretory production of *Aspergillus oryzae* xylanase XynF1, xynF1 cDNA product, in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Applied microbiology and biotechnology* 63, 728–733.
- Kikuchi, M., Ogawa, K.-i., Yamazaki, T., Kajiwara, S., Sugio, A., Nakamura, S., and Shishido, K. (1999). Secretory expression of a *Bacillus subtilis* xylanase gene in the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. *FEMS microbiology letters* 178, 277–282.

- Kilaru, S., Hoegger, P.J., and Kües, U. (2006a). The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current genetics* *50*, 45–60.
- Kilaru, S., Hoegger, P.J., Majcherczyk, A., Burns, C., Shishido, K., Bailey, A., Foster, G.D., and Kües, U. (2006b). Expression of laccase gene *lcc1* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. *Applied microbiology and biotechnology* *71*, 200–210.
- Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., and Fox, P.F. (2002). Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzyme and Microbial Technology* *31*, 310–320.
- Koda, A., Bogaki, T., Minetoki, T., and Hirotsune, M. (2006). 5' Untranslated region of the *Hsp12* gene contributes to efficient translation in *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology* *70*, 333–336.
- Koda, A., Minetoki, T., Ozeki, K., and Hirotsune, M. (2004). Translation efficiency mediated by the 5' untranslated region greatly affects protein production in *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology* *66*, 291–296.
- Kothari, D., Rani, A., and Goyal, A. (2017). Keratinases. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (Elsevier), pp. 447–469.
- Kraševc, N. and Benčina, M. (2016). Gene Expression in Filamentous Fungi: Advantages and Disadvantages Compared to Other Systems. In *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*, M. Schmoll and C. Dattenböck, eds. (Springer International Publishing: Cham), pp. 201–226.
- Kubodera, T., Watanabe, M., Yoshiuchi, K., Yamashita, N., Nishimura, A., Nakai, S., Gomi, K., and Hanamoto, H. (2003). Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* *thiA* requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Letters* *555*, 516–520.
- Kües, U., Klaus, M.J., Polak, E., and Aebi, M. (2001). Multiple cotransformations in *Coprinus cinereus*. *Fungal Genetics Reports* *48*, 32–34.
- Kües, U. and Rühl, M. (2011). Multiple multi-copper oxidase gene families in basidiomycetes - what for? *Current genomics* *12*, 72–94.
- Kulmburg, P., Mathieu, M., Dowzer, C., Kelly, J., and Felenbok, B. (1993). Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* *7*, 847–857.
- Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., and Batish, V.K. (2010). Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical reviews in biotechnology* *30*, 243–258.
- Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A., and Alcalde, M. (2008). Laccases and Their Applications: A Patent Review. *BIOT* *2*, 10–24.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 680–685.
- Ledent, P., Duez, C., Vanhove, M., Lejeune, A., Fonzé, E., Charlier, P., Rhazi-Filali, F., Thamm, I., Guillaume, G., Samyn, B., Devreese, B., van Beeumen, J., Lamotte-Brasseur, J., and Frère, J.-M. (1997). Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters. *FEBS Letters* 413, 194–196.
- Leonhardt, R.-H., Krings, U., Berger, R.G., and Linke, D. (2016). Heterologous production of the stain solvolytic peptidase PPP1 from *Pleurotus pulmonarius*. *Bioprocess and biosystems engineering* 39, 845–853.
- Li, A.-N., Xie, C., Zhang, J., Zhang, J., and Li, D.-C. (2011). Cloning, expression, and characterization of serine protease from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 49, 121–129.
- Li, W., Zhou, X., and Lu, P. (2004). Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Research in microbiology* 155, 605–610.
- Liu, A., Yu, X.-W., Sha, C., and Xu, Y. (2015). *Streptomyces violaceoruber* phospholipase A2: expression in *Pichia pastoris*, properties, and application in oil degumming. *Applied biochemistry and biotechnology* 175, 3195–3206.
- Liu, L., Liu, J., Qiu, R.X., Zhu, X.G., Dong, Z.Y., and Tang, G.M. (2003). Improving heterologous gene expression in *Aspergillus niger* by introducing multiple copies of protein-binding sequence containing CCAAT to the promoter. *Letters in applied microbiology* 36, 358–361.
- Liu, M., Liang, Y., Zhang, H., Wu, G., Wang, L., Qian, H., and Qi, X. (2018). Production of a recombinant carrot antifreeze protein by *Pichia pastoris* GS115 and its cryoprotective effects on frozen dough properties and bread quality. *LWT* 96, 543–550.
- Liu, Y., Yang, Q., and Zhao, F. (2021). Synonymous but Not Silent: The Codon Usage Code for Gene Expression and Protein Folding. *Annual review of biochemistry* 90, 375–401.
- Lottenberg, R. and Jackson, C.M. (1983). Solution composition dependent variation in extinction coefficients for p-Nitroaniline. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 742, 558–564.
- Lubertozzi, D. and Keasling, J.D. (2009). Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology advances* 27, 53–75.
- Madzak, C., Otterbein, L., Chamkha, M., Moukha, S., Asther, M., Gaillardin, C., and Beckerich, J.-M. (2005). Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS yeast research* 5, 635–646.
- Mainwaring, D.O., WIEBE, M.G., Robson, G.D., Goldrick, M., Jeenes, D.J., Archer, D.B., and Trinci, A.P.J. (1999). Effect of pH on hen egg white lysozyme production and evolution of a recombinant strain of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology* 75, 1–10.

- Mamat, U., Wilke, K., Bramhill, D., Schromm, A.B., Lindner, B., Kohl, T.A., Corchero, J.L., Villaverde, A., Schaffer, L., Head, S.R., Souvignier, C., Meredith, T.C., and Woodard, R.W. (2015). Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microbial cell factories* 14, 57.
- Marzorati, M., Danieli, B., Haltrich, D., and Riva, S. (2005). Selective laccase-mediated oxidation of sugars derivatives. *Green Chem.* 7, 310.
- Mate, D.M. and Alcalde, M. (2015). Laccase engineering: from rational design to directed evolution. *Biotechnology advances* 33, 25–40.
- Matsumura, E., Yamamoto, E., Numata, A., Kawano, T., Shin, T., and Murao, S. (1986). Structures of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxybenzoic acids in the presence of ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). *Agricultural and Biological Chemistry* 50, 1355–1357.
- Matsushima, K., Yashiro, K., Hanya, Y., Abe, K., Yabe, K., and Hamasaki, T. (2001). Absence of aflatoxin biosynthesis in koji mold (*Aspergillus sojae*). *Applied microbiology and biotechnology* 55, 771–776.
- Messerschmidt, A. (1997). *Multi-copper oxidases* (World Scientific Pub. Co: Singapore, River Edge, N.J.).
- Mika, N. (2015). Charakterisierung neuartiger insektenassoziiertes Peptidasen für die Lebensmittelbiotechnologie. Dissertation (Gießen).
- Mika, N., Zorn, H., and Rühl, M. (2015). Prolyl-specific peptidasen for applications in food protein hydrolysis. *Applied microbiology and biotechnology* 99, 7837–7846.
- Minetoki, T., Kumagai, C., Gomi, K., Kitamoto, K., and Takahashi, K. (1998). Improvement of promoter activity by the introduction of multiple copies of the conserved region III sequence, involved in the efficient expression of *Aspergillus oryzae* amylase-encoding genes. *Applied microbiology and biotechnology* 50, 459–467.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., and Durán, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 13, 205–216.
- Morita, H., Okamoto, A., Yamagata, Y., Kusumoto, K.-I., Koide, Y., Ishida, H., and Takeuchi, M. (2009). Heterologous expression and characterization of Cpl, OcpA, and novel serine-type carboxypeptidase OcpB from *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology* 85, 335–346.
- Mösch, H.U., Graf, R., Schmidheini, T., and Braus, G. (1990). Three GCN4 responsive elements act synergistically as upstream and as TATA-like elements in the yeast TRP4 promoter. *The EMBO Journal* 9, 2951–2957.
- Muszewska, A., Stepniewska-Dziubinska, M.M., Steczkiewicz, K., Pawlowska, J., Dziedzic, A., and Ginalski, K. (2017). Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. *Scientific reports* 7, 9147.

- Mutasa, E.S., Tymon, A.M., Gttgens, B., Mellon, F.M., Little, P.F.R., and Casselton, L.A. (1990). Molecular organisation of an A mating type factor of the basidiomycete fungus *Coprinus cinereus*. *Current genetics* *18*, 223–229.
- Nakade, K., Nakagawa, Y., Yano, A., Konno, N., Sato, T., and Sakamoto, Y. (2013). Effective induction of pblac1 laccase by copper ion in *Polyporus brumalis* ibrc05015. *Fungal biology* *117*, 52–61.
- Nakazawa, F., Kannemeier, C., Shibamiya, A., Song, Y., Tzima, E., Schubert, U., Koyama, T., Niepmann, M., Trusheim, H., Engelmann, B., and Preissner, K.T. (2005). Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *The Biochemical journal* *385*, 831–838.
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, IV, and Dubchak, I. (2014). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Copci1/Copci1.home.html>.
- Olczak, M. and Olczak, T. (2006). Comparison of different signal peptides for protein secretion in nonlytic insect cell system. *Analytical biochemistry* *359*, 45–53.
- Olempska-Bier, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., and DiNovi, M.J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms--a review. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* *45*, 144–158.
- Orsini, R.A. (2006). Bromelain. *Plastic and reconstructive surgery* *118*, 1640–1644.
- Otterbein, L., Record, E., Longhi, S., Asther, M., and Moukha, S. (2000). Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *European journal of biochemistry* *267*, 1619–1625.
- Page, M.J. and Di Cera, E. (2008). Serine peptidases: classification, structure and function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *65*, 1220–1236.
- Palmore, G.T.R. and Kim, H.-H. (1999). Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry* *464*, 110–117.
- Palonen, H. and Viikari, L. (2004). Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and bioengineering* *86*, 550–557.
- Pan, K., Zhao, N., Yin, Q., Zhang, T., Xu, X., Fang, W., Hong, Y., Fang, Z., and Xiao, Y. (2014). Induction of a laccase Lcc9 from *Coprinopsis cinerea* by fungal coculture and its application on indigo dye decolorization. *Bioresource technology* *162*, 45–52.
- Pedersen, J., Lauritzen, C., Madsen, M.T., and Weis Dahl, S. (1999). Removal of N-terminal polyhistidine tags from recombinant proteins using engineered aminopeptidases. *Protein expression and purification* *15*, 389–400.
- Petsch, D. (2000). Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of Biotechnology* *76*, 97–119.
- Piscitelli, A., Giardina, P., Mazzoni, C., and Sannia, G. (2005). Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology* *69*, 428–439.

- Punt, P.J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Magnus, J., and van den Hondel, C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in biotechnology* 20, 200–206.
- Raksakulthai, R. and Haard, N.F. (2003). Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review. *Critical reviews in food science and nutrition* 43, 401–445.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597–635.
- H.M. Rauen, ed. (1964). *Biochemisches Taschenbuch* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, s.l.).
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* 44, D343-50.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., and Barrett, A.J. (2007). An Introduction to Peptidases and the Merops Database. In *Industrial enzymes. Structure, function and applications*, J. Polaina and A.P. MacCabe, eds. (Springer: Dordrecht), pp. 161–179.
- R.C. Ray and D. Montet, eds. (2015). *Microorganisms and fermentation of traditional foods* (CRC Press: Boca Raton, Fla.).
- Reverter, D., Ventura, S., Villegas, V., Vendrell, J., and Avilés, F.X. (1998). Overexpression of human procarboxypeptidase A2 in *Pichia pastoris* and detailed characterization of its activation pathway. *The Journal of biological chemistry* 273, 3535–3541.
- Rick, W. (1974). Trypsin. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Elsevier), pp. 1013–1024.
- Rowlands, R.T. (1984). Industrial strain improvement: Mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme and Microbial Technology* 6, 3–10.
- Rühl, M. (2009). Laccases and other ligninolytic enzymes of the basidiomycetes *Coprinopsis cinerea* and *Pleurotus ostreatus*. Dissertation (Göttingen).
- Rühl, M., Lange, K., and Kües, U. (2018). Laccase production and pellet morphology of *Coprinopsis cinerea* transformants in liquid shake flask cultures. *Applied microbiology and biotechnology* 102, 7849–7863.
- Rühl, M., Majcherczyk, A., and Kües, U. (2013). Lcc1 and Lcc5 are the main laccases secreted in liquid cultures of *Coprinopsis cinerea* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 103, 1029–1039.
- S., H. and T., A. (2001). Complex control of the developmental regulatory locus *brlA* in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Genetics and Genomics* 266, 260–270.
- Schallmeyer, M., Singh, A., and Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian journal of microbiology* 50, 1–17.
- Schneider, P., Caspersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K., Østergaard, P.R., Brown, K.M., Brown, S.H., and Xu, F. (1999). Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 502–508.

- Schulze, M., Geisler, L., Majcherczyk, A., and Rühl, M. (2019). Signal peptide replacement resulted in recombinant homologous expression of laccase Lcc8 in *Coprinopsis cinerea*. *AMB Express* 9, 36.
- Schutter, K. de, Lin, Y.-C., Tiels, P., van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., van de Peer, Y., and Callewaert, N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* 27, 561–566.
- Selker, E.U. (1997). Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeat-induced confusion? *Trends in Genetics* 13, 296–301.
- Shiloach, J. and Fass, R. (2005). Growing *E. coli* to high cell density--a historical perspective on method development. *Biotechnology advances* 23, 345–357.
- Shinde, U.P., Liu, J.J., and Inouye, M. (1997). Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature* 389, 520–522.
- Sigoillot, C., Record, E., Belle, V., Robert, J.L., Levasseur, A., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., Fournel, A., Sigoillot, J.C., and Asther, M. (2004). Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Applied microbiology and biotechnology* 64, 346–352.
- Singh Arora, D. and Kumar Sharma, R. (2010). Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied biochemistry and biotechnology* 160, 1760–1788.
- Slomczynski, D., Nakas, J.P., and Tanenbaum, S.W. (1995). Production and Characterization of Laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Applied and environmental microbiology* 61, 907–912.
- Smith, E.L., DeLange, R.J., Evans, W.H., Landon, M., and Markland, F.S. (1968). Subtilisin Carlsberg. *Journal of Biological Chemistry* 243, 2184–2191.
- Solé, M., Müller, I., Pecyna, M.J., Fetzer, I., Harms, H., and Schlosser, D. (2012). Differential regulation by organic compounds and heavy metals of multiple laccase genes in the aquatic hyphomycete *Clavariopsis aquatica*. *Applied and environmental microbiology* 78, 4732–4739.
- Solovyev, V.V., Shahmuradov, I.A., and Salamov, A.A. (2010). Identification of promoter regions and regulatory sites. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 674, 57–83.
- Stajich, J.E., Wilke, S.K., Ahrén, D., Au, C.H., Birren, B.W., Borodovsky, M., Burns, C., Canbäck, B., Casselton, L.A., Cheng, C.K., Deng, J., Dietrich, F.S., Fargo, D.C., Farman, M.L., Gathman, A.C., Goldberg, J., Guigó, R., Hoegger, P.J., Hooker, J.B., Huggins, A., James, T.Y., Kamada, T., Kilaru, S., Kodira, C., Kües, U., Kupfer, D., Kwan, H.S., Lomsadze, A., Li, W., Lilly, W.W., Ma, L.-J., Mackey, A.J., Manning, G., Martin, F., Muraguchi, H., Natvig, D.O., Palmerini, H., Ramesh, M.A., Rehmeier, C.J., Roe, B.A., Shenoy, N., Stanke, M., Ter-Hovhannisyan, V., Tunlid, A., Velagapudi, R., Vision, T.J., Zeng, Q., Zolan, M.E., and Pukkila, P.J. (2010). Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11889–11894.
- Stepniak, D., Spaenij-Dekking, L., Mitea, C., Moester, M., Ru, A. de, Baak-Pablo, R., van Veelen, P., Edens, L., and Koning, F. (2006). Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl

- endoprotease: implications for celiac disease. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 291, G621-9.
- Sugano, S.S., Suzuki, H., Shimokita, E., Chiba, H., Noji, S., Osakabe, Y., and Osakabe, K. (2017). Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, optimized by a high-throughput transformation system. *Scientific reports* 7, 1260.
- Sumantha A., Larroche C., and Pandey A. (2006). Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technology and Biotechnology* 44.
- Swift, R.J., Karandikar, A., Griffen, A.M., Punt, P.J., van den Hondel, C.A., Robson, G.D., Trinci, A.P., and Wiebe, M.G. (2000). The Effect of organic nitrogen sources on recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* in chemostat culture. *Fungal genetics and biology : FG & B* 31, 125–133.
- Szwajcer-Dey, E., Rasmussen, J., Meldal, M., and Breddam, K. (1992). Proline-specific endopeptidases from microbial sources: isolation of an enzyme from a *Xanthomonas* sp. *Journal of bacteriology* 174, 2454–2459.
- Takagi, H. and Takahashi, M. (2003). A new approach for alteration of protease functions: pro-sequence engineering. *Applied microbiology and biotechnology* 63, 1–9.
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* 60, 523–533.
- Tian, Y.-S., Xu, H., Peng, R.-H., Yao, Q.-H., and Wang, R.-T. (2014). Heterologous expression and characterization of laccase 2 from *Coprinopsis cinerea* capable of decolourizing different recalcitrant dyes. *Biotechnology, biotechnological equipment* 28, 248–258.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A., and Davies, R.W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26, 205–221.
- Tominaga, M., Lee, Y.-H., Hayashi, R., Suzuki, Y., Yamada, O., Sakamoto, K., Gotoh, K., and Akita, O. (2006). Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. *Applied and environmental microbiology* 72, 484–490.
- Trudeau, F., Daigle, F., and Leech, D. (1997). Reagentless mediated laccase electrode for the detection of enzyme modulators. *Analytical chemistry* 69, 882–886.
- Tuteja, R. (2005). Type I signal peptidase: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics* 441, 107–111.
- Valkonen, M., Ward, M., Wang, H., Penttilä, M., and Saloheimo, M. (2003). Improvement of foreign-protein production in *Aspergillus niger* var. *awamori* by constitutive induction of the unfolded-protein response. *Applied and environmental microbiology* 69, 6979–6986.
- Vallejo, J.A., Ageitos, J.M., Poza, M., and Villa, T.G. (2012). Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins. *Journal of dairy science* 95, 609–613.

- van den Brink, H.J.M., Petersen, S.G., Rahbek-Nielsen, H., Hellmuth, K., and Harboe, M. (2006). Increased production of chymosin by glycosylation. *Journal of Biotechnology* 125, 304–310.
- van den Hombergh, J.P.T.W., van de Vondervoort, P.J.I., Fraissinet-Tachet, L., and Visser, J. (1997). *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends in biotechnology* 15, 256–263.
- Ventura, S., Villegas, V., Sterner, J., Larson, J., Vendrell, J., Hershberger, C.L., and Avilés, F.X. (1999). Mapping the pro-region of carboxypeptidase B by protein engineering. Cloning, overexpression, and mutagenesis of the porcine proenzyme. *The Journal of biological chemistry* 274, 19925–19933.
- Verdoes, J.C., Punt, P.J., Schrickx, J.M., van Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H., and van den Hondel, C.A.M.J.J. (1993). Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*: Molecular genetic analysis of strains containing multiple copies of the *glaA* gene. *Transgenic Research* 2, 84–92.
- Verdoes, J.C., Punt, P.J., and van den Hondel, C.A.M.J.J. (1995). Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by Filamentous fungi. *Applied microbiology and biotechnology* 43, 195–205.
- Vilela, C. and McCarthy, J.E.G. (2003). Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5' untranslated region. *Molecular Microbiology* 49, 859–867.
- Wakelin, S.J., Sabroe, I., Gregory, C.D., Poxton, I.R., Forsythe, J.L.R., Garden, O.J., and Howie, S.E.M. (2006). "Dirty little secrets"--endotoxin contamination of recombinant proteins. *Immunology letters* 106, 1–7.
- Walter, R., Simmons, W.H., and Yoshimoto, T. (1980). Proline specific endo- and exopeptidases. *Molecular and cellular biochemistry* 30, 111–127.
- Wälti, M.A., Villalba, C., Buser, R.M., Grünler, A., Aebi, M., and Künzler, M. (2006). Targeted gene silencing in the model mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*) by expression of homologous hairpin RNAs. *Eukaryotic cell* 5, 732–744.
- Wang, B., Wang, L., Lin, Y., Han, Q., Han, J., Gao, J., Tian, Y., Zhao, W., Peng, R., and Yao, Q. (2014). Purification and characterization of a laccase from *Coprinopsis cinerea* in *Pichia pastoris*. *World journal of microbiology & biotechnology* 30, 1199–1206.
- Wang, H., Yuan, D., Xu, R., and Chi, C.-W. (2011). Purification, cDNA cloning, and recombinant expression of chymotrypsin C from porcine pancreas. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 43, 568–575.
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., and Moo-Young, M. (2005). Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology advances* 23, 115–129.
- Ward, M., Wilson, L.J., Kodama, K.H., Rey, M.W., and Berka, R.M. (1990). Improved Production of Chymosin in *Aspergillus* by Expression as a Glucoamylase-Chymosin Fusion. *Nat Biotechnol* 8, 435–440.

- Wariishi, H., Valli, K., and Gold, M.H. (1992). Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *The Journal of biological chemistry* *267*, 23688–23695.
- Wesenberg, D. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology advances* *22*, 161–187.
- Westers, L., Westers, H., and Quax, W.J. (2004). *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et biophysica acta* *1694*, 299–310.
- Wiebe, M.G., Robson, G.D., Shuster, J., and Trinci, A.P. (2001). Evolution of a recombinant (gucoamylase-producing) strain of *Fusarium venenatum* A3/5 in chemostat culture. *Biotechnology and bioengineering* *73*, 146–156.
- WIEBE, M.G. (1999). Stable production of recombinant proteins in filamentous fungi - problems and improvements. *Mycologist* *17*, 140–144.
- Yang, H., Zhu, Q., Zhou, N., and Tian, Y. (2016). Optimized expression of prolyl aminopeptidase in *Pichia pastoris* and its characteristics after glycosylation. *World journal of microbiology & biotechnology* *32*, 176.
- Yang, J., Li, W., Ng, T.B., Deng, X., Lin, J., and Ye, X. (2017). Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. *Frontiers in microbiology* *8*, 832.
- Yang, X. and Zhang, Y. (2019). Expression of recombinant transglutaminase gene in *Pichia pastoris* and its uses in restructured meat products. *Food Chemistry* *291*, 245–252.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* *33*, 103–119.
- Yin, C., Zheng, L., Chen, L., Tan, Q., Shang, X., and Ma, A. (2014). Cloning, expression, and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (Po-Asp) from *Pleurotus ostreatus*. *Applied biochemistry and biotechnology* *172*, 2119–2131.
- Yoon, J., Kimura, S., Maruyama, J.-i., and Kitamoto, K. (2009). Construction of quintuple protease gene disruptant for heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology* *82*, 691–701.
- Yoon, J., Maruyama, J.-i., and Kitamoto, K. (2011). Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Applied microbiology and biotechnology* *89*, 747–759.
- Yoshizawa, K. (1999). Sake: Production and flavor. *Food Reviews International* *15*, 83–107.
- You, L.-F., Liu, Z.-M., Lin, J.-F., Guo, L.-Q., Huang, X.-L., and Yang, H.-X. (2014). Molecular cloning of a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Journal of basic microbiology* *54 Suppl 1*, S134-41.

- Zhang, Y., Huang, H., Yao, X., Du, G., Chen, J., and Kang, Z. (2018). High-yield secretory production of stable, active trypsin through engineering of the N-terminal peptide and self-degradation sites in *Pichia pastoris*. *Bioresource technology* 247, 81–87.
- Zhao, X., Hong, H., and Wu, Z. (2017). Efficient extracellular expression of transpeptidase sortase A in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* 133, 132–138.
- Zheng, X.F., Kobayashi, Y., and Takeuchi, M. (1998). Construction of a low-serine-type-carboxypeptidase-producing mutant of *Aspergillus oryzae* by the expression of antisense RNA and its use as a host for heterologous protein secretion. *Applied microbiology and biotechnology* 49, 39–44.
- Zhou, K., Dong, Y., Zheng, H., Chen, B., Mao, R., Zhou, L., and Wang, Y. (2017). Expression, fermentation, purification and lyophilisation of recombinant Subtilisin QK in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* 54, 1–8.