



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Klonierung, Expression und Reinigung von Galaktose Oxidase aus
verschiedenen *Fusarien spp.* und verwandten Spezies

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:

Petra Wührer

Matrikel-Nummer:

0203503

Studienrichtung /Studienzweig
(lt. Studienblatt):

Genetik-Mikrobiologie (A441)

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Prof. Dr. Angela Witte

Wien, im Oktober 2009

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Hilfe und Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Angela Witte für die Überlassung des interessanten Diplomarbeitsthemas und die Korrektur dieser Arbeit.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dietmar Haltrich für die freundliche Aufnahme und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Bei Regina Paukner und Christian Leitner möchte ich mich für die geduldige Betreuung bedanken. Außerdem ließen sie mir während der ganzen Arbeit ausreichend Freiräume für eigene Ideen und waren immer zur Stelle, wenn es Probleme gab.

Auch bei allen anderen Kollegen der Lebensmittelbiotechnologie möchte ich mich für ihre Unterstützung und hilfreichen Tipps bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Anita, Brigitte und Christian bedanken, welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mir das Studentendasein sehr angenehm gestalteten.

Besonderen Dank schulde ich Mathias für seine guten und hilfreichen Ideen, seine verständnisvolle Art und den Rückhalt während meines gesamten Studiums.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, welche mich stets unterstützt haben und immer für mich da waren.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktion der GalOx mit D-Galaktose	1
Abbildung 2: Struktur der GalOx	2
Abbildung 3: Die 3 verschiedenen Oxidationsstufen der GalOx	2
Abbildung 4: Reaktionsschema der GlyOx	3
Abbildung 5: Partielle Taubährigkeit infolge einer Infektion mit <i>Fusarium</i>	4
Abbildung 6: <i>P. chrysosporium</i> in einer Petrischale	6
Abbildung 7: pCR® II-Blunt-TOPO®-Vektor	18
Abbildung 8: pJET1/blunt cloning Vektor	19
Abbildung 9: pET-21a Vektor	22
Abbildung 10: Reaktionsschema des Galox-Aktivitätstests	27
Abbildung 11: Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	34
Abbildung 12: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	35
Abbildung 13: MassRuler™ DNA Ladder Mix	35
Abbildung 14: Isolierte gDNA aus <i>F. oxysporum</i>	36
Abbildung 15: Isolierte gDNA aus <i>F. sambucinum</i>	36
Abbildung 16: Amplifikation des GalOx-Gens ohne Ausschleuse-Sequenz aus <i>F. oxysporum</i>	37
Abbildung 17: Amplifikation des GalOx-Gens inkl. Ausschleuse-Sequenz aus <i>F. oxysporum</i>	38
Abbildung 18: Amplifikation des GalOx-Gens ohne Ausschleuse-Sequenz aus <i>F. sambucinum</i>	38
Abbildung 19: Amplifikation des GalOx-Gens inkl. Ausschleuse-Sequenz aus <i>F. sambucinum</i>	39
Abbildung 20: Kontrollrestriktion	40
Abbildung 21: Kontrollrestriktion	40
Abbildung 22: Restriktionsanalyse für das Auffinden geeigneter Schnittstellen	41
Abbildung 23: Verdau mit NheI	41
Abbildung 24: Reinigung der rekombinanten GalOx mittels IMAC	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Ansatz (allgemein)	15
Tabelle 2: Temperaturverlauf einer PCR-Reaktion (allgemein)	15
Tabelle 3: Primer zur Amplifikation verschiedener GalOx-Gene	16
Tabelle 4: Temperaturverlauf der PCR-Amplifikation der GalOx-Gene.....	16
Tabelle 5: Primer zur Amplifikation verschiedener GlyOx-Gene	17
Tabelle 6: Temperaturverlauf der PCR-Amplifikation der GlyOx-Gene	17
Tabelle 7: Ligation mit pJET1/blunt cloning Vektor	19
Tabelle 8: Ansatz für die Kontrollrestriktion	21
Tabelle 9: Enzyme für die Restriktionsanalyse.....	22
Tabelle 10: Induktor für die Genexpression.....	24
Tabelle 11: Bedingungen bei der Homogenisation	25
Tabelle 12: Puffer für die Homogenisation und Aktivitätsmessung.....	26
Tabelle 13: Peroxidaselösung.....	27
Tabelle 14: ABTS-Reagenz.....	27
Tabelle 15: Pipettierschema des Aktivitätstests	27
Tabelle 16: Puffer für Proteinreinigung mittels HIC	30
Tabelle 17: Zusammenfassung der Reinigungsparameter (HIC)	31
Tabelle 18: Zusammenfassung der Reinigungsparameter (IEC)	32
Tabelle 19: Zusammenfassung der Reinigungsparameter (IMAC)	33
Tabelle 20: Zusammensetzung eines SDS-Gels.....	34
Tabelle 21: Zusammenfassung der Methoden zur gDNA-Isolierung	37
Tabelle 22: Induktionsversuche zur Verbesserung der Ausbeute an rekombinanter GalOx ...	42
Tabelle 23: Versuche zur Optimierung des Zellaufschlusses	43
Tabelle 24: Optimierungsversuche zur Steigerung der Enzymaktivität I	43
Tabelle 25: Optimierungsversuche zur Steigerung der Enzymaktivität II.....	44
Tabelle 26: Auffinden der geeigneten CuSO ₄ -Konzentration.....	44
Tabelle 27: Auffinden geeigneter Reinigungsparameter	45
Tabelle 28: Reinigungsschema rekombinanter GalOx ohne His-Tag.....	46
Tabelle 29: Daten der Reinigung mittels IMAC	47
Tabelle 30: <i>In silico</i> Analyse.....	49
Table 31: GalOx- and GlyOx-genes which were amplified and cloned in <i>E. coli</i>	52

Quellenverzeichnis

Abbildung 1: [http://www.brenda-enzymes.org/Mol/reaction-](http://www.brenda-enzymes.org/Mol/reaction-popup.php4?id=36746&type=I&displayType=marvin)

[popup.php4?id=36746&type=I&displayType=marvin](http://www.brenda-enzymes.org/Mol/reaction-popup.php4?id=36746&type=I&displayType=marvin)

Abbildung 2: Wilkinson, D., Akumanyi, N., Hurtado-Guerrero, R., Dawkes, H., Knowles,

P.F., Phillips, S.E. & McPherson, M.J. 2004

Structural and kinetic studies of a series of mutants of galactose oxidase

identified by directed evolution. *Protein Engineering, Design and Selection* 17,

141-148

Abbildung 3: Rogers, M.S., Tyler, E.M., Akyumani, N., Kurtis, C.R., Spooner, R.K.,

Deacon, S.E., Tamber, S., Firbank, S.J., Mahmoud, K., Knowles, P.F., Phillips,

S.E.V., McPherson, M. J. & Dooley, D.M. 2007

The stacking tryptophan of galactose oxidase: A second-coordination sphere

residue that has profound effects on tyrosyl radical behavior and enzyme

catalysis. *Biochemistry* 46, 4606-4618

Abbildung 4: Whittaker, M.M., Kersten, P.J., Nakamura, N., Sanders-Loehr, J., Schweizer,

E.S. & Whittaker, J.W. 1996

Glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is a new radical-copper

oxidase. *The Journal of biological chemistry* 271, 681-687

Abbildung 5: <http://www.lfl.bayern.de/ipz/weizen/19731/index.php>

Abbildung 6: <http://www.vscht.cz/kch/galerie/obrazky/houby/pctvmak.gif>

Abbildung 7: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcrbluntitopo_map.pdf

Abbildung 8: <http://www.fermentas.com/catalog/kits/img/pjet1bluntmap.pdf>

Abbildung 9: <http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB036.pdf>

Abbildung 10: Paukner, R. 2008

Klonierung und Kristallisation von Pyranose-2-Oxidase aus Basidiomyceten,

Diplomarbeit. Universität für Bodenkultur, Wien

Abbildung 11: http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_3118.pdf

Abbildung 12: <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/generulers.htm>

Abbildung 13: <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/massrulers.htm>

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Galaktose Oxidase.....	1
1.2	Glyoxal Oxidase.....	2
1.3	Ascomycetes (Schlauchpilze)	3
1.3.1	Fusarien	4
1.3.2	<i>Aspergillus terreus</i>	5
1.3.3	<i>Neurospora crassa</i>	5
1.3.4	<i>Botrytis cinerea</i>	5
1.4	Basidiomyceten (Ständerpilze)	5
1.4.1	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	6
2	Aufgabenstellung	7
3	Materialien	8
3.1	Chemikalien	8
3.2	Mikroorganismen	8
3.3	Chromatographische Materialien	8
3.4	Medien.....	9
3.4.1	Medien für Pilze	9
3.4.2	Medien für <i>E. coli</i>	9
3.5	Puffer und Lösungen	10
3.5.1	50 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP) pH 8,0	10
3.5.2	Saline Lösung	10
3.6	Primer	10
3.7	Geräte	11
3.8	Molekularbiologische Kits	12
4	Methoden	13
4.1	Klonierung und Sequenzierung von Galaktose bzw. Glyoxal Oxidase Genen.....	13
4.1.1	Isolierung genomischer DNA.....	13
4.1.2	Amplifizierung der Galaktose bzw. Glyoxal Oxidase Gene mittels PCR (Polymerase chain reaction)	14
4.1.3	Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion der DNA aus dem Agarosegel....	17
4.1.4	Klonierung des Blunt-End-PCR-Produktes und Transformation in <i>E. coli</i>	17

4.1.5	Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	20
4.1.6	Verdau der Plasmid-DNA	20
4.1.7	Restriktionsanalyse.....	21
4.1.8	Dauerkultur.....	23
4.2	Expression des GalOx-Gens ohne Ausschleuse-Sequenz aus <i>F. oxysporum</i>	23
4.2.1	Expressionsversuche	23
4.2.2	Bestimmung der Enzymaktivität der GalOx	26
4.3	Proteinbestimmung.....	28
4.4	Isoelektrische Fokussierung	28
4.5	Reinigung der GalOx ohne Ausschleuser aus <i>F. oxysporum</i>	29
4.5.1	Fermentation - Erzeugung des Rohextrakts	29
4.5.2	Vorversuche	29
4.5.3	Proteinreinigung ohne His-Tag	31
4.5.4	Proteinreinigung mit His-Tag.....	32
4.5.5	SDS-PAGE.....	33
5	Ergebnisse und Diskussion	35
5.1	Klonierung von Galaktose bzw. Glyoxal Oxidase Genen.....	35
5.1.1	Isolierung der gDNA aus unterschiedlichen Organismen.....	35
5.1.2	Amplifizierung der Galaktose bzw. Glyoxal Oxidase Gene	37
5.2	Sequenzierung der Galaktose bzw. Glyoxal Oxidase Gene	39
5.2.1	Kontrollrestriktion nach Isolierung der Plasmid-DNA	39
5.2.2	Restriktionsanalyse.....	41
5.3	Expression des GalOx-Gens ohne Ausschleuser von <i>F. oxysporum</i>	42
5.3.1	Expressionsversuche	42
5.4	Reinigung der GalOx ohne Ausschleuser aus <i>F. oxysporum</i>	45
5.4.1	Vorversuche	45
5.4.2	Proteinreinigung ohne His-Tag	46
5.4.3	Proteinreinigung mit His-Tag.....	46
5.4.4	SDS-PAGE.....	47
6	Zusammenfassung.....	49
7	Summary.....	52
8	Literatur.....	54
9	Anhang.....	58
9.1	DNA-Sequenz der GalOx (ohne Ausschleuse-Sequenz) aus <i>Fusarium oxysporum</i>	58

9.2 Aminosäure-Sequenz der GalOx (ohne Ausschleuse-Sequenz) aus <i>Fusarium</i>	
<i>oxysporum</i>	59
Lebenslauf	60

Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>F.</i>	<i>Fusarium</i>
GalOx	Galaktose Oxidase
GlyOx	Glyoxal Oxidase
h	Stunde
HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
KPP	Kaliumphosphatpuffer
krpm	kilo rounds per minute (kilo Umdrehungen pro Minute)
LB	Luria Bertani
Mb	Megabasen
min	Minute
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
RNase	Ribonuclease
RO-H ₂ O	Umkehrosiose-Wasser
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TB	Terrific Broth
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethandiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

V

Volt

1 Einleitung

1.1 Galaktose Oxidase

Bei dem Enzym Galaktose Oxidase (GalOx, D-Galaktose: Sauerstoff 6-Oxidoreduktase, EC 1.1.3.9) handelt es sich um ein extrazelluläres kupferhaltiges Protein, welches von Ascomyceten, wie beispielsweise *Gibberella fujikuroi* (Aisaka *et al.*, 1981) oder *Dactylium (Fusarium) dendroides* (Avigad *et al.*, 1962) produziert wird. Dieses strikt regioselektive Enzym oxidiert primäre Alkohole zu den entsprechenden Aldehyden unter gleichzeitiger Reduktion von O₂ zu H₂O₂ (Cooper *et al.*, 1959). Als Beispiel wird die Umsetzung von D-Galaktose zu D-Galakto-Hexodialose unter Bildung von H₂O₂ gezeigt (Abbildung 1).

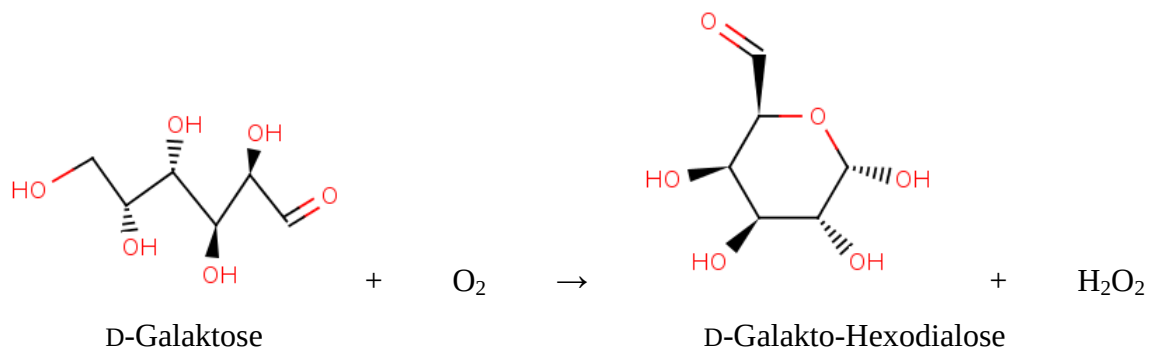


Abbildung 1: Reaktion der GalOx mit D-Galaktose

Die GalOx kann ein breites Spektrum an Substraten verwerten: Mono-, Polysaccharide, aliphatische und aromatische Alkohole, sowie Polyalkohole. Durch Kristallisationsexperimente konnte die Struktur des aktiven Zentrums aufgeklärt werden (Ito *et al.*, 1991). Das Protein enthält vorwiegend β -Strukturen mit 3 Domänen. Das Kupfer-Atom im aktiven Zentrum ist koordiniert durch His496, His581 und Tyr272 (Abbildung 2). Weiters findet man ein Wasser-Molekül als äquatorialen und Tyr495 als axialen Liganden. Tyr272 ist kovalent an das Schwefel-Atom von Cys228 gebunden und fungiert als freies Radikal während der Katalyse. Trp290 liegt in unmittelbarer räumlicher Nähe zur oben genannten Aminosäure und moduliert deren Reaktivität (Rogers *et al.*, 2007).

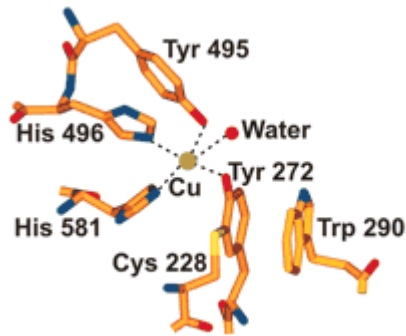


Abbildung 2: Struktur der GalOx (Wilkinson et al., 2004)

Das Enzym kann in drei verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen: reduziert, semi-reduziert und oxidiert (Abbildung 3). Die katalytisch inaktive, semi-reduzierte Form enthält ein Kupfer (II) Ion und kein Radikal. Durch Oxidation entsteht die katalytisch aktive Form, welche ein Kupfer (II) Ion und ein Phenoxyl-Radikal enthält. Diese oxidierte Form katalysiert die Zwei-Elektronen-Oxidation von Alkoholen zu den entsprechenden Aldehyden unter gleichzeitiger Reduktion zu [Cu (I)-Tyr]. Die reduzierte Form des Enzyms wird durch Sauerstoff reoxidiert zu [Cu (II)-Tyr] unter Bildung von Wasserstoffperoxid.

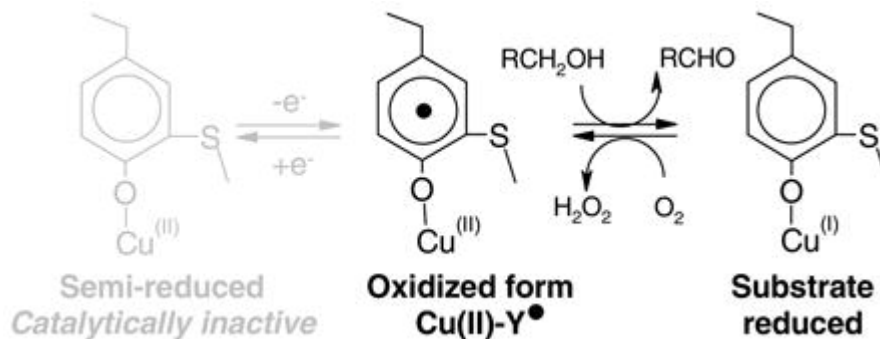


Abbildung 3: Die 3 verschiedenen Oxidationsstufen der GalOx (Rogers et al., 2007)

1.2 Glyoxal Oxidase

Die Glyoxal Oxidase (GlyOx) ist ein extrazelluläres kupferhältiges Metalloenzym, welches unter anderem von dem Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* produziert wird. Es katalysiert die Oxidation von Aldehyden zu den entsprechenden Carbonsäuren unter gleichzeitiger Reduktion von O_2 zu H_2O_2 (Abbildung 4). Das

gebildete Wasserstoffperoxid wird für den Ligninabbau benötigt (Whittaker *et al.*, 1996).

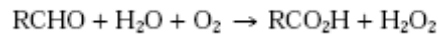


Abbildung 4: Reaktionsschema der GlyOx (Whittaker *et al.*, 1996)

Die GlyOx besteht aus 537 Aminosäuren; die ersten 22 bilden ein Signalpeptid, welches typisch für extrazelluläre Proteine ist. Das aktive Zentrum des Enzyms zeigt große Ähnlichkeit mit jenem der GalOx; die Aminosäuresequenz weist allerdings große Unterschiede auf. Die GlyOx ist ein monomeres Glykoprotein, dessen Molekulgewicht von 68 kDa mittels SDS-PAGE bestimmt wurde. Die zwei vorhandenen Isoformen besitzen pI-Werte von 4,7 und 4,9 (Kersten & Cullen, 1993).

Ebenso wie die GalOx wird auch die GlyOx zu den radikalischen Kupferoxidasen gezählt. Das aktive Zentrum enthält einen metalloradikalischen Komplex, in welchem ein Tyrosyl-Radikal das Kupferion koordiniert. Bei dem Vergleich beider Enzyme mittels biochemischer und spektroskopischer Methoden stellte sich heraus, dass sie „funktionelle Varianten“ sind, welche verschiedene Reaktionen mit nahezu identischen aktiven Zentren katalysieren. Ursachen für die trotz der homologen aktiven Zentren unterschiedliche Substratspezifität liegen möglicherweise in den unterschiedlichen Redoxpotentialen der Radikale in den aktiven Zentren der beiden Enzyme. Die Feineinstellung der beiden Redoxpotentiale passiert über die Stärke der Interaktion mit den beteiligten Liganden (Whittaker *et al.*, 1996).

1.3 Ascomycetes (Schlauchpilze)

Gemeinsam mit den Basidiomyceten werden die Ascomyceten zu den höheren Pilzen (Eumyceten) zusammengefasst. Charakteristisch sind ein septiertes Myzel und die Bildung von Konidiosporen. Begeißelte Zellen sind nicht zu finden.

Namensgebend für diese Gruppe sind schlauchartige Gebilde, der Ascus, in welchem Ascosporen gebildet werden. Im Ascus laufen die Karyogamie, sowie die Meiose ab.

Das Ascusstadium ist die Endphase der sexuellen Fortpflanzung, welche auch die perfekte (vollkommene) oder Hauptfruchtform genannt wird. Die asexuelle Vermehrung vieler Ascomyceten verläuft mittels Konidienbildung, wobei diese Nebenfruchtform auch imperfektes (unvollkommenes) Stadium genannt wird. Von vielen Pilzen ist nur das imperfekte Stadium, die Konidienbildung, bekannt. Diese werden als Fungi imperfekti oder Deuteromyceten bezeichnet (Schlegel, 1992).

1.3.1 Fusarien

Arten der Gattung *Fusarium* spielen eine große Rolle beim Celluloseabbau unter aeroben Bedingungen. Sie erweisen sich gegenüber Bakterien insbesondere in sauren Böden und beim Abbau mit Lignin inkrustierter Cellulose (Holz) als überlegen. Weiters sind diese Pilze befähigt zum Pektinabbau. Die Pathogenität unterschiedlicher Mikroorganismen (z.B. *Fusarium oxysporum f. lycopersici*) für Pflanzen beruht auf der Ausscheidung Pektin-auflösender Enzyme (Schlegel, 1992).

a) *Fusarium graminearum* (anamorph *Giberella zeae*): Dieser Pilz verursacht das Krankheitsbild der „partiellen Taubährigkeit“ (*Fusarium* head blight oder scab) bei Weizen und Gerste (Abbildung 5). Außerdem produziert *F. graminearum* ein Mykotoxin namens Vomitoxin, welches für Menschen und Tiere gesundheitsgefährdend ist. Die Größe des Genoms beträgt 40 Mb; vier Chromosomen sind vorhanden (Cuomo *et al.*, 2007).



Abbildung 5: Partielle Taubährigkeit infolge einer Infektion mit *Fusarium*

b) *Fusarium oxysporum*: Die verschiedenen Stämme unterscheiden sich deutlich bezüglich Genomgröße und Chromosomenzahl. Die Größe des Genoms variiert von 30 Mb bis über 50 Mb. *F. oxysporum* ist ein phytopathogener Pilz (Birren *et al.*, 2008).

1.3.2 *Aspergillus terreus*

Dieser filamentöse Pilz produziert Statine (z.B. Simvastatin), welche Cholesterinsenkende Wirkung haben. Weitere Produkte sind die Toxine Patulin und Citrinin, welche in Menschen und Tieren Toxikosen und Aspergillosen (der Lunge und/ oder disseminierte Aspergillose) hervorrufen können. Das haploide Genom hat eine Größe von etwa 35 Mb und ist in 8 Chromosomen organisiert (Askenazi *et al.*, 2003).

1.3.3 *Neurospora crassa*

Dieser filamentöse rote Schimmelpilz hat eine Genomgröße von 43 Mb, welches auf 7 Chromosomen verteilt ist (Galagan *et al.*, 2003). *Neurospora crassa* ist ein wichtiger Modellorganismus für genetische Studien. So gelang es beispielsweise mittels Tetradenanalyse das Phänomen des „Crossing-over“ zu erklären (Kück, 2005).

1.3.4 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea zählt zu den Cellulose-abbauenden Mikroorganismen (unter aeroben Bedingungen). Weiters sind diese Pilze dazu befähigt Pektin abzubauen (Schlegel, 1992).

1.4 Basidiomyceten (Ständerpilze)

Die Basidiomyceten werden als die am höchsten entwickelten Pilzgruppe angesehen und sind durch die Basidie, eine endständige Pilzzelle welche dem Ascus entspricht, gekennzeichnet. Von ihr werden in der Regel vier einkernige, haploide Basidiosporen nach außen abgeschnürt. Die Basidiosporen sind wie die Ascosporen das Resultat von

Plasmogamie, Karyogamie und Meiose, wobei die letzten beiden Prozesse im Ascus bzw. in der Basidie stattfinden. Das Myzel besteht aus septierten Hyphen. Die Zell- und Kernteilung erfolgt bei vielen Basidiomyceten durch Schnallenbildung, wobei dieser Mechanismus garantiert, dass die neue Zelle je einen der beiden Tochterkerne enthält (Schlegel, 1992)

1.4.1 *Phanerochaete chrysosporium*

Phanerochaete chrysosporium (Abbildung 6) ist einer der aktivsten Weißfäulepilze und der Modellorganismus des pilzlichen Ligninabbaus. Die Erreger der „Weißfäule“ des Holzes hinterlassen eine nahezu weiße Masse und greifen in erster Linie Lignin an, wobei Cellulose zunächst weitgehend unberührt bleibt. Der Ligninabbau erfolgt ausschließlich unter Anwesenheit von Sauerstoff und Glukose. Am Abbau ist ein Enzymsystem beteiligt, zu welchem die Lignin- und die Manganperoxidase gehören (Schlegel, 1992). Das von den Peroxidasen benötigte H_2O_2 wird unter anderem durch die Aktivität der GlyOx zur Verfügung gestellt (Kersten & Cullen, 1993).



Abbildung 6: *P. chrysosporium* in einer Petrischale

2 Aufgabenstellung

Primäres Ziel dieser Diplomarbeit war die Klonierung und anschließende Sequenz-Analyse des GalOx Gens aus verschiedenen Pilzen. Parallel dazu sollte auch versucht werden verschiedene GlyOx Gene zu amplifizieren und klonieren.

Wie McPherson *et al.*, 1992 herausfanden, besteht das Transkript des GalOx-Gens aus *Dactylium dendroides* nicht aus der gesamten Nukleotidsequenz des Gens, sondern nur aus den Nukleotiden 591 bis 2507. An Anlehnung daran wurde versucht das Gen aus verschiedenen *Fusarien spp.* sowohl mit als auch ohne diese „Ausschleuse-Sequenz“ (das daraus resultierende „leader“-Peptid dient der Sekretion des Enzyms in den extrazellulären Raum) zu amplifizieren, klonieren und in weiterer Folge zu exprimieren. Deshalb wurde innerhalb der Gensequenz eine ähnliche (homologe) Nukleotid-Abfolge wie in *D. dendroides* gesucht und dementsprechende Primer designt.

Weiters sollte versucht werden das GalOx Gen in *E. coli* zu exprimieren, wobei hierfür das Gen ohne Ausschleuse-Sequenz aus *F. oxysporum* verwendet wurde. Um eine möglichst hohe Expressionsrate und Enzymaktivität zu erlangen, wurde nach den optimalen Bedingungen und Parametern gesucht.

Zuletzt wurde versucht das erzeugte Protein mithilfe verschiedener Methoden zu reinigen.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Gängige Laborchemikalien und Medien-Bestandteile wurden in der höchsten erhältlichen Qualität von Sigma (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt, D), Roth (Graz, A) und Fluka (Buchs, CH) bezogen.

Chemikalien für molekularbiologische Anwendungen wurden zusätzlich von Finnzymes OY (Espoo, FIN), MBI Fermentas (Vilnius, LT), Invitrogen (Carlsbad, USA), BIORAD (Hercules, USA) und Promega (Madison, USA) bezogen.

3.2 Mikroorganismen

Für Klonierungen wurden chemisch kompetente Stämme (DH5 α , TOP10) von Invitrogen (Carlsbad, USA), sowie der elektrokompente Stamm BL21(DE3) von Novagen, (Madison, USA) verwendet.

Der verwendete Organismus *Fusarium graminearum* wurde freundlicherweise von Prof. Gerhard Adam (Department für Angewandte Genetik und Zellbiologie, BOKU Wien) zur Verfügung gestellt. Die Pilze *Aspergillus terreus* und *Botrytis cinerea* stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Alle anderen Organismen wurden von der Stammsammlung der Abteilung Lebensmittelbiotechnologie des Departments für Lebensmittelwissenschaften und -technologie (BOKU Wien) entnommen.

3.3 Chromatographische Materialien

CM (Carboxymethyl) Sepharose TM FF (Fast Flow)	GE Healthcare (Uppsala, S)
HiTrap TM 1 mL Capto TM S	GE Healthcare
HiTrap TM Phenyl HP 1 mL Säule	GE Healthcare
HiTrap TM FF crude 1 mL	GE Healthcare
Phenyl Sepharose TM High Performance	GE Healthcare

3.4 Medien

Die Bestandteile der Medien wurden eingewogen, in RO-Wasser gelöst und anschließend 20 min bei 121°C autoklaviert.

3.4.1 Medien für Pilze

Sabouraud-Medium

Pepton aus Casein	5 g/L
Pepton aus Fleisch	5 g/L
Glukose	10 g/L
Maltose	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L

PDA (Potato Dextrose Agar)

PDA	39 g/L
-----	--------

3.4.2 Medien für *E. coli*

Luria Bertani (LB) Medium (bzw. Agar) + Antibiotikum (Amp oder Kan)

Pepton aus Casein	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L
Amp oder Kan	100 mg/L oder 30 mg/L
(Agar	15 g/L)

Für die Herstellung von doppelt konzentriertem LB-Medium wurden 20 g/L Pepton aus Casein und 10 g/L Hefeextrakt verwendet; die Konzentrationen der restlichen Bestandteile blieben gleich.

Terrific Broth (TB) Medium + Antibiotikum (Amp)

Lösung A		Lösung B	
Pepton aus Casein	12 g/L	KH ₂ PO ₄ pH 7,5	13,6 g/100 mL
Hefeextrakt	24 g/L		
Glycerin	4 mL/L		
RO-Wasser	auf 900 mL		
	auffüllen		

Die beiden Lösungen wurden separat autoklaviert und anschließend steril vermengt. Die Amp-Konzentration betrug 100 mg/L.

3.5 Puffer und Lösungen

3.5.1 50 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP) pH 8,0

KH ₂ PO ₄	1,2 g/L
K ₂ HPO ₄	7,2 g/L

3.5.2 Saline Lösung

NaCl	5 g/L
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,12 g/L

3.6 Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma VBC Biotech (Wien, Österreich) hergestellt.

GO-F.oxyspo-fwd1:	5'-GCC-TCA-GCT-CCC-ATC-GGC-ACT-GCT-3'
Foxy-pre-fwd:	5'-ATG-AAG-CCC-CTT-TGG-ACA-CTT-GC-3'
GO-F.oxyspo-rev1:	5'-CTA-CTG-AGT-AAC-GAG-AAG-AGT-ACT-CGC-3'
GO-ADAM-for1:	5'-GCC-TCA-GCA-CCT-ATC-GGA-AGC-GCT-3'
ADAM-pre-fwd:	5'-ATG-AAA-CAC-TTT-TTA-TCA-CTC-GCT-C-3'
GO-ADAM-rev1:	5'-TCA-CTG-AGT-AAC-GCG-AAT-CGT-CG-3'
GO-A.terreus-for1:	5'-AAG-CTC-CAT-TGG-GCC-TCG-TGC-3'
GO-A.terreus-rev1:	5'-CTA-AGC-CTG-ATG-CAC-3'

GO-N.crassa-for2:	5'-ATG-AAC-CGA-GAA-CGC-GTT-TCT-G-3'
GO-N.grassa-rev1:	5'-TCA-TTT-CGC-CAA-CTC-AAT-TTG-GAA-CCT-C-3'
GO-Fu-Wob-for2:	5'-GCC-TCA-GCA/T-CCC/T-A/CTC-GG-3'
Fus-wobble-fwd3:	5'-ATG-AAA/G-C/TA/CC-C/TTT-TG/TA/G-A/TCA-CT-3'
GO-Fu-Wob-rev1:	5'-CTG-AGT-AAC-GA/CG-AAG/T-A/CGT-3'
Gly-P.chryso-for2:	5'-ATG-TTG-TCG-CTG-CTA-G-3'
Gly-P.chryso-rev1:	5'-TTA-CTC-CAG-GGT-CGG-CG-3'
Gly-Fucki-for1:	5'-CGG-ATG-CTA-ATT-TTT-AC-3'
Gly-Fucki-rev1:	5'-TCA-AAC-CGT-AAC-AAA-CTG-TCC-3'

3.7 Geräte

ÄKTA Prime Amersham Biosciences (Uppsala, S)
 Biometra T3 Thermocycler Whatman Biometra (Göttingen, D)
 BIORAD Software Gel Doc 2000 BIORAD (Hercules, USA)
 Braun Biostat[®] MD with culture vessel M2 Braun (Melsungen, D)
 Eppendorf Centrifuge 5415 R Eppendorf AG (Hamburg, D)
 Gel Doc 2000 UV BIORAD (Hercules, USA)
 Homogenisator APV-2000 Invensys APV Products (Albertslund, DK)
 Laborautoklav Certoklav EL 18 L Certoclav Sterilizer GmbH (Traun, A)
 Laborwaagen Sartorius (Göttingen, D)
 Megafuge 1.0 R Heraeus (Hanau, D)
 Membran Vakuumpumpe MZ 2C Vacuubrand (Wertheim, D)
 Phast System Pharmacia (Uppsala, S)
 pH Meter Metrohm 744 Metrohm (D)
 Pipetten Eppendorf (Hamburg, D)
 Precellys 24 (PeqLab, Erlangen, D)
 Schüttler Thermomixer Compact Eppendorf (Hamburg, D)
 Spectrophotometer DU-650 Beckman (München, D)
 Sterilbank HS-P 18/2 (LF-Werkbank) Heraeus (Hanau, D)
 Ultrazentrifuge Beckman L-70 Beckman (München, D)
 Zentrifuge Sorvall Evolution RC Du Pont (Wilmington, USA)
 Zentrifuge Sorvall RC 26 Plus Du Pont (Wilmington, USA)

3.8 Molekularbiologische Kits

Wizard [®] SV Genomic DNA Purification System	Promega (Madison, USA)
Phusion [™] High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes)	New England Biolabs (Frankfurt am Main, D)
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
Zero Blunt [®] TOPO [®] PCR Cloning Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
GenElute Plasmid Mini-Prep Kit	Sigma (St. Louis, USA)
GeneJET [™] PCR Cloning Kit	Fermentas (Vilnius, Litauen)
GeneJET [™] Plasmid Miniprep Kit	Fermentas

4 Methoden

4.1 Klonierung und Sequenzierung von Galaktose bzw. Glyoxal Oxidase Genen

4.1.1 Isolierung genomischer DNA

Die Pilze wurden auf PDA- Platten kultiviert und nach erfolgtem Wachstum in jeweils 50 mL Sabouraud Medium überführt. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C und 110 rpm, mit Ausnahme von *Aspergillus terreus*, welcher bei 30 °C seine optimale Wachstumstemperatur hat.

Nach etwa zwei Tagen wurden die Pilz-Kulturen 15 Minuten lang bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert. Die daraus resultierenden Pellets wurden anschließend mit jeweils 50 ml Saline Lösung gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die einzelnen Pellets mittels Filterpapier vom überschüssigen Wasser befreit und unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in der Reibschale homogenisiert. Die Proben wurden bei -70 °C eingefroren. Eine Ausnahme bildet *P. chrysosporium*, bei welchem die Biomasse mittels Vakuumpumpe und Filter vom Medium abgetrennt wurde.

Isolierung der gDNA von *F. oxysporum* G12, *F. graminearum* PH-1, *A. terreus* (DSMZ 826) und *B. cinerea* (DSMZ 877)

Die gDNA-Extraktion erfolgte mittels Wizard® SV Genomic DNA Purification System entsprechend Protokoll (Purification of genomic DNA from Mouse Tail Clippings or Animal Tissues using a microcentrifuge; <http://www.promega.com/tbs/tb302/tb302.pdf>).

Isolierung der gDNA von *N. crassa*

Die Gewinnung der gDNA erfolgte laut „Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR“ (Liu *et al.*, 2000).

Isolierung der gDNA von *P. chrysosporium* K3 und *F. sambucinum* MA1886

Die Isolierung der gDNA erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (nach Chomczynski & Sacchi, 1987).

100 mg Biomasse wurden mit 0,4 mL Salzlösung (1 M Tris pH 7,5-8,0 / 0,5 M EDTA / 1,4 M NaCl) und 0,4 mL Phenol versetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 65 °C (dazwischen öfters vortexen) wurden 0,4 mL CHCl₃ zugefügt und nach erneutem Vortexen erneut für 2 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10 min; 10000 rpm; 4 °C). Die wässrige Phase wurde mit Chloroform gewaschen, danach erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt (5 min). Der Waschschritt wurde wiederholt, der Überstand mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt. Einer Inkubation bei -4 °C für 60 min folgte eine Zentrifugation (20 min; 10000 rpm; 4 °C). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 100 µL sterilem RO-Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 0,25 µL RNase A erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 60 min.

4.1.2 Amplifizierung der Galaktose bzw. Glyoxal Oxidase Gene mittels PCR (Polymerase chain reaction)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes.

Das typische PCR-Programm besteht aus 3 Schritten:

1. Denaturierungsschritt: Dieser Schritt dient zur Trennung der beiden Stränge der Template-DNA und wird bei 98 °C durchgeführt.
2. Annealingschritt: Die Erniedrigung der Temperatur erlaubt eine Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA.
3. Elongationsschritt: Durch erneutes Ansteigen der Temperatur (auf das Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase) wird der Primer verlängert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, welche der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht.

Aufgrund der Tatsache, dass die Komplementierung an beiden Strängen der Template-DNA abläuft, wird nach jedem Zyklus die Zahl der Template-DNAs verdoppelt (Müllhardt, 2003).

Alle PCR-Reaktionen wurden mit der Phusion™ DNA Polymerase durchgeführt. Tabelle 1 beschreibt einen typischen PCR-Ansatz, während Tabelle 2 eine Übersicht über ein typisches PCR-Programm gibt.

Tabelle 1: PCR-Ansatz (allgemein)

Komponente	Volumen
5x Phusion™ HF Buffer	5 µL
10 mM dNTPs	0,5 µL
Forward Primer (10 pmol/µL)	2 µL
Reverse Primer (10 pmol/µL)	2 µL
DNA template	1 µL
Phusion-Polymerase	0,25 µL
Wasser	14,25 µL

Tabelle 2: Temperaturverlauf einer PCR-Reaktion (allgemein)

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	2 min	1
Denaturierung	98	10 s	35
Hybridisierung	abhängig von Primern	20 s	
Elongation	72	15-30 s/ 1 kb	
Finale Elongation	72	7 min	1
Pause	4		

Amplifizierung von GalOx-Genen aus verschiedenen Organismen

Die Reaktionsbedingungen, unter welchen die verschiedenen PCR-Reaktionen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 3: Primer zur Amplifikation verschiedener GalOx-Gene

Organismus	gesuchtes Gen	Vorwärts-Primer	Revers-Primer
<i>F. oxysporum</i>	GalOx inklusive Ausschleuse-Sequenz	Foxy-pre-fwd	GO-F.oxyspo-rev1
	GalOx ohne Ausschleuser	GO-F.oxyspo-fwd1	GO-F.oxyspo-rev1
<i>F. graminearum</i>	GalOx inklusive Ausschleuser	ADAM-pre-fwd	GO-ADAM-rev1
	GalOx ohne Ausschleuser	GO-ADAM-for1	GO-ADAM-rev1
<i>F. sambucinum</i>	GalOx inklusive Ausschleuser	Fus-wobble-fwd3	GO-Fu-Wob-rev1
	GalOx ohne Ausschleuser	Primer GO-Fu-Wob-for2	GO-Fu-Wob-rev1
<i>A. terreus</i>	GalOx	GO-A.terreus-for1	GO-A.terreus-rev1
<i>N. crassa</i>	GalOx	GO-N.crassa-for2	GO-N.grassa-rev1

Tabelle 4: Temperaturverlauf der PCR-Amplifikation der GalOx-Gene

Organismus	Annealing-Temperatur	Elongationszeit	Größe des Gens (bp)
<i>F. oxysporum</i>	63 °C	60 s	2046
ohne Ausschleuser	63 °C	60 s	1929
<i>F. graminearum</i>	63 °C	63 s	2123
ohne Ausschleuser	63 °C	63 s	2000
<i>F. sambucinum</i>	60 °C	60 s	
ohne Ausschleuser	58 °C	40 s	
<i>A. terreus</i>	59 °C	69 s	2343
<i>N. crassa</i>	61 °C	60 s	2139 (mit Introns)

Amplifizierung von GlyOx-Genen aus verschiedenen Organismen

Die Reaktionsbedingungen, unter welchen die verschiedenen PCR-Reaktionen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 5 und

Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 5: Primer zur Amplifikation verschiedener GlyOx-Gene

Organismus	gesuchtes Gen	Vorwärts-Primer	Revers-Primer
<i>B. cinerea</i>	GlyOx	Gly-Fucki-for1	Gly-Fucki-rev1
<i>P. chrysosporium</i>	GlyOx inkl. Signalpeptid	Gly-P.chryso-for2	Gly-P.chryso-rev1

Tabelle 6: Temperaturverlauf der PCR-Amplifikation der GlyOx-Gene

Organismus	Annealing-Temperatur	Elongationszeit	Größe des Gens (bp)
<i>B. cinerea</i>	58 °C	120 s	2025 (mit Introns)
<i>P. chrysosporium</i>	60 °C	63 s	1907 (mit Introns)

4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion der DNA aus dem Agarosegel

Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld in Richtung Anode und werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt (kleinere Fragmente wandern dabei schneller als größere). Mit Hilfe von Ethidiumbromid sind die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar (Lodish *et al.*, 1999).

PCR-Produkte wurden mittels 0,8 % Agarose in 1x TAE Gelen aufgetrennt, wobei jeweils der gesamte PCR-Ansatz geladen wurde. Nach erfolgter elektrophoretischer Trennung (100 V; ca. 30 min) wurde die Bande mit der gesuchten Größe aus dem Gel mithilfe eines Skalpell ausgeschnitten und mit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Erfolge der einzelnen Aufreinigungen wurden mithilfe von 0,8 %-igen Agarosegelen kontrolliert. Hierfür wurden jeweils 5 µL der gereinigten DNA mit entsprechendem Auftragspuffer versetzt und geladen.

4.1.4 Klonierung des Blunt-End-PCR-Produktes und Transformation in *E. coli*

Für nachfolgende Klonierungen wurde der pJET1/blunt cloning vector verwendet, mit Ausnahme des GalOx-Gens (ohne Ausschleuser) aus *F. graminearum*.

F. graminearum (ohne Ausschleuse-Sequenz): Klonierung in den pCR[®] II-Blunt-TOPO[®]-Vektor

Die Klonierung der gereinigten PCR-Produkte in den pCR[®] II-Blunt-TOPO[®]-Vektor (Abbildung 7) erfolgte mittels Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit entsprechend den Angaben des Herstellers. Es wurden 3 µL des aufgereinigten PCR-Produktes und 0,25 µL des Vektors für den Ligationsansatz verwendet, welcher anschließend 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Für die Transformation wurden 50 µL chemisch kompetente Zellen (Library Efficiency[®] DH5α[™]) verwendet, der Hitzeschock dauerte 1 min und wurde bei 42 °C durchgeführt. Die Zellen wurden auf LB-Kan-Platten ausplattiert (50 µL und etwa 200 µL) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

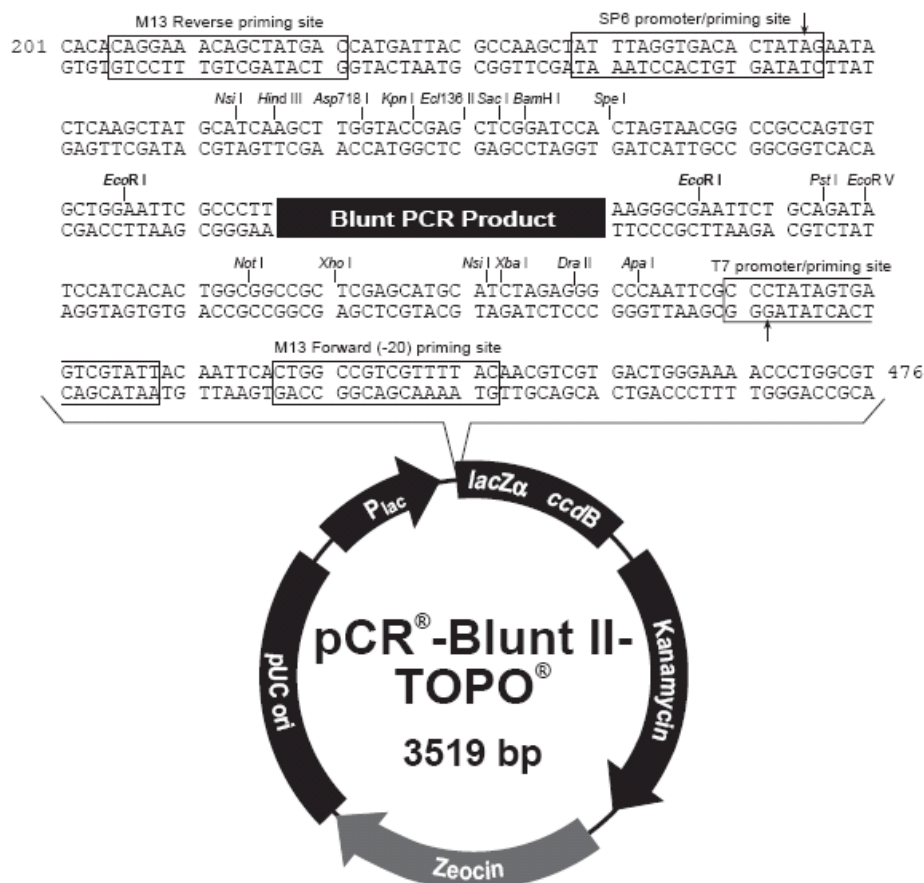


Abbildung 7: pCR[®] II-Blunt-TOPO[®]-Vektor

4.1.5 Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*

Jeweils eine Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und anschließend wurde derselbe Zahnstocher in 3 mL entsprechendes Flüssigmedium überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 120 rpm. Die gesamte Biomasse wurde nach erfolgtem Wachstum abzentrifugiert und das resultierende Pellet für nachfolgende Miniprep-Reaktion verwendet.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mittels GenElute™ Plasmid Miniprep Kit entsprechend den Angaben des Herstellers, mit Ausnahme der möglichen GalOx-Gene (ohne Ausschleuse-Sequenz) aus *F. graminearum* und *F. oxysporum*.

GalOx-Gene ohne Ausschleuser aus *F. graminearum* und *F. oxysporum*

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgt mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit entsprechend den Angaben des Herstellers.

4.1.6 Verdau der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI (pCR® II-Blunt-TOPO®) bzw. XhoI (pJET1/blunt cloning vector) geschnitten, um das Vorhandensein des gewünschten Inserts zu überprüfen.

Der Pipettieransatz des Verdau ist aus Tabelle 8 ersichtlich und wurde für etwa 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und die vermeintlich positiven Proben wurden von der Firma Agowa (Berlin, D) sequenziert. Das Zusammenfügen der Sequenzen der einzelnen Fragmente zur Gesamtsequenz erfolgte mittels Vector NTI 11 von Invitrogen. Anschließend wurde die DNA- Sequenz mittels „ExpASy Translate tool“ (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) in die entsprechende Aminosäure-Sequenz umgeschrieben.

Tabelle 8: Ansatz für die Kontrollrestriktion

Komponenten	Volumen
Plasmid	5 µL
Restriktionsenzym	0,5 µL
Puffer	3 µL
Autoklaviertes RO-Wasser	auf 30 µL

4.1.7 Restriktionsanalyse

Für die nachfolgende Umklonierung in den Expressionsvektor pET-21a von Novagen (Abbildung 9) war es notwendig, geeignete Restriktionsenzyme zu ermitteln. Aus diesem Grunde wurden die isolierten Plasmide mit gängigen Restriktionsenzymen (Tabelle 9) verdaut und mittels Vergleich der Restriktionskarte der jeweiligen Vektoren wurden Restriktionsschnittstellen auf den jeweiligen GalOx-Genen identifiziert. Parallel dazu wurde eine *in silico*- Analyse durchgeführt, welche es erlaubte potentielle Restriktionsschnittstellen zu identifizieren.

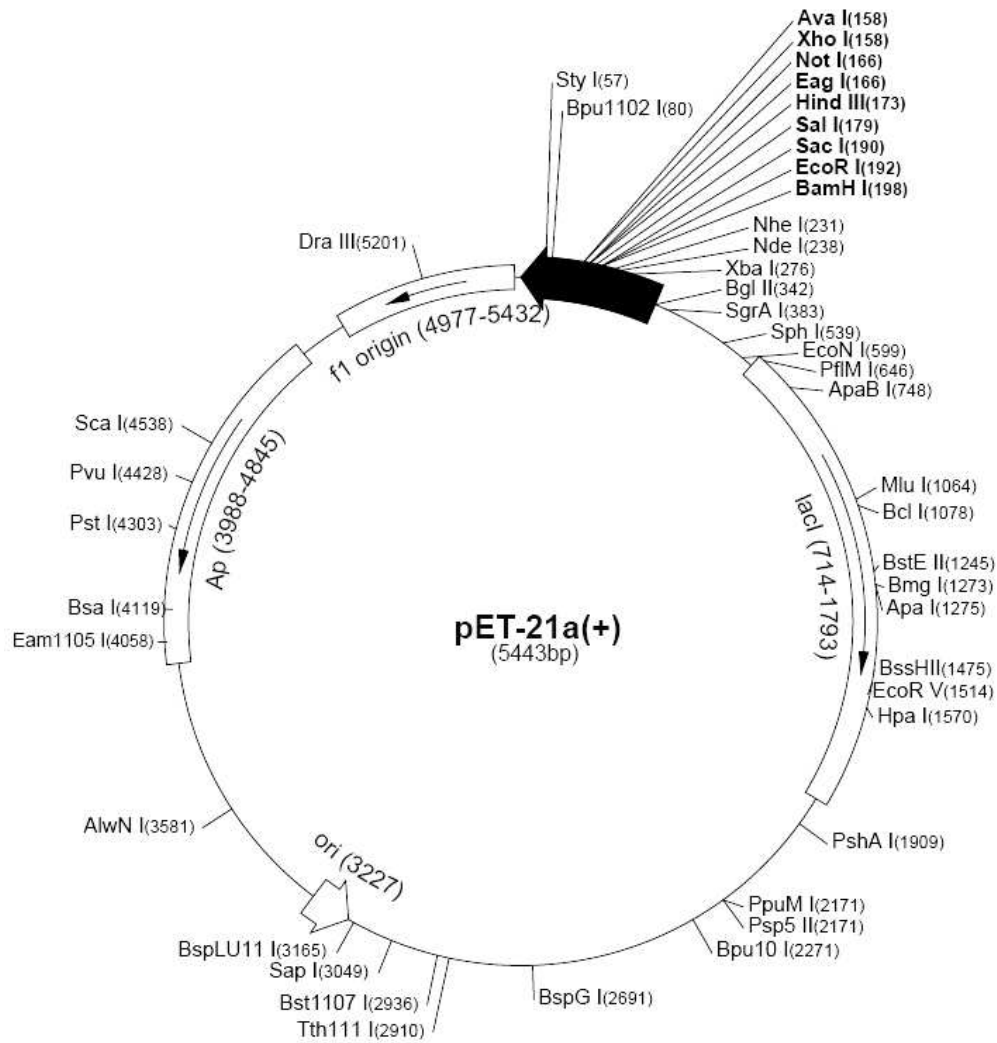


Abbildung 9: pET-21a Vektor

Tabelle 9: Enzyme für die Restriktionsanalyse

Restriktionsenzym	Puffer
NdeI	R
NotI	O
NheI	Tango
SalI	O
BamHI	BamHI Puffer
HindIII	R
NcoI	Tango

4.1.8 Dauerkultur

Um Dauerkulturen herzustellen, wurde jeweils eine Kolonie steril in 3 mL entsprechendes Medium (LB-Kan bzw. LB-Amp) überführt und über Nacht bei 25 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden jeweils 500 µL der Flüssigkultur mit 500 µL sterilem 30 %-igen Glycerin in einem Cryoröhrchen vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

4.2 Expression des GalOx-Gens ohne Ausschleuse-Sequenz aus *F. oxysporum*

4.2.1 Expressionsversuche

Das Einfügen geeigneter Restriktionsschnittstellen sowie die Umklonierung des GalOx-Gens in den Expressionsvektor pET-21a, wurde von meinen Kolleginnen Regina Paukner und Erica Durigon ausgeführt, ebenso wie die Transformation in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3).

Es wurden zwei Plasmide designt: einer enthielt die His-Tag-Sequenz des Vektors, bei dem anderen verhinderte das Stopp-Codon des GalOx-Gens die Expression dieser Sequenz. Die folgenden Versuche wurden mit Transformanten, welche letzteres Plasmid trugen, durchgeführt.

Induktion

Um die heterologe Genexpression zu optimieren, wurde versucht den besten Induktor (und dessen nötige Konzentration) zu ermitteln. Um dies zu realisieren wurde jeweils eine Kolonie in 3 mL TB-Amp-Medium überführt und etwa 3-6 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Sobald ein Wachstum der Zellen erkennbar war, wurde auf vier verschiedene Arten induziert (Tabelle 10). Als Negativ-Kontrolle diente eine Flüssigkultur, welcher kein Induktor beigegeben wurde. Die Inkubation erfolgte bei 25°C über Nacht.

Tabelle 10: Induktor für die Genexpression

Induktor	Endkonzentration
Laktose	0,5 %
IPTG	0,01 mM
IPTG	0,1 mM
IPTG	1 mM

Der Aufschluss der Zellen erfolgte mithilfe des Homogenisators Precellys 24. Das Aufschlussprinzip beruht auf dem Zermahlen der Probe mittels hochbeschleunigter Glaskügelchen durch Schüttelbewegungen. Nachdem die einzelnen Kulturen abzentrifugiert wurden (13,2 krpm; 2 min), wurden die resultierenden Pellets in 750 µL 50 mM KPP-Puffer pH 8,0 resuspendiert. In den Homogenisierungstubes wurden Glaskügelchen (Durchmesser 0,5 mm) eingewogen (Tube inklusive Glaskügelchen sollte ein Gewicht von 1,9 g haben). Jeweils 500 µL der resuspendierten Pellets wurden in „Homogenisierungstubes“ pipettiert und 2x 30 s bei 6000 rpm aufgeschlossen, wobei die Proben dazwischen 5 min auf Eis gekühlt wurden. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 4 °C und 13,2 krpm abzentrifugiert und die gewonnenen Überstände für die folgenden Aktivitätstests (siehe 4.2.2) verwendet.

Für die Aktivitätsmessung wurden verschiedene Parameter variiert:

- ✓ Messung erfolgte ohne CuSO₄-Inkubation.
- ✓ Proben wurden vor der Aktivitätsmessung zwei Stunden lang bei 4 °C unter Schütteln mit CuSO₄ (Endkonzentration 0,4 mM) inkubiert.
- ✓ Proben wurden vor der Aktivitätsmessung zwei Stunden lang bei Raumtemperatur unter Schütteln mit CuSO₄ (Endkonzentration 0,4 mM) inkubiert.
- ✓ Als Negativkontrolle wurden die Proben ohne Zusatz von Galaktose gemessen.

Aufschluss der Zellen

Um die optimale Homogenisations-Methode zu finden, wurden verschiedene Parameter getestet (Tabelle 11). Hierfür wurden transformierte Zellen in 30 mL TB-Amp-Medium angeimpft, die Induktion erfolgte mit 0,5 %-iger Laktose. Gleichzeitig mit dem Induktor wurde CuSO₄ (Endkonzentration: 0,4 mM) zugegeben; die Genexpression erfolgte bei 25 °C über Nacht. Von der Flüssigkultur wurden 2 mL entnommen und nach einem

Zentrifugationsschritt (13,2 krpm; 2 min) wurde das Pellet in 750 μ L KPP-Puffer pH 8,0 resuspendiert.

Tabelle 11: Bedingungen bei der Homogenisation

Dauer des Schüttelintervalls	Anzahl der Schüttelintervalle
15 s	1x
30 s	1x
15 s	2x (dazwischen 5 min auf Eis)
30 s	2x (dazwischen 5 min auf Eis)

Nach dem Zellaufschluss wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min; 4 °C; 13,2 krpm), der Aktivitätstest erfolgte mit den Überständen.

CuSO₄-Konzentration

Die Aktivitätsbestimmung erforderte eine Inkubation der GalOx mit CuSO₄. In vorherigen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die Temperatur während der Inkubation eine entscheidende Rolle spielt. Um die Inkubationsbedingungen weiter zu optimieren, wurden weitere Experimente durchgeführt. Zellwachstum und Expression erfolgten unter denselben Bedingungen wie vorher bereits beschrieben. Die Homogenisation erfolgte unter jenen Bedingungen, welche vorher die besten Ergebnisse lieferten, d.h. 2x 15 s.

- ✓ Bei einem Versuch wurde CuSO₄ (Endkonzentration 0,4 mM) gemeinsam mit dem Induktor zur Flüssigkultur zugegeben, während beim Parallelexperiment CuSO₄ erst nach dem Zellaufschluss zugegeben wurde und 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert wurde.

Für die beiden folgenden Experimente wurde die Biomasse in größerem Maßstab angezüchtet. Jeweils 20 mL einer Übernachtskultur wurden in 250 mL TB-Amp-Medium + 0,5 % Laktose überführt, wobei in einem Fall bereits CuSO₄ (0,4 mM) im Medium vorhanden war. Die resultierenden Pellets wurden in 50 mM KPP-Puffer pH 8,0 resuspendiert, der Aufschluss erfolgte wie oben bereits beschrieben.

- ✓ Um die optimale Dauer der CuSO₄-Inkubation herauszufinden, wurden nach unterschiedlichen Zeiten (5, 15, 30, 60, 90, 120 min) die Aktivitäten gemessen.
- ✓ Weiters wurden verschiedene CuSO₄-Konzentrationen (10; 3; 1; 0,3; 0,1; 0,03; 0,01 mM) während der Inkubation getestet.

Medium

Es wurden zwei verschiedene Medien (doppelt-konzentriertes LB-Amp- bzw. TB-Amp-Medium) ausgetestet, in denen die Transformanten wuchsen und das GalOx-Gen exprimierten.

Puffer

Um eine möglichst hohe Enzymaktivität zu erlangen, wurden verschiedene Puffer (Tabelle 12) und –kombinationen für die Homogenisierung bzw. Aktivitätsmessung getestet.

Tabelle 12: Puffer für die Homogenisation und Aktivitätsmessung

Homogenisation	Aktivitätsmessung
100 mM NaH ₂ PO ₄ + 0,1 mM EDTA pH 7,0	100 mM NaH ₂ PO ₄
50 mM KPP pH 8,0 + 0,1 mM EDTA	50 mM KPP pH 8,0
50 mM Bis-Tris pH 8,0 + 0,1 mM EDTA	50 mM Bis-Tris pH 8,0
20 mM Tris pH 8,0 + 0,1 mM EDTA	20 mM Tris pH 8,0

Weiters wurden 50 mM KPP-Puffer mit verschiedenen pH-Werten (pH 6,0 - 6,5 - 7,0 - 7,5 - 8,0) getestet, welche in verschiedenen Kombinationen als Homogenisationspuffer und Puffer für die Aktivitätsmessung eingesetzt wurden.

4.2.2 Bestimmung der Enzymaktivität der GalOx

Die GalOx katalysiert die Oxidation von Galaktose zu Galaktose-6-aldehyd unter gleichzeitiger Reduktion von O₂ zu H₂O₂ (Abbildung 10). Das Enzym „Horseradish Peroxidase“ wiederum katalysiert die Reduktion des zuvor gebildeten H₂O₂ zu H₂O, wobei ABTS-Diammoniumsalz als Elektronendonator fungiert. Das resultierende ABTS-Radikal-Kation besitzt ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 420 nm.

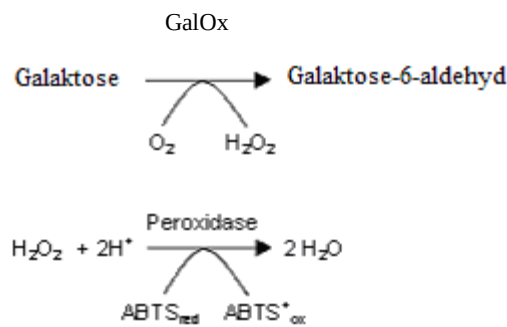


Abbildung 10: Reaktionsschema des Galox-Aktivitätstests (nach Paukner, 2008)

Die photometrische Messung wurde bei 30 °C durchgeführt, die Absorptionszunahme wurde über einen Zeitraum von 180 s erfasst. Für die Bestimmung der Aktivität wurden die Lösungen entsprechend Tabelle 15 pipettiert. Die Bestandteile der einzelnen Lösungen sind in Tabelle 13 und

Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 13: Peroxidaselösung (1420 U/mL)

Komponente	Menge
Peroxidase (222 U/mg)	6,4 mg
50 mM KPP pH 6,5	1 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 M

Tabelle 14: ABTS-Reagenz

Komponente	Menge
ABTS	14,7 mg
Peroxidaselösung	100 µL
RO-Wasser	auf 2,5 mL

Tabelle 15: Pipettierschema des Aktivitätstests

Komponente	Volumen
Probe	20 µL
ABTS Reagenz	90 µL
0,5 M Galaktose	20 µL
20 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,0	870 µL

Die Küvetten mit den einzelnen Reagenzien, mit Ausnahme der Enzymlösung, wurden im Wasserbad vorgewärmt. Die Enzymlösung wurde erst beigegeben, nachdem die Küvetten bereits im Photometer waren, um den Reaktionsverlauf (und speziell den Reaktionsstart) möglichst genau erfassen zu können.

4.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte entsprechend der Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Die Bindung von Coomassie Brilliant Blue an aromatische und basische Aminosäurereste führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Mittels Vergleich mit einer Eichkurve, welche mit BSA (Albumin aus Rinderserum) im Konzentrationsbereich 0,1 bis 1,0 mg/mL erstellt wurde, lassen sich Aussagen über die Proteinkonzentration treffen (Pingoud & Urbanke, 1997).

In der Praxis lässt sich dies durch Mischen von 20 µL einer entsprechend verdünnten Proteinlösung mit 1 mL Bradford Reagenz realisieren. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

4.4 Isoelektrische Fokussierung

Diese Methode basiert auf der Trennung amphoterer Substanzen in einem elektrischen Feld, unter Verwendung eines Spannungs- und pH-Gradienten zwischen den Elektroden. Die Umgebung der Anode bildet das saure, jene der Kathode das alkalische Ende. Dazwischen liegt ein stabiler pH-Gradient, wofür ein pH-Bereich gewählt wird, in welchem die zu trennenden Substanzen ihren isoelektrischen Punkt besitzen. Substanzen welche anfangs unterhalb ihres isoelektrischen Punktes liegen, sind dort positiv geladen und wandern zur Kathode, wobei sich der pH-Wert ihrer Umgebung solange erhöht, bis er ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Dann liegen sie als Zwitterionen vor und tragen folglich keine Nettoladung, was dazu führt, dass die Bewegung stoppt. Ferner werden Substanzen in einem pH-Bereich oberhalb ihres isoelektrischen Punktes negativ geladen sein und zur Anode wandern, bis sie ihren isoelektrischen Punkt erreichen und folglich bewegungslos sind (Wilson & Goulding, 1991).

Nach erfolgter elektrophoretischer Trennung (Probenvolumen 1 µL) wurde das Gel (PhastGel IEF 3-9 von Amersham Biosciences) mit einer 50 mM CuSO₄-Lösung überschichtet und etwa eine halbe Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit ABTS-Reagenz, worauf eine leichte Färbung bei ca. pH 10 sichtbar wurde.

4.5 Reinigung der GalOx ohne Ausschleuser aus *F. oxysporum*

4.5.1 Fermentation - Erzeugung des Rohextrakts

Für die Anzucht im Fermenter wurden 4,5 L Medium (doppelt-konzentriertes LB + Amp) verwendet. Die Temperatur wurde auf 25 °C eingestellt, die Sauerstoffsättigung betrug 50 %. Als Antischaummittel diente Antifoam 204 (Sigma), als Inokulum wurden 250 mL einer Übernachtskultur verwendet. Die Fermentation wurde nach 18 Stunden abgebrochen, die Biomasse wurde bei 6000x g 15 min lang (10 °C) abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 20 mM KPP pH 7,0 resuspendiert und mittels Homogenisator (2 Durchgänge) aufgeschlossen

4.5.2 Vorversuche

Um die optimalen Reinigungsparameter (Säulenmaterial, pH-Werte etc.) zu finden, wurden verschiedene Versuche durchgeführt.

Kationenaustauschchromatographie

Um jenen pH-Wert zu ermitteln, bei welchem das Protein am effizientesten an das Säulenmaterial bindet, wurden 100 µL Säulenmaterial (CM-Sepharose FF) mit 1 mL 50 mM KPP pH 6,0 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 min folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13,2 krpm für 30 s, wonach der Überstand verworfen wurde. Diese Schritte wurden 9-mal wiederholt. Selbiges wurde mit 50 mM KPP-Puffern pH 6,5 - 7,0 - 7,5 und 8,0 durchgeführt. Anschließend wurde das Säulenmaterial über Nacht bei 4 °C mit 20 mM KPP-Puffer mit dem entsprechenden pH-Wert inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein Zentrifugationsschritt (13,2 krpm; 30s); der Überstand wurde verworfen. Zu dem Säulenmaterial wurden jeweils 180 µL 20 mM KPP-Puffer mit dem entsprechenden pH-Wert und 20 µL Überstand des Rohextrakts pipettiert. Darauf folgte eine 10-minütige Inkubation bei 1000 rpm und 25 °C. Anschließend folgte erneut ein Zentrifugationsschritt (30 s; 13,2 krpm), der jeweilige Überstand wurde 30

min bei 1000 rpm und 25 °C mit CuSO₄ (Endkonzentration 1 mM) inkubiert und anschließend für die Bestimmung der Aktivität verwendet. Für die Aktivitätsmessung wurde 20 mM KPP-Puffer pH 7,0 verwendet.

Um den optimalen Elutions-Puffer zu ermitteln, wurden zu dem jeweiligen Säulenmaterial 20 mM KPP + 2 M NaCl mit dem entsprechenden pH-Wert (d.h. pH 6,0- 6,5- 7,0- 7,5 bzw. 8,0) zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 1000 rpm und 25 °C folgte ein Zentrifugationsschritt (13,2 krpm; 30 s). Der Überstand wurde erneut mit CuSO₄ (Endkonzentration 1 mM) inkubiert und anschließend für die Aktivitätsmessung und Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet.

Ammonsulfatfällung und Hydrophobe Interaktionschromatographie

Es wurden verschiedene Mengen an Ammoniumsulfat getestet, um herauszufinden bei welcher Sättigung (in %) das Protein am optimalsten gereinigt wird. Hierfür wurden entsprechende Mengen Ammoniumsulfat eingewogen und mit jeweils 250 µL Überstand des Rohextrakts versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10 min; 4 °C; 13,2 krpm), wonach der Überstand mit CuSO₄ inkubiert wurde und einem Aktivitätstest unterzogen wurde. Das Pellet wurde in 250 µL 20 mM KPP-Puffer pH 7,0 resuspendiert und ebenfalls, nach einer CuSO₄-Inkubation, für den Aktivitätstest verwendet.

Für die folgende HIC wurden verschiedene Parameter variiert, welche in Tabelle 16 aufgelistet sind. Als Säulenmaterial diente Phenyl Sepharose[™] High Performance, das Säulenvolumen betrug 1 mL.

Tabelle 16: Puffer für Proteinreinigung mittels HIC

Puffer A	50 mM KPP+30 % Ammoniumsulfat pH 7,0 50 mM KPP+20 % Ammoniumsulfat pH 7,0
Puffer B	50 mM KPP pH 7,0
Probe	500 µL Protein, welches mit 20 % Ammoniumsulfat gefällt wurde 500 µL Protein, welches mit 30 % Ammoniumsulfat gefällt wurde

Die Proben wurden jeweils mit 500 µL entsprechendem Puffer A geladen; der Durchfluss für anschließende photometrische Messungen aufbewahrt. Die Elution erfolgte mit 100 % Puffer B.

4.5.3 Proteinreinigung ohne His-Tag

Ammonsulfatfällung und HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography)

Die Präzipitation von Makromolekülen aus ihren wässrigen Lösungen mittels anorganischen Salzen beruht auf der Veränderung der Hydrathülle. Ammoniumsulfat wird aufgrund seiner guten Löslichkeit und der stabilisierenden Wirkung auf die biologische Aktivität vieler Proteine am häufigsten eingesetzt (Sternbach, 1991).

Bei der HIC wird die Tatsache ausgenützt, dass Proteine meist aus Aminosäuren aufgebaut sind, welche hydrophobe Seitenketten besitzen. Durch ihre Zusammenlagerung entstehen hydrophobe Bereiche, welche spezifisch mit einem anderen Molekül interagieren (Sternbach, 1991).

Die Ammonsulfatfällung erfolgte bei 20 % Sättigung über Nacht bei 4 °C. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden 500 µL auf die HIC-Säule (Phenyl Sepharose® HP 1 mL) geladen. Die Reinigungsparameter sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Nach der Aufreinigung wurden Aliquote der gesammelten Fraktionen mit CuSO₄ inkubiert (30 min; 25 °C; 1000 rpm) und anschließend Aktivitätsmessungen durchgeführt. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitätswerten wurden vereinigt und die Aktivität sowie die Proteinkonzentration bestimmt.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Reinigungsparameter (HIC)

Flussrate	0,3 mL/min
Fraktionsvolumen	1 mL
Gradient	0-100 % Puffer B in 10 mL
Puffer A	50 mM KPP + 20 % (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7,0
Puffer B	50 mM KPP pH 7,0

Kationenaustauschchromatographie

Das Prinzip der IEC („Ion-Exchange Chromatography“) beruht darauf, dass geladene Gruppen auf der Proteinoberfläche mit entgegengesetzt geladenen Gruppen auf der Oberfläche des Ionenaustauschermediums wechselwirken.

Kationenaustauscher tragen negativ geladene Gruppen, welche positiv geladene Gruppen anziehen können. Diese Austauscher werden auch saure Ionenaustauscher genannt, da ihre negativen Ladungen aus der Protolyse saurer Gruppen herrühren (Wilson & Goulding, 1991).

Vor dem Beladen der Säule wurde die Probe mittels RO-Wasser über Nacht dialysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (2 min; 4 °C; 13,2 krpm) wurden 500 µL Probe auf die Säule (HiTrap™ 1 mL Capto™ S) geladen. Die Reinigungsparameter sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Die weiteren Schritte waren ident mit den zuvor bereits beschriebenen.

Tabelle 18: Zusammenfassung der Reinigungsparameter (IEC)

Flussrate	0,3 mL/min
Fraktionsvolumen	1 mL
Gradient	0-100 % Puffer B in 10 mL
Puffer A	5 mM KH ₂ PO ₄ pH 5,0
Puffer B	50 mM KH ₂ PO ₄ + 1 M NaCl pH 5,0

Nach erfolgter chromatographischer Auftrennung wurden Aliquote der einzelnen Fraktionen mit CuSO₄ inkubiert und für die Aktivitätsmessung herangezogen.

4.5.4 Proteinreinigung mit His-Tag

Erzeugung des Rohextrakts

Die Transformanten (BL21(DE3)), welche den pET-21a Vektor inklusive des GalOx-Gens aus *F. oxysporum* (ohne Ausschleuse-Sequenz) mit anschließender His-Tag-Sequenz enthielten, wurden freundlicherweise von meinen Kolleginnen Regina Paukner und Erica Durigon zur Verfügung gestellt.

Für die Vorkultur wurde eine Kolonie in 30 mL Medium (doppelt-konzentriertes LB-Amp) angeimpft und 4-6 h lang bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Kultur in 300 mL Medium überführt und solange bebrütet bis die OD₆₀₀ einen Wert zwischen 0,4-0,6 erreicht hatte. Danach erfolgte die Zugabe der Laktose; die Genexpression erfolgte bei 25 °C über Nacht bei 110 rpm. Nach einem Zentrifugationsschritt (6000 rpm; 20 min; 15 °C) wurde das Pellet in 20 mM KH₂PO₄-Puffer pH 7,0 resuspendiert und nach einer Lysozym-Behandlung (1 mg Lysozym pro mL resuspendiertes Pellet; 30 min; 37 °C) mittels Ultraschall aufgeschlossen (3 mal 1 min aufschließen, dazwischen 1 min auf Eis). Anschließend wurde

die Biomasse abzentrifugiert (Ultrazentrifuge; 30000 rpm; 30 min; 4 °C) und der Überstand für die Proteinreinigung herangezogen.

Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Das Prinzip der IMAC beruht auf der Bindung von Proteinen, welche in geeigneter Anordnung mehrere Histidin- oder Cysteinreste enthalten, an Säulen die Metallchelate kovalent gebunden haben. Im speziellen Fall wurde eine Ni-Chelatchromatographie verwendet, die dazu dient rekombinante Proteine, welche N- oder C-terminal mit einem His₆-Tag fusioniert sind, mittels Affinitätschromatographie zu reinigen. Auf der verwendeten Säule ist Ni²⁺ durch Nitriloessigsäure-Reste gebunden und kann mit zwei Histidin-Resten des Proteins im Austausch gegen Wasser interagieren. Die Elution erfolgt mittels Imidazolgradienten (Pingoud & Urbanke, 1997).

Tabelle 19: Zusammenfassung der Reinigungsparameter (IMAC)

Flussrate	0,3 mL/min
Fraktionsvolumen	1 mL
Gradient	0-100 % Puffer B in 10 mL
Puffer A	20 mM KH ₂ PO ₄ + 500 mM NaCl pH 7,0
Puffer B	20 mM KH ₂ PO ₄ + 1 M NaCl + 1 M Imidazol pH 7,0

Es wurden 5 mL Rohextrakt auf die Säule (HisTrap™ FF crude 1 mL) geladen. Nach erfolgter Auftrennung wurden Aliquote der einzelnen Fraktionen einer CuSO₄-Inkubation unterzogen und für einen nachfolgenden Aktivitätstest verwendet. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden gepoolt und ebenfalls einem Aktivitätstest unterzogen sowie auf den Proteingehalt getestet. Die Reinigungsparameter sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

4.5.5 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-(SDS-) Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient zur Trennung von Proteingemischen und Bestimmung der Molekulargewichte. SDS, ein anionisches Detergens, bewirkt die Auflösung von Sekundär- und Tertiärstrukturen im Protein, die Aufspaltung von Wasserstoffbrückenbindungen, die Aufhebung hydrophober Wechselwirkungen, sowie die Überdeckung von Ladungsunterschieden. Durch die Anlagerung von SDS-Molekülen entstehen lang-gestreckte SDS-Protein-Micellen, die während der Elektrophorese zur Anode wandern.

Die Erfolge der einzelnen Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE (Zusammensetzung der Gele: Tabelle 20) überprüft. Hierfür wurden Aliquote der jeweils besten Fraktion mit Laemmli-Puffer versetzt und für 3 min auf 99 °C erhitzt, wobei das β -Mercaptoethanol zum Aufbrechen von Disulfidbrücken führt.

Tabelle 20: Zusammensetzung eines SDS-Gels

	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	4,8 mL	3,4 mL
30 % Acrylamid-Bis	3,96 mL	0,83 mL
1,5 M Tris pH 8,8	3,0 mL	
1,0 M Tris pH 6,8		0,63 mL
10 % SDS	0,12 mL	50 μ L
10 % APS	0,12 mL	50 μ L
TEMED	4,8 μ L	5 μ L

Als Massenstandard wurde Precision Plus Protein™ Dual Color Standard von BIORAD (Abbildung 11) verwendet, das Gel wurde nach erfolgter elektrophoretischer Trennung mit Coomassie-Blau gefärbt.

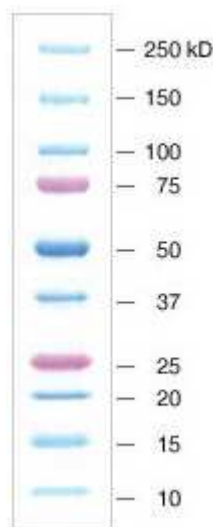


Abbildung 11: Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (BIORAD)

5 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse beziehen sich hauptsächlich auf die GalOx ohne Ausschleuse-Sequenz aus *F. oxysporum*.

5.1 Klonierung von Galaktose bzw. Glyoxal Oxidase Genen

5.1.1 Isolierung der gDNA aus unterschiedlichen Organismen

Um den Erfolg der jeweiligen Methode zu überprüfen, wurden 5 µL der isolierten DNA mit entsprechender Menge 6x MassRuler™ DNA loading dye (Fermentas) versetzt und auf ein 0,8 %-iges Agarosegel geladen. Als Längenstandard wurden 5 µL GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Abbildung 12) bzw. MassRuler™ DNA Ladder Mix (Abbildung 13) verwendet.

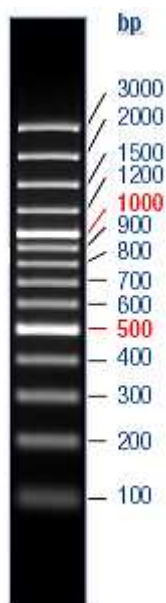


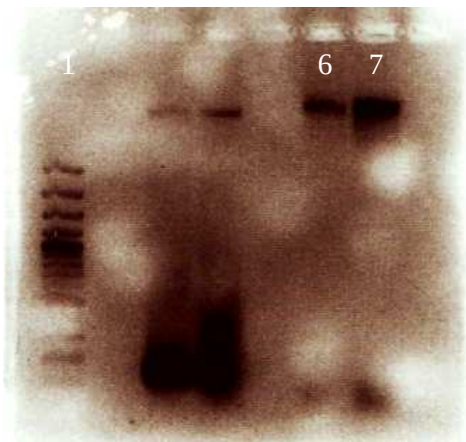
Abbildung 12: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)



Abbildung 13: MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)

Isolierung der gDNA aus *F. oxysporum*

Um den Erfolg der Methode zu überprüfen, wurden 5 µL der isolierten DNA mit 2 µL 6x „loading dye“ versetzt und auf ein 0,8 %-iges Agarosegel geladen (Abbildung 14). Als Längenstandard wurden 5 µL GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Abbildung 12) verwendet.



lane 1: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder

lane 6: 1. Elution

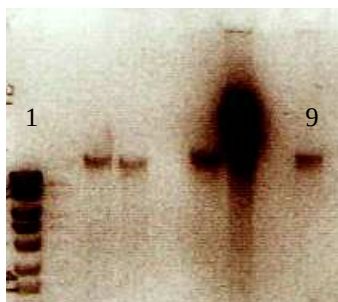
lane 7: 2. Elution

Abbildung 14: Isolierte gDNA aus *F. oxysporum*

Für die nachfolgende PCR-Reaktion wurde jene gDNA aus *F. oxysporum* verwendet, welche auf lane 6 sichtbar ist. Diese Bande spiegelt jene DNA wieder, welche mittels erster Elution gewonnen wurde. Lane 7 zeigt jene DNA, welche nach der zweiten Elution gewonnen wurde. Die untere Bande auf dem Foto zeigt die RNA, welche nicht vollständig von der RNase abgebaut wurde.

Isolierung der gDNA aus *F. sambucinum*

Lane 9 zeigt die Ausbeute der gDNA Isolierung aus *F. sambucinum* (Abbildung 15).



lane 1: MassRuler™ DNA Ladder Mix (Abbildung 13)

lane 9: *F. sambucinum* gDNA

Abbildung 15: Isolierte gDNA aus *F. sambucinum*

Der erste Schritt dieser Arbeit bestand darin genomische DNA aus den unterschiedlichen Pilzen zu isolieren. Dies erwies sich als relativ schwierig, da unterschiedliche Methoden unterschiedlich gut für die verschiedenen Organismen geeignet waren. Die jeweils beste Methode für die Isolierung der gDNA ist aus Tabelle 21 ersichtlich.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Methoden zur gDNA-Isolierung

Organismus	Methode um die gDNA zu isolieren
<i>F. oxysporum</i>	Wizard [®] SV Genomic DNA Purification System
<i>F. graminearum</i>	Wizard [®] SV Genomic DNA Purification System
<i>F. sambucinum</i>	Phenol-Chloroform-Extraktion (nach Chomczynski & Sacchi, 1987)
<i>A. terreus</i>	Wizard [®] SV Genomic DNA Purification System
<i>N. crassa</i>	"Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR" (Liu <i>et al.</i> , 2000)
<i>B. cinerea</i>	Wizard [®] SV Genomic DNA Purification System
<i>P. chrysosporium</i>	Phenol-Chloroform-Extraktion (nach Chomczynski & Sacchi, 1987)

5.1.2 Amplifizierung der Galaktose bzw. Glyoxal Oxidase Gene

Amplifizierung des GalOx Gens (ohne Ausschleuse-Sequenz) aus *F. oxysporum*

Die gesamten PCR-Produkte (25 µL) wurden mit jeweils 5 µL 6x „loading dye“ versetzt und auf ein 0,8 %-iges Agarosegel geladen (Abbildung 16). Als Längenstandard wurden 5 µL GeneRuler[™] 100 bp Plus DNA Ladder (Abbildung 12) aufgetragen.

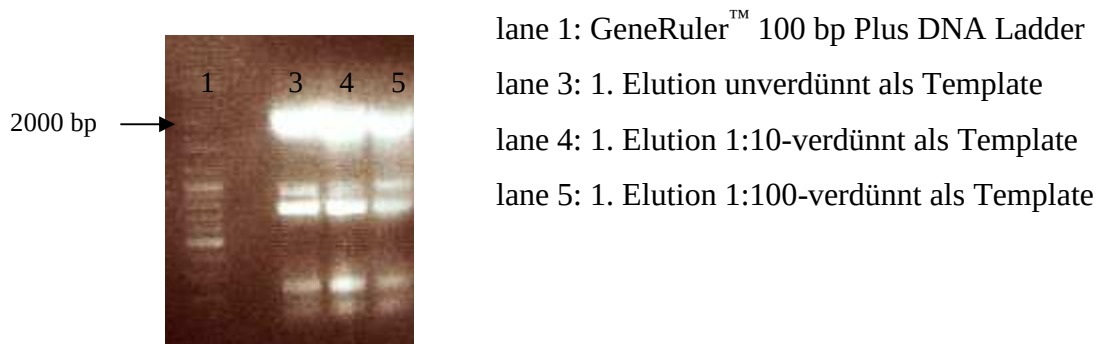


Abbildung 16: Amplifikation des GalOx-Gens ohne Ausschleuse-Sequenz aus *F. oxysporum*

Da nach der Aufreinigung der DNA aus dem Gel relativ viel DNA verloren ging, wurde die PCR-Reaktion unter denselben Bedingungen wiederholt, wobei als Template die 1:10-verdünnte gDNA (nach 1. Elutionsschritt; lane 4) diente. Es wurden fünf idente Ansätze verwendet, welche nach erfolgter PCR-Reaktion vereint und gemeinsam auf ein 0,8 %-iges

Agarosegel geladen wurden. Anschließend wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten, aufgereinigt und als Insert für eine nachfolgende Klonierung verwendet.

Amplifizierung des GalOx Gens (inklusive Ausschleuse-Sequenz) aus *F. oxysporum*

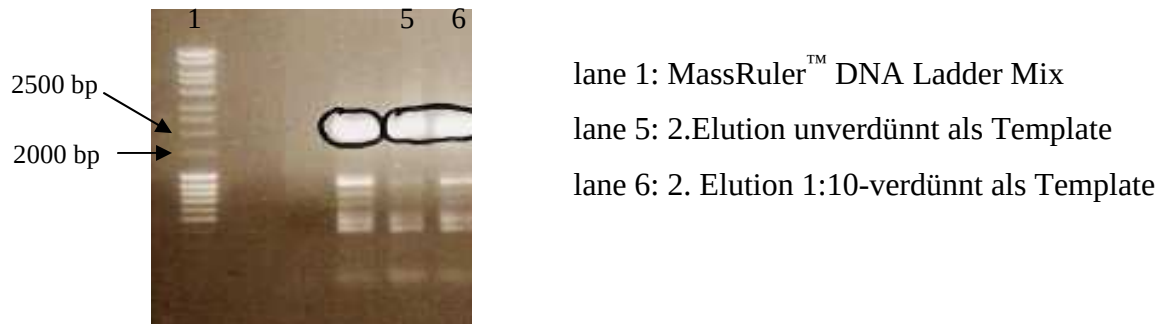


Abbildung 17: Amplifikation des GalOx-Gens inkl. Ausschleuse-Sequenz aus *F. oxysporum*

Die DNA-Banden mit den entsprechenden Größen sind in Abbildung 17 gekennzeichnet.

Amplifizierung des GalOx Gens (ohne Ausschleuse-Sequenz) aus *F. sambucinum*

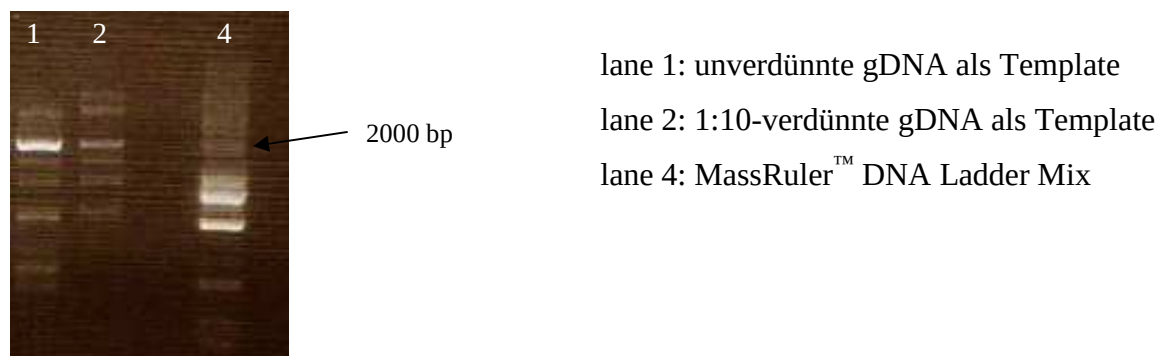


Abbildung 18: Amplifikation des GalOx-Gens ohne Ausschleuse-Sequenz aus *F. sambucinum*

Die DNA-Banden bei der entsprechenden Größe (ca. 2 kb) wurden ausgeschnitten und gemeinsam aufgereinigt.

Amplifizierung des GalOx Gens (inklusive Ausschleuse-Sequenz) aus *F. sambucinum*

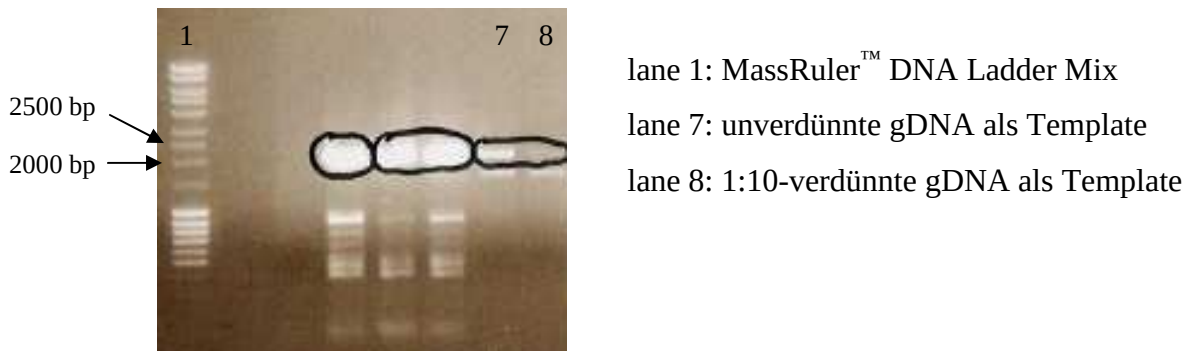


Abbildung 19: Amplifikation des GalOx-Gens inkl. Ausschleuse-Sequenz aus *F. sambucinum*

Die DNA-Banden mit den entsprechenden Größen sind in Abbildung 19 gekennzeichnet.

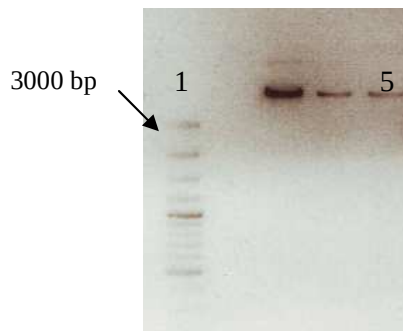
5.2 Sequenzierung der Galaktose bzw. Glyoxal Oxidase Gene

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der jeweiligen PCR- Produkte wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System aufgereinigt. Um den Erfolg der Aufreinigung zu kontrollieren, wurden 5 µL gereinigte DNA mit 2 µL 6x „loading dye“ versetzt und erneut auf ein 0,8 %-iges Agarosegel geladen. Im Anschluss daran erfolgte die Ligation in entsprechende Vektoren mit anschließender Transformation in kompetente DH5α *E. coli* Zellen.

5.2.1 Kontrollrestriktion nach Isolierung der Plasmid-DNA

Nach der Transformation wurden jeweils drei bis vier Einzelkolonien gepickt und in 3 mL entsprechendem Medium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA. Zur Kontrolle der Plasmid-Isolierung, sowie der Restriktion wurden jeweils 5 µL der verdauten Plasmide mit 2 µL 6x „loading dye“ versetzt und auf ein 0,8 %-iges Agarosegel geladen. Dadurch konnte überprüft werden, ob der Vektor ein Insert mit entsprechender Größe enthält.

GalOx Gen (ohne Ausschleuse-Sequenz) in pJET1/blunt cloning vector aus *F. oxysporum*



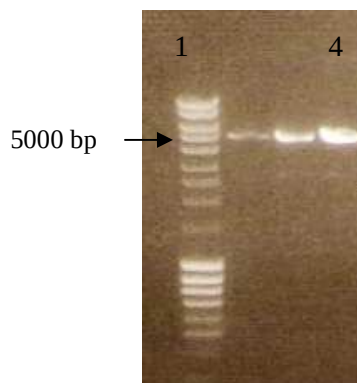
lane 1: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder

lane 5: GalOx-Gen aus *F. oxysporum* in pJET1/blunt cloning vector geschnitten mit XhoI

Abbildung 20: Kontrollrestriktion

Leider zeigt der Größenstandard keine Bande bei 5000 bp (Abbildung 20). Aus diesem Grund konnte nur angenommen werden, dass Vektor und Insert etwa dieser Größe entsprechen. Nach der Sequenzierung wurde allerdings bestätigt, dass der Vektor das GalOx-Gen enthielt.

GalOx Gen (inklusive Ausschleuse-Sequenz) in pJET1/blunt cloning vector aus *F. oxysporum*



lane 1: MassRuler™ DNA Ladder Mix

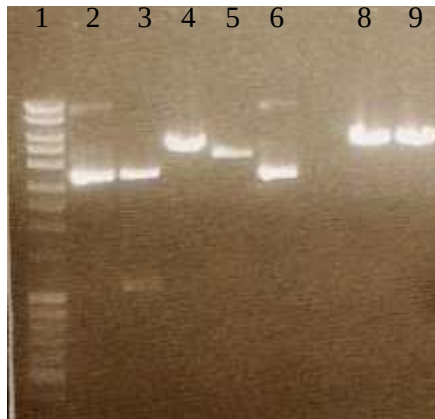
lane 5: GalOx-Gen aus *F. oxysporum* in pJET1/blunt cloning vector geschnitten mit XhoI

Abbildung 21: Kontrollrestriktion

Das gesuchte Konstrukt sollte eine DNA-Bande bei etwa 5170 bp zeigen. Mithilfe des Größenstandards konnte gezeigt werden, dass der Vektor ein Insert mit etwa 2000 bp enthielt (Abbildung 21). Auch hier wurde mittels Sequenzierung bestätigt, dass die Klonierung erfolgreich war.

5.2.2 Restriktionsanalyse

Die Ergebnisse beziehen sich auf das GalOx Gen (ohne Ausschleuse-Sequenz) im pJET1/blunt cloning vector. Es wurden jeweils 5 μ L der verdauten Plasmide mit 2 μ L 6x „loading dye“ versetzt und auf ein 0,8 %-iges Agarosegel geladen (Abbildung 22). Als Negativkontrolle diente der unverdaute Vektor.



Lane 1: MassRuler™ DNA Ladder Mix

Lane 2: Negativkontrolle

Lane 3: Plasmid geschnitten mit BamHI

Lane 4: Plasmid geschnitten mit HindIII

Lane 5: Plasmid geschnitten mit NcoI

Lane 6: Plasmid geschnitten mit NdeI

Lane 8: Plasmid geschnitten mit Not I

Lane 9: Plasmid geschnitten mit SalI

Abbildung 22: Restriktionsanalyse für das Auffinden geeigneter Schnittstellen

Anhand dieser Abbildung (Abbildung 22) lassen sich folgende Aussagen treffen: Die Enzyme HindIII, NcoI, NotI und SalI schneiden einmal innerhalb des Vektors. BamHI schneidet einmal innerhalb des Vektors sowie einmal innerhalb des Insert. Das Restriktionsenzym NdeI findet weder im Vektor, noch im Insert eine entsprechende Erkennungssequenz.



Abbildung 23. Verdau mit NheI

Die Restriktionsendonuklease NheI schneidet einmal innerhalb des Vektors (Abbildung 23).

Aufgrund dieser Restriktionsanalyse wurden geeignete Erkennungsstellen für NdeI und SalI mittels PCR-Reaktionen an den jeweiligen Gen-Enden eingefügt um die Umklonierung in einen Expressionsvektor zu realisieren.

5.3 Expression des GalOx-Gens ohne Ausschleuser von *F. oxysporum*

5.3.1 Expressionsversuche

Induktion

Fand keine Inkubation mit CuSO₄ statt, konnte keinerlei Aktivität erfasst werden.

Tabelle 22 zeigt, dass Laktose als Induktor die besten Aktivitäten lieferte. Weiters konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität größer ist, wenn die CuSO₄-Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt wurde.

Tabelle 22: Induktionsversuche zur Verbesserung der Ausbeute an rekombinanter GalOx

Induktor	Inkubation mit CuSO ₄ bei 4 °C	Inkubation mit CuSO ₄ bei 25 °C	Negativkontrolle
Blank	0,08 U/mL	0,11 U/mL	0 U/mL
0,5 % Laktose	0,41 U/mL	0,52 U/mL	0 U/mL
0,01 mM IPTG	0,14 U/mL	0,18 U/mL	0 U/mL
0,1 mM IPTG	0,07 U/mL	0,08 U/mL	0 U/mL
1 mM IPTG	0,01 U/mL	0,02 U/mL	0 U/mL

Ein möglicher Grund für die geringen Aktivitätswerte könnte sein, dass das Gen vermehrt in seiner inaktiven, stabilen Form exprimiert wird. Je höher die eingesetzte IPTG-Konzentration ist, desto niedriger ist die gemessene Aktivität. Der Grund dafür liegt darin, dass bei Überexpression des GalOx-Gens vermehrt „Inclusion Bodies“ gebildet werden.

Aufschluss der Zellen

Bei der Homogenisation kleiner Volumina mittels „Precellys 24“ konnte festgestellt werden, dass ein Schüttelintervall mit einer Dauer von 15 s deutlich bessere Ergebnisse lieferte, als jenes mit einer Dauer von 30 s (Tabelle 23).

Tabelle 23: Versuche zur Optimierung des Zellaufschlusses

Homogenisation	Aktivität (U/mL)
1x 15 s	0,23
1x 30 s	0,09
2x 15 s	0,3
2x 30 s	0

Die geringen Aktivitätswerte nach einem 30-sekündigen Homogenisations-Zyklus sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Proteine durch die eingetragene Energie teilweise denaturieren.

CuSO₄-Konzentration

Tabelle 24 zeigt, dass größere Aktivitätswerte gemessen werden konnten, wenn die CuSO₄-Zugabe nachträglich erfolgte und lässt erneut erkennen, dass Laktose den optimalen Induktor darstellt. Die CuSO₄-Endkonzentration betrug 0,4 mM.

Tabelle 24: Optimierungsversuche zur Steigerung der Enzymaktivität I

	CuSO₄- gleichzeitig mit Induktor-Zugabe	CuSO₄-Zugabe nachträglich
Blank	0 U/mL	0,05 U/mL
0,01 mM IPTG	0 U/mL	0,08 U/mL
0,1 mM IPTG	0 U/mL	0,15 U/mL
1 mM IPTG	0 U/mL	0,24 U/mL
0,5 % Laktose	0,30 U/mL	5,44 U/mL

Erfolgt die CuSO₄-Zugabe zu früh, hat das Schwermetall ausreichend Gelegenheit sein cytotoxisches Potential zu entfalten.

Anhand der gemessenen Werte konnte gezeigt werden, dass eine Inkubationszeit von 30 min nicht unterschritten werden sollte (Tabelle 25). Mit fortlaufender Dauer veränderten sich die Werte nicht mehr signifikant. Die CuSO_4 -Konzentration betrug 0,4 mM.

Tabelle 25: Optimierungsversuche zur Steigerung der Enzymaktivität II

Dauer der CuSO_4 -Inkubation (min)	Aktivität (U/mL)
5	0,19
15	1,36
30	1,84
60	1,77
90	1,9
120	1,56

Anhand der folgenden Tabelle 26 ist zu erkennen, dass eine CuSO_4 -Konzentration von 1 mM während der Inkubation die höchsten Aktivitätswerte lieferte.

Tabelle 26: Auffinden der geeigneten CuSO_4 -Konzentration

CuSO_4 -Konz. (mM)	Aktivität (U/mL)
10	3,3
3	4,37
1	5,01
0,4	0,15
0,3	0,01
0,1	0,01
0,03	0,05
0,01	0,04

Medium

Bei der Verwendung von TB-Amp-Medium wurde eine Aktivität von 3,13 U/mL gemessen, beim Gebrauch von doppelt-konzentriertem-LB-Amp-Medium betrug die Aktivität 4,16 U/mL. Der Grund dafür ist, dass in letzterem Medium mehr Biomasse produziert wird und in Folge verstärkte Genexpression stattfindet.

Puffer

Die Aktivität erreichte einen Höchstwert bei der Verwendung folgender Pufferkombination:

- Homogenisationspuffer: 100 mM NaH₂PO₄ + 0,1 mM EDTA pH 7,0
- Puffer für die Aktivitätsmessung: 50 mM KPP pH 8,0.

Bei weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass 50 mM KPP-Puffer mit einem pH-Wert von 7,0 ebenfalls hohe Aktivitäten lieferte.

5.4 Reinigung der GalOx ohne Ausschleuser aus *F. oxysporum*

5.4.1 Vorversuche

Kationenaustauschchromatographie

Da bei der Verwendung des Puffers mit einem pH-Wert von 6,0 der geringste Aktivitätswert gemessen wurde, lässt dies darauf schließen, dass hier die Bindung an das Säulenmaterial am effizientesten war. Weiters konnte gezeigt werden, dass die Elution bei pH 6,0 die besten Aktivitätswerte lieferte.

Ammonsulfatfällung und Hydrophobe Interaktionschromatographie

Nach erfolgter Ammonsulfatfällung wies jener Überstand die höchste Aktivität (13,4 U/mL) auf, welcher einer 20 %-igen Sättigung ausgesetzt war. Die Proteinkonzentration betrug 12,5 mg/mL. Bei der Aktivitätsmessung der resuspendierten Pellets lieferte eine 60 %-ige Sättigung den höchsten Wert (17,5 U/mL). Die Proteinkonzentration betrug 9,5 mg/mL.

Nach erfolgter HIC wurden Durchfluss und eluiertes Protein auf Aktivität und Proteinkonzentration getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Auffinden geeigneter Reinigungsparameter

20 % Ammonsulfat-Fällung	Aktivität (U/mL)	Protein-Konzentration (mg/mL)
Durchfluss	0	0,17
eluiertes Protein	1,24	0,36
30 % Ammonsulfat-Fällung		
Durchfluss	0	0,15
eluiertes Protein	1,16	0,39

5.4.2 Proteinreinigung ohne His-Tag

Ammonsulfatfällung und HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography)

Die Reinigungsdaten sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Reinigungsschema rekombinanter GalOx ohne His-Tag

Reinigungsstufe	Gesamt-Protein [mg]	Gesamt-Aktivität [U]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	4,93	19,16	3,89	100	1
HIC	0,75	9,98	13,31	52,1	3,43

Mittels Ammonsulfatfällung und HIC konnte die spezifische Aktivität von 3,89 U/mg auf 13,31 U/mg erhöht werden. Die Ausbeute betrug etwa 52 %, der Reinigungsfaktor 3,43. Leider war die Bindung des Proteins an die Säule nicht sehr erfolgreich, da relativ hohe Aktivitäten im Durchfluss gemessen wurden. Der Versuch die spezifische Aktivität mittels IEC weiter zu erhöhen scheiterte, da die Bindung des Proteins an das verwendete Säulenmaterial sehr ineffizient war.

Es wurde ebenfalls versucht den Rohextrakt mittels IEC zu reinigen, doch diese Methode erwies sich als wenig erfolgreich. Der höchste Aktivitätswert konnte im Durchfluss gemessen werden, was darauf schließen lässt, dass das Enzym nicht an das Säulenmaterial binden konnte. Auch der Versuch die pH-Werte der Puffer bzw. die Salzkonzentrationen zu variieren konnte die Proteinreinigung nicht verbessern. Tabelle 18 spiegelt jene Reinigungsparameter wider, welche die besten Ergebnisse lieferten, doch auch hier befand sich das meiste Protein im Durchfluss.

Der isoelektrische Punkt des für die Untersuchungen verwendeten Enzyms lag bei ca. pH 10. Somit hätte das Enzym bei den gewählten Parametern an das Säulenmaterial binden müssen. Da die Proteinkonzentration in den Fraktionen zu gering war konnte keine SDS PAGE durchgeführt werden. Für weitere Aufreinigungsversuche müssen andere Chromatographie-Bedingungen gewählt werden.

5.4.3 Proteinreinigung mit His-Tag

Da das „Taggen“ von Proteinen zu Konformationsänderungen bzw. sonstigen Änderungen in der Proteinstruktur führen kann, wurden die ersten Versuche ohne His-Tag gemacht. Da die

Reinigung allerdings nicht den Erwartungen entsprach, wurde das Stopp-Codon des GalOx-Gens entfernt, um ein Fusionsprotein mit C-terminalem His-Tag zu kreieren.

Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Reinigungsdaten sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Daten der Reinigung mittels IMAC

Reinigungsstufe	Gesamt-Protein [mg]	Gesamt-Aktivität [U]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	55,22	13	0,23	100	1
IMAC	0,69	4,34	6,27	33,38	27,26

Die spezifische Aktivität betrug vor der Reinigung 0,23 U/mg und konnte mittels IMAC auf 6,27 U/mg erhöht werden. Die Ausbeute betrug etwa 33 %, der Reinigungsfaktor 27,26.

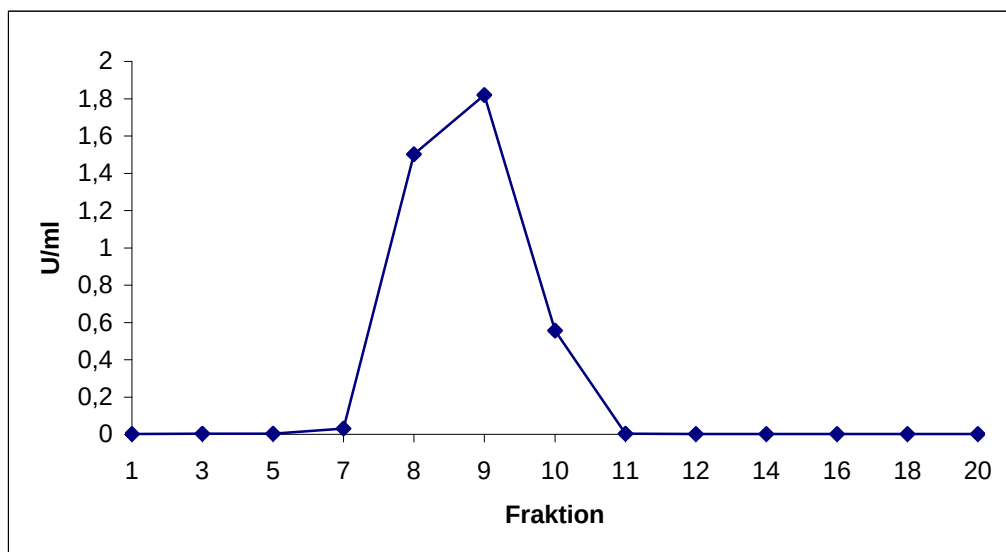


Abbildung 24: Reinigung der rekombinanten GalOx mittels IMAC

Abbildung 24 zeigt den Verlauf der Reinigung mittels IMAC. Die Fraktionen 8, 9 und 10 wurden gepoolt und ein Aliquot wurde für eine SDS-PAGE-Analyse verwendet. Diese zeigte, dass die Proteinreinigung effizient war, da nur noch eine Bande am Gel sichtbar war.

5.4.4 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE-Analyse lieferte kaum verwertbare Ergebnisse, da die einzelnen Banden nur sehr schwach und kaum sichtbar waren. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die

IMAC die Reinigungsmethode war, nach welcher nur noch eine Bande zu sehen war und daher die größte Spezifität aufwies.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte versucht werden Galaktose- bzw. Glyoxal-Oxidase-Gene aus verschiedenen Organismen zu klonieren. Weitere Ziele waren die Expression eines GalOx-Gens in *E. coli* und die anschließende Reinigung des Proteins mittels verschiedener Techniken.

Um diese Vorgaben zu realisieren mussten zunächst die entsprechenden Pilze kultiviert und die genomische DNA isoliert werden. Hierfür wurden verschiedenen Methoden getestet um ausreichend Ausgangsmaterial für nachfolgende PCR-Reaktionen zu erhalten.

Um die Gene amplifizieren zu können wurden in der Regel „perfect match“-Primer designt, welche auf Einträgen in entsprechenden Datenbanken (Tabelle 30) basierten. Im Falle des GalOx-Gens aus *F. sambucinum* wurden degenerierte Primer verwendet, welche auf Sequenzen verwandter Organismen beruhten (Accession Number: FGSG_11032.3 / M86819 / FOXG_09956.2 / FVEG_08555.3).

Tabelle 30: In silico Analyse

	Accession Number	Datenbank
<i>F. oxysporum</i>	FOXG_09956.2	Broad Institute
<i>F. graminearum</i>	FGSG_11032.3	Broad Institute
<i>F. sambucinum</i>		
<i>A. terreus</i>	ATEG_06260.2	Broad Institute
<i>N. crassa</i>	NCU09209.3	Broad Institute
<i>B. cinerea</i>	AJ557245	NCBI GenBank
<i>P. chrysosporium</i>	L47286	NCBI GenBank

Die amplifizierten Gensequenzen dienten in weiterer Folge als Inserts für „blunt-end“-Vektoren. Nach erfolgter Transformation in *E. coli*, anschließender Isolierung der Plasmide und Sequenzanalyse konnte bestätigt werden, dass es sich tatsächlich um GalOx- bzw. GlyOx-Gene aus den oben genannten Organismen handelte.

In weiterer Folge wurde versucht das GalOx-Gen aus *F. oxysporum* ohne Ausschleuse-Sequenz in *E. coli* zu exprimieren. Dieser Organismus wurde aus dem Grund gewählt, da er in der Literatur noch nicht präsent war. Bei der phylogenetisch verwandten Spezies *F. graminearum* wurde das GalOx-Gen mit Ausschleuse-Sequenz erfolgreich heterolog in *E. coli*

exprimiert, jedoch war dies ohne Ausschleuse-Sequenz nicht zu realisieren. Deshalb wurde das Gen in dieser Arbeit ohne Ausschleuse-Sequenz für die meisten Versuche herangezogen. Für die erfolgreiche Expression war es notwendig passende Schnittstellen an den Enden des Gens einzufügen und anschließend in einen induzierbaren Expressionsvektor pET-21a zu klonieren.

Weiters wurden verschiedene Bedingungen bzw. Parameter, wie Induktor, Medium oder Homogenisation variiert um die heterologe Genexpression zu optimieren. Hierbei stellte sich heraus, dass Laktose mit einer Endkonzentration von 0,5 % als Induktor am besten geeignet ist. Als Medium wurde doppelt-konzentriertes LB-Amp verwendet, da es die höchsten Aktivitäten lieferte. Nach erfolgreichem Zellaufschluss musste eine Inkubation mit CuSO_4 erfolgen, damit die GalOx aktiviert wurde. Hierbei lieferte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und 1000 rpm mit einer CuSO_4 -Endkonzentration von 1,0 mM die besten Ergebnisse.

Für die Herstellung des Rohextraktes für die nachfolgenden Proteinreinigungen wurde eine Fermentation durchgeführt. Eine Reinigung mittels Ammonsulfatfällung und HIC lieferte eine Ausbeute von etwa 52 % mit einem Reinigungsfaktor von ca. 3. Die spezifische Aktivität betrug 13,3 U/mg.

Ein anschließender Reinigungsschritt mittels IEC brachte keine Erfolge, da die GalOx nicht an das verwendete Säulenmaterial binden konnte.

Da die Proteinreinigungen mittels HIC und IEC nicht die gewünschten Ergebnisse lieferten, wurde das Stopp-Codon des GalOx-Gens im pET-21a Vektor mittels PCR-Reaktion entfernt, welches verhinderte, dass das rekombinante Protein einen His₆-Tag trug. Nach diesem Schritt war eine Reinigung mittels IMAC möglich. Diese lieferte eine Ausbeute von etwa 33 % mit einem Aufreinigungsfaktor von etwa 27. Die spezifische Aktivität betrug 6,3 U/mg, die anschließend durchgeführte SDS-PAGE zeigte eine Bande.

Im verwendeten Puffersystem war das Enzym nicht ausreichend stabil. Der Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass die GalOx stark negativ geladen ist und mit positiven Bestandteilen des Puffers wechselwirkt, was in weiterer Folge zur Bildung von Aggregaten führen könnte. Ein weiterer Grund könnte eine Denaturierung des Proteins sein, wodurch es ausfällt.

Zusammenfassung

Eine Lagerung des aufgereinigten Proteins bei 4 °C führte zu einem Aktivitätsverlust von etwa 50 % über Nacht. Es wurden verschiedene Temperaturen für die Aufbewahrung (4 / -30 / 25 °C) getestet, doch den geringsten Verlust erhielt man bei 4 °C.

In weiteren Experimenten kann der Einsatz von Protein-Stabilisatoren getestet werden, z.B. Triton X-100 oder Tween 80. Weiters sollte die Lagerung in einem kationischen Puffer, wie beispielsweise Tris oder Bis-Tris getestet werden.

.

7 Summary

The aim of this work was to clone galactose respectively glyoxal oxidase genes from different organisms. Furthermore, one of these genes should be expressed in *E. coli* and purified by using different techniques.

Starting with the cultivation of appropriate fungi, different methods were used to isolate genomic DNA. Afterwards standard PCR methods were applied to amplify the genes. Therefore perfect match primers were designed based on sequences available in relevant databases (Tabelle 30). To amplify the galactose oxidase gene from *F. sambucinum* degenerated primers were used based on sequences from related organisms (Accession Numbers: FGSG_11032.3 / M86819 / FOXG_09956.2 / FVEG_08555.3).

These amplified genes were cloned in blunt end vectors and transformed in *E. coli* cells. Afterwards the plasmids were isolated and sequenced to proof that these vectors contained the correct inserts. The following genes (Table 31:) were amplified:

Table 31: GalOx- and GlyOx-genes which were amplified and cloned in *E. coli*

Organism	Gene
<i>F. oxysporum</i>	GalOx with and without prepro-sequence
<i>F. graminearum</i>	GalOx with and without prepro-sequence
<i>F. sambucinum</i>	GalOx with and without prepro-sequence
<i>A. terreus</i>	GalOx precursor
<i>N. crassa</i>	GalOx precursor
<i>B. cinerea</i>	GlyOx precursor
<i>P. chrysosporium</i>	GlyOx with signal sequence

To express the galactose oxidase gene (without prepro-sequence) from *F. oxysporum* in *E. coli* PCR reaction was performed to insert appropriate restriction sites at both ends of this gene sequence for cloning into the inducible expression vector pET-21a. *F. oxysporum* was selected because it has not been cited in journals. The gene from the phylogenetically related organism *F. graminearum* was successfully expressed in *E. coli* using the prepro-sequence, but not without this sequence. Therefore it was tried to express the gene without this sequence in this work.

Summary

For optimizing the expression level, different parameters were varied like type and concentration of inducer, medium or conditions for cell disruption. The best results were obtained with 0.5 % lactose as inducer and double-concentrated LB-Amp-medium for cultivation. After homogenisation it was necessary to incubate the protein with CuSO_4 to activate the galactose oxidase. The highest activities were obtained after incubation for 30 minutes at 25 °C while shaking at 1000 rpm with a copper concentration of 1 mM.

The production of the crude extract for subsequent protein purification was performed in a 4.5 L scale. Samples were saturated to 20 % with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and afterwards purified by HIC. The yield of enzyme was 52 %, the purification factor 3 and the specific activity 13.3 U/mg. A further purification step via IEC failed, because the enzyme did not bind to the column.

To minimize the activity of galactose oxidase in the flow-through it was tried to purify the enzyme via IMAC. Therefore it was necessary to remove the stop-codon of the gene upstream of the His₆-Tag. This purification step provided a yield of 33 %, a purification factor of 27 and the specific activity was 6.3 U/mg.

In the applied buffer system the enzyme was not sufficiently stable. The reason for this observation might be the highly negative charge of the protein and the possible interaction with cationic species present in the buffer system. This may lead to the formation of aggregates. Furthermore denaturing effects could occur resulting in formation of precipitation. An overnight incubation at 4 °C lead to a drastic loss of activity. Various temperatures were assessed, thus the lowest loss in activity is at 4 °C.

Continuative experiments may be performed in order to test the application of protein stabilizers, for example Triton X-100 or Tween 80. Furthermore the usage of cationic buffering agents should be evaluated, for example Tris or Bis-Tris.

8 Literatur

Aisaka, K. & Terada, O. 1981

Production of Galactose Oxidase by *Gibberella fujikuroi*. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**, 2311-2316

Askenazi, M., Driggers, E.M., Holtzman, D.A., Norman, T.C., Iverson, S., Zimmer, D.P., Boers, M.E., Blomquist, P.R., Martinez, E.J., Monreal, A.W., Feibelman, T.P., Mayorga, M.E., Maxon, M.E., Sykes, K., Tobin, J.V., Cordero, E., Salama, S.R., Trueheart, J., Royer, J.C. & Madden, K.T. 2003

Integrating transcriptional and metabolite profiles to direct the engineering of lovastatin-producing fungal strains. *Nature biotechnology* **21**, 150-156

Avigad, G., Amaral, D., Asensio, C. & Horecker, B.L. 1962

The D-Galactose Oxidase of *Polyporus circinatus*. *The Journal of Biological Chemistry* **237**, 2736-2743

Birren, B., Lander, E., Galagan, J., Nusbaum, C., Devon, K., Ma, L.-J., Jaffe, D., Butler, J., Alvarez, P., Gnerre, S., Grabherr, M., Kleber, M., Mauceli, E., Brockman, W., MacCallum, I.A., Young, S., LaButti, K., DeCaprio, D., Crawford, M., Koehrsen, M., Engels, R., Montgomery, P., Pearson, M., Howarth, C., Larson, L., White, J., O'Leary, S., Kodira, C., Zeng, Q., Yandava, C., Alvarado, L., Kistler, C., Shim, W.-B., Kang, S. & Woloshuk, C. 2008

Genome Sequence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*.

Submitted (08-NOV-2008) Broad Institute of MIT and Harvard, 7 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142, USA

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

Chomczynski, P. & Sacchi, N. 1987

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**, 156-159

Cooper, J.A.D., Smith, W., Bacila, M. & Medina, H. 1959

Galactose Oxidase from *Polyporus circinatus*, Fr. *The Journal of biological chemistry* **234**, 445-448

Cuomo, C.A., Güldener, U., Xu, J.R., Trail, F., Turgeon, B.G., Di Pietro, A., Walton, J.D., Ma, L.J., Baker, S.E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y.L., Decaprio, D., Gale, L.R., Gnerre, S., Goswami, R.S., Hammond-Kosack, K., Harris, L.J., Hilburn, K., Kennell, J.C., Kroken, S., Magnuson, J.K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H.W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., Münsterkötter, M., Nelson, D., O'donnell, K., Ouellet, T., Qi, W., Quesneville, H., Roncero, M.I., Seong, K.Y., Tetko, I.V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T.J., Yao, J., Birren, B.W. & Kistler, H.C. 2007

The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* **317**, 1400-1402

Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C.B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C.P., Kinsey, J.A., Braun, E.L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G.O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R.L., Perkins, D.D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R.J., Osmani, S.A., DeSouza, C.P., Glass, L., Orbach, M.J., Berglund, J.A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D.O., Alex, L.A., Mannhaupt, G., Ebbole, D.J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M.S., Lander, E.S., Nusbaum, C. & Birren, B. 2003

The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**, 859-868

Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. & Gelbart, W.M. 1999

Introduction to Genetic Analysis. *W. H. Freeman & Co., New York*

Ito, N., Phillips, S.E.V., Stevens, C., Ogel, Z.B., McPherson, M.J., Keen, J.N., Yadav, K.D.S. & Knowles, P.F. 1991

Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase. *Nature* **350**, 87-90

Kersten, P.J. & Cullen, D. 1993

Cloning and characterization of cDNA encoding glyoxal oxidase, a H₂O₂-producing enzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 7411-7413

Kück, U. (Hrsg.) 2005

Praktikum der Molekulargenetik. *Springer Verlag*

Liu, D., Coloe, S., Baird, R. & Pederson, J. 2000

Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of clinical microbiology* **38**, 471

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J.E. 1999

Molecular Cell Biology. *W. H. Freeman & Co., New York*

McPherson, M.J., Ogel, Z.B., Stevens, C., Yadav, K.D., Keen, J.N. & Knowles, P.F. 1992

Galactose oxidase of *Dactylium dendroides*. Gene cloning and sequence analysis. *The Journal of biological chemistry* **267**, 8146-8152

Mülhardt, C. 2003

Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg* 2008. 4. Auflage

Paukner, R. 2008

Klonierung und Kristallisation von Pyranose-2-Oxidase aus Basidiomyceten, Diplomarbeit. Universität für Bodenkultur, Wien

Pingoud, A. & Urbanke, C. 1997

Arbeitsmethoden der Biochemie. *De Gruyter Lehrbuch, Berlin*

Rogers, M.S., Tyler, E.M., Akyumani, N., Kurtis, C.R., Spooner, R.K., Deacon, S.E., Tamber, S., Firbank, S.J., Mahmoud, K., Knowles, P.F., Phillips, S.E.V., McPherson, M. J. & Dooley, D.M. 2007

The stacking tryptophan of galactose oxidase: A second-coordination sphere residue that has profound effects on tyrosyl radical behavior and enzyme catalysis. *Biochemistry* **46**, 4606-4618

Schlegel, H.G. 1992

Allgemeine Mikrobiologie. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York* 7. Auflage

Sternbach, H. 1991

Chromatographische Methoden in der Biochemie. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York* 1. Auflage

Whittaker, M.M., Kersten, P.J., Nakamura, N., Sanders-Loehr, J., Schweizer, E.S. & Whittaker, J.W. 1996

Glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is a new radical-copper oxidase. *The Journal of biological chemistry* **271**, 681-687

Wilkinson, D., Akumanyi, N., Hurtado-Guerrero, R., Dawkes, H., Knowles, P.F., Phillips, S.E. & McPherson, M.J. 2004

Structural and kinetic studies of a series of mutants of galactose oxidase identified by directed evolution. *Protein Engineering, Design and Selection* **17**, 141-148

Wilson, K. & Goulding K.H. 1991

Methoden der Biochemie. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York* 3. Auflage

9 Anhang

9.1 DNA-Sequenz der GalOx (ohne Ausschleuse-Sequenz) aus *Fusarium oxysporum*

GCCTCAGCTCCCATCGGCACTGCTATCAACCGCGACAAATGGCGTGTTACCTGTGACAGCCAGCAC
 GAGGGAGATGAGTGTTC AAGGCCATTGATGGTGACCGCGACACCTTCTGGCACA CTGCCTGGGCC
 GCTGGAGGCACCAATGACCCAAAGCCTCCTCATACCATCACTATCGACATGGGCTCTTCCCAGAAT
 GTGAACGGCTTATCTGTTCTTCCTCGTCAGGACGGTAGTGATCACGGCTGGATCGGCCGTCACAAT
 GTCTTTCTAAGTACAGATGGGAAGAACTGGGGCGACGCTGTGCGAACTGGAACATGGTTCGCTGAC
 AACACTGAAAAATACTCTAATTTTGAGACTCGTCCTGCTCGTTACGTTCTGCTTGTCACTGTTACTG
 AAGCAAACGACCAGCCTTGGACCAGTATCGCCGAGATCAACGTCTTCAAGGCAGCTTCTTATACCA
 GCCCTCAACCTGGCCTCGGGCGCTGGGGCCCAACACTTGACTTTCTATTGTTCTGTGGCTGCTGC
 AGTTGAGCCAACATCAGGAAAAGTTCTCGTTTGGTCTTCATACCGCAACGATGCGTTCGGAGGCTC
 TCCTGGCGGCGTAACCTTAACCTCAACTTGGGATCCTTCCACGGGTGTGATTTCTCAACGCACTGTA
 ACTGTCACCAAGCATGATATGTTTTGCCCTGGTATCTCCATGGATGGAAATGGGCAGGTTGTTGTCA
 CGGGTGGCAATGACGCTCAGAAAACAAGTCTTTATGACTCGTCTAGTGATAGTTGGATCCCAGGCC
 CAGATATGAAAGTTGCCCCGCGGATACCAGTCATCAGCGACTCTATCGAATGGTTCGCGTCTTTACTA
 TCGGCGGCTCATGGAGCGGTGGTATATTTGAGAAGAATGGCGAAGTATATGACCCATCCTCAAAAA
 CATGGACCTCCCTTCCAGGAGCTTTGGTCAAGCCAATGTTGACAGCAGATCAACAAGGCCTCTACC
 GTTCTGATAACCACGGATGGCTCTTCGGTTGGAAGAAGGGATCCGTATTCCAAGCTGGACCTAGCA
 CTGCTATGAACTGGTATTACACCACTGGCAATGGAGATGTAAAGTCAGCTGGCAAGCGCCAATCGA
 GCCGCGGTACTGACCCAGATGCGATGTGCGGAAACGCCGTCATGTATGATGCCGTTAAAGGAAAG
 ATCCTTACGTTTGGCGGTTCCCCAAGCTATCAAGACTCTGATGCCACGACGAACGCTCACATCATC
 ACAATCAGCGAGCCCGGAAGCACACCCAAGACAGTGTTTCGCGAGCAATGGCCTGTACTATCCCCG
 AACTTTTCATACGTCTGTTATTCTTCCCGATGGAAACGTTTTTCATCACAGGTGGCCAACAGCGTGGT
 ATTCTTTTCGCCGACTCAACTCCGCAGCTTACACCAGAGCTTTATGTCCCCAACGATGACACTTTCT
 ATAAACAGCAACCAAACTCCATTGTCCGAGTCTACCACAGTATTTCTTATTACTACCTGACGGCA
 GGGTTTTTAACGGTGGTGGCGGTCTTTGTGGTGATTGCGACACCAACCATTTTCGATGCCCAGATCTA
 TACGCCAAACAATCTTTACGACTCTAATGGAAAACCTGGCGACACGTCCCAAGATCACTAAAGTCTC
 TGCTAAGAGTGTCAAGGTCGGTGGCAAGATCACAATCACAGCAGATACCAGCATCAAGCAGGCTT
 CGTTGATCCGTTATGGTACATCAACTCATAAGTTAATACTGACCAGCGTCGTATTCCTTTAAGTCT
 GAGACGTACTGGAACCTGGAAACAGCTATTCGTTTCAGGTTCCAAGCGACTCTGGTATTGCTTTGCCT
 GGGTATTGGATGTTGTTTGTATGAACTCGGCGGGTGTACCAAGTGTTGCGAGTACTCTTCTCGTTA
 CTCAGTAG

9.2 Aminosäure-Sequenz der GalOx (ohne Ausschleuse-Sequenz) aus *Fusarium oxysporum*

ASAPIGTAINRDKWRVTCDSQHEGDECSKAIDGDRDTFWHTAWAAGGTNDPKPPHTITIDMGSSQNVN
GLSVLPRQDGS DHGWIGRHN VFLSTDGKNWGD AVATGTWFADNTEKYSNFETR PARYVRLVTVTEAN
DQPWTSIAEINV FKAASYTSPQPGLGRWGPTLDFPIVPVAAAVEPTSGKVLVWSSYRND AFGGSPGGVT
LTSTWDPSTGVISQRTVTVTKHDMFCPGISMDGNGQVVVTGGNDAQKTSLYDSSSDSWIPGPD MKVAR
GYQSSATLSNGRVFTIGGSWSGGIFEKNGEVYDPSSKTWTS LPGALVKPMLTADQQGLYRSDNHGWLF
GWKKGSVFQAGPSTAMNWYYTTGNGDVKSAGKRQSSRGTD PDAMCGNAV MYDAVKGKILTFGGSP
SYQDSDATTNAHIITISEPGSTPKTVFASNGLYYPRTFHTSVILPDGNVFITGGQQRGIPFADSTPQLTPEL
YVPNDDTFYKQQPNSIVRVYHSISLLL PDGRVFNGGGGLCGDCDTNHFDAQIYTPNNLYDSNGKLATRP
KITKVSASVKVGGKITITADTSIKQASLIRYGTSTHTVNTDQRRIPLSLRRTGTGNSYSFQVPSDSGIALP
GYWMLFVMNSAGVPSVASTLLVTQ-

Lebenslauf

Name: **Petra Wührer**
Anschrift: Baumergasse 13/2/14
1210 Wien
Tel.: +43 (0)699 110 677 93
E-Mail: petra_wuehrer@gmx.at
Geburtsdaten: 14. Jänner 1984, Wien
Staatsangehörigkeit: Österreich

Bildungsweg

09/04–heute Studium der **Biologie – Studienzweig Genetik und Mikrobiologie**,
Universität Wien
02/08–12/08 **Diplomarbeit** am Department für Lebensmittelwissenschaften und -
technologie (BOKU), Abt. Lebensmittelbiotechnologie
Betreuer: Prof. Angela Witte
Thema: Klonierung, Expression und Reinigung von Galaktose-
Oxidase aus verschiedenen *Fusarien spp.* und verwandten Spezies
10/02–09/04 Studium der **Biologie-Diplomstudium**, Universität Wien
06/02 Mit Auszeichnung bestandene **Matura** an der De La Salle Schule in
Wien, Strebersdorf
Schulform: Realgymnasium mit Schwerpunkt Biologie und Physik

Berufserfahrung

09/09-12/09 **Angewandte Biokatalyse-Kompetenzzentrum GmbH, Graz**
Wissenschaftliche Angestellte
04/09-09/09 **Universität für Bodenkultur, Wien**
Technische Assistentin am Department für
Lebensmittelwissenschaften und -technologie,
Abteilung Lebensmittelbiotechnologie
05/08 **Universität für Bodenkultur, Wien**
Tutor im Rahmen der Lehrveranstaltung „Protein Engineering“ am
Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie,
Abteilung Lebensmittelbiotechnologie
07/07-08/07 **Baxter AG, Wien**
Ferialpraxis in der Abteilung Finished Goods Release
07/06–08/06 **Baxter AG, Wien**
Ferialpraxis in der Abteilung Finished Goods Release