

**Molekulargenetische und physiologische Charakterisierung eines
rekombinanten Pentose-vergärenden Hefestammes**

Diplomarbeit im Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Beate Wiedemann
Mai 2005

Die vorliegende Arbeit wurde an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, am Institut für Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. E. Boles angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | EINLEITUNG | 6 |
| 1.1 | D-Xyloseverwertung durch Mikroorganismen..... | 8 |
| 1.2 | L-Arabinoseverwertung durch Mikroorganismen..... | 10 |
| 1.3 | Pentoseverwertung durch rekombinante <i>S. cerevisiae</i> -Stämme..... | 11 |
| 1.3.1 | Xylose-Verwertung durch <i>S. cerevisiae</i> | 12 |
| 1.3.2 | Arabinose-Verwertung durch <i>S. cerevisiae</i> | 14 |
| 1.4 | Ziele dieser Arbeit | 16 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| 2.1 | Stämme und Medien..... | 17 |
| 2.1.1 | Bakterienstämme | 17 |
| 2.1.2 | Hefestämme | 17 |
| 2.1.3 | Plasmide..... | 19 |
| 2.2 | Synthetische Oligonukleotide..... | 20 |
| 2.3 | Enzyme, Chemikalien und weitere Materialien | 22 |
| 2.4 | Sequenzierung von DNA..... | 22 |
| 2.5 | Bestimmung der DNA-Konzentration..... | 23 |
| 2.6 | Transformation | 23 |
| 2.6.1 | Transformation von <i>E. coli</i> | 23 |
| 2.6.2 | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> | 23 |
| 2.7 | Präparation von DNA | 23 |
| 2.7.1 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 23 |
| 2.7.2 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> | 24 |
| 2.8 | Enzymatische Modifikation von DNA | 24 |
| 2.8.1 | DNA-Restriktion..... | 24 |
| 2.8.2 | Ligation..... | 24 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.9 | DNA-Amplifizierung mittels PCR | 24 |
| 2.10 | DNA-Aufreinigung von PCR-Produkten | 25 |
| 2.11 | Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten | 25 |
| 2.12 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 25 |
| 2.13 | Klonierung von Plasmiden durch <i>in vivo</i> -Rekombination | 26 |
| 2.14 | Genomische Integration durch homologe Rekombination..... | 26 |
| 2.15 | Bestimmung der Wachstumsrate | 27 |
| 2.16 | Bestimmung der Pentoseumsetzung..... | 27 |
| 3 | ERGEBNISSE | 29 |
| 3.1 | Selektion eines optimierten L-Arabinose verwertenden Hefestammes..... | 29 |
| 3.2 | Charakterisierung des Stammes BWY01A-4M und seiner Mutationen | 31 |
| 3.3 | Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus in das Genom von JBY25 | 37 |
| 3.3.1 | Gleichzeitige Integration der Gene | 38 |
| 3.3.2 | Schrittweise Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus mittels eines Selektionsmarkers | 40 |
| 3.4 | Konstruktion eines L-Arabinose und D-Xylose verwertenden Hefestammes.... | 45 |
| 3.4.1 | Klonierung der Gene für die D-Xylose-Fermentation in den <i>S. cerevisiae</i> Stamm BWY01 | 45 |
| 3.4.2 | Umklonierung des reisolierten Isomerase Plasmids | 46 |
| 3.4.3 | Transformation mit den 3 Arabinose Plasmiden | 48 |
| 3.4.4 | Untersuchung des Wachstumsverhaltens des <i>S. cerevisiae</i> Stammes BWY2 auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen..... | 48 |
| | Wachstumsverhalten auf Arabinose und auf Xylose-haltigen Mediumsplatten: | 48 |
| | Wachstumsverhalten in Arabinose- und/oder Xylose-haltigen Flüssigkulturen: | 48 |
| 4 | DISKUSSION | 55 |
| 4.1 | Zufällige Mutagenese durch Selektion | 56 |
| 4.2 | Stabile Expression der Gene des L-Arabinose Katabolismus | 58 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4.3 | Faktoren der L-Arabinose und D-Xylose Verwertung in <i>S. cerevisiae</i> | 60 |
| 4.4 | Co-Verbrauch von Arabinose und Xylose | 62 |
| 4.5 | Optimierung der Verwertung der beiden Pentosezucker..... | 63 |
| 4.6 | Biotechnologische Anwendung..... | 68 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 70 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 71 |
| 7 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 78 |

1 EINLEITUNG

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird aufgrund ihrer Eigenschaft, Zucker zu Ethanol und Kohlendioxid zu fermentieren, seit Jahrhunderten für die Brot-, Wein- und Bierherstellung eingesetzt. In der heutigen Zeit findet die Hefe immer größere Verwendung in anderen Bereichen. So zählt sie in der Forschung zu einem der wichtigsten Modellorganismen. Mit der kompletten Sequenzierung des Genoms wurde 1996 eine neue Dimension in der biologischen Grundlagenforschung eröffnet (Goffeau *et al.* 1997). Viele Mechanismen der Kontrolle der Genexpression, der Signaltransduktion oder des Metabolismus sind auf Zellen höherer Eukaryonten übertragbar (Tamkun *et al.*, 1992, Peterson und Herskowitz, 1992). Neben diesen Anwendungsgebieten gewinnt die Hefe immer mehr in biotechnologischen Produktionen an Bedeutung.

Produktion von Bioalkohol:

Einer der wichtigsten biotechnologischen Anwendungsbereiche von *S. cerevisiae* ist die Produktion von Ethanol durch Fermentationsprozesse. Ethanol wird in vielen Industriezweigen eingesetzt. So wird es unter anderem als Ausgangsstoff für zahlreiche chemische Reaktionen zur Produktion von Chemikalien oder zur Herstellung von Reinigungsmitteln, Lacken und Farben verwendet. Vor allem aber gewinnt der Einsatz von Bioethanol als Treibstoff oder als Treibstoffzusatz immer mehr an Gewicht. In Anbetracht des steigenden Benzinverbrauchs und des vermehrten Verbrauchs fossiler Brennstoffe (Hall *et al.*, 1991; Lynd *et al.*, 1991; Brown, 1999) gewinnen alternative Energiequellen immer mehr an Bedeutung. In Brasilien wird Ethanol seit den 70er Jahren aus Zuckerrohr hergestellt und als reiner Treibstoff eingesetzt; in den USA beträgt der Ethanolanteil im Treibstoff ungefähr 10% (Wyman und Goodmann, 1993). Ethanol als Treibstoff oder Treibstoffzusatz hat den Vorteil, dass zum einen aufgrund seines Sauerstoffanteils es zu einer verbesserten Verbrennung des Benzins kommt und somit die Emission von Kohlenmonoxid und unverbrannten Kohlenwasserstoffen gesenkt wird (Wyman und Goodmann, 1993). Zum anderen kann durch den hohen Octanwert von Ethanol auf andere Antiklopfmittel verzichtet werden (Wyman und Goodmann, 1993). Lignozellulose stellt einen sich stets selbst erneuernden Ausgangsstoff für die Fermentationsprozesse dar. CO₂ wird von Pflanzen fixiert, kann dann zu Ethanol umgesetzt werden und wieder zu CO₂ verbrannt werden. Solange also nicht mehr Biomasse verbraucht wird, als in der entsprechenden Zeit nachwachsen

kann, verursacht die Verbrennung des Ethanols keinen Anstieg der Netto-CO₂-Konzentration in der Atmosphäre, welcher einer der Hauptursachen der globalen Erwärmung darstellt (van Wyk, 2001).

Zur Produktion von Ethanol als Bioalkohol können viele verschiedene Arten von pflanzlicher Biomasse genutzt werden. Zur Zeit wird Ethanol hauptsächlich durch die Fermentation von Saccharose (Zuckerrohr, Zuckerrüben, Melasse) und hydrolysiertes Stärke (Kartoffeln, Mais, Reis, Maniok) gewonnen (Wartenberg, 1989). Da diese Rohstoffe auch von der Nahrungsmittelsindustrie genutzt werden, ist es notwendig, eine kostengünstige Alternative zu finden. Ein in großen Mengen verfügbares und sich stets selbst erneuerndes Gärungssubstrat ist lignozellulose Biomasse. Darunter fallen unter anderem land- und forstwirtschaftliche Pflanzenabfälle, Abfälle aus der Papierindustrie sowie andere industrielle Abfälle (Schmitz, 2003). Somit könnte durch Umstellung des Fermentationssubstrats nicht nur die Konkurrenzsituation zur Nahrungsmittelindustrie vermieden werden, sondern gleichzeitig die Abfallmenge reduziert werden.

Biomasse-zu-Ethanol Projekt:

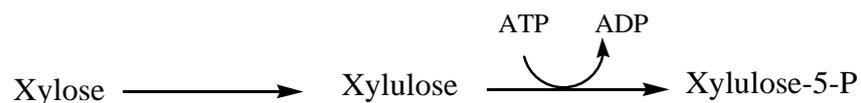
Pflanzliche Biomasse setzt sich hauptsächlich aus den Komponenten Zellulose (28-50%), Hemizellulose (20-30%) und Lignin (18-30%) zusammen (Breznak und Brune, 1994). Gemeinsam bilden sie die Zellwände der Pflanzen. Zellulose ist ein Homopolymer aus β -1,4-verknüpften Glukosemolekülen. Hemizellulose ist ein Heteropolymer und besteht aus einem β -1,4-verknüpften Xyloserückrad mit Seitenketten aus α -D-Glukuronsäure, Mannose, Galaktose und L-Arabinose. Lignin ist ein komplexes aromatisches Polymer aus Phenylpropaneinheiten, die unterschiedlich miteinander verknüpft sein können (Rosenberg, 1980). Der Hauptbestandteil der Hemizellulose ist mit 15-35% die Pentose Xylose, die neben Glukose den zweithäufigst vorkommenden Zucker in pflanzlicher Biomasse darstellt (Sjöström, 1981, Chandrakant und Bisaria, 1998, Hahn-Hägerdal *et al.* 2001). Die Zucker Glukose, Mannose und L-Arabinose liegen in Hemizellulose nur in geringen Konzentrationen vor (Sjöström, 1981). Jedoch kann die Menge an Arabinose (in Arabinoxylan oder Arabinogalactan mit Xylose oder Galaktose verknüpft) in einigen pflanzlichen Materialien und Hydrolysaten dieser Materialien signifikant sein. In vielen Kräutern macht Arabinan 10-20% der gesamten nicht-Glucan-Kohlenhydrate aus (McMillan und Boynton, 1994).

Um die Zuckerpolymeren zu Ethanol umwandeln zu können, müssen sie zuvor enzymatisch oder durch saure Hydrolyse zu den entsprechenden Monomeren gespalten werden (Claassen *et al.*, 1999). Bei der Hydrolyse lignozellulosischer Biomasse entstehen die Hexosen Glukose, Mannose und Galaktose und die Pentosen Xylose und L-Arabinose (Jeffries und Shi, 1999). Die Hefe *S. cerevisiae* wird industriell am häufigsten zur Ethanolproduktion eingesetzt. Sie ist in der Lage, Hexosen mit hoher Fermentationsrate und hoher Ausbeute umzusetzen. Weiterhin zeigt sie eine hohe Resistenz gegenüber Inhibitoren in den Hydrolysaten. Sie ist jedoch nicht in der Lage, Pentosen zu verwerten. Da Arabinose und Xylose einen hohen Anteil in pflanzlicher Biomasse einnehmen, wäre für die wirtschaftliche Ethanolproduktion ein Hefestamm von Interesse, der zusätzlich zu seinem bereits vorhandenen Substratspektrum diese beiden weiteren Zuckerarten metabolisieren könnte.

1.1 D-Xyloseverwertung durch Mikroorganismen

Verschiedene Bakterien, Hefen und Pilze sind in der Lage, Xylose zu fermentieren. Die Verstoffwechslung von Xylose unterscheidet sich bei Pro- und Eukaryonten hauptsächlich in der Art der Isomerisierung der Xylose zu Xylulose. In Prokaryonten erfolgt die Umsetzung von Xylose zu Xylulose durch das Enzym Xylose-Isomerase (XI). In Eukaryonten wird Xylose meist in zwei Schritten isomerisiert. Zuerst wird Xylose durch die NAD(P)H-abhängige Xylose-Reduktase (XR) zu Xylitol reduziert und weiter durch die NAD-abhängige Xylitol-Dehydrogenase (XDH) zu Xylulose umgesetzt. Die anschließende Phosphorylierungsreaktion erfolgt in Pro- und Eukaryonten durch die Xylulokinase (XK).

Xylose-Umsetzung durch direkte Isomerisierung



Xylose-Umsetzung durch indirekte Isomerisierung über eine Redoxreaktion

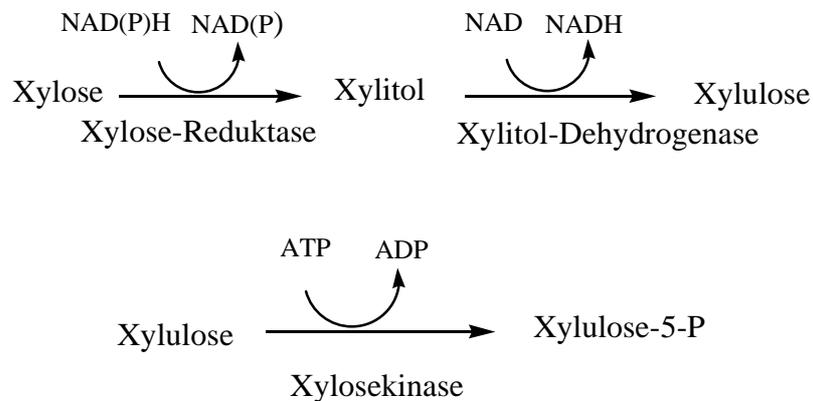


Abb. 1: Reaktionsschritte der Xyloseumwandlung in Xylulose-5-Phosphat durch direkte Isomerisierung und durch indirekte Isomerisierung über eine Redoxreaktion.

Das entstandene Intermediat Xylulose-5-Phosphat ist ein Intermediat des Pentosephosphatweges. Der Hauptteil des Xylulose-5-Phosphats gelangt in Form von Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat in die Glykolyse und wird dort weiter zu Pyruvat umgesetzt (Schaaff-Gerstenschläger und Miosga, 1997). Unter fermentativen Bedingungen wird der Zucker durch die Pyruvat-Decarboxylase und durch die Alkohol-Dehydrogenase weiter zu Ethanol abgebaut. Unter aeroben Bedingungen kann Pyruvat im Citratzyklus über eine Reihe von Reaktionsschritten bis zum Kohlendioxid oxidiert werden.

Natürlich vorkommend gibt es eine Reihe von Mikroorganismen, die in der Lage sind, Xylose zu fermentieren. So bringen die verschiedenen Pro- und Eukaryonten unterschiedliche Vor- und Nachteile für die industrielle Ethanolproduktion mit sich.

Bakterien (z.B. *Escherichia coli*) weisen oftmals ein bereits vorhandenes breites Substratspektrum auf sowie hohe Fermentationsraten. Aufgrund ihrer geringen Ethanoltoleranz und der gemischten Säuregärung, in der zahlreiche Nebenprodukte entstehen, sind diese Organismen für die Ethanolproduktion jedoch weniger geeignet (Jeffries *et al.*, 1983). Viele Eukaryonten sind schwierig in der Kultivierbarkeit und somit kostenintensiver. Niedrige Erträge sowie geringe Ethanolproduktion sind weitere Nachteile.

1.2 L-Arabinoseverwertung durch Mikroorganismen

Die Umsetzung von L-Arabinose erfolgt in Mikroorganismen, genau wie bei der Verstoffwechslung von D-Xylose, auf zwei verschiedenen Wegen. Sowohl bei Prokaryonten wie auch bei Eukaryonten entsteht nach den ersten L-Arabinose umsetzenden Schritten das Zwischenprodukt D-Xylulose-5-Phosphat. In Prokaryonten wie *E. coli* oder *Bacillus subtilis* beginnt der L-Arabinose Katabolismus mit der Umsetzung von L-Arabinose zu L-Ribulose durch die L-Arabinose Isomerase. Durch die L-Ribulokinase wird es weiter zu L-Ribulose-5-Phosphat phosphoryliert. Die L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase katalysiert schließlich den Schritt, in dem D-Xylulose-5-Phosphat entsteht, welches ein Intermediat des Pentosephosphatweges ist. Die weitere Verstoffwechslung findet über die gleichen Enzyme statt, wie bei der D-Xylose Verwertung beschrieben.

Die drei genannten, prokaryontischen Enzyme für den L-Arabinose Katabolismus werden durch ein Operon kodiert, welches aus den Genen *araA* (L-Arabinose Isomerase), *araB* (L-Ribulokinase) und *araD* (L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase) besteht. Die Reihenfolge der Gene innerhalb des Operons kann in verschiedenen Organismen variieren.

In Eukaryonten verläuft die L-Arabinose Umsetzung in fünf Reaktionsschritten ab wie in Abbildung 2 gezeigt ist. Der Stoffwechselweg enthält zwei reduzierende und zwei oxidierende Schritte sowie die Phosphorylierung des entstandenen Intermediats mittels einer Kinase (Witteveen *et al.*, 1989). Ähnlich der D-Xylose Umsetzung im eukaryontischen Stoffwechselweg, läuft der Arabinoseabbau in Eukaryonten nicht redoxneutral ab. In zwei Reduktionsschritten wird NADPH verbraucht, während bei der Oxidation nur NADH entsteht. Dies führt dazu, dass Hefen, die in der Lage sind L-Arabinose zu fermentieren, wie *Candida aurangiensis* oder *Candida succiphila* (Dien *et al.*, 1996), unter Sauerstoff limitierten Bedingungen neben geringen Mengen an Ethanol als Hauptprodukt Arabitol herstellen. Da kein Sauerstoff zur Verfügung steht, kann NADH über die Atmungskette nicht wieder regeneriert werden. Durch das entstandene Kofaktor-Ungleichgewicht zwischen NADPH und NADH kommt der L-Arabinose Stoffwechsel unter anaeroben Bedingungen zum Erliegen.

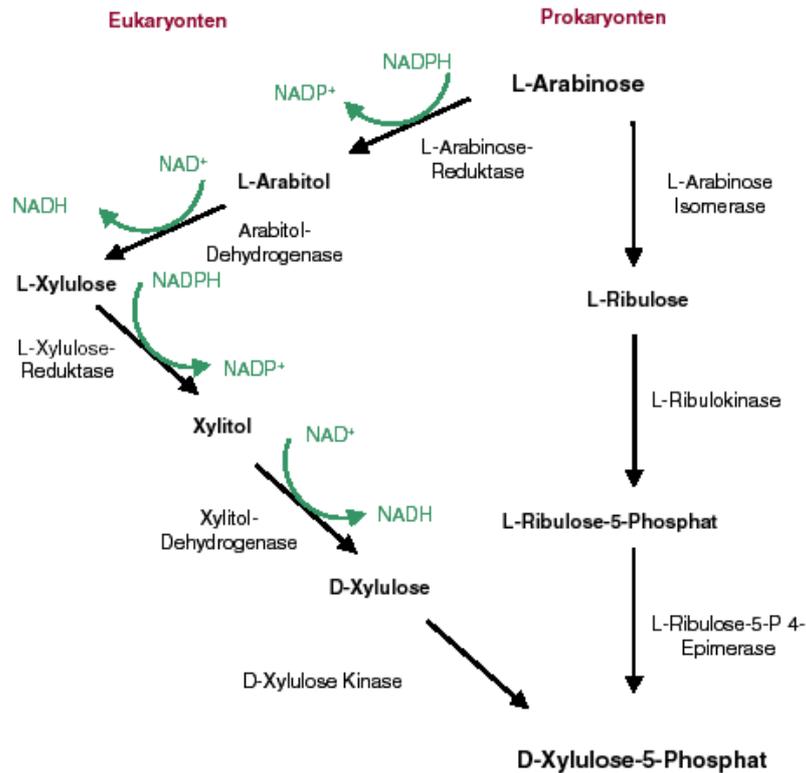


Abb. 2: Vergleich der Reaktionsschritte der Umwandlung von L-Arabinose zu D-Xylulose-5-Phosphat in L-Arabinose verwertenden Pro- und Eukaryonten (Abbildung aus Becker 2003).

1.3 Pentoseverwertung durch rekombinante *S. cerevisiae*-Stämme

In industriellen Fermentationsprozessen ist der Einsatz der Hefe *S. cerevisiae* etabliert. Trotz vieler schon genannter Vorteile gegenüber anderen Mikroorganismen, ist *S. cerevisiae* nicht in der Lage, die Pentosen D-Xylose und L-Arabinose zu Ethanol umzusetzen (Barnett, 1976). Wahrscheinlich besitzt *S. cerevisiae* jedoch die biochemischen Mechanismen zur Verwertung von Pentose-Phosphaten, da Ribose-5-Phosphat und Xylose-5-Phosphat metabolisiert werden können (Jeffries und Shi, 1999). Die beiden Pentosezucker D-Xylose und L-Arabinose können über einige der Hefe-eigenen Hexosetransporter in die Zelle aufgenommen werden (Hsiao *et al.*, 1982; Batt *et al.*, 1986; Hamacher *et al.*, 2002; Becker und Boles 2003).

1.3.1 Xylose-Verwertung durch *S. cerevisiae*

Xylose-Umsetzung durch indirekte Isomerisierung über eine Redoxreaktion:

Da kein natürlicherweise vorkommender Mikroorganismus für den kommerziellen Einsatz zur Verwertung von Pentosezucker existierte, bestand großes Interesse durch gentechnische Methoden einen Stamm zu konstruieren, der dazu in der Lage war. In Arbeiten von Kötter und Ciriacy (1993) wurde erstmals ein solcher rekombinanter *S. cerevisiae* Stamm konstruiert, der in der Lage war, D-Xylose zu metabolisieren. Hierfür wurden die für D-Xylose Reduktase (*XYL1*) und Xylitol Dehydrogenase (*XYL2*) kodierenden Gene der Hefe *Pichia stipitis* heterolog in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert. In späteren Arbeiten wurde zusätzlich die endogene Xylulokinase (*XKSI*) überexprimiert, was die D-Xylose Aufnahme in die Zelle sowie deren Umsetzung zu Ethanol verbesserte (Ho *et al.*, 1998; Eliasson *et al.*, 2000). Trotz der erzielten Verbesserungen war unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen das Hauptnebenprodukt der Xyloseumsetzung Xylitol. Dies wird einem Ungleichgewicht in der Redoxbalance zugeschrieben, welches dadurch verursacht wird, dass die in dem Stoffwechselweg zuerst ablaufende Reaktion bevorzugt NADPH nutzt, die zweite Reaktion jedoch ausschließlich NADH produziert (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001). Unter aeroben Bedingungen kann das durch die Xylitol-Dehydrogenase gebildete NADH über die Atmungskette zu NAD regeneriert werden. Unter anaeroben Bedingungen kann NAD folglich nicht regeneriert werden und es kommt zu einer Ansammlung von NADH in der Zelle. Ohne den Cofaktor NAD kann die Xylitol-Dehydrogenase Xylitol nicht weiter zu Xylulose umsetzen.

Xylose-Umsetzung durch direkte Isomerisierung:

Obwohl die in der genannten Arbeit verwendete Xylose-Reduktase aus *P. stipitis* stammt, welche in der Lage ist neben NADPH auch NADH als Cofaktor zu nutzen (Metzger und Hollenberg, 1995), kommt es unter strikt anaeroben Bedingungen zum Erliegen der Xylosefermentation. Eine Lösung des Problems bestand darin, einen redoxneutralen Stoffwechselweg in *S. cerevisiae* einzuführen. In Prokaryonten erfolgt die Umsetzung von Xylose zu Xylulose durch das Enzym Xylose-Isomerase (XI). Für eine vollständige Umsetzung der D-Xylose müsste in *S. cerevisiae* zusätzlich nur das Gen *XI* exprimiert werden, da eine endogene Xylulokinase vorhanden ist. Obwohl eine Xylose-Isomerase in manchen Pilzen nachgewiesen werden konnte (Tomoyoda und Horitsu, 1964; Vongsuvanglert und Tani, 1988; Banerjee *et al.*, 1994; Rawat *et al.*,

1996), war in Eukaryonten nur der Xylose-Abbau über die Enzyme Xylose Reduktase und Xylitol Dehydrogenase gezeigt worden. Viele Bemühungen, eine Xylose-Isomerase aus unterschiedlichen Organismen in Hefe heterolog zu exprimieren, schlugen fehl (Gárdonyi und Hahn-Hägerdal, 1993). Meistens waren die Enzyme in Hefe nicht funktionell oder sie wurden nicht zu Proteinen synthetisiert (Sarchy *et al.*, 1987; Amore *et al.*, 1989; Hallborn, 1995; Moes *et al.*, 1996). Aktiv konnten nur die Xylose-Isomerasen aus den Organismen *Streptomyces rubiginosus* (Schründer *et al.*, 1996), aus *Thermus thermophilus* (Walfridsson *et al.*, 1996) und aus *Piromyces* sp. E2 (Kuyper *et al.*, 2003) in Hefe exprimiert werden. Das Enzym aus *S. rubiginosus* wies geringe Aktivität auf. Die Xylose-Isomerase aus *T. thermophilus* zeigte zwar hohe Aktivität, hatte aber den Nachteil, dass ihr Temperaturoptimum (85°C) über der maximalen Wachstumstemperatur von *S. cerevisiae* lag. Durch gerichtete Evolution konnte eine *T. thermophilus* Xylose-Isomerase erhalten werden, die im Vergleich zum nativen Protein bei 60°C eine 9-fach höhere spezifische Aktivität sowie eine geringere Xylitolproduktion aufwies (Lönn *et al.* 2002). Bei heterologer Überexpression der Xylose-Isomerase aus *Piromyces* (Harhangi *et al.*, 2003), ein obligat anaerober Pilz, war *S. cerevisiae* in der Lage, langsam auf Xylose zu wachsen und es auch unter anaeroben Bedingungen zu metabolisieren (Kuyper *et al.*, 2003).

Ein limitierender Schritt bei der Pentoseverwertung in rekombinanten *S. cerevisiae* Stämmen scheint in den nachfolgenden Reaktionen im Pentosephosphatweg zu liegen. Hinweise darauf waren eine Anhäufung von Sedoheptulose-7-Phosphat in Hefen, die D-Xylose verstoffwechselten (Kötter und Ciriacy, 1993). Eine Überexpression des *TALI*-Gens, welches die Reaktion von Sedoheptulose-7-Phosphat mit Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat katalysiert, führte zu verbessertem Xylosewachstum eines rekombinanten Hefestammes (Walfridsson *et al.*, 1995) bzw. ermöglichte erst die L-Arabinose Umsetzung eines Stammes, der die Enzyme eines bakteriellen L-Arabinose Stoffwechsels exprimiert (Becker und Boles, 2003).

In Arbeiten mit einem *S. cerevisiae* Stamm, der das Gen für die Xylose-Isomerase (*XI* aus *Piromyces* sp.) exprimiert (Kuyper *et al.*, 2004), wurden die Hefe-eigenen Enzyme Xylulokinase, Ribulose-5-Phosphat Isomerase, Ribulose-5-Phosphat Epimerase, Transketolase und Tansaldolase überexprimiert. D-Xylose wird durch die Xylose-Isomerase zu Xylulose umgesetzt, welches durch die Xylulokinase weiter zu Xylulose-5-Phosphat umgewandelt werden kann, einem Intermediat des Pentosephosphatweges

Arbeiten von Johansson (2001) zeigten, dass ein limitierender Schritt in der Pentoseumsetzung die Aktivität der endogenen Xylulokinase darstellte und dass eine Überexpression des endogenen Enzyms die Xylose-Verwertung und die Ethanolproduktion in rekombinanten *S. cerevisiae* Stämmen steigerte. Bei zusätzlicher Überexpression der endogenen Enzyme des nicht-oxidativen Teils des Pentosephosphatweges konnte eine dreifach gesteigerte Xylose-Verwertung unter anaeroben Bedingungen erzielt werden (Kuyper *et al.*, 2004).

1.3.2 Arabinose-Verwertung durch *S. cerevisiae*

Neben den Versuchen einen Stoffwechselweg zur D-Xylose-Umsetzung in *S. cerevisiae* einzuführen, sollte ebenfalls ein Stamm konstruiert werden, der in der Lage war L-Arabinose zu verwerten.

Für die L-Arabinose-Metabolisierung gab es ebenfalls die beiden Möglichkeiten, einen bakteriellen oder einen eukaryontischen Stoffwechselweg in *S. cerevisiae* zu exprimieren. Die Vor- und Nachteile der beiden verschiedenen Arten der Verstoffwechslung sind ähnlich zu denen der Xylose-Umsetzung.

Eukaryontischer Stoffwechselweg:

In Arbeiten von Richard *et al.* (2001; 2002) wurde ein eukaryontischer Stoffwechselweg zum L-Arabinose Abbau in *S. cerevisiae* eingeführt. Die verwendeten Gene stammten aus dem Pilz *Trichoderma reesei* und konnten funktionell in Hefe exprimiert werden. Bei Überexpression der Gene L-Arabinitol 4-Dehydrogenase (*lad1*), L-Xylulose Reduktase (*lxr1*) aus *Trichoderma reesei* und den aus dem D-Xylose Abbau erwähnten Genen *XYL1*, *XYL2* und *XKS1* konnte ein rekombinanter Stamm konstruiert werden, der in der Lage war auf L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (Richard *et al.*, 2003). Seine Verdoppelungszeit lag bei mehreren Tagen.

Bakterieller Stoffwechselweg:

Versuche, L-Arabinose in Hefe über heterologe Expression von prokaryontischen Enzymen umzusetzen, schlugen anfangs fehl. Drei Gene für einen L-Arabinose Stoffwechselweg aus *E. coli* sollten in *S. cerevisiae* heterolog exprimiert werden (Sedlak und Ho, 2001). Die Gene *araA*, *araB* und *araD* wurden unter Kontrolle starker, konstitutiver Hefe-Promotoren in ein Plasmid kloniert. Die nachgewiesenen Enzymaktivitäten für die L-Ribulokinase und die L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase

waren hoch, die L-Arabinose Isomerase hingegen zeigte nur 10% ihrer nativen Aktivität. Dieser Hefestamm war nicht in der Lage auf L-Arabinose zu wachsen oder es zu fermentieren.

In den Arbeiten von Becker und Boles (2003) konnte erstmals erfolgreich ein Stamm zur L-Arabinose Fermentation präsentiert werden, der einen bakteriellen Stoffwechselweg des L-Arabinose Katabolismus exprimiert.

Der konstruierte Stamm von Becker und Boles (2003) JBY25-4M ist in der Lage, auf L-Arabinose als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen und es zu Ethanol umzusetzen. Hierfür wurden in *S. cerevisiae* die Gene eines bakteriellen Stoffwechselwegs exprimiert, dessen Produkt in den Pentosephosphatweg mündet. Der eingeführte Stoffwechselweg bestand aus der L-Arabinose Isomerase von *B. subtilis* und der L-Ribulokinase und L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase von *E. coli*. Zur verbesserten Arabinose-Aufnahme wurde die Hefe-eigene Galaktose-Permease überexprimiert. Trotz funktioneller Form aller heterolog exprimierten Gene konnte der Stamm zunächst nicht wachsen. Nach wochenlangem Selektionieren auf L-Arabinose-haltigem Medium konnte der Stamm JBY25-4M erhalten werden, der mit einer Verdopplungszeit von ca. 8 Stunden auf L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle wuchs. Die Ethanolproduktionsrate des Stammes lag in Tests unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen bei 0,06-0,08g Ethanol pro g Trockengewicht und Stunde. Charakterisierungen von JBY25-4M ergaben, dass zur L-Arabinose-Verwertung eine verminderte Enzymaktivität der L-Ribulokinase und eine gesteigerte Expression des *TALI*-Gens, welches für die Transaldolase aus dem Pentosephosphatweg kodiert, benötigt wurden. Die gesteigerte Transkription der Transaldolase beruhte auf Duplikation des Chromosomenbereichs, auf dem sich das Gen *TALI* befand. Die reduzierte Aktivität der Kinase wurde durch einen Aminosäureaustausch in der Substratbindestelle bewirkt. Dies führte zu einer erniedrigten Affinität der Kinase gegenüber der Ribulose. Der Vorteil in der erniedrigten Kinaseaktivität kann darin begründet sein, dass der zu Beginn des Stoffwechselweges liegende ATP-verbrauchende Schritt zu einem kompletten Verbrauch des intrazellulär vorliegenden ATPs führt. Die Energiereserven der Zelle sind schon erschöpft, bevor im Laufe des weiteren Stoffwechselweges weiteres ATP gebildet werden kann. Da die Kinase durch ihre Mutation eine verringerte Aktivität aufwies, läuft die Phosphorylierung nur langsam ab und der ATP-synthetisierende Schritt im Stoffwechselweg kann erreicht

werden, ohne dass es vorher zu einem Erliegen des Metabolismus kommt. Ähnliche Modelle wurden für den Glukose-Metabolismus aufgestellt (Teusink *et al.*, 1998a).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Der konstruierte *S. cerevisiae* Stamm JBY25-4M (Becker und Boles, 2003) ist in der Lage, L-Arabinose zu Ethanol zu fermentieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte der bereits vorhandene Pentose-vergärende Hefestamm unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen auf L-Arabinose-Wachstum optimiert werden. Ein Teil der Arbeit bestand in der physiologischen Charakterisierung des neu selektierten und des bereits vorhandenen L-Arabinose-vergärenden Hefestammes. Es konnte hier zum ersten Mal der L-Arabinose-Verbrauch gemessen werden. Der durch repetitive Selektion auf L-Arabinose-Wachstum optimierte Hefestamm wurde molekulargenetisch charakterisiert. Sowohl genomische Veränderungen als auch Veränderungen in den Plasmiden sollten untersucht werden.

Der Stamm JBY25-4M exprimiert die für den L-Arabinose-Katabolismus notwendigen Enzyme und Transporter von vier verschiedenen Plasmiden. Für den industriellen Einsatz eines rekombinanten Hefestammes ist es notwendig, die Gene des L-Arabinose Metabolismus stabil in das Genom zu integrieren. In der vorliegenden Arbeit sollten die drei essentiellen Arabinose-Stoffwechsel-Gene in den rDNA-Locus der Hefe integriert werden.

Des Weiteren sollte erstmals ein Hefestamm konstruiert werden, der in der Lage ist, beide Pentosen, D-Xylose und L-Arabinose zu fermentieren. Hierfür wurden in den Plasmid-freien optimierten Hefestamm sowohl die Gene des Stoffwechselweges für den Arabinose Katabolismus als auch des Xylose Katabolismus exprimiert. Der entstandene Stamm wurde physiologisch charakterisiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stämme und Medien

2.1.1 Bakterienstämme

Tab. 1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme

| Stamm | Genotyp | Quelle/Referenz |
|-------|---|-----------------|
| DH10B | <i>F'</i> , <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>lacX74 deoR recA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ rpsL endA1 nupG</i> | Gibco BRL |
| SURE | <i>e14'</i> (<i>McrA'</i>) Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) 171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> <i>lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB lac^fZAM15</i> <i>Tn10(Tet^r)]</i> | Stratagene |

Medien und Anzucht von *E. coli*

| | | |
|------------|----|---|
| Vollmedium | LB | 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5 (Maniatis <i>et al.</i> , 1982) |
|------------|----|---|

Für die Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 40µg/ml Ampicillin zugesetzt. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2% Agar. Die Anzucht erfolgte bei 37°C.

2.1.2 Hefestämme

Tab. 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae* Stämme

| Stamm | Genotyp/Plasmide | Quelle/Referenz |
|----------|---|-------------------------|
| JBY25 | <i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1</i> <i>MAL2-8c SUC2</i> + unbekannte Mutationen für besseres Wachstum auf L-Arabinose | Becker und Boles (2003) |
| JBY25-4M | Genotyp siehe JBY25 +p423H7araABs ^{re} , p424H7araB ^{re} , p425H7araD ^{re} , pHL125 ^{re} | Becker und Boles (2003) |

Tab. 3: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte *S. cerevisiae* Stämme

| Stamm | Genotyp | Plasmide |
|-----------|--|---|
| BWY01 | Genotyp siehe JBY25 + weitere Mutationen für verbessertes Wachstum auf L-Arabinose unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen | |
| BWY01A-4M | Genotyp siehe BWY01 | p423H7araABs ^{re} , p424H7araB ^{re} , p425H7araD ^{re} , pHL125 ^{re} |

| | | |
|-----------|----------------------|---|
| BWY01B-4M | Genotyp siehe BWY01 | p423H7araABs ^{re} , p424H7araB ^{re} , p425H7araD ^{re} , pHL125 ^{re} |
| BWY-02 | Genotyp siehe BWY01A | p423H7araABsura ^{re} , p424H7araB ^{re} , p425H7araD ^{re} , integratives Xylose- Plasmid YIpXR/XDH/XK |

Medien und Anzucht von *S. cerevisiae*

Tab.4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Medien zur Anzucht von *S. cerevisiae*

| | | |
|--|-----|--|
| Vollmedium | YEP | 1% Hefeextrakt, 2% bakteriologisches Pepton, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration |
| synthetisches Kompletmedium (Selektivmedium) | SC | 0,67% Yeast nitrogen base w/o amino acids, pH6,3, Aminosäure/Nukleobase-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegeben Konzentration |
| synthetisches Minimalmedium | SM | 0,16% Yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulphate, 0,5% Ammoniumsulfat , pH6,3, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegeben Konzentration (Regenberger und Hansen, 2000) |

Konzentration der Aminosäuren und Nukleobasen im synthetischen Kompletmedium (nach Zimmermann, 1975): Adenin (0,08mM), Arginin (0,22mM), Histidin (0,25mM), Isoleucin (0,44mM), Leucin (0,44mM), Lysin (0,35mM), Methionin (0,26mM), Phenylalanin (0,29mM), Tryptophan (0,19mM), Threonin (0,48mM), Tyrosin (0,34mM), Uracil (0,44mM), Valin (0,49mM).

Innerhalb dieser Arbeit wurden die Kohlenstoffquellen Glukose, Galaktose, Arabinose, Xylose und Maltose verwendet. Glukose, Galaktose und Maltose wurden zusammen mit dem Medium autoklaviert. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen bzw. auf Zellen mit genomisch integriertem *HIS3MX*-Markergen wurde die jeweilige Aminosäure nicht zugefügt. Die Selektion auf eine Geneticin-Resistenz erfolgte auf Vollmediumsplatten mit 200µg/ml G418 (Longtine *et al.*, 1998). Zur Selektion auf Verlust eines Plasmids mit *URA3*-Selektionsmarkergen wurden synthetische Kompletmediumsplatten verwendet, die neben Uracil 1mg/ml 5-FOA enthielten (Boeke *et al.*, 1984). Feste Voll- und Selektivmedien enthielten zusätzlich 2 % Agar. Die Anzucht der Hefezellen erfolgte bei 30°C.

2.1.3 Plasmide

Tab. 5: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

| Plasmid | Quelle/Referenz | Beschreibung |
|---------------------------------------|-------------------------------|---|
| p423HXT7-6HIS (=p423H7) | Becker und Boles, 2003 | 2 μ -Expressionsplasmid für die Überexpression verschiedener Gene und für die Fusionierung der <i>E. coli</i> L-Arabinose Isomerase mit einem His ₆ -Epitop; <i>HIS3</i> -Selektionsmarkergen, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator (Hamacher <i>et al.</i> , 2002) |
| p424HXT7-6HIS (=p424H7) | Becker und Boles, 2003 | 2 μ -Expressionsplasmid für die Überexpression verschiedener Gene und für die Fusionierung der mutierten und der Wildtyp <i>E. coli</i> L-Ribulokinase mit einem His ₆ -Epitop; <i>TRP1</i> -Selektionsmarkergen, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator (Hamacher <i>et al.</i> , 2002) |
| p425HXT7-6HIS (=p425H7) | Becker und Boles, 2003 | 2 μ -Expressionsplasmid für die Überexpression verschiedener Gene; <i>LEU2</i> -Selektionsmarkergen, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator (Hamacher <i>et al.</i> , 2002) |
| p426HXT7-6HIS (=p426H7) | Hamacher <i>et al.</i> , 2002 | 2 μ -Expressionsplasmid zur Überexpression von Genen und zur Herstellung eines His ₆ -Epitop; <i>URA3</i> -Selektionsmarkergen, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator |
| pUG6 | Güldener <i>et al.</i> , 1996 | DNA-Vorlage für die Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Kassette als Selektionsmarker |
| pHL125 ^{re} | Liang und Gaber, 1996 | 2 μ -Plasmid mit dem <i>GAL2</i> -Gen exprimiert hinter dem <i>ADHI</i> -Promotor, <i>URA3</i> -Selektionsmarkergen; reisoliert aus JBY25-4M |
| p423H7araAB ^{s^{re}} | Becker und Boles, 2003 | <i>B.subtilis araA</i> in p423HXT7-His, reisoliert aus JBY25-4M |
| p424H7araB | Becker und Boles, 2003 | <i>E. coli araB</i> in p423HXT7-His |
| p424H7araB ^{re} | Becker und Boles, 2003 | <i>E. coli araB</i> in p423HXT7-His; reisoliert aus JBY25-4M, Mutation in <i>araB</i> |
| p425H7araD ^{re} | Becker und Boles, 2003 | <i>E. coli araD</i> in p425HXT7-His; reisoliert aus JBY25-4M |
| YIpXR/XDH/XK | Eliasson <i>et al.</i> , 2000 | integratives 2 μ -Plasmid mit den Genen <i>XYL1</i> , <i>XYL2</i> und <i>XKS1</i> ; <i>XYL1</i> unter Kontrolle des <i>ADH</i> -Promotor und Terminator, <i>XYL2</i> und <i>XKS1</i> unter Kontrolle des <i>PGK</i> -Promotor und Terminator, <i>HIS3</i> -Selektionsmarkergen, |
| pSH47 | Güldener <i>et al.</i> , 1996 | Cre-Rekombinase hinter dem <i>GAL1</i> -Promotor der Hefe; <i>URA3</i> -Selektionsmarkergen |

Tab. 6: Im Rahmen dieser Arbeit konstruiertes Plasmid

| Plasmid | Beschreibung |
|-----------------|---|
| p423H7araAbsura | Das 1,8 kb große Fragment des <i>araA</i> -Gens wurde von dem Plasmid p423H7araABs mittels PCR amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> Rekombination in den mit <i>EcoRI/BamHI</i> geschnittenen Vektor p426HXT7-6His kloniert. |

2.2 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net (Ulm) synthetisiert. Das Lösungsvolumen der Oligonukleotide in Wasser wurde so gewählt, dass eine Endkonzentration von 100pmol/μl erreicht wurde.

Tab. 7: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

| Oligo-nukleotid | Sequenz (5' → 3') | Beschreibung/Verwendung |
|-----------------|--|--|
| Epi-1 | CGTACCTCAACCACTTCACC | Aufwärtsprimer zum Nachweis von <i>araD</i> |
| Epi-2 | CGATGCAGCGCAAATGCCCGG | Abwärtsprimer zum Nachweis von <i>araD</i> |
| Gal2-a | TGTGTGTTGCCTTCGGCGGC | Abwärtsprimer zum Nachweis von <i>Gal2</i> |
| Gal2-b | AATGGCAGATGTGATGAATG | Aufwärtsprimer zum Nachweis von <i>Gal2</i> |
| Iso-1 | GCTTCACTGTACTCCGCTTC | Aufwärtsprimer zum Nachweis von <i>araA</i> |
| Iso-2 | TGGAAGCCGGAGCCGTCATTG | Abwärtsprimer zum Nachweis von <i>araA</i> |
| k3kanMX | TATGGAAGTGCCTCGGTGAG | Kontrolle der Integration von <i>kanMX</i> ; Bindestelle im <i>kanMX</i> -Gen |
| kanhom1 | GAGACCGGCAGATCCGCGGCCGCATA GGCCACTAGTGGATCTG | Abwärtsprimer zur Amplifikation von <i>kanMX</i> aus pUG6 |
| kanhom1-2 | GAGACCGGCAGATCCGCGGCCGCATA GGCCACTAGTGGATCTGATATCACCTA | Abwärtsprimer zur Amplifikation von <i>kanMX</i> aus pUG6 (Sequenz wie Primer kanhom1 mit 10 Nucleotiden Verlängerung im 3' Bereich) |
| kanhom2 | CAGATCCACTAGTGGCCTATGCGGCCG CGGATCTGCCGTCTCGAGCTCGTAGG ACAATTTTCG | Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>araD</i> aus p425H7araD ^{re} (homologe Überhänge zu Primer kanhom1-2) |
| kanhom2Iso | CAGATCCACTAGTGGCCTATGCGGCCG CGGATCTGCCGTCTCGTACCGGCCG AAATTAAG | Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>araD</i> aus p425H7araD ^{re} (homologe Überhänge zu Primer kanhom1-2) |
| kanP1-1 | CTTCTACGGTTAATACTTTCTCTTCGT CTTTTTCTACACCCTTTCGTACGCTGC AGGTCGAC | Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>kanMX</i> aus pUG6 (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |
| kanP1-1Iso | GCCGCATTACACTATATGATCGTAGTA CATCTTACAACCTCCGCATACCGCCTT CGTACGCTGCAGGTCGAC | Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>kanMX</i> aus pUG6 (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |
| Kin-1 | AATCGGTGCGGGCGTCGAGC | Aufwärtsprimer zum Nachweis von <i>araB</i> |

| | | |
|-------------|--|---|
| Kin-2 | GCACGCAGACATCCCATCAG | Abwärtsprimer zum Nachweis von <i>araB</i> |
| rDNA1 | GCCATATCTACCAGAAAGCAC | Aufwärtsprimer zur Sequenzierung des rDNA-Locus |
| rDNA2 | GCTTGCTGGCGAATTGCAATG | Abwärtsprimer zur Sequenzierung des rDNA-Locus |
| rDNAG1-1 | CTTCTACGGTTAATACTTTCCTCTTCGT CTTTTCTACACCCTCGAGCTCGTAGG AACAAATTCG | Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>araB</i> aus p424H7araBs mit <i>HXT7</i> -Promoter zur Klonierung in den rDNA-Locus (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |
| rDNAG1-2 | AAATGTTAGTGCAGGAAAGCGGGAAG GAATAAGAAGCAACTAAACGGTACCG GCCGCAAATTAAG | Abwärtsprimer zur Amplifikation von <i>araB</i> aus p424H7araBs mit <i>CYC1</i> -Terminator zur Klonierung in den rDNA-Locus (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |
| rDNAkan1 | ATATTGCACTGGCTATTCATCTTGCACT TTTCTCTTTCTTCTTCCCAGTTTCGTA CGCTGCAGGTCGA | Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>kanMX</i> aus pUG6 zur Klonierung in den rDNA-Locus (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |
| rDNAkan2 | GGCAGTTTCTAGGGAATGATGATGGCA AGTTCCAGAGAGGCAGCGTAAAAGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG | Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>kanMX</i> aus pUG6 zur Klonierung in den rDNA-Locus (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |
| rDNAP2-1 | GCCGCATTACACTATATGATCGTAGTA CATCTTACAACCTCCGCATACCGCGGTA CCGGCCGCAAATTAAG | Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>araA</i> mit <i>HXT7</i> -Promotor aus p423H7araABs ^{re} zur Klonierung in den rDNA Locus (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |
| rDNAP2-2 | ACTTAACAGATATGGAATGGTTGGCGA AGTAAATTTTGGCGACGCGGCGGAGC TCGTAGGAACAATTCG | Abwärtsprimer zur Amplifikation von <i>araA</i> mit <i>CYC1</i> -Terminator aus p423H7araABs ^{re} zur Klonierung in den rDNA Locus (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |
| rDNAP3-1 | ATATTGCACTGGCTATTCATCTTGCACT TTTCTCTTTCTTCTTCCCAGTGAGCTC GTAGGAACAATTCG | Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>araB^{mut}</i> mit <i>HXT7</i> -Promotor aus p423H7araABs zur Klonierung in den rDNA Locus (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |
| rDNAP3-2 | GGCAGTTTCTAGGGAATGATGATGGCA AGTTCCAGAGAGGCAGCGTAAAAGGT ACCGGCCGCAAATTAAG | Abwärtsprimer zur Amplifikation von <i>araB^{mut}</i> mit <i>CYC1</i> -Terminator aus p423H7araABs zur Klonierung in den rDNA Locus (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |
| seqCYC1 | GGCGTGAATGTAAGCGTGAC | Abwärtsprimer zur Amplifikation des <i>CYC1</i> -Terminators |
| seqp426HXT7 | CAAACAAGCTCAACTTGTC | Aufwärtsprimer zur Amplifikation des <i>HXT7</i> -Promotors |
| WTKinH11 | TTCAACATCTAGTAGTGTACTTAAGC CTGTTAGGATGTTGTTTTAGGTGAGCT CGTAGGAACAATTCG | Aufwärtsprimer zur Amplifikation der WT-Kinase <i>araB</i> mit <i>HXT</i> -Promotor aus p423H7araABs ^{re} zur Klonierung in den rDNA Locus (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |
| WTKinH12 | ATCCATTGAGATCGACTCGGTTATCTG TTAATGGAAATTATTGCTAGTAGGTAC CGGCCGCAAATTAAG | Abwärtsprimer zur Amplifikation der WT-Kinase <i>araB</i> mit <i>CYC1</i> -Terminator aus p423H7araABs ^{re} zur Klonierung in den rDNA Locus (homologe Überhänge zum rDNA-Locus) |

2.3 Enzyme, Chemikalien und weitere Materialien

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Enzyme, Chemikalien und weitere Materialien

| Quelle/Referenz | Enzyme, Chemikalien, Material |
|--------------------------------------|---|
| Acros Organics | Arginin, Galaktose, Lysin, Maltose, Natriumacetat, Phenylalanin |
| biomers | synthetische Oligonukleotide |
| Braun-Melsungen | Glasperlen (\varnothing 0,45mm) |
| Calbiochem | G418 Sulfat/Geneticin |
| Difco | bakteriologischer Hefeextrakt, bakteriologisches Trypton, Maltose, Pepton, Yeast nitrogen base w/o amino acids, Yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulphate |
| Gibco BRL / Invitrogen | UltraPure Agarose, <i>E.coli</i> Stämme, T4-DNA-Ligase |
| J.T.Baker | di-Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, Magnesiumchlorid, Schwefelsäure |
| New England Biolabs (NEB) | Restriktionsenzyme, Rinderserumalbumin (BSA) |
| MBI | Lambda-Phagen-DNA, dNTP Set |
| Merck | Adenin, Alanin, EDTA, Leucin, Magnesiumchlorid, 2-Propanol, Salzsäure, Uracil |
| Oxoid | bakteriologischer Agar, Hefeextrakt, bakteriologisches Pepton |
| Qiagen | QIAprep Spin Miniprep Kit, Plasmid Mini Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAex II Gel Extraction Kit |
| Research Genetics | synthetische Oligonukleotide (Yeast GENEPAIRS) |
| Riedel-de Haen | Essigsäure, Ethanol |
| Roche | alkalische Phosphatase, Expand TM High Fidelity PCR System, Hering-Sperma DNA |
| Roth | Adenin, Ammoniumsulfat, Ampicillin, L(+)-Arabinose, Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Galaktose, Glasperlen, Glukose, Glycin, Glycerin, Histidin, Iso-leucin, Isopropanol, KOH, Lithiumacetat, Lysin, Methionin, Natronlauge, Phenylalanin, Prolin, Salzsäure, Threonin, Tyrosin, Valin, D(+)-Xylose |
| Serva | Calciumchlorid, Glycerin, Rinderserumalbumin (BSA), Bromphenolblau |
| Sigma / Fluka | Ampicillin, Ethidiumbromid, Glycin, Lithiumacetat, synthetische Oligonukleotide, Tris, PEG 3350 |
| Stratagene | <i>E.coli</i> Stamm |
| TRC Toronto Re-search Chemicals Inc. | 5-Fluoroorotsäure (5-FOA) |

2.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurde von der Firma SRD (Scientific Research and Development GmbH, Oberursel) durchgeführt.

2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch in einem Wellenlängenbereich von 240-300nm gemessen. Liegt die Reinheit der DNA, bestimmt durch den Quotient $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$, bei 1,8, so entspricht die Extinktion $E_{260\text{nm}}=1,0$ einer DNA-Konzentration von 50 μg dsDNA/ml (Maniatis *et al.*, 1982).

2.6 Transformation

2.6.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation der *E. coli* Zellen erfolgte durch die Elektroporationsmethode nach Dower *et al.* (1988) und Wirth (1989) mittels eines Easyject prima Geräts (EQUIBO).

2.6.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* Stämmen mit Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmenten erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode von Gietz und Woods (1994). Zur Selektion auf eine Geneticin-Resistenz wurden die Zellen nach der Transformation für 4h bei 30°C in Vollmedium inkubiert und im Anschluss auf G418-haltigen Mediumsplatten ausplattiert. Bei Transformation mit den PCR-Fragmenten für eine gleichzeitige Integration der Arabinose-Stoffwechsel-Gene wurden die Zellen nach der Transformation für 4h bei 30°C in Vollmedium inkubiert, im Anschluß mit H₂O gewaschen und auf synthetische Minimalmediumsplatten ausplattiert, welche Uracil, Tryptophan, Histidin, Leucin, 0,1% Hefeextrakt, 0,2% Pepton sowie 2% L-Arabinose enthielten.

2.7 Präparation von DNA

2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979), modifiziert nach Maniatis *et al.* (1982) oder alternativ mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen.

Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen wurde mit dem „Plasmid Mini Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers präpariert.

2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die Zellen einer stationären Hefekultur (5ml) wurden durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und in 400µl Puffer P1 (Plasmid Mini Kit, Firma Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 400µl Puffer P2 und $\frac{2}{3}$ Volumen Glasperlen (\varnothing 0,45mm) erfolgte der Zellaufschluss durch 5-minütiges Schütteln auf einem Vibrax (Vibrax-VXR von Janke & Kunkel oder IKA). Der Überstand wurde mit $\frac{1}{2}$ Volumen Puffer P3 versetzt, gemischt und für 10min auf Eis inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000rpm wurde durch Zugabe von 0,75ml Isopropanol zum Überstand die Plasmid-DNA bei Raumtemperatur gefällt. Die durch Zentrifugation für 30min bei 13000rpm pelletierte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl Wasser resuspendiert. 1µl der DNA wurde für die Transformation in *E. coli* (2.6.1) eingesetzt.

2.8 Enzymatische Modifikation von DNA

2.8.1 DNA-Restriktion

Sequenzspezifische Spaltungen der DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen für 2-3 Stunden mit 2-5U Enzym pro µg DNA durchgeführt.

2.8.2 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 20µl Ansatz bestehend aus Vektor-DNA, einem 3-5fachem molarem Überschuß an Fragment-DNA und 1U T4-Ligase für 1h bei 22°C. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte bei 65°C für 10 min.

2.9 DNA-Amplifizierung mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50µl mit dem „ExpandTM High Fidelity PCR System“ der Firma Roche nach Angaben des Herstellers. Jeder Ansatz bestand aus 1-10ng DNA oder 1-2 Hefekolonien als Synthesevorlage, 0,2mM dNTP-Mix, 1xPuffer 2 (enthält 1,5mM MgCl₂), 1U Polymerase und je 100pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer. Im Falle des Einsatzes ganzer Hefezellen wurden diese mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen und in einem Reaktionsgefäß für 2min in der Mikrowelle erhitzt bevor die übrigen

Komponenten zugefügt wurden. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Techne durchgeführt und die PCR-Bedingungen nach Bedarf wie folgt gewählt:

- | | | | |
|----|--------|----------------|---|
| 1. | 1x | 4min, 95°C | Denaturierung der DNA |
| 2. | 16-30x | 30sec, 95°C | Denaturierung der DNA |
| | | 30sec, 56-68°C | Annealing/Bindung der Primer an die DNA |
| | | 0,5-3min, 72°C | DNA-Synthese/Elongation |
| 3. | 1x | 7min, 72°C | DNA-Synthese/Elongation |

Nach dem ersten Denaturierungsschritt wurde die Polymerase zugegeben („hot start PCR“). Die PCR-Produkte wurden durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft und bei Bedarf wie unter 2.10 oder 2.12 beschrieben aufgereinigt.

2.10 DNA-Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem „Qiaquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.11 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 0,15-20kb erfolgte in 0,5-1%igen Agarosegelen mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer (40mM Tris, 40mM Essigsäure, 2mM EDTA) verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Als Größenstandard diente eine mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* geschnittene Lambda-Phagen-DNA. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{10}$ Volumen Blaumarker (1xTAE-Puffer, 10% Glycerin, 0,004% Bromphenolblau) versetzt und nach der Auftrennung durch Bestrahlung mit UV-Licht (254nm) sichtbar gemacht.

2.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem TAE-Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366nm) ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.13 Klonierung von Plasmiden durch *in vivo*-Rekombination

Für eine *in vivo*-Klonierung von DNA-Fragmenten in *S. cerevisiae* wurde zunächst die zu klonierende DNA-Sequenz in einer PCR (2.9) amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide binden im Promotor- sowie im Terminator-Bereich des Gens *araA*. Die amplifizierte DNA-Sequenz besitzt an den Enden Homologien zu dem gewählten Integrationsbereich im Zielvektor p426HXT7-His. Der Vektor wurde durch Restriktion im Integrationsbereich linearisiert (2.8.1), gereinigt (2.12) und zusammen mit dem PCR-Produkt in die Hefe transformiert (2.6.2). Die Zellen wurden im Anschluss auf Selektivmedium ausplattiert, dem für die Selektion auf den Auxotrophiemarker des Vektors die entsprechende Aminosäure fehlte. Somit konnten nur solche Transformanten wachsen, die aufgrund homologer Rekombination des DNA-Fragmentes bzw. der DNA-Fragmente mit dem linearisierten Vektor ein stabiles, zirkularisiertes Plasmid besaßen. Die Plasmide wurden isoliert (2.7.2), in *E. coli* amplifiziert (2.6.1) und durch eine anschließende Restriktionsanalyse (2.8.1) überprüft.

2.14 Genomische Integration durch homologe Rekombination

Gleichzeitige Integration der Arabinose-Gene:

Für eine genomische Integration von DNA-Fragmenten in den rDNA-Locus von *S. cerevisiae* wurde die zu integrierende DNA-Sequenz in einer PCR-Reaktion mit 18 Zyklen amplifiziert (2.9). Die eingesetzten Oligonukleotide binden an den Anfang bzw. an das komplementäre Ende der zu amplifizierenden Sequenz und besitzen Überhänge, die homolog zu den Gensequenzen sind, in die das PCR-Produkt integrieren soll. Als Integrationsstelle wurde der rDNA-Bereich zwischen dem *5S*-Gen und der *HOT1*-Region innerhalb der *NTS1* von *S. cerevisiae* gewählt bzw. der Region hinter dem *hxt1*-Gen. Die PCR-Produkte wurden gemeinsam in den Hefestamm JBY25 transformiert (2.6.2). Die Zellen wurden im Anschluss auf Selektivmedium ausplattiert, welches neben 2% L-Arabinose zusätzlich 0,1% Hefeextrakt und 0,2% Pepton enthielt. Somit konnten nur solche Transformanten wachsen, die aufgrund homologer Rekombination alle PCR-Fragmente in das Genom integriert hatten.

Schrittweise Integration der Arabinose-Gene:

Für eine schrittweise Integration von DNA-Fragmenten in *S. cerevisiae* wurde zunächst die zu integrierende DNA-Sequenz und der Selektionsmarker *kanMX* in getrennten

PCR-Reaktionen mit 18 Zyklen amplifiziert (2.9). Die eingesetzten Oligonucleotide zur Amplifikation von *araD* und *kanMX* wurden so gewählt, dass sie überlappende Überhänge besaßen, die eine homologe Rekombination zwischen *araD* und *kanMX* gewährleisten sowie Homologien zur rDNA aufwiesen, die eine anschließende Integration des Fusionsprodukts ermöglichen. Die PCR-Produkte wurden gemeinsam in den Hefestamm JBY25 transformiert (2.6.2). Die Zellen wurden im Anschluss zur Selektion auf Integration des Geneticin-enthaltenen Fusionsproduktes nach der Transformation für 4h bei 30°C in Vollmedium inkubiert und im Anschluss auf G418-haltigen Mediumsplatten ausplattiert. Die Transformanten wurden durch anschließende Kolonie-PCR überprüft (2.9).

2.15 Bestimmung der Wachstumsrate

Zur Bestimmung der Wachstumsraten wurden die Stämme in Minimalmedium mit 2% des jeweiligen Zuckers herangezogen, dieses entweder direkt zum Animpfen verwendet oder zuvor zweimal mit Wasser gewaschen. Mit einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,2-07 ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) wurde in Minimalmedium mit 2% L-Arabinose oder 2% D-Xylose oder 2% L-Arabinose mit 2% D-Xylose angeimpft. Im Zeitraum von 2-12 h wurde jeweils eine 100 µl Probe entnommen und diese in einer entsprechenden Verdünnung mit Wasser gegen eine Probe mit Wasser als Referenz bei 600nm spektralphotometrisch gemessen.

2.16 Bestimmung der Pentoseumsetzung

Für die Bestimmung der Pentoseumsetzung unter aeroben Bedingungen wurden die Zellen in Minimalmedium mit 2% des jeweiligen Zuckers herangezogen. In einem Fall wurde die Vorkultur zweimal mit Wasser gewaschen, in den anderen Fällen diente sie direkt als Inokulum. Angeimpft wurde mit einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,2 ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml). Die Transformanten wurden in Erlenmeyerkolben bei 30°C schüttelnd kultiviert. In Abständen von 2-12 h wurden über einen Zeitraum von 170 h 600 µl Proben abgenommen und diese sofort gekühlt. Die Probe wurde bei 4°C für 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und aus dem Überstand 450 µl entnommen. Die Proteinfällung wurde mit 50%iger Sulfosalizylsäure durchgeführt. 1/10 Volumen Sulfosalizylsäure wurde auf die Proben gegeben, gemischt und für 20 min bei 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und nach einer weiteren Verdünnung mit Wasser konnten die Proben für die Messung eingesetzt

werden. Als Standards dienten Proben mit L-Arabinose, D-Xylose und Ethanol welche in Konzentrationen von 0,05% w/v, 0,1% w/v, 0,5% w/v und 1,0% w/v eingesetzt wurden. Die Zuckerkonzentrationen sowie die Ethanolkonzentration wurden mittels BioLC (Dionex) gemessen. Es wurde der Autosampler „AS50“, der Säulenofen „TCC-100“, der RI-Detektor „RI-101“ (Shodex) und die Gradienten-Pumpe „GS50“ bei der Messung verwendet.

Die Messung der Proben wurde mit der Säule VA 300/7.7 Nucleogel Sugar 810 H durchgeführt. Diese Säule wird für die chromatographische Trennung von einer Vielzahl polarer organischer Verbindungen eingesetzt. Die Trennung der Analyten basiert auf einer Kombination verschiedener Mechanismen. Ionenausschluss- und Ionenaustauscheffekte sowie hydrophobe Wechselwirkungen und sterischer Ausschluss spielen bei der Analytentrennung auf der Säule eine Rolle. Als Software für die Auswertung der Daten wurde das Programm Chromeleon Version 6.50 verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Selektion eines optimierten L-Arabinose verwertenden Hefestammes

Der Stamm JBY25-4M ist in der Lage, L-Arabinose zu Ethanol zu fermentieren (Becker und Boles, 2003).

Der Stamm JBY25-4M sollte auf verbessertes Wachstum mit L-Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen hin selektiert werden. Dazu wurde der Stamm in flüssigem synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose, 0,1% Hefeextrakt und 0,2% Pepton inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter leichtem Rühren über 17 Wochen bei 30°C in verschlossenen Reagenzgläsern. Der Stamm wurde jeweils nachdem er die stationäre Phase erreicht hatte mit einer Anfangs-OD_{600nm} von 0,2 in frisches Medium überimpft.

Nach 17 Wochen repetitiver Selektion wurde die Kultur auf Platte ausgestrichen und es wurde mit zwei Einzelkolonien weitergearbeitet. Genannt wurden die beiden neuen Stämme BWY01A-4M und BWY01B-4M.

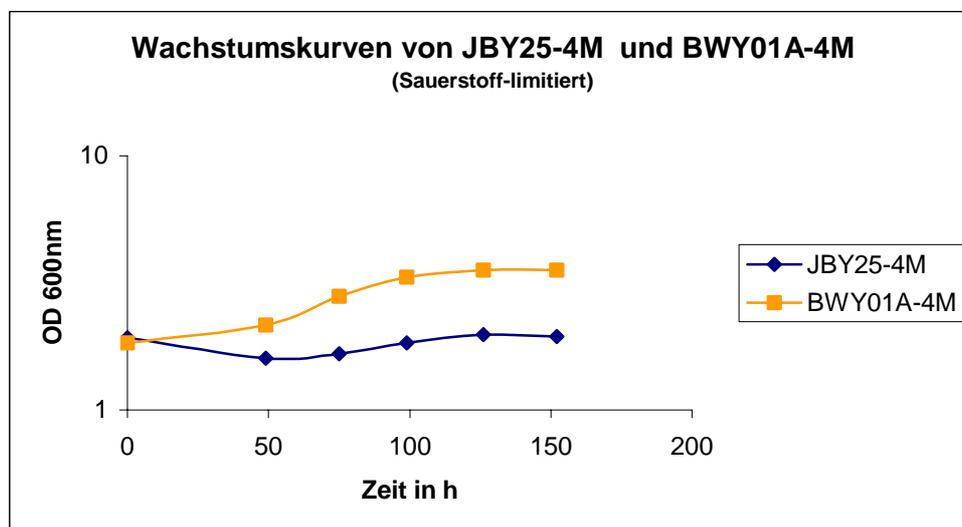


Abb.3: Wachstumskurven des *S. cerevisiae* Stammes JBY25-4M und dem selektierten Stamm BWY01A-4M unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen im Vergleich, in synthetischem Minimalmedium mit 2% L-Arabinose bei pH5. Die Stämme wurden in synthetischem Minimalflüssigmedium mit 2% L-Arabinose herangezogen, nach 2 Tagen in das selbe Medium mit einer Anfangs-OD_{600nm} von ca. 0,6-0,8 umgeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C leichtem Rühren. Die Wachstumsraten wurden alle 2 bis 24 Stunden durch Messung der optischen Dichte bei 600nm bestimmt.

Das Wachstumsverhalten des selektierten Stammes BWY01A-4M wurde im Vergleich zu dem Stamm JBY25-4M unter Sauerstoff-limitierten sowie unter aeroben Wachstumsbedingungen in Flüssigmedium mit 2% L-Arabinose getestet.

Zur Analyse des Wachstumsverhalten der beiden Stämme unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen wurden diese in synthetischem Minimalflüssigmedium mit 2% L-Arabinose herangezogen und nach zwei Tagen in das selbe Medium mit einer Anfangs-OD_{600nm} von ca. 0,7 umgeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C unter leichtem Rühren in kleinen Reagenzgläsern, die mit Gummistopfen abgedichtet wurden. Damit dass sich im Laufe der Fermentationsprozesse entwickelnde CO₂ aus den geschlossenen Gefäßen entweichen konnte, wurden Nadelspitzen in die Gummistopfen gesteckt. Die Probenentnahme erfolgte mittels einer Spritze.

Das Ergebnis des Wachstumstests unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen ist in Abbildung 3 dargestellt.

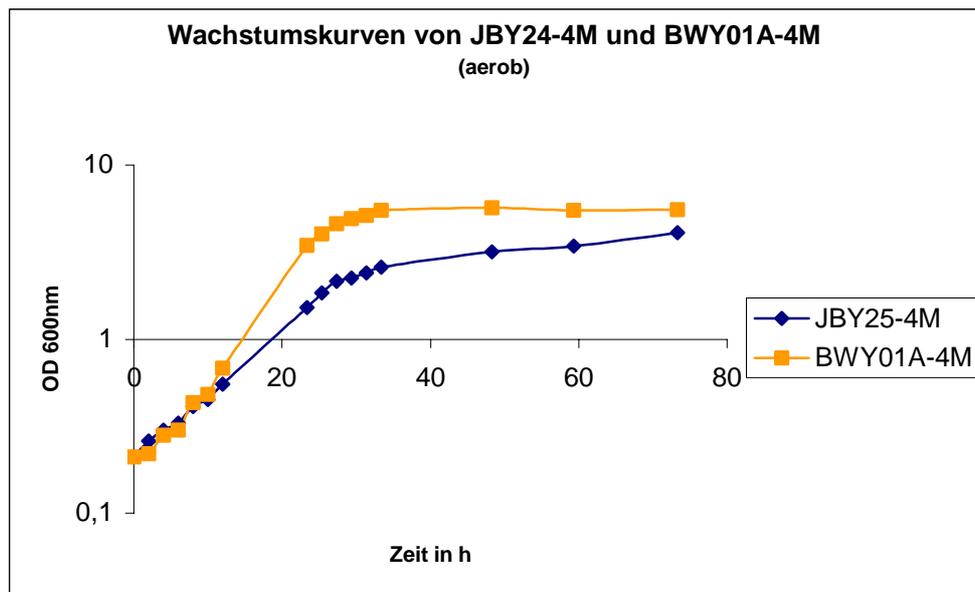


Abb.4: Wachstumskurve des *S. cerevisiae* Stammes JBY25-4M und dem selektierten Stamm BWY01-4M unter aeroben Bedingungen im Vergleich, in synthetischem Minimalmedium mit 2% L-Arabinose bei pH5. Die Stämme wurden in synthetischem Minimalflüssigmedium mit 2% L-Arabinose herangezogen, nach 2 Tagen in das selbe Medium mit einer Anfangs-OD_{600nm} von ca. 0,2 umgeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C in Schüttelkolben. Die Wachstumsraten wurden alle 2 bis 24 Stunden durch Messung der optischen Dichte bei 600nm bestimmt.

Für die Aufnahme der Wachstumskurve unter aeroben Bedingungen wurden die beiden Stämme ebenfalls in synthetischem Minimalflüssigmedium mit 2% L-Arabinose angezogen. Nach zwei Tagen Wachstum wurden die Kulturen in das selbe Medium mit einer Anfangs-OD_{600nm} von ca. 0,2 umgeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C in

Schüttelkolben. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der Wachstumskurven der beiden Stämme JBY25-4M und BWY01A-4M unter aeroben Bedingungen.

Wie aus den Abbildungen 3 und 4 hervorgeht, zeigte der selektierte Stamm BWY01-4M in Wachstumstests unter Sauerstoff-limitierten und aeroben Bedingungen ein verbessertes Wachstum auf L-Arabinose. Stamm BWY01A-4M konnte schneller wachsen und erreichte eine höhere End-Zelldichte. Die Verdopplungszeit war unter aeroben Bedingungen mit 4 Stunden doppelt so hoch wie von Stamm JBY25-4M. Aus dem gezeigten verbesserten L-Arabinose-Wachstum ließ sich schließen, dass im Laufe des Selektionsverfahrens Mutationen im Genom und/oder in den Plasmiden von JBY25-4M aufgetreten sein mussten.

3.2 Charakterisierung des Stammes BWY01A-4M und seiner Mutationen

Das verbesserte Wachstum von BWY01A-4M ist auf spontane Mutationen zurückzuführen, auf die durch den gegebenen Selektionsdruck auf Arabinose-Verwertung selektiert wurde. Der neu erhaltene Stamm enthält die vier Plasmide mit den Genen des Arabinose-Stoffwechsels. Folglich konnten sich Mutationen bei dem Plasmid-transformierten Stamm entweder im Genom ereignen und/oder sie konnten die Plasmid-kodierenden Gene betreffen. Mutationen im Genom können sich auch auf die auf Plasmiden befindlichen Gene auswirken.

Wichtig für eine effiziente Arabinose-Verwertung scheint auch das Verhältnis der Plasmide zueinander zu sein (Becker und Boles, 2003). So könnte ein verbessertes Arabinose-Wachstum nicht durch Mutationen sondern durch ein optimiertes Zahlenverhältnis der Plasmide zueinander verursacht worden sein.

Zum Auffinden der Ursache für das verbesserte Arabinose-Wachstum von BWY01A-4M auf L-Arabinose war es notwendig, die Plasmide aus dem Stamm zu isolieren und beides, die Plasmide und den Plasmid-freien Hefestamm, getrennt voneinander zu analysieren.

Quantifizierung der Plasmide:

Die Plasmide wurden aus dem Stamm JBY25-4M, aus BWY01A-4M und aus einem weiteren Stamm BWY01B-4M quantifiziert. Der Stamm BWY01B-4M wurde ebenfalls 17 Wochen selektiert, zeigte aber nicht das gleiche verbesserte Wachstum auf

Arabinose wie Stamm BWY01A-4M (Daten nicht gezeigt). Die Stämme wurden in synthetischem Minimalmedium mit 2% Arabinose herangezogen. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurden Proben für die anschließende Plasmid-Isolierung abgenommen. BWY01A-4M wurde in mehreren unabhängigen Kulturen angezogen. Die isolierten Plasmide wurden in *E. coli* transformiert und die Transformanten auf LB-Medium mit Ampicillin ausplattiert.

Zur Quantifizierung des Zahlenverhältnisses der Plasmide zueinander wurde von einzelnen Kolonien der *E. coli*-Transformanten Plasmid-Präparationen durchgeführt. Mittels Restriktionskartierung wurde jeweils bestimmt, um welches Plasmid es sich handelte. Die Plasmide wurden mit *SacI/KpnI* geschnitten.

Es stellte sich heraus, dass aus den 30 getesteten Plasmid-Präparationen von JBY25-4M hauptsächlich die Plasmide p423H7araABs^{re} und pHL125^{re} isoliert werden konnten. Beide machten jeweils schon fast 40% der nachgewiesenen Plasmide aus. Plasmid p424araB^{re} war mit 20% in dem Stamm vertreten. Hingegen konnte Plasmid p425H7araD^{re} nur ein Mal nachgewiesen werden.

Aus dem Stamm BWY01B-4M, der trotz Selektion kein deutlich verbessertes L-Arabinose Wachstum aufwies, wurde bei den 20 getesteten Plasmid-Präparationen mit 85% fast ausschließlich das Plasmid p423H7araABs^{re} isoliert. Nur jeweils in einem Fall konnte pHL125^{re}, p424H7araB^{re} und p425H7araD^{re} nachgewiesen werden.

Bei dem Stamm BWY01A-4M, der verbessertes L-Arabinose Wachstum aufwies, hatte sich das Plasmid-Verhältnis deutlich zu einem Plasmid verschoben, welches durch Restriktionskartierung keinem der transformierten Plasmide entsprach. In dem Bandenmuster ähnelte es dem Plasmid p423H7araABs^{re}. Es wurde p423H7verIso1 genannt. Zusätzlich konnte aus dem optimierten Stamm ein weiteres, verändertes Plasmid nachgewiesen werden, welches sich deutlich durch seine Größe unterschied. Dieses bekam den Namen p423H7verIso2. Unveränderte Plasmide konnten aus BWY01A-4M kaum isoliert werden. Von den 60 getesteten Plasmid-Präparationen aus *E. coli* von dem Stamm BWY01A-4M entsprachen mehr als 80% dem neuen Plasmid p423H7verIso1, nur 7% machte das andere veränderte Plasmid p423H7verIso2 aus. Das Plasmid p423H7araABs^{re} wurde mit einem Anteil von 5%, p424H7araB^{re} mit 4% und pHL125^{re} mit 2% quantifiziert. Plasmid p425H7araD^{re} konnte in dem optimierten Stamm nicht nachgewiesen werden. Die unveränderten Plasmide nahmen mit insgesamt 10% einen geringen Anteil bei der Plasmid-Verteilung ein.

Aufgrund des erhaltenen Ergebnisses sollten die veränderten Plasmide genauer analysiert werden, da sie vielleicht ein Grund für das verbesserte L-Arabinose-Wachstum von BWY01A-4M waren.

Für weitere Quantifizierung des Plasmid-Verhältnisses in BWY01A-4M wurde ein PCR-Ansatz gewählt. In der PCR (Denaturierung 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 56°C; DNA-Synthese für 2min bei 72°C; 25 Zyklen; Primer: seqp426HXT7, seqCYC1) diente die Plasmid-Präparation aus dem Hefestamm BWY01A-4M als Template. Als Kontrolle wurde die Plasmid-Präparation aus dem Stamm JBY25-4M verwendet. Der verwendete Aufwärtsprimer bindet im *HXT7*-Promotor und der Abwärtsprimer im *CYCI*-Terminator, sodass, falls vorhanden, die Gene *araA*, *araB* und *araD* amplifiziert werden konnten. Das Gen für den Gal2-Transporter konnte auf diese Weise nicht nachgewiesen werden, da es andere Promotor- bzw. Terminator-Sequenzen besitzt. Die Idee bestand darin, dass die Gene, welche am häufigsten in den Plasmid-Präparationen aus Hefe enthalten waren, auch stärker in der PCR-Reaktion amplifiziert werden würden. Der PCR-Ansatz wurde entgegen den sonst gewählten 50µl in einem 75µl-Ansatz durchgeführt. Während der PCR-Reaktion wurden zwei Mal je 5 µl Proben entnommen, um den Verlauf der Amplifikation verfolgen zu können. Die Probenentnahme fand nach 10 Zyklen, nach 17 Zyklen und am Ende nach 25 Zyklen statt.

Die nach den verschiedenen Zyklen abgenommenen Aliquots wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Erwartet wurden 3 Banden im Gel, da mit den gewählten Primern die Gene *araA*, *araB* und *araD* amplifiziert werden konnten. Die amplifizierten Fragmente von *araB* und *araA* hatte mit 1841bp und 1629bp ähnliche Größen, wodurch die beiden Fragmenten schlecht im Agarosegel getrennt werden können. Das *araD*-Fragment ist mit einer Größe von 835bp deutlich kleiner. In dem Agarosegel waren nach 10 Zyklen bei keinem der beiden überprüften Plasmid-Präparationen Banden erkennbar. Nach 17 Zyklen konnten zwei unterschiedlich große Fragmente bei beiden Ansätzen nachgewiesen werden. Aufgetragene Proben, die die gesamten 25 Zyklen durchliefen, zeigten die zuvor erkennbaren Banden stärker amplifiziert. Unterschiede in dem Bandenmuster im Agarosegel von Stamm JBY25-4M zu BWY01A-4M konnten nicht gezeigt werden. Auch war keine der beiden Banden im Gel deutlich stärker repräsentiert.

Zur Identifikation der im Agarosegel erhaltenen Banden sollten diese sequenziert werden. Hierfür wurde ein neuer PCR-Ansatz gestartet (Denaturierung 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 56°C; DNA-Synthese für 2min bei 72°C; 25 Zyklen; Primer: seqp426HXT7, seqCYC1). Die gleichen Primer wie zuvor wurden zur Amplifikation verwendet. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt. Nur die beiden Fragmente aus der Plasmid-Hefe-Präparation von Stamm BWY01-4M wurden aus dem Agarosegel unter langwelligem UV-Licht 366nm ausgeschnitten und unter Verwendung des „Qiaex II Gel Extraction Kit“ (Qiagen) isoliert. Durch die Sequenzierung stellte sich heraus, dass die größere der beiden erkennbaren Banden aus den beiden Gen-Fragmenten *araA* und *araB* bestand. Die kleinere der beiden Banden konnte als *araD* identifiziert werden. Somit konnten in BWY01-4M alle essentiellen Gene für den L-Arabinose Katabolismus nachgewiesen werden. Eine eindeutige Quantifizierung war nicht möglich.

Analyse der veränderten Plasmide

Test auf vorhandene Marker:

Um einen Plasmid-freien Stamm zu erhalten, wurde BWY01-4M über mehrere Generationen in nicht-selektivem YEPD-Glukosemedium kultiviert. Nach Vereinzelausstrich auf YEPD-Platten wurde anschließend eine Replikaplattierung auf synthetisches Komplettmedium mit 2% Glukose jeweils entweder ohne Leucin oder Uracil oder Tryptophan oder Histidin durchgeführt. Kolonien, die auf keiner der Replikaplaten wachsen konnten, hatten alle Plasmide verloren. Solche Stämme zeigten kein Wachstum auf L-Arabinose-Platten mehr.

Zur Analyse der veränderten Plasmide sollte getestet werden, welche Selektionsmarker auf den Plasmiden enthalten waren. Hierfür wurden die beiden Plasmide p423H7verIso1 und p423H7verIso2 jeweils in BWY01 ohne Plasmide transformiert.

Die Transformanten mit den neuen Plasmiden wurden auf entweder uracilfreien, histidinfreien, leucinfreien oder tryptophanfreien synthetischen Komplett-Mediumsplatten mit 2% Glukose herangezogen. Je nachdem welche Markergene auf den Plasmiden enthalten waren, konnten die Transformanten auf den entsprechenden Platten wachsen.

Bei dem Plasmid p423H7verIso1 zeigte sich, dass es das *TRP1* und das *URA3*-Markergenen enthält. Plasmid p423H7verIso2 enthielt neben den Markergenen *TRP1* und *URA3* zusätzlich das Markergenen *HIS3*.

Test auf vorhandene Gene:

Neben dem Test auf die Marker war von Interesse, welche Gene auf den neuen Plasmiden enthalten waren. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. In dem ersten Ansatz sollte das Vorhandensein der Gene mittels PCR nachgewiesen werden. Der zweite Ansatz konnte neben der Bestimmung des Vorhandenseins der Gene zusätzlich deren Funktionalität überprüfen.

In dem PCR-Ansatz zum Nachweis für das Vorhandensein der Gene wurde das erste Primerpaar so gewählt, dass der Aufwärtsprimer im *HXT7*-Promotor bindet und der Abwärtsprimer kurz hinter der kodierenden Region des Gens (*araA*, *araB* oder *araD*) bindet. Beim zweiten Primerpaar sollte der Aufwärtsprimer in der Nähe des Ende des Gens (*araA*, *araB* oder *araD*) binden und der Abwärtsprimer im *CYC1*-Terminator (Denaturierung 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 56°C; DNA-Synthese für 30sec bei 72°C; 25 Zyklen; Primer: Nachweis von *araA*: Iso1, seqp426HXT7; Iso2, seqCYC1; Nachweis von *araB*: Kin1, seqp426HXT7; Kin2, seqCYC1, Nachweis von *araD*: Epi1, seqp426HXT7; Epi2, seqCYC1, Nachweis von *GAL2*: Gal2b, Gal2a). Da das *GAL2*-Gen nicht den *HXT7*-Promotor und den *CYC1*-Terminator besitzt, wurden die Primer hier so gewählt, dass sie im Gen binden und nicht wie bei den anderen Ansätzen nach außen amplifizieren. Das Gen wird hier nach innen amplifiziert. Zur Kontrolle der PCR-Ansätze wurden die ursprünglichen Plasmide ebenfalls in der PCR-Reaktion getestet. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Es zeigte sich, dass p423H7verIso1 nur das Gen *araA* enthielt. In Plasmid p423H7verIso2 konnte *araA* sowie *GAL2* nachgewiesen werden.

Um mit einer weiteren Methode das Vorhandensein der Gene und zusätzlich deren Funktionalität nachweisen zu können, wurden mehrere Transformationsansätze mit verschiedene Plasmid-Kombinationen getestet. Die veränderten Plasmide wurden in Kombination mit den ursprünglichen Plasmiden in Hefe transformiert und auf L-Arabinose Wachstum getestet. Die Transformationen wurden in Stamm BWY01A durchgeführt.

Bei den Tests stellte sich heraus, dass das Plasmid p423H7verIso2 neben einem funktionalen *araA*-Gen auch ein funktionales *araB*-Gen besitzen musste. Wenn das Gen *araD* nicht zusätzlich zu Plasmid p423H7verIso2 mit transformiert wurde, waren die Transformanten nicht in der Lage, auf L-Arabinoseplatten zu wachsen. Folglich war Gen *araD* nicht auf diesem Plasmid vertreten oder zumindest nicht in seiner

funktionellen Form. Auf *GAL2* konnte nicht getestet werden, da dessen Selektionsmarkergen *URA3* auch auf dem neuen Plasmid vorhanden war.

Bei Plasmid p423H7verIso1 konnte gezeigt werden, dass es ein funktionales *araA*-Gen besaß.

Tab.9: Charakterisierung der neu isolierten Plasmide aus BWY1A-4M. Zusammenfassung der Ergebnisse der Analyse der neu isolierten Plasmide p423H7verIso1 und p423H7verIso2 aus BWY01A-4M. Getestet wurden auf vorhandene Markergene sowie auf vorhandene Arabinose-Stoffwechsel-Gene.

| | vorhandene Marker-Gene | vorhandene Arabinose-Stoffwechsel-Gene |
|---------------|-------------------------|--|
| p423H7verIso1 | <i>TRP1, URA3</i> | <i>araA</i> |
| p423H7verIso2 | <i>TRP1, URA3, HIS3</i> | <i>araA, araB, GAL2</i> |

Test des Stammes BWY01 auf seine Mutationen:

Zur Untersuchung, ob Mutationen im Genom von BWY01A-4M aufgetreten waren oder ob das verbesserte Wachstum auf Veränderungen in den Plasmiden zurückzuführen war, wurden die beiden Stämme BWY01 und JBY25, welche jeweils keine Plasmide besaßen, mit unterschiedlichen Plasmidkombinationen transformiert.

Die beiden Stämme wurden zum einen mit den 4 ursprünglichen Plasmiden für Verwertung von L-Arabinose (p423H7araABs^{re}, p424H7araB^{re}, p425H7araD^{re} und pHL125^{re}) transformiert, zum anderen wurden sie mit dem veränderten Plasmid p423H7verIso2 in Kombination mit p425H7araD^{re} transformiert. Die Transformanten wurden auf synthetischen Minimalmediumsplatten mit 2% Glukose herangezogen. Die gewachsenen Kolonien wurden auf synthetischen Minimalmediumsplatten mit 2% L-Arabinose ausgestrichen.

Es stellte sich heraus, dass der Stamm JBY25, transformiert mit den ursprünglichen Plasmiden, schlechter auf L-Arabinose-haltigen Platten wachsen konnte als der neu selektierte Stamm BWY01A, welcher ebenfalls mit den ursprünglichen Plasmiden transformiert wurde. Bei Transformation mit dem neuen Plasmid p423H7verIso2 in Kombination mit p425H7araD^{re} zeigte BWY01A im Vergleich zu JBY25 deutlich besseres Wachstum auf L-Arabinose. Von den verschiedenen Ansätzen war der selektierte Stamm BWY01, transformiert mit dem neuen Plasmid p423H7verIso2 in Kombination mit p425H7araD^{re} in der Lage am besten auf L-Arabinoseplatten zu wachsen.

Aus dem Wachstumsverhalten der Transformanten ließ sich schließen, dass sowohl genomische Mutationen als auch Mutationen auf den Plasmiden von BWY01 für das verbesserte L-Arabinose Wachstum verantwortlich sind.

3.3 Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus in das Genom von JBY25

Für eine stabile Expression der Gene des L-Arabinose Katabolismus in Hefe ist es notwendig, die betreffenden Gene in das Genom zu integrieren. Ein Nachteil bei Transformation von mehreren Plasmiden ist neben der Beeinträchtigung des ganzen Zell-Metabolismus, dass die Transformationseffizienz bei Kointegration von vier Plasmiden relativ gering ist. Ein weiteres Problem ist, dass bei Wachstum auf nicht selektivem Medium die Plasmide schnell verloren gehen. Des Weiteren kommt hinzu, dass die verwendeten Plasmide für die Einführung des L-Arabinose Katabolismus hohe Homologien untereinander aufweisen. Bei drei der verwendeten Plasmide sind Promotor- sowie Terminatorsequenzen identisch. Zwischen diesen Bereichen kann es zu homologer Rekombination kommen, wodurch enthaltene Informationen auf den Plasmiden verloren oder verändert würden. Eine Integration der Gene hätte zusätzlich den Vorteil, dass es zu einer Steigerung der L-Arabinose Umsetzung führen könnte. Weiterhin würde die Integration die gleichzeitige Expression der Enzyme des L-Arabinose und des D-Xylose Katabolismus erleichtern.

Die Idee bestand darin, die essentiellen Gene für den L-Arabinose Katabolismus also die Gene *araB* und *araD* aus *E. coli*, sowie *araA* aus *B. subtilis*, in das Genom von JBY25 zu integrieren. Auf das Hefe-eigene Gen für den Gal2-Transporter sollte zuerst verzichtet werden, da Tests zeigten, dass dessen Überexpression nicht für die L-Arabinose-Verwertung essentiell ist (Becker und Boles, 2003). Für die Integration der Arabinose-Stoffwechsel-Gene wurde der ribosomale DNA-Locus (rDNA) der Hefe ausgewählt.

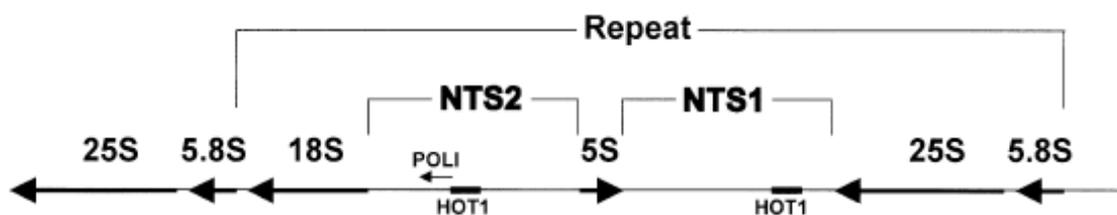


Abb.5: Organisation eines rDNA-Segments von *S. cerevisiae*. Enthalten sind die identisch orientierten 18S-, 5,8S- und 25S-Gene sowie das in umgekehrter Orientierung vorkommende 5S-Gen. In einem rDNA-Segment befinden sich zwei nicht-transkribierte Zwischenregionen (NTS1 und 2) mit jeweils enthaltener HOT1-Sequenz („hot spot“ für Rekombination). Abbildung verändert aus Klabunde *et al.*, 2002.

Die einzelnen rDNA-Segmente liegen in der Zelle in hoher Kopienanzahl vor (Lopes *et al.*, 1998). In *S. cerevisiae* besteht die rDNA aus einer 150fachen Wiederholung von identischen Sequenzen, die tandemartig aneinandergereiht sind (Petes, 1979). Wie in Abbildung 5 gezeigt, ist eine rDNA-Einheit von *S. cerevisiae* aus verschiedenen Elementen aufgebaut. Die Gene *18S*, *5,8S* und *25S* sind in gleicher Orientierung enthalten und werden gemeinsam transkribiert. Das *5S* Gen ist invertiert zu den anderen Genen orientiert und befindet sich zwischen NTS1 und NTS2 (nicht-transkribierte Zwischenregion). In den beiden NTSs-Regionen sind jeweils eine HOT1-Sequenz („hot spot“ für Rekombination) enthalten. Lokalisiert ist der Abschnitt der rDNA-Segment-Wiederholungen auf Chromosom XII (Petes, 1997).

Die jeweilige optimale Enzymaktivität der Gene des L-Arabinose Stoffwechsels ist von der Kopienzahl der Gene abhängig (Becker und Boles, 2003). Zusätzlich scheint das Verhältnis der Enzymaktivitäten zueinander von entscheidender Rolle zu sein. Der Vorteil einer Integration der Gene in diesem Bereich liegt darin, dass die individuell beste Kopienanzahl der einzelnen Gene bei Integration in die rDNA durch Selektion auf L-Arabinose Verwertung erhalten werden kann.

Der präzise molekulare Mechanismus der Integration in die rDNA ist noch nicht bekannt (Klabunde *et al.*, 2002).

3.3.1 Gleichzeitige Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus

Es sollten die drei Arabinose-Stoffwechsel-Gene *araB* und *araD* aus *E. coli*, sowie *araA* aus *B. subtilis* in das Genom des Stammes JBY25 integriert werden. Als Integrationsstelle wurde der rDNA-Bereich zwischen dem *5S*-Gen und der HOT1-Region in NTS1 ausgesucht. Zur Kontrolle der rDNA-Sequenz in dem genannten Bereich sollte dieser zuvor sequenziert werden. Hierfür wurde ein PCR-Ansatz gestartet und das erhaltene DNA-Fragment sequenziert (Denaturierung für 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 55°C; DNA-Synthese für 2 min bei 72°C; 28 Zyklen; Primer: rDNA1, rDNA2). Es zeigte sich, dass keine Sequenzveränderung in dem überprüften Bereich in Stamm JBY25 vorhanden war.

Um nach Integration weiterhin eine starke und konstitutive Expression der Arabinose-Stoffwechsel-Gene zu gewährleisten, blieben die Gene unter der Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors. Ein Selektionsmarker war nicht notwendig, da die

erfolgreiche Integration und Funktionalität der Gene mittels L-Arabinose-Wachstum festgestellt werden sollte.

Verwendung der mutierten Kinase:

Bei Integration des mutierten Kinase-Gens diente als DNA-Vorlage zur Amplifikation der Gene *araB*, *araD* und *araA* mittels PCR die aus JBY25-4M reisolierten Plasmide p423H7araABs^{re}, p424H7araB^{re} und p425H7araD^{re}. In den PCR-Ansätzen wurden Primerpaare verwendet, bei denen der Aufwärtsprimer vor dem verkürzten *HXT7*-Promoter und der Abwärtsprimer komplementär hinter dem entsprechenden *CYC1*-Terminator bindet (Denaturierung für 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 55°C; DNA-Synthese für 2 min bei 72°C; 18 Zyklen; Primer zur Amplifikation von *araD*: rDNAG1-1, rDNAG1-2; Primer zur Amplifikation von *araA*: rDNAP2-1, rDNAP2-2; Primer zur Amplifikation von *araB*: rDNAP3-1, rDNAP3-2). Die Primer besitzen 45bp-Überhänge, die Bereichen in der NTS1-Region homolog sind. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel auf ihre Größe hin geprüft und mit dem „Qiaquick PCR-Purification Kit“ aufgereinigt. Sie dienten als DNA-Vorlage für die Transformation in JBY25.

Die Gene sollten hintereinander in der Reihenfolge *araD*, *araA* und *araB* integriert werden. Da die zu integrierenden Gene des Arabinose-Stoffwechsels identische Promotor- und Terminatorsequenzen besitzen, bestand die Möglichkeit, dass es nach erfolgreicher Integration zu homologer Rekombination innerhalb der übereinstimmenden Sequenzen kommen könnte. Bei gleicher Orientierung der Gene würde eine homologe Rekombination zu einer Deletion und somit zu einem Informationsverlust führen. Um der Wahrscheinlichkeit eines solchen Genverlustes entgegenzuwirken, sollte das Gen *araA* in umgekehrter Orientierung in den rDNA-Bereich hineinintegriert werden. Somit würde eine stattfindende Rekombination nicht eine Deletion, sondern nur eine Inversion innerhalb der Bereiche bewirken. Da es sich bei Integration von drei Genen in den gleichen Locus nicht vermeiden ließe, zwei Gene, in diesem Fall die beiden Gene *araD* und *araB*, in gleicher Orientierung zu integrieren, konnte ein Genverlust durch homologe Rekombination nicht ausgeschlossen werden.

Verwendung der WT-Kinase:

Der zweite Ansatz zur gleichzeitigen Integration der Gene sollte das Problem des angesprochenen Genverlustes durch homologe Rekombination innerhalb der

identischen Sequenzen der Gene umgehen. Der Unterschied zum ersten Ansatz bestand darin, dass das Gen *araB* nicht in den rDNA-Locus integriert wurde, sondern hinter das Gen *HXT1*. Zur Amplifikation der WT-Kinase wurden die gleichen PCR-Bedingungen wie zuvor gewählt. Die WT-Kinase wurde mit den Primern WTKinH11 und WTKinH12 amplifiziert. Nach Integration wird das Gen in dem Genomabschnitt hinter *HXT1* nur in einfacher Kopienzahl vorliegen. Damit die Kinase weiterhin eine optimale Aktivität aufweist, wurde nicht die mutierte Form des *araB*-Gens verwendet, sondern seine Wildtyp-Form, die die native Enzymaktivität besitzt. Das *araA*-Gen und das *araD*-Gen wurden wieder in unterschiedlicher Orientierung in den rDNA-Locus integriert.

Bei beiden Ansätzen zur Integration der Gene des Arabinose Katabolismus wurde der Stamm JBY25 in YEPD-Medium bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,4 herangezogen. Zur Transformation von JBY25 wurden die aufgereinigten, im Agarosegel überprüften PCR-Produkte verwendet.

Die Transformanten wurden für 4 Stunden in 5ml YEPD-Flüssigmedium unter aeroben Bedingungen inkubiert und anschließend auf Minimalmediumsplatten mit 2% L-Arabinose, 0,2% Pepton, 0,1% Hefeextrakt und den Aminosäuren Uracil, Tryptophan, Histidin und Leucin herangezogen. Auf dem L-Arabinose-haltigen Medium sollten nur die Transformanten wachsen können, die alle drei Gene besaßen.

Nach mehreren Wochen waren kleine Hefekolonien auf den Platten zu erkennen. Die Wasserkontrolle zeigte jedoch den gleichen Bewuchs mit kleinen Kolonien. Nach Abschwämmen der Platten mit den vermeintlichen Transformanten sollten diese in Arabinose-haltigem Flüssigmedium mit den Aminosäuren Uracil, Tryptophan, Histidin und Leucin unter aeroben Bedingungen bei 30°C herangezogen werden. Nach mehreren Wochen war jedoch kein Wachstum erkennbar.

3.3.2 Schrittweise Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus mittels eines Selektionsmarkers

Ein weiterer Ansatz für die stabile Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus in den rDNA-Locus von *S. cerevisiae* war die schrittweise Integration jedes einzelnen Gens. Auch hier sollten die Gene weiterhin unter der Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors bleiben. Zum Nachweis der erfolgten Integration war ein Selektionsmarker notwendig.

Im Rahmen dieses Versuchsansatzes wurde das Gen *kanMX* als Selektionsmarker gewählt, welches in Hefe eine Resistenz gegen das Antibiotikum Geniticin vermittelt.

Als erstes Gen sollte *araD* in die NTS1-Region von JBY25 integriert werden. Die Primer zur Amplifikation von *araD* und *kanMX* mussten so gewählt werden, dass sie überlappende Überhänge besitzen, die eine homologe Rekombination zwischen *araD* und *kanMX* gewährleisten bzw. Homologien zur rDNA aufweisen, die eine anschließende Integration des Fusionsprodukts ermöglichen.

Die PCR-Ansätze von *araD* und *kanMX* (Denaturierung für 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 55°C; DNA-Synthese für 2 min bei 72°C; 18 Zyklen; Primer zur Amplifikation von *kanMX*: kanP1-1, kanhom1-2; Primer zur Amplifikation von *araD*: kanhom2, rDNAG1-2) wurden im Agarosegel auf ihre Größe hin überprüft und mit dem „Qiaquick PCR-Purification Kit“ aufgereinigt. Sie dienten als DNA-Vorlage für die Transformation in JBY25.

Der Stamm JBY25 wurde in YEPD-Medium bis zum Erreichen einer OD600 von ca. 0,4 herangezogen und mit den PCR-Produkten von *araD* und *kanMX* transformiert. Nur das durch homologe Rekombination entstandene Fusionsprodukt zwischen *araD* und *kanMX* sollte in der Lage sein, in den rDNA-Locus zu integrieren.

Die Transformanten wurden für 4 Stunden in 5ml YEPD-Medium unter aeroben Bedingungen inkubiert und anschließend auf YEPDG418-Platten herangezogen. Nur Transformanten mit integriertem Fusionsprodukt sollten auf den Platten wachsen können. Die erhaltenen Transformanten wurden auf Integration des Fusionsprodukts getestet.

Durch PCR wurden einzeln ausgestrichene Kolonien auf Integration des Fusionsprodukts in den rDNA-Locus überprüft (Denaturierung für 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 55°C; DNA-Synthese für 2 min bei 72°C; 28 Zyklen; Primer: k3kanMX, rDNA2). Die Primer wurden so gewählt, dass der Aufwärtsprimer in *kanMX* selber und der Abwärtsprimer im rDNA-Locus bindet. Es zeigte sich, dass getestete Transformanten enthalten waren, die das Fusionsprodukt aus *araD* und *kanMX* an der richtigen Stelle integriert hatten. Das erste Gen des L-Arabinose Katabolismus konnte somit erfolgreich in JBY25 integriert werden.

Um die Funktionalität der integrierten Epimerase zu überprüfen, wurden getestete Kolonien mit dem integrierten Fusionsprodukt in YEPD-Medium bis zum Erreichen einer OD600 von ca. 0,4 herangezogen und mit den Plasmiden p423H7araABs^{re}, p424H7araB^{re} und pHL125^{re} transformiert. Die Transformanten wurden auf

synthetischen Minimalmediumsplatten mit 2% Glukose und Leucin herangezogen. Die gewachsenen Kolonien wurden auf synthetischen Minimalmediumsplatten mit 2% Arabinose und Leucin ausgestrichen. Die erhaltenen, wachsenden Kolonien besaßen die integrierte Epimerase in funktioneller Form.

Zur weiteren Integration der anderen essentiellen Gene des L-Arabinose Katabolismus musste das *kanMX*-Gen entfernt werden, damit eine erneute Selektion auf Genitacinresistenz möglich wurde. Für die Entfernung von *kanMX* wurde der Stamm mit dem pSH47 Plasmid transformiert. Dazu musste der neu konstruierte Stamm sein Plasmid pHL125^{re} mit dem Uracil-Marker verlieren, da das Plasmid pSH47 selber das *URA3*-Markergen trägt. Hierfür wurden auf Arabinose wachsende Stämme unter nicht-selektiven Bedingungen angezogen und auf YEPD-Platten ausgestrichen. Die gewachsenen Kolonien wurden auf synthetische Komplettmediumsplatten mit 2% Glukose ohne Uracil überstempelt. Kolonien, die hierauf nicht mehr wachsen konnten, hatten das Plasmid pHL125^{re} verloren. In diesem Stamm konnte das Plasmid pSH47 transformiert werden, welches das Gen für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *GAL2*-Promotors enthält.

Die Cre-Rekombinase erkennt die *loxP*-Sequenzen, die mit dem *kanMX*-Gen von dem Plasmid pUG6 amplifiziert wurden und das *kanMX*-Gen flankieren. Die Bereiche zwischen den *loxP*-Sequenzen werden durch die Cre-Rekombinase aus dem Genom heraus rekombiniert. Auf diesem Weg geht die Genitacinresistenz verloren. Nach der Transformation des Plasmids pSH47 wurden die Transformanten auf synthetischem, uracilfreiem Minimalmedium mit 2% Galaktose ausgestrichen, um den *GAL2*-Promotor zu induzieren. Auf diese Weise wird mit Hilfe der Cre-Rekombinase das *kanMX*-Gen entfernt. Zur Kontrolle wurden die Transformanten auf YEPDG418-Platten überstempelt und nach Kolonien gesucht, die die Genitacinresistenz und somit auch das *kanMX*-Gen verloren hatten.

Transformanten, die das *kanMX*-Gen verloren hatten, sollten anschließend wieder das Plasmid pSH47 verlieren. Daher wurden die Transformanten auf YEPD angezogen, um nicht weiter auf die Plasmid-vermittelte Uracil-Prototrophie zu selektieren. Nach Anwachsen der Transformanten wurden sie auf 5-FOA-haltiges Medium überführt. Diejenigen Transformanten, die eine 5-FOA-Resistenz und somit Wachstum zeigten, hatten das Plasmid pSH47 verloren. Die 5-FOA resistenten Kolonien wurden zur Kontrolle auf Minimalmedium ohne Uracil ausgestrichen. Auf diesem Medium zeigten

die Kolonien kein Wachstum, hatten somit das Plasmid pSH47 verloren und waren daher Uracil-auxotroph.

Um zu testen, ob die Integration in den rDNA-Locus stabil ist, sollte mit PCR das integrierte Epimerase-Gen in dem Stamm nachgewiesen werden, bei dem *kanMX* entfernt wurde. Dieser Stamm wurde über mehrere Generationen unter nicht-selektiven Bedingungen für die L-Arabinose Verwertung angezogen und sollte bei Instabilität dieses Locus sein Gen verloren haben. Die Primer wurden so gewählt, dass der Aufwärtsprimer im *HXT7*-Promotor und der Abwärtsprimer in der rDNA bindet. Als Kontrolle diente ein Stamm, indem die integrierte Epimerase zuvor mit PCR nachgewiesen werden konnte, sowie ein Stamm, der in der Lage war, nach Transformation mit den Plasmiden p423H7araABs^{re}, p424H7araB^{re} und pHL125^{re} auf L-Arabinose zu wachsen (1. Ansatz: Denaturierung für 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 55°C; DNA-Synthese für 1 min bei 72°C; 25 Zyklen; Primer: seqp426HXT7, rDNA2; 2. Ansatz: Denaturierung für 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 55°C; DNA-Synthese für 0,5 min bei 72°C; 25 Zyklen; Primer: seqp426HXT7, Epi1; seqCYC1, Epi2).

In den PCR-Ansätzen konnte nur in dem Stamm mit zuvor schon nachgewiesenem Epimerase-Gen die Integration gezeigt werden. In dem Stamm, welcher unter nicht selektiven Bedingungen über mehrere Generationen angezogen wurde und in dem *kanMX* entfernt war, konnte das Epimerase-Gen nicht mehr nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich, dass in dem Stamm, welcher nach Transformation mit den Plasmiden p423H7araABs^{re}, p424H7araB^{re} und pHL125^{re} auf L-Arabinose wachsen konnte, das Epimerase-Gen auch nicht mehr nachweisbar war.

Es wurde in 12 Kolonien, in denen *kanMX* entfernt war und die Plasmide mit den Genen des Arabinose-Stoffwechsels nicht mehr vorhanden waren, versucht, das reisolierete Isomerase-Gen zu integrieren. Der Ansatz zur Integration von *araA* war der gleiche Ansatz wie der bei Integration des Epimerase-Gens. Um auch in diesem Ansatz eine Rekombination zwischen den identischen Promotor- und Terminatorsequenzen der Gene zu vermeiden, sollte das Gen *araA* in umgekehrter Orientierung in die rDNA integriert werden (Denaturierung für 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 55°C; DNA-Synthese für 2 min bei 72°C; 18 Zyklen; Primer zur Amplifikation von *kanMX*: kanP1-1Iso, kanhom1-2; Primer zur Amplifikation von *araA*: kanhom2Iso, rDNAP2-2). Primer wurden wieder so gewählt, dass *araA* und *kanMX* amplifiziert wurden und dass sie überlappende Überhänge besaßen, die eine homologe Rekombination zwischen *araA*

und *kanMX* gewährleisteten bzw. Homologien zur rDNA aufwiesen, um eine anschließende Integration des Fusionsprodukts zu ermöglichen. PCR-Bedingungen sowie Nachweis und Aufreinigung des PCR-Produkts wurden wie zuvor bei der Integration des Epimerase-Gens durchgeführt. Nach Transformation von *araA* und *kanMX* in die Stämme, die nur noch das integrierte Epimerase-Gen ohne das *kanMX*-Gen enthielten, wurden die Transformanten für 4 Stunden in YEPD-Flüssigmedium herangezogen und anschließend auf YEPDG418-Platten ausgestrichen. Mittels Kolonie-PCR wurden 8 einzeln ausgestrichene Kolonien auf Integration des Fusionsprodukts *araA* mit *kanMX* in den rDNA-Locus überprüft (Denaturierung für 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 55°C; DNA-Synthese für 2,5 min bei 72°C; 25 Zyklen; Primer: k3kanMX, rDNA2). Primer, die in *kanMX* und in der rDNA binden, konnten das gewünschte Fusionsprodukt in allen getesteten Transformanten nachweisen. Somit war es gelungen, auch das zweite Gen für den L-Arabinose Katabolismus erfolgreich zu integrieren.

Die Funktionalität von *araA* sollte auch hier durch L-Arabinose Wachstum nach Transformation mit den Plasmiden p424H7araB^{re} und pHL125^{re} getestet werden. Die Transformanten wurden auf synthetischen Minimalmediumsplatten mit 2% Glukose und Leucin und Histidin herangezogen. Die wachsenden Kolonien wurden auf synthetischen Minimalmediumsplatten mit 2% Arabinose und Leucin und Histidin ausgestrichen. Bei einem der 12 Ansätze waren kleine Kolonien auf der Platte erkennbar, die in synthetisches Minimalflüssigmedium mit 2% Arabinose und Leucin sowie Histidin angeimpft wurden. Der Stamm zeigte gutes Wachstum auf L-Arabinose. Bei dem Versuch in diesem Stamm das integrierte *araD*-Gen mittels PCR nachzuweisen, konnte kein Produkt erhalten werden (PCR-Ansatz siehe oben). Das integrierte Isomerase-Gen konnte über PCR nachgewiesen werden (Denaturierung für 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 55°C; DNA-Synthese für 3 min bei 72°C; 25 Zyklen; Primer: seqp426HXT7, rDNA2).

Der Selektionsmarker *kanMX* musste für die weitere Integration des Gens *araB* wieder aus dem Stamm entfernt werden. Es wurde nach der gleichen Methode wie zuvor vorgegangen. Der einzige Unterschied war, dass nach Transformation mit dem Plasmid pSH47 nicht auf synthetischem Medium mit 2% Galaktose ausgestrichen wurde, sondern auf Maltose-haltigen Platten. Die Cre-Rekombinase, welche unter der Kontrolle des *GAL2*-Promotors steht, sollte nur leicht induziert werden, da bereits *loxP*-Sequenzen im rDNA-Bereich enthalten waren. Auf diese Weise sollte ein mehrfaches

Rekombinieren zwischen den verschiedenen *loxP*-Sequenzen vermieden werden. Die auf den Galaktose-haltigen Platten wachsenden Kolonien wurden zur Kontrolle auf YEPDG418-Platten überstempelt. Es wurden Transformanten gefunden, die keine Genitcinresistenz mehr zeigten.

Die anschließende Entfernung des pSH47-Plasmids sowie die darauf folgende Integration des letzten essentiellen Arabinose-Stoffwechsel-Gens *araB* in den bereits konstruierten Stamm konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

3.4 Konstruktion eines L-Arabinose und D-Xylose verwertenden Hefestammes

Pflanzliche Biomasse besteht neben den Hexosen Glukose, Galaktose und Mannose zu einem hohen Anteil aus den Pentosen D-Xylose und L-Arabinose. Für einen verbesserten, kommerziellen Einsatz von Hefe in der Bioethanolproduktion wäre ein Stamm von großem Interesse, der neben seinem natürlichen Substratspektrum auch die Pentosen D-Xylose und L-Arabinose effizient zu Ethanol fermentieren könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein *S. cerevisiae* Stamm konstruiert werden, der in der Lage ist L-Arabinose und D-Xylose zu fermentieren (Becker und Boles 2003). Hierfür sollten in den Hefestamm JBY25 die Gene eines D-Xylose-Stoffwechsel (Eliasson *et al.*, 2000) sowie die Gene eines Arabinose-Stoffwechsel (Becker und Boles, 2003) eingeführt werden.

3.4.1 Klonierung der Gene für die D-Xylose-Fermentation in den *S. cerevisiae* Stamm BWY01

In der Arbeit von Eliasson (2000) wurde der integrative Vektor YIpXR/XDH/XK konstruiert, der die Gene für die Enzyme Xylose-Reduktase XR (*XYL1* aus *P. stipitis*) und Xylitol-Dehydrogenase XDH (*XYL2* aus *P. stipitis*), die für eine Xyloseverwertung notwendig sind, und zusätzlich das Gen für die Xylulokinase XK (*XKS1* aus *S. cerevisiae*) unter der Kontrolle des *PGK1*-Promotors enthält. Über den *HIS3*-Locus kann der Vektor in das Genom integrieren. Der Vektor wurde mittels Restriktionskartierung überprüft. Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym *PstI*, welches im *HIS3*-Locus schneidet, linearisiert, im Agarosegel überprüft und in den Stamm BWY01A transformiert. Der Vektor kann über homologe Rekombination integrieren. Die Transformanten wurden auf histidinfreien Minimalmediumsplatten mit

2% Glukose herangezogen. Anschließend wurden die Transformanten auf synthetischem Komplettmedium mit 2% Xylose ausgestrichen. Als Negativkontrolle diente Stamm BWY01A ohne integratives Xylose-Plasmid, welcher auf den Xylosehaltigen Platten nur kleine Kolonien bildete. Der mit YIpXR/XDH/XK transformierte Stamm BWY01 hingegen zeigte gutes Wachstum auf Platte und bildete große Kolonien.

3.4.2 Umklonierung des reisolierten Isomerase Plasmids

Der *S. cerevisiae* Hefestamm BWY01A-4M ist ein auf Arabinose-Wachstum selektierter Stamm, der auf dem Ausgangsstamm JBY25-4M basiert (Becker und Boles, 2003). Er besitzt drei Aminosäure-Auxotrophien (*his3*, *trp1*, *leu2*) sowie eine Uracil-Auxotrophie (*ura3*), die zur Selektion auf Plasmide mit diesen Markergenen genutzt werden können. Um eine Co-Fermentation der beiden Pentosen L-Arabinose und D-Xylose zu erzielen, wurde in den Stamm BWY01 der Vektor YIpXR/XDH/XK chromosomal integriert (3.4.1). Dieser trägt zur Selektion das *HIS3*-Markergen. Für die Expression der Gene des L-Arabinose Katabolismus wurden vier Plasmide mit den Genen konstruiert, die für eine effiziente Arabinose-Verwertung nötig waren (Becker und Boles, 2003; Hamacher *et al.*, 2002). Da nur noch drei Auxotrophie-Marker in dem rekombinanten Hefestamm zur Verfügung standen, musste auf ein Plasmid verzichtet werden. In der Arbeit von Becker und Boles (2003) stellte sich heraus, dass die *GAL2*-Überexpression einen Vorteil für den L-Arabinose Katabolismus in Hefe bedeutete, aber nicht zwingend erforderlich war. Folglich konnte im Rahmen dieses Projekts auf die zusätzliche Expression des Gal2-Transporters verzichtet werden. Das Gen *araA*, welches sich auf dem Plasmid p423H7araABs^{re} befindet, sollte anstelle des *HIS3*-Markergens das *URA3*-Markergen erhalten. Das Gen für den Gal2-Transporter befindet sich auf dem Plasmid pHL125^{re} mit dem *URA3*-Markergen.

Durch Restriktion und anschließender Ligation sollte das *araA*-Gen in das Plasmid p426HXT7-6His eingefügt werden. Hierfür wurde das Plasmid p423H7araABs^{re} mit den Restriktionsenzymen *SacI/KpnI* geschnitten, welche direkt vor bzw. hinter der Promotor- bzw. Terminator-Sequenz des Gen-Fragments von *araA* schneiden. Der Vektor p426HXT7-6His wurde mit denselben Restriktionsenzymen linearisiert. Beide Ansätze wurden anschließend in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und die Banden mit den Fragmenten mit dem *araA*-Gen sowie dem linearisierten Vektor unter langwelligem UV-Licht (366nm) aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des "Qiaex II Gel Extraction Kit" (Qiagen) isoliert. Die Ligation der beiden DNA-

Fragmente erfolgte in einem Ansatz mit einem 5fachen molaren Überschuss an Fragment-DNA *araA* und 1U T4-Ligase für 1h bei 22°C. Die Ligase wurde bei 65°C für 10 min inaktiviert. Von dem Ansatz wurde 1µl in *E. coli* transformiert. Die *E. coli* Transformanten wurden auf LB-Medium mit Ampicillin ausplattiert. Aus mehreren der auf Platte erhaltenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert und über Restriktionskartierung überprüft. Bei der Restriktionskartierung wurde das Enzym *EcoRV* eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden zur Überprüfung des konstruierten Plasmids in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Es zeigte sich, dass keines der 40 überprüften Plasmidkonstrukte das umklonierte Isomerase-Gen enthielt.

Als alternativen Ansatz wurde versucht das *araA* Gen über homologe Rekombination umzuklonieren. Dazu wurde der Vektor p426HXT7-6HIS mit den Restriktionsenzymen *EcoRI/BamHI* geschnitten, in einem Agarosegel aufgetrennt und der linearisierte Vektor aus dem Gel geschnitten und mittels dem „Qiaex II Gel Extraction Kit“ (Qiagen) aufgereinigt. Das *araA*-Gen wurde in zwei getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert (Denaturierung für 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 56°C; DNA-Synthese für 2min bei 72°C; 16 Zyklen). Es wurden die Primer seqp426HXT7 und seqCYC1 zur Amplifikation des Gens verwendet, die im *HXT7*-Promotor bzw. im *CYC1*-Terminator binden. Hierdurch entstanden an den Enden der amplifizierten DNA-Sequenz homologe Bereiche zu Regionen im Vektor.

Das PCR-Produkt wurde zusammen mit dem *EcoRI/BamHI* geschnittenen p426HXT7-6His-Plasmid in den Stamm BWY01 transformiert. Das Plasmid wurde in dem Hefestamm über homologe Rekombination kloniert. Die Transformanten wurden auf synthetischen Komplettmediumsplatten ohne Uracil mit 2% Glukose herangezogen. Aus mehreren Transformanten wurden die Plasmide isoliert, in *E. coli* transformiert und auf LB-Medium mit Ampicillin ausplattiert. Nach der Isolierung der Plasmide aus *E. coli* Kolonien wurden diese mittels PCR überprüft (Denaturierung für 30sec bei 95°C; Annealing für 30sec bei 55°C; DNA-Synthese für 2 min bei 72°C; 25 Zyklen; Primer: rDNAP2-1, rDNAP2-2). Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Es zeigte sich, dass die überprüften Plasmide das *araA*-Gen enthielten. Das konstruierte Plasmid mit dem *URA3*-Selektionsmarker und dem *araA* Gen wurde p423H7araAbsura bezeichnet und für die Transformation des rekombinanten Hefestammes BWY01A mit Plasmid YIpXR/XDH/XK weiter verwendet.

3.4.3 Transformation mit den 3 Arabinose-Plasmiden

Der Stamm BWY01 mit dem integrierten Plasmid YIpXR/XDH/XK wurde mit den drei Plasmiden p423H7araABsura, p424H7araB^{re} und p425H7araD^{re} transformiert, um die zusätzliche Fähigkeit zur L-Arabinose Verwertung einzuführen. Die Transformanten wurden auf synthetischen Minimalmediumsplatten mit 2% Glukose herangezogen. Die erhaltenen Transformanten sollten nun in der Lage sein, L-Arabinose sowie D-Xylose zu verwerten. Dies sollte in folgenden Tests bestätigt werden. Der neu konstruierte Stamm wurde BWY2 benannt.

3.4.4 Untersuchung des Wachstumsverhaltens des *S. cerevisiae* Stammes BWY2 auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Wachstumsverhalten auf Arabinose und auf Xylose-haltigen Mediumsplatten:

Zur Untersuchung, ob der Stamm BWY2 in der Lage ist, die Pentosezucker D-Xylose und L-Arabinose mittels der beiden neu eingeführten Stoffwechselwege zu verwerten, wurden mehrere Transformanten (3.4.3) auf synthetischen Minimalmediumsplatten mit entweder 2% L-Xylose oder 2% L-Arabinose ausgestrichen.

Alle Kolonien von BWY2 zeigten Wachstum auf sowohl den Minimalmediumsplatten mit 2% D-Xylose wie auch auf den Platten mit 2% L-Arabinose. Auffallend war, dass auf Xylose-haltigen Platten die Kolonien in den ersten Tagen schneller heranwuchsen, nach innerhalb 5 Tagen jedoch die Transformanten auf den Arabinose-Platten größere Kolonien ausgebildet hatten. Der Test zeigte, dass die Gene des L-Arabinose Katabolismus sowie die Gene des D-Xylose Katabolismus erfolgreich transformiert wurden und beide Pentosezucker von dem neu konstruierten Stamm verwertet werden konnten.

Wachstumsverhalten in Arabinose- und/oder Xylose-haltigen Flüssigkulturen:

Zur weiteren Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurden zwei unabhängige Transformanten von BWY2 einer flüssigen Stammkultur in 5ml synthetischem Flüssigmedium mit 2% L-Arabinose und 2% D-Xylose über 2 Tage bei 30°C herangezogen. Die Kulturen wurden in der späten exponentiellen Phase in 50ml synthetischem Flüssigmedium mit 2% L-Arabinose und 2% D-Xylose mit einer

Anfangs- OD_{600nm} von ca. 0,2 angeimpft. Das Wachstumsverhalten wurde unter aeroben Bedingungen über mehrere Tage verfolgt.

Die Wachstumsraten wurden durch Messung der optischen Dichte bei 600nm bestimmt.

In den Wachstumskurven der Abbildung 6 zeigten die beiden unabhängigen Transformanten von BWY2 erwartungsgemäß identische Wachstumsraten. In der Untersuchung der beiden Transformanten konnte gezeigt werden, dass BWY2 auf L-Arabinose- und D-Xylose- haltigem Flüssigmedium in der Lage ist, zu wachsen. Die Verdoppelungszeit lag bei ca. 8 Stunden und war somit identisch zu der Verdoppelungszeit des Stammes JBY25-4M in reinem L-Arabinose-Medium (Becker und Boles, 2003).

Mit Hilfe der Wachstumskurve konnte festgestellt werden, dass mindestens einer der beiden Pentosezucker von BWY2 verwertet werden konnte. Ob beide Zucker und wenn in welchen Anteilen sie umgesetzt wurden, konnte mit diesem Test nicht gezeigt werden. Zur genaueren Analyse des Zuckerverbrauchs wurden HPLC-Messungen durchgeführt.

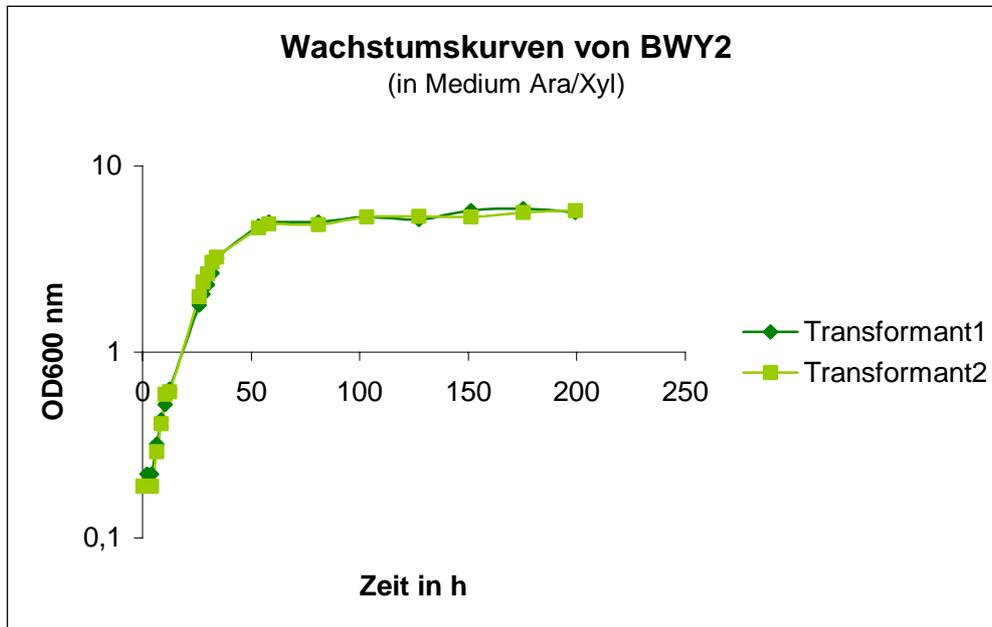


Abb.6: Wachstumskurve des *S. cerevisiae* Stammes BWY2, in synthetischem Minimalmedium mit 2% D-Xylose und 2% L-Arabinose bei pH 5. Die beiden unabhängigen Transformanten von BWY2 wurden in synthetischem Minimalflüssigmedium mit 2% D-Xylose und 2% L-Arabinose herangezogen, bei Erreichen der späten exponentiellen Phase in das selbe Medium mit einer Anfangs- OD_{600nm} von ca. 0,2 angeimpft. Die Wachstumsraten wurden alle 2 bis 24 Stunden durch Messung der optischen Dichte bei 600nm bestimmt.

HPLC-Messung zum Co-Verbrauch von D-Xylose und L-Arabinose

Es konnte in Wachstumstests gezeigt werden, dass der Stamm BWY2 in der Lage ist, in Flüssigmedium mit den beiden Kohlenstoffquellen L-Arabinose und D-Xylose zu wachsen. In welchem Maß und zu welchen Anteilen die Umsetzung der Pentosezucker stattfand, sollte durch HPLC-Analyse festgestellt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, in wieweit die Zucker zu Ethanol fermentiert wurden.

Es wurden Proben zur HPLC-Analyse von den in Abbildung 6 gezeigten Wachstumskurven parallel zur Messung der optischen Dichte abgenommen. Um zu vermeiden, dass sich möglicherweise entstandenes Ethanol bei der Probenabnahme verflüchtigt, wurden die Proben nach Entnahme sofort kühl gelagert und bei 4°C für die weitere Vermessung vorbereitet.

Die Ergebnisse der HPLC-Analyse zeigten deutlich den Unterschied in der Verwertung der beiden Pentosezucker. BWY2 schien nur in der Lage zu sein, L-Arabinose zu verwerten. Der D-Xylose Gehalt im Medium war nach über 7 Tagen unverändert. Auffallend war, dass auch die L-Arabinose nicht vollständig umgesetzt werden konnte. Nach Verbrauch der Hälfte sich im Medium befindende L-Arabinose blieb ihre Menge konstant. Folglich wurde keine weitere L-Arabinose verbraucht.

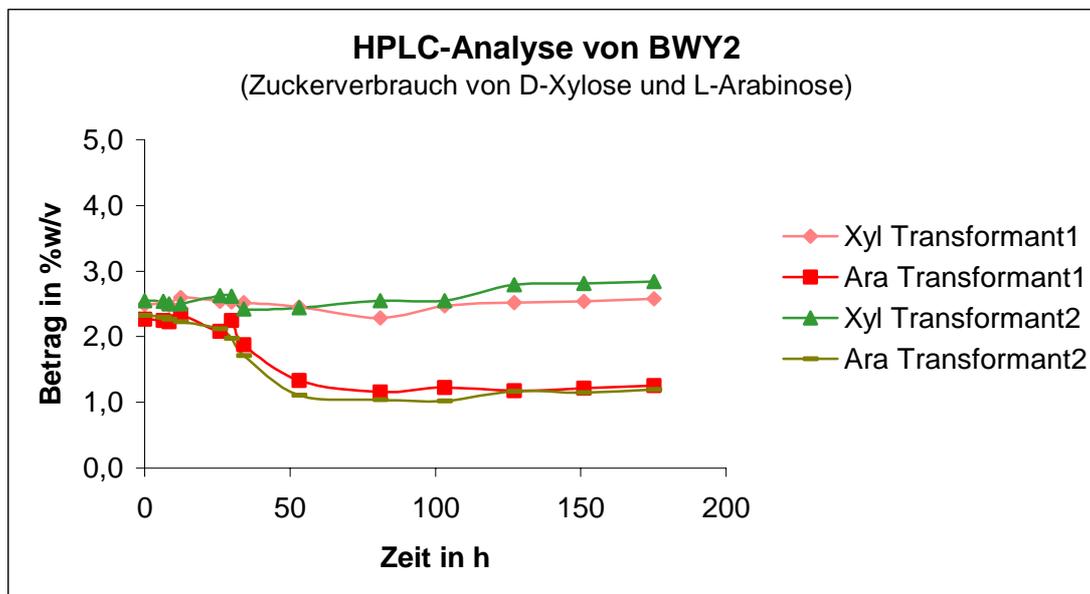


Abb. 6: HPLC-Messung zum Co-Verbrauch der Pentosezucker D-Xylose und L-Arabinose im *S. cerevisiae* Stamm BWY2, in synthetischem Flüssigminimalmedium mit 2% D-Xylose und 2% L-Arabinose bei pH 5. Die beiden unabhängigen Transformanten von BWY2 wurden in synthetischem Minimalflüssigmedium mit 2% D-Xylose und 2% L-Arabinose herangezogen, bei Erreichen der späten exponentiellen Phase in das selbe Medium mit einer Anfangs-OD_{600nm} von ca. 0,2 umgeimpft. Die HPLC-Proben wurden alle 2 bis 24 Stunden parallel zur Messung der optischen Dichte bei 600nm abgenommen.

Ethanol konnte bei der Messung nicht nachgewiesen werden. Signifikante Ethanolwerte waren bei dem Ansatz auch nicht zu erwarten, da der Versuch unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurde.

Bei Vergleich der optischen Dichte der BWY2 Kultur und dem Zuckerverbrauch im Medium stellte sich heraus, dass die exponentielle Wachstumsphase mit dem L-Arabinose Verbrauch endete.

Zusätzlich zum Test des Co-Verbrauchs von L-Arabinose und D-Xylose sollte der neue Stamm BWY2 auf Wachstum auf den einzelnen Pentosezuckern in Flüssigkulturen getestet werden. Hierfür wurde der Stamm BWY2 in Flüssigmedium mit 2% L-Arabinose vorgezogen und in Flüssigmedium mit 2% L-Arabinose oder 2% D-Xylose umgeimpft. Die Wachstumsraten wurden durch Messung der optischen Dichte bei 600nm bestimmt. Aus der Wachstumskurve wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 32 Stunden neben der photometrischen Messung zusätzlich Proben entnommen, um den Zuckergehalt mittels HPLC-Analyse zu bestimmen.

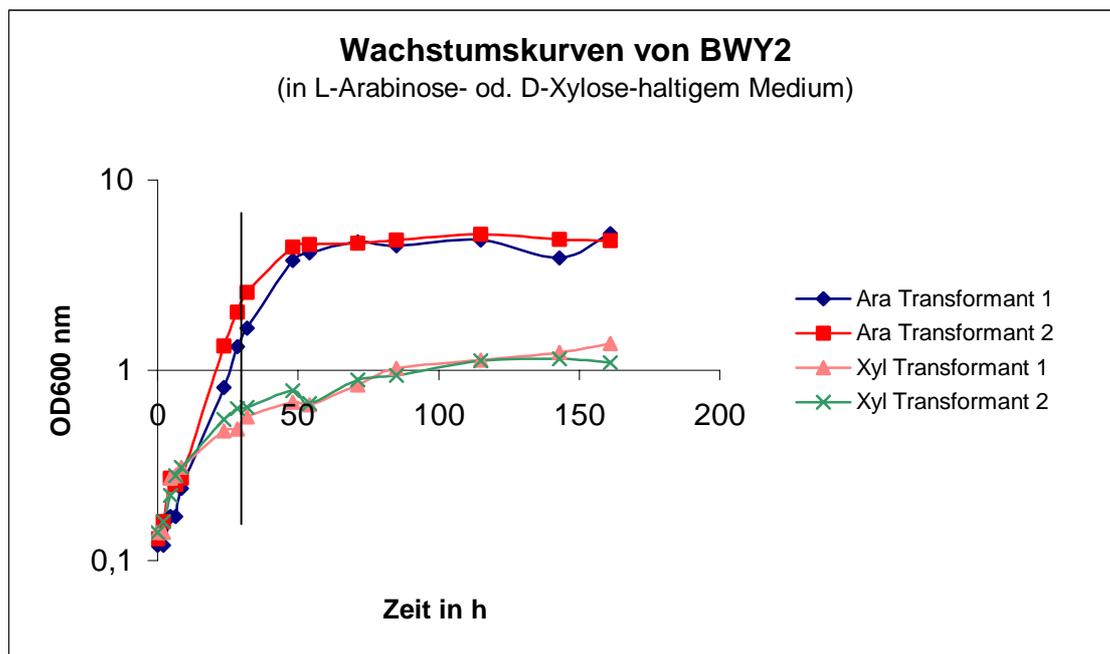


Abb.7: Wachstumskurve des *S. cerevisiae* Stammes BWY2, in synthetischem Minimalmedium mit entweder 2% D-Xylose oder 2% L-Arabinose bei pH 5. Die beiden Stämme von BWY2 wurden in synthetischem Flüssigmedium mit 2% L-Arabinose herangezogen, bei Erreichen der späten exponentiellen Phase in synthetisches Minimalmedium mit entweder 2% D-Xylose oder 2% L-Arabinose mit einer Anfangs-OD_{600nm} von ca. 0,15 umgeimpft. Die Wachstumsraten wurden alle 2 bis 24 Stunden durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt; schwarze durchgezogene Linie markiert den zweiten Zeitpunkt der Probenabnahme für die HPLC-Messung.

Bei den in Abbildung 7 gezeigten Wachstumskurven konnte beobachtet werden, dass der Stamm BWY2 nur in der Lage war auf Flüssigmedium in L-Arabinose zu wachsen. Die Verdoppelungszeit betrug hier ungefähr 8 Stunden. Es zeigte sich, dass in Xylosehaltigem Medium nur die ersten 20 Stunden Wachstum möglich war. Wahrscheinlich konnte D-Xylose überhaupt nicht metabolisiert werden und das leichte Wachstum wurde nur durch die vorhandenen Energiereserven in den Zellen temporär möglich.

Durch HPLC-Messung konnte bestätigt werden, dass BWY2 nicht in der Lage war D-Xylose in Flüssigmedium umzusetzen. Die Hälfte sich im Medium befindende L-Arabinose konnte, wie schon zuvor gezeigt, verbraucht werden.

Analyse zur Inhibition der Xyloseverwertung in Flüssigmedium von BWY2

Wie aus den Wachstumskurven und aus der Messung des Zuckerverbrauchs hervorgeht, konnte der Stamm BWY2 in Xylose-haltigen Flüssigkulturen keine D-Xylose verwerten. In den Wachstumstests auf D-Xylose haltigen Mediumsplatten zeigte BWY2 jedoch gutes Wachstum, was die Fähigkeit zur D-Xylose Verstoffwechslung beweist. Obwohl der Stamm BWY2 folglich die Gene für den D-Xylose Katabolismus besitzt, konnte in den durchgeführten Wachstumstests in Flüssigmedium die enthaltene D-Xylose nicht verwertet werden.

Bei den durchgeführten Tests zum Wachstumsverhalten von BWY2 in Flüssigkulturen wurde D-Xylose entweder in gleicher Konzentration wie L-Arabinose angeboten, oder das Xylose-Medium enthielt Spuren von L-Arabinose. Ausschließlich D-Xylosehaltiges Medium wurde in den bisher durchgeführten Wachstumstests nicht verwendet, da die Vorkulturen in Medium bestehend aus D-Xylose und L-Arabinose angezogen wurden und dieses direkt zum Animpfen (ohne vorherigen Waschschrift) eingesetzt wurden.

Bevor Hefe einen Zucker metabolisieren kann, muss er über die Plasmamembran in die Zelle gelangen. Folglich übt in *S. cerevisiae* der Transport einen entscheidenden Einfluss auf die Verstoffwechslung von Zucker, in diesem Fall der beiden Pentosezucker, aus. Die Vermutung bestand darin, dass es zu einer Hemmung der Aufnahme der Xylose durch Arabinose an den Transportproteinen kam, da beide Zucker über die Hxt-Transporter in die Zelle aufgenommen werden.

In dem Versuch sollte untersucht werden, ob die Xyloseaufnahme in BWY2 durch das Vorhandensein von Arabinose gehemmt wird.

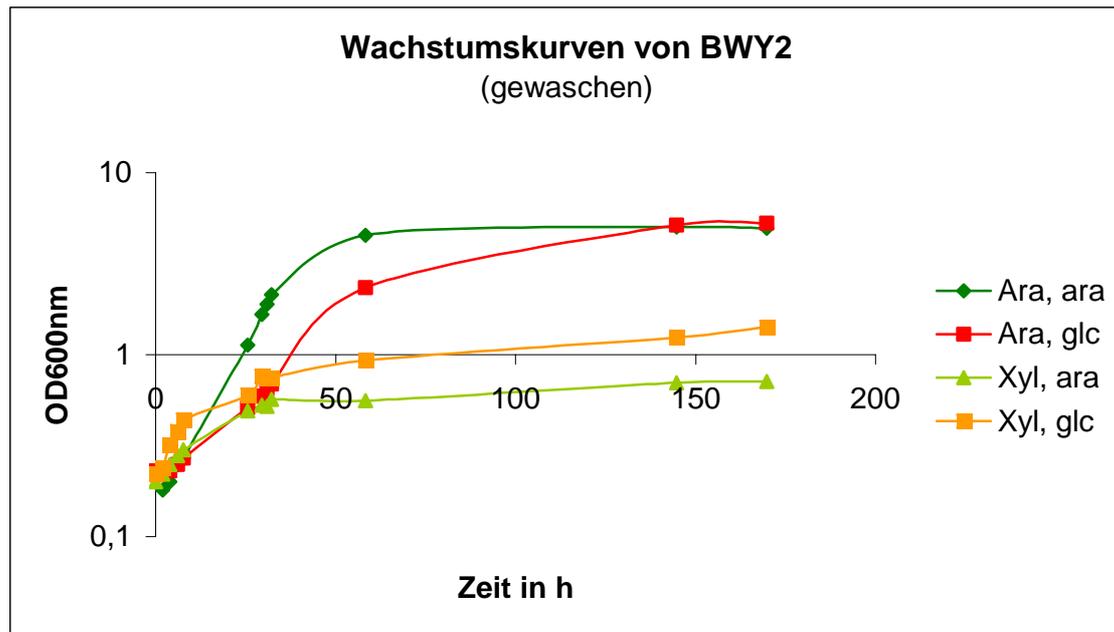


Abb.8: Wachstumskurve des *S. cerevisiae* Stammes BWY2, in synthetischem Minimalmedium mit 2% D-Xylose oder 2% L-Arabinose bei pH 5. Der Stamm BWY2 wurden in synthetischem Minimalflüssigmedium mit entweder 2% Glukose (glc) oder 2% L-Arabinose (ara) herangezogen, zwei Mal gewaschen und in synthetisches Minimalflüssigmedium mit 2% D-Xylose (Xyl) oder 2% L-Arabinose (Ara) mit einer Anfangs-OD_{600nm} von ca. 0,2 umgeimpft. Die Wachstumsraten wurden alle 2 bis 24 Stunden durch Messung der optischen Dichte bei 600nm bestimmt.

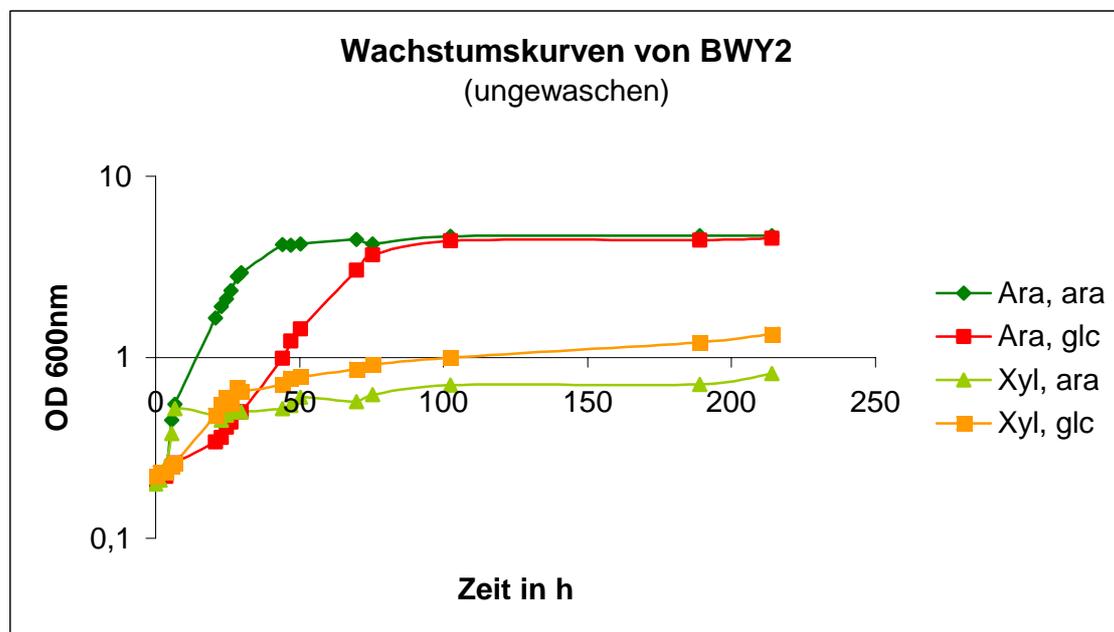


Abb.9: Wachstumskurve des *S. cerevisiae* Stammes BWY2, in synthetischem Minimalmedium mit 2% D-Xylose oder 2% L-Arabinose bei pH 5. Der Stamm BWY2 wurden in synthetischem Minimalflüssigmedium mit entweder 2% Glukose (glc) oder 2% L-Arabinose (ara) herangezogen, nicht gewaschen und in synthetisches Minimalflüssigmedium mit 2% D-Xylose (Xyl) oder 2% L-Arabinose (Ara) mit einer Anfangs-OD_{600nm} von ca. 0,2 umgeimpft. Die Wachstumsraten wurden alle 2 bis 24 Stunden durch Messung der optischen Dichte bei 600nm bestimmt.

Es wurden parallel zwei Ansätze mit Wachstumskurven aufgenommen, in denen der Stamm BWY2 in entweder Flüssigmedium mit 2% Glukose oder Flüssigmedium mit 2% Arabinose angezogen wurde. Mit jeder der Vorkulturen wurde eine Wachstumskurve mit 2% L-Arabinose-haltigem oder mit 2% D-Xylose-haltigem Flüssigmedium angeimpft. Bei dem ersten Ansatz wurden die Vorkulturen vor dem Umimpfen zwei Mal gewaschen, bei dem zweiten Ansatz dienten die Vorkulturen direkt als Inokulum. Folglich waren im zweiten Ansatz noch Reste von L-Arabinose enthalten. Die Wachstumsraten wurden durch Messung der optischen Dichte bei 600nm bestimmt.

Bei dem Versuch zeigte sich, dass kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von L-Arabinose und dem blockierten Wachstum von BWY2 in D-Xylose-haltigem Medium bestand. In reinem D-Xylose-Medium wurde die Xylose-Verwertung genauso inhibiert wie in Medium mit zusätzlich enthaltener Arabinose. Dies lässt darauf schließen, dass die D-Xylose-Aufnahme nicht den entscheidenden, limitierenden Faktor bei dem Co-Verbrauch der beiden Pentosezucker darstellt.

4 DISKUSSION

Die Hefe *S. cerevisiae* ist ein kommerziell stark genutzter Mikroorganismus. Zur Herstellung von Bioalkohol aus pflanzlicher Biomasse bietet sie sich durch ihre im Vergleich zu anderen Hefen höheren Fermentationsraten und eine höhere Ethanoltoleranz hervorragend an. Ein entscheidender Nachteil dieser Hefe ist jedoch ihr beschränktes Substratspektrum. *S. cerevisiae* ist nicht in der Lage, die Pentosezucker D-Xylose und L-Arabinose, welche einen signifikanten Anteil der zu vergärenden Zucker in pflanzlicher Biomasse ausmachen (McMillan und Boynton, 1994), zu verwerten (Barnett, 1976). In Arbeiten von Eliasson *et al.* (2000) wurden rekombinante *S. cerevisiae* Stämme konstruiert, in denen die Gene *XYL1* (kodiert die Xylose-Reduktase) und *XYL2* (kodiert die Xylitol-Dehydrogenase) aus *P. stipitis* und das *S. cerevisiae*-eigene Gen *XKSI* (kodiert die Xylulokinase) unter der Kontrolle des PGK1-Promotors in den chromosomalen *HIS3*-Locus integriert wurden. Eine zusätzliche Expression eines Transporter-Gens für die Xylose Aufnahme war nicht notwendig, da gezeigt werden konnte, dass *S. cerevisiae* natürlicherweise Xylose aufnehmen kann (Hsiao *et al.*, 1982; Batt *et al.*, 1986). Die rekombinanten Hefestämme waren in der Lage D-Xylose zu fermentieren.

Da neben Xylose auch ein signifikanter Teil der pflanzlichen Biomasse aus Arabinose besteht, gab es viele Bemühungen, Arabinose durch *S. cerevisiae* zu fermentieren. Erfolgreich waren die Arbeiten von Becker und Boles (2003). Hier konnte ein Stamm konstruiert werden, der einen bakteriellen Stoffwechselweg für den L-Arabinose Katabolismus exprimiert. Der Stoffwechselweg bestand aus der L-Arabinose Isomerase von *B. subtilis* und der L-Ribulokinase und L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase von *E. coli*. Zusätzlich wurde für den L-Arabinose Transport die Hefe-eigene Galaktose-Permease überexprimiert. Die vier Gene wurden auf jeweils einem Plasmid in Hefe transformiert. Eine L-Arabinose Umsetzung war jedoch erst durch eine erniedrigte L-Ribulokinase Aktivität sowie einer gesteigerten Transaldolase-Aktivität möglich.

Während folglich rekombinante *S. cerevisiae* Stämme konstruiert wurden, die entweder in der Lage waren D-Xylose oder L-Arabinose zu fermentieren, existierte noch kein Stamm, der beide Pentosezucker verwerten konnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den bereits konstruierten Pentose-vergärenden Hefestamm von Becker und Boles (2003) unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen auf L-Arabinose Wachstum zu optimieren und diesen molekulargenetisch und

physiologisch zu charakterisieren. Des Weiteren sollten die essentiellen Gene eines bakteriellen Stoffwechselweges für den L-Arabinose Katabolismus stabil in das Genom des Hefestammes integriert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Hefestamm konstruiert werden, der in der Lage ist, L-Arabinose und D-Xylose gleichzeitig zu fermentieren. Hierfür wurde ein Xylose-verwertender Stoffwechselweg heterolog in dem bereits konstruierten Stamm JBY25 von Becker und Boles (2003) exprimiert.

4.1 Zufällige Mutagenese durch Selektion

Der L-Arabinose verwertende Stamm JBY25-4M konnte durch 17 Wochen lange Selektion unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen auf L-Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle auf L-Arabinose-Wachstum hin verbessert werden. Der optimierte Stamm wurde BWY01A-4M genannt. Beispiele in der Literatur für eine erfolgreiche Selektion ohne die Verwendung mutagener Substanzen bieten Arbeiten von Brown und Oliver (1982), die durch kontinuierliche Selektion im Chemostat Ethanol-tolerante Hefe-Mutanten isolieren konnten. Der in dieser Arbeit verwendete Ausgangsstamm JBY25-4M, welcher in der Lage ist L-Arabinose zu Ethanol zu fermentieren, wurde ebenfalls durch Selektion erhalten (Becker und Boles, 2003).

Der Stamm BWY01A-4M zeigte in Wachstumstests auf L-Arabinose unter aeroben sowie Sauerstoff-limitierten Bedingungen eine deutlich verbesserte Wachstumsrate im Vergleich zu seinem Ausgangsstamm JBY25-4M. Der optimierte Stamm wuchs schneller und zu einer höheren End-Zelldichte.

Da der Stamm unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen selektiert wurde, sind die Unterschiede in den Wachstumsraten der beiden Stämme unter limitierter Sauerstoff-Zufuhr deutlicher. JBY25-4M kann in einem Zeitraum von über 150 h kaum wachsen. BWY01A-4M ist trotz Sauerstofflimitierung zu Wachstum in der Lage. Der neu selektierte Stamm lässt auf eine gesteigerte Ethanolproduktion vermuten.

S. cerevisiae zeichnet sich dadurch aus, dass sie bei ausreichend hohen Zuckerkonzentrationen im Medium auch unter Anwesenheit von Sauerstoff die Tendenz zur alkoholischen Gärung besitzt (Petrik *et al.*, 1983; Käppeli, 1986; van Dijken *et al.*, 1986). In dieser Arbeit wurde der Verbrauch von Arabinose in Wachstumstests unter aeroben Bedingungen durch HPLC-Messungen bestimmt (Daten nicht gezeigt). Unter aeroben Wachstumsbedingungen stellte sich heraus, dass sowohl der Stamm JBY25-4M als auch der optimierte Stamm BWY01A-4M nicht in der Lage waren, Arabinose zu Ethanol umzusetzen. Im Gegensatz zu Glukose wird Arabinose folglich auch bei

Vorhandensein in hohen Konzentrationen unter aeroben Bedingungen oxidativ abgebaut. Zur Produktion von Ethanol durch die rekombinanten Hefestämme müssten Sauerstoff-limitierte Bedingungen gewählt werden. Eine Steigerung der Ethanolausbeute bei Arabinose-Verwertung könnte wahrscheinlich durch Blockierung der Atmungskette erlangt werden. Wie in Arbeiten von Hamacher (2001) gezeigt werden konnte, wurde durch Zugabe von Antimycin A die Atmungskette blockiert und der eingesetzte rekombinante Hefestamm zeigte bei Xylose-Verwertung eine höhere Ethanolausbeute.

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass der selektierte Hefestamm verbessertes Wachstum auf L-Arabinose aufweist. Dies wurde verursacht durch Selektion auf spontane Mutationen im Genom sowohl in den Plasmiden, welche zu einer Verbesserung der L-Arabinose-Verwertung führen. Es konnte durch Tests gezeigt werden, dass das verbesserte Wachstum auf L-Arabinose durch Veränderungen in den transformierten Plasmiden wie auch durch genomische Mutationen verursacht wurde. Die genomischen Mutationen wurden noch nicht näher untersucht. Bei der Analyse der reisolierten Plasmide aus BWY01A-4M zeigten sich erhebliche Veränderungen innerhalb der Plasmide auf. Zwei der reisolierten Plasmide (benannt p423H7verIso1 und p423H7verIso2) aus BWY01A-4M fielen bei der Restriktionskartierung durch ihre starken Veränderungen im Bandenmuster im Agarosegel auf. Die beiden Plasmide wurden in Tests näher untersucht. Bei der Analyse der vorhandenen Markergene zeigte sich, dass Plasmid p423H7verIso1 die Markergene *TRP1* und *URA3* enthielt, dass Plasmid p423H7verIso2 zusätzlich zu den beiden genannten Markergenen noch das Markergen *HIS3* enthielt. Verwunderlich war, dass das Plasmid p425H7araD^{re} mit dem Markergen *LEU2* nicht in seiner ursprünglichen Form in dem Stamm nachgewiesen werden konnte, obwohl *LEU2* auch nicht in den beiden neuen Plasmiden enthalten war. Die anderen unveränderten Plasmide p423H7araABs^{re}, p424H7araB^{re} und pHL125^{re} konnten nur selten aus BWY01A-4M reisoliert werden.

Bei Tests auf Vorhandensein der Arabinose-Gene auf den neuen Plasmiden stellte sich heraus, dass auf beiden Plasmiden das Gen *araA* vertreten war und in p423H7verIso2 zusätzlich das Gen *araB* nachgewiesen werden konnte. Es konnte somit gezeigt werden, dass Plasmidteile mit einander rekombiniert waren und somit Plasmide mit neuen Kombinationen aus Arabinose-Stoffwechsel-Genen sowie neuen Markergen-Kombinationen entstanden waren.

Die Gene auf den Plasmiden wurden auf ihre Funktionalität hin untersucht, nicht auf Veränderungen in ihrer Sequenz oder Änderungen in der Aktivität ihrer Genprodukte. Zusätzlich konnte eine Abschätzung des Zahlenverhältnisses der Plasmide zueinander ermittelt werden. Aus den Ergebnissen ging hervor, dass fast ausschließlich nur noch die veränderten Plasmide aus dem neu selektierten Stamm nachgewiesen werden konnten, die das *araA*-Gen enthielten. Wie schon in der Arbeit von Becker und Boles (2003) vermutet wurde, spielt das ideale Verhältnis der Enzymaktivitäten zueinander eine entscheidende Rolle bei der effizienten L-Arabinose-Verwertung. Durch die Veränderung innerhalb der Plasmide, das heißt, durch den Wechsel der Markergene und der Gene des L-Arabinose Katabolismus, konnte somit ein verbessertes Verhältnis der Gene zueinander geschaffen werden. Markergene, die die Zelle in höherer/niedriger Kopienzahl vorliegen haben muss, verursachen nun nicht mehr, wie es bei dem ursprünglichen Plasmid der Fall gewesen wäre, dass das dazugehörige Gen des L-Arabinose Katabolismus auch stärker/schwächer vertreten sein muss. So wurde mit der Plasmidveränderung eine höhere Variabilität in der Möglichkeit des Zahlenverhältnisses der Arabinose-Gene zueinander geschaffen. Die Arabinose-Gene könnten somit in einem höheren bzw. niedrigeren Zahlenverhältnis zueinander vorliegen. Zusätzlich kann sich das Expressionsniveau der Gene verändert haben und einen positiven Effekt auf die L-Arabinose-Metabolisierung haben.

4.2 Stabile Expression der Gene des L-Arabinose Katabolismus

In dieser Arbeit ist es gelungen, die Gene *araD* und *araA*, zwei von den insgesamt drei für die L-Arabinose Metabolisierung essentiellen Gene (Becker und Boles, 2003), erfolgreich in den rDNA-Locus von dem Hefestamm JBY25 zu integrieren.

Bei der schrittweisen Integration der Arabinose-Stoffwechsel-Gene zeigte sich, dass die Höhe der Enzymaktivität von AraA wahrscheinlich der entscheidende Faktor bei der L-Arabinose Verwertung ist.

Um die erfolgreiche Integration der Arabinose-Stoffwechsel-Gene nachzuweisen, wurden in dem Versuch Wachstumstests durchgeführt. Nachdem die Integration der Gene mittels PCR in den einzelnen Kolonien gezeigt werden konnte, wurden diese mit den weiteren Genen des Arabinose Katabolismus, welche sich auf Plasmiden befanden, transformiert. Da die erhaltenen Transformanten in der Lage waren, auf L-Arabinose-haltigem Medium zu wachsen, konnte davon ausgegangen werden, dass die integrierten Gene in funktioneller Form vorlagen. Die schrittweise Integration der Gene wurde über

Wachstumstests und nicht über Enzymtests überprüft. Enzymtests waren in diesem Fall aus mehreren Gründen ungeeignet. Zum einen waren für solche Tests die benötigten Substrate nicht alle kommerziell erhältlich oder die Substrate waren zu teuer. Zum anderen wurde in Arbeiten von Becker und Boles (2003) gezeigt, dass die Funktionalität der Arabinose-Stoffwechsel-Gene nicht notwendiger Weise von deren Expressionsstärke abhing.

Der Hefestamm, der die beiden Gene *araD* und *araA* integrativ enthält, wurde mit den Plasmiden p424H7araB^{re} und pHL125^{re}, welche die beiden weiteren Gene des L-Arabinose Katabolismus enthalten, transformiert. Der resultierende Stamm war in der Lage, gut auf L-Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle zu wachsen. In dem Stamm konnte durch PCR das Vorhandensein des integrierten Epimerase-Gens jedoch nicht mehr nachgewiesen werden. Das Vermögen auf L-Arabinose wachsen zu können, deutete aber darauf hin, dass ein funktionelles Epimerase-Gen immer noch im Genom enthalten sein musste.

Vermutet wurde, dass sich durch weitere Rekombinationen, welche im Laufe der Anzucht der Zellen stattgefunden haben können, das *araD*-Gen an einer anderen Stelle im Genom befindet. Somit könnte das bereits in den rDNA-Locus integrierte *araD*-Gen durch eine nicht planmäßige Integration, verursacht durch Sequenzhomologien zu einem weiteren Genort im Genom, seine Position gewechselt haben.

Es wäre auch möglich, dass das Epimerase-Gen noch an dem gleichen Genort in der rDNA integriert ist. Durch Mutationen hat sich aber die Sequenz von *araD* so weit verändert, dass die Primer, welche zum Nachweis eingesetzt wurden, nicht mehr binden konnten. Wenn dies der Fall war, müssen sich dramatische Veränderungen der Gensequenz ereignet haben, da für den Gen-Nachweis unterschiedliche Primer benutzt wurden, die an verschiedenen Stellen innerhalb des Gens binden sollten.

Es muss in Erwägung gezogen werden, dass die Integration von *araD* in den rDNA-Locus nicht stabil ist. Das Gen wäre somit unter nicht-selektiven Bedingungen, wie sie auch bei der Anzucht der Zellen herrschten, verloren gegangen. Es wurde schon mehrfach diskutiert, ob die Integration in den rDNA-Locus stabil ist. In Arbeiten von Lopes (1989) wird von einer mitotisch-stabilen Integration in den rDNA-Bereich berichtet. Unter nicht-selektiven Bedingungen bleiben integrierte Plasmide stabil erhalten (Lopes *et al.*, 1996). Erfolgreiche Anwendung der rDNA-Integration wurde auch von mehreren anderen Arbeitsgruppen in anderen Hefen berichtet (Bergkamp *et al.*, 1992; Wartmann *et al.*, 1998; Juretzek *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 2000). Konkrete

Beweise für die dauerhafte Stabilität der Integration in den rDNA-Locus bleiben in dieser Arbeit jedoch aus. Um zu überprüfen, ob sich die integrierten Gene noch im Genom des Stammes befinden, könnte ein Southern-Blot durchgeführt werden. Es müssten markierte Sonden gegen das Epimerase- sowie das Isomerase-Gen eingesetzt werden. Somit könnten die integrierten Gene nachgewiesen werden, auch wenn sie sich durch Rekombination an einer anderen Stelle im Genom befinden.

Unter der Annahme, dass das *araA*-Gen wegen Instabilität des rDNA-Locus nicht mehr genomisch enthalten ist, muss diskutiert werden, warum der oben erwähnte Stamm mit den transformierten Plasmiden p424H7araB^{re} und pHL125^{re} weiterhin zu L-Arabinose-Wachstum in der Lage ist. Eine Möglichkeit wäre, dass Genprodukte endogener Hefegene die weitere Umsetzung der entstandenen Intermediate übernehmen konnten. In Arbeiten von Becker und Boles (2003) wurden endogene Hefegene mit Ähnlichkeiten zu prokaryontischen Genen des L-Arabinose Katabolismus identifiziert. Bei Versuchen diese zu überexprimieren waren allerdings keine Enzymaktivitäten nachweisbar. Dies kann darin begründet sein, dass die Assays nicht sensitiv genug für eine eventuell sehr schwache Enzymaktivität waren, oder aber, dass es keine Aktivität gab. Die Homologien der gefundenen Gene in *S. cerevisiae* könnten nur Zufall sein, oder die Gene liegen in der Zelle nicht in funktioneller Form vor. Trotzdem wäre es denkbar, dass in diesem Fall durch spontane Mutation das Hefe-eigene Gen *Yjr024c*, welches Ähnlichkeit zu einer prokaryontischen L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase aufweist, die Funktion des *araD*-Gens übernehmen konnte. Folglich könnte das zuvor integrierte und nachgewiesene Epimerase-Gen aus *E. coli* verloren gegangen sein, ohne dass die Fähigkeit der L-Arabinose Metabolisierung zwangsläufig auch aufhört.

4.3 Faktoren der L-Arabinose und D-Xylose Verwertung in *S. cerevisiae*

Bei der Metabolisierung von Zucker in Hefe ist der erste entscheidende Faktor, wie schnell und effizient der Zucker in die Zelle transportiert werden kann. Für die beiden Pentosezucker Arabinose und Xylose konnten noch keine spezifischen Transporter nachgewiesen werden.

Die L-Arabinose-Verwertung in *S. cerevisiae* beginnt mit der Aufnahme des Zuckers über die endogen vorhandene Gal2-Permease sowie andere Hxt-Transporter. Über einen heterolog exprimierten bakteriellen Stoffwechselweg wird die Pentose bis zum D-Xylose-5-Phosphat metabolisiert und in den in Hefe vorhandenen Pentosephosphatweg eingeschleust und hier weiter umgesetzt. Der neu eingeführte Reaktionsweg enthält die

L-Arabinose Isomerase (*araA*), die L-Ribulokinase (*araB*) und die L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase (*araD*). In Arbeiten von Becker und Boles (2003) wurde gezeigt, dass die Metabolisierung der L-Arabinose über den eingeführten Stoffwechselweg nur stattfinden kann, wenn die Aktivität der L-Ribulokinase nicht zu hoch ist. Eine zu geringe Aktivität des Enzyms führt jedoch ebenfalls zum Erliegen der L-Arabinose Umsetzung. Einen weiteren entscheidenden Einfluss hat die erhöhte Aktivität der Transaldolase, einem Enzym des Pentosephosphatweges. Durch die Überexpression des Hefe-eigenen Galaktose-Permease Transporters konnte eine Wachstumssteigerung auf L-Arabinose erreicht werden (Becker und Boles, 2003). Das Verhältnis der Enzyme zueinander ist ein wichtiger Faktor bei der L-Arabinose Umsetzung und bewegt sich in einem engen Rahmen. In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass eine hohe L-Arabinose Isomerase Aktivität eine wichtige Rolle bei der effizienten Arabinose Metabolisierung spielt. Sowohl bei der Analyse des ursprünglichen Pentoseumsetzenden Stammes JBY24-4M als auch des optimierten Stammes BWY01A-4M hatte sich das Plasmid-Verhältnis eindeutig zu Plasmiden verschoben, die die L-Arabinose Isomerase enthielten.

Die Xylose-Verwertung beginnt in *S. cerevisiae* mit deren Aufnahme in die Zelle über die Hefe-eigenen Hexosetransporter Hxt4, Hxt5, Hxt7 und Gal2. Um D-Xylose umzusetzen, wurde ein eukaryontischer Stoffwechselweg eingeführt, in denen die heterologen Gene Xylose-Reduktase (*XYL1*) und Xylitol-Dehydrogenase (*XYL2*) und das Hefe-eigene Gen Xylulokinase (*XKS1*) unter der Kontrolle des *PGK1*-Promotors in den chromosomalen *HIS3*-Locus integriert wurden (Eliasson *et al.*, 2000). Folglich kommen die Gene, nicht wie bei dem eingeführten Arabinose-Stoffwechsel, immer im gleichen Zahlenverhältnis vor. Probleme treten hier unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen auf. Es kommt zu einem Ungleichgewicht in der Redoxbilanz (Bruinenberg *et al.*, 1983; Kötter und Ciriacy, 1993; van Dijken und Scheffers, 1986; Wahlbom *et al.*, 2001), verursacht durch den Verbrauch von NADPH durch die Xylose-Reduktase und durch die Bildung von NADH durch die Xylitol-Dehydrogenase. NADP, welches durch die Xylose-Reduktase entsteht, kann im Pentosephosphatweg bei der Umsetzung von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phospho-Glukonat und bei der weiteren Metabolisierung zu Ribulose-5-Phosphat wieder zu NADPH umgesetzt werden. Hingegen kann NAD nur in Anwesenheit von Sauerstoff über die Atmungskette regeneriert werden. Ist die Sauerstoffzufuhr nun limitiert, reichert sich NADH in der

Zelle an und Xylitol kann nicht zu Xylulose umgesetzt werden. Es kommt zu einer Akkumulation von Xylitol in der Zelle.

Um das Problem zu umgehen, wurde in Arbeiten von Kyper (2003) ein bakterieller Stoffwechselweg zur Xylose Metabolisierung eingeführt. Er enthält nur das Gen Xylose-Isomerase (*XI*) aus *Piromyces* sp. E2, welches Xylose in einer redoxneutralen Reaktion zu Xylulose umsetzt.

Beide Stoffwechselwege brauchen für eine effiziente Pentoseverwertung ihren jeweiligen Stammhintergrund, in dem der Stoffwechselweg etabliert wurde. Noch nicht genau identifizierte und charakterisierte Mutationen in den Stämmen tragen in Kombination mit den überexprimierten Genen zu einer verbesserten Umsetzung der Pentose bei.

4.4 Co-Verbrauch von Arabinose und Xylose

Die gleichzeitige Verwertung von L-Arabinose und D-Xylose in *S. cerevisiae* ist für industrielle Zwecke von großem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Hefestamm konstruiert werden, der in der Lage ist, auf L-Arabinose-haltigen sowie D-Xylose-haltigen Nähragarplatten zu wachsen. Es konnte jedoch keine parallele Metabolisierung der beiden Pentosezucker in Flüssigkulturen nachgewiesen werden. In HPLC-Messungen wurde gezeigt, dass der neu konstruierte Stamm BWY2 die in Flüssigmedium vorhandene D-Xylose nicht metabolisieren kann. Vermutet wurde, dass die Hemmung des Xylose-Verbrauchs durch deren verhinderte Aufnahme in die Zelle verursacht wurde. Da Arabinose und Xylose über ähnliche Transporter in die Zelle aufgenommen werden (Hamacher *et al.*, 2001; Becker und Boles, 2003) lag die Annahme nahe, dass es an den Transportproteinen zu einer Verdrängung der Xylose bei Anwesenheit von Arabinose im Medium kam. In weiteren Tests, in denen das Wachstum des Stammes BWY2 in Xylose-haltigem Medium ohne Arabinose und mit Arabinose verglichen wurde, konnte kein Unterschied im Wachstumsverhalten festgestellt werden. Folglich konnte gezeigt werden, dass der Grund für die Hemmung des D-Xyloseverbrauchs in Flüssigkulturen nicht in deren gehemmte Aufnahme verursacht durch L-Arabinose lag.

Die Wachstumstests auf Platten bestätigen jedoch die funktionelle Anwesenheit der benötigten Gene für die D-Xylose Umsetzung. Möglich wäre, dass eine 2% ige Xylose-Konzentration im Medium inhibierend auf die Zellen wirkt. Bei Plattenwachstum kann durch die Zellen verbrauchte Xylose nur langsam nachdiffundieren. Die

Xylosekonzentration um die Kolonien sinkt. Die geringere Xylosekonzentration entspricht vielleicht mehr dem Wachstumsoptimum des neuen Stammes. Eine Erklärung hierfür kann das aufgestellte mathematische Modell für den Glukose-Metabolismus von Teusink *et al.* (1998a) liefern. In diesem Modell wird postuliert, dass es von Vorteil oder sogar notwendig sein kann, dass ein Enzym, welches einen ATP verbrauchenden Schritt in einem Stoffwechselweg durchführt, eine geringere Umsetzung seines Substrats aufweist. Viele Stoffwechselwege beginnen in der Zelle mit einem ATP verbrauchenden Schritt um das Substrat zu aktivieren. Nachfolgende Reaktionsschritte produzieren zwar wieder einen Überschuss an ATP für die Zelle, doch kann der zuvor ATP verbrauchende Schritt zu schnell abgelaufen sein und der Rest des Metabolismus kommt zum Erliegen. Die Zelle hat ihr sämtliches verfügbares intrazelluläres ATP verbraucht, bevor neues ATP gebildet werden konnte. Denkbar wäre, dass in dem für die Xylose-Verwertung eingeführten Stoffwechselweg die Xylulokinase (XK) eine zu hohe Aktivität aufweist und Xylulose zu schnell zu Xylulose-5-Phosphat umgesetzt wird. Das Zucker-Phosphat kann in den weiteren Reaktionsschritten im Pentosephosphatweg nicht schnell genug metabolisiert werden. Es kann kein ATP synthetisiert werden und der Zellmetabolismus kommt zum Erliegen. Niedrige Xylosekonzentrationen im Medium würden den Ablauf der ersten Reaktionsschritte verlangsamen und folglich eine zu schnelle Phosphorylierung und somit einen zu schnellen ATP-Verbrauch unterbinden.

In Flüssigkulturen auf dem Schüttler hingegen kommt es zu einer ständigen Durchmischung der Kultur. Neue Xylose aus dem Medium wird an die Zellen herangetragen. Es entsteht kein Konzentrationsgefälle. Somit kommt es nicht zu den verbesserten Wachstumsbedingungen bewirkt durch den geringeren Xylosegehalt. Der Stamm ist nicht in der Lage seine Wachstumsrate zu steigern.

4.5 Optimierung der Verwertung der beiden Pentosezucker

Eine Optimierung der Umsetzung der Pentosezucker durch den rekombinanten Hefestamm wäre von großem Vorteil. Um eine Verbesserung in der Metabolisierung von L-Arabinose und D-Xylose zu erzielen, bieten sich verschiedene Ansatzpunkte an.

Aus mehreren Arbeiten geht hervor, dass sowohl bei L-Arabinose- und auch bei D-Xylose-Verwertung der Transport des Zuckers in die Zelle einen limitierenden Schritt bei der Metabolisierung darstellt (Hamacher *et al.*, 2001; Becker und Boles, 2003).

Es wurden bislang noch keine spezifischen Transporter für die Pentosezucker in *S. cerevisiae* gefunden. Bei der Suche nach Xylosetransportern aus *S. cerevisiae*, *A. thaliana* und *P. stipitis*-Genbanken konnten keine entsprechenden Gene identifiziert werden (Hamacher, 2001). Es zeigte sich aber, dass die Hefe-eigenen Hexosetransporter Hxt4, Hxt5, Hxt7 und Gal2 in der Lage sind, Xylose zu transportieren. Bei Überexpression der Xylose-transportierenden Hexosetransporter in rekombinanten *S. cerevisiae* Stämmen wurde jedoch keine verbesserte Wachstums- sowie keine verbesserte Fermentationsrate von D-Xylose gemessen (Hamacher *et al.*, 2002). Es kann davon ausgegangen werden, dass L-Arabinose über die gleichen Transporter in die Zelle aufgenommen wird. Bekannt war, dass die Hefe-eigene Galaktose-Permease Gal2 in der Lage ist, L-Arabinose zu transportieren (Kuo *et al.*, 1970). Eine zusätzliche Überexpression von *GAL2* führte in dem L-Arabinose verwertenden Hefestamm JBY25-4M zu einem verbesserten Wachstum auf L-Arabinose (Becker und Boles, 2003). Die L-Arabinose-Aufnahme über den Gal2-Transporter konnte somit bestätigt werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Überexpression von *GAL2* die Fermentationsrate steigerte. Wahrscheinlich wird über die *GAL2*-Überexpression unter anaeroben Bedingungen auch eine Steigerung der Ethanolproduktion verursacht. Für eine optimierte Pentoseumsetzung wäre folglich eine Überexpression der Gene für die genannten Transporter von Vorteil. Zusätzliche Modifikationen der Transportergene könnten eine höhere Effektivität und Affinität für die Pentosezucker bewirken.

Um eine verbesserte Fermentationsrate des rekombinanten Hefestammes zu erhalten, könnte dieser unter anaeroben Bedingungen auf die Metabolisierung von Pentosen selektiert werden. Die Selektion würde zuerst auf verbessertes Wachstum und anschließend auf optimale Fermentation der Pentosezucker unter anaeroben Bedingungen stattfinden. In Arbeiten von Kuyper *et al.* (2004) konnte ein rekombinanter *S. cerevisiae* Stamm, welcher das *XylA*-Gen aus *Piromyces* sp. E2 exprimiert, durch Selektion erhalten werden, der in der Lage war, anaerob auf Xylosehaltigem Medium zu wachsen und die Xylose zu Ethanol zu fermentieren. Zur Selektion auf spontane Mutationen für verbessertes Xylose-Wachstum wurde der Stamm in synthetischem Minimalmedium mit Xylose als einziger Kohlenstoffquelle unter aeroben Bedingungen in Schüttelkolben kultiviert. Der Stamm wurde mehrere Male in frisches Medium überführt. Tests zeigten, dass der Stamm nicht in der Lage war unter komplett anaeroben Bedingungen zu wachsen. Zur weiteren Selektion wurde der Stamm unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen im Fermenter angezogen. Nach Verbrauch der

Xylose im Medium wurde die Kultur in frisches Xylose-haltiges Medium überführt. Nach mehreren Wiederholungen sollte der Stamm unter anaeroben Bedingungen im Fermenter angezogen werden. Auch hier wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen umgeimpft. Es konnte nun Wachstum sowie Xyloseverbrauch und Ethanolproduktion unter anaeroben Wachstumsbedingungen gemessen werden.

In Anlehnung an dieses Beispiel könnte der neu konstruierte Stamm auf anaerobes Wachstum selektiert werden. Der Vorteil wäre, dass unter anaeroben Bedingungen Arabinose nicht veratmet werden kann. Somit könnte die Ethanolausbeute gesteigert werden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, war der neu konstruierte Stamm BWY2 trotz funktionell enthaltener Gene für den L-Arabinose sowie den D-Xylose Katabolismus nicht in der Lage, D-Xylose in Flüssigmedium zu verwerten. Ein Ansatz zur Ermöglichung der Metabolisierung von D-Xylose könnte die Überexpression von Genen im Pentosephosphatweg darstellen. In den beiden eingeführten Stoffwechselwegen zur L-Arabinose- und zur D-Xylose-Verwertung entsteht in beiden Fällen Xylulose-5-Phosphat als Produkt. Dieses wird in den Hefe-eigenen Pentosephosphatweg eingeschleust und kann dort weiter metabolisiert werden. Vorstellbar bei einem Co-Verbrauch der beiden Zucker ist ein Engpass bei einem der nachfolgenden Reaktionsschritte im Pentosephosphatweg.

Eine Optimierung der L-Arabinose Verwertung stellt sicherlich die stabile genomische Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus dar. Die daraus resultierenden Vorteile werden in Abschnitt 4.6 bzw. 3.3 diskutiert.

Bei der heterologen Expression von Genen treten in vielen Fällen Probleme auf. Die heterologe Expression von Genen anderer Organismen in Hefe führt oftmals nicht zu funktionellen Enzymen (Moes *et al.*, 1996). Gründe können in einer unterschiedlichen Nutzung der Kodons liegen oder dass das heterologe Gen schwächer exprimiert wird. Auf Proteinebene kann es zu einer mangelnden Funktionalität kommen, da aufgrund falscher Faltung, posttranslationaler Modifikation oder Ausbildung inter- oder intramolekularer Disulfidbrücken es zu einer Instabilität des Proteins führen kann (Sarthy *et al.*, 1987). Die Aktivität der exprimierten Enzyme liegt meistens deutlich unter ihrer nativen Aktivität. Bei dem Versuch durch Sedlak und Ho (2001) die L-Arabinose Isomerase aus *E. coli* in Hefe zu exprimieren, konnte zwar ein funktionelles Enzym synthetisiert werden, doch betrug die Aktivität nur ca. 10% der Aktivität in *E. coli*. Hingegen konnte in den vorangehenden Arbeiten zur Konstruktion des Pentose-

vergärenden Hefestamms JBY25-4M die L-Arabinose Isomerase aus *B. subtilis* aktiv in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Zusätzlich war hier eine geringe Enzymaktivität messbar (Becker und Boles, 2003). Denkbar sind strukturelle Unterschiede zwischen den L-Arabinose Isomerasen aus *E. coli* und *B. subtilis*, welche die unterschiedlichen Aktivitäten in Hefe verursachen. Weitere Schwierigkeiten bei der heterologen Expression von Genen treten durch die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der Enzyme auf. So kann die Aktivität eines Enzyms stark durch den vorherrschenden pH-Wert oder die Temperatur beeinflusst werden. In Arbeiten von Walfridsson (1996) lag das Temperaturoptimum einer heterolog exprimierten Xylose Isomerase aus *T. thermophilus* über dem Wachstumsoptimum seines rekombinanten Hefestammes. Die daraus resultierende geringe Enzymaktivität musste erst durch weitere Arbeiten gesteigert werden (Lönn *et al.*, 2002). Die Optimierung von Enzymen geht jedoch oft mit ihrem Stabilitätsverlust einher. Folglich stellt die heterologe Expression von Stoffwechsel-Genen einen kritischer Punkt bei der Effektivität der Metabolisierung dar. Um eine heterologe Expression von Genen und somit die genannten Nachteile zu umgehen, kann für die Einführung eines neuen Stoffwechselweges versucht werden, endogene Enzyme aus Hefe zu finden und diese zu überexprimieren. Oft sind solche Gene vorhanden, sind aber nicht in ausreichender Form aktiv oder sie stellen nur Teile des Stoffwechselweges dar.

Weiterhin wäre für eine verbesserte Umsetzung der Pentosen die Optimierung der einzelnen Gene der Stoffwechselwege möglich. Wie schon im Fall der L-Ribulokinase aus dem Arabinose Metabolismus gezeigt wurde, war deren Enzymaktivität für den gesamten Stoffwechselweg von entscheidender Rolle (Becker und Boles, 2003). In diesem Fall ermöglichte erst die verringerte Aktivität, verursacht durch eine erniedrigte Substrataffinität des Enzyms, die weitere Metabolisierung der L-Arabinose. Genauso könnte eine veränderte Aktivität der anderen Enzyme des Stoffwechselweges zu einer verbesserten Umsetzung führen. Wahrscheinlich scheint, dass eine Erhöhung der Enzymaktivität der L-Arabinose Isomerase einen positiven Einfluss auf die Metabolisierung von Arabinose haben würde. In Arbeiten von Sedlak und Ho (2001) zeigte sich schon, dass die geringe Aktivität der Isomerase aus *E. coli* eine Arabinose Umsetzung verhinderte. Auch in der Arbeit von Becker und Boles (2003) schien in dem Arabinose-verwertenden Hefestamm nur eine geringe Enzymaktivität der heterolog exprimierten Isomerase aus *B. subtilis* erreichbar zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurde der Arabinose-umsetzende Hefestamm BWY01A-4M genauer analysiert,

welcher die Gene des L-Arabinose Katabolismus auf vier einzelnen Plasmiden enthält. Es wurde unter anderem überprüft, in was für einem Zahlenverhältnis die Plasmide und somit die Arabinose-umsetzenden Gene zueinander vorlagen. Die Tests ergaben, dass der Stamm fast ausschließlich Plasmide enthielt, auf denen die L-Arabinose Isomerase vorhanden war. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine effiziente Arabinose Umsetzung von dem Vorhandensein von einer hohen Isomeraseaktivität abhängig ist. Anhand der Resultate wäre es nun sinnvoll zu versuchen, die Enzymaktivität der L-Arabinose Isomerase zu steigern. Beispiele für eine Optimierung der Enzymeigenschaften sind in der Literatur häufig zu finden. Erfolgreich konnte in mehreren Arbeiten das Temperaturoptimum von Enzymen erniedrigt werden. Bei der 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase aus *T. thermophilus* oder der β -Glykosidase aus *Pyrococcus furiosus* konnte eine gesteigerte Enzymaktivität bei niedrigen Temperaturen erreicht werden (Suzuki *et al.*, 2001; Lebbink *et al.*, 2000). Um die veränderten Enzyme zu erhalten, wurde eine „fehlerhafte PCR“ mit anschließendem „DNA-shuffling“ durchgeführt (Lebbink *et al.*, 2000). Auch konnten die Eigenschaften der zuvor berichteten Xylose Isomerase aus *T. thermophilus* durch Zufalls-PCR-Mutagenese verbessert werden. Ähnliche Methoden könnten zur Steigerung der Enzymaktivität der L-Arabinose Isomerase angewendet werden.

Ein Problem, welches die effiziente Umsetzung der Pentosen zu Ethanol verhindert, ist die Entstehung von Nebenprodukten bei der Zuckerumsetzung. Unter Sauerstofflimitierten oder anaeroben Wachstumsbedingungen kommt es bei dem eingeführten eukaryontischen Stoffwechselweg des Xyloseabbaus zur Produktion von Ethanol, jedoch entsteht als Hauptnebenprodukt in signifikanten Mengen Xylitol (Bruinenberg *et al.*, 1983; Kötter und Ciriacy, 1993; van Dijken und Scheffers, 1986; Wahlbom *et al.*, 2001). In Arbeiten von Träff (2001) konnte durch Deletion der Aldose Reduktase *GRE3* eine Verminderung der Xylitolbildung in einem rekombinanten *S. cerevisiae* Stamm, in welchem die *XI* (Xylose-Isomerase) aus *T. thermophilus* und die endogenen Xylulokinase überexprimiert wurde, um das zwei- bis dreifache erreicht werden. Ein weiteres Beispiel ist die Arbeit von Kyper *et al.* (2004), in der das *GRE3*-Gen in einem rekombinanten *S. cerevisiae* Stamm, in welchem die Xylose-Isomerase aus *Piromyces* sp. E2 exprimiert wurde, deletiert wurde. Der Betrag der Xylitol-Bildung war selbst unter anaeroben Bedingungen vernachlässigbar. Eine Deletion des *GRE3*-Gens würde vermutlich eine höhere Ethanolausbeute in Stamm BWY2 bewirken.

4.6 Biotechnologische Anwendung

In industriellen Prozessen zur Ethanolproduktion aus Lignozellulose ist es wichtig, alle vorhandenen Zucker schnell und mit hoher Effizienz zu fermentieren (Sivers und Zacchi, 1995). Der Einsatz von *S. cerevisiae* als Ethanolproduzent hat viele Vorteile, wie schnelle Zuckerumsetzung, hohe Ethanolbeträge aus Hexosen, hohe Ethanoltoleranz sowie hohe Resistenzen gegen inhibitorische Hydrolysate. Der Hauptnachteil von *S. cerevisiae* ist das Unvermögen der Verwertung von Pentosezucker, die einen signifikanten Anteil der pflanzlichen Biomasse ausmachen.

Für industrielle Fermentationsprozesse wäre ein Stamm mit erweitertem Substratspektrum von großer Bedeutung. Zur Konstruktion eines Hefestammes, der in der Lage ist neben Hexosen auch die Pentosen L-Arabinose und D-Xylose zu verwerten, wurde der Stamm JBY25 mit den essentiellen Genen des L-Arabinose Katabolismus und den Genen für einen Xylosestoffwechselweg transformiert. Der neu konstruierte Stamm BWY2 war jedoch nicht in der Lage, Xylose in Flüssigmedium zu nutzen. Durch Selektion von BWY2 auf optimiertes Wachstum in D-Xylose-haltigem Medium könnte dies eventuell erreicht werden.

Trotzdem bleibt weiterhin das Problem der Kofermentation der Zucker bestehen. In der Industrie angebotene Hydrolysate für Fermentationsprozesse enthalten zum Großteil Hexosen. In rekombinanten *Zymomonas mobilis* Stämmen, welche in der Lage sind Arabinose und Xylose zu fermentieren, werden zwar bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glukose, Arabinose und Xylose die Zucker metabolisiert, sie werden jedoch bevorzugt in der genannten Reihenfolge umgesetzt (Mohagheghi *et al.*, 2002). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glukose (und anderen Hexosen) würde in den rekombinanten Hefestämmen die Pentose-Aufnahme an den Transportproteinen gehemmt werden und die gleichzeitige Metabolisierung somit verhindert.

Für den industriellen Einsatz eines rekombinanten Hefestammes ist es unerlässlich, die Gene der neu eingeführten Stoffwechselwege stabil in das Genom zu integrieren. Unter den vorherrschenden nicht-selektiven Bedingungen würden die zusätzlich eingeführten Eigenschaften, wenn sie nur auf Plasmiden enthalten wären, in kürzester Zeit verloren gehen.

In industriellen Prozessen werden meist optimierte, wenig charakterisierte Hefestämme eingesetzt, welche prototroph, oft diploid oder aneuploid sind. Die in dieser Arbeit verwendeten Laborstämme hingegen sind haploid und besitzen zur genetischen Manipulation Auxotrophie-Marker. Die eingeführten Stoffwechselwege müssten erst in

industrielle Stämme übertragen werden. Diese Übertragung verläuft oft nicht unproblematisch. Die Transformation von Industriestämmen stellt sich oft als schwierig dar. Unter anderem müssten dominante Resistenz-Marker verwendet werden (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzliche Biomasse bietet sich hervorragend als billiges und in großen Mengen verfügbares Ausgangssubstrat für industrielle Fermentationsprozesse an. Dabei könnte z.B. die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zur Herstellung von Bioalkohol eingesetzt werden. *S. cerevisiae* kann jedoch die in großen Mengen in der Biomasse enthaltenen Pentosen D-Xylose und L-Arabinose nicht vergären. Deshalb wäre ein Hefestamm mit entsprechend erweitertem Substratspektrum von großem wirtschaftlichen Interesse. In dieser Arbeit sollte rekombinante Hefestämme konstruiert bzw. optimiert werden, die in der Lage sind D-Xylose und/oder L-Arabinose zu Ethanol zu vergären.

Zunächst wurde ein bereits vorhandener L-Arabinose vergärender Hefestamm unter Einsatz der Methoden der „gerichteten Evolution“ optimiert, L-Arabinose effektiver zu verstoffwechseln. Dies geschah durch repetitive Selektion auf Wachstum mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen. Eine genetische und physiologische Charakterisierung des Stammes ergab, dass dieser sowohl Mutationen im Hefegenom als auch auf den L-Arabinose Stoffwechselweg exprimierenden Plasmiden erworben hatte.

Dieser Stamm exprimierte die für den L-Arabinose Katabolismus notwendigen Enzyme und Transporter von vier verschiedenen Plasmiden. Für den industriellen Einsatz eines rekombinanten Hefestammes ist es jedoch unerlässlich, die Gene des L-Arabinose Katabolismus stabil in das Genom zu integrieren. In dieser Arbeit ist es gelungen, zwei der insgesamt drei essentiellen Gene des Stoffwechselweges in funktioneller Form in den rDNA-Locus von *S. cerevisiae* zu integrieren.

Im letzten Teil der Arbeit konnte erstmals ein Hefestamm konstruiert werden, der sowohl die Gene des Stoffwechselweges für den L-Arabinose- als auch die des Stoffwechselweges für den D-Xylose-Katabolismus exprimiert. Der Stamm war in der Lage auf Nähragarplatten zu wachsen, bei denen L-Arabinose oder/und D-Xylose die einzigen Kohlenstoffquellen darstellten. Wachstumstests mit Flüssigkulturen sowie HPLC-Analysen des Zuckerverbrauchs ergaben jedoch, dass der Hefestamm überraschenderweise nicht in der Lage war, D-Xylose in Flüssigmedien zu verstoffwechseln. Mögliche Erklärungen hierfür werden diskutiert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Amore, R., Wilhelm, M. und Hollenberg, C. P. (1989)

The fermentation of xylose – an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast.

Appl. Microbiol. Biotechnol. **30**:351-357

Banerjee, S., Archana, A. und Satyanarayana, T. (1994)

Xylose metabolism in a thermophilic mould *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* TMD 8.

Curr. Microbiol. **29**:349-352

Barnett, J. A. (1976)

The utilization of sugars by yeasts.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **32**:125-234

Becker, J. und Boles, E. (2003)

A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol.

Appl. Environ. Microbiol. **69**:4144-4150

Becker, J. (2003)

Konstruktion und Charakterisierung eines L-Arabinose fermentierenden *Saccharomyces cerevisiae* Hefestammes.

Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Bergkamp, R.J., Kool, I.M. Geerse, R.H. und Planta, R.J. (1992)

Multiple-copy integration of the alpha-galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonoloba* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis*.

Curr. Genet. **21**:365-370

Birnboim, H.C. und J. Doly (1979)

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1523

Boeke, J.D., F. und G.R. Fink (1984)

A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance.

Mol. Gen. Genet. **197**: 345-346

Breznak, J.A. und Brune, A. (1994)

Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites *Annu.*

Rev. Entomol. **39**:453-487

Bruinenberg, P.M., de Bot, P.H.M., van Dijken, J.P. und Scheffers, W.A. (1983)

The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts.

Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **18**:287-292

Chandrakant, P. und Bisaria, V. S. (1998)

Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol.

Crit. Rev. Biotechnol. **18**:295-331

Claassen, P.A.M., van Lier, J.B., Lopez, A.M., Contreras, E.W.J., van Niel, L., Sijtsma, A.J.M., de Vries, S.S. und Weusthuis, R.A. (1999)

Utilisation of biomass for the supply of energy carriers.

Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**: 741-755

Cox, H., Mead, D., Sudbery, P., Eland, M. und Mannazzu, I. (2000)

Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the *PMAl* promotor.

Yeast **16**:1191-1203

Dien, B. S., Kurtzman, C. P., Saha, B. C. und Bothast, R. J. (1996)

Screening for L-arabinose fermenting yeasts.

Appl. Biochem. Biotechnol. **57-58**:233-242

Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988)

High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.

Nucl. Acids Res. **16**: 6127-6145

Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C.F. und Hahn-Hägerdal, B. (2000)

Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2* and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures.

Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3381-3386

Gietz, R.D. und Woods, R.A. (1994)

High efficiency transformation in yeast.

In: Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches, J.A. Johnston (Ed.).

Oxford University Press pp. 121-134

Güldener, U., S. Heck, T. Fiedler, J. Beinhauer und Hegemann, J.H. (1996)

A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast.

Nucl. Acids Res. **24**: 2519-2524

Güldener U, Heinisch, J., Köhler, G.J., Voss, D. und Hegemann, J.H (2002)

A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast.

Nucl. Acids Research **30**: e23

Hahn-Hägerdal, B., Wahlborn, C.F., Gárdonyi, M., van Zyl, W., Otero, R.R.C. und Jönsson, L.J. (2001)

Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization.

Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **73**:53-84

Hallborn, J. (1995)

Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of genes involved in pentose metabolism.

PhD thesis, Lund University, Schweden.

Hamacher, T. (2001)

Expression und Charakterisierung von Xlosetransportern in *Saccharomyces cerevisiae*.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Hamacher, T., Becker, J., Gárdonyi, M., Hahn-Hägerdal, B. und Boles, E. (2002)

Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transportes and their influence on xylose utilization.

Microbiology **148**:2783-2788.

Hanahan, D. (1985)

Techniques for transformation of *Escherichia coli*.

In: DNA-Cloning I, edited by D. M. Glover, Oxford, *IRL Press*, pp 109-135

Harhangi, H.R. (2003)

Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. Strain E2 follows the bacterial pathway.

Arch Microbiol. **180**:134-141

Ho, N.W.Y., Chen, Z. und Brainard, A.P. (1998)

Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose.

Appl. Environ. Microbiol. **64**:1852-1859

Jeffries, T.W. (1983)

Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungus.

Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **27**: 1-32

Jeffries, T.W. und Shi, N.Q. (1999)

Genetic engineering for improved xylose fermentation in yeast.

Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **65**: 117-161

Johansson, B., Christensson, C., Hobley, T. und Hahn-Hägerdas, B. (2001)

Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate.

Appl. Environ. Microbiol. **67**:4249-4255

Juretzek, T., Le Dall, M., Mauersberger, S., Gaillardin, C., Barth, G.und Nicaud, J., (2001) Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*.

Yeast **18**:97-113

Käppeli, O. (1986)

Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts.
Adv. Microbiol. Physiol. **28**:181-209

Klabunde, J., Diesel, A., Wachk, D., Gellissen, G., Hollenberg, C.P. und Suckow, M. (2002)

Single-step co-integration of multiple expressible heterologous genes into the ribosomal DNA of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **58**:797-805

Kötter, P. und Ciriacy, M. (1993)

Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**:776-783

Kuo, S.C., Christensen, M.C. und Cirillo, V.P. (1970)

Galactose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*.II. Characteristics of galactose uptake and exchange in galactokinaseless cells.
J. Bacteriol. **103**:671-678

Kyper, M. Harhangi, H.R., Stave, A.K., Winkler, A.A., Jetten, M.S., de Laat, W.T., den Ridder, J.J.J., Op den Camp, H.J., van Dijken, J.P. und Pronk, J.T. (2003)

High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?
FEMS Yeast Res. **4**:69-78

Kyper, M., Hartog, M.M.P., Toirkens, M.J., Almering, M.J.H., Winkler, A.A., van Dijken, J.P. und Pronk, J.T. (2004)

Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation.
FEMS Yeast Res. **5**:399-409

Kyper, M., Winkler, A.A., van Dijken, J.P. und Pronk, J.T. (2004)

Miminal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle.
FEMS Yeast Res. **4**:655-664

Lebbink, J.H., Kaper, T., Bron, P., van der Oost, J. und de Vos, W.M. (2000)

Improving low-temperature catalysis in the hyperthermostable *Pyrococcus furiosus* beta-glucosidase CelB by directed evolution.
Biochemistry. **39**:3656-3665

Lönn, A., Gardonyi, M., Zyl, W., van, Hahn-Hägerdal, B., Otero, R.C. (2002)

Cold adaptation of xylose isomerase from *Thermus thermophilus* through random PCR mutagenesis. Gene cloning and protein characterisation.
Eur. J. Biochem. **269**:157-163

Longtine, M.S., McKenzie, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachet, A., Philippsen, P. und Pringle, J.R. (1998)

Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*.
Yeast **14** :953-961

Liang, H. und Gaber, R.F. (1996)

A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of *HXT6*.

Mol. Biol. Cell **7**:1953-1966

Maniatis T, Fritsch, E.F und Sambrook, J. (1982)

Molecular cloning. A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

McMillan, J.D. und Boynton, B.L. (1994)

Arabinose utilization by xylose-fermenting yeasts and fungi.

Appl. Biochem. Biotechnol. **45-46**:569-584

Metzger, M.H. und Hollenberg, C.P. (1994)

Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* transketolase gene and expression in a xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* transformant.

Appl. Microbiol. Biotechnol. **42**:319-325

Moes, C.J., Pretorius, I.C. und van Zyl, W.H. (1996)

Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*.

Biotechnol. Lett. **18**:269-274

Peterson, C.L. und Herskowitz, I. (1992)

Characterization of the yeast *SWI1*, *SWI2* and *SWI3* gene, which encode a global activator of transcription.

Cell **68**:573-583

Petrik, M., Käppeli, O. und Fiechter, A. (1983)

An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short- and long-term regulation.

J.Cen.Micorbiol. **129**:43-49

Rawat, U., Phadthare, S., Deshpande, V. und Rao, M. (1996)

A novel xylose isomerase from *Neurospora crassa*.

Biotechnol. Lett. **18**:1267-1270

Richard, P., Londesborough, J., Putkonen, M., Kalkkinen, N. und Penttilä, M. (2001) Cloning and expressing of a fungal L-arabinitol 4-dehydrogenase gene.

J. Biol. Chem. **276**:40631-40637

Richard, P., Putkonen, M., Vaananen, R., Londesborough, J. und Penttilä, M. (2002) The missing link in the fungal L-arabinose catabolic pathway, identification of the L-xylose reductase gene.

Biochemistry **41**:6432-6437

Rosenberg, S. L. (1980)

Fermenting of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms.

Enzyme Microb. Technol. **2**:185-193

Sarthy A.V., McConaughy B.L., Lobo Z., Sundstrom J.A., Furlong C.E. und Hall B.D. (1987)

Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*.
Appl. Environ. Microbiol. **53**:1996-2000

Schaaff-Gerstenschläger, I. und Miosga, T. (1997)

The pentose phosphate pathway.

In: Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications.
Zimmermann, F.K. und Entian K.-D (Ed.), Kapitel 15. Technomic, Lancaster, PA.

Schaaff-Gerstenschläger, I. und Zimmermann, F.K. (1993)

Pentose-phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of deletion mutants for transketolase, transaldolase and glucose-6-phosphate dehydrogenase.

Schmitz, N. (2003)

Bioethanol in Deutschland, Landwirtschaftsverlag, Münster.

Schründer, J., Gunge, N. und Meinhardt, F. (1996)

Extranuclear expression of the bacterial xylose isomerase (*xylA*) and the UDP-glucose dehydrogenase (*hasB*) genes in yeast with *Kluyveromyces lactis* linear killer plasmids as vectors.

Cur. Microbiol. **33**:323-330

Sedlak, M. und Ho, N.W.Y. (2001)

Expression of *E. coli* araBAD operon encoding enzymes for metabolizing L-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae*.

Enz. Microbiol. **28**:16-24

Sjöström, E. (1981)

Wood chemistry, fundamentals and applications.

New York: Academic Press, pp. 62-65

Suzuki, T., Yasugi, M., Arisaka, F., Yamagishi, A. und Oshima, T. (2001)

Adaptation of a thermophilic enzyme, 3-isopropylmalate dehydrogenase, to low temperatures.

Protein Eng. **14**:85-91

Tamkun, J.W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C. und Kennison, J. A. (1992)

Brahma: a regulation of *Drosophila homeotic* genes structurally related to the yeast transcriptional activator *SNF2/SWI2*.

Cell **68**:561-572

Teusink, B., Walsh, M. C., van Dam, K. und Westerhoff, H. V. (1998a)

The danger of metabolic pathways with turbo design.

Trends Biochem. Sci. **23**:162-169

Tomoyeda, M. und Horitsu, H. (1964)

Pentose metabolism in *Candida utilis* Part I: Xylose isomerase.

Agric. Biol. Chem. **28**:139-143

Wahlbom, C.F., Eliasson, A. und Hahn-Hägerdal, B. (2001)

Intracellular fluxes in a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cultivated anaerobically at different dilution rates and feed concentrations.

Biotechnol. Bioeng. **72**:289-296

Walfridsson, M., Bao, X., Anderlund, M., Lilius, G., Bülow, L. und Hahn-Hägerdal, B. (1996)

Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase.

Appl. Env. Microbiol. **62**:4648-4651

Wartenberg, A. (1989)

Einführung in die Biotechnologie.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Wartmann, T., Rosel H., Kunze, I., Bode, R., Kunze, G. (1998)

AILV1 gene from the yeast *Arxula adenivorans* LS3 – a new selective transformation marker.

Yeast **11**:1017-1025

Witteveen, C.F.B., Busink, R., Van de Vondervoort, P., Dijkema, C., Swar, K. und Visser, J. (1989)

L-arabinose and D-xylose catabolism in *Aspergillus niger*.

J. Gen. Microbiol. **135**:2163-2171

Wyman, C.E. und Goodman, B.J. (1993)

Biotechnology for production of fuels, chemicals, and materials from biomass.

Appl. Biochem. Biotechnol. **39/40**:41-59

van Dijken, J.P. und Schefferts, W.A. (1986)

Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts.

FEMS Microbiol. Rev. **32**:199-224

Vongsuvanglert, V. und Tani, Y. (1988)

Purification and characterisation of xylose isomerase of a methanol yeast, *Candida boidinii*, which is involved in sorbitol production from glucose.

Agric. Biol. Chem. **52**:1818-1824

van Wyk, J.P.H.L (2001)

Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development.

Trends Biotechnol. **19**:172-177

von Sivers, M., und Zacchi, G. 1995.

A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine.

Bioresour. Technol. **51**:43-52

Zimmermann, F. K. (1975)

Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Mutation Res. **31**:71-81

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------|---|
| A | Adenosin |
| Abb. | Abbildung |
| Ade | Adenin |
| Ala | Alanin |
| Arg | Arginin |
| Asn | Asparagin |
| Asp | Aspartat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| °C | Temperatur in Grad Celsius |
| Cys | Cystein |
| ∅ | Durchmesser |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| FOA | Fluororotsäure |
| g | Gramm |
| G | Guanosin |
| G 418 | Geneticin |
| Gln | Glutamin |
| Glu | Glutamat |
| Gly | Glycin |
| h | Stunde(n) |
| His | Histidin |
| Ile | Isoleucin |
| kb | Kilobasen |
| l | Liter |
| LB | <i>Lucia-Broth</i> , Vollmedium für Bakterien |
| Leu | Leucin |
| Lys | Lysin |
| M | Molar |
| Met | Methionin |
| min | Minute(n) |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei 600 nm |
| ORF | „open reading frame“ (offener Leserahmen) |

| | |
|------|---|
| P | Phosphat |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| pH | <i>potentia Hydrogenii (lat.)</i> , Säurestärke |
| Phe | Phenylalanin |
| Pro | Prolin |
| rDNA | ribosomale Desoxyribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| sec | Sekunde(n) |
| Ser | Serin |
| t | Zeit |
| T | Thymidin |
| Tab. | Tabelle |
| Thr | Threonin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan |
| Trp | Tryptophan |
| Tyr | Tyrosin |
| U | „unit“ (Enzymeinheit) |
| Ura | Uracil |
| UV | Ultraviolett |
| v | Geschwindigkeit |
| Val | Valin |
| WT | Wildtyp |
| YEP | Yeast Extract Peptone |
| YNB | Yeast Nitrogen Base |
| z.B. | zum Beispiel |

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung des Projekts.

Herrn Prof. Dr. B. Ludwig möchte ich danken, dass er sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Korreferat zu übernehmen.

Für die Bereitstellung des Plasmids YIpXR/XDH/XK möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Bärbel Hahn-Hägerdal bedanken (Universität Lund, Schweden).

Allen übrigen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie danke ich für die Hilfsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an Carsten und Doreen für die liebe Unterstützung sowohl in fachlichen wie auch privaten Angelegenheiten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Beate Wiedemann

Frankfurt, den 18.05.2005