Caldariomyces fumago als neue Expressionsplattform zur Gewinnung technischer Enzyme

16152 N

Ziel dieses Projektes war die Entwicklung eines Proteinexpressionssystems mit dem filamentösen Pilz *Caldariomyces fumago* (Synonym: *Leptoxyphium fumago*). Die Besonderheit dieses Pilzes ist sein hoch effizienter und sehr spezifischer Sekretionsapparat, der für die Herstellung von Enzymen im industriellen Maßstab geradezu prädestiniert ist.

Mit einem Expressionsvektor, der bereits erfolgreich für eine Überexpression von CPO angewandt worden ist, sind Expressionskonstrukte für GLuc, HRP, MsP2 und PVA hergestellt worden. Für die MsP2- und PVA Expressionsvektoren wurde neben der N-terminalen Signalpeptidsequenz der CPO die jeweilig native Signalpeptidsequenz in die Expressionskassette integriert. Außerdem wurden Konstrukte mit und ohne C-terminales Propeptid der CPO konstruiert. Durch ein Rekombinationsklonierungsverfahren sind die GLuc-, HRP-, MsP2- bzw. PVA-Leserahmen mit den für das N-terminale Signalpeptid bzw. das C-terminale Propeptid kodierenden Bereichen des CPO-Gens verbunden worden. Bei den Expressionsversuchen, die mit jeweils mehreren *C. fumago*-Stämmen durchgeführt wurden, konnte allerdings für keines der oben genannten Enzyme eine Überexpressionsbande im SDS-Gel detektiert werden. Aktivitätstests für HRP und MsP2 Klone lieferten ebenfalls keinerlei Aktivität.

Neben dem für Hygromycin Phosphotransferase (hph) codierenden Gen von *E. coli* unter Kontrolle des trpC-Promotors und Terminators von *A. niger* sollten in diesem Projekt auch andere dominante Selektionsmarker auf ihre Eignung getestet werden. Es wurde zwar gezeigt werden, dass der *C. fumago* Wildtypstamm auf Fructose-Vollmedium Platten bei Zusatz von Zeocin (400 mg/L) oder Nourseothricin (200 µg/mL) kein bzw. nur ein deutlich vermindertes Wachstum aufweist, allerdings konnten die betreffenden Plasmide, die als dominante Selektionsmarker das Nourseothricin Resistenzgen von *Streptomyces noursei* oder das Bleomycin (=Zeocin; Phleomycin) Resistenzgen von *Streptoalloteichus hindustanus* tragen, nicht erfolgreich generiert werden.

Neben den dominanten Selektionsmarkern wurde auch das *URA3*-Gen als weiterer möglicher auxotropher Selektionsmarker untersucht. Mittels UV-Mutagenese wurden 3 Klone erhalten, die das für *ura3*$^-$-Zellen typische Wachstumsmerkmal (Wachstum auf Fructose-Minimalmedium Platten nur bei Zusatz von Uracil) aufweisen. Die Komplementierung dieser möglichen auxotrophen Mutanten war bislang nicht erfolgreich.

Nach der UV-Mutagenese wurden mehrere white-Mutanten isoliert, die sich sehr gut als CPO-Produktionsstämme eignen, da sie das dunkle Pigment nicht mehr bilden. Dadurch wird die Aufarbeitung enorm erleichtert. Außerdem kann man über die Intensität der Rotfärbung der Kultur direkt auf den CPO-Gehalt schließen. Die Stämme ohne das dunkle Pigment produzieren sehr viel früher CPO und könnten somit die Fermentationsdauer bei der CPO-Produktion deutlich verkürzen.

Neben den white-Mutanten wurde ein Klon isoliert, der keine aktive CPO mehr produziert. Eine im SDS-Gel auftretende Bande bei 38 kDa konnte als CPO identifiziert werden und nachfolgende Deglykosylierungsversuche bestätigten die Annahme, dass es sich bei der Proteinbande der CPO$^-$-Mutante um nicht korrekt glykosylierte CPO handelt und dass die Mutation sehr wahrscheinlich die N-Glykosylierung des Proteins beeinträchtigt.

Bearbeitet wurde das Forschungsthema vom 08/09 bis 01/12 von der **DECHEMA e.V., Karl-Winnacker-Institut** (Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt, Tel.: 069/7564-422) unter der Leitung von PD Dr. J. Schrader (Leiter der Forschungsstelle Prof. Dr. K. Wagemann).

--> TIB

Gefördert durch:

Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das IGF-Vorhaben Nr. 16152 N der Forschungsvereinigung DECHEMA, Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V., Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt am Main wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.